

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**RASEMİK BENZOİN ASETATTAN LİPAZ KATALİZLİ
HİDROLİZ TEPKİMESİ İLE ENANTİYOMERİK SAFLIKTA
BENZOİN ÜRETİMİ**

Binnaz LURÇİ

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ANKARA

2007

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

RASEMİK BENZOİN ASETATTAN LİPAZ KATALİZLİ HİDROLİZ TEPKİMESİ İLE ENANTİYOMERİK SAFLIKTA BENZOİN ÜRETİMİ

Binnaz LURÇİ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Emine BAYRAKTAR

Bu çalışmada, farmasotik önemi bulunan ve birçok değerli ilaç etken maddesinin çıkış bileşeni olan optikçe saf benzoinin, rasemik benzoin asetattan hidroliz tepkimesi ile enzimatik olarak üretimi amaçlanmıştır. Enantiyomerik olarak saf α -hidroksi ketonlar, sahip oldukları önemli fonksiyonel gruplar nedeniyle asimetrik sentezin vazgeçilmez yapı taşlarıdır ve biyolojik olarak etkin çeşitli moleküllerin asimetrik sentezinde başlangıç maddeleridir.

Optikçe aktif benzoini yüksek enantiyomerik aşırılıkta üretmek için gerçekleştirilen hidroliz tepkimesini katalizleyen bir grup lipaz denenmiş ve en uygun lipazın *Rhizopus arrhizus* kaynaklı lipaz olduğu görülmüştür (ee(P)=% 51). Tepkime süresinin etkisini görmek amacıyla 48 saatlik deneyler yapılmış ve 4.saatten sonra dönüşümün artmasından dolayı ee(P) düşmüştür. Sıcaklığın (30, 37, 45 ve 50°C) ve karıştırma hızının (150, 200 ve 250 rpm) etkisi incelenmiş ve yaklaşık % 50 dönüşüm için 30°C'de % 51, 250 rpm'de % 67 ee(P) değerine ulaşılmıştır. Ancak, 250 rpm'de çalışma zorluğu olduğu için deneyler 200 rpm'de (ee(P)=% 51) gerçekleştirilmiştir. Yine aynı enzim ile pH etkisi incelenmiş ve pH 6'da en yüksek ee(P) (% 51) değeri elde edilmiştir. Rasemik benzoin asetattın lipaz katalizörlüğünde gerçekleştirilen hidroliz tepkimesini en çok etkileyen üç parametre (substrat derişimi, pH ve enzim miktarı) için RSM ile belirlenen 20 adet deney yapılmış ve üç bağımsız değişkenin enantiyomerik aşırılığa etkisini gösteren denklem çözülerek optimum koşullar belirlenmiştir. Optimum koşullar olarak belirlenen 75 mM substrat derişimi, pH 4.65 ve 75 mg enzim ile deney yapılmış, % 53 enantiyomerik aşırılığa ulaşılmıştır. Ayrıca, rasemik benzoin asetattın hidroliz tepkimesi ile enantiyomerik saflıkta benzoin üretimine mikrodalga etkisi farklı sıcaklıklarda (60, 70, 80 ve 90°C) ve farklı pH'larda (6, 6.3, 6.5, 7) incelenmiş ve 2 dk gibi kısa bir sürede tüm sıcaklıklarda ve pH 6, 6.3 ve 6.5'te yaklaşık % 50 dönüşüm ve % 50 ee(P) değerine ulaşılmıştır.

Lipaz katalizörlüğünde gerçekleştirilen hidroliz tepkimesi ile elde edilen enantiyomerik aşırılığın fazla yükseltilememesinden dolayı optikçe saf benzoin üretimi, *Rhizopus oryzae* mikroorganizması katalizörlüğünde gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. Çoğalan mikroorganizmalar ses ötesi dalgalar kullanılarak parçalanmış ve gerçekleştirilen hidroliz tepkimeleri sonucu ee(P) değeri % 89'a yükseltilmiştir. Mikroorganizma kullanılan deneylerde pH etkisi 20 ve 30 kHz'lik ultrasonik homojenizerler kullanılarak incelenmiştir. 20 kHz'lik homojenizer kullanıldığında pH 6'da % 96 ee(P) değerine ulaşılırken 30 kHz'lik homojenizer kullanıldığında pH 4'te % 89 ee(P) değerine ulaşılmıştır. Tüm tepkimeler sonunda (S)-benzoin elde edilmiştir.

2007, 121 sayfa

Anahtar Kelimeler: Lipaz, optikçe aktif, benzoin, rasemik benzoin asetat, enantiyomerik aşırılık, α -hidroksi keton, hidroliz

ABSTRACT

Master Thesis

PRODUCTION OF ENANTIOMERICALLY PURE BENZOIN WITH LIPASE CATALYZED HYDROLYSIS REACTION FROM RACEMIC BENZOIN ACETATE

Binnaz LURÇI

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemical Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Emine BAYRAKTAR

In this study, the production of optically pure benzoin from rac-benzoin acetate by enzymatic hydrolysis was aimed. It has pharmaceutical importance and is an important structural unit in many drugs. Enantiomerically pure α -hydroxy ketones are building blocks in asymmetric synthesis for their important functional group and important starting materials in the asymmetric synthesis of biologically active compounds.

Different lipase types were used for production of optically active benzoin in high enantiomeric excess (ee) and the lipase from *Rhizopus arrhizus* was found the most agreeable one (ee(P)=51 %). To investigate the effect of reaction time, experiments were carried out for 48 hours. Because of increasing conversion over 50 % after 4 hours, ee value decreased. Because of this reason the next experiments were carried out 4 hours. The effect of temperature (30, 37, 45 ve 50°C) and stirring rate (150, 200 ve 250 rpm) were investigated and the best results were found at 30°C 51 % ee(P), at 250 rpm 67 % ee(P). But the experiments were carried out at 200 rpm (ee(P)= 51 %) because of the difficulty of study at 250 rpm. Also, the effect of pH was investigated with the same enzyme and the highest ee(P) (51 %) was observed at pH 6. Three parameters (concentration of substrate, pH and amount of enzyme) chosen as the most effective parameters, 20 experiments which were determined by Response Surface Methodology (RSM) were carried out. The optimum conditions were substrate concentration 75 mM, pH 4.65 and enzyme quantity 75 mg. 53 % enantiomeric excess was obtained at this conditions. The effect of microwave on the production of enantiomerically pure benzoin with lipase catalyzed hydrolysis reaction was investigated at different temperatures (60, 70, 80 and 90°C) and pH (6, 6.3, 6.5 and 7). 50 % conversion and 50 % ee(P) were achieved at all temperatures and pH value of 6, 6.3, 6.5 in a short time like 2 minutes.

Enantiomeric excess of lipase catalyzed hydrolysis reaction wasn't increased so much. For this reason, enantiomerically pure benzoin production was investigated with *Rhizopus oryzae* fungus. The grown cells were smashed by ultrasound so the cells were homogenized. Enantiomeric excess was increased to 89 % using the homogenized cells in hydrolysis reaction. The effect of pH in experiments with fungus was also investigated by using ultrasonic homogenizer (20 and 30 kHz). 89 % ee(P) was obtained at pH 4 by using 30 kHz ultrasonic homogenizer and 96 % ee(P) was obtained at pH 6 by using 20 kHz ultrasonic homogenizer. (S)-benzoin was obtained in all reactions.

2007, 121 pages

Key words: Lipase, optically active, benzoin, racemic benzoin acetate, enantiomeric excess, α -hydroxy ketone, hydrolysis

TEŞEKKÜR

Yaşamım boyunca desteklerini bir an olsun eksik hissetmediğim, hayatımın en büyük şansları olan annem Aynur ve babam Erol LURÇİ'ye,

Deneylerime başladığım ilk günden itibaren bana her zaman en büyük yardımı sağlayan danışman hocam Doç. Dr. Emine BAYRAKTAR'a, bilgi, deneyim ve önerilerinden yararlandığım Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU'na, güler yüzü ile bana pozitif enerji verdiğine inandığım Doç. Dr. Afife GÜVENÇ'e,

Ondaki o güzel, anlayışlı, fedakar yüreği sonradan gördüğüm, zor günlerimin kurtarıcısı, dostum Pınar BAKIŞ'a,

Her zaman yanımda olduklarını hissettiğim sevgili ablam Fatma YİĞİT ve canım kardeşlerim Adem, Elif ve Safiye'ye çok teşekkür ederim.

Ayrıca, bu yüksek lisans çalışması boyunca çalışmalarına maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a (104M148 no'lu proje) ve Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine (2006.0745050 no'lu proje) çok teşekkür ederim.

Binnaz LURÇİ

Ankara, Temmuz 2007

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	4
2.1 Stereoizomerler	4
2.1.1 Stereoizomerlerin R- ve S- Konfigürasyonları	5
2.1.2 Enantiyomerler, Diastereomerler ve Özellikleri	5
2.2 Kiral Bileşikler İçin Üretim Prosesleri	6
2.3 Enzimler	9
2.3.1 Enzimlerin Adlandırılması	9
2.3.2 Enzim Aktivitesi	11
2.3.3 Enzimlerin Yapıları ve Özellikleri	11
2.4. Lipazlar	12
2.4.1 Lipaz Türleri	14
2.4.2 Lipazların Uygulama Alanları	15
2.5 Rasemazlar	20
2.6 <i>Rhizopus oryzae</i> Mikroorganizması	20
2.7 Enantiyoseçimlilik	21
2.8 α -Hidroksi Ketonlar ve Benzoin	22
2.9 Mikrodalga	25
2.10 Ses Ötesi Dalgalar (Ultrasound)	27
2.10.1 Ses Ötesi Dalgaların Kullanım Alanları	30
2.10.2 Ses Ötesi Dalgaların Kimyasal Tepkimeler Üzerindeki Etkileri	30
2.11 Cevap Yüzey Yöntemi (RSM)	31
2.12 Kaynak Araştırması	35
2.12.1 Aromatik aldehitlerden C-C bağı oluşumu ile α -hidroksi ketonların eldesi	35
2.12.2 α -diketonların indirgenmesi ile α -hidroksi ketonların eldesi	38
2.12.3 Derasemizasyon yöntemleri ile α -hidroksi ketonların eldesi	42
2.12.4 Rasemik α -hidroksi ve α -asetoksi ketonların kinetik rezolüsyonu ile α -hidroksi ketonların eldesi	45
2.12.4.1 α -hidroksi ketonların transesterleşme tepkimesiyle eldesi	45
2.12.4.2 α -hidroksi ketonların hidroliz tepkimesiyle eldesi	50
2.12.5 Mikrodalga etkisi	58
2.12.5.1. Mikrodalga ile ısıtmanın reaksiyon hızı üzerindeki etkisi	58
2.12.5.2 Mikrodalga'nın hız ve enantiyoseçimliliğe etkisi	59
2.12.5.3 Mikrodalga'nın dönüşüme etkisi	62
2.12.6 Ses ötesi dalgaların etkisi	64
3. MATERYAL VE YÖNTEM	68
3.1 Materyal	68
3.1.1 Enzimler	68

3.1.2 Mikroorganizma	68
3.1.3 Kimyasallar	68
3.2 Yöntem	69
3.2.1 Benzoin Asetatın Kimyasal Üretimi	69
3.2.2 Rasemik Benzoin Asetatın Hidrolizi	69
3.2.3 Mikrodalga Deneyleri	70
3.2.4 Aktivite Deneyleri	70
3.2.5 Katı Çoğalma Ortamı	71
3.2.6 Spor Çözeltilisinin Hazırlanışı	71
3.2.7 Sıvı Çoğalma Ortamı	72
3.2.8 Mikroorganizmanın Kullanıldığı Deneyler	72
3.2.9 Ses Ötesi Dalganın (SÖD) Uygulandığı Deneyler	72
3.2.10 HPLC Analizleri	73
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	74
4.1 Rasemik Benzoin Asetatın Lipaz Katalizli Kinetik Rezolüsyonu	74
4.1.1 Enzim Türünün Etkisi	74
4.1.2 Tepkime Süresinin Etkisi	78
4.1.3 pH Etkisi	78
4.1.4 Sıcaklık Etkisi	82
4.1.5 Karıştırma Hızının Etkisi	83
4.1.6 Mikrodalganın Etkisi	87
4.1.7 Cevap Yüzey Yöntemi ile Optimizasyon	91
4.1.7.1 Substrat Derişimi ile pH'ın Enantiyomerik Aşırılığa Etkisi	92
4.1.7.2 Substrat Derişimi ile Enzim Miktarının Enantiyomerik Aşırılığa Etkisi	93
4.1.7.3 pH ile Enzim Miktarının Enantiyomerik Aşırılığa Etkisi	94
4.1.8 Bağımsız Değişkenler İle Bağımlı Değişken Arasındaki Bağntı	95
4.2 Mikroorganizma ile Gerçekleştirilen Deneyler	96
4.2.1 Mikroorganizma ile Gerçekleştirilen Deneylerde Parçalama Türünün Etkisi	96
4.2.2 Mikroorganizma İle Gerçekleştirilen Deneylerde pH Etkisi	100
5. SONUÇLAR	105
KAYNAKLAR	108
EKLER	111
Ek 1 Kullanılan kimyasalların bazı özellikleri	112
Ek 2 Substrat (ras-benzoin asetat) ve ürünlerin ((S) ve (R) benzoin) Kromatogramları	113
Ek 3 Enzim türü etkisinin incelendiği deneylerde zamanla % dönüşüm, %ee(P) ve E'nin değişimi	114
Ek 4 Tepkime süresinin incelendiği deneylerde zamanla % dönüşüm, % ee(P) ve E'nin değişimi	115
Ek 5 pH etkisinin incelendiği deneylerde zamanla % dönüşüm, % ee(P) ve E'nin değişimi	116
Ek 6 Sıcaklık etkisinin incelendiği deneylerde zamanla % dönüşüm, % ee(P) ve E'nin değişimi	117
Ek 7 Karıştırma hızı etkisinin incelendiği deneylerde zamanla % dönüşüm, % ee(P) ve E'nin değişimi	118

Ek 8 Mikrodalga etkisinin incelendiği deneylerde zamanla	
% dönüşüm, % ee(P) ve E'nin değışimi	119
Ek 9 Mekanik homojenizerle gerçekleştirilen deneylerden örnek bir	
Kromatogram	120
ÖZGEÇMİŞ	121

SİMGELER DİZİNİ

C_R	(R) enantiyomerin derişimi
C_{Ro}	(R) enantiyomerin başlangıç derişimi
C_S	(S) enantiyomerin derişimi
C_{So}	(S) enantiyomerin başlangıç derişimi
E	Enantiyomerik oran
ee_p	Ürün için enantiyomerik aşırılık
ee_s	Substrat için enantiyomerik aşırılık
K	Denge sabiti
k_R	(R) enantiyomerin dönüştüğü tepkimenin hız sabiti
k_{ras}	Rasemizasyon tepkimesinin hız sabiti
k_S	(S) enantiyomerin dönüştüğü tepkimenin hız sabiti
x	Dönüşüm
x_1, x_2, x_3	Bağımsız değişkenler
Y	Cevap değişkeni
β_0	Regresyon eşitliğinin bağımsız terimi
β_i	Doğrusal terim
β_{ij}	İç etkileşim terimi
ϵ	Deney hatası

Kısaltmalar

ATCC	American Typ Culture Collection
BAL	Benzaldehit liyaz
BFD	Benzoilformat dekarboksilaz
CBS	Central Bureau voor Schimmelcultures
DKR	Dinamik kinetik rezolüsyon
DMAP	4-Dimetilamino piridin
DMSO	Dimetilsülfoksit
EMD	Elektromagnetik dalgaları
GC	Gaz Kromatografi (Gas Chromatograph)
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografi (High Performance Liquid Chromatography)
IUPAC	Uluslararası Kurumsal ve Uygulamalı Kimya Birliği (International Union of Pure and Applied Chemistry)
İGEME	İhracatı Geliştirme Etüd Merkezi
MVK	Metil vinil keton
NMR	Nükleer Magnetik Rezonans (Nuclear Magnetic Resonance)
NRRL	Northern Regional Research Laboratory
PPL	Porcine Pancreatic Lipase
RSM	Cevap Yüzey Yöntemi (Response Surface Methodology)
SÖD	Ses Ötesi Dalgalar
ThDP	Thiamin difosfat
THF	Tetrahidrofuran
TLC	Tabaka kağıt kromatografisi (Thin Layer Chromatography)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Enzim substrat kompleks oluşumu	4
Şekil 2.2 Stereoizomerlerin R- ve S- konfigürasyonlarının belirlenmesi	6
Şekil 2.3 Enantiyomerik olarak saf bileşiklerin elde edilmesi	7
Şekil 2.4 Stereoseçimli sentez	8
Şekil 2.5 Katalitik kinetik rezolüsyon	8
Şekil 2.6 Dinamik kinetik rezolüsyon	9
Şekil 2.7 <i>Candida rugosa</i> lipazı	14
Şekil 2.8 <i>Rhizopus oryzae</i> kültürü	21
Şekil 2.9 Rasemik benzoin asetatın lipaz katalizli hidroliz tepkimesi	24
Şekil 2.10 Mikrodalganın spektrumdaki yeri	25
Şekil 2.11 Mikrodalga ile ısıtma ve geleneksel ısıtmada sıcaklık bölgelerinin Karşılaştırılması	27
Şekil 2.12 Ses ötesi dalgaların yansıması, kırılması ve saçılması A. Geliş açısı kritik açıdan büyükse gelen ışın demeti yansıtılır. B. Gelen ışınının bir kısmı yansıtılır, kalanı kırılır ve yoluna devam eder. Geçen ışın demeti kısmen saçılır. C. Işın demeti yüzeye dik olarak gelirse yansıyan ışınların çoğu, dönüştürücüye işaret güçlendirici olarak geri döner.	29
Şekil 2.13 Aromatik aldehitlerden benzoin oluşumu	35
Şekil 2.14 Benzaldehitin BAL katalizörlüğündeki tepkimesi	37
Şekil 2.15 Rasemik benzoinin BAL katalizörlüğündeki tepkimesi	38
Şekil 2.16 (R)-benzoinin BAL katalizörlüğü ve asetaldehit varlığındaki tepkimesi	38
Şekil 2.17 Benzilin benzoin ve hidrobenzoine, benzoinin de hidrobenzoine indirgenmesi	39
Şekil 2.18 α -diketonların indirgenme tepkimesi	41
Şekil 2.19 Benzoinin derasemizasyonu	42
Şekil 2.20 Derasemizasyon mekanizması	43
Şekil 2.21 Rasemik α -hidroksi asit esterlerinin <i>C. Parapsilosis</i> (ATCC 7330) hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen derasemizasyon tepkimesi	44
Şekil 2.22 α -hidroksi ketonların kinetik rezolüsyonu	46
Şekil 2.23 Benzoinin lipaz katalizli kinetik rezolüsyonunu	47
Şekil 2.24 (S)-benzoin asetatın hidroliz tepkimesi	48
Şekil 2.25 Rasemik (1)'in diizopropil eter içindeki lipaz katalizli transesterleşmesi	49
Şekil 2.26 Aromatik ketonların mangan (III) asetat ile oksidasyonu ve asetoksi ketonların <i>Rhizopus oryzae</i> yardımıyla gerçekleştirdiği seçimli hidroliz tepkimesi	51
Şekil 2.27 Asetoksi keton	52
Şekil 2.28 (R)-2-hidroksipropiyofenonların kemoenzimatik sentezi	54
Şekil 2.29 Ketonlarının mangan (III) asetat ile oksidasyonu ve asetoksi ketonların enantiyoseçimli hidroliz tepkimeleri	55
Şekil 2.30 Metoksi ketonların enantiyoseçimli transesterleşmesi	57
Şekil 2.31 Bütanol ve etil bütirat arasındaki lipaz katalizli transesterleşme tepkimesi	58

Şekil 2.32 1,2,3,4-tetrahidro-1-naftol'ün lipaz katalizli mikrodalga ışınlam ile açılması	60
Şekil 2.33 1-indanol'ün lipaz katalizli mikrodalga ışınlam ile açılması	61
Şekil 2.34 1-indanol'ün lipaz katalizli mikrodalga ışınlam ile açılması	62
Şekil 2.35 Metil asetoasetat'ın <i>n</i> -bütanol'a mol oranının ve mikrodalganın dönüşüme etkisi	64
Şekil 3.1 Deneylerde kullanılan Biotage Initiator mikrodalga sistemi	70
Şekil 3.2 Deneylerde kullanılan parçalayıcılar (a) Cole Parmer Ultrasonic Homogenizer (b) Hielscher Ultrasound Technology UP100H (c) Micra D-9 Mekanik Homojenizer	73
Şekil 4.1 Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde enzim kaynağının zamanla ee(P) üzerine etkisi (Enzim=50 mg, Substrat=5.1 g/L, V=5 ml, Sıcaklık=30 °C, Karıştırma hızı=200 rpm, pH= 6)	75
Şekil 4.2 Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde enzim kaynağının zamanla E üzerine etkisi (Enzim=50 mg, Substrat=5.1 g/L, V=5 ml, Sıcaklık=30 °C, Karıştırma hızı=200 rpm, pH= 6)	75
Şekil 4.3 Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde ee(P) üzerine enzim kaynağının etkisi (Enzim=50 mg, Substrat=5.1 g/L, V=5 ml, Sıcaklık=30 °C, Karıştırma hızı=200 rpm, pH= 6)	77
Şekil 4.4 Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde E üzerine enzim kaynağının etkisi (Enzim=50 mg, Substrat=5.1 g/L, V=5 ml, Sıcaklık=30 °C, Karıştırma hızı=200 rpm, pH= 6)	77
Şekil 4.5 Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde ee(P) üzerine tepkime süresinin etkisi (Enzim=50 mg, Substrat=5.1 g/L, V=5 ml, Sıcaklık=30 °C, Karıştırma hızı=200 rpm, pH= 6)	78
Şekil 4.6 Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde pH'nın zamanla ee(P) üzerine etkisi (Enzim=50 mg, Substrat=5.1 g/L, V=5ml, Sıcaklık=30 °C, Karıştırma hızı=200 rpm)	79
Şekil 4.7 Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde pH'nın zamanla E üzerine etkisi (Enzim=50 mg, Substrat=5.1 g/L, V=5ml, Sıcaklık=30 °C, Karıştırma hızı=200 rpm)	80
Şekil 4.8 Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde ee(P) üzerine pH'nın etkisi (Enzim=50 mg, Substrat=5.1 g/L, V=5ml, Sıcaklık=30 °C, Karıştırma hızı=200 rpm)	81
Şekil 4.9 Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde E üzerine pH'nın etkisi (Enzim=50 mg, Substrat=5.1 g/L, V=5ml, Sıcaklık=30 °C, Karıştırma hızı=200 rpm)	81

Şekil 4.10 Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde sıcaklığın zamanla ee(P) üzerine etkisi (Enzim=50 mg, Substrat=5.1 g/L, V=5ml, pH=6, Karıştırma hızı=200 rpm)	82
Şekil 4.11 Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde sıcaklığın zamanla E üzerine etkisi (Enzim=50 mg, Substrat=5.1 g/L, V=5ml, pH=6, Karıştırma hızı=200 rpm)	83
Şekil 4.12 Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde karıştırma hızının zamanla ee(P) üzerine etkisi (Enzim=50 mg, Substrat=5.1 g/L, V=5ml, pH=6, Sıcaklık=30°C)	84
Şekil 4.13 Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde karıştırma hızının zamanla E üzerine etkisi (Enzim=50 mg, Substrat=5.1 g/L, V=5ml, pH=6, Sıcaklık=30°C)	85
Şekil 4.14 Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde ee(P) üzerine karıştırma hızının etkisi (Enzim=50 mg, Substrat=5,1 g/L, V=5ml, pH=6, Sıcaklık=30°C)	86
Şekil 4.15 Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde E üzerine karıştırma hızının etkisi (Enzim=50 mg, Substrat=5,1 g/L, V=5ml, pH=6, Sıcaklık=30°C)	86
Şekil 4.16 Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile farklı pH'larda optikçe saf benzoin üretiminde ee(P) üzerine mikrodalganın etkisi (Enzim=50 mg, V=5ml, Substrat=5,1 g/L, T=60°C)	88
Şekil 4.17 Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile farklı pH'larda optikçe saf benzoin üretiminde E üzerine mikrodalganın etkisi (Enzim=50 mg, V=5ml, Substrat=5,1 g/L, T=60°C)	89
Şekil 4.18 Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile farklı sıcaklıklarda optikçe saf benzoin üretiminde ee(P) üzerine mikrodalganın etkisi (Enzim=50 mg, V=5ml, Substrat=5,1 g/L, pH=6)	90
Şekil 4.19 Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile farklı sıcaklıklarda optikçe saf benzoin üretiminde E üzerine mikrodalganın etkisi (Enzim=50 mg, V=5ml, Substrat=5,1 g/L, pH=6)	90
Şekil 4.20 Enantiyomerik aşırılık değerinin substrat derişimi ile pH ile değişimi (Enzim=50 mg, T=30°C, N=200 rpm, V=5 ml)	92
Şekil 4.21 Enantiyomerik aşırılık değerinin substrat derişimi ve enzim miktarı ile değişimi (pH=6.3, T=30°C, N=200 rpm, V=5 ml)	93
Şekil 4.22 Enantiyomerik aşırılık değerinin pH ve enzim miktarı ile değişimi (Substrat=50 mM, T=30°C, N=200 rpm, V=5 ml)	94
Şekil 4.23 <i>Rhizopus oryzae</i> (CBS 111718) mikroorganizması varlığında gerçekleştirilen enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde parçalama türünün ee(P) üzerine etkisi (Substrat=5.1 g/L, pH:ayarsız, V=5ml, T=30°C)	97
Şekil 4.24 <i>Rhizopus oryzae</i> (CBS 111718) mikroorganizması varlığında gerçekleştirilen enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde parçalama türünün dönüşüm üzerine etkisi (Substrat=5.1 g/L, pH:ayarsız, V=5ml, T=30°C)	98

Şekil 4.25 <i>Rhizopus oryzae</i> (CBS 111718) mikroorganizması varlığında gerçekleştirilen enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde 7. gün sonunda parçalama türünün ee(P) üzerine etkisi (Substrat=5.1 g/L, V=5ml, pH:ayarsız, T=30°C)	100
Şekil 4.26 <i>Rhizopus oryzae</i> (CBS 111718) mikroorganizması varlığında gerçekleştirilen enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde üreme ortamı pH'ının ee(P) üzerine etkisi (Substrat=5.1 g/L, V=5ml, T=30°C, parçalama türü=30 kHz'lik ultrasonik homojenizer)	101
Şekil 4.27 <i>Rhizopus oryzae</i> (CBS 111718) mikroorganizması varlığında gerçekleştirilen enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde üreme ortamı pH'ının dönüşüm üzerine etkisi (Substrat=5.1 g/L, V=5ml, T=30°C, parçalama türü=30 kHz'lik ultrasonik homojenizer)	102
Şekil 4.28 <i>Rhizopus oryzae</i> (CBS 111718) mikroorganizması varlığında gerçekleştirilen enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde üreme ortamı pH'ının ee(P) üzerine etkisi (Substrat=5.1 g/L, V=5ml, T=30°C, parçalama türü=20 kHz'lik ultrasonik homojenizer)	103
Şekil 4.29 <i>Rhizopus oryzae</i> (CBS 111718) mikroorganizması varlığında gerçekleştirilen enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde üreme ortamı pH'ının ee(P) üzerine etkisi (Substrat=5.1 g/L, V=5ml, T=30°C, parçalama türü=20 kHz'lik ultrasonik homojenizer)	103

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Enzimlerin sınıflandırılması	10
Çizelge 2.2 Türkiye'nin enzim ithal ettiği ülkeler ve ithal edilen enzim miktarları	16
Çizelge 2.3 Türkiye'nin enzim ihraç ettiği ülkeler ve ihraç edilen enzim miktarları	17
Çizelge 2.4 Kullanılan substrat ve oluşan ürünlerin bazı özellikleri	23
Çizelge 2.5 Farklı sayıdaki değişkenler için α ve n_0 değerleri	33
Çizelge 2.6 Kullanılan modelin ANOVA testi ile istatistiksel değerlendirilmesi	34
Çizelge 2.7 BFD katalizli enantiyoseçimli benzoin eldesi	36
Çizelge 2.8 Benzilin indirgenmesi	40
Çizelge 2.9 Benzilin hidrobenzoine biyodönüşümü	41
Çizelge 2.10 (RS)- 2-hidroksi-4-fenilbütanoik asitin etil esterinin derasemizasyonunda ee'nin zamanla değişimi	44
Çizelge 2.11 α -hidroksi asit esterlerinin <i>C. Parapsilosis</i> (ATCC 7330) ile derasemizasyonu	45
Çizelge 2.12 Rasemik keto alkollerin 1-4 lipaz katalizli kinetik rezolüsyonu	47
Çizelge 2.13 Rasemik benzoinin kinetik rezolüsyonu	48
Çizelge 2.14 (1)'in, çeşitli açıl vericiler kullanılarak yapılan lipaz katalizli transesterleşmesi	50
Çizelge 2.15 α -asetoksi ketonlar ve hidroliz sonucu elde edilen α -hidroksi ketonlar	53
Çizelge 2.16 Esterlerin mikroorganizma katalizli hidrolizi	55
Çizelge 2.17 3-metoksi-4-metil-2-oksosiklohex-3-enyl asetatın (ras-3a) toluendeki enzimatik hidrolizi	56
Çizelge 2.18 3-metoksi-4,6,6-trimetil-2- oksosiklohex-3-enyl asetatın (ras-3b) enzimatik hidrolizi	57
Çizelge 2.19 6-hidroksi-2-metoksi-3,5,5-trimetilsiklohex-2-en-1-one (ras-4b)'ın transesterleşmesi	58
Çizelge 2.20 Lipaz katalizli transesterleşme reaksiyonunda farklı sıcaklık ve su aktivitelerinde konvansiyonel ısıtma ve mikrodalga destekli ısıtmanın hız üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması	59
Çizelge 2.21 (ras)-1,2,3,4-Tetrahidro-1.Naftol'ün lipaz katalizli açillenme tepkimesinde mikrodalga'nın tepkime hızı ve enantiyoseçimlilik üzerindeki etkisi	60
Çizelge 2.22 1-indanol'ün lipaz katalizli açillenme tepkimesinde mikrodalga'nın tepkime hızı ve enantiyoseçimliliğe etkisi	61
Çizelge 2.23 Metil asetoasetat'ın enzim katalizli (Novozym 435) transesterleşme tepkimesinde dönüşüm üzerinde enzim katalizi ve mikrodalga'nın birlikte etkisi	63
Çizelge 2.24 Etil piruvatın farklı platin katalizörlerle normal koşullar ve ses ötesi dalgalarla enantiyoseçimli hidrojenasyonu	65
Çizelge 2.25 Başlangıç hidrojenasyon hızı ve enantiyoseçimliliğe, Pt/Al ₂ O ₃ katalizörüne uygulanan önışlemin etkisi (% 50 dönüşümdeki ee değeri)	66

Çizelge 2.26 Başlangıç hidrojenasyon hızı ve enantiyoseçimliliğe, Pt/SF ve Pt/Al ₂ O ₃ katalizörlüğünde, kullanılan çözücülerin etkisi (% 15 dönüşümdeki ee değeri)	66
Çizelge 3.1 <i>Rhizopus oryzae</i> (CBS 111718) için malt ekstrakt agar (MEA) ortamı	71
Çizelge 3.2 <i>Rhizopus oryzae</i> (CBS 111718) için sıvı çoğalma ortamı	72
Çizelge 3.3 HPLC analiz koşulları	73
Çizelge 4.1 Box-Wilson merkezi kompozit tasarımı ile belirlenen 20 adet deneyin bağımsız değişkenlerin değerleri ve cevabın gerçek değeri	91
Çizelge 4.2 Enantiyomerik saflıkta benzoïn üretiminin optimizasyonunda kullanılan modelin ANOVA (varyans analizleri) testi ve en küçük kareler yöntemini temel alarak Design-Expert programına hesaplatılan model katsayıları ve istatistiksel hesaplamaları	95

1. GİRİŞ

İlaçlar, kimyasal yöntemlerle sentezlendiğinde genellikle rasemik karışım şeklindedir. Rasemik karışım, maddenin iki farklı enantiyomerini eşit miktarda içermektedir. Enantiyomerler, ayna görüntüsü üst üste çakıştırılamayan kiral moleküllerdir. Enantiyomerlerin kiral özellikleri dışındaki erime noktaları, kaynama noktaları, kiral olmayan çözücülerdeki çözünürlükleri gibi özellikleri aynıdır. Ancak düzlem polarize ışığı çevirme yönleri farklıdır. Bu durum, enantiyomerlerin biyolojik etkilerinin de farklı olmasına neden olmaktadır. Genel olarak enantiyomerlerden yalnızca bir tanesi biyolojik olarak aktiftir ya da farmakolojik açıdan ilgi görür. İstenmeyen enantiyomer safsızlık olarak nitelendirilir, yan etki ve toksik etki gösterebilir ya da diğer enantiyomerin etkisini azaltacak yönde etki gösterebilir. İlaç etken maddesinde istenmeyen enantiyomerin % 0.1 seviyesine düşürülmesi istenir. Bu nedenle de bu enantiyomerlerin ayrılması farmakolojik açıdan büyük öneme sahiptir.

Optikçe aktif saf enantiyomerler hedefe spesifiktirler ve rasemik karışımlardan daha az yan etkiye sahiptirler. Tek enantiyomerli ilaç satışları dünya çapında sürekli olarak büyümektedir.

Biyokatalizörlerin gerçekleştirdiği tepkimeler çevre için daha az zararlıdır. İlmli koşullarda tepkimeleri gerçekleştirdiklerinden dolayı bozunma, izomerizasyon ve rasemizasyon gibi istenmeyen yan tepkimeler önlenir. Biyokatalizörler, sayısız tepkimeleri katalizleyebilirler ve biyokatalizörlerin stereoseçimlilikleri yüksektir. Bu nedenlerle optikçe saf ilaçların elde edilmesi için katalizör olarak ticari saf enzimler veya enzim kaynağı olan mikroorganizmaların kullanımı giderek önem kazanmaktadır.

Enantiyomerik olarak saf α -hidroksi ketonlar, sahip oldukları önemli fonksiyonel gruplar nedeniyle asimetrik sentezin vazgeçilmez yapı taşlarıdır ve biyolojik olarak etkin çeşitli moleküllerin asimetrik sentezinde başlangıç maddeleridir. Endüstriyel açıdan önemli olan aerolik asit antibiyotiklerin, anti-depresyon, anti-bakteriyel, anti-virütik, potasyum kanal açıcıları ve çeşitli kalp ilaçlarının ve doğal ürünlerin sentezinde kullanılan kiral alkollerin üretiminde kullanılırlar.

Demir *et al.* (1998), çalışmalarında farklı aril ve alkil gruplarına sahip aromatik asetoksi ketonların *Rhizopus oryzae* (NRRL 395) mikroorganizması yardımıyla enantiyoseçimli hidrolizi sonucu α -hidroksi ketonların sentezini incelenmiştir. Enantiyomerik aşırılık (ee) değeri ketona bağlı alkil gruplarına göre farklılık gösterdiği gözlenmiştir. Aril ve alkil gruplarının büyüklüklerinde farklılık gözlenen alkollerde yüksek ee'ler (% 93-96) bulunmuştur. Tepkime sonucunda yüksek enantiyomerik aşırılıkta (*R*)-hidroksi keton üretmişlerdir.

Demir *et al.* (2001b), bir başka çalışmalarında propiyofenon türevlerinden yola çıkılarak farmakolojik önemi olan (*R*)-2-hidroksipropiyofenonların kemoenzimatik sentezini incelemişlerdir. Hidroliz tepkimesinin enantiyoseçimliliğini etkileyen enzim kaynağı incelenmiş ve *Rhizopus oryzae* mikroorganizması ile gerçekleştirilen tepkimelerde en iyi sonuçlar elde edilmiştir (ee=%92-99). Tepkimeler pH=6.0-6.5 olan ortamlarda, çözücü olarak DMSO varlığında, 30 °C'de gerçekleştirilmiştir.

Yine Demir *et al.* (2006), çalışmalarına α -hidroksi ketonlardan, farmakolojik olarak önemli olan α -asetoksi ve α -hidroksi- α -metoksi siklik ketonların her iki enantiyomerinin kemoenzimatik sentezini incelemişlerdir. 1,2-diketonların mangan (III) asetat ile asetillenmesini izleyen asetoksi grupların lipaz katalizli hidrolizi ile yüksek enantiyomerik aşırılık değerinde (> % 99) hidroksi ketonlar ve asetoksi ketonlar elde edilmiştir.

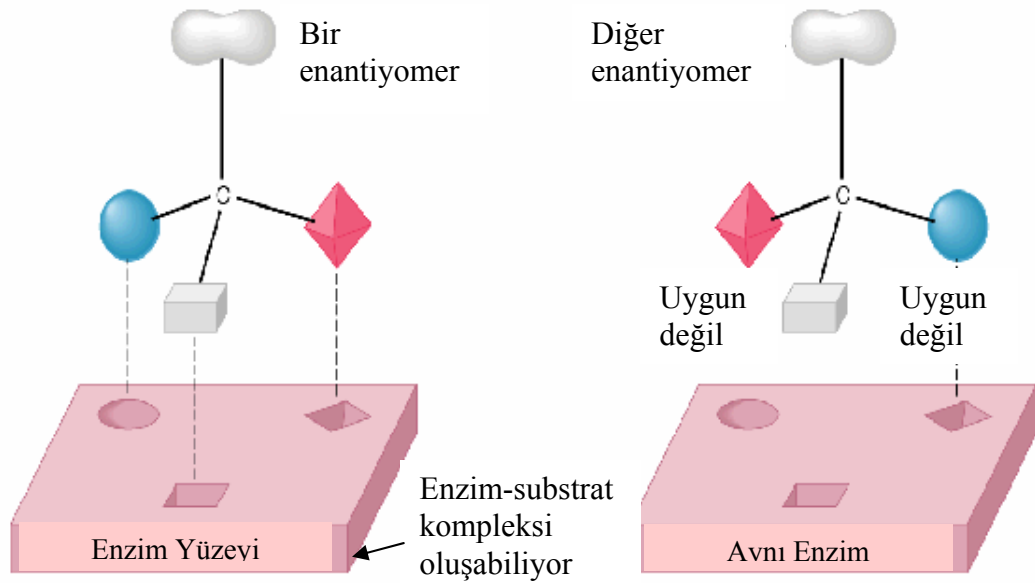
Bu çalışmada, farmasotik önemi bulunan ve birçok değerli ilaç etken maddesinin çıkış bileşeni olan optikçe saf benzoinin, rasemik benzoin asetattan hidroliz tepkimesi ile enzimatik olarak üretilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda ilk olarak hidroliz tepkimesine enzim türü, pH, sıcaklık, karıştırma hızı ve mikrodalga gibi değişkenlerin etkisini inceleyerek en yüksek enantiyomerik aşırılığı (% ee) verecek en uygun kinetik rezolüsyon koşulları belirlenmiştir. En etkin parametrelerin belirlenmesi için yapılan bu ön çalışmalar sonucunda substrat derişimi, pH ve enzim miktarı olmak üzere 3 farklı parametre için cevap yüzey yöntemi (Response Surface Methodology-RSM) kullanılarak kinetik rezolüsyon için sistematik inceleme yapılmıştır. Ayrıca, enantiyomerik aşırılık değerini daha fazla yükseltebilmek için hidroliz tepkimeleri,

enzim kaynağı olarak *Rhizopus oryzae* (CBS 111718) mikroorganizması varlığında gerçekleştirilmiştir. Mikroorganizma varlığında gerçekleştirilen deneylerde ses ötesi dalgaların etkisi de incelenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Stereoizomerler

İzomerler, aynı molekül formülüne sahip ancak farklı olan bileşiklerdir. Yapısal ve stereoizomerler olarak iki grupta incelenebilirler. *Yapısal izomerler* aynı molekül formülüne sahip ancak atom ya da atom gruplarının bağlantıları farklı olan bileşiklerdir. Bu tür izomerlik gösteren bileşiklerin yapıları ve fiziksel özellikleri birbirinden tamamen farklıdır. *Stereoizomerler* ise aynı molekül formülüne sahip atom ya da atom gruplarının bağlantıları aynı ancak uzaydaki dizilişlerinin farklı olduğu bileşiklerdir. Stereoizomerler de enantiyomerler ve diastereomerler olarak iki sınıfa ayrılırlar. *Enantiyomerler*, birbirinin ayna görüntüsü olan stereoizomerlerdir (Şekil 2.1). *Diastereomerler*, birbirinin ayna görüntüsü olmayan stereoizomerlerdir.



Şekil 2.1 Enzim substrat kompleks oluşumu

Stereoizomerlerde bir tetrahedral atoma birbirinden farklı dört atom ya da atom grubu bağlıdır ve bu tetrahedral atom *asimetrik* ya da *stereomerkez* atom olarak adlandırılmaktadır. Stereoizomerlerin tümü kiral özellik göstermeyebilir. Bu nedenle, bir molekülün kiral olup olmadığı ayna görüntüsü incelenerek bulunabilir. Bir molekül,

ayna görüntüsü olan molekül ile üst üste çakışmıyorsa *kiraldir*, çakışıyorsa *akiraldir* yani iki molekül aslında aynıdır.

2.1.1 Stereoizomerlerin R- ve S- konfigürasyonları

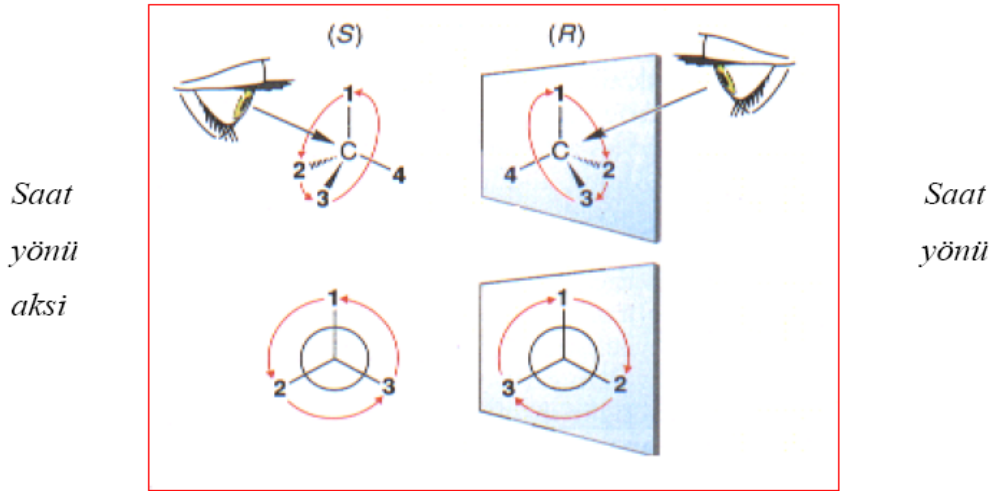
Chan-Ingold-Prelog sistemi (*R-S* sistemi), üç kimyacının geliştirdiği ve stereoizomerlerin adlandırılmasında kullanılan bir sistemdir. *R-S* sistemi, IUPAC sistemi ile birlikte kullanılan bir konfigürasyon belirleme yöntemidir.

Bu yöntemde, stereomerkez atoma bağlı dört farklı atom ya da atom grubunun atom numaraları büyükten küçüğe doğru olacak şekilde numaralandırılır. Stereomerkez atoma bağlı gruplar içerisinde çift bağlı atomlar var ise bu atomlara çift bağlı olan atomların iki ya da üç kez bağlı olduğu düşünülerek işlemler yapılır.

