

1. GİRİŞ

Günümüzde enantiyomerikçe saf bileşiklerin elde edilmesi ilaç endüstrisi başta olmak üzere, zirai kimyasallar (insektisit, herbisit, fungusit), gıda ve parfüm endüstrisi için oldukça önemlidir. Optikçe aktif ürünlere ilginin başlıca nedeni enantiyomerlerin farklı biyolojik aktiviteler sergilemesidir. İlaçlarda enantiyomerlerden biri istenen aktiviteye sahipken, diğer enantiyomer farklı ve çoğu zaman zararlı farmakolojik özelliklere sahiptir (Ong *et al.* 2006). Rasemik karışımlarda enantiyomerler çok farklı etkiler gösterebilmektedir. İstenen aktiviteyi sağlamada inaktif olan enantiyomer ciddi yan etkiler gösterirken, bir arada bulunan iki enantiyomer birbirlerinden bağımsız olarak farklı tedavi etkisine sahip olabilmekte ya da her iki enantiyomerin bir arada bulunması tedavi için avantaj sağlayabilmektedir (Sheldon 1993).

1992 yılında A.B.D. Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Avrupa Komisyonu tescilli ilaç ürünleri için rasemik karışım şeklinde satılan tüm ilaçlarda varolan her iki enantiyomerin tanımlanmasını ve araştırılmasını istemiştir. Böylece ilaçların rasemat şeklinde üretimine son verilmeye başlanmıştır (www.biorefining.com/pdf/PharmaChemSept2003.pdf). Kiral bileşiklerin enantiyoseçimli sentezi kimya endüstrisinde giderek önem kazanmaktadır. 1995 yılında tedavi edicilerin toplam satış tutarı 150 milyon \$ olarak belirtilmiş ve bu miktarın 60 milyon \$'nı kiral bileşiklerin oluşturduğu tahmin edilmiştir. Amoksisilin (antibiyotik), kaptopril (anjiotensin) ve eritropoietin (eritrosit üretimini stimüle eden bir büyüme faktörü) gibi kiral ilaçların mevcut satış hacmi 1 milyon \$ aşmaktadır (Jaeger and Reetz 1998).

Asimetrik sentezdeki etkileyici gelişmelere rağmen, saf enantiyomerlerin endüstriyel sentezi için başlıca üretim yöntemi rasematların rezolüsyonudur (Ghanem and Aboul-Enein 2004). Rasematların rezolüsyonu, kristalizasyon, kinetik rezolüsyon ve dinamik kinetik rezolüsyon yöntemleri ile gerçekleştirilir. Bu yöntemler arasında kinetik rezolüsyon en çok tercih edilenidir. Kinetik rezolüsyon bir kiral ajan varlığında enantiyomerlerin farklı hızlarda tepkime vermesine dayanır. Bu kiral ajan bir biyokatalizör (enzim yada mikroorganizma) veya bir kemokatalizör (kiral asit veya baz, bir kiral metal kompleksi) olabilir. Rasemik bileşiklerin kinetik rezolüsyonunda en çok kullanılan enzim lipaz enzimidir (Ghanem and Aboul-Enein 2004).

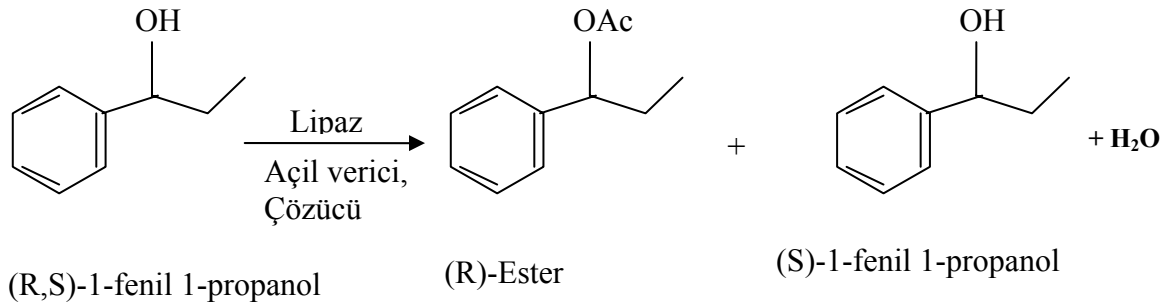
Kinetik rezolüsyon tepkimelerinde farklı açıl vericiler kullanılabilir. Açıl verici olarak esterlerin kullanıldığı tepkimelere transesterleşme tepkimeleri adı verilirken, serbest asitlerin kullanıldığı tepkimelere esterleşme tepkimeleri denilmektedir. Serbest asitler kimyasal olarak daha kararlı, daha az toksik, daha ucuz olmaları ve kolayca bulunmaları nedeniyle esterleşme tepkimelerinde açıl verici olarak kullanılırlar. Bazı sekonder alkollerin enantiyomerleri, serbest yağ asitleri ile esterleşme tepkimesiyle çözücüsüz sistemde düşük basınç altında etkili bir şekilde ayrılır (İrimescu *et al.* 2004).

Enzim katalizli tepkimelerde enantiyomerik aşırılık (ee) ve enantiyomerik oran (E) olmak üzere iki önemli kavram vardır. Herhangi bir bileşiğin enantiyomerik saflığı enantiyomerik aşırılık terimi ile ifade edilir. Enantiyomerik oran değeri (E) ise enantiyoseçimliliği ifade eder. Enantiyoseçimli olmayan tepkimelerde E değeri “1” iken, kabul edilebilir bir rezolüsyon için E değeri 20’den büyük olmalıdır (Ghanem and Aboul-Enein 2004).

Enantiyomerik saflıktaki kiral alkoller pek çok farmakolojik ürünün çıkış maddesidir. Sekonder alkol olan 1-fenil 1-propanol türevleri ilaç etken maddesi olarak farmasotik sanayinde geniş kullanım alanlarına sahiptir. (-)-Efedrin HCl ticari adıyla bilinen bir türevi (1R,2S-2-metilamino-1-fenil-1-propanol hidroklorür) bronşaçıcı ilaçlar grubuna girmektedir (www.pharma-solutions.basf.com). Bu ilaçlar astım, bronşit ve akciğer ile ilgili hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. (+)-Pseudoefedrin HCl (1S,2S-2-metilamino-1-fenil-1-propanol hidroklorür) ise Efedrin’in diastereomeridir. Genellikle antihistamin, parasetamol ve ibuprofen içeren karışımlarda bulunur ve “Sudafed” adıyla tanınmaktadır (<http://en.wikipedia.org/wiki/Pseudoephedrine>). 1-fenil 1-propanolün diğer bir türevi olan PDMP (D-threo-1-fenil-2-dekanoyilamino-3-morfolino 1-propanol) kanser tedavisinde kullanılmaktadır (Inokucki *et al.* 1987). Rasemik 1-fenilpropanol ise koleretik (karaciğerin safra üretimini arttıran ajan) bir ilaç olarak kullanılmaktadır. Bu kimyasalın (R)-izomeri ise optikçe aktif 1-kloro-1-fenilpropan sentezinde ve terpenlerin hazırlanmasında kullanılmaktadır (Uzura *et al.* 2001).

Literatürde rasemik bileşiklerin kinetik rezolüsyon çalışmaları biyokatalizör olarak kullanılan lipaz kaynağının ve miktarının, açıl verici türünün, substrat konsantrasyonunun, organik çözücü türü ve çözücü polaritesinin ve tepkime sıcaklığının tepkimenin enantiyomerik aşırılığını ve enantiyoseçimliliğini etkilediği görülmüştür. Ayrıca literatürde optikçe aktif bileşiklerin elde edilmesinde biyokatalizör olarak mikroorganizmaların (whole cell) kullanıldığı çalışmalara da rastlamak mümkündür. Saf enzim fiyatlarının pahalı oluşu, enzim saflaştırma işlemlerinin uzun zaman alması ve maliyet gerektiren bir işlem olması ve bazı enzimlerin koenzime ihtiyaç duyması nedeniyle mikrobiyal hücreler ile biyotransformasyon daha avantajlıdır.

Bu çalışmada sekonder bir alkol olan rasemik 1-fenil 1-propanolün lipaz enzimi katalizörlüğünde esterleşme tepkimesi ile enantiyomerik saflıkta elde edilmesi amaçlanmıştır (Şekil 1.1). Rasemik 1-fenil 1-propanolün kinetik rezolüsyonuna enzim türü ve miktarı, açıl verici ve çözücü türü, açıl verici/alkol mol oranı, moleküler elek miktarı ve sıcaklık gibi parametrelerin etkisi incelenmiş, en yüksek enantiyomerik aşırılık değerini verecek uygun koşullar belirlenmeye çalışılmıştır. Daha sonraki çalışmalarda ise rasemik 1-fenil 1-propanolün kinetik rezolüsyon deneylerinde, en iyi sonuçları veren enzim kaynağı mikroorganizma üretilmiş ve biyokatalizör olarak kullanılmıştır.



Şekil 1.1 Rasemik 1-fenil 1- propanolün esterleşme tepkimesiyle kinetik rezolüsyonu

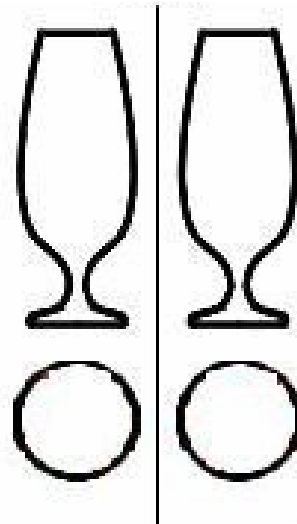
2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Stereokimya

Doğada özellikle de canlı organizmalarda meydana gelen kimyasal olaylar moleküller arası üç boyutlu ilişkilerden etkilenir. Atomların ve moleküllerin uzaysal (üç boyutlu) düzenlenmeleri ile ilgili çalışmalar stereokimya olarak adlandırılır.

2.1.1 Kiralite

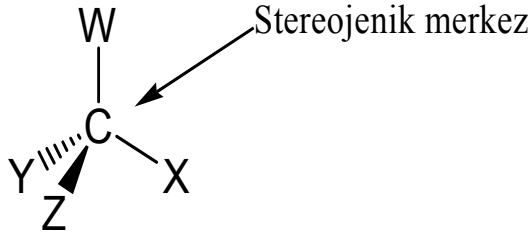
Kiral sözcüğü Yunanca'da el anlamına gelen *chiros* kelimesinden gelmektedir. Ayna görüntüsü ile üst üste çakışmayan nesne ya da moleküller kiral olarak tanımlanır (Şekil 2.1). Ayna görüntüsü ile üst üste çakışan nesne kiral olmayıp akiraldir. Bir akiral nesne ya da molekül kendi ayna görüntüsü ile aynıdır (Şekil 2.2). Kiralite olgusu canlı sistemlerde yaygındır. Aminoasitler, nükleik asitler, lipitler, karbonhidratlar, metabolik arabileşikler ve diğer birçok biyomolekül kiraldir (Nejem 2004).



Şekil 2.1 Kiral objeler ve ayna görüntüleri Şekil 2.2 Akiral objeler ve ayna görüntüleri

2.1.2 Stereojenik merkez

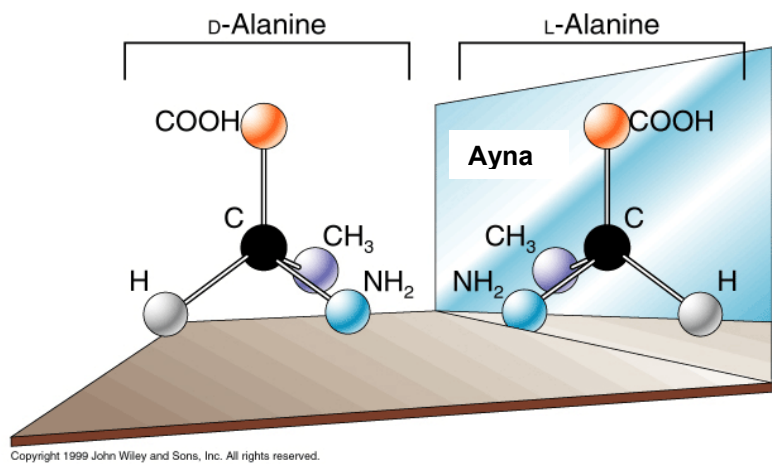
Kiral moleküller, üzerlerinde dört farklı atom yada grubun bağlı olduğu, stereojenik merkez olarak adlandırılan en az bir karbon atomu içerirler. Stereojenik merkez ayrıca kiral merkez, asimetric merkez ve stereomerkez olarak da adlandırılır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 Kiral molekülde stereojenik merkez

2.1.3 Moleküler kiralite ve enantiyomerler

Bir nesne ya da molekül ile onun ayna görüntüsü olan ve üst üste çakışmayan stereoizomere enantiyomerler denir (Şekil 2.4). Stereoizomer terimi, aynı yapıya sahip ancak atomların uzaydaki düzenlenmeleri farklı molekülleri ifade eder. Enantiyomer sözcüğü Yunanca karşı-zıt anlamındaki *enantios* ve parça anlamına gelen *meros* kelimelerinden oluşur (Burke and Henderson 2002).

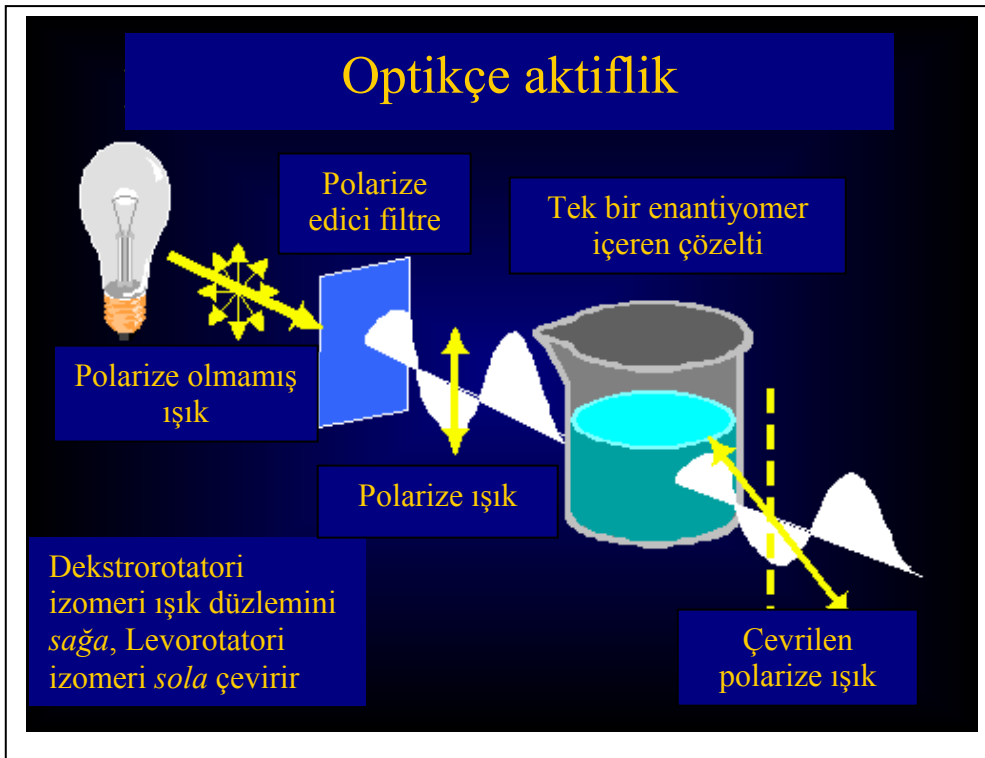


Şekil 2.4 Alanin aminoasidinin enantiyomerleri

2.1.4 Kiral moleküllerde optikçe aktiflik

Organik stereokimyanın esasları Jacobus van't Hoff ve Charles Le Bel tarafından birbirlerinden bağımsız olarak 1874 yılında belirlenmiştir. Van't ve Le Bel'e aynı yapıdaki moleküllerin uzaydaki düzenlenmelerinin farklı olabileceği fikrini veren deneysel gerçekler *optikçe aktiflik* olarak adlandırılan fiziksel bir özellik ile ilgilidir. Optikçe aktiflik, kiral bir molekülün polarize olmuş ışığın polarizasyon düzlemini çevirme yeteneğidir. Bir kiral molekülün her bir enantiyomeri optikçe aktiflik gösterir.

Işık kaynağından çıkan bir ışık demeti polarizör denen bir alet içerisinden geçirilerek ışık dalgalarının yalnızca bir düzlem üzerine titreşmesi sağlanır. Bu ışıkta düzlem polarize ışık olarak adlandırılır. Kiral bir maddenin tek bir enantiyomerini içeren bir çözelti içerisinden düzlem polarize olmuş ışık demeti geçirildiğinde bu ışığın, polarizasyon düzlemini α açısı kadar sağa ya da sola çevirdiği gözlenir (Şekil 2.5). Optikçe aktiflikten kastedilen işte bu çevirmedir. Bir maddenin optikçe aktifliği özgül çevirme olarak ifade edilir ve $[\alpha]$ sembolü ile gösterilir (Atkins and Carey 1997).



Şekil 2.5 Enantiyomerlerin polarize ışık düzlemini çevirmeleri

Bir kiral bileşimin enantiyomerlerinden her biri düzlem polarize ışığın polarizasyon düzlemini eşit miktarda ama zıt yönlü çevirirler. Örneğin bir kiral maddenin bir enantiyomeri $[\alpha] = +37^\circ$ lik bir çevirme gösteriyor ise diğer enantiyomer $[\alpha] = -37^\circ$ lik özgül çevirme gösterir. Işık kaynağına doğru bakıldığında sağa çevrilme (saat yönünde) (+) ile , sola çevrilme ise (-) olarak ifade edilir.

Kiral bir bileşimin eşit miktardaki iki enantiyomerini bir arada içeren bir karışım herhangi bir optik çevirme göstermez ($\alpha=0$). Çünkü her bir enantiyomerin pozitif ve negatif çevirmeleri birbirini yok eder. Bir kiral bileşimin enantiyomerlerinden eşit miktarda içeren karışım *rasemik karışım* olarak adlandırılır ve herhangi bir optikçe aktiflik göstermez. Akiral moleküllerde optikçe aktiflik göstermez. Bir maddenin optikçe aktiflik gösterebilmesi için madde kiral olmalı ve enantiyomerlerden birinin miktarı diğerinden fazla olmalıdır.

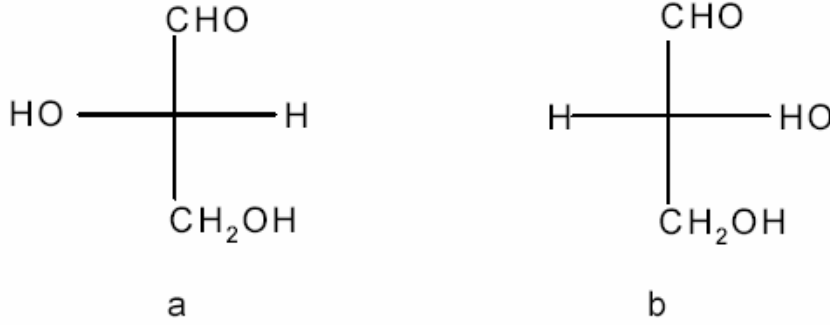
2.1.5 Kiral moleküllerin gösterimi (Adlandırılması)

Bir molekülün iki enantiyomeri en iyi şekilde onların mutlak konfigürasyonları ya da optik çevirmeleri temel alınarak tanımlanır. Kiral bir molekülün konfigürasyonu stereojenik merkeze bağlı dört farklı grubun uzaysal düzenlenmesiyle gösterilir. Mutlak konfigürasyon iki enantiyomerin ayırt edilmesini sağlar ve onların kiralitesini tanımlar. En yaygın olarak kullanılan gösterimler L- ve D- gösterimi, R- ve S- gösterimi, (-) ve (+) gösterimidir (Nejem 2004).

2.1.5.1 D ve L gösterimi

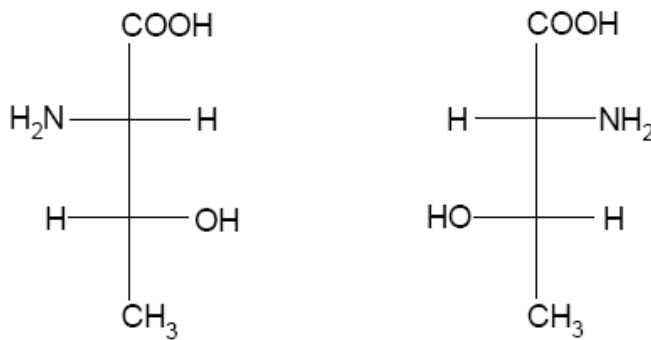
Bu konfigürasyon 19. yüzyıl sonlarında Alman kimyager Emil Fischer tarafından optikçe aktif bileşikler göstermek için geliştirilmiştir. Fisher iz düşüm formülü olarak adlandırılan bu yöntem moleküllerin üç boyutlu gösterimi yerine iki boyut içerisinde gösterilmesidir. Stereojenik merkeze bağlı dört farklı grup içeren kiral bir molekülün kağıt düzlemine iz düşümü alınırsa merkezde stereojenik karbon atomu bulunan bir artı işareti elde edilir. Kiral karbon atomunun sağında ve solunda yer alan iki grup kağıt düzleminden dışarı doğru yönelen bağları, kiral karbon atomunun üstünde ve altında yer alan gruplar ise kağıt düzleminin arkasında kalan bağları gösterir.

Dekstrorotatori ve levorotatori şekilleri iki enantiyomerin ayırt edilmesinde kullanılır. Gliseraldehit en küçük kiral karbonhidrat olup, Fischer tarafından kullanılan standart örnektir. Şekil 2.6’de gliseraldehitin enantiyomerleri gösterilmiştir.



Şekil 2.6 a) *L*-(-)-gliseraldehit ve b) *D*-(+)-gliseraldehit

Gliseraldehitin dekstrorotatori ve levorotatori şekilleri C-2 hidroksil grubunun (-OH) yatay düzlemde sağ ya da solda olmasına bağlı olarak *D*- ve *L*-gliseraldehit olarak adlandırılır. Bileşikler, konfigürasyonlarının (+)- ve (-)- gliseraldehitin yapısına benzer olup olmadıklarına bağlı olarak *D* ya da *L* olarak tanımlanırlar. *L*- ve *D*- gösterimi karbonhidratlar ve aminoasitler için kullanılır. Şekil 2.7’de threonin aminoasidinin enantiyomerleri gösterilmektedir.



Şekil 2.7 a) *L*-threonin ve b) *D*- threonin

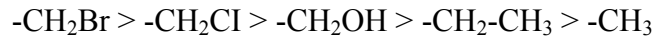
2.1.5.2 R ve S tanımlama sistemi (Cahn-Ingold-Prelog Gösterimi)

Mutlak konfigürasyonu belirlemek için kullanılan bu sistem 1956 yılında iki İngiliz kimyacı R.S. Cahn ve Sir Christopher Ingold tarafından İsviçreli meslektaşları Vladimir Prelog'un işbirliği ile geliştirilmiştir. Bir kiral molekülün mutlak konfigürasyonu o bileşiğin üç boyutlu yapısının R ve S olarak tanımlanmasıdır. Bu sistemin en önemli özelliği moleküldeki stereojenik karbona bağlı olan grupların atom numaralarına ve kütlelerine göre öncelikli sıralanmasıdır. S (Latince *sinister* 'sol') saat yönünün tersini, R ise (Latince *rectus* 'sağ') saat yönünü ifade etmektedir. Mutlak konfigürasyonda grupların öncelik sıralaması aşağıdaki kurallara göre belirlenir;

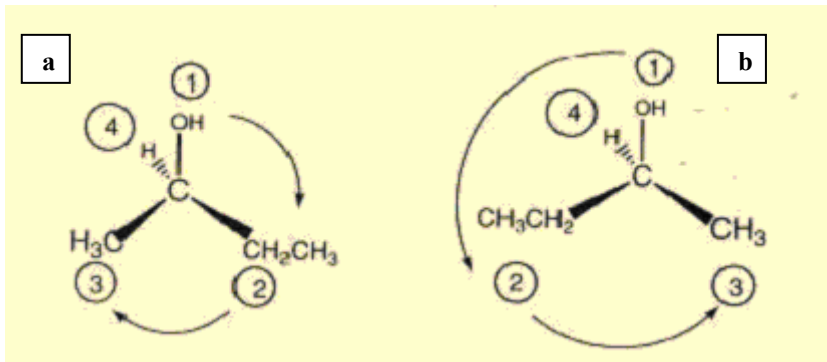
- 1- Atom numarası en büyük olan ve doğrudan stereojenik merkeze bağlı atomlar yüksek öncelik sırasına sahiptir. Örneğin;



- 2- Aynı atom numarasına sahip iki yada daha fazla grup stereojenik merkeze bağlı ise bu gruplar içinde atom numarası en büyük olan atoma göre sıralama yapılmalıdır.



- 3- Bazı grupların öncelik sırası şu şekildedir; $-CHO > -CH(CH_3)OH$, Fenil $>$ Olefin, üçlü bağ $>$ ikili bağ
- 4- Benzer çiftler [(S,S) yada (R,R)] benzer olamayan çiftlerden [(S,R) yada (R,S)] daha önceliklidir.
- 5- En az öncelikli atom ya da grup sayfa düzleminin arkasında kalacak şekilde molekül yönlendirilir. En öncelikli olan gruptan azalan öncelik sırasına göre gidildiğinde saat ibresinin yönünde gidilmişse mutlak konfigürasyon "R" olarak, saat ibresinin tersi yönünde gidilmişse molekülün mutlak konfigürasyonu "S" olarak tanımlanır (Şekil 2.8).



Şekil 2.8 a) (R)-2-bütanol b) (S)-2-bütanol

R ve S gösterim şekli çoğunlukla ilaçların ve metabolitlerin adlandırılmasında kullanılır. Birden daha çok kiral merkeze sahip moleküllerin adlandırılması bu yöntemle mümkündür (Nejem 2004).

2.1.5.3 (-) ve (+) gösterimi (*d* ve *l*)

Bu gösterim şekli bir kiral molekülün polarize ışık düzlemini çevirme yeteneğinin ölçülmesiyle ilgilidir. Bir bileşiğin çözeltisi ışık kaynağına doğru bakıldığında polarize ışık düzlemini saat yönünde çeviriyor ise bu çevirme (+) veya *d* (*dekstro*), saat yönünün tersi yönde çeviriyorsa (-) veya *l* (*levo*) olarak adlandırılır.

2.1.6 Kiral seçicilik

Kiral tanıma ya da kiral seçicilik, canlı sistemlerdeki kiral alıcıların veya kimyasal bileşiklerin bir kiral molekülün enantiyomerlerinden biri ile seçici olarak etkileşmesidir (Atkins and Carey 1997). Özellikle biyolojik etkileşimlerde kiral seçicilik baskın şekilde rol oynar. Canlı sistemlerde bir kiral molekülün enantiyomerlerini ayırt edebilen yapılar enzim ve reseptörlerdir.

Canlı sistemlerde dış ve iç ortamda meydana gelen kimyasal, fiziksel, elektriksel vb. gibi tüm değişiklikler serbest sinir uçları veya sinirlerin bağlı oldukları duyu almaçları yani reseptörler tarafından algılanır. Fizyolojik fonksiyonları ne olursa olsun reseptörlerde ortak olan nokta hepsinin kiral moleküller olmasıdır. Bu nedenle reseptörlerin uyarıcı moleküllerine bağlanmalarında enantiyoseçici davranmaları beklenir (Sheldon 1993).

Protein yapısında olan ve canlılarda kimyasal tepkimeleri katalizleyen biyokatalizörlere enzim denir. Canlı sistemlerde çoğu biyokimyasal tepkime enzimler tarafından katalizlenir. Enzimler kiraldır ve tek bir enantiyomer halinde bulunurlar. Üzerlerinde kimyasal reaksiyonların meydana geldiği asimetrik bir bölge (aktif merkez) vardır. Bu şekilde enzimlerin katalizledikleri reaksiyonların çoğunda ürünün yalnızca bir enantiyomerik şekli oluşur (Atkins and Carey 1997).

2.1.7 Enantiyomerlerin Özellikleri

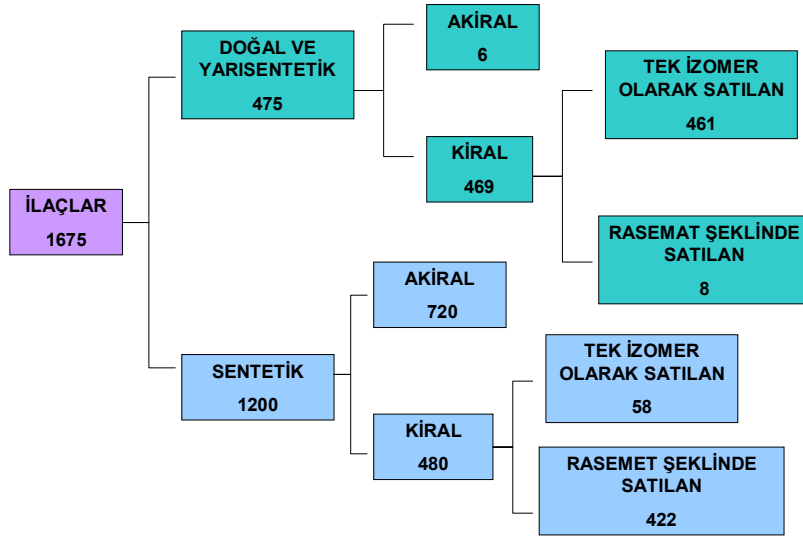
Yoğunluk, kaynama noktası, erime noktası, çözünürlük gibi fiziksel özellikler bir kiral bileşiğin her iki enantiyomeri için aynıdır. Enantiyomerlerin polarize ışık düzlemini çevirme yönleri, uzaydaki üç boyutlu düzenlenmeleri ve başka kiral moleküller varlığında davranışları farklıdır. Buna bağlı olarak biyolojik aktiviteleri farklılık göstermektedir

2.2 Enantiyomerlerin Biyolojik Etkileri

Kiralitenin, biyolojik aktivite için önemli olmasının nedeni moleküler seviyede simetrisinin biyolojik süreçlere hakim olmasıdır. Kiralite biyoaktivite için bir önkoşul değildir. Ancak stereojenik merkeze sahip biyoaktif moleküllerde enantiyomerlerin aktivitelerinde büyük farklılık gözlenmektedir. Bu olgu ilaç, insektisit, herbisit, tat ve koku vericiler ve gıda katkı maddeleri gibi tüm biyoaktif maddelerde görülür. Gerçekte canlı organizmaların moleküler bileşenleri çoğunlukla kiraldır ve kiralite bu moleküllerin biyoaktif maddelerle etkileşimlerinde baskın bir rol oynar (Sheldon 1993).

