



**BİYOAKTİF MOLEKÜL ANALOGLARININ YAPIMINDA  
KULLANILABİLİR ŞEKER ESTERLERİNİN SENTEZİ**

**SERAP ÇETİNKAYA**

**DOKTORA TEZİ**

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**2018**



**T. C.  
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOAKTİF MOLEKÜL ANALOGLARININ YAPIMINDA  
KULLANILABİLİR ŞEKER ESTERLERİNİN SENTEZİ**

**DOKTORA TEZİ**

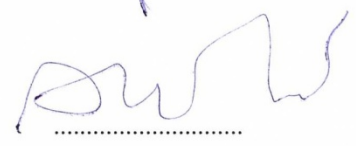
**Serap ÇETİNKAYA  
(201392020038)**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı  
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ali Fazıl YENİDÜNYA**

**SİVAS  
MAYIS 2018**

Serap ÇETİNKAYA'nın hazırladığı ve “**BİYOAKTİF MOLEKÜL ANALOGLARININ YAPIMINDA KULLANILABİLİR ŞEKER ESTERLERİNİN SENTEZİ**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANA BİLİM DALI'nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

**Tez Danışmanı :** **Prof. Dr. Ali Fazıl YENİDÜNYA**  
Cumhuriyet Üniversitesi



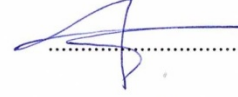
**Jüri Üyesi:** **Prof. Dr. Burhan ARIKAN**  
Çukurova Üniversitesi



**Jüri Üyesi:** **Doç. Dr. Musa SARI**  
Cumhuriyet Üniversitesi



**Jüri Üyesi:** **Doç. Dr. Mahir BUDAK**  
Cumhuriyet Üniversitesi



**Jüri Üyesi:** **Dr. Öğr. Üyesi Kamiran SARAÇ**  
Bitlis Eren Üniversitesi



Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından DOKTORA TEZİ olarak onaylanmıştır.

**Prof. Dr. İsmail ÇELİK**  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 20.08.2014 tarihli ve 7 sayılı kararı ile kabul edilen Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırlanmıştır.



*Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) Komisyonu tarafından **F-464** Nolu proje kapsamında desteklenmiştir.*



Bütün hakları saklıdır.  
Kaynak göstermek koşuluyla alıntı ve gönderme yapılabilir.

© Serap ÇETİNKAYA, 2018



*Çalışma sırasında bana destek olan canım aileme...*

## ETİK

Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- ✓ Bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- ✓ Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- ✓ Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere, bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- ✓ Bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ✓ Tezin herhangi bir bölümünü, Cumhuriyet Üniversitesi veya bir başka üniversitede, bir başka tez çalışması olarak sunmadığımı; beyan ederim.

11.05.2018

Serap ÇETİNKAYA

## TEŞEKKÜR

Bilgi ve deneyimlerinden sürekli yararlandığım, tezin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Ali Fazıl YENİDÜNYA' ya çok teşekkür ederim.

Ayrıca, doktora boyunca yanımda olan, yardımlarını esirgemeyen hocam Doç. Dr. Birnur AKKAYA' ya ve çalışmalarımnda yardımcı olan hocalarım Prof. Dr. Zübeyda AKIN POLAT ve Doç. Dr. Sevgi DURNA DAŞTAN' a çok teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca ve hayatımın her aşamasında benden her türlü maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen canım anneme ve babama, beni yorulduğum anlarda yüreklendiren kardeşlerime (dostlarıma) ve doktora çalışmalarım boyunca tüm stres ve mutluluğumu paylaşan arkadaşlarıma Dr. Sümeyra SAVAŐ, Arő. Gör. Özgöl DOĞAN, Arő. Gör. Faika BAŐOĐLU, Fizyoterp. Özge ÖZKAYNAK, Dr. Öğr. Üyesi Esra Ünal ve Dr. Yener ÜNAL' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) tarafından F-464 numaralı projeyle desteklenmiştir.



## ÖZET

### BİYOAKTİF MOLEKÜL ANALOGLARININ YAPIMINDA KULLANILABİLİR ŞEKER ESTERLERİNİN SENTEZİ

Serap ÇETİNKAYA

Doktora Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ali Fazıl YENİDÜNYA

2018, 123+xvi sayfa

Şeker-yağ asidi esterlerinin sentezinde kısıtlayıcı parametre organik ortamda substrat çözünürlüğüdür. Şekerler birçok organik ortamda yeterince çözünmemektedir. Öte yandan şekeri çözen birçok organik ortam enzim aktivitesine elverişli değildir. Ayrıca bu iki temel koşulu karşılayan organik çözücülerin çoğu tepkime ortamında birbiri ile faz oluşturabilmektedir. Bu üç sorunu bertaraf edebilmek için ilk çalışmalar çözünürlük kapsamında yürütüldü. Bulgular doğrultusunda, tepkime ortamı olarak iki organik çözücü çifti tercih edildi: dimetilsulfoksit/tert-bütanol ve dimetil sülfoksit/2-metil-2-bütanol. Dimetilsulfoksit yerine dimetilformamit de kullanılabilirdi. Ancak, şeker çözünürlüğünün dimetilformamitte nispeten daha az olduğu saptandı. Her bir şekerin esterleşmede farklı davranış gösterebileceği düşüncesiyle birden fazla şeker denendi. Örneğin, ribozların doğada fonksiyonel moleküllerde yapı birimi olarak heksozlardan çok daha yaygın tercih edilmesine karşın, mevcut literatürde şeker esterlerinde hiç kullanılmadığı görüldü. Yağ asidi zincir uzunluğunun tepkime verimi üzerinde etkili olduğuna ilişkin bilgi vardır. Bu nedenle deneylerde birden fazla yağ asidi kullanıldı. Şeker esterleri sırasıyla ince tabaka kromatografisi, IR, ve NMR ile analiz edildi. Ayrıca yalnızca bir örneğin HSQC ve kütle spektrometri analizi de yapıldı. Kullanılan şeker ve yağ asidinin cinsinden bağımsız olarak enzim içermeyen kontrol deneyleri de, her seferinde esterleşme ürünü verdiğinden, diğer örnekler uygulanan işlemler ve analiz yöntemlerine bu örnekler de dahil edildi. Rasgele örnekler seçilerek HPLC ile ppm düzeyinde verim analizi yapıldı. Elde edilen bulgular organik bir tepkime ortamında ve enzim ya da tanımlı bir kimyasal katalizör yokluğunda şeker esterlerinin sentezlenebildiğini tekrarlı olarak doğruladı. Bu sonuç literatürde mevcut olmayıp, teze özgü orijinal bir bulgudur. Bu bulgu yine literatürde mevcut olmayan ve farklı yağ asitleri ile sentezlenen riboz esterleri için de doğrulanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Şeker, yağ asidi, ester, biyomolekül, biyolojik aktif molekül.

## ABSTRACT

### SYNTHESIS OF SUGAR ESTERS TO BE USED IN THE DEVELOPMENT OF BIOACTIVE MOLECULE ANALOGUES

Serap ÇETİNKAYA

PhD Thesis

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Dr. Ali Fazıl YENİDÜNYA

2018, 123+xvi pages

The limiting parameter in the synthesis of sugar-fatty acid esters is the substrate solubility in the organic medium. Sugars are not sufficiently soluble in many organic media. On the other hand, many sugar-dissolving organic media are not suitable for enzyme activity. In addition, most of these two essential organic solvents can form phases with each other in the reaction medium. In order to overcome these three problems, the first studies were carried out on the solvability. In the lights of findings, two organic solvent pairs were preferred as the reaction medium, as indicated in the thesis text: dimethylsulfoxide / tertbutanol and dimethylsulfoxide / 2-methyl-2-butanol. Dimethylformamide could also be used instead of dimethylsulfoxide. However, the sugar solubility was found to be relatively low in this latter solvent. More than one sugar were tried, on the grounds that each sugar could behave differently to esterification. For example, although ribose is much more commonly used as a structural unit in nature than hexoses, it has not been used in sugar esters in the current literature. There is information that the chain length of the fatty acid is effective on the reaction efficiency. For this reason, more than one fatty acid was used in the experiments. Sugar esters were analysed by thin layer chromatography, IR, and NMR, respectively. Only one sample HSQC and mass spectrometry analysis were also performed. Since enzyme-free control experiments, independent of the type of sugar and fatty acid used, gave rise to the esterification product each time, these samples were also included in the procedures and analysis methods applied to the other samples. Random samples were also selected and used for the yield analysis at ppm level by HPLC. The obtained findings reaffirmed that sugar esters could be synthesized in an organic reaction medium and in the absence of an enzyme or a defined chemical catalyst. This result has not been available in the literature and therefore it was an original finding of the treatise. This finding has also been confirmed for ribose esters with different fatty acids which are not present in the literature.

**Key Words:** Sugar, fatty acid, ester, biomolecule, biologically active molecule.

## İÇİNDEKİLER

ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvi
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
1.1 Karbohidratlar .....	2
1.1.1 Glukoz .....	3
1.1.2 Fruktoz.....	4
1.1.3 Riboz.....	6
1.2. Yağ Asitleri .....	6
1.2.1 Doymuş yağ asitleri.....	6
1.2.2 Doymamış yağ asitleri .....	8
1.3 Enzimler ve Katalitik Mekanizmalar .....	9
1.3.1 Katalizde konformasyon değişimleri .....	9
1.3.2 Çok adımlı tepkimelerin katalizi .....	10
1.3.3 Enzimlerde yapı esnekliği .....	10
1.3.3.1 Enzimlerde atomların doldurma yoğunluğu (packing density) .....	10
1.3.3.2 Çözünmezlik teorisi .....	11
1.3.3.3 Üç-nokta tutunma kuralı .....	11
1.3.4 Organik ortamlarda enzimli tepkimeler.....	11
1.3.4.1 Enzimli tepkimelerin organik ortamlarda yapılmasının avantajları .....	12
1.3.4.2 Tek fazlı sulu-organik bir çözeltilde çözündürülen enzim .....	13
1.3.4.3 İki fazlı sulu-organik bir çözeltilde çözündürülen enzim .....	14
1.3.4.4 pH hafızası .....	14
1.3.4.5 Çözücü seçimi.....	15
1.3.4.6 Enzim aktivitesine katkı maddelerinin etkisi.....	16
1.3.4.7 Süperkritik gaz tepkime ortamları .....	17
1.3.5 Biyokatalizörlerin avantajları .....	17
1.3.6 Lipazlar.....	18
1.3.6.1 <i>Candida antarctica</i> lipazı (CALB).....	19
1.3.6.2 Esterifikasyon tepkimesi.....	23
1.4 Karbohidrat Esterlerinin Sentezi .....	25
1.4.1 Karbohidrat esterlerinin organik ortamda kimyasal sentezi.....	26

1.4.2 Karbohidrat esterlerinin organik ortamlarda biyokatalizör yardımıyla sentezi	27
1.4.2.1 Çözücü hidrofobisitesi ve substrat çözünürlüğü	28
1.4.2.2 Ürün verimi	31
1.4.2.3 Enzim miktarının verime etkisi	31
1.4.2.4 Tepkime sıcaklığının enzim aktivitesi ve rezidüel enzim aktivitesi üzerine etkisi	32
1.5 Yüzey Aktif Maddeler	32
1.5.1 Sınıflandırılmaları	32
1.5.1.1 Anyonik sınıf	32
1.5.1.2 Katyonik sınıf	33
1.5.1.3 Noniyonik yüzey aktif maddeler	34
1.5.1.4 Amfoterik sınıf	34
1.5.1.5 Biosürfektanlar	35
1.5.2 Çözünmüş sürfektan özellikleri	35
1.5.3 Kritik misel derişimi değişiminin ölçümü	36
1.6 Literatür Özeti	36
<b>2. MATERYAL VE METOD</b>	<b>47</b>
2.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar	47
2.2 İmmobilize Lipazın Aktivite Tayini	48
2.3 p-Nitro Fenol Standart Eğrisinin Oluşturulması	49
2.4 Protein Tayini	49
2.5 Esterifikasyon Tepkimesi	50
2.6 Sentezlenen Şeker Esterlerinin Yapı Karakterizasyonu	52
2.6.1 Kromatografik analiz	52
2.6.1.1 İnce tabaka kromatografisi (TLC)	52
2.6.1.2 Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)	52
2.6.2 Spektral analizler	52
2.6.2.2 <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C-NMR ve 2D-HSQC analizi	52
2.7 Biyoaktivite Çalışmaları	53
2.7.1 Doku kültürü hazırlanması	53
2.7.2 XTT sitotoksosite testi	53
<b>3. BULGULAR</b>	<b>55</b>

3.1. Enzim Aktivitesi.....	55
3.1.1 Enzim aktivitesinin belirlenmesi için gerekli standart eğri çizimi .....	55
3.1.1.1 Hidroliz ürününün standart eğrisi .....	55
3.1.1.2 Sığır serum albüminin standart eğrisi .....	56
3.1.1.3 Enzim aktivite tayini sonuçları .....	57
3.1.1.4 Enzim protein miktar tayini sonuçları .....	57
3.2 İnce Tabaka Kromatografi (TLC) Analizi .....	57
3.3 Şeker Esterlerinin Yapı Analizi .....	58
3.3.2 Glukoz-oleik asit esterleri.....	65
3.3.3 Fruktoz-oleik asit esterleri.....	69
3.3.4 Fruktoz-palmitik asit esterleri.....	77
3.3.5. Fruktoz-laurik asit esterleri.....	78
3.3.6. Riboz-oleik asit esterleri.....	80
3.4 Sitotoksosite Analiz Sonuçları .....	87
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>88</b>
4.1 TLC Verileri.....	88
4.2 HPLC Verileri .....	88
4.3 IR Verileri .....	89
4.4 NMR Verileri .....	94
4.4.1 <sup>13</sup> C-NMR verileri.....	94
4.4.2 <sup>1</sup> H-NMR verileri.....	104
4.4.3 HSQC verileri .....	107
4.5 Organik Ortamlarda Şeker Çözünürlüğü .....	109
<b>KAYNAKÇA.....</b>	<b>112</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>124</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	Glukozun Fischer ve Haworth formülleri. ....	3
Şekil 1.2	D-Glukoz ve $\alpha$ , $\beta$ -Glukopiranoz halka yapıları. ....	4
Şekil 1.3	D-Glukoz halkasının konformasyonları. ....	4
Şekil 1.4	Fruktoz (furanoz halkası formu).....	5
Şekil 1.5	Fruktozun sudaki çözeltisindeki furanoz ve piranoz yapıları.....	5
Şekil 1.6	Ribozun Haworth ve Fischer formülleri.....	6
Şekil 1.7	Palmitik asidin yapısal formülü.....	7
Şekil 1.8	Laurik asidin yapısal formülü.....	7
Şekil 1.9	Oleik asidin yapısal formülü. ....	8
Şekil 1.10	<i>Candida antarctica</i> lipaz B geninin DNA ve türetilmiş amino asit sekansı. ....	20
Şekil 1.11	CALB' nin ikincil yapı diyagramı (Kabsch ve Sander, 1983).....	21
Şekil 1.12	Modifiye şeker ve lipazın kullanıldığı şeker-yağ asidi esteri sentezi.....	27
Şekil 1.13	Farklı glukoz başlangıç konsantrasyonlarına göre ester verimi. ....	31
Şekil 1.14	Sürfektan molekülünün şematik gösterimi.....	32
Şekil 1.15	Bir anyonik sürfektan örneği.....	33
Şekil 1.16	Amonyum tuzlarının genel formülü. ....	33
Şekil 1.17	Bir katyonik sürfektan örneği.....	34
Şekil 1.18	Noniyonik yüzey aktif maddelerin genel yapısı.....	34
Şekil 1.19	Amfoterik yüzey aktif maddelerin genel yapısı. ....	34
Şekil 1.20	Bazı şeker esteri sürfektan örnekleri. ....	35
Şekil 1.21	KMD (kritik misel derişim) değişimi grafiği. ....	35
Şekil 1.22	Biyosürfektan misellerin oluşumu.....	36
Şekil 1.23	Daptomisin. ....	38
Şekil 1.24	Halka lipopeptit surfaktin. ....	40
Şekil 1.25	Polimiksin B. ....	42
Şekil 1.26	Lipit A'nın ( <i>Escherichia coli</i> ) kimyasal yapısı. Polimiksin dirençli suşlarda gözlenen fosfat gruplarının amino-4-deoksi-L-arabinoz ile modifikasyonu gri renkte gösterilmiştir (Velkov ve ark., 2010).....	43
Şekil 3.1	p-NPP'ın enzimatik hidrolizi.....	55
Şekil 3.2	p-Nitrofenol standart eğrisi. ....	56
Şekil 3.3	Protein standart grafiği. ....	56
Şekil 3.4	Şeker esterlerinin TLC analiz sonuçları .....	58
Şekil 3.5	Glukoz-palmitik asit esteri sentez şeması. ....	58
Şekil 3.6	Glukoz-palmitat'ın (7Ö) IR spektrumu (ATR). ....	59
Şekil 3.7	Glukoz palmitat'ın (7Ö) <sup>13</sup> C-NMR spektrumu. ....	60
Şekil 3.8	6-O-Glukoz palmitat'ın (7K) IR spektrumu (ATR).....	61
Şekil 3.9	6-O-Glukoz palmitat'ın (7K) <sup>13</sup> C-NMR spektrumu.....	61
Şekil 3.10	6-O-Glukoz palmitat'ın (8Ö) IR spektrumu (ATR).....	62
Şekil 3.11	6-O-Glukoz palmitat'ın (8Ö) C13-NMR spektrumu.....	63

Şekil 3.12 6-O-Glukoz palmitat'ın (8K) IR spektrumu (ATR).....	64
Şekil 3.13 6-O-Glukoz palmitat'ın (8K) <sup>13</sup> C-NMR spektrumu.....	64
Şekil 3.14 Glukoz-oleik asit esterinin sentez şeması.....	65
Şekil 3.15 6-O-Glukoz oleat'ın (10Ö) HPLC verim hesabı (% 90,99; 0,66 g).....	66
Şekil 3.16 6-O-Glukoz oleat'ın (10Ö) IR spektrumu (ATR).....	66
Şekil 3.17 6-O-Glukoz oleat'ın (10Ö) <sup>13</sup> C-NMR spektrumu.....	67
Şekil 3.18 6-O-Glukoz oleat (10Ö) HSQC Spektrumu.....	67
Şekil 3.19 6-O-Glukoz oleat'ın (10K) IR spektrumu (ATR).....	68
Şekil 3.20 6-O-Glukoz oleat'ın (10K) <sup>13</sup> C-NMR spektrumu.....	69
Şekil 3.21 Fruktoz-oleik asit esterinin sentez şeması.....	69
Şekil 3.22 6-O-Fruktoz oleat'ın (9Ö) HPLC ile verim hesabı (% 98,9; 0,71 g).....	70
Şekil 3.23 6-O-Fruktoz oleat'ın (9Ö) IR spektrumu (ATR).....	71
Şekil 3.24 6-O-Fruktoz oleat'ın (9Ö) <sup>13</sup> C-NMR spektrumu.....	71
Şekil 3.25 6-O-Fruktoz oleat'ın (9K) IR spektrumu (ATR).....	72
Şekil 3.26 6-O-Fruktoz oleat'ın (9K) <sup>13</sup> C-NMR spektrumu.....	73
Şekil 3.27 6-O-Fruktoz oleat'ın (9K) <sup>1</sup> H-NMR spektrumu.....	73
Şekil 3.28 6-O-Fruktoz oleat'ın (9K) <sup>1</sup> H-NMR spektrumu (1,5-2,5 ppm).....	74
Şekil 3.29 Bileşik 12Ö'nün IR spektrumu (ATR).....	74
Şekil 3.30 6-O-Fruktoz oleat'ın (12K) HPLC ile verim hesabı (% 98,9; 0,71 g).....	75
Şekil 3.31 6-O-Fruktoz oleat'ın (12K) IR spektrumu (ATR).....	76
Şekil 3.32 Bileşik 12K'nın <sup>13</sup> C-NMR spektrumu.....	76
Şekil 3.33 Fruktoz-palmitik asit esterinin sentez şeması.....	77
Şekil 3.34 6-O-Fruktoz palmitat'ın (P1) <sup>13</sup> C-NMR spektrumu.....	78
Şekil 3.35 Fruktoz-laurik asit esterinin sentez şeması.....	78
Şekil 3.36 6-O-Fruktoz laurat'ın (L1) IR spektrumu (ATR).....	79
Şekil 3.37 6-O-Fruktoz laurat'ın (L1) <sup>13</sup> C-NMR spektrumu.....	80
Şekil 3.38 Riboz-oleik asit esterinin sentez şeması.....	80
Şekil 3.39 5-O-Riboz oleat'ın (C1/Ö) HPLC ile verim hesabı (%90,30 (0,54 g)).....	81
Şekil 3.40 5-O-Riboz oleat'ın (C1/Ö) IR spektrumu (ATR).....	82
Şekil 3.41 5-O-Riboz oleat'ın (C1/Ö) <sup>13</sup> C-NMR spektrumu.....	82
Şekil 3.42 5-O-Riboz oleat'ın (C1/K) IR spektrumu (ATR).....	83
Şekil 3.43 5-O-Riboz oleat'ın (C1/K) <sup>13</sup> C -NMR spektrumu.....	84
Şekil 3.44 5-O-Riboz oleat'ın (C2/Ö) IR spektrumu (ATR).....	85
Şekil 3.45 5-O-Riboz oleat'ın (C2/Ö) <sup>13</sup> C -NMR spektrumu.....	85
Şekil 3.46 5-O-Riboz oleat'ın (C2/K) IR spektrumu (ATR).....	86
Şekil 3.47 5-O-Riboz oleat'ın (C2/K) <sup>13</sup> C -NMR spektrumu.....	87

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 1.1</b> Doymuş yağ asitleri .....	7
<b>Tablo 1.2</b> Doymamış yağ asitleri .....	8
<b>Tablo 1.3</b> Genel organik çözücüler için log P değerleri.....	15
<b>Tablo 1.4</b> Organik çözücülerin enzim aktivitesi ile uyumluluğu.....	16
<b>Tablo 1.5</b> Enzim aktivitesi, glukoz çözünürlüğü ve farklı hidrofobisiteli çözücülerde enzim kararlılığı.....	29
<b>Tablo 1.6</b> Farklı çözücü karışımlarında, enzim aktivitesi, glukoz çözünürlüğü ve rezidüel enzim aktivitesi .....	30
<b>Tablo 1.7</b> <i>C. antarctica</i> lipazının farklı sıcaklıklardaki aktivitesi ve rezidüel aktivitesi.....	32
<b>Tablo 2.1</b> Deneylerde kullanılan kimyasallar, firmalar ve katalog numaraları.....	47
<b>Tablo 2.2</b> Deneylerde kullanılan cihazlar .....	48
<b>Tablo 2.3</b> Yapı Karakterizasyon Çalışmalarında Kullanılan Cihazlar.....	48
<b>Tablo 2.4</b> p-Nitrofenol standart eğrisi .....	49
<b>Tablo 2.5</b> Lipaz Aktivite Tayin Yöntemi .....	49
<b>Tablo 2.6</b> Glukoz ile esterifikasyonun tepkime koşulları .....	51
<b>Tablo 2.7</b> Fruktoz ile esterifikasyonun tepkime koşulları.....	51
<b>Tablo 2.8</b> Riboz ile esterifikasyonun tepkime koşulları.....	51
<b>Tablo 3.1</b> <i>Candida antarctica</i> lipazının aktivite tayini.....	57
<b>Tablo 4.1</b> Sentezlenen şeker esterlerinin HPLC dönüşüm yüzdeleri.....	88
<b>Tablo 4.2</b> Literatürde mevcut bazı şeker esterlerinin dönüşüm oranları.....	89
<b>Tablo 4.3</b> Glukoz esterlerine ait IR verileri .....	90
<b>Tablo 4.4</b> Fruktoz esterlerinin IR pikleri.....	91
<b>Tablo 4.5</b> Riboz esterlerinin IR verileri .....	92
<b>Tablo 4.6</b> Literatürde sentezlenen bazı esterlerin IR verileri.....	93
<b>Tablo 4.7</b> Glukoz-palmitat örneklerinin <sup>13</sup> C-NMR analizi .....	95
<b>Tablo 4.8</b> Glukoz oleat'ın <sup>13</sup> C-NMR ile molekül yapı tayini.....	96
<b>Tablo 4.9</b> Fruktoz oleat örneklerinin <sup>13</sup> C NMR analizi.....	97
<b>Tablo 4.10</b> Fruktoz palmitat örneklerinin <sup>13</sup> C-NMR analizi.....	98
<b>Tablo 4.11</b> Fruktoz laurat örneklerinin <sup>13</sup> C-NMR analizi.....	99
<b>Tablo 4.12</b> Riboz oleat örneklerinin <sup>13</sup> C-NMR analizi .....	100
<b>Tablo 4.13</b> Literatürdeki bazı esterlerin önemli <sup>13</sup> C NMR pikleri.....	102
<b>Tablo 4.14</b> SDBS veritabanında yeralan bazı bileşiklere ait <sup>13</sup> C pikleri.....	104
<b>Tablo 4.15</b> Bir fruktoz oleat örneğinin (9K) <sup>1</sup> H-NMR sonuçları.....	105
<b>Tablo 4.16</b> SDBS veritabanında yer alan bazı bileşiklerin proton kayma değerleri....	107
<b>Tablo 4.17</b> Bileşik 10Ö'nün proton taşıyan <sup>13</sup> C-NMR (HSQC) verileri .....	109
<b>Tablo 4.18</b> Fruktoz, glukoz ve ribozun organik ortamlarda çözünürlüğü.....	110
<b>Tablo 4.19</b> Sentezlenen şeker esterlerin çözünürlüğü.....	110



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b><math>\delta</math></b>	: Çözünürlük parametresi
<b><math>\epsilon</math></b>	: Dielektrik sabiti
<b><math>\mu</math></b>	: Dipol momenti
<b><math>\mu\text{L}</math></b>	: Mikrolitre
<b><math>\mu\text{mol}</math></b>	: Mikromol
<b>w/v</b>	: Kütle / hacim
<b>ATEE</b>	: Asetiltirozin etil esteri
<b>ATNA</b>	: Asetiltirozin p-nitrilanilit
<b>ATR</b>	: Azaltılmış toplam yansıtma
<b>BS</b>	: Biyosürefektan
<b>CALB</b>	: <i>Candida antarctica</i> Lipazı
<b>CRL</b>	: <i>Candida rugosa</i> lipazı
<b>DIP</b>	: Di-izopropil
<b>DFP</b>	: Di-izopropilfosforofloridat
<b>DMF</b>	: Dimetilformamid
<b>DMP</b>	: Bis [1,3-di (p-metoksifenil) -1,3-propanedionato]
<b>DMSO</b>	: Dimetilsülfoksit
<b>IR</b>	: Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi
<b>GCL</b>	: <i>Geotrichum candidum</i> lipazı
<b>GPL</b>	: Kobay pankreatik lipazı
<b>HPLC</b>	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
<b>HSQC</b>	: Heteronükleer Tek Kuantum Korelasyon
<b>IL</b>	: İyonik sıvılar
<b>IUB</b>	: International Union of Biochemistry
<b><math>k_{\text{kat}}</math></b>	: Enzimsiz tepkimelerin hız sabitleri
<b>kDa</b>	: Kilodalton
<b>KMD</b>	: Kritik misel derişimi
<b>log P</b>	: Çözücünün partiyon katsayısının logaritması
<b>MHz</b>	: Frekans ölçüsü (saniye başına bir milyon)
<b>NMR</b>	: Nükleer magnetik rezonans
<b>OD</b>	: Optik yoğunluk
<b>p-NP</b>	: p-nitrofenol
<b>p-NPP</b>	: p-nitrofenol palmitat
<b>pI</b>	: İzoelektrik nokta
<b>Ppm</b>	: Milyonda bir birime verilen isimdir
<b>Rf</b>	: Mevcudiyet faktörü
<b>RML</b>	: <i>Rhizomucor miehei</i> lipazı
<b>SCF</b>	: Süperkritik sıvılar
<b>SDBS</b>	: Organik Bileşikler için Spektral Veri Tabanı
<b>TBU</b>	: Tert-bütanol
<b>THF</b>	: Tetrahidrofur
<b>TLC</b>	: İnce tabaka kromatografisi
<b>Tyr</b>	: Tirozin
<b>Thr</b>	: Treonin
<b>YAM</b>	: Yüzey aktif madde
<b>2M2B</b>	: 2-metil-2-bütanol

## 1. GİRİŞ

Monosakkaritler canlılar dünyasında önemli rollere sahiptir. Heksozlar genellikle enerji kaynağı ve depo materyalidir. Çoğunlukla prokaryotlar ve hayvanlarda yaygındır. Antijen olma işlevleri de vardır. Fruktoz meyve şekeri olarak bilinir ve bitkilerde yaygındır. Ribozlar biyosferin en yaygın ve en temel moleküllerinden olup, nükleotidlerin fosfat ve bazı bağlayan temel birimidirler. Ayrıca, elektron transferinde rol alan ve yine nükleotid içeren bileşiklerin yapısında bulunurlar. Bu bakımdan moleküllerin evriminde ribozlar yapı birimi olarak seçilmiştir denilebilir.

Yağ asitleri prokaryotik ve ökaryotik hücre membranlarının temel alt bileşenleridir. Sülfatid gibi biyomoleküllerin yapılarında da yer alırlar. Monosakkarit ve yağ asitleri ester oluşturduklarında sürfektan özelliği de göstermektedir. Bazı biyosürfektanlar (BS) ikinci nesil antibiyotiklerin sentezinde ana bileşen olma özelliğine de sahiptir.

Şeker esterleri sentezi tepkime koşulları mevcut literatürde tablolar halinde verilmiştir. Katalizör olarak çoğunlukla immobilize *Candida antarctica* lipazı; şeker çözücü dimetilsülfoksit ya da dimetilformamit, tert-bütanol ya da 2-metil-2-bütanol ile birlikte, organik tepkime ortamı olarak kullanılmıştır. Enzimsiz örnekler kontrol olarak kullanılmış ve bu örneklerde ester üretiminin gerçekleşmediği rapor edilmiştir.

Projenin başlangıçtaki hedefi, enzimatik yöntemle sentezlenen şeker esteri omurgasına amino asit, fosfat, sülfat gibi alt bileşenlerin eklenmesiyle fonksiyonel grup bakımından zengin ve potansiyel olarak biyolojik aktif moleküller üretmektir. Tez kapsamında yapılan deneyler literatürde tanımlanmış ve birçok çalışmada denenmiş koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Kontrol örnekleri, diğer örnekler gibi, sırasıyla ince tabaka kromatografisi, IR ve NMR ile incelenmiştir. Tüm analiz sonuçları kontrol örneklerinde, enzim yokluğunda ve %100'e yaklaşan verimde, şeker esteri ürünlerinin bulunduğunu doğrulamıştır. Bu sonuçlar mevcut literatürdekilerle çelişmekteydi. Enzim ya da tanımlanmış bir katalizör yokluğunda şeker esteri sentezlenebildiğini ikna edici bir tarzda savunabilmek için, deneyler enzim veya tanımlanmış herhangi bir katalizörün yokluğunda birden çok şeker, yağ asidi ve tepkime ortamı hazırlanarak çeşitlendirilmiştir. Sonuçlar, yukarıda anılan üç analiz yöntemi ile incelenmiştir. Denenen üç şeker, fruktoz, glukoz ve riboz, yağ asitleri laurik-, oleik- ve palmitik

asitten ester ürünleri elde edilmiştir. Proje zamanı ve bütçesinin çoğu doğal olarak bu çalışmalara ayrılmıştır.

Yukarıda özetlenen bulgular ışığında iki farklı yorum yapılabilir: (1) tepkime sıcaklığı, 55°C, katalitik bir etki sergilemiş olabilir; (2) dimetilsülfoksitle birlikte kullanılan tert-bütanol ve 2-metil-2-bütanol katalizör rolü üstlenmiş olabilir. Çünkü bazı deneylerde, tert-bütanol veya 2-metil-2-bütanol'ün varlığına bağlı olarak farklı ester ürünler elde edilmiştir.

Bundan sonraki projelerle, enzimsiz ve tanımlanmış başka bir katalizör kullanmaksızın, büyük ölçekli sentez deneyleri kurgulanacak ve gerçekleştirilecektir. Üretilen esterler, tez projesinin asıl hedefi doğrultusunda, çeşitli fonksiyonel gruplar ve yeni yağ asidi zincirleri ile zenginleştirilerek yeni biyolojik aktif bileşiklerin sentezlenmesinde değerlendirilecektir. Bu çalışmalara biyolojik aktivite deneyleri de eklenecektir.

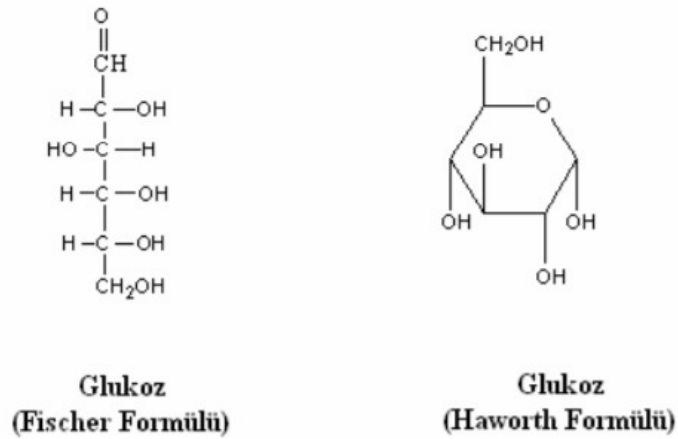
### **1.1 Karbohidratlar**

Karbohidrat monomerleri, temelde polihidroksi aldehitler veya ketonlardır. Genel formülleri  $(CH_2O)_n$  olmasına karşın, yapılarında azot, fosfor ve kükürt gibi atomları da içerirler. Yeryüzünde en bol bulunan biyomoleküllerdir. Fotosentez ile yılda, 100 milyar tondan fazla karbondioksit ve suyun, selüloz ve diğer bitkisel ürünlere dönüştürüldüğü varsayılmaktadır. Fotosentez yapmayan organizmaların enerji birimi glukozdur. Oligosakkaritlerin bağışıklık sisteminde ve patojenitede antijen, toksin ve enfeksiyon aracı olmak gibi çok yönlü işlevleri vardır. Karbohidrat polimerleri, hayvanların bağ dokularının koruyucu, mikroorganizma ve bitki hücre duvarının yapı bileşenidir. Glikokonjugatlar olarak bilinen çok bileşenli karbohidrat polimerleri, yeni sentezlenen proteinlere veya lipitlere kovalent bağlanarak hücre içinde asıl yerlerine taşınmalarında ve aynı zamanda yıkımlarına aracılık ederler (Nelson ve Cox, 2013).

Karbohidrat içeren bileşikler farmasötik, kozmetik, deterjan ve gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu maddeler ağırlıklı olarak kimyasal yöntemlerle üretilmekle birlikte, enzimatik sentez yöntemlerinin kullanımı son yıllarda artmıştır. Ayrıca, karbohidratların organik çözücülerde düşük çözünürlüğü; su, süperkritik sıvılar (SCF) ve iyonik sıvılar (IL) gibi alternatif enzimatik tepkime ortamlarının geliştirilmesine yol açmıştır (Degn ve Zimmermann, 2001).

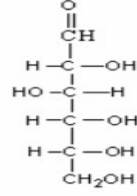
### 1.1.1 Glukoz

Glukoz, monosakkarit sınıfına ait en önemli şeker olup,  $C_6H_{12}O_6$  molekül formülüne sahiptir. Karbohidratlar, metabolik süreçlerle glukozla dönüştürülerek kullanılır. Glukoz, bütün monosakkaritler gibi beyaz kristal yapıda olup, suda çözünebilir ve tatlıdır. Suda çözüldüğünde, polarize ışığı  $\alpha$ -D-glukoz  $112^\circ$  sağa çevirirken,  $\beta$ -D-glukoz ise  $19^\circ$  sağa çevirir. Bundan dolayı glukozu dekstrozu da denilmektedir. Meyve ve sebzelerde glukoz serbest olarak bulunur. Glikojen ve selüloz da glikozit bağı oluşturarak, bileşik halinde bulunur. Glukoz, indirgeme özelliğine sahip olan bir monosakkarittir, endüstride nişastanın hidrolizi sonucu elde edilir ve şurupları fermantasyon ürünlerinde kullanılır. Glukoz, ayrıca fruktoz şuruplarının elde edilmesinde de kullanılır. Altı karbonlu olan glukoz, aldoz grubuna ait bir şekerdir ve düz molekül formülü ve halka yapısı Fischer ve Haworth tarafından belirlenmiştir (Şekil 1.1).

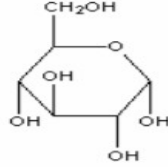


Şekil 1.1 Glukozun Fischer ve Haworth formülleri.

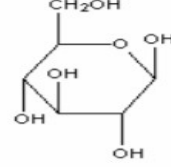
Glukozun sudaki çözeltisinde aldehit formu ile  $\alpha$  ve  $\beta$ -anomerleri belirli bir denge içinde bulunur (Şekil 1.2). Glukoz solüsyonunun, denge durumundaki özgül rotasyonu  $+52.7^\circ$ dir ve ayrıca, çözeltideki glukozun %64'ü  $\beta$ -anomeri formunda iken, %36'sı  $\alpha$ -anomeri formunda ve çok az bir kısmı da (%0,5) aldehit formunda bulunmaktadır.



**D-Glukoz**



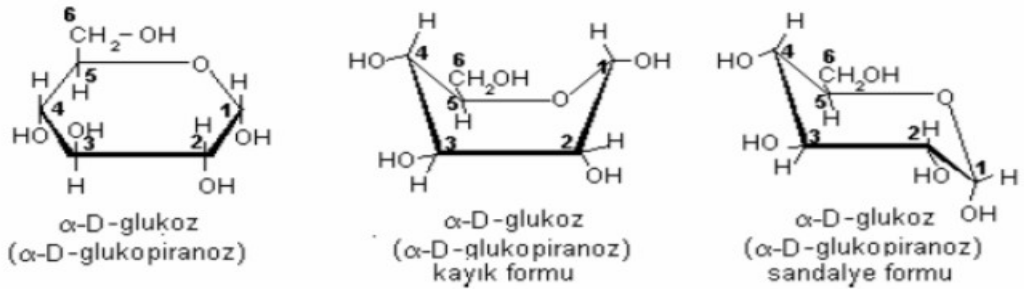
**$\alpha$ -D-Glukopiranoz**



**$\beta$ -D-Glukopiranoz**

**Şekil 1.2** D-Glukoz ve  $\alpha$ ,  $\beta$ -Glukopiranoz halka yapıları.

Altı elemanlı olan glukopiranoz halkasına ait tüm elemanlar aynı düzlem üzerinde bulunmaz, yani glukopiranoz halkası düzlemsel bir yapı oluşturmaz. Bu durumun sebebi, karbon atomuna bağlı olan grupların birbirlerini itmeleri ya da çekmeleridir. Sonuç olarak, glukopiranoz halkasının iki konformasyonu oluşur (Şekil 1.3). Bunlar, sandalye (chair) ve kayık (boat) konformasyonları olarak bilinmektedir. Sandalye yapısı, grupların geçimli olmasından dolayı daha dayanıklıdır.

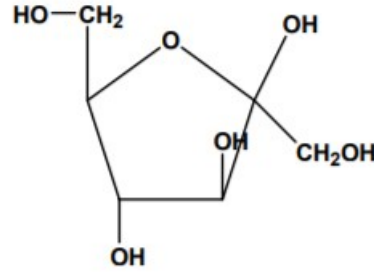


**Şekil 1.3** D-Glukoz halkasının konformasyonları.

### 1.1.2 Fruktoz

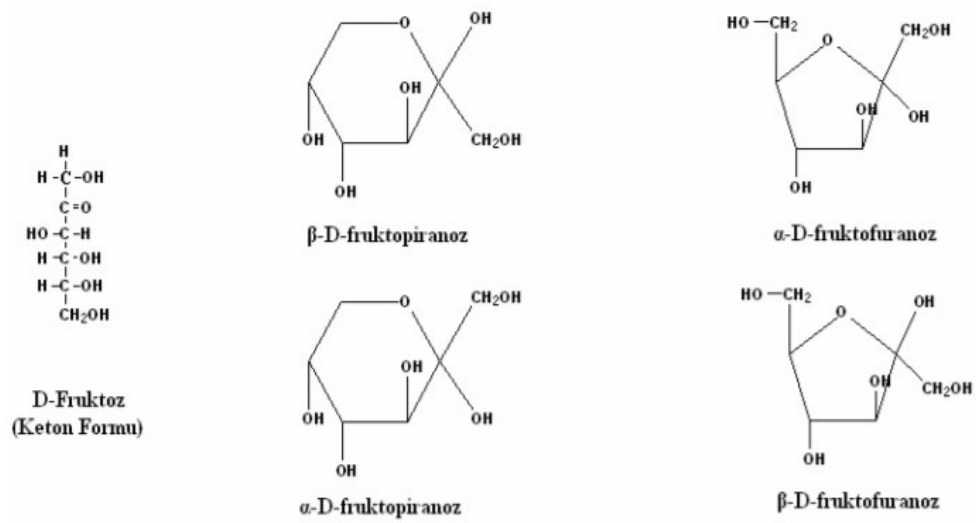
Fruktoz meyve şekeri olarak bilinen altı karbonlu ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) en tatlı monosakkarittir (Şekil 1.4) ve suda glukozu göre daha kolay çözünmektedir. Fruktoz, polarize ışığı sola çevirir ( $-90^\circ$ ) ve bu özelliğinden dolayı da levüloz olarak da adlandırılmaktadır. Fruktoz

organizmada, karaciğer ve bağırsaklarda glukozla dönüştürülerek kullanılır. Glukoz gibi indirgen bir şekerdir ve glukozla aynı osazonu oluşturmaktadır.



Şekil 1.4 Fruktoz (furanoz halkası formu).

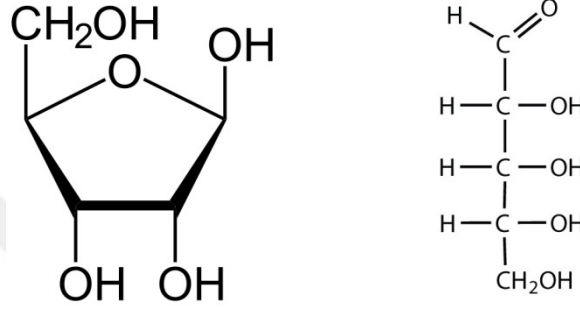
Fruktoz, bir keto heksozdur ve suda çözündüğünde hemiketal oluşturur. Hemiketal, bir keton grubu ile bir alkol grubu arasında oluşur ve oluşum mekanizması açısından aynen hemiasetallere benzediği için IUB (International Union of Biochemistry) hemiketal yerine de hemiasetal teriminin kullanılmasını önermiştir. Fruktoz suda genellikle  $\beta$ -fruktofuranoz ve daha az miktarda  $\alpha$ -fruktofuranozu oluşturur (Şekil 1.5) (Nelson ve Cox, 2013).



Şekil 1.5 Fruktozun sudaki çözeltisindeki furanoz ve piranoz yapıları.

### 1.1.3 Riboz

Phoebus Levene tarafından 1905 yılında karakterize edilen D-riboz ( $C_5H_{10}O_5$ ), doğada bol bulunan beş karbonlu bir pentozdur (Şekil 1.6). Nükleik asitlerin yapıtaşı olarak seçilmiştir ve siklik AMP (cAMP), asetil koenzim-A (Asetil CoA), ATP ve NADH gibi diğer birçok fonksiyonel molekülün yapısında yer alır.



Şekil 1.6 Ribozun Haworth ve Fischer formülleri.

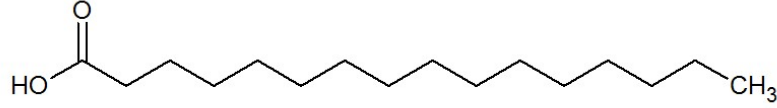
## 1.2. Yağ Asitleri

Yağ asitleri çoğunlukla çift sayıda karbon atomuna sahiptir. Doymuş ve doymamış (*cis* konfigürasyonda), düz zincirli ve dallanmış mono-karboksilik asitler olarak isimlendirilirler. Doymamış yağ asitleri içerdikleri çift bağlar nedeniyle kolay oksitlenirler. Isı, ışık ve metaller oksitlenme hızına pozitif etki yapan faktörlerdir. Yağ asitleri, esterler halinde doğal sıvı ve katı yağlarda bulunurlar. Temel yağ asit içeriği bir yağın karakterini belirlemektedir (Nelson ve Cox, 2000). Hayvan ve bitkilerden birçok doymuş ve doymamış yağ asidi karakterize edilmiştir (Tablo 1.1 ve Tablo 1.2).

### 1.2.1 Doymuş yağ asitleri

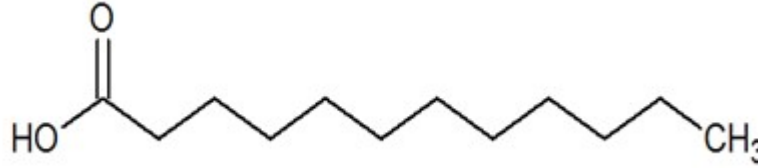
Karbon zincirinde çift bağ içermeyen yağ asitleridir. Üç ve dört karbonlu propiyonik asit ve bütirik asit uçucu yağ asitleridir. Palmitik- ve stearik asit hayvanlarda yaygındır.

Bu çalışmada doymuş yağ asitleri içinden ester sentezinde açıl verici olarak palmitik asit (Şekil 1.7) ve laurik asit (Şekil 1.8) seçilmiştir. Palmitik asit (hekzadekanoik asit) 16 karbonlu olup, baz haline palmitat denilmektedir. Kimyasal formülü  $CH_3(CH_2)_{14}COOH$  ve erime sıcaklığı  $63.1\text{ }^{\circ}C$ ' dir. Peynir, süt, tereyağı ve ette de bulunur (Nelson ve Cox, 2013).



**Şekil 1.7** Palmitik asidin yapısal formülü.

Laurik asit olarak bilinen dodekanoik asit, 12 karbonlu bir doymuş yağ asididir. Kimyasal formülü  $C_{12}H_{24}O_2$  ve erime sıcaklığı  $43,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'dir. Orta boyutlu yağ asitlerinin birçok özelliğini barındırır. Pudra halinde katı ve hafif sabun kokuludur. Tuz ve esterleri lauratlar olarak bilinir. Trigliseritlerin bir bileşenidir. İnsan sütü yağının %60'ı, hindistan cevizi sütü ve palmye meyve çekirdeğinde bulunan yağın yaklaşık yarısı laurik asittir. Az miktarda (~%3) inek ve keçi sütünde de bulunur. Diğer orta zincir uzunluğuna sahip yağlara göre, kanda üçte bir oranında daha az bulunur.



**Şekil 1.8** Laurik asidin yapısal formülü.

**Tablo 1.1** Doymuş yağ asitleri

Yağ asidinin adı	Karbon iskeleti	Yapı formülü
Asetik asit	2:0	$CH_3COOH$
Propiyonik asit	3:0	$CH_3CH_2COOH$
Butirik asit	4:0	$CH_3(CH_2)_2COOH$
Kaproik asit	6:0	$CH_3(CH_2)_4COOH$
Kaprilik asit	8:0	$CH_3(CH_2)_6COOH$
Kaprik asit	10:0	$CH_3(CH_2)_8COOH$
Laurik asit	12:0	$CH_3(CH_2)_{10}COOH$
Miristik asit	14:0	$CH_3(CH_2)_{12}COOH$
Palmitik asit	16:0	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$
Stearik asit	18:0	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$
Araşidik asit	20:0	$CH_3(CH_2)_{18}COOH$
Behinik asit	22:0	$CH_3(CH_2)_{20}COOH$
Lignoserik asit	24:0	$CH_3(CH_2)_{22}COOH$
Serotik asit	26:0	$CH_3(CH_2)_{24}COOH$

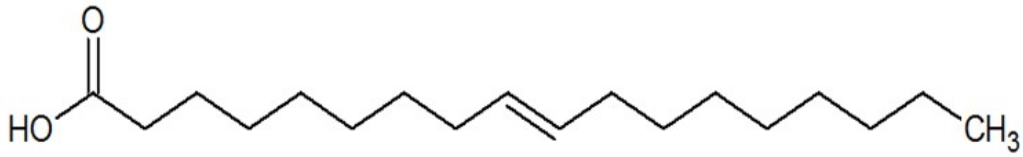


## 1.2.2 Doymamış yağ asitleri

Karbon zincirinde çift bağ bulunduran yağ asitleridir. Bazı önemli biyolojik maddelerin yapımı için organizmalar tarafından kullanılırlar. Örneğin, prostoglandinler araziidonik asitten sentezlenmektedir. Yağ doku metabolizmasında önemli rolleri vardır ve glikojen, adrenalin ve düz kaslar üzerine etkileri nedeniyle de önemli maddelerdir.

Yağ asitlerinin karboksil grupları geri dönüşümlü olarak alkollerle esterleşebilir. Esterleşme reaksiyonu, kendiliğinden yavaş, ancak ısı veya asit varlığında hızlı gerçekleşir (Nelson ve Cox, 2013).

Bu çalışmada doymamış yağ asitleri içinden ester sentezinde açıl verici olarak oleik asit seçilmiştir (Şekil 1.9). Oleik asit 18 karbonlu olup kimyasal formülü  $C_{18}H_{34}O_2$ 'dir. İki farklı kristal yapıya sahip olan oleik asidin  $\alpha$ -oleik asidi  $13,4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de,  $\beta$ -oleik asidi ise  $16,3\text{ }^\circ\text{C}$ 'de erimektedir. Molekül yapısında, dokuz ile onuncu karbonlar arasında bir tane çift bağ vardır. Oleik asit, sabun ve cila yapımında, tıpta, tekstil ve deri endüstrisinde yaygın kullanıma sahiptir.



Şekil 1.9 Oleik asidin yapısal formülü.

Tablo 1.2 Doymamış yağ asitleri

Yağ asidinin adı	Karbon iskeleti	Yapı formülü
Miristoleik asit	14: $1\Delta^9$	$CH_3(CH_2)_3CH=CH(CH_2)_7COOH$
Palmitoleik asit	16: $1\Delta^9$	$CH_3(CH_2)_5CH=CH(CH_2)_7COOH$
Oleik asit	18: $1\Delta^9$	$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH$
Vaksenik asit	18: $1\Delta^{11}$	$CH_3(CH_2)_5CH=CH(CH_2)_9COOH$
Nervonik asit	24: $1\Delta^{15}$	$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_{13}COOH$
Linoleik asit	18: $2\Delta^{9,12}$	$CH_3(CH_2)_4CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_7COOH$
Linolenik asit	18: $3\Delta^{9,12,15}$	$CH_3CH_2CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_7COOH$
Araşidonik asit	20: $4\Delta^{5,8,11,14}$	$CH_3(CH_2)_4CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_3COOH$

### 1.3 Enzimler ve Katalitik Mekanizmalar

Enzimler hayatın temeli olan ve hücrelerde gerçekleşen biyokimyasal tepkimelerin alternatifsiz katalizörleridir. Biyokatalizör adı verilen bu moleküller genellikle protein olmakla birlikte ribonükleik asit ve ribonükleoprotein yapısında olabilirler. Substratın bağlandığı ve ürüne dönüştürüldüğü katalitik mekanizma, aktif bölge, ana yapının çok küçük bir kısmını oluşturur. Bazı biyokatalizörlerin substrat bağlama ve dönüştürme bölgeleri ayrı olabilir. Bu tür enzimlere en tipik örnek genellikle dimer olarak iş gören deoksiribonükleazlardır.

Bir enzimin katalitik etkisinin atomik seviyede tanımlanması enzim mekaniği araştırmalarının birincil amacıdır. Kemotripsin, ticari olarak bulunabilmesi ve basit bir tepkimeyi katalizlemesi nedeniyle, bu amaç için uygun enzimlerden biri olmuştur. Substratın katalitik bölgeye bağlanması hidrofobik, elektrostatik, dipolar etkileşimler ve hidrojen bağları ile olur. Amino asitlerin yan zincirinde bulunan fonksiyonel gruplar (örneğin: glutamat ve aspartatın karboksili; lizinin amini; histidinin imidazolü; serin, treonin ve tirozinin hidroksili, ve sisteinin tiol grubu) kimyasal katalizi gerçekleştirir. Bu gruplarla substratlar arasında oluşan elektrostatik bağlar ve hidrojen bağları asit-baz, nükleofilik ve elektrofilik tepkimelerine yol açar.

Amino asitlerin çok sınırlı sayıda fonksiyonel gruba sahip olması, koenzimlere ve kofaktörlere duyulan gereksinimi açıklayabilir. Bu moleküller de substrat üzerinde fonksiyonel grup benzeri fizikokimyasal etkileşimler gerçekleştirir.