Organik bileşiklerde, genelde stereomerkez atoma bağlı atomlar karbon atomlarıdır ve bu durumda da bir sonraki atomlara bakılarak atom grupları numaralandırılmaktadır. Numaralandırma işlemi bittikten sonra stereomerkez atoma, en küçük atom ya da atom grubu simetrisine gelecek şekilde bakılır ve diğer üç atomun ya da atom grubunun uzaydaki sıralanışı belirlenir. Molekülün bu atom ya da atom gruplarının sıralanışı, saat yönünü gösteriyorsa molekül *R*- (*R*: rectus, Latince “sağ” anlamında) konfigürasyonlu, saat yönünün tersini gösteriyorsa *S*- (*S*: sinister, Latince “sol” anlamında) konfigürasyonlu olarak nitelendirilmektedir (Şekil 2.2).

2.1.2 Enantiyomerler, diastereomerler ve özellikleri

Enantiyomerler, birbirinin ayna görüntüsü olan stereoizomerlerdir. Bu enantiyomerler birbirlerinden (*R*) ve (*S*) şeklinde sembollendirilerek ayrılır. Enantiyomerlerin kaynama noktası, yoğunluk, erime noktası, çözünürlükleri gibi fiziksel özellikleri aynıdır. Enantiyomerik bileşikler aynı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olmalarına rağmen çok farklı biyolojik etkiler göstermektedirler. Farmasotik sanayinde büyük önem taşıyan kiral maddelerin farklı enantiyomerleri, ilaçlar için farklı etkilerde bulunmaktadır. Bir



Şekil 2.2 Stereoizomerlerin R- ve S- konfigürasyonlarının belirlenmesi

enantiyomer biyolojik olarak aktiftir ve farmakolojik açıdan ilgi görür. Enantiyomerlerin farklılıkları sadece kiral çözücü, başka bir kiral molekül veya polarize ışığın var olduğu kiral bir çevre içerisinde gözlenebilmektedir. Enantiyomerler arasındaki tek fark, çevirme açılarının yönü ve biyolojik etkilerinin farklı olmasıdır. Enantiyomerler kristalizasyon, ekstraksiyon, distilasyon gibi fiziksel metodlarla ayrılamazlar. Bir kiral bileşiğin enantiyomerlerinden eşit miktarda içeren bir karışıma ise *rasemik karışım* ya da *rasemat* adı verilir ve bu rasematlar optikçe aktiflik göstermezler yani enantiyomerlerin herbirinin polarize ışık düzlemini eşit ancak zıt yönlerde değiştirmesi nedeniyle polarize ışığın düzlemindeki net değişim sıfır olacaktır.

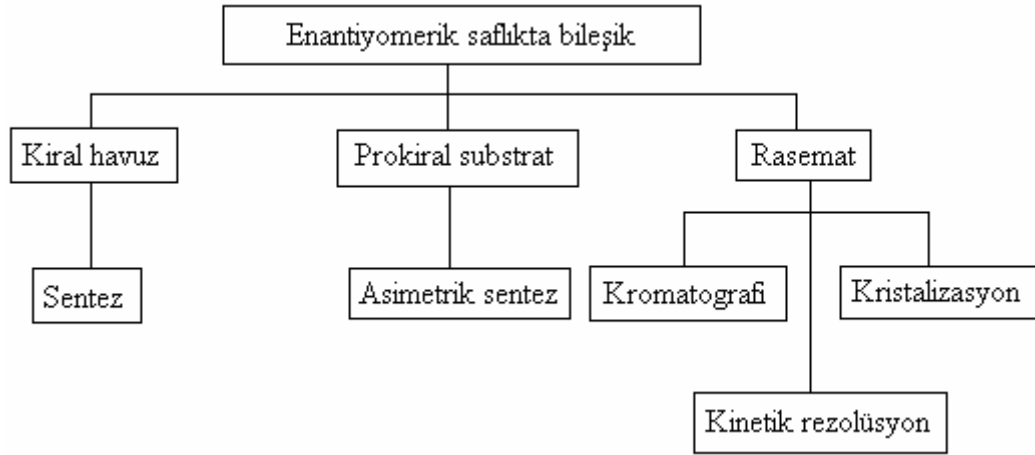
Diastereomerler, birbirinin ayna görüntüsü olmayan stereoizomerlerdir. Aynı açık formüle sahip olmalarına rağmen enantiyomerlerin tersine, diastereomerlerin çoğunun fiziksel özellikleri (erime noktası, kaynama noktası, yoğunluk v.b.) farklılık gösterir. Diastereomerler kristalizasyon, distilasyon gibi fiziksel yöntemlerle ayrılabilirler.

2.2 Kiral Bileşikler İçin Üretim Prosesleri

Kiral bileşiklerin canlı sistemlerde farklı biyolojik aktiviteler göstermesi nedeniyle enantiyomerik saflıkta kullanımları tercih edilmektedir. Bu bileşiklerin üretim prosesleri

iki ana başlık altında toplanabilir. Birincisi, tepkime ortamında kiral bir etkinin bulunmadığı koşullarda üretilen rasemik karışımın enantiyomerlerinin ayrıldığı *rezolüsyon yöntemleri*; ikincisi ise tepkime ortamında bir bileşiğin ya da kimyasal/biyokimyasal katalizörün kiral etki kaynağı olduğu koşullarda yalnız bir enantiyomerin ya da birinin diğerine göre daha fazla oluştuğu *asimetrik sentezler*dir.

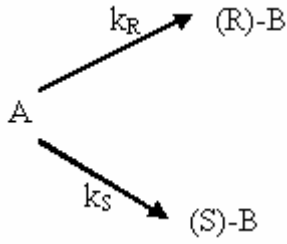
Genel olarak, enantiyomerik saflıkta bileşikler elde etmek kullanılan başlangıç noktasına göre üç farklı yöntem bulunmaktadır. Bunlar; kiral substratlar, prokiral substratlar veya rasemik karışımlardır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 Enantiyomerik olarak saf bileşiklerin elde edilmesi

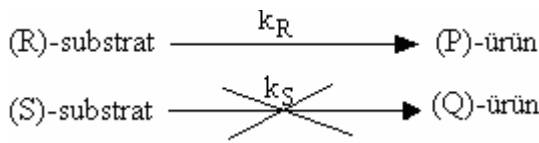
Kiral substratlardan yola çıkılarak stereoseçimli sentez metodu, kiral havuz bileşikleri adı verilen kiral başlangıç substratı ve kimyasal ya da biyolojik kiral ayırıcı ve kiral çevre kullanılarak akiral bileşiklerle gerçekleştirilebilmektedir (Şekil 2.4).

Asimetrik sentezdeki etkileyici gelişmelere rağmen, endüstriyel alanda tek bir enantiyomerin elde edilmesi için kullanılan en yaygın üretim metodu, rasematların rezolüsyonudur.



Şekil 2.4 Stereoseçimli sentez

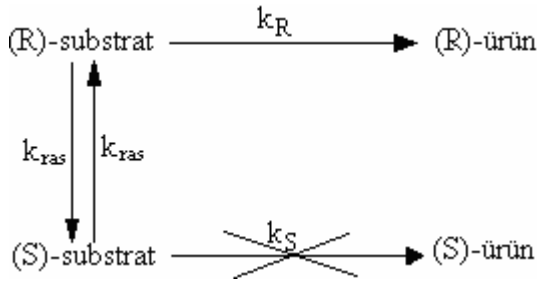
Kinetik rezolüsyon rasematların enantiyomerlerinden birinin, kiral yapıya sahip kimyasal ya da biyokimyasal katalizör yardımıyla enantiyoseçimli olarak, hızlı bir şekilde farklı bir yapıya dönüştürülmesinin sağlandığı rezolüsyon yöntemidir. Kinetik rezolüsyon yönteminin asimetrik sentezlerden ayrıldığı tek nokta, kiral girdi ya da substratın rasemik formda olmasıdır. Bu yöntemin başarısı, kiral girdi varlığında iki enantiyomerinin tepkime hızlarının farklı olmasına bağlıdır ve $k_R \neq k_S$ olduğunda gerçekleşir (Şekil 2.5). Bu kiral girdiler ortamda katalitik miktarlarda bulunmalıdır. Kiral girdi olarak, biyokatalizörler (enzim veya mikroorganizma) veya kemokatalizörler (kiral asit veya baz, kiral metal kompleksler) kullanılabilir. Rasemik bileşiklerin kinetik rezolüsyonu lipazların katalizlediği dönüşüm tepkimelerinden en yaygın olanıdır. Lipaz enzimi rasemik karışımdaki iki enantiyomer arasında ayrım yapabilir. Dolayısıyla bir enantiyomer diğerinden daha hızlı ürüne dönüştürülür.



Şekil 2.5 Katalitik kinetik rezolüsyon

Kinetik rezolüsyonda bazı sınırlamalar vardır. Bu sınırlama; rasemik karışımdan enantiyomerik saf bileşiklerin maksimum % 50 verimle elde edilebilmesidir. Böyle bir sınırlamanın üstesinden, meso bileşikler veya prokiral substratlar kullanılarak, istenmeyen enantiyomerin stereokimyası değiştirilerek, rasemizasyon ve istenmeyen enantiyomerin geri dönüşümü sağlanarak, dinamik kinetik rezolüsyon (DKR) gibi farklı bir yöntem kullanılarak gelinebilir. Dinamik kinetik rezolüsyonda enzim katalizli

kinetik rezolüsyon ile rasemizasyon birlikte gerçekleştirilir. Yaygın olarak kullanılan kinetik rezolüsyon ve dinamik kinetik rezolüsyonda (*R*)-enantiyomeri (*S*)-enantiyomerinden daha hızlı (*R*)-ürüne dönüştürülür ($k_R > k_S$) (Şekil 2.6). Dinamik kinetik rezolüsyonun tek farkı (*S*)-enantiyomeri rezolüsyon prosesi süresince izomerleşir. Böylece başlangıç (*R*)-substratının tamamı (*R*)-ürüne dönüşebilir ($k_{ras} \geq k_R$ olmalı) (Ghanem and Aboul 2004). Maksimum verim % 100'e ulaşabilir ve rasemizasyon için katalizör olarak rasemazlar kullanılabilir.



Şekil 2.6 Dinamik kinetik rezolüsyon

2.3 Enzimler

Biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen protein yapısındaki maddelere *enzim* denir. Enzimlerle ilgili ilk çalışmalar 1897 yılında E. Buchner'in maya ekstraktı kullanarak fermentasyonla alkol elde etmesi ile başlamıştır. Çoğu enzimler yalnız bir substrata karşı aktivite gösterirler. Enzimlerden günlük hayatta yararlanma olgusu çok eskidir. İnsanlar farkında olmadan enzimlerden; ekmek, peynir, bira, şarap v.b. maddelerin yapımında ve ayrıca ilaç olarak yararlanmıştır. Çağdaş enzim kimyası çalışmaları, enzimatik reaksiyonlarla ilgili Michaelis-Menten varsayımı ve Summer tarafından 1926 yılında saf kristal bir enzimin (üreaz) izolasyonu ile başlamıştır (Keha ve Kührevioğlu 2004).

2.3.1 Enzimlerin adlandırılması

Birçok enzim etki ettiği maddenin sonuna "-az" (-ase) eki getirilerek ya da katalizlediği tepkimenin çeşidine göre adlandırılırlar. Örneğin, kitine etki eden kitinaz enzimi gibi. Bazı enzimler (katalaz, pepsin, tripsin) tepkimenin türünü belirten bu adlandırmanın

dışında kalırlar. Bu sıra dışı adlandırmadan ve bulunan enzim sayısının hızla artmasından dolayı Uluslararası Enzim Komisyonu, 1955 yılında enzimleri sınıflamak için sistematik bir metod geliştirmiştir. Bu yeni sistem enzimleri altı ana gruba ayırır. Bu ayırım, enzimlerin katalizledikleri reaksiyona bağlıdır. Her enzime kısa ve kullanıma uygun olarak önerilen bir ad, sistematik bir isim ve enzimi simgeleyen bir numara (E.C.) verilir. Yapılan bu gruplama Çizelge 2.1’de verilmiştir (Tüzün 2005).

Çizelge 2.1 Enzimlerin sınıflandırılması

GRUP	TEPKİME	ALT GRUP
1. Oksidoredüktazlar	İndirgenme/yükseltgenme	1.1. CH-OH 1.2. C=O 1.3. CH=CH 1.4. CH-NH ₂ 1.5. CH-NH 1.6. NADH,NAD,PH
2. Transferazlar	Grup veya molekül transferi	2.1. Tek C’lu gruplar 2.2. Aldehit/keton grubu 2.3. Açıl grubu 2.4. Glukozil grubu 2.5. Alkil/aril grubu 2.6. Fosfat grubu 2.7. S içeren gruplar
3. Hidrolazlar	Hidroliz	3.1. Esterler 3.2. Glukosidik bağlar 3.3. Eter bağları 3.4. Peptit bağları 3.5. Diğer C-N bağları 3.6. Asit anhidritler
4. Liyazlar	Substrattan grup uzaklaştırma, çift bağlara katılım	4.1. C=C 4.2. C=O 4.3. C=N
5. İzomerazlar	İzomerleştirme	5.1. Rasemazlar 5.2. Cis-Trans
6. Ligazlar	ATP enerjisi kullanılarak moleküllerin birleştirilmesi	6.1. C-O 6.2. C-S 6.3. C-N 6.4. C-C

2.3.2 Enzim aktivitesi

Enzimlerin katalitik etkinliği katalitik aktiviteleri ile tanımlanmaktadır. Enzimin aktivitesi, enzimin yapısı dışında pH, sıcaklık, basınç, kesme gerilimi, kimyasal bileşenler, ışık, ses ve iyonizasyon radyasyonuna bağlıdır. Bu nedenle aktivite tanımının belli koşullarda yapılması gerekir. Enzimlerin aktiviteleri genellikle katalizledikleri tepkimenin başlangıç hızları tayin edilerek bulunur. Enzim aktivitesi:

1. Enzimin saniyede etki ettiği substratın mol sayısı (Turnover sayısı) veya
2. Dakikada bir mikromol substratı ürüne dönüştüren miligram enzim miktarı (enzim ünitesi) olarak tanımlanmaktadır.

Enzimler çok yüksek katalitik etkinliğe sahiptirler. Katalitik etkinlikleri kimyasal katalizörlerinkinden binlerce kat daha çoktur. Birçok enzimde katalitik etkinlik değişkendir (allosterik etki). Böylece, metabolizmanın ortam koşullarına uyumluluğu sağlanır. Enzimlerin optimum etkinlikleri ortam koşullarının dar sınırları içindedir. Bu sınırların dışına çıktığında enzim etkinliği hızla düşer (Keha ve Kührevioğlu 2004).

2.3.3 Enzimlerin yapıları ve özellikleri

Yalıtılan enzimlerin tümü protein yapısındadır ya da protein kısmı bulundurlar. Proteinler, hücrelerde en çok bulunan organik moleküllerdir. Hücrenin kuru ağırlılığının % 50'sinden fazlasını proteinler oluşturur. Çok defa renksizdirler, bazen sarı, yeşil, mavi, kahverengi ya da kırmızı olabilirler. Suda ya da sulandırılmış tuz çözeltisinde çözülebilirler. Fakat mitokondrilerde bulunan enzimler lipoproteinler ile bağlandığından (bir fosfolipit-protein kompleksi) suda çözünmez. Enzimlerin etkinlikleri akıllara durgunluk verecek derecededir. Örneğin, sığır karaciğerinden elde edilen ve bir molekül demir içeren katalaz enzimi bir dakikada, 0°C'de 5.000.000 hidrojen peroksit molekülünü H₂O ve O₂'ye parçalayabilir.

Enzim tepkimelerinde yan ürün meydana gelmez, yani substratın tamamı ürüne dönüştürülür. Oysa kimyasal tepkimelerde az veya çok her zaman yan ürün meydana gelir.

Özgüllük (spesifiklik), substrat veya substrat grubunun özel bir enzimi olması demektir. Hücre içinde çok sayıda biyokimyasal tepkime meydana geldiği için buna çok sayıda enzim karşılık gelir. Oysa çok sayıda kimyasal tepkimenin oldukça az sayıda kimyasal katalizörü vardır. Hem tepkime tipleri hem de tepkimeye girecek maddeler için seçimlilik gösterirler. Bir enzimin substratına spesifikliğinin ortaya çıkması için iki ayrı yapısal özelliğin gerekli olduğu yapılan çalışmalar sonucu belirlenmiştir. Birincisi, substrat enzim tarafından etkilenebilecek bir kimyasal bağa sahip olmalıdır. İkincisi substrat üzerinde enzimin yapışabileceği ve substratı katalitik bölgenin etkileyebileceği pozisyona getirebilecek gruplar bulunmalıdır. Bu grupların parçalanacak bağla spesifik bir geometrik ilişkisi de vardır (Pamuk 2000).

Enzimler substratlara göre binlerce kat daha büyük moleküllerdir. Bu durum kimyasal katalizörlerde tamamen tersidir. Kimyasal katalizörler örneğin proton, hidroksil iyonu gibi katalizörler etkilediği organik moleküle göre çok daha küçük yapıdadırlar. Enzim çok büyük bir molekül olmakla birlikte aktif merkezi yani asıl tepkimeyi yürüten yeri oldukça küçük bir bölgedir. Substratın bağlanma yeri, bu bölgeye bağlanarak tepkime meydana gelir. Aktif merkez ve bağlanma yerinin durumu, anahtarın kilide uymasına benzer bir olaydır.

Biyokimyasal tepkimelerde de termodinamik yasalar geçerlidir. Termodinamik yasalar evrenseldir. Yeryüzünde meydana gelen kimyasal, biyokimyasal bütün tepkimeler için geçerlidir.

2.4. Lipazlar

Lipaz, yağların parçalanmasından sorumlu enzim grubudur. Lipaz, suda çözünebilen bir enzimdir ve lipitlerin ester bağlarının hidrolizini katalizler.

Günümüzde lipazlar hem sulu hem de susuz ortamda yapılması güç reaksiyonları başaran en önemli biyokatalizörler arasında yer almaktadır. Bu, her şeyden önce onların geniş bir substrat spektrumunu kullanabilme, aşırı sıcaklıklara, pH ve organik çözücülere ve enantioselektiviteye karşı kararlılık gösterebilme yetenekleri sayesinde olmaktadır. Kısa bir zaman önce lipazların üç boyutlu yapılarının belirlenmesiyle eşsiz yapı-fonksiyon ilişkileri aydınlatılmıştır.

Lipazlar (triaçilgliserol, açilhidrolazlar) serin hidrolazları sınıfı içinde yer alır ve bu nedenle hiçbir kofaktöre ihtiyaç duymazlar. Lipazların doğal substratları olan triaçil gliseroller, suda çok düşük çözünürlüğe sahiptir. Doğal şartlar altında lipazlar, çözünmeyen bir substratlı faz ile enzimin erimediği sıvı faz arasındaki arabirimde bulunan ester bağlarının hidrolizini katalizler. Bazı deneysel şartlar altında, örneğin su yokluğunda, reaksiyonu tersine çevirebilmektedirler. Transesterleşme, esterleşme ve yağ asitleri ile gliserolden gliseridlerin oluşmasına yol açar. Substrat ve sıvı faz arasındaki bir arabirim üzerinde lipaz reaksiyonunun oluşu, reaksiyonun kinetik analizi ve denemede zorluklara neden olur. Alışılmış endüstriyel lipazlar, katı ve sıvı yağlar üzerine etki eden, ve onların başlangıçta gliserid ve yağ asitlerinin yerine konulan maddeler için hidrolize ederler ve son olarak gliserol ve yağ asitlerinin toplam hidrolizlerini gerçekleştirirler.

Lipazların biyosentezi hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalarda gerçekleşmektedir. Hayvansal ve bitkisel kaynaklardan lipaz eldesindeki zorluklar ve üretimin artan talebe yetmemesi, mikrobiyal kaynaklardan lipaz üretimini hızlandırmıştır. Lipaz üretme özelliğindeki mikroorganizmalar bitkisel yağ ve süt sanayi atıkları, yağ ile kontamine olmuş toprak, yağlı tohumlar ve bozulmuş gıdalar gibi pek çok doğal ortamda bulunabilmektedir. Enzim üretimi amacıyla kullanılan mikrobiyal kaynaklar mayalar, küfler ve bakterilerdir. Mikroorganizmalar arasında küfler genellikle iyi lipaz kaynakları olarak tanımlanırlar. Ticari olarak lipaz üreten önemli bazı küfler: *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus japonicus*, *Mucor miehei*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus niveus*, *Candida rugosa*, *Aspergillus terreus* ve *Penicillium* sp. olarak sıralanmaktadır (Şekil 2.7) (Sağlam vd. 2005).



Şekil 2.7 *Candida rugosa* lipazı

2.4.1 Lipaz türleri

a. Mikrobiyal Lipazlar: Bitki, hayvan ve mikrobiyal lipazların arasında çok geniş uygulama alanı bulan lipazlar, mikrobiyal lipazlardır. Bunun sebebi, mikropların kolay yetiştirilebilmeleri ve lipazlarının çeşitli hidrolitik ve sentetik birçok reaksiyonu katalizleyebilmeleridir. Mikrobiyal lipazların üretimi için küfler en uygun kaynak olup, özellikle gıda sanayinde kullanılan enzimlerin endüstriyel üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır.

b. Bakteriyel Lipazlar: Bakteriyel lipazlar glikoprotein yapısındadırlar, fakat bazı hücre dışı bakteriyel lipazlarsa lipoprotein yapısındadırlar. Winkler et al. çoğu bakteride enzim üretiminin bazı polisakkaritler tarafından etkilendiğini bildirmiştir. Şimdiye kadar çoğu bakteriyel lipazların yapıcı ve substratlarına karşı özgül olmadığı ve az bir kısım bakteriyel lipazların da ısıya karşı dayanıklı olduğu bildirilmiştir.

c. Fungal Lipazlar: Fungal lipazlar üzerinde 1950'lerden beri çalışılmaktadır ve Lawrence, Brockerhoff ve Jensen kapsamlı görüşler sunmuşlardır. Bu lipazlar, düşük maliyetli soy verme özelliklerinin olması, ısıya ve pH'ya karşı dayanıklı olmaları, substrat özgüllüğü ve organik çözücülerde aktif olmalarından dolayı kullanılmaktadırlar. Ticari lipazların başlıca üreticileri *Aspergillus niger*, *Candida cylindracea*, *Candida rugosa*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Rhizopus arrhizus*, *R. delemar*, *R. japonicus*, *R. niveus* ve *R. oryzae* türleridir.

(www.birseygoren.com/hakkinda/lipaz, 2007)

2.4.2 Lipazların uygulama alanları

Enzimlerin katalitik potansiyeli ve tabiatı anlaşıldıktan sonra, endüstri bu çok faydalı maddelerden geniş ölçüde yararlanmaya başlamıştır. İzole edilmiş enzimler, kendilerini içeren mikroorganizmalara çoğu kez tercih edilmektedir. Çünkü izole enzimler daha spesifik olarak etki etmekte, satış ve saklama için kolaylıklar sağlamaktadır. Ülkemizin gerçekleştirmiş olduğu 2002-2006 yılları arasındaki, büyük bir kısmını lipazın oluşturduğu enzim ithalat ve ihracat verileri Çizelge 2.2 ve Çizelge 2.3'te görülmektedir. Bu veriler İGEME'den temin edilmiştir. 2006 yılında ithal edilen enzim miktarı bir önceki yılın yaklaşık 2.5 katıdır. İhracatta da her geçen yıl ihraç edilen enzim miktarında artma söz konusudur.

Endüstriyel alanda kullanılan enzimler bitkisel, hayvansal ve mikroorganizma kökenli olmakla birlikte, ağırlıklı olarak mikroorganizmalardan izole edilmektedirler. Bunun nedeni; mikroorganizma kaynaklı enzimlerin katalitik aktivitelerinin yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha kararlı ve ucuz olmaları, büyük boyutta ve yüksek saflıkta elde edilmesi gibi avantajlara sahip olmasıdır. Endüstriyel enzimler, çok çeşitli proseslerde uygulanabilmelerinden dolayı özellikle mikrobiyal kökenli olanlar için gelen talep sürekli artmaktadır. Enzim katalizli tepkimeler, alternatifleri olan yorucu ve pahalı kimyasal reaksiyonlardan daha caziptir.

Endüstriyel olarak başta gıda sanayi olmak üzere ilaç, kozmetik, deterjan, tarımla ilgili kimyasal madde (insektisit, pestisit) ve oleokimyasal (katı-sıvı yağ hidrolizleri, biyolojik yüzey aktif madde sentezleri) sanayilerinde lipaz enzimlerine olan talebin artıyor olması, lipazların trigliseridleri hidrolizleme özelliğinin yanında çeşitli esterleşme, interesterleşme ve transesterleşme tepkimelerini katalizleme özelliklerinden kaynaklanmaktadır.

Çizelge 2.2 Türkiye'nin enzim ithal ettiği ülkeler ve ithal edilen enzim miktarları

Ülke	İthal Edilen Enzim Miktarı (kg)				
	2002	2003	2004	2005	2006
A.B.D.	-	80631	479798	-	327
ABD KÜÇÜK OUT ADASI	-	221277	-	-	-
ALMANYA	206026	-	136593	-	2864
ARJANTİN	-	374782	-	39400	55947
AVUSTRALYA	-	-	2678289	1502937	-
AVUSTURYA	2320	-	217610	234270	184400
AZERBAYCAN-NAHÇ.	20572	-	-	-	-
BELÇİKA	66240	30	1204980	1000	32150
BREZİLYA	204	920	-	-	2321225
BULGARİSTAN	7801	-	-	48206	7695
ÇİN HALK CUMHUR.	27	-	-	1210	3016500
DANİMARKA	-	1800	182772	-	686768
EGE SERBEST BÖLGE	-	-	-	2000	-
ENDONEZYA	-	-	-	12500	-
FAS	-	-	-	74385	-
FİNLANDİYA	583929	365	210492	193607	-
FRANSA	-	-	659406	91240	-
GÜNEY AFRİKA CUM.	159841	-	-	-	38640
HİNDİSTAN	173233	559288	-	15355	-
HOLLANDA	465108	195562	34246	-	-
HONG-KONG	-	2554	-	-	-
İNGİLTERE	300	-	787004	-	-
İRAN	-	1500	-	3775	959274
İRLANDA	389825	9	1281469	-	-
İSPANYA	17512	-	-	1791706	24038
İSRAİL	356395	13000	20174	-	-
İST.DERİ SER.BÖLG	375	-	7	27200	-
İSVEÇ	147472	-	-	-	815
İSVİÇRE	271459	2436230	-	-	-
İTALYA	990	698846	822494	130	117060
JAPONYA	-	30438	297693	-	356369
KANADA	96774	988197	111158	-	183483
KONGO	-	4500	-	-	-
KONGO DEM. CUM.	-	-	-	2500	-
MAKEDONYA	-	72363	-	-	-
MALEZYA	186365	-	-	55360	-
MEKSİKA	28354	-	-	-	8710
NORVEÇ	99702	-	-	-	-
POLONYA	-	-	-	98435	75388
RUSYA FEDERASYONU	400	519415	-	-	-
SAN MARIO	-	-	-	-	-
SİNGAPUR	-	-	-	226947	2710194
UKRAYNA	-	-	-	291	-
YENİ ZELANDA	-	-	-	-	31346
YUNANİSTAN	-	-	221161	-	6032
TOPLAM	3281224	6201707	9345346	4422454	10819225
GENEL TOPLAM	34069956				

Çizelge 2.3 Türkiye'nin enzim ihraç ettiği ülkeler ve ihraç edilen enzim miktarları

Ülke	İhraç Edilen Enzim Miktarı (kg)					
	2002	2003	2004	2005	2006	2007
A.B.D.	-	-	-	-	-	211
AFGANİSTAN	-	-	-	-	-	1000
ALMANYA	31613	-	1993	22087	-	10520
ANTALYA SERBEST B	-	-	-	-	-	20
ARNAVUTLUK	2380	369	16565	-	-	3955
AVRUPA SERBEST BÖL	-	-	5470	-	3420	-
AVUSTURYA	3270	-	-	324	60	-
AZERBAYCAN-NAHÇ.	-	63581	-	24050	105414	68350
BAHREYN	-	-	-	-	2000	-
BANGLADEŞ	-	-	2040	1040	-	6060
BELÇİKA	-	8743	98	-	12670	-
BEYAZ RUSYA	-	1251	-	2010	4680	-
BİR.ARAP EMİRLİK.	-	-	290	17076	-	-
BOSNA HERSEK	-	-	2050	7783	10671	-
BULGARİSTAN	25973	-	-	-	55785	45703
BURSA SER. BÖL.	-	-	-	-	-	75
CEZAYİR	-	-	66120	-	92145	-
ÇEK CUMHURİYETİ	-	1980	-	150	-	-
ÇİN HALK CUMHUR.	-	-	-	-	1500	-
DANİMARKA	-	-	1640	-	10945	-
EGE SERBEST BÖLGE	-	-	-	-	-	2000
ENDONEZYA	-	5000	-	-	-	-
FAS	-	7000	-	600	5767	-
FİLİPİNLER	4000	-	1000	5850	-	-
FİNLANDİYA	-	-	8050	-	-	-
FRANSA	-	-	5610	19265	1380	-
GÜNEY AFRIKA CUM.	4300	-	6280	5000	2080	1000
GÜRCİSTAN	233174	-	115879	23000	248350	10480
HİNDİSTAN	-	2300	-	-	5550	-
HOLLANDA	-	144	2006	1100	-	-
HONG-KONG	6050	300	3070	3000	4400	-
IRAK	-	-	790	2000	-	-
İNGİLTERE	-	-	80	60	-	-
İRAN	-	27480	28750	61388	68695	102853
İRLANDA	60	-	-	225	-	-
İSPANYA	29100	-	-	-	141148	-
İSRAİL	51380	127080	-	11840	-	-
İST.AHL.SERBEST B	-	1020	-	60	-	-
İST.DERİ SER.BÖLG	-	1150	11350	65155	-	-
İST.TRAKYA SER.BÖ	-	1200	-	-	22010	20
İSVİÇRE	-	3780	1602	-	-	-
İTALYA	24295	33325	40619	-	33340	22158
JAPONYA	-	-	-	-	-	120
KANADA	-	735	338	-	-	25
KAYSERİ SER.BÖL.	-	-	440	-	-	3125
KAZAKİSTAN	100	5790	125	115	-	-
KENYA	-	-	26330	-	-	-

Çizelge 2.3 Türkiye'nin enzim ihraç ettiği ülkeler ve ihraç edilen enzim miktarları (devam)

KIRGIZİSTAN	-	161	-	-	-	-
KOLOMBİA	-	-	-	143	250	-
KOSOVA	-	210	-	-	-	210
KUVEYT	-	1705	-	3255	-	-
KUZEY KIBRIS T.C.	4256	-	10254	23558	12809	-
KÜBA	-	-	-	-	16860	6000
LÜBNAN	2540	1985	-	2195	-	4098
MACARİSTAN	-	80	100	-	-	-
MAKEDONYA	-	14415	-	19644	8540	17680
MALTA	-	3080	-	120	-	-
MERSİN SERBEST BÖ	1430	-	-	2830	70	1120
MISIR	8310	-	-	146513	64115	10880
MOLDOVYA	-	109	-	-	-	1740
MORİTANYA	-	-	-	-	300	152
NİJERYA	12500	12700	-	-	-	-
NORVEÇ	-	2	-	-	-	-
ÖZBEKİSTAN	24520	-	8221	26196	-	2590
PAKİSTAN	9040	-	1600	23665	-	-
POLONYA	1665	13420	-	5425	8150	4290
PORTEKİZ	8250	-	13780	60	7150	-
ROMANYA	125035	-	43030	349089	-	6670
RUSYA	7700	8451	-	4120	2003	-
FEDERASYONU						
SENEGAL	15000	-	-	-	-	-
SİRBİSTAN	-	-	-	-	47797	-
SİRBİSTAN VE	28716	-	-	3460	-	-
KARADAĞ						
SİNGAPUR	250	-	-	500	-	500
SİRİ LANKA	-	520	-	-	3120	-
SUDAN	18138	4000	-	200	52	-
SURİYE	127020	22915	59505	-	68560	-
SUUDİ ARABİSTAN	3430	2000	-	40960	-	-
TACİKİSTAN	-	-	-	-	1420	-
TUNUS	-	-	4800	8863	4460	250
TÜRKMENİSTAN	8084	-	3275	-	14605	-
UKRAYNA	1650	45420	990	-	6605	-
URUGUAY	-	464	813	-	-	-
ÜRDÜN	-	-	-	79580	43920	10270
YEMEN	-	-	60	-	7350	5700
YUNANİSTAN	-	865	-	7450	-	-
TOPLAM	823229	424730	495013	1021004	1150146	349825
GENEL TOPLAM	4263947					

Lipazlar, süt yağının hidrolizi için süt ürünleri endüstrisinde oldukça fazla kullanılmaktadır. Günümüz uygulamaları, peynir aromasının artırılması, peynir olgunlaşmasının hızlandırılması, peynir benzeri ürünlerin imalatı ve kaymak hidrolizi

işlemlerini içermektedir. İnek sütüne lipaz ilavesi ile koyun veya keçi sütünden elde edilen aromaya benzer bir aroma üretilmektedir. Bu, peynir üretimi için kullanılmakta ve enzimle modifiye edilmiş peynir (EMP) olarak adlandırılmaktadır. EMP; soslar, çorbalar ve çerezler gibi diğer ürünlerde bir katkı maddesi olarak kullanılmak üzere konsantre aroma üretiminde, yüksek sıcaklıklarda, enzim varlığında inkübe edilmiş bir peynirdir.

Günümüz uygulamalarından biri, yıkama tozlarında enzimlerin kullanılmasıdır. Bazik pH'da (8'den 11'e kadar denebilir) kararlı olan ve çalışan enzimli toz ve sıvı deterjanlar içinde yıkama şartlarına uygun olan lipazlar bulunmakta ve bunlar deterjan endüstrisinde çok miktarda kullanılmaktadır. Yıkama tozlarında enzimlerin kullanımı hala endüstriyel enzimler için tek büyük pazar olmayı sürdürmektedir. Dünya çapında, evlerde kullanılan deterjan formülasyonu için daha düşük çamaşır yıkama sıcaklıklarına yönelme, taleplerin oldukça artmasına sebep olmuştur. Novo Nordisk'in lipolazı (*Aspergillus oryzae*'de tanımlanan Humicola lipazı) gibi genetik olarak üretilen enzimlerin yer aldığı çeşitli karışımlar yoğun koruma programlarında tanıtım imkanı bulmuştur.

Kiral ilaçların üretiminde lipazların faydası oldukça iyi bilinmektedir. Fenoksipropiyonat herbisitlerin sentezi için başlangıç materyalleri olan 2-halopropiyonik asitlerin eldesi, (S) izomerlerinin bütanolle Porcine Pankreatik Lipazının (PPL) hegzan içerisinde katalizlenen enantiyoseçimli esterleşmesine dayalı bir işlemdir. Çok fonksiyonlu organik bileşiklerin bölgesel seçimli modifikasyonu, özellikle AIDS tedavisi alanında lipaz uygulamasının yine hızla genişleyen diğer bir alanıdır.

Enerji biriktirdiği ve hidroliz, gliseroliz ve alkoliz reaksiyonları sırasında sıcaklık farkını en aza indirdiği için, lipazların oleokimyasal endüstrisinde uygulama sahası çok büyüktür. Japon Miyoshi yağ şirketi, sabun üretiminde *Candida cylindracea* lipazının ticari bir şekilde kullanıldığını bildirmiştir. Ucuz ve sıcaklığa daha dayanıklı enzimlerin tanıtımı, ekonomik dengeyi lipaz kullanımının lehine değiştirebilir. Oleokimyasal endüstrisinde bugünkü eğilim, organik çözücüler ve emülsifiyerlerin kullanımından uzaklaşma yönündedir. Hidroliz, alkoliz ve gliseroliz reaksiyonlarını içeren çeşitli

reaksiyonlar, doğrudan karışık substratlar üzerinde bir dizi tutuklanmış lipazın kullanımıyla gerçekleştirilmektedir. Bunun sonucu olarak da proses sürekli işlediği için yüksek verim elde edilmektedir. Enzimatik hidrolizler, fazla miktarda enerji masrafı, pahalı ekipman gibi büyük yatırımlar gerektirmediği için yağ ayrıştırma işlemlerinde çok tercih edilmektedirler (www.birseyogren.com/hakkinda/lipaz, 2007).

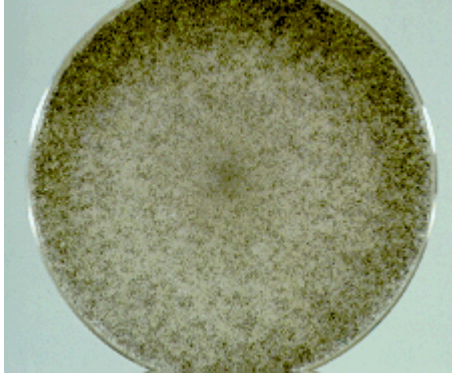
Lipazlar, potansiyel biyokatalizör olarak kullanıldıkları daha birçok yeni alanda başarıyla görev almaktadırlar.

2.5 Rasemazlar

Enzimlerin, izomerazlar grubunda (E.C 5 . . .) yer alan, optik ve geometrik izomerlerin birbirine dönüşümünü katalizleyen enzimlerdendir. Derasemizasyon tepkimelerini katalizlerler. Derasemizasyon tepkimelerinde birden fazla enzim görev yaptığı için bu sistemler çoklu enzim sistemleri olarak adlandırılmaktadır. Çoklu enzim sistemleri her ne kadar ticari olarak henüz fazla kullanılsa da membran biyoreaktörlerle kullanımlarının endüstriyel potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir (Sheldon 1993).

2.6 *Rhizopus oryzae* Mikroorganizması

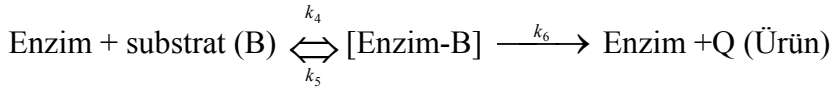
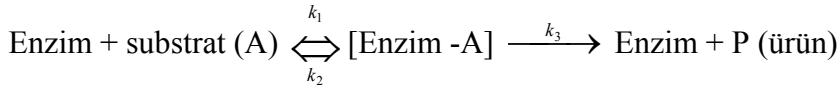
Rhizopus oryzae (*Rhizopus arrhizus*) spor oluşturan bir küf mantarıdır (Şekil 2.8). Optimum üreme sıcaklığı 30-35°C arasında olup, minimum 5-7°C ve maksimum 44-49°C olmak üzere geniş bir sıcaklık aralığında ürerler. Koloniler üreme periyodunun değişik evrelerinde beyazdan kahverengine dönüşerek ve genellikle sıvı besin ortamının yüzeyinde 10 mm yüksekliğe ulaşabilen küf oluşturarak ürerler. Patates dekstroza agar, malt özütü, soya pepton, glukoz, sakkaroz gibi besin ortamı bileşenleri içeren ortamlarda, özellikle pH 5.4-5.6 aralığında hızla büyürler. Besin ortamı pH'sı bakımından çok asidik olmamak koşuluyla belirgin bir seçicilikleri yoktur. pH 7 civarında da aynı hızla ürerler. (www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Zygomycetes/Rhizopus/R_oryzae.html, 2007, www.sonerorhan.com/biyoloji.htm, 2007)



Şekil 2.8 *Rhizopus oryzae* kültürü

2.7 Enantiyoseçimlilik

Tersinmez enzimatik rezolüsyon tepkimesi aşağıda görüldüğü gibidir:



Enantiyoseçimlilik (E); ee_s , ee_p ve x 'e bağlı olarak; ürün için Eşitlik 2.1, substrat için Eşitlik 2.2 ile hesaplanır.

$$E = \frac{\ln[1 - x(1 + ee_p)]}{\ln[1 - x(1 - ee_p)]} \dots\dots\dots 2.1$$

$$E = \frac{\ln[(1 - x)(1 - ee_s)]}{\ln[(1 - x)(1 + ee_s)]} \dots\dots\dots 2.2$$

Burada; ee_s substrat için enantiyomerik aşırılık değerini, ee_p ürün için enantiyomerik aşırılık değerini ve x de dönüşümü ifade etmektedir. Ayrıca Eşitlik 2.1 ve Eşitlik 2.2'de kullanılan dönüşüm değerleri Eşitlik 2.3, enantiyomerik aşırılık değerleri Eşitlik 2.4'teki eşitliklerden hesaplanır.

$$x = 1 - \frac{C_R + C_S}{C_{Ro} + C_{So}} \dots\dots\dots 2.3$$

$$\%ee_S = \frac{C_R - C_S}{C_R + C_S} * 100 \dots\dots\dots 2.4$$

E değeri, x'e bağlı olmadan sadece ee_s ve ee_p'ye bağlı olarak Eşitlik 2.5 kullanılarak hesaplanır.

$$E = \frac{\ln \frac{[ee_p(1 - ee_s)]}{(ee_p + ee_s)}}{\ln \frac{[ee_p(1 + ee_s)]}{(ee_p + ee_s)}} \dots\dots\dots 2.5$$

2.8 α-Hidroksi Ketonlar ve Benzoin

Enantiyomerik olarak saf α-hidroksi ketonlar, sahip oldukları önemli fonksiyonel gruplar nedeniyle asimetrik sentezin vazgeçilmez yapı taşlarıdır ve biyolojik olarak etkin çeşitli moleküllerin asimetrik sentezinde başlangıç maddeleridir. Endüstriyel açıdan önemli ilaçların ve doğal ürünlerin sentezinde kullanılan kiral alkollerin üretiminde kullanılırlar. Ayrıca 2-hidroksi propiyofenon türevlerinin sentezinde anahtar ara üründürler. Aerolik asit antibiyotiklerin, anti-depresyon, anti-bakteriyel, anti-virütik, potasyum kanal açıcıları ve çeşitli kalp ilaçlarının sentezlenmesi için önemli yapı taşlarıdır. Propiyofenon türevleri bupropiyon için çıkış maddeleridir. Örnek olarak (R)-1-(3-klorofenil)-2-hidroksipropan-1-on, depresyonu iyileştirmekte kullanılan bupropiyon için başlangıç maddesidir. Bupropiyon, Wellbutrin® (GlaxoSmithkline) ticari isimlerle satılmakta olan ve depresyon tedavisinde kullanılan ilacın etken maddesidir. Ayrıca Zyban® (GlaxoSmithkline) ticari isimli ve sigarayı bırakma tedavisinde kullanılan ilacın da etken maddesi bupropiyondur.

Bir α-hidroksi keton olan benzoin, kristal yapıda ve renksizdir, sıcak alkolde çözünür. Benzoinin bazı özellikleri Çizelge 2.4'te görülmektedir.

Optikçe saf α -hidroksi ketonlar çeşitli kimyasal ve enzimatik yöntemlerle üretilbilirler.

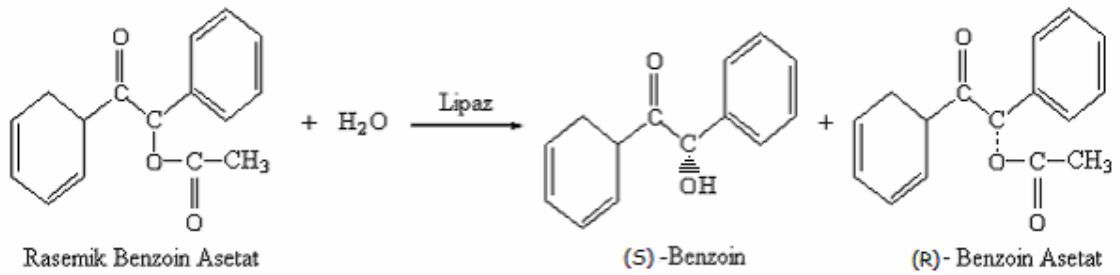
Kimyasal olarak;

- kiral triazolium tuzlarının katalizör olarak kullanıldığı C-C bağı oluşum tepkimeleri
- C-C bağı oluşumuna dayanmayan optikçe aktif enolatların stereoseçimli oksidasyonu,
- optikçe aktif oksaziridinler kullanılarak prokiral enolatların oksidasyonu,
- kiral titanyum enolatlarının seçimli oksidasyonu,
- silil enol eterlerin asimetrik oksidasyonu yollarıyla yapılmaktadır.