2.2.1 Farmasotikler

Doğal olarak varolan tedavi edici ajanların büyük çoğunluğu kiral moleküllerdir üstelik bunlar doğada tek enantiyomer şeklinde bulunurlar. Buna karşılık uzun yıllar boyunca sentetik kiral ilaçlar rasemat şeklinde satışa sunulmuştur (Şekil 2.9). Ancak bu durum günümüzde değişmeye başlamıştır. 1990 yılına ait satış gelirleri esas alınarak hazırlanan liste incelendiğinde kiral sentetik ilaçlarda enantiyosaflığın önem kazandığı görülmektedir (Çizelge 2.1). Rasyonel ilaç tasarımlarına yönelik çalışmalar artmış ve daha karmaşık moleküller üretilmeye başlanmıştır.



Şekil 2.9 Kiral ilaçların tek bir enantiyomer ve rasemat şeklinde kullanımı (Sheldon 1993)

Çizelge 2.1 1990 yılında en çok satan yirmi ilacın dünya genelindeki satış tutarları ve ilaçların satış formu (Sheldon 1993)

	İLAÇ	TERAPOTİK SINIFI	SATIŞ TUTARLARI (MİLYON \$)
◆	Ranitidin	Antiülser	2370
★	Amoksisilin	Antibiyotik	2000
★	Ampisilin	Antibiyotik	1800
★	Kaptopiril	ACE-inhibitörü	1520
★	Enalapril	ACE-inhibitörü	1500
+	İbuprofen	NSAID	1400
◆	Nifedipin	Kalsiyum antagonisti	1290
★	Sefaklor	Antibiyotik	1040
◆	Simetidin	Antiülser	1030
+	Atenolol	Beta-bloker	1020
◆	Diklofenak	NSAID	975
★	Diltiazem	Kalsiyum antagonisti	960
★	Naproksen	NSAID	950
★	Sefaleksim	Antibiyotik	900
★	Lovastatin	Antihiperkolesteromi	750
◆	Famotidin	Antiülser	630
+	İyoheksol	Kontrast madde	620
★	Seftriakson	Antibiyotik	600
◆	Piroksikam	NSAID	585
+	Albuterol	Bronşaçıcı	555

★ Optikçe aktif (10 ilaç) + Rasemik (4 ilaç) ◆ Akiral (6 ilaç)

İlaçların ve pestisitlerin biyolojik etkilerinin anlaşılması için davranışlarını etkileyen üç ana fazın ayırt edilmesi önemlidir. Bu fazlar sırasıyla, başlangıç fazı, farmakokinetik faz ve farmakodinamik fazdır. Farmakokinetik faz, ilacın emilimini, metabolik dönüşümünü ve atılımını ifade eder. Farmakodinamik faz, hedef dokuda ilaç ile reseptör etkileşimini ve ilacın etkisinin gözlenmesini ifade eder (Sheldon 1993). Bir ilacın farmakolojik etkisi farmakodinamik ve farmakokinetik fazlardan etkilenir. Enantiyoseçicilik her iki fazda da önemli rol oynar.

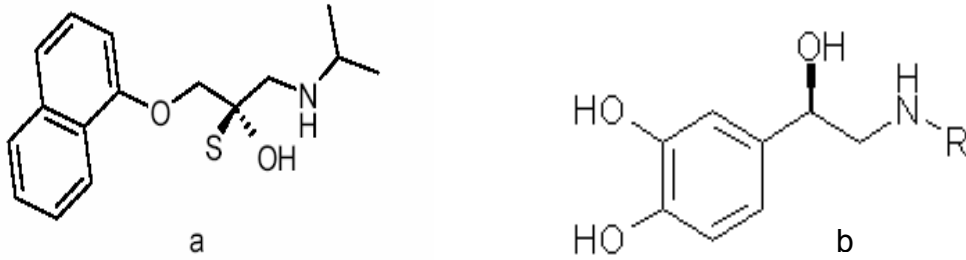
Enantiyomerler farmakolojik etkilerine göre eutomer ve distomer olarak adlandırılır. Tedavi edici aktif izomer için '*eutomer*' terimi, daha az etkili inaktif izomer için '*distomer*' terimi kullanılır. Bir rasemik ilacın tedavi edici olmayan inaktif izomeri (distomer) istenmeyen safsızlık olarak nitelendirilir ve farklı farmakolojik etkiler gösterir. Kısacası rasemik bir ilaçta eutomer ve distomerin farmakodinamik ve farmakokinetik fazlarının farklı oluşu inaktif izomer ile ilgili çeşitli etkilerin ortaya çıkmasına yol açabilir. İlaçlar aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir.

- A. Distomer ciddi yan etkiler göstermez.
- B. Distomer istenmeyen yan etkiler gösterir.
- C. Her iki enantiyomer bağımsız tedavi edici etkiye sahiptir.
- D. Her iki enantiyomer tedavi için avantaj sağlar.

A. Distomer ciddi yan etkiler göstermez

Bazı durumlarda distomer ciddi yan etki göstermediği için kiral ilaçlar rasemat şeklinde uygulanır. Buna örnek olarak beta-blokerler verilebilir. Beta blokerler adrenerjik reseptörlerin bloke edilmesi yoluyla antihipertensif etki (kan basıncının düşmesi) gösterirler. Bu bileşiklerin neredeyse tümünde S-enantiyomeri tedavi edici etkiye sahiptir. Bunun nedeni ise S-enantiyomerinin adrenerjik hormon olan noradrenaline yapısal olarak çok benzemesidir. Bir beta-bloker olan S-propranolol Şekil 2.10'da gösterilmiştir. Üç önemli beta-bloker olan propranolol, atenolol ve metoprolol rasemat şeklinde piyasada satılmaktadır. Bu ilaçların rasemat şeklinde satılmasının nedeni klasik yöntemler ile ayrılmasının zor olması ve distomerlerin ciddi yan etkiler göstermemesidir.

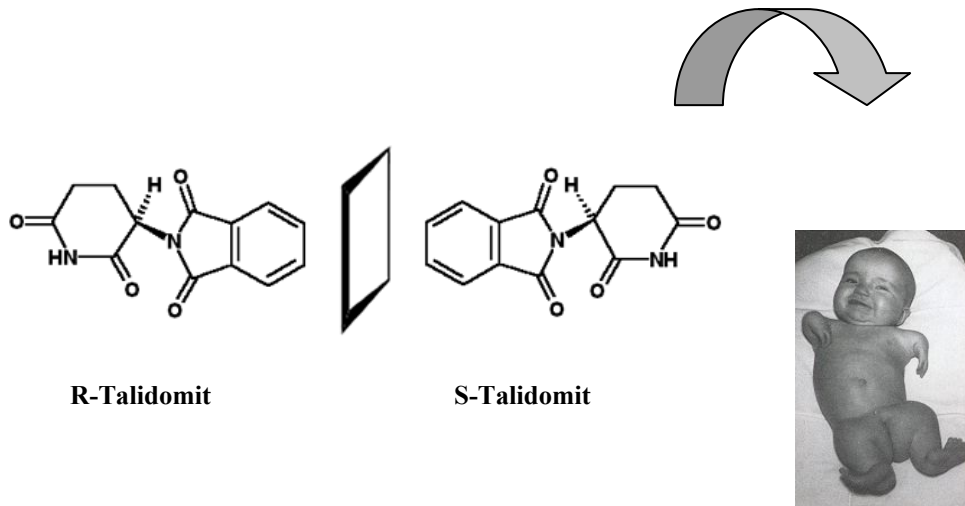
Eğer beta-blokerler yeni ilaçlar olarak bugün tanımlanmış olsaydı, hemen hemen hepsi tek bir enantiyomer şeklinde satılırdı. Çünkü rasemat şeklinde satılanlarda distomer gereksiz bir izomerik yük oluşturmaktadır.



Şekil 2.10 a) (S)-Propranolol ve b) Noradrenalin

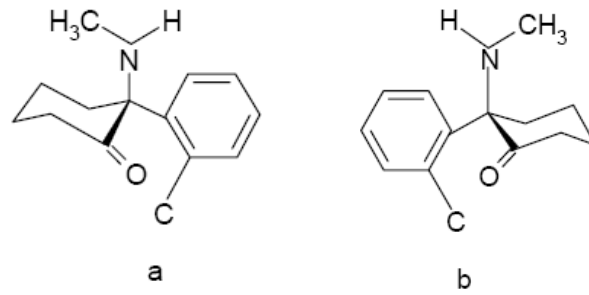
B. Distomer istenmeyen yan etkiler gösterir

Bazı durumlarda distomer istenmeyen yan etkiler gösterebilir. Distomerin ciddi yan etkilere sebep olduğu bilinen ilaçlara en iyi örnek talidomidir. Talidomid 1960'lı yıllarda rasemat şeklinde piyasaya sürülmüş ve hamile bayanlar tarafından yatıştırıcı ve mide bulantılarını önleyici bir ilaç olarak kullanılmıştır. Ancak daha sonraki yıllarda R-Talidomidin yatıştırıcı etkisi olmasına karşın, S-Talidomidin yüksek teratojenik etkisinin olduğu ve doğum anormalliklerine yol açtığı tespit edilmiştir (Şekil 2.11).



Şekil 2.11 (R)-Talidomid ve (S)-Talidomidin teratojenik etkisi

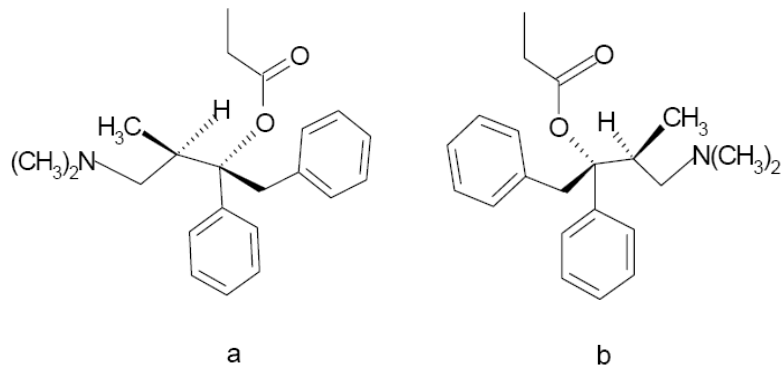
Distomerin istenmeyen yan etkiler gösterdiği diğer bir örnek ise ketamindir. Ketamin anestezik ve analjezik olarak kullanılan bir maddedir. Rasemat şeklinde uygulanmasından dolayı anestezi sonrası hastalarda halüsinasyon ve zihinsel karışıklıklar gözlenmiştir. Ketaminin enantiyomerleri araştırıldığında S-(+)-Ketaminin anestezik olduğu, istenmeyen yan etkilerin büyük çoğunlukla R-(-)-Ketamin ile ilişkili olduğu görülmüştür (Şekil 2.12). Bu örnekler gösteriyor ki distomerler yan etkilerden öncelikli olarak sorumludur ve ilaçlar kesinlikle tek bir enantiyomer şeklinde üretilmelidir.



Şekil 2.12 a) S-(+)-Ketamin ve b) R-(-)-Ketamin

C. Her iki enantiyomer bağımsız tedavi edici etkiye sahiptir

Bazı durumlarda bir kiral ilacın her iki izomeri istenen, ancak farklı tedavi etkisi gösterebilir. Birçok doğal ürün ve yine sentetik ilaç bu şekildedir. Buna örnek propoksifen verilebilir. Dekstropoksifen analjezik bir ajan iken, levopoksifen etkili bir öksürük önleyicidir (Şekil 2.13). İlginç olan birbirinin ayna görüntüsü olan bu iki molekül iki farklı ilaç olarak Eli Lilly firması tarafından piyasada satılmaktadır.



Şekil 2.13 a) (2R,3S)-(+)-Dekstropoksifen b) (2S,3R)-(-)-Levopoksifen

D. Her iki enantiyomer tedavi için avantaj sağlar

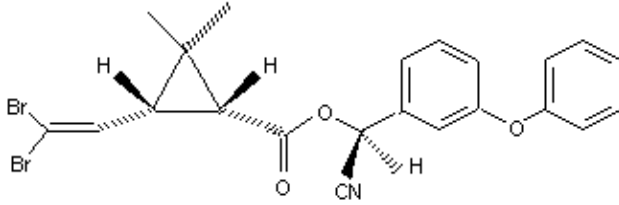
Her iki enantiyomerin istenen tedavi etkinini sağlamada farklı yollardan katkıda bulunduğu kiral ilaçlar mevcuttur. Bu olguya en iyi örnek, bir diüretik olan indakrinondur. R-(+)-enantiyomer aktif bir diüretiktir. Diğer birçok diüretikte olduğu gibi R-izomeri ürik asit oluşumunu engelleyerek istenmeyen yan etkiler gösterir. S-enantiyomeri ise ürik asit salgısını artırarak R-izomerinin antagonisti (karşıtı) olarak görev yapar. Bu gibi durumlarda ilaçların rasemat şeklinde satışı iyi bir fikir olarak görülebilir. Ancak yapılan çalışmalar iki enantiyomeri, 9/1 oranında içeren karışımların tedavi için uygun olduğunu göstermiştir (Sheldon 1993).

2.2.2 Zirai kimyasallar

Bitkiler, böcekler ve mantarlar gibi canlı organizmalar üzerinde etkili olan zirai kimyasallar da enantiyoseçicilik sergiler. Bu olayın moleküler mekanizması ilaçlardaki ile tamamen aynıdır ve hedef organizmadaki enzim ya da reseptör ile biyoaktif maddelerin etkileşimi söz konusudur. İlaçlar ile kıyaslandığında pestisitlerin miktarı milyon tonlar ile ifade edilir. Bu yüzden kiral pestisitlerin tek bir optik izomer şeklinde üretimi çevre üzerindeki kimyasal yükün % 50 azalması anlamına gelir. Tek bir izomer şeklinde tasarlanan pestisitler düşük dozlarda daha etkili, daha seçici ve daha çevre dostudur.

Herbisit tarımda istenmeyen otların yok edilmesinde kullanılan kimyasalların genel adıdır. α -ariloksipropionik asitler herbisitlerin ticari olarak önemli bir sınıfını oluşturmaktadır. Bunların tümünde, herbisidal etki (R)-enantiyomerine aittir. Bu bileşikler herbisidal etkilerini bitki büyüme hormonu olan indol-3-asetik asiti inhibe ederek gösterirler. Geçmiş yıllarda Hollanda hükümeti herbisitlerin rasemat şeklinde kullanımını sınırlamış ve bu nedenle bir herbisit olan karbetamit saf (R)-enantiyomeri şeklinde üretilmiştir.

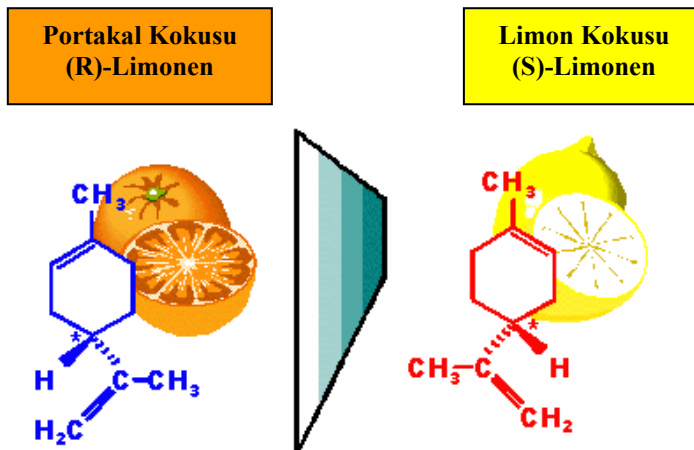
Tarım zararlısı böcekleri öldürmede kullanılan kimyasal maddelere insektisit denmektedir. Nöroaktif bir insektisit olan deltametrin üç asimetrik merkeze sahiptir ve mümkün olan sekiz optik izomerinden sadece biri olan R,R,S izomeri şeklinde satılmaktadır (Şekil 2.14). Deltametrin 1950’li yıllardaki DDT kadar aktif olan ancak memeli ve kuşlara zarar vermeyen günümüzdeki en etkili insektisittir.



Şekil 2.14 (αS , 2R, 3R)-Deltametrin

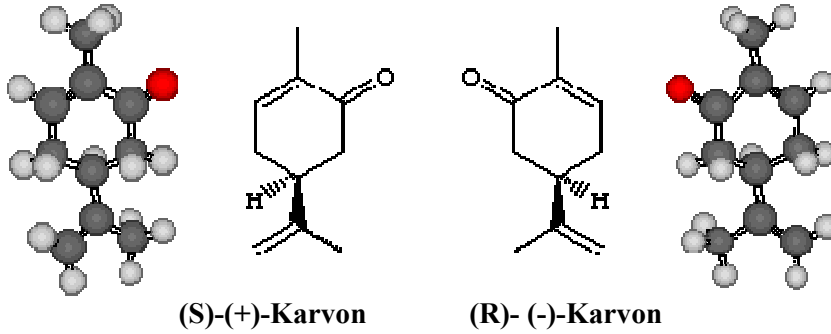
2.2.3 Tat ve koku vericiler

Tat ve koku algısı, dil ve burundaki reseptörler ile aroma maddeleri arasındaki özel etkileşimler ile belirlenir. Örneğin Limonen bileşiğinin her iki enantiyomerinin kendi karakteristik kokuları vardır. (S)-Limonen limon kokusu, diğer enantiyomeri (R)-Limonen ise portakal kokusu olarak algılanmaktadır (Şekil 2.15).



Şekil 2.15 Limonen bileşiğinin enantiyomerleri

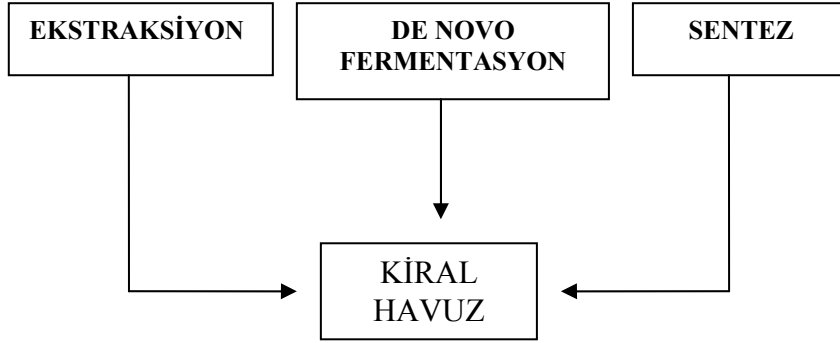
(S)- ve (R)-Limonen arasındaki bu koku farklılığı onların burundaki alıcı sinir hücrelerine karşı farklı davranmalarından kaynaklanır. Alıcı sinir uçları kiral yapıda olduklarından enantiyomerlerden sadece biri için uygunluk gösterir. Diğer bir örnek ise karvon bileşiğidir. Karvonun (R)-enantiyomeri nane kokusu verirken, (S)-enantiyomeri kimyon kokusu verir (Şekil 2.16). Zencefil ise rasemik karvon içermektedir.



Şekil 2.16 Karvon bileşiğinin enantiyomerleri

2.3 Saf Enantiyomer Kaynakları

Enantiyomerikçe saf ilaçların ve zirai kimyasalların sentezlenmesi için kullanılan saf enantiyomerler başlıca üç kaynaktan elde edilir (Sheldon 1993). Birinci kaynak, saf enantiyomer şeklinde doğal olarak var olan karbonhidrat, terpen, alkaloid türevi kiral moleküllerin bitki ve hayvan materyallerinden ekstraksiyon yoluyla elde edilmesidir. İkinci kaynak, ucuz ve bolca bulunan karbonhidrat kaynaklarından De novo fermentasyonu ile mikroorganizmalarca üretilmesidir. De novo fermentasyon, laktik asit, tartarik asit ve L-amino asit gibi basit yapılı kiral moleküller ile antibiyotikler, hormonlar ve vitaminler gibi daha kompleks moleküllerin önemli üretim kaynağıdır. Saf enantiyomerlerin elde edilmesi için üçüncü kaynak, kiral veya prokiral başlangıç maddelerinden kimyasal/biyokimyasal olarak sentezlenmesidir (Şekil 2.17).



Şekil 2.17 Başlıca saf enantiyomer kaynakları (Sheldon 1993)

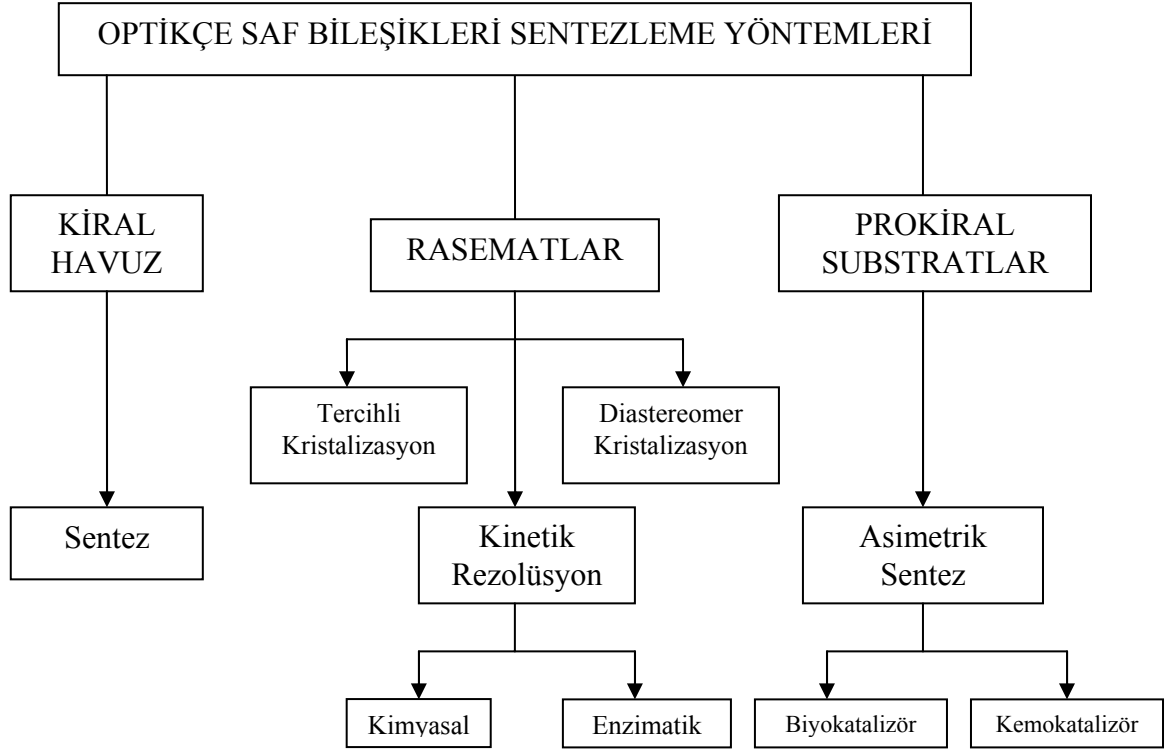
Kiral havuz ucuz ve doğal olarak bulunan ürünleri veya onların türevlerini ifade eder. Bu moleküller konfigürasyon dönüşümü ya da kiralite transferi gibi kimyasal manipülasyonlarla sentetik ürünlere dönüştürülür.

2.4 Enantiyomerikçe Saf Bileşikler Sentezleme Yöntemleri

Enantiyomerikçe saf bileşikler sentezleme yöntemleri kullanılan hammadde türüne bağlı olarak 3 gruba ayrılabilir (Şekil 2.18).

2.4.1 Rasematların rezolüsyonu

Asimetrik sentezdeki etkileyici gelişmelere rağmen, saf enantiyomerlerin endüstriyel sentezi için başlıca yöntem rasematların rezolüsyonudur (Ghanem and Aboul-Enein 2004). Rezolüsyon, bir rasemik karışımın enantiyomerlerine ayrılması işlemidir. Böylece istenen enantiyomer istenmeyen enantiyomerinden ayrılır. Rasematların rezolüsyonu dört farklı yöntemle gerçekleştirilir; i) Direkt tercihli kristalizasyon, ii) Diastereomerik tuzların kristalizasyonu, iii) Kinetik rezolüsyon, iv) Dinamik kinetik rezolüsyon.



Şekil 2.18 Enantiyomerikçe saf bileşikler sentezleme yöntemleri

2.4.1.1 Tercihli kristalizasyon

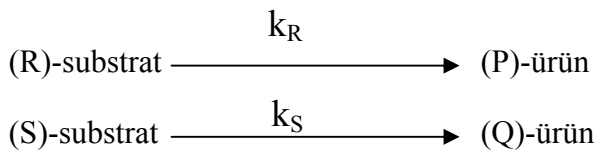
Tercihli kristalizasyon endüstriyel ölçekte yaygın olarak kullanılır. Örneğin kloramfenikol (enfeksiyon önleyici bir ilaç) ve α -metil-L-dopa (kalp damar hastalıklarında tedavi edici ajan) üretimi tercihli kristalizasyon yöntemiyle mümkündür. Bu yöntem sadece “konglomerat” şeklindeki rasematlara uygulanabilir. Konglomerat eşit miktarda iki enantiyomerin kristallerinin mekanik karışımından oluşur. Ancak tüm rasematların % 20’den daha azı konglomerat şeklindedir. Geri kalanı gerçek rasemik bileşiklerdir ve tercihli kristalizasyon yöntemiyle ayrılamazlar. Tercihli kristalizasyonun başarısı konglomerat şeklindeki rasemik karışımın enantiyomerlerden herhangi birinden daha çözünür olmasına bağlıdır.

2.4.1.2 Diastereomer kristalizasyon

Eğer rasemat gerçek bir rasemik karışım ise tercihli kristalizasyon yoluyla ayrılamaz. Bu durumda diastereomer kristalizasyon yöntemi kullanılabilir. Bu yöntemin öncülüğünü 1854'te Louis Pasteur yapmıştır. Su ya da etanol içindeki rasemik karışım çözeltisi saf bir enantiyomer (çözücü ajan) ile reaksiyona girer ve diastereomerik bir tuz karışımı oluşur. Böylece diastereomerik karışım kristalizasyon yoluyla ayrılabilir. Bu yöntemde rasemik karışımın enantiyomerleri önce farklı fiziksel özelliklere sahip diastereomer türevlerine dönüştürülür. Diastereomerleri oluşturan ve oluşan diastereomerleri tekrar enantiyomerlerine dönüştüren tepkimeler basit asit-baz tepkimeleridir. Genellikle optikçe aktif bir baz ile rasemik bir asit tepkimeye girer ve diastereomerik tuzlar oluşur. Bu yöntem kiral amin ve karboksilik asitlerin rezolüsyonunda yaygın olarak kullanılır.

2.4.1.3 Katalitik kinetik rezolüsyon

Rasematların rezolüsyonunda kullanılan üçüncü yöntem ise kinetik rezolüsyondur. Bu yöntemin başarısı bir kiral ajan varlığında iki enantiyomerin farklı hızlarda reaksiyon vermesine bağlıdır. Bu kiral varlık, bir biyokatalizör (enzim veya mikroorganizma) ya da bir kemokatalizör (kiral metal kompleksi, kiral asit veya baz) olabilir ve ortamda katalitik miktarda bulunmalıdır. Kinetik rezolüsyon rasemik karışımındaki enantiyomerlerden birinin diğerinden daha hızlı ürüne dönüşmesi olarak tanımlanabilir (Şekil 2.19).



Şekil 2.19 Katalitik kinetik rezolüsyon

Kinetik rezolüsyon $k_R \neq k_S$ olduğunda gerçekleşir ve dönüşüm % 0 ile % 100 arasında bir yerdeyken tepkime durdurulur. İdeal olarak bir enantiyomer diğerinden daha hızlı tepkimeye girer. Örneğin (R)-izomeri tepkimeye giren tek enantiyomer ise ($k_S=0$), 50:50 oranındaki başlangıç karışımının % 50 dönüşümü sonunda, final karışım içinde % 50 (S)-izomeri ve % 50 ürün (P) kalır. Bu yöntem tek bir enzim kullanılarak iki enantiyomerin kolay şekilde ayrılmasında avantaj sağlar. Enantiyomerikçe saf bileşiklerin elde edilmesinde yaygın olarak kullanılan bir rezolüsyon türüdür. Ancak bu proseste maksimum % 50 verimle enantiyomerik saflıkta ürün elde edilir.

Dinamik kinetik rezolüsyonda, kinetik rezolüsyon ile rasemizasyon prosesi birlikte gerçekleştirilir. Hem kinetik rezolüsyon hem de dinamik kinetik rezolüsyonda (R)-enantiyomeri, (S)-enantiyomerinden daha hızlı (R)-ürününe dönüşür ($k_R > k_S$). Dinamik kinetik rezolüsyonun tek farkı (S)-enantiyomeri rezolüsyon prosesi süresince izomerleşir, başlangıç (R)- substratının tamamı (R)-ürününe dönüşebilir ($k_{ras} \geq k_R$). Böylece % 100 verime ulaşılabilir.

Enzim katalizli tepkimelerde enantiyomerik aşırılık (ee) ve enantiyomerik oran (E) gibi iki önemli kavram vardır. Herhangi bir bileşiğin enantiyomerik saflığı enantiyomerik aşırılık terimi ile ifade edilir (Eşitlik 1). R, (R)-enantiyomerinin, S, (S)-enantiyomerinin derişimini göstermektedir. Rasemik bir karışım için ee değeri "0" iken enantiyomerikçe saf bir bileşik için ee değeri "1" dir

$$\% ee = \frac{[R] - [S]}{[R] + [S]} \times 100 \quad R > S \quad (1)$$

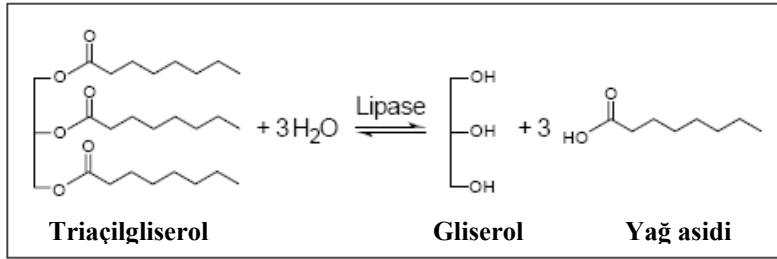
$$E = \frac{\ln[(1-c) \times (1-ee(S))]}{\ln[(1-c) \times (1+ee(S))]} \quad (2)$$

$$\text{Dönüşüm (c)} = 1 - \frac{([R] + [S])}{([R_0] + [S_0])} \quad (3)$$

Enzimler kiraldır ve rasemik bir karışımın iki enantiyomeri arasında ayırım yapma yeteneğine sahiptir. Enzim katalizli tepkimelerin enantiyoseçimliliğini veya stereoseçimliliğini tanımlamak için enantiyomerik oran (E) denilen bir parametre kullanılır (Eşitlik 2). Enantiyoseçimli olmayan tepkimelerde E değeri “1” iken, kabul edilebilir bir rezolüsyon için E değeri 20’den büyük olmalıdır (Ghanem and Aboul-Enein 2004).