#### 1.3.1 Katalizde konformasyon değişimleri

Çoğu enzim, konformasyon esnekliği gerektiren katalitik özellikler sergilemektedir. Teorik olarak atomların bir protein içindeki titreşim özellikleri, molekül içinde çok yüksek frekanslı hareketleri zorunlu kılar (Karplus, 2002). Örneğin, substrat tarafından indüklenen konformasyon değişimi, hegzokinazın MgATP'a bağlanması, ancak katalizlememesinden anlaşılabilir (Koshland ve Neet, 1968). Glukozun hegzokinaza bağlanması enzimin aktif bölgesinin bulunduğu yarığın kapanmasına ve bu yarığın bulunan su moleküllerinin uzaklaşmasına yol açmaktadır. Böylelikle hegzokinaz, fosforil transferini yalnızca glukozun altıncı karbonuna, C6(OH)'a, yapabilmektedir. İzleyen çalışmalar, bu mekanizmanın diğer enzimlerde de yaygın olarak bulunduğunu göstermiştir.

### 1.3.2 Çok adımlı tepkimelerin katalizi

Çoğu enzimatik tepkime birden fazla kimyasal işlem içermektedir. Bunlar aslında ara ürünlerin oluşturulduğu adımlardır. Bir peptit bağı hidrolizi açılasyon ve deaçilasyon olmak üzere iki aşamalıdır. Bu durumda aynı aktif bölge iki farklı tepkimeyi katalizlemektedir. Örneğin, tirozil tRNA sentetazın tirozil tRNA<sup>Tyr</sup>'i üretmesinde ilk adım bir fosforil transferini ve ikinci adım açıl transferini içermektedir. Açıl transferi gerçekleşirken, tirozil bağlandığı bölgeyi terk etmemektedir. Bu iki tepkime tamamen farklı olmasına karşın aynı aktif bölgede gerçekleşir. Burada iki farklı tepkimenin aktif bölgede farklı yapısal değişmelere yol açması kaçınılmazdır.

### 1.3.3 Enzimlerde yapı esnekliği

Nanosaniye ölçeğinde, yüksek frekanslı yapı hareketlerini anlamak için enzimlerin floresan özelliklerinden yararlanılmıştır. Oksijen, proteinin neresinde bulunursa bulunsun, bütün triptofan birimlerinin floresan özelliğini yok edebilmektedir (Lakowicz ve ark., 1973). Floresans olayında, bir proteinin birincil yapısında yer alan triptofan birimleri dışarıdan verilen ultraviyole ışığı absorplar ve eksite olur. Sonra bu birimler, ışıktan aldığı enerjiyi salıvererek yeniden önceki konumuna dönerler. Süreç esnasında enerjinin bir kısmı ısı şeklinde kaybedilir. Bu nedenle triptofan birimlerinin geriye salıverdiği ışık, ultraviyole ışıktan daha uzun dalga boyuna sahip olan floresanstır. Organik moleküller genellikle ultraviyole aralığındaki ışığı emer ve görünür ışık aralığında salıverirler. Proteinlerde triptofanın eksite olma ömrü birkaç nanosaniyedir. Bir proteine yüksek basınçlı oksijen verildiğinde oksijen molekülleri triptofan birimleri ile çarpışarak floresan ışık yayma özelliklerini yok ederler. Oksijen, proteinin iç kısmında derinlere gömülü triptofan birimlerinin tümüne ulaşabilmektedir. Oksijenin molekül hacmi, bir proteinin atomları arasındaki boşluktan oldukça büyüktür. Bu nedenle bir proteinin içine oksijen molekülünün girebilmesi ve yayılması için proteinin iç kısmının esnek ve boşluklu olması gerekmektedir.

#### 1.3.3.1 Enzimlerde atomların doldurma yoğunluğu (packing density)

Bir proteinin içine oksijen moleküllerinin difüzyonu yapısındaki atomların doldurabilirliği ile ters orantılıdır. Önceleri bir proteinin iç kısmının yağ damlacıklarına benzediği düşünülmekteydi. Bunun nedeni iç kısımda hidrofobik birimlerin ağırlıkta olmasıydı. Daha sonra yapılan deneyler proteinlerin iç kısımlarının yağa benzeyemeyeceğini göstermiştir (Klapper, 1971; Richards, 1974). Protein kristal yapı

analizleri, atomların doldurma yoğunluklarının 0,75 aralığında olduğunu; yani, proteinin iç hacminin %75'ini atomların işgal ettiğini göstermiştir. Bu sonuçlardan proteinin iç kısmının sıvı ya da katı değil, ancak mumsu bir yapıda olabileceği öne sürülmüştür. Çünkü sıvıların doluluk yoğunluğu 0,5'ten daha az ve katılarınki ise 0,6'dan büyüktür. Bir ribonükleaz ile yapılan araştırmalar, doluluk yoğunluğunun değişken olduğunu göstermiştir. Aktif bölge boş iken, yüzeye yakın kısımlarında doluluk yoğunluğunun 0,60 ile 0,65; derinlerde ise 0,70 ile 0,85 aralığında olduğu saptanmıştır (Richards, 1974). Buradan, bir konformasyon değişmesinin proteinin toplam hacminde önemli bir artışa neden olamayacağı, böyle bir değişimin atomlar arasındaki hassas düzenli van der Waals etkileşimini yeniden yapılandırması gerektiği sonucuna varılmıştır.

### **1.3.3.2 Çözünmezlik teorisi**

Enzimli tepkime kinetikleri gaz fazı tepkime kinetiklerine benzemektedir (Dewar, 1986). Bir substrat enzimin aktif bölgesine girdiğinde, burada bulunan su moleküllerinin tümüyle yer değiştirir. Böylelikle aktif bölgede tepkime kuru (çözücüsüz) bir ortamda gerçekleştiği için bir gaz fazı tepkimesini taklit etmiş olur. Bu teori nispeten küçük substrat moleküllerinin, daha büyük analoglarından, niçin daha yavaş dönüştürüldüklerini açıklayabilmektedir; küçük substrat molekülleri, aktif bölgedeki su moleküllerinin tümünü yerinden edememektedir.

### **1.3.3.3 Üç-nokta tutunma kuralı**

Bir molekülün iki enansiyomeri aktif bölgeye bağlanmak için rekabet eder. Yarışı, daha düşük bağlanma enerjisine sahip izomer kazanır. Enzimlerin substrat moleküllerin yalnızca bir izomerini dönüştürebilmelerinin nedeni budur. Kiralite üç boyutlu bir mekân özelliği olduğu için, doğru izomer seçimi aktif bölgede üç boyutlu tanımayı gerektirir. Bu yüzden doğru izomer aktif bölgeye en az üç farklı noktadan tutunmalıdır (Ogston, 1948). Katalizi sonuçlandırmak için ayrıca birçok fonksiyonel grup ve bazen de koordine metal iyonları, enzimin aktif bölgesinde birlikte çalışmak zorundadır. Böylelikle polaritelere, nükleofil/elektrofil ve asit/baz'a dayalı organik kimya tepkime mekanizmaları, enzimli katalizlerde de geçerli olabilmektedir.

### **1.3.4 Organik ortamlarda enzimli tepkimeler**

Su, organik kimya tepkimeleri için genellikle zayıf bir çözücü ortamdır. Tepkime sona erdiğinde suyun uzaklaştırılması, yüksek kaynama ve buharlaşma sıcaklığı nedeniyle, zor ve maliyetlidir. Ayrıca hidroliz, rasemizasyon, polimerizasyon ve bozunma gibi yan

tepkimler su varlığında daha kolay gerçekleşmektedir. Buna karşın, enzimlerin suda en aktif olduğu dogması ve organik çözücülerin sadece enzimlerin katalitik gücünü yok ettiği varsayımı nedeniyle, geleneksel biyokataliz, temelde sulu çözeltilerde yapılmıştır. Ancak, doğada birçok enzimin veya çoklu enzim komplekslerinin hidrofobik ortamlarda, örneğin, bir membran varlığında veya ona bağlı olarak işlediği (Borgstrom ve Brockman, 1984) hatırd tutulduğunda, yaygın kabul gören bu görüş çok kolaycı olmaktadır. Öte yandan, enzimin aktif konformasyonunun sürekliliği bir miktar suyun tepkime ortamında var olmasına bağlıdır (Schultz ve Schirmer, 1979). Organik bir tepkime ortamında katalitik aktiviteyi korumak için gerekli su, enzimden enzime değişiklik gösterdiği için, deneyerek belirlenmelidir (Bell ve ark., 1995). Örneğin, bir  $\alpha$ -kimotripsine karşılık sadece 50 su molekülünün gerekli olduğu ve bu miktarın enzim üzerinde tam ve bir tek su tabakası oluşturmaya yetmediği saptanmıştır (Zaks ve Klivanov, 1986). Subtilisin ve değişik lipazlar eser miktarda suya ihtiyaç duymaktadır (Zaks ve Klivanov, 1988). Ancak, polifenil oksidaz gibi bazı enzimlerin oldukça 'ıslak' bir ortamı tercih ettiği bilinmektedir (Kazandjian ve Klivanov, 1985).

Hücre gibi biyolojik bir sistemde mevcut su, fiziksel olarak, farklı birkaç kategoriye ayrılabilir (Cooke ve Kuntz, 1974; Bone, 1987; Rupley ve ark., 1983). Suyun çoğu (>%98) gerçek bir çözücü ('asıl su') işlevi görür iken, küçük bir kısmı enzimlerin yüzeyine sıkıca tutunmuş halde bulunur ve buna bağlı su denilmektedir. Bağlı su sıklıkla 'yapısal su' olarak da anılmaktadır. Organik ortamda gerçekleştirilen enzimli bir katalizde bu yapısal su etkilenmeden kaldığı sürece, tepkime ortamının geri kalanını organik bir ortam ile değiştirmek mümkün olmalıdır.

#### **1.3.4.1 Enzimli tepkimelerin organik ortamlarda yapılmasının avantajları**

Organik ortamlarda yapılan tepkimelerin genel verimi, özütleme basamağının çıkarılması nedeniyle, genellikle daha iyidir. Bu nedenle, emülsiyonların oluşmasına neden olan kaybın önüne geçilebilir ve ürünün geri kazanımı suya göre daha düşük sıcaklıkta kaynayan organik çözücülerin kullanımı ile kolaylaşır. Organik bir ortam canlılığın sürdürülmesi için elverişsiz koşullara sahiptir. Bu nedenle dışarıdan kontaminasyon riski ihmal edilebilir olduğundan endüstriyel ölçekli sistemler için bile sterilizasyon gerekmemektedir.

Hidrofobik substratlar, artan çözünürlükleri nedeniyle, daha yüksek hızlarda ürüne dönüştürülür (Cotterill ve ark., 1991). Lipofilik substratlar ve/veya ürünlerin neden

olduğu enzim deaktivasyonu ve/veya inhibisyonu en aza indirgenmiştir; çünkü, bunların organik ortamda çözünürlüğü enzim yüzeyinde azalmış bir lokal konsantrasyona yol açar. Hassas grupların (örneğin epoksitler, asit anhidritleri) (Yamamoto ve ark., 1989) hidrolizi, kinonların polimerleşmesi (Kazandjian ve Klibanov, 1985), siyanohidrinlerin rasemizasyonu (Wang ve ark., 1989) veya açıl göçü (Laumen ve ark., 1990) gibi birçok yan tepkimeler suya bağımlıdır ve bu nedenle organik bir ortamda büyük bir ölçüde baskılanırlar.

Enzimlerin immobilizasyonu gerekmez; çünkü bunlar, organik ortamda çözünmezliklerinden dolayı, tepkimeden sonra basit filtrasyon ile geri kazanılabilirler. Ancak, istenirse, deneysel olarak diatomik toprak (selit), silika veya cam boncuklar gibi ucuz makroskobik taşıyıcıların yüzeyine basit adsorpsiyonları mümkündür. Taşıyıcı üzerinden ortama desorpsiyon – sızma – lipofilik bir çevre tarafından büyük bir oranda engellenir.

Enzim denatürasyonuna neden olan tepkimelerin çoğu hidrolitik tepkimeler olduğu ve bu nedenle su gereksindiği için, enzimlerin düşük su içeren bir ortamda daha kararlı olmaları gerektiği beklenebilir (Aldercreutz ve Mattiasson, 1987). Örneğin, domuz pankreası lipazı %99'luk bir organik ortamda ve 100 °C'de çok uzun süre aktif kalmaktadır (Zaks ve Klibanov, 1984).

Organik bir ortamda termodinamik denge hidrolizden senteze daha kolay kayabilmektedir. Bu nedenle, hidrolaz enzimleri (temelde lipazlar ve proteazlar) kullanılarak esterler (Langrand ve ark., 1986; Koshiro ve ark., 1985; Inagaki ve Ueda, 1987), poliesterler (Morrow ve Wallace, 1990; Margolin ve ark., 1991), laktonlar (Gutman ve Bravdo, 1989; Makita ve ark., 1987), amitler (Kitaguchi ve ark., 1989; Gotor ve ark., 1988) ve peptitler (Kullmann, 1987) kemo-, regio- ve enansiyo seçimli bir tarzda sentezlenebilmektedir.

#### **1.3.4.2 Tek fazlı sulu-organik bir çözeltide çözündürülen enzim**

Enzim, substrat ve/veya ürün, su ve dimetil sülfoksit, dimetil formamit, tetrahidrofur, dioksan, aseton veya metanol ya da tert-bütanol gibi düşük alkollerden biri gibi suya karışabilen bir organik ko-çözücüden oluşan tek fazlı bir çözeltide çözündürülür. Bu tip sistemler temel olarak tek başına bir sulu sistemde nadir çözünen ve bu nedenle düşük tepkime hızlarında tepkiyen lipofilik substratların dönüşümü için kullanılmaktadır. Bazı durumlarda, esteraz ve proteazların seçicilikleri suya karışabilen organik çözücünün

(ko-çözücü) kullanılmasıyla artırılabilir. Pratik bir kural olarak, suya karışabilen organik çözücüler toplam hacmin ~%10'una kadar konsantrasyonlarda kullanılabilir. Sadece bazı ender enzim/çözücü kombinasyonlarında %50-70 bulunmaktadır. Organik çözücü oranı belirli bir eşik değerini geçerse, enzim yüzeyinden alınan esansiyel bağlı su deaktivasyona neden olur. Enzim çok düşük su içerikli ortamlarda ve suya karışabilen saf organik çözücülerde nadiren katalitik olarak aktif kalmaktadır; genellikle subtilisin ve bazı lipazlar, örneğin *Candida antarctica* lipazı, gibi birkaç enzim bu tür ortamlarda aktif konformasyonlarını koruyabilmektedir (Therisod ve Klivanov, 1986; Riva ve Klivanov, 1988; Riva ve Klivanov ve ark., 1988). Sıcaklığı 0 °C'nin altında tutulan tepkimelerde suya karışabilen organik çözücüler, sulu sistemlerin donma sıcaklıklarını düşürmek için başarılı olarak kullanılmışlardır (Douzou, 1977; Fink ve Cartwright, 1981; Sakai, 2004, Sakai ve ark., 2005).

#### **1.3.4.3 İki fazlı sulu-organik bir çözeltide çözüldürülen enzim**

İki makroskobik fazdan oluşan tepkime sistemleri, yani çözülmüş enzimi içeren sulu faz ve (tercihen lipofilik ve yüksek molekül ağırlıklı) hidrokarbonlar, eterler veya klorlanmış hidrokarbonlar gibi polar olmayan organik çözücüler, biyokatalizörlerin organik fazdan mekânsal ayrılmasını başarmak için avantajlı olabilirler (Carrea, 1984; Halling, 1989; Anderson ve Hahn- Hägerdal, 1990). Böylelikle, biyokatalizör elverişli bir sulu çevrededir ve substrat ve ürünün çoğunun bulunduğu organik çözücü ile doğrudan bir iletişim halinde değildir. Bu nedenle, organik materyalin sulu fazdaki sınırlı konsantrasyonu, enzim inhibisyonunu önleyebilir. Buna ek olarak, ürünün enzim yüzeyinden uzaklaştırılması tepkimeyi tamamlanmaya götürür. Böyle iki fazlı sistemlerde enzimli tepkimenin sadece sulu fazda ilerlediği gerçeği nedeniyle, iki faz arasında, biyokatalizöre ve biyokatalizörden, yeterli miktarda tepkiyen(ler) ve ürün(ler) transferi gereklidir (Lilly, 1982). Böyle sistemlerde çalkalama veya karıştırmanın temel bir parametre olduğu açıktır.

#### **1.3.4.4 pH hafızası**

Ayrı bir sulu fazdan yoksun organik çözeltilerde pH ölçümü zordur (Hsu ve ark., 1990) ve pH enzimin iyonlaşma konformasyonunu ve böylelikle aktivite, seçicilik gibi özelliklerini belirlemektedir. Bir protein organik bir çözücüye konulduğunda yüklü grupları sabitlenmiş olur. Bu nedenle, liyofilizasyon ile veya optimum pH'da

çöktürülerek geri kazanılan katı enzimler için bir 'pH-hafızası' oluşturulabilir (Clark, 1994).

#### 1.3.4.5 Çözücü seçimi

Bir organik çözücünün enzimin yüksek aktivitesi ile 'uyumluluğuna' bir ölçü sağlamak için, çözücünün hidrofobikliğini tanımlayan Hildebrandt çözümlülük parametresi ( $\delta$ ), dielektrik sabiti ( $\epsilon$ ) ve dipol momenti ( $\mu$ ) gibi birçok parametre önerilmiştir. Ancak, en güvenilir sonuçlar, 1-oktanol ve su arasında herhangi bir çözücünün partiyon katsayısının logaritması ( $\log P$ ) kullanılarak elde edilmektedir (Tablo 1.3) (Laane ve ark., 1987).

**Tablo 1.3** Genel organik çözücüler için  $\log P$  değerleri

Çözücü	$\log P$	Çözücü	$\log P$
Dimetilsülfoksit	-1,30	Dipropil eter	1,90
Dioksan	-1,10	Kloroform	2,00
N,N-dimetilformamit	-1,00	Benzen	2,00
Metanol	-0,76	Pentil asetat	2,20
Asetonitril	-0,33	Toluen	2,50
Etanol	-0,24	Oktanol	2,90
Aseton	-0,23	Dibütil eter	2,90
Tetrahidrofuran	0,49	Pentan	3,00
Etil asetat	0,68	Karbon tetraklorür	3,00
Piridin	0,71	Sikloheksan	3,20
Bütanol	0,80	Hekzan	3,50
Dietil eter	0,85	Oktan	4,50
Propil asetat	1,20	Dekan	5,60
Bütil asetat	1,70	Dodekan	6,60



**Tablo 1.4** Organik çözücülerin enzim aktivitesi ile uyumluluğu

<b>log P</b>	<b>Suya- Karışabilirlik</b>	<b>Enzim Aktivitesi üzerine Çözücü-Etkisi</b>
<b>-2,5'ten 0'a</b>	Tam karışabilir	%10-50 v/v konsantrasyonlarda enzimi deaktive etmeksizin yalnızca lipofilik substratların çözündürülmesinde kullanılabilir.
<b>0'dan 1,5'e</b>	Kısmen karışabilir	Ciddi enzim bozunmasına yol açar, yalnızca olağanüstü kararlı enzimler için kullanılabilir, sıradan proteinler için deaktivasyon yaygındır.
<b>1,5'ten 2,0'a</b>	Az karışabilir	Bir kısım enzim bozunmasına neden olur, birçok enzimle dikkatli kullanılabilir fakat aktiviteler sıklıkla tahmin edilememektedir.
<b>&gt;2,0</b>	Karışmaz	İhmal edilebilir enzim bozunmasına sebep olur ve yüksek aktivitenin korunumunu temin eder.

#### **1.3.4.6 Enzim aktivitesine katkı maddelerinin etkisi**

Aktivatörler veya artırıcılar olarak belirtilen enzim kararlılığını koruyan ajanların düşük konsantrasyonlarda eklenmesi yararlı olabilir (Tomazic, 1991; Yamane ve ark., 1990; Freeman, 1984). Kararlılık koruyucu ajanların protein üzerine etkisi moleküler düzeyde çok az anlaşılmıştır; bu da bu tekniği ampirik yapmaktadır ve sadece birkaç katkı maddesi grubu önerilmektedir. Karbohidratlar, şeker alkollerini veya gliserol gibi polialkoller ve suyun yapısına belirli bir yapısal benzerliği olan polimerlerin (polietilen glikol, polivinil alkol gibi), inaktif proteinlerin (sığır serum albümini) yanı sıra, proteinleri kararlı kıldıkları iyi bilinmektedir (Mejri ve ark., 1998; Colaco ve ark., 1996). Küçük (N,N-dimetil formamit ve formamit gibi) polar organik moleküllerin 'moleküler kayganlaştırıcı' gibi davranarak tepkime hızlarını artırdıkları bilinmektedir (Yamamoto ve Kise, 1994; Reslow ve ark., 1992; Kitaguchi ve Klivanov, 1989). Dengeyi arzu edilen yöne kaydıran tuzların (LiCl, NaCl, KCl (Okamoto ve Ueji, 1999)) veya zayıf organik bazların (trietilamin, piridin gibi (Ke ve Klivanov, 1999; Parker ve ark., 1998)) eklenmesi, substrat ve/veya ürünün tuz-çiftleri oluşturmaları yoluyla, tepkime hızını ve enansiyomer seçiciliğini iyileştirebilmektedir.

#### **1.3.4.7 Süperkritik gaz tepkime ortamları**

Karbondioksit, freonlar ( $\text{CHF}_3$  gibi) gibi süperkritik gazlar, hidrokarbonlar (etan, eten, propan) veya çözünme özellikleri hekzan gibi bir hidrokarbona benzeyen inorganik bileşikler ( $\text{SF}_6$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ), lipofilik organik bileşiklerin enzimatik dönüşümü için tek başına ya da diğer çözücülerle birlikte kullanılabilirler (Nakamura, 1990; Mesiano ve ark., 1999; Russell ve Beckman, 1991; Aaltonen ve Rantakylä, 1991). Enzimler bu ortamlarda lipofilik organik çözücülerde oldukları kadar kararludur. Süperkritik gazların kullanımı belirli bir enzim sınıfı ile sınırlı değildir; ancak hidrosilasyon (Hammond ve ark., 1985) ve dehidrojenasyon tepkimelerinin (Randolph ve ark., 1988) yanı sıra, esterifikasyon (Marty ve ark., 1990), trans-esterifikasyon (Chi ve ark., 1988; Pasta ve ark., 1989), alkoliz (van Eijs ve de Jong, 1989) ve hidroliz (Randolph ve ark., 1985) gibi genellikle hidrolazların biyokatalizör olarak kullanıldığı tepkimelerde yaygın çözücü ortamlarını oluştururlar. Bu tip çözücülerin en çarpıcı avantajları toksisiteden yoksun olmaları, kolay uzaklaştırılmaları ve düşük viskoziteli olmalarıdır. Düşük viskozite, tepkime içinde difüzyonun yüksek olmasını sağlar. Ek olarak, sıcaklık ve basınçta küçük değişiklikler, bir enzimin tepkime hızı veya stereo-seçicilik gibi katalitik özelliklerini kontrol etmeye izin veren kritik noktaya yakın büyük çözünürlük değişmelerine neden olabilir (Beckman ve Russell, 1993). Ancak, bazı dezavantajları da vardır. Yüksek basınç (100 atm ve üzeri) dayanıklı cihazlara gereksinim vardır. Tepkime sonunda basıncın düşürülmesi enzim denatürasyonuna neden olabilir (Kasche ve ark., 1988; Chulalaksananukul ve ark., 1993). Bazı süperkritik gazlar enzim yüzeyinde bulunan hassas gruplar ile tepkimeye girerek aktivite kaybına neden olabilir. Süperkritik gazlar kozmetik ve besinler için 'doğal' bileşiklerin üretiminde temel çözücüler olarak kullanılmaktadır.

#### **1.3.5 Biyokatalizörlerin avantajları**

Kimotripsin en yaygın çalışılan ve mekaniği en iyi anlaşılmış olan enzimlerden biridir. Protein hidrolizini özellikle fenilalaninil, tirozil, ve triptofanil gibi hidrofobik asit birimlerinin karboksamit gruplarını katalizler. Kimotripsin asetiltirozin etil esteri (ATEE) ya da asetiltirozin p-nitranilil (ATNA) katalizleyebilmektedir. Kinetik olarak bir-substratlı enzimatik tepkimeler gibi davranan bu tepkimeler geri dönüşümsüz olduğundan hızları spektrofotometre ile ölçülebilmektedir.

Kimotripsin, pH: 7'de kendiliğinden gerçekleşen bir peptit bağı hidrolizini  $10^{12}$  kat artırabilmektedir. Bu enzimin aktif bölgesi 195. pozisyonundaki serin biriminin belirlenmesiyle karakterize edilmiştir. Kimotripsin ve diğer serin proteaz ve serin esterazlar, di-izopropilfosforofloridat (DFP) (Jansen ve Balls, 1952) kullanılarak inaktifleştirilebilmektedir. DFP'nin kimotripsin ile tepkimesi HF ve di-izopropilkimotripsini (DIP-kimotripsin) verir. Enzim burada fosforillenmektedir ve di-izopropil, serin 195'e bağlanmaktadır (Hartley ve Kauffman, 1966; Hess, 1971). Serin 195'in kimotripsinin katalik bölgesinde yer aldığı böylelikle saptanmıştır (Sigler ve ark., 1968).

Enzimler biyolojik tepkimeleri sıklıkla tasavvur bile edilemeyecek hızlarda katalizlemektedir. Enzimsiz tepkimelerin hız sabitleri ( $k_{kat}$ )  $10^{-17}$  ile  $10^{-1} s^{-1}$  iken, enzimli tepkimelerin hız sabitleri  $10$  ile  $10^7 s^{-1}$  aralığındadır. Enzimli tepkime hızlarının üst sınırı, enzimin substrat bağlanması için gerekli difüzyon hızı sabitlerine,  $10^7$  ile  $10^8 M^{-1} s^{-1}$ , yaklaşmaktadır.

### 1.3.6 Lipazlar

Lipazlar (EC 3.1.1.3), lipit-su arayüzünde trigliseritleri hidrolize edebilen çeşitli enzim gruplarından oluşur. Etkinlik, enzimin lipit yüzeyine bağlandığında konformasyonel değişikliğe uğramasıyla dramatik bir şekilde artar. Arayüz aktivasyonu, lipazları suda çözünür esterleri hidroliz eden diğer esterazlardan ayırır. Etkinlikte ve substrat özgünlüğünde geniş bir varyasyon gösteren çok sayıda lipaz karakterize edilmiştir (Rogalska ve ark., 1993). Trigliseritler, her üç ester bağından veya özel olarak yalnızca bir veya ikinci konumdan bölünebilir. Lipazlar, yağ asitlerinin uzunluğuna bağlı olarak farklı özgünlükler gösterebilmektedir. Organik ortamda, enzim davranışı sentez yönünde değişir; lipazlar bu durumda trans-esterifikasyon ya da lipit türevleri üretmek için kullanılabilir. Üç boyutlu kristal yapıları bilinen beş lipaz pek çok yapı benzerliği göstermektedir (Brad ve Brzozowski, 1990; Winkler ve ark., 1990; Schrag ve ark., 1991; Grochulski ve Li, 1993; Noble ve ark., 1993). Tümünde serin proteazlardakine benzer katalitik bir üçlü amino asit birimi vardır (Wright ve ark., 1969; Blow ve ark., 1969). Üçlü birim Ser-His-Asp/Glu'dir. Katalitik serin, genellikle korunan GxSxG dizisi ile tanımlanır (Boel ve ark., 1988). Yapıları karakterize edilen tüm lipazlarda nükleofilik birim serin amino asididir. GCL (*Geotrichum candidum* lipazı) ve CRL (*Candida rugosa* lipazı), genel bir dizi homolojisi ve çok benzer yapıya sahip olmasına karşın, kapak bölgeleri oldukça farklıdır. *Pseudomonas glumae* lipazı yapısı belirlenen

ilk bakteri lipazıdır (Noble ve ark., 1993). Bu yapı,  $\alpha/\beta$ -hidrolaz tipi katlanmaların çoğunu içerir; ek olarak bir kalsiyum bağlama yeri bulunmaktadır. İlgili bir enzim olan kütinazın yapısı da belirlenmiştir (Martinez ve ark., 1992). Bu enzimin doğal substratı olan kütin, bitkilerin yüzeyinde bulunan bir lipit polyester matrisidir. Kütinaz lipolitik aktiviteye sahiptir, ancak arayüz aktivasyonu göstermez ve kapak yapı bulundurmaz. HPL'nin (insan pankreas lipazı) kristal yapısından yola çıkılarak kobay pankreatik lipazı (GPL) için bir model yapı inşa edilmiştir (Hjorth ve Carrir, 1993). Kapak bölge dışında kalan bölgelerde iki enzim arasında dizi benzerliği yüksektir. GPL aynı zamanda bir fosfolipazdır.

Kristallerden ortaya çıkarılan bu beş lipazın yapısı, çoğunlukla,  $\alpha$ -sarmallar ile çevrili,  $\beta$ - katlanmalardan oluşmaktadır. HPL, ayrıca, lipit bağlamaktan sorumlu ve kolipaz adı verilen bir domaine sahiptir. Yapıları bilinen lipazların çoğunluğunda katalitik bölgeyi örten hareketli bir kapak (lid) vardır. Enzim inaktif iken kapak kapalıdır. Bu nedenle kapak açılmasının arayüz aktivasyonunda kilit bir rol oynadığı düşünülmektedir. Bu temel mekanizma RML lipazı (*Rhizomucor miehei* lipazı) (Brzozowski ve Derewenda, 1991) ve HPL (van Tilbeurgh ve ark., 1993) için gösterilmiştir. Kapağın hareket etmesiyle aktif bölgenin substrat giriş yüzeyi genişler ve bölge hidrofobikliği artar. GCL ve CRL, genel dizi homolojisi göstermemelerine karşın, benzer katlanmaya sahip olduklarından  $\alpha/\beta$ -hidrolaz ailesi içinde sınıflandırılmıştır (Ollis ve Cheah, 1992).

### 1.3.6.1 *Candida antarctica* lipazı (CALB)

Maya *Candida antarctica* yüksek sıcaklıklarda bile, trigliseritlere karşı, özgün olmayan bir lipaz aktivitesi sergilemektedir (Michiyo, 1989). Bu organizmadan izoelektrik noktaları ve molekül ağırlıkları farklı, A ve B olarak adlandırılan iki lipaz izole edilmiştir (Heldt-Hansen ve ark., 1989). Lipaz A (45 kDa, pI 7.5) yüksek sıcaklıkta daha kararlıdır ve spesifik aktivite göstermez. Lipaz B (CALB; 33 kDa, pI 6.0) hidroliz (Rogalska ve ark., 1993) ve organik sentezde (Frykman ve ark., 1993; Mattson ve ark., 1993; Partali ve ark., 1993) yüksek stereo-seçiciliğe sahiptir; böylelikle glikolipit sentezinde önemli bir biyokatalizördür (Adelhorst ve ark., 1990).

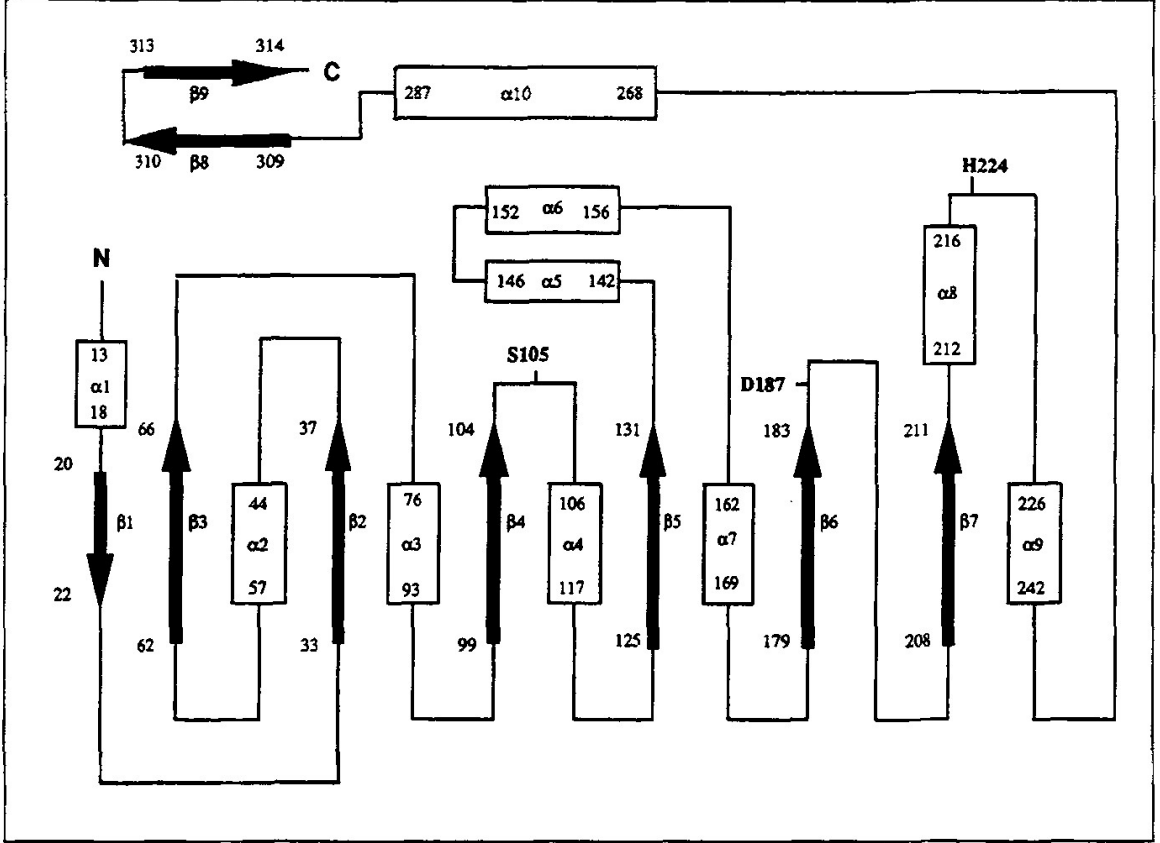
CALB, 317 amino asit biriminden oluşmaktadır. Amino asit dizisi diğer lipazlar ile önemli bir homoloji göstermemektedir (Şekil 1.10). Diğer lipazlar için belirlenen yapılardan, CALB'nin bir Ser-His-Asp/Glu katalitik üçlüsü öngörülmesine karşın, aktif bölgede serini çevreleyen GxSxG konsensüs dizisi CALB'de mevcut olmayıp, ilk glisin

yerine treonin gelmiştir (TWSQG). Bu enzimde yalnızca bir histidin bulunması (H224) aktif bölgenin tayin edilmesini kolaylaştırmaktadır.

ATG	AAG	CTA	CTC	TCT	CTG	ACC	CGT	GTG	GCT	GGT	GTG	CTT	GCG	ACT	TGC	GTT	GCA	GCC	ACT
met	lys	leu	leu	ser	leu	thr	gly	val	ala	gly	val	leu	ala	thr	cys	val	ala	ala	thr
					-20														
					-1														
CCT	TTG	GTG	AAG	CGT	CTA	CCT	TCC	GGT	TCG	GAC	CCT	GCC	TTT	TCG	CAG	CCC	AAG	TCG	GTG
pro	leu	val	lys	arg	leu	pro	ser	gly	ser	asp	pro	ala	phe	ser	gln	pro	lys	ser	val
					21														
CTC	GAT	GCG	GGT	CTG	ACC	TGC	CAG	GGT	GCT	TCG	CCA	TCC	TCG	GTC	TCC	AAA	CCC	ATC	CTT
leu	asp	ala	gly	leu	thr	cys	gln	gly	ala	ser	pro	ser	ser	val	ser	lys	pro	ile	leu
					41														
CTC	GTC	CCC	GGA	ACC	GGC	ACC	ACA	GGT	CCA	CAG	TCG	TTC	GAC	TCG	AAC	TGG	ATC	CCC	CTC
leu	val	pro	gly	thr	gly	thr	thr	gly	pro	gln	ser	phe	asp	ser	asn	trp	ile	pro	leu
					61														
TCA	ACG	CAG	TTG	GGT	TAC	ACA	CCC	TGC	TGG	ATC	TCA	CCC	CCG	CCG	TTC	ATG	CTC	AAC	GAC
ser	thr	gln	leu	gly	tyr	thr	pro	cys	trp	ile	ser	pro	pro	pro	phe	met	leu	asn	asn
					81														
ACC	CAG	GTC	AAC	ACG	GAG	TAC	ATG	GTC	AAC	GCC	ATC	ACC	GCG	CTC	TAC	GCT	GGT	TCG	GGC
thr	gln	val	asn	thr	glu	tyr	met	val	asn	ala	ile	thr	ala	leu	tyr	ala	gly	ser	gly
					101														
AAC	AAC	AAG	CTT	CCC	GTG	CTT	ACC	TGG	TCC	CAG	GGT	GGT	CTG	GTT	GCA	CAG	TGG	GGT	CTG
asn	asn	lys	leu	pro	val	leu	thr	trp	ser	gln	gly	gly	leu	val	ala	gln	trp	gly	leu
					121														
ACC	TTC	TTC	CCC	AGT	ATC	AGG	TCC	AAG	GTC	GAT	CGA	CTT	ATG	GCC	TTT	GCG	CCC	GAC	TAC
thr	phe	phe	pro	ser	ile	arg	ser	lys	val	asp	arg	leu	met	ala	phe	ala	pro	asp	tyr
					141														
AAG	GGC	ACC	GTC	CTC	CCC	GGC	CCT	CTC	GAT	GCA	CTC	GCG	GTT	AGT	GCA	CCC	TCC	GTA	TGG
lys	gly	thr	val	leu	ala	gly	pro	leu	asp	ala	leu	ala	val	ser	ala	pro	ser	val	trp
					161														
CAG	CAA	ACC	ACC	GGT	TCG	GCA	CTC	ACC	ACC	GCA	CTC	CGA	AAC	GCA	GGT	GGT	CTG	ACC	CAG
gln	gln	thr	thr	gly	ser	ala	leu	thr	thr	ala	leu	arg	asn	ala	gly	gly	leu	thr	gln
					181														
ATC	GTG	CCC	ACC	ACC	AAC	CTC	TAC	TCG	CCC	ACC	GAC	GAG	ATC	GTT	CAG	CCT	CAG	GTG	TCC
ile	val	pro	thr	thr	asn	leu	tyr	ser	ala	thr	asn	glu	ile	val	gln	pro	gln	val	ser
					201														
AAC	TCG	CCA	CTC	GAC	TCA	TCC	TAC	CTC	TTC	AAC	GGA	AAG	AAC	GTC	CAG	GCA	CAG	GCC	GTG
asn	ser	pro	leu	asp	ser	ser	tyr	leu	phe	asn	gly	lys	asn	val	gln	ala	gln	ala	val
					221														
TGT	GGG	CCG	CTG	TTC	GTC	ATC	GAC	CAT	GCA	GGC	TCG	CTC	ACC	TCG	CAC	TTC	TCC	TAC	GTC
cys	gly	pro	leu	phe	val	ile	asp	his	ala	gly	ser	leu	thr	ser	gln	phe	ser	tyr	val
					241														
GTC	GGT	CGA	TCC	GCC	CTG	CGC	TCC	ACC	ACG	GGC	CAG	GCT	CGT	AGT	GCA	GAC	TAT	GGC	ATT
val	gly	arg	ser	ala	leu	arg	ser	thr	thr	gly	gln	ala	arg	ser	ala	asp	tyr	gly	ile
					261														
ACG	GAC	TGC	AAC	CCT	CTT	CCC	GCC	AAT	GAT	CTG	ACT	CCC	GAG	CAA	AAG	GTC	GCC	GCG	GCT
thr	asp	cys	asn	pro	leu	pro	ala	asn	asp	leu	thr	pro	glu	gln	lys	val	ala	ala	ala
					281														
GCG	CTC	CTG	GCG	CCG	GCA	GCT	GCA	GCC	ATC	GTG	GCG	GGT	CCA	AAG	CAG	AAC	TGC	GAG	CCC
ala	leu	leu	ala	pro	ala	ala	ala	ala	ile	val	ala	gly	pro	lys	gln	asn	cys	glu	pro
					301														
GAC	CTC	ATG	CCC	TAC	GCC	CGC	CCC	TTT	GCA	GTA	GGC	AAA	AGG	ACC	TGC	TCC	GGC	ATC	GTC
asp	leu	met	pro	tyr	ala	arg	pro	phe	ala	val	gly	lys	arg	thr	cys	ser	gly	ile	val
					311														
ACC	CCC	TGA																	
thr	pro	OPA																	

Şekil 1.10 *Candida antarctica* lipaz B geninin DNA ve türetilmiş amino asit sekansı.

CALB, boyutları 30Å x 40Å x 50Å olan küresel  $\alpha/\beta$  tipi bir proteindir (Şekil 1.11). Altısı paralel, toplam yedi  $\beta$ -katlanma içerir.  $\beta$ -katlanmalar  $\alpha$ -sarmal motiflerle bağlanmıştır; böylelikle, ana yapı çoğunlukla sağ dönüşlü  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$  motiflerden oluşmaktadır.



Şekil 1.11 CALB' nin ikincil yapı diyagramı (Kabsch ve Sander, 1983).

İlk iki katlanma ( $\beta$ 1 ve  $\beta$ 2) anti-paraleldir; son iki katlanma bir halka yapı ile bağlanmıştır. Protein, saç tokası şeklinde iki katlanma ile sonlanmaktadır. CALB, 10  $\alpha$ -sarmal motif içermektedir.  $\alpha$ -5, 6 ve 10, aktif bölge cebinin büyük bir kısmını oluşturduğundan, arayüz aktivasyonu ve substrat spesifitesi bakımından önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir.

CALB'de, paralel  $\beta$ -tabakanın karboksi-terminal tarafında bulunan serin üçlüsü, Ser105, Asp187 ve His224,  $\alpha/\beta$ -hidrolazlarda olduğu gibi, katalitik üçlüyü oluşturmaktadır. Aktif bölge histidini, His224, yan zinciri aktif bölgenin içine doğru yönelecek şekilde  $\alpha$ -9 sarmalın başında bulunur. Asp187, tipik  $\alpha/\beta$ -hidrolaz katlanmasından beklendiği

üzere, altıncı iplikçikten sonra gelen dönme (turn) üzerindedir. Asp187'nin yan zinciri, oksijen atomu gömülü bir su molekülünün yanı sıra, ana zincir ve diğer yan zincir atomları ile hidrojen bağları kurar. Bir sonraki birim glutamik asittir. CALB'de, glutamik asit aktif bölgenin dışına doğru yönelmiştir; çevreleyen çözücüyle temas halindedir ve işlevi bilinmemektedir.

Ser105 çevresindeki bölge oldukça dikkat çekici bir şekilde polardır. His224'e ek olarak polar yan zincire sahip üç amino asit (Thr40, Asp134 ve Gln157) daha vardır. Gln157 yan zincirinin amit grubu üç hidrojen bağı yapar. Thr40 bir hidrojen bağı kabul ederken, Asp134'ün protonlanmış karboksilatı Gln157 ile hidrojen bağı yapar. Bu üç polar birim böylelikle çözücünün tamamen ulaşabileceği bir hidrojen bağı ağı kurar. Bu ağ yapı amfipatik lipit moleküllerinin aktif bölgede hidrojen bağı yapmalarını zorlaştırabilir. Bu durumda aktif bölgede, serin proteazlarda olduğu gibi bir oksianyon deliğinin oluşması öngörülmektedir.

CALB'nin aktif bölgesine, çözücü ortam bir kanal aracılığı ile ulaşabilmektedir. Kanalin çoğu üç parçalı yapıdan oluşur; sarmallar  $\alpha 5$ ,  $\alpha 10$  ve Ile189'u taşıyan halka yapı. Kanal duvarları çok hidrofobiktir ve çoğunlukla alifatik birimlerle örtülüdür. Trp104 haricinde kanalda hiçbir aromatik yan zincir bulunmaz. Triptofan yan zincirinin azotu, aktif bölge histidininin karbonil oksijeni ile bir hidrojen bağı oluşturur ve bu bölgeyi dengeler. Kapak yapının  $\alpha 5$  ya da  $\alpha 10$  olduğu düşünülmektedir. Bu yapının en çarpıcı özelliği gömülü bir aspartik aside (Asp145) sahip olmasıdır. Bu amino asit Ser150 ve Thr158 ile kararlaştırıcı hidrojen bağları yapar. Öte yandan,  $\alpha 10$  çok sayıda alanin ve diğer hidrofobik amino asitleri içermektedir. Orta kısmında bulunan prolin, sarmalın "V" şeklini (kink) almasına neden olur. Proteinin geri kalan kısmı ile hidrojen bağı oluşturmadığından  $\alpha 10$  serbest hareket edebilir.

CALB, aktif bölgeyi kuşatan geniş bir hidrofobik dış yüzeye sahiptir. Dış yüzey, çözücüye doğru yönlendirilmiş alifatik yan zincirlerin hâkimiyeti altındadır. Bu yüzeyin alanı  $450\text{\AA}$ 'dür ve muhtemelen hidroliz sırasında bir lipit yüzeyi ile sıkı sıkıya temas halindedir. Komşu enzim molekülleri ile de etkileşmektedir.

CALB'nin birincil yapısında, disülfid bağı yapan altı sistein birimi vardır. İlk disülfid bağı birinci ve üçüncü anti-paralel iplikçikleri birleştiren Cys22—Cys64 köprüsüdür. İkinci köprü Cys216 ile Cys258 arasındadır ve protein yüzeyindeki iki halka bölgeyi

bağlar. Üçüncü bağ Cys293 ve Cys311 arasındadır ve enzimin karboksi ucunu kararlaştırır. CALB, Asn74'de olası bir N-glikozilasyon bölgesine de sahiptir.

### 1.3.6.2 Esterifikasyon tepkimesi

Biyokataliz, organik ortamlarda termodinamik dengenin senteze kaydırıldığı ve hidrofobik substratların çözünürlüklerinin artırıldığı durumlarda avantajlı bir yoldur (Torres ve Castro, 2004). Susuz ortamlarda lipazların aktivite ve stabilitesini iyileştirmek için bir dizi yöntem izlenmektedir: (a) yüzey aktif maddelerle kovalent olmayan etkileşim, (b) mikro-emülsiyonlarda tuzaklama, (c) ters miseller oluşturma ve (d) uygun çözünmeyen destekler üzerine immobilizasyon.

Esterifikasyon tepkimelerinin verimi, substrat konsantrasyonundan ziyade, substratın toplam yüzey alanı ile ve suyun organik ortamdaki termodinamik aktivitesi tarafından belirlenmektedir (Krishna ve Karanth, 2002; Papamichael ve ark., 2012). Substrat yüzeyinin büyüklüğü, substratın enzimin aktif bölgesine ulaşabilirliğini etkilemektedir (Reis ve ark., 2009). Bir başka etken de enzim çözünürlüğüdür. Proteinler birçok organik çözücüde çözünmemektedir. Genel olarak, karboksilik asitler, tersinir asidik katalize uğratılabilirler. Esterleşme tepkimesinin su üretmesi sentezi olumsuz etkilemektedir. Bunun yanı sıra organik asit ve alkol zincirinin uzunluğu da, substrat bağlanmasını etkilediğinden, önemli bir parametredir.

Sıcaklık ve pH, çoğu homojen ve heterojen reaksiyonlarda olduğu gibi, genellikle lipaz ile yapılan esterifikasyonu etkileyen iki faktördür. Çeşitli memeli lizozomal lipazlar asit spektrumunda optimum aktivite sergilerken, mikrobiyal kaynaklardan elde edilen lipazlar alkali pH'da daha aktiftirler. Ancak, sulu ortamda elde edilen bu değerler gerçek tepkime ortamında değişebilmektedir. İyonlar, emülsiyon ajanları ve substratların varlığı, alkali ortamı asitlendirmektedir (Krishna ve Karanth, 2002).

Enzimlerin aktif üç boyutlu yapıları birçok hidrojen bağı, hidrofobik ve dipol etkileşimlerinin yanı sıra van der Waals kuvvetlerini gerektirir. Bu bağlar protein molekülleri arasında ve protein ile çözücü arasında kurulur. Bu nedenle susuz tepkime ortamında enzim stabilitesi birincil önemdedir (Costas ve ark., 2008). Tepkime sıcaklığı, çözücü ortamın enzim moleküllerine ulaşabilirliği ve ortamın iyonik kuvveti, protein ile çözücü arasındaki mesafeyi belirleyen fizikokimyasal koşullardır. Su ve organik çözücülerin homojen karışımlarında, organik çözücü enzimin esneklik sınırını (conformational flexibility) zorlayarak mikro yapısını bozar. Sonuçta enzimin üç



boyutlu yapısında telafi edilebilecek (reversible) ve edilemeyecek (denaturation) açılmalar (unfolding) olabilir (Torres ve Castro, 2004). Polar çözücüler proteinlerin, genellikle suda daha esnek olan yan zincirlerini etkilemektedir.

### 1.3.6.3 Lipazların biyoteknolojide uygulamaları

Lipazların ticari kullanımı, geniş bir yelpazede ve farklı uygulamaları içerdiğinden, milyarlarca dolarlık bir pazar yaratmıştır. Deterjan katkısı olarak her yıl yaklaşık 1000 ton lipaz tüketilmektedir (Godfrey ve West, 1996). Lipazlar, gıda bileşeni üretiminde de önemli bir rol oynamaktadır (Jaeger ve Reetz, 1998). Örneğin, palmitik asidin stearik asit ile değiştirilmesi *Rhizomucor miehei* lipazı ile katalizlenen bir trans-esterifikasyon reaksiyonudur (Coleman ve Macrae, 1980). Çikolatada, kakao yağı yerine kullanılan ve istenen erime noktasına sahip stearik-oleik-stearik trigliseritlerin sentezlenmesini sağlamaktadır. Ayrıca, kâğıt endüstrisinde kâğıt hamurundan reçineyi uzaklaştırmada, süt ürünleri ve meyve sularında lezzet geliştirmede ve sentetik organik kimyada lipaz kullanımı gittikçe artmaktadır (Boland ve ark., 1991; Drauz ve Waldmann, 1995; Faber, 1997; Jaeger ve Reetz, 1998; Schmid ve Verger, 1998; Stecher ve Faber, 1997; Theil, 1995).

Sentetik organik kimyada lipazların katalizör olarak kullanılmasına ilişkin raporların sayısı gittikçe artmaktadır. Regioselektif hidroliz, açılasyon veya trans-esterifikasyona ek olarak, inanılmaz derecede geniş bir enansiyoseçici işlem çeşidi geliştirilmiştir. Lipazlar ile katalizlenen enansiyoseçici organik dönüşümler prokiral substrat tepkimeleri ve rasematların kinetik çözünürlük reaksiyonlarıdır. Başlangıçta, iki ana bileşik sınıfı olarak prokiral veya kiral alkoller veya karboksilik asit esterleri kullanılmaktaydı. Uygulamalar, yakın dönemde, siyanohidrinler, klorohidrinler, dioller,  $\alpha$ - ve  $\beta$ -hidroksi asitler, aminler, diaminler ve amino alkoller de kapsamıştır. İlke olarak, organik bileşiklerin en önemli sınıfları, lipaz-kataliz kullanarak enansiyoseçici olarak üretilebilir. Ya sulu bir ortam seçilir (hidroliz reaksiyonları) ya da organik çözücüler (açılasyon ya da trans-esterifikasyon) kullanılır. Bu sentetik organik reaksiyonlar için tipik katalizörler bakteri lipazlarıdır. Ekonomik öneme sahip önemli bir örnek, yüksek tansiyon tedavisinde kullanılan kalsiyum antagonisti Diltiazem'in üretimi ile ilgilidir. Anahtar adım, bir enansiyomerik formun tercihli hidrolizi temelinde bir kiral epoksi esterin rasemik karışımının kinetik çözünürlüğüdür. 1993 yılından beri, yılda 50 tondan fazla kiral yapı taşı imal edilmiş ve daha sonra Diltiazem'e dönüştürülmüştür.

Enansiyoseçici organik kimyada bir lipazın endüstriyel olarak uygulanmasının bir diğer göze çarpan örneği, optik olarak aktif aminlerin üretimi ile ilgilidir. *Burkholderia plantarii* lipazı oldukça geniş bir çeşitlilikte rasemik aminlerin enansiyoseçici açilasyonunu katalize eder ( $ee > 95\%$ ). Belki de kinetik çözünürlüğün bir dezavantajı, toplam maddenin yalnızca yarısının kullanılmasıdır. Bununla birlikte, dönüşüm oranının  $> 50\%$  olmasına izin veren yöntemler geliştirilmektedir. Temel ilke “dinamik kinetik çözünürlük”tür. Buna göre, sistem enansiyoseçici lipazın yanı sıra substratın hızlı rasemizasyonuna neden olan bir ikinci katalizörü de içerir. Böylelikle, teorik olarak yalnızca bir enansiyomeri  $100\%$  elde etmek mümkündür. Bu ilke, biyokataliz için ve aslında sentetik organik kimya için tamamen yeni perspektifler açmayı vaatsetse de pratikte uygulanabilirliği zordur. Her şeyden önce lipazın ikinci katalizör ile uyumlu olması gerekir. Bu temelde birkaç ilginç araştırmaya rastlamak mümkündür.