Biyokatalitik olarak enantiyoseçimli α -hidroksi ketonların eldesi

- aromatik aldehitlerden C-C bağı oluşumuyla,
- α -diketonların indirgenmesi,
- derasemizasyon yöntemiyle,
- rasemik α -hidroksi, perokso ve asetoksi ketonların kinetik rezolüsyonu yöntemleri ile gerçekleştirilmektedir (Demir *et al.* 1999).

Bu çalışmada bir α -hidroksi keton olan benzoinin rasemik benzoin asetatın hidroliz tepkimesi ile enantiyomerik olarak sentezi gerçekleştirilmiştir. Tepkime Şekil 2.9’da görülmektedir.

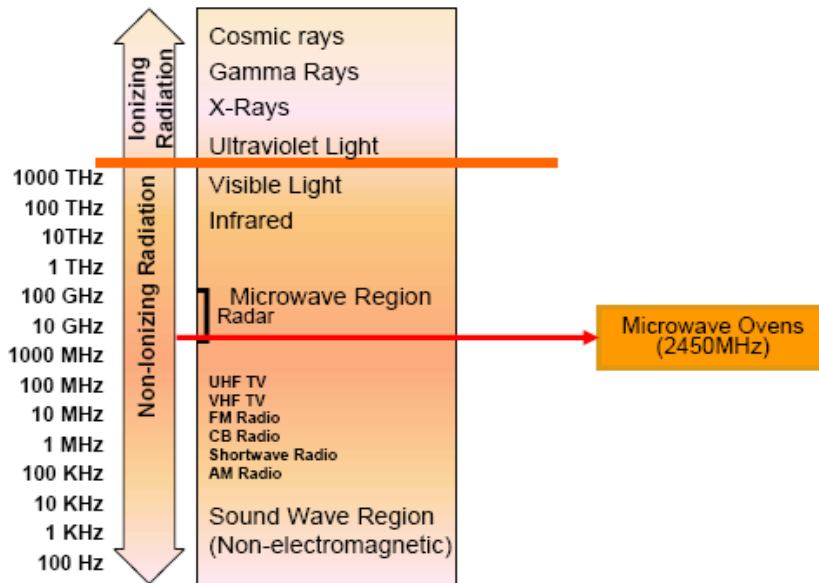


Şekil 2.9 Rasemik benzoin asetatın lipaz katalizli hidroliz tepkimesi

2.9 Mikrodalga

Mikrodalga terimi, 1 cm ile 1 m arasında uzunluğa sahip elektromagnetik dalgaları (EMD) tanımlamak için kullanılır. Bu dalga boylarına karşılık gelen frekans bölgesi 300 MHz ile 30 GHz arasındaki bölgede, iyonize olmamış elektromanyetik radyasyondur (Şekil 2.10). Mikrodalgalar, maddenin içinden, ışığın renkli camdan geçtiği gibi geçerler. Bu nedenle maddede kalıcı etki bırakmazlar. Bir maddeye mikrodalga uygulanabilmesi için maddenin dielektrik kaybına sahip olması gerekmektedir. Yani değişken bir elektromagnetik alan uygulandığında, madde içinde dipolar elektrik yüklerinin oluşması gerekmektedir. Su molekülleri kolaylıkla dipolar elektrik yükleri oluşturabildiğinden, su içeren yapıda her madde mikrodalga ile ısıtmaya uygundur.

Metalik bir levha benzeri aynadan yansıyan mikrodalgalar, dielektrik ara yüzeyde kırılır ve parabolik yansıtıcı ile odaklanır. Mikrodalga enerji belli bir frekansta yüzdelik bir dönüşüm verimiyle elektrik enerjisinden elde edilir. Mikrodalgalar; görünür, ultraviyole gibi elektromanyetik enerji şekillerinden daha yüksek dalga boylarına ve daha düşük enerji miktarına sahiptirler (www.purchaseon.com/physics/electromagnetic.htm#micro, 2007).



Şekil 2.10 Mikrodalga'nın spektrumdaki yeri

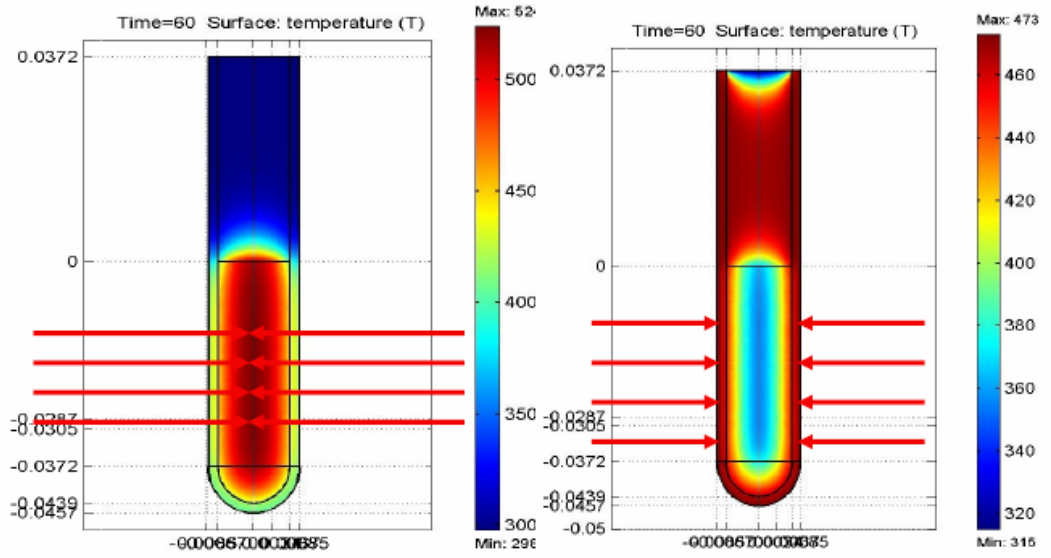
Mikrodalga bir çeşit radyasyondur. Bu durumda madde tarafından ya absorplanır ya yansıtılır ya da geçirilir. Mikrodalgalar özellikle polar maddeler üzerinde etkilidir. Mikrodalgalar düşük enerjili fotonlar olduklarından maddelerin molekül yapılarını bozmazlar.

Mikrodalga ısıtma sistemlerinde elektromanyetik enerji doğrudan madde içerisinde ısıya dönüşür. Yani ısı maddenin içinden dışına doğru taşınır. Bu nedenle ısıtma hızı diğer yöntemlere göre daha yüksektir. Mikrodalga enerjisi madde tarafından emildikçe maddenin içindeki sıcaklık artar. Mikrodalga ısıtma sistemlerinde kondüksiyon, konveksiyon ve radyasyon mekanizmaları aynı anda gerçekleşir. Mikrodalga ile ısıtma sırasında polar molekül sürekli olarak kendisini dalgalanan alana göre düzenler. Bu da elektromanyetik enerjiyi ısı enerjisine çevirir. Reaksiyon hızlarındaki artışın termal etkilere mi yoksa bazı termal olmayan etkilere mi bağlı olduğu çok açık değildir. Bazı reaksiyonlardaki hız artışı o kadar yüksektir ki bunun sadece ısıtma etkilerine bağlı olmayacağı düşünülmektedir.

Şekil 2.11’de de görüldüğü gibi geleneksel ısıtma ile ısınma, tüpün çeperlerinden başlamakta ve içeriye doğru sıcaklık düşmektedir. Oysa mikrodalga ile ısınma, merkezden başlamakta ve çeperlere doğru yayılmaktadır. Böylece önemli olan reaksiyon alanı daha çok ısınmaktadır (http://microwavetechnology.gsk.com/main/pdf/F_Mavandadi_GSK_Workshop_092805.pdf, 2007).

Mikrodalga ısıtma ile gerçekleştirilen tepkimelerin bir çok avantajı vardır:

1. Kısa reaksiyon süresi
2. Arttırılmış verimlilik
3. Yüksek miktarda ürün, arttırılmış saflık
4. Geniş reaksiyon çeşitliliği
5. Bazı zor reaksiyonların mümkün kılınması
6. Daha az reaktif
7. Daha az çözücü
8. Tekrarlanabilen sonuçlar
9. Ölçeklendirilebilir koşullar



Mikrodalga ile Isıtma

Konvansiyonel Isıtma



Şekil 2.11 Mikrodalga ile ısıtma ve geleneksel ısıtmada sıcaklık bölgelerinin karşılaştırılması

Mikrodalga enerjisi; ısıtma, kurutma, kavurma, ergitme, oksitli minerallerin karbotermik redüksiyonu gibi işlemlerin uygulanmasında kullanılır. Seramik malzemelerde ise mikrodalga enerjisi; sentezleme, kurutma, kalsinasyon ve sinterleme gibi işlemler için kullanılır. Endüstriyel işlemler için mikrodalga ısıtma; işlem zamanını azaltması ve düşük enerji maliyetinden dolayı tercih edilmektedir (http://www.metalurji.org.tr/dergi/dergi137/d137_5256.pdf, 2007).

2.10 Ses Ötesi Dalgalar (Ultrasound)

Ses dalgaları, değişik ortamlar içinde yayılan boyuna dalgalardır. Bu dalgalar her hangi bir ortamda (yani gazlar, katılar veya sıvılar), ortamın özelliklerine bağlı olan bir hızla yayınırlar. Ses dalgası bir ortamda yayılırken; ortamın parçacıkları, dalganın hareket doğrultusu boyunca yoğunluk ve hacim değişiklikleri üreterek titreşirler. Bu parçacık hareketi, dalga hareketinin yönüne dik olan enine dalga hareketindeki durumun tersidir. Ses dalgaları şeklinde ortaya çıkan yer değiştirmeler, denge konumundan itibaren her bir molekülün boyuna yer değiştirmesini gerektirir. Bu sıkışma ve genişleme şeklinde

yüksek ve alçak basınç düşmelerine yol açar. Bir mikrofonun diyaframındaki gibi, ses dalgası kaynağı sinüsel olarak titreşirse, basınç değişimleri de sinüsel olur. Frekanslarına göre, boyuna mekanik dalgalar üç gruba ayrılır.

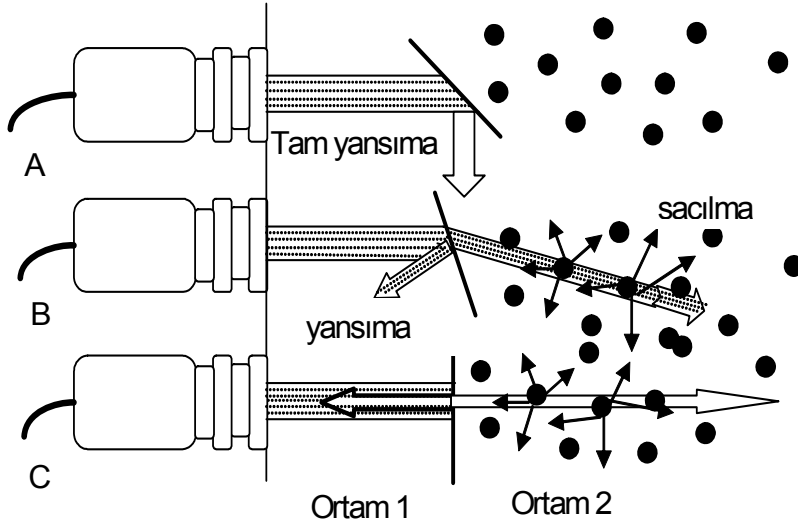
1. İşitilebilir dalgalar: İnsan kulağının duyarlık sınırı içinde olan ses dalgalarıdır. Bu dalgalar 20 Hz ile 20.000 Hz frekansları arasındadır. Bu sesler değişik yollarla yaratılabilir; müzik aletleriyle, boğazdaki ses telleriyle ve hoparlör ile.

2. Ses altı dalgalar (İnfrasonic) dalgalar; işitilebilir mertebenin altındaki frekansta olan boyuna dalgalarıdır. Deprem dalgaları bu dalgalara örnektir.

3. Ses ötesi dalgalar (SÖD) (Ultrasonic) dalgalar; işitilebilir mertebenin üstündeki frekansları olan boyuna dalgalarıdır. Örneğin, bu dalgalar, bir kuartz kristaline alternatif elektrik alanının uygulanmasıyla elde edilebilirler. Bu yol ile, $6 \cdot 10^8$ Hz (600 MHz) kadar yüksek ultrasonik frekanslar elde etmek mümkündür. Hava içinde bu frekansa karşılık gelen dalga boyu $5 \cdot 10^{-5}$ cm'dir. Bu değer görünür ışık dalgalarının boyu ile aynı büyüklüktedir.

Ses ötesi dalgaların temelini, puls-eko prensibi oluşturmaktadır. Yani bir dalga pulsu gönderilir ve hedeften yansiyarak gelen eko geri alınır. Geri alınan ekodan, gözle görülmeyen hedefle ilgili istenen bilgiler elde edilebilmektedir. Bu sistemi kullanan canlılar içerisinde en çok bilinenleri yarasalar ve yunus balıklarıdır. Bu canlılar örnek alınarak geliştirilen ve daha çok askeri amaçlı olarak kullanılan cihazlar sonar ve radarlardır. Sonar ve radarlarda amaç; gözle görülmeyen nesneleri belirlemek, sınıflandırmak ve izlemektir.

Ses ötesi dalgaların yansıması-kırılması, düzgün ve büyük yüzeylerde söz konusudur. Ancak ortamlar içinde homojen olmayan ve farklı yoğunlukta bölgeler bulunmaktadır. Dalga demeti bu tür ortamlara çarptığında saçılmaya uğrar ve yön değiştirir (Şekil 2.11).



Şekil 2.12 Ses ötesi dalgaların yansıması, kırılması ve saçılması

- A. Geliş açısı kritik açıdan büyükse gelen ışın demeti yansıtılır.
- B. Gelen ışınının bir kısmı yansıtılır, kalanı kırılır ve yoluna devam eder. Geçen ışın demeti kısmen saçılır.
- C. Işın demeti yüzeye dik olarak gelirse yansıyan ışınların çoğu, dönüştürücüye işaret güçlendirici olarak geri döner.

Ses ötesi dalga demeti farklı ortamlardan geçerken gücünde bir azalma yani zayıflama olmaktadır. Dalgalarının yoğunluğunun azalmasına, enerjisinin bir kısmını kaybetmesine neden olan zayıflamaya üç temel etken yol açmaktadır. Bunlardan birincisi absorpsiyondur. Farklı ortamlardan geçen ses ötesi dalgaların enerjisinin bir kısmı ortam tarafından soğurulmakta ve soğurulan enerji ısı olarak ortaya çıkmaktadır. Zayıflamaya yol açan ikinci etmen saçılma. Saçılma sonucunda birim alandan geçen enerji miktarı azalmaktadır. Zayıflamaya neden olan üçüncü faktör ise dalga demetinin belirli bir mesafeden sonra genişleyerek yayılmasıdır. Enerji yoğunluğu kesit alanla ters orantılıdır. Demet genişlediğinde kesit alan artacağından dokudan geçen enerji yoğunluğu azalmaktadır (Gümüşdere 2007).

Ses ötesi dalga demetinin zayıflaması geçilen ortamın tipi, kalınlığı ve dalganın frekansına bağlıdır. Ortam kalınlığı ve frekans arttıkça zayıflama da artmaktadır.

2.10.1 Ses ötesi dalgaların kullanım alanları

Ses ötesi dalgaların endüstrideki uygulamaları başlıca üç grup altında toplanabilmektedir (Gümüşdere 2007):

1. Sıvı ortamdaki uygulamaları

Temizleme	Katı maddelerin ayrıştırılması
Lehimleme	Sterilize etme
Zımparalama	Filtreleme
Aşındırma testi	Atomizasyon
Hücre ayrımı	Kristal büyümesi
Bitkilerden çıkarma	Eritme kristalleşmesi
Emülsiyonlaştırma	Gaz alma

2. Katı ortamdaki uygulamaları

Plastik kaynak	Metal kesme
Metal kaynatma	Dayanıklılık testi
Metal formlandırılması	Sert, zayıf malzemelerin işlenmesi

3. Hava ortamındaki uygulamaları

Pıhtılaşma
Köpük giderme
Kurutma

2.10.2 Ses ötesi dalgaların kimyasal tepkimeler üzerindeki etkileri

Ses ötesi dalgaların kullanıldığı tepkimelere *Sonokimyasal Tepkimeler* denmektedir. Sonokimya ‘ses ötesi dalgalar’ yoluyla kimyasal tepkimenin gerçekleştiği koşulların iyileştirilmesini, tepkime mekanizmasının değiştirilmesini ve tepkimeyi hızlandıracak radikal oluşumunu arttırmayı amaçlamaktadır. Ses ötesi dalgaların kimyasal tepkimelere etkileri çok çeşitlidir. Bunları aşağıdaki gibi sıralayabiliriz;

- Tepkime hızını artırır.
- Serbest radikal oluşumunu sağlayarak başlatıcı veya katalizör olarak görev yapar.
- Mekanik etkileri sayesinde yüzey alanını arttırarak, kütle aktarımını hızlandırır.
- Yan ürünlerin oluşmasını engeller.
- Tepkimenin verimini arttırmakla birlikte tepkime süresini kısaltır.
- Tepkime yol izini değiştirir.
- Yüksek sıcaklık ve basınçta gerçekleşen tepkimenin koşullarını değiştirerek, elverişli koşullarda gerçekleşmesini sağlayabilmektedir (Gümüşdere 2007).

2.11 Cevap Yüzey Yöntemi (RSM)

Cevap yüzey yöntemi (RSM), ilgilenilen cevabın birçok değişken tarafından etkilendiği ve amacı cevap değişkeninin optimizasyonu olan problemlerin modellenmesinde ve analizinde kullanılan matematiksel ve istatistiksel tekniklerin toplamıdır. Bu yöntemde amaç sistemin cevabını öngörebilmek için öncelikle uygun bir yaklaşım fonksiyonu elde etmek ve bağımsız parametrelerin optimum değerlerini belirlemektir. RSM tasarımları, optimum proses koşullarını bulmak, zayıf noktaları görerek proses sorunlarını gidermek ve bir ürün veya prosesi dış etkilere karşı daha da güçlendirmek için kullanılmaktadır. Cevap yüzey modelleri sadece temel etkileri ve iç etkileşimleri içerebiliyorken bazen kuadratik (ikinci dereceden) ve kübik (üçüncü dereceden) terimler de içerebilmektedir (www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section3/pri33.htm, 2007).

DeneySEL verilerle uyumlu en yaygın ampirik modeller lineer model ve kuadratik modeldir. İki faktöre göre, x_1 ve x_2 , lineer model aşağıdaki gibi yazılabilir.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \varepsilon \dots\dots\dots 2.6$$

Burada; x_1 ve x_2 bağımsız değişkenleri, $x_1 x_2$ terimi x_1 ve x_2 arasındaki olası etkileşimi, β_0 regresyon eşitliğinin bağımsız terimini, β_i doğrusal terimini, β_{ij} iç etkileşim terimini, ε deney hatasını ve Y bağımsız değişkenlerin verilen seviyeleri için cevabı göstermektedir.

Daha karmaşık bir örnek olan, tek cevaplı (Y) ve üç değişkenli (x_1, x_2, x_3) lineer model (modelde olabilecek tüm terimler ile birlikte) aşağıdaki denklemle ifade edilmektedir.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{123} x_1 x_2 x_3 + \varepsilon \dots\dots\dots 2.7$$

Üç değişkenli bir tasarımda kuadratik model Eşitlik 2.8’de verildiği gibidir. Kuadratik model endüstriyel uygulamalarda her zaman başarılıdır.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \varepsilon \dots\dots\dots 2.8$$

Burada; x_1, x_2 ve x_3 bağımsız değişkenleri, $x_1 x_2$ terimi x_1 ve x_2 arasındaki olası etkileşimi, $x_1 x_3$ terimi x_1 ve x_3 arasındaki olası etkileşimi, $x_2 x_3$ terimi x_2 ve x_3 arasındaki olası etkileşimi, β_0 regresyon eşitliğinin bağımsız terimini, β_i doğrusal terimini, β_{ii} ikinci derece terimini, β_{ij} iç etkileşim terimini, ε deney hatasını ve Y bağımsız değişkenlerin verilen seviyeleri için cevabı göstermektedir (<http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section3/pri336.htm>, 2007).

Bu deneysel tasarım yönteminde boyutsuz koordinatlar sisteminde çalışılır ve bağımsız değişkenler aşağıdaki şekilde ifade edilirler:

$$x_1 = \frac{\xi_i - \xi_i^0}{\Delta \xi_i} \dots\dots\dots 2.9$$

$$\Delta \xi_i = \xi_i^{maks} - \xi_i^{min} \dots\dots\dots 2.10$$

$$\xi_i^0 = \frac{\xi_i^{maks} + \xi_i^{min}}{2} \dots\dots\dots 2.11$$

Boyutsuz koordinat sisteminde en yüksek seviye +1, en düşük seviye -1 ve merkez nokta 0 ile gösterilmektedir.

Deneysel tasarım yapılırken, kaç tane deneyin yapılacağı aşağıdaki eşitlikle belirlenir:

$$N = 2^k + 2k + n_0 \quad k < 5 \dots\dots\dots 2.12$$

$$N = 2^{k-1} + 2k + n_0 \quad k \geq 5 \dots\dots\dots 2.13$$

Bu eşitliklerde; N deney sayısını, k bağımsız değişken sayısını, n_0 merkezdeki deney sayısını göstermektedir.

Deneysel planlamada genelde merkezi bileşen tasarımı kullanılmaktadır. Bileşen tasarımları, ikinci derece eksenlerin katsayılarını belirleyebilmek için nokta sayısı artırılmış birinci dereceden faktoriyel tasarımlardır. Genellikle nokta sayısı artırılmış merkezi bileşen tasarımı (her değişken -1, +1 şeklinde kodlanmış olarak) uygulanır. α ; tasarımın, merkez noktasına olan uzaklığı ifade eden ve değeri araştırmacı tarafından çeşitli kriterler kullanılarak tanımlanan eksenel noktasıdır. Genellikle araştırmacı kesin tasarım özellikleri için merkez noktada birden fazla sayıda inceleme yapar. Bu deneylerde ikinci derece eksen üzerinde α değeri Eşitlik 2.14'e göre hesaplanır.

$$\alpha = 2^{k/4} \quad k < 5 \dots\dots\dots 2.14$$

$$\alpha = 2^{(k-1)/4} \quad k \geq 5 \dots\dots\dots 2.15$$

Farklı sayıdaki değişkenler için n_0 ve α 'nın değerleri Çizelge 2.5'te verilmiştir.

Çizelge 2.5 Farklı sayıdaki değişkenler için α ve n_0 değerleri

	Değişken sayısı, k							
	2	3	4	5	5	6	6	7
Tasarım	2^2	2^3	2^4	2^5	2^{5-1}	2^6	2^{6-1}	2^7
α	1.414	1.682	2.00	2.378	2.00	2.828	2.378	3.33
n_0	5	6	7	10	6	15	9	21

Model katsayılarının belirlenmesi için Eşitlik 2.16'daki Taylor serisi kullanılır.

$$\beta_i = \left. \frac{\partial f}{\partial x_i} \right|_{x_i=0} ; \beta_{ij} = \left. \frac{\partial^2 f}{\partial x_i \partial x_j} \right|_{x=0} ; \beta_{ii} = \left. \frac{\partial^2 f}{\partial x_i^2} \right|_{x=0} \dots\dots\dots 2.16$$

Eşitlik 2.8'deki katsayıların bulunması için en küçük kareler yöntemi kullanılmaktadır. Bu yönetime göre gözlenen fonksiyon değerleri ile hesaplanan fonksiyon değeri arasındaki farkın minimum olması gerekir.

Gerçekleştirilen bu deneysel tasarım yönteminde kullanılan modelin ANOVA (Analysis of Variance) testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmesi Çizelge 2.6'da verilmiştir. Burada SSM modelin kareler toplamını, SSE hatanın kareler toplamını, SST model ve hatanın kareler toplamını, MSM model karelerinin oranını (SSM/f₃), MSE ise hata karelerinin oranını (SSE/f₂) göstermektedir. F değeri hesaplandıktan sonra belirlenen büyüklük seviyesinde ve f₁, f₂ serbestlik derecesi için Biometrika tablolarından verilen F_p(f₂, f₃) değeri okunur ve karşılaştırma yapılır. Hesaplanan F değerinin tablodan okunan değerden büyük olması durumunda kullanılan regresyon modelinin sistemi matematiksel olarak ifade ettiği kabul edilebilir (Kapucu 2003).

Çizelge 2.6 Kullanılan modelin ANOVA testi ile istatistiksel değerlendirilmesi

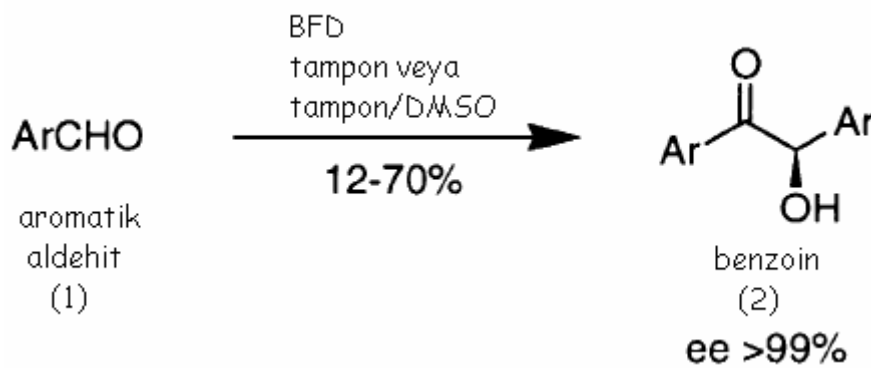
	Serbestlik derecesi	Karelerin toplamı	Karelerin oranı	F
Model	f ₃	$\sum (\bar{y}_i - \bar{y})^2$	SSM/f ₃	MSM/MSE
Hata	f ₂	$\sum (y_i - \bar{y}_i)^2$	SSE/f ₂	
Toplam	f ₁	$\sum (y_i - \bar{y})^2$	SST/f ₁	

2.12 Kaynak Araştırması

Biyokatalitik üretim, kimyasal yöntemler kullanılarak yapılan üretime göre avantajlı olduğundan kaynak araştırmasında biyokatalitik olarak α -hidroksi ketonların enantiyoseçimli eldesi araştırılmıştır.

2.12.1 Aromatik aldehitlerden C-C bağı oluşumu ile α -hidroksi ketonların eldesi

Demir *et al.* (1999), çalışmalarında aromatik aldehitlerin, benzoilformat dekarboksilaz (BFD) katalizli C-C bağı oluşumuyla benzoine dönüştürülmesini incelemişlerdir (Şekil 2.13). Çalışmada kullanılan BFD enzimi *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter calcoaceticus* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi bakterilerde bulunur. Tepkime, $MgSO_4$ ve enzim kofaktörü tiamin difosfat bulunan potasyum fosfat tamponunda (50 mM, pH=7, 2.5 mM $MgSO_4$ ve 0.15 mM ThDP) gerçekleştirilmiştir. Aldehitler suda çok az çözündüğünden çözücüde çözüldükten sonra tepkime ortamına eklenmiştir. BFD'nin eklenmesiyle tepkime başlamış ve 48 saatte oda sıcaklığında başarılı bir şekilde tamamlanmıştır. Tepkime ince tabaka kağıt kromatografisi (TLC) ile izlenmiş ve tepkime sonunda ürün analizi Chiralpak AD kiral kolonu kullanılarak HPLC'de yapılmıştır.



Şekil 2.13 Aromatik aldehitlerden benzoin oluşumu

Aromatik aldehitler, BFD katalizli C-C bağı oluşumu yoluyla benzoinlere dönüştürülmüştür. Tepkime sonucu (*R*)-benzoinler yüksek enantiyomerik aşırılık ve iyi bir kimyasal verimde elde edilmiştir. Geniş bir aromatik aldehit grubu tamponda ve

tampon/DMSO çözeltisinde substrat olarak kullanılmıştır. DMSO eklenmesi dönüşüm hızını arttırmış ama ürünlerin enantiyomerik aşırılığına etki etmemiştir.

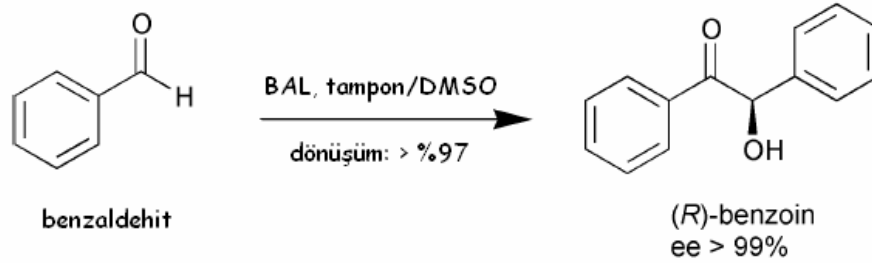
(*S*)-2-hidroksi-1-fenilpropanon ((*S*)-2-HPP)'un BFD katalizli oluşum çalışmalarında, benzaldehit/asetaldehit oranının ürün dağılımı için çok önemli olduğu görülmüştür. Aşırı asetaldehitin yanında düşük benzaldehit derişimi sonucu yüksek enantiyomerik saflıkta (*S*)-2-HPP oluşumu gözlenmiştir. Benzaldehit derişiminin artması veya asetaldehit derişiminin azalması sonucu (*R*)-benzoin oluşumu gözlenmiştir. Optimizasyon çalışmaları (tepkime süresi, enzim miktarı, kofaktör ve tepkime ortamı) (*R*)-benzoinin yüksek verimle eldesiyle sonuçlanmıştır.

Substrat olarak benzaldehit kullanıldığında (*R*)-benzoin % 20 verim ve >% 99 ee'de elde edilmiştir. Reaksiyon süresi, enzim miktarı, kofaktör ve reaksiyon ortamı optimize edildikten sonra % 70 verim ve >% 99 ee'de (*R*)-benzoin bulunmuştur. Dönüşüm hızının aldehit yapısının fonksiyonu olduğu ve benzaldehit kullanıldığında en yüksek değeri ulaştığı gözlenmiştir (Çizelge 2.7). Aldehit yapısının orto kısmına bağlı gruplar genel olarak çok az dönüşmüştür.

Çizelge 2.7 BFD katalizli enantiyoseçimli benzoin eldesi

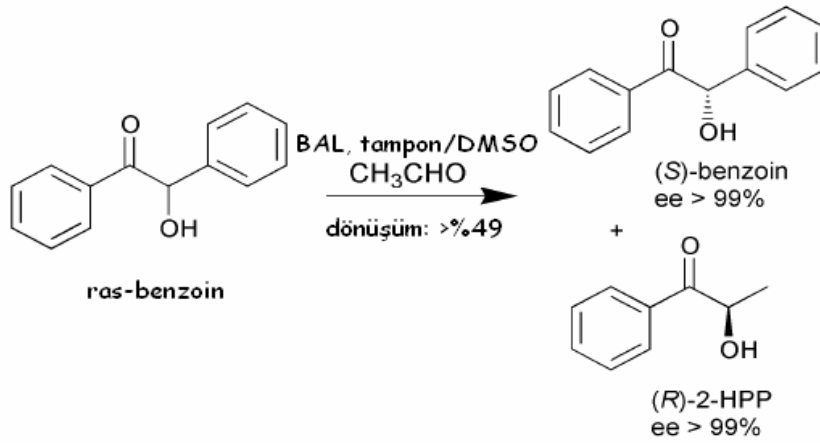
Ar	Verim (%)	ee (%)	Konfigürasyon
Fenil (Ph)	70	>99	<i>R</i>
3-MeOC ₆ H ₄	18	>99	<i>R</i>
4-MeOC ₆ H ₄	12	>99	<i>R</i>
4-MeC ₆ H ₄	69	>99	<i>R</i>
2-FC ₆ H ₄	68	>99	<i>R</i>
4-FC ₆ H ₄	25	>99	<i>R</i>
4-ClC ₆ H ₄	17	>99	<i>R</i>
4-BrC ₆ H ₄	13	>99	<i>R</i>
2-furil	62	94	<i>R</i>
5-Me-2-furil	50	96	<i>R</i>
2-tiofenil	65	95	<i>R</i>

Demir *et al.* (2001a), çalışmalarında aromatik aldehytler, rasemik benzoin ve alifatik aldehytlerden enzim katalizli C-C bağ bozunması ve C-C bağ oluşumu tepkimeleriyle benzoinleri ve (*R*)-2-hidroksi-1-fenilpropanon ((*R*)-2-HPP)'u elde etmişlerdir. Bu çalışmalarda enzim olarak tiamin difosfat (ThDP) bağlı benzaldehyt liyaz (BAL E.C. 4.1.2.38) kullanılmıştır. İlk olarak benzaldehytin BAL varlığında gerçekleştirdiği tepkime incelenmiştir. Benzaldehytin bir kısmı (% 1-2) tepkime sonunda ortamda dönüşmeden kalmıştır (Şekil 2.14). Tepkime sonucunda yüksek enantiyomerik aşırılık değerleri hesaplanmıştır. Bu tepkimede benzaldehyte fenil grubunun bağlanması ile C-C bağ oluşumu gözlenmiştir.



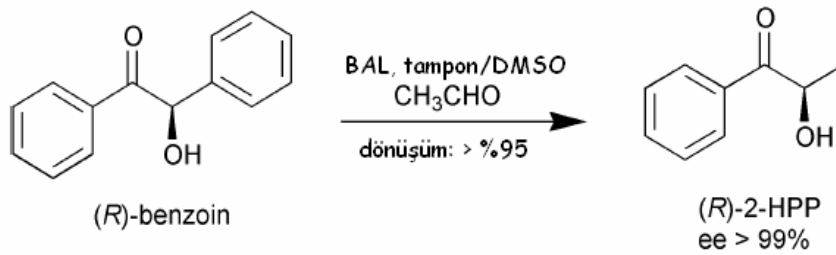
Şekil 2.14 Benzaldehytin BAL katalizörlüğündeki tepkimesi

Rasemik benzoin, potasyum fosfat tamponunda pH=7'de BAL ile tepkimeye girdiği zaman benzaldehytin az bir kısmı oluşmuştur. Benzoinin sulu tampon çözeltisindeki düşük çözünürlüğü buna neden olarak gösterilmiştir. Çözücü olarak % 20 DMSO (v/v) eklenmesi veya alternatif olarak % 15 polietilen glikol (PEG 400) (v/v) eklenmesi benzaldehyt oluşumunu arttırmıştır. Bu tepkime kinetik rezolüsyondur. Benzoinde fenil grubunun ayrılması sonucu C-C bağ bozunması gerçekleşmiştir (Şekil 2.15).



Şekil 2.15 Rasemik benzoinin BAL katalizörlüğündeki tepkimesi

Varsayımın doğruluğunu kanıtlamak için; benzoinin sadece bir enantiyomeri substrat olarak kullanılmış, tepkime (R) ve (S)-benzoin ile gerçekleştirilmiştir. Sadece (R)-benzoin BAL katalizörlüğünde benzaldehite dönüşmüştür. (S)-benzoin hiçbir tepkime göstermemiştir (Şekil 2.16).

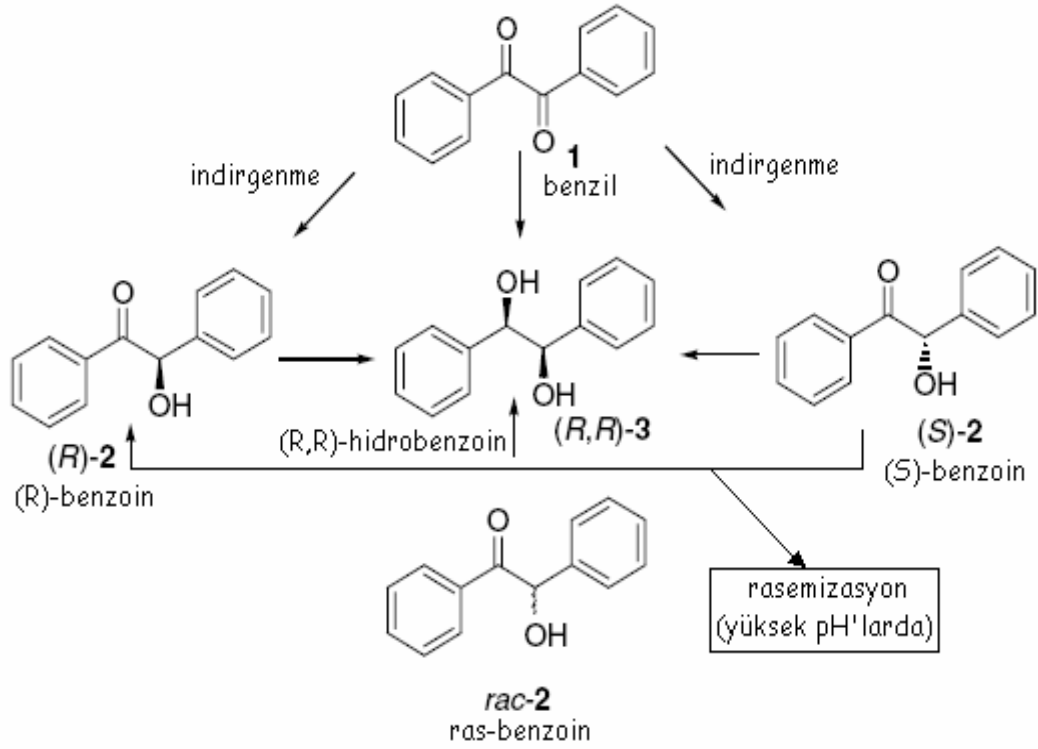


Şekil 2.16 (R)-benzoinin BAL katalizörlüğü ve asetaldehit varlığındaki tepkimesi

Rasematların, C-C bağ bozunması ve C-C bağ oluşumuyla enzim katalizli sentezi sonucu yüksek enantiyomerik aşırılık (> % 99) ve verim (> % 97) gözlenmiştir.

2.12.2 α -diketonların indirgenmesi ile α -hidroksi ketonların eldesi

Demir *et al.* (2004), bu çalışmada enzim katalizörlüğünde; benzilin benzoin ve hidrobenzoine, benzoinin de hidrobenzoine indirgenmesi tepkimelerini incelemişlerdir (Şekil 2.17).



Şekil 2.17 Benzilin benzoin ve hidrobenzoine, benzoinin de hidrobenzoine indirgenmesi

İlk olarak benzilin benzoine indirgenmesi incelenmiştir. Bu tepkime farklı mikroorganizma türleri kullanarak gerçekleştirilmiştir. *Rhizopus* türleri (R)-benzoini %99 ee'de sağlarken *Rhizomucor* türleri (S)-benzoini % 73 ee'de sağlamıştır (Çizelge 2.8). Dönüşümler sırasında her bir mikroorganizmanın farklı pH'larda çalıştığı görülmüştür.

Rhizopus oryzae (ATCC 9363) ve *Rhizopus oryzae* (72465) inkübasyondan sonra pH'ı değiştirmemiştir. *Rhizomucor miehei* ve *Rhizomucor pusillus* ilk olarak ortamın pH'ını 3 günde 4.5'e düşürmüştür. Bu zaman zarfında benzilin büyük bir kısmı (S)-benzoine dönüşmüştür. 5 gün sonra pH 8.0-8.5'e yükselmiş ve 15 gün boyunca bu değerde sabit kalmıştır. Bu yüksek pH'ta (S)-benzoinin kısmi rasemizasyonu gerçekleşmiştir (Şekil 2.17).

Çizelge 2.8 Benzilin indirgenmesi

sıra	mantar	Tep. süresi (gün)	pH	(R)-Benzoin ee verim (%) (%)	(S)-Benzoin ee verim (%) (%)
1	<i>Rhizopus oryzae</i> (ATCC 9363)	6	6.5-8.5	>99	81
2	<i>Rhizopus oryzae</i> (ATCC 9363)	5	4.2-5.0		80 75
3	<i>Rhizopus oryzae</i> (72465)	7	6.8-8.5	98	83
4	<i>Rhizopus oryzae</i> (72465)	5	4.1-5.0		85 78
5	<i>Rhizomucor miehei</i> (72460)	2	4.3-4.6		71 72
6	<i>Rhizomucor miehei</i> (72460)	3	8.0-8.5		33 75
7	<i>Rhizomucor pusillus</i> (72561)	3	4.3-4.5		73 77
8	<i>Rhizomucor pusillus</i> (72561)	3	8.0-8.5		37 73

Ortamanın pH'ı, ürünlerin stereokimyasal sonucunu güçlü bir şekilde etkilemiştir. *Rhizopus oryzae* (ATCC 9363) ve *Rhizopus oryzae* (72465), düşük pH'ta (4.2-5.0) benzoinin (S)-enantiyomerini % 80-85 ee değerinde oluştururken yüksek pH'ta (6.5-8.5) benzoinin (R)-enantiyomerini % 98-99 ee değerinde oluşturmuştur. *Rhizomucor miehei* (72460) ve *Rhizomucor pusillus* (72561) ise düşük ve yüksek pH'larda benzoinin (S)-enantiyomerini oluşturmuşlardır. Ancak, yüksek pH'larda % 33-37 gibi düşük ee değerleri göstermişlerdir (Çizelge 2.6).

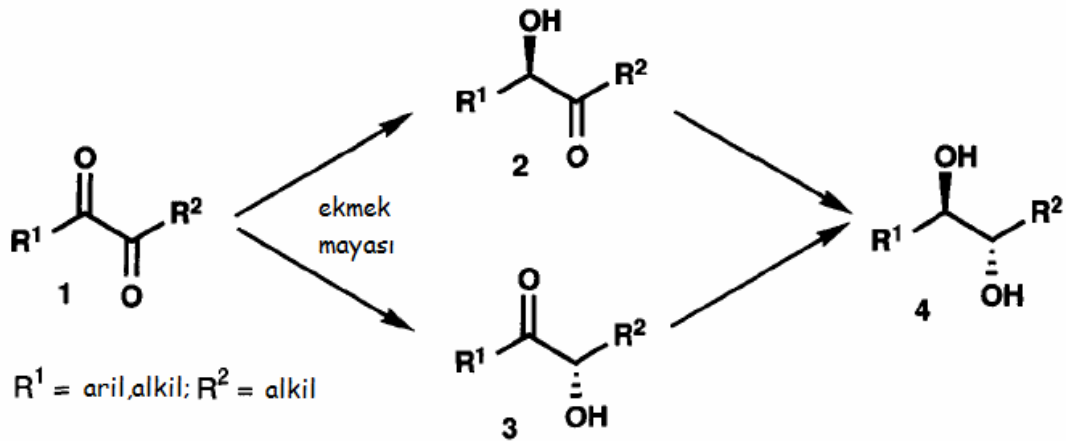
Benzil-benzoin biyodönüşüm tepkimeleriyle birlikte aynı zamanda, belirlenmiş koşullarda, 4 mikroorganizma ile, düşük verimde hidrobenzoin oluşturmuştur. Bu tepkime farklı pH'larda uzun sürelerde tekrar edilmiştir. Hidrobenzoin % 71-77 verim ve % 96-99 ee değerinde elde edilmiştir (Çizelge 2.9).