2.5 Lipazlar

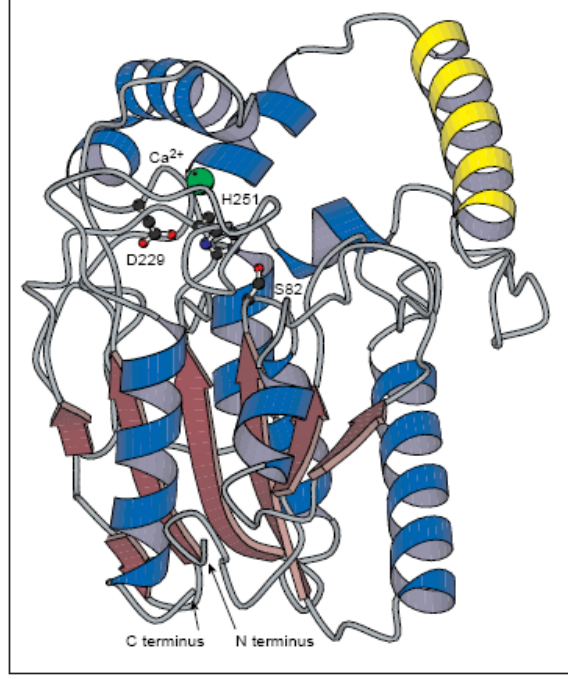
Lipazlar (EC 3.1.1.3) gliserit ester bağlarının hidrolizini katalizleyen hidrolaz grubu enzimlerdir. Açilgliserolaz, açilhidrolaz veya triaçilgliserol hidrolazlar olarak da adlandırılırlar. Lipazlar hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunur. Lipazların biyolojik görevleri yağlarda bulunan zengin enerji kaynaklarının kullanılmasına olanak sağlamak için sindirime yardımcı olmaktır.



Şekil 2.20 Lipazların katalitik etkisi

2.5.1 Lipazların üç boyutlu yapıları

Lipazların büyük çoğunluğu, hücre dışı, moleküler ağırlığı 20 ve 60 kDa arasındaki asidik glikoproteinlerdir. Çoğu saflaştırılmış lipazlar % 2-15 karbonhidrat içerir. Memeli, bakteri ve fungal kaynaklı lipazların primer yapıları saptanmış ve aminoasit sayılarının 270 ile 641 arasında değiştiği görülmüştür. Tüm lipazlar “ α / β -hidrolaz katlanması” olarak bilinen karakteristik bir katlanma şekli gösterirler. Lipazın iç kısmı 8 farklı β zincirinden (β 1- β 8) oluşan merkezi β tabakası ve bunu çevreleyen 6 adet α -heliks (A-F) zincirinden oluşmaktadır (Şekil 2.21). Aktif bölge serin, aspartik (glutamik) asit ve histidin aminoasitlerini içeren katalitik üçlüden oluşur (Jaeger and Reetz 1998).



Şekil 2.21 *Pseudomonas aeruginosa* lipazının yapısı (Jaeger and Reetz 1998)

Katalitik üçlü nükleofilik serin ve aspartatın (glutamat) hidrojen bağıyla histidine bağlanmasıyla oluşur. Bu katalitik üçlü serin proteazlar ile benzerdir. Lipazlar üzerinde trigliseridler için dört adet substrat bağlanma cebi tanımlanmıştır: bir oksianyon boşluğu ve *sn*-1, *sn*-2 ve *sn*-3 pozisyonlarına bağlı yağ asitlerine yer sağlayan üç adet cep mevcuttur. Bu ceplerin hidrofilik/hidrofobikliği ve boyutlarındaki farklılıklar lipazların enantiyotercihini belirler (Jaeger *et al.* 1999).

2.5.2 Arayüzey aktivasyonu

Lipazların üç boyutlu yapılarının saptanması arayüzey aktivasyonu için iyi bir açıklama getirmiştir. Arayüzey aktivasyonu, lipolitik enzimlerin yağ-su arayüzeyleri veya çözünmeyen substratlarla etkileşmesiyle meydana gelen aktivite artışını açıklamaktadır. Enzimatik aktivitedeki bu artış lipaz aktif bölgesinin yapısal olarak yeniden düzenlenmesi ile meydana gelir (Jaeger *et al.* 1999). Yağ-su arayüzey yokluğunda lipazların aktif merkezi “kapak” olarak adlandırılan α -helikal bir yapı tarafından örtülmüştür. Hidrofobik maddelerin varlığında bu kapak hareket eder ve enzim “kapalı” formdan “açık” forma dönüşür. Böylece aktif merkez çözücü içine ulaşabilir ve aynı zamanda büyük bir hidrofobik yüzey ortaya çıkar.

Bu yapının lipazın arayüze bağlanmasını kolaylaştırdığı düşünülür. Son zamanlarda kapak yapısının varlığının arayüze aktivasyonu ile ilişkili olmadığı görülmüştür. *Pseudomonas aeruginosa*, *P. glumae* ve *Candida antarctica* B ve kunduz pankreatik lipazı aktif merkezi örten amfifilik bir kapağa sahip olmalarına rağmen arayüze aktivasyonu göstermez (Jaeger and Reetz 1998).

2.5.3 Lipazların uygulama alanları

Lipazlar endüstride önemli bir biyokatalizör grubu oluşturur (Çizelge 2.2). Mikrobiyal lipazların büyük biyoteknolojik potansiyel oluşturma nedenleri; organik çözücülerde kararlı olmaları, kofaktöre ihtiyaç duymamaları, geniş substrat özgüllüğüne sahip olmaları ve yüksek enantioseçicilik sergilemeleridir (Jaeger and Reetz 1998). Lipazların substrat özgüllüklerinin diğer enzimlerle kıyaslandığında daha esnek olduğu bilinmektedir (Gandhi *et al.* 2000).

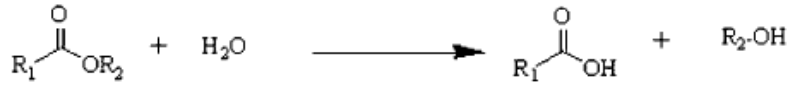
Çizelge 2.2 *Biyoteknoloji endüstrisinde lipazların uygulama alanları (Krishna and Karanth 2002)*

Endüstri	Proses	Ürün ve Uygulamaları
Süt Ürünleri	Hidroliz	Süt yağının hidrolizi
Doğal Yağlar	Yağların transesterleşmesi	Kakao yağı
Gıda	Hidroliz	İçki, et, balık ürünlerinde kalite ve tadın geliştirilmesi
Deri	Hidroliz	Deriden yağların uzaklaştırılması
Deterjan	Hidroliz	Sıvı yağ ve lipid lekelerinin uzaklaştırılması
Aroma ve Koku	Esterleşme ve transesterleşme	Doğal aroma esterlerin sentezi
	İntramoleküler esterleşme	Parfümeri için makrosiklik laktonların üretimi
İlaç ve Farmasotik	Rasemik alkol ve esterlerin rezolüsyonu	Kiral ilaçların ve insektisitlerin yapı taşı sentezi
Polimer	Monosakkaritlerin transesterleşmesi	Akrilat ester sentezi
Yüzey aktif madde	Yağların gliserolizisi	Yüzey aktif madde için monoaçil gliserol sentezi
	Şeker alkollerin açılması	Yüzey aktif madde için şeker monoaçil ester sentezi

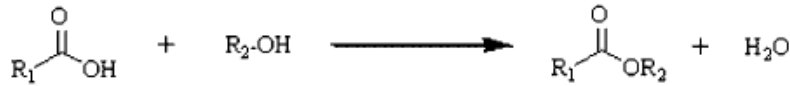
2.5.4 Lipazların katalizlediği tepkimeler

Lipazlar çok yönlü katalizörlerdir. Doğal olarak yağların hidrolizini katalizlemeleri yanında esterleşme, transesterleşme, interesterleşme ve aminolizis tepkimelerini de katalizlerler (Şekil 2.22) (Krishna and Karanth 2002).

1. Hidroliz



2. Esterleşme



3. Transesterleşme

Asidolizis :



Alkolizis:



4. İnteresterleşme



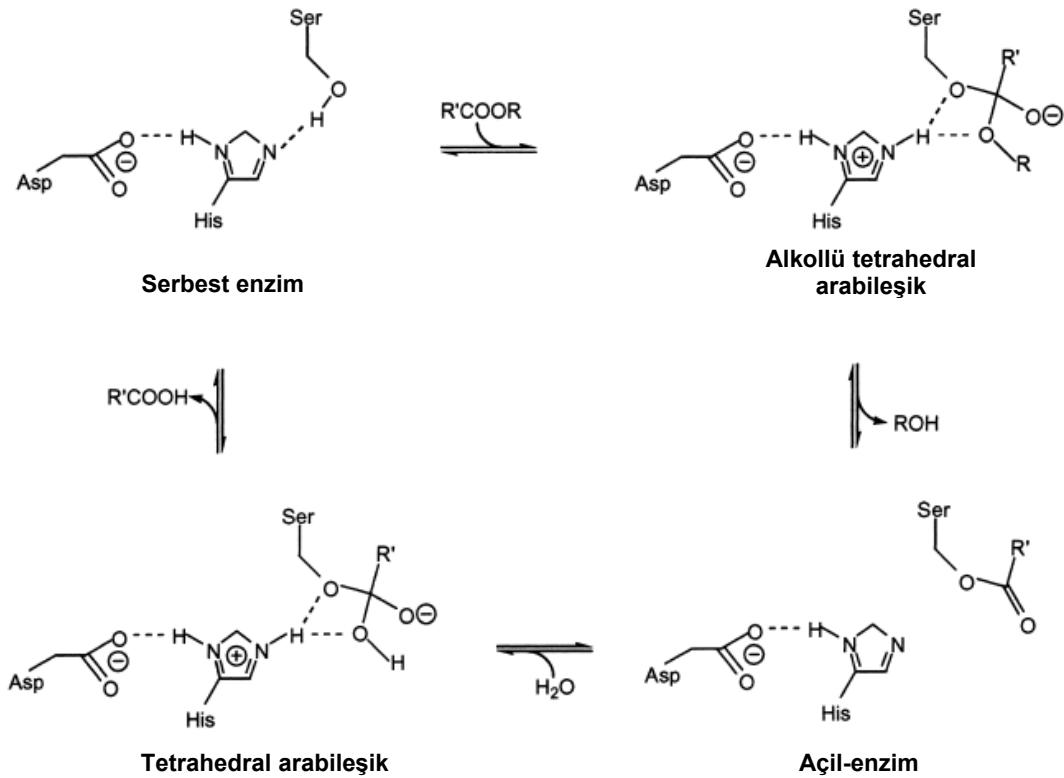
5. Aminolizis



Şekil 2.22 Lipaz katalizörlüğünde gerçekleşen tepkimeler

2.5.5 Lipaz katalizli esterleşme tepkimesi mekanizması

Lipaz katalizli esterleşme tepkimesinin mekanizması serin hidrolazlara benzemektedir. Burada iki tetrahedral arabileşik oluşmaktadır (Şekil 2.23). İlk tetrahedral arabileşik katalitik üçlüdeki serin rezidüsünün asit üzerine nükleofilik atağı ile oluşur. Arabileşik bir molekül su kaybettiğinde açıl-enzim kompleksi ortaya çıkmaktadır. Daha sonraki basamakta alkol molekülü açıl-enzim kompleksine nükleofilik atak yapar ve ikinci tetrahedral arabileşik oluşur. En son olarak ise bir ester molekülü kaybedilir ve enzim doğal formuna geri döner (Gandhi *et al.* 2000).



Şekil 2.23 Serin hidrolazın katalizlediği hidroliz/esterleşme tepkimelerinin mekanizması (Raza *et al.* 2001)

2.6 Biyotransformasyon

Biyokatalizör olarak enzim ya da mikroorganizma kullanılarak bir A substratından istenen B ürünün bir ya da birkaç basamakta oluşumuna biyotransformasyon denir. Kimyasal olarak üretilmesi imkansız ya da güç olan tepkimeler gerçekleştirilir. Biyokatalitik tepkimelerin avantajları şu şekilde sıralanabilir;

- Tepkime spesifikliği: Biyokatalizör olarak kullanılan enzim istenilen ürünü vermek üzere tepkimeyi katalizler ve yan ürün oluşmaz.
- Bölgesel spesifiklik: Substrat molekülünde eşdeğer birkaç grup bulunuyor ise enzim bu grupları ayırt eder ve hep aynı bölge ile tepkimeye girer.
- Stereospesifiklik: Enzimler rasemik substratların enantiyomerleri arasında ayırım yapabilir. Böylece enantiyomerlerden sadece bir tanesi tepkimeye girer.
- İlmli tepkime koşulları: Enzim tepkimesinin aktivasyon enerjisi düşük olduğundan biyotransformasyon prosesleri düşük sıcaklıkta, nötral pH'da ve atmosfer basınç altında gerçekleşir.
- Yüksek verim elde edilir.

Biyotransformasyon beş farklı yöntemle gerçekleştirilebilir, i) büyüyen hücreler ile biyotransformasyon, ii) önceden çoğaltılmış hücreler ile biyotransformasyon, iii) tutuklanmış hücreler ile biyotransformasyon, iv) saf enzimler ile biyotransformasyon, v) çok fazlı sistemlerde biyotransformasyon.

Büyüyen hücreler ile biyotransformasyonda mikroorganizma çoğaldıkça gerekli enzimlerde çok miktarda sentezlenir. Substrat tepkime ortamına aşılama ile birlikte veya üremenin durgunluk fazında eklenir. Substrat mikroorganizma üremesini inhibe edebilir. Bu nedenle belli bir hücre derişimine ulaşıldıktan sonra substrat eklenmesi daha iyidir.

Önceden çoğaltılmış hücreler ile biyotransformasyonda mikroorganizma optimum koşullar altında çoğaltılır. Daha sonra filtrasyon ya da santrifüj ile biyokütle ayrılır. Elde edilen biyokütle su veya tampon çözelti içeren tepkime ortamına eklenir. Bu yöntemin avantajları şunlardır; substratın mikroorganizmanın çoğalması üzerine olan olumsuz etkileri

önlenebilir, her basamak tek tek optimize edilebilir, optimum dönüşüm hızını veren hücre derişimini belirlemek mümkündür ve ortam çok karmaşık olmadığından ürün ayrılması kolaydır. Ayrıca üretilen mikroorganizmanın tepkime ortamına eklenmesi sırasında steril çalışmaya gerek yoktur.

Hücrelerden izole edilen saf enzimler ile gerçekleştirilen biyotransformasyon proseslerinin avantajları şu şekilde sıralanabilir; tepkimenin işletim ve kontrolünün kolay olması, enzimlerin istenilen tepkimeye spesifik olmalarından dolayı yan tepkimelerin oluşmaması, enzimlerin mikroorganizmalara göre çözücü toleransının daha fazla olmasıdır. Saf enzimlerin dezavantajları ise enzim saflaştırma işleminin uzun zaman alan yorucu bir işlem olması, ve saf enzim fiyatlarının pahalı oluşudur. Ayrıca bazı enzimlerin koenzim veya kofaktöre ihtiyaç duyması nedeniyle maliyet bir kat daha artmaktadır. Oysa ki hücrelerde rejenerasyon ile kofaktör geri kazanımı mümkündür.

Tutuklanmış hücreler ile biyotransformasyonda tutuklanmış hücreler ile gerçekleştirilen biyotransformasyonlar, serbest hücreler ile gerçekleştirilenlere göre daha kararlı işletme olanağına sahiptir. Tutuklanmış hücreler tepkime ortamından kolaylıkla uzaklaştırılabilir ve tekrar kullanılabilirler. Tutuklamanın ek maliyet getirmesi ve difüzyon kısıtlamaları bu yöntemin dezavantajlarındanır.

Çok fazlı sistemler ile biyotransformasyonun avantajları ise şu şekilde sıralanabilir;

1. Sudaki çözünürlüğü düşük olan substrat veya ürünlerin, yüksek derişimlerinde çalışmak mümkündür.
2. Substrat ve ürün inhibisyonu azaltılır.
3. Tepkime hızı yükselir.
4. Substrat ve/veya ürün hidrolizi önlenir.
5. Tepkime dengesi, ilgili fazlar arasında ürün ve substrat dağılımı ile değiştirilebilir.
6. Su aktivitesinin azalmasıyla tepkime dengesi değişir.
7. Biyokatalizör ya da ürün uzaklaştırması kolaydır.
8. Biyokatalizörler daha kararlıdır.

2.7 Kaynak Araştırması

Literatürde rasemik 1-fenil 1-propanolün esterleşme tepkimesiyle kinetik rezolüsyon çalışmalarının sınırlı olduğu görülmüştür. Ancak bazı primer (birincil) ve sekonder (ikincil) alkoller ile rasemik bileşiklerin lipaz enzimi katalizörlüğünde esterleşme ve transesterleşme tepkimeleriyle kinetik rezolüsyon çalışmalarına rastlanmıştır.

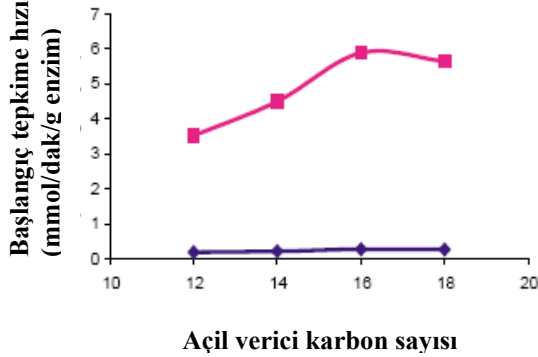
Suan and Sarmidi (2004) geri döngülü dolgu yatak reaktörde rasemik 1-feniletanolün enantiyoseçimli esterleşme tepkimesinde tutuklanmış lipazların rolünü araştırmıştır. Altı ticari tutuklanmış lipazın incelendiği bu çalışmada rezolüsyon için en iyi sonuçlar ChiroCLEC-PC (*P. cepacia*) ve Chirazyme L2, c.-f., C3, Iyo (*C. antarctica*) ile elde edilmiştir. Enzim aktivitesi ve enantiyoseçimlilik üzerine substrat konsantrasyonunun (25-250 mM), açıl vericilerin zincir uzunluklarının (12 C-18 C), organik çözücülerin Log P değerlerinin (1.4-4.5) ve tepkime sıcaklığının (25-50 °C) etkileri incelenmiştir. Başlangıç tepkime hız yaklaşımı enzim aktivitesini belirlemede kullanılmıştır.

(R,S)-1-feniletanolün rezolüsyonunda 50 mM (R,S)-1-feniletanol, 150 mM laurik asit 25 ml izooktan içinde çözüldükten sonra tepkimeler ChiroCLEC-PC (12,5 mg), Chirazyme L2, c.-f., C3, Iyo (250 mg) enzimleri eklenerek 35 °C'de başlatılmıştır. Tepkime karışımına (4°A) % 10 moleküler elek (w/v) eklenmiştir.

Lipase PS-C (*P. cepacia*) ve Lipase Sol-Gel-Ak (*C. cylindracea*) dışındaki tüm lipazların tepkimeyi katalizleyebildiği, tüm enzimlerin (R)-1-feniletanole ilgi gösterirken (S)-1-feniletanolün değişmeden kaldığı görülmüştür. ChiroCLEC-PC (*P. cepacia*) enzimi tüm enzimler arasında rezolüsyon için en yüksek etkinliği sergilemiştir. Substrat için enantiyomerik aşırılık değeri Chirazyme L2, c.-f., C3, Iyo (*C. antarctica*) için % 97, ChiroCLEC-PC (*P. cepacia*) için % 96 olarak bulunmuştur. Enantiyomerik oran (E) değeri ise 200'ün üzerindedir.

İncelenen tüm substrat oranlarında tutuklanmış ChiroCLEC-PC lipazının, liyofilize Chirazyme L2, c.-f., C3, Iyo'dan (*C. antarctica* lipaz B) daha aktif olduğunu göstermiştir. Laurik asit konsantrasyonunun etkisi incelendiğinde (R,S)-1-feniletanolün rezolüsyonu için optimum laurik asit konsantrasyonunun 150 mM olduğu bu değer üzerine çıktığında substrat inhibisyonu gözlemlendiği belirtilmiştir.

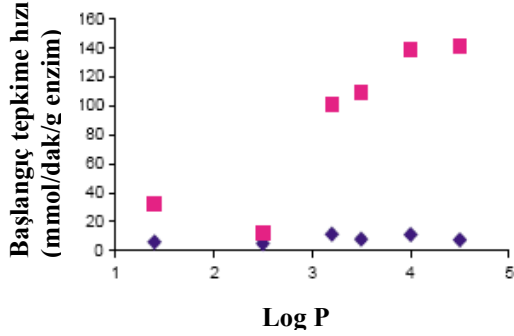
Açıl verici olarak kullanılan yağ asitlerinin zincir uzunluklarının etkisi incelendiğinde ChiroCLEC-PC'nin (*P. cepacia*) kullanıldığı tepkimelerde, başlangıç tepkime hızının laurik asitten (12 C) palmitik asite (16 C) kadar arttığı, ancak stearik asitte % 3-4'lük bir azalma olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 2.24). Araştırmacılar bu durumu enzimin açıl bağlama bölgesinin karbon sayısının 16 C'a kadar olan açıl grupları için yeterli olabileceği ve stearik asitin uzun açıl zincirine sahip olmasının katalizleme süresince enzimin serbest hareketini engellemiş olabileceği şeklinde yorumlamışlardır. Diğer bir nedenin ise amfifilik karakterde olan stearik asitin enzim molekülü ile organik çözücü faz arasında ayrılması olduğu belirtilmiştir (Suan and Sarmidi 2004).



Şekil 2.24 ChiroCLEC-PC (■) ve Chirazyme L2, c.-f., C3, Iyo (◆) enzimlerinin farklı karbon sayılarındaki açıl vericilerde başlangıç tepkime hızları (Suan and Sarmidi 2004)

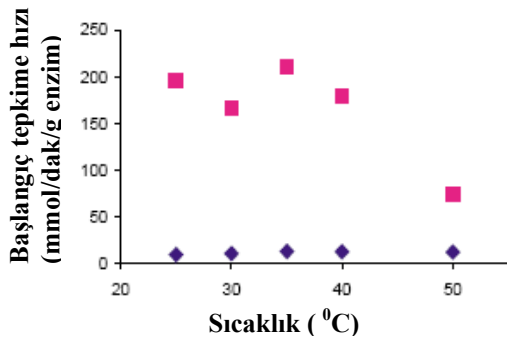
Çözücü polaritesinin enzimin enantiyoseçimliliğini ve aktivitesini etkilediği bilinmektedir. (R,S)-1-feniletanolün rezolüsyonuna çözücü türünün etkisini belirlemek için izooktan (Log P=4,5), heptan (Log P=4), hegzan (Log P=3,5), siklohegzan (Log P=3,2), toluen (Log P=2,5) ve ter-bütümetiler (Log P=1,4) çözücüleri incelenmiştir. ChiroCLEC-PC (*P. cepacia*) katalizli tepkimelerde çözücü hidrofobikliğin artmasıyla başlangıç tepkime hızı da artmıştır. Enzim performansı toluen çözücüsünde belirgin şekilde azalmıştır. Ter-bütümetil eter ise diğer tüm hidrokarbon çözücülerden daha hidrofilik olması nedeniyle

düşük tepkime hızı sergilemiştir (Şekil 2.25). Hidrofilik çözücüler enzimin fonksiyonel yapısının parçalaması ya da enzim için gerekli suyu enzimden uzaklaştırması yoluyla enzimi deaktive etmektedir (Suan and Sarmidi 2004). Chirazyme L2, c.-f., C3, Iyo (*C. antarctica*) katalizli tepkimelerde başlangıç tepkime hızının çözücü polaritesinden etkilenmediği gözlenmiştir. Çözücü polaritesinin katalitik aktiviteyi büyük ölçüde etkilemesine rağmen enantiyoseçimliliği etkilemediği görülmüştür.



Şekil 2.25 ChiroCLEC-PC (■) ve Chirazyme L2, c.-f., C3, Iyo (◆) enzimlerinin farklı LogP değerli organik çözücülerde başlangıç tepkime hızları (Suan and Sarmidi 2004)

Sıcaklık etkisi incelendiğinde, ChiroCLEC-PC aktivitesinin 25 ile 40 °C arasındaki sıcaklıklardan çok fazla etkilenmediği ancak 50 °C’de belirgin şekilde düştüğü görülmüştür (Şekil 2.26). Tepkime hızı optimum sıcaklık olan 35 °C’nin üzerindeki sıcaklıklarda düşmüştür. Bunun nedeni olarak yüksek sıcaklıklarda enzimin deaktive olabileceği belirtilmiştir. 25-50 °C arasındaki sıcaklıklarda E değeri 200’ün üzerindedir.



Şekil 2.26 ChiroCLEC-PC (■) ve Chirazyme L2, c.-f., C3, Iyo (◆) enzimlerinin farklı sıcaklıklardaki başlangıç tepkime hızları (Suan and Sarmidi 2004)

İrimescu *et al.* (2004) tutuklanmış *Candida antarctica* (CALB) ve *Rhizomucor miehei* lipazları (RML) katalizörlüğünde 2-metoksi-2-feniletanol, 2-fenil-1-propanol ve 1-fenil-1,2-etanediol gibi bazı primer alkollerin esterleşme tepkimesiyle kinetik rezolüsyonlarını gerçekleştirmiştir. Tepkimeler düşük basınç altında suyun uzaklaştırıldığı çözücüsüz sistemde yapılmıştır. 10 mmol primer alkol ve 5,5 mmol yağ asidi tepkime ortamına eklenerek 200 rpm hızındaki manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve 0,23 gr tutuklanmış enzim eklenmiştir. Tepkime kabı sıvı azot tuzağı vasıtasıyla vakum pompasına bağlanmış ve basınç 5 mmHg'de sabit tutulmuştur.

CALB'nin enantiyoseçimlilik ve tepkime hızı bakımından RML'den üstün bir enzim olduğu görülmüştür. 2-metoksi-2-feniletanol'ün esterleşme tepkimesinde CALB'nin enantiyoseçimliliği üzerine asit türlerinin etkisi incelenmiştir. Serbest yağ asitleri arasında en yüksek enantiyomerik oran değeri 4-okso-pentanoik asit (E=31) ile elde edilmiştir. Pentenoik asitteki çift bağın pozisyonu tepkime hızını ve enantiyoseçimliliği (E) etkilemiştir (Çizelge 2.3). CALB'nin enantiyoseçimliliği tepkime sıcaklığının azalmasıyla belirgin şekilde artmıştır. 25°C'de 2-metoksi-2-feniletanol'ün 4-pentenoik asit ile esterleşme tepkimesinde E değeri 14 iken 0 °C'de E değeri 43 olarak bulunmuştur.

Çizelge 2.3 25 °C'de CALB enzimi katalizörlüğünde 2-metoksi-2-feniletanol'ün esterleşme tepkimesinde asit türlerinin etkisi (İrimescu *et al.* 2004)

Asit Türü	Başlangıç hızı ($\mu\text{mol/dak mg}$)	Tepkime süresi (dakika)	Dönüşüm (%)	E
4-Oksopentanoik	0,36	30	25,2	31
4-Pentenoik	0,85	15	29,2	14
trans-3- Pentenoik	0,53	30	30,4	11
trans-2- Pentenoik	0,10	120	27,0	4
Pentanoik	0,93	15	32,2	15
Hegzanoik	0,81	15	27,9	10
Oktanoik	0,35	30	22,2	11
Dekanoik	0,38	30	25,5	12
<i>cis</i> -9-oktadekenoik	0,19	60	26,3	9

Enzim seçiciliği ve aktivitesi eklenen çözücü türünden etkilenmektedir. Enzim aktivitesi için çözücü ve girdilerin hidrofobikliği, çözücünün polaritesi ve su ile karışabilmesi göz önünde bulundurulmalıdır. Çözücü hidrofobikliği Log P ile karakterize edilir. Frings *et al.* (1999) *Mucor miehei* (Novozym 388) lipazı katalizörlüğünde rasemik 1-fenil etanolün vinil propiyonat ile organik çözücülü ortamda kinetik rezolüsyonunu incelemiş ve çalışmada çözücünün enzim aktivitesi üzerinde belirgin bir etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Düşük Log P değerlerinde hiç aktivite gözlenmezken enzim aktivitesinin çözücü hidrofobikliği arttıkça tutarlı şekilde arttığı görülmüştür (Çizelge 2.4). En iyi sonuçlar hegzan çözücüsünde elde edilmiştir. Ter-bütileteler (MTBE) gibi polar bir çözücüde aktivite gözlenmemesinin nedeni, enzim yüzeyindeki su tabakasının uzaklaşması veya parçalanması yoluyla enzimin inaktive olması şeklinde açıklanmıştır.

Çizelge 2.4 Ester oluşumunda farklı Log P değerli organik çözücülerin enzim aktivitesi (Frings *et al.* 1999)

Organik Çözücü	Log P değeri	Enzim aktivitesi ($\mu\text{mol/dak g}$)
MTBE	1,8	0,0
Hegzan/dietileteler	3,2	1,1
Hegzan	3,5	12,0
Heptan	4,0	5,6
Oktan	4,5	5,9
Dekan	5,6	10,3

Tepkimeler 25 °C’de 8 ml hegzan içeren vida kapaklı şişelerde 100 mM 1-fenil etanol ve 200 mM vinil propionat ile 1 ml enzim çözeltisi eklenerek başlatılmıştır. Enantiyomerik aşırılık değeri % 99’un üzerinde olduğundan enantiyoseçimlilik (E) 200’ü aşmıştır. 1-fenil etanolün vinil propionat ile enantiyoseçimli transesterleşme tepkimesinde enzimin R-enantiyomerine karşı seçici olduğu ve 48 saat sonunda sadece R-fenil-etil propionat oluştuğu görülmüştür.

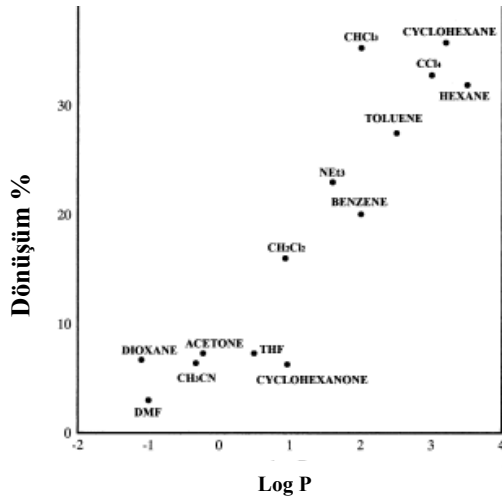
Lipaz katalizli esterleşme ve transesterleşme tepkimelerinde tepkime ortamının rolü Cernia *et al.* (1998) tarafından araştırılmıştır. Çalışmalarında süperkritik koşullardaki akışkanları ve farklı organik çözücüleri kullanmışlardır. Doğal ve sentetik bileşiklerin substrat olarak kullanıldığı esterleşme ve transesterleşme tepkimelerinde tepkime ortamı enzim aktivitesini etkilemiştir. Çözücü polaritesi ve hidrofobikliği lipaz aktivitesini büyük ölçüde değiştirebilmektedir. Süperkritik akışkanlar (SCF) susuz ortamda bazı enzimlerin kullanılabilirliğini ve aktivitesini artırmak için önerilmektedir .