#### 1.4 Karbohidrat Esterlerinin Sentezi

Karbohidrat esterleri, kimyasal ya da enzimatik olmak üzere iki yoldan sentezlenebilmektedir. Kimyasal sentezde genellikle birden fazla tepkime gerçekleşir ve mono-, di-, tri-ester gibi birden fazla ürün oluşur; ancak, verim oldukça yüksektir. Bu nedenle kimyasal yoldan esterifikasyonda karşılaşılan en büyük sorun, istenilen ürünün sentezlenen ester karışımından saflaştırılma maliyetidir. Biyokatalizörlerle, substrat molekülü üzerindeki fonksiyonel grup sayısını azaltmaya yarayan zahmetli koruma tepkimelerine gerek duyulmaksızın, birçok monosakkarit-yağ asidi esteri bir izomer halinde sentezlenebilmektedir (Björkling ve ark., 1991; Mutua ve Akoh, 1993). Bu yüzden, özellikle *Candida antarctica* ve *Thermomyces lanuginosus* (*Humicola lanuginosa*) lipazlarının biyokatalizör olarak kullanıldığı karbohidrat esterleri üretimi alternatif bir yol olarak gelişmekte ve dezavantajlarını azaltmak için çeşitli yaklaşımlar uygulanmaktadır (Ikeda ve Klivanov 1993; Sarney ve ark., 1994; Sarney ve ark., 1997; Kitagawa ve Tokiwa 1998). Örneğin, şeker esteri verimini artırmak amacıyla bazı deneylerde ortama yüzey aktif maddeleri eklenmiştir. Saf organik ortamlarda yaşanan enzim inhibisyonu sorunu ise,  $55-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  aralığında, yüksek bir tepkime sıcaklığı kullanılarak aşılmaya çalışılmıştır. Tepkime sonrasında ürün, ortamının organik ya da su olmasına bakılmaksızın, genellikle distilasyon işlemiyle izole edilmektedir.

Sulu ortamlarda ve hidrolitik aktivite için evrilmiş olan hidrolazların sentez tepkimelerinde kullanılmaları, düşük su içerikli organik ortamlarda mümkün

olmaktadır. Lipaz ve proteazlar sentez tepkimelerinde kullanılan yaygın biyokatalizörlerdir.

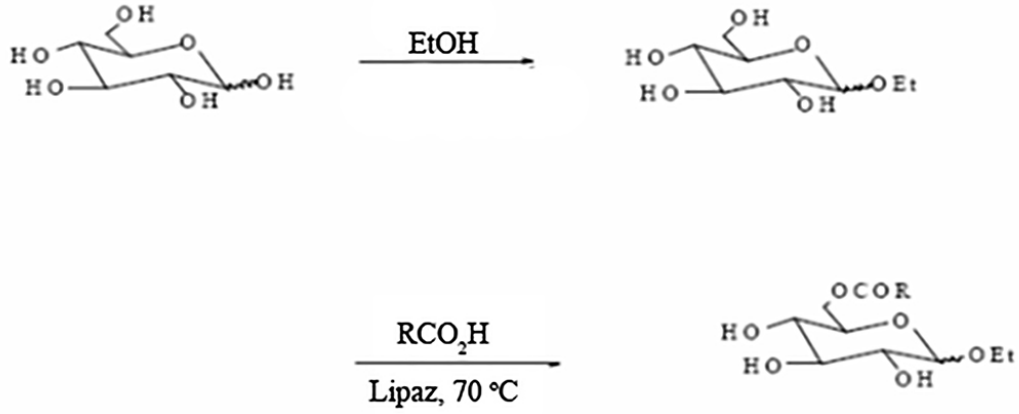
Eser miktarda su içeren organik tepkime ortamları genellikle hidrofobiktir. Polar şeker molekülleri bu ortamlarda oldukça düşük çözünürlük göstermektedir ve bu karbohidrat esterlerinin enzimatik yolla sentezinde başlıca problemidir. Bu problemin üstesinden gelmek için, sıklıkla, ya polar organik çözücülerde aktifleştirilen yağ asitleri kullanılmış ya da apolar organik çözücülerde aktifleştirilen şekerler kullanılmıştır. Her iki seçenekte de maliyetin oldukça yüksek olması nedeniyle, bazen de, ortalama bir polariteye sahip organik çözücüler tercih edilmiştir.

#### **1.4.1 Karbohidrat esterlerinin organik ortamda kimyasal sentezi**

Şeker-yağ asidi esterlerinin sentezi ilk zamanlarda hem şekerlerin hem de serbest yağ asitlerinin çözüldüğü DMSO, DMF veya DMP gibi toksik çözücülerde gerçekleştirilmekteydi (Hass-Snell, 1959). İlk zamanlarda, sentezlenen şeker-yağ asidi esterleri gıda katkı maddesi olarak kullanılmalarına karşın, toksik ve kokulu kalıntılar içermeleri nedeniyle sonraları vazgeçilmiştir. Şeker-yağ asidi esterleri için ticari süreç, yağ asidi metil esterlerinin DMF’de sentezlenmesiyle başlatılmıştır (Osipow ve Rosenblatt, 1967).

Sonrasında, nispeten daha güvenli bir kimyasal trans-esterifikasyon tepkimesi geliştirilmiştir (Şekil 1.12). Sükrozun şeker kaynağı olarak kullanıldığı bu işlemde tepkime ortamı glikol veya su, katalizör de potasyum karbonattır. Bazı kimyasal sentez deneylerinde ise şeker kaynağı erimiş sükrozdur ve tepkime sıcaklığı da buna göre seçilmiştir. Ortama, çözülmüş şeker miktarını artırmak için lityum, potasyum ve sodyum tuzları eklenmiştir.

Karbohidrat-yağ asidi esterlerinin sentezi için susuz ortamda enzimlerin kullanıldığı çok sayıda sistem geliştirilmiştir (Adelhorst ve ark., 1990).



Şekil 1.12 Modifiye şeker ve lipazın kullanıldığı şeker-yağ asidi esteri sentezi.

#### 1.4.2 Karbohidrat esterlerinin organik ortamlarda biyokatalizör yardımıyla sentezi

Karbohidrat-yağ asidi esterleri lipazlar ile organik ortamda sentezlenebilmektedir. Enzim katalizörler spesifik izomerlerin yüksek verimlerde elde edilmesini sağlamaktadır (Arcos

ve ark., 1998a; Degn ve ark., 1999; Ducret ve ark., 1995; Sarney ve ark., 1997). Amfifilik doğaları ve biyo-bozunur olmalarından dolayı yağ asidi esterlerinin endüstriyel ölçekli sentezi gittikçe önem kazanmaktadır (Björkling ve ark., 1989; Sarney ve Vulfson, 1995; Schekermann ve ark., 1995). Elde edilen esterler besin, ilaç ve kozmetik ürünlerinde katkı maddesi olarak kullanılabilir (Akoh, 1994; Nishikawa ve ark., 1981; Pomeranz, 1994).

*Candida antarctica* lipazının biyokatalizör olarak kullanıldığı deneylerle saf ve karışım halinde bir dizi organik tepkime ortamının farklı karbohidratlar ile miristik asit esterlerinin sentezlenmesine elverişliliği araştırılmıştır. En yüksek verim, tert-bütanol:piridin (55:45 v/v) karışımında ve miristol-glukoz esterinden, 20,2  $\mu\text{molmin}^{-1}\text{g}^{-1}$  elde edilmiştir. *Candida antarctica* lipazı yağ asidini spesifik olarak glukozun altıncı karbonuna eklemekte ve sonunda,  $\alpha$  ve  $\beta$  olmak üzere, iki 6-O-miristat-D-glikopiranoz anomeri oluşmaktadır (Arcos ve ark., 1998a; Degn ve ark., 1999; Ljunger ve ark., 1994). Bundan sonra, substrat ve biyokatalizör miktarları değiştirilerek ester verimi optimize edilmeye çalışılmıştır. Bu koşullar altında önemli miktarda çözünmemiş glukozun tepkimeye katılmasıyla verim 34 mg/ml'ye yükselmiştir. Aynı

koşullar altında  $22,3 \mu\text{molmin}^{-1}\text{g}^{-1}$  fruktoz-miristik asit,  $26,9 \mu\text{molmin}^{-1}\text{g}^{-1}$   $\alpha$ -D-metilglukopiranosit ve  $1,9 \mu\text{molmin}^{-1}\text{g}^{-1}$  maltoz-miristik asit esteri elde edilmiştir. Maltotrioz, sellobiyoz, sükroz ve laktoz ise miristik asit ile esterleşme tepkimesi vermemiştir. Tepkime ortamına %2 DMSO katıldığında enzim aktivitesinde önemli azalma saptanmıştır. Tepkime ortamında %0,85 ile %2,17 (v/v) su varlığı enzim aktivitesinde önemli bir değişiklik yapmamıştır.

#### 1.4.2.1 Çözücü hidrofobisitesi ve substrat çözünürlüğü

Organik tepkime ortamlarında enzim aktivitesi sıklıkla çözücünün hidrofobisitesi (logP) ile doğru orantılıdır (Carrea ve ark., 1995; Kazlauskas ve Bornscheuer, 1998; Ducret ve ark., 1998; Laane ve ark., 1987; Reslow ve ark., 1987; van Tol ve ark., 1995; Valivety ve ark., 1992). Yüksek enzim aktiviteleri yüksek logP değerlerinde elde edilmiştir. Ayrıca, enzimin kararlılığı genellikle yüksek hidrofobisiteye sahip çözücülerde daha yüksektir. logP değeri ikinin altında olan organik çözücüler enzimatik kataliz için uygun bulunmamaktadır (Laane et al., 1987). Düşük bir logP değerine sahip organik çözücü molekülleri enzim molekülünün yüzeyi ile nispeten daha fazla etkileşebilmekte ve substrat ile enzim arasına girebilmektedirler. Ayrıca, piridin gibi nispeten daha polar yapıya ve düşük hidrofobisiteye (logP=0,69) sahip saf organik ortamlar enzim ile spesifik etkileşimler yaparak enzim deaktivasyonuna sebep olabilmektedir (Halling, 1994). Ancak, hidrofilik bir substratın çözünürlüğü dikkate alındığında, hidrofobik bir çözücü her zaman iyi bir seçim olmayabilmektedir. Bu nedenle, karbohidratlar ya da glikozitlerin açıl akseptörü olarak kullanıldığı trans-esterifikasyon tepkime ortamları sıklıkla iki ya da daha fazla organik çözücünden oluşturulmaktadır (Akoh ve Mutua, 1994; Ferrer ve ark., 1999; Ferrer ve ark., 2000; Mutua ve Akoh, 1993; Rich ve ark., 1995). Bu konuda doğrudan esterifikasyon tepkimeleriyle ilgili bilgi yetersizdir.

Şeker-yağ asidi esterlerinin sentezinde kullanılacak bir dizi organik çözücü karışımı önerilmiştir (Degn ve Zimmermann, 2001). Bu tepkime ortamı karışımlarının hidrofobisite değerleri, çözülmüş karbohidrat miktarları ve rezidüel enzim aktivite değerleri saptanmıştır (Tablo 1.5) (Laane ve ark., 1987). Tabloda dikkat çeken bir sonuç, farklı çözücü ortamlarında farklı miktarda çözünen karbohidratın, diğer bir söylemle başlangıç karbohidrat konsantrasyonunun, tepkimenin veriminde sınırlayıcı etken olmasıdır. Enzim aktivitesi de tepkime ortamına göre farklılık göstermektedir. En yüksek aktivite tert-bütanol-aseton ve tert-pentanol-aseton karışımından elde edilmiştir. Başka bir araştırmada asetonitril tepkime ortamı olarak kullanılmış ve verim

alınmışken (Ducret ve ark., 1995), verilen listede asetonitrilin karbohidrat-miristik asit esterinin sentezine uygun olmadığı görülmektedir. Bu çelişki açıl donörünün ve tepkime sıcaklığının farklı olmasına bağlanmaktadır (Degn ve Zimmermann, 2001). Düşük sıcaklıklarda miristik asit gibi bazı yağ asitlerinin tepkime ortamını dondurduğu ve tepkime kinetiğini düşürdüğü gözlenmiştir (Janssen ve ark., 1999). Benzer şekilde diğer bazı araştırmalarda hekzan ve toluenin de içinde bulunduğu hidrofobik birkaç organik ortamda ürün elde edilmiştir. (Otamiri ve ark., 1991; Tsitsimpikou ve ark., 1997; Valivety ve ark., 1992).

**Tablo 1.5** Enzim aktivitesi, glukoz çözünürlüğü ve farklı hidrofobisiteli çözücülerde enzim kararlılığı

Çözücü	Enzim aktivitesi $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$	Glukoz çözünürlüğü (mM)	Rezidüel aktivite (%)	Çözücü hidrofobisitesi
DMSO	0	29	0	-1,3
Dioksan	1,1	7,5	53	-1,1
DMF	0	12	0	-1,0
Asetonitril	0	1,1	27	-0,33
Aseton	3	2,6	56	0,23
THF	1,6	2,1	46	0,49
Piridin	0	134	0	0,69
t-Bütanol	3,7	12	75	0,80
t-Pentanol	3,6	10	71	1,4
Toluen	0	0,6	54	2,5
Hekzan	0	0	80	3,5

Saf DMSO ve %20' den fazla DMSO içeren aseton ortamında *Candida antarctica* lipazı tamamen inaktifleşmektedir (Tablo 1.6). En yüksek enzim aktiviteleri üçüncül alkollerin piridin veya DMSO ile karışımlarından elde edilmiştir. DMSO ve piridin, karbohidrat (glukoz) çözücü rolünü üstlenirken alkoller enzim aktivitesinin korunmasını temin etmektedir (Ferrer ve ark., 1999).

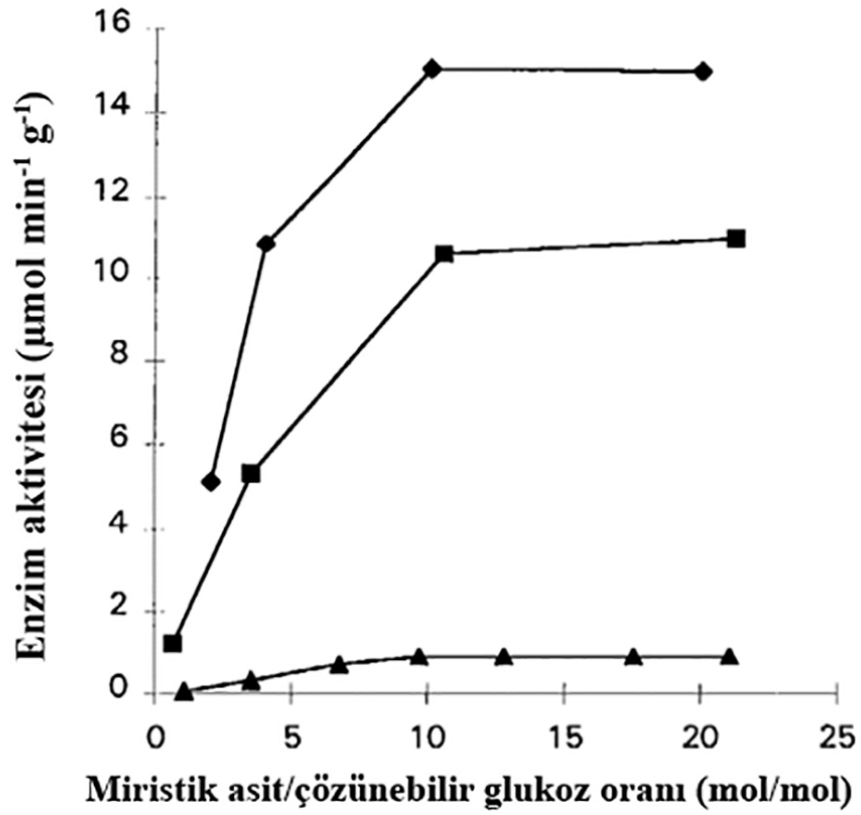
Tepkime ortamının enzimin bağlı suyu için gerekli olan başlangıç su miktarı tepkime sırasında sabit kalmamaktadır. Bunun nedeni, esterleşme tepkimesinin su molekülü üretmesidir. Gittikçe artan başlangıç su miktarı tepkime verimini düşürmektedir. Bu yüzden tepkime sırasında üretilen suyun tutulması gereklidir. Bunun için en pratik çözüm tepkime ortamına moleküler elek eklemektir.

**Tablo 1.6** Farklı çözücü karışımlarında, enzim aktivitesi, glukoz çözünürlüğü ve rezidüel enzim aktivitesi

Çözücü	Enzim aktivitesi $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$	Glukoz çözünürlüğü (mM)	Rezidüel aktivite (%)	Çözücü	Enzim aktivitesi $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$	Glukoz çözünürlüğü (mM)	Rezidüel aktivite (%)
Hekzan DMSO %1	0	0	8,3	t-Bütanol:piridin %1	3,8	12	74
Hekzan DMSO %5	1,9	0,4	1,3	t-Bütanol:piridin %5	4,9	12	65
Hekzan DMSO %10	0	nd	0	t-Bütanol:piridin %10	4,6	14	69
Aseton DMSO %1	1,4	1,5	60	t-Bütanol:piridin %20	9,4	20	72
Aseton DMSO %5	1,9	2,6	94	t-Bütanol:piridin %30	9,6	21	70
Aseton DMSO %10	1,2	8,1	70	t-Bütanol:piridin %40	13,2	39	73
Aseton DMSO %20	0	33	0	t-Bütanol:piridin %42,5	14,9	42	64
Aseton DMSO %30	0	43	0	t-Bütanol:piridin %45	15,2	51	75
t-Bütanol:DMSO %1	3,4	12	70	t-Bütanol:piridin %47,5	14,0	54	76
t-Bütanol:DMSO %5	5,0	20	77	t-Bütanol:piridin %50	13,5	63	61
t-Bütanol:DMSO %10	7,6	29	85	t-Bütanol:piridin %60	5,7	77	25
t-Bütanol:DMSO %20	10,8	67	51	t-Bütanol:piridin %70	3,6	92	12
t-Bütanol:DMSO %30	2,5	127	2	t-Bütanol:piridin %80	1,3	114	7
Hekzan:piridin %1	0	0,2	78	t-Bütanol:piridin %90	0,3	122	3
Hekzan:piridin %5	0	0,1	57	t-Bütanol:dioksan %1	3,8	10	69
Hekzan:piridin %10	0,3	0,0	69	t-Bütanol:dioksan %5	3,6	8,1	72
Hekzan:piridin %20	1,8	0,3	42	t-Bütanol:dioksan %10	3,8	10	56
Hekzan:piridin %30	2,9	0,8	32	t-Bütanol:dioksan %20	4,3	8,2	37
Aseton:piridin %1	2,8	1,6	46	t-Bütanol:dioksan %30	3,9	8,8	37
Aseton:piridin %5	3,5	2,2	37	Hekzan:dioksan %1	0	0,2	76
Aseton:piridin %10	3,4	3,0	24	Hekzan:dioksan %5	0	0,4	69
Aseton:piridin %20	3,2	6,7	27	Hekzan:dioksan %10	0	0,2	57
Aseton:piridin %30	2,3	8,9	26	Hekzan:dioksan %20	0,3	0,2	52
t-Pentanol:piridin %20	7,2	26	75	Hekzan:dioksan %30	0,6	0,3	55
t-Pentanol:piridin %40	12,0	32	73	Aseton:dioksan %1	3,5	1,9	63
t-Pentanol:piridin %45	10,6	46	70	Aseton:dioksan %5	2,8	2,4	42
t-Pentanol:piridin %50	11,0	43	71	Aseton:dioksan %10	2,5	3,0	47
t-Pentanol:piridin %55	9,6	56	59	Aseton:dioksan %20	2,3	3,9	44
t-Pentanol:piridin %60	7,3	71	43	Aseton:dioksan %30	1,9	3,2	46
t-Pentanol:piridin %80	1,0	98	12				

### 1.4.2.2 Ürün verimi

Doygun tepkime ortamında ilave karbohidrat varlığı, başlangıç çözünmüş karbohidrat konsantrasyonuna göre, esterleşme miktarını %100' ün üzerine (%188) çıkarabilmektedir (Ducret ve ark., 1995; Ljunger ve ark., 1994a; Degn ve ark., 1999). Karbohidrat-yağ esterlerinde verim, organik çözücünün glukozu çözme kapasitesine göre belirlenmektedir (Şekil 1.13).



Şekil 1.13 Farklı glukoz başlangıç konsantrasyonlarına göre ester verimi.

### 1.4.2.3 Enzim miktarının verime etkisi

Çözünmemiş glukoz içeren doygun bir çözücü sisteminde maksimum enzim aktivitesi için gerekli (immobilize) enzim konsantrasyonunun 10 mg/ml olduğu rapor edilmiştir (Degn ve Zimmermann, 2001).



#### 1.4.2.4 Tepkime sıcaklığının enzim aktivitesi ve rezidüel enzim aktivitesi üzerine etkisi

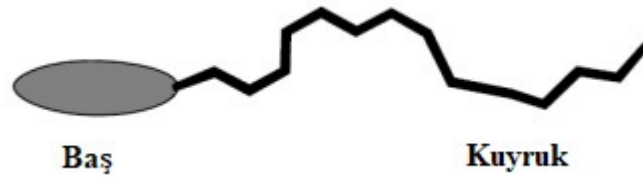
Elli üç santigrat derecenin *C. antarctica* lipazının enzim aktivitesi için optimum olduğu ve 60 °C’de verim farkının deney hata sınır payı içinde kaldığı ve 50 °C’nin altındaki sıcaklıklarda ise rezidüel aktivitede anlamlı bir artışın olduğu rapor edilmiştir (Tablo 1.7).

**Tablo 1.7** *C. antarctica* lipazının farklı sıcaklıklardaki aktivitesi ve rezidüel aktivitesi

Sıcaklık (°C)	Enzim aktivitesi ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ )	Rezidüel aktivite
45	14,1	79
53	19,2	71
60	20,2	51

#### 1.5 Yüzey Aktif Maddeler

Suya ya da sulu çözeltilere eklendiklerinde viskoziteyi azaltan polar bileşiklere genel olarak yüzey aktif maddeler (YAM) veya sürfektanlar denilmektedir (Baykut ve Biran 1996). Bu bileşikler temel olarak hidrofilik bir baş ve hidrofobik ve düz bir kuyruk kısmından oluşurlar (Şekil 1.14).



**Şekil 1.14** Sürfektan molekülünün şematik gösterimi.

#### 1.5.1 Sınıflandırılmaları

Polar baş grupların yük durumuna göre anyonik, katyonik, iyonik olmayan (non-iyonik) ve amfoterik (zwitteriyonik) olmak üzere dört ana grupta sınıflandırılırlar.

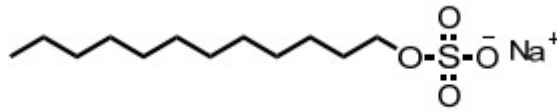
##### 1.5.1.1 Anyonik sınıf

Sürfektanların büyük çoğunluğu anyoniktir. Üretimlerinin nispeten kolay ve daha ucuz olması nedeniyle en çok tercih edilen gruptur. Baş kısmı genellikle fosfat, karboksilat

veya sülfonattır ve son iki bileşik sıklıkla kullanılmaktadır (Şekil 1.15) (Baykut ve Biran, 1996).

Karboksilatlar (R-COOH, R-COOX): Uzun zincirli karboksilik asitlerin sodyum ya da potasyum tuzlarıdır (R-COO-M<sup>+</sup>). R, düz ve hidrofobik alkil zinciri olan kuyruk kısmını simgelemektedir. Karboksil grubuna ait hidrojen atomu, K<sup>+</sup> veya Na<sup>+</sup> gibi bir değerlikli kation (M) ile yer değiştirmektedir.

Sülfat baş (-O-SO<sub>3</sub>H), hidrofobik moleküllerin suda çözünmesine yardımcı olan hidrotropik özellik göstermektedir. Nispeten sulu ortamlarda kolay çözünürler ve ortamın viskozitesini daha fazla azaltırlar.

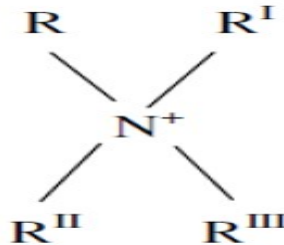


*Sodyum dodesilsülfat*

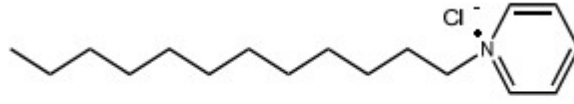
Şekil 1.15 Bir anyonik sürfektan örneği.

### 1.5.1.2 Katyonik sınıf

Baş kısımları genellikle amin veya amonyum bileşiklerinin tuzlarından oluşmaktadır. Birinci, ikincil ve üçüncül aminler (R<sub>1</sub>-NH<sub>2</sub>, R<sub>2</sub>-NH, R<sub>3</sub>-N), yalnızca asidik ortamda çözünebilmekle birlikte, amonyum tuzları (R<sub>4</sub>N<sup>+</sup>) tüm pH spektrumunda çözünebilmektedir (Şekil 1.16). Deterjan özelliklerinin nispeten zayıf ve üretim maliyetinin yüksek olması nedeniyle çoğunlukla amfoterik sürfektanlarla birlikte kullanılabilirler (Şekil 1.17) (Clint, 1992).



Şekil 1.16 Amonyum tuzlarının genel formülü.

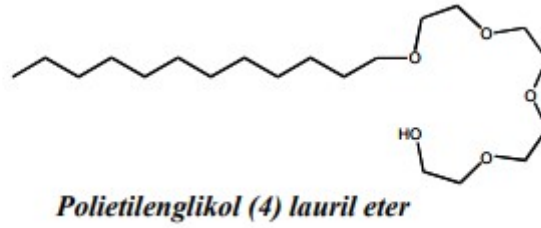


*Dodesilpiridinyum klorür*

**Şekil 1.17** Bir katyonik sürfektan örneği

### 1.5.1.3 Noniyonik yüzey aktif maddeler

Baş kısmın genel formülü  $O(CH_2CH_2O)_nH$  olan bu bileşikler yüksüzdür (Şekil 1.18). Böylelikle, ortamın tuzluluğu ve pH'sından etkilenmedikleri için daha kararlıdır. Ancak yüksek ortam sıcaklıkları çözünürlüğü azaltır ve sürfektan çözelti dışına çıkmaya başlar (Baykut ve Biran, 1996).

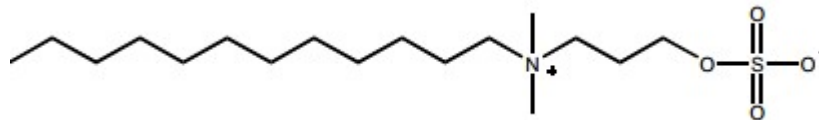


*Polietilenglikol (4) lauril eter*

**Şekil 1.18** Noniyonik yüzey aktif maddelerin genel yapısı.

### 1.5.1.4 Amfoterik sınıf

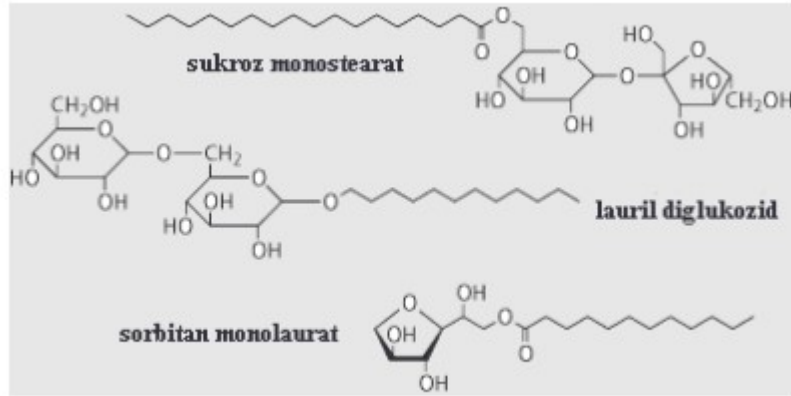
Diğerlerinden farklı olarak kuyruk kısmında katyonik (artı yüklü) fonksiyonel gruplar bulundurlar (Şekil 1.19). Böylelikle yüksek pH'larda anyonik, düşük pH'larda katyonik davranış sergilerler. Sert suya sahip ortamlarda ve geniş bir pH spektrumunda kullanılabilirler (Baykut ve Biran, 1996; Rosen, 1978).



**Şekil 1.19** Amfoterik yüzey aktif maddelerin genel yapısı.

### 1.5.1.5 Biyosürfektanlar

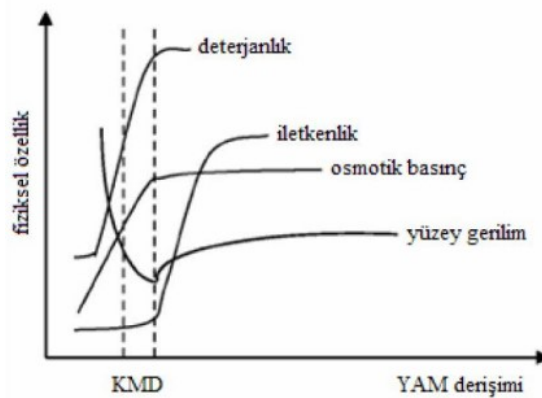
Glikozitler, şeker esterleri, fosfolipitler ve proteinler bu gruba girmektedir (Şekil 1.20). Başlıca avantajları biyobozunur olmaları ve zehir etkilerinin bulunmamasıdır.



Şekil 1.20 Bazı şeker esteri sürfektan örnekleri.

### 1.5.2 Çözünmüş sürfektan özellikleri

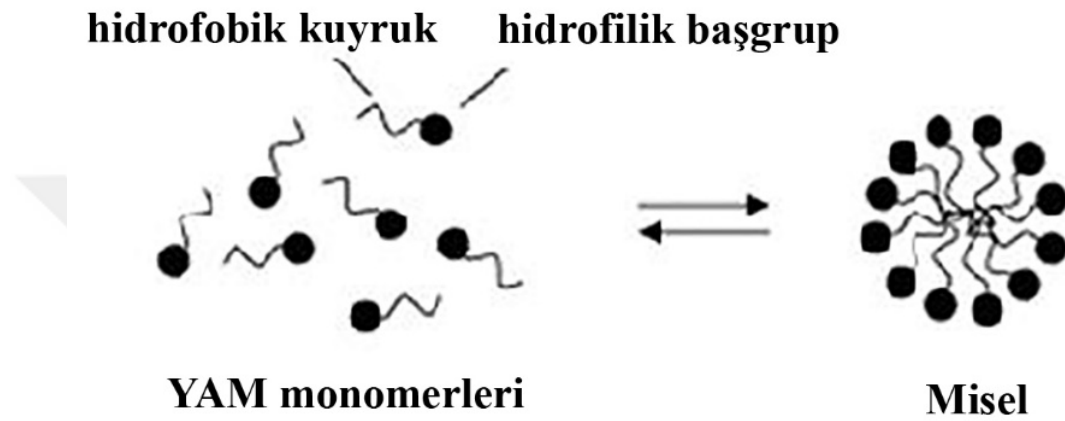
Düşük miktarlarda sürfektanlar genellikle eklendikleri ortamların yüzey ve arayüz gerilimini hızla azaltarak çözücü, ıslatma, yayılma, dağılma, emülsiyon oluşturma, köpürme ve dezenfektan özelliklerini değiştirirler. Bu değişimler, sürfektan konsantrasyonu belirli bir noktaya ulaştığında ortamın ozmotik basıncı, elektrik iletkenliği ve viskozitesinde belirli bir sapma ortaya çıkar. Buna kritik misel derişim (KMD) değişimi denilmektedir (Şekil 1.21).



Şekil 1.21 KMD (kritik misel derişim) değişimi grafiği.

KMD değişimini açıklayabilmek için kolloidal partiküllerin (misellerin) nasıl oluştuna ilişkin bir hipotez ileri sürülmüştür. Hipotezde, sürfektan baş kısımlarının su

ile temas halinde sıralanarak kuyrukların etrafını kuşatmasıyla hidrofobik bir iç kısım oluşturacakları varsayılmıştır. Bu yoldan oluşacak koloidal boyutlu partiküllere “misel” ve bu misel oluşumunun başlayacağı sürfektan derişimine ise “Kritik Misel Derişimi (KMD)” denilmiştir (Şekil 1.22) (Baykut ve Biran 1996, Clint 1992). Belirli koşullar altında, biyosürfektan moleküllerinin tamamı misel oluşumuna katılmaz ve serbest halde bulunur. Bu durumda sürfektan monomerleri ile misel yapılar arasında bir denge söz konusudur (Rangel-Yagui ve ark., 2005).



Şekil 1.22 Biyosürfektan misellerin oluşumu.

### 1.5.3 Kritik misel derişimi değişiminin ölçümü

En yaygın teknikler viskozite, türbidite, difüzyon, elektrik iletkenliği, ozmotik basınç ve floresans ölçümü ve çözündürme yöntemleridir. Bu ölçülen değerler, karşılık gelen biyosürfektan derişimleri değerleri ile birlikte kullanılarak eğriler çizildiğinde ortaya çıkan kırılmalar KMD değişim değerlerini verir (Şekil 1.21) (Rangel-Yagui ve ark., 2005; Ünsal, 2008).

Misel çapı ve morfolojisi sürfektan konsantrasyonunun yanı sıra, ortamın sıcaklığı, pH ve elektrolit içeriğinden etkilenmektedir (Ünsal, 2008). İyonik olmayan (non-iyonik) sürfektanlar diğer sınıflara göre daha düşük KMD değerlerine sahiptir. Bu durumun, bir elektrostatik itmeden kaynaklandığı ileri sürülmüştür.

### 1.6 Literatür Özeti

Mikroorganizmalardan elde edilen birçok lipaz, yaklaşık 40 yıldan beri, çeşitli karbohidrat ve yağ asitlerinden ester sentezlenmesinde kullanılmaktadır. Mevcut lipaz

enzimleri *Rhizopus*, *Enterbacterium*, *Aspergillus*, *Pseudomonas*, *Chromobacterium*, *Candida*, *Mucor* ve *Penicillium* cinslerine ait suşlardan üretilmektedir. Genellikle uzun zincirli yağ asitleri, palmitik asit (16 karbonlu), stearik-, oleik- ve linoleik asit (18 karbonlu). Glukoz, fruktoz, sorbitol ve sükröz gibi mono- ve disakkaritler, karbohidrat kaynağını oluşturmaktadır (Seino ve ark., 1984).

Organik çözücüler, tek başlarına ya da karışım halinde, büyük bir oranda tepkime ortamı olarak kullanılmasına karşın, bazen sulu tampon çözücüler de denenmiştir. Tepkime sıcaklığı 40 °C ile 70 °C aralığındadır. Sulu ortam tepkimeleri için düşük, organik ortamlar için yüksek sıcaklıklar seçilmektedir (Seino ve ark., 1984).

Tepkimeler çoğunlukla immobilize lipazlarla yapılmakta; enzim kinetiği üretilen kaynağa, substratların molekül yapısı ve büyüklüklerine göre değişiklik göstermektedir. Örneğin, *Candida cylindracea* lipazı karbohidrat esterlerinin sentezinde en aktif enzim olarak bilinmektedir (Seino ve ark., 1984).

Biyosürfektanlar ve emülsifikasyon ajanları (BE), hidrofilik ve hidrofobik iki birimden oluşan, genellikle mikroorganizmalarda üretilen yüzey aktif maddelerdir. Hidrofilik birim amino asitler, proteinimsi yapılar ya da karbohidratlardan (mono-, oligo-, ve polisakkarit), hidrofobik birim ise bir yağ asidinin hidrokarbon zincirinden oluşmaktadır. Bu amfifilik yapı BS veya BE'in birbirine karışmayan (faz oluşturan) sıvıların arayüzünde farklı geometrik görünüme sahip düzenli molekül kümeleri (miseller) oluşturmaya neden olur. Bu düzenli yapılar, hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler yardımıyla, sıvı fazların arayüzünde yüzey gerilimini (viskoziteyi) azaltır; katı yüzeylerin ıslanmasını temin eder. Bu işlevler kapsamında bir biyosürfektanın performansı, arayüzde elde edilen minimum yüzey gerilim değeri ve kritik misel konsantrasyonu ile ölçülmektedir (Fletcher, 1992).

Ester verimi yaklaşık %35 ile %70 aralığındadır. Bazı araştırmalarda fruktoz ve glukoz ile benzer, disakkaritlerle değişken oranlarda ester elde edildiği rapor edilmiştir. Bir araştırmada maltozun laktoz ve sükrözden daha iyi bir substrat olduğu saptanmıştır (Ku ve Hang, 1995).

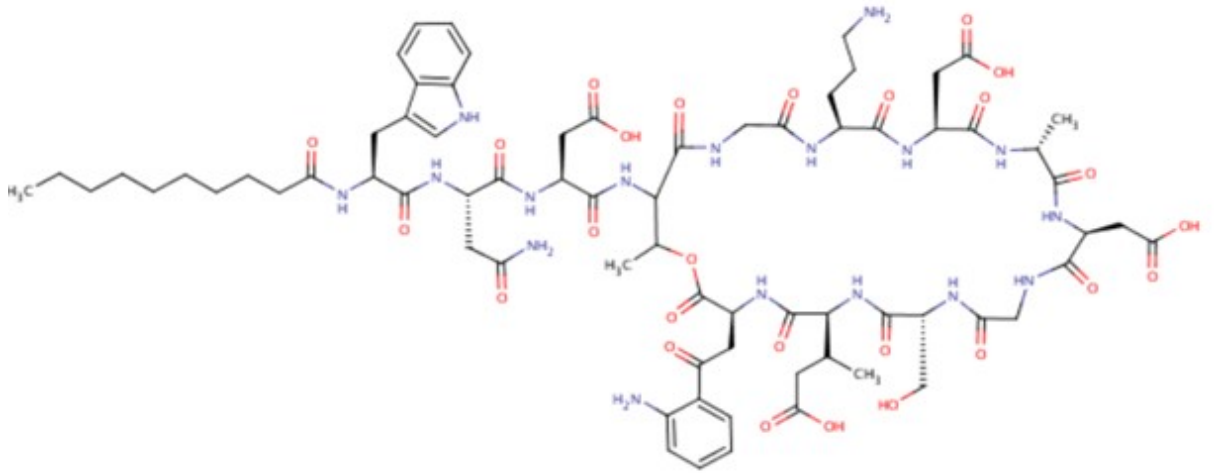
Organik tepkime ortamlarında ürün verimini sınırlayıcı faktörün karbohidrat çözünürlüğü olduğu belirtilmektedir. Mevcut literatürde kullanılan substrat oranları, şeker: yağ (M:M), 1:1 ile 1:3 aralığındadır. Bir araştırmada glukoz kullanılan tepkimelerde 1:1 şeker yağ oranı ile %90 esterleşme gerçekleştirildiği; yani glukozun

%90'ının ürüne (6-0-palmitoilglukoz) dönüştüğü rapor edilmiştir (Tsuzuki ve ark., 1999).

Her bir esterleşme tepkimesi doğal olarak bir molekül su üretir. Ortamda suyun birikmesi tepkimenin hızını ve yönünü etkilemektedir. Bu suyun ortamdan uzaklaştırılması için genellikle tepkime ortamına belirli miktarda moleküler elek eklenmektedir (Tsuzuki ve ark., 1999).

Ürün verimi tepkime ortamına göre de değişiklik göstermektedir. Örneğin, glukoz ve palmitik asitten; heksanlı ortamda ~%41, aseton ortamında ~%54 verim kaydedilmiştir. Burada mekanik etkinin (inkübasyon sırasında çalkalama hızının) verim miktarında değişiklik yaptığı ayrıca vurgulanmaktadır (Tarahomjoo ve Alemzadeh, 2003).

Daptomisin *Streptomyces roseosporus*'un ürettiği bir tridekapeptittir. Proteinlerin birincil yapılarında rastlanmayan birçok amino asidi içerir. N-terminalinde dekanoil yağ asidi vardır. Ana yapısı, Thr-4 hidroksil grubu üzerinden C-terminalde bulunan karboksilatla halka yapı oluşturan bir dekapeptittir (Şekil 1.23). Diğer asidik lipopeptit antibiyotikleri ile benzer bir yapıya sahiptir. Bunlara *Streptomyces coelicolor*'un kalsiyuma bağlı antibiyotikleri (CDA), *Streptomyces fradiae*'nin A54145'ü ve *Actinoplanes friuliensis*'in friulimisinleri ve amfomisinleri dahildir.



Şekil 1.23 Daptomisin.

Asidik lipopeptitler ribozomlarda sentezlenmeyen doğal peptit ürünler ailesi kapsamındadır. Non-ribozomal peptitler doğada en çok yapısal çeşitlilik ve yaygın dağılım gösteren ikincil metabolitlerdendir ve vankomisin, siklosporin, bleomisin ve

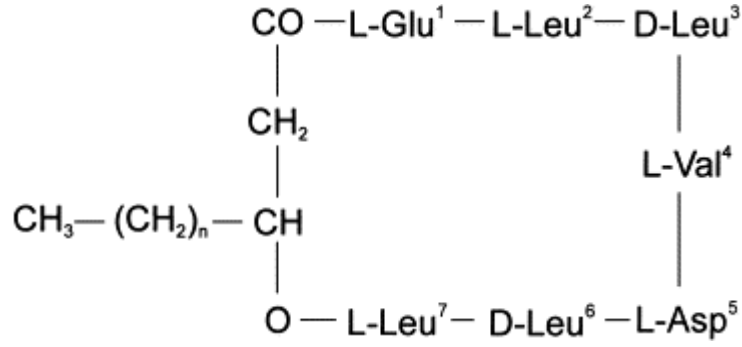
daptomisin gibi önemli terapötik ajanları içerir. Bu kompleks yapıların endüstriyel yöntemlerle sentezlenmesi mümkün olmadığından, *in situ* biyosentez mekanizmalarının anlaşılması ve benzer yöntemlerin geliştirilebilmesi için önemli gayretler olmuştur. Bu peptitlerin biyosentezinin temelini, non-ribozomal peptit sentetazlar (NRPS) oluşturmaktadır. Bu büyük montaj hattı enzimleri çoklu modüllerden oluşur ve sentezlenmekte olan peptit zincirine belirli bir amino asidin dahil edilmesinden ve aktivasyonundan sorumludur. NRPS modüllerini oluşturan katalitik domainlerin fonksiyonu ve substrat özgüllüğü açıklığa kavuşturulmuştur. Böylelikle, yeni ürünlerin biyosentezini gerçekleştiren yöntemlerin geliştirilmesi mümkün olabilmektedir. Bir NRPS modülüne temel özelliğini kazandıran yapı adenilasyon (A) domainidir. Bu yapı, substrat amino asidi aktiveleştirerek bir amino açıl-AMP ara ürünü oluşturur. Bundan sonra ilgili substrat amino asit, NRPS ile kovalent bağ yapar ve sentezlenmekte olan lipopeptit zincirine peptit bağı ile eklenir. Bu bağlamda mutant adenilasyon domainleri vasıtasıyla lipopeptit türevlerinin sentezlenebilmesi de mümkün görünmektedir (Micklefield, 2004).

Enzim kaynağı ve tipinin mono- veya diester ve ürünün belirli bir izomerinin sentezinde belirleyici olduğu bilinmektedir. Regioselektif *Thermomyces lanuginosus* ve *Candida antarctica* lipazı (CALB), 6'-O-palmitoilmaltoz ve 6'-0-laurilglukoza sentezlemektedir. Öte yandan CALB, 6,6'-di-açilsükrozu veririrken, *T. lanuginosus* lipazı 6'-0- açilsükrozu üretmektedir. Bu tepkimeler bütanol (2-metil-2-bütanol, 2M2B) ve dimetilsülfoksit (DMSO) ortamında gerçekleştirilmiştir (Ferrer ve ark., 2005).

Bazı çalışmalarda şeker esterlerinin anti-bakteriyel ve anti-fungal potansiyelleri de araştırılmıştır. Yaklaşık 1 ile 10 mg/ml dozda, 6'-O-laurozilsükroz ve 6'-O-laurilmaltoz, bazı Gram (+) bakterilerin büyümesini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Ferrer ve ark., 2005).

Lipopeptitler net yükü sıfır, negatif (surfaktin, daptomisin) ya da pozitif olan (polimiksin) eşsiz bir halka peptit sınıfını temsil ederler (Şekil 1.24). Bu biyoaktif sekonder metabolitler çok önemli terapötik ve biyoteknolojik özelliklere sahiptir. Antibiyotik aktiviteleri, sürfektan aktivitelerinden daha popülerdir.





Şekil 1.24 Halka lipopeptit surfaktin.

*Bacillus subtilis*'in ürettiği surfaktin, bilinen en güçlü biyosüfektanlardan biridir. Kritik misel konsantrasyonundan (23 mg/L) çok düşük konsantrasyonlarda, 10 µM, suyun yüzey gerilimini 72 mN.m<sup>-1</sup>'den 27 mN.m<sup>-1</sup>'e düşürebilmektedir. Yaklaşık 170 surfaktin molekülü bir araya gelerek çubuk şeklinde bir misel oluşturur.

Surfaktin, amfifilik bir molekül olması sebebiyle hücre zarını kararsızlaştırarak bütünlüğünü bozar. Hücre zarına hidrofobik etkileşimler aracılığı ile girerek homodimer oluşturur. Bir ve iki değerlikli katyonları tutar (chelates). Bir deterjan gibi, kanallar açarak, hücre zarını çözünür hale getirir.

Surfaktin anti-bakteriyel ve anti-fungal aktivitelerin yanında anti-viral etkiye de sahiptir. Özellikle zarflı (enveloped) *Herpes* ve retrovirüsler üzerine etkilidir. Ancak 40 µM ile 60 µM aralığında hemolitik aktivite gösterdiğinden toksik özelliğe sahiptir. Bu da sağlık alanında kullanımını kısıtlamaktadır (Seydlová ve Svobodová, 2008).

CALB ile katalizlenen stearik asit ve glukoz mono-esteri sentez mekanizmasını açıklamak için matematik ifadeler içeren bir Pin-Pon (Ping-Pong) kinetik model önerilmiştir. Model, farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen tepkime verileri ile test edilmiştir. Bu çalışma, mono-ester sentezi için gerekli aktivasyon enerjisinin 19,4 kJ/mol olduğunu öngörmüştür (Yu ve ark., 2008).

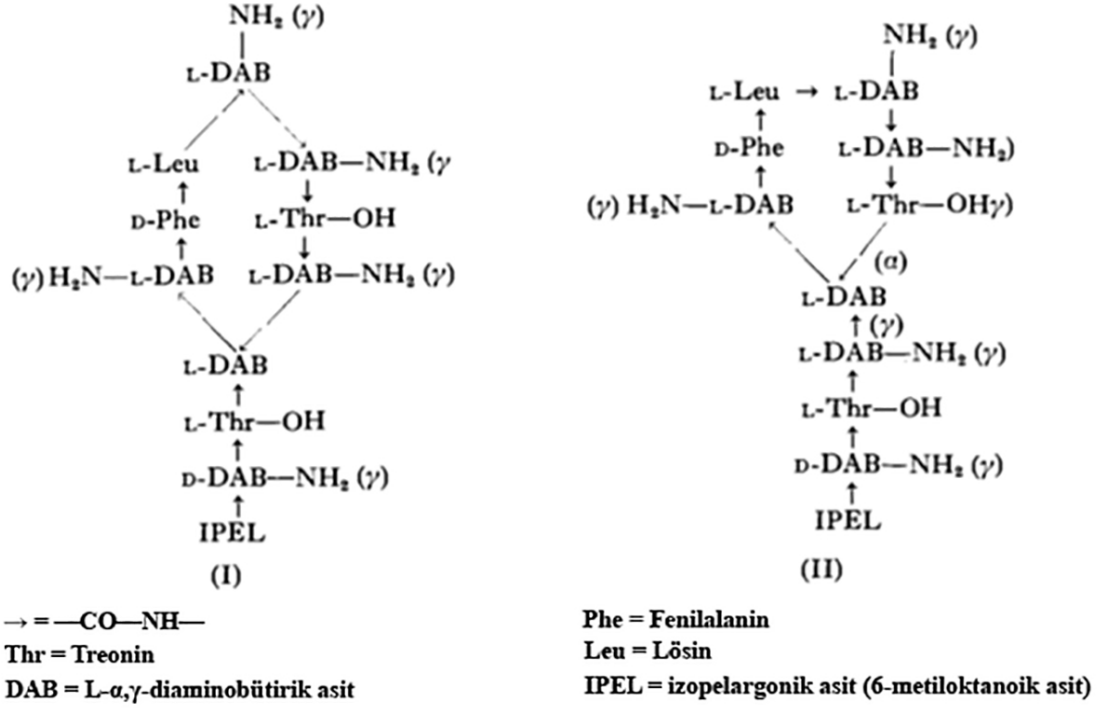
Bir araştırmada tepkime ortamı organik çözücülerin yanı sıra CO<sub>2</sub> de içermektedir. Substrat olarak 1:2 (M:M) glukoz ve palmitik asit kullanılmıştır. Çalışmada basınç, sıcaklık, substrat ve enzim konsantrasyonları gibi anahtar süreç parametrelerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Sonuç olarak, tepkimenin genişmiş bir sıvı fazda gerçekleşmesini sağlamak için, %3'e kadar (v/v) bir aseton miktarı gerektiği, optimum sıcaklığın 50 °C ve optimum basıncın 65 bar olduğu, optimum enzim miktarının

ortamda çözülmüş yağ asidi miktarının ağırlıkça %30'u kadar olması gerektiği belirlenmiştir. Tepkime sırasında ortaya çıkan suyun uzaklaştırılması için moleküler elek içermeyen bir mekanizma önerilmiştir (Tai ve Brunner, 2009).

Polimiksin B (PMB) yaklaşık 60 yıl önce toprak bakterisi *Bacillus polymyxa*'dan keşfedilmiştir. Kimyasal yapısındaki korunmuş elementler polar (Thr) ve katyonik (L- $\alpha$ - $\gamma$ -amino asitler) segmentleriyle ayrılmış iki hidrofobik domain (N-terminal yağ açıl zinciri ve D-Phe<sup>6</sup>-L-Leu<sup>7</sup> segmenti) diaminobutirik asit (Dab) birimleridir. PMB'nin ana bileşenleri olan PMB1 (1) ve PMB2 (2), sırasıyla (S)-6-metiloktanoik asit ve (S)-6-metilheptanoik asit ile N-terminalden açillenmiştir (Şekil 1.25). Çoğunlukla başka yollardan tedavi edilmeyen ciddi enfeksiyon vakalarında son çare antibiyotik olarak kullanılmaktadır. Bugün için polimiksinlere dirençlilik oldukça düşüktür (Velkov ve ark., 2010).

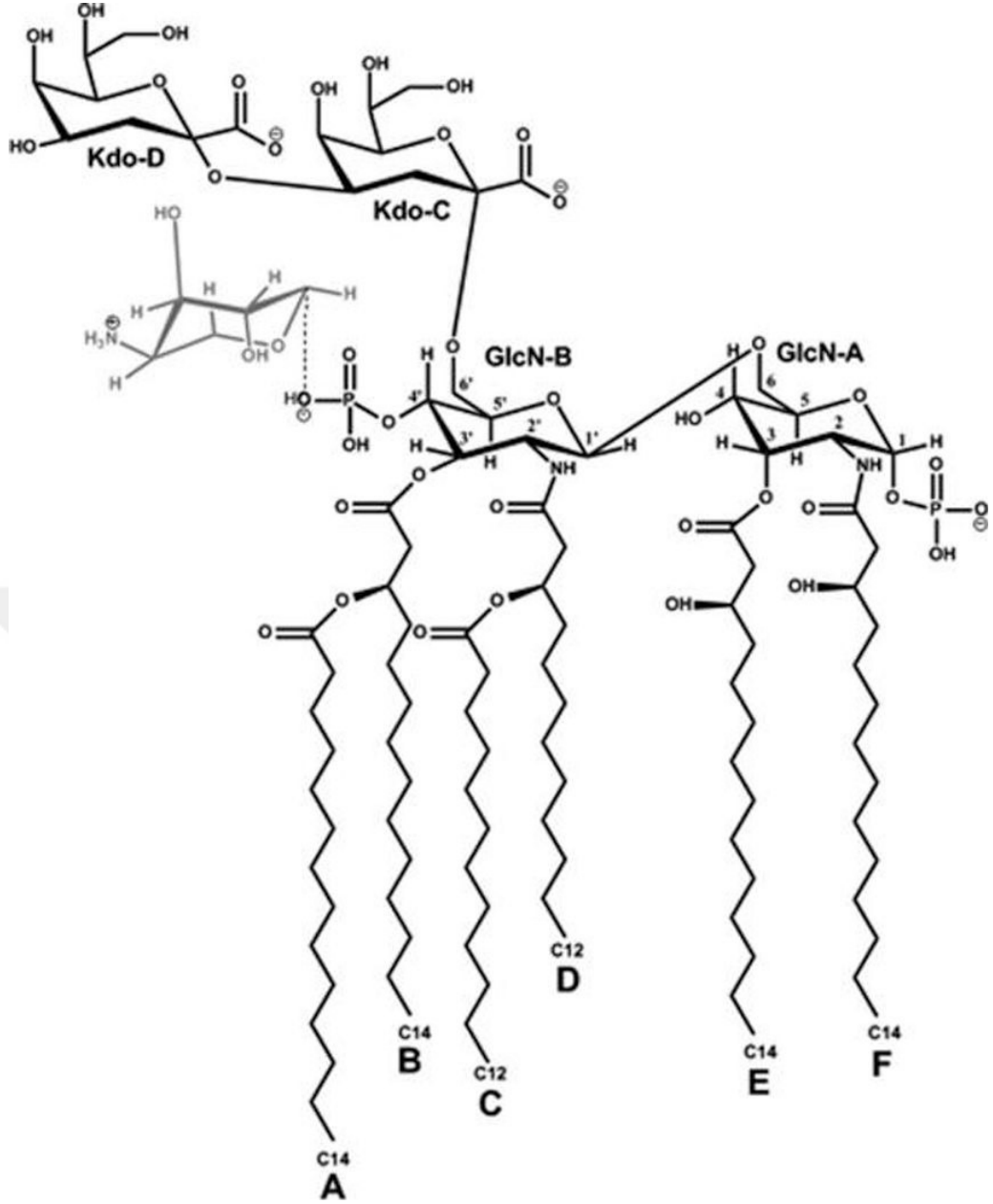
Polimiksinlerin başlangıç hedefi zarın LPS bileşenidir. Bu nedenle, polimiksin aktivitesinin mekanizmasının anlaşılması, LPS yapısının bilinmesini gerektirir. LPS, lipit A'ya bağlanmış bir iç çekirdek 2-keto-3-deoksioktonoik asit (Kdo) ve çeşitli polisakkaritlerin tekrar eden birimlerinden oluşan bir değişken O-antijeni olmak üzere üç bölgeden oluşur. Lipit A'nın konsensüs yapısı, 1'- ve 4'-konumlarından fosforile olan  $\beta$ -1'-6'-bağlı D-glukozamin (GlcN) disakkarittir (Şekil 1.26). Lipit A genellikle altı açıl zincir içerir. Doğrudan glukozamin şekerlerine bağlanan dört açıl zinciri,  $\beta$ -hidroksiaçıl zincirleridir. İkincil açıl zincirleri genellikle  $\beta$ -hidroksi grubuna bağlanır. Lipit A, yağ açıl zincirlerinin sıkı bir şekilde paketlenmesiyle genel dış membran yapısının stabilize edilmesine yardımcı olan hidrofobik bir çapa işlevi görür (Velkov ve ark., 2010).