Çizelge 2.9 Benzilin hidrobenzoine biyodönüşümü

sıra	mantar	Tep. süresi (gün)	pH	Hidrobenzoin ee (%)	verim (%)
1	<i>Rhizopus oryzae</i> (ATCC 9363)	21	6.5-8.5	>99	77
2	<i>Rhizopus oryzae</i> (72465)	18	6.5-8.5	>99	74
3	<i>Rhizomucor miehei</i> (72460)	13	8.0-8.5	96	76
4	<i>Rhizomucor pusillus</i> (72561)	11	8.0-8.5	97	71

Nakamura *et al.* (1996), α -diketonların indirgenmesiyle α -hidroksi ketonun yüksek kimyasal verimde üretilmesini sağlamak ve indirgenmenin bölgesel seçiciliğini geliştirmek için basit ve etkin bir metod geliştirmeye çalışmışlardır. Mikrobiyal hücre olarak ekmek mayası, substrat olarak ise farklı diketonlar kullanılmıştır. İndirgenme tepkimesi pH 7 olan fosfat tamponunda, 30°C sıcaklığında 2.5 h sürede gerçekleştirilmiştir.

α -diketonun ekmek mayası biyokatalizörlüğünde indirgenmesiyle α -hidroksi ketonun 2 bölgesel izomeri oluşmakta, α -hidroksi ketonlardan ise ekmek mayasındaki diğer enzimlerin devreye girmesi ile yan ürün olarak diol elde edilmektedir (Şekil 2.18).

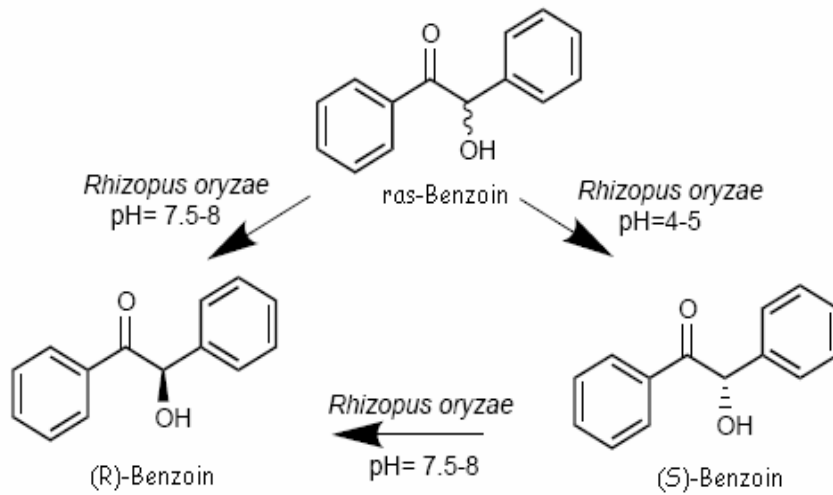


Şekil 2.18 α -diketonların indirgenme tepkimesi

Bu çalışmada diol oluşumu istenmeyen bir durumdur ve engellemek için çeşitli enzim inhibitörleri kullanılmıştır. Bölgesel seçimliliği arttırmak için ise mayaya ısıl ön işlem uygulanmıştır. Enzim inhibitörleri içinde en iyi sonuç metil vinil keton (MVK) ile elde edilmiştir. Substrat 1-fenil-1,2-propandion iken ısıl işlem uygulanmadığında ve MVK ortamda bulunmadığında verim % 38 ve 2:3 oranı 32:68 , ısıl işlem uygulandığında ve MVK var iken ise verim % 81, 2:3 oranı 6:94 olarak bulunmuştur. Substrat olarak 1-fenil-1,2-propandion kullanıldığında % 81 verimle (S)-1-fenil-2-hidroksi-2-propanon % 98 ee'de elde edilmiş olup, 1-fenil-1,2-bütadion, 1-fenil-1,2-pentadiondion ve 2,3-fenil-1,2-oktandion substrat olarak kullanıldığında iyi sonuç alınamamıştır.

2.12.3 Derasemizasyon yöntemleri ile α -hidroksi ketonların eldesi

Demir *et al.* (2002), çalışmalarında *Rhizopus oryzae* (ATCC 9363) mikroorganizması kullanılarak gerçekleştirilen yeni bir enzimatik derasemizasyon tepkimesiyle benzoinin her 2 enantiyomerinin hazırlanışını incelenmişlerdir (Şekil 2.19). Rasemizasyon tepkimesi mikroorganizma üreme ortamında, 35°C'de gerçekleştirilmiş ve rasemik benzoin tepkime ortamına DMSO'da çözülerek eklenmiştir.



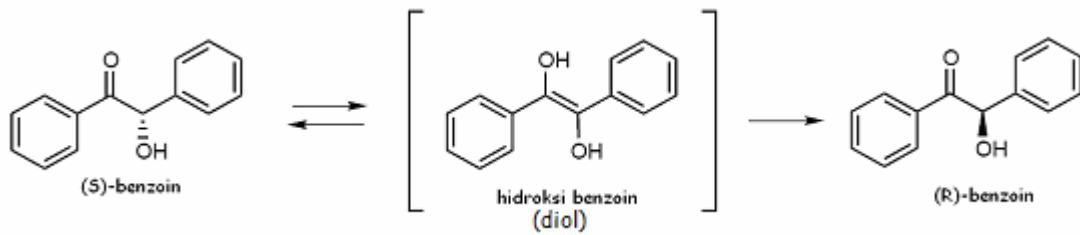
Şekil 2.19 Benzoinin derasemizasyonu

Tepkime için optimum pH aralığı 7.5-8.5 olarak bulunmuş ve tepkime süresince bu pH aralığında rasemik benzoinin (*S*)-enantiyomeri azalırken (*R*)-enantiyomerinin arttığı gözlenmiştir. Tepkime, hiçbir değişim gözlenmeyene kadar ((*S*)-enantiyomerin tamamının tüketimi, 21 gün) devam etmiştir. 21 gün sonunda (*R*)-benzoin % 73-76 verim ve % 95-97 ee değerinde izole edilmiştir. Reaksiyon farklı pH (4-5) değerlerinde gerçekleştirildiğinde ras-benzoinin % 71 verim ve % 85 ee ile (*S*)-enantiyomerine dönüşmüştür.

Kontrol deneyi olarak, (*S*)-benzoin substrat olarak kullanılmış ve (*R*)-benzoin % 74 verimlilikle ve % 97 ee değerinde izole edilmiştir. Aynı koşullar altında (*R*)-benzoin substrat olarak kullanıldığında hiçbir değişim gözlenmemiş ve (*R*)-benzoin % 77 verimle geri kazanılmıştır.

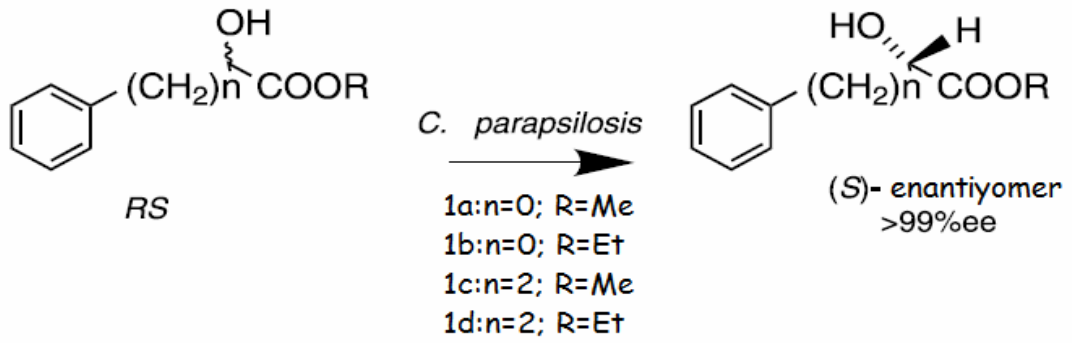
Her ne kadar derasemizasyon mekanizması çok net olmasa da substratların rasemizasyonu için mümkün olan 2 yöntem bulunmaktadır. Biri, bir diolün oluşumuyla substratın derasemizasyonu, diğeri bir enantiyomerin enantiyoseçimli bozunmasıdır (Şekil 2.20).

Sonuç olarak asimetric merkez etrafındaki grupların üç boyutlu dizilişleri ortamın asitliğine bağlı olarak değiştiği gözlenmiştir.



Şekil 2.20 Derasemizasyon mekanizması

Chadha and Baskar (2002), bu çalışmalarında 2-hidroksi-4-fenilbütanoik asitin rasemik etil esterinin ve mandelik asitin etil ve metil esterinin *Candida parapsilosis* (ATCC 7330) mikroorganizması varlığında biyokatalitik derasemizasyonunu incelemişlerdir (Şekil 2.21).



Şekil 2.21 Rasemik α -hidroksi asit esterlerinin *C. Parapsilosis* (ATCC 7330) hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen derasemizasyon tepkimesi

Rasemik esterler az miktardaki (toplam tepkime hacminin % 10'u) suyla karışabilen çözücüde çözüldükten sonra sulu hücre süspansiyonuna eklenmiştir. Suyla karışmayan çözücülerin kullanılması tepkime süresini uzatmıştır. Örneğin; hegzan kullanıldığında 5 saatte % 97 ee değerini ulaşılırken etanol kullanıldığında >% 99 ee değerine 1 saatte ulaşılmıştır.

Tepkime sonunda > % 99 enantiyomerik aşırılık (ee) değerinde ve % 85-90 verimde 2-hidroksi-4-fenilbütanoik asitin rasemik etil esterinin sadece (S)-enantiyomeri oluşmuştur. Tepkime süresi, ürünün enantiyomerik aşırılık değerine göre belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 2.10'da görülmektedir.

Çizelge 2.10 (RS)- 2-hidroksi-4-fenilbütanoik asitin etil esterinin derasemizasyonunda ee'nin zamanla değişimi

Sıra	Tepkime süresi (dk)	(S)- 2-hidroksi-4-fenilbütanoik asitin etil esterinin % ee'si
1	10	30
2	20	58
3	40	86
4	60	>99

Diğer tepkime (mandelik asitin etil ve metil esterinin substrat olarak kullanıldığı) sonunda ise 1 saatte > % 99 ee değerinde sadece (*S*)-enantiyomer oluştuğu görülmüştür (Çizelge 2.11).

Çizelge 2.11 α -hidroksi asit esterlerinin *C. Parapsilosis* (ATCC 7330) ile derasemizasyonu

Sıra	Bileşik	Verim (%)	Zaman (h)	Konfigürasyon
1	n=0; R=Me*	70	1	<i>S</i>
2	n=0; R=Et*	74	1	<i>S</i>
3	n=2; R=Me*	73	1	<i>S</i>
4	n=2; R=Et*	85-90	1	<i>S</i>

*100 mg substrat kullanılmıştır.

Sonuç olarak; α -hidroksi asit esterlerinin *C. Parapsilosis* (ATCC 7330) varlığında gerçekleştirilen derasemizasyonu sonucu, (*R*)-enantiyomerin kendi ayna görüntüsüne dönüşmesiyle (*S*)-enantiyomer yüksek verim ve ee değerinde elde edilmiştir. Ayrıca aynı tepkimeyi serbest asitler (2-hidroksi-4-fenilbütanoik asit ve mandelik asit) kullanarak denemişler ve bu bileşiklerdeki hidroksi gruplar sekonder alkol grubu olmasına rağmen hiçbir derasemizasyon tepkimesi gözlenmemiştir. Bu da gösteriyor ki; α -karbon üzerindeki diğer fonksiyonel gruplar enzimatik derasemizasyona etki etmektedir.

2.12.4 Rasemik α -hidroksi ve α -asetoksi ketonların kinetik rezolüsyonu ile α -hidroksi ketonların eldesi

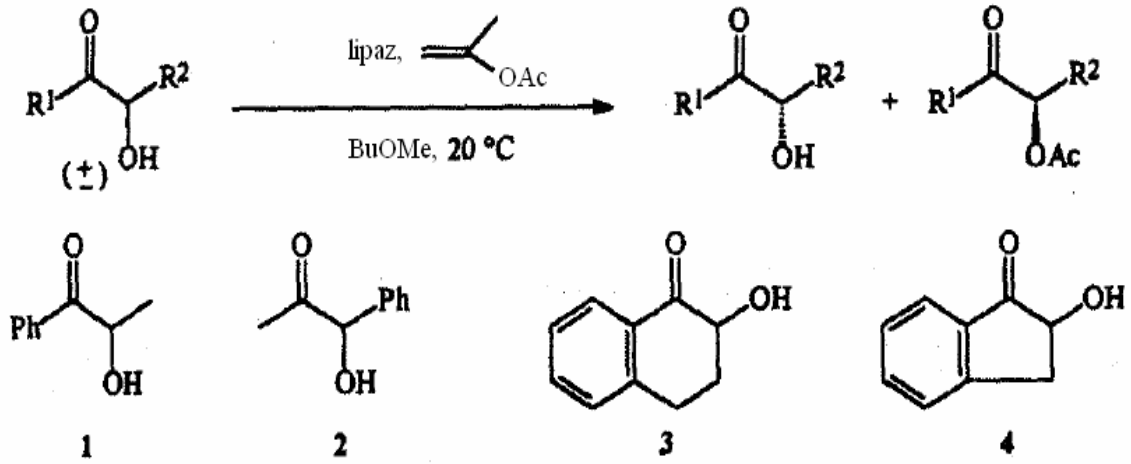
α -hidroksi ketonların kinetik rezolüsyonla eldesi transesterleşme ve hidroliz tepkimeleri ile yapılmıştır.

2.12.4.1 α -hidroksi ketonların transesterleşme tepkimesiyle eldesi

Adam *et al.* (1996), lipaz katalizli tersinmez transesterleşme tepkimesi ile rasemik α -hidroksi ketonların kinetik rezolüsyonunu incelemişlerdir. Bu tepkimenin gerçekleşmesi

için ilk olarak izoprofenil asetat ve lipaz (100-200 mg/mmol substrat), t-butil metil eterde çözülmüş 0.1 M'lık rasemik α -hidroksi keton çözeltisine eklenmiştir. Karışım oda sıcaklığında (20 °C) karıştırılmıştır. Tepkime süresinden (12-210 h) sonra enzim süzülerek uzaklaştırılmış ve çözücü indirgenmiş basınç (40 °C/40 Torr) altında buharlaştırılmıştır. Substrat ve ürünlerin analizleri ise Chiralcell OD ve OB kolonları kullanılarak HPLC'de yapılmıştır.

Rasemik α -hidroksi ketonların izoprofenil asetatla lipaz katalizli asimetrik asetillenmesi sonucu yüksek enantiyomerik aşırılıkta optikçe aktif keto alkoller ve asetatlar oluşturmaktadır (Şekil 2.22).



Şekil 2.22 α -hidroksi ketonların kinetik rezolüsyonu

İlk olarak, α -hidroksi ketonların transesterleşmesini katalizleyen farklı ticari lipazların etkisi incelenmiştir. Amano PS ve Amano AK, çözücü olarak tert-butil metil eter kullanıldığında en iyi sonuç gösteren lipazlar olarak bulunmuştur. Substrat olarak 2-hidroksi propiyofenon kullanıldığında Amano AK ile 92 saatte % 48 dönüşüm ve % 89 ee elde edilmiştir (Çizelge 2.12).

İzoprofenil asetat yerine vinil asetatın kullanılması ve çözücü olarak t-butil metil eter yerine THF, hegzan, diklormetan veya toluenin kullanılması sonuçları değiştirmemiştir.

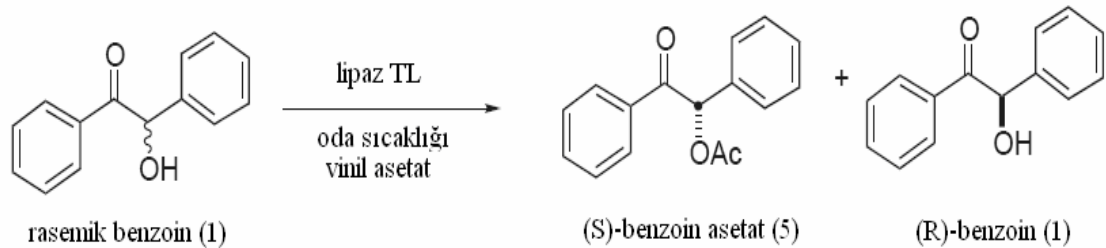
Pseudomonas kaynaklı lipazlar, biyokatalitik transformasyonlar için en kullanışlı enzimler grubundadırlar. Özellikle α -hidroksi ketonların, karbonil substratların transesterleşmesinde etkilidirler.

Çizelge 2.12 Rasemik keto alkollerin 1-4 lipaz katalizli kinetik rezolüsyonu

Sıra	Substrat	Lipaz	Süre (h)	Dönüşüm (%)	Keto Alkoller ee(%)	Keto Alkoller konfig	Keto Asetatlar ee(%)	Keto Asetatlar konfig	E
1	1	AK	92	48	89	<i>S</i> (-)	95	<i>R</i> (+)	113
2	1	AK	138	52	99	<i>S</i> (-)	90	<i>R</i> (+)	82
3	1	PS	210	19	23	<i>S</i> (-)	99	<i>R</i> (+)	249
4	2	AK	87	48	92	<i>R</i> (-)	98	<i>S</i> (+)	311
5	2	AK	138	51	99	<i>R</i> (-)	95	<i>S</i> (+)	201
6	2	PS	87	46	83	<i>R</i> (-)	98	<i>S</i> (+)	261
7	3	AK	40	57	99	<i>S</i> (-)	79	<i>R</i> (+)	35
8	3	PS	25	49	77	<i>S</i> (-)	79	<i>R</i> (+)	19
9	3	PS	39	60	95	<i>S</i> (-)	63	<i>R</i> (+)	16
10	4	AK	20	58	99	<i>S</i> (+)	72	<i>R</i> (-)	34
11	4	PS	14	52	95	<i>S</i> (+)	86	<i>R</i> (-)	45

Sonuçlar gösteriyor ki; lipazlar, α -hidroksi ketonların izoprofenil asetat ile organik ortamda enantiyoseçimli transesterleşmesini katalizlerler. Enantiyomerik saflıkta keto alkoller ve enantiyomerik olarak zengin keto asetatları yüksek verimde oluştururlar.

Aoyagi *et al.* (2000), benzoinin lipaz katalizli kinetik rezolüsyonunu incelemişlerdir. Bu tepkime sonucu optikçe aktif (*R*)-benzoin oluşmuştur (Şekil 2.23). Diğer taraftan, (*S*)-benzoin asetat hidroliz olarak (*S*)-benzoine dönüşmüştür.



Şekil 2.23 Benzoinin lipaz katalizli kinetik rezolüsyonunu

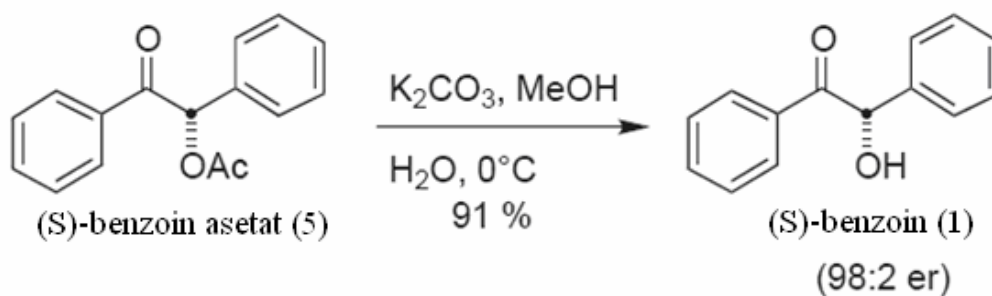
Başlangıçta rasemik benzoinin kinetik rezolüsyonunu farklı kaynaklı lipazlarla (PPL, Amano I, Amano II, Lipase MY, UL, TL, SC, AL, OF ve OL), vinil asetat ve THF karışımında ve oda sıcaklığında denemişlerdir. En etkin lipazın Lipase TL olduğu görülmüştür. Daha sonra reaksiyon parametrelerinin açıl verici, tepkime süresi ve çözücüye bağlı olarak değiştiği gözlenmiştir (Çizelge 2.13). En iyi sonuca oda sıcaklığında, çözücü olarak THF, açıl verici olarak vinil asetat kullanıldığında ulaşılmıştır.

Çizelge 2.13 Rasemik benzoinin kinetik rezolüsyonu

Sıra	Lipaz TL [®] (mg) ^a	Çözücü ^b	Açılverici ^d	Tep. Süresi (h)	(S)-5 Verim(%)	Er ^g	(R)-1 Verim(%)	Er ^g
1	10	THF ^b	VA	20	9	-	79	-
2	50	THF ^b	VA	20	29	-	35	-
3	100	THF ^b	VA	42	40	-	53	-
4	250	THF ^b	VA	20	52	-	46	-
5	100	EtOAc ^b	VA	20	2	-	95	-
6	100	Benzen ^b	VA	20	18	-	69	-
7	100	THF ^b	IA	43	3	-	88	-
8 ^c	1250	THF ^c	VA	20	42	>99:1	40	97:3
9 ^{e,f}	1250	THF ^c	VA	20	46	>99:1	48	96:4

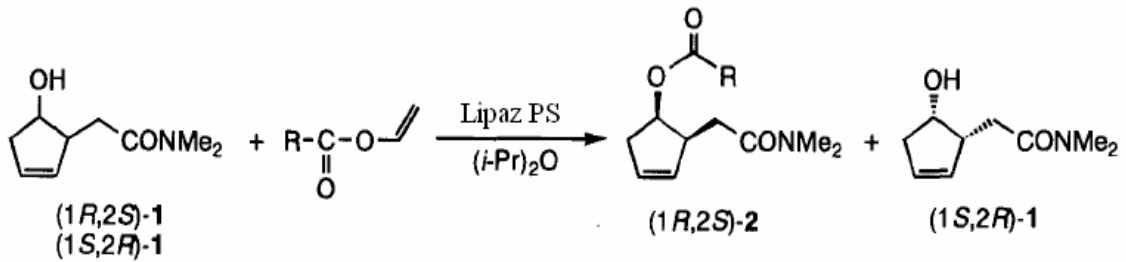
^aTepkime miktarı=100 mg rasemik benzoin. ^b5 ml çözücü kullanılmıştır. ^c25 ml çözücü kullanılmıştır. ^dVA: vinil asetat, IA: izopentenil asetat. ^eTepkime miktarı=500 mg rasemik benzoin. ^fCelite yokluğundaki tepkime. ^gEnantiyomerik oranlar (er's) Chiralcel OD kullanılarak HPLC'de analizlenmiştir.

Ayrıca, metanol su içinde potasyum karbonat ile 0 °C'de gerçekleşen hidroliz tepkimesi ile (*S*)-benzoin asetatın (*S*)-benzoin elde edilmiştir. Verim % 91 olarak hesaplanmıştır (Şekil 2.24).



Şekil 2.24 (*S*)-benzoin asetatın hidroliz tepkimesi

Ema *et al.* (1996), lipaz katalizli transesterleşmelerin enantiyoseçimliliğine açıl gruplarının etkisini incelemiştir. Rasemik 2-[(N,N-dimetilkarbamoyl)metil]-3-siklopenten-1-ol'ün (1) diizopropil eter içinde lipaz katalizli transesterleşmesinin (Şekil 2.25) enantiyoseçimliliğine açıl vericilerin açıl grubunun etkisinin önemli olduğu bulunmuştur. Enantiyoseçimlilik, açıl vericinin vinil asetatın vinil butirata değişmesiyle önemli bir şekilde artmıştır. Değişik türdeki açıl vericilerin arasında, açıl vericilerin açıl gruplarının etkisini incelemek için vinil esterlerin en uygun olduğu düşünülmüştür.



Şekil 2.25 Rasemik (1)'in diizopropil eter içindeki lipaz katalizli transesterleşmesi

Farklı alkil zincir uzunluğuna sahip birkaç vinil esteri, (1)'in lipaz katalizli kinetik rezolüsyonunda denenmiştir. Elde edilen enantiyoseçimlilikler Çizelge 2.14'te verilmiştir.

Vinil esterlerin alkil zincirlerindeki bir uzama enantiyoseçimliliği epey değiştirmiştir. Vinil asetat (E=30) yerine vinil butirat (E=156) kullanıldığında enantiyoseçimlilik çok iyi bir şekilde artmıştır. Vinilkloro asetat ile yapılan tepkimede en yüksek reaksiyon hızı gözlenmiştir ve enantiyomerik oran 89 hesaplanmıştır.

Çizelge 2.14 (1)'in, çeşitli açıl vericiler kullanılarak yapılan lipaz katalizli transesterleşmesi

Açıl grup R	Süre (h)	Dönüşüm ^b (%)	(1R,2S)-1 %verim ^c (%ee ^d)	(1R,2S)-2 %verim ^c (%ee ^d)	E
CH ₃	3	50	46 (83)	47 (84)	30
n-C ₂ H ₅	3	42	48 (69)	41 (95)	81
n-C ₃ H ₇	3	45	51 (78)	42 (97)	156
n-C ₅ H ₁₁	3	51	47 (72)	43 (70)	12
n-C ₇ H ₁₅	2	45	40 (70)	51 (86)	28
n-C ₉ H ₁₉	1.5	49	42 (84)	44 (89)	45
ClCH ₂	0.5	51	43 (95)	48 (92)	89
CF ₃	0.75	40	45 (8)	35 (12)	1.4
ter-C ₄ H ₉	48	24	10 ^e (27)	19 (84)	15
C ₆ H ₅	48	14	53 ^e (15)	19 (89)	20
CH ₃ CH=CH	48	7	16 ^e (7)	12 (92)	26

^aKoşullar: Lipase PS (400 mg), 1 (1.2 mmol), açıl verici (2.4 mmol), kuru (i-Pr)₂O (10 ml), 30 °C.

^b100*ee(1)/(ee(1)+ee(2)) formülünden hesaplanmıştır.

^cİzole edilmiş verim.

^dChrompack CP-siklodekstrin-β-2,3,6-M-19 kullanılarak gerçekleştirilen GC'de belirlenmiştir.

^elaktonun büyük miktarı uzamış tepkime süresinden dolayı elde edilmiştir. Lakton, lipaz kataliziyle değil kendi kendine oluşmuştur.

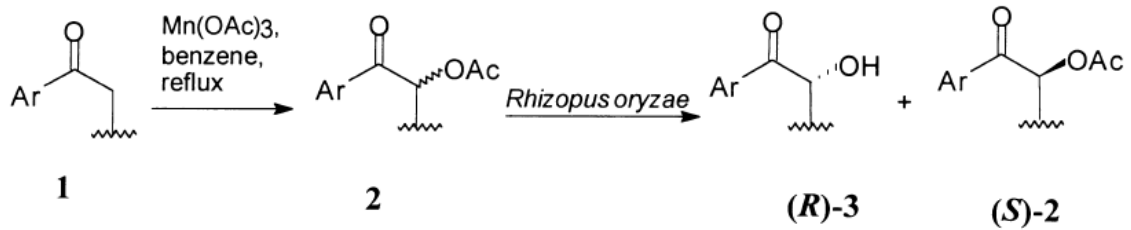
2.12.4.2 α-hidroksi ketonların hidroliz tepkimesiyle eldesi

Demir *et al.* (1998), çalışmalarında *Rhizopus oryzae* yardımıyla α-asetoksi ketonların enantiyoseçimli hidrolizi ile α-hidroksi ketonların sentezini incelemişlerdir. α-asetoksi ketonları, aromatik ketonların Mn(OAc)₃ ile oksidasyonu ile yüksek verimlilikte elde etmişlerdir. Elde ettikleri α-asetoksi ketonları kullanarak yüksek enantiyomerik aşırılıkta (*R*)-hidroksi keton üretmişlerdir.

α-asetoksi ketonların hazırlanması için ilk olarak 10 mmol mangan (III) asetat ve 2.5 mmol keton (benzoin) karışımı 50 ml benzen içinde çözülmüştür. Tepkime TLC ile takip edilmiştir. Karışım oda sıcaklığına soğutulduktan sonra etil asetatla seyreltilmiştir. 1 M HCl çözeltisi ile yıkanmış sulu NaHCO₃ ve tuzlu su ile doyurulduktan sonra susuz MgSO₄ ile kurutulmuştur.

Biyokatalizör olarak *Rhizopus oryzae* (NRRL 395) küfı kullanılmıştır. Çoğalma ortamı 15 g glukoz şurubu, 1 g (NH₄)₂SO₄, 0.3 g KH₂PO₄, 0.12 g MgSO₄ ve 0.02 g ZnSO₄ içermektedir. Bu karışım destile suyla 500 ml'ye seyreltilmiştir. Hazırlanan bu ortam 5 eşit parçaya ayrılmış ve otoklavda 15 dk boyunca sterillenmiştir. 100 ml steril ortam içeren erlenmayere asıl tabakadan sporlar aktarılmıştır. Küfler 30 °C'de 2 gün boyunca çalkalayıcıda çoğaltılmıştır. Hidroliz tepkimesi (şekil 2.26) üreme ortamında, 30°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiş ve substratı (1.7 mmol) özmek için 2 ml etanol kullanılmıştır. Tepkime TLC ile izlenmiş ve rasemik asetatın % 40-45'i hidroliz olana kadar tepkime devam etmiştir. Hidroliz süresince ortam % 10'luk CaCO₃ özeltisi ile nötralleştirilmiştir. Tepkime süzölerek sonlandırılmış, destile su ile yıkanmış ve sulu faz etilasetatla ekstrakte edilmiştir. Tepkime sonunda ise ürün ve substrat analizi NMR ve GC ile yapılmıştır.

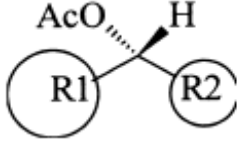
şekil 2.26'da gösterilen başlangıç tepkimesinde aromatik ketonların (1) dört aynı mangan (III) asetat ile oksidasyonu sonucu α-asetoksi ketonlar (2) yüksek verimlilikte elde edilmiştir. Devam eden araştırmalarla ilgili olarak mangan (III) asetatın kaynağının, tepkimenin yüksek verimlilikte gerçekleşmesi için çok önemli olduğunu bulmuşlardır. Bu oksidasyonda kullanılan susuz mangan (III) asetat, mangan (II) nitrat ve asetik anhidritten hazırlanmıştır ve kullanmadan önce fosfor pentaoksit kullanılarak vakum altında kurutulmuştur.



şekil 2.26 Aromatik ketonların mangan (III) asetat ile oksidasyonu ve asetoksi ketonların *Rhizopus oryzae* yardımıyla gerçekleştirdiği seçimli hidroliz tepkimesi

Farklı R₁(aril) ve R₂(alkil) gruplarına sahip aromatik asetoksi ketonların hidrolizi incelenmiştir (şekil 2.27). ee değerinin ketona bağlı alkil gruplarına göre farklılık gösterdiği gözlenmiştir (izelge 2.15). R₁ (aril) ve R₂ (alkil) gruplarının

büyükliklerinde farklılık gözlenen ketonlarda yüksek ee'ler bulunmuştur. Doğal, optikçe aktif asetatlar ile biyodönüşüm koşulları altında yapılan kontrol deneyleri, R gruplarının konfigürasyonel kararlı olduklarını ve rasemizasyonun düşük enantiyomerik aşırılığa neden olmadığını kanıtlamıştır.

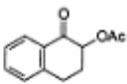
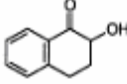
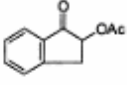
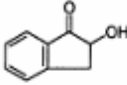
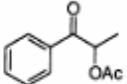
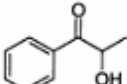
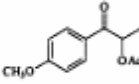
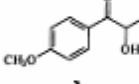
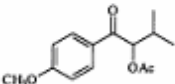
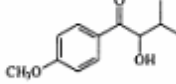
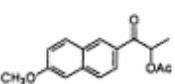
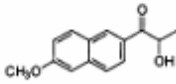
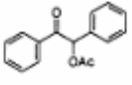
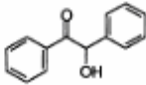


Şekil 2.27 Asetoksi keton

Enzimlerin, asetoksi grubun hidroksi gruba hidrolaz katalizli enantioseçimli hidroliziyle uyumlu bir şekilde (*R*)-enantiyomerlerini oluşturdukları gözlenmiştir.

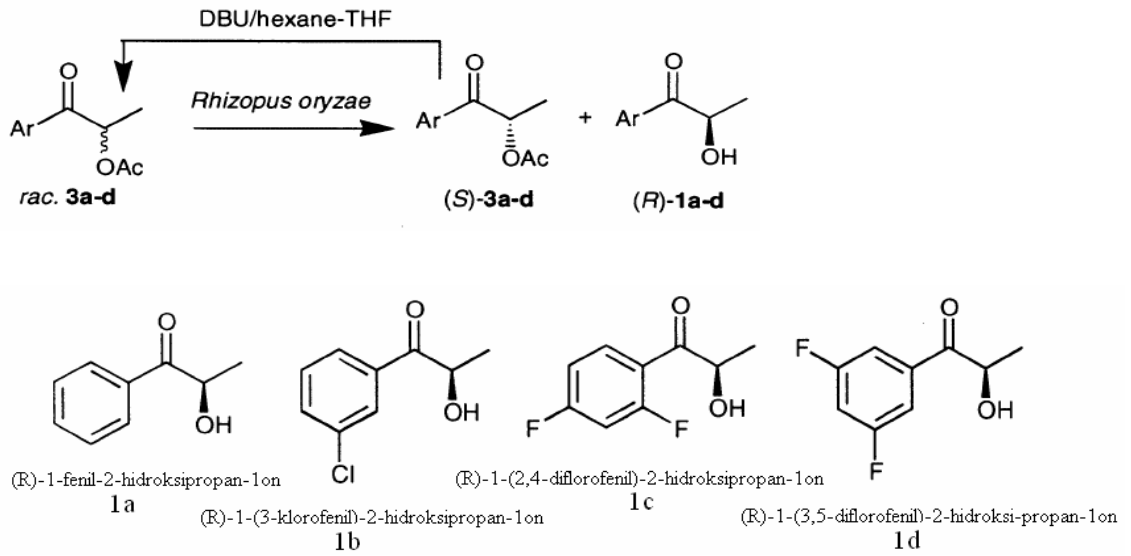
Sonuç olarak; aromatik ketonların $Mn(OAc)_3$ ile oksidasyonu ile elde edilen α -asetoksi ketonların hidrolizi ile yüksek ee'de hidroksi keton ve enantiyomerik olarak zenginleşmiş asetoksi ketonlar iyi kimyasal verimlerle üretilmiştir.

Çizelge 2.15 α -asetoksi ketonlar ve hidroliz sonucu elde edilen α -hidroksi ketonlar

Asetoksi Keton	Tep. Süre.	Verim	Hidroksi Ketonlar	Dönüşüm	Tep. Süre.	Verim	Hidroksi Keton	Asetoksi Keton	E
2	(h)	(%)	(R)-3	(%)	(h)	(%)	(R)-3 ee ^{a)} (%)	(S)-2 ee (%)	
	5	86		45	84	39	94	77	75
a			a						
	3	82		48	96	41	93	86	76
b			b						
	4	88		41	120	40	96	67	98
c			c						
	4	77		47	120	38	94	83	85
d			d						
	6	71		27	144	34	66	24	6
e			e						
	5	78		38	142	41	89	55	30
f			f						
	-	-		32	146	36	70	33	8
g			g						

a) Hidroksi ketonların enantiyomerik aşırılık değerleri, onların (S)-O-asetilaktil ester türevleri yoluyla GC (capiler kolon HP-5 çapraz bağlı %5 PhMe silikon) ve H NMR Eu(hfc)₃ ile belirlenmiştir.

Demir *et al.* (2001b), çalışmalarında propiyofenon türevlerinden yola çıkılarak farmakolojik önemi olan (R)-2-hidroksipropiyofenonların kemoenzimatik sentezini incelemişlerdir (Şekil 2.28).



Şekil 2.28 (R)-2-hidroksipropiyofenonların kemoenzimatik sentezi

Propiyofenon türevleri bupropiyon için çıkış maddeleridir. Bupropiyon, Wellbutrin® (Glaxo Wellcome) ticari adıyla satılmakta olan ve depresyon tedavisinde kullanılan ilacın etken maddesidir. Ayrıca Zyban® (Glaxo Wellcome) ticari isimli ve sigarayı bırakma tedavisinde kullanılan ilacın da etken maddesi bupropiyondur. Bunların dışında anti-depresif ve anti-bakteriyel ilaçların çıkış maddesidir.

Enzimatik hidroliz tepkimesi için ilk olarak α -asetoksi ketonlar kimyasal olarak hazırlanmıştır. Üretilen α -asetoksi keton substrat olarak hidroliz tepkimesinde kullanılmıştır.

Hidroliz tepkimesinin enantiyoseçimliliğini etkileyen enzim kaynağı incelenmiş ve *Rhizopus oryzae* mikroorganizması ile gerçekleştirilen tepkimelerde en iyi sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 2.16). Tepkimeler pH=6.0-6.5 olan ortamlarda, çözücü olarak DMSO varlığında, 30 °C’de gerçekleştirilmiştir.

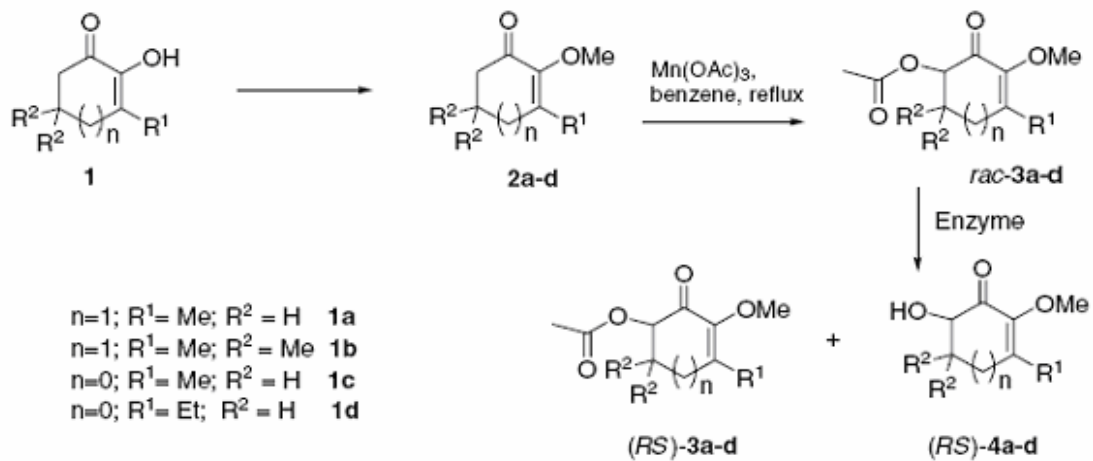
Ketonların, mangan (III) asetatla oksitlenmesini takip eden asetoksi grubun hidrolizi sonucu farmakolojik bileşikler için önemi olan hidroksi ketonlar yüksek enantiyomerik aşırılıkla elde edilmişlerdir. Bu çalışmadaki dönüşüm tepkimelerinde enzimler (R)-enantiyomeri üretmişlerdir.

Çizelge 2.16 Esterlerin mikroorganizma katalizli hidrolizi

Sıra	Substrat	Mantar	Tep. Süresi (h)	(R)-Alkol	ee (%)	Verim (%)
1	3a	<i>Rhizopus oryzae</i> (W&P G)	48	1a	92	46
2	3a	<i>Rhizopus oryzae</i> (NRRL 395)	60	1a	>99	42
3	3b	<i>Rhizopus oryzae</i> (W&P G)	64	1b	94	39
4	3b	<i>Rhizopus oryzae</i> (NRRL 395)	72	1b	>99	40
5	3c	<i>Rhizopus oryzae</i> (W&P G)	76	1c	96	36
6	3c	<i>Rhizopus oryzae</i> (NRRL 395)	92	1c	>99	37
7	3d	<i>Rhizopus oryzae</i> (W&P G)	72	1d	96	35
8	3d	<i>Rhizopus oryzae</i> (NRRL 395)	96	1d	97	34

Demir *et al.* (2006), α -hidroksi ketonlardan, farmakolojik olarak önemli olan α -asetoksi ve α -hidroksi- α -metoksi siklik ketonların her iki enantiyomerinin kemoenzimatik sentezini incelemiştir.

Başlangıç tepkimesi olarak, 2a-d ketonlarının mangan (III) asetat ile benzendeki oksidasyonu sonucu α -asetoksi ketonlar (ras-3a-d) % 88-95 verimlilikle elde edilmiştir. Elde edilen bu asetoksi ketonlar, farklı enzimlerle enantiyoseçimli hidroliz tepkimeleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.29).



Şekil 2.29 Ketonlarının mangan (III) asetat ile oksidasyonu ve asetoksi ketonların enantiyoseçimli hidroliz tepkimeleri

Enzimatik hidroliz tepkimesi için ilk olarak α -asetoksi ketonlar hazırlanmıştır. 8 mmol α,β -doymamış keton ve 12 mmol $Mn(OAc)_3$ 30 ml benzen/AcOH (10:1) içinde çözülmüş ve sürekli karıştırılmıştır. $Mn(OAc)_3$ 'ün koyu kahverengi kaybolana kadar TLC ve GC-MS ile takip edilmiştir. Karışım eter ile seyreltildikten sonra tuzlu su ile yıkanmıştır. Organik faz $MgSO_4$ ile kurutulmuş ve vakum altında uzaklaştırılmıştır. Elde edilen asetoksi ketonlar substrat olarak hidroliz tepkimesinde kullanılmışlardır. Lipaz (200-300 mg) fosfat tamponunda (pH=7, 30 ml) çözülmüştür. 3 ml çözücüye saf substrat (0.5 mmol) eklenerek hazırlanmış çözelti tampona eklenmiş ve karışım oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Dönüşüm % 50 oluncaya kadar TLC ve HPLC ile takip edilmiştir. Süzme işleminden sonra süzölmüş kısım diklormetan ile ekstrakte edilmiş, $MgSO_4$ ile kurutulmuştur.

Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesinde farklı enzimlerin enantiyoseçimliliğe etkisi incelenmiş ve Çizelge 2.17'de görüldüğü gibi enzimler ras-3a'nın hidrolizinde, pH=7'de, toluende yüksek ee değerleri göstermişlerdir.

Çizelge 2.17 3-metoksi-4-metil-2-oksosiklohex-3-enyl asetatın (ras-3a) toluendeki enzimatik hidrolizi

Sıra	Enzim	Tep. süresi	Asetat ee (%)	Alkol ee (%)	Dönüşüm (%)	E
1	<i>Aspergillus</i>	20 h	25	57	30	4.6
2	Amano PS	18 h	83	85	49	31
3	QLM	22 h	69	61	53	8.3
4	Lipase PL	22 h	70	73	49	13
5	Lipase TL	2 d	64	70	48	10
6	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	4 d	78	88	47	37
7	<i>Mucor miehei</i>	8 d	85	90	49	51
8	<i>Rhizopus arrhizus</i>	10 d	59	75	44	12
9	Porcine Pancrease	7 d	88	83	51	31
10	<i>Candida cylindracea</i>	4 d	97	86	53	55
11	Lipase AL	10 d	66	68	49	10

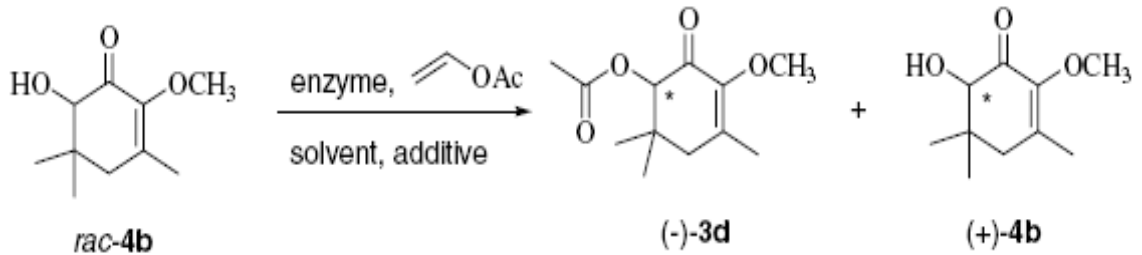
Asetoksi keton ras-3b'nin enantiyoseçimli hidrolizi için farklı pH'larda (5,7,9) ve çözücülerde (toluen, THF, asetonitril, DMSO) bir seri enzim denemesi yapılmıştır. Çizelge 2.18'de görüldüğü gibi sadece toluen ve DMSO pH=7'de hidroksi ketonlar

(ee=% 60-99) için yüksek enantiyomerik aşırılık değerleri vermiştir. *Aspergillus*, hidroksi ketonlar için yüksek enantiyomerik aşırılık göstermiştir.