Organik çözücüdeki esterleşme tepkimesinde substrat olarak 1-fenil etanol ve türevleri (0,9 mmol) kullanılmıştır. 0,9 mmol açıl verici (asetik anhidrit) ile birlikte serbest ve tutuklanmış *Pseudomonas cepacia* lipazları (25-60 mg) 1,75 ml organik çözücü içerisine eklenmiştir. Tepkimeler 40 °C'de ve 600 rpm karıştırma hızındaki manyetik karıştırıcıda gerçekleşmiştir. Tepkimenin enantiyoseçimliliği ve dönüşüm yüzdesinin kullanılan çözücü türüne bağlı olduğu görülmüştür. Farklı aktive substratların kullanılması tepkime hızını büyük ölçüde etkilememiştir (Çizelge 2.5).

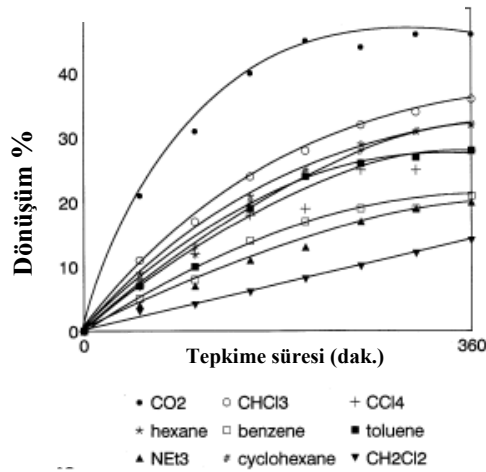
Çizelge 2.5 Farklı organik çözücülerde ve süperkritik CO₂'de tutuklanmış *Pseudomonas cepacia* lipazı katalizörlüğünde gerçekleşen farklı sekonder alkollerin asetik anhidrit ile esterleşme tepkimesinin enantiyomerik aşırık değerleri (Cernia *et al.* 1998)

Substrat	SC-CO ₂	Hegzan	CCl ₄	Toluen	CHCl ₃	NEt ₃
1-fenil etanol	97	42	88	88	93	67
1-(4-florofenil)-etanol	96	69	76	80	85	7
1-(4-klorofenil)-etanol	80	58	69	70	90	12
1-(4-bromofenil)-etanol	96	88	70	89	80	4
1-(4-metoksifenil)-etanol	100	60	49	88	55	20
1-(4-ter-bütilfenil)-etanol	99	93	62	70	80	3

Log P oktanol-su çift fazlı sisteminde verilen bileşiğin dağılma katsayısının logaritmasını ifade eder. Bu çalışmada Log P ile dönüşüm yüzdesi arasında doğrusal bir korelasyon olduğu bulunmuştur (Şekil 2.27). Bu sonuçlar Log P değeriyle ifade edilen çözücü hidrofobikliğin artması ile lipaz aktivitesinin arttığını kanıtlamıştır.



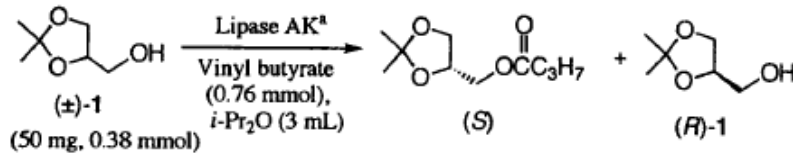
Şekil 2.27 1-feniletanol ile asetik anhidritin *P.cepacia* lipazı katalizörlüğünde farklı Log P değerli çözücüler içerisinde gerçekleşen esterleşme tepkimesinin dönüşüm değerleri (Cernia et al. 1998)



Şekil 2.28 1-feniletanol ile asetik anhidritin *P.cepacia* lipazı katalizörlüğünde organik çözücüler ve süperkritik CO₂ ortamında tepkime sürelerine karşılık dönüşüm değerleri (Cernia et al. 1998)

Organik çözücülerle kıyaslandığında süperkritik CO₂ ortamında dönüşümün yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmadaki sonuçlar süperkritik CO₂ için Log P ve dielektrik sabiti değerlerine ait bilgi olmamasına rağmen çözücü hidrofobikliğinin tepkime hızını artırmada önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Elde edilen sonuçlar süperkritik ortamda çözünen maddenin yüksek yayılma gücüne sahip olması ve süperkritik fazda enzim kararlılığının artması olarak açıklanabilir. Süperkritik tepkime ortamının kullanımı ile tepkimenin ee değerlerinin (> %98) açık şekilde arttığı saptanmıştır. Elde edilen ee değeri organik çözücü ile elde edilenden daha yüksektir.

Sakai *et al.* (1998) primer ve sekonder alkollerin lipaz katalizli transesterleşme tepkimelerinde enantiyoseçimliliği arttırmak için düşük sıcaklık yönteminin uygulanabileceğini göstermiştir. Lipaz AK (*Pseudomonas fluorescens*) enzimi katalizliğinde solketalin vinil bütirat ile kinetik rezolüsyonunda tepkime sıcaklığı -40 °C'e düşürülerek E değerinin 55'e kadar artması sağlanmıştır (Şekil 2.29). Tepkime sıcaklığının 30 °C'den -40 °C'e azalmasıyla enantiyomerik orandaki artış kadar enzim miktarı ve tepkime süresindeki artış da dikkat çekicidir (Çizelge 2.6).

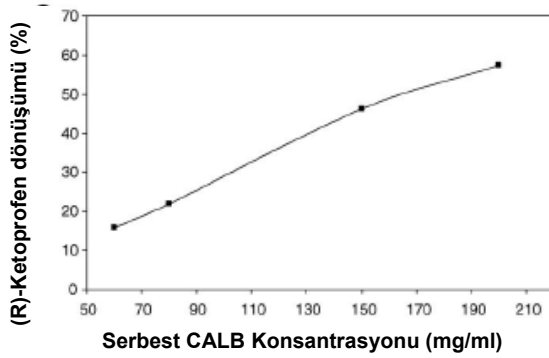


Şekil 2.29 Solketalin lipaz katalizli kinetik rezolüsyonu (Sakai *et al.* 1998)

Çizelge 2.6 Solketalin Lipaz AK katalizörlüğünde vinil bütirat ile kinetik rezolüsyonuna sıcaklık etkisi (Sakai *et al.* 1998)

Sıcaklık (°C)	Lipaz (mg)	Zaman (saat)	Ester (% ee)	Solketal (% ee)	Dönüşüm	E
30	20	3	63	69	0,52	9
0	20	6	88	25	0,22	20
-10	60	8	84	77	0,48	26
-20	60	11	92	32	0,26	31
-30	100	16	93	39	0,30	39
-40	200	24	93	63	0,41	55
-50	200	48	74	97	0,57	27
-60	200	48	93	51	0,35	44

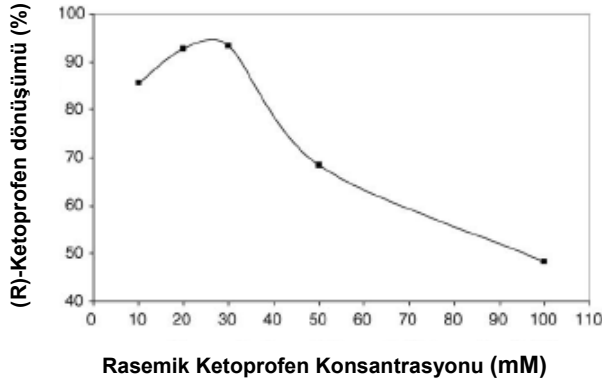
Ong *et al.* (2006) karışık çözücülü sistemde serbest *Candida antarctica* lipazı (CALB) katalizörlüğünde rasemik ketoprofenin [2-(3-benzoilfenil)-propionik asit] enantiyoseçimli esterleşme tepkimesini araştırmıştır. Enzim miktarı (60-200 mg/ml), substrat konsantrasyonu (10-100 mM), alkol/asit mol oranı (0:1-5:1), çözücü türü ve sıcaklık (30-60 °C) etkisi incelenmiştir. Deneyler 250 ml Erlenmayer şişelerinde 25 ml organik çözücü içerisine uygun substrat miktarı ve enzim (CALB) eklenerek 37 °C’de 250 rpm karıştırma hızındaki çalkalayıcılarda gerçekleştirilmiştir. Tepkime sonunda (S)-ketoprofen tepkimeye girmeyen enantiyomer olarak elde edilmiştir. (R)-ketoprofenin dönüşüm değeri enzim miktarının artışıyla birlikte dramatik şekilde artmıştır. En yüksek dönüşüm % 57 ile 200 mg/ml enzim miktarında elde edilmiştir (Şekil 2.30). Yüksek enzim konsantrasyonu tepkimenin gerçekleşmesi için substratın bağlanacağı daha fazla aktif merkez sağlamıştır. Daha sonraki deneyler 200 mg/ml CALB enzimi katalizörlüğünde yürütülmüştür.



Tepkime koşulları: 50 mM Rasemik ketoprofen, n-bütanol:ketoprofen mol oranı=4:1, tepkime süresi=48 h, çözücü olarak hegzan:diklorometan (80:20, %v/v), T=37 °C, 250 rpm

Şekil 2.30 Enzim miktarının (R)-ketoprofen dönüşümüne etkisi (Ong *et al.* 2006)

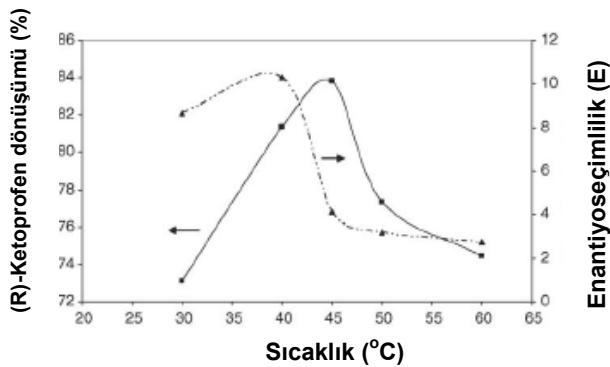
Rasemik ketoprofen konsantrasyonunun 30 mM’a kadar artmasıyla dönüşüm değeri ilk olarak artmış ancak daha sonra yüksek substrat konsantrasyonlarında düşmüştür. En yüksek dönüşüm değeri (% 93,4) 30 mM rasemik ketoprofen kullanıldığında 96 saatlik tepkime süresinde elde edilmiştir (Şekil 2.31). Yüksek substrat konsantrasyonunda enzim etkinliğinin azalma nedeni olarak, yüksek asit konsantrasyonlarında tepkime ortamının polaritesi gibi özelliklerin değiştiği, substratın reaktif olmayan karboksil grubunun üretken olmayan şekilde enzimin aktif merkezini kapladığı, esterleşme süresince yüksek asit konsantrasyonlarında daha fazla su açığa çıkacağından tepkimenin hidroliz yönünde ilerlediği belirtilmiştir.



Tepkime koşulları: n-bütanol:ketoprofen mol oranı=4:1, tepkime süresi=96 h, çözücü olarak hegzan:diklorometan (80:20, %v/v), Serbest CALB= 200 mg/ml, T=37 °C, 250 rpm

Şekil 2.31 *Substrat konsantrasyonunun (R)-ketoprofen dönüşümüne etkisi (Ong et al. 2006)*

Tepkime sıcaklığı enzimatik tepkimelerde büyük etkiye sahiptir. Ketoprofenin enantiyoseçimli esterleşme tepkimesinde dönüşüm değeri tepkime sıcaklığının artmasıyla artmıştır. 45 °C’ de dönüşüm değeri % 84 ile en yüksek değerine ulaşmıştır. 45 °C’ den daha yüksek sıcaklıklarda dönüşüm dikkat çekici şekilde azalmıştır. Enantiyoseçimlilik (E) tepkime sıcaklığının 40 °C’ ye kadar artmasıyla artmış ve 45 °C’ de hızlı bir şekilde azalmıştır. Tepkime için en uygun sıcaklık olarak 40 °C seçilmiştir. En yüksek enantiyoseçimlilik değerine (E=10) ve (R)- Ketoprofenin dönüşüm değerine (% 81) 24 saat sonunda bu sıcaklıkta ulaşılmış ve ee (P) değeri % 66,4, ee (S) değeri % 59,4 olarak hesaplanmıştır.

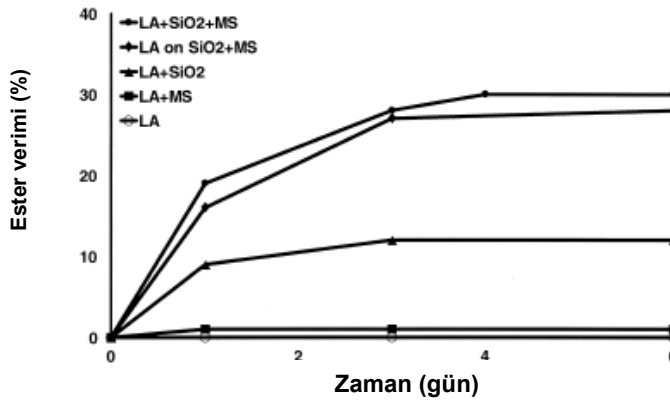


Tepkime koşulları: 30 mM Rasemik ketoprofen, n-bütanol:ketoprofen mol oranı=1:1, tepkime süresi=24 h, çözücü olarak hegzan:1,2-dikloropropan (80:20, %v/v), Serbest CALB enzimi= 200 mg/ml, 250 rpm, (■) Dönüşüm ve (▲) Enantiyoseçimlilik (E)

Şekil 2.32 *Rasemik Ketoprofenin enantiyoseçimli esterleşme tepkimesine sıcaklığın etkisi (Ong et al. 2006)*

Torres and Otera (2001) laktik asitin bazı yağ asitleriyle lipaz katalizli esterleşme tepkimesini çalışmışlardır. Yapılan çalışmada ürün dönüşümü üzerine silika jel ve moleküler eleğin birlikte kullanımının faydalı etkilerinin olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte kullanılan moleküler elek miktarının kontrol edilmesi gerektiği bildirilmiştir. Moleküler elek tepkime ortamındaki su ve laurik asiti tutarak iki karşıt etki göstermiştir. Optimum tepkime koşullarında 2-*O*-kaproyil-laktik asit % 35 verimle elde edilmiştir.

Tepkime ortamı 100 mg (0,7 mmol) kaprilik asit, 35 mg (0,38 mmol) laktik asit, 100 mg Novozym 435, 2 ml hegzan, 100 mg moleküler elek, 60 mg silika jelden oluşmuştur. Tepkimeler 60°C sıcaklıkta ve 200 rpm hızındaki orbital çalkalayıcılarda gerçekleştirilmiştir. Bu koşullarda 2-*O*-kaproyil-laktik asidin enzimatik sentezi üzerine silika jel (SiO₂) ve moleküler elek (MS) etkisi incelenmiştir. Silika jel laktik asitin tutuklanması için alternatif bir yüzey olarak görev yapmıştır. Silika jel varlığında verim artmıştır. Ancak moleküler elek ve silika jelin her ikisinin tepkime ortamında var olması yüksek verim elde edilmesinde yararlı olmuştur (Şekil 2.33).

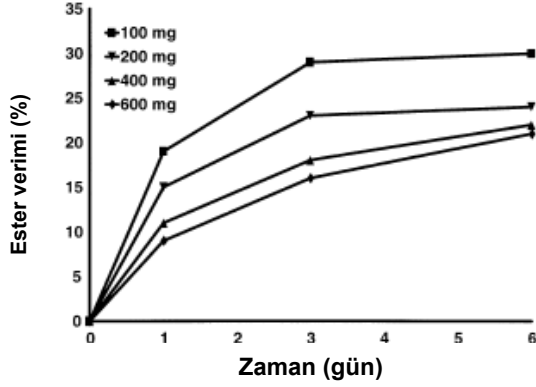


MS: Moleküler elek, SiO₂: Silika jel, LA: Laktik asit
LA on SiO₂: Silika jel üzerine tutuklanmış laktik asit
LA+ SiO₂: Ayrı ayrı eklenmiş silika jel ve laktik asit

Şekil 2.33 2-*O*-kaproyil-laktik asidin enzimatik sentezi üzerine silika jel (SiO₂) ve moleküler elek (MS) etkisi (Torres and Otera 2001)

Torres and Otera (2001) 2-*O*-kaproyil-laktik asidin enzimatik sentezi üzerine moleküler elek miktarının etkisini de incelemişlerdir. Kullanılan moleküler elek miktarı arttıkça ester veriminde azalma gözlenmiştir (Şekil 2.34). Bu etkinin moleküler eleğin polar molekülleri tutma ilgisiyle ilişkili olabileceği belirtilmiştir. Bu da küçük boyutlarda bulunan ve polar

bir molekül olan laktik asitin tutulmasını mümkün hale getirmiştir. Böylece tepkime ortamında mevcut laktik asit miktarı azalmış ve beraberinde tepkime hızı düşmüştür.



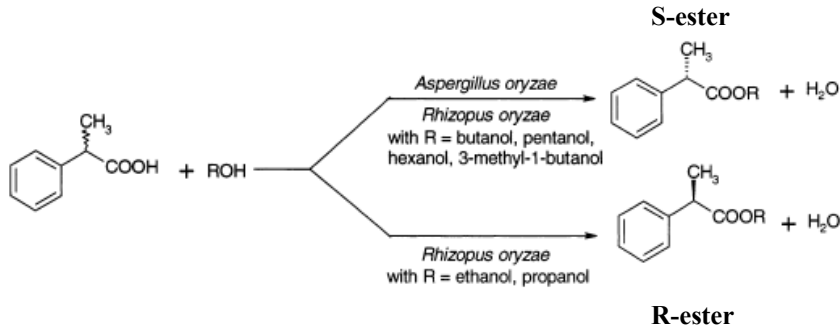
Şekil 2.34 2-O-kaproyil-laktik asidin enzimatik sentezi üzerine kullanılan moleküler elek miktarının etkisi (Torres and Otera 2001)

Bununla birlikte Şekil 2.33'te gösterildiği gibi moleküler eleğin tepkime ortamına eklenmesi ester verimini arttırmada yararlı olmuştur. Bu nedenle moleküler eleğin iki karşıt etkisi görülmüştür. Moleküler elek, suyu tutarak tepkimenin yönünün ester sentezine doğru kaymasını sağlarken, diğer taraftan tepkime karışımındaki serbest laktik asit miktarını azaltmıştır. Bu nedenlerden dolayı tepkime ortamında kullanılan moleküler elek miktarı kontrol edilmelidir.

Kinetik rezolüsyon çalışmalarında saf enzimler kadar mikroorganizmalarda biyokatalizör olarak kullanılmaktadır. Mikrobiyal hücreleri kullanmak ekonomik ve teknik açıdan bazı avantajlar sunmaktadır. Gandolfi *et al.* (2001) liyofilize *Aspergillus oryzae* MIM ve *Rhizopus oryzae* CBS 112.07 hücreleriyle rasemik 2-fenil-1-propanoik asitin etanol ile esterleşme tepkimesini organik çözücüde araştırmıştır.

Rhizopus oryzae CBS 112.07'nin kuru hücreleri heptan ve pentadekan çözücüsünde gerçekleşen biyotransformasyonda yüksek enantiyomerik aşırılıkta (> %97) (R)-etil esterleri vermiştir. *Aspergillus oryzae* MIM'in kuru hücreleri 20-40 °C arasındaki sıcaklıkta toluen çözücüsünde (S)-2-fenilpropanoik asit etil esterlerini % 90 enantiyomerik aşırılıkta üretmiştir.

Aspergillus oryzae MIM'ın etanol ile yüksek enantiyoseçicilikte (S)-ester oluşumunu tercih ederken, *Rhizopus oryzae* CBS 112.07'nin enantiyoseçiciliği kullanılan alkol türüne bağlı olarak değişmiştir; 2-fenil-1-propanoik asitin etanol ve propanol ile esterleşmesi ile (R)-ester, daha uzun zincirli alkoller ile (S)-esterler oluşmuştur.



Şekil 2.35 2-fenilpropanoik asitin farklı alkol türleri ile esterleşme tepkimesinde *Aspergillus oryzae* MIM ve *Rhizopus oryzae* CBS 112.07'nin enantiyoseçiciliği (Gandolfi et al. 2001)

Çözücü polaritesinin enzimatik aktiviteyi etkilemesi nedeniyle farklı Log P değerli çözücüler denenmiştir. *Aspergillus oryzae* MIM katalizörlü biyotransformasyon için en yüksek enantiyomerik oran (E) toluen ve heptan çözücülerini ile elde edilmiştir (Çizelge 2.7). Sıcaklık ise *Aspergillus oryzae* MIM'ın enantiyomerik oranında büyük bir etki yaratmamıştır. *Rhizopus oryzae* CBS 112.07 için en iyi çözücülerin heptan ve pentadekan olduğu belirtilmiş ve genellikle düşük sıcaklıklarda yüksek enantiyomerik oran değeri elde edilmiştir (Çizelge 2.8).

Çizelge 2.7 Farklı sıcaklıklarda *Aspergillus oryzae* MIM kuru hücreleri katalizörlüğünde gerçekleşen 2-fenilpropanoik asitin etanol ile esterleşme tepkimesi (Gandolfi et al. 2001)

Çözücü	Sıcaklık	Molar dönüşüm (%)	ee (%)	E
Toluen	20	8	84 S	12
	30	12	86 S	14
	40	21	89 S	21
Heptan	20	12	73 S	7,1
	30	21	75 S	8,5
	40	30	82 S	14

Çizelge 2.8 Farklı sıcaklıklarda *Rhizopus oryzae* CBS 112.07 kuru hücreleri katalizörlüğünde gerçekleşen 2-fenilpropanoik asitin etanol ile esterleşme tepkimesi (Gandolfi et al. 2001)

Çözücü	Sıcaklık	Molar dönüşüm (%)	ee (%)	E
Heptan	20	9	>98 R	>100
	30	16	>98 R	>100
	40	24	95 R	52
Pentadekan	20	8	>98 R	>100
	30	15	>98 R	>100
	40	18	97 R	80

Yapılan kaynak araştırması sonucunda rasemik bileşiklerin kinetik rezolüsyon çalışmalarında biyokatalizör olarak kullanılan lipaz kaynağının ve miktarının, açıl verici türünün, substrat konsantrasyonunun, organik çözücü türü ve çözücü polaritesinin ve tepkime sıcaklığının tepkimenin enantiyomerik aşırılığını ve enantiyoseçimliliğini etkilediği görülmüştür. Bu nedenle kinetik rezolüsyon çalışmalarında en uygun koşulların belirlenmesinde bu parametreler bir arada incelenmelidir. Saf enzimlerin pahalı oluşu ve saflaştırma işlemlerinin uzun zaman alan yorucu bir işlem olması nedeniyle mikrobiyal hücreler ile kinetik rezolüsyon daha avantajlıdır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Enzim ve kimyasallar

Bu araştırmada substrat olarak kullanılan sekonder alkol rasemik 1-fenil 1-propanol ve saf enantiyomerleri olan (R)- ve (S)- 1-fenil 1-propanol Aldrich'ten temin edilmiştir. Rasemik 1-fenil 1-propanolün kinetik rezolüsyonunda biyokatalizör olarak kullanılan akrilik reçineye tutuklanmış Novozym 435 (*Candida antarctica* lipaz B) Novozymes'den, serbest Amano Lipaz AK (*Pseudomonas fluorescens*) ve Amano Lipaz PS (*Pseudomonas cepacia*) Aldrich'den temin edilmiştir.

Açıl verici olarak doymuş yağ asitlerinden laurik asit, miristik asit ve palmitik asit kullanılmış olup bu ürünler Merck'ten temin edilmiştir. Açıl vericilere ait bazı fiziksel özellikler Ek 1'de gösterilmiştir. Çözücü olarak kullanılan THF (tetrahidrofuran), toluen, hegzan, heptan ve izooktan Merck'ten satın alınmış olup, çözücülere ait bazı fiziksel özellikler Ek 2'de gösterilmiştir. Ayrıca HPLC analizinde kullanılan yüksek saflıktaki hegzan ve 2-propanol de Merck'ten temin edilmiştir. İncelenen tepkime esterleşme tepkimesi olduğundan ortamda oluşacak suyu uzaklaştırmak için moleküler elek kullanılmıştır. Tepkimede Sigma'dan temin edilen sodyum alumino-silikat yapısındaki 4A° boyutundaki moleküler elek tanecikleri kullanılmıştır. TLC kağıtları (20x20 cm boyutunda silika jel 60 F₂₅₄) Merck'ten temin edilmiştir.

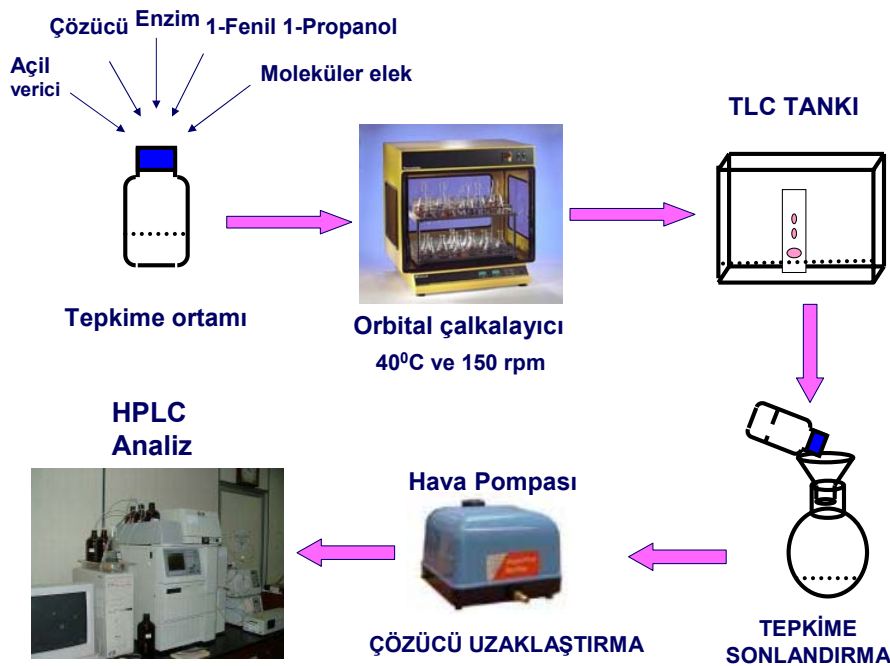
3.1.2 Mikroorganizma ve besiyeri

(R,S)-1-fenil 1-propanolün kinetik rezolüsyon deneylerinde lipaz enzimi kaynağı olan *Candida antarctica* mikroorganizması esterleşme tepkimesinde biyokatalizör olarak kullanılmıştır. *Candida antarctica* (*Pseudozyma aphidis* DSM 70725) mikroorganizması DSM (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) koleksiyon merkezinden temin edilmiştir. Besiyeri içeriğinin hazırlanmasında kullanılan D-(+)-Glukoz monohidrat Merck'ten, yeast ekstrakt, kazein pepton ve agar Fluka'dan, malt ekstrakt Amresco'dan temin edilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 (R,S)-1-fenil 1-propanolün lipaz katalizörlüğünde kinetik rezolüsyonu

Tepkimeler 25 ml hacmindeki vida kapaklı şişelerde, sıcaklık ve karıştırma hızı kontrol edilen orbital çalkalayıcılarda gerçekleştirilmiştir. Açıl verici olarak kullanılan yağ asitleri organik çözücüde (3 ml) çözüldükten sonra rasemik alkol (R,S)-1-fenil 1-propanol (0,5 mmol) tepkime ortamına eklenmiştir. Tepkime ortamında oluşacak suyu uzaklaştırmak için ortama değişen miktarlarda moleküler elek eklendikten sonra değişen miktarlarda enzim eklenerek tepkime başlatılmıştır. Tepkimeler 150 rpm karıştırma hızındaki orbital çalkalayıcılarda gerçekleştirilmiştir. Belirli sürelerde alınan örnekler U.V. ışık yardımıyla ince tabaka kromatografisinde (TLC) izlenmiştir. TLC analizlerinde yürütücü faz olarak etil asetat/n-hegzan (1:3) kullanılmıştır. TLC'deki yürütme sonucunda, oluşan ürün bandı ile alkol bandı yaklaşık aynı büyüklüğe ulaştığında tepkimeler sonlandırılmıştır. Sonlandırma işlemi sırasında enzim ve moleküler elek tepkime ortamından filtre kağıdı ile ayrılmıştır. Tepkime ortamındaki organik çözücü ise hava pompası yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Çözücü uzaklaştıktan sonra kalan kısım 2 ml hegzan içerisinde çözülüp, mikrofiltreden süzülerek analiz için hazırlanmıştır. Örnekler yüksek performanslı sıvı kromatografide (HPLC) analizlenmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 (R,S)-1-fenil 1-propanolün kinetik rezolüsyon deney sistemi