Polimiksinler antimikrobiyal etkilerini LPS'nin lipit A bileşeni ile doğrudan etkileşimleri vasıtasıyla bakteri dış membranını geçirgen kılarak (permeabilize ederek) gerçekleştirirler. Bu nedenle, Gram-negatif bakteriler için göstermiş oldukları dar etki spektrumu, LPS'e seçici bağlanmalarının bir sonucudur. Polimiksinlerin yapısal amfifilikliği ve muhtemelen gözenekli kümelenmeler oluşturma özelliği, dış membranı (OM) permeabilize edici mekanizmanın temelini oluşturabilir (Velkov ve ark., 2010).



Şekil 1.25 Polimiksin B.

Polimiksinin pozitif yüklü Dab birimleri ile negatif yüklü lipit A fosfatları arasındaki elektrostatik etkileşimin, normalde dış zarın lipopolisakkaritlerini stabilize eden  $Ca^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$  iyonlarını uzaklaştırdığına inanılmaktadır (Şekil 1.26). Bu başlangıçtaki elektrostatik etkileşim, kompleksi geçici olarak stabilize eder ve polimiksin molekülünün N-terminal yağ açıl zincirini dış membrana yakın hale getirir. Yağ açıl zinciri ve D-Phe<sup>6</sup>-L-Leu<sup>7</sup> (PMB) hidrofobik domainin membrana girmesi ile komşu lipit A yağlı açıl zincirlerini bir arada tutan kuvvetler zayıflar ve tek tabakalı dış membranın genişlemesine sebep olur. Alternatif bir mekanizma da önerilmiştir. Bu modelde, polimiksinin anyonik fosfolipitlerle vezikül-vezikül etkileşimleri yaptığı varsayılmaktadır. Bu temas, iki veziküler yapı arasında fosfolipit değiş tokuşunu teşvik ederek iç ve dış zarın membran kompozisyonunu değiştirecek ve sonuçta ozmotik dengenin bozulmasıyla hücrenin parçalanmasına sebep olacaktır (Velkov ve ark., 2010).



**Şekil 1.26** Lipit A'nın (*Escherichia coli*) kimyasal yapısı. Polimiksin dirençli suşlarda gözlenen fosfat gruplarının amino-4-deoksi-L-arabinoz ile modifikasyonu gri renkte gösterilmiştir (Velkov ve ark., 2010).

Biyosümfektan ve biyo emülsifiye edici (BE) üreten mikroorganizmaları taramak, belirlemek veya değerlendirmek için kullanılan 11 ana yöntem bulunmaktadır:

\* Hidrokarbonlarla kaplanmış agar tabaklar: Saf izolatlar yağ kaplı agar tabaklar üzerine çizilir ve istenen sıcaklıkta bir hafta inkübasyona bırakılır. Emülsiyonlaşmış bir şeffaf alan (halo) ile çevrili koloniler BS üreticileri olarak kabul edilir (Satpute ve ark., 2010).

\* Aksimetrik damla şekli analizi (ADSA): Bu teknik, katı bir yüzey üzerinde bir sıvı damlacık profilinin temas açısının (CA, contact angle) yanı sıra yüzey gerilimini (SFT, surface tension) de belirler. Hücreler, bir tampon çözeltisi içinde ya da besiyerinde asılı tutulur. Sonuç olarak, her süspansiyonun damlacıkları floroetilenpropilen yüzey üzerine yerleştirilir ve bir damlamanın profili, 2 saatlik bir zamana bağlı olarak saptanır. Süspansiyonların SFT'si, ADSA ile damla profilinden hesaplanır. Yalnızca BS üreten süspansiyonlar, ürün konsantrasyonuna ve/veya BS üreten mikroorganizma sayısına bağlı olarak SFT'de azalma gösterir (Satpute ve ark., 2010).

\* Hücre yüzeyi hidrofobisitesi tekniği: Hücrenin yüzey hidrofobisitesi ile BS üretimi arasında doğrudan bir korelasyon vardır. Hücreler, santrifüjleme (12,000 g/30 dakika/4 °C) ile hasat edilir ve iki kez 50 mM fosfat tamponu (pH 7,0) ile yıkanır ve aynı tampon kullanılarak 0,5 absorbansta ( $A_{600}$ ) yeniden süspansiyon edilir. Hücre süspansiyonları (3 mL) hidrokarbonlara (0,5 mL) eklenir ve 3 dk vortekslenir. Hidrokarbon fazının tamamen yukarı çıkması için 10 dk bekletilir. Sulu faz alınarak  $A_{600}$ ' de ölçüm yapılır. Sulu fazda  $A_{600}$ 'deki azalma, hücre yüzeyi hidrofobisitesinin (%H) bir ölçümü olarak alınır; bu, şu formülle hesaplanır:  $\%H = [(A_0 - A) / A_0] \times 100$ .  $A_0$  hidrokarbonla karıştırmadan önceki ve  $A$  ise sonraki okunan absorban değeridir. BS üretimi hidrokarbon alımıyla ilişkilidir. Mikroorganizmalar, BS/BE hücre dışına salındığında, düşük yüzey hidrofobisitesi gösterir (Satpute ve ark., 2010).

\* Mavi agar tabak yöntemi: Bu teknik, *Pseudomonas* sp.'nin ürettiği ramnolipit ve benzeri glikolipitlerin saptanması için özel olarak geliştirilmiştir. Diğer Gram negatif izolatlar için de uygulanabilir. Mineral tuzlar içeren agar ortamı (MSA) (karbon kaynağı (%2) ve setiltrimetilamonyum bromür (CTAB: %0,0005), metilen mavisi (MB: %0,0002) ile takviye edilmiştir. Anyonik BS'ın, katyonik CTAB-MB ile çözünmez iyon çifti oluşturması koloni çevresinde koyu mavi renkte şeffaf bir görünüme (halo) sebep olur. Bu görünümle çevrili koloniler BS pozitif kabul edilir (Satpute ve ark., 2010).

\* Hemolitik aktivite: Nitel tarama testidir. Yüzde beş tam taze kan ile takviye edilmiş Luria agar (LA) veya nütrient agar (NA) gibi katı ortamlar kullanılır. Çizgi ekimden sonra izolatlar uygun sıcaklıkta 48 saat inkübe edilir. Gözle görülebilen hemoliz, yüzey aktif moleküllerin varlığına işaret eder (Satpute ve ark., 2010).

\* Modifiye çökük damla yöntemi: Mikrotitrasyon kuyucukları ince bir katman oluşturacak şekilde *Pennzoil* ile kaplanmıştır. Kuyucukların ortasına 5 µL'lik bir örnek (kültür besiyeri) ilave edilir ve 1 dk boyunca gözlemlenir. Kültür içeren damla yağın yüzeyinden düşmesi, BS varlığının bir göstergesidir (Satpute ve ark., 2010).

\* Yağ yayma yöntemi: Bir Petri tabağına 20 mL ham petrol ve 50 mL damıtılmış su (DW) eklenir. Yağla kaplanmış su yüzeyine 10 µL'lik kültür besiyeri ilave edilir. Emülsiyon haline getirilmiş bir daire ile çevrili koloni, BS üretimi için pozitif kabul edilir. BS üreticilerinin varlığını tespit etmenin en iyi yöntemlerinden biridir (Satpute ve ark., 2010).

\* Eğimli lam testi: İzolatlar 24 saat boyunca agar tabaklarda büyütülür. Koloni örneği, cam lamın bir ucunda bir %0,9 NaCl damlacığı ile karıştırılır. Lam eğimlidir ve damlacık gözlemlenir. BS üreticileri çöken damlaların görülmesi ile tespit edilir (Satpute ve ark., 2010).

\* Koloni-ince tabaka kromatografisi (TLC) tekniği: Bu teknikte, bakteri kütlesi doğrudan önceden geliştirilmiş (kloroform: metanol; 2: 1) TLC plakaya konulur. Bakteri kütlesi kurutulduktan sonra plaka kloroform: metanol: 5 M amonyak (85: 25: 4 v/v) içerisinde yürütülür ve geliştiriciler (developers) yardımıyla bantlar görüntülenir. Elde edilen kromatograf, organizmanın karakteristik lipit kompozisyonlarını gösterir (Satpute ve ark., 2010).

\* Emülsifikasyon testi (EA): Kültür besiyeri oda sıcaklığında 10.000 rpm'de 15 dk santrifüjlenir. Üst sıvı (3 mL), yağ veya hidrokarbon (0,5 mL) ile karıştırılır ve 2 dk boyunca kuvvetli bir şekilde vortekslenir. Sulu ve yağ fazının ayrılması için 1 saat beklenir. Yağ veya hidrokarbon içermeyen aynı miktarda bir üst sıvı örneği kontrol olarak kullanılır. Sulu fazın absorbansı bir spektrofotometre kullanılarak ölçülür. Seyreltme faktörü ile çarpılan 400 nm'de 0,01 birimlik bir absorbans, mililitrede (EU/mL) bir emülsifikasyon aktivitesi birimi olarak kabul edilir (Satpute ve ark., 2010).

\* Bulanıklık deneyi: Kültür besiyeri filtrelenir ve filtrat kurutulur bir tampona ilave edilir. OD<sub>446</sub>'de ölçüm yapılır. Sonra örneğin üzerine hidrokarbon eklenir ve karışım 2 dk vortekslenir. 10 dk bekletilir ve yine OD ölçülür. EA, başlangıç ve son OD arasındaki farktan hesaplanır (Satpute ve ark., 2010).

Şeker esterleri, aynı zamanda sürfektan özellikli bileşiklerdir; sürfektanlar gibi iki sıvı faz arasında arayüz gerilimini azaltırlar. Bu nedenle emülsiyon ajanları olarak kullanılabilirler. Örneğin; sütler ve özellikle bitki sütleri bekletildiklerinde faz ayrışması eğilimindedirler. Örneğin; fruktoz esterlerinin taze Hindistan cevizi sütü örneklerine 1:10 oranında eklenmesi sonucunda 38,0 N/m değerinde bir yüzey gerilimi ve %54,1 değerinde bir emülsiyon endeksi ölçülmüştür. Bir başka şeker esteri olan 5-0-Palmitoil-L- (+) – arabinoz'un da çok çeşitli sanayi formülasyonlarında güvenli ve

iyonik olmayan bir yüzey aktif madde olarak kullanılabilceği rapor edilmiştir (Neta ve ark., 2012).

Daptomisin, Gram pozitif bakterilerle komplike cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları (cSSTI) olan hastalarda etkindir. Etkinlik alanına metisilin duyarlılığından bağımsız olarak *Staphylococcus aureus* enfeksiyonları da dahildir. Yaşlı hastalarda, yine metisilin duyarlılığına bakılmaksızın, *S. aureus*'un neden olduğu enfeksiyonlar da dahil olmak üzere, daptomisinin etkinliği ve güvenilirliği doğrulanmıştır (Konychev ve ark., 2013).

Glikolipit biyosürefektanlar, genellikle  $\alpha/\beta$  glukoz ya da galaktoz ile bir lipit omurgadan oluşurlar. Prokaryot ve ökaryot hücre zarının yapısında sterilglikozit, glikozilseramit ve diaçilgliserolglükozitler halinde yer alırlar. Glikolipitler, diğer lipitlerle birlikte, iki tabakalı hücre zarının yapısal ve statik bileşenleri olarak kabul edilirler. Yapı elemanı olmanın yanı sıra; bir yandan iyon geçirmez özellikleri ile yüzeyin yük yoğunluğu ve hidrasyonunu dengeleyerek, diğer yandan zar proteinleri ile etkileşimleri ile bu moleküllerin zara yerleşmelerine, katlanmalarına ve hareket etmelerine yardım ederek, hücre zarının iç kısmının ve dış yüzeyinin fiziksel özelliklerine katkıda bulunurlar. Seramit, glikozilseramit, sfingolipit ve glikosfingolipitlerin bileşenleri olarak hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını önlemede, hücre döngüsünü durdurmada ve sinyal aktarım yollarında, yaşlanma, apoptoz ve enflamasyon gibi temel süreçlerde rol oynadıkları rapor edilmiştir (Cortés-Sánchez ve ark., 2013).

Tepkime ürünleri önce ince tabaka kromatografisi (TLC) ile kalitatif olarak incelenmektedir. İlk çalışmalarda yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ikinci analitik adımı oluşturmaktaydı. Doksanlı yıllardan sonra Fourier-transform infrared (IR) spektroskopisi ikinci analitik adım olarak kullanılmaya başlamıştır. Nükleer Magnetik Rezonans (NMR) prensip olarak IR'a benzemesine karşın, ürün piklerini daha net görüntülemesi bakımından son ürün karakterizasyonunda üçüncü analitik adımı oluşturmaktadır. Dördüncü analitik adım kütle spektrofotometrisidir ve ürünün molekül yapısını belirlemek için kullanılmaktadır (Pappalardo ve ark., 2017).

Tert-bütanol de DMSO ile birlikte tepkime ortamı olarak kullanılabilir. Bir araştırmada L-(+)-arabinoz-palmitik asit esteri sentezi bu ortamda gerçekleştirilmiştir. Ürün, 5-0-Palmitoil-L-(+)- arabinoz monoesteridir (Pappalardo ve ark., 2017).

## 2. MATERYAL VE METOD

### 2.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

Deneylerde kullanılan kimyasal ve cihazların listesi Tablo 2.1, 2.2 ve 2.3'te verilmiştir. Çalışmalarda kullanılan tüm kimyasalların analizler için uygun analitik saflıkta olmasına dikkat edilmiştir.

**Tablo 2.1** Deneylerde kullanılan kimyasallar, firmalar ve katalog numaraları.

<b>Madde Adı</b>	<b>Üretici firma</b>	<b>Katalog numarası</b>
DMSO	Merck	802912
2M2B	Sigma	721123
tert-bütanol	Sigma	308250
Kloroform	Merck	102445
Metanol	Merck	106009
Asetik asit	Sigma	1.00063
Büret reaktifi	Merck	110307
Glukoz	Merck	G8270
Fruktoz	Merck	1.05323
Riboz	AppliChem	A2219,0010
Palmitik asit	Sigma	P0500
Oleik asit	Merck	4954
Hekzanoik asit	Sigma	153745
Laurik asit	Sigma	W261408
Orcinol	Sigma	447420
p-anisaldehyd	Sigma	A88107
Silika TLC	Merck	105554
Moleküler elek	Alfa aesar	L05335
<i>Candida antarctica</i> lipazı	Sigma	L4777



**Tablo 2.2** Deneylerde kullanılan cihazlar

<b>Araç/Gereç</b>	<b>Marka</b>	<b>Model</b>
Hassas terazi	PRESICA	XB220A
Vorteks	IKA	GENIUS 3
Liyofilizatör	SCANVAC	CoolSafe 55-4
Su banyosu	Nüve	ST402
Evaporatör	IKA	RV 10
Etüv	SHEL LAB	SI6-2
Manyetik karıştırıcı	MULTIMATIC	9N
Kromatografi tankı	LATCH-LID	CHROMATOTANK
Spektrofotometre	AOE	UV-1800

**Tablo 2.3** Yapı Karakterizasyon Çalışmalarında Kullanılan Cihazlar

<b>Adı</b>	<b>Modeli</b>	<b>Bulunduğu yer</b>
NMR Spektrometresi	BRUKER 400	Erciyes Üniversitesi
NMR Spektrometresi	Varian UNITY INOVA 500	İstanbul Üniversitesi
FT-IR Spektrometresi	PERKIN ELMER 400	Erciyes Üniversitesi
HPLC	AGILENT 1260	Erciyes Üniversitesi
ESI-MS	Thermo Finnigan LCQ	İstanbul Üniversitesi

## 2.2 İmmobilize Lipazın Aktivite Tayini

Spektrofotometrik yöntemle lipaz aktivitesi tayininde p-nitrofenil palmitat (p-NPP) substrat olarak kullanılmıştır. Hidrolitik aktivite başlangıçta açık sarı tepkime ortamı rengini koyu sarıya dönüştürür. Koyu renk 410 nm'de ortamın absorbansında artışa neden olur. Absorbans farkı lipazın hidrolitik aktivitesinin karşılığı olarak alınır.

Bir Uluslararası Ünite (International Unit: IU) lipaz aktivitesi, optimum koşullarda dakikada 1  $\mu$ mol p-NPP hidrolizini katalizleyen lipaz miktarıdır.

### 2.3 p-Nitro Fenol Standart Eğrisinin Oluşturulması

Farklı derişimlerde p-nitrofenol (0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08 ve 0,1 mM) çözeltisi 50 mM fosfat tamponu (pH: 7,5) içinde hazırlanmıştır (Tablo 2.4). Fosfat tamponu (50 mL) 200 mg Triton X-100, 50 mg gum arabik ve %10 propanol ve %1 Tris (w/v) içermektedir. Derişimler OD<sub>410</sub>'da okunmuştur. p-nitrofenol'in molar absorpsiyon katsayısından ( $\epsilon = 10500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) yararlanılarak standart eğri çizilmiştir.

**Tablo 2.4** p-Nitrofenol standart eğrisi

	Kör	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Distile Su (mL)	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 mM p-NP çözeltisi ( $\mu\text{L}$ )	-	10	20	30	40	60	80	100	120	140	160
Tampon ( $\mu\text{L}$ )	-	990	980	970	960	940	920	900	880	860	840
Tris (%1, w/v)						1 mL					

**Tablo 2.5** Lipaz Aktivite Tayin Yöntemi

	Kör	Örnek
Saf Su	100 $\mu\text{L}$	---
Substrat	900 $\mu\text{L}$	900 $\mu\text{L}$
Serbest Enzim	----	100 $\mu\text{L}$
İnkübasyon (15 dk, 37 °C'de)		
%1'lik Tris Bazı 1 mL		
Santrifügasyon (6000 rpm, 15dk)		

Enzim ünitesi aşağıdaki formül yardımıyla belirlenmiştir:

$$U = \frac{\text{Abs} \times V_{\text{topl}}}{\epsilon \times \text{Süre (dk)} \times \text{Enzim Miktarı (mL)}}$$

### 2.4 Protein Tayini

Protein miktar tayini belirlenmesinde ticari olarak satın alınan Biüret reaktifi kullanılmıştır. Biüret yöntemi, duyarlılığı düşük (1-10 mg/ml) olmakla birlikte, sıkça kullanılmaktadır. Alkali koşullarda belirtecin bakır iyonları ( $\text{Cu}^{+2}$ ) proteinin azotlarına

bağlanarak renkli bir kompleks oluşturmuştur. Renk farkı spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda absorbans olarak okunmuştur.

Standart olarak sığır serum albumini (BSA) kullanılmıştır. Bu proteinden bir dizi derişimi farklı çözeltiler hazırlanmıştır (0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2,0, 2,2, 2,4, 2,6 ve 2,8 mg/mL). Her bir standart çözelti örneği (1 mL) üzerine 4 mL Biüret reaktifi eklenmiştir ve 30 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Enzim örnekleri ile birlikte 540 nm'de absorbans değerleri okunmuş ve miktar grafiği (standart eğri) çizilmiştir.

## 2.5 Esterifikasyon Tepkimesi

Lipaz ile katalizlenen glukoz, fruktoz ve riboz esterlerinin sentezi, 50 mL'lik Erlenmeyer şişeleri içinde, bazı değişikliklerle birlikte, yayınlanan yöntem izlenerek aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir (Degn ve ark., 2001):

Dimetilsülfoksit (DMSO; %20, v/v) ile 2-metil-2-bütanol (2M2B; %80, v/v) ya da *tert*-bütanol (%80, v/v) karışımından oluşan 25 mL'lik tepkime ortamında esterifikasyon D-glukoz (0,2 M), fruktoz (0,2 M) veya riboz (0,2 M) ile palmitik asit (0,6 M), oleik asit (0,2 M veya 0,6 M), palmitik asit (0,2 M) veya laurik asit (0,2 M) arasında gerçekleştirilmiştir (Tablo 2.6, 2.7 ve 2.8). Katalizör olarak 140 mg immobilize *Candida antarctica* lipazı eklenmiştir. Esterifikasyon sırasında ortaya çıkan su moleküllerini tutmak için 2 g moleküler elek kullanılmıştır. Her tepkime için katalizör içermeyen bir kontrol örneği hazırlanmıştır. Örnekler bir çalkalamalı inkübatör içinde 55 °C ve 200 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. Tepkime süresinin (24, 48 ve 72 saat) bitiminden sonra örnekler 5.000 rpm'de santrifüjlenmiştir ve üst sıvı yeni cam şişelere alınarak ileriki işlemler için -20 °C'de saklanmıştır.

**Tablo 2.6** Glukoz ile esterifikasyonun tepkime koşulları

Kod	Tepkime ortamı	Hacim (ml)	Substrat	Substrat oranı (M)	Sıcaklık °C	Süre (saat)	Enzim-miktarı mg	Moleküler elek (g)
7Ö	DMSO/TBU	4/16	Glukoz/PA	0,2/0,6	55	48	140	2
7K	DMSO/TBU	4/16	Glukoz/PA	0,2/0,6	55	48	--	2
8Ö	DMSO/2M2B	4/16	Glukoz/PA	0,2/0,6	55	48	140	2
8K	DMSO/2M2B	4/16	Glukoz/PA	0,2/0,6	55	48	--	2
10Ö	DMSO/TBU	4/16	Glukoz/OL	0,2/0,2	55	24	140	2
10K	DMSO/TBU	4/16	Glukoz/OL	0,2/0,2	55	24	--	2

**PA: Palmitik asit      OL: Oleik asit**

**Tablo 2.7** Fruktoz ile esterifikasyonun tepkime koşulları

Kod	Çözücü	Hacim (ml)	substrat	Substrat oranı (M)	Sıcaklık °C	Süre (saat)	Enzim-miktarı mg	Moleküler elek (g)
9Ö	DMSO/TBU	4/16	Fruktoz/OL	0,2/0,2	55	72	140	2
9K	DMSO/TBU	4/16	Fruktoz/OL	0,2/0,2	55	72	--	2
12Ö	DMSO/2M2B	4/16	Fruktoz/OL	0,2/0,2	55	24	140	2
12K	DMSO/2M2B	4/16	Fruktoz/OL	0,2/0,2	55	24	--	2
P1	DMSO/2M2B	4/16	Fruktoz/PA	0,2/0,2	55	24	--	2
L1	DMSO/2M2B	4/16	Fruktoz/LA	0,2/0,2	55	24	--	2

**OL: Oleik asit      PA: Palmitik asit      LA: Laurik asit**

**Tablo 2.8** Riboz ile esterifikasyonun tepkime koşulları

Kod	Çözücü	Hacim (ml)	substrat	Substrat oranı (M)	Sıcaklık °C	Süre (saat)	Enzim-miktarı mg	Moleküler elek (g)
C1/Ö	DMSO/TBU	4/16	Riboz/OL	0,2/0,2	60	24	140	2
C1/K	DMSO/TBU	4/16	Riboz/OL	0,2/0,2	60	24	--	2
C2/Ö	DMSO/2M2B	4/16	Riboz/OL	0,2/0,2	60	24	140	2
C2/K	DMSO/2M2B	4/16	Riboz/OL	0,2/0,2	60	24	--	2

**OL: Oleik asit**

## **2.6 Sentezlenen Şeker Esterlerinin Yapı Karakterizasyonu**

### **2.6.1 Kromatografik analiz**

#### **2.6.1.1 İnce tabaka kromatografisi (TLC)**

Sentez çalışmaları sırasında reaksiyonların yürüyüşünü izlemek, sentezlenen ürünlerin saflık derecelerini belirlemek amacı ile ince tabaka kromatografisinden yararlanılmıştır.

İnce tabaka plaklarının alt ucunda 1 cm'lik boşluk çizilerek belirlenmiştir. Esterifikasyon ürünlerinden doğrudan 2'şer mikrolitre alınarak, kontrol örnekleri ile birlikte, TLC silika jel 60 plakanın üst ucuna sırasıyla emdirilmiştir. Örnekler kloroform, metanol, asetik asit ve su (70: 20: 8: 2) karışımından oluşan yürütme sıvısı aracılığı ile ayrıştırılmıştır. Kurutma işleminden sonra, bantlaşma örüntüleri p-anisaldehyd/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> veya orsinol ile 100 °C'de 10 dk boyanarak görüntülenmiştir. Elde edilen her bir bant için Rf değeri hesaplanmıştır (Değn ve ark., 2001).

#### **2.6.1.2 Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)**

Küçük ölçekli analizlerde moleküllerin ayrılması, saflaştırılması ve ağırlıklarının belirlenmesinde etkin ve hızlı bir kromatografi yöntemidir. Molekül ağırlığı aralığına uygun, hazır kolonların seçilmesi ve kullanımını gerektirir. Bir dedektör yardımıyla bir karışımda bulunan her bir farklı molekül ayrı ayrı saptanır. Bu çalışmada HPLC, sentezlenen şeker esterlerinin verim hesabı için ve Agilent Zorbax karbohidrat analiz kolonu kullanılarak yapılmıştır.

### **2.6.2 Spektral analizler**

#### **2.6.2.1 IR spekturumları**

Işınla uyarılan bir ürünün yapısında yer alan atomların tür ve bağ özelliklerine göre yaydıkları farklı titreşimleri okuyan IR sistemi, molekül yapılarının aydınlatılmasına ilişkin çalışmaların genellikle ilk adımında kullanılır.

IR spektrumlarının ölçümü, Perkin Elmer spektrofotometresinde ATR yöntemiyle gerçekleştirilmiştir.

#### **2.6.2.2 <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-NMR ve 2D-HSQC analizi**

Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektroskopisi, molekül ve bileşikleri içerik, saflık, yapı ve konformasyon bakımından tanımlamada kullanılan bir kimyasal analiz yöntemidir. Temelinde quantum fiziği vardır. Her bir atomun çekirdeği sürekli dönme

halinde ve elektrik yüklü olduğundan özgün bir manyetik alana sahiptir. Bu manyetik alana dışarıdan çok daha güçlü ve süresiz bir manyetik alan uygulandığında atom çekirdekleri daha yüksek bir enerji seviyesine geçerler. Önceki hallerine dönerken radyo frekansında dalgalar yayarlar. Bu dalgalar bir dedektör vasıtasıyla okunur ve her bir çekirdek için özgün bir sinyal (spektrum) elde edilir. Bu çalışmada sentezlenen şeker ester ürünleri, Bruker ve Varian Unity Inova NMR spektrometre cihazlarında incelenmiştir.

## **2.7 Biyoaktivite Çalışmaları**

### **2.7.1 Doku kültürü hazırlanması**

Fibroblastlar memeli organizmalarda en yüksek sayıya sahip hücrelerdir ve ortalama 24 saatte bir kez bölünmektedirler. Sitotoksikite testi için L929 fare fibroblast hücre hattı (ATCC cell line, NCTC clone 929) kullanıldı. Doku kültürü Dulbecco's minimum Eagle medium (DMEM: %10 fetal calf serumu (FCS) ve 2 mM/mL L-glutamine; Sigma, St. Louis, MO, USA) besiyerinde, %5 CO<sub>2</sub> altında ve 37°C' de hazırlandı. Sitotoksikite testlerinde herhangi bir antibiyotik kullanılmamaktadır. Kültür konflüent duruma ulaştığında yani hücreler kültür flaskı tabanının yaklaşık %75'ini kapladığında, pasajlama yapıldı. Bu işlem için ilk önce besiyeri ortamı boşaltıldıktan sonra kültür PBS (Fosfat buffered saline) ile yıkandı. Hücreler kısmi tripsin (0,05 trypsin+%0,02 EDTA, WISENT Inc St. Bruno, Quebec, Kanada) sindirimi ile serbest hale getirildi. Sindirim işlemi ortama taze DMEM eklenerek sonlandırıldı. Hücre süspansiyonundan 96 kuyucuklu ELIZA plağının her bir kuyucuğuna 100 µL hacimde yaklaşık 10<sup>4</sup> hücre konuldu.

### **2.7.2 XTT sitotoksikite testi**

Herbir şeker esteri için dört farklı çözelti ( 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> ve 10<sup>-7</sup> M ) hazırlandı ve sitotoksik potansiyelleri XTT [2,3-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)-karboil]-2H-tetrazolyum hidroksit) yöntemi ile belirlendi. Besiyeri olarak FBS ve L-glutamin içeren DMEM kullanıldı. XTT ticari olarak mevcut bir hücre proliferasyon reaktifidir (Biological Industries, ABD) ve tetrazolyum tuzlarının hücrenin mitokondri dehidrojenaz enzimi tarafından formazona parçalanmasına bağlı olarak hücre sayısının saptanmasını sağlar (Berridge, M.V, 2005). Yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan her bir 100µL hücre süspansiyonu üzerine 10µL XTT eklenerek 2s inkübasyon yapıldı. Plakları OD<sub>450</sub>'de negatif kontrol örneklerine karşı okundu (Thermo Scientific

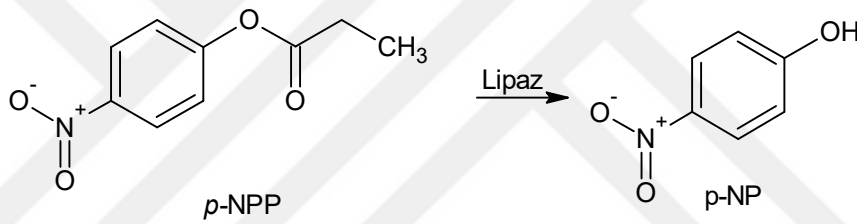
Microplate Photometer, Multiskan FC, ABD). Canlı hücre sayısı yüzde olarak aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:  $(\%) = [(OD_{450} (\text{örnek}) / OD_{450} (\text{negatif kontrol})) \times 100]$ . Sonuçlar; % 95 güven seviyesinde, çoklu karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile Student t testi istatistik programları kullanılarak ve 0,05 yanılma payı ile analiz edildi.



### 3. BULGULAR

#### 3.1. Enzim Aktivitesi

Enzim aktivitesini belirlemede çoğunlukla Winkler ve Stuckmann yöntemi tercih edilmektedir (Abramic ve ark., 1999; Bruno ve ark., 2004; Bruno ve ark., 2005; Casa ve ark., 2002; Dalmau ve ark., 2000; Nthangeni ve ark., 2001). Spektrofotometrik ölçüme dayalı bu yöntemde substrat *p*-nitrofenol palmitatın (*p*-NPP) hidrolizi ile açığa çıkan *p*-nitrofenol (*p*-NP), örnek rengini açık sarıdan koyu sarıya döndürür. Koyu renk, absorbans artışına neden olur. Böylelikle; lipaz aktivitesi, başlangıç absorbansına göre elde edilen farktan, en fazla %5 hata payı ile belirlenebilmektedir (Palomo ve ark., 2002).



Şekil 3.1 *p*-NPP'ın enzimatik hidrolizi.

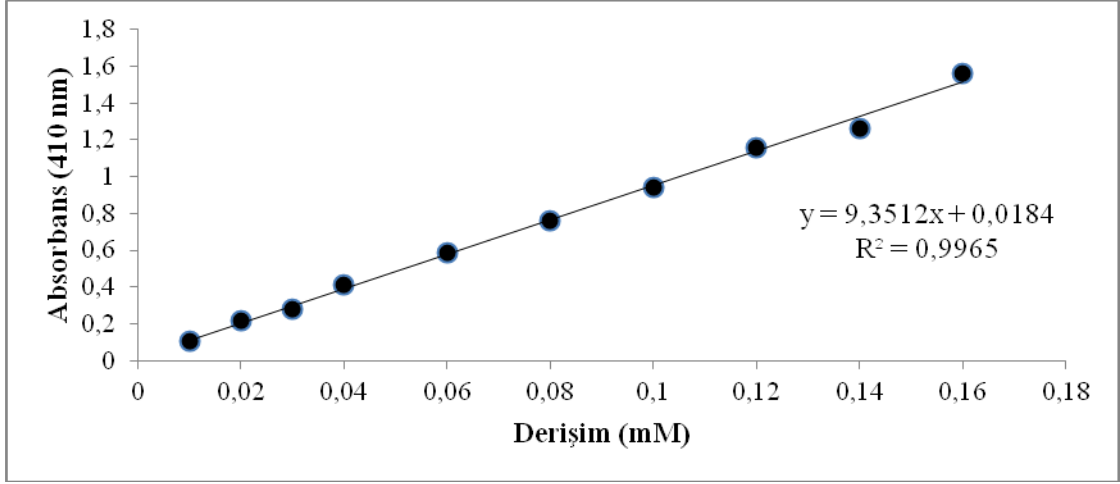
Bu çalışmada *Candida antarctica* (CALB) lipazının aktivitesi yukarıda açıklanan yöntemle belirlenerek esterifikasyon deneylerinde kullanılmıştır. *p*-NP ürününün molar absorpsiyon katsayısı ( $\epsilon = 10.500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) deneysel olarak çizilen standart grafiğinden belirlenerek enzim aktivite değerlerinin hesaplanmasında kullanılmıştır.

#### 3.1.1 Enzim aktivitesinin belirlenmesi için gerekli standart eğri çizimi

##### 3.1.1.1 Hidroliz ürününün standart eğrisi

Stok (1 mM) *p*-nitrofenol çözeltisinden 0,005 mM ile 0,1 mM aralığında seyreltme yapılmıştır. Seyreltme örneklerinin OD<sub>410</sub> nm'de okunan absorbans değerleri standart eğri çiziminde kullanılmıştır (Şekil 3.2).

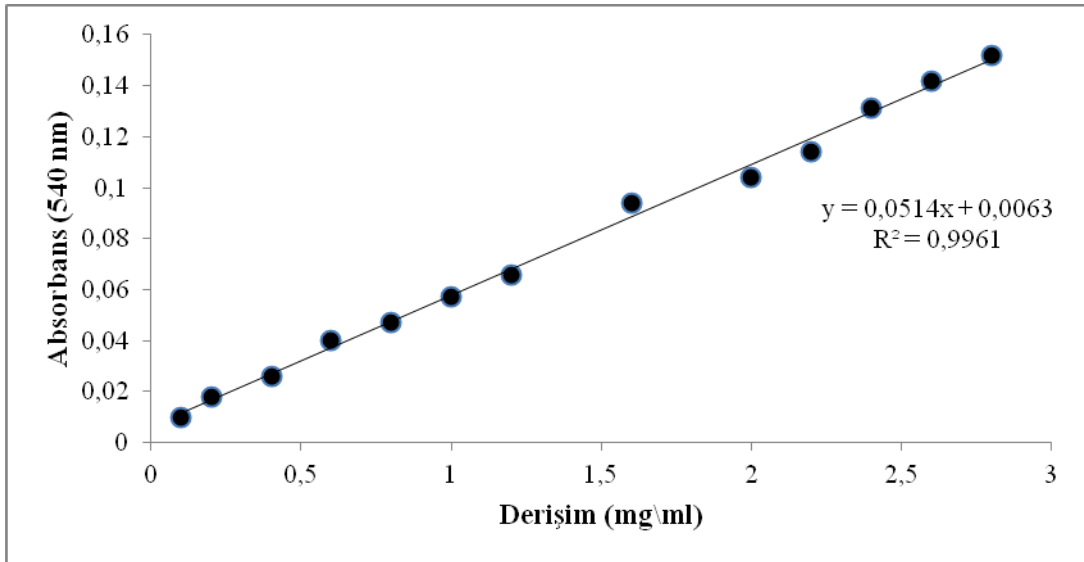




Şekil 3.2 p-Nitrofenol standart eğrisi.

### 3.1.1.2 Sığır serum albüminin standart eğrisi

Stok sığır serum albümininden bir dizi dilüsyon örnekleri (0,02, 0,05, 0,1, 0,125, 0,15 ve 0,2 mg/mL) hazırlanmıştır. Her bir dilüsyon örneği (100 µL) üzerine 2 mL Bradford reaktifi eklendi ve oda sıcaklığında 10 dk inkübasyondan sonra OD<sub>595</sub> nm’de absorbans değerleri kaydedilmiştir. Bu absorbans ve derişim değerleri ile standart protein eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 Protein standart grafiği.

### 3.1.1.3 Enzim aktivite tayini sonuçları

**Tablo 3.1** *Candida antarctica* lipazının aktivite tayini

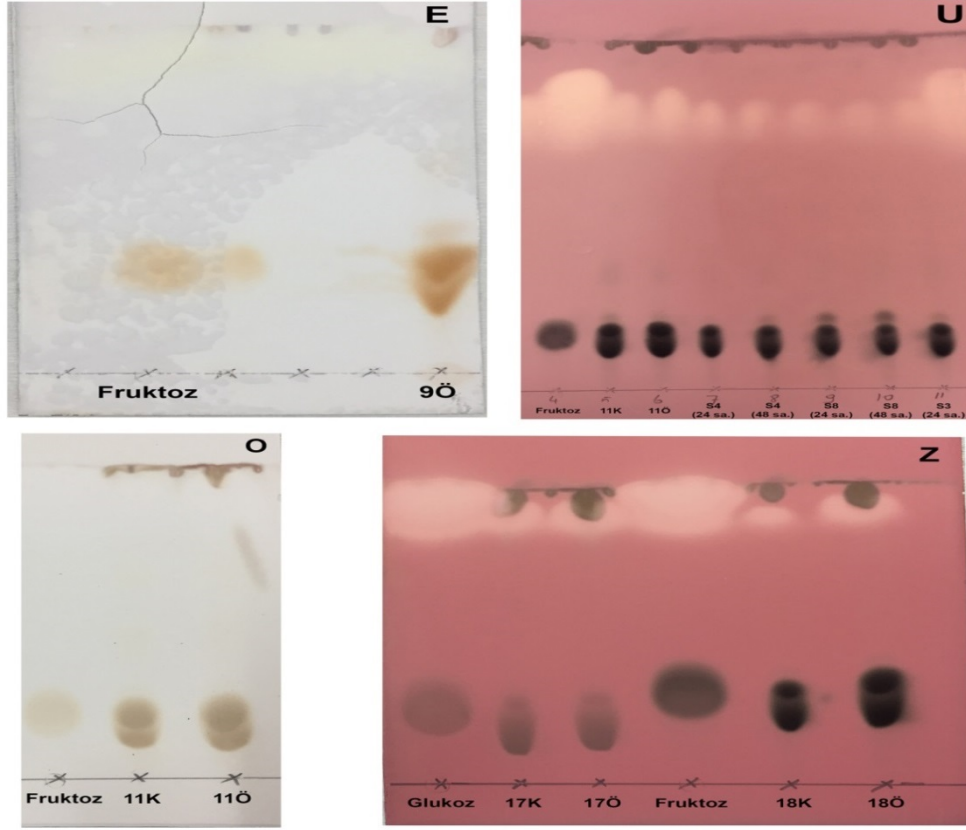
Enzim	Miktar	410 nm
<i>Candida antarctica</i>	3 mg/ml	1. 2,377
		2. 2,509
		3. 2,237
		4. 2,036
<i>Candida antarctica</i>	1,4 mg/ml	1. 1,975
<i>Candida antarctica</i>	0,7 mg/ml	1. 1,272
		2. 1,296
		3. 1,227

### 3.1.1.4 Enzim protein miktar tayini sonuçları

Protein miktarını belirlerken 500 µl enzim çözeltisi üzerine 4 ml Biüret reaktifi eklenerek ölçüm alınmıştır. OD<sub>540</sub>'ta kaydedilen 0,061 absorbans değerine göre 1 ml'de 3 mg protein olduğu belirlenmiştir.

### 3.2 İnce Tabaka Kromatografi (TLC) Analizi

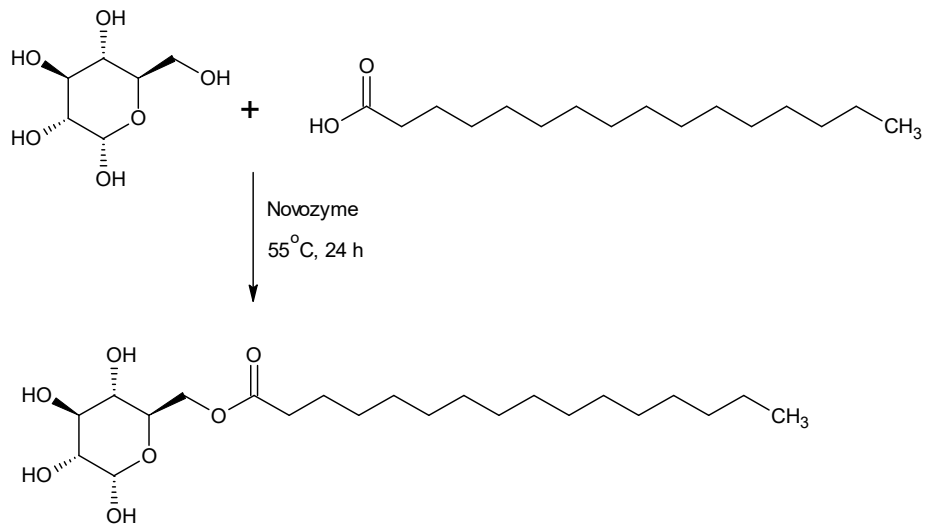
Şeker esterleri tepkime ürünleri, ilgili şeker substratlar eşliğinde, TLC kâğıt ve jellerinde ayrıştırılarak görüntülenmiştir (Şekil 3.4). Ürün, şeker substratların ve tepkime ürünlerinin oluşturduğu bantların R<sub>f</sub> (mevcudiyet faktörü) değerleri temelinde belirlenmiştir.



Şekil 3.4 Şeker esterlerinin TLC analiz sonuçları

### 3.3 Şeker Esterlerinin Yapı Analizi

#### 3.3.1 Glukoz-palmitik asit esterleri



Şekil 3.5 Glukoz-palmitik asit esterleri sentez şeması.

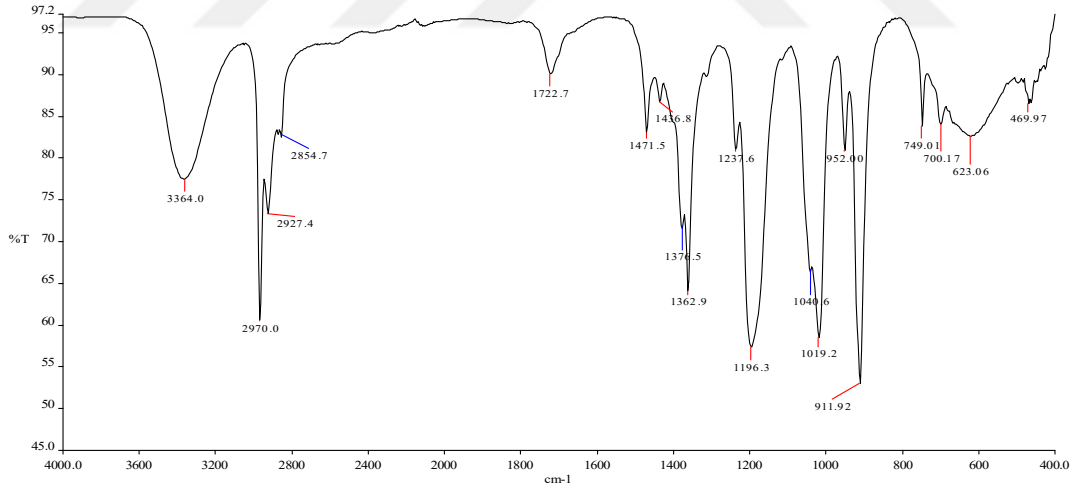
Bileşimi, C (%63.13) H (%10.11) O (%26.76). Molekül ağırlığı, 418.56468 g/mol. Molekül formülü:  $C_{22}H_{42}O_7$ . Tepkime ortamı, tert-bütanol (TBU) ve dimetilsülfoksit (DMSO) (16 ml: 4 ml). Glukoz, 3 g; palmitik asit, 0,72 g; moleküler elek, 2 g; immobilize *C. antarctica* lipazı, 140 mg.

### **Spektral bulgular:**

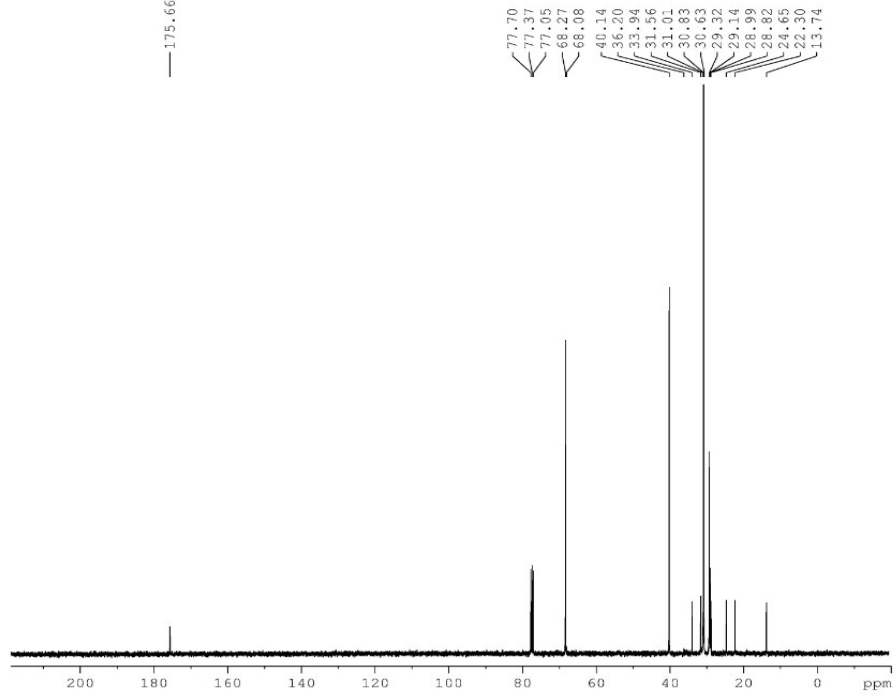
#### **1. 6-O-Glukoz palmitat (7Ö):**

**IR (ATR)  $\nu$  ( $cm^{-1}$ ) pikleri,  $cm^{-1}$**  (Şekil 3.6): 3364 (O-H gerilme titreşimi), 1722 (ester C=O gerilme titreşimi), 1196 (C-O titreşimi), 2970, 2927 (alifatik C-H asimetric gerilim titreşimi), 2854  $cm^{-1}$  (alifatik C-H simetrik gerilim titreşimi).

**$^{13}C$ -NMR (400 MHz) (DMSO- $d_6$ /TMS)  $\delta$  pikleri, ppm** (Şekil 3.7): 13,74 ( $CH_3$ ), 22,30 (palmitik asit C15), 24,65 (palmitik asit C3), 28,82, 28,99, 29,14, 29,32, 30,63, 30,83 ve 31,01 (palmitik asit C4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13), 31,56 (palmitik asit C14), 33,94 (palmitik asit C2), 36,20 ve 40,14 ( $CH_2COO$ ), 68,08 ve 68,27 (Siklik Glukoz C-OH), 175,66 ( $CH_2COO$ ).



**Şekil 3.6** Glukoz-palmitat'ın (7Ö) IR spektrumu (ATR).

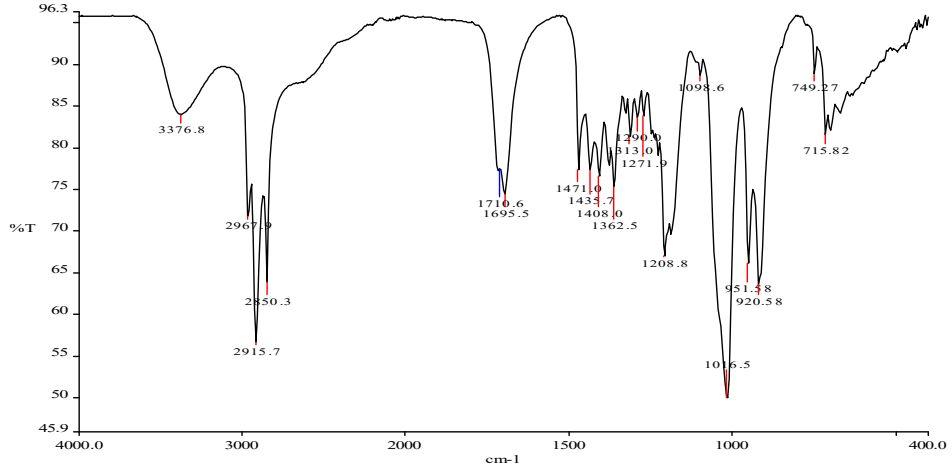


Şekil 3.7 Glukoz palmitat'ın (7Ö)  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu.

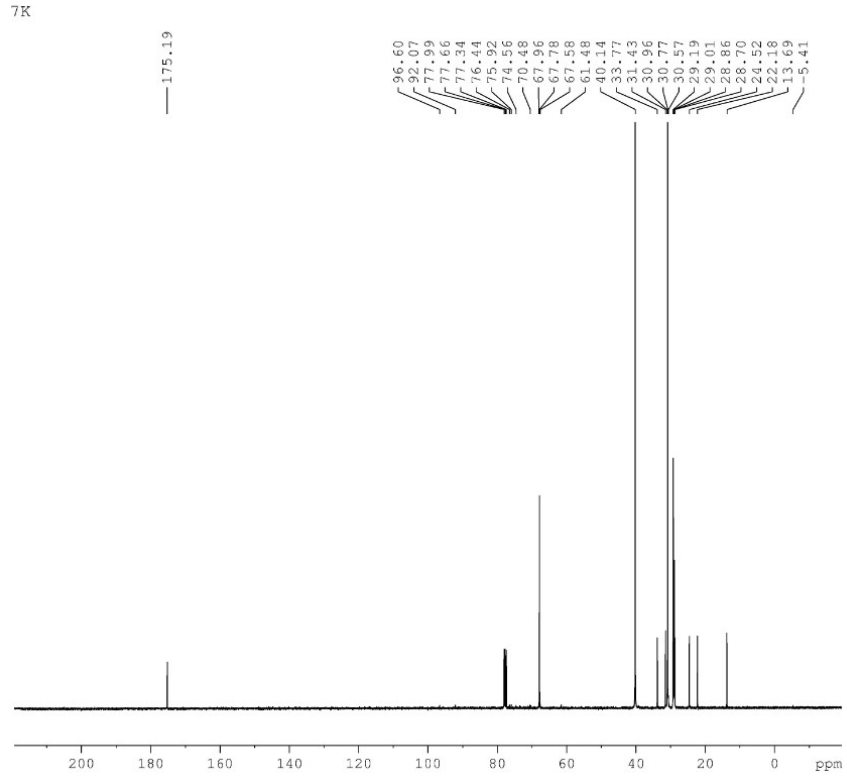
## 2. 6-O-Glukoz palmitat (7K):

**IR (ATR) pikleri,  $\text{cm}^{-1}$**  (Şekil, 3.8): 3376 (O-H gerilme titreşimi), 1710 (ester C=O gerilme titreşimi), 1208 (C-O gerilim titreşimi), 2967, 2915 (alifatik C-H asimetric gerilim titreşimi), 2850 (alifatik C-H simetric gerilim titreşimi).