Çizelge 2.18 3-metoksi-4,6,6-trimetil-2- oxosiklohex-3-enyl asetatın (ras-3b) enzimatik hidrolizi

Sıra	Enzim	Tep. Süresi (d)	Çözücü	pH	Dönüşüm (%)	Asetat ee (%)	Alkol ee (%)	E
1	Hog pancrease	32	DMSO	7	40	48	72	9.8
2	<i>Rhizopus niveus</i>	42	DMSO	7	37	35	60	5.6
3	<i>Rhizopus niveus</i>	15	THF	7	-	-	-	-
4	<i>Rhizopus niveus</i>	15	CH ₃ CN	7	-	-	-	-
5	<i>Aspergillus</i>	15	DMSO	7	13	11	76	8.2
6	<i>Aspergillus</i>	15	THF	7	-	-	-	-
7	<i>Aspergillus</i>	15	CH ₃ CN	7	-	-	-	-
8	<i>Aspergillus</i>	5	Toluen	7	42	73	>99	>200
9	<i>Aspergillus</i>	18	Toluen	5	27	31	83	14
10	<i>Aspergillus</i>	20	Toluen	9	51	78	74	15

Daha sonra ras-4b'nin farklı koşullar altındaki transesterleşmesi incelenmiştir. Bunun için karışmakta olan 10 ml hegzan içine 6-hidroksi-2-metoksi-3,5,5-trimetilsiklohex-2-en-1-one (ras-4b) (0.5 mmol), vinil asetat (10 mmol) ve 2.5 mmol 4-Dimetilamino piridin (DMAP, organik katalizör) eklenerek karıştırma işlemine oda sıcaklığında devam edilmiştir. Tepkime, % 50 dönüşüm elde edilene kadar TLC ile takip edilmiştir. Süzme işleminden sonra süzöntü diklormetan ile ekstrakte edilmiş MgSO₄ ile kurutulmuştur. Şekil 2.30'da görüldüğü gibi ras-4b'nin asimetrik transesterleşmesi çeşitli çözücülerde (DMSO, toluen, asetonitril, hegzan) ve çözücüsüz ortamda farklı lipazlarla gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.30 Metoksi ketonların enantiyoseçimli transesterleşmesi

Transesterleşme tepkimesinde sadece Lipase TL DMAP varlığında reaktivite göstermiştir (Çizelge 2.19).

Çizelge 2.19 6-hidroksi-2-metoksi-3,5,5-trimetilsiklohex-2-en-1-one (ras-4b)'ın transesterleşmesi

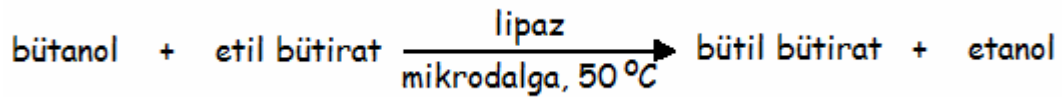
Enzim	Çözücü	Additive	Tep. Süresi (d)	Asetat ee (%)	Alkol ee (%)	Dönüşüm (%)	E
Lipase TL	Hegzan	DMAP _(oda sic.)	2	76	91	54	22
Lipase TL	Hegzan	DMAP(5°C)	4	57	94	62	12
Lipase TL	Hegzan	DMAP	2	73	93	56	21

Sonuçlar gösteriyor ki; 1,2-diketonların mangan (III) asetat ile asetillenmesini izleyen asetoksi grupların enzim katalizli hidrolizi ile yüksek enantiyomerik aşırılık değerinde (% 99'un üzerinde) hidroksi ketonlar ve asetoksi ketonlar elde edilmiştir. Siklik hidroksi ketonların sentezinde yeni bir yöntem olarak bu metod geliştirilmiştir.

2.12.5 Mikrodalga etkisi

2.12.5.1. Mikrodalga ile ısıtmanın reaksiyon hızı üzerindeki etkisi

Parker *et al.* (1996) çalışmalarında, organik ortamda gerçekleştirdikleri lipaz katalizli transesterleşme tepkimesinin tepkime hızına mikrodalga ile ısıtmanın etkisini incelemişlerdir. Mikrodalga'nın etkisinin incelendiği Şekil 2.31'deki tepkime, bütanol ve etil bütirat arasındaki lipaz katalizli transesterleşme tepkimesidir.



Şekil 2.31 Bütanol ve etil bütirat arasındaki lipaz katalizli transesterleşme tepkimesi

Tepkime farklı sıcaklıklarda ve farklı su aktivitelerinde hem konvansiyonel hem de mikrodalga ısıtma ile gerçekleştirilmiştir.

Kütinaz enzimi çözücüler (etil bütirat ve bütanol) içinde belli bir süre bekletilmiştir. Her iki çözücü ve enzim aynı a_w değerine dengelenmiştir. Tepkime karışımı sırasıyla 50°C’de mikrodalga reaktörde ve devamında ceketli cam reaktörde aynı sabit sıcaklıkta ısıtılmıştır. Transesterleşmenin ilerlemesi gaz kromatografi ile izlenmiştir.

0.58 ve 0.69 su aktivitelerinde enzim-substrat karışımına mikrodalga etkisi transesterleşme katalitik hızını 2-3 kat arttırmıştır. Su aktivitesi 0.97’ye çıkarıldığında ise ters bir etki oluşarak mikrodalga ile ısıtma klasik ısıtmaya göre belirgin şekilde daha düşük reaksiyon hızları ile sonuçlanmıştır (Çizelge 2.20).

Çizelge 2.20 Lipaz katalizli transesterleşme reaksiyonunda farklı sıcaklık ve su aktivitelerinde konvansiyonel ısıtma ve mikrodalga destekli ısıtmanın hız üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması

Su aktivitesi, a_w	T, °C	Isıtma metodu	Hız, $\mu\text{mol}/(\text{dk.mg.ml})$
0.58 ⁺	50	Klasik	1.23
0.58 ⁺	50	Mikrodalga	2.94
0.58	60	Klasik	2.45
0.58	60	Mikrodalga	5.64
0.58	70	Klasik	6.37
0.58	70	Mikrodalga	14.9
0.97	60	Klasik	6.37
0.97	60	Mikrodalga	2.94

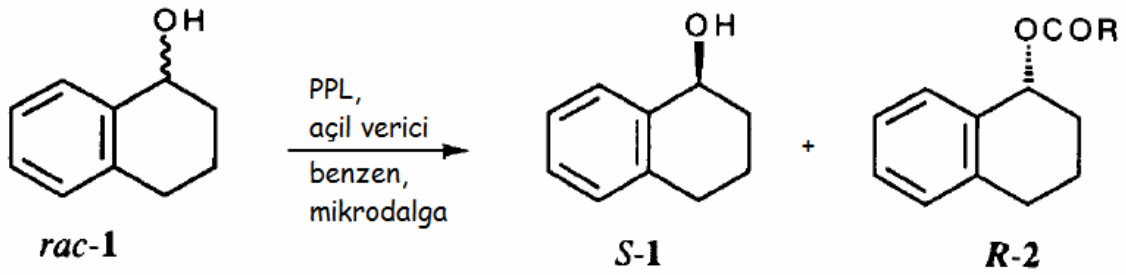
⁺ Bütanol yerine 1-pentanol kullanılmıştır.

2.12.5.2 Mikrodalğanın hız ve enantiyoseçimliliğe etkisi

Lin and Yuan Lin (1998) çalışmalarında, PPL (Porcine pancreatic lipase) katalizli iki farklı tepkimenin mikrodalga destekli ısıtılması ile mikrodalğanın hem hız hem de

enantiyoseçimlilik üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Bu tepkimeler, (ras)-1,2,3,4-tetrahidro-1-naftol'ün ve (ras)-1-indanol'ün lipaz katalizli açılmesidir.

(ras)-1,2,3,4-tetrahidro-1-naftol'den (ras-1) yola çıkılarak (R)-1,2,3,4-tetrahidro-1-naftol'ün (R-1) PPL katalizli açılmesi ile (R)-1,2,3,4-tetrahidro-1-naftilaçilat (R-2) ve (S)-1,2,3,4-tetrahidro-1-naftol (S-1) yüksek stereoseçimlilikle üretilmiştir (Şekil 2.32).



Şekil 2.32 1,2,3,4-tetrahidro-1-naftol'ün lipaz katalizli mikrodalga ışınlam ile açılmesi

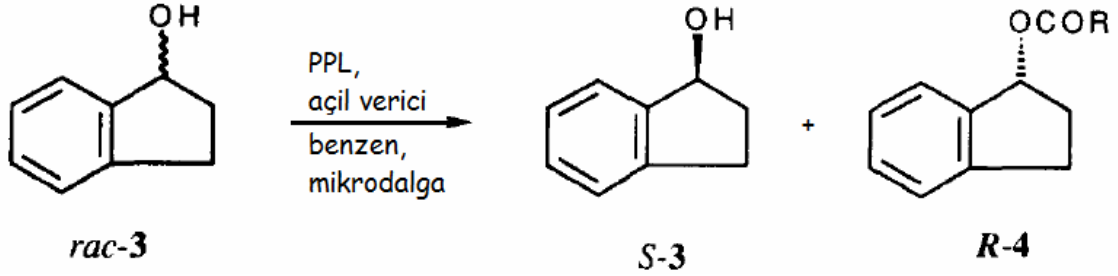
Çizelge 2.21'de görüldüğü gibi farklı açıl vericiler kullanılarak, mikrodalga etkisi altında tepkime hızları 4-6 kat, stereoseçimlilik 3-9 kat artmıştır (ultrasonik koşullardaki gibi).

Çizelge 2.21 (ras)-1,2,3,4-Tetrahidro-1.Naftol'ün lipaz katalizli açılma tepkimesinde mikrodalga'nın tepkime hızı ve enantiyoseçimlilik üzerindeki etkisi

Tepkime koşulu	Açıl verici	% ee (S-1) ^a	% ee (R-2) ^a	dönüşüm %	E ^b
Kontrol, 25°C	Vinil asetat	43	85	33	19
MW, ^c 35°C	Vinil asetat	28	98	22	142
Kontrol, 25°C	Vinil bütirat	94	90	51	64
MW, ^c 35°C	Vinil bütirat	44	98	31	196
Kontrol, geri akım ^d	Palmitik asit	65	78	45	16
MW, ^e geri akım	Palmitik asit	54	97	36	117
Kontrol, geri akım ^d	Palmitik anhidrit	47	85	35	20
MW, ^e geri akım	Palmitik anhidrit	33	98	25	174

a. %ee, %ee=OS-(1-OS) (OS; optikçe saflık) formülü ile hesaplanmıştır. b. Enantiyomerik oran. c. Zayıf mikrodalga ışınlamı (her 30 s'de 10s puls etki). d. Bir Dean-Stark kazan ile geri akım. e. Güçlü mikrodalga ışınlamı (sürekli).

(ras)- 1-indanol'ün (ras-3) PPL katalizli açılmasında ise (R)-1-indanilaçilat (R-4) ve S-3 elde edilmiş ve enantiyoseçimlilik 3-5 kat artarken tepkime hızı 1-14 kat artmıştır (Şekil 2.33).



Şekil 2.33 1-indanol'ün lipaz katalizli mikrodalga ışınlama ile açılması

Deney aynı şekilde farklı açıl vericiler ile mikrodalga etkisi altında gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Çizelge 2.22'de görülmektedir.

Çizelge 2.22 1-indanol'ün lipaz katalizli açılma tepkimesinde mikrodalganın tepkime hızı ve enantiyoseçimliliğe etkisi

Tepkime koşulu	Açıl verici	% ee (S-1) ^a	% ee (R-2) ^a	dönüşüm %	E ^b
Kontrol, 25°C	Vinil asetat	57	94	38	54
MW, ^c 35°C	Vinil asetat	38	99	28	265
Kontrol, 25°C	Vinil bütirat	73	88	46	34
MW, ^c 35°C	Vinil bütirat	81	95	46	96
Kontrol, geri akım ^e	Palmitik asit	88	88	50	45
MW, ^f geri akım	Palmitik asit	77	97	44	166
Kontrol, geri akım ^e	Palmitik anhidrit	52	93	36	50
MW, ^f geri akım	Palmitik anhidrit	33	98	25	159

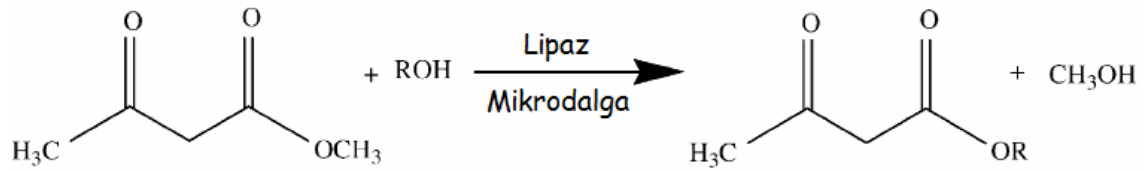
a. %ee, %ee=OS-(1-OS) (OS; optikçe saflık) formülü ile hesaplanmıştır. b. Enantiyomerik oran. c. Zayıf mikrodalga ışınlama (her 30 s'de 10s puls etki). d. Lin et al. (1995). e. Bir Dean-Stark kazan ile geri akım. f. Güçlü mikrodalga ışınlama (sürekli).

Mikrodalga ile ısıtma, fonksiyonel gruplar tarafından enerjinin absorpsiyonunu içerir. Bu enerji absorpsiyonu fonksiyonel grupların çevredeki reaktantlara karşı daha yüksek bir reaktivite göstermesine neden olur. Sonuç olarak; tepkimelerdeki hız artışının alkol

substratların mikrodalga enerjisini absorplayarak aşırı derecede aktif olması veya yerel yüksek basınç ve katalizörün kullanılabilir yüzey alanındaki artış olduğu, enantiyoseçimlilik artışının ise reaktif alkol substratlarının aktivasyonundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

2.12.5.3 Mikrodalga'nın dönüşüme etkisi

Yadav and Lathi (2004) çalışmalarında, mikrodalga'nın dönüşüm üzerindeki etkisini incelemek amacıyla metil asetoasetatın farklı alkoller ile lipaz katalizli (Novozym 435) transesterleşme tepkimesini gerçekleştirmiştir (Şekil 2.34).



Şekil 2.34 l-indanol'ün lipaz katalizli mikrodalga ışınlam ile açillenmesi

Farklı alkoller ile aynı tepkime süresi, aynı katalizör yüklemesi ve aynı sıcaklıklarda konvansiyonel ve mikrodalga destekli ısıtma ile deneyler yapılmış ve dönüşüm üzerindeki etkiler incelenmiştir.

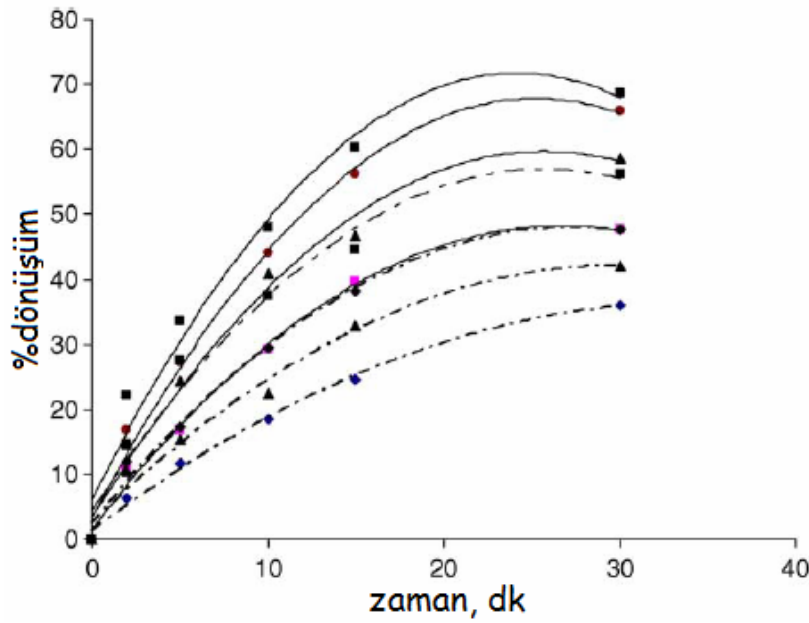
Alkol olarak lineer (*n*-propanol, *n*-bütanol, *n*-pentanol, *n*-hegzanol, *n*-oktanol ve *n*-dekanol) ve sekonder (2-propanol, 2-bütanol ve 2-pentanol) alkoller kullanılmıştır. Tüm dönüşümler mikrodalga altında, konvansiyonel ısıtmaya oranla tüm alkollerde daha yüksek çıkmıştır (Çizelge 2.23). Bu da, bu etkinin sadece termal bir etki olamayacağını göstermektedir. Her iki ısıtmada da lineer alkollerin zincir uzunluğu arttıkça tepkime hızları azalmıştır. Aynı sonuç sekonder alkollerde de görülmüştür.

Çizelge 2.23 Metil asetoasetat'ın enzim katalizli (Novozym 435) transesterleşme tepkimesinde dönüşüm üzerinde enzim katalizi ve mikrodalga'nın birlikte etkisi

Alkol	Zaman (dk)	Katalizör miktarı (w/w)	Sıcaklık (°C)	Dönüşüm (%)	
				Mikrodalga	Konvansiyonel
1-propanol	60	3	50	74	57
1-bütanol	60	3	50	72	53
1-pentanol	60	3	50	66	42
1-hegzanol	60	3	50	61	34
1-oktanol	60	3	50	55	17
1-dekanol	60	3	50	33	9
2-propanol	60	3	50	68	48
2-bütanol	60	3	50	64	43
2-pentanol	60	3	50	57	38

DeneySEL koşullar: 0.01 mol metil asetoasetat, 0.01 mol alkol, 10 ml toluen, 300 rpm

Ayrıca mikrodalga etkisi altında ve konvansiyonel ısıtma ile metil asetoasetat'ın *n*-bütanol'e mol oranının dönüşümüne etkisi de incelenmiştir. metil asetoasetat'ın *n*-bütanol'e mol oranı 1:1'den 2.5:1'e arttıkça dönüşüm değerleri de mikrodalga altında % 47'den % 69'a, mikrodalga olmadan % 36'dan % 56'ya artmıştır. Elde edilen değerler Şekil 2.35'te görülmektedir. Bu sonuçlar gösteriyor ki; reaktantların yüksek derişiminin dönüşümüne yan etkisi yoktur ve enzim ile mikrodalga arasında dönüşüm üzerine ortak bir işbirliğinin vardır.



n-bütanol: 0.01 mol, Çözücü: toluen 10 ml, 300 rpm, Sıcaklık: 50°C, Metil Asetoasetat: (♦) 0.01, (▲) 0.015, (●) 0.02, (■) 0.025, (—) microwave irradiation, (- - -) conventional heating

Şekil 2.35 Metil asetoasetat'ın *n*-bütanol'a mol oranının ve mikrodalga'nın dönüşüme etkisi

Bunun yanında mikrodalga için başlangıç aktivitesindeki artış, konvansiyonel ısıtma ile karşılaştırıldığında 2.2-4.6 kat daha fazladır. Derişim-zaman profillerine ve başlangıç hız verilerine bağlı olarak bir kinetik model oluşturulmuş ve mikrodalga etkisi altındaki enzim katalizli reaksiyonlara en çok uyanın Ping-Pong Bi-Bi mekanizması olduğu görülmüştür.

2.12.6 Ses ötesi dalgaların etkisi

Günümüzde enantiyomerik saflıkta ilaç üretim yöntemleri ile ilgili araştırmalar yoğun bir şekilde ilerlerken, bu tepkimelere ses ötesi dalgaların etkisini inceleyen çalışmalar da devam etmektedir. Bu çalışmalar arasında biyokimyasal katalizör kullananlara rastlanmamakla birlikte kimyasal katalizör varlığında gerçekleştirilen ve enantiyomerik saflıkta madde üretimini hedefleyen çalışmalar bulunmaktadır.

Török *et al.* 1997 etil piruvatın etil laktata enantiyoseçimli hidrojenasyonunu platin katalizörler (Pt/C, Pt/SiO₂ ve Pt/K-10) varlığında gerçekleştirilmiştir. Tepkimeden önce

katalizörler ultrasonik banyoda (20 kHz, 30 W) 30 dk tutularak önışlem uygulanmış, ses ötesi dalgaların katalitik aktivite ve enantiyoseçimliliğe etkisi incelenmiştir.

Tepkimeler her bir katalizör için önışlem uygulanmış ve uygulanmamış olarak etanol ve toluen çözücülerıyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 2.24'te görünmektedir.

Çizelge 2.24 Etil piruvatın farklı platin katalizörlerle normal koşullar ve ses ötesi dalgalarla enantiyoseçimli hidrojenasyonu

Katalizör	Çözücü	% verim (süre)		% ee	
		normal	SÖD	normal	SÖD
% 5 Pt/C	Etanol	95 (73 dk)	95 (58 dk)	20.2	23.2
	Toluen	100 (65 dk)	100 (45 dk)	30.5	31.7
% 3 Pt/SiO ₂	Etanol	95 (600 dk)	100 (52 dk)	20.2	34.2
	Toluen	95 (73 dk)	100 (110 dk)	24.8	50.5
% 5 Pt/K-10	Etanol	74 (960 dk)	93 (210 dk)	23.0	40.4
	Toluen	46 (720 dk)	100 (320 dk)	25.3	44.1

Ultrasonik önışlemin, tüm katalizörlerle enantiyoseçimliliği ve dönüşümü arttırırken tepkime süresini de kısalttığı görülmüştür. Pt/K-10 katalizörü ile tepkime süresinin 4.5 kat kısaldığı ve enantiyomerik aşırılığın % 25'den % 44'e yükseldiği görülmüştür. Buradaki ses ötesi dalgaların etkisinin, destek maddesi olarak kilin (K-10) kullanıldığı katalizörde lameller arası boşluktan metal taneciklerinin yüzeye aktarılması ve metal yüzeyden safsızlıkların giderilmesiyle daha etkin bir katalizör aktivitesinin sağlandığı belirtilmektedir.

Toukoniitty *et al.* 2006 1-fenil-1,2-propandionun platin katalizör varlığında enantiyoseçimli hidrojenasyonunu ses ötesi dalgalar varlığında gerçekleştirmişlerdir. Başlangıç tepkime hızı ve enantiyoseçimliliğe katalizör destek türü, katalizöre uygulanan önışlemler, çözücü türü ve ultrasonik gücün etkisi incelenmiştir. Deneyler, 20 kHz'lik prob ses ötesi dalgaların ile katalizör üzerine önışlem uygulaması ve tepkime ortamına uygulanması ile gerçekleştirilmiştir. Katalizöre önışlem uygulamanın

başlangıç hızı ve enantiyoseçimliliğe etkisi Pt/Al₂O₃ katalizörü ile incelenmiştir. Katalizörlere, hidrojen akışı etkisinde 400°C’de 2 saat ve 170°C’de 1 saat boyunca önişlem uygulanmış ve tepkime sıcaklığına soğutularak hidrojenasyon tepkimesinde kullanılmışlardır. Çizelge 2.25’te görüldüğü gibi katalizöre önişlem uygulamak başlangıç tepkime hızını ve enantiyomerik aşırılığı arttırmıştır.

Çizelge 2.25 Başlangıç hidrojenasyon hızı ve enantiyoseçimliliğe, Pt/Al₂O₃ katalizörüne uygulanan önişlemin etkisi (% 50 dönüşümdeki ee değeri)

Çözücü	Başlangıç tepkime hızı, mol/Lg _{kat} dk		% ee	
	normal	SÖD	normal	SÖD
Önişlemsiz	6.3*10 ⁻³	7.5*10 ⁻³	22	23
1h 170°C	5.6*10 ⁻³	6.8*10 ⁻³	24	29
2h 400°C	4.5*10 ⁻³	5.3*10 ⁻³	45	47

Başlangıç tepkime hızı ve enantiyoseçimliliğe, farklı buhar basıncına sahip çözücülerin (metil asetat, toluen ve mesitilen) etkisi incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 2.26’da verilmiştir. Burada katalizör olarak Pt/SF (silika fiber) ve Pt/Al₂O₃ kullanılmıştır. Kullanılan çözücü türüne göre başlangıç hızının ve enantiyomerik aşırılığın çok az arttığı görülmektedir.

Çizelge 2.26 Başlangıç hidrojenasyon hızı ve enantiyoseçimliliğe, Pt/SF ve Pt/Al₂O₃ katalizörlüğünde, kullanılan çözücülerin etkisi (% 15 dönüşümdeki ee değeri)

Çözücü	Başlangıç tepkime hızı, mol/Lg _{kat} dk		% ee	
	normal	SÖD	normal	SÖD
Pt/SF				
Metilasetat	1.6*10 ⁻³	2.1*10 ⁻³	41	39
Toluen	2.6*10 ⁻³	3.3*10 ⁻³	17	34
Mesitilen	0.3*10 ⁻³	1.3*10 ⁻³	35	55
Pt/Al₂O₃				
Metilasetat	3.0*10 ⁻³	2.9*10 ⁻³	49	45
Toluen	4.5*10 ⁻³	5.3*10 ⁻³	45	47
Mesitilen	1.7*10 ⁻³	2.0*10 ⁻³	54	50

Katalizörlerdeki metal tanecik boyutları TEM (Transmission Electron Microscopy) analizleriyle ölçülmüş ses ötesi dalga önışlemi ile çok fazla bir değışiklik olmadığı gözlenmiştir. Katalizör önışleminin enantiyomerik aşırılık ve başlangıç hızını etkilediğı belirtilmektedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Enzimler

Bu yüksek lisans çalışmasında farklı firmalardan temin edilmiş aşağıdaki altı adet lipaz kullanılmıştır.

1. *Rhizopus arrhizus* (Fluka 62305)
2. *Candida rugosa* (Fluka 90860)
3. Novozym 435 (*Candida antarctica* Lipaz B) (Novozymes LC 200207)
4. Lipozyme RM IM (Novozymes LUX 00205)
5. Porcine Pancreas Lipase (Fluka 62300)
6. Amano Lipase AK (*Pseudomonas cepacia*) (Aldrich 534730)

3.1.2 Mikroorganizma

Rasemik benzoin asetatın lipaz katalizli hidroliz tepkimesi ile optikçe aktif benzoin üretilen deneylerde referans olarak alınan Demir *et al.* (1998) çalışmasında lipaz kaynağı olarak *Rhizopus oryzae* (NRRL 395) mikroorganizması kullanılmıştır. ee(P) değerlerini iyileştirmek amacıyla yapılan deneyler, Central Bureau voor Schimmelcultures Baarn Holland'dan temin edilen *Rhizopus oryzae* (CBS 111718) mikroorganizması kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.1.3 Kimyasallar

Lipaz katalizli kinetik rezolüsyonda kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta olup Sigma, Riedel ve Merck'ten temin edilmiştir. Kullanılan kimyasalların isimleri ve bazı özellikleri Ek 1'de verilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Benzoin asetatın kimyasal üretimi

Rasemik benzoinde kimyasal yöntemlerle rasemik benzoin asetat üretilmiştir (Erdik vd. 1987). 2 g rasemik benzoin, 2 ml asetanhidrit ve 2 ml buzlu asetik asit içinde karıştırılarak çözülmüştür. Karışıma yavaşça 2 ml derişik H_2SO_4 katılmıştır. Benzoinin hızla çözülmesiyle sıcaklık yükselmiştir. Isınan karışım $55^{\circ}C$ 'deki su banyosunda 20 dk bekletilmiştir. Soğuyunca damlatma hunisi yardımıyla hızla karışmakta olan 50 ml suya yavaş yavaş damlatılmıştır. Karıştırma işlemine 1 saat kadar devam edilmiştir. Karışım tromptan süzölmüş ve kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan kristallere 8 ml etanol katılarak $60^{\circ}C$ 'ye ısıtılmıştır. Karışım sıcakken tromptan süzölmüş ve üretilen benzoin asetat kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan rasemik benzoin asetat, optikçe aktif benzoin üretimi için yapılan hidroliz tepkimesinde substrat olarak kullanılmıştır.

3.2.2 Rasemik benzoin asetatın hidrolizi

Rasemik benzoin asetatdan lipaz katalizli hidroliz tepkimesi ile optikçe aktif benzoin üretilen deneylerde referans olarak Demir *et al.* (1998) çalışması alınmıştır. İlk olarak 510 mg rasemik benzoin asetat 3 ml DMSO'da çözülmüştür. Bu karışımın 150 μl 'si 5 ml pH=6 olan (pH etkisinin incelendiği deneyler dışındaki deneylerde) fosfat tamponu içeren tepkime kabına (25 ml'lik vida kapaklı cam şişe) ilave edilmiş ve 50 mg enzim eklenerek tepkimeler başlatılmıştır. Tepkimeler belirli sürelerde kaba süzgeç kağıdından süzölerek sonlandırılmıştır. Süzöntü etil asetatla 1:1 (v/v) oranında iki kez ekstrakte edilmiştir. Ekstraktın içinde kalmış olan suyu tutması için bir miktar $MgSO_4$ eklenmiş ve karışım tekrar süzölmüştür. Elde edilen süzöntünün üzerinden hava geçirilerek çözücü faz uzaklaştırılmıştır. Çözücü fazı uzaklaştırılmış tepkime kabına 2 ml kloroform ekleyip ürün tamamen çözüldükten sonra filtreden süzerek HPLC analizi için vialle doldurulmuştur. Deneyler, sıcaklık etkisinin incelendiği deneyler dışında $30^{\circ}C$ sıcaklıktaki ve karıştırma hızının etkisinin incelendiği deneyler dışında 200 rpm karıştırma hızındaki orbital çalkalayıcıda (Heidolph Incubator 1000) gerçekleştirilmiştir.

3.2.3 Mikrodalga deneyleri

Rasemik benzoin asetatın hidroliz tepkimesi, 5 ml hacimli, içinde magnetik karıştırıcı olan ağız kapaklı tepkime kabında, hava soğutmalı Biotage Initiator mikrodalga sentez sisteminde (400 Watt magnetron) gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Deneylerde kullanılan Biotage Initiator mikrodalga sistemi

Mikrodalga cihazının özel tepkime kabına 50 mg enzim koyulmuş ve daha sonra 5 ml hacmindeki ve pH=6 olan (pH etkisinin incelendiği deneyler dışındaki deneylerde) fosfat tamponu dikkatli bir şekilde tepkime kabına eklenmiştir. 510 mg rasemik benzoin asetat 3 ml DMSO'da çözülmüş ve bu karışımın 150 µl'si tepkime kabına ilave edilmiştir. Tepkime kabının kapağı kapatılarak mikrodalga cihazına yerleştirilmiştir. Uygulanacak mikrodalga süresi, sıcaklık ve tepkime kabının hacmi girilerek deney başlatılmıştır. Girilen sürenin sonunda tepkime kabının kapağı açılmış, ürün ile enzim süzülerek ayrılmış, süzüntü etil asetatla 1:1 (v/v) oranında iki kez ekstrakte edilmiştir. Ekstraktın içinde kalmış olan suyu tutması için bir miktar MgSO₄ eklenmiş ve karışım tekrar süzülmüştür. Elde edilen süzüntünün üzerinden hava geçirilerek çözücü faz uzaklaştırılmıştır. Çözücüsü uzaklaştırılan ürün 2 ml kloroform içinde çözüldükten sonra filtreden süzülerek vialle doldurulup analize hazır hale getirilmiştir.

3.2.4 Aktivite deneyleri

Lipazın aktivitesi pH-stat metodu ile ölçülmüştür. Bu metoda göre 10 ml Tris-HCl tampon çözeltisine (1 mM, pH=7.2) 50 mg enzim eklenerek karıştırılmıştır. Daha sonra

substrat olarak 200 µl tribütirin eklenerek tepkime başlatılmıştır. Tepkime, 10 dk boyunca 200 rpm karıştırma hızı ve 40 °C sıcaklıktaki orbital çalkalayıcıda gerçekleştirilmiştir. 10 dk sonunda tepkimeyi sonlandırmak için ortama, hacimce 1:1 oranda karıştırılmış etanol-aseton karışımından 10 ml eklenmiştir. Birkaç damla fenolftaleyn damlatılıp 0.1 N'lik NaOH ile titre edilmiştir. Bir ünite (µmol/dk), dakikada harcanan NaOH miktarının (µmol) üçte biridir.

3.2.5 Katı çoğalma ortamı

Rhizopus oryzae (CBS 111718) için kullanılan malt ekstrakt agar (MEA) ortamını oluşturan maddeler ve bileşimleri Çizelge 3.1'de verilmiştir. Mikroorganizmalar katı-agar ortama steril koşullarda öze ile agardan aktarıldıktan sonra 30 °C'de 3-4 gün inkübatörde (Bellco) çoğaltılmıştır. Çoğalan hücreler +4 °C'de saklanmıştır.

Çizelge 3.1 *Rhizopus oryzae* (CBS 111718) için malt ekstrakt agar (MEA) ortamı

Bileşen	Derişim, g L ⁻¹
Glukoz	20.00
Maya Özütü	20.00
Agar	20.00
Pepton	1.00

3.2.6 Spor çözeltisinin hazırlanışı

Katı çoğalma ortamında çoğaltılmış sporlar steril ortamda öze yardımıyla 15 ml steril su bulunan erlene aktarılmıştır. Erlenin ağzı sıkıca kapatılarak iyice çalkalanmıştır. Daha sonra bu solüsyon kaba süzgeç kağıdından süzölmüştür. Süzölmüş olan süspansiyon iyice karıştırıldıktan sonra 1 ml'si alınmış ve temiz bir tüpe aktarılmıştır. Steril bir pipetle sayım için hazırlanmış olan kültürden bir damla alınarak Thoma lamının sayıyla ilgili olan yerine damlatılmıştır. Thoma lamı lamel kapatılarak mikroskoba koyulmuş ve 100x objektifle sayım yapılmıştır. Başlangıç spor sayısı $5 \cdot 10^7$ olacak şekilde üretim ortamına eklenmiştir.

3.2.7 Sıvı çoğalma ortamı

Sıvı çoğalma ortamını oluşturan maddeler ve bileşimleri Çizelge 3.2’de verilmiştir. Hazırlanan spor çözeltisi pipet yardımıyla steril koşullarda 50 ml hacimli sıvı çoğalma ortamlarına aktarılmıştır. Aktarma yapıldıktan sonra hücreler, karıştırma hızı 150 rpm olan karışmalı inkübatörde (Labcon) 30 °C sıcaklıkta 2 gün boyunca çoğaltılmış ve hidroliz tepkimelerinde kullanılmıştır.

Çizelge 3.2 *Rhizopus oryzae* (CBS 111718) için sıvı çoğalma ortamı

Bileşen	Derişim, g L ⁻¹
Glukoz	20.00
Maya Özü	5.00
Sodyum Klorür	5.00
Tripton	10.00

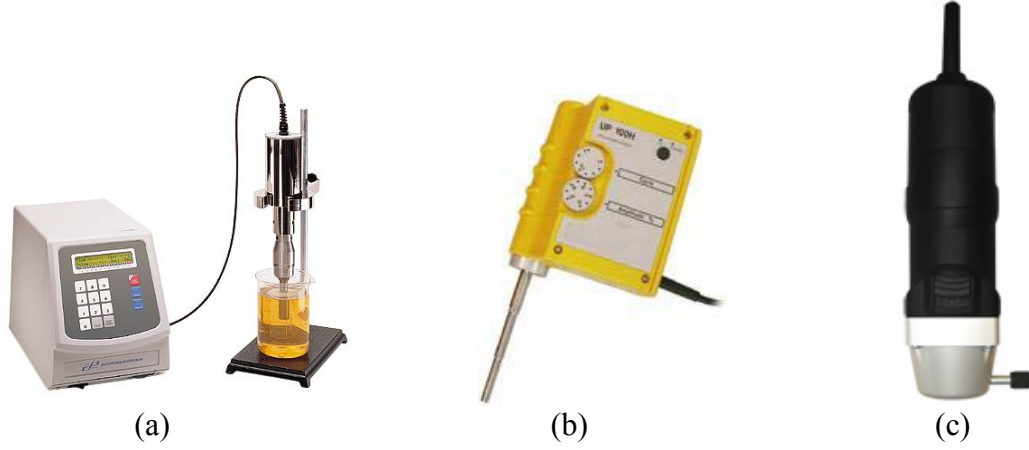
3.2.8 Mikroorganizmanın kullanıldığı deneyler

Hidroliz ve derasemizasyon tepkimeleri öncesi küfler, 100ml’lik erlenlerde, bileşiminde Çizelge 3.2’de belirtilen maddeler bulunan 50 ml sıvı ortamda 30°C ve 150 rpm’de üretilmiştir. Küfler bu koşullarda üretildikten sonra uygun koşullarda homojen hale getirilerek hidroliz ve derasemizasyon tepkimelerinde kullanılmıştır.

3.2.9 Ses ötesi dalganın (SÖD) uygulandığı deneyler

Rasemik benzoin asetatın lipaz katalizli hidroliz tepkimesi ile optikçe aktif benzoin üretilen deneylerde ilk olarak çoğaltılan *Rhizopus oryzae* (CBS 111718) mikroorganizması 20 kHz’lik (Cole Parmer Ultrasonic Homogenizer, 750W, 20kHz, 13mm prob çapı, Şekil 3.2.a), 30 kHz’lik (Hielscher Ultrasound Technology UP100H, 100W, 30kHz, Şekil 3.2.b) ve mekanik (Micra D-9, 850W, 11.000-39.000 devir/dk, Şekil 3.2.c) homojenizerler kullanılarak parçalanmıştır. 3 ml DMSO’da çözölen 510 mg rasemik benzoin asetatın 150 µl’si 5 ml homojen hale getirilmiş mikroorganizma içeren tepkime kabına ilave edilerek tepkimeler başlatılmıştır. Süzöntü etil asetatla 1:1 (v/v)

oranında iki kez ekstrakte edilmiştir. Ekstraktın içinde kalmış olan suyu tutması için bir miktar $MgSO_4$ eklenmiş ve karışım tekrar süzölmüştür. Elde edilen süzöntünün üzerinden hava geçirilerek çözücü faz uzaklaştırılmıştır. Deneyler, 30°C sıcaklıktaki ve 200 rpm karıştırma hızındaki orbital çalkalayıcıda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2 Deneylerde kullanılan parçalayıcılar
(a) Cole Parmer Ultrasonic Homogenizer (b) Hielscher Ultrasound Technology UP100H (c) Micra D-9 Mekanik Homojenizer

3.2.10 HPLC analizleri

Analizler, Çizelge 3.3'te özellikleri ve analiz koşulları belirtilen yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. (*R*) ve (*S*)-benzoin pikleri ve toplam asetat piki kullanılarak dönüşüm, enantiyomerik aşırılık ve enantiyomerik oran değerleri hesaplanmıştır. Örnek bir kromatogram Ek 2'de verilmiştir.

Çizelge 3.3 HPLC analiz koşulları

HPLC	Kolon	Çözücü	Akış Hızı	Enjeksiyon Hacmi	Kolon Sıcaklığı	UV Dedektör Dalga Boyu
Spectra SYSTEM	Chiralcel OB	n-hegzan / 2-propanol : 95 / 5	0,9 ml/dk	10 µL	30 °C	254 nm

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

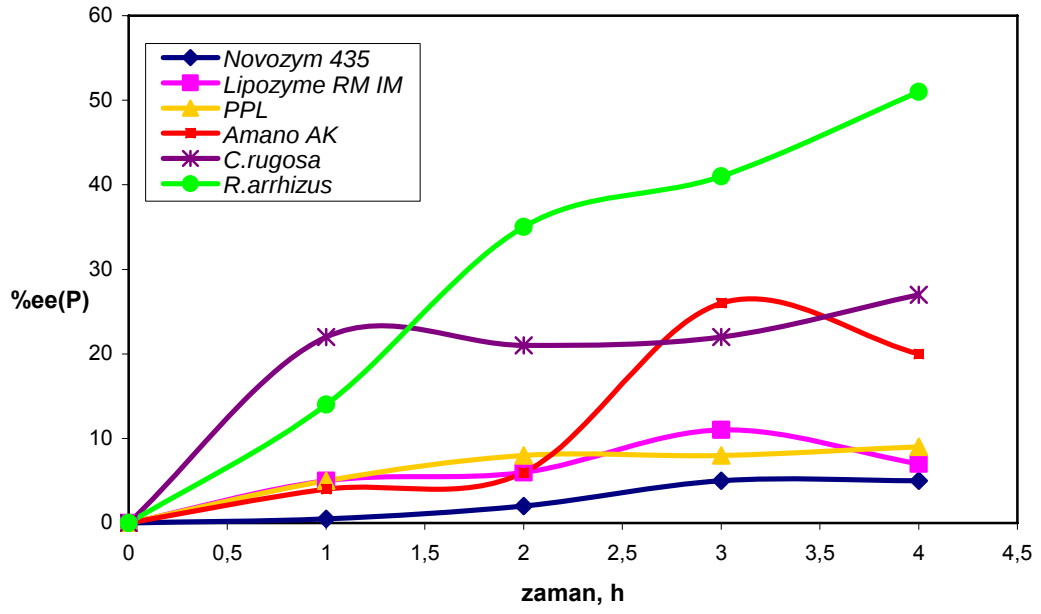
4.1 Rasemik Benzoin Asetatın Lipaz Katalizli Kinetik Rezolüsyonu

4.1.1 Enzim türünün etkisi

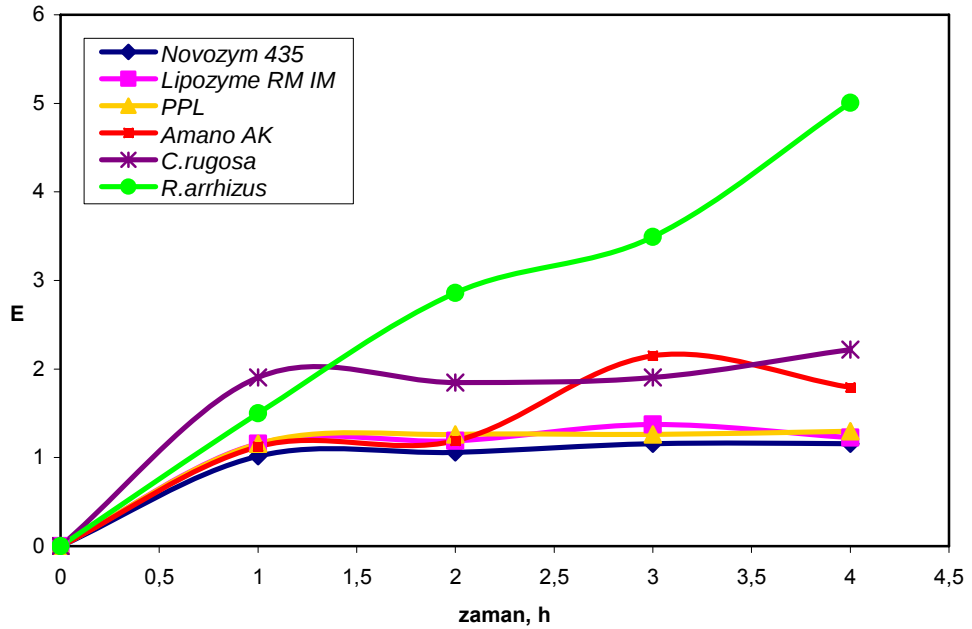
Optikçe saf benzoin üretimine enzim türünü etkisini incelemek amacıyla, Novozym 435 (13.3 U), Lipozyme RM IM (1 U), PPL (11 U), Amano Lipaz AK (9.3 U), *Candida rugosa* (12 U) ve *Rhizopus arrhizus* (10 U) lipazları varlığında rasemik benzoin asetatin hidroliz tepkimesi gerçekleştirilmiştir. Deneyler literatürde bu tepkime için optimum başlangıç pH'ı olarak verilen pH=6 değerinde ve 30°C sıcaklıkta (Demir *et al.* 1998) gerçekleştirilmiş ve sonuçlar 2 deneyin ortalaması alınarak verilmiştir.