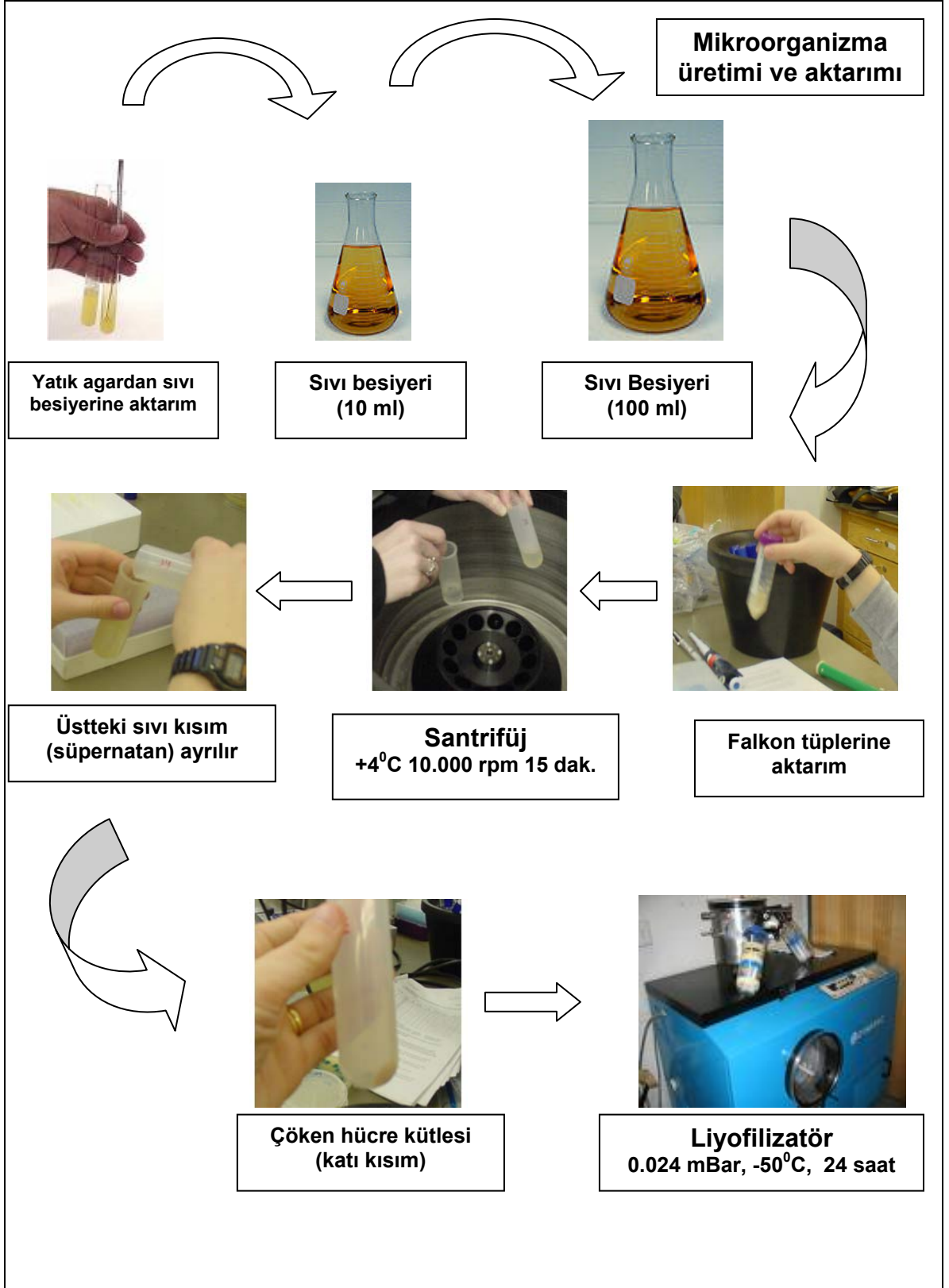
3.2.2 (R,S)-1-fenil 1-propanolün liyofilize mikrobiyal hücreler ile kinetik rezolüsyonu

3.2.2.1 Besiyerinin hazırlanması ve mikroorganizma üretimi

Kinetik rezolüsyon deneylerinin bir kısmında lipaz kaynağı olarak *Candida antarctica* (*Pseudozyma aphidis* DSM 70725) mikroorganizması kullanılmıştır. Bu mikroorganizma basidiomycetes sınıfı içinde yer alan bir maya türüdür. Üretim ortamı olarak DSM' nin mayalar için belirlediği standart besiyeri kullanılmıştır. Besiyeri bileşimi: 3.0 g/L yeast ekstrakt, 3.0 g/L malt ekstrakt, 5.0 g/L kazein pepton, 10.0 g/L glukoz, 15.0 g/L agar ilavesiyle hazırlanmıştır. Yatık agardaki mikroorganizma kültürü öncelikle 100 ml hacmindeki Erlenmayer içerisine hazırlanan 10 ml agar içermeyen sıvı besiyerine ekilmiştir. Ekimi yapılan besiyeri 30 °C sıcaklıkta ve 170 rpm karıştırma hızındaki orbital çalkalayıcıda 3 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. 3 gün sonunda 10 ml besiyeri, steril kabin içerisinde 100 ml sıvı besiyeri içeren 250 ml hacmindeki Erlenmayerlere aktarılmıştır. Aktarma işleminden sonra 100 ml'lik sıvı besiyeri aynı sıcaklık derecesinde ve karıştırma hızında 3 gün süreyle orbital çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.2.2 Liyofilize hücre kütlelerinin elde edilmesi

Candida antarctica (*Pseudozyma aphidis* DSM 70725) mikroorganizması 100 ml sıvı besiyeri içeren 250 ml hacmindeki Erlenmayerler içerisinde üretilmiştir. Mikroorganizma ekimi yapılan besiyeri 30 °C sıcaklıkta ve 170 rpm karıştırma hızındaki çalkalayıcıda 3 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda 100 ml'lik sıvı kültür ortamı falkon tüplerine eşit olarak ayrılmış ve 10.000 rpm'de 15 dakika boyunca +4 °C' de santrifüj edilmiştir. Santrifüj cihazı sıvı kültür içinde süspansiyon halinde bulunan mikroorganizmaların çöktürülmesi amacıyla kullanılmıştır. Santrifüjden sonra üstteki sıvı kısım alttaki katı kısımdan ayrılmıştır. Sıvı ve katı kısım ayrı falkon tüpleri içerisine konarak 0.024 mBar, -50 °C'de yaklaşık 24 saat liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon işlemi sırasında ortamda bulunan su uzaklaştırılmış ve kuru hücre kütlesi elde edilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 *Candida antarctica* liyofilize hücre kütlesinin elde edilmesi

3.2.3 Lipaz aktivitesinin belirlenmesi

Ticari lipazların ve liyofilizasyon işlemi sonrasında elde edilen liyofilize hücre kütesinin ve sıvı kısmın lipaz içeriğini belirlemek için lipaz aktivitesi ölçülmüştür. Lipaz aktivitesi titrasyon yöntemiyle ölçülmüştür. Substrat olarak kullanılan 200 µl tribütrin, 10 ml 1 mM Tris-HCl tamponu (pH=7.2) içerisinde çözüldükten sonra 0,5 mg enzim tampon içerisine eklenmiştir. Tepkime 40 °C'de 150 rpm hızındaki orbital çalkalayıcıda gerçekleştirilmiştir. 10 dakika sonunda enzim, tampon ortamından filtre kağıdı ile ayrılmış ve tepkime sonlandırılmıştır. Tampon içerisine 100 µl fenol fitalein eklendikten sonra 0,1 M NaOH çözeltisiyle titrasyon gerçekleştirilmiştir. Bir ünite (µmol/dakika), dakikada harcanan NaOH (µmol) miktarıdır (Kim *et al.* 2000).

3.2.4 Analiz yöntemi

Tepkime sonrası ürünler, Chiralcel[®] OB-H kiral kolonu kullanılarak Spectra SYSTEM SN4000 HPLC cihazında Çizelge 3.1'de gösterilen koşullarda analizlenmiştir. Analiz sonucunda alıkonma süresinin (S)-1-fenil 1-propanol için 8. dakika, (R)-1-fenil 1-propanol için 10. dakika olduğu saptanmıştır. Ek 3'de örnek kromatogram gösterilmiştir. Analiz sonucu elde edilen kromatogramlardan Eşitlik 1, Eşitlik 2 ve Eşitlik 3 yardımıyla substrat için enantiyomerik aşırılık (ee(S)), enantiyomerik oran (E) ve yüzde dönüşüm (% c) değerleri hesaplanmıştır.

Çizelge 3.1 (R,S)-1-fenil 1-propanolün HPLC analiz koşulları

HPLC	Spectra SYSTEM SN 4000
Kolon	Chiralcel [®] OB-H
Kolon Boyutu	250 x 4,6 mm
Taşıyıcı Faz	n-hegzan/2-propanol (97:3)
Kolon Sıcaklığı	30 °C
Akış Hızı	0,80 ml/dak
Enjeksiyon Hacmi	10 µl
Süre	20 dakika
Dedektör	U.V Dedektör (254 nm)

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

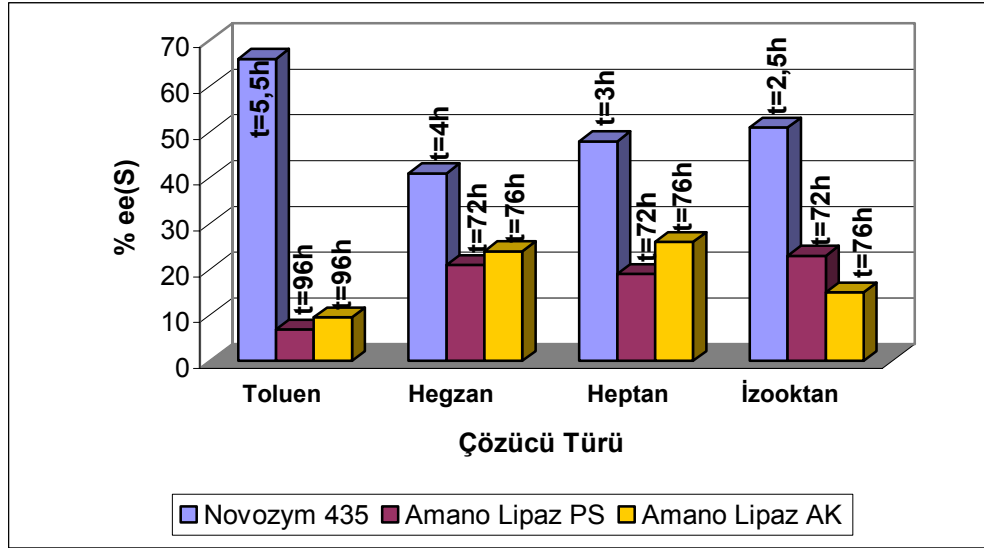
Rasemik 1-fenil 1-propanolün esterleşme tepkimesiyle kinetik rezolüsyonu ilk olarak ticari lipaz enzimleri biyokatalizörlüğünde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma kapsamında enantiyomerik saflıkta 1-fenil 1-propanol üretimine enzim türü, açıl verici ve çözücü türü, açıl verici/alkol mol oranı, moleküler elek miktarı, sıcaklık ve enzim miktarı gibi parametrelerin etkisi araştırılmıştır. Daha sonra biyokatalizör olarak liyofilize *Candida antarctica* (*Pseudozyma aphidis* DSM 70725) hücreleri kullanılarak rasemik 1-fenil 1-propanolün kinetik rezolüsyonu gerçekleştirilmeye çalışılmıştır.

4.1 (R,S)-1-fenil 1-propanolün Lipaz Katalizörlüğünde Kinetik Rezolüsyonu

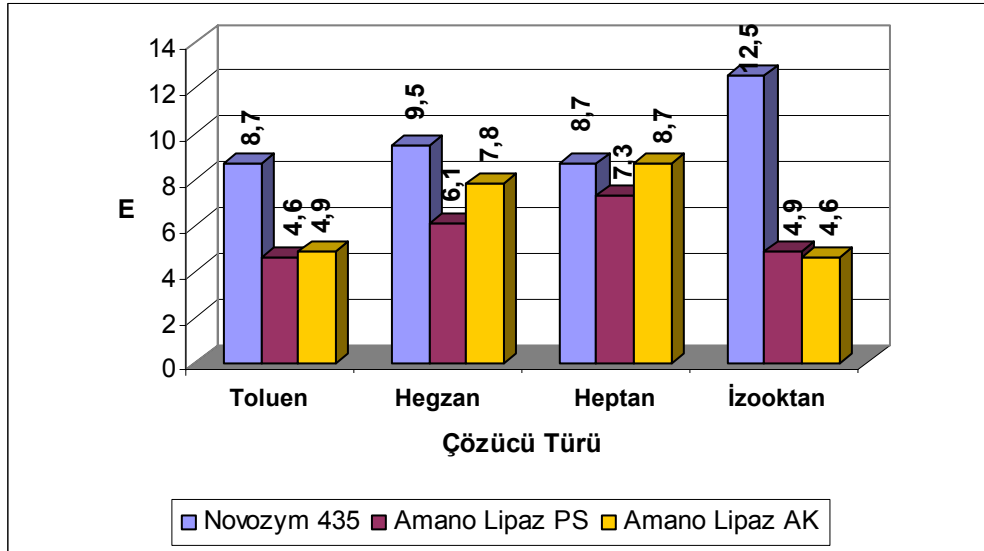
4.1.1 Enzim ve çözücü türü etkisi

Rasemik 1-fenil 1-propanolün enantiyoseçimli esterleşme tepkimesinde enzim ve çözücü türünün etkisini incelemek amacıyla biyokatalizör olarak Novozym 435 (*Candida antarctica* lipaz B), Amano Lipaz AK (*Pseudomonas fluorescens*) ve Amano Lipaz PS (*Pseudomonas cepacia*) olmak üzere üç farklı lipaz denenmiştir. Enzim aktiviteleri Novozym 435 enzimi için 23 U, Amano Lipaz AK için 24 U ve Amano Lipaz PS için 28 U olarak bulunmuştur. Farklı lipazların katalizörlüğündeki tepkimeler toluen, hegzan, heptan ve izooktan gibi organik çözücülerde gerçekleştirilmiştir. Açıl verici olarak kullanılan 1 mmol laurik asit, 3 ml organik çözücüde çözüldükten sonra tepkime ortamına 0,5 mmol (R,S)-1-fenil 1-propanol ve 100 mg moleküler elek eklenmiştir. En son 100 mg enzim eklenerek tepkime başlatılmıştır. Tepkimeler 40 °C'de ve 150 rpm karıştırma hızındaki orbital çalkalayıcılarda gerçekleştirilmiştir.

HPLC analizleri çalışılan her üç enzimin de (R)-1-fenil 1-propanole karşı seçici olduğunu göstermiştir. Tepkime sonunda (R)-1-fenil 1-propanol azalırken, (S)-1-fenil 1-propanol büyük ölçüde değişmeden kalmıştır. Çalışılan enzimler içerisinde en yüksek enantiyomerik aşırılık değerleri (ee) Novozym 435 enzimi ile elde edilmiştir (Şekil 4.1). Bu sonuç Novozym 435 enziminin (R,S)-1-fenil 1-propanolün yüksek enantiyomerik saflıkta elde edilmesinde kullanılabileceğini göstermektedir.



Şekil 4.1 Enzim ve çözücü türünün enantiyomerik aşırılık ve tepkime süresine etkisi (1-fenil 1-propanol=0,5 mmol, laurik asit=1 mmol, enzim=100 mg, çözücü=3 ml, moleküler elek=100 mg, $T = 40^{\circ}\text{C}$ ve $N = 150 \text{ rpm}$)



Şekil 4.2 Enzim ve çözücü türünün enantiyomerik oran (E) değerine etkisi (1-fenil 1-propanol=0,5 mmol, laurik asit=1 mmol, enzim=100 mg, çözücü=3 ml, moleküler elek=100 mg, $T = 40^{\circ}\text{C}$ ve $N = 150 \text{ rpm}$)

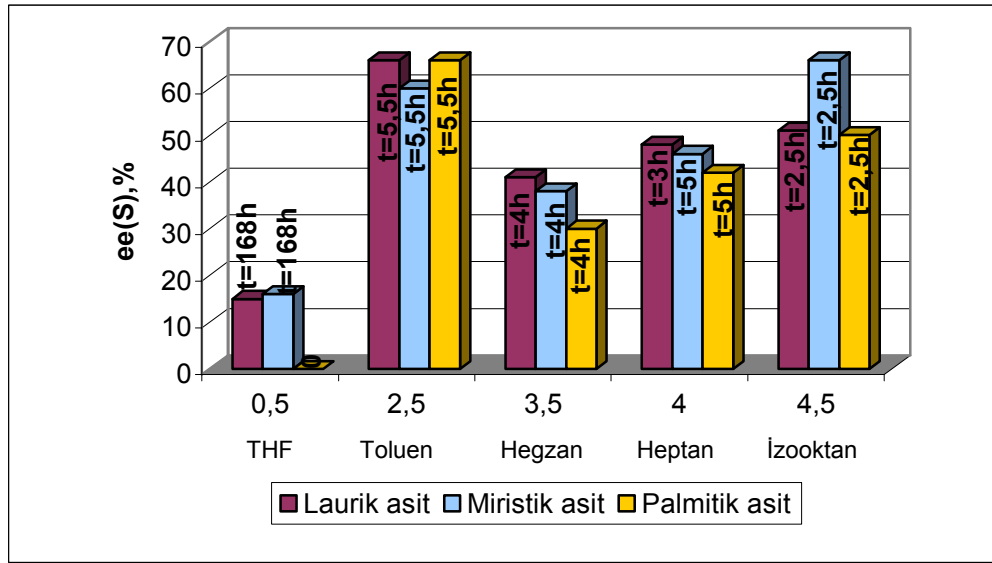
Novozym 435 enzimi ile hemen hemen tüm çözücü türlerinde iyi sonuçlar elde edilmiş olup en yüksek sonuca toluen ile ulaşılmıştır. Çözücü olarak toluenin kullanıldığı tepkimelerde 5,5 saatin sonunda % ee (S) değeri 66, dönüşüm yaklaşık % 51, E değeri 8,7 olarak bulunmuştur. Novozym 435 enzimi katalizörlüğünde diğer çözücüler için hesaplanan substrat için enantiyomerik aşırılık (ee (S)) ve enantiyomerik oran (E) değerleri sırasıyla; hegzan için % 41 ve 9,5, heptan için % 48 ve 8,7, izooktan için % 51 ve 12,5'dir (Şekil 4.2). Novozym 435 enzimi ile tepkimeler çok kısa sürede % 50 dönüşüm değerlerine ulaşmıştır. Ancak Amano Lipaz AK ve Amano Lipaz PS enzimleri ile gerçekleşen tepkimelerde 72-96 saat beklenmesine rağmen % 13 ile % 28 arasında değişen düşük dönüşüm değerleri elde edilmiştir (Ek 4 Çizelge 1).

Amano Lipaz AK ve Amano Lipaz PS enzimleri için hegzan, heptan ve izooktan çözücülerinde birbirine yakın ee (S) değerleri elde edilirken toluen çözücüsünde ee (S) değerleri dikkat çekici şekilde azalmıştır. Toluene çözücüsünde 96 saatlik tepkime süresi sonunda Amano Lipaz AK için % ee (S) değeri 9,5, Amano Lipaz PS için 6,9 olarak bulunmuştur. Bu durum Amano Lipaz AK ve Amano Lipaz PS'nin serbest enzimler olmasından kaynaklanabilir. Toksik bir çözücü olan toluen serbest enzimin fonksiyonel yapısında bozulmaya yol açarak, enzim inaktivasyonuna neden olmuş olabilir. Novozym 435 enzimi ise akrilik reçine tutuklanmış bir enzimdir ve tutuklanmış enzimlerin organik çözücülere karşı daha dayanıklı olduğu bilinmektedir. Enzim tutuklanmasının yüksek kararlılık, yüksek biyokatalitik özgüllük ve geri kullanım kolaylığı gibi önemli avantajlar sağladığı bildirilmektedir (Frings *et al.* 1999). Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, rasemik 1-fenil 1-propanolün transesterleşme tepkimesi ile enantiyomerik saflıkta üretimine enzim türünün etkisinin incelendiği diğer bir çalışmayla örtüşmektedir. Soyer (2007) (R,S)-1-fenil 1-propanolün transesterleşme tepkimesinde açıl verici olarak vinil laurat, çözücü olarak izooktan ve biyokatalizör olarak *Mucor meihei*, Amano Lipaz PS (*Pseudomonas cepacia*), *Pseudomonas stutzeri*, Amano Lipaz AK (*Pseudomonas fluorescens*), Lipozyme RMIM ve Novozym 435 lipazlarını kullanmıştır. 30 dakikalık tepkime süresi sonunda en yüksek ee (S) değeri % 71 ile Novozym 435 enzimi kullanıldığında elde edilmiştir. Amano Lipaz PS (*Pseudomonas cepacia*) için % ee (S) değeri 25, Amano Lipaz AK (*Pseudomonas fluorescens*) lipazı için % ee (S) değeri 9 olarak bulunmuştur.

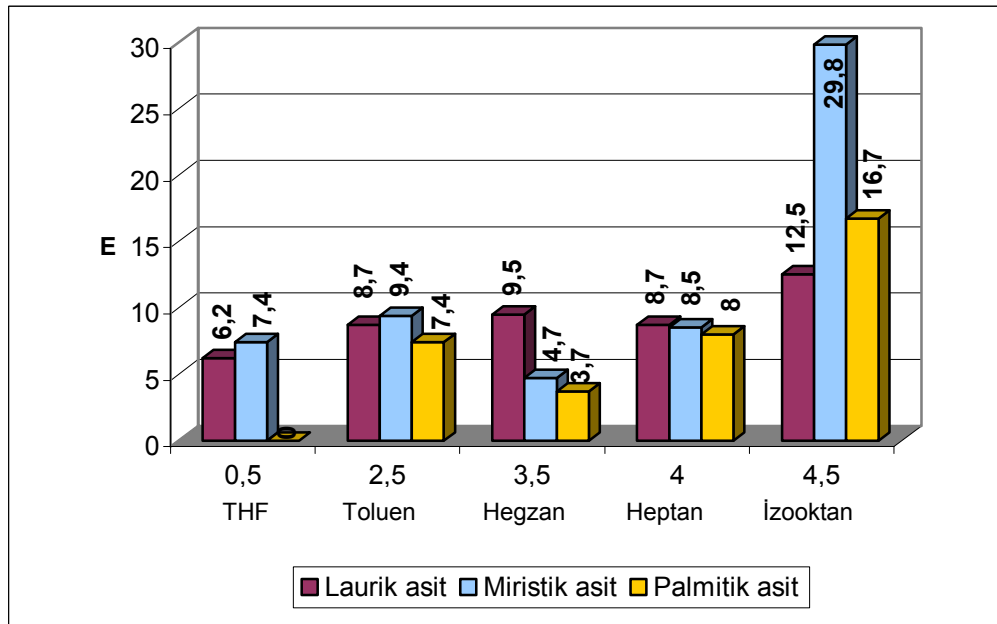
4.1.2 Açıl verici ve çözücü türü etkisi

Novozym 435 enzimi katalizörlüğünde rasemik 1-fenil 1-propanolün esterleşme tepkimesiyle kinetik rezolüsyonuna açıl verici ve çözücü türünün etkisi araştırılmıştır. Çözücü türünün etkisini belirlemek amacıyla izooktan (Log P=4.5), heptan (Log P=4.0), hegzan (Log P=3.5), toluen (Log P=2.5) ve THF (Log P=0.5) olmak üzere beş farklı çözücü ile deneyler gerçekleştirilmiştir. Tepkimelerde açıl verici türü etkisi incelenirken doymuş yağ asitleri laurik asit (12 C), miristik asit (14 C) ve palmitik asit (16 C) kullanılmıştır. Deneylerde 1 mmol açıl verici, 3 ml organik çözücü içinde çözüldükten sonra tepkime ortamına sırasıyla 0,5 mmol (R,S)-1-fenil 1-propanol, 100 mg moleküler elek ve 100 mg enzim eklenmiştir. Tepkimeler 40 °C'de ve 150 rpm karıştırma hızındaki orbital çalkalayıcılarda gerçekleştirilmiştir.

Çözücü hidrofobikliği Log P değeri ile karakterize edilmektedir. Log P değeri oktanol-su çift fazlı sisteminde çözücünün dağılma katsayısının logaritmasını ifade eder. Laane *et al.* (1987) çözücülerin Log P değerlerinin sınıflandırmasını şu şekilde yapmıştır; Log P < 2 olan çözücüler polar (hidrofilik) çözücülerdir ve polar çözücüler biyokatalitik sistemler için uygun değildir. Log P > 4 olan çözücüler, apolar (hidrofobik) çözücülerdir ve biyokatalizör için uygundur. Hidrofilik çözücüler enzim için gerekli suyu uzaklaştırmak ya da enzimin fonksiyonel yapısını parçalamak suretiyle enzimi deaktive edebilirler. Bunun nedeni suyun enzime bağlanmaktansa hidrofilik çözücülere ilgisinin daha fazla olmasıdır (Suan and Sarmidi 2004). Genellikle lipazların aktiviteleri hidrofobik çözücülerde daha yüksek olmasına rağmen bazı hidrofobik çözücüler enzim aktivitesi için gerekli olan enzim yüzeyindeki suyu çekmelerinden dolayı inhibisyon etkiside yaratabilirler (Frings *et al.* 1999). Log P değeri 2-4 arasında değişen organik çözücüler enzim yapısında zayıf bozulmalara neden olabilir ve bu tür çözücülerde enzim aktivitesini önceden tahmin etmek mümkün değildir (Krishna and Karanth 2002). Elde edilen deneysel sonuçlar literatürü destekler niteliktedir. Toluene dışındaki çözücülerde çözücü hidrofobikliğinin göstergesi olan Log P değerinin artmasıyla enantiyomerik aşırılık değerinde (ee (S)) artış gözlenmiştir (Şekil 4.3). Organik çözücüler içerisinde daha hidrofilik olan THF çözücüsünde (Log P=0.5) en düşük ee (S) değerleri elde edilmiştir. Enantiyomerik oran değerleri Şekil 4.4'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3 Açıl verici ve çözücü türünün enantiyomerik aşırılık ve tepkime süresine etkisi (1-fenil 1-propanol=0,5 mmol, açıl verici= 1 mmol, çözücü=3 ml, Novozym 435=100 mg, moleküler elek=100 mg, T= 40 °C ve N=150 rpm)



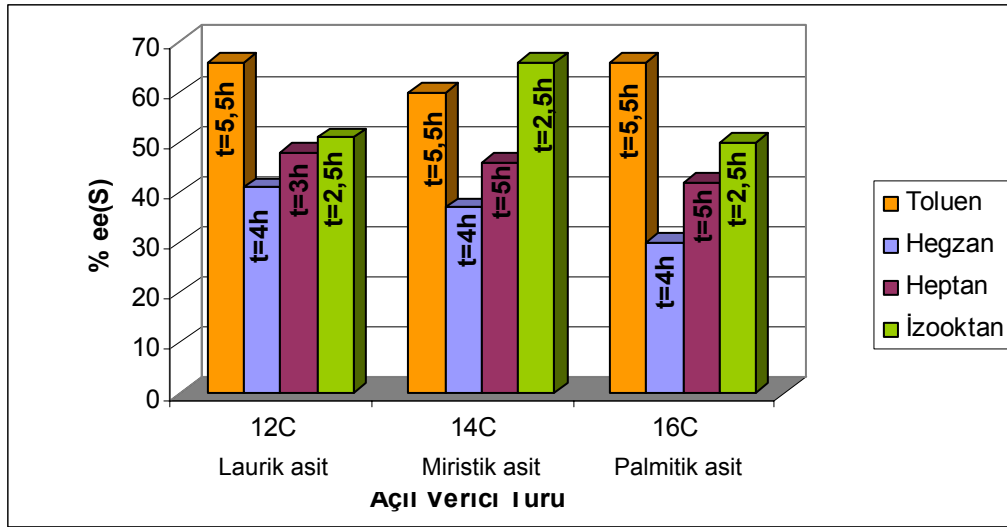
Şekil 4.4 Açıl verici ve çözücü türünün enantiyomerik oran (E) değerine etkisi (1-fenil 1-propanol=0,5 mmol, açıl verici= 1 mmol, çözücü=3 ml, Novozym 435=100 mg, moleküler elek=100 mg, T= 40 °C ve N=150 rpm)

THF'in kullanıldığı tepkimeler yaklaşık 7 gün sürmüş ve dönüşüm değerleri yaklaşık % 18'de kalmıştır (Ek 5 Çizelge 1). THF çözücüsünde laurik asit için % ee (S) 15, miristik asit için % ee (S) 16 olarak bulunmuştur. Bu durum hidrofilik bir çözücü olan THF'in enzimin konformasyonel esnekliğini koruyan bağlı suyu çekerek enzimin katalitik aktivitesini azaltmasıyla açıklanabilir. Toluene (Log P=2.5) çözücüsü tüm çözücü türleri içinde en yüksek sonuçları vermiştir. Toluenin kullanıldığı tepkimelerde 5,5 saat sonunda, % ee (S) değerleri laurik asit için 66, miristik asit için 60, palmitik asit için 66 olarak bulunmuştur. Literatürde toluene çözücüsünde enzim aktivitesinin belirgin şekilde düştüğü çalışmalara rastlandığı gibi (Suan and Sarmidi 2004), toluene çözücüsünde yüksek enantiyomerik aşırılık değerinin elde edildiği çalışmalara da rastlamak (Cernia *et al.* 1998) mümkündür. Bu farklılığın kullanılan substratların ve açıl vericilerin farklılığından kaynaklandığı düşünülebilir. Toluen ile iyi sonuçlar elde edilmesinin nedeni çözücü polaritesi yerine toluenin moleküler yapısıyla açıklanabilir. Substratın yapısındaki (1-fenil 1-propanol) fenil grubu toluenin yapısında da mevcuttur. Bu durum toluenin substratın tepkime ortamında dağılımını etkileyerek enzimin aktif bölgesiyle etkileşimini hızlandırdığı şeklinde düşünülebilir. Hegzan, heptan ve izooktan gibi çözücüler ise düz zincirli hidrokarbon çözücülerdir.

Toluenden sonra en iyi sonuçlar ise hidrofobikliği en yüksek olan izooktan ile elde edilmiştir. İzooktanın kullanıldığı tepkimelerde % ee (S) değerleri laurik asit için 51, miristik asit için 66, palmitik asit için 50 olarak hesaplanmıştır. İzooktanlı tepkimeler yaklaşık 2,5 saat sürmüştür. İzooktan çözücüsü (Log P=4.5) hidrofobik bir çözücü olduğundan enzim aktivitesi ve buna bağlı olarak enantiyomerik aşırılık değerinde artış beklenen bir durumdur. En yüksek enantiyomerik oran (E) değerleri izooktan için hesaplanmıştır (Şekil 4.4). İzooktan çözücüsünün kullanıldığı tepkimelerde E değerleri; laurik asit için 12,5, miristik asit için 29,8, palmitik asit için 16,7 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar rasemik 1-fenil 1-propanolün transesterleşme tepkimesi ile enantiyomerik saflıkta üretimine çözücü türünün etkisinin incelendiği diğer iki çalışma (İşbakan 2006, Soyer 2007) ile örtüşmektedir. Soyer (2007) rasemik 1-fenil 1-propanolün transesterleşme tepkimesini Novozym 435 enzimi katalizörlüğünde açıl verici olarak vinil laurat, çözücü olarak THF, toluene, hegzan, heptan ve izooktan kullanarak gerçekleştirmiştir. Polar bir çözücüsü olan THF ile 4 saatlik tepkime sonunda % 15 ee (S) değerinin üzerine çıkılamamıştır.

En yüksek ee(S) değeri % 71 ile izooktan ile elde edilirken toluen ile 4 saatlik tepkime sonunda % 70 ee (S) değeri elde edilmiştir. İşbakan (2006) rasemik 1-fenil 1-propanolün transesterleşme tepkimesiyle kinetik rezolüsyonunu Porcine Pancreatic lipaz katalizörlüğünde gerçekleştirmiştir. 5 farklı çözücü türünün denendiği çalışmada en düşük değerlere çözücü olarak THF'in kullanılmasıyla ulaşılmıştır. En iyi sonuçlara çözücü olarak izooktan, açıl verici olarak vinil bütirat kullanıldığı durumda; % 48 ee (S) ve 9,4 E değeri ile ulaşılmıştır.