**$^{13}\text{C}$ -NMR (400 MHz) (DMSO- $d_6$ /TMS)  $\delta$  pikleri, ppm** (Şekil 3.9): 13,69 ( $\text{CH}_3$ ), 22,18 (palmitik asit C14), 24,52 (palmitik asit C2), 28,70, 28,86, 29,01, 29,19, 30,96 (palmitik asit C3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12), 30,96 (palmitik asit C13), 40,14 ve 61,48 (açık zincir glukoz/siklik glukoz C6), 67,58, 67,78, 67,96 (açık zincir glukoz C3), 70,48 (açık zincir glukoz C4,5/siklik glukoz C2), 74,56 (siklik glukoz C3), 75,92 (siklik glukoz C5), 76,44 (siklik glukoz C4), 92,07 ve 96,60 (açık zincir glukoz C2/siklik glukoz C1), 175,19 ( $\text{CH}_2\text{COO}$ ).



Şekil 3.8 6-O-Glukoz palmitat'ın (7K) IR spektrumu (ATR).



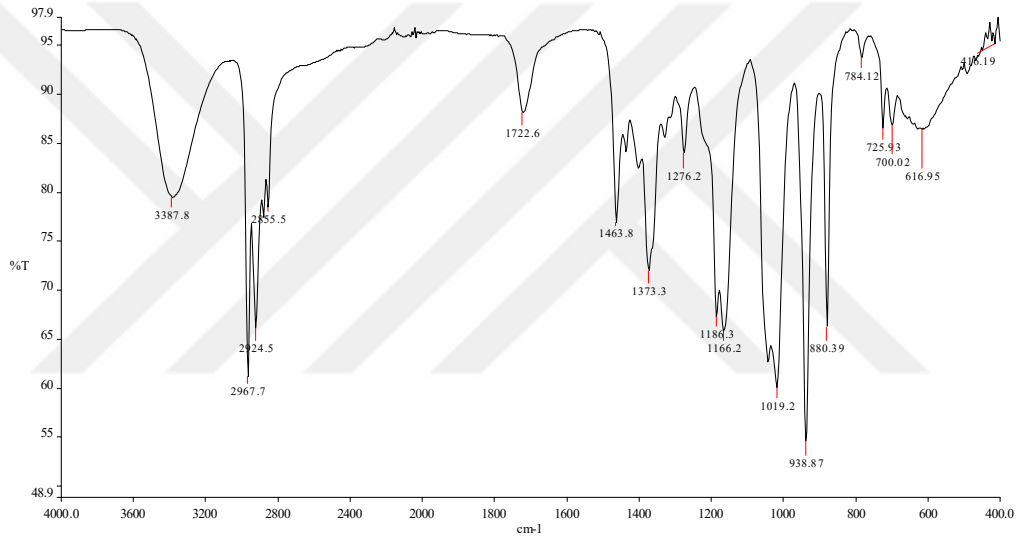
Şekil 3.9 6-O-Glukoz palmitat'ın (7K) <sup>13</sup>C-NMR spektrumu.

### 3. 6-O-Glukoz palmitat (8Ö):

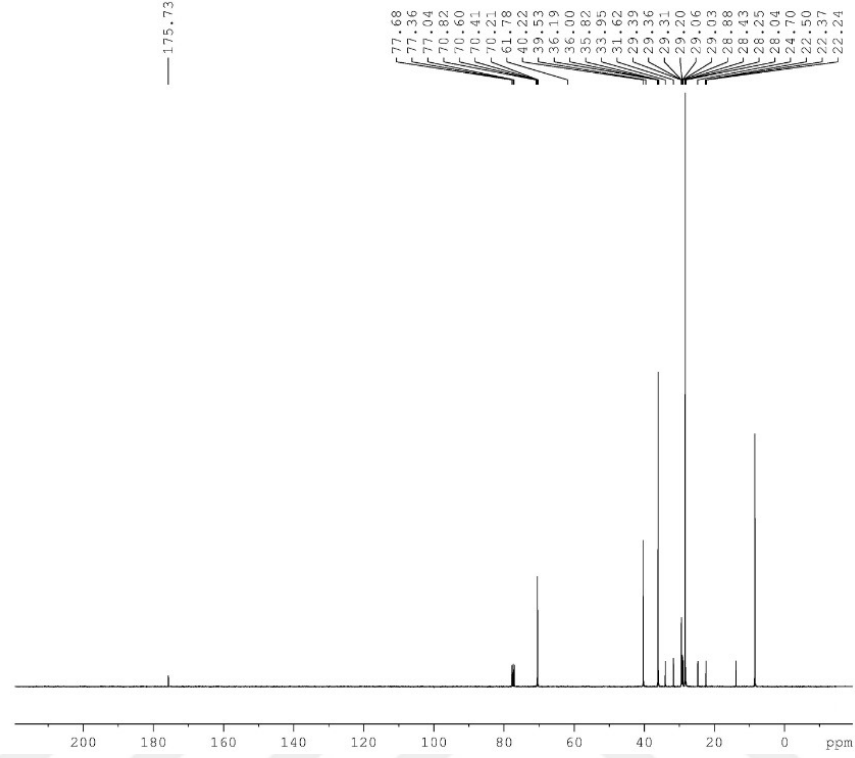
Tepkime ortamı: 2-Metil-2-bütanol ve dimetilsülfoksit (16ml: 4ml). Glukoz, 3 g; palmitik asit, 0,72 g; moleküler elek, 2 g; immobilize *C. antarctica* lipazı, 140 mg.

**IR (ATR) pikleri,  $\text{cm}^{-1}$**  (Şekil 3.10): 3387 (O-H gerilme titreşimi), 1722 (ester C=O gerilme titreşimi), 1186 (C-O gerilim titreşimi), 2967, 2924 (alifatik C-H asimetric gerilim titreşimi), 2855 (alifatik C-H simetrik gerilim titreşimi).

**$^{13}\text{C}$ -NMR (400 MHz) (DMSO- $d_6$ /TMS)  $\delta$  pikleri, ppm** (Şekil 3.11): 8,39, 13,87 (CH<sub>3</sub>), 22,24, 22,37, 22,50 (palmitik asit C15), 24,70 (palmitik asit C3), 28,04, 28,25, 28,43, 28,88, 29,03, 29,06, 29,20, 29,31, 29,36, 29,39 (palmitik asit C4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13), 31,62, 33,95 (palmitik asit C14), 35,82, 36,00, 36,19 (palmitik asit C2), 61,78 (siklik glukoz C6), 70,41, 70,60 (siklik glukoz C4, C5/C1), 70,60, 70,82 (siklik glukoz C2, 3/C1), 175,73 (CH<sub>2</sub>COO).



**Şekil 3.10** 6-O-Glukoz palmitat'ın (8Ö) IR spektrumu (ATR).



Şekil 3.11 6-O-Gluzoz palmitat'ın (8Ö) C13-NMR spektrumu.

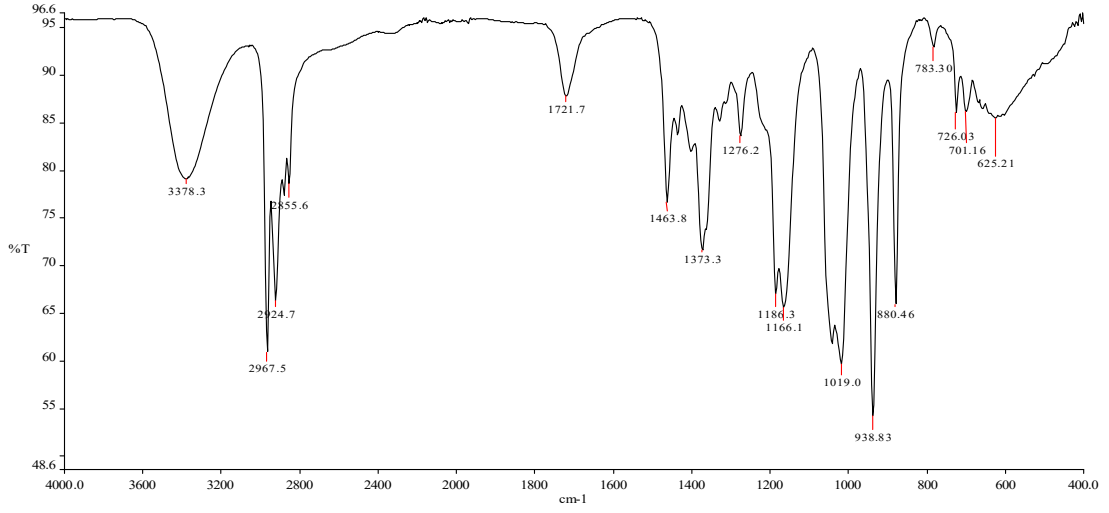
#### 4. 6-O-Gluzoz palmitat (8K):

Tepkime ortamı: 2-Metil-2-bütanol (2M2B) ve DMSO (16ml: 4ml). Gluzoz, 3g; palmitik asit, 0,72 g; moleküler elek, 2g.

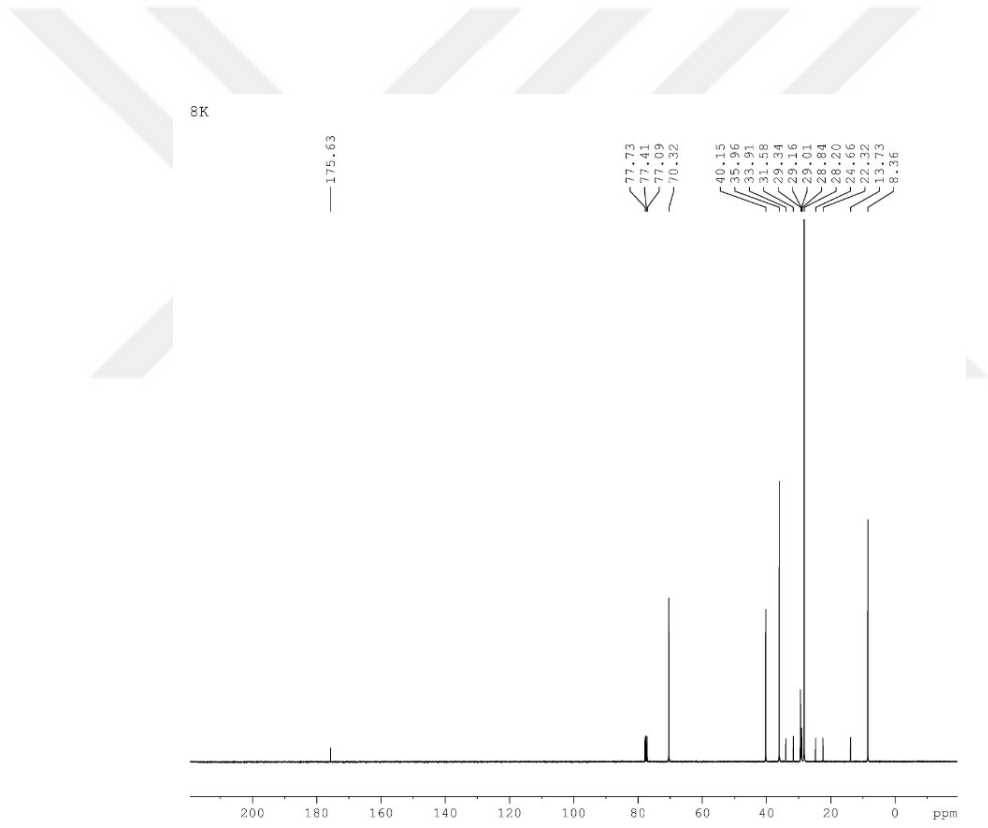
**IR (ATR) pikleri,  $\text{cm}^{-1}$**  (Şekil 3.12): 3378 (O-H gerilme titreşimi), 1721 (ester C=O gerilme titreşimi), 1186 (C-O gerilim titreşimi), 2967, 2924 (alifatik C-H asimetric gerilim titreşimi), 2855 (alifatik C-H simetric gerilim titreşimi).

**$^{13}\text{C}$ -NMR (400 MHz) (DMSO- $d_6$ /TMS)  $\delta$  pikleri, ppm** (Şekil 3.13): 13,73 ( $\text{CH}_3$ ), 22,32 (palmitik asit C15), 24,66 (palmitik asit C3), 28,20, 28,84, 29,01, 29,16, 29,34 (palmitik asit C4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13), 31,58 (palmitik asit C14), 33,91, 35,96 (palmitik asit C2), 40,15 ( $\text{CH}_2\text{COO}$ ), 70,32 (Siklik gluzoz C1, 2, 3, 4, 5, 6), 175,63 ( $\text{CH}_2\text{COO}$ ).



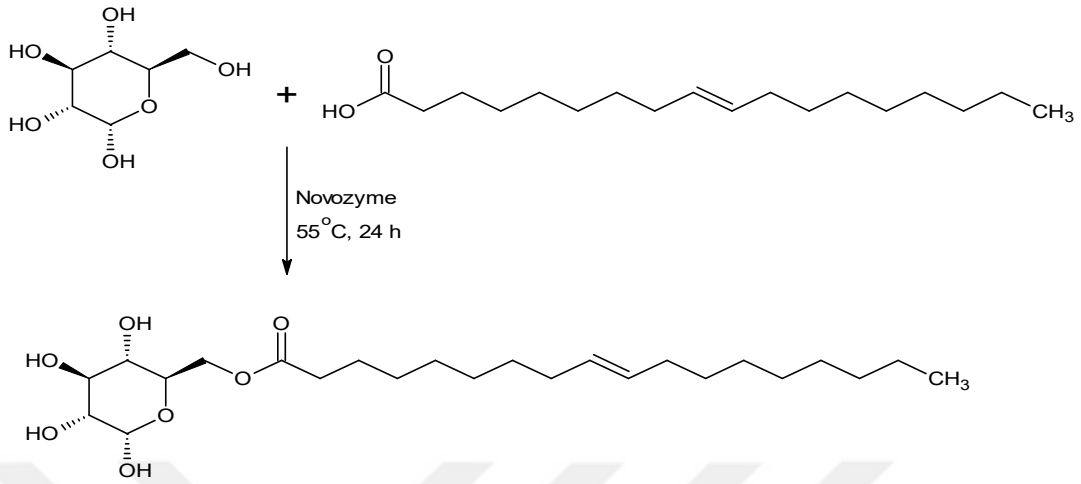


Şekil 3.12 6-O-Gluzoz palmitat'ın (8K) IR spektrumu (ATR).



Şekil 3.13 6-O-Gluzoz palmitat'ın (8K) <sup>13</sup>C-NMR spektrumu.

### 3.3.2 Glukoz-oleik asit esterleri



Şekil 3.14 Glukoz-oleik asit esterinin sentez şeması.

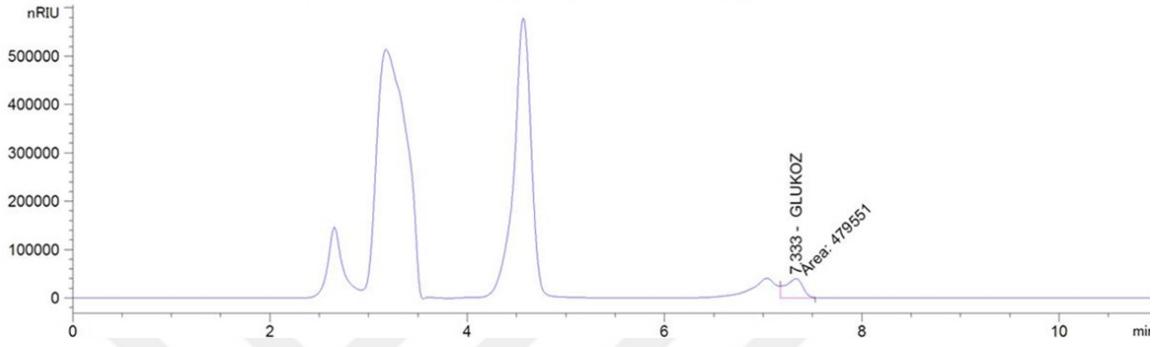
Bileşimi, C(%64,83) H(%9,98) O(%25,19). Molekül ağırlığı, 444.60196 g/mol. Molekül formülü, C<sub>24</sub>H<sub>44</sub>O. Tepkime ortamı: TBU (16 ml) ve DMSO (4 ml). Glukoz, 0,72 g; oleik asit, 1,128 g; moleküler elek, 2 g; immobilize *C. antarctica* lipazı, 140 mg.

#### 1. 6-O-Glukoz oleat (10Ö):

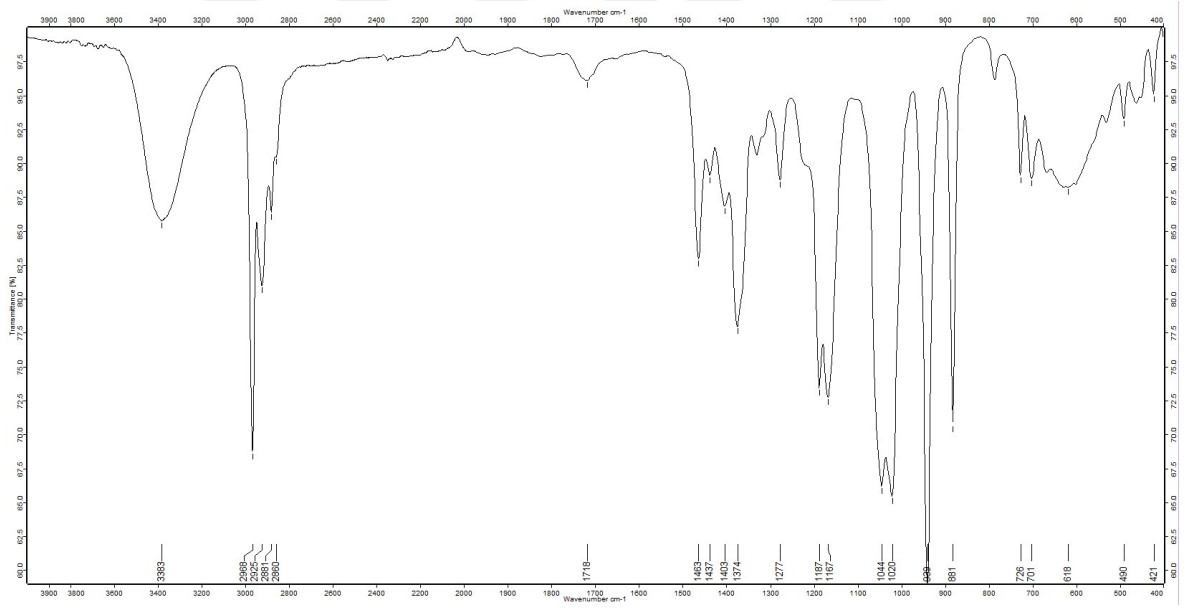
**IR (ATR) pikleri, cm<sup>-1</sup>** (Şekil 3.16): 3383 (O-H gerilme titreşimi), 1718 (ester C=O gerilme titreşimi), 1187 (C-O gerilim titreşimi), 2968, 2925 (alifatik C-H asimetric gerilim titreşimi), 2881 (alifatik C-H simetrik gerilim titreşimi).

**<sup>13</sup>C-NMR (400 MHz) (DMSO-*d*<sub>6</sub>/TMS) δ pikleri, ppm** (Şekil 3.17): 9,05, 14,36 (CH<sub>3</sub>), 22,43, 22,54, 22,81 (oleik asit C17), 24,95, 25,64 (oleik asit C3), 27,01, 27,85 (oleik asit C8 ve C11), 28,95, 29,02, 29,04, 29,08, 29,15, 29,29, 29,54 (oleik asit C4, 5, 6, 13, 14, 15), 31,35, 31,50, 31,70 (oleik asit C7 ve C12), 31,89 (oleik asit C16), 34,13, 36,09, 36,37 (oleik asit C2), 61,66 (açık zincir/siklik glukoz C6), 67,18, 67,38, 67,57 (açık zincir glukoz C3), 73,52 (siklik glukoz C3), 72,39, 72,81 (siklik glukoz C2/açık zincir glukoz C5), 70,72 (açık zincir glukoz C4), 70,72, 77,19 (siklik glukoz C4), 73,52 (siklik glukoz C3), 71,03, 75,25 (siklik glukoz C5), 92,66 (siklik glukoz C1), 174,77 (CH<sub>2</sub>COO).

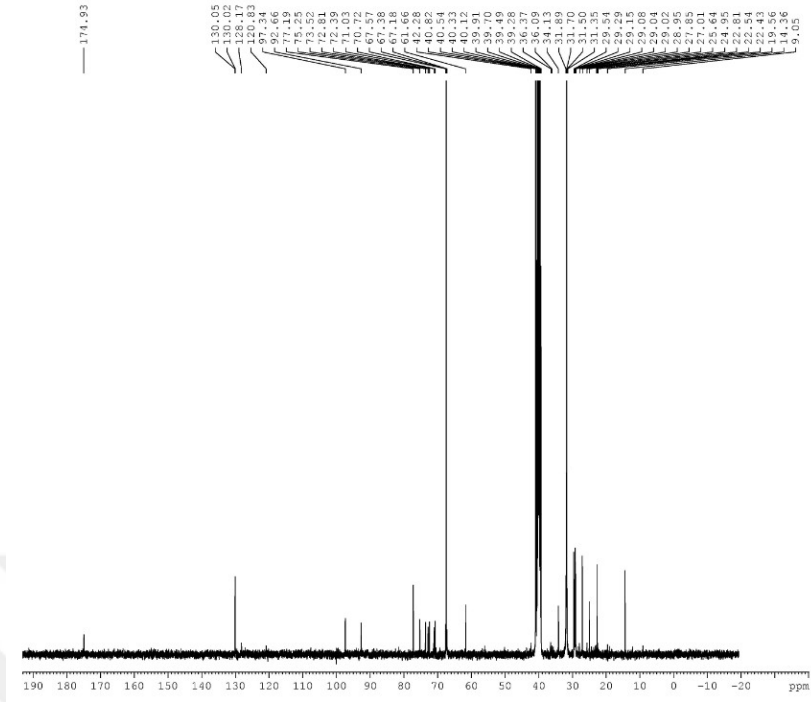
$^{13}\text{C}$ -NMR (HSQC) (400 MHz) (DMSO- $d_6$ /TMS)  $\delta$  (ppm): 14,36 (oleik asit  $\text{CH}_3$ ), 24,95 ve 25,64 (oleik asit C-3), 27,01 (oleik asit 8-11), 31,55 (oleik asit C-7, 12, 16), 73,52 (siklik glukoz C-3), 70,72 ve 77,19 (siklik glukoz C-4), 92,66 (siklik glukoz C-1), 97,34 (açık zincir glukoz C-2), 128,17 ve 130,02 (oleik asit C-9 ve C-10), 174,77 ( $\text{CH}_2\text{COO}$ ).



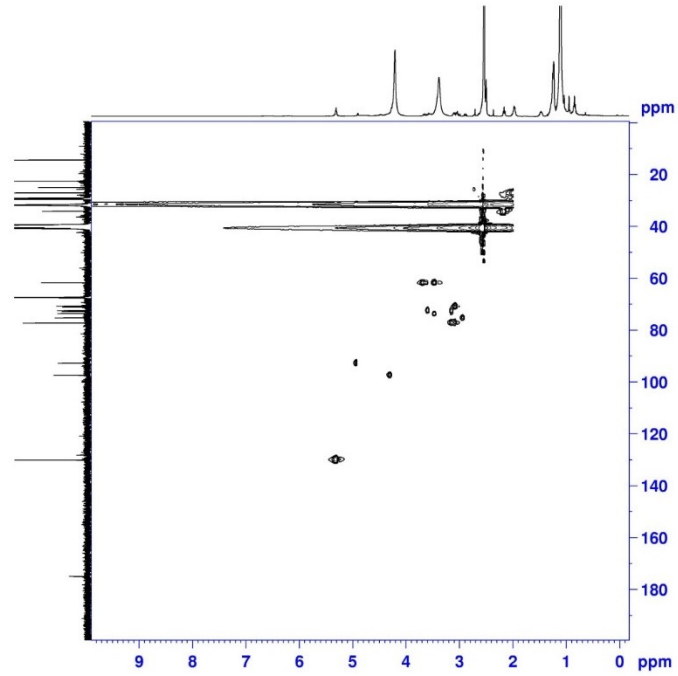
Şekil 3.15 6-O-Glukoz oleat'ın (10Ö) HPLC verim hesabı (% 90.99; 0,66 g).



Şekil 3.16 6-O-Glukoz oleat'ın (10Ö) IR spektrumu (ATR).



Şekil 3.17 6-O-Glukoz oleat'ın (10Ö)  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu.



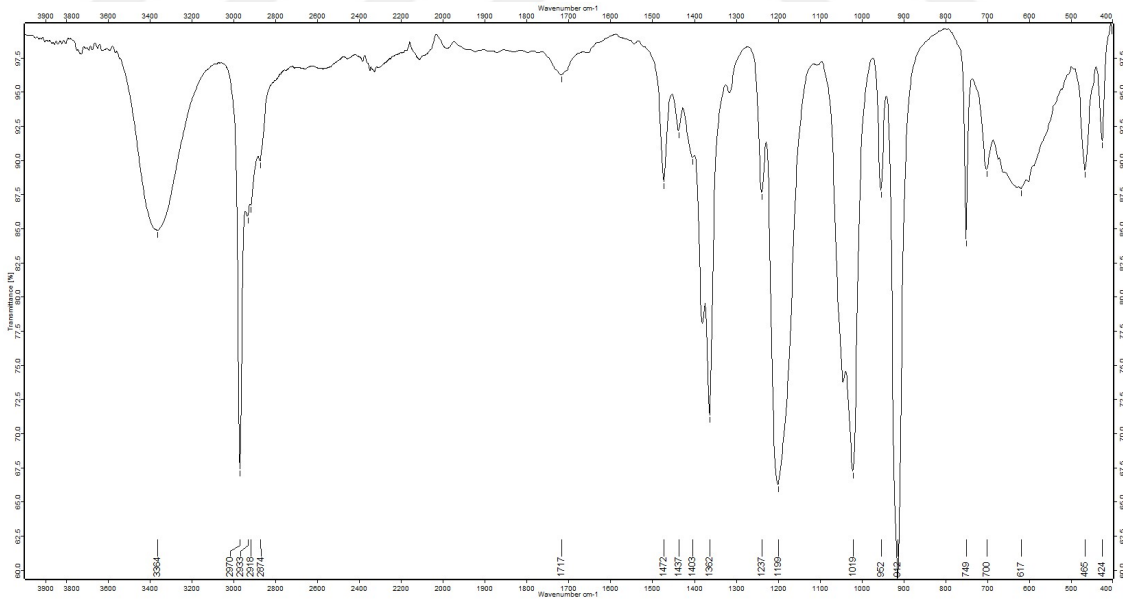
Şekil 3.18 6-O-Glukoz oleat (10Ö) HSQC Spektrumu.

## 2. 6-O-Glukoz oleat (10K) :

Tepkime ortamı: TBU (16 ml) ve DMSO (4 ml). Glukoz, 0,72 g; oleik asit, 1,128g; moleküler elek, 2 g.

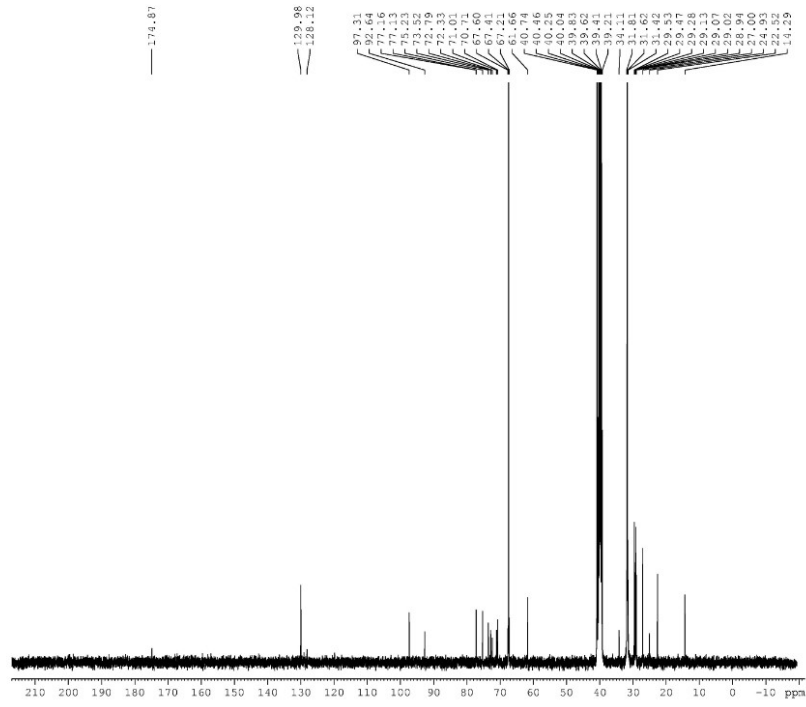
**IR (ATR) pikleri,  $\text{cm}^{-1}$**  (Şekil 3.19): 3364 (O-H gerilme titreşimi), 1717 (ester C=O gerilme titreşimi), 1199 (C-O gerilim titreşimi), 2970, 2933 (alifatik C-H asimetric gerilim titreşimi), 2874 (alifatik C-H simetrik gerilim titreşimi).

**$^{13}\text{C}$ -NMR (400 MHz) (DMSO- $d_6$ /TMS) pikleri, ppm** (Şekil 3.20): 14,29 ( $\text{CH}_3$ ), 22,52, 24,93 (oleik asit C3), 27,00 (oleik asit C8 ve C11), 28,94, 29,02, 29,07, 29,13, 29,28, 29,47, 29,53 (oleik asit 4, 5, 6, 13, 14, 15, 17), 31,42, 31,62, 31,81 (oleik asit 7,12 ve 16), 34,11 (oleik asit C2), 61,66 (siklik glukoz C6/açık zincir glukoz C6), 67,21, 67,41, 67,60 (açık zincir glukoz C3), 70,71 (siklik glukoz C4/açık zincir glukoz C4), 71,01 ve 75,23 (siklik glukoz C5), 73,52 (siklik glukoz C3), 72,33 ve 72,79 (siklik glukoz C2 / açık zincir glukoz C5), 77,13 ve 77,16 (siklik glukoz C4), 92,64 (siklik glukoz C1), 97,31 (açık zincir glukoz C2), 129,12, 129,98 (oleik asit C9 ve C10), 174,87 ( $\text{CH}_2\text{COO}$ ).



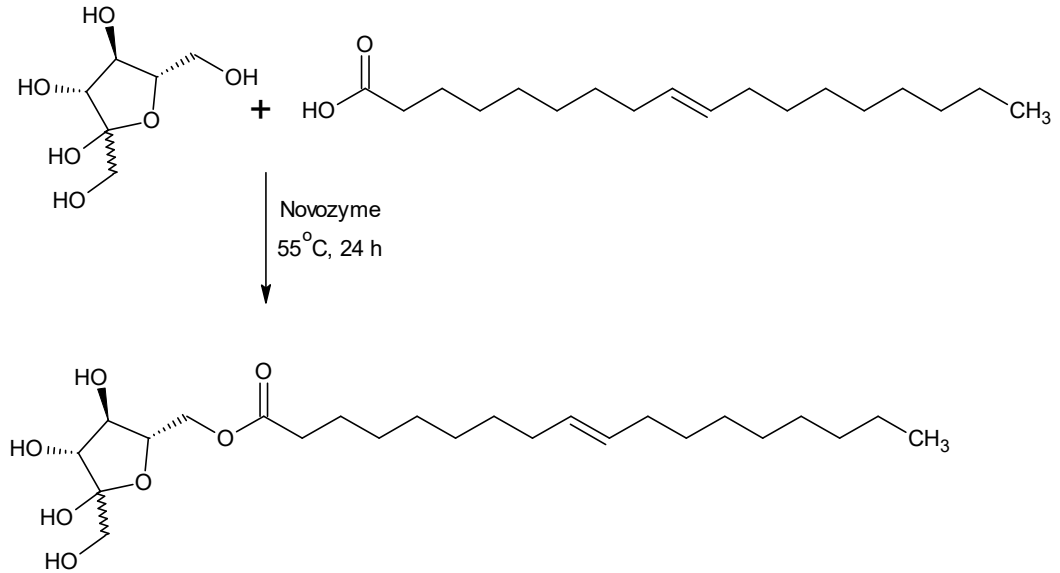
Şekil 3.19 6-O-Glukoz oleat'ın (10K) IR spektrumu (ATR).

10K



Şekil 3.20 6-O-Glukoz oleat'ın (10K)  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu.

### 3.3.3 Fruktoz-oleik asit esterleri



Şekil 3.21 Fruktoz-oleik asit esterinin sentez şeması.

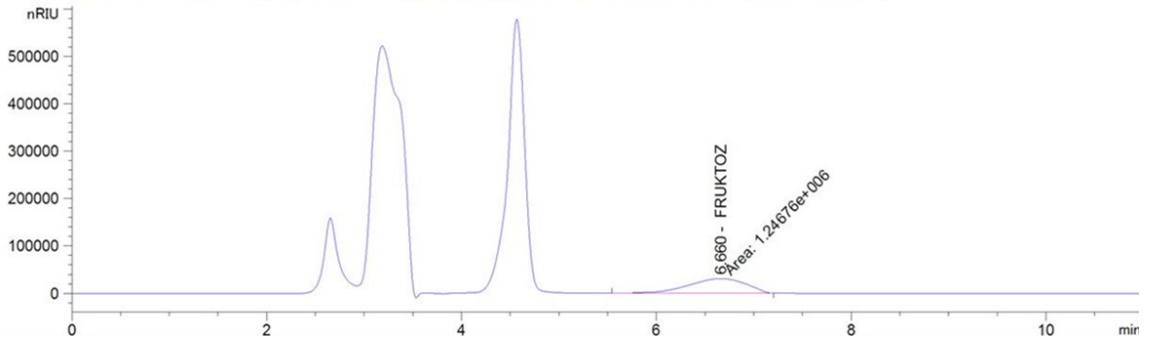
Bileşimi, C(%64,83) H(%9,98) O(%25,19). Molekül ağırlığı, 444,60196 g/mol. Molekül formülü, C<sub>24</sub>H<sub>44</sub>O<sub>7</sub>. Tepkime ortamı, TBU (16 ml) ve DMSO (4 ml). Fruktoz, 0,72 g; oleik asit, 1,128 g; moleküler elek, 2 g; immobilize *C. antarctica* lipazı.

### **Spektral bulgular**

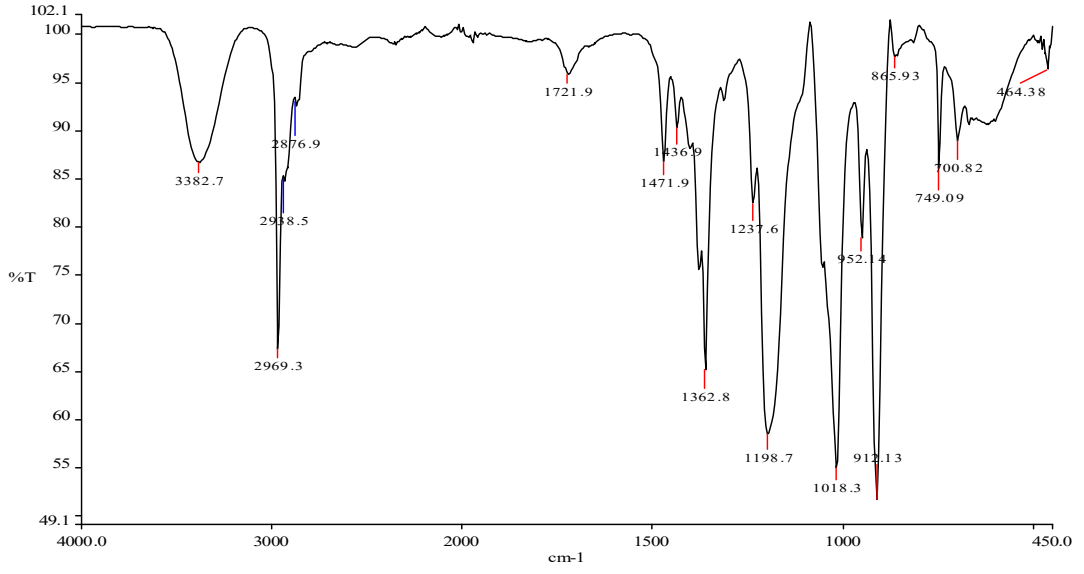
#### **1. 6-O-Fruktoz oleat (9Ö)**

**IR (ATR), cm<sup>-1</sup>** (Şekil 3.23): 3382 (O-H gerilme titreşimi), 1721 (ester C=O gerilme titreşimi), 1198 (C-O gerilim titreşimi), 2969, 2938 (alifatik C-H asimetric gerilim titreşimi), 2876 (alifatik C-H simetrik gerilim titreşimi).

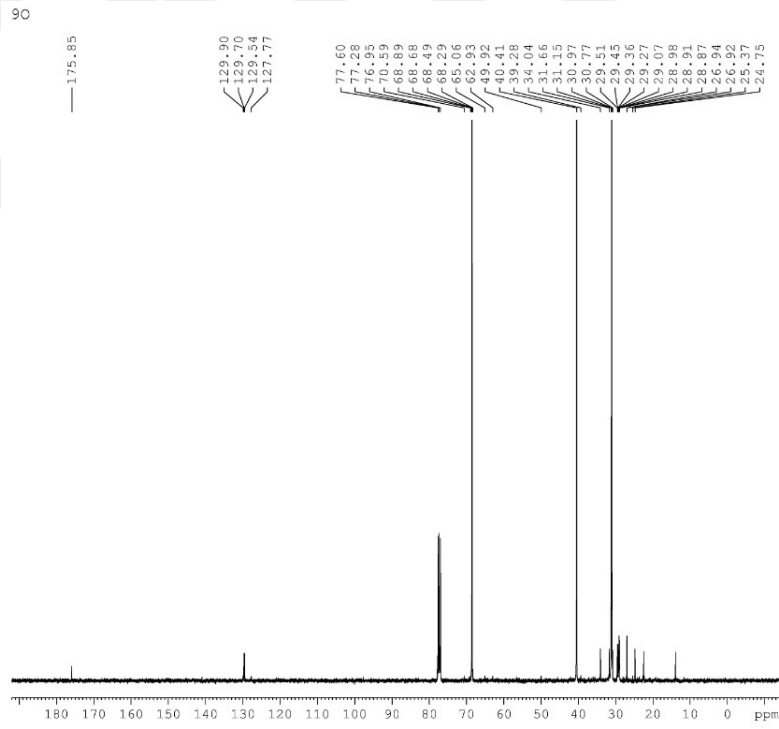
**<sup>13</sup>C-NMR (400 MHz) (DMSO-*d*<sub>6</sub>/TMS) δ pikleri, ppm** (Şekil 3.24): 13,93 (CH<sub>3</sub>), 24,75, 25,37 (oleik asit C3), 26,92, 26,94 (oleik asit C8 ve C11), 28,91, 28,98, 29,07, 29,27, 29,36, 29,45, 29,51 (oleik asit C4, 5, 6, 13, 14, 15, 17), 30,77, 30,97 (oleik asit C7,12), 31,15, 31,66 (oleik asit C16), 34,04 (oleik asit C2), 62,93 (açık zincir fruktoz C6), 65,06, 68,29 (açık zincir fruktoz C1), 68,49, 68,89, 70,59 (açık zincir fruktoz C3, 4, 5), 175,85 (CH<sub>2</sub>COO).



**Şekil 3.22** 6-O-Fruktoz oleat'ın (9Ö) HPLC ile verim hesabı (% 98,9; 0,71 g).



Şekil 3.23 6-O-Fruktoz oleat'ın (9Ö) IR spektrumu (ATR).



Şekil 3.24 6-O-Fruktoz oleat'ın (9Ö) <sup>13</sup>C-NMR spektrumu.



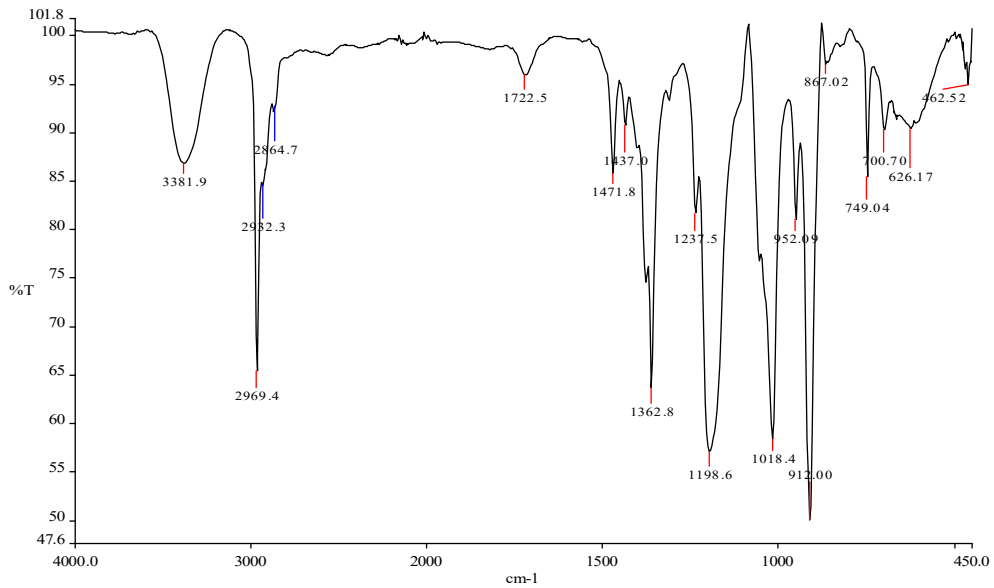
## 2. 6-O-Fruktoz oleat (9K)

Tepkime ortamı, TBU (16 ml) ve DMSO (4 ml). Fruktoz, 0,72 g; oleik asit, 1,128 g; moleküler elek, 2 g.

**IR (ATR) pikleri,  $\text{cm}^{-1}$**  (Şekil 3.25): 3381 (O-H gerilme titreşimi), 1722 (ester C=O gerilme titreşimi), 1198 (C-O gerilim titreşimi), 2969, 2932 (alifatik C-H asimetric gerilim titreşimi), 2864 (alifatik C-H simetric gerilim titreşimi).

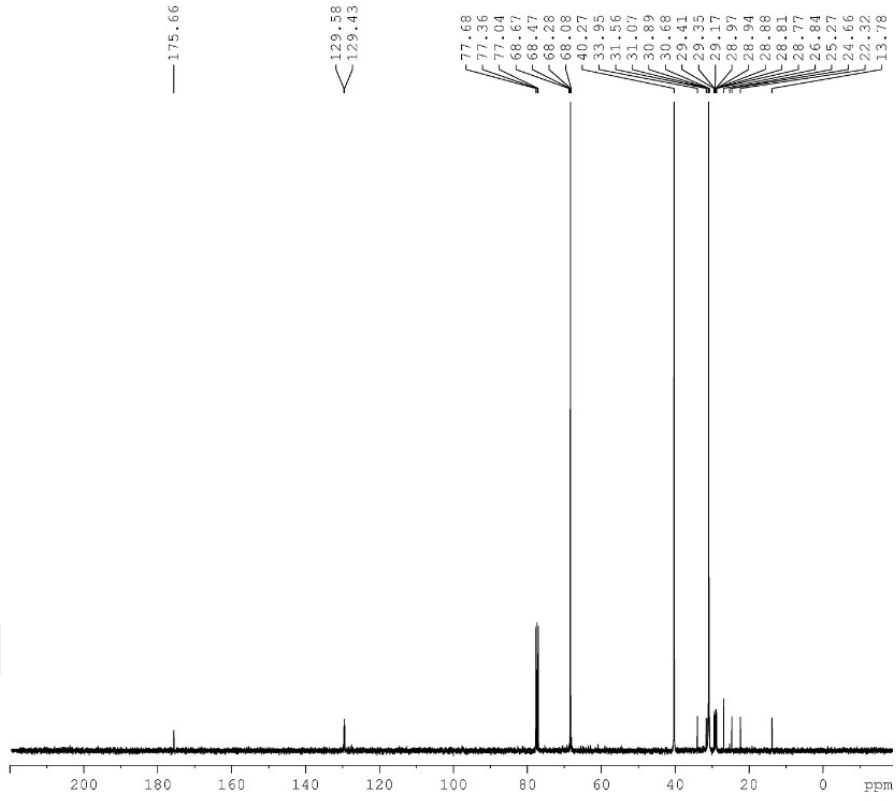
**$^{13}\text{C-NMR}$  (400 MHz) (DMSO- $d_6$ /TMS)  $\delta$  pikleri, ppm** (Şekil 3.26): 13,78 ( $\text{CH}_3$ ), 22,32, 24,66 (oleik asit C3), 25,27, 26,84 (oleik asit C8 ve C11), 28,77, 28,88, 28,94, 28,97, 29,17, 29,35, 29,41 (oleik asit C4, 5, 6, 13, 14, 15, 17), 30,68, 30,89 (oleik asit C7,12), 31,07, 31,56 (oleik asit C16), 33,95 (oleik asit C2), 40,27 ( $\text{CH}_2\text{COO}$ ), 68,08, 68,28, 68,47, 68,67 (açık zincir Fruktoz C-OH), 129,43 (oleik asit C10), 129,58 (oleik asit C9), 175,66 ( $\text{CH}_2\text{COO}$ ).

**$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) (DMSO- $d_6$ /TMS)  $\delta$  pikleri, ppm** (Şekil 3.27, 3.28): 0,86 (t, 3H,  $J=4,40$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1,14 (s, 12H, oleik asit C5, 7, 12, 15, 16, 17-H), 1,23 (s, 8H, oleik asit C4,6,13,14-H), 1,48 (t, 2H,  $J=6,83$  Hz, oleik asit C3-H), 1,97 (q, 4H,  $J=5,32$  Hz, oleik asit C8,11-H), 2,16 (t, 2H,  $J=7,32$  Hz, oleik asit C2-H), 2,40 (s, 2H, fruktoz C1-H), 2,49-2,50 (m, 3H, fruktoz C3,4,5-H), 3,26 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{-O-CO}$ ), 4,18 (s, 4H, OH), 5,31 (t, 2H,  $J=4,39$  Hz, oleik asit C9,10-H).

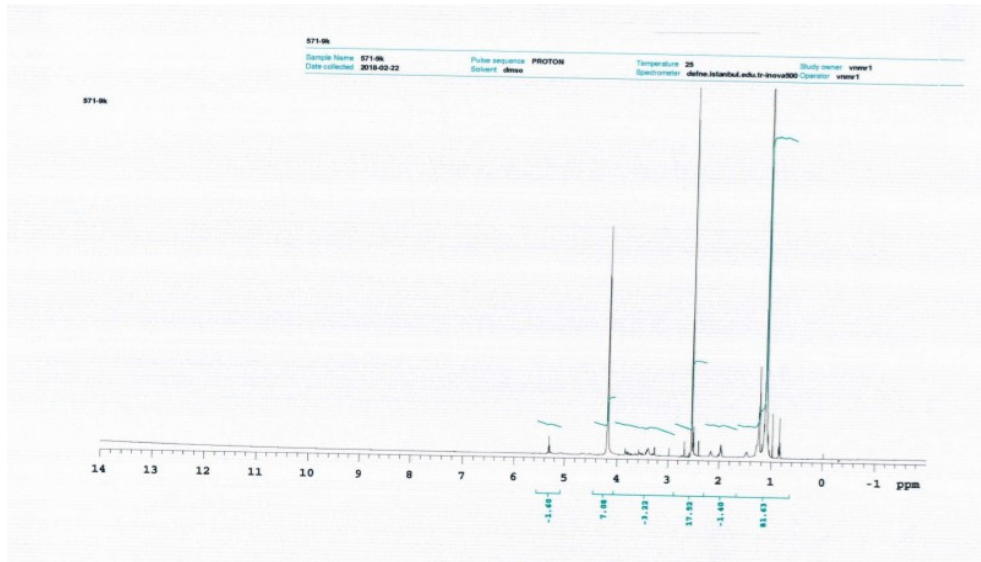


Şekil 3.25 6-O-Fruktoz oleat'ın (9K) IR spektrumu (ATR).

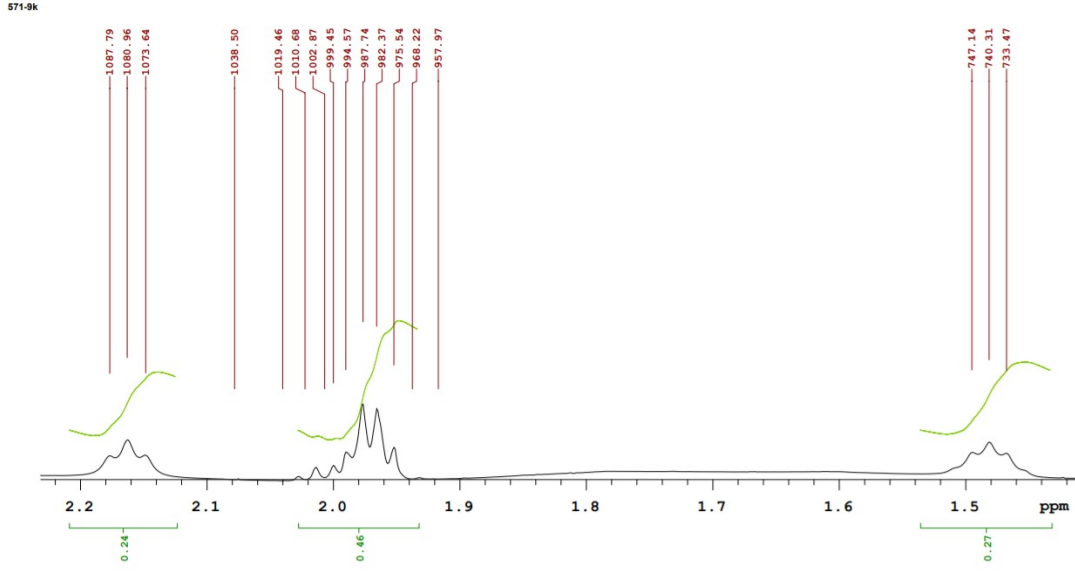
9K



Şekil 3.26 6-O-Fruktoz oleat'ın (9K)  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu.



Şekil 3.27 6-O-Fruktoz oleat'ın (9K)  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu.

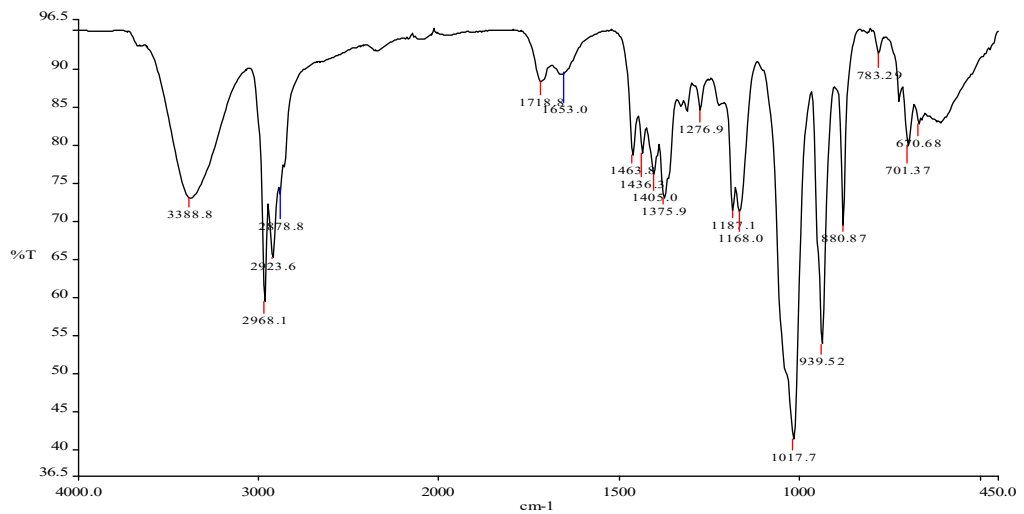


Şekil 3.28 6-O-Fruktoz oleat'ın (9K)  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu (1,5-2,5 ppm).

### 3. 6-O-Fruktoz oleat (12Ö)

Tepkime ortamı, 2M2B (16 ml) ve DMSO (4 ml); fruktoz, 0,72 g; oleik asit, 1,128 g; moleküler elek, 2 g; immobilize *C. antarctica* lipazı, 140 mg.

**IR (ATR)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ )** (Şekil 3.29): 3388 (O-H gerilme titreşimi), 1718 (ester C=O gerilme titreşimi), 1168 ve 1187 (C-O gerilim titreşimi), 2968, 2923 (alifatik C-H asimetrik gerilim titreşimi), 2878 (alifatik C-H simetrik gerilim titreşimi).