510 mg rasemik benzoin asetat suda çözünmediği için 3 ml DMSO'da çözülmüştür. Bu karışımın 150 µl'si (20 mM) 5 ml pH=6 olan fosfat tamponu içeren tepkime kabına ilave edilmiş ve 50 mg enzim eklenerek tepkimeler başlatılmıştır. Deneyler 30°C sıcaklıktaki ve 200 rpm karıştırma hızındaki orbital çalkalayıcıda gerçekleştirilmiştir. Tepkimeler belirli sürelerde kaba süzgeç kağıdından süzülerek sonlandırılmıştır. Süzüntü etil asetatla 1:1 (v/v) oranında iki kez ekstrakte edilmiştir. Ekstrakta bir miktar MgSO₄ eklenmiş ve karışım tekrar süzölmüştür. Elde edilen süzüntünün üzerinden hava geçirilerek çözücü faz uzaklaştırılmıştır. Çözücü fazı uzaklaştırılmış tepkime kabına 2 ml kloroform ekleyip ürün tamamen çözüldükten sonra filtreden süzerek viallere doldurulmuş ve Chiralcel OB kolonda analizlenmiştir. Kullanılan bütün enzimlerin (S)-benzoin asetata karşı seçici olduğu görülmüştür. Tepkime sonunda (S)-benzoin oluşmuştur.

Zamanla alınan örnekler analizlenerek hesaplanan ee(P) ve E değerleri grafiğe geçirilmiş, Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Yapılan analizler sonucu hemen hemen her enzimle gerçekleştirilen tepkimenin 4. saatte yaklaşık % 50 dönüşüm değerine ulaştığı görülmüştür (Ek 3). Dönüşümün % 50 değerinden daha yüksek olması durumunda enzim diğer enantiyomere de etki etmeye başlayacağından enantiyomerik aşırılık ve enantiyomerik oran azalacaktır.



Şekil 4.1 Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde enzim kaynağının zamanla ee(P) üzerine etkisi (Enzim=50 mg, Substrat=5.1 g/L, V=5 ml, Sıcaklık=30 °C, Karıştırma hızı=200 rpm, pH= 6)

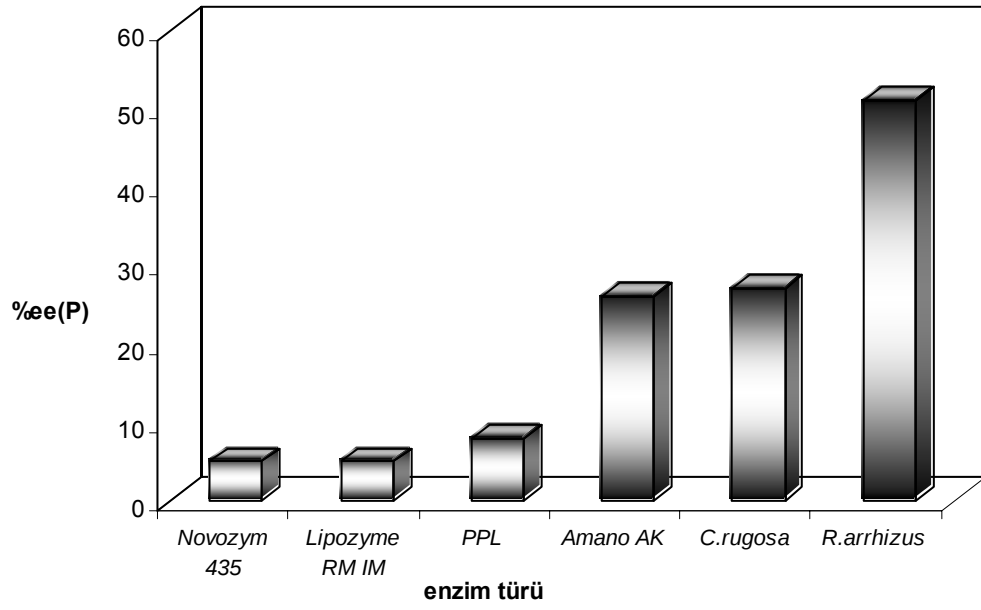


Şekil 4.2 Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde enzim kaynağının zamanla E üzerine etkisi (Enzim=50 mg, Substrat=5.1 g/L, V=5 ml, Sıcaklık=30 °C, Karıştırma hızı=200 rpm, pH= 6)

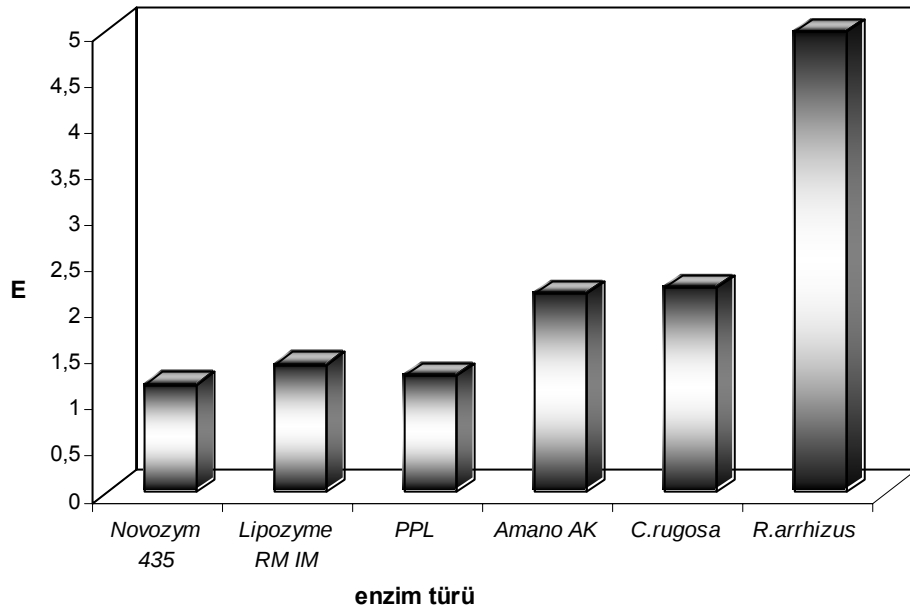
Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesine enzim kaynağının etkisinin incelendiği deneylerde yaklaşık % 50 dönüşüm için ee(P) değerleri Novozym 435 ile % 5 , Lipozyme RM IM ile % 5, PPL ile % 8, Amano AK ile % 26, *Candida rugosa* ile % 27 ve *Rhizopus arrhizus* ile % 51 olarak hesaplanmıştır. Yaklaşık aynı dönüşüm değerlerinde farklı ee(P) değerleri elde edilmiştir. Bu, enzim türünün ee için önemli bir parametre olduğunun göstergesidir.

Demir *et al.* (1998) enantiyomerik saflıkta benzoin eldesi için inceledikleri hidroliz tepkimesinde *Rhizopus* türü mikroorganizma kullanarak yüksek ee değerine (% 70) ulaşmışlardır. *Rhizopus* türü mikroorganizma lipaz kaynağı olarak düşünüldüğünde, bu kaynaklı lipazın daha iyi enantiyoseçimlilik vermesi beklenen bir durumdur. Yine Demir *et al.* (2006) çalışmalarında enantiyomerik saflıkta diğer α -hidroksi ketonların lipaz katalizli hidroliz tepkimesi ile kinetik rezolüsyonunda *Rhizopus arrhizus* lipazı ile % 75 ee değeri elde etmişlerdir.

Enantiyomerik saflıkta benzoin eldesi için gerçekleştirilen bu çalışmada en iyi enantiyomerik aşırılık ve enantiyomerik oran değeri *Rhizopus arrhizus* ile sırasıyla %51 ve 5 olarak elde edilmiştir (Şekil 4.3-4.4). Bundan sonraki deneylerde enzim olarak *Rhizopus arrhizus* lipazı kullanılmıştır. Şekil 4.4'ten de görüldüğü gibi enantiyomerik oran değeri oldukça düşüktür.



Şekil 4.3 Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde ee(P) üzerine enzim kaynağının etkisi (Enzim=50 mg, Substrat=5.1 g/L, V=5 ml, Sıcaklık=30 °C, Karıştırma hızı=200 rpm, pH= 6)

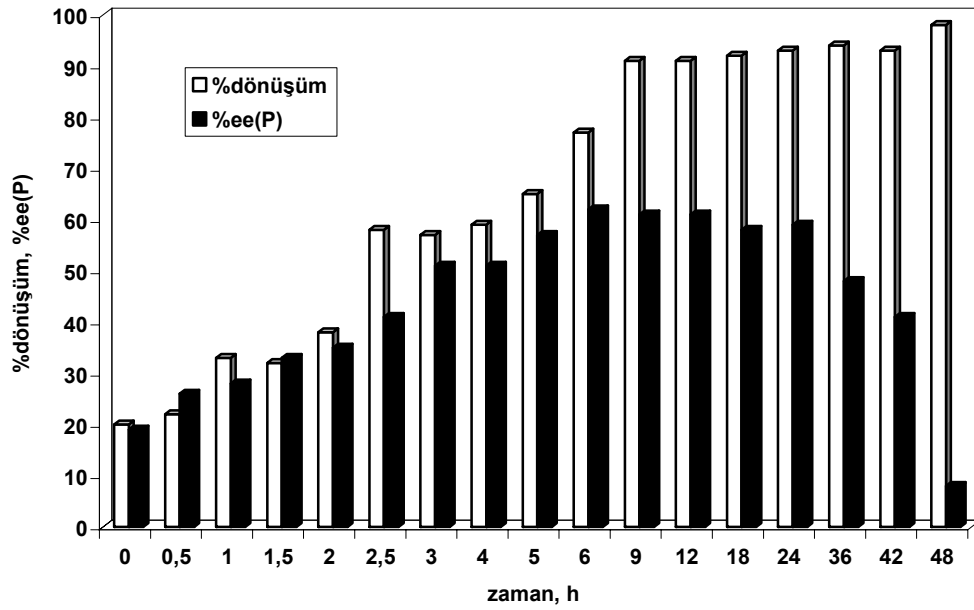


Şekil 4.4 Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde E üzerine enzim kaynağının etkisi (Enzim=50 mg, Substrat=5.1 g/L, V=5 ml, Sıcaklık=30 °C, Karıştırma hızı=200 rpm, pH= 6)

4.1.2 Tepkime süresinin etkisi

Rhizopus arrhizus lipazı ile en iyi ee(P) değerinin elde edilmesi sonucu tepkime süresini belirlemek amacıyla 48 saatlik deneyler yapılmıştır. Deneyler, enzim kaynağının etkisinin incelendiği koşullarda gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.5'te görüldüğü gibi ee(P) değeri altıncı saate kadar artmış, daha sonra azalmıştır. Dördüncü saatten sonra dönüşüm değeri % 50'den daha yüksek değerlere çıktığı için enzim diğer enantiyomere de etki etmeye başlamış, dolayısıyla enantiyomerik aşırılık ve enantiyomerik oran (Ek 4) değerleri azalmıştır. Bu nedenle bundan sonraki deneylerde tepkime süresi 4 saat olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.5 Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde ee(P) üzerine tepkime süresinin etkisi (Enzim=50 mg, Substrat=5.1 g/L, V=5 ml, Sıcaklık=30 °C, Karıştırma hızı=200 rpm, pH= 6)

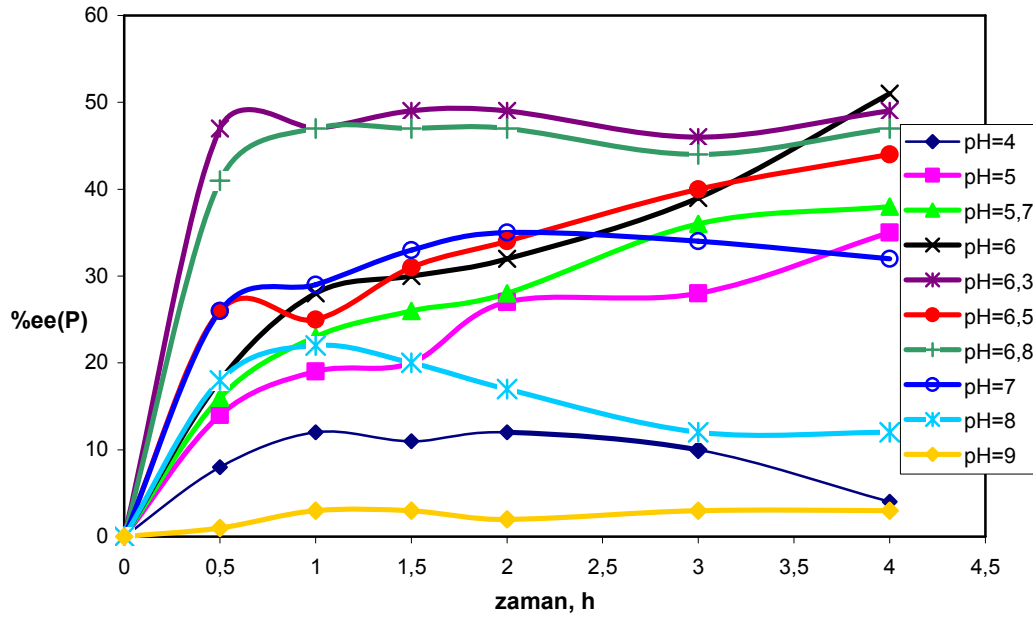
4.1.3 pH etkisi

Optikçe saf benzoin üretimine pH etkisini incelemek amacıyla pH 4 (sitrata-fosfat tamponu), 5 (sitrata-fosfat tamponu), 5.7 (fosfat tamponu), 6 (fosfat tamponu), 6.3 (fosfat tamponu), 6.5 (fosfat tamponu), 6.8 (fosfat tamponu), 7 (fosfat tamponu), 8 (fosfat

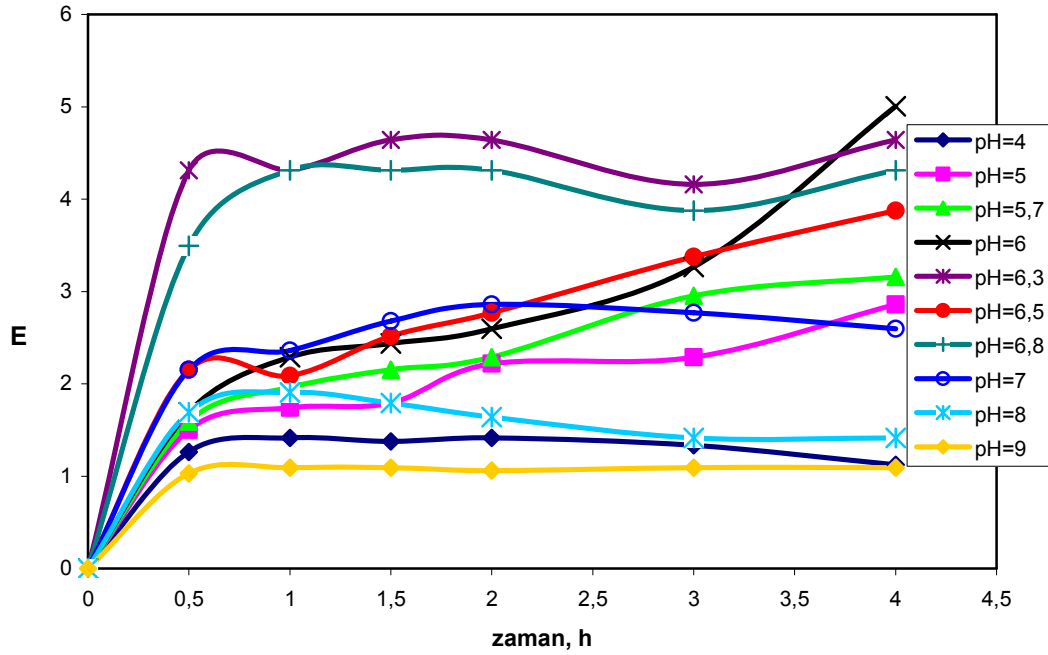
tamponu) ve 9 (karbonat-bikarbonat tamponu) değerinde hazırlanmış çeşitli tamponlar ve enzim olarak *Rhizopus arrhizus* kaynaklı lipaz kullanılmıştır. Sonuçlar, 2 deneyin ortalaması alınarak verilmiştir.

İncelenen pH'ta hazırlanmış olan 5 ml tampon çözeltisine, 3 ml DMSO'da çözülmüş 510 mg rasemik benzoin asetat karışımının 150 μ l'si ilave edilmiş (20 mM) ve 50 mg (10 U) *Rhizopus arrhizus* lipazı eklenerek tepkimeler başlatılmıştır. Deneyler 30°C sıcaklıktaki ve 200 rpm karıştırma hızındaki orbital çalkalayıcıda gerçekleştirilmiştir. Tepkimeler belirlenen sürelerde süzülerek sonlandırılmıştır. Süzüntü etil asetatla ekstrakte edilerek örnekler HPLC analizine hazırlanmış ve Chiralcel OB kolonda analizlenmiştir. Tepkime sonunda bütün pH'larda (S)-benzoin oluşmuştur.

Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de, zamanla alınan örneklerin hesaplanan ee(P) ve E değerleri yer almaktadır.



Şekil 4.6 Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde pH'nın zamanla ee(P) üzerine etkisi (Enzim=50 mg, Substrat=5.1 g/L, V=5ml, Sıcaklık=30 °C, Karıştırma hızı=200 rpm)

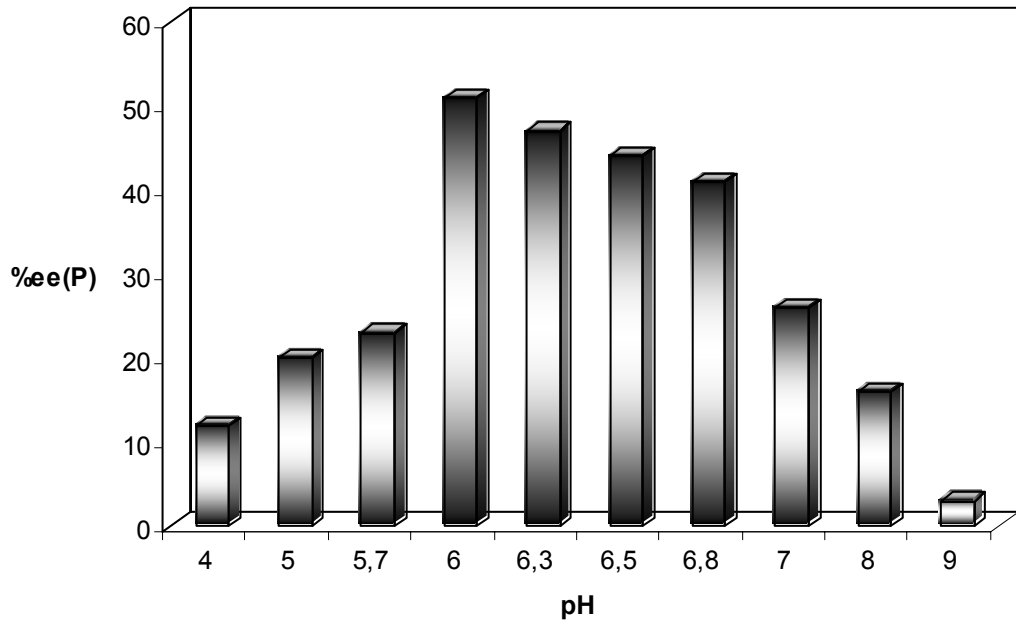


Şekil 4.7 Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde pH'nın zamanla E üzerine etkisi (Enzim=50 mg, Substrat=5.1 g/L, V=5ml, Sıcaklık=30 °C, Karıştırma hızı=200 rpm)

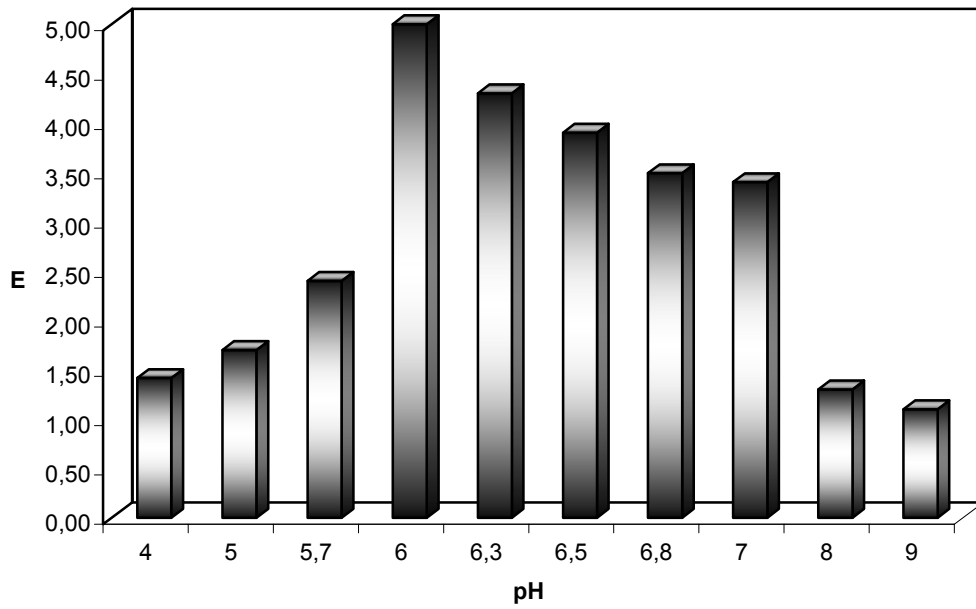
Yüksek pH değerlerinde (6.5-9) tepkime, ortalama 30 dk gibi kısa bir sürede % 50 dönüşüme ulaşmıştır (Ek 5). Sürenin daha fazla artmasıyla ee değerinde çok fazla bir değişim gözlenmemiştir. Düşük pH'larda (4-6.3) ise % 50 dönüşüm değerine ortalama olarak 1 saatte ulaşılmıştır.

Rhizopus arrhizus kaynaklı lipazın kullanıldığı hidroliz tepkimesine pH etkisinin incelendiği deneylerde % 50 dönüşüm değerinde pH=6'da % 51, pH=6.3'te % 47 ve pH=6.5'te % 44 ee(P) değerleri hesaplanmıştır (Şekil 4.8, Şekil 4.9). Enzim katalizli hidroliz tepkimelerinde pH'ın önemli bir parametre olduğu bu deneyler sonucu da görülmüş, düşük ve çok yüksek pH'larda enantiyomerik aşırılık değeri oldukça düşmüştür.

Demir *et al.* (2001b) α -asetoksi ketonlardan *Rhizopus oryzae* mikroorganizması katalizörlüğünde gerçekleştirilen hidroliz tepkimesi ile α -hidroksi ketonların eldesini inceledikleri çalışmada optimum tepkime ortam pH'ının 6.0-6.5 olduğunu bulmuşlardır. Mikroorganizmanın kullanıldığı bu çalışma ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 4.8 Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde ee(P) üzerine pH'nın etkisi (Enzim=50 mg, Substrat=5.1 g/L, V=5ml, Sıcaklık=30 °C, Karıştırma hızı=200 rpm)



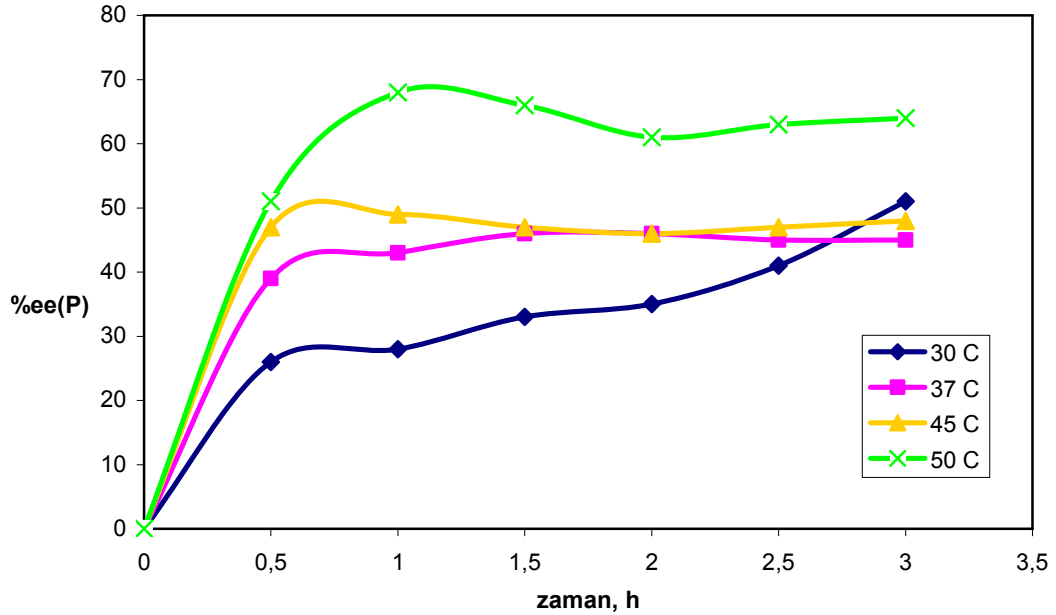
Şekil 4.9 Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde E üzerine pH'nın etkisi (Enzim=50 mg, Substrat=5.1 g/L, V=5ml, Sıcaklık=30 °C, Karıştırma hızı=200 rpm)

4.1.4 Sıcaklık etkisi

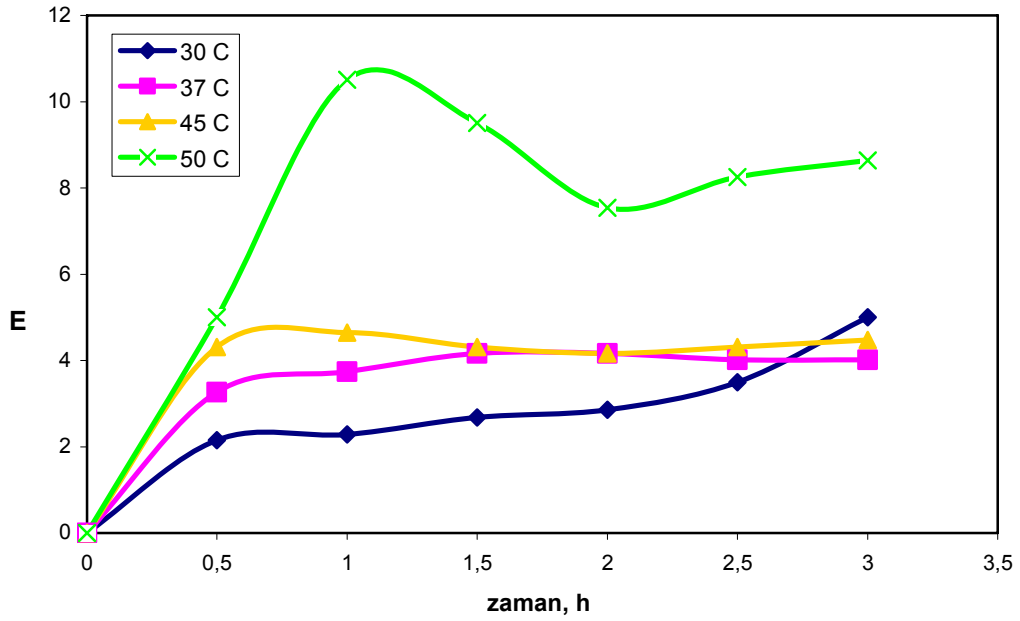
Sıcaklık etkisini incelemek amacıyla 4 farklı sıcaklık değerinde (30, 37, 45, 50°C) deneyler gerçekleştirilmiştir. Enzimler belli bir sıcaklıkta optimum aktivite gösterirler. 30°C'nin altında tepkime vermeleri zorlaşmaktadır. Deneylerde enzim olarak *Rhizopus arrhizus* kaynaklı lipaz kullanılmıştır. Sonuçlar 2 deneyin ortalamasıdır. Tepkime sonunda bütün sıcaklıklarda (S)-benzoin oluşmuştur.

Tepkime sıcaklığı enzimatik tepkimeler üzerinde etkilidir. Yapılan deneylerde sıcaklığın enantiyomerik aşırılık değerini ve enantiyomerik oranı etkilediği görülmüştür. Sıcaklığın artmasıyla beklenildiği gibi tepkime hızı artmış, kısa zamanda ee(P) ve E değerlerinde artış gözlenmiştir. Ancak dönüşüm de % 50'nin üzerine çıkmıştır. 3 saat boyunca zamanla alınan örneklerin dönüşüm, ee(P) ve E değerleri Ek 6'da yer almaktadır.

Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'de, zamanla alınan örneklerin hesaplanan ee(P) ve E değerleri görülmektedir.



Şekil 4.10 Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde sıcaklığın zamanla ee(P) üzerine etkisi (Enzim=50 mg, Substrat=5.1 g/L, V=5ml, pH=6, Karıştırma hızı=200 rpm)



Şekil 4.11 Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde sıcaklığın zamanla E üzerine etkisi (Enzim=50 mg, Substrat=5.1 g/L, V=5ml, pH=6, Karıştırma hızı=200 rpm)

37, 45 ve 50°C sıcaklıklarda, sıcaklık artışı tepkime hızını etkilemiş ve 15 dk gibi kısa bir sürede dönüşüm %50'nin çok üzerine çıkmıştır. 30°C'de ise dönüşüm zamanla artmış ve bununla beraber ee(P) değerinde de düzenli bir artış görülmüştür.

İncelenen kaynaklarda lipaz katalizörlüğünde gerçekleştirilen α -hidroksi keton eldesinde sıcaklık etkisine bakılmamış ancak genellikle oda sıcaklığı (Demir *et al.* 2006) ve 30°C'de (Demir *et al.* 1998, 2001b) çalışılmıştır.

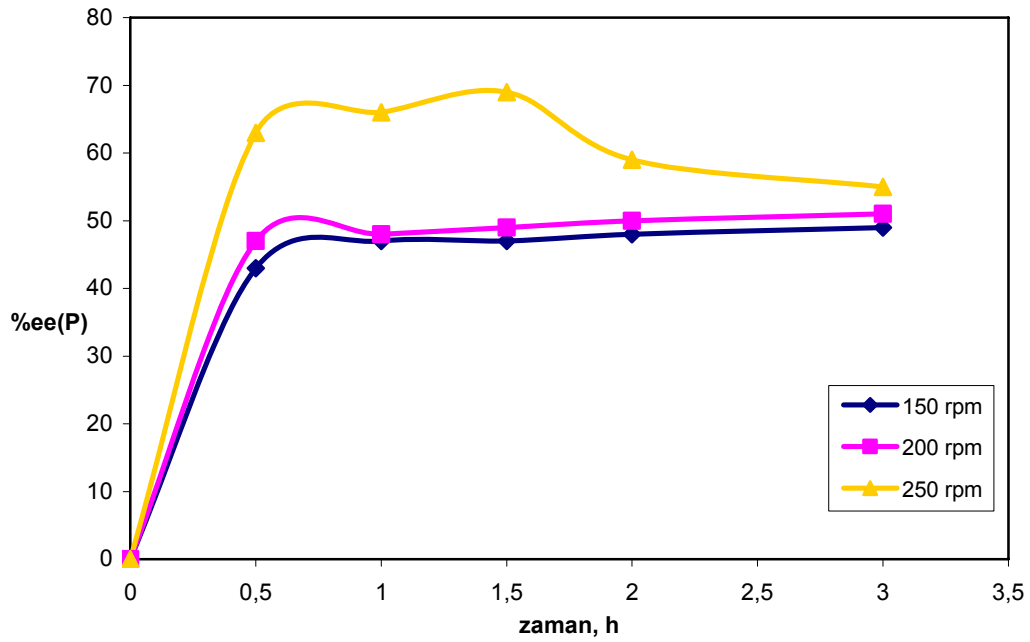
Sonuçlardan da görüldüğü gibi enantiyomerik oran değeri hala çok düşüktür (E=5). Bu düşük E değerlerine göre enantiyomerik saflıkta madde üretimi gerçekleştirememiştir. Devam eden çalışmalarda bu değeri arttırmak hedeflenmiştir.

4.1.5 Karıştırma hızının etkisi

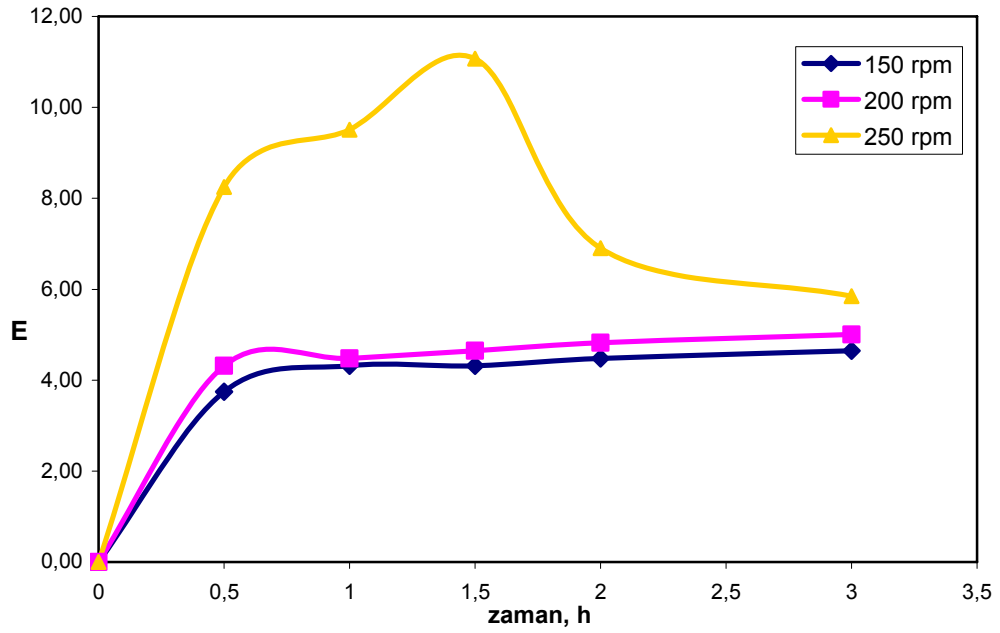
Rhizopus arrhizus kaynaklı lipaz katalizörlüğünde gerçekleştirilen hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretimine karıştırma hızının etkisini incelemek amacıyla deneyler 150, 200 ve 250 rpm'de gerçekleştirilmiştir.

Deneyler pH 6 olan fosfat tamponu içeren ortamda, 30°C sıcaklıktaki orbital çalkalayıcıda gerçekleştirilmiştir. Tepkime sonunda (*S*)-benzoin oluşmuştur. Sonuçlar 2 deneyin ortalaması alınarak verilmiştir.

Karıştırma hızının etkisinin incelendiği deneylerde zamanla alınan örneklerin hesaplanan ee(P) ve E değerleri grafiğe geçirilmiştir. Bu sonuçlar Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'te görülmektedir.



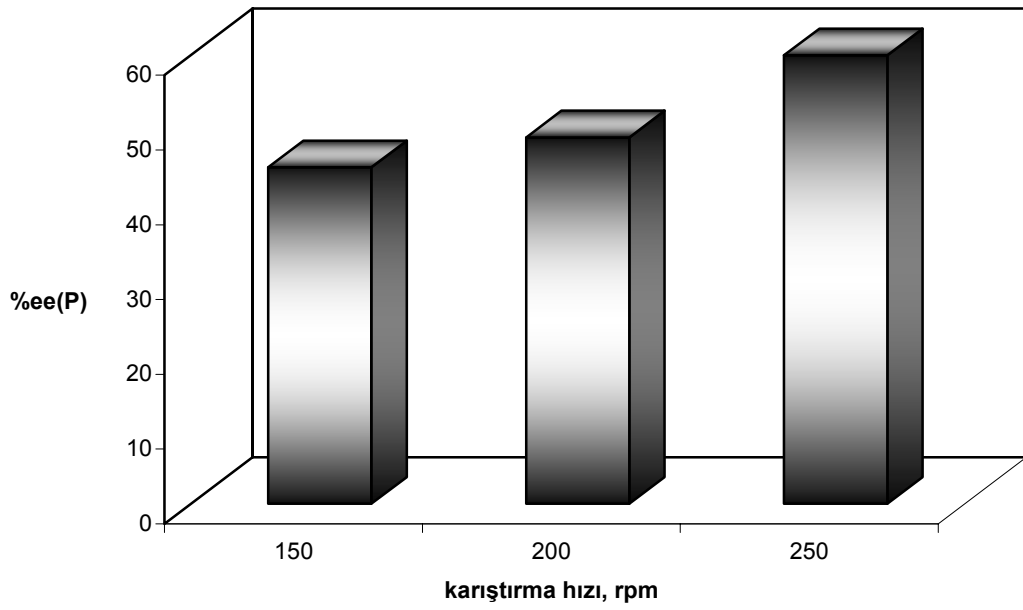
Şekil 4.12 Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde karıştırma hızının zamanla ee(P) üzerine etkisi (Enzim=50 mg, Substrat=5.1 g/L, V=5ml, pH=6, Sıcaklık=30°C)



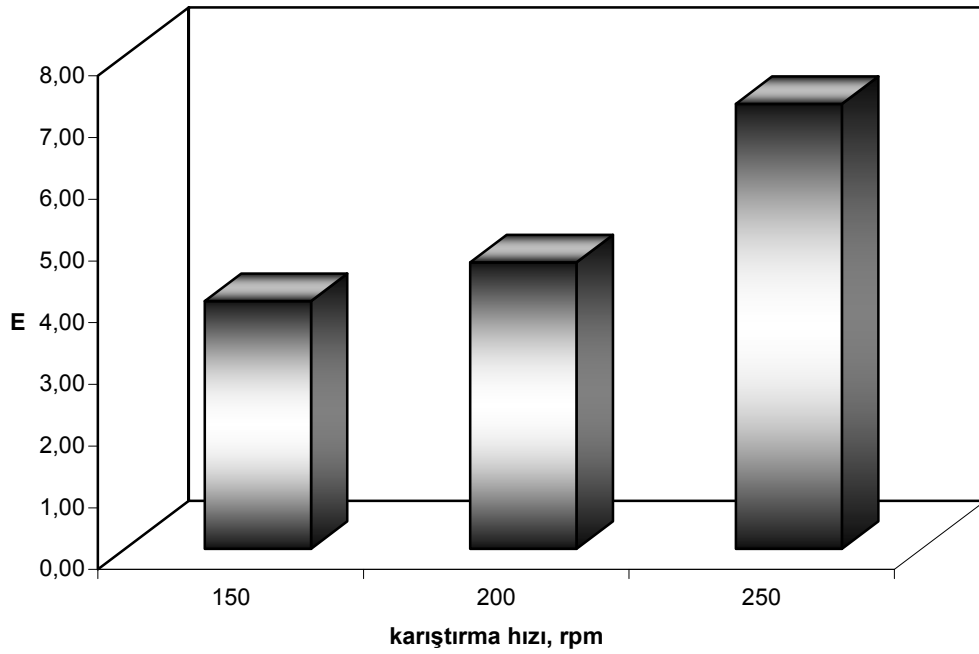
Şekil 4.13 Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde karıştırma hızının zamanla E üzerine etkisi (Enzim=50 mg, Substrat=5.1 g/L, V=5ml, pH=6, Sıcaklık=30°C)

Sonuçlardan görüldüğü gibi 250 rpm karıştırma hızında en yüksek ee(P) değeri elde edilmiş ve dönüşüm hızla artmıştır (Ek 7). Tutuklanmış enzimlerle yapılan deneylerde kütle aktarım direnci yüksek olduğu için tepkimeler daha uzun sürede gerçekleşir. Bu çalışmada serbest enzim kullanılmasına rağmen, yüksek karıştırma hızlarında kütle aktarım direnci azaltıldığı için kısa sürede yüksek dönüşüm ve ee(P) değerleri elde edilmiş olabilir. Yüksek karıştırma hızının enzim konformasyonuna olumsuz etkisi olabilirdi. Fakat burada böyle bir etki görülmemiştir.

Sonuçları daha iyi görebilmek için yaklaşık % 50 dönüşüm değeri için karıştırma hızı ee(P) ve E grafikleri çizilmiş en iyi ee(P) (% 60) ve E (7,2) değerine 250 rpm'de ulaşılmıştır (Şekil 4.14-4.15). Burada yine oldukça düşük enantiyomerik oran değeri elde edilmiştir. 250 rpm'de çalışırken karşılaşılan zorluklar (tepkime kabının fırlaması gibi) nedeniyle bundan sonraki deneyler 200 rpm'de yapılmıştır. Ancak, karıştırma hızı olarak 250 rpm değeri daha büyük ölçekli üretimlerde kullanılabilir.



Şekil 4.14 Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde ee(P) üzerine karıştırma hızının etkisi (Enzim=50 mg, Substrat=5.1 g/L, V=5ml, pH=6, Sıcaklık=30°C)



Şekil 4.15 Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde E üzerine karıştırma hızının etkisi (Enzim=50 mg, Substrat=5.1 g/L, V=5ml, pH=6, Sıcaklık=30°C)

4.1.6 Mikrodalga'nın etkisi

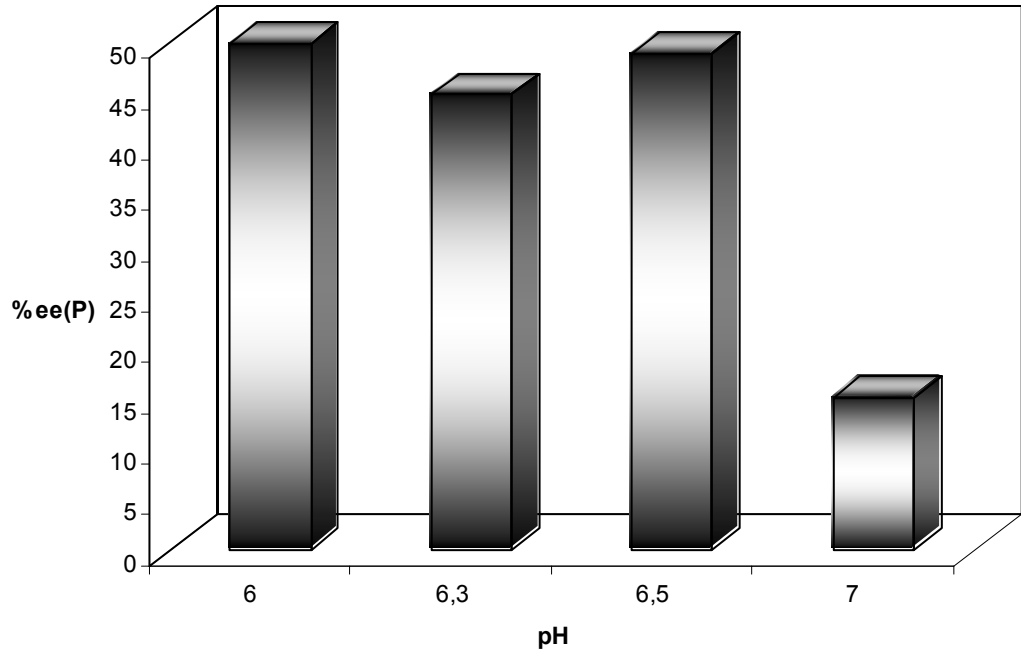
Mikrodalga'nın optikçe saf benzoin üretimine etkisini incelemek amacıyla ve enzim olarak *Rhizopus arrhizus* kaynaklı lipaz kullanılmıştır.