Açıl verici türünün etkisi Novozym 435 lipazı katalizörlüğünde laurik asit (12C), miristik asit (14C) ve palmitik asit (16C) olmak üzere üç farklı yağ asidi kullanılarak incelenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda açıl verici karbon sayısı ile tepkimenin enantiyomerik aşırılık değeri ve enantiyomerik oran (E) değeri arasında bir bağlantı olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.5). Ancak literatürde açıl vericinin karbon sayısının artmasıyla enantiyoseçimliliğin arttığını gösteren çalışmalara rastlanmıştır (İrimescu *et al.* 2004, Suan and Sarmidi 2004).



Şekil 4.5 Açıl verici karbon sayısının enantiyomerik aşırılığa etkisi (1-fenil 1-propanol=0,5 mmol, açıl verici= 1 mmol, çözücü=3 ml, Novozym 435=100 mg, moleküler elek=100 mg, T= 40 °C ve N=150 rpm)

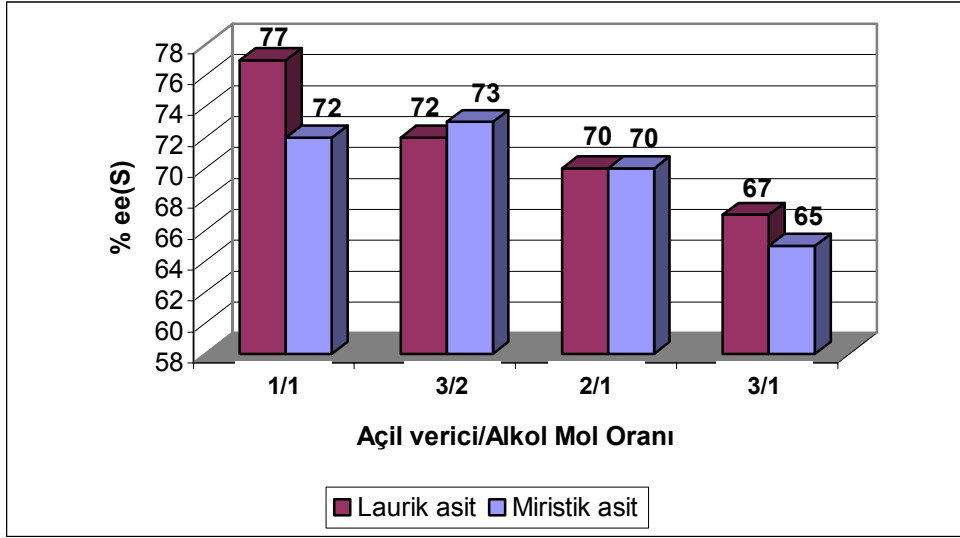
İrimescu *et al.* (2004) rasemik 2-metoksi-2-feniletanol'ün CALB katalizörlüğündeki esterleşme tepkimesinde açıl verici olarak asit türlerinin etkisi incelenmiştir. Enantiyomerik oran (E) hegzanoik asitten dekanıik asite doğru zincir uzunluğunun artmasıyla belirgin şekilde artmıştır. Suan and Sarmidi (2004) (R,S)- 1-fenil etanolün lipaz katalizli esterleşme tepkimesinde enzim aktivitesi ve enantioseçimlilik üzerine açıl vericinin zincir uzunluğunun etkisini incelemiş ve karbon sayısı 12-18 arasında değişen farklı yağ asitleriyle çalışmışlardır. Enzim aktivitesinin 12 C'dan 16 C'a doğru arttığı ancak 18 C'da % 3-4'lük azalma olduğu gözlenmiştir.

Bu çalışmada ise ee (S) değerleri bakımından incelenen açıl verici türleri arasında büyük farklar olmadığı görülmüştür. Ancak genellikle en iyi sonuçlara açıl verici olarak laurik asitin (12C) kullanılmasıyla ulaşılmıştır. Açıl verici olarak laurik asit kullanıldığında % ee (S) değeri THF için 15, toluen için 66, hegzan için 41, heptan için 48, izooktan için 51 olarak bulunmuştur. Bunun nedeni literatürde belirtildiği gibi uzun açıl zincirli yağ asitlerinin enzimin serbest hareketini engellemiş olması (Suan and Sarmidi 2004) yada katı partiküller şeklinde bulunan yağ asitlerinin organik çözücüde çözünmesinin güç olmasından dolayı enzim aktif merkezine diffüzyonu engellenmiş olabilir. Diğer taraftan çözücü olarak izooktan, açıl verici olarak miristik asitin kullanıldığı deneylerde 2,5 saatlik tepkime sonunda % ee (S) 66, E değeri 29,8 olarak bulunmuştur. Deneyler sırasında palmitik asitin oda sıcaklığında donması nedeniyle tepkime sonlandırmada ve HPLC analizlerinde zorluklar yaşanmıştır. Bundan dolayı palmitik asitin tepkimelerde kullanımı oldukça zordur. Çalışmalarda çözücü içerisinde daha iyi çözünen ve iyi sonuçlar veren laurik asitin kullanılması uygundur.

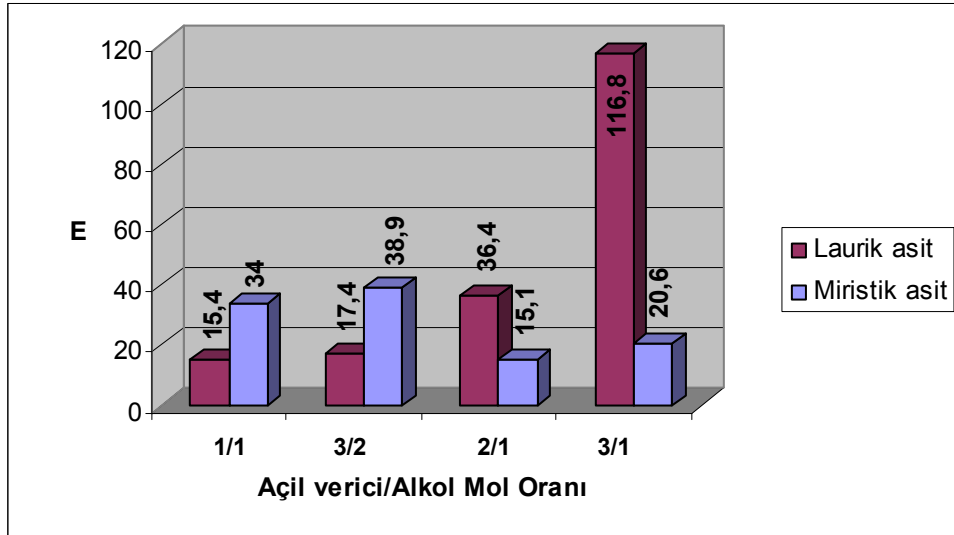
4.1.3 Açıl verici/alkol mol oranı etkisi

(R,S)-1-fenil 1-propanolün esterleşme tepkimesi ile kinetik rezolüsyonuna açıl verici/alkol mol oranı etkisinin incelemesi amacıyla; 1/1, 3/2, 2/1 ve 3/1 mol oranları denenmiştir. Deneylerde alkol oranı sabit tutulurken açıl verici miktarı artırılmıştır. Çalışmalar sırasında açıl verici olarak laurik asit ve miristik asit, organik çözücü olarak toluen ve izooktan kullanılmıştır. 0,5 mmol (R,S)-1-fenil 1-propanol ve sırasıyla 0,5, 0,75, 1 ve 1,5 mmol açıl verici, 3 ml çözücüde çözüldükten sonra 200 mg moleküler elek ve 100 mg Novozym 435 enzimi eklenerek tepkimeler 150 rpm ve 40 °C'de başlatılmıştır.

Açıl verici/alkol mol oranının etkisinin incelendiği çalışmalarda en yüksek % ee (S) değerine çözücü olarak toluen kullanıldığında 1/1 mol oranında ulaşılrken (Şekil 4.6), en yüksek enantiyomerik oran (E) değerine 3/1 mol oranında ulaşılmıştır (Şekil 4.7).



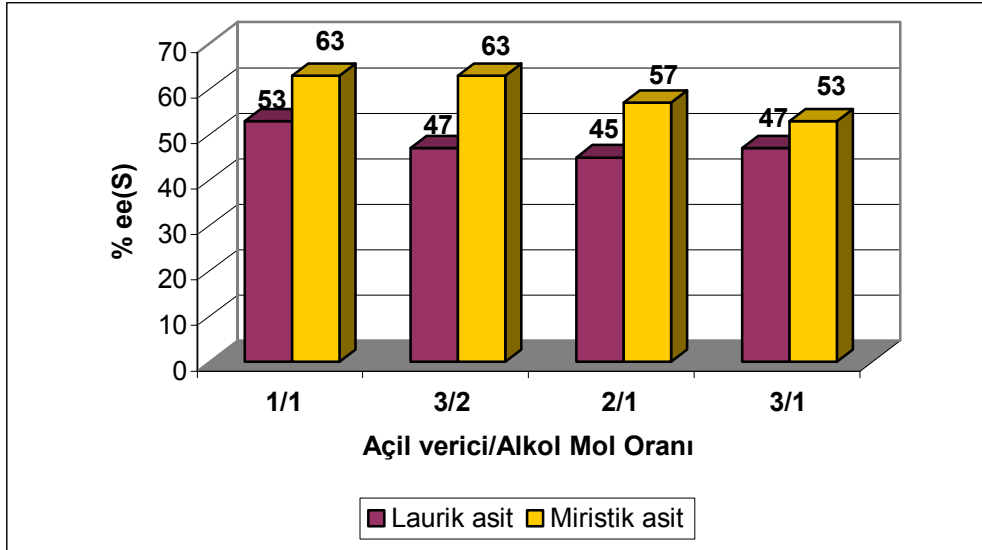
Şekil 4.6 Toluene çözücüsünde açıl verici/alkol mol oranının enantiyomerik aşırılığa etkisi (Tepkime süresi=3 h, 1-fenil 1-propanol=0,5 mmol, toluen=3 ml, Novozym 435=100 mg, moleküler elek=200 mg, T= 40 °C ve N=150 rpm)



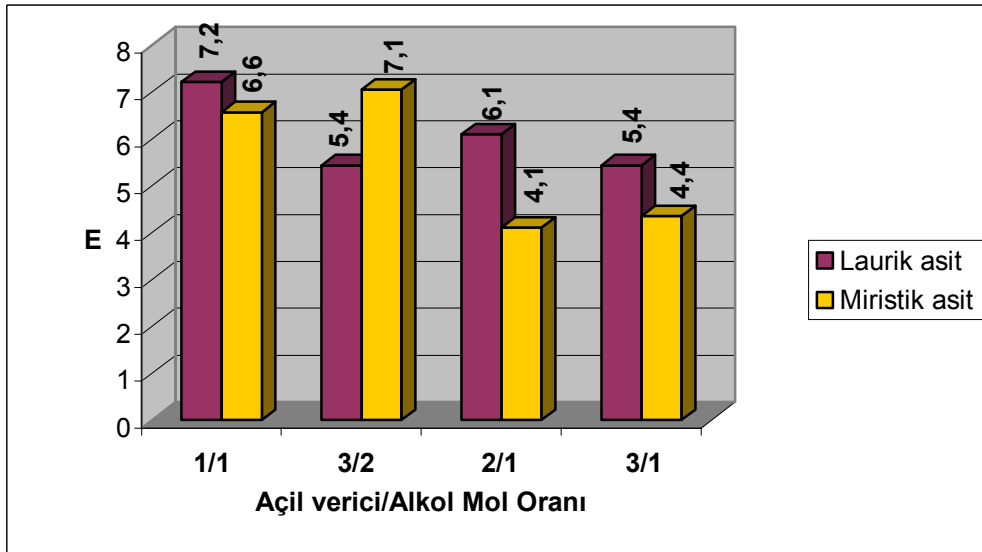
Şekil 4.7 Toluene çözücüsünde açıl verici/alkol mol oranının enantiyomerik orana (E) etkisi (Tepkime süresi=3 h, 1-fenil 1-propanol=0,5 mmol, toluen=3 ml, Novozym 435=100 mg, moleküler elek=200 mg, T= 40 °C ve N=150 rpm)

Ong *et al.* (2006) rasemik ketoprofenin *Candida antarctica* lipaz B (CAL B) katalizörlüğünde gerçekleşen enantiyoseçimli esterleşme tepkimesine asit/alkol mol oranının etkisini araştırmıştır. Rasemik ketoprofenin derişimi sabit tutulurken, açil verici olarak kullanılan n-bütanol miktarı değişkenlik göstermiştir. En yüksek dönüşüm değeri 1/1 mol oranında elde edilmiştir. Mol oranı 5/1'den 1/1'e azaldığında dönüşüm % 28,3'den % 72,9'a yükselmiştir. Alkol tarafından meydana getirilen substrat inhibisyon etkisi dikkat çekici olmuştur. Literatürdeki bu çalışmayı destekler şekilde açil verici/alkol mol oranı azaldıkça ee (S) değerlerinde kademeli bir artış gözlenmiştir. Toluene çözücüsünde mol oranı 3/1'den 1/1'e azaldığında laurik asit için % ee (S) değeri 67'den 77'e yükselmiştir. Toluene çözücüsünde mol oranının azalmasıyla benzer bir artış miristik asit için de gözlenmiştir. Toluene kullanıldığı tepkimeler 3 saat sürmüş ve yaklaşık olarak % 50 dönüşüm gözlendiğinde tepkimeler durdurulmuştur (Ek 6 Çizelge 1 ve 2). En çarpıcı sonuçlar ise enantiyomerik oran (E) değerlerinde gözlenmiştir. En yüksek enantiyomerik oran değerine 3/1 mol oranında, çözücü olarak toluene, açil verici olarak laurik asitin kullanıldığı durumda; % 41 dönüşümde, % 67 ee (S) değeri ve 116,8 E ile ulaşılmıştır (Şekil 4.7). Bu sonucun bulunmasında düşük dönüşüm değerinde yüksek enantiyomerik aşırılık değeri etkili olmuştur. Fazla miktarda açil verici kullanımı ile enzim aktif merkezinde açil vericinin tükenmesi önlenemez. Ancak eğer kütle aktarım kısıtlamaları mevcut ise bu artış içe difüzyonu azaltacaktır. Açil verici miktarındaki artış tersinir bir tepkimenin ürünler yönüne kaymasını sağlayacak ve ürün verimi artacaktır. Bakker *et al.* (2000) sekonder alkollerin yavaş hareket eden girdiler olduğunu bu nedenle tersinmez tepkimelerin etkili kinetik rezolüsyon için ön koşul olduğunu belirtmiştir. Daha sonraki deneysel çalışmalarda 2/1 mol oranı esas alınmış alınmıştır.

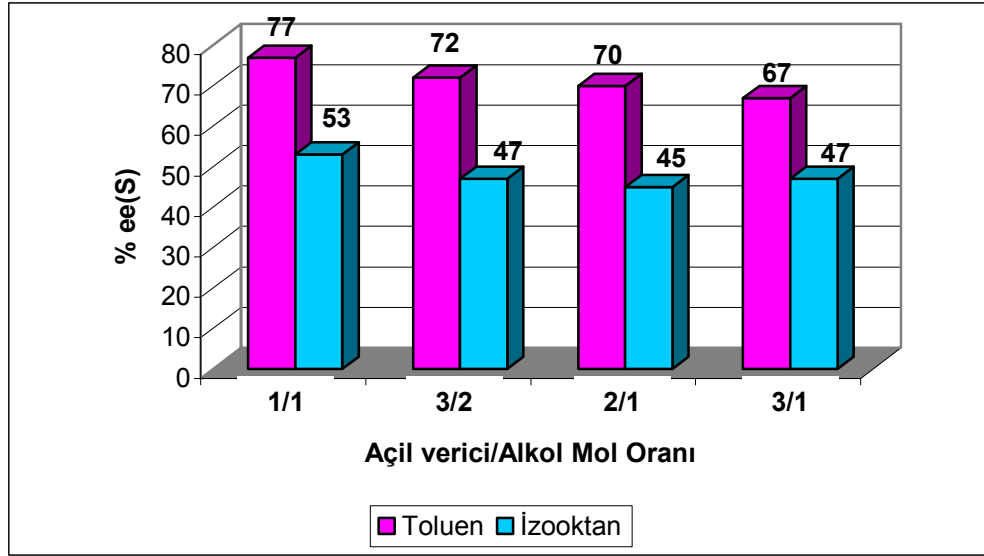
Açil verici/alkol mol oranı etkisi incelenirken kullanılan diğer bir çözücüde izooktandır. İzooktanlı tepkimeler yaklaşık 1-1,5 saat sürmüştür. İzooktanlı deneylerde en yüksek sonuçlara laurik asit için; 1/1 mol oranında % ee (S) 53 ve E değeri 7,2, miristik asit için; 1/1 mol oranında % ee (S) 63 ve E değeri 6,6 ile ulaşılmıştır (Şekil 4.8, Şekil 4.9). İzooktanlı tepkimelerde elde edilen ee (S) değerleri toluenden daha düşük olmasına rağmen dikkat çekici olan her iki çözücü ve açil verici türü içinde mol oranının azalmasıyla ee (S) değerinin artmasıdır (Şekil 4.10, Şekil 4.11).



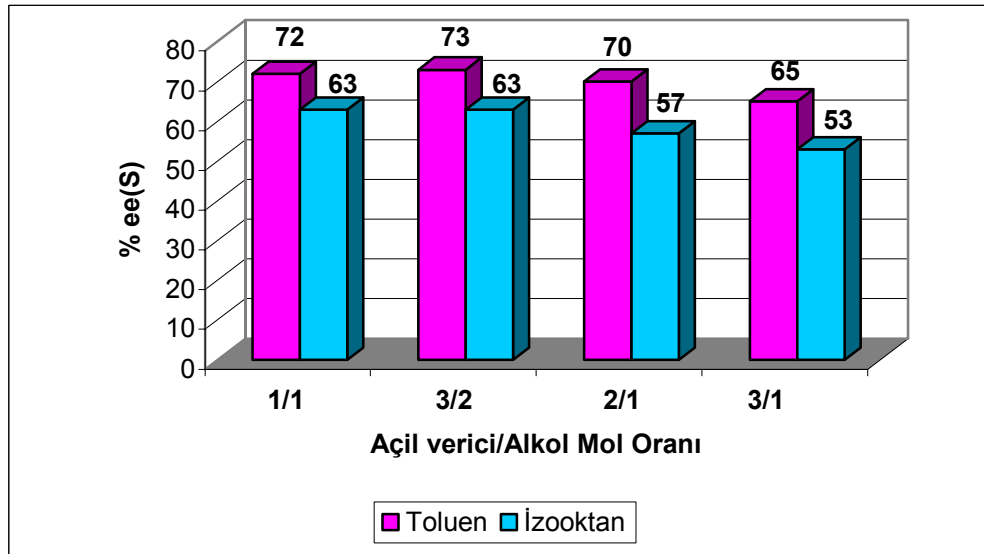
Şekil 4.8 İzooktan çözücüsünde açıl verici/alkol mol oranının enantiyomerik aşırılığa etkisi (Tepkime süresi=1,5 h, 1-fenil 1-propanol=0,5 mmol, izooktan=3 ml, Novozym 435=100 mg, moleküler elek=200 mg, T= 40 °C ve N=150 rpm)



Şekil 4.9 İzooktan çözücüsünde açıl verici/alkol mol oranının enantiyomerik orana (E) etkisi (Tepkime süresi=1,5 h, 1-fenil 1-propanol=0,5 mmol, izooktan=3 ml, Novozym 435=100 mg, moleküler elek=200 mg, T= 40 °C ve N=150 rpm)



Şekil 4.10 Açıl verici olarak laurik asitin kullanıldığı tepkimelerde açıl verici/alkol mol oranının enantiyomerik aşırılığa etkisi (1-fenil 1-propanol=0,5 mmol, çözücü=3ml, Novozym 435=100 mg, moleküler elek=200 mg, T= 40 °C ve N=150 rpm)



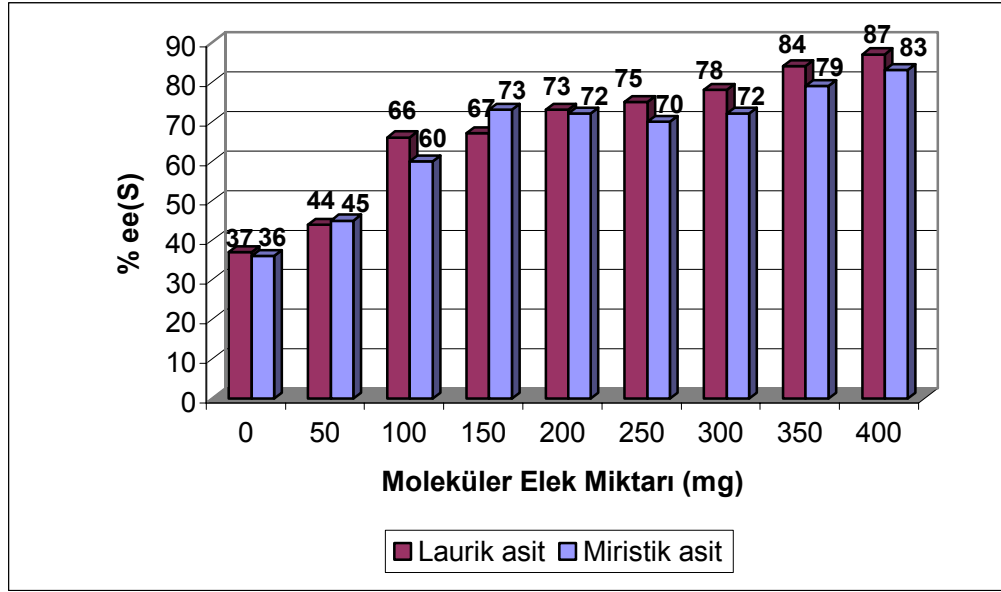
Şekil 4.11 Açıl verici olarak miristik asitin kullanıldığı tepkimelerde açıl verici/alkol mol oranının enantiyomerik aşırılığa etkisi (1-fenil 1-propanol=0,5 mmol, çözücü=3ml, Novozym 435=100 mg, moleküler elek=200 mg, T= 40 °C ve N=150 rpm)

4.1.4 Moleküler elek miktarı etkisi

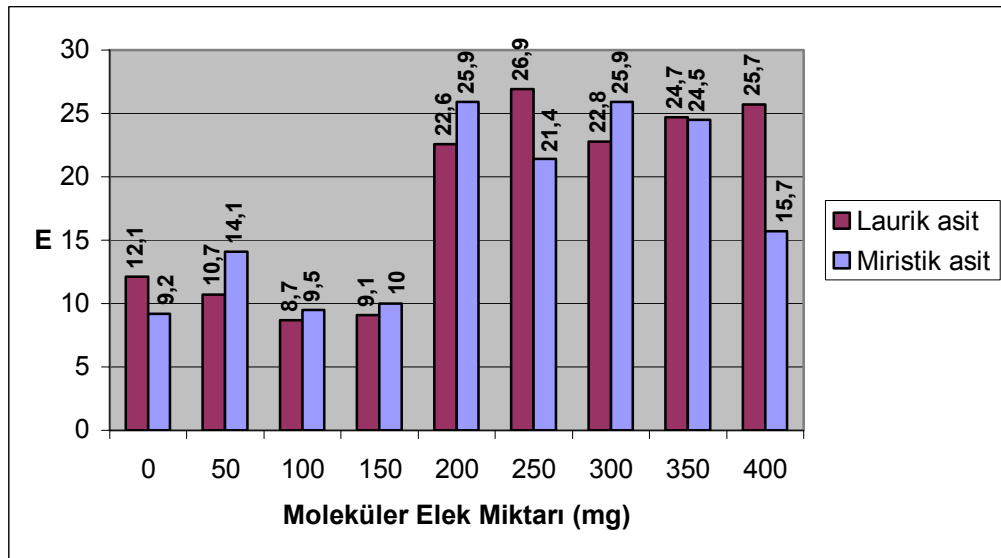
Moleküler elek miktarı etkisinin incelenmesi amacıyla tepkime ortamına 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 ve 400 mg moleküler elek eklenmiştir. Açıl verici olarak laurik asit ve miristik asit, organik çözücü olarak toluen ve izooktan kullanılmıştır. Açıl verici/alkol mol oranı olarak 2/1 oranı esas alınmış ve tepkime ortamına 1 mmol açıl verici ile 0,5 mmol (R,S)-1-fenil 1-propanol eklenmiştir. 100 mg Novozym 435 eklenerek tepkime başlatılmıştır. Tepkimeler 40 °C’de ve 150 rpm karıştırma hızındaki çalkalayıcılarda gerçekleştirilmiştir.

Moleküler eleğin tepkime ortamına eklenme nedeni esterleşme tepkimesi sonucu oluşan suyun ortamdaki uzaklaştırmaktır. Suyun ortamdaki uzaklaştırılmasıyla tepkime ürünler yönüne doğru kayar. Moleküler eleğin ortamdaki suyu uzaklaştırmanın yanında enzim davranışını etkilediğine dair çalışmalar literatürde mevcuttur. Zeolit moleküler elekler kation değiştirme yeteneklerinden dolayı enzimler üzerinde dramatik şekilde asit-baz etkisine sahiptirler. Tüm zeolitler Na^+ ve K^+ gibi kasyonları H^+ ile değiştirebilirler. Bu değişim protein üzerindeki asidik grupların protonlanma durumunu etkilemekte ve bu da enzim aktivitesini etkilemektedir (Fontes *et al.* 2002).

Toluen çözücünde moleküler elek miktarının enantiyomerik aşırılık ve enantiyomerik oran değerlerine etkisi Şekil 4.12 ve Şekil 4.13’de gösterilmiştir. Toluenin çözücü olarak kullanıldığı tepkimelerde moleküler elek miktarının artmasıyla, enantiyomerik aşırılık değerlerinde (ee (S)) artış gözlenmiştir. Moleküler elek miktarının 0’dan 400 mg’a artmasıyla % ee (S) değerleri; laurik asit için 37’den 87’ye, miristik asit için 36’dan 83’e yükselmiştir. Toluen çözücüsü için en iyi sonuçlara 400 mg moleküler elek kullanıldığı durumda ulaşılmıştır. 400 mg moleküler elek kullanıldığında laurik asit ile % 52 dönüşümde, % 87 ee (S) ve 25,7 E değeri (Ek 7 Çizelge 1), miristik asit ile % 54 dönüşümde, % 83 ee (S) ve 15,7 E değeri (Ek 7 Çizelge 2) elde edilmiştir. Toluen çözücüsünde moleküler elek miktarının artması tepkime hızını etkilemiş ve tepkime süresinde azalmaya neden olmuştur.

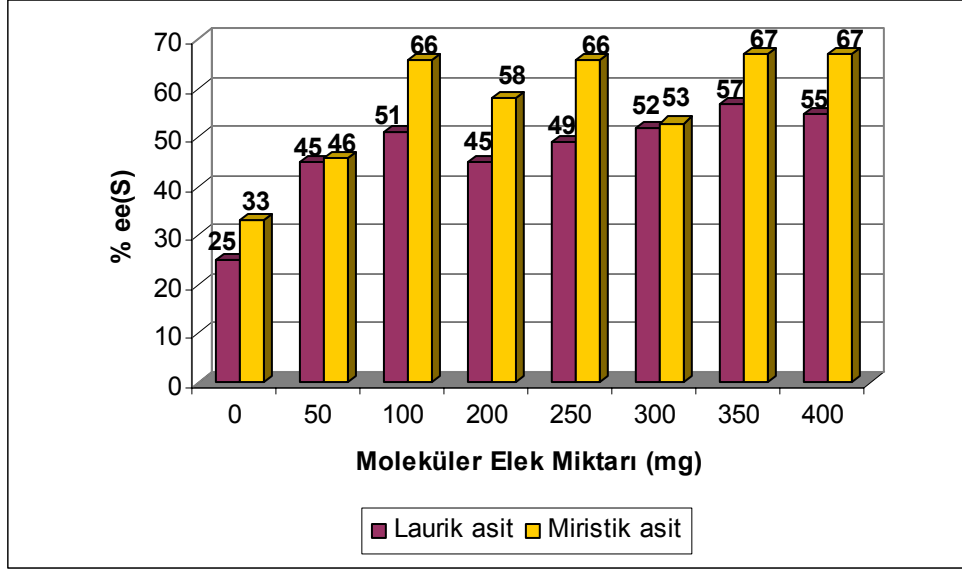


Şekil 4.12 Toluen çözücüsünde moleküler elek miktarının enantiyomerik aşırılığa etkisi (1-fenil 1-propanol=0,5 mmol, açil verici= 1 mmol, toluen= 3 ml, Novozym 435=100 mg, T= 40 °C ve N= 150 rpm)

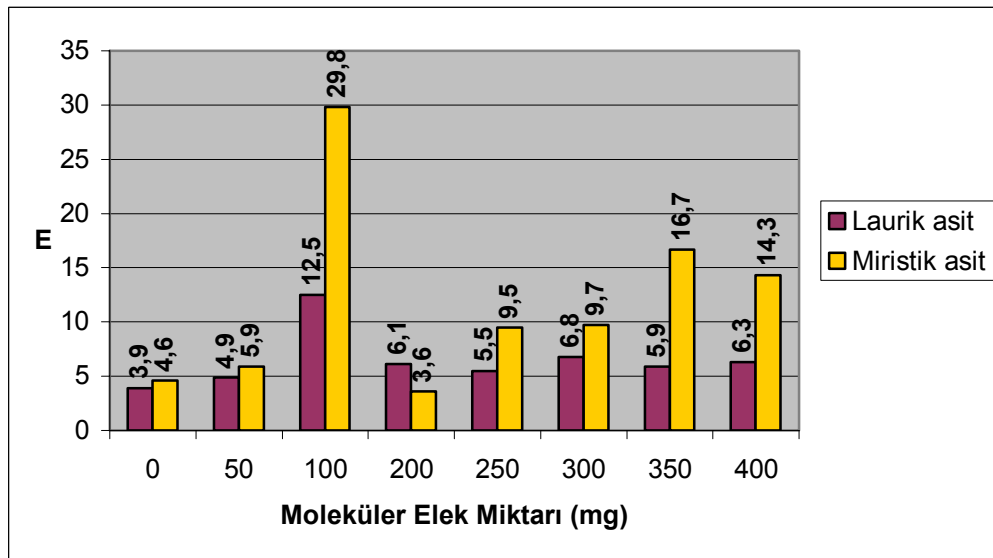


Şekil 4.13 Toluen çözücüsünde moleküler elek miktarının enantiyomerik orana (E) etkisi (1-fenil 1-propanol=0,5 mmol, açil verici=1 mmol, toluen=3 ml, Novozym 435=100 mg, T= 40 °C ve N= 150 rpm)

İzooktan çözücünde moleküler elek miktarının enantiyomerik aşırılığa (ee (S)) etkisi Şekil 4.14'de, enantiyomerik orana (E) etkisi Şekil 4.15'de gösterilmiştir. Çözücü olarak izooktanın kullanıldığı tepkimelerde moleküler eleksiz tepkimelerde enantiyomerik aşırılık değeri ve dönüşüm değeri oldukça düşük olduğu görülmektedir (Ek Çizelge 3 ve 4).