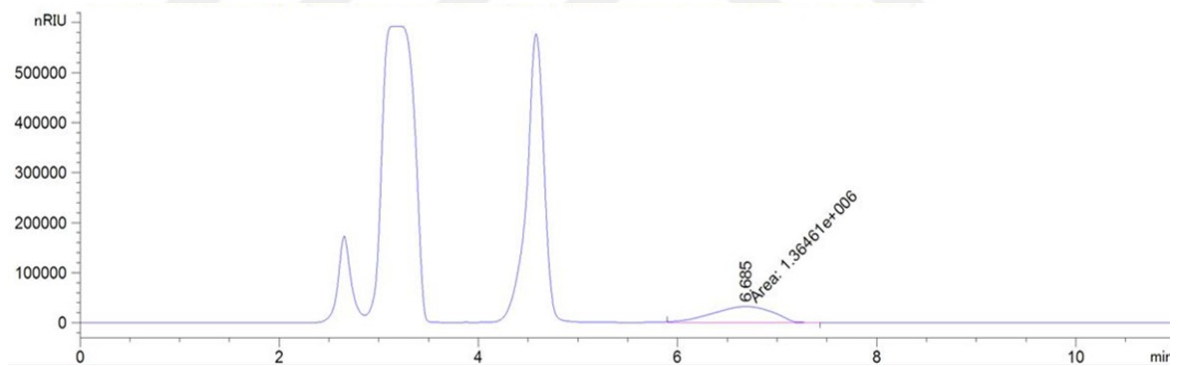
Şekil 3.29 Bileşik 12Ö'nün IR spektrumu (ATR).

#### 4. 6-O-Fruktoz oleat (12K)

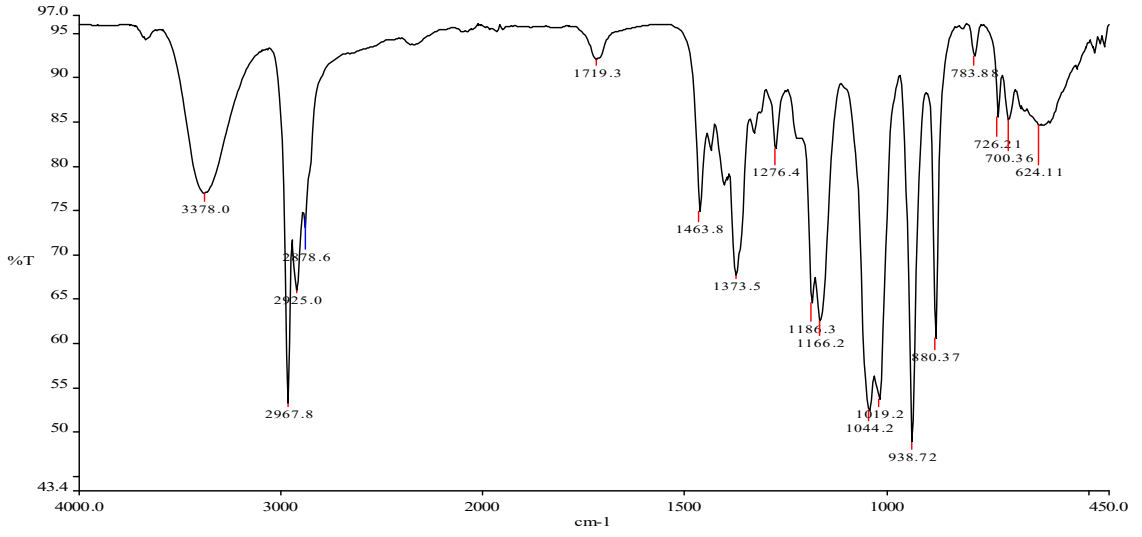
Tepkime ortamı, 2M2B (16 ml) ve DMSO (4 ml); fruktoz, 0,72 g; oleik asit, 1,128 g; moleküler elek, 2 g.

**IR (ATR) pikleri,  $\text{cm}^{-1}$**  (Şekil 3.31): 3378 (O-H gerilme titreşimi), 1719 (ester C=O gerilme titreşimi), 1166 ve 1186 (C-O gerilim titreşimi), 2967, 2925 (alifatik C-H asimetrik gerilim titreşimi), 2878 (alifatik C-H simetrik gerilim titreşimi).

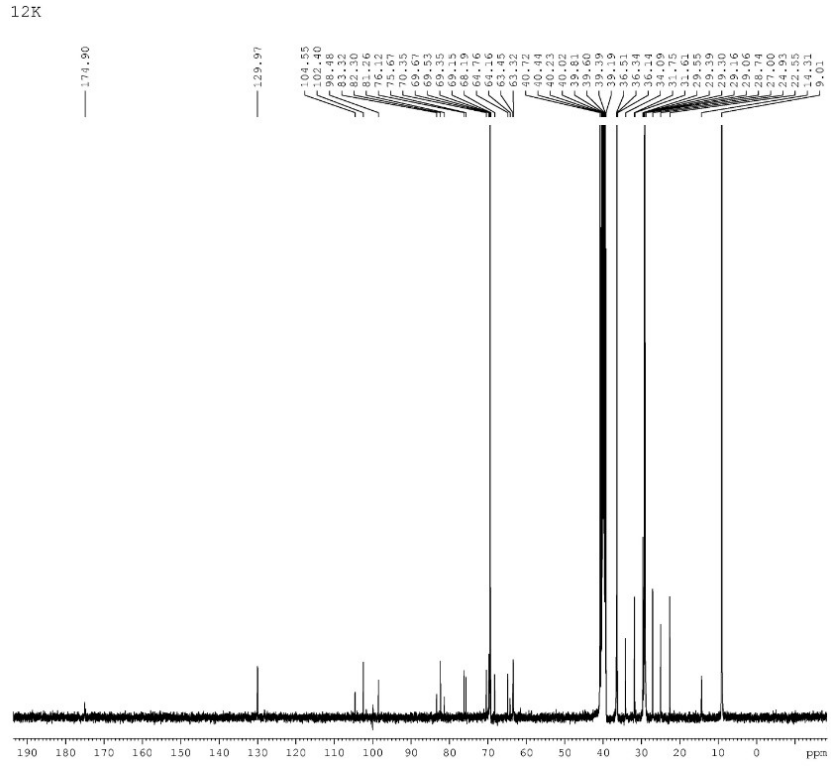
**$^{12}\text{C}$ -NMR (400 MHz) (DMSO- $d_6$ /TMS)  $\delta$  pikleri, ppm** (Şekil 3.32): 9,01, 14,31 ( $\text{CH}_3$ ), 24,93 (oleik asit C3), 27,00 (oleik asit C8 ve C11), 28,74, 29,06, 29,16, 29,30, 29,39, 29,55 (oleik asit C4, 5, 6, 7, 12, 13, 14, 15, 17), 31,61, 31,75 (oleik asit C16), 34,09, 36,14, 36,34, 36,51 (oleik asit C2), 63,32, 63,45 (açık zincir fruktoz C1 ve C6), 64,16, 64,76 (açık zincir fruktoz C6), 68,19 (açık zincir fruktoz C1), 69,15, 69,35, 69,67, 70,35 (açık zincir fruktoz C5), 75,67, 76,12 (açık zincir fruktoz C3/siklik fruktoz C5), 81,26, 82,30, 83,32 (siklik fruktoz C3 ve 4), 98,48, 102,40, 104,55 (siklik fruktoz C2), 129,97 (oleik asit C9 ve C10), 174,90 ( $\text{CH}_2\text{COO}$ ).



Şekil 3.30 6-O-Fruktoz oleat'ın (12K) HPLC ile verim hesabı (% 98,9; 0,71 g).

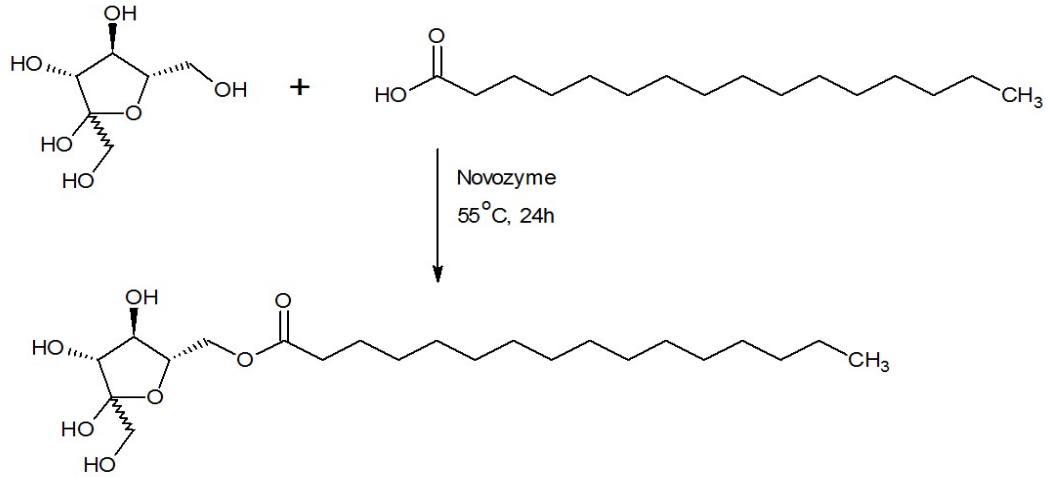


Şekil 3.31 6-O-Fruktoz oleat'ın (12K) IR spektrumu (ATR).



Şekil 3.32 Bileşik 12K'nın <sup>13</sup>C-NMR spektrumu.

### 3.3.4 Fruktoz-palmitik asit esterleri



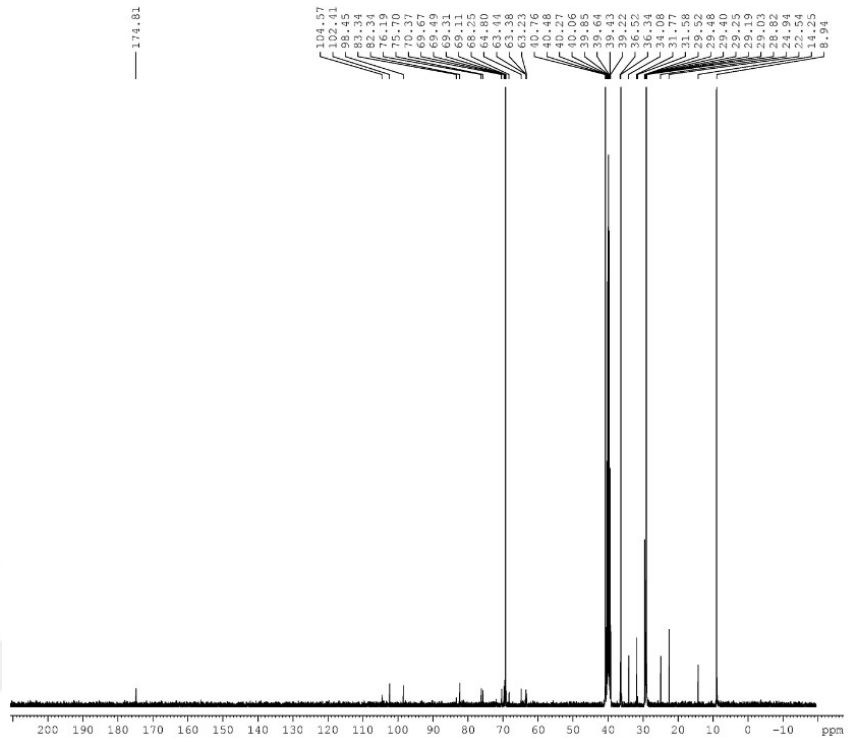
Şekil 3.33 Fruktoz-palmitik asit esterinin sentez şeması.

#### 1. 6-O-Fruktoz palmitat (P1)

Bileşimi, C(%63,13) H(%10,11) O(%26,76). Molekül ağırlığı, 418,56468 g/mol. Molekül formülü, C<sub>22</sub>H<sub>42</sub>O<sub>7</sub>. Tepkime ortamı, 2M2B (16 ml) ve DMSO (4 ml); fruktoz, 0,72 g; palmitik asit, 1,024 g; moleküler elek, 2 g.

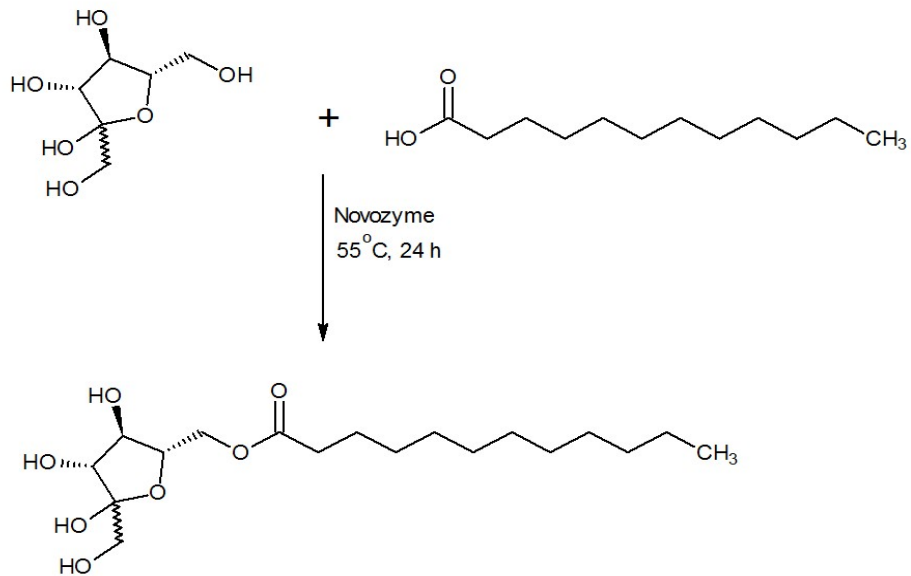
<sup>13</sup>C-NMR (400 MHz) (DMSO-*d*<sub>6</sub>/TMS) δ pikleri, ppm (Şekil 3.34): 8,94, 14,25 (CH<sub>3</sub>), 22,54 (palmitik asit C15), 24,94 (palmitik asit C3), 28,82, 29,03, 29,19, 29,25, 29,40, 29,48, 29,52 (palmitik asit C4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13), 31,58, 31,77 (palmitik asit C14), 34,08, 36,34, 36,52 (palmitik asit C2), 63,23, 63,38, 63,44 (siklik fruktoz C1 ve C6), 64,80 (açık zincir fruktoz C6), 68,25 (açık zincir fruktoz C1), 69,11, 69,31, 69,49, 69,67, 70,37 (açık zincir fruktoz C5), 75,70, 76,19 (açık zincir fruktoz C3/siklik fruktoz C5), 82,34, 83,34 (siklik fruktoz C3 ve C4), 98,45, 102,41, 104,57 (siklik fruktoz C2), 174,81 (CH<sub>2</sub>COO).

P1



Şekil 3.34 6-O-Fruktoz palmitat'ın (P1)  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu.

### 3.3.5. Fruktoz-laurik asit esterleri



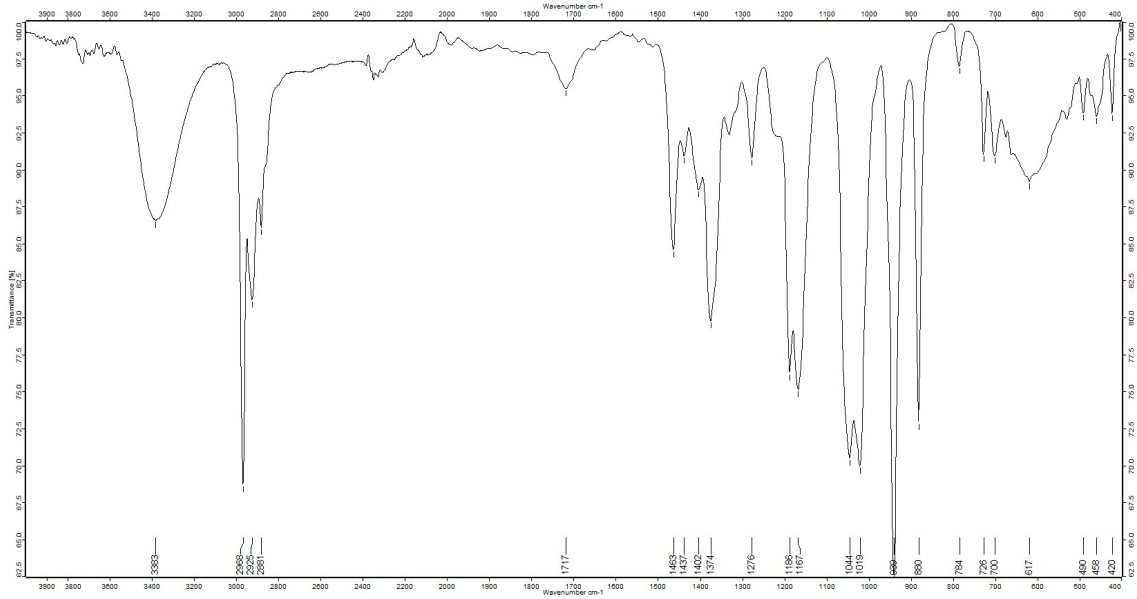
Şekil 3.35 Fruktoz-laurik asit esterinin sentez şeması.

Bileşim: C (%59,65), H (%9,45), O (%30,90). Molekül ağırlığı, 362,45836 g/mol. Molekül formülü, C<sub>18</sub>H<sub>34</sub>O<sub>7</sub>. Tepkime ortamı, 2M2B (16 ml) ve DMSO (4 ml); fruktoz, 0.72 g; laurik asit, 0,8 g, moleküler elek, 2g.

### 1. 6-O-Fruktoz laurat (L1)

**IR (ATR) pikleri, cm<sup>-1</sup>** (Şekil 3.36): 3383 (O-H gerilme titreşimi), 1717 (ester C=O gerilme titreşimi), 1167 ve 1186 (C-O gerilim titreşimi), 2925 ve 2968 (alifatik C-H asimetrik gerilim titreşimi), 2881 (alifatik C-H simetrik gerilim titreşimi).

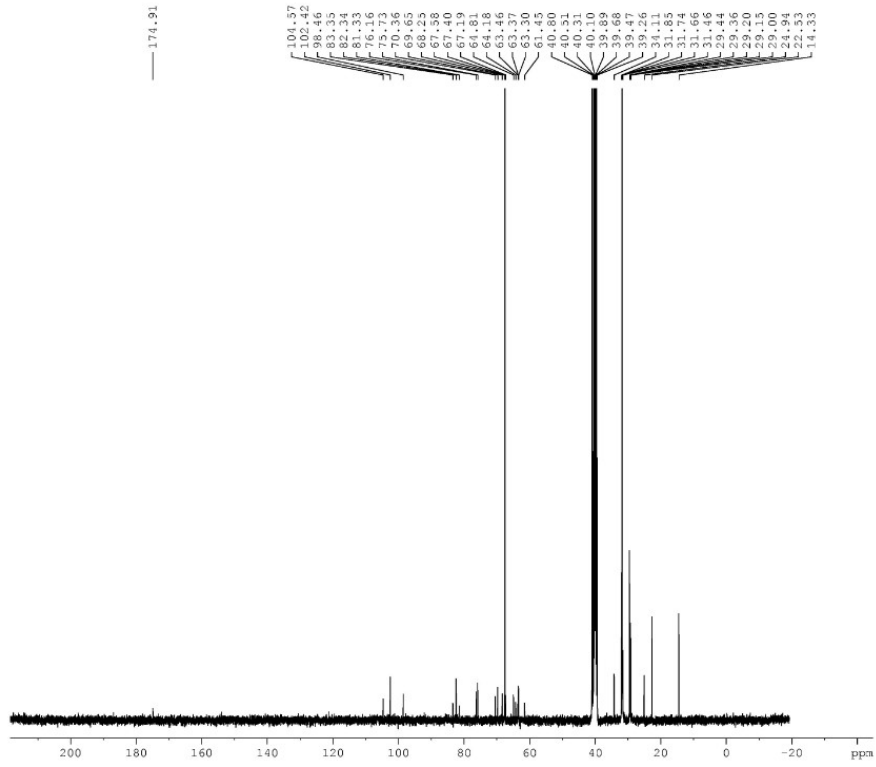
**<sup>13</sup>C-NMR (400 MHz) (DMSO-*d*<sub>6</sub>/TMS) pikleri, ppm** (Şekil 3.37): 14,33 (CH<sub>3</sub>), 22,53 (laurik asit C11), 24,94 (laurik asit C3), 29,00, 29,15, 29,20, 29,36, 29,44 (laurik asit C4, 5, 6, 7, 8, 9), 31,46, 31,66, 31,74, 31,85 (laurik asit C10), 34,11 (laurik asit C2), 61,45, 63,30, 63,37, 63,46, (siklik fruktoz C1 ve C6), 64,18, 64,81 (açık zincir fruktoz C6), 67,19, 67,40, 67,58 (açık zincir fruktoz C1), 68,25, 69,65, 70,36 (açık zincir fruktoz C5), 75,73, 76,16 (açık zincir fruktoz C3/siklik fruktoz C5), 81,83, 82,34, 83,35 (siklik fruktoz C3 ve C4), 98,46, 102,42, 104,57 (siklik fruktoz C2), 174,91 (CH<sub>2</sub>COO).



Şekil 3.36 6-O-Fruktoz laurat'ın (L1) IR spektrumu (ATR).

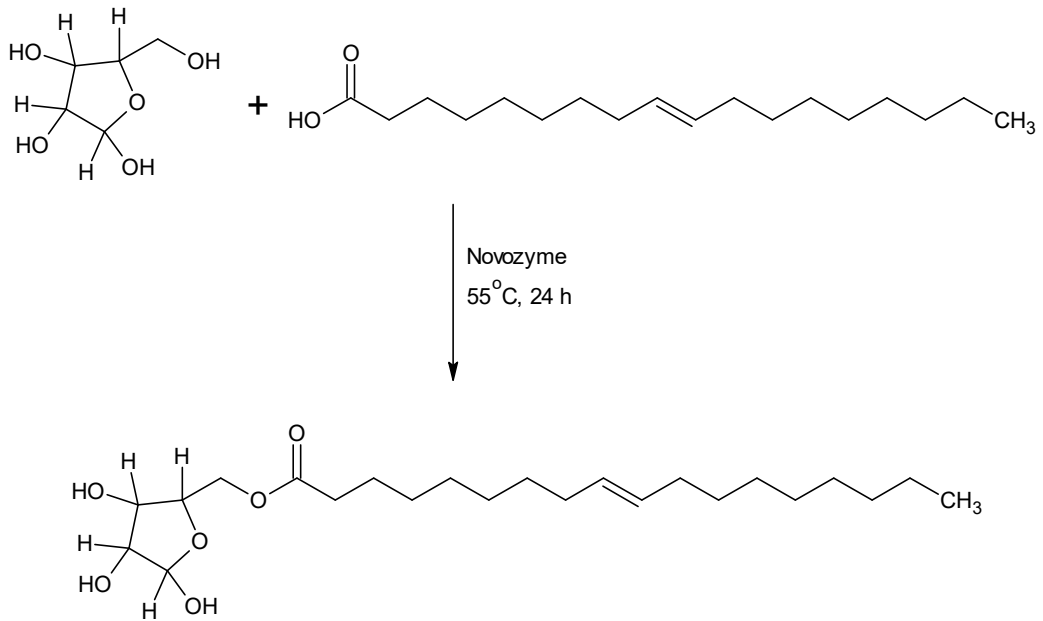


L1



Şekil 3.37 6-O-Fruktoz laurat'ın (L1) <sup>13</sup>C-NMR spektrumu.

### 3.3.6. Riboz-oleik asit esterleri



Şekil 3.38 Riboz-oleik asit esterinin sentez şeması.

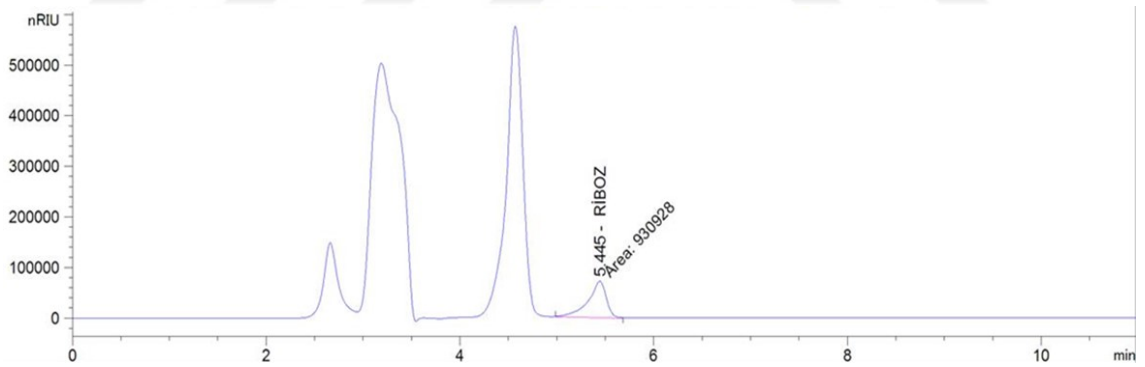
Bileşimi: C (%66,63), H (%10,21), O (%23,16). Molekül ağırlığı, 414,57598 g/mol. Molekül formülü, C<sub>23</sub>H<sub>42</sub>O<sub>6</sub>. Tepkime ortamı, TBU (16 ml) ve DMSO (4 ml); riboz, 0,6 g; oleik asit, 1,128 g; moleküler elek, 2 g; immobilize *C. antarctica* lipazı, 140 mg.

### **Spektral bulgular**

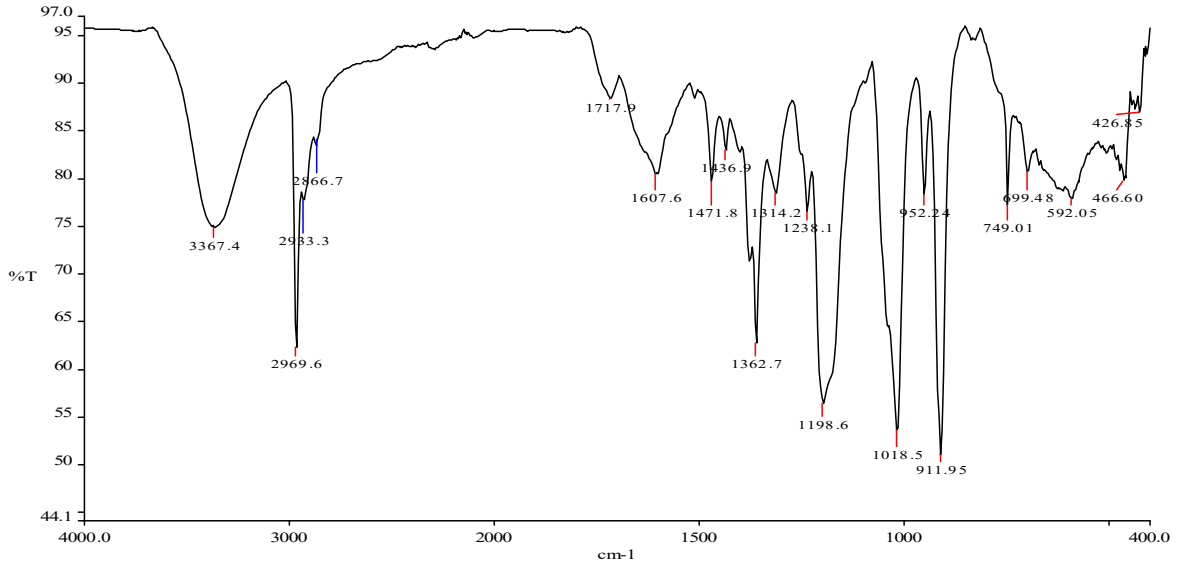
#### **1. 5-O-Riboz oleat (C1/Ö)**

**IR (ATR) pikleri, cm<sup>-1</sup>** (Şekil 3.40): 3367 (O-H gerilme titreşimi), 1717 (ester C=O gerilme titreşimi), 1198 (C-O gerilim titreşimi), 2969, 2933 (alifatik C-H asimetric gerilim titreşimi), 2866 (alifatik C-H simetrik gerilim titreşimi).

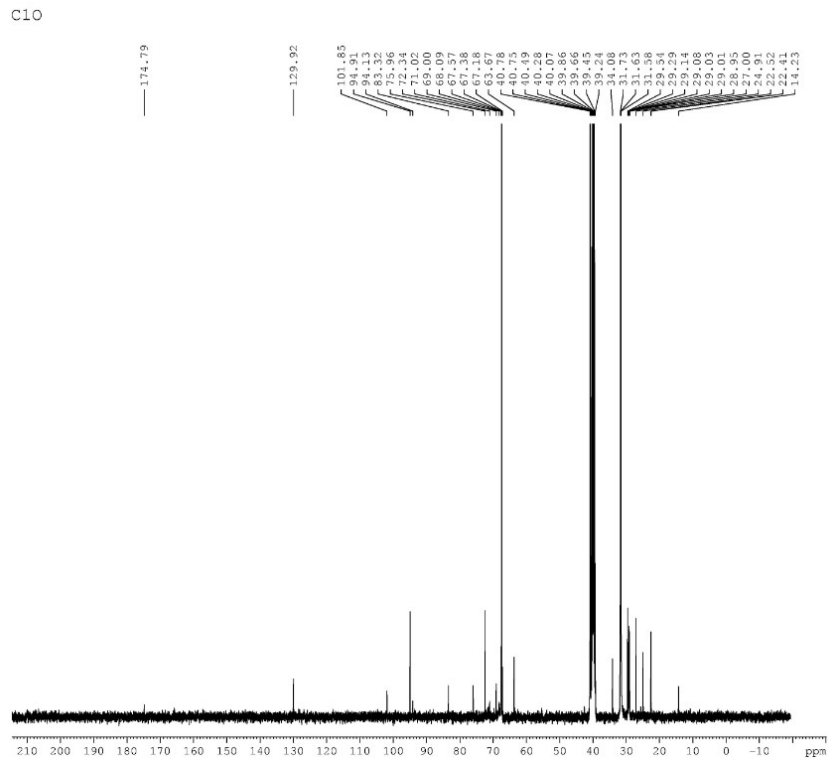
**<sup>13</sup>C-NMR (400 MHz) (DMSO-*d*<sub>6</sub>/TMS) δ (ppm)** (Şekil 3.41): 14,23 (CH<sub>3</sub>), 22,41, 22,52, 24,92 (oleik asit C3), 27,00 (oleik asit C8 ve 11), 28,95, 29,91, 29,03, 29,08, 29,54, 29,14, 29,29 (oleik asit C4, 5, 6, 13, 14, 15, 17), 31,58, 31,63 (oleik asit C7, 12, 16), 34,08 (oleik asit C2), 63,67 (açık zincir riboz C5), 67,18, 67,38, 67,57, 68,09, 69,00 (açık zincir riboz C3 ve C4), 71,02, 72,34 (açık zincir riboz C3 ve C4/siklik riboz C5), 75,96 (siklik riboz C4), 83,32 (siklik riboz C2 ve C3 / açık zincir riboz C-2), 94,13, 94,91, 101,85 (siklik riboz C1), 129,92 (oleik asit C9 ve 10), 174,79 (CH<sub>2</sub>COO).



**Şekil 3.39** 5-O-Riboz oleat'ın (C1/Ö) HPLC ile verim hesabı (%90,30 (0,54 g)).



Şekil 3.40 5-O-Riboz oleat'ın (C1/Ö) IR spektrumu (ATR).



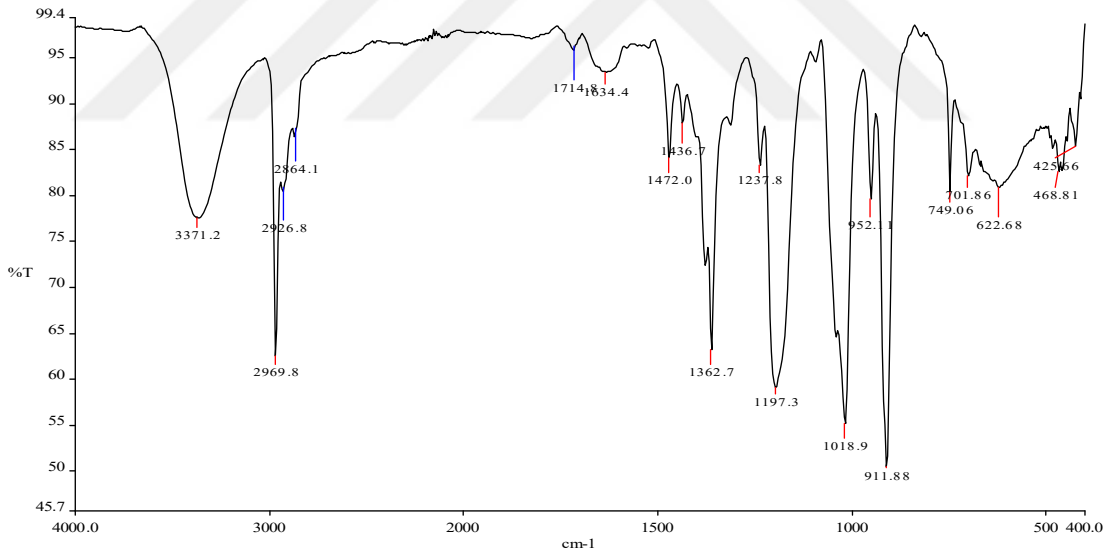
Şekil 3.41 5-O-Riboz oleat'ın (C1/Ö) <sup>13</sup>C-NMR spektrumu.

## 2. 5-O-Riboz oleat (C1/K)

Tepkime ortamı, TBU (16 ml) ve DMSO (4 ml); riboz, 0,6 g; oleik asit, 1,128 g; moleküler elek, 2 g.

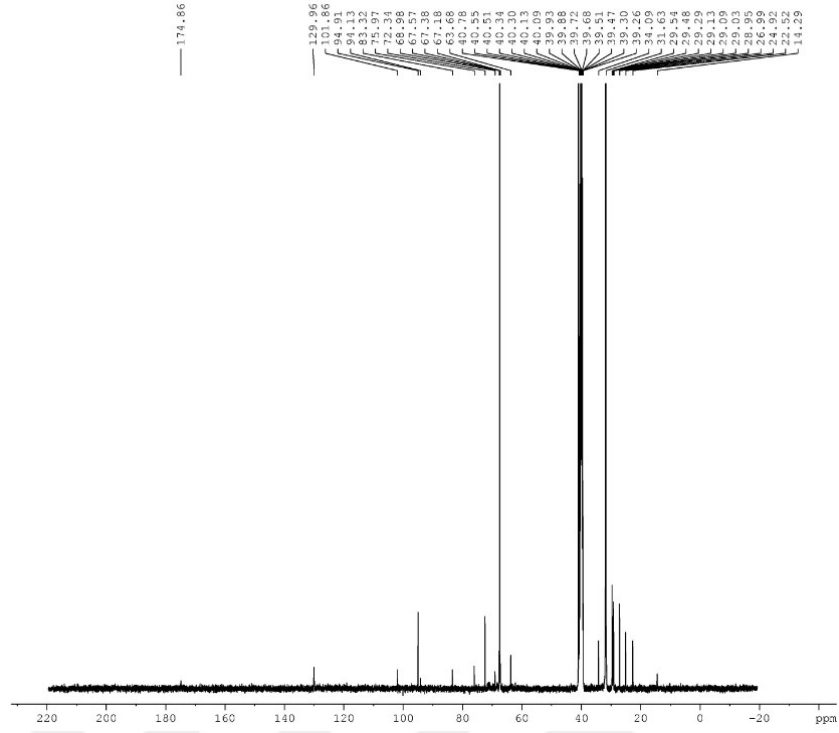
**IR (ATR) pikleri,  $\text{cm}^{-1}$**  (Şekil 3.42): 3371 (O-H gerilme titreşimi), 1714 (ester C=O gerilme titreşimi), 1197 (C-O gerilim titreşimi), 2969, 2926 (alifatik C-H asimetric gerilim titreşimi), 2864 (alifatik C-H simetrik gerilim titreşimi).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (400 MHz) (DMSO- $d_6$ /TMS)  $\delta$  (ppm)** (Şekil 3.43): 14,29 ( $\text{CH}_3$ ), 22,52, 24,92 (oleik asit C3), 26,99 (oleik asit C8 ve 11), 28,95, 29,03, 29,09, 29,13, 29,29, 29,48, 29,54 (oleik asit C4, 5, 6, 13, 14, 15, 17), 31,63 (oleik asit C7, 12, 16), 34,09 (oleik asit C2), 63,68 (alifatik riboz C5), 67,18, 67,38, 67,57, 68,98 (alifatik riboz C3 ve C4), 72,34 (siklik riboz C5/alifatik riboz C3 ve C4), 75,97 (siklik riboz C4), 83,32 (siklik riboz C2 ve C3/alifatik riboz C2), 94,13, 94,91, 101,86 (siklik riboz C1), 129,96 (oleik asit C9 ve C10), 174,86 ( $\text{CH}_2\text{COO}$ ).



Şekil 3.42 5-O-Riboz oleat'ın (C1/K) IR spektrumu (ATR).

C1K



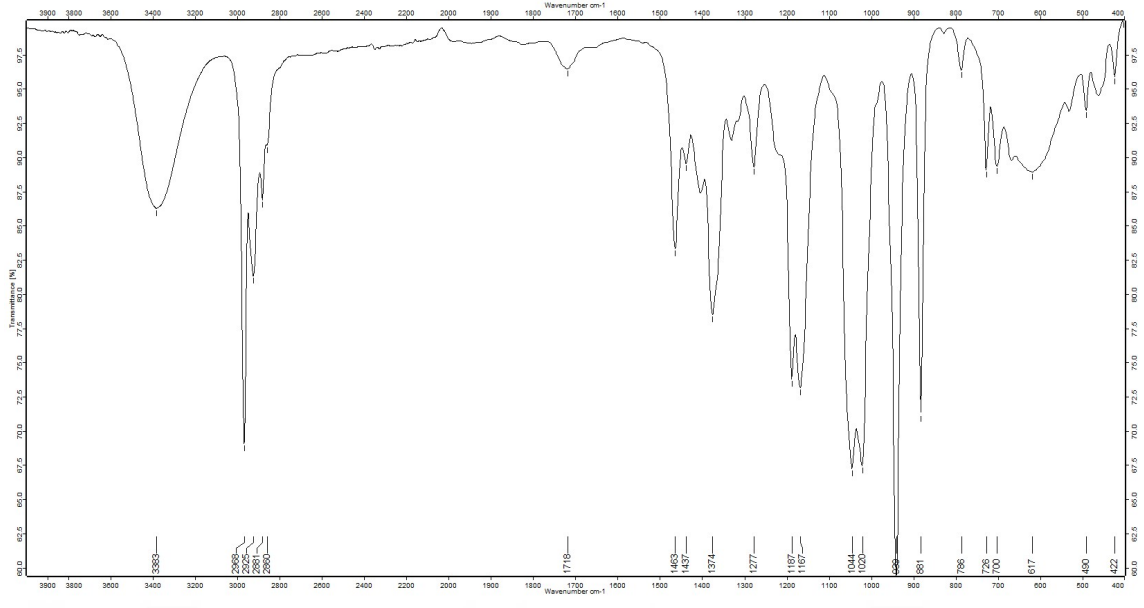
Şekil 3.43 5-O-Riboz oleat'ın (C1/K)  $^{13}\text{C}$  -NMR spektrumu.

### 3. 5-O-Riboz oleat (C2/Ö)

Tepkime ortamı, 2M2B (16 ml) ve DMSO (4 ml); riboz, 0,6 g; oleik asit, 1,128 g; moleküler elek 2 g; immobilize *C. antarctica* lipazı, 140 mg.

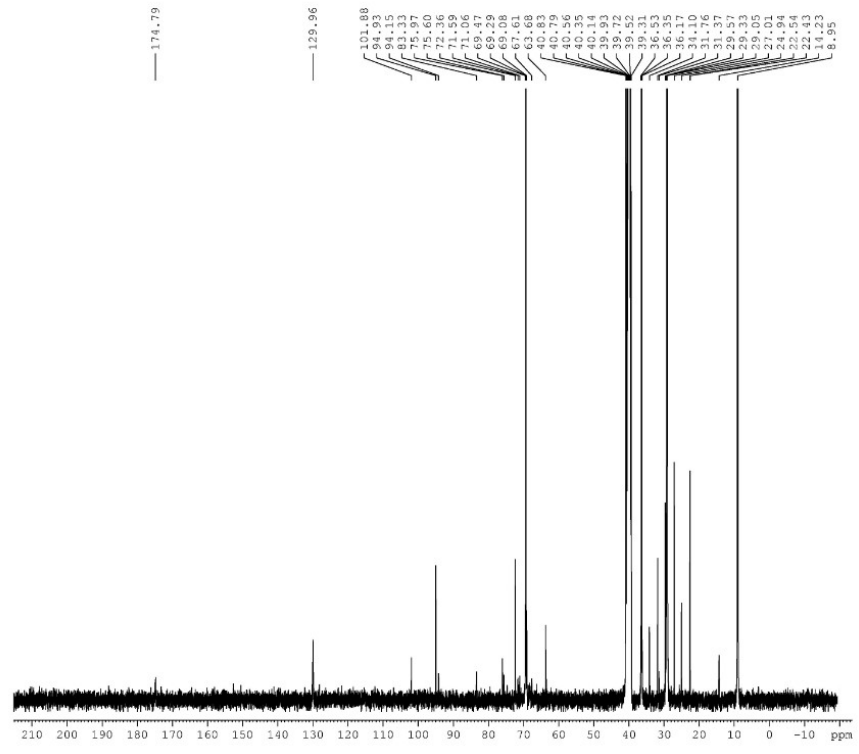
**IR (ATR) pikleri,  $\text{cm}^{-1}$**  (Şekil 3.44): 3383 (O-H gerilme titreşimi), 1718 (ester C=O gerilme titreşimi), 1187 ve 1167 (C-O gerilim titreşimi), 2968, 2925 (alifatik C-H asimetrik gerilim titreşimi), 2881, 2860 (alifatik C-H simetrik gerilim titreşimi).

**$^{13}\text{C}$ -NMR (400 MHz) (DMSO- $d_6$ /TMS)  $\delta$  pikleri, ppm** (Şekil 3.45): 8,95, 14,23 (CH<sub>3</sub>), 22,43, 22,54, 24,94 (oleik asit C3), 27,01 (oleik asit C8 ve C11), 29,05, 29,33, 29,57 (oleik asit C4, 5, 6, 12, 13, 15, 17), 31,37, 31,76 (oleik asit C7, 12, 16), 34,10, 36,17, 36,35, 36,53 (oleik asit C2), 63,68 (alifatik riboz C5), 67,61, 69,08, 69,29, 69,47 (alifatik riboz C3 ve C4), 71,06, 71,59, 72,36 (siklik riboz C5/alifatik C3 ve C4), 75,60, 75,97 (siklik riboz C4), 82,33 (siklik riboz C2 ve C3/alifatik C2), 94,15, 94,93, 101,8 (siklik riboz C1), 129,96 (oleik asit C9 ve C10), 174,79 (CH<sub>2</sub>COO).



Şekil 3.44 5-O-Riboz oleat'ın (C2/Ö) IR spektrumu (ATR).

C2O



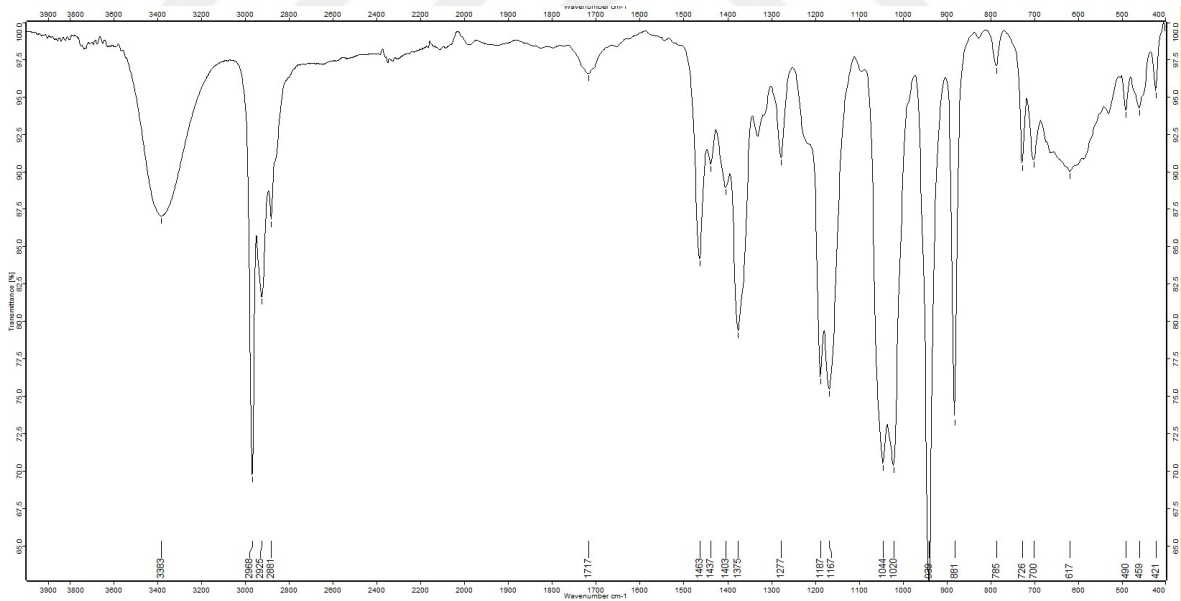
Şekil 3.45 5-O-Riboz oleat'ın (C2/Ö) <sup>13</sup>C -NMR spektrumu.

#### 4. 5-O-Riboz oleat (C2/K)

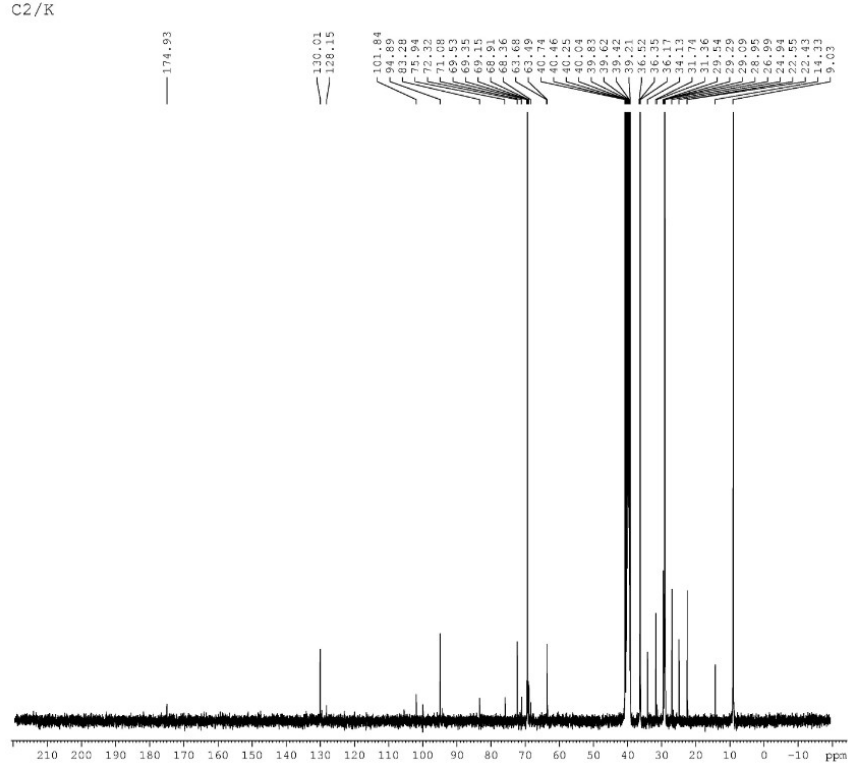
Tepkime ortamı, 2M2B (16 ml) ve DMSO (4 ml); riboz, 0,6 g; oleik asit, 1,128 g; moleküler elek 2 g.

**IR (ATR) pikleri,  $\text{cm}^{-1}$**  (Şekil 3.46): 3383 (O-H gerilme titreşimi), 1717 (ester C=O gerilme titreşimi), 1187 ve 1167 (C-O gerilim titreşimi), 2968, 2925 (alifatik C-H asimetric gerilim titreşimi), 2881 (alifatik C-H simetrik gerilim titreşimi).

**$^{13}\text{C}$ -NMR (400 MHz) (DMSO- $d_6$ /TMS)  $\delta$  pikleri, ppm** (Şekil 3.47): 9,03, 14,33 ( $\text{CH}_3$ ), 22,43, 22,55, 24,94 (oleik asit C3), 26,99 (oleik asit C8 ve C11), 28,95, 29,09, 29,29, 29,54 (oleik asit C4, 5, 6, 13, 14, 15, 17), 31,36, 31,74 (oleik asit 7, 12, 16), 34,13, 36,17, 36,35, 36,52 (oleik asit C2), 63,49, 63,68 (açık zincir riboz C5), 68,36, 68,91, 69,15, 69,35, 69,53 (açık zincir riboz C3 ve C4), 71,08, 72,32 (siklik riboz C5/açık zincir riboz C3 ve C4), 75,94 (siklik riboz C4), 83,28 (siklik riboz C2 ve C3/açık zincir riboz C2), 94,89, 101,84 (siklik riboz C1), 128,15, 130,01 (oleik asit C9 ve C10), 174,93 ( $\text{CH}_2\text{COO}$ ).



Şekil 3.46 5-O-Riboz oleat'ın (C2/K) IR spektrumu (ATR).



Şekil 3.47 5-O-Riboz oleat'ın (C2/K)  $^{13}\text{C}$  -NMR spektrumu.

### 3.4 Sitotoksisite Analiz Sonuçları

Canlı hücre sayısı yüzde olarak aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı: (%) =  $[(\text{OD}_{450} (\text{örnek}) / \text{OD}_{450} (\text{negatif kontrol})) \times 100]$ . Sonuçlar; % 95 güven seviyesinde, çoklu karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile Student t testi istatistik programları kullanılarak ve 0,05 yanılma payı ile analiz edildi.

Şeker esterlerinin fare fibroblastları üzerine anlamlı bir sitotoksik etki yapmadıkları saptandı.



## 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

### 4.1 TLC Verileri

Reaksiyon karışımından doğrudan aliquotlar alınarak ürün varlığı ve verim ince tabaka kromatografisi ile kalitatif olarak incelenmiştir. Ürün bantları, tutma faktörü (Rf) hesaplanarak saptanmıştır (Şekil 3.4). Sentezlenen tüm şeker esterlerinin Rf değerleri 0,2 ile 0,5 aralığında yer almıştır. Bu değerler mevcut literatürde rapor edilenlerle uyumludur (Bousquet ve ark., 1998; Khaled ve ark., 1991; Tortorello ve Delwiche, 1983).

### 4.2 HPLC Verileri

Çözünür karbohidratların (disakkaritler, heksozlar ve pentozlar) ayrıştırılması, tanımlanması ve miktarlarının belirlenmesi HPLC ile kısa sürede yapılabilmektedir (Temizkan ve ark., 2008). Bu çalışmada şekerlerin esterlere dönüşüm yüzdeleri üzerine bir fikir edinmek amacıyla rastgele seçilen örnekler HPLC ile analiz edilmiştir (Tablo 4.1).

**Tablo 4.1** Sentezlenen şeker esterlerinin HPLC dönüşüm yüzdeleri

Bileşik	Organik çözücü	Şeker dönüşümü (%) (HPLC)
6-O-glukoz oleat (10Ö)	TBU/DMSO	90,99
6-O-fruktoz oleat (9Ö)	TBU/DMSO	98,90
6-O-fruktoz oleat (12K)	2M2B/DMSO	98,90
5-O-riboz oleat (C1Ö)	TBU/DMSO	90,30

Tablodaki verilerden şeker dönüşüm oranının (ürün veriminin) tepkime ortamı, şeker cinsi ve enzim varlığından çok az etkilendiği (yaklaşık, %2 - %10) söylenebilir. Literatürde *Candida antarctica* lipazı ile enzimatik olarak sentezlenen farklı şeker esterlerine ait bileşiklerin dönüşüm yüzdeleri ayrı bir tablo halinde hazırlanmıştır (Tablo 4.2). Bu tablodaki verilerin önemli bir kısmının nispeten çok düşük olduğu ve dönüşüm oranlarının çok daha geniş bir aralıkta değişkenlik gösterdiği görülebilir.