Mikrodalga cihazının özel reaktörüne 50 mg enzim koyulmuş ve daha sonra 5 ml hacmindeki, değişik pH'larda hazırlanmış fosfat tamponu dikkatli bir şekilde eklenmiştir. 510 mg rasemik benzoin asetat 3 ml DMSO'da çözülmüş ve bu karışımın 150 µl'si (20 mM) ilave edilmiştir. Reaktörün kapağı kapatılarak mikrodalga cihazına yerleştirilmiştir. Uygulanacak mikrodalga süresi, sıcaklık ve reaktör hacmi girilerek deney başlatılmıştır. Girilen sürenin sonunda reaktörün kapağı açılmış, ürün ile enzim süzülerek ayrılmıştır. Süzüntü etil asetatla 1:1 (v/v) oranında iki kez ekstrakte edilmiştir. Ekstraktın içinde kalmış olan suyu tutması için bir miktar MgSO₄ eklenmiş ve karışım tekrar süzülmüştür. Elde edilen süzüntünün üzerinden hava geçirilerek çözücü faz uzaklaştırılmıştır. Çözücüsü uzaklaştırılan ürün 2 ml kloroform içinde çözüldükten sonra filtreden süzülerek HPLC'de analizlenmiştir. Analiz sonunda (S)-benzoin olduğu gözlenmiştir. Sonuçlar 2 deneyin ortalaması alınarak verilmiştir.

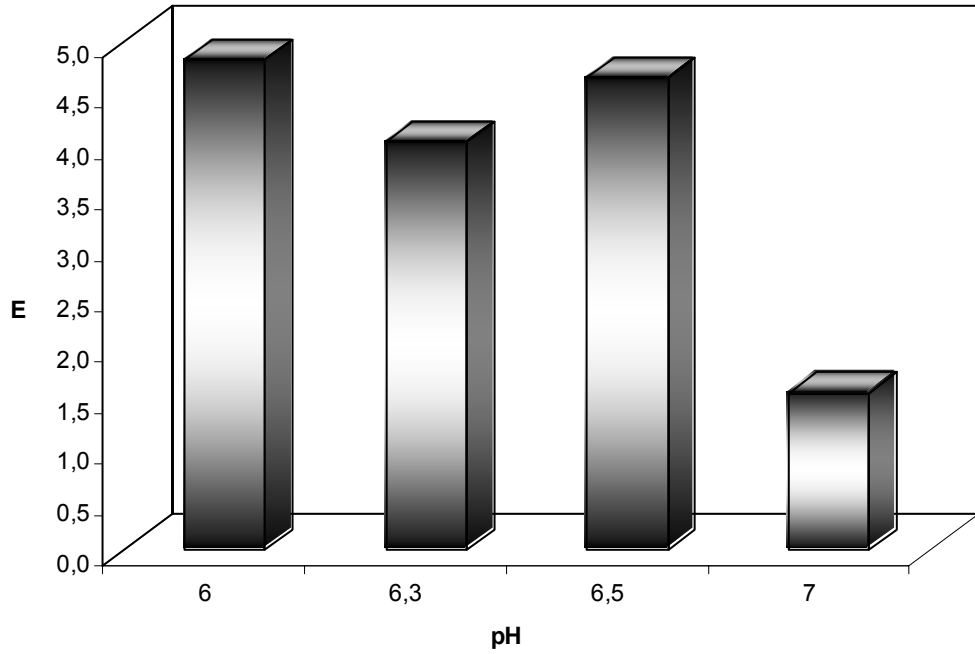
Rhizopus arrhizus kaynaklı lipazın kullanıldığı hidroliz tepkimesine mikrodalga'nın etkisi pH'ı 6, 6.3, 6.5 ve 7 olan fosfat tampon çözeltiğinde incelenmiştir. Tepkimeler 60°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Yapılan deneylerde 2 dk'lık mikrodalga uygulama süresinde tüm pH'larda yaklaşık % 50 dönüşüm değerine ulaşıldığı için daha uzun süre mikrodalga uygulaması düşünülmemiştir (Ek 8). Burada yine pH 6-6.5 arasında en iyi ee değeri elde edilmiş pH 7'de ise ee değeri oldukça azalmıştır. Elde edilen bu sonuçların, konvansiyonel ısıtma ile gerçekleştirilen pH deneyleriyle (Bölüm 4.1.3) yaklaşık olarak aynı olduğu görülmüştür. Mikrodalga etkisinde özellikle tepkime hızının çok fazla arttığı, enantiyoseçimliliğin ise çok fazla değişmediği görülmüştür. Benzer şekilde Parker *et al.* (1996) çalışmalarında inceledikleri lipaz katalizli transesterleşme tepkimesinin katalitik hızını, mikrodalga ile ısıtmanın konvansiyonel ısıtmaya göre 2-3 kat arttırdığını görmüşlerdir. Yine Lin and Yuan (1998) alkolün lipaz katalizli kinetik rezolüsyonunu inceledikleri çalışmalarında mikrodalga etkisinin hızı arttırdığını fakat ee değerini etkilemediğini bulmuşlardır. Ayrıca Yadav and Lathi

(2004) alkolün lipaz katalizli kinetik rezolüsyonunu inceledikleri çalışmalarında mikrodalga ile ısıtmanın dönüşümü arttırdığını dolayısıyla tepkime hızını da arttırarak tepkime süresini kısalttığını görmüşlerdir.

Mikrodalga etkisinin incelendiği pH deneylerinde pH=6'da en yüksek ee(P) (% 50) ve E (4,8) değeri elde edilmiştir (Şekil 4.16-4.17).



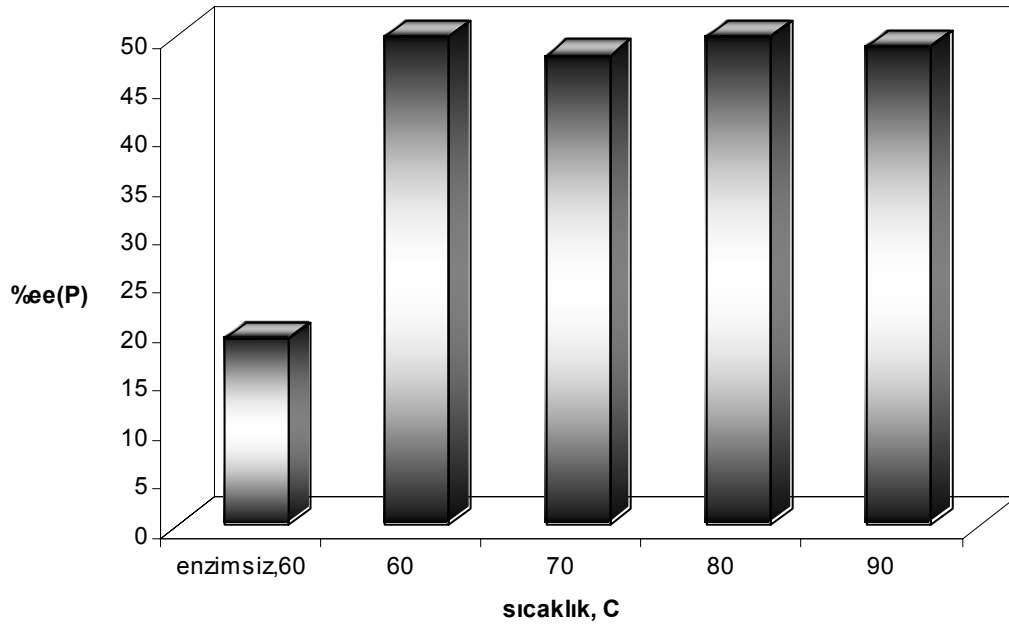
Şekil 4.16 Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile farklı pH'larda optikçe saf benzoin üretiminde ee(P) üzerine mikrodalga'nın etkisi (Enzim=50 mg, V=5ml, Substrat=5.1 g/L, T=60°C)



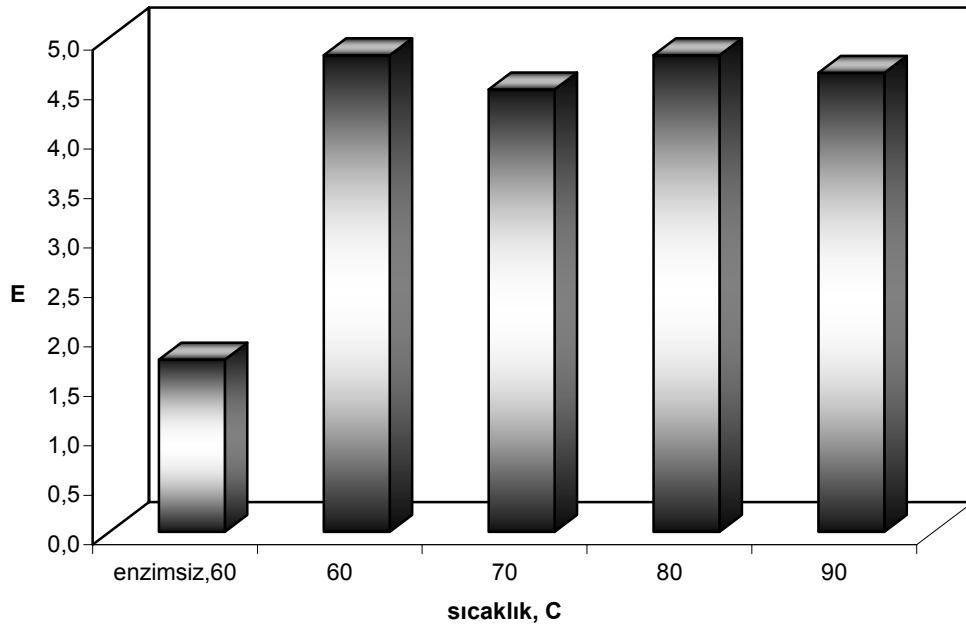
Şekil 4.17 Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile farklı pH’larda optikçe saf benzoin üretiminde E üzerine mikrodalga’nın etkisi (Enzim=50 mg, V=5ml, Substrat=5.1 g/L, T=60°C)

Ayrıca, mikrodalga’nın farklı sıcaklıklarda enantiyoseçimli hidroliz tepkimesine etkisini görmek için pH=6 olan tampon çözeltide 60, 70, 80 ve 90°C sıcaklıklarda deneyler yapılmış ve yine 2 dk’lık mikrodalga uygulama süresinde % 50 dönüşüme ulaşılmış, sıcaklık arttıkça dönüşüm daha da artmıştır (Ek 8). Mikrodalga ile ısıtma sonucu tepkime hızının artmasının yanı sıra sıcaklığın artmasıyla da tepkime hızı artmış ve dönüşüm değeri çok kısa bir sürede yükselmiştir. Bunun yanında, enzim eklenmemiş tepkime ortamına mikrodalga uygulanmış ve düşük dönüşümde de olsa (*S*)-benzoin oluşumu gözlenmiştir. Bu da mikrodalga’nın katalizör görevi gördüğünün bir göstergesidir.

Mikrodalga etkisinin incelendiği sıcaklık deneylerinde en yüksek ee(P) (% 50) ve E (4,8) değeri 60°C’de elde edilmiştir (Şekil 4.18-4.19).



Şekil 4.18 Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile farklı sıcaklıklarda optikçe saf benzoin üretiminde ee(P) üzerine mikrodalganın etkisi (Enzim=50 mg, V=5ml, Substrat=5.1 g/L, pH=6)



Şekil 4.19 Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile farklı sıcaklıklarda optikçe saf benzoin üretiminde E üzerine mikrodalganın etkisi (Enzim=50 mg, V=5ml, Substrat=5.1 g/L, pH=6)

4.1.7 Cevap yüzey yöntemi ile optimizasyon

Rhizopus arrhizus kaynaklı lipaz varlığında gerçekleştirilen benzoin asetatın enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe aktif benzoin üretim koşulları önceki bölümlerde incelenmiştir. En uygun koşulları belirlemek için substrat derişimi, pH ve enzim miktarı bağımsız parametreler olarak belirlenmiştir. Bağımsız parametre değişim aralıkları (substrat derişimi için 25-75 mM, pH için 4.3-8.3, enzim miktarı için 25-75 mg) ve sistemden alınacak cevap değişkeni (ürün için enantiyomerik aşırılık, % ee(P)) belirlenerek bu değişim aralıklarında Design-Expert 6.0 programı yardımıyla, saptanan aralıklarda gerçekleştirilen 20 adet deneyin gerçek değerleri ile cevabın gerçek değeri Çizelge 4.1’de görölmektedir.

Çizelge 4.1 Üç bağımsız değişken için deneysel matriks ve gözlenen cevap değerleri

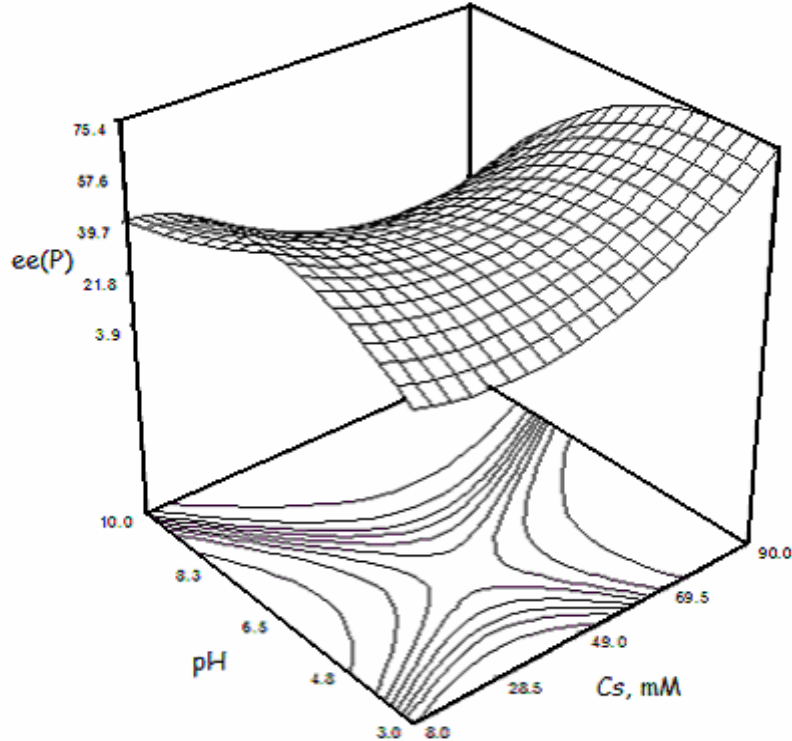
	x ₁	x ₂	x ₃	Cevap değişkeni
Deney no	Substrat derişimi, mM	pH	Enzim miktarı, mg	%ee(P)
1	25.00	4,3	25.00	41.0
2	75.00	4,3	25.00	63.0
3	25.00	8,3	25.00	33.0
4	75.00	8,3	25.00	31.0
5	25.00	4,3	75.00	53.0
6	75.00	4,3	75.00	68.0
7	25.00	8,3	75.00	52.0
8	75.00	8,3	75.00	45.0
9	7.96	6,3	50.00	65.0
10	92.04	6,3	50.00	59.0
11	50.00	2,94	50.00	36.0
12	50.00	9,66	50.00	10.0
13	50.00	6,3	7.96	43.0
14	50.00	6,3	92.04	47.0
15	50.00	6,3	50.00	47.0
16	50.00	6,3	50.00	46.0
17	50.00	6,3	50.00	51.0
18	50.00	6,3	50.00	42.0
19	50.00	6,3	50.00	42.0
20	50.00	6,3	50.00	48.0

Deneyler gerçekleştirilmiş ve deney sonuçları değerlendirilerek, 3 bağımsız değişkenin enantiyomerik aşırılığa etkisini incelemek amacıyla ikili etkileşim grafiklerinin 3 boyutlu gösterimi elde edilmiştir.

4.1.7.1 Substrat derişimi ile pH'ın enantiyomerik aşırılığa etkisi

Substrat derişimi ile pH'ın enantiyomerik aşırılığa etkisi için, 30°C sıcaklık, 200 rpm karıştırma hızında ve 50 mg *Rhizopus arrhizus* lipazı varlığında gerçekleştirilen deney sonuçlarına göre Şekil 4.20 çizilmiştir.

Substrat derişiminin artması ile ee(P) değerinin 48-55 arasında çok fazla değişmediği görülmektedir. Substrat derişiminin yüksek olduğu durumlarda pH'ın artması enantiyomerik aşırılığı azaltmaktadır. Yapılan daha önceki çalışmalara benzer şekilde pH'ın yaklaşık 6 olduğu değerlerde en yüksek ee(P) değeri elde edilmiştir. Bu değerden düşük ve yüksek değerlerde ise enantiyomerik aşırılık değeri düşmüştür.

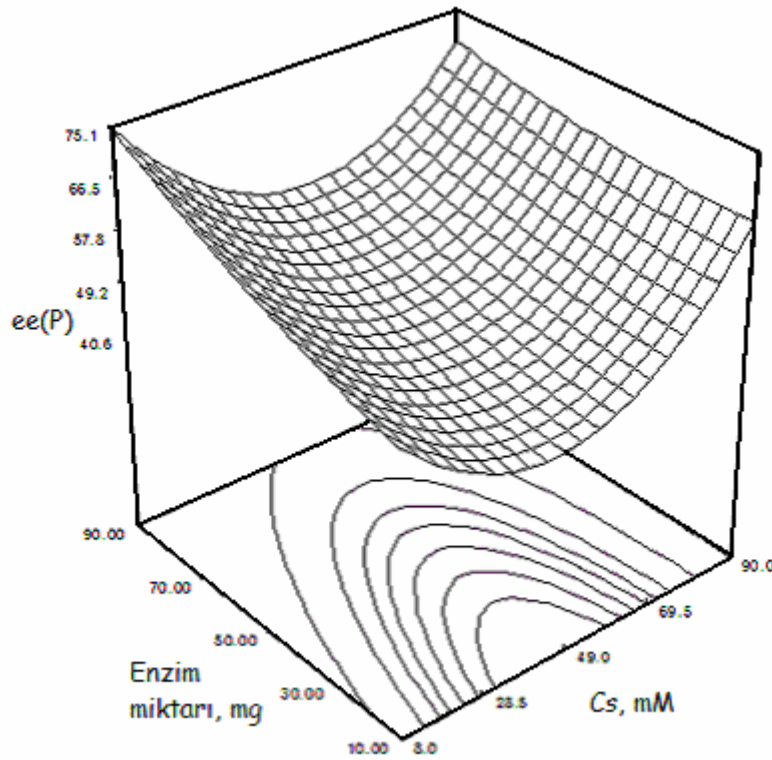


Şekil 4.20 Enantiyomerik aşırılık değerinin substrat derişimi ve pH ile değişimi (Enzim=50 mg, T=30°C, Karıştırma hızı=200 rpm, V=5 ml)

4.1.7.2 Substrat derişimi ile enzim miktarının enantiyomerik aşırılığa etkisi

Rasemik benzoin asetatın *Rhizopus arrhizus* kaynaklı lipaz katalizörlüğünde gerçekleştirilen enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretimine substrat derişimi ile enzim miktarının etkisi için 30°C sıcaklık, 200 rpm karıştırma hızında ve pH=6.3'te gerçekleştirilen deneylerin sonuçları Şekil 4.21'de görölmektedir.

Enzim miktarının sabit olduğu durumda substrat derişiminin artması ee(P) değerini önce azaltmış daha sonra arttırmıştır. Bunun yanında, belli substrat derişiminde enzim miktarının artması ee(P) değerini arttırmıştır. Yüksek enzim derişimi substratın bağlanması için daha çok aktif merkez sağlayacağından tepkime hızını ve ee(P) değerini arttırmıştır.

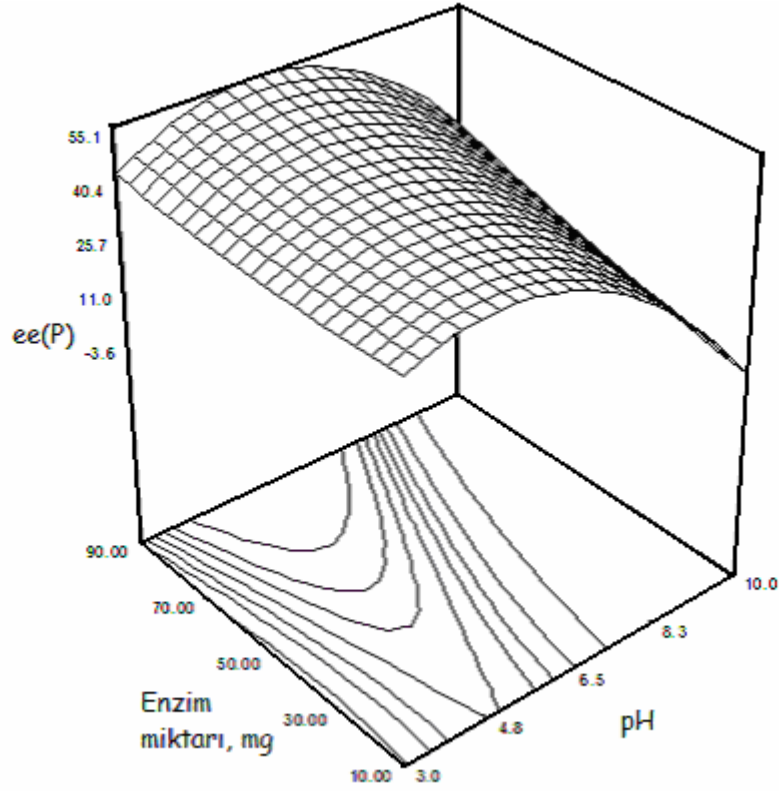


Şekil 4.21 Enantiyomerik aşırılık değerinin substrat derişimi ve enzim miktarı ile değişimi (pH=6.3, T=30°C, Karıştırma hızı=200 rpm, V=5 ml)

4.1.7.3 pH ile enzim miktarının enantiyomerik aşırılığa etkisi

pH ile enzim miktarının enantiyomerik aşırılığa etkisi için, 30°C sıcaklık, 200 rpm karıştırma hızında ve 50 mM substrat derişiminde gerçekleştirilen deney sonuçlarına göre Şekil 4.22 çizilmiştir.

Şekil 4.22 incelendiğinde burada da benzer şekilde enzim miktarının artması ee(P) değerini arttırmıştır. Yine pH için benzer sonuçlar elde edilmiş, pH 6 civarında yüksek ee(P) değerleri bulunmuştur.



Şekil 4.22 Enantiyomerik aşırılık değerinin pH ve enzim miktarı ile değişimi (Substrat=50 mM, T=30°C, Karıştırma hızı=200 rpm, V=5 ml)

4.1.8 Bağımsız değişkenler ile cevap değişkeni arasındaki bağıntı

Sistemden alınan ee(P) değerleri Design-Expert 6.0 programına cevap olarak girilmiş ve program tarafından gerçekleştirilen istatistiksel analizler sonucunda enantiyomerik aşırılık değerini en iyi tanımlayan modelin quadratik model olduğuna karar verilmiştir.

Enantiyomerik aşırılık değeri (cevap değişkeni, Y) bağımsız değişkenlere (x_1 , x_2 , x_3) Eşitlik 5.1’de verilen cevap fonksiyonu ile bağlanmıştır.

$$Y=45.84+1.31x_1-7.89x_2+4.15x_3+6.73x_1^2-7.06x_2^2+0.72x_3^2-5.75x_1x_2-15x_1x_3+2x_2x_3 \dots 4.1$$

Modelin katsayıları ve istatistiksel analizleri Çizelge 4.2’de verilmiştir. Yine bu model için standart sapma değeri 5.68 ve R^2 değeri 0.9016 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.2 Enantiyomerik saflıkta benzoin üretiminin optimizasyonunda kullanılan modelin ANOVA (varyans analizleri) testi ve en küçük kareler yöntemini temel alarak Design-Expert programına hesaplatılan model katsayıları ve istatistiksel hesaplamaları

Model parametresi	Hesaplanan katsayı	Serbestlik derecesi	Standart sapma	F değeri	Prob > F
Kayma	45.84	1	2.32	10.18	0.0006
x_1	1.31	1	1.54	0.73	0.4134
x_2	-7.89	1	1.54	26.35	0.0004
x_3	4.15	1	1.54	7.31	0.0222
x_1^2	6.73	1	1.50	20.23	0.0011
x_2^2	-7.06	1	1.50	22.27	0.0008
x_3^2	0.72	1	1.50	0.23	0.6415
x_1x_2	-5.75	1	2.01	8.20	0.0168
x_1x_3	-1.50	1	2.01	0.56	0.4722
x_2x_3	2.00	1	2.01	0.99	0.3427

Design Expert 6.0 programına göre Prob>F değerinin <0.05 olması modelin hassaslığını, parametrenin model üzerine etkisinin önemli olduğunu göstermektedir. Çizelge 4.2’de yer alan modeldeki bağımsız değişkenler için Prob>F değerlerine bakıldığında pH’nın (x_2) (hem birinci mertebeden hem de ikinci mertebeden etki ile) ve substrat derişiminin karesinin (x_1^2) modele yani enantiyomerik aşırılığa etkisinin çok

fazla olduğu görülmektedir. Ayrıca, modele en az etkili olan parametrenin enzim miktarının karesi olduğu (x_3^2) görülmektedir.

Eşitlik 4.1 Design Expert 6.0 ile çözülmüş, maksimum ee(P) değerini verecek koşullar belirlenmiş, buna göre substrat derişimi 75 mM, pH 4.65 ve enzim miktarı 75 mg olarak bulunmuştur. Bu koşullarda deneyler gerçekleştirilmiş ve yaklaşık % 53 ee(P) değeri elde edilmiştir. Fakat ee(P) değeri hala istenilen oranda yükseltilememiştir. Bunun için çalışmanın bundan sonraki kısmında *Rhizopus oryzae* mikroorganizması ile hidroliz tepkimesi incelenmiştir.

4.2 Mikroorganizma ile Gerçekleştirilen Deneyler

Lipaz katalizörlüğünde gerçekleştirilen rasemik benzoin asetattan hidroliz tepkimesi ile enantiyomerik saflıkta benzoin üretiminde, enantiyomerik aşırılık değerinin fazla yükseltilememesinden dolayı bundan sonraki deneylerde enzim kaynağı olarak *Rhizopus oryzae* (CBS 111718) mikroorganizması kullanılmıştır.

4.2.1 Mikroorganizma ile gerçekleştirilen deneylerde parçalama türünün etkisi

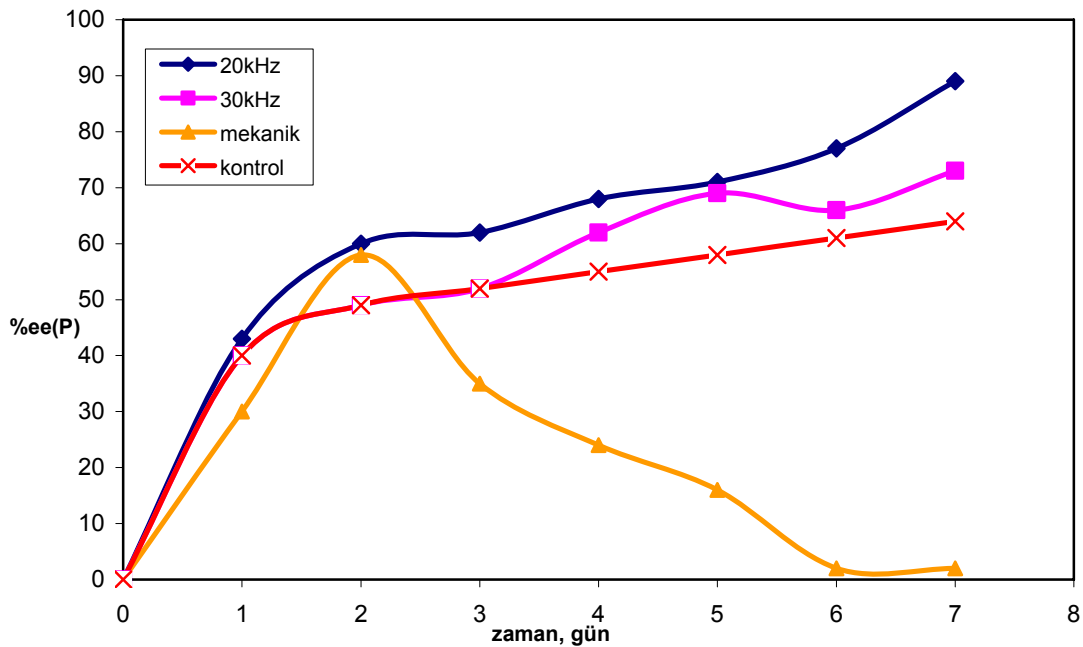
Enantiyomerik saflıkta benzoin üretiminin incelendiği bu çalışmada, enzim kaynağı olarak kullanılan küflerin tepkime ortamında homojen bir şekilde bulunması ve hücre dışı olduğu bilinen lipaz enziminin hücre içindeki miktarının da serbest kalabilmesi düşüncesiyle 20 kHz’lik ultrasonik homojenizer (Cole Parmer Ultrasonic Homogenizer, 750W, 20kHz, 13mm prob çapı), 30 kHz’lik ultrasonik homojenizer (Hielscher Ultrasound Technology UP100H, 100W, 30kHz) ve mekanik (Micra D-9, 850W, 11.000-39.000 devir/dk) homojenizer kullanılmıştır.

Rhizopus oryzae (CBS 111718) mikroorganizması, bileşimi Çizelge 4.2’de yer alan 50 ml sıvı ortamda 30°C ve 150 rpm’de çoğaltılmış, çoğalan mikroorganizmalar 20 ve 30 kHz’lik ultrasonik homojenizerler ve mekanik homojenizer kullanılarak parçalanmıştır. Daha sonra homojenize edilmiş mikroorganizmalı karışımdan ve kontrol deneyi için çoğaltılmış mikroorganizmanın sıvı kısmından 5’er ml alınıp 7 ayrı tepkime kabına

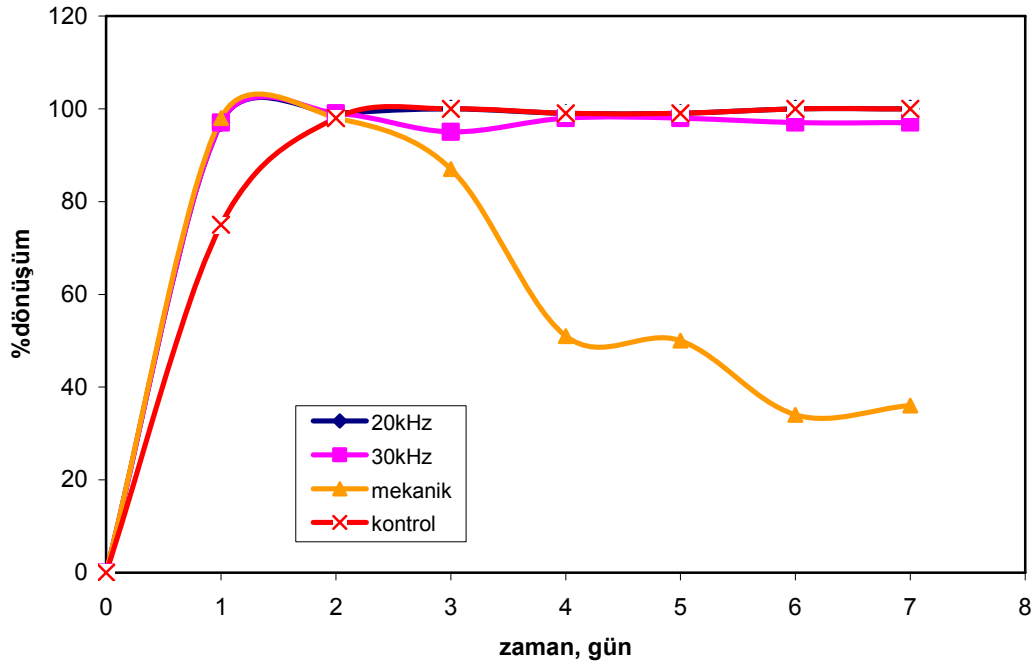
koyulmuştur. 510 mg rasemik benzoin asetat 3 ml DMSO'da çözülmüş ve bu karışımın 150 µl'si (20 mM) tepkime ortamına ilave edilerek tepkimeler başlatılmıştır. Deneyler, 30°C sıcaklıktaki ve 200 rpm karıştırma hızındaki orbital çalkalayıcıda gerçekleştirilmiştir. 7 günlük deney süresince her gün sonlandırılan örnekler HPLC'de analizlenmiştir. Yapılan analizler sonucu her bir durumda deney süresi boyunca (S)-enantiyomerin oluştuğu görülmüştür.

Çoğaltılan mikroorganizmanın sıvı kısmının, 20 ve 30 kHz'lik ultrasonik homojenizerler ve mekanik homojenizer kullanıldıktan sonraki mikroorganizmalı karışımın 5 ml'sindeki lipaz aktivitelerine bakılmış ve her bir durumda aktivite değerlerinin eşit olduğu (36.6 U) görülmüştür. Sıvısı ile parçalanmış mikroorganizmanın aktivitelerinin aynı olması, yapılan parçalama işlemlerinin enzim aktivitesini olumsuz etkilemediğini göstermektedir.

7 günlük tepkimeler sonucunda elde edilen ee(P) ve dönüşüm değerleri sırasıyla Şekil 4.23 ve Şekil 4.24'te görülmektedir.



Şekil 4.23 *Rhizopus oryzae* (CBS 111718) mikroorganizması varlığında gerçekleştirilen enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde parçalama türünün ee(P) üzerine etkisi (Substrat=5.1 g/L, pH:ayarsız, V=5ml, T=30°C)



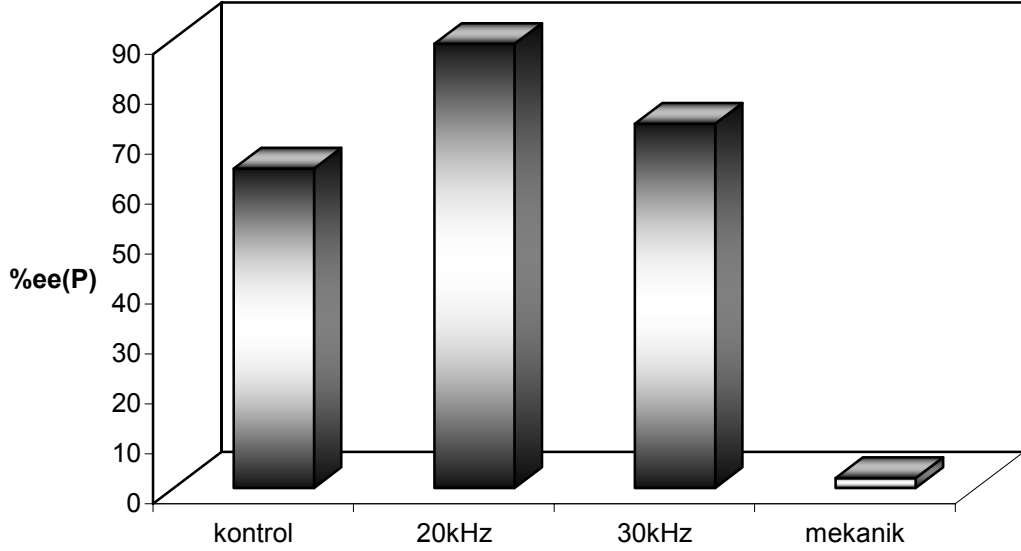
Şekil 4.24 *Rhizopus oryzae* (CBS 111718) mikroorganizması varlığında gerçekleştirilen enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde parçalama türünün dönüşüm üzerine etkisi (Substrat=5.1 g/L, pH:ayarsız, V=5ml, T=30°C)

Şekil 4.24'ten görüldüğü gibi 20 ve 30 kHz'lik ultrasonik homojenizerlerle ve çoğalan mikroorganizmanın sıvı kısmıyla gerçekleştirilen deneylerde (kontrol deneyi) % 100'e yakın dönüşüm değeri bulunmuştur. Şekil 4.23'te ise dönüşümün artmasıyla enantiyomerik aşırılık değeri de artmaktadır. Kinetik rezolüsyonda dönüşüm değerinin % 50'nin üzerine çıkması durumunda enantiyomerik aşırılık değerinin azalmasına rağmen burada dönüşümün yaklaşık % 100'e ulaştığı ve ee(P) değerinin de düzenli olarak arttığı görülmektedir. Dolayısıyla bu hidroliz tepkimesinde sadece kinetik rezolüsyon değil, bunun yanında mikroorganizmada bulunan rasemaz enzimlerinin katalizörlüğünde derasemizasyon tepkimesinin de gerçekleştiği düşünülmektedir. Mekanik homojenizerle gerçekleştirilen deneylerde ise ikinci günden sonra dönüşüm azalmaya başlamıştır. Bu tepkimenin analiz sonuçları incelendiğinde (Ek 8) 17. dk'da benzoin asetat, 20. dk'da (S)-benzoin, 24. dk'da (R)-benzoin piklerinin (Ek 2) yanında 14. dk'da daha önce görülmeyen bir pik daha elde edilmiştir. Bu durum mekanik homojenizerle yapılmış olan tüm deneylerde görülmektedir. Dönüşümdeki ve ee(P)'deki azalmanın nedeninin büyük bir olasılıkla (S)-benzoinden bir başka maddenin oluşumu olduğu düşünülmektedir.

Şekil 4.24'te ses ötesi dalga uygulanmış tepkimelerin dönüşüm değerlerindeki artışın ses ötesi dalga uygulanmamış tepkimelerin dönüşüm değerlerindeki artıştan farklı oluşu ses ötesi dalgaların tepkime hızını arttırmasından kaynaklanmaktadır. Literatürde, enzim veya mikroorganizma katalizörlüğünde enantiyoseçimli maddelerin üretimi üzerine ses ötesi dalgaların etkisinin incelendiği herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Genellikle kimyasal katalizörlerin kullanıldığı enantiyoseçimli tepkimeler üzerine ses ötesi dalga etkisinin incelendiği çalışmalar bulunmaktadır. Török *et al.* 1997 etil piruvatın etil laktata enantiyoseçimli hidrojenasyonunu platin katalizörler varlığında gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarında katalizöre (Pt/K-10) 20 kHz'lik ultrasonik banyoda önişlem uygulanmış, bunun sonucunda tepkime süresinin kısaldığını ve enantiyomerik aşırılığın % 25'den % 44'e yükseldiğini görmüşlerdir. Buradaki ses ötesi dalgaların etkisinin, destek maddesi olarak kilin (K-10) kullanıldığı katalizörde lameller arası boşluktan metal taneciklerinin yüzeye aktarılması ve metal yüzeyden safsızlıkların giderilmesiyle daha etkin bir katalizör aktivitesinin sağlandığı belirtilmektedir. Toukoniitty *et al.* 2006 1-fenil-1,2-propandionun platin katalizörlüğünde enantiyoseçimli hidrojenasyon tepkimesinde katalizöre 20 kHz'lik prob ile ses ötesi dalga önişlemi uygulanmıştır. Kullanılan çözücü türüne göre başlangıç hızının ve enantiyomerik aşırılığın az da olsa arttığı belirtilmektedir. Katalizörlerdeki metal tanecik boyutları TEM analizleriyle ölçülmüş ses ötesi dalga önişlemi ile çok fazla bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Katalizör önişleminin enantiyomerik aşırılık ve bölgesel seçimliliği etkilediği belirtilmektedir. Literatürdeki bu sonuçlara benzer şekilde Şekil 4.24 incelendiğinde kontrol deneyine göre ses ötesi dalga uygulamasının tepkimeyi hızlandırdığı görülmektedir.

Bu yüksek lisans çalışmasında ise literatürde rasemazlar hakkında çok fazla bilgi olmadığı için rasemazların hücrenin hangi bölgesinde olduğu hakkında bir bilgi elde edilememiştir. Çalışmada, ses ötesi dalgaların mikroorganizmadaki rasemazları serbest hale çıkardığı ve homojen bir ortam sağladığı düşünülmektedir. Bu etkilerden dolayı enantiyomerik aşırılık değeri kontrol deneyinde % 64 iken 20 kHz'lik ultrasonik homojenizerin kullanıldığı deneylerde % 100 dönüşümle % 89 değerine ulaşılmıştır (Şekil 4.25). 20 kHz'lik ultrasonik homojenizerle en yüksek ee(P) değerine ulaşılmasının yanında 30 kHz'lik ultrasonik homojenizerle ee(P) değeri aynı oranda

arttırılamamış, buna neden olarak ses ötesi dalgaların enzime ve hücreye belli bir seviyeden sonra zarar verdiği düşünülmüştür.



Şekil 4.25 *Rhizopus oryzae* (CBS 111718) mikroorganizması varlığında gerçekleştirilen enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde 7. gün sonunda parçalama türünün ee(P) üzerine etkisi (Substrat=5.1 g/L, V=5ml, pH:ayarsız, T=30°C)

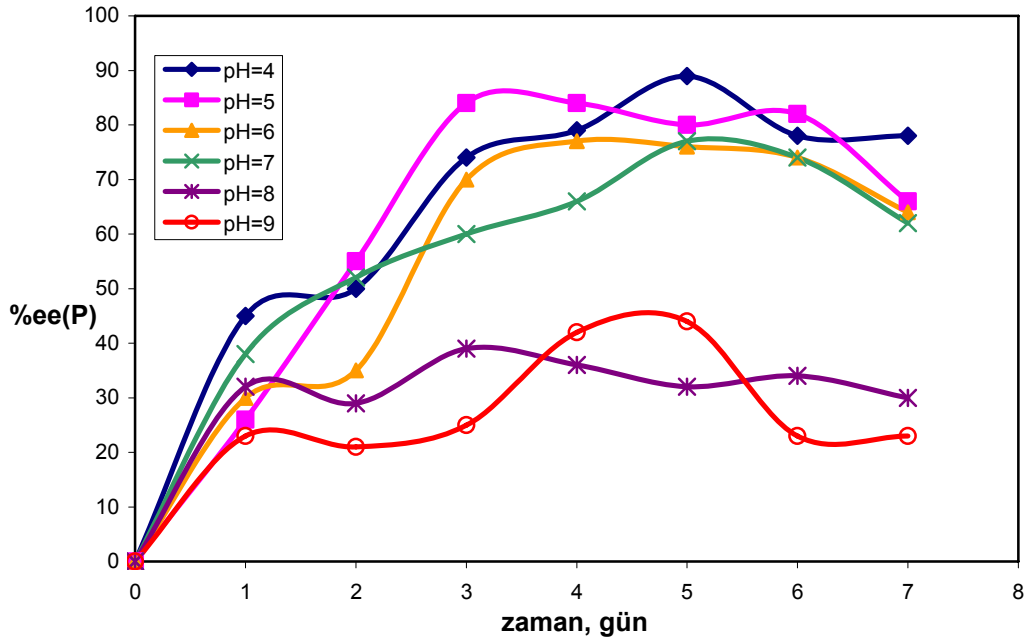
Demir *et al.* (2002) çalışmalarında, bu yüksek lisans çalışmasından farklı kaynaklı *Rhizopus oryzae* (ATCC 9363) mikroorganizması varlığında derasemizasyon tepkimesiyle enantiyomerik saflıkta benzoinin eldesini incelemişlerdir. pH 4-5'te % 71 dönüşümle % 85 ee değerine sahip (*S*)-enantiyomer (15 gün), pH 7.5-8'te % 73-76 dönüşümle % 95-97 ee değerine sahip (*R*)-enantiyomer (21 gün) elde edilmiştir.