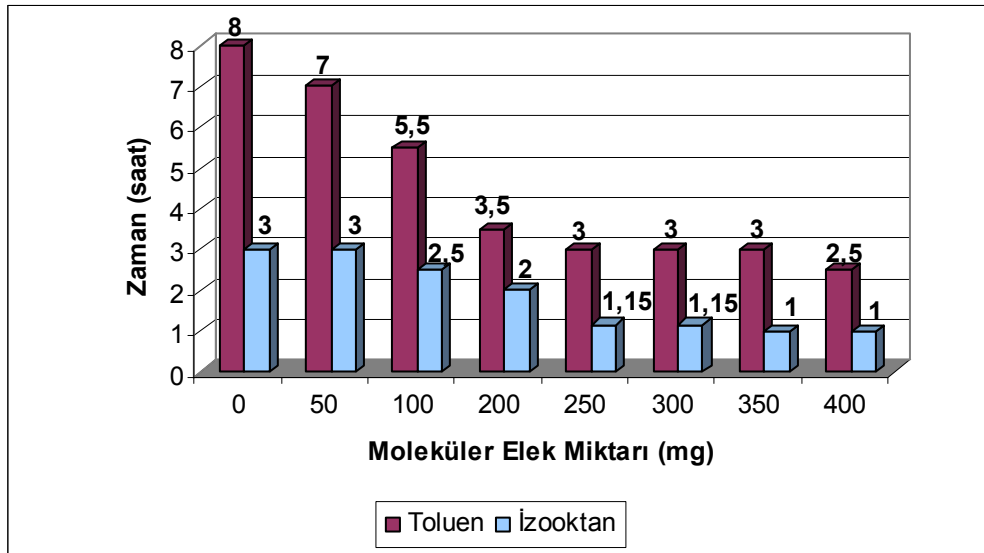
Şekil 4.14 İzooktan çözücüsünde moleküler elek miktarının enantiyomerik aşırılığa etkisi (1-fenil 1-propanol=0,5 mmol, açıl verici= 1 mmol, izooktan= 3 ml, Novozym 435=100 mg, $T= 40^{\circ}C$ ve $N= 150$ rpm)



Şekil 4.15 İzooktan çözücüsünde moleküler elek miktarının enantiyomerik orana (E) etkisi (1-fenil 1- propanol=0,5 mmol, açıl verici= 1 mmol, izooktan= 3 ml, Novozym 435=100 mg, $T= 40^{\circ}C$ ve $N= 150$ rpm)

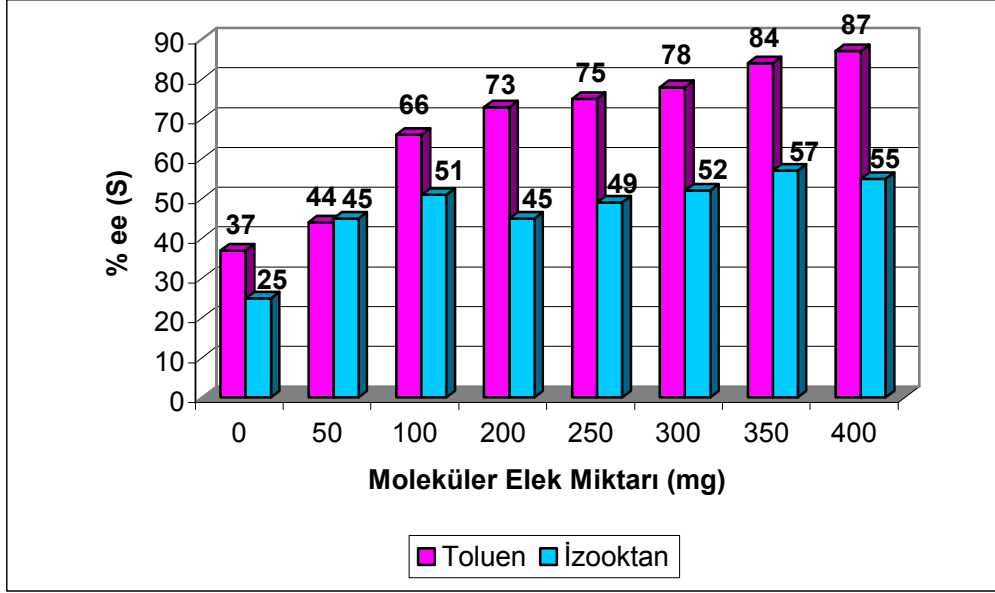
İzooktanın kullanıldığı tepkimelerde ortamda moleküler elek olmadığı durumda; laurik asit için % 33 dönüşümde, % ee (S) değeri 25, miristik asit için ise % 38 dönüşümde, % ee (S) değeri 33 olarak hesaplanmıştır. Ancak 100 mg'ın üzerindeki moleküler elek miktarlarında ee (S) değerlerinde büyük bir artış gözlenmemiştir. Ancak moleküler eleğin tepkime ortamına eklenmesi tepkime verimini arttırmada yararlı olmuştur. İzooktan çözücüsünde en yüksek enantiyomerik oran (E) değeri, 100 mg moleküler elek kullanıldığında elde edilmiştir. Laurik asit için E değeri 12,5, ee (S) % 51; miristik asit için E değeri 29,8, ee (S) % 66 olarak hesaplanmıştır.

Moleküler elek miktarındaki artış tepkime süresinde çarpıcı şekilde azalmaya neden olmuştur. Toluen çözücüsünde 0 mg moleküler elek kullanıldığında tepkime süresi 8 saat iken, 400 mg moleküler elek kullanıldığında süre 2,5 saate düşmüştür. İzooktan çözücüsünde ise 0'dan 400 mg'a moleküler elek artışıyla tepkime süresi 3 saatten 1 saate kadar düşmüştür. Moleküler elek suyu tutarak, tepkimenin ürünler yönüne kaymasını sağlamış ve tepkimeyi hızlandırmıştır. Moleküler elek miktarının tepkime süresine etkisi Şekil 4.16'de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar moleküler elek miktarının lipaz katalizli enantiyoseçimli esterleşme tepkimeleri üzerinde önemli etkilere sahip olduğunu açıkça göstermektedir.

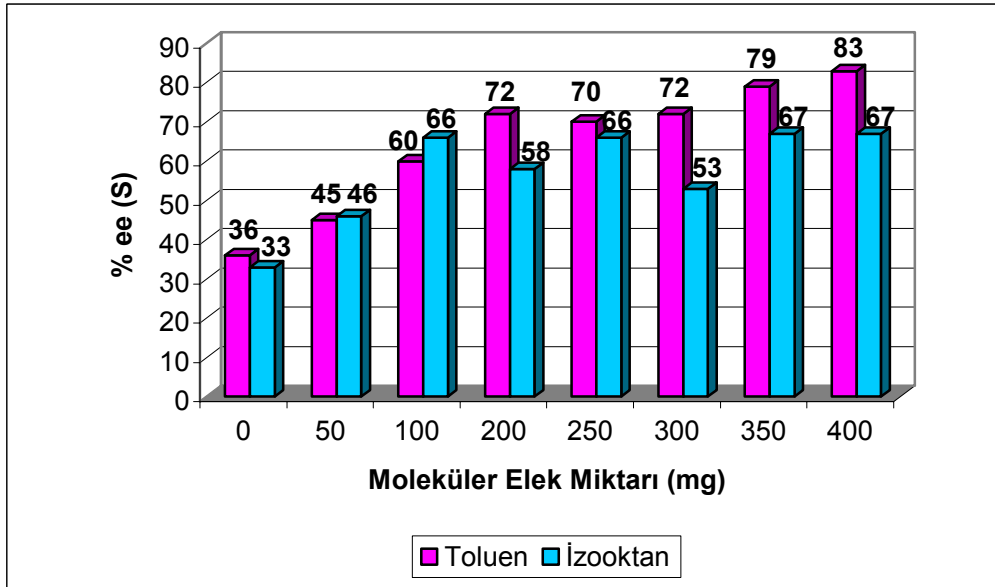


Şekil 4.16 Moleküler elek miktarının tepkime süresine etkisi

Çalışmalarda kullanılan toluen ve izooktan çözücüler için değişen moleküler elek miktarlarında elde edilen % ee (S) değerleri Şekil 4.17 ve Şekil 4.18’de karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.17 Açıl verici olarak laurik asitin kullanıldığı tepkimelerde moleküler elek miktarının enantiyomerik aşırılığa etkisi (1-fenil 1-propanol=0,5 mmol, laurik asit=1 mmol, çözücü= 3 ml, Novozym 435=100 mg, T= 40 °C ve N= 150 rpm)

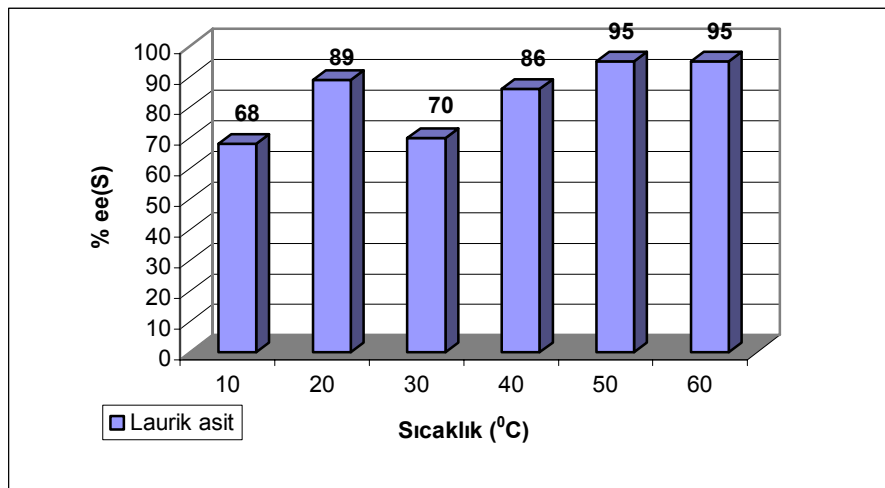


Şekil 4.18 Açıl verici olarak miristik asitin kullanıldığı tepkimelerde moleküler elek miktarının enantiyomerik aşırılığa etkisi (1-fenil 1-propanol=0,5 mmol, miristik asit=1 mmol, çözücü= 3 ml, Novozym 435=100 mg, T= 40 °C ve N= 150 rpm)

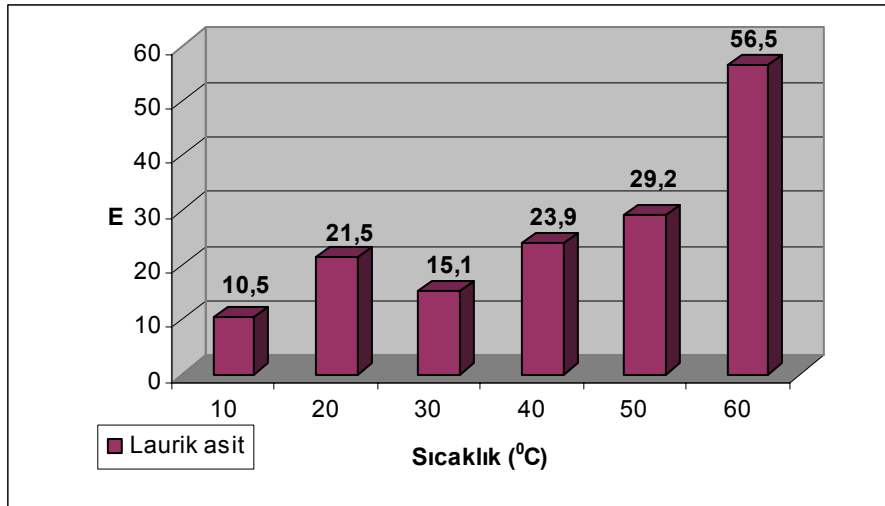
4.1.5 Sıcaklık etkisi

Rasemik 1-fenil 1-propanolün enantiyoseçimli esterleşme tepkimesine sıcaklık etkisinin incelenmesi amacıyla tepkimeler 10-60 °C arasındaki sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık etkisinin incelendiği çalışmada çözücü olarak toluen (3 ml), açıl verici olarak laurik asit (1 mmol) ve 0,5 mmol (R,S)-1-fenil 1-propanol kullanılmıştır. Daha sonra tepkime ortamına 400 mg moleküler elek ve 100 mg Novozym 435 enzimi eklenmiştir. Tepkimeler 150 rpm karıştırma hızındaki orbital çalkalayıcılarda gerçekleştirilmiştir.

Tepkime sıcaklığı enzimatik tepkimeler üzerinde büyük etkiye sahiptir. Yapılan deneylerde sıcaklığın enantiyomerik aşırılık değerini (ee (S)) ve enantiyomerik oranı (E) etkilediği görülmüştür. Sıcaklık artışıyla birlikte E değerlerinde belirgin bir artış gözlenmiştir (Şekil 4.20). Sıcaklık deneylerinde 10 °C sıcaklıkta % ee (S) değeri 68, E değeri 10,5 olarak hesaplanırken 60 °C sıcaklıkta % ee (S) değeri 95, E değeri 56,5 olarak bulunmuştur. En yüksek enantiyomerik aşırılık değerlerine 50 °C ve 60 °C ile ulaşılmıştır (Şekil 4.19). Tepkimeler TLC' de izlenmiş, yaklaşık olarak % 50 dönüşüm gözlendiğinde deneyler sonlandırılmıştır. Ancak bazı sıcaklık deneylerinde bu değer çok azda olsa aşılmıştır (Ek 8 Çizelge 1).

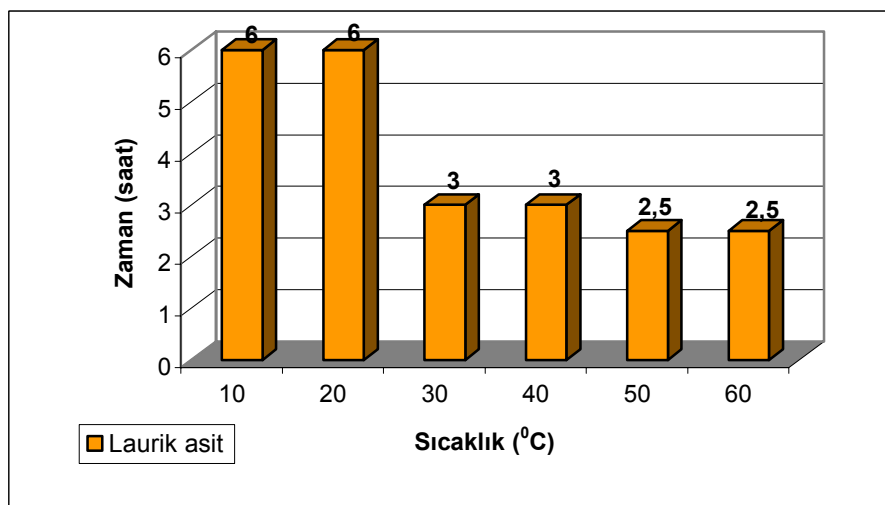


Şekil 4.19 Sıcaklığın enantiyomerik aşırılığa etkisi (1-fenil 1-propanol=0,5 mmol, laurik asit= 1 mmol, çözücü=toluen, Novozym 435=100 mg, moleküler elek=400 mg ve N= 150 rpm)



Şekil 4.20 Sıcaklığın enantiyomerik orana (E) etkisi (1-fenil 1-propanol=0,5 mmol, laurik asit= 1 mmol, çözücü=toluen, Novozym 435=100 mg, moleküler elek=400 mg ve N= 150 rpm)

Ayrıca sıcaklık artışı tepkime hızını etkilemiş ve tepkime süresinde azalmaya neden olmuştur. Sıcaklık tepkime süresine etkisi Şekil 4.21’de gösterilmiştir. Yüksek sıcaklıklarda enzimler katalitik aktivitelerini kaybedebilmektedir. Buda enzimin üç boyutlu yapısının yüksek sıcaklıklarda bozulmasıyla ilgilidir. Yapılan deneyler Novozym 435 enziminin 10 °C ile 60 °C arasındaki sıcaklıklarda enantiyoseçimli esterleşme tepkimesini katalizlediğini göstermiştir. Fakat deneylerde yüksek sıcaklıklarda iyi sonuçların elde edilmesini nedeni kullanılan Novozym 435 lipazının tutuklanmış bir enzim olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Çünkü tutuklama işlemleri enzimlerin termal kararlılığını artırmaktadır.

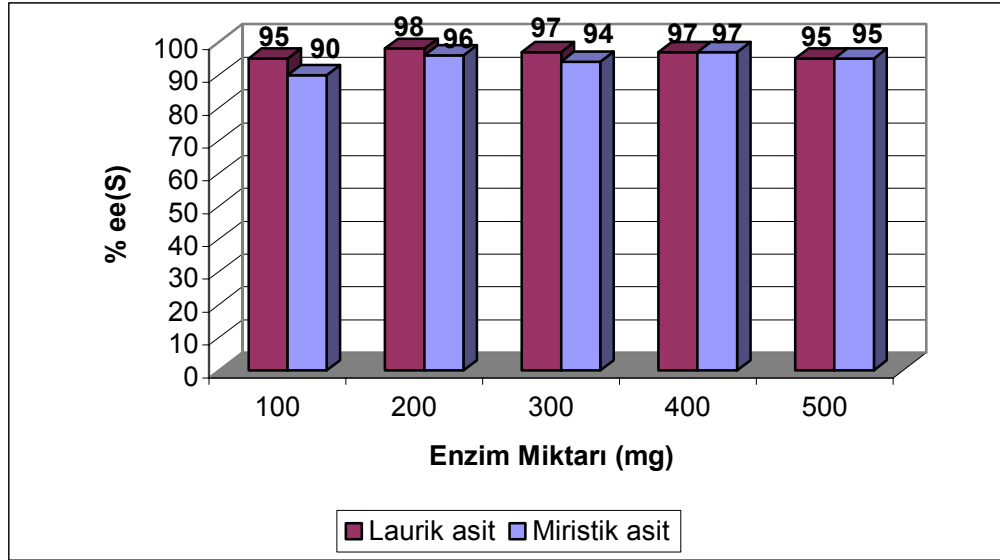


Şekil 4.21 Sıcaklığın tepkime süresine etkisi

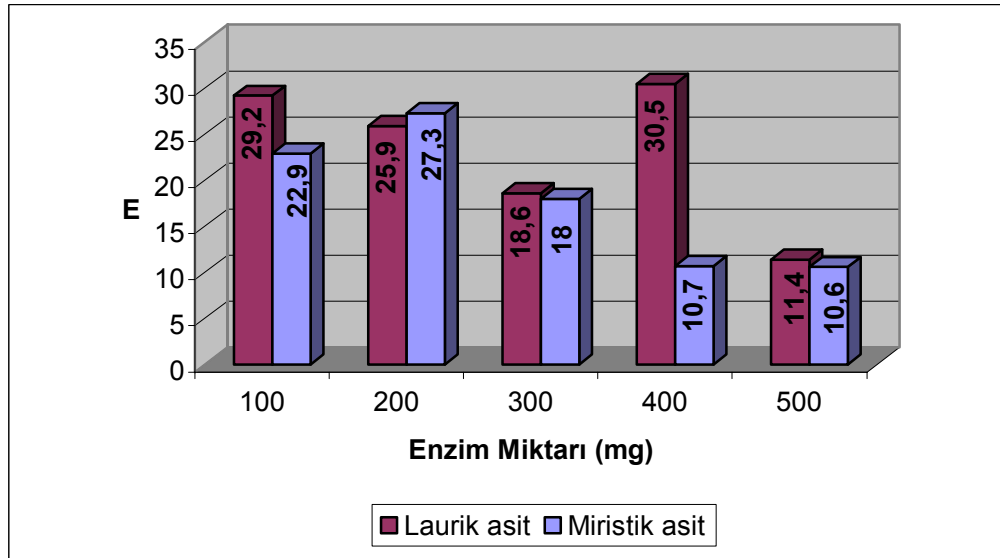
4.1.6 Enzim miktarı etkisi

Enzimler tepkime basamaklarını kolaylaştıracak bölgesel seçimliliğe sahiplerdir ve ılıman koşullar altında çalışırlar. Bu durum biyokatalitik prosesleri kimyasal proseslere göre daha avantajlı yapar. Optimum enzim miktarını belirlemek hem tepkimenin yüksek verimle daha kısa sürede gerçekleşmesi hem de maliyeti için önemlidir. Bu nedenle rasemik 1-fenil 1-propanolün enantiyoseçimli esterleşme tepkimesinde uygun enzim miktarı belirlemek önemlidir. Yapılan deneylerde tepkime ortamına 100, 200, 300, 400 ve 500 mg Novozym 435 enzimi eklenmiştir. Çözücü olarak toluen (3 ml), açıl verici olarak laurik ve miristik asit kullanılmış olup tepkimeler 50 °C’ de gerçekleştirilmiştir. Açıl verici/alkol mol oranı olarak 2/1 oranı esas alınmış ve tepkime ortamına 1 mmol açıl verici ile 0,5 mmol (R,S)-1-fenil 1-propanol eklenmiştir. Tepkime ortamına 400 mg moleküler elek eklenmiştir. Tepkimeler yaklaşık 2,5 saat sürmüştür.

Denenen tüm enzim miktarlarında yüksek enantiyomerik aşırı değerleri elde edilmiş olup, ee (S) değerleri % 90 - 98 arasında değişmektedir (Şekil 4.22). Enzim miktarındaki artış ile birlikte dönüşümün dikkat çekici şekilde arttığı gözlenmiş, bu durum enantiyomerik oran (E) değerinde azalmaya yol açmıştır (Ek 8 Çizelge 2 ve 3). Yüksek enzim konsantrasyonu substratın bağlanması için daha çok aktif merkez sağlayacağından tepkimenin dönüşüm değerinin artması ve tepkimenin hızlanması beklenen bir durumdur. Hem tepkimenin maliyeti hemde tepkimeyi yüksek enantiyoseçimlilikte katalizlemesi bakımından 100 mg enzim miktarının uygun olduğu düşünülmektedir. 100 mg enzim kullanıldığında laurik asit için ee (S) % 95 ve 29,2 E, miristik asit için ee (S) % 90 ve 22,9 E olarak bulunmuştur (Şekil 4.23).



Şekil 4.22 Enzim miktarının enantiyomerik aşırılığa etkisi (Tepkime süresi=2,5 h, 1-fenil 1-propanol=0,5 mmol, açıl verici=1 mmol, enzim= Novozym 435, toluen= 3 ml, moleküler elek=400 mg, $T=50^{\circ}C$ ve $N= 150$ rpm)



Şekil 4.23 Enzim miktarının enantiyomerik orana (E) etkisi (Tepkime süresi=2,5 h, 1-fenil 1-propanol=0,5 mmol, açıl verici=1 mmol, enzim= Novozym 435, toluen= 3 ml, moleküler elek=400 mg, $T=50^{\circ}C$ ve $N= 150$ rpm)

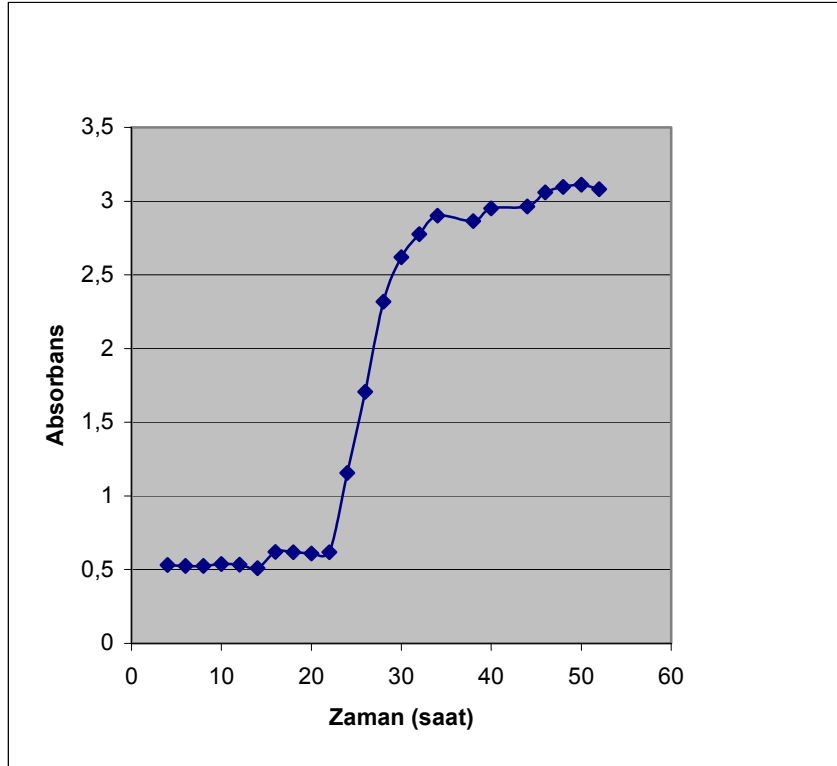
4.2 (R,S)-1-fenil 1-propanolün Liyofilize Mikrobiyal Hücreler ile Kinetik

Rezolüsyonu

Rasemik 1-fenil 1-propanolün saf lipaz enzimi katalizörlüğünde gerçekleşen esterleşme tepkimesine çeşitli parametrelerin etkisi incelendikten sonra biyokatalizör olarak liyofilize *Candida antarctica* (*Pseudozyma aphidis* DSM 70725) hücreleri kullanılarak kinetik rezolüsyon çalışmaları yapılmıştır. Kinetik rezolüsyon çalışmalarında saf enzimler kullanıldığı gibi enzim kaynağı olarak mikroorganizmalarda kullanılmaktadır. Mikrobiyal hücrelerin kullanılması hem ekonomik hem de teknik açıdan bazı avantajlar sağlamaktadır. Saf enzimlerin pahalı oluşu ve saflaştırma işlemlerinin uzun zaman alan yorucu bir işlem olması nedeniyle mikrobiyal hücreler avantajlıdır. Ayrıca bazı enzimlerin koenzim veya kofaktöre ihtiyaç duyması nedeniyle maliyet bir kat daha artmaktadır. Oysaki enzimler kendi doğal ortamlarında bulduklarından daha kararlı ve dışardan kofaktör eklenmesine ihtiyaç yoktur. Bu nedenlerden dolayı daha önceki çalışmamızda iyi sonuçlar elde ettiğimiz Novozym 435 enziminin kaynağı olan *Candida antarctica* (*Pseudozyma aphidis* DSM 70725) mikroorganizması (R,S)-1-fenil 1-propanolün esterleşme tepkimesinde biyokatalizör olarak kullanılmıştır.

4.2.1 Mikroorganizma üreme eğrisinin oluşturulması

Candida antarctica (*Pseudozyma aphidis* DSM 70725) mikroorganizmasının üreme eğrisini oluşturabilmek için 100 ml sıvı besiyerine ekimi yapılmış mikroorganizma 30 °C sıcaklıkta ve 170 rpm karıştırma hızındaki orbital çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır. Ekim yapılan homojen besiyerinden her 2 saatte belli miktarda sıvı alınmış ve spektrofotometre küveti içinde belli miktarda distile su ile seyreltilmiştir. Besiyeri içinde üreyen mikroorganizmanın yoğunluğu 600 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında ölçülmüştür. Absorbans değerleri seyreltme faktörü ile çarpılarak grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.24). Üreme eğrisi sonucu 54. saatte üremenin durgunluk fazına ulaştığı gözlenmiştir. Bunun sonucu olarak mikroorganizmanın yaklaşık olarak 2,5 - 3 gün inkübasyona bırakılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.24 *Candida antarctica* (*Pseudozyma aphidis* DSM 70725) üreme eğrisi

4.2.2 Lipaz aktivitesinin ölçülmesi

Candida antarctica mikroorganizmasının liyofilize kuru hücre kütlelerinin ve liyofilize sıvı kısmın lipaz içeriğini belirlemek amacıyla lipaz aktivitesi ölçülmüştür. Hem kuru hücre kütlelerinin hem de sıvı kısmın (santrifüj sonrası) ayrı ayrı liyofilize edilmesinin nedeni lipazın hücre dışı bir enzim olmasına rağmen hücre içinde de var olabileceğinin düşünülmesidir. Elde edilen sonuçlar Novozym 435 lipazının aktivitesi ile karşılaştırılmıştır. 200 mg liyofilize kuru hücrenin lipaz aktivitesi 5,43 U, 200 mg liyofilize sıvı kısmın lipaz aktivitesi 4,66 U, 1000 µl liyofilize edilmemiş (santrifüj sonrası) sıvı kısmın lipaz aktivitesi 0,53 U olarak ölçülmüştür. Novozym 435 lipazının aktivitesi 50 mg enzim için 14 U olarak ölçülmüştür (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 Lipaz aktivite sonuçları

Biyokatalizör	Miktar	Aktivite U
Saf enzim (Novozym 435)	50 mg	14 U
<i>C. antarctica</i> liyofilize hücre kütlesi	200 mg	5,43 U
<i>C. antarctica</i> liyofilize sıvı kısım	200 mg	4,66 U
<i>C. antarctica</i> sıvı kısım	1000 µl	0,53 U

4.2.3 Liyofilize mikrobiyal hücrelerin biyokatalizör olarak kullanılması

Rasemik 1-fenil 1-propanolün esterleşme tepkimesi ile kinetik rezolüsyonunda biyokatalizör olarak *Candida antarctica* mikroorganizmasının liyofilize hücre kütlesi ve liyofilize sıvı kısmı kullanılmıştır. Deneyler 25 ml'lik vida kapaklı şişelerde, hem liyofilize hücre kütlesi hem de liyofilize sıvı kısım için ayrı ayrı yapılmıştır. Deneylerde açıl verici olarak laurik asit kullanılmış öncelikle 1 mmol laurik asit, 6 ml izooktan içinde çözüldükten sonra rasemik alkol 1-fenil 1-propanol (0,5 mmol) tepkime ortamlarına eklenmiştir. Tepkime ortamına 400 mg moleküler elek eklenmiştir.

En son olarak ise tepkime ortamlarına biyokatalizör olarak 200 mg liyofilize edilmiş kuru hücre ve 200 mg liyofilize sıvı kısım eklenmiştir. Tepkimeler 40 °C'de ve 150 rpm karıştırma hızındaki çalkalayıcılarda gerçekleştirilmiştir. 10 günlük süre boyunca her iki tepkime içinde TLC'de herhangi bir ürün bandı oluşumu gözlenmemiştir. 10 günün sonunda tepkimeler sonlandırılmıştır. Sonlandırma işlemi sırasında biyokatalizör ve moleküler elek tepkime ortamından filtre kağıdı ile süzülerek ayrılmıştır. Tepkime ortamındaki çözücü ise hava pompası yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Tepkime sonrası alkol analizi yüksek basınç sıvı kromatografisinde (HPLC), Chiralcel® OB-H kolonu kullanılarak yapılmıştır. HPLC analizleri sonucunda biyokatalizör olarak *Candida antarctica*'nın liyofilize kuru hücre kütlesi ve liyofilize sıvı kısmın kullanıldığı tepkimelerde rasemik 1-fenil 1-propanolün enantiyoseçimli esterleşme tepkimesini katalizlemediği görülmüştür.