**Tablo 4.2** Literatürde mevcut bazı şeker esterlerinin dönüşüm oranları

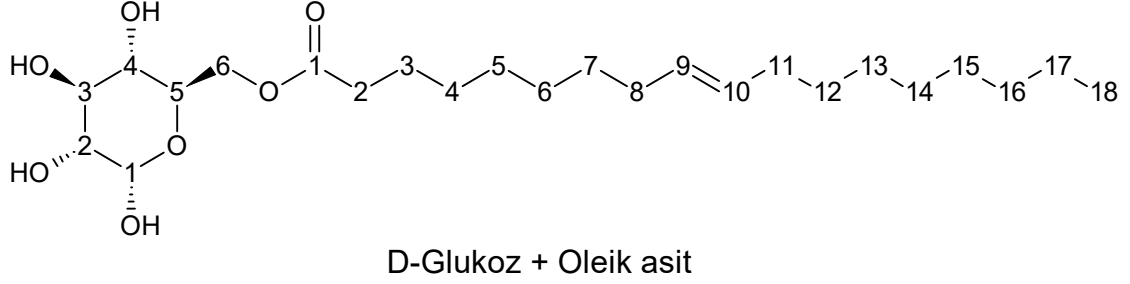
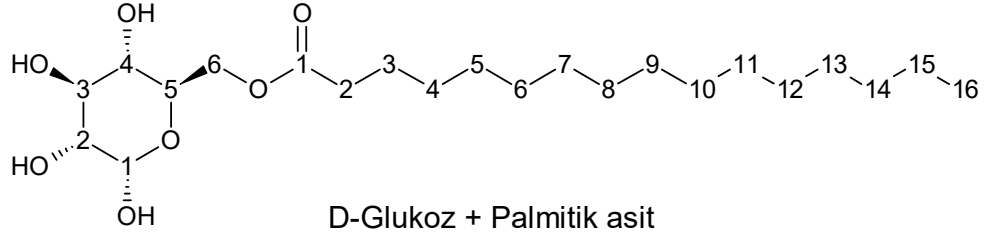
Bileşik	Organik Çözücü	Şeker Dönüşüm (%) (HPLC)	Referans
Sükroz-laurik asit	2M2B/DMSO	45	Ferrer ve ark., 1999
Glukoz-palmitik asit	<i>n</i> -hekzan	92	Tsuzuki ve ark., 1999
Fruktoz-palmitik asit	<i>n</i> -hekzan	89	Tsuzuki ve ark., 1999
Fruktoz-oleik asit	aseton	77	Arcos ve ark., 1998b
Glukoz-laurik asit	İyonik sıvı	29,7	Ha ve ark., 2010
Glukoz-palmitik asit	İyonik sıvı	33,5	Ha ve ark., 2010

### 4.3 IR Verileri

Infrared (IR, kızılötesi) absorpsiyon spektroskopisi bir tür titreşim spektroskopisidir. Dalga boyu uzunluğundan ziyade emilen ya da yansıtılan ışın sayısının ölçümüne dayanır. Biyomolekül ve biyopolimerlerin (karbohidratlar, nükleik asitler, polisakkaritler, proteinler ve yağ asitleri) saptanması ve molekül yapılarının aydınlatılmasında yaygın kullanılan yöntemlerden biridir (Büyüksırt ve Kuleaşan, 2014). Bu çalışmada örnekler yansıyan ışını ölçen ATR (attenuated total reflectance) sisteminde incelenmiştir (Tablolar 4.3, 4.4 ve 4.5).

Glukoz-palmitik asit ve glukoz-oleik asit esterlerinin grafiklerinde –OH gerilim titreşiminin  $3364-3387\text{ cm}^{-1}$  arasında olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 4.3). Bu pik, molekül içi hidrojen bağına işaret etmektedir. C=O ester fonksiyonel grubuna ait bantlar  $1710-1722\text{ cm}^{-1}$  aralığında görülmektedir. –CH asimetric alifatik gerilim titreşimi genel olarak  $2924-2970\text{ cm}^{-1}$  aralığında, simetric alifatik gerilim titreşimi ise  $2850-2872\text{ cm}^{-1}$  aralığında pik vermektedir.

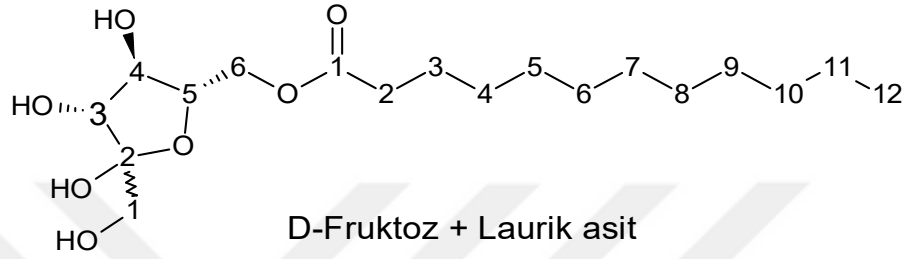
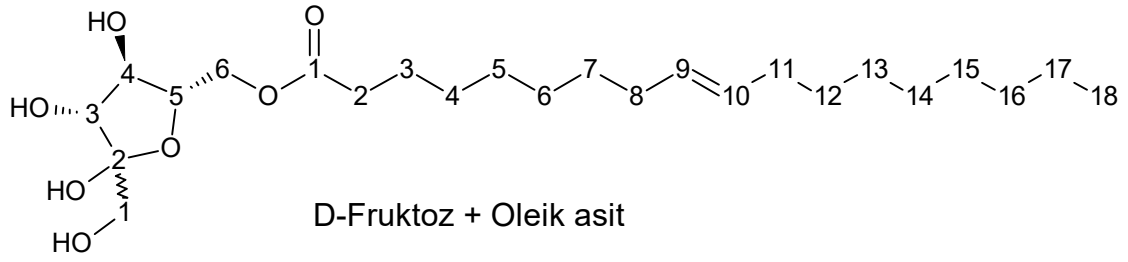
DMSO/TBU ortamında ve enzimsiz sentezlenen 6-*O*-glukoz palmitat (7K) bileşiğinin IR spektrumunda  $1695\text{ cm}^{-1}$  piki ortamda henüz mevcut olan palmitik aside aittir.



**Tablo 4.3** Glukoz esterlerine ait IR verileri

Bant	7K	7Ö	8K	8Ö	10K	10Ö
O-H	3376	3364	3378	3387	3364	3383
C=O	1710	1722	1721	1722	1717	1718
C-O	1208	1196	1186 1166	1186 1166	1199	1187 1167
Alifatik C-H asimetrik	2967 2915	2970 2927	2967 2924	2967 2924	2970 2933	2968 2925
Alifatik C-H simetrik	2850	2854	2855	2855	2874	2881 2860

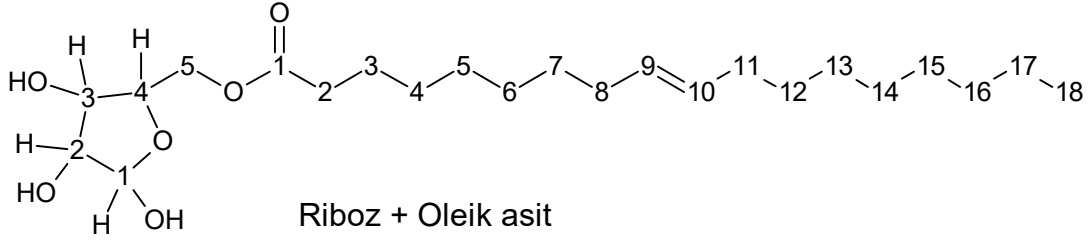
Fruktoz oleik asit, fruktoz palmitik asit ve fruktoz laurik asit esterlerinin sentezinde –OH gerilim titreşiminin 3371-3388  $\text{cm}^{-1}$  arasında olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 4.4). Bu bant molekül içi hidrojen bağının varlığına işaret etmektedir. C=O ester fonksiyonel grubuna ait bant 1717-1722  $\text{cm}^{-1}$  aralığında bulunmaktadır. –CH asimetrik alifatik gerilim titreşimi 2925-2969  $\text{cm}^{-1}$  aralığında, simetrik alifatik gerilim titreşimi ise 2864-2881  $\text{cm}^{-1}$  aralığında yer almaktadır. 6-O-fruktoz oleat'ın (12Ö) IR spektrumunda 1653  $\text{cm}^{-1}$  bandı oleik asitten kaynaklanmaktadır.



**Tablo 4.4** Fruktoz esterlerinin IR pikleri

Bant	9K	9Ö	12K	12Ö	L1
O-H	3381	3382	3378	3388	3383
C=O	1722	1721	1719	1718	1717
C-O	1198	1198	1186 1166	1187 1168	1167 1186
Alifatik C-H asimetrik	2969	2969	2967	2968	2968
	2932	2938	2925	2923	2925
Alifatik C-H simetrik	2864	2876	2878	2878	2881

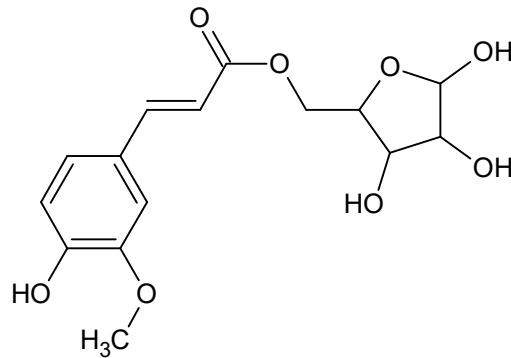
Riboz oleik asit esterlerinin sentezinde –OH gerilim titreşimi 3367-3383  $\text{cm}^{-1}$  aralığında görüntülenen bant, molekül içi hidrojen bağının varlığına işaret etmektedir (Tablo 4.5). C=O ester fonksiyonel grubuna ait pikler 1714-1718  $\text{cm}^{-1}$  aralığında saptanmıştır. –CH asimetrik alifatik gerilim titreşimleri 2925-2969  $\text{cm}^{-1}$ , simetrik alifatik gerilim titreşimleri ise 2860-2881  $\text{cm}^{-1}$  aralığındaki piklerle temsil edilmektedir. 5-O-riboz oleat'ın (C1K) IR spektrumunda gözlenen 1634  $\text{cm}^{-1}$  bandı ortamda henüz var olan oleik asidi işaret etmektedir.



**Tablo 4.5** Riboz esterlerinin IR verileri

Bant	C1/K	C1/Ö	C2/K	C2/Ö
O-H	3371	3367	3383	3383
C=O	1714	1717	1717	1718
C-O	1197	1198	1187 1167	1187 1167
Alifatik C-H asimetrik	2969 2926	2969 2933	2968 2925	2968 2925
Alifatik C-H simetrik	2864	2866	2881	2881 2860

Literatürde yer alan şeker esterlerinden bazılarının IR bulguları karşılaştırma amacıyla tez metninde yer verilmiştir (Tablo 4.6).



5-O-(trans-feruloil)-D-arabinofuranoz (Vafiadi ve ark., 2009)

**Tablo 4.6** Literatürde sentezlenen bazı esterlerin IR verileri

	<b>5-O-palmitoil-L-(+)-arabinoz</b>	<b>5-O-(trans-feruloil)-D-arabinofuranoz</b>	<b>6-O-Glukoz stearat</b>	<b>Glukoz palmitat</b>
<b>O-H</b>	3400		3408	3423
<b>C=O</b>	1736	1725	1740	1738
<b>C-O</b>			1099 1031	1176
<b>C-H ali./asi</b>			2962	2915
<b>C-H ali./sim</b>			2925	2853
<b>Referans</b>	Pappalardo ve ark., 2017	Vafiadi ve ark., 2007	Yu ve ark., 2007	Tarahomjoo ve Alemzadeh, 2003

Yukarıda verilen literatür bulguları ışığında ester grubuna ait IR bantları 1725, 1736, 1738 ve 1740  $\text{cm}^{-1}$ 'de görülmektedir. Feruloil esteraz bileşiği *n*-hekzan ve *t*-bütanol karışımından oluşan reaksiyon ortamında sentezlendiği ve 1725  $\text{cm}^{-1}$ 'de C=O ester gerilmesine sahip olduğu belirtilmiştir (Vafiadi ve ark., 2007).

Yukarıdaki verilerden bazı sonuçlar çıkarmak mümkün görünmektedir: (1) Bu çalışmada ester bağları IR spektrumunda 1710 ve 1722  $\text{cm}^{-1}$  aralığında yer almaktadır. (2) Fruktoz esterleri nispeten daha dar bir aralıkta bulunmaktadır (1717-1722  $\text{cm}^{-1}$ , Tablo 4.4.). (3) Literatürde glukoz palmitatın ester bağı biraz daha sağa kaymış durumdadır (1738  $\text{cm}^{-1}$ , Tablo 4.6). Bu, cihaz tipi, çalışma modu, ya da örneği çözmek için seçilen çözücünün farklı olmasından kaynaklanabilir. –OH gerilim piki için de aynı durum söz konusu olabilir. Bu çalışmada –OH piki sağ sınır değeri yaklaşık 3387  $\text{cm}^{-1}$  iken literatürde glukoz palmitattaki karşılığının yine sağa kaydığı görülmektedir (3423  $\text{cm}^{-1}$ ). C-O bağına ait pik ise bu çalışmada elde edilen aralığın yaklaşık ortasında bir değere sahiptir. Sonuç olarak, IR spektrumunun aynı bileşikler için yakın, fakat daha geniş bir aralıkta pikler üretmesi aşırı bir sapma olmadığı sürece kabul edilebilir olmalıdır. Bu vargı, NMR analizlerinin daha kesin ve beklenen spektrumları vermiş olmasıyla desteklenebilir.

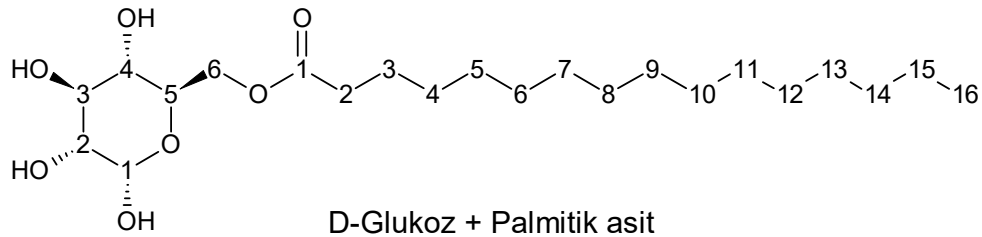
#### 4.4 NMR Verileri

Atom çekirdekleri dışarıdan ve belirli bir yönde çok büyük bir elektromanyetik kuvvete maruz bırakıldıklarında geçici olarak mıknatıs özelliği kazanırlar. Bu durumda ancak iki yönde hareket edebilirler. Davranışları geri tepmeli bir top örneği ile açıklanabilir. Atomlar normalde her yöne ve aynı anda mermi fırlatan bir top gibi her yöne ışın yapabilirler ve bu durumda hareketleri bir küre içindedir. Dışarıdan kuvvet uygulandığında nispeten düşük enerji seviyesine sahip çekirdekler namludan çıkan top mermisi gibi uygulanan kuvvetle aynı doğrultuda hareket ederken, daha yüksek enerji seviyesine sahip çekirdekler top gibi geri teper; yani zıt yönde hareket eder (Samueli ve Boudenot, 2005). Bu iki ve zıt yönlü hareket geçici mıknatıs özelliği kazanmalarından kaynaklanır. Atom çekirdekleri önceki enerji seviyesine dönerken radyo dalgaları salar. NMR cihazı bu salınan radyo dalgalarını okur (Erdik, 2015).

Bu çalışmada  $^{13}\text{C}$ -NMR spektroskopisi ile elde edilen molekül yapıları  $^1\text{H}$ -NMR ve HSQC spektroskopileri yöntemleriyle doğrulanmıştır.

##### 4.4.1 $^{13}\text{C}$ -NMR verileri

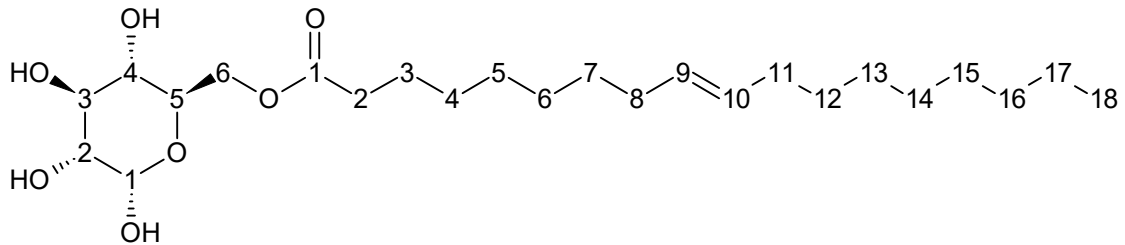
Glukoz-palmitik asit esterleri 7Ö, 7K, 8Ö ve 8K, DMSO-TBU ve DMSO-2M2B tepkime ortamı kullanılarak elde edilmiştir (Tablo 4.7). Ö harfi *Candida antarctica* lipazı varlığında sentezlenen örnekleri, K harfi ise enzimsiz ve tanımlı bir kimyasal katalizör kullanılmaksızın elde edilen ester örneklerini simgelemektedir. NMR grafiklerinde her iki örnek grubunda ester bağlarının oluştuğunu 175,19- 175,73 ppm aralığındaki pikler ifade etmektedir.



**Tablo 4.7** Glukoz-palmitat örneklerinin <sup>13</sup>C-NMR analizi

	<sup>13</sup> C-NMR (400 MHz) (DMSO-d <sub>6</sub> /TMS) δ (ppm):
<b>7Ö</b>	13,74 (CH <sub>3</sub> ), 22,30 (palmitik asit C15), 24,65 (palmitik asit C3), 28,82, 28,99, 29,14, 29,32, 30,63, 30,83 ve 31,01 (palmitik asit C4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13), 31,56 (palmitik asit C14), 33,94 (palmitik asit C2), 36,20 ve 40,14 (CH <sub>2</sub> COO), 68,08 ve 68,27 (siklik glukoz C-OH), 175,66 (CH <sub>2</sub> COO).
<b>7K</b>	13,69 (CH <sub>3</sub> ), 22,18 (palmitik asit C14), 24,52 (palmitik asit C2), 28,70, 28,86, 29,01, 29,19, 30,96 (palmitik asit C3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12), 30,96 (palmitik asit C13), 40,14 ve 61,48 (açık zincir glukoz/siklik glukoz C6), 67,58, 67,78, 67,96 (açık zincir glukoz C3), 70,48 (açık zincir glukoz C4, 5 / siklik glukoz C2), 74,56 (siklik glukoz C3), 75,92 (siklik glukoz C5), 76,44 (siklik glukoz C4), 92,07 ve 96,60 (açık zincir glukoz C2 / siklik glukoz C1), 175,19 (CH <sub>2</sub> COO).
<b>8Ö</b>	8,39, 13,87 (CH <sub>3</sub> ), 22,24, 22,37, 22,50 (palmitik asit C15), 24,70 (palmitik asit C3), 28,04, 28,25, 28,43, 28,88, 29,03, 29,06, 29,20, 29,31, 29,36, 29,39 (palmitik asit C4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13), 31,62, 33,95 (palmitik asit C14), 35,82, 36,00, 36,19 (palmitik asit C2), 61,78 (siklik glukoz C6), 70,41, 70,60 (siklik glukoz C4, C5 / C1), 70,60, 70,82 (siklik glukoz C2,3 / C1), 175,73 (CH <sub>2</sub> COO).
<b>8K</b>	13,73 (CH <sub>3</sub> ), 22,32 (palmitik asit C15), 24,66 (palmitik asit C3), 28,20, 28,84, 29,01, 29,16, 29,34 (palmitik asit C4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13), 31,58 (palmitik asit C14), 33,91, 35,96 (palmitik asit C2), 40,15 (CH <sub>2</sub> COO), 70,32 (siklik glukoz C1, 2, 3, 4, 5, 6), 175,63 (CH <sub>2</sub> COO).
<b>Glukoz</b>	92,66, 97,32 ve 103,67 (siklik glukoz C-1 / açık zincir glukoz C-2), 70,19, 70,75, 77,15, 77,20, 78,71, 81,08 ve 81,53 (siklik glukoz C-4), 71,04, 75,28, 75,76, 76,06 ve 76,53 (siklik glukoz C-5), 70,19 ve 70,75 (açık zincir glukoz C-4), 72,38 ve 72,80 (açık zincir glukoz C-5 / siklik glukoz C-2), 73,54 (siklik glukoz C-3), 64,26 ve 69,94 (açık zincir glukoz C-3), 61,68 (açık zincir glukoz C-6 / siklik glukoz C-6).
<b>Palmitik asit</b>	180,58 (C1), 34,23 (C2), 24,80 (C3), 29,21 (C4), 29,37 (C5), 29,57 (C6), 29,81 (C7, 8, 9, 10, 11, 12), 29,49 (C13), 32,05 (C14), 22,79 (C15), 14,14 (C16).

Dimetilsülfoksit-TBU tepkime ortamında sentezlenen glukoz oleat'ın (10Ö) ester grubundaki karbon atomu 174,77 ppm'de bir kayma ile temsil edilmektedir (Tablo 4.8).

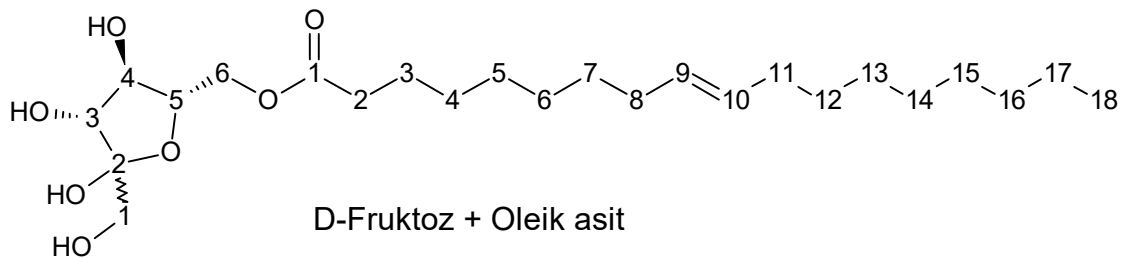
**D-Glukoz + Oleik asit**



**Tablo 4.8** Glukoz oleat'ın  $^{13}\text{C}$ -NMR ile molekül yapı tayini

	$^{13}\text{C}$ -NMR (400 MHz) (DMSO- $d_6$ /TMS) $\delta$ (ppm):
<b>10Ö</b>	9,05, 14,36 (CH <sub>3</sub> ), 22,43, 22,54, 22,81 (oleik asit C17), 24,95, 25,64 (oleik asit C3), 27,01, 27,85 (oleik asit C8 ve C11), 28,95, 29,02, 29,04, 29,08, 29,15, 29,29, 29,54 (oleik asit C4, 5, 6, 13, 14, 15), 31,35, 31,50, 31,70 (oleik asit C7 ve C12), 31,89 (oleik asit C16), 34,13, 36,09, 36,37 (oleik asit C2), 61,66 (açık zincir/siklik glukoz C6), 67,18, 67,38, 67,57 (açık zincir glukoz C3), 73,52 (siklik glukoz C3), 72,39, 72,81 (siklik glukoz C2/açık zincir glukoz C5), 70,72 (açık zincir glukoz C4), 70,72, 77,19 (siklik glukoz C4), 73,52 (siklik glukoz C3), 71,03, 75,25 (siklik glukoz C5), 92,66 (siklik glukoz C1), 174,77 (CH <sub>2</sub> COO).
<b>10K</b>	14,29 (CH <sub>3</sub> ), 22,52, 24,93 (oleik asit C3), 27,00 (oleik asit C8 ve C11), 28,94, 29,02, 29,07, 29,13, 29,28, 29,47, 29,53 (oleik asit 4, 5, 6, 13, 14, 15, 17), 31,42, 31,62, 31,81 (oleik asit 7,12 ve 16), 34,11 (oleik asit C2), 61,66 (siklik glukoz C6/açık zincir glukoz C6), 67,21, 67,41, 67,60 (açık zincir glukoz C3), 70,71 (siklik glukoz C4/açık zincir glukoz C4), 71,01 ve 75,23 (siklik glukoz C5), 73,52 (siklik glukoz C3), 72,33 ve 72,79 (siklik glukoz C2/açık zincir glukoz C5), 77,13 ve 77,16 (siklik glukoz C4), 92,64 (siklik glukoz C1), 97,31 (açık zincir glukoz C2), 129,12, 129,98 (oleik asit C9 ve C10), 174,87 (CH <sub>2</sub> COO).
<b>Glukoz</b>	92,66, 97,32 ve 103,67 (siklik glukoz C-1 / açık zincir glukoz C-2), 70,19, 70,75, 77,15, 77,20, 78,71, 81,08 ve 81,53 (siklik glukoz C-4), 71,04, 75,28, 75,76, 76,06 ve 76,53 (siklik glukoz C-5), 70,19 ve 70,75 (açık zincir glukoz C-4), 72,38 ve 72,80 (açık zincir glukoz C-5 / siklik glukoz C-2), 73,54 (siklik glukoz C-3), 64,26 ve 69,94 (açık zincir glukoz C-3), 61,68 (açık zincir glukoz C-6 / siklik glukoz C-6).
<b>Oleik asit</b>	180,58 (C1), 34,18 (C2), 24,73 (C3), 29,14 (C4, 5, 6), 29,73 (C7, 12), 27,24 (C8), 129,74 (C9), 130,03 (C10), 27,24 (C11), 29,40 (C13, 15), 29,65 (C14), 31,99 (C16), 22,74 (C17), 14,12 (C18).

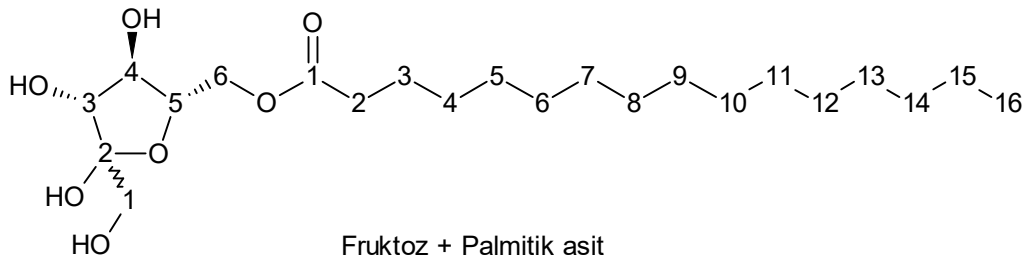
Fruktoz oleat örneklerine (9Ö ve 9K, 12Ö ve 12K) ait NMR grafiğinde görülen piklerin temsil ettiği karbon atomları saptanmaya çalışılmıştır (Tablo 4.9). Ester bağlarının 174,90- 175,85 ppm aralığındaki piklerle ifade edildiği belirlenmiştir.



**Tablo 4.9** Fruktoz oleat örneklerinin <sup>13</sup>C NMR analizi

	<sup>13</sup> C-NMR (400 MHz) (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> /TMS) δ (ppm):
<b>9Ö</b>	13,93 (CH <sub>3</sub> ), 24,75, 25,37 (oleik asit C3), 26,92, 26,94 (oleik asit C8 ve C11), 28,91, 28,98, 29,07, 29,27, 29,36, 29,45, 29,51 (oleik asit C4, 5, 6, 13, 14, 15, 17), 30,77, 30,97 (oleik asit C7, 12), 31,15, 31,66 (oleik asit C16), 34,04 (oleik asit C2), 62,93 (açık zincir fruktoz C6), 65,06, 68,29 (açık zincir fruktoz C1), 68,49, 68,89, 70,59 (açık zincir fruktoz C3, 4, 5), 175,85 (CH <sub>2</sub> COO).
<b>9K</b>	13,78 (CH <sub>3</sub> ), 22,32, 24,66 (oleik asit C3), 25,27, 26,84 (oleik asit C8 ve C11), 28,77, 28,88, 28,94, 28,97, 29,17, 29,35, 29,41 (oleik asit C4, 5, 6, 13, 14, 15, 17), 30,68, 30,89 (oleik asit C7, 12), 31,07, 31,56 (oleik asit C16), 33,95 (oleik asit C2), 40,27 (CH <sub>2</sub> COO), 68,08, 68,28, 68,47, 68,67 (açık zincir fruktoz C-OH), 129,43 (oleik asit C10), 129,58 (oleik asit C9), 175,66 (CH <sub>2</sub> COO).
<b>12K</b>	9,01, 14,31 (CH <sub>3</sub> ), 24,93 (oleik asit C3), 27,00 (oleik asit C8 ve C11), 28,74, 29,06, 29,16, 29,30, 29,39, 29,55 (oleik asit C4, 5, 6, 7, 12, 13, 14, 15, 17), 31,61, 31,75 (oleik asit C16), 34,09, 36,14, 36,34, 36,51 (oleik asit C2), 63,32, 63,45 (açık zincir fruktoz C1 ve C6), 64,16, 64,76 (açık zincir fruktoz C6), 68,19 (açık zincir fruktoz C1), 69,15, 69,35, 69,67, 70,35 (açık zincir fruktoz C5), 75,67, 76,12 (açık zincir fruktoz C3/siklik fruktoz C5), 81,26, 82,30, 83,32 (siklik fruktoz C3 ve 4), 98,48, 102,40, 104,55 (siklik fruktoz C2), 129,97 (oleik asit C9 ve C10), 174,90 CH <sub>2</sub> COO).
<b>Fruktoz</b>	Siklik fruktoz 63,60 ve 64,81 (C1), 104,01 ve 101,86 (C2), 82,76 ve 75,56 (C3), 75,67 ve 75,19 (C4), 80,76 ve 81,76 (C5), 60,94 ve 62,79 (C6). Açık zincir fruktoz 65,8 (C1), 75,6 (C3), 73,1 (C4), 71,8 (C5), 64,1 (C6)
<b>Oleik asit</b>	180,58 (C1), 34,18 (C2), 24,73 (C3), 29,14 (C4, 5, 6), 29,73 (C7,12), 27,24 (C8), 129,74 (C9), 130,03 (C10), 27,24 (C11), 29,40 (C13, 15), 29,65 (C14), 31,99 (C16), 22,74 (C17), 14,12 (C18).

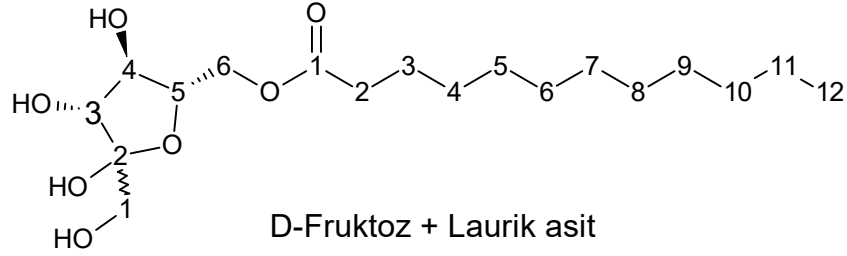
Fruktoz palmitat örneği **P1**, DMSO-TBU tepkime ortamında enzimsiz ve herhangi bir kimyasal katalizör kullanılmaksızın sentezlenmiştir (Tablo 4.10). P1'de ester fonksiyonel grubuna ait C atomunun kayma değeri 174,81 ppm'de gözlenmiştir.



**Tablo 4.10** Fruktoz palmitat örneklerinin  $^{13}\text{C}$ -NMR analizi

$^{13}\text{C}$ -NMR (400 MHz) (DMSO- $d_6$ /TMS) $\delta$ (ppm):	
<b>P1</b>	8,94, 14,25 (CH <sub>3</sub> ), 22,54 (palmitik asit C15), 24,94 (palmitik asit C3), 28,82, 29,03, 29,19, 29,25, 29,40, 29,48, 29,52 (palmitik asit C4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13), 31,58, 31,77 (palmitik asit C14), 34,08, 36,34, 36,52 (palmitik asit C2), 63,23, 63,38, 63,44 (siklik fruktoz C1 ve C6), 64,80 (açık zincir fruktoz C6), 68,25 (açık zincir fruktoz C1), 69,11, 69,31, 69,49, 69,67, 70,37 (açık zincir fruktoz C5), 75,70, 76,19 (açık zincir fruktoz C3/siklik fruktoz C5), 82,34, 83,34 (siklik fruktoz C3 ve C4), 98,45, 102,41, 104,57 (siklik fruktoz C2), 174,81 (CH <sub>2</sub> COO).
<b>Fruktoz</b>	Siklik fruktoz 63,60 ve 64,81 (C1), 104,01 ve 101,86 (C2), 82,76 ve 75,56 (C3), 75,67 ve 75,19 (C4), 80,76 ve 81,76 (C5), 60,94 ve 62,79 (C6). Açık zincir fruktoz 65,8 (C1), 75,6 (C3), 73,1 (C4), 71,8 (C5), 64,1 (C6).
<b>Palmitik asit</b>	180,58 (C1), 34,23 (C2), 24,80 (C3), 29,21 (C4), 29,37 (C5), 29,57 (C6), 29,81 (C7,8,9,10,11,12), 29,49 (C13), 32,05 (C14), 22,79 (C15), 14,14 (C16).

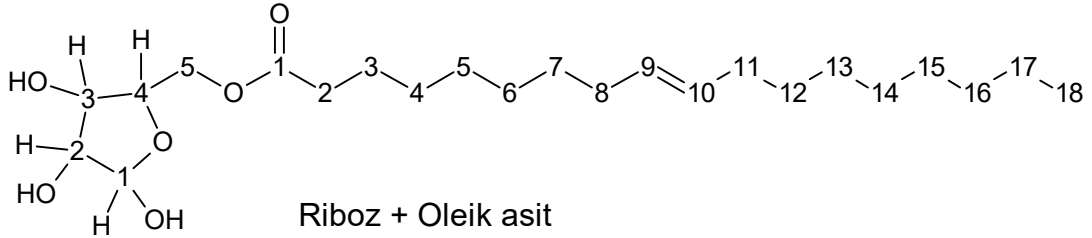
“K” örnekleri gibi sadece DMSO-2M2B varlığında üretilen bir adet fruktoz laurat örneği, L1, için ester fonksiyonel grubuna ait karbonun kayma değeri 174,91 ppm’de görülmüştür (Tablo 4.11).



**Tablo 4.11** Fruktoz laurat örneklerinin  $^{13}\text{C}$ -NMR analizi

$^{13}\text{C}$ -NMR (400 MHz) (DMSO- $d_6$ /TMS) $\delta$ (ppm):	
<b>L1</b>	14,33 (CH <sub>3</sub> ), 22,53 (laurik asit C11), 24,94 (laurik asit C3), 29,00, 29,15, 29,20, 29,36, 29,44 (laurik asit C4, 5, 6, 7, 8, 9), 31,46, 31,66, 31,74, 31,85 (laurik asit C10), 34,11 (laurik asit C2), 61,45, 63,30, 63,37, 63,46, (siklik fruktoz C1 ve C6), 64,18, 64,81 (açık zincir fruktoz C6), 67,19, 67,40, 67,58 (açık zincir fruktoz C1), 68,25, 69,65, 70,36 (açık zincir fruktoz C5), 75,73, 76,16 (açık zincir fruktoz C3/siklik fruktoz C5), 81,83, 82,34, 83,35 (siklik fruktoz C3 ve C4), 98,46, 102,42, 104,57 (siklik fruktoz C2), 174,91 (CH <sub>2</sub> COO).
<b>Fruktoz</b>	Siklik fruktoz 63,60 ve 64,81 (C1), 104,01 ve 101,86 (C2), 82,76 ve 75,56 (C3), 75,67 ve 75,19 (C4), 80,76 ve 81,76 (C5), 60,94 ve 62,79 (C6). Açık zincir fruktoz 65,8 (C1), 75,6 (C3), 73,1 (C4), 71,8 (C5), 64,1 (C6).
<b>Laurik asit</b>	180,74 (C1), 34,21 (C2), 24,75 (C3), 29,15 (C4), 29,34 (C5), 29,52 (C6), 29,68 (C7 ve C8), 29,42 (C9), 31,99 (C10), 22,76 (C11), 14,13 (C12)

Riboz oleat (C1Ö ve C1K, C2Ö ve C2K) örneklerinde ester grubunun karbonu 175,79-174,93 ppm aralığındaki piklerle karakterize edilmiştir.



**Tablo 4.12** Riboz oleat örneklerinin <sup>13</sup>C-NMR analizi

<sup>13</sup> C-NMR (400 MHz) (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> /TMS) δ (ppm):	
<b>C1/Ö</b>	14,23 (CH <sub>3</sub> ), 22,41, 22,52, 24,92 (oleik asit C3), 27,00 (oleik asit C8 ve 11), 28,95, 29,91, 29,03, 29,08, 29,54, 29,14, 29,29 (oleik asit C4, 5, 6, 13, 14, 15, 17), 31,58, 31,63 (oleik asit C7, 12, 16), 34,08 (oleik asit C2), 63,67 (açık zincir riboz C5), 67,18, 67,38, 67,57, 68,09, 69,00 (açık zincir riboz C3 ve C4), 71,02, 72,34 (açık zincir riboz C3 ve C4/siklik riboz C5), 75,96 (siklik riboz C4), 83,32 (siklik riboz C2 ve C3/açık zincir riboz C-2), 94,13, 94,91, 101,85 (siklik riboz C1), 129,92 (oleik asit C9 ve 10), 174,79 (CH <sub>2</sub> COO).
<b>C1/K</b>	14,29 (CH <sub>3</sub> ), 22,52, 24,92 (oleik asit C3), 26,99 (oleik asit C8 ve 11), 28,95, 29,03, 29,09, 29,13, 29,29, 29,48, 29,54 (oleik asit C4, 5, 6, 13, 14, 15, 17), 31,63 (oleik asit C7, 12, 16), 34,09 (oleik asit C2), 63,68 (alifatik riboz C5), 67,18, 67,38, 67,57, 68,98 (alifatik riboz C3 ve C4), 72,34 (siklik riboz C5/alifatik riboz C3 ve C4), 75,97 (siklik riboz C4), 83,32 (siklik riboz C2 ve C3/ alifatik riboz C2), 94,13, 94,91, 101,86 (siklik riboz C1), 129,96 (oleik asit C9 ve C10), 174,86 (CH <sub>2</sub> COO).
<b>C2/Ö</b>	8,95, 14,23 (CH <sub>3</sub> ), 22,43, 22,54, 24,94 (oleik asit C3), 27,01 (oleik asit C8 ve C11), 29,05, 29,33, 29,57 (oleik asit C4, 5, 6, 12, 13, 15, 17), 31,37, 31,76 (oleik asit C7, 12, 16), 34,10, 36,17, 36,35, 36,53 (oleik asit C2), 63,68 (alifatik riboz C5), 67,61, 69,08, 69,29, 69,47 (alifatik riboz C3 ve C4), 71,06, 71,59, 72,36 (siklik riboz C5/alifatik C3 ve C4), 75,60, 75,97 (siklik riboz C4), 82,33 (siklik riboz C2 ve C3/alifatik C2), 94,15, 94,93, 101,8 (siklik riboz C1), 129,96 (oleik asit C9 ve C10), 174,79 (CH <sub>2</sub> COO).
<b>C2/K</b>	9,03, 14,33 (CH <sub>3</sub> ), 22,43, 22,55, 24,94 (oleik asit C3), 26,99 (oleik asit C8 ve C11), 28,95, 29,09, 29,29, 29,54 (oleik asit C4, 5, 6, 13, 14, 15, 17), 31,36, 31,74 (oleik asit 7, 12, 16), 34,13, 36,17, 36,35, 36,52 (oleik asit C2), 63,49, 63,68 (açık zincir riboz C5), 68,36, 68,91, 69,15, 69,35, 69,53 (açık zincir riboz C3 ve C4), 71,08, 72,32 (siklik riboz C5/açık zincir riboz C3 ve C4), 75,94 (siklik riboz C4), 83,28 (siklik riboz C2 ve C3/açık zincir riboz C2), 94,89, 101,84 (siklik riboz C1), 128,15, 130,01 (oleik asit C9 ve C10), 174,93 (CH <sub>2</sub> COO).
<b>Riboz</b>	94,14, 94,88, 96,60 ve 101,86 ( siklik riboz C-1), 83,28 ve 83,59 (siklik riboz C-2 ve C-3 / açık zincir riboz C-2), 75,94 (siklik riboz C-4), 70,63, 71,10, 71,26, 71,51 ve 72,31 (siklik riboz C-5/ açık zincir riboz C-3 ve C-4), 67,51, 68,51, 68,84, 69,68 ve 70,63 (açık zincir riboz C-3 ve C-4), 60,85, 62,20, 63,55 ve 63,70 (açık zincir riboz C-5).
<b>Oleik asit</b>	180,58 (C1), 34,18 (C2), 24,73 (C3), 29,14 (C4,5,6), 29,73 (C7,12), 27,24 (C8), 129,74 (C9), 130,03 (C10), 27,24 (C11), 29,40 (C13,15), 29,65 (C14), 31,99 (C16), 22,74 (C17), 14,12 (C18).

Şeker esterlerinde, karbohidrat ve yağ asidi pikleri dışında yer alan ester fonksiyonel grubuna ait karbon pikinin varlığı esterleşme tepkimesinin gerçekleşmiş olduğunu ifade eden en önemli ipucudur.

Karbon atomları arasında en güçlü perdelememe etkisi karbonil karbonlarında görülür. Karbonil grubu üzerinde elektron yoğunluğunu artıran her fonksiyonel grup, spektrumda sağa kaymaya neden olur. Esterdeki elektron yoğunluğu asit grubundakine

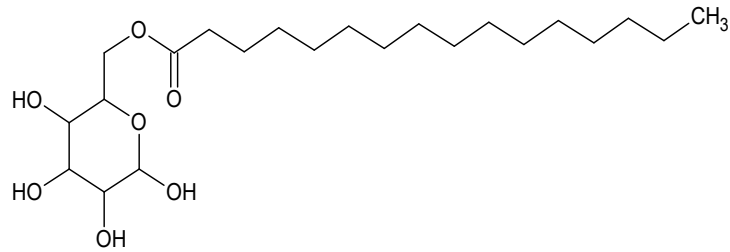
göre daha fazladır. Çünkü asit karbonili rezonansa uğrar; fakat ester grubunda rezonans durumu söz konusu değildir. Buna bağlı olarak asetik asitteki COOH karbonu 190,7 ppm'de,  $\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$  bileşiğinde altı çizili ester karbonunun ise 175,7 ppm'de görülmektedir (Erdik, 2007).

Bu çalışmada da beklentiler doğrultusunda, fruktoz, glukoz ve ribozillaurik-, oleik- ve palmitik asitlerin karbon NMR grafiklerinde asit ve alkol grupları yerini ester örneklerinde fonksiyonel ester grubuna bırakmaktadır.

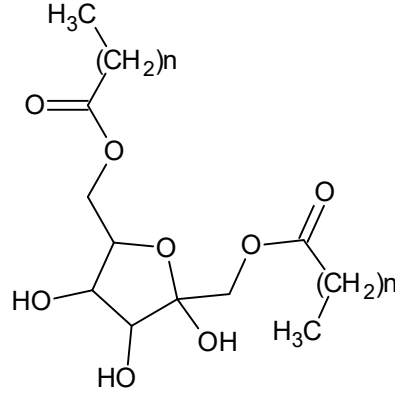
Laurik-, oleik-, ve palmitik asitlerde COOH grubunun karbonu 180-182 ppm aralığında yer alan kayma değerleri ile temsil edilmiştir (Tablolar 4.10, 4.11 ve 4.12). Örneklerde ise fonksiyonel ester grubuna ait karbon pikleri 174,79-175,85 ppm aralığında görülmüştür. Bu değerler ester bağının oluştuğuna dair en ikna edici kanıt olarak değerlendirilmiştir. Çünkü, aside ait yüksek rezonans pikleri (180-182 ppm), esterleşmeden dolayı beklentiler doğrultusunda yaklaşık 174-176 bandına gerilemiştir.

Şeker anomerleri kararsız yapılardır ve bu nedenle halka oksijenine komşu karbona ait 90-110 ppm aralığındaki pik her zaman görüntülenememektedir (Pappalardo ve ark., 2017).

Literatürde mevcut ve *Candida antarctica* lipazı ile sentezlenen bazı şeker esterlerine ait karbon pik değerleri ile ayrı bir tablo oluşturulmuştur (Tablo 4.13). Görüleceği üzere ester karbonu iki farklı çalışmada 173 ppm ile 175 ppm'de saptanmıştır (sırasıyla, Ren ve Lamsal, 2017; Arcos ve ark., 1998b). Birinci çalışmada ürün palmitoil glukopiranoz ve ikincisinde 1,6-diaçil-O-fruktofuranoz'dur.



6-O-Palmitoilglukopiranoz (Ren ve Lamsal, 2017)

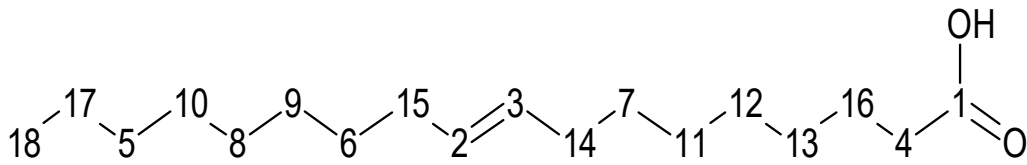


1,6-diaçil-O-fruktofuranoz (Arcos ve ark., 1998c)

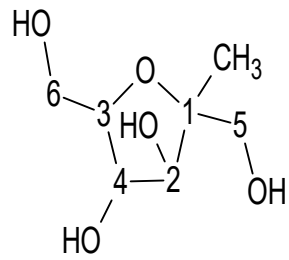
**Tablo 4.13** Literatürdeki bazı esterlerin önemli  $^{13}\text{C}$  NMR pikleri

Bileşik	$\text{CH}_2\text{COO}$ $\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\text{CH}_2\text{COO}$ $\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\text{CH}_3\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	Referans
6- <i>O</i> -palmitoilglukoz	33,7	173,0	14,1	Tsuzuki ve ark., 1998
6- <i>O</i> -palmitoilglukopiranoz	33,9	173,3	14,3	Ren ve Lamsal, 2017
5- <i>O</i> -palmitoil-L-(+)-arabinoz	64,6	173,2	14,3	Pappalardo ve ark.,2017
6- <i>O</i> -glukoz stearat	34,5	174,2	22,1	Yu ve ark., 2007
1,6-diaçil- <i>O</i> -fruktofuranoz	35,0	175,2	14,5	Arcos ve ark., 1998c

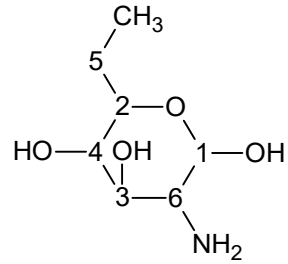
Yukarıda adı geçen bileşiklerin (Tablo 4.13)  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumlarındaki kimyasal kaymaları aşağıda ayrı bir tablo halinde verilen bulgulardan yararlanılmıştır (Tablo 4.14). Bu çalışmada yer alan şeker esteri örneklerinin NMR sonuçları da yine literatürde yer alan bazı benzer bileşiklerin  $^{13}\text{C}$ -NMR verileri dikkate alınarak değerlendirilmiştir. Bu bileşiklerin konfigürasyonları aşağıda verilmiş ve piklerin işaret ettiği karbon atomları ayrı bir tablo halinde sunulmuştur (Tablo 4.14).



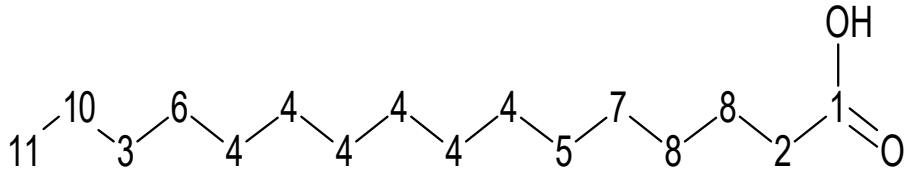
Oleik asit (SDBS, no:1035)



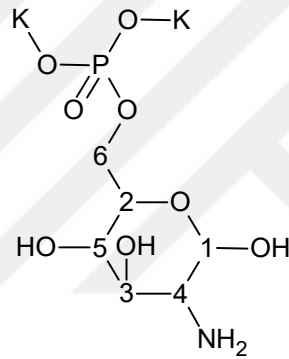
D-fruktoz (SDBS, no:1139)



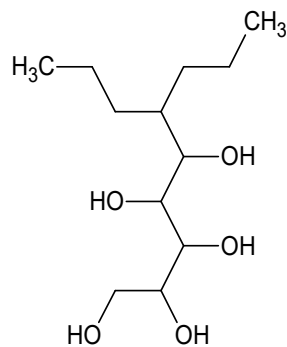
D-glukozamin (SDBS, no: 11562)



Hekzadekanoikasıit (SDBS, no:908)



D-glukoz 6-fosfat dipotasyum tuzu  
(SDBS, no:10390)



D-glukoz dietil ditiyoasetal  
(SDBS, no: 19644)



**Tablo 4.14** SDBS veritabanında yeralan bazı bileşiklere ait  $^{13}\text{C}$  pikleri

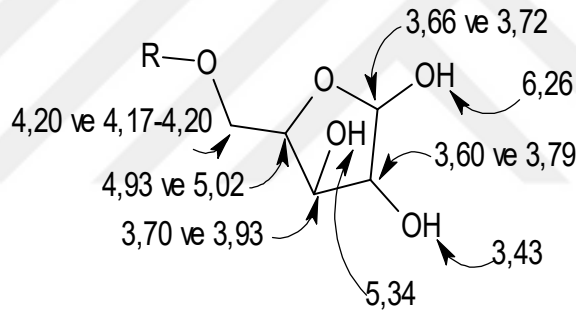
SDBS No:	Kimyasal Kayma Değerleri $\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1035	180,58 (C=O), 130,03, 129,74 (oleik asit C2 ve C3), 34,18 (oleik asit C4), 31,99 (oleik asit C5), 29,73, 29,65, 29,40, 29,14 (oleik asit C6-C13), 27,24 (oleik asit C14), 24,73 (oleik asit C16), 22,74 (oleik asit C17), 14,12 (oleik asit C18).
1139	104,01 (D-fruktoz C1), 82,79 (D-fruktoz C2), 80,76 (D-fruktoz C3), 75,67 (D-fruktoz C4), 63,60 (D-fruktoz C5), 60,94 (D-fruktoz C6).
908	180,58 (C=O), 34,23 (heksadekanoik asit C2), 32,05 (heksadekanoik asit C3), 29,81 (heksadekanoik asit C4), 29,57 (heksadekanoik asit C5), 29,49 (heksadekanoik asit C6), 29,37 (heksadekanoik asit C7), 29,21 (heksadekanoik asit C8), 24,80 (heksadekanoik asit C9), 22,79 (heksadekanoik asit C10), 14,14 (heksadekanoik asit C11).
11562	93,30 (D-glukozamin C1), 74,28 (D-glukozamin C2), 72,83 (D-glukozamin C3), 70,91 (D-glukozamin C4), 61,92 (D-glukozamin C5), 56,19 (D-glukozamin C6).
10390	94,35 (D-glukoz 6-fosfat dipotasyum C1), 76,99, 76,26 (D-glukoz 6-fosfat dipotasyum C4), 73,56 (D-glukoz 6-fosfat dipotasyum C2), 72,58 (D-glukoz 6-fosfat dipotasyum C3), 64,85 (D-glukoz 6-fosfat dipotasyum C5), 61,25, 61,15 (D-glukoz 6-fosfat dipotasyum C6).
19644	75,22 (D-glukozdietilditiyoasetal C1), 71,84 (D-glukozdietilditiyoasetal C2), 71,32 (D-glukozdietilditiyoasetal C3), 69,75 (D-glukozdietilditiyoasetal C4), 63,27 (D-glukozdietilditiyoasetal C5), 53,86 (D-glukozdietilditiyoasetal C6), 24,34, 24,28 (D-glukozdietilditiyoasetal C7 ve C8), 14,49, 14,38 (D-glukozdietilditiyoasetal C9 ve C10).

#### 4.4.2 $^1\text{H}$ -NMR verileri

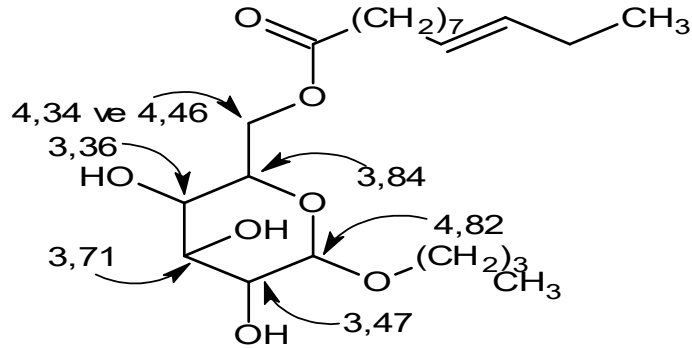
$^1\text{H}$ -NMR spektroskopisi, bir organik molekülün hidrojen atomları hakkında yapısal bilgi vermektedir. Bu çalışmada sentezlenen şeker ester örneklerinin  $^{13}\text{C}$ -NMR ile belirlenen molekül yapılarını teyit etmek için bir fruktozoleat örneği (9K, 6-O-fruktoz oleat) temsilen seçilmiştir. Elde edilen analiz sonuçları, proton kaymaları, bir tabloda sunulmuştur (Tablo 4.15). Bu sonuçları değerlendirmek için son yıllarda yapılan bazı benzer çalışmalar referans alınmıştır. Literatürde yer alan bu çalışmalarda söz konusu ürünlerin molekül yapıları ve  $^1\text{H}$ -NMR pik değerleri ve bu değerlerin atanmasına ilişkin sonuçlar bir tablo haline getirilmiştir (Tablo 4.16). Aşağıda görüleceği üzere, fruktoz oleat 9K'nın proton dağılımı, literatür bulgularındaki proton kayma değerlerine benzerlik göstermiştir (Tablo 4.15; Tablo.4.16, bileşikler: SDBS 1035, SDBS 12652, ve SDBS 2549). Bu analizde en çarpıcı bulgu, 10-14 ppm'de bir pik ile ifade edilen COOH protonunun 9K fruktoz oleat örneğinde görülmemesidir (Balcı, 2011).