4.2.2 Mikroorganizma ile gerçekleştirilen deneylerde pH etkisi

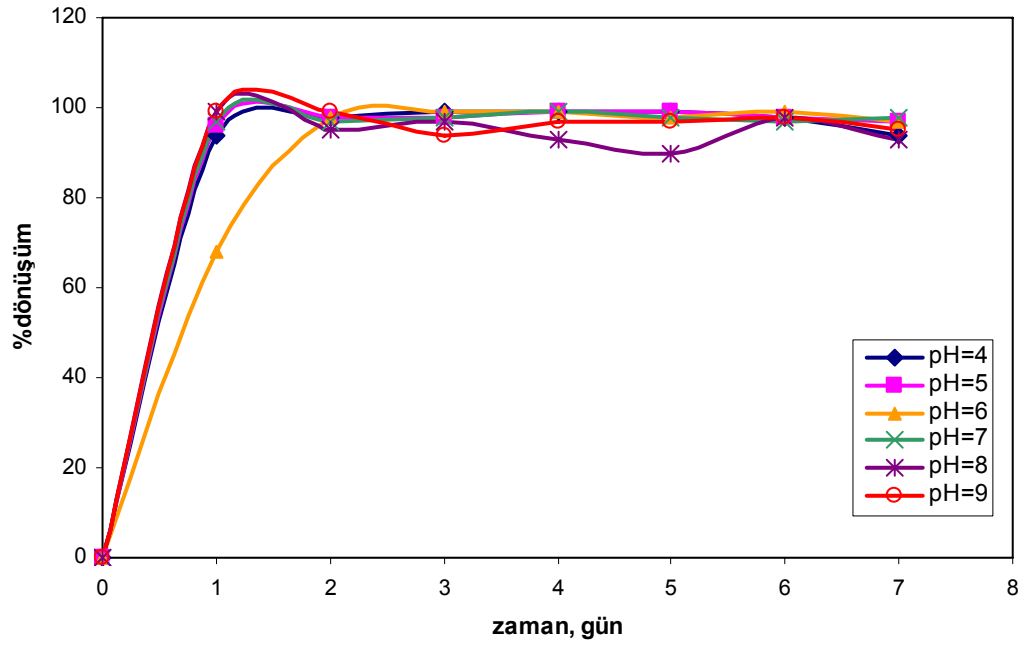
Rasemik benzoin asetattan enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretimine pH etkisini incelemek amacıyla pH'ı 3, 3.5, 4, 5, 6, 7, 8 ve 9 değerinde ayarlanmış, bileşimi Çizelge 4.2'de yer alan sıvı çoğalma ortamlarında üretilmiş *Rhizopus oryzae* (CBS 111718) mikroorganizması kullanılarak deneyler yapılmıştır. pH=8 ve pH=9'da mikroorganizmalar fazla çoğalmamıştır. Parçalama türünün etkisinin

incelendiği deneylerde 20 kHz'lik ultrasonik homojenizer ile en yüksek ee(P) değerine ulaşılmış olmasına rağmen pH etkisini görmek için 20 kHz'lik ultrasonik homojenizerin yanında 30 kHz'lik ultrasonik homojenizer kullanılarak da parçalama işlemi gerçekleştirilmiştir. Homojenize edilmiş mikroorganizmalı karışımdan 5 ml alınıp 510 mg rasemik benzoin asetatın 3 ml DMSO'da çözülmesiyle hazırlanmış karışımın 150 µl'si (20 mM) tepkime ortamına ilave edilerek tepkimeler başlatılmıştır. Deneyler 30°C sıcaklıktaki ve 200 rpm karıştırma hızındaki orbital çalkalayıcıda gerçekleştirilmiştir. 7 günlük deney süresince her gün sonlandırılan örnekler Chiralcel OB kolonda analizlenmiştir. Tepkimeler sonunda bütün pH'larda (S)-benzoin oluşmuştur. Sonuçlar 2 deneyin ortalaması alınarak verilmiştir.

30 kHz'lik homojenizerin kullanıldığı deneyler pH 4, 5, 6, 7, 8 ve 9 değerinde üretilmiş *Rhizopus oryzae* (CBS 111718) mikroorganizmalarla gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.26 ve Şekil 4.27'de, 7 günlük deney süresince her gün alınan örneklerin analizi sonucu hesaplanan ee(P) ve dönüşüm değerleri yer almaktadır.



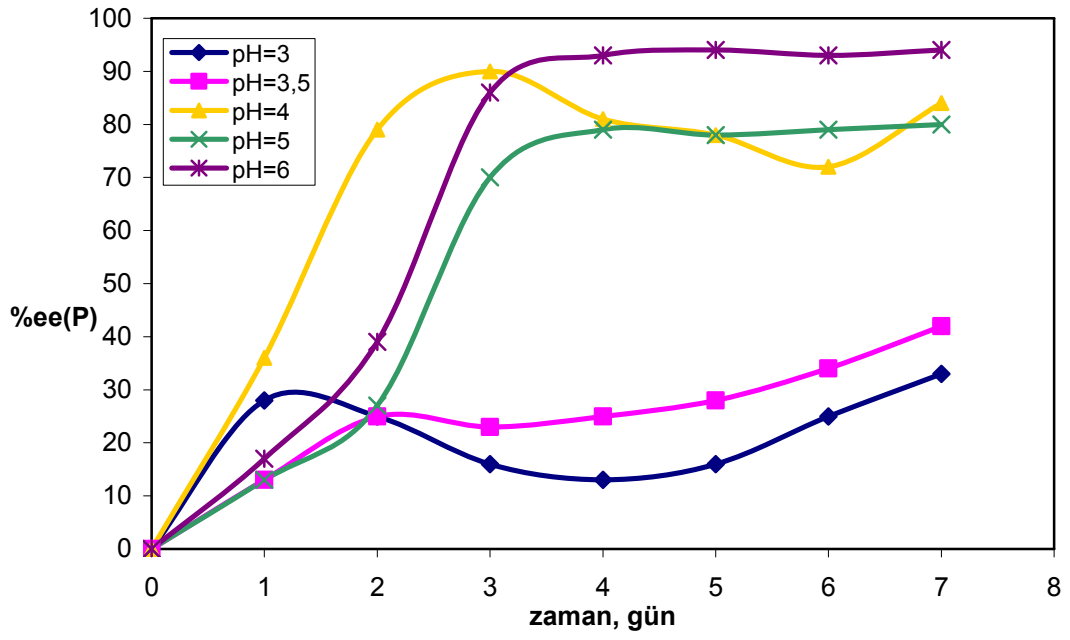
Şekil 4.26 *Rhizopus oryzae* (CBS 111718) mikroorganizması varlığında gerçekleştirilen enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde üreme ortamı pH'ının ee(P) üzerine etkisi (Substrat=5.1 g/L, V=5ml, T=30°C, parçalama türü=30 kHz'lik ultrasonik homojenizer)



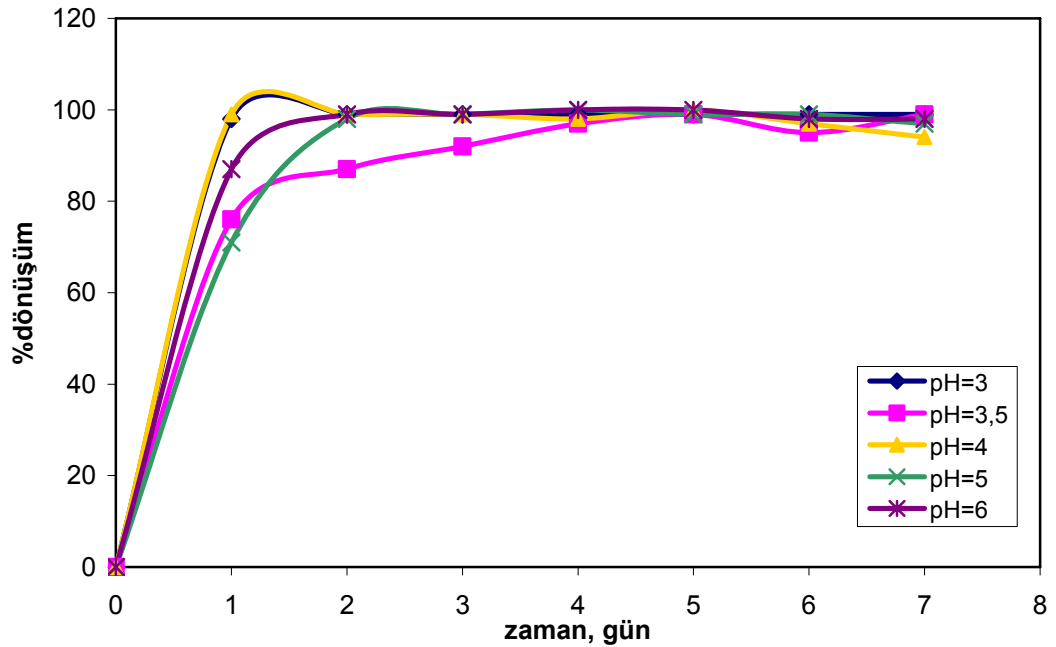
Şekil 4.27 *Rhizopus oryzae* (CBS 111718) mikroorganizması varlığında gerçekleştirilen enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde üreme ortamı pH'nın dönüşüm üzerine etkisi (Substrat=5.1 g/L, V=5ml, T=30°C, parçalama türü=30 kHz'lik ultrasonik homojenizer)

Şekil 4.26'da görüldüğü gibi düşük pH'larda (4, 5, 6) ee(P) değeri yüksek çıkmıştır. pH 4'te 5.günde % 89 ee(P) değeri elde edilmiştir.

pH deneyleri 20 kHz'lik homojenizer kullanılarak da yapılmıştır. 30 kHz'lik homojenizerin kullanıldığı deneylerde düşük pH'larda daha yüksek enantiyomerik aşırılık elde edildiği için 20 kHz'lik homojenizerin kullanıldığı deneyler pH 3, 3.5, 4, 5 ve 6 değerinde üretilmiş *Rhizopus oryzae* (CBS 111718) mikroorganizmalarla gerçekleştirilmiştir. 7 günlük deney süresince her gün alınan örneklerin analizi sonucu hesaplanan ee(P) ve dönüşüm değerleri sırasıyla Şekil 4.28 ve Şekil 4.29'da yer almaktadır.



Şekil 4.28 *Rhizopus oryzae* (CBS 111718) mikroorganizması varlığında gerçekleştirilen enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde üreme ortamı pH'nın ee(P) üzerine etkisi (Substrat=5.1 g/L, V=5ml, T=30°C, parçalama türü=20 kHz'lik ultrasonik homojenizer)



Şekil 4.29 *Rhizopus oryzae* (CBS 111718) mikroorganizması varlığında gerçekleştirilen enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretiminde üreme ortamı pH'nın ee(P) üzerine etkisi (Substrat=5.1 g/L, V=5ml, T=30°C, parçalama türü=20 kHz'lik ultrasonik homojenizer)

Şekil 4.28’de de görüldüğü gibi 20 kHz’lik ultrasonik homojenizerin kullanıldığı tepkimelerde de pH 4, 5 ve 6’da ee(P) değeri yüksek çıkmıştır. pH 6’da 6.günde % 96 ee(P) değeri elde edilmiştir.

Demir *et al.* (2002) çalışmalarında bu çalışmadan farklı kaynaklı *Rhizopus oryzae* (ATCC 9363) mikroorganizması varlığında derasemizasyon tepkimesiyle enantiyomerik saflıkta benzoinin eldesini incelemişlerdir. Çalışmalarında tepkime için optimum pH aralığı 7.5-8.5 olarak bulmuşlar ve tepkime süresince (21 gün) (*R*)-enantiyomerin arttığı görmüşlerdir. Ancak tepkime farklı pH değerlerinde (4-5) gerçekleştirildiğinde (*S*)-enantiyomerin oluştuğunu görmüşlerdir. Bu çalışmada denenen tüm pH’larda hep (*S*)-benzoin elde edilmiştir. Bu farklılığın mikroorganizma türünün farklı olmasından ve en önemlisi ses ötesi dalgaların tepkime üzerine etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

5. SONUÇLAR

Optikçe saf benzoin üretimine enzim türünün etkisini incelemek amacıyla, Novozym 435, Lipozyme RM IM, PPL, Amano Lipaz AK, *Candida rugosa* ve *Rhizopus arrhizus* lipazları varlığında rasemik benzoin asetatın hidroliz tepkimesi gerçekleştirilmiştir. Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesine enzim kaynağının etkisinin incelendiği deneylerde yaklaşık % 50 dönüşümde en iyi enantiyomerik aşırılık ve enantiyomerik oran değeri *Rhizopus arrhizus* ile % 51 ve 5 olarak elde edilmiştir.

Rhizopus arrhizus lipazı ile en iyi ee(P) değerinin elde edilmesi sonucu tepkime süresini belirlemek amacıyla 48 saatlik deneyler yapılmıştır. Dördüncü saatten sonra dönüşüm değeri % 50'den daha yüksek değerlere çıktığı için enzim diğer enantiyomere de etki etmeye başlamış, dolayısıyla enantiyomerik aşırılık azalmıştır. Bu nedenle bundan sonraki deneylerde tepkime süresi 4 saat olarak belirlenmiştir.

Optikçe saf benzoin üretimine pH etkisini incelemek amacıyla pH 4, 5, 5.7, 6, 6.3, 6.5, 6.8, 7, 8 ve 9 değerinde hazırlanmış çeşitli tamponlar ve enzim olarak *Rhizopus arrhizus* kaynaklı lipaz kullanılmıştır. Yüksek pH değerlerinde (6.5-9) tepkime, ortalama 30 dk gibi kısa bir sürede % 50 dönüşüme ulaşmıştır. Sürenin daha fazla artmasıyla ee değerinde çok fazla bir değişim gözlenmemiştir. Düşük pH'larda (4-6.3) ise % 50 dönüşüm değerine ortalama olarak 1 saatte ulaşılmıştır. *Rhizopus arrhizus* kaynaklı lipazın kullanıldığı hidroliz tepkimesine pH etkisinin incelendiği deneylerde yaklaşık % 50 dönüşüm değerinde pH=6'da % 51, pH=6.3'te % 47 ve pH=6.5'te % 44 ee(P) değerleri hesaplanmıştır.

Sıcaklık etkisini incelemek amacıyla 4 farklı sıcaklık değerinde (30, 37, 45, 50°C) deneyler gerçekleştirilmiştir. 37, 45 ve 50°C sıcaklıklarda, sıcaklık artışı tepkime hızını etkilemiş ve 15 dk gibi kısa bir sürede dönüşüm % 50'nin çok üzerine çıkmıştır. 30°C'de ise dönüşüm zamanla artmış ve bununla beraber ee(P) değerinde de düzenli bir artış görülmüştür.

Rhizopus arrhizus kaynaklı lipaz katalizörlüğünde gerçekleştirilen hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretimine karıştırma hızının etkisini incelemek amacıyla deneyler 150, 200 ve 250 rpm’de gerçekleştirilmiştir. 250 rpm karıştırma hızında dönüşüm daha hızlı artmış ve en yüksek ee(P) (% 60) ve E (7,2) değeri elde edilmiştir. 250 rpm’de çalışırken karşılaşılan zorluklar (tepkime kabının fırlaması gibi) nedeniyle bundan sonraki deneyler 200 rpm’de yapılmıştır (ee(P)=% 51).

Rhizopus arrhizus kaynaklı lipazın kullanıldığı hidroliz tepkimesine mikrodalga etkisi pH’ı 6, 6.3, 6.5 ve 7 olan fosfat tampon çözeltilerinde incelenmiştir. Tepkimeler 60°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Yapılan deneylerde 2 dk’lık mikrodalga uygulama süresinde tüm pH’larda yaklaşık % 50 dönüşüm değerine ulaşıldığı için daha uzun süre mikrodalga uygulaması düşünülmemiştir. Burada yine pH=6-6.5 arasında en iyi ee değeri elde edilmiş pH 7’de ise ee değeri oldukça azalmıştır. Mikrodalga etkisinin incelendiği pH deneylerinde pH 6’da en yüksek ee(P) (% 50) ve E (4,8) değeri elde edilmiştir. Ayrıca, mikrodalga’nın farklı sıcaklıklarda enantiyoseçimli hidroliz tepkimesine etkisini görmek için pH=6 olan tampon çözeltide 60, 70, 80 ve 90°C sıcaklıklarda deneyler yapılmış ve yine 2 dk’lık mikrodalga uygulama süresinde % 50 dönüşüme ulaşılmış, sıcaklık arttıkça dönüşüm daha da artmıştır. Mikrodalga etkisinin incelendiği sıcaklık deneylerinde en yüksek ee(P) (% 50) ve E (4,8) değeri 60°C’de elde edilmiştir.

Rasemik benzoin asetatın lipaz katalizörlüğünde gerçekleştirilen hidroliz tepkimesini en çok etkileyen üç parametre (substrat derişimi, pH ve enzim miktarı) için RSM ile belirlenen 20 adet deney yapılmış ve üç bağımsız değişkenin enantiyomerik aşırılığa etkisini gösteren denklem çözülerek optimum koşullar belirlenmiştir. Optimum koşul olarak belirlenen 75 mM substrat derişimi, pH=4.65 ve 75 mg enzim ile deney yapılmış, % 53 enantiyomerik aşırılığa ulaşılmıştır.

Lipaz katalizörlüğünde gerçekleştirilen rasemik benzoin asetatın hidroliz tepkimesi ile enantiyomerik saflıkta benzoin üretiminde, enantiyomerik aşırılık değerinin fazla yükseltilememesinden dolayı bundan sonraki deneylerde enzim kaynağı olarak *Rhizopus oryzae* (CBS 111718) mikroorganizması kullanılmıştır. İlk olarak, enzim

kaynağı olan küflerin tepkime ortamında homojen bir şekilde bulunması için 20 ve 30 kHz'lik ultrasonik homojenizerler ve mekanik homojenizer kullanılmıştır. 20 ve 30 kHz'lik ultrasonik homojenizerlerle ve çoğalan mikroorganizmanın sıvı kısmıyla gerçekleştirilen deneylerde % 100'e yakın dönüşüm değeri bulunmuştur. Mekanik homojenizerle gerçekleştirilen deneylerde ise ikinci günden sonra dönüşüm azalmaya başlamıştır. Bu tepkimeler sonucunda 20 kHz'lik ultrasonik homojenizerin kullanıldığı deneylerde ortalama % 100 dönüşümde % 89 ee(P) değerine ulaşılmış ve kontrol deneyine göre tepkime daha hızlanmıştır.

Rasemik benzoin asetatın enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile optikçe saf benzoin üretimine pH etkisini incelemek amacıyla pH'ı 3, 3.5, 4, 5, 6, 7, 8 ve 9 değerinde ayarlanmış, sıvı çoğalma ortamında üretilmiş *Rhizopus oryzae* (CBS 111718) mikroorganizması kullanılarak deneyler yapılmıştır. 30 kHz'lik homojenizerin kullanıldığı deneyler pH 4, 5, 6, 7, 8 ve 9 değerinde üretilmiş *Rhizopus oryzae* (CBS 111718) mikroorganizmalarla gerçekleştirilmiş ve düşük pH'larda (4, 5, 6) ee(P) değerinin yüksek çıktığı görülmüştür. pH=4'te 5.günde % 89 ee(P) değeri elde edilmiştir. 30 kHz'lik homojenizerin kullanıldığı deneylerde düşük pH'larda daha yüksek enantiyomerik aşırılık elde edildiği için 20 kHz'lik homojenizerin kullanıldığı deneyler pH 3, 3.5, 4, 5 ve 6 değerinde üretilmiş *Rhizopus oryzae* (CBS 111718) mikroorganizmalarla gerçekleştirilmiştir. 20 kHz'lik ultrasonik homojenizerin kullanıldığı tepkimelerde de pH 4, 5 ve 6'da ee(P) değeri yüksek çıkmıştır. pH=6'da 6.günde % 96 ee(P) değeri elde edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Adam, W., Diaz, M.T., Fell, R.T. and Moller, C.R. 1996. Kinetic Resolution of Racemic Hydroxy Ketones By Lipase Catalyzed Irreversible Transesterification. *Tetrahedron Asymmetry*, 7(3); 2207–2210.
- Anonim. 2007. İGEME, İhracatı Geliştirme Etüd Merkezi, Ankara.
- Anonim. 2007. Web sitesi: http://www.metalurji.org.tr/dergi/dergi137/d137_5256.pdf. Erişim Tarihi: 02/05/2007.
- Anonim. 2007. Web sitesi: <http://www.sonerorhan.com/biyoloji.htm>. Erişim Tarihi: 22/04/2007.
- Anonim. 2007. Web sitesi: <http://www.birseyyogren.com/hakkinda/lipaz>. Erişim Tarihi: 17/05/2007.
- Anonymous. 2007. Web sitesi: <http://www.sigma-aldrich.com>. Erişim Tarihi: 11/06/2007.
- Anonymous. 2007. Web sitesi: <http://www.chemfinder.com>. Erişim Tarihi: 12/07/2007.
- Anonymous. 2007. Web sitesi: http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Zygomycetes/Rhizopus/R_oryzae.html. Erişim Tarihi: 11/06/2007.
- Anonymous. 2007. Web sitesi: <http://www.purchon.com/physics/electromagnetic.htm#micro>. Erişim Tarihi: 14/06/2007.
- Anonymous. 2007. Web sitesi: http://microwavetechnology.gsk.com/main/pdf/F_Mavandadi_GSK_Workshop_092805.pdf. Erişim Tarihi: 09/07/2007.
- Anonymous. 2007. Web sitesi: <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section3/pri33.htm> Erişim Tarihi: 17/06/2007.
- Anonymous. 2007. Web sitesi: <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section3/pri336.htm>. Erişim Tarihi: 17/06/2007.
- Aoyagi, Y., Agata, N., Shibata, N., Horiguchi, M. and Williams, R.M. 2000. Lipase TL –mediated kinetic resolution of benzoin: facile synthesis of (1R,2S)-erythro -2-amino-1,2-diphenylthanol. *Tetrahedron Letters* 41, 10159–10162.
- Chadha, A. and Baskar, B. 2002. Biocatalytic deracemisation of α -hydroxy esters: high yield preparation of (*S*)-ethyl 2-hydroxy-4-phenylbutanoate from the racemate. *Tetrahedron Asymmetry*, 13; 1461-1464.

- Demir, A.S., D nnwald, T., Iding, H., Pohl, M. and M ller, M. 1999. Asymmetric benzoin reaction catalyzed by benzoylformate decarboxylase. *Tetrahedron Asymmetry*, 10; 4769–4774.
- Demir, A.S., Pohl, M., Janzen, E. and M ller, M. 2001a. Enantioselective Synthesis of Hydroxy Ketones Through Cleavage and Formation of Acyloin Linkage. Enzymatic Kinetic Resolution via C-C Bond Cleavage. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*; 633-635.
- Demir, A.S., Hamamcı, H., Ayhan, P., Duygu, A.N., Iğdir, A.C. and Capanoğlu, C. 2004. Fungi mediated conversion of benzil to benzoin and hydrobenzoin. *Tetrahedron Asymmetry*, 15; 2579–2582.
- Demir, A.S., Hamamcı, H., Sesenoğlu, O., Neslihanoglu, R., Asikoğlu, B. and  apanoğlu, D. 2002. Fungal deracemization of benzoin. *Tetrahedron Letters*, 43; 6447–6449.
- Demir, A.S., Hamamcı, H., Tanyeli, C., Akhmedov, I.M. and Doganel, F. 1998. Synthesis and *Rhizopus oryzae* mediated enantioselective hydrolysis of α -acetoxy aryl alkyl ketones. *Tetrahedron Asymmetry*, 9; 1673–1677.
- Demir, A.S., Hamamcı, H., Sesenoğlu, O., Aydoğan, F., Capanoğlu, C. and Neslihanoglu, R. 2001b. Simple chemoenzymatic access to enantiopure pharmacologically interesting (*R*)-2-hydroxypropiofenone. *Tetrahedron Asymmetry*, 12; 1953–1956.
- Demir, A.S., Caliskan, Z., Aydin, A.E. and Bicer, I. 2006. A new and efficient chemoenzymatic route to both enantiomers of α -acetoxy and α -hydroxy- α -methoxy cyclic enones. *Tetrahedron: Asymmetry*, 17; 786-791.
- Ema, T., Maeno, S., Takaya, Y., Sakai, T. and Utaka, M. 1996. Significant Effect of Acyl Groups on Enantioselectivity in Lipase-Catalyzed Transesterifications. *Tetrahedron: Asymmetry*, 47; 625–628.
- Erdik, E., Obalı, M., Y ksek şık, N.,  ktemer, A., Pekel, T. ve  hsanoğlu, E. 1987. *Denel Organik Kimya*. Ankara  nv. Fen Fakültesi Yayını, syf478, Ankara.
- Ghanem, A. and Aboul-Enein, H.Y. 2004. Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents. *Tetrahedron: Asymmetry Report Number 78*, 15, 3331-3351.
- Gümüşdere, H.T. 2007. Zararlı Organik Bileşiklerin Bozundurulmasına Ses  tesi Dalgaların (Ultrasound) Etkisi, Ankara Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.

- Kapucu, N. 2003. Lipaz Enziminin Katalizlediği Bir Ester Üretiminin Süperkritik CO₂'de İncelenmesi. Ankara Üniversitesi, Doktora Tezi. Ankara.
- Keha, E.E. ve Kührevioğlu, Ö.İ. 2004. Biyokimya. 3.baskı, Aktif Yay., 91-140, Erzurum.
- Lin, G. and Yuan Lin, W. 1998. Microwave-promoted lipase-catalyzed reactions. Tetrahedron Letters, 39; 4333-4336.
- Nakamura, K., Kondo, S., Kawai, Y., Hida, K., Kitano, K. and Ohno, A. 1996. Enantio- and regioselective reduction of α -diketones by baker's yeast, Tetrahedron: Asymmetry, 7; 409-412.
- Pamuk, F. 2000. Biyokimya. Gazi Kitabevi, 103–117, Ankara.
- Parker, M.C., Besson, T., Lamare, S. and Legoy, M.D. 1996. Microwave radiation can increase the rate of enzyme-catalysed reactions in organic media. Tetrahedron Letters, 37 (46); 8383-8386.
- Sağlam, D., Aran, N. ve Üstün, G. 2005. Katı Faz Fermentasyon Yöntemi İle *Rhizopus oryzae* Küfünden Lipaz Üretimi, GAP IV. Tarım Kongresi, Şanlıurfa.
- Sheldon, R.A. 1993. Chirotechnology. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Toukoniitty, B., Toukoniitty, E., Maki-Arvela, P., Mikkola, J.P., Salmi, T., Murzin, D.Y. and Kooyman, P.J. 2006. Effect of ultrasound in enantioselective hydrogenation of 1-phenyl-1,2-propanedione: comparison of catalyst activation, solvent and supports. Ultrasonics Sonochemistry, 13; 68-75.
- Török, B., Felföldi, K., Szakonyi, G. and Bartok, M. 1997. Sonochemical enantioselective hydrogenation of ethyl pyruvate over platinum catalysts. Ultrasonics Sonochemistry, 4; 301-304.
- Tüzün, C. 2005. Biyokimya. Palme Yayınları, 81–100, Ankara.
- Yadav, G. and Lathi, P.S. 2004. Synergism between microwave and enzyme catalysis in intensification of reactions and selectivities: transesterification of methyl acetoacetate with alcohols. Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, 223; 51-56.

EKLER

- Ek 1 Kullanılan kimyasalların bazı özellikleri
- Ek 2 Substrat (ras-benzoin asetat) ve ürünlerin ((*S*) ve (*R*) benzoin) kromatogramları
- Ek 3 Enzim türü etkisinin incelendiği deneylerde zamanla % dönüşüm, %ee(P) ve E'nin değişimi
- Ek 4 Tepkime süresinin incelendiği deneylerde zamanla % dönüşüm, % ee(P) ve E'nin değişimi
- Ek 5 pH etkisinin incelendiği deneylerde zamanla % dönüşüm, % ee(P) ve E'nin değişimi
- Ek 6 Sıcaklık etkisinin incelendiği deneylerde zamanla % dönüşüm, % ee(P) ve E'nin değişimi
- Ek 7 Karıştırma hızı etkisinin incelendiği deneylerde zamanla % dönüşüm, % ee(P) ve E'nin değişimi
- Ek 8 Mikrodalga etkisinin incelendiği deneylerde zamanla % dönüşüm, % ee(P) ve E'nin değişimi
- Ek 9 Mekanik homojenizerle gerçekleştirilen deneylerden örnek bir kromatogram

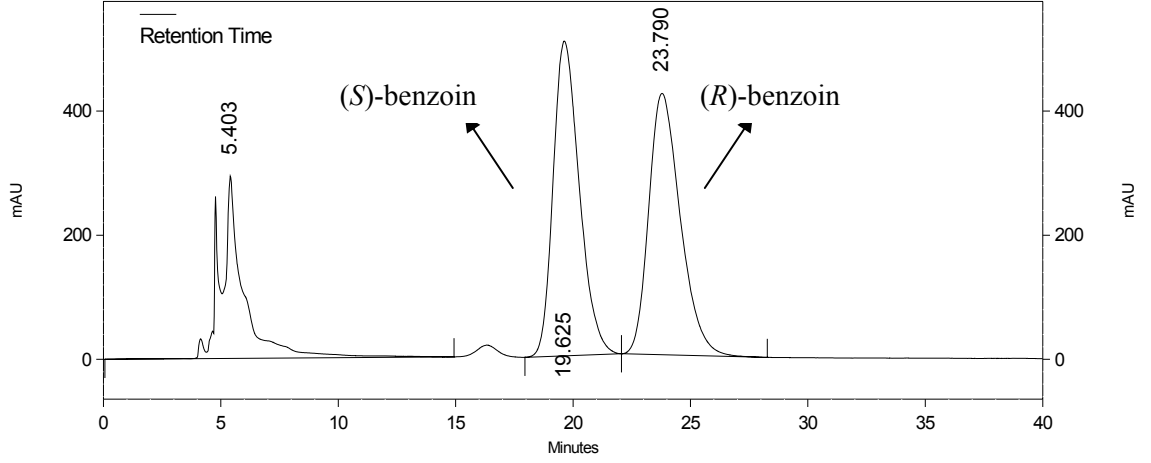
Ek 1 Kullanılan kimyasalların bazı özellikleri

Adı	Kapalı Formül	Erime Sic., °C	Kaynama Sic., °C	Molekül Ağırlığı,g/mol	Yoğunluk, g/ml
Asetik anhidrit	C ₄ H ₆ O ₃	-73.1	139.9	102.09	1.08
Asetik asit	C ₂ H ₄ O ₂	16.6	117.9	60.05	1.0492
Sülfürk asit	H ₂ SO ₄	3	280	98.07	1.84
Hidroklorik asit	HCl	-114.24	-85.06	36.46	0.909
Etanol	C ₂ H ₆ O	-114.1	78.3	46.07	0.789
Dimetil sülfoksit	C ₂ H ₆ OS	18.45	189	78.13	1.096
Etilasetat	C ₄ H ₈ O ₂	-83.6	77.1	88.106	0.8945
Hegzan	C ₆ H ₁₄	-95	69	86.18	0.6548
2-propanol	C ₃ H ₈ O	-88.5	82.4	60.10	0.785
Aseton	C ₃ H ₆ O	-94.3	56.2	58.08	0.7857
Kloroform	CHCl ₃	-63.7	61.7	119.38	1.49845
Sodyum fosfat heptahidrat	Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	48.1	-	268.07	1.68
Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat	NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	60	-	156.01	1.915
Magnezyum sülfat heptahidrat	MgSO ₄ .7H ₂ O	-	-	246.48	1.68
Tris	NH ₂ C(CH ₃ O) ₃	167-172	219-220	121.14	-
Tribütirin	C ₁₅ H ₂₆ O ₆	-75	305-310	302.37	1.032
Fenolftaleyn	C ₂₀ H ₁₄ O ₄	263-265	258	318.33	1.299
Sodyum hidroksit	NaOH	318	1390	39.99	2.13
Glukoz	C ₆ H ₁₂ O ₆	150-152	-	180.16	1.54
Sodyum klorür	NaCl	801	1413	58.44	2.165

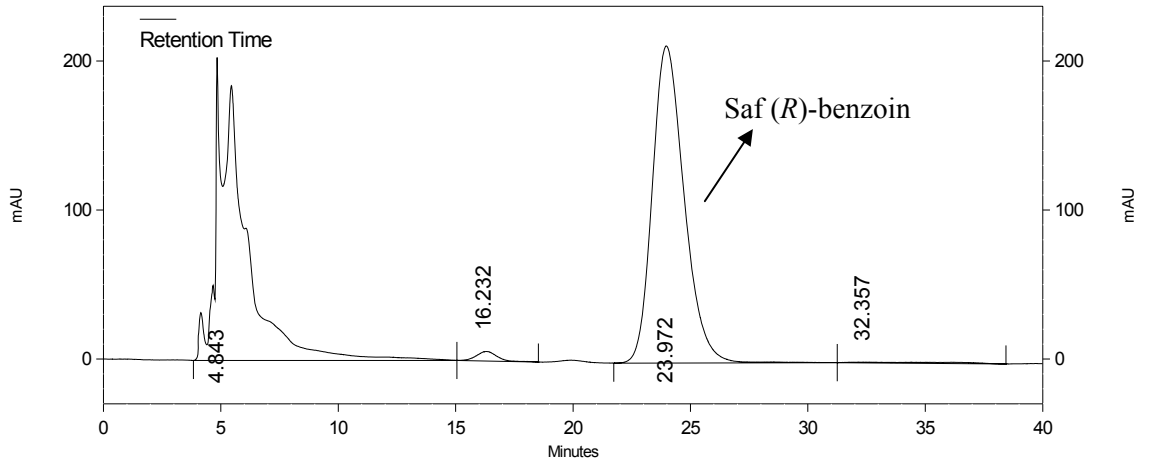
(<http://www.sigmaaldrich.com>, 2007, <http://chemfinder.cambridgesoft.com>, 2007)

Ek 2 Substrat (ras-benzoin asetat) ve ürünlerin ((*S*) ve (*R*) benzoin) kromatogramları

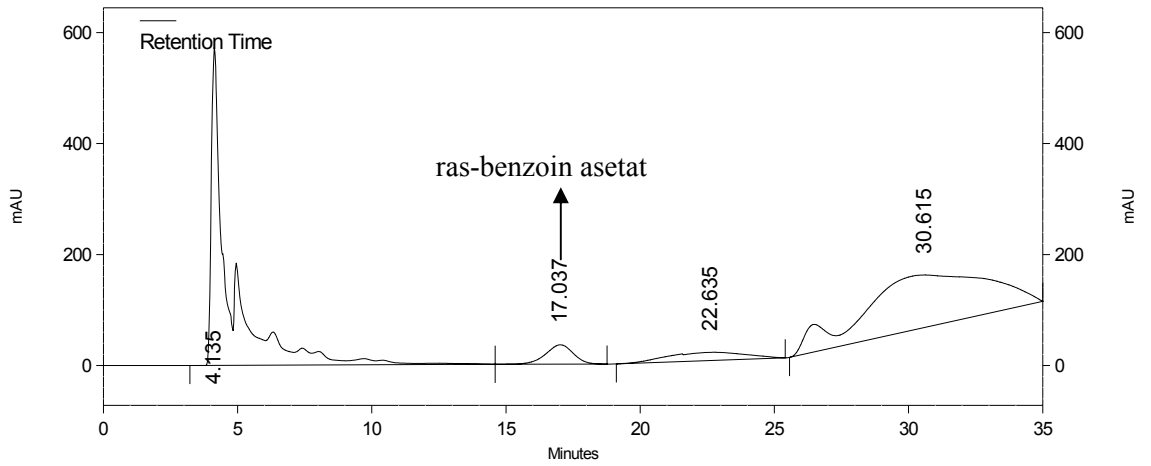
1. Rasemik Benzoin



2. Saf (*R*)-Benzoin



3. Rasemik Benzoin Asetat



Ek 3 Enzim türü etkisinin incelendiği deneylerde zamanla % dönüşüm, % ee(P) ve E'nin değişimi

zaman,h	Novozym 435	Lipozyme RM IM	PPL	Amano AK	<i>C.rugosa</i>	<i>R.arrhizus</i>
%ee(P)						
0	0	0	0	0	0	0
1	0,5	5	5	4	22	14
2	2	6	8	6	21	35
3	5	11	8	26	22	41
4	5	7	9	20	27	51
%dönüşüm						
0	0	0	0	0	0	0
1	15	60	38	49	32	33
2	44	68	89	52	34	38
3	51	68	92	49	38	47
4	64	69	92	52	40	59
E						
0	0	0	0	0	0	0
1	1,01	1,16	1,16	1,12	1,90	1,50
2	1,06	1,19	1,26	1,19	1,85	2,86
3	1,16	1,38	1,26	2,15	1,90	3,49
4	1,16	1,22	1,30	1,79	2,22	5,00

Ek 4 Tepkime süresinin incelendiği deneylerde zamanla % dönüşüm, % ee(P) ve E'nin değişimi

t,h	%dönüşüm	%ee(P)	E
0	20	19	1,74
0,5	22	26	2,15
1	33	28	2,29
1,5	32	33	2,68
2	38	35	2,86
2,5	58	41	3,49
3	57	51	5,00
4	59	51	5,00
5	65	57	6,35
6	77	62	7,88
9	91	61	7,54
12	91	61	7,54
18	92	58	6,62
24	93	59	6,91
36	94	48	4,47
42	93	41	3,49
48	98	8	1,26

Ek 5 pH etkisinin incelendiği deneylerde zamanla % dönüşüm, % ee(P) ve E'nin değişimi

zaman,h	pH=4	pH=5	pH=5,7	pH=6	pH=6,3	pH=6,5	pH=6,8	pH=7	pH=8	pH=9
% ee(P)										
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,5	8	14	16	18	47	26	41	26	18	1
1	12	19	23	28	47	25	47	29	22	3
1,5	11	20	26	30	49	31	47	33	20	3
2	12	27	28	32	49	34	47	35	17	2
3	10	28	36	39	46	40	44	34	12	3
4	4	35	38	51	49	44	47	32	12	3
% dönüşüm										
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,5	31	40	48	30	42	44	60	50	75	76
1	36	58	51	33	56	47	65	65	78	84
1,5	45	59	55	37	62	50	68	64	80	85
2	48	59	60	38	73	52	62	65	82	91
3	56	64	64	47	85	50	61	75	86	90
4	66	67	66	59	86	53	68	78	87	92
E										
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,5	1,26	1,50	1,59	1,69	4,31	2,15	3,49	2,15	1,69	1,03
1	1,42	1,74	1,96	2,29	4,31	2,09	4,31	2,36	1,90	1,09
1,5	1,38	1,79	2,15	2,44	4,64	2,52	4,31	2,68	1,79	1,09
2	1,42	2,22	2,29	2,60	4,64	2,77	4,31	2,86	1,64	1,06
3	1,34	2,29	2,95	3,26	4,16	3,38	3,88	2,77	1,42	1,09
4	1,12	2,86	3,16	5,00	4,64	3,88	4,31	2,60	1,42	1,09

Ek 6 Sıcaklık etkisinin incelendiği deneylerde zamanla % dönüşüm, % ee(P) ve E'nin değişimi

zaman,h	30°C	37 °C	45 °C	50 °C
%ee(P)				
0	0	0	0	0
0,25	-	-	42	42
0,5	26	39	47	51
1	28	43	49	68
1,5	33	46	47	66
2	35	46	46	61
2,5	41	45	47	63
3	51	45	48	64
%dönüşüm				
0	0	0	0	0
0,25	-	-	68	55
0,5	29	72	75	61
1	33	80	81	70
1,5	37	82	82	80
2	38	85	84	78
2,5	47	85	85	78
3	59	86	85	79
E				
0	0	0	0	0
0,25	-	-	3,61	3,61
0,5	2,15	3,26	4,31	5,00
1	2,29	3,74	4,64	10,51
1,5	2,68	4,16	4,31	9,51
2	2,86	4,16	4,16	7,54
2,5	3,49	4,01	4,31	8,25
3	5,00	4,01	4,47	8,64

Ek 7 Karıştırma hızı etkisinin incelendiği deneylerde zamanla % dönüşüm, % ee(P) ve E'nin değişimi

zaman, h	150 rpm	200 rpm	250 rpm
%ee(P)			
0	0	0	0
0,5	43	47	63
1	47	48	66
1,5	47	49	69
2	48	50	59
3	49	51	55
%dönüşüm			
0	0	0	0
0,5	54	29	67
1	74	33	69
1,5	75	37	74
2	76	38	77
3	83	47	82
E			
0	0	0	0
0,5	3,74	4,31	8,25
1	4,31	4,47	9,51
1,5	4,31	4,64	11,07
2	4,47	4,82	6,91
3	4,64	5,00	5,85

Ek 8 Mikrodalga etkisinin incelendiği deneylerde zamanla % dönüşüm, % ee(P) ve E'nin değışimi

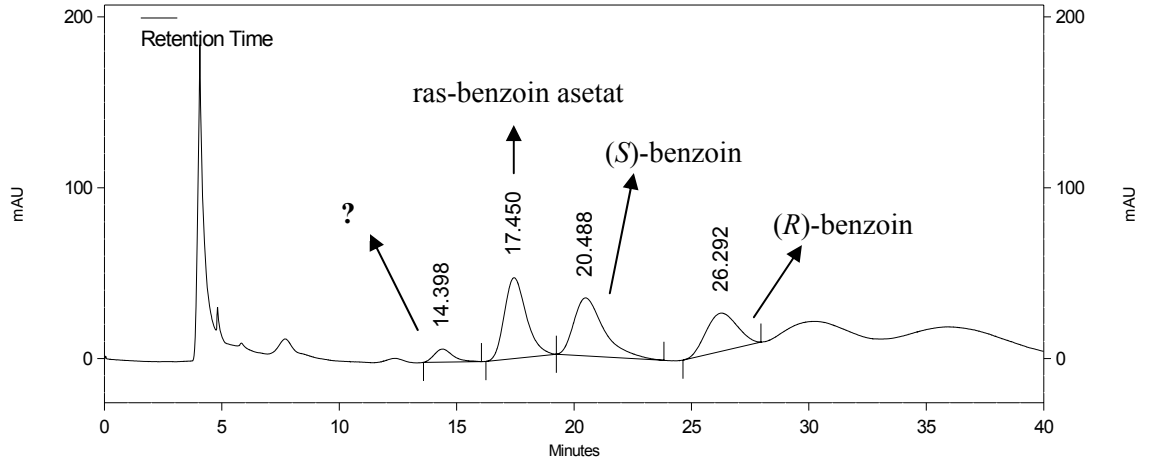
1.

Sıcaklık, °C	% dönüşüm	% ee(P)	E
enzimsiz,60	43	19	1,7
60	45	50	4,8
70	63	48	4,5
80	65	50	4,8
90	72	49	4,6

2.

pH	% dönüşüm	% ee(P)	E
6	45	50	4,8
6,3	48	45	4,0
6,5	47	49	4,6
7	54	15	1,5

Ek 9 Mekanik homojenizerle gerçekleştirilen deneylerden örnek bir kromatogram



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Binnaz LURÇİ
Doğum Yeri : Çayeli / Rize
Doğum Tarihi : 23.10.1980
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Düzce Lisesi (Süper Lise), 1994-1998
Lisans : Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi,
Kimya Mühendisliği Bölümü, 2000-2004
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, 2005-2007

Yayınları

Lurçi, B., Aydoğan, Ö., Bayraktar, E., Mehmetoğlu, Ü., 2004. Aspartaz Enzimi İçeren E.coli ile L-Aspartik Asit Üretimine Mikroorganizma derişimi ve pH Etkisi. 6. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi (UKMK-6), ÖP2, İzmir.

Lurçi, B., Uçar, B., Babaarslan, Ç., Bayraktar, E., Mehmetoğlu, Ü., 2006. Enantiyomerik Safılıkta Benzoin Üretimine Enzim Kaynağı, Açıl Verici Tipi ve Sıcaklığın Etkisi. 7. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi (UKMK-7), BT12, Eskişehir.