5. SONUÇLAR

Rasemik 1-fenil 1-propanolün esterleşme tepkimesiyle kinetik rezolüsyonu ilk olarak ticari lipaz enzimleri biyokatalizörlüğünde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma kapsamında enantiyomerik saflıkta 1-fenil 1-propanol üretimine enzim türünün, açıl verici ve çözücü türünün, açıl verici/alkol mol oranının, moleküler elek miktarının, sıcaklığın ve enzim miktarının etkisi araştırılmıştır. Enantiyoseçimli esterleşme tepkimesinde biyokatalizör olarak tutuklanmış Novozym 435 (*Candida antarctica* lipaz B) enzimi, Amano Lipaz AK (*Pseudomonas fluorescens*) ve Amano Lipaz PS (*Pseudomonas cepacia*) serbest enzimleri denenmiştir. İncelenen enzimler içerisinde en yüksek enantiyomerik aşırılık değerleri Novozym 435 enzimi ile elde edilmiştir. Novozym 435 enziminin en önemli başarısı ise tepkimeyi çok kısa sürede ve yüksek enantiyoseçimlilikte katalizleyebilmesidir. Novozym 435 enzimi ile hemen hemen tüm çözücü türlerinde iyi sonuçlar elde edilmiş olup en iyi sonuca toluen ile ulaşılmıştır. Çözücü olarak toluenin kullanıldığı tepkimelerde 5,5 saatin sonunda % ee (S) değeri 66, dönüşüm % 51, E değeri 8,7 olarak bulunmuştur.

Yapılan çalışmalar çözücü türünün tepkimenin enantiyomerik aşırılık (ee) ve enantiyomerik oran (E) değerini büyük ölçüde etkilediğini göstermiştir. Toluen dışındaki çözücülerde çözücü hidrofobikliğin göstergesi olan Log P değerinin artmasıyla enantiyomerik aşırılık değerinde artış gözlenmiştir. Organik çözücüler içerisinde diğerlerinden daha hidrofilik olan THF çözücüsünde (Log P=0.5) en düşük enantiyomerik aşırılık değerleri elde edilmiştir. THF'in kullanıldığı tepkimeler yaklaşık 7 gün sürmüş ve ee (S) değeri % 15-16'in üzerine çıkmamıştır. Bu durum hidrofilik bir çözücü olan THF'in enzimin konformasyonel esnekliğini koruyan bağlı suyu çekerek enzimin katalitik aktivitesini azaltmasıyla açıklanabilir. Toluenin çözücü olarak kullanıldığı tepkimelerde % ee (S) değerleri laurik asit için 66, miristik asit için 60, palmitik asit için 66 olarak bulunmuştur. Yapılan deneyler sonucunda açıl verici karbon sayısı ile tepkimenin enantiyomerik aşırılık değeri ve enantiyomerik oran değeri arasında bir bağlantı bulunamamıştır.

Yapılan literatür araştırması sırasında açıl verici/alkol mol oranının da kinetik rezolüsyon çalışmalarında önemli bir işletim parametresi olduğu görülmüştür. Çözücü olarak toluen, açıl verici olarak laurik asit kullanıldığında açıl verici/alkol mol oranı azaldıkça substrat için enantiyomerik aşırılık ee (S) değerlerinde kademeli bir artış gözlenmiştir. Mol oranı 3/1'den 1/1'e azaldığında % ee (S) değeri 67'den 77'e yükselmiştir. Toluen çözücüsünde mol oranının azalmasıyla benzer bir artış miristik asit içinde gözlenmiştir.

Moleküler elek tepkime ortamında bulunan su miktarını ayarlamakta kullanılan su tutucu ajan görevi görmektedir. Moleküler eleğin ortamdaki suyu uzaklaştırmanın yanında enzim davranışını etkilediğine dair çalışmalar literatürde mevcuttur. Zeolit moleküler elekler kation değiştirme yeteneklerinden dolayı enzimler üzerinde dramatik şekilde asit-baz etkisine sahiplerdir. Elde edilen sonuçlar moleküler elek miktarının lipaz katalizli enantiyoseçimli esterleşme tepkimeleri üzerinde önemli etkilere sahip olduğunu açıkça göstermektedir. Toluenin çözücü olarak kullanıldığı tepkimelerde moleküler elek miktarının artmasıyla, ee (S) değerlerinde artış gözlenmiştir. Moleküler elek miktarının 0'dan 400 mg'a artmasıyla % ee (S) değerleri; laurik asit için 37'den 87'ye, miristik asit için 36'dan 83'e yükselmiştir. Toluen çözücüsü için en yüksek sonuçlara 400 mg moleküler elek kullanıldığı durumda ulaşılmıştır. 400 mg moleküler elek kullanıldığında laurik asit ile % 87 ee (S) ve 25,7 E değerine ulaşılmıştır. Moleküler elek miktarındaki artış tepkime süresinde çarpıcı şekilde azalmaya neden olmuştur. Toluen çözücüsünde 0 mg moleküler elek kullanıldığında tepkime süresi 8 saat iken, 400 mg moleküler elek kullanıldığında süre 2,5 saate düşmüştür.

Tepkime sıcaklığı enzimatik tepkimeler üzerinde büyük etkiye sahiptir. Yapılan deneylerde sıcaklığın enantiyomerik aşırılık değerini ve enantiyomerik oranı (E) etkilediği görülmüştür. Sıcaklık artışıyla birlikte E değerlerinde belirgin bir artış gözlenmiştir. Sıcaklık etkisi deneylerinde 10 °C sıcaklıkta % ee (S) değeri 68, E değeri 10,5 olarak hesaplanırken 60 °C sıcaklıkta % ee (S) değeri 95, E değeri 56,5 olarak bulunmuştur. Optimum enzim miktarını belirlemek hem tepkimenin yüksek verimle daha kısa sürede gerçekleşmesi hemde maliyeti için önemlidir. Denenen tüm enzim miktarlarında (100-500 mg) yüksek enantiyomerik aşırılık değerleri (\geq % 90) elde edilmiştir.

Hem tepkimenin maliyeti hemde tepkimeyi yüksek enantiyoseçimlilikte katalizlemesi bakımından 100 mg enzim miktarının uygun olduğu düşünülmektedir. Çözücü olarak toluenin kullanıldığı tepkimelerde, 100 mg enzim kullanıldığında laurik asit için ee (S) % 95 ve 29,2 E, miristik asit için ee (S) % 90 ve 22,9 E olarak bulunmuştur.

Yapılan deneyler sonucunda substratın enantiyomerik saflığını ifade eden ee (S) değerlerinde büyük bir artış gözlenmiştir. Bu durum rasemik 1-fenil 1-propanolün yüksek enantiyomerik saflıkta üretilebileceğinin bir göstergesidir. En uygun kinetik rezolüsyon koşulları çözücü olarak toluen (3 ml), açıl verici olarak laurik asit (1 mmol), 400 mg moleküler elek kullanıldığında, açıl verici/alkol mol oranı 2/1, tepkime sıcaklığı 50 ve 60 °C olarak bulunmuştur. Tepkimelerde denenen tüm enzim miktarlarında yüksek enantiyomerik aşırılık değerleri (\geq % 90) elde edilmiştir. Bu nedenle tepkimenin maliyeti açısından 100 mg enzim miktarı daha uygundur.

Biyokatalizör olarak liyofilize *Candida antarctica* (*Pseudozyma aphidis* DSM 70725) hücrelerinin kullanıldığı deneylerde, rasemik 1-fenil 1-propanolün enantiyoseçimli esterleşme tepkimesinin gerçekleşmediği görülmüştür. Yapılan literatür araştırması sonucu *Candida antarctica* (*Pseudozyma aphidis* DSM 70725)'nın biyokatalizör olarak kullanıldığı kinetik rezolüsyon çalışmalarına rastlanamamıştır. Bu yüzden çalışmalarımızda birtakım zorluklar yaşanmıştır. Özellikle *Candida antarctica* mayasını çoğaltmak güç olmuş, az miktarda üretilebilmiştir. 100 ml besiyerinden yaklaşık olarak 0,5-0,6 g arasında kuru hücre ağırlığı elde edilmiştir. Biyokatalizörün rasemik 1-fenil 1-propanolün enantiyoseçimli esterleşme tepkimesini katalizlememesinin nedeni olarak; biyokütle ve süpernatant içeriğindeki lipaz miktarının yetersiz oluşu, tepkime ortamına eklenen miktarın tepkimeyi katalizlemek için yeterli olmayışı veya hücrede varolan lipazın esterleşme tepkimesine özgül olmaması düşünülebilir. Lipaz üretimini artırmak için mikroorganizmanın üreme ortamına farklı substratlar eklenerek bu sorun giderilebilir.

KAYNAKLAR

- Anonim. 2007. Web sitesi. <http://www.biorefining.com/pdf/PharmaChemSept2003.pdf>,
Erişim tarihi: 21.04.2007.
- Anonim. 2007. Web sitesi. <http://www.pharma-solutions.basf.com>, Erişim tarihi:
23.04.2007.
- Anonim. 2007. Web sitesi. <http://www.patient.co.uk/showdoc/30002411/>, Erişim tarihi:
05.04.2007.
- Anonim. 2007. Web sitesi. <http://chemistry.semo.edu/crawford/ch186/lectures/ch20/slide31.html>
Erişim tarihi: 23.04.2007.
- Anonim. 2007. Web sitesi. <http://en.wikipedia.org/wiki/Pseudoephedrine> Erişim tarihi:
12.05.2007.
- Atkins, R.C. and Carey, F.A. 1997. Organic Chemistry. The McGraw-Hill companies, Inc,
184–212, New York.
- Bakker, M., Spruijt, A.S., van Rantwijk F. and Sheldon, R.A. 2000. Highly
enantioselective aminoacylase-catalysed transesterification of secondary alcohols.
Tetrahedron: Asymmetry, 11; 1801-1808.
- Burke, D. and Henderson, D. J. 2002. Chirality: a blueprint for the future. British Journal
of Anaesthesia 88(44); 563-576.
- Cernia E., Palocci C. and Soro S. 1998. The role of the reaction medium in lipase-
catalyzed esterifications and transesterifications. Chemistry and Physics of Lipids,
93;157-168.
- Fontes, N., Partridge, J., Halling, P.J. and Barreiros, S. 2002. Zeolite molecular sieves
have dramatic acid-base effects on enzymes in nonaqueous media. Biotechnology
and Bioengineering, 77; 296-305.
- Frings, K., Koch, M. and Hartmeier, W. 1999. Kinetik resolution of 1-phenyl ethanol
with enantioselectivity with native and immobilized lipase in organic solvents.
Enzyme and Microbial Technology, 25; 303-309.
- Gandhi, N.N., Patil, N.S., Sawant, S.B. and Joshi J.B. 2000. Lipase-catalyzed
esterification. Catal. Rev.-Sci. Eng., 42(4), 439-480.
- Gandolfi, R., Gualandris, R., Zanchi, C. and Molinari, F. 2001. Resolution of (R,S)-2-
phenylpropanoic acid by enantioselective esterification with dry microbial cells in
organic solvent. Tetrahedron: Asymmetry 12; 501-504.




- Ghanem, A. and Aboul-Enein, H.Y. 2004. Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents. *Tetrahedron: Asymmetry*, 15; 3331-3351
- Irimescu, R., Saito, T., Kato, K. 2004. Enzymatic kinetic resolution of primary alcohols by direct esterification in solvent-free system. *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, 27; 69-73.
- Inokuchi, J., Mason, I., Radin, N.S. 1987. Antitumor activity via inhibition of glycosphingolipid biosynthesis, *Cancer Letter*, 38: 23-30.
- İşbakan, N. 2006. Lipaz enzimi biyokatalizörlüğünde enantiyomerik saflıkta 1-fenil 1-propanolün transesterleşme tepkimesiyle kinetik rezolüsyonu. Yüksek lisans tezi. Ankara Üniversitesi, 107s., Ankara.
- Jaeger, K.E. and Reetz, M.T. 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Tibtech*, Vol (16); 396–403
- Jaeger, K. E., Dijkstra, B.W. and Reetz, M.T. 1999. Bacterial Biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.*, 53; 315-351.
- Kim, M. G., Lee, E. G. and Chung, B. G. 2000. Improved enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase towards ketoprofen ethyl ester by a simple two-step treatment. *Process Biochemistry*, 35; 977-982.
- Krishna, S.H. and Karanth, N.G. 2002. Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in nonaqueous media. *Catalysis Reviews*, Vol. 44, No:4, 499-591.
- Laane, C., Boeren, S., Vos, K. and Veeger C. 1987. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents, *Biotechnol. Bioeng.* 30; 81-87.
- Nejem, R.M. 2004. Doctor Thesis: Enantioselective sensors and biosensors for clinical analysis. University of Pretoria, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, Pretoria.
- Ong, A.L., Kamaruddin, A.H., Bhatia, S., Long, W.S., Lim, S.T., Kumari, R. 2006. Performance of free *Candida antarctica* lipase B in the enantioselective esterification of (R)-ketoprofen. *Enzyme and Microbial Technology*, in press.
- Raza, S., Fransson L. and Hult, K. 2001. Enantioselectivity in *Candida antarctica* lipase B: A molecular dynamics study. *Protein Science*, 10; 329-338
- Sakai, T., Kishimoto, T., Tanaka, Y., Ema, T. and Utaka, M. 1998. Low –Temperature method for enhancement of enantioselectivity in the lipase-catalyzed kinetic resolutions of solketal and some chiral alcohols. *Tetrahedron Letters*, 39; 7881–7884

- Sheldon, R.A. 1993. Chirechnology. Marcel Dekker, Inc, 47-83, New York.
- Soyer, A. 2007. Lipaz enzimi biyokatalizörlüğünde kinetik rezolüsyon ile enantiyomerik saflıkta 1-fenil 1-propanolün üretimi. Yüksek lisans tezi. Ankara Üniversitesi, 80s., Ankara.
- Suan, C. and Sarmidi, M.R. 2004. Immobilised lipase-catalysed resolution of (R,S)-1-phenylethanol in recirculated packed bed reactor, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 28, 111-119.
- Torres, C. and Otera, C. 2001. Part III. Direct enzymatic esterification of lactic acid with fatty acids. *Enzyme and Microbial Technology*, 29; 3-12.
- Uzura, A., Katsuragi, T. and Tani, Y. 2001. Optimal conditions for production of (R)-1-phenylpropanol by *Fusarium moniliforme* Strain MS 31. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 92, No.3, 288-293.


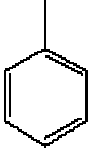



EKLER

- EK 1 Kullanılan Açıl Vericilerin Bazı Fiziksel Özellikleri
- EK 2 Kullanılan Organik Çözücülerin Bazı Fiziksel Özellikleri
- EK 3 (R,S)-1-fenil 1-propanolün örnek HPLC Kromatogramı
- EK 4 Enzim ve Çözücü Türü Etkisi Çizelge Gösterimi
- EK 5 Açıl verici ve Çözücü Türü Etkisi Çizelge Gösterimi
- EK 6 Açıl verici/Alkol Mol Oranı Etkisi Çizelge Gösterimi
- EK 7 Moleküler Elek Miktarı Etkisi Çizelge Gösterimi
- EK 8 Sıcaklık ve Enzim Miktarı Etkisi Çizelge Gösterimi

EK 1 Kullanılan Açıl Vericilerin Fiziksel Özellikleri

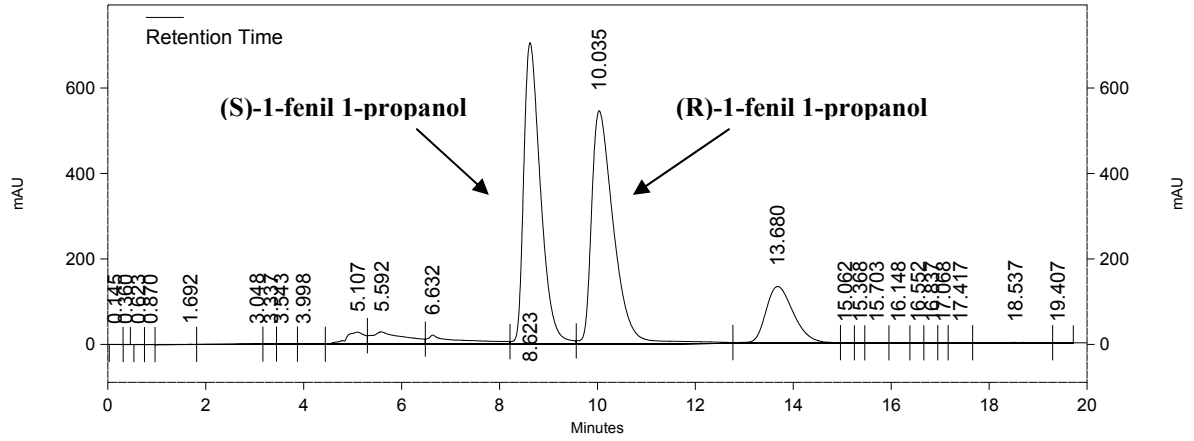
	Kapalı Formülü	Açık Formülü	Molekül Ağırlığı	Erime Noktası (°C)	Kaynama Noktası (°C)
Laurik Asit	$C_{12}H_{24}O_2$		200.3204	44	225
Miristik Asit	$C_{14}H_{28}O_2$		228.374	54	250
Palmitik Asit	$C_{16}H_{32}O_2$		256.4276	62	271.4

EK 2 Kullanılan Organik Çözücülerin Fiziksel Özellikleri

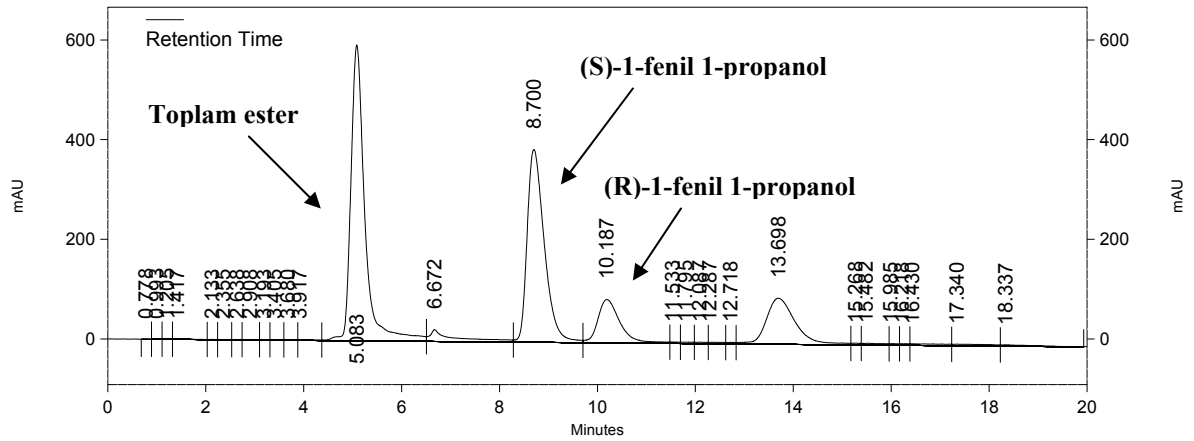
	Kapalı Formülü	Log P	Açık Formülü	Molekül Ağırlığı	Erime Noktası (°C)	Kaynama Noktası (°C)
THF	C ₄ H ₈ O	0,49		72.1066	-108.4	66
Toluen	C ₇ H ₈	2,5		92.1402	-93	110.6
Hegzan	C ₆ H ₁₄	3,5		86.1766	-95	69
Heptan	C ₇ H ₁₆	4		100.2034	-90.6	98.4
İzooktan	C ₈ H ₁₈	4,5		114.2302	-107	99.2

EK 3 (R,S)-1-fenil 1-propanolün örnek HPLC Kromatogramı

(R,S)-1-fenil 1-propanolün esterleşme tepkimesi öncesi HPLC analizi



(R,S)-1-fenil 1-propanolün esterleşme tepkimesi sonundaki HPLC analizi



EK 4 Enzim ve Çözücü Türü Etkisi Çizelge Gösterimi

Çizelge 1. Enzim ve çözücü türü etkisi (1-fenil 1-propanol=0,5 mmol, laurik asit =1mmol, enzim=100 mg, çözücü=3 ml, moleküler elek=100 mg, T= 40 °C ve N =150 rpm)

<i>Enzim Türü</i>	<i>Çözücü Türü</i>	<i>ee (S),%</i>	<i>Dönüşüm,%</i>	<i>E</i>	<i>Tepkime Süresi (saat)</i>
Amano Lipaz AK (<i>P. fluorescens</i>)	Toluen	9,5	13	4,9	96
	Hegzan	24	25	7,8	76
	Heptan	26	26	8,7	76
	İzooktan	15	20	4,6	76
Amano Lipaz PS (<i>P. cepacia</i>)	Toluen	6,9	10	4,6	96
	Hegzan	21	24	6,1	72
	Heptan	19	21	7,3	72
	İzooktan	23	28	4,9	72
Novozym 435	Toluen	66	51	8,7	5,5
	Hegzan	41	36	9,5	4
	Heptan	48	41	8,7	3
	İzooktan	51	40	12,5	2,5

EK 5 Açıl verici ve Çözücü Türü Etkisi Çizelge Gösterimi

Çizelge 1. Açıl verici ve çözücü türü etkisi(1-fenil 1-propanol=0,5 mmol, açıl verici= 1 mmol, enzim=100 mg, çözücü=3 ml, moleküler elek=100 mg, T= 40 °C ve N =150 rpm)

Çözücü Türü	Log P	Açıl Verici Türü	ee (S),%	Dönüşüm,%	E	Tepkime süresi (saat)
THF	0,5	Laurik asit	15	18	6,2	168
		Miristik asit	16	18	7,4	168
		Palmitik asit	-	-	-	-
Toluen	2,5	Laurik asit	66	51	8,7	5,5
		Miristik asit	60	47	9,4	5,5
		Palmitik asit	66	53	7,4	5,5
Hegzan	3,5	Laurik asit	41	36	9,5	4
		Miristik asit	38	41	4,7	4
		Palmitik asit	30	39	3,7	4
Heptan	4,0	Laurik asit	48	41	8,7	3
		Miristik asit	46	40	8,5	5
		Palmitik asit	42	38	8,0	5
İzooktan	4,5	Laurik asit	51	40	12,5	2,5
		Miristik asit	66	43	29,8	2,5
		Palmitik asit	50	38	16,7	2,5

EK 6 Açıl verici/Alkol Mol Oranı Etkisi Çizelge Gösterimi

Çizelge 1. Toluen çözücüsünde açıl verici/alkol mol oranının etkisi (1-fenil 1-propanol=0,5 mmol, toluen=3 ml, Novozym 435=100 mg, moleküler elek=200 mg, T= 40 °C ve N=150 rpm)

<i>Açıl Verici Türü</i>	<i>Asit /Alkol mol oranı</i>	<i>ee (S),%</i>	<i>Dönüşüm ,%</i>	<i>E</i>	<i>Tepkime süresi (saat)</i>
Laurik asit	1/1	77	51	15,4	3
	3/2	72	48	17,4	3
	2/1	70	44	36,4	3
	3/1	67	41	116,8	3
Miristik asit	1/1	72	45	34	3
	3/2	73	45	38,9	3
	2/1	70	48	15,1	3
	3/1	65	44	20,6	3

Çizelge 2. İzooktan çözücüsünde açıl verici/alkol mol oranının etkisi (1-fenil 1-propanol=0,5 mmol, izooktan=3 ml, Novozym 435=100 mg, moleküler elek=200 mg, T= 40 °C ve N=150 rpm)

<i>Açıl Verici Türü</i>	<i>Asit /Alkol mol oranı</i>	<i>ee (S),%</i>	<i>Dönüşüm ,%</i>	<i>E</i>	<i>Tepkime süresi (saat)</i>
Laurik asit	1/1	53	46	7,2	1,5
	3/2	47	46	5,4	1,5
	2/1	45	43	6,1	1,5
	3/1	47	46	5,4	1,5
Miristik asit	1/1	63	53	6,6	1,5
	3/2	63	52	7,1	1,5
	2/1	57	58	4,1	1,5
	3/1	53	54	4,4	1,5

EK 7 Moleküler Elek Miktarı Etkisi Çizelge Gösterimi

Çizelge 1. Toluen çözücüsünde moleküler elek miktarının etkisi (1-fenil 1-propanol=0,5 mmol, açil verici= laurik asit (1mmol), toluen= 3 ml, Novozym 435=100 mg, T= 40 °C ve N = 150 rpm)

Açil Verici Türü	Moleküler elek miktarı,mg	ee (S),%	Dönüşüm,%	E	Tepkime süresi (saat)
Laurik asit	0	37	32	12,1	8
	50	44	37	10,7	7
	100	66	51	8,7	5,5
	150	67	51	9,1	4
	200	73	47	22,6	3,5
	250	75	47	26,9	3
	300	78	49	22,8	3
	350	84	51	24,7	3
	400	87	52	25,7	2,5

Çizelge 2. Toluen çözücüsünde moleküler elek miktarının etkisi (1-fenil 1-propanol=0,5 mmol, açil verici= miristik asit (1mmol), toluen= 3 ml, Novozym 435=100 mg, T= 40 °C ve N = 150 rpm)

Açil verici Türü	Moleküler elek miktarı,mg	ee (S),%	Dönüşüm,%	E	Tepkime süresi (saat)
Miristik asit	0	36	33	9,2	8
	50	45	36	14,1	7
	100	60	47	9,5	5,5
	150	73	53	10	4
	200	72	46	25,9	3,5
	250	70	46	21,4	3
	300	72	46	25,9	3
	350	79	49	24,5	3
	400	83	54	15,7	2,5

Çizelge 3. İzooktan çözücüsünde moleküler elek miktarının etkisi (1-fenil 1-propanol=0,5 mmol, açil verici= laurik asit (1mmol), izooktan= 3 ml, Novozym 435=100 mg, T= 40 °C ve N = 150 rpm)

<i>Açil Verici Türü</i>	<i>Moleküler elek miktarı,mg</i>	<i>ee (S),%</i>	<i>Dönüşüm,%</i>	<i>E</i>	<i>Tepkime süresi (saat)</i>
Laurik asit	0	25	33	3,9	3
	50	45	46	4,9	3
	100	51	40	12,5	2,5
	200	45	43	6,1	2
	250	49	55	5,5	1,15
	300	52	46	6,8	1,15
	350	57	51	5,9	1
	400	55	49	6,3	1

Çizelge 4. İzooktan çözücüsünde moleküler elek miktarının etkisi (1-fenil 1-propanol=0,5 mmol, açil verici= miristik asit (1mmol), izooktan=3 ml, Novozym 435=100 mg, T= 40 °C ve N = 150 rpm)

<i>Açil Verici Türü</i>	<i>Moleküler elek miktarı,mg</i>	<i>ee (S),%</i>	<i>Dönüşüm,%</i>	<i>E</i>	<i>Tepkime süresi (saat)</i>
Miristik asit	0	33	38	4,6	3
	50	46	44	5,9	3
	100	66	43	29,8	2,5
	200	58	62	3,6	2
	250	66	50	9,5	1,15
	300	53	43	9,7	1,15
	350	67	46	16,7	1
	400	67	47	14,3	1

EK 8 Sıcaklık ve Enzim Miktarı Etkisinin Çizelge Gösterimi

Çizelge 1. Sıcaklık etkisi (1-fenil 1-propanol=0,5 mmol, açil verici=laurik asit (1mmol), çözücü=toluen (3 ml), Novozym 435=100 mg, moleküler elek=400 mg ve N = 150 rpm)

Açil Verici Türü	Sıcaklık (°C)	ee (S),%	Dönüşüm,%	E	Tepkime süresi (saat)
Laurik asit	10	68	50	10,5	6
	20	89	54	21,5	6
	30	70	48	15,1	3
	40	86	52	23,9	3
	50	95	55	29,2	2,5
	60	95	52	56,5	2,5

Çizelge 2. Enzim miktarı etkisi (1-fenil 1-propanol=0,5 mmol, açil verici=laurik asit (1mmol), çözücü=toluen (3 ml), moleküler elek=400 mg, T=50°C ve N= 150 rpm)

Açil Verici Türü	Enzim miktarı (mg)	ee (S),%	Dönüşüm,%	E	Tepkime süresi (saat)
Laurik asit	100	95	55	29,2	2,5
	200	98	58	25,9	2,5
	300	97	60	18,6	2,5
	400	97	56	30,5	2,5
	500	95	64	11,4	2,5

Çizelge 3. Enzim miktarı etkisi (1-fenil 1-propanol=0,5 mmol, açil verici=miristik asit (1mmol), çözücü=toluen (3 ml), moleküler elek=400 mg, T=50°C ve N= 150 rpm)

Açil Verici Türü	Enzim miktarı (mg)	ee (S),%	Dönüşüm,%	E	Tepkime süresi (saat)
Miristik asit	100	90	54	22,9	2,5
	200	96	56	27,3	2,5
	300	94	58	18	2,5
	400	97	67	10,7	2,5
	500	95	65	10,6	2,5

ÖZGEÇMİŞ

11.10.1982 yılında Manavgat'da doğdu. 2000 yılında Ankara Keçiören Süper Lisesinden mezun oldu ve aynı yıl Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı. 2004 yılında Biyoloji Bölümünden dereceyle mezun oldu. 2004 yılında Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Temel Biyoteknoloji Yüksek Lisans Programına kabul edildi. 2006 yılından bu yana Ankara Kriminal Polis Laboratuvarı Biyolojik İncelemeler Şube Müdürlüğünde Biyolog ünvanı ile görev yapmaktadır.

Görev aldığı araştırma projeleri

Yardımcı Araştırmacı, “Rasemik Benzoinden Lipaz Katalizli Transesterleşme Tepkimesi ile Optikçe Saf Benzoin Üretimi” TÜBİTAK Projesi (MAG 104K148), 2005-2006

Yardımcı Araştırmacı, “1-Fenil 1-Propanolün Enzimatik ve Mikrobiyal Hücre Biyokatalizörlüğünde Enantiyoseçimli Esterleşme Tepkimeleriyle Kinetik Rezolüsyonu” Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Projesi (Proje No 162), 2005-2007

Ulusal Sempozyumlarda Sunulan Bildiri

F. Karadeniz, E. Bayraktar, Ü. Mehmetoğlu, “Rasemik 1-Fenil 1-Propanolün *Candida antarctica* Lipazı İle Kinetik Rezolüsyonuna İşletme Parametrelerinin Etkisi” 7. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi (UKMK-7) Bildiri Özetleri Kitabı BT 33 Kodlu Bildiri.