**Tablo 4.15** Bir fruktoz oleat örneğinin (9K)  $^1\text{H-NMR}$  sonuçları

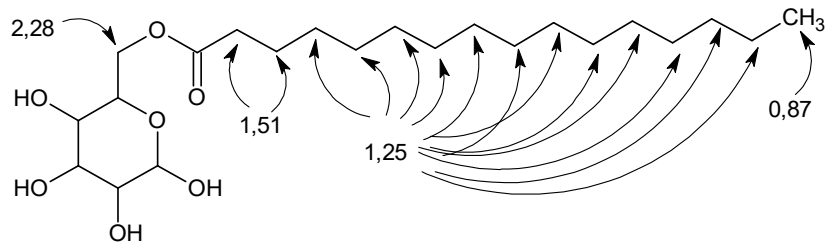
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) $\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	
Fruktoz	9K
C2, C3, C4	2,49-2,50 (m, 3H)
C6	2,40 (s, 2H)
$\text{CH}_2\text{-O-CO}$	3,26 (s, 2H)
OH	4,18 (s, 4H)
Oleik asit	
C2	2,16 (t, 2H, $J=7,32$ Hz)
C3	1,48 (t, 2H, $J=6,83$ Hz)
C4, 6, 13, 14	1,23 (s, 8H)
C5, 7, 12, 15, 16, 17	1,14 (s, 12H)
C9, C10	5,31 (t, 2H, $J=4,39$ Hz)
$\text{CH}_3$	0,86 (t, 3H, $J=4,40$ Hz)



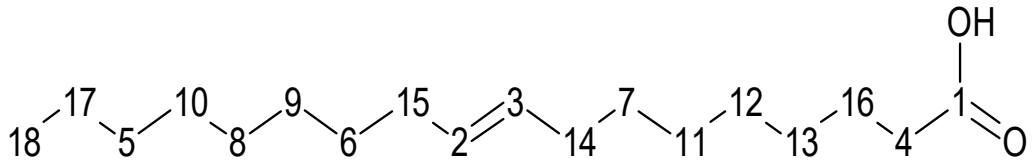
5-*O*-palmitoil-L-(+) arabinoz (Pappalardo ve ark.,2017)



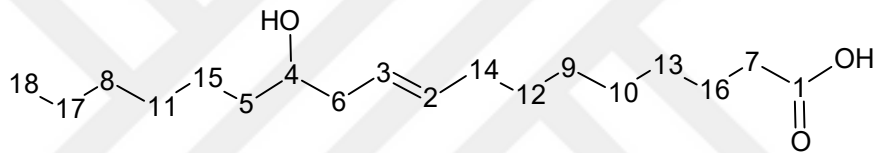
$\alpha$ -butilglukozidoleat (Bousquet ve ark., 1998)



6-*O*-palmitoilglukopiranoz (Ren ve Lamsal, 2017)

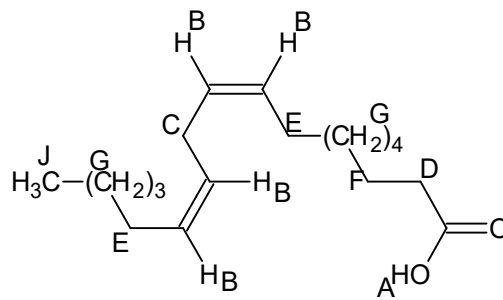


Oleik asit (SDBS, no:1035)



(*R*-(*Z*))-12-hidroksi-9-oktadekenoik asit

(SDBS, no:12652)



*cis,cis*-9,12-octadecadienoyik asit

(SDBS, no:2549)

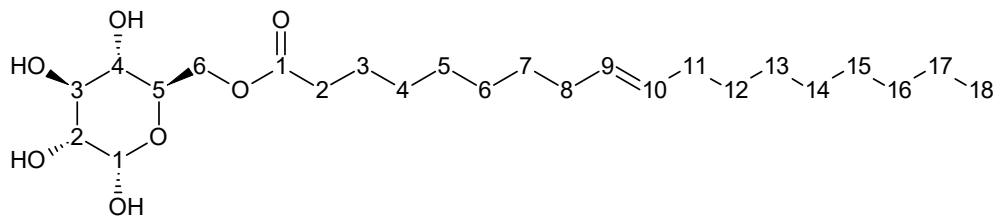
**Tablo 4.16** SDBS veritabanında yer alan bazı bileşiklerin proton kayma değerleri

SDBS No:	<sup>1</sup> H Kayma Değerleri (δ,ppm)
1035	5,34 (2H, oleik asit C2, 3-H), 2,344 (2H, oleik asit C4-H), 2,011 (2H, oleik asit C14-H), 1,631 (2H, oleik asit C16-H), 1,35 (2H, oleik asit C13-H), 1,31 (6H, oleik asit C7, 11, 12-H), 1,27 (10H, oleik asit C9, 8, 10, 5, 17-H), 0,879 (3H, oleik asit C18-H).
2549	11,0 (1H, cis, cis-9,12-octadecadienoyik asit CA-H), 5,58, 5,12 (4H, cis, cis-9,12-octadecadienoyik asit CB-H), 2,764 (2H, cis, cis-9,12-octadecadienoyik asit CC-H), 2,33 (2H, cis,cis-9,12-octadecadienoyik asit CD-H), 2,03 (4H, cis,cis-9,12-octadecadienoyik asit CE-H), 1,63 (2H, cis,cis-9,12-octadecadienoyik asit (CF-H), 1,10, 1,53 (14H, cis, cis-9,12-octadecadienoyik asit CG-H), 0,90 (3H, cis,cis-9, 12-octadecadienoyik asit CJ-H).
12652	6,5 (1H, R-(Z))-12-hidroksi-9-oktadekenoik asit C4-OH), 5,535 (1H, R-(Z))-12-hidroksi-9-oktadekenoik asit C2-H), 5,396 (1H, R-(Z))-12-hidroksi-9-oktadekenoik asit C3-H), 3,639 (1H, R-(Z))-12-hidroksi-9-oktadekenoik asit C4-H), 2,328 (2H, R-(Z))-12-hidroksi-9-oktadekenoik asit C7-H), 2,216 (2H, R-(Z))-12-hidroksi-9-oktadekenoik asit C6-H), 2,033 (2H, R-(Z))-12-hidroksi-9-oktadekenoik asit C14-H), 1,623 (2H, R-(Z))-12-hidroksi-9-oktadekenoik asit C16-H), 1,465 (2H, R-(Z))-12-hidroksi-9-oktadekenoik asit C5-H), 1,31 (16H, R-(Z))-12-hidroksi-9-oktadekenoik asit C8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 17-H), 0,883 (3H, R-(Z))-12-hidroksi-9-oktadekenoik asit C18-H).

#### 4.4.3 HSQC verileri

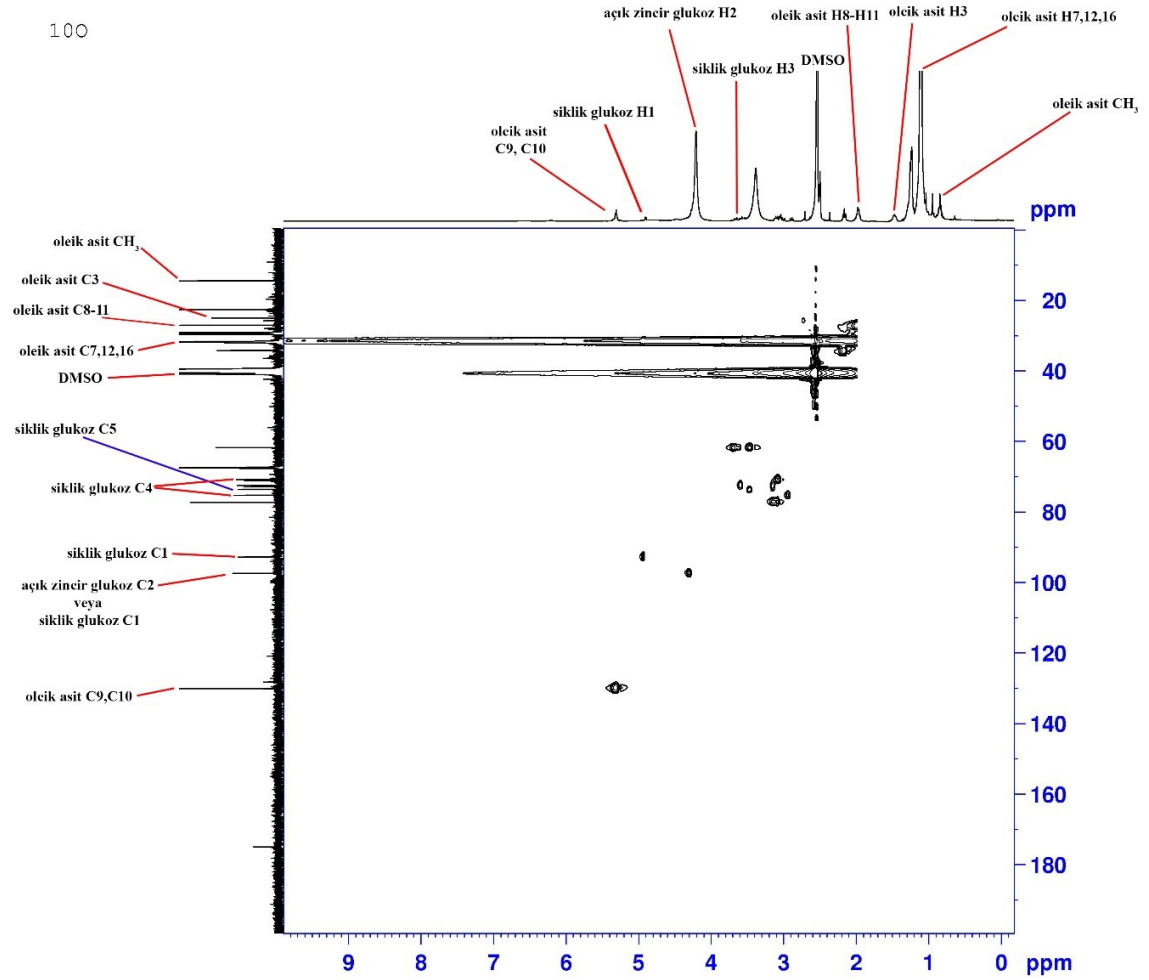
<sup>1</sup>H-NMR ve <sup>13</sup>C-NMR sonuçlarını bir başka yöntemle desteklemek amacıyla bir ester örneği seçilerek HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) analizine tabi tutulmuştur. HSQC temelde, <sup>1</sup>H-NMR ve <sup>13</sup>C-NMR analizi sonuçlarının iki boyutlu bir grafik üzerinde çakıştırılmasından ibarettir. İki ekseninde yer alan karşılıklı değerlerin kesişim noktaları hidrojen bağlayan karbon atomlarının saptanmasını sağlamaktadır.

<sup>1</sup>H-NMR spektrumlarını <sup>13</sup>C-NMR spektrumları ile ilişkilendirerek desteklemek ve şeker ester bileşiklerinin yapılarını kanıtlamak amacıyla prototip olarak seçilen glukoz oleat 10Ö bileşiğine tek bağ <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C ilişkilerini gösteren HSQC deneyi uygulanmıştır.



D-Glukoz + Oleik asit

174,77 ppm'deki ester grubuna ait olduğu düşünölen C atomu HSQC spektrumunda herhangi bir etkileşim göstermemiştir. Bu veri  $^{13}\text{C}$ -NMR'da 174,77 ppm'de gözlenen pikin ester fonksiyonel grubuna ait olan C atomuna ait olduğunu kanıtlamaktadır.



Şekil 4.1 Bileşik 100'nün HSQC spektrumu (0-180 ppm).

**Tablo 4.17** Bileşik 10Ö'nün proton taşıyan <sup>13</sup>C-NMR (HSQC) verileri

Karbon konumu	δ ppm
CH <sub>2</sub> COO	174,77
oleik asit C-9 ve 10	128,17 ve 130,02
açık zincir glukoz C2	97,34
siklik glukoz C-1	92,66
siklik glukoz C-4	77,19 ve 70,72
siklik glukoz C-3	73,52
oleik asit C-7, 12, 16	31,35
oleik asit C8-11	27,01
oleik asit C-3	25,64 ve 24,95
oleik asit CH <sub>3</sub>	14,36

Buraya kadar verilen bilgilerden, tez projesi kapsamında bir çok şeker esterinin üretildiği ve bunların doğru karakterizasyonu için gerekli ve imkanlar dahilinde tüm yöntemlerin kullanıldığı söylenebilir. Bu çalışmayı orijinal kılan asıl sonuç, **K** ile simgelenen kontrol örneklerinde ester sentezinin %100'e yakın bir verimde ve enzimatik yöntemle sentezlenen ester örnekleri ile aynı konfigürasyonda üretilebilmiş olmasıdır. Bu bilgi literatürde mevcut değildir. Çoğu benzer araştırma, kontrol örneklerinde herhangi bir ester ürüne rastlanmadığı doğrultusunda bulgu ifadeleri içermektedir. Bu çalışma bir yandan kontrol deneylerinin tekrarlanması gerektiğini düşündürürken bir yandan da ticari enzimlerin şeker esterlerinin sentezindeki rolünü tartışılır hale getirmiştir.

#### 4.5 Organik Ortamlarda Şeker Çözünürlüğü

Fruktoz, glukoz ve riboz farklı organik ortamlarda ve 25 °C ve 55 °C'de benzer çözünürlük özellikleri göstermektedir (Tablo 4.18). Sıcaklık arttıkça çözünürlük de artmaktadır. Bu nedenle, yüksek tepkime sıcaklıklarının, çözülmüş şeker miktarına

bağlı olarak, tepkime hızını artırması beklenir (Arcosa ve ark., 1998a). Denemeler sonunda en uygun çözücünün DMSO-TBU ve DMSO-2M2B olduğuna karar verilmiştir. Dimetilsülfoksit 10 ml’de yaklaşık 3 g şeker çözebilmektedir. Sentez tepkimelerinde DMSO şeker çözücü olarak ve mümkün olduğu kadar en düşük oranda kullanılmıştır. Çünkü enzim aktivitesini inhibe etmektedir. TBU ve 2M2B şeker çözmemekle birlikte, enzim aktivitesini korudukları ve DMSO ile faz oluşturmadıkları için seçilmiştir. Şeker esteri sentez tepkimeleri 55 °C’de yapılmıştır.

**Tablo 4.18** Fruktoz, glukoz ve ribozun organik ortamlarda çözünürlüğü

Çözücü	D-Glukoz	D-Fruktoz	D-Riboz
DMSO	+	+	+
2M2B	-	-	+
TBU	-	-	+
Hekzan	-	-	-
Piridin	+	+	+
Etanol	-	-	+
Metanol	+	+	+
Kloroform	-	-	-
Aseton	-	-	-
Asetonitril	-	-	-
Dietil eter	-	-	-
Petrol eter	-	-	-
dH <sub>2</sub> O	+	+	+
Diklormetan	-	-	-
DMF	+	+	+
THF	-	-	-

**Tablo 4.19** Sentezlenen şeker esterlerin çözünürlüğü

Çözücü	Şeker esteri (ürün)
DMSO	+
Hekzan	+
Etanol	+
Aseton	+
dH <sub>2</sub> O	+
Diklormetan	-
THF	-

## **Öneri**

1. Şeker ve yağ asidini tek bir omurga olarak kullanıp, şeker birimini amino asit, asetil, fosfat, karboksil ve sülfat, gibi fonksiyonel gruplarla zenginleştirerek yüksek ve kontrol edilebilir biyolojik aktiviteye sahip bileşikler üretilebilir.
2. Prokaryotlar tarafından üretilen ikincil nesil antibiyotik olabilme özellikleri taşıyan ikincil metabolitlerin analogları sentezlenebilir.





## KAYNAKÇA

- Aaltonen O. ve Rantakylä, M.** (1991). Biocatalysis in supercritical CO<sub>2</sub>. *Chemtech*, 240-248.
- Abramic, M., Lescic, I., Korica, T., Vitale, L., Saenger, W. ve Pigac, J.** (1999). Purification and properties of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 522-529.
- Adelhorst, K., Bjorkling, F., Godtfredsen, S. ve Kirk, O.** (1990). Enzyme catalyzed preparation of 6-*O*-acylglucopyranosides. *Synthesis*, 2, 112-115.
- Akoh, C.C.** (1994). Synthesis of carbohydrate fatty acid polyesters. Carbohydrate polyesters as fat substitutes. Akoh, C. C. ve Swanson, B. G. (Eds.), *Marcel Dekker, Inc.*, 9-37s, New York.
- Aldercreutz, P. ve Mattiasson B.** (1987). Aspects of biocatalyst stability in organic solvents. *Biocatalysis*. 1, 99.
- Anderson, E. ve Hahn-Hagerdal, B.** (1990). Bioconversions in aqueous two-phase systems. *Enzyme Microb. Technol.*, 12, 242-254.
- Arcos, J. A., Bernabé, M. ve Otero, C.** (1998a). Quantitative enzymatic production of 6-*O*-acylglucose esters. *Biotechnol Bioeng*, 57, 505-509.
- Arcos, J. A., Bernabé, M. ve Otero, C.** (1998b). Different strategies for selective monoacylation of hexoaldoses in acetone. *Journal of Surfactants and Detergents*, 1, 345-352.
- Arcos, J. A., Bernabé, M. ve Otero, C.** (1998c). Quantitative enzymatic production of 1,6=diacylfructofuranoses. *Enzyme and Microbial Technology*, 22, 27-35.
- Awouafack, M.D., McGaw, L.J., Gottfried, S., Mbouangouere R., Tane, P., Spiteller, M. ve Eloff, J.N.** (2013). Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of the Ethanol Extract, Fractions and Eight Compounds Isolated from *Eriosema robustum* (Fabaceae). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13, 289.
- Balci, M.** (2011). *Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi*. Ankara, TR: ODTÜ Yayıncılık. 36.
- Baykut, S., Biran, M.** (1996). Yüzey Aktif Maddeler ve Fizikokimyası. *İstanbul Üniversitesi Yayınları*, 3385.
- Bell, G., Halling, P. J., Moore, B. D., Partidge, J. ve Rees, D. G.** (1995). Biocatalyst behaviour in low-water systems. *Trends Biotechnol.*, 13, 468-473.
- Berridge MV, Herst PM, Tan AS.** (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev.*, 11, 127-52.
- Björkling, F., Godtfredsen, S. E. ve Kirk, O.** (1989). A highly selective enzyme catalysed esterification of simple glucosides. *J Chem Soc Chem Commun*, 934-935.
- Björkling, F., Godtfredsen, S.E. ve Kirk, O.** (1991). The future impact of industrial lipases. *Trends Biotechnol*, 9, 360-363.

- Blow, D.M., Birktoft, J.J. ve Hartley, B.S.** (1969). Role of buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. *Nature*, 221, 337-340.
- Boel, E., Høge-Jensen, B., Christens, M., Thim, L. ve Fiil, N. P.** (1988). *Rhizomucor miehei* triglyceride lipase is synthesized as a precursor. *Lipids*, 23, 701-706.
- Boland, W., Fröbl, C. ve Lorenz, M.** (1991). Esterolytic and lipolytic enzymes in organic synthesis. *Synthesis*, 1049-1072.
- Bone, S.** (1987). Time-domain reflectometry studies of water binding and structural flexibility in chymotrypsin. *Biochim. Biophys. Acta.*, 916, 128-134.
- Borgström, B. ve Brockman, H. L.** (1984). Lipases. *Elsevier*, 500s, Amsterdam.
- Bousquet, M. P., Willemot, R. M., Monsan, P. ve Boures, E.** (1998). Enzymatic synthesis of unsaturated fatty acid glucoside esters for dermocosmetic applications. *Biotechnol Bioeng.*, 3, 730–736.
- Brady, L, Brzozowski, A.M., Derewenda, Z.S., Donson, E., Donson, G., Tolley, S., Turkenburg, J.P., Christiansen, L., Høge-Jensen, B., Nørskov, B., Thim, L. ve Menge, U.** (1990). A serine protease triad forms the catalytic centre of a triglyceride lipase. *Nature*, 343, 767-770.
- Bruno, L. M., Pinto, G. A. S., Castro, H. F., Lima-Filho, J. L. ve Melo, E. H. M.** (2004). Variables that affect immobilization of *Mucor miehei* lipase on nylon membrane. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 20, 371-375.
- Bruno, L. M., Coelho, J. S., Melo, E. H. M. ve Lima-Filho, J. L.** (2005). Characterization of *Mucor miehei* lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic particles. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21, 189-192.
- Brzozowski, A. M., Derewenda, U., Derewenda, Z. S., Dodson, G. G., Lawson, D. M., Turkenburg, J. P., Bjorkling, F., Høge-Jensen, B., Patkar, S. S. ve Thim, L.** (1991). A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature*, 351, 491-494.
- Büyüksırt, T. ve Kuleaşan, H.** (2014). Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (IR) Spektroskopisi ve gıda analizlerinde kullanımı. *Gıda Dergisi*, 39, 235-241.
- Carrea, G.** (1984). Biocatalysis in water-organic solvent two-phase systems. *Trends Biotechnol.*, 2, 102-106.
- Carrea, G., Ottolina, G. ve Riva, S.** (1995). Role of solvent in the control of enzyme selectivity in organic media. *Trends Biotechnol.*, 13, 63–70.
- Casa, R. M., Guisán, J. M., Sánchez-Montero, J. M. ve Sinisterra, J.V.** (2002). Modification of the activities of two different lipases from *Candida rugosa* with dextrans. *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 30–40.
- Chi, Y.M., Nakamura, K. ve Yano, T.** (1988). Enzymatic interesterification in supercritical carbon dioxide. *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1541.
- Chulalaksananukul, W., Condoret, J.S. ve Combes, D.** (1993). Geranyl acetate synthesis by lipase-catalyzed transesterification in supercritical carbon dioxide. *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 691-698.

- Clark, D.S.** (1994). Can immobilization be exploited to modify enzyme activity? *Trends Biotechnol.*, 12, 439-443.
- Clint, J. H.** (1992). Surfactant Aggregation. *Springer Netherlands*, 283s, Dodrecht.
- Colaco, C. A. L. S., Collett, M. ve Roser, B. J.** (1996). Pharmaceutical formulation instability and the Maillard reaction. *Chimica Oggi*, 14, 32-37.
- Coleman, M. H. ve Macrae, A. R.** (1980). Fat process and composition. *US Patent* 1577933.
- Cooke, R. ve Kuntz, I. D.** (1974). The properties of water in biological systems. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 3, 95-126.
- Cortés-Sánchez, A. J., Hernández-Sánchez, H. ve Eugenia Jaramillo-Flores, M.** (2013). Biological activity of glycolipids produced by microorganisms: New trends and possible therapeutic alternatives. *Microbiological Research*, 168, 22-32.
- Costas, L., Bosio, V.E., Pandey, A. ve Castro, G.R.** (2008). Effects of organic solvents on immobilized lipase in pectin microspheres. *Appl Biochem Biotechnol*, 151, 578-586.
- Cotterill, I. C., Sutherland, A. G., Roberts, S. M., Grobbauer, R., Spreitz, J. ve Faber, K.** (1991). Enzymatic resolution of sterically demanding bicyclo [3.2.0] heptanes: evidence for a novel hydrolase in crude porcine pancreatic lipase and the advantages of using organic media for some of the biotransformations. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1, 1365.
- Dalmau, E., Montesinos, J. L., Lotti, M. ve Casas, C.** (2000). Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 657-663.
- Degn, P., Pedersen, L. H., Duus, J. Ø. ve Zimmermann, W.** (1999). Lipase-catalysed synthesis of glucose fatty acid esters in *tert*-butanol. *Biotechnol Lett*, 21, 275–280.
- Degn, P., Zimmermann, W.** (2001). Optimization of carbohydrate fatty acid ester synthesis in organic media by a lipase from *Candida antarctica*. *Biotechnology and Bioengineering*, 74, 483–491.
- Dewar, M. J. S.** (1986). New ideas about enzyme reactions. *Enzyme*, 36, 8.
- Douzou, P.** (1977). Cryobiochemistry. An introduction. *Academic Press*, 286s, Londra.
- Drauz, K. ve Waldmann, H.** (1995). Enzyme catalysis in organic synthesis: A comprehensive handbook. *Wiley-VCH*, 1500s, Weinheim.
- Ducret, A., Giouroux, A., Trani, M. ve Lortie, R.** (1995). Enzymatic preparation of biosurfactants from sugars or sugar alcohols and fatty acids in organic media under reduced pressure. *Biotechnol Bioeng.*, 48, 214–221.
- Ducret, A., Trani, M. ve Lortie, R.** (1998). Lipase-catalysed enantioselective esterification of ibuprofen in organic solvents under controlled water activity. *Enz Microb Technol.*, 22, 212–216.
- Eloff, J. N.** (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimum inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Plant. Med.*, 64, 711-713.

- Erdik E.** (2007). *Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler*. Ankara, TR: Gazi Kitabevi. 342-343.
- Erdik, E.** (2015). *Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler*. Ankara, TR: Gazi Kitabevi. 183.
- Faber, K.** (1997). Biotransformations in organic chemistry. A textbook, third edition, *Springer-Verlag*, 402s, Berlin.
- Ferrer, M., Cruces, M. A., Bernabe, M., Ballesteros, A. ve Plou, F. J.** (1999). Lipase catalysed regioselective acylation of sucrose in two-solvent mixtures. *Biotechnol Bioeng.*, 65, 10–16.
- Ferrer, M., Cruces, M. A., Plou, F. J., Bernabe, M. ve Ballesteros, A.** (2000). A simple procedure for the regioselective synthesis of fatty acid esters of maltose, leucrose, maltotriose and n-dodecyl maltosides. *Tetrahedron*, 56, 4053–4061.
- Ferrer, M., Soliveri, J., Plou, F. J., López-Cortés, N., Reyes-Duarte, D., Christensen, M., Copa-Patiño, J. S. ve Ballesteros, A.** (2005). Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Candida antarctica* B, and their antimicrobial properties. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 391–398.
- Fletcher, A.** (1992). Biosurfactants moving towards industrial application. *Trend Biotechnol.*, 10, 208-217.
- Fink, A. L., Cartwright, S. J. ve Douzou, P.** (1981). Cryoenzymology. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 11, 145-207.
- Freeman, A.** (1984). Understanding enzyme stabilization. *Trends Biotechnol.* 2, 147-148.
- Frykman, H., Ohmer, N., Norin, T. ve Hult, K.** (1993). S-ethyl thiooctanoate as acyl donor in lipase catalysed resolution of secondary alcohols. *Tetrahedron Lett.*, 34, 1367-1370.
- Godfrey, T. ve Reichelt, J.** (1996). Industrial enzymology: The application of enzymes in industry. *Nature Press*, 582s, Macmillan, New York.
- Gotor, V., Brieva, R. ve Rebolledo, F.** (1988). A simple procedure for the preparation of chiral amides. *Tetrahedron Lett.*, 29, 6973-6974.
- Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J. D., Bouthillier, F., Smith, P., Harrison, D., Rubin, B. ve Cygler, M.** (1993). Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *J Biol.Chem.* ,268, 12843-12847.
- Gutman, A. L. ve Bravdo, T.** (1989). Enzyme-catalyzed enantioconvergent lactonization of  $\gamma$ -hydroxy diesters in organic solvents. *J. Org. Chem.*, 54, 4263-4265.
- Ha, S., Hiep, N., Lee, S. ve Koo, Y. M.** (2010). Optimization of lipase-catalyzed glucose ester synthesis in ionic liquids. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 33, 63–70.
- Halling, P. J.** (1989). Organic liquids and biocatalysts: theory and practice. *Trends Biotechnol.*, 7, 50-52.

- Halling, P. J.** (1994). Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: Theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis. *Enz Microb Technol.*, 16, 178–206.
- Hammond, D. A., Karel, M., Klibanov, A. M. ve Krukoniš, V.** (1985). Enzymatic reactions in supercritical gases. *J. Appl. Biochem. Biotechnol.*, 11, 393-400.
- Hartley, B.S. ve Kauffman, D. L.** (1966). Addendum: Corrections to the amino acid sequence of bovine chymotrypsinogen A. *Biochem J.*, 101, 229-231.
- Hass, H. B., Summit, N. J., Snell, F. D. ve Osipow, L. J.** (1959). Process for producing sugar esters, *US Patent 2*, 893,990.
- Heldt-Hansen, H. P., Ishii, M., Patkar, S. A., Hansen, T. T. ve Eigtved, P.** (1989). Biocatalysis in Agricultural Biotechnology. ACS Symposium Series 389, **Whitaker, J. R. ve Sonnet, P. E.** (Ed.), *American Chemical Society*, 157-172, Washington DC.
- Hess, G.P.** (1971). In Boyer, P. D. (ed): *The Enzymes*, vol 3, 3rd ed. *Academic Press*, 213p, New York.
- Hjorth, A., Carriere, F., Cudrey C., Woldike, H., Boel, E., Lawson, D. M., Ferrato, F., Cambillau, C. ve Donson, G. G.** (1993). A structural domain (the lid) found in pancreatic lipases is absent in the guinea pig (phospho) lipase. *Biochemistry*, 32, 4702-4707.
- Hsu, S. H., Wu, S. S., Wang, Y. F. ve Wong, C. H.** (1990). Lipase-catalyzed irreversible transesterification using enol esters: XAD-8 immobilized lipoprotein lipase-catalyzed resolution of secondary alcohols. *Tetrahedron Lett.*, 31, 6403-6406.
- Ikeda, I. ve Klibanov, A. M.** (1993). Lipase-catalyzed acylation of sugars solubilized in hydrophobic solvents by complexation. *Biotechnol. Bioeng.*, 42, 788-791.
- Inagaki, T. ve Ueda, H.** (1987). Enantioselective esterification of racemic terpene alcohols with fatty acids by *Pseudomonas* sp. NOF-5 Strait. *Agric. Biol. Chem.*, 51, 1345-1348.
- Jaeger, K. E. ve Reetz, M. T.** (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 16, 396-403.
- Jansen, E. F. ve Balls, A. K.** (1952). The inhibition of  $\beta$ - and  $\gamma$ -chymotrypsin and trypsin by diisopropyl fluorophosphate. *J Biol Chem.*, 194, 721.
- Janssen, A. E. M., Sjursen, B. J., Vakurov, A. V. ve Halling, P. J.** (1999). Kinetics of lipase-catalyzed esterification in organic media: correct model and solvent effect on parameters. *Enz Microb Technol.*, 24, 463–470.
- Kabsch, W. ve Sander, C.** (1983). Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, 22, 2577-2637.
- Kamat, S.V., Beckman, E. J. ve Russell, A. J.** (1993). Control of enzyme enantioselectivity with pressure changes in supercritical fluororoform. *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 8845.
- Karplus, M.** (2002). Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Acc Chem Res.*, 35, 321.

- Kasche, V., Schlothauer, R. ve Brunner, G.** (1988). Enzyme denaturation in supercritical CO<sub>2</sub>: Stabilizing effect of S-S bonds during the depressurization step. *Biotechnol. Lett.* 10, 569-574.
- Kazandjian, R. Z. ve Klibanov, A. M.** (1985). Regioselective oxidation of phenols catalyzed by polyphenol oxidase in chloroform. *J. Am. Chem. Soc.* 107, 5448-5450.
- Kazlauskas, R. J. ve Bornscheuer, U. T.** (1998). Biotransformations with lipases. *Biotechnology*, vol. 8a: Biotransformations I. **Kelly, D. R. ve Rehm, H-J.** (Eds.) Wiley-VCH. 37-191s, Weinheim.
- Ke, T. ve Klibanov, A. M.** (1999). Markedly enhancing enzymatic enantioselectivity in organic solvents by forming substrate salts. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 3334-3340.
- Kitagawa, M., Takegami, S. ve Tokiwa, Y.** (1998). Free-radical polymerization of a reducing vinyl sugar ester in dimethylformamide and water. *Macromolecular Rapid Communications*, 19, 155-158.
- Kitaguchi, H., Fitzpatrick, P. A., Huber, J. E. ve Klibanov, A. M.** (1989). Enzymic resolution of racemic amines: crucial role of the solvent. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 3094-3095.
- Kitaguchi, H. ve Klibanov, A. M.** (1989). Enzymic peptide synthesis via segment condensation in the presence of water mimics. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 9272-9273.
- Klapper, M. H.** (1971). On the nature of the protein interior. *Biochim Biophys Acta*, 229, 557-566.
- Konychev, A., Heep, M., Moritz, R. K. C., Kreuter, A., Shulutko, A., Fierlbeck, G., Bouylout, K., Pathan, R., Trostmann, U. ve Chaves, R. L.** (2013). Safety and efficacy of daptomycin as first-line treatment for complicated skin and soft tissue infections in elderly patients: an open-label, multicentre, randomized phase IIIb trial. *Drugs Aging*, 30, 829-836.
- Koshiro, S., Sonomoto, K., Tanaka, A. ve Fukui, S.** (1985). Stereoselective esterification of *dl*-menthol by polyurethane-entrapped lipase in organic solvent. *J. Biotechnol.*, 2, 47-57.
- Koshland, D. E. ve Neet, K. E.** (1968). The catalytic and regulatory properties of enzymes. *Annu Rev Biochem.*, 37, 359-411.
- Ku, M. A. ve Hang, Y. D.** (1995). Enzymatic synthesis of esters in organic medium with lipase from *Byssochlamys fulva*. *Biotechnol Lett.*, 17, 1081-1084.
- Kuete, V.** (2010). Potential of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: a review. *Planta Med.*, 76, 1479-1491.
- Kullman, W.** (1987). Enzymatic peptide synthesis, *CRC Press*, Boca Raton, FL.
- Krishna, H. S. ve Karanth, N. G.** (2002). Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in nonaqueous media. *Catal Rev.*, 44, 499-591.
- Laane, C., Boeren, S., Hilhorst, R. ve Veeger, C.** (1987). Optimization of biocatalysts in organic media. *Biocatalysis in Organic Media*. **Laane, C., Tramper, J. ve Lilly, M. D.** (Eds.). *Elsevier*, 65s, Amsterdam.

- Laane, C., Boeren, S., Vos, K. ve Veeger, C.** (1987). Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 81-87.
- Lakowicz, J.R. ve Weber, G.** (1973). Quenching of protein fluorescence by oxygen. Detection of structural fluctuations in proteins on the nanosecond time scale. *Biochemistry*, 21, 4171-4179.
- Langrand, G., Baratti, J., Buono, G. ve Triantaphylides, C.** (1986). Lipase catalyzed reactions and strategy for alcohol resolution. *Tetrahedron Lett.*, 27, 29-32.
- Laumen, K., Seemayer, R. ve Schneider, M. P.** (1990). Enzymic preparation of enantiomerically pure cyclohexanols: Ester synthesis by irreversible acyl transfer. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 49-51.
- Lilly, M. D.** (1982). Two-liquid-phase biocatalytic reactions. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 32, 162-169.
- Ljunger, G., Adlercreutz, P. ve Mattiasson, B.** (1994). Lipase catalyzed acylation of glucose. *Biotechnol Lett.*, 16, 1167-1172.
- Ogston, A. G.** (1948). Interpretation of experiments on metabolic processes, using isotopic tracer elements. *Nature*, 162, 963.
- Makita, A., Nihira, T. ve Yamada, Y.** (1987). Lipase catalyzed synthesis of macrocyclic lactones in organic solvents. *Tetrahedron Lett.*, 28, 805-808.
- Margolin, A. L., Fitzpatrick, P. A. ve Klibanov, A. M.** (1991). Chemoenzymic synthesis of optically active (meth)acrylic polymers. *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 4693-4694.
- Martinez, C., DeGeus, P., Lauwereys, M., Matthysens, G. ve Cambillau, C.** (1992). *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. *Nature*, 356, 615-618.
- Marty, A., Chulalaksananukul, W., Condoret, J. S., Willemot, R. M. ve Durand, G.** (1990). Comparison of lipase-catalysed esterification in supercritical carbon dioxide and in n-hexane. *Biotechnol. Lett.*, 12, 11-16.
- Mattson, A., Ohmer, N., Hult, K. ve Norin, T.** (1993). Resolution of diols with C2-symmetry by lipase catalysed transesterification. *Tetrahedron Asymm.*, 4, 925-930.
- Mejri, M., Pauthe, E., Larreta-Garde, V. ve Mathlouthi, M.** (1998). Effect of polyhydroxylic additives on the catalytic activity of thermolysin. *Enzyme Microb. Technol.*, 23, 392-396.
- Mesiano, A. J., Beckman, E. J. ve Russell, A. J.** (1999). Supercritical biocatalysis. *Chem. Rev.*, 99, 623-634.
- Michiyo, M.** (1989). Purification of a thermostable, nonspecific lipase from *Candida* and its use in transesterification. WO Patent 8802775, 1986. *Chem. Abstr.* 110, 20529.
- Micklefield, J.** (2004). Daptomycin Structure and Mechanism of Action Revealed. *Chemistry & Biology*, 11, 887-895

- Morrow, C. J. ve Wallace, J. S.** (1990). Synthesis of polyesters by lipase-catalysed polycondensation in organic media. Biocatalysis. **Abramowicz, D. A.** (ed), *Van Nostrand Reinhold*, 2p, New York.
- Mutua, L. N. ve Akoh, C. C.** (1993). Synthesis of alkyl glycoside fatty acid esters in nonaqueous media by *Candida* sp. lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 70, 43–46.
- Nakamura, K.** (1990). Biochemical reactions in supercritical fluids. *Trends Biotechnol.*, 8, 288-292.
- Nelson, D.L. ve Cox, M.M.** (2013). Carbohydrates and Glycobiology. Lehninger Principle of Biochemistry. **Freeman, W. H.** (ed.), 1198s, New York.
- Neta, N., Santos, J., Sancho, S., Rodrigues, S., Gonçalves, L., Rodrigues, L. R. ve Teixeira, J. A.** (2012). Enzymatic synthesis of sugar esters and their potential as surface-active stabilizers of coconut milk emulsions. *Food Hydrocolloids*, 27: 324-331.
- Nishikawa, M., Yoshimoto, K., Nishijama, M., Fukuoka, F. ve Ikekawa, T.** (1981). Chemical and biochemical studies of carbohydrate esters, IV. Antitumor effect of selectively fatty acylated products of maltose. *Chem Pharm Bull*, 29, 505–513.
- Noble, M. E. M., Cleasby, A., Johnson, L. N., Egmond, M. R. ve Frenken, L. G. J.** (1993). The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. *FEBS Lett.*, 331, 123-128.
- Nthangeni, M. B., Patterton, H. G., Tonder, A., Vergeer, W. P. ve Litthauer, D.** (2001). Overexpression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: a comparative report on *Bacillus* lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 28, 705-712.
- Okamoto, T. ve Ueji, S.** (1999). Drastic enhancement of the enantioselectivity of lipase-catalysed esterification in organic solvents by the addition of metal ions. *Chem. Commun.*, 939-940.
- Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I. ve Schrag, J.** (1992). The  $\alpha$ -hydrolase fold. *Protein Eng.*, 5, 197-211.
- Osipow, L. I. ve Rosenblatt, W.** (1967). Micro-emulsion process for the preparation of sucrose esters. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 44, 307-309.
- Otamiri, M., Adlercreutz, P. ve Matiasson, B.** (1991). Effects of ester synthesis in toluene by immobilized chymotrypsin by addition of polymers to reaction medium. *Biotechnol Appl Biochem.*, 23, 54–64.
- Palomo, J. M., Muñoz, G., Fernández-Lorente, G., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R. ve Guisán, J. M.** (2002). Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): Immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. *J Mol Catal B Enzym*, 19–20: 279–286.
- Papamichael, E. M., Stergiou, P-Y., Foukis, A., Kokkinou, M. ve Theodorou, L. G.** (2012). Effective kinetic methods and tools in investigating the mechanism of action of specific hydrolases. Medicinal chemistry and drug design, Ekinci, D. (Ed.), *Intech Open Science*, 235–274, Rijeka.



- Pappalardo, V. M., Boeriu, C. G., Zaccheria, F. ve Ravasio, N. (2017).** Synthesis and characterization of arabinose-palmitic acid esters by enzymatic esterification. *Molecular Catalysis*, 433, 383-390.
- Parker, M. C., Brown, S. A., Robertson, L. ve Turner, N. J. (1998).** Enhancement of *Candida antarctica* lipase B enantioselectivity and activity in organic solvents. *Chemical Communications*, 20, 2247–2248.
- Partali, V., Waagen, V., Alvik, T. ve Anthonsen, T. (1993).** Enzymatic resolution of butanoic esters of 1-phenylmethyl and 1-[2-phenylethyl] ethers of 3-chloro-1,2-propanediol. *Tetrahedron Asymm.*, 4, 961-968.
- Pasta, P., Mazzola, G., Carrea, G. ve Riva, S. (1989).** Subtilisin-catalyzed transesterification in supercritical carbon dioxide. *Biotechnol. Lett.*, 11, 643-648.
- Pomeranz, Y. (1994).** Sucrose esters in baked products. Carbohydrate Polyesters As Fat Substituents, **Akoh, C. C. ve Swanson, B. G. (Ed.)**, Marcel Dekker Inc., 137-148, New York.
- Randolph, T. W., Blanch, H. W., Prausnitz, J. M. ve Wilke, C. R. (1985).** Enzymatic catalysis in a supercritical fluid. *Biotechnol. Lett.*, 7, 325-328.
- Randolph, T. W., Clark, D. S., Blanch, H. W. ve Prausnitz, J. M. (1988).** Enzymatic oxidation of cholesterol aggregates in supercritical carbon dioxide. *Science*, 238, 387.
- Rangel-Yagui, C. O., Pessoa-Jr, A. ve Tavares, C. (2005).** Micellar solubilization of drugs. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 8, 147-163.
- Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M. E. ve Miller R. (2009).** Lipases at interfaces: A review. *Adv Colloid Interface Sci.*, 147–48, 237–50.
- Ren, K. ve Lamsal, B. P. (2017).** Synthesis of some glucose fatty acid esters by lipase from *Candida antarctica* and their emulsion functions, *Food Chemistry*, 214, 556-563.
- Reslow, M., Adlercreutz, P. ve Mattiasson, B. (1992).** Modification of the microenvironment of enzymes in organic solvents: substitution of water by polar solvents. *Biocatalysis*, 6, 307–318.
- Rich, J., Bedell, B. A. ve Dordick, J. (1995).** Controlling enzyme-catalyzed regioselectivity in sugar ester synthesis. *Biotechnol Bioeng.*, 45, 426–434.
- Richards, F. M. (1974).** The interpretation of protein structures: Total volume, group volume distributions and packing density. *J Mol Biol*, 82, 1-14.
- Riva, S. ve Klibanov, A. M. (1988).** Enzymochemical regioselective oxidation of steroids without oxidoreductase. *J. Am. Chem. Soc.* 110, 3291-3295.
- Riva, S., Chopineau, J., Kieboom, A. P. G. ve Klibanov, A. M. (1988).** Protease-catalyzed regioselective esterification of sugars and related compounds in anhydrous dimethylformamide. *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 584-589.
- Rogalska, E., Cudrev, C., Ferrato, F. ve Verger, R. (1993).** Stereoselective hydrolysis of triglycerides by animal and microbial lipases. *Chirality*, 5, 24-30.
- Rosen, M. J. (1978).** Surfactants and Interfacial Phenomena, John Wiley and Sons, USA.

- Rupley, J. A., Gratton, E. ve Careri, G.** (1983). Water and globular proteins. *Trends Biochem. Sci.*, 8, 18-22.
- Russell, A.J. ve Beckman, E.J.** (1991). Enzyme activity in supercritical fluids. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 31, 197-211.
- Sakai, T.** (2004). Low-temperature method' for a dramatic improvement in enantioselectivity in lipase-catalyzed reactions. *Tetrahedron Asymmetry*, 15, 2749-2756.
- Sakai, T., Mitsutomi, H., Korenaga, T. ve Ema, T.** (2005). Kinetic resolution of 5-(hydroxymethyl)-3-phenyl-2-isoxazoline by using the 'low-temperature method' with porous ceramic-immobilized lipase. *Tetrahedron Asymmetry*, 16, 1535-1539.
- Samueli J-J ve Boudenot J-C.** (2005). Henri Poincaré (1854 - 1912): physicien Jean-Jacques Samueli; Jean-Claude Boudenot, *Ellipses*, 152s, Paris.
- Sarney, D. B., Kapeller, H., Fregapane, G. ve Vulfson, E. N.** (1994). Chemo-enzymatic synthesis of disaccharide fatty acid esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71, 711-714.
- Sarney, D. ve Vulfson, E. N.** (1995). Application of enzymes for the synthesis of surfactants. *Trends Biotechnol.*, 31, 164-172.
- Satpute, S. K., Banpurkar, A. G., Dhakephalkar, P. K., Banat, I. M. ve Chopade, B. A.** (2010). Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: A review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30, 127-144.
- Scheckermann, C., Schlotterbeck, A., Schmidt, M., Wray, V. ve Lang, S.** (1995). Enzymatic monoacylation of fructose by two procedures. *Enz Microb Technol*, 17, 157-162.
- Schmid, R. D. ve Verger, R.** (1998). Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 37, 1608-1633.
- Schrag, J. D., Li, Y., Wu, S. ve Cygler, M.** (1991). Ser-His-Glu forms the catalytic site of a lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature*, 351, 761-764.
- Schultz, G. E. ve Schirmer, R. H.** (1979). Principles of Protein Structure. *Springer*, Berlin, Heidelberg, New York.
- SDBS web: <http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS> Spektrum No. 908
- SDBS web: <http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS> Spektrum No. 1035
- SDBS web: <http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS> Spektrum No. 1139
- SDBS web: <http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS> Spektrum No. 2549
- SDBS web: <http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS> Spektrum No. 10390
- SDBS web: <http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS> Spektrum No. 11562
- SDBS web: <http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS> Spektrum No. 12652
- SDBS web: <http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS> Spektrum No. 16944

- Seino, K., Uchibori, T., Nishitani, T. ve Inamasu, S.** (1984). Enzymatic synthesis of carbohydrate esters of fatty acid (I). Esterification of sucrose, glucose, fructose, and sorbitol. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 61,1761–1765.
- Seydlová, G. ve Svobodová, J.** (2008). Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications. *Cent. Eur. J. Med.*, 3, 123-133.
- Sigler, P. B., Blow, D. M., Matthews, B. W. ve Henderson, R.** (1968). Structure of crystalline  $\alpha$ -chymotrypsin: II. A preliminary report including a hypothesis for the activation mechanism. *J Mol Biol.*, 35, 143-164.
- Stecher, H. ve Faber, K.** (1997). Biocatalytic deracemization techniques. Dynamic resolutions and stereoinversions. *Synthesis*, 1, 1-16.
- Tai, H. P. ve Brunner, G.** (2009). Sugar fatty acid ester synthesis in high-pressure acetone–CO<sub>2</sub> system. *J Supercrit Fluids*, 48(1), 36–40.
- Tarahomjoo, S. ve Alemzadeh, I.** (2003). Surfactant production by an enzymatic method. *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 33–37.
- Temizkan, G., Yilmazer, S., Öztürk, M., Arı, Ş., Ertan, H., Sarıkaya, T. ve Arda, N.** (2008). Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, **Temizkan, G. ve Arda, N.** (Ed.), İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi, 3, 28.
- Theil, F.** (1995). Lipase-supported synthesis of biologically active compounds. *Chem.Rev.*, 95, 2203-2227.
- Therisod, M. ve Klibanov, A. M.** (1986). Facile enzymatic preparation of monoacylated sugars in pyridine. *J. Am. Chem. Soc.*,108, 5638-5640.
- Tomazic, S. J.** (1991). Protein Stabilization. *Biocatalysis for Industry*, **Dordick, J. S.** (ed.), Plenum Press, 241p, New York.
- Torres, S. ve Castro, G. R.** (2004). Non-aqueous biocatalysis in homogeneous solvent systems. *Food Technol Biotechnol.*, 42, 271–7.
- Tsitsimpikou, C., Daflos, H. ve Kolisis, F. N.** (1997). Comparative studies on the sugar esters synthesis catalysed by *Candida antarctica* and *Candidarugosa* lipases in hexane. *J Mol Catal B-Enzymatic*, 3, 189–192.
- Tsuzuki W., Kitamura Y., Suzuki T. ve Kobayashi S.** (1999). Synthesis of sugar fatty acid esters by modified lipase. *Biotechnology and Bioengineering*, 64, 267–271.
- Ünsal, H.,** (2008). Hibrit Yüzey Aktif Maddeleri Kullanarak Çok Bölmeli Misellerin Elde Edilmesi. *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, (Yüksek Lisans Tezi). Ankara.
- Vafiadi, C., Topakas, E., Alderwick, L. J., Besra, G. S. ve Christakopoulos, P.** (2007). Chemo enzymatic synthesis of feruloyl D-arabinose as a potential antimycobacterial agent. *Biotechnol Lett.*, 29, 1771–1774.
- Valivety, R. H., Halling, P. J. ve Macrae, A.** (1992). Reaction rate with suspended lipase catalyst show similar dependence on water activity in different organic solvents. *Biochem Biophys Acta*, 1118, 218–222.
- Van Eijs, A. M. M. ve de Jong, P. J. P.** (1989). *Procestechniek* 8, 50.

- Van Tilbeurgh, H., Egloff, M. P., Martinez, C., Rugani, N., Verger, R. ve Cambillau, C.** (1993). Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography. *Nature*, 362, 814-820.
- Van Tol, J., Stevens, R., Veldhuizen, W., Jongejan, J. ve Duine, J.** (1995). Do organic solvents affect the catalytic properties of lipase? Intrinsic kinetic parameters of lipases in ester hydrolysis and formation in various organic solvents. *Biotechnol Bioeng.*, 47, 71–81.
- Velkov, T., Thompson, P. E., Nation, R. L. ve Li, J.** (2010). Structure-activity relationships of polymyxin antibiotics. *J Med Chem.*, 53, 1898–1916.
- Wang, Y. F., Chen, S. T., Liu, K. K. C. ve Wong, C. H.** (1989). Lipase-catalyzed irreversible transesterification using enol esters: Resolution of cyanohydrins and syntheses of ethyl (R)-2-hydroxy-4-phenylbutyrate and (S)-propranolol. *Tetrahedron Lett.*, 30, 1917-1920.
- Winkler, F. K., D'Arcy, A. ve Hunziker, W.** (1990). Structure of human pancreatic lipase. *Nature*, 343, 771-774.
- Wright, C. S., Alden, R. A. ve Kraut, J.** (1969). Structure of subtilisin BPN' at 2.5Å resolution. *Nature*, 221, 235-242.
- Yamamoto, Y., Yamamoto, K., Nishioka, T. ve Oda, J.** (1989). Asymmetric synthesis of optically active lactones from cyclic acid anhydrides using lipase in organic solvents. *Agric. Biol. Chem.* 52, 3087-3092.
- Yamamoto, Y. ve Kise, H.** (1994). Concentration- and structure-dependent effects of amides on protease activity in organic solvents. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 67, 1367-1370.
- Yamane, T., Ichiryu, T., Nagata, M., Ueno, A. ve Shimizu, S.** (1990). Intramolecular esterification by lipase powder in microaqueous benzene: Factors affecting activity of pure enzyme. *Biotechnol. Bioeng.*, 36, 1063-1069.
- Yu, J., Zhang, J., Zhao, A. ve Ma, X.** (2008). Study of glucose ester synthesis by immobilized lipase from *Candida* sp. *Catal. Comm.* 9, 1369–1374.
- Zaks, A. ve Klibanov, A. M.** (1984). Enzymatic catalysis in organic media at 100 degrees C. *Science*, 224, 1249.
- Zaks, A. ve Klibanov, A. M.** (1986). Substrate specificity of enzymes in organic solvents vs. water is reversed. *J. Am. Chem. Soc.*, 108, 2767-2768.
- Zaks, A. ve Klibanov, A. M.** (1988). Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. *J. Biol. Chem.* 263, 3194-3201.

## **ÖZGEÇMİŞ**

### **Kişisel bilgiler**

Adı Soyadı : Serap ÇETİNKAYA  
Yabancı Dil : İngilizce  
İletişim Adresi : Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Fakültesi,  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 58140-Sivas  
E-posta Adresi : secetinkaya@cumhuriyet.edu.tr

### **Eğitim ve Akademik Durumu**

Lisans : 2006-2010, Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Fakültesi,  
Biyoloji Bölümü  
Yüksek Lisans : 2010-2013 C.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler  
Biyoloji ve Genetik A.B.D.

### **Mesleki Deneyimler**

Araştırma Görevlisi : Mayıs-2012, C.Ü. Fen Fak. Moleküler Biyoloji ve  
Genetik Bölümü

### **Uluslararası Makaleler (SCI kapsamlı)**

Yavuz Sevgi, Kocabay Samet, **Çetinkaya Serap**, Akkaya Birnur, Akkaya Recep, Yenidünya Ali Fazıl, Bakıcı Mustafa Zahir (2017). Production, purification, and characterization of metalloprotease from Candida kefyr 41 PSB. International Journal of Biological Macromolecules, 94, 106-113.

Kocabay Samet, **Çetinkaya Serap**, Akkaya Birnur, Yenidünya Ali Fazıl (2016). Characterization of thermostable amylase isozymes from Lactobacillus fermentum. International Journal of Biological Macromolecules, 93, 195-202.

**Çetinkaya Serap**, Akkaya Birnur (2016). Selective and single step adsorption of lactalbumin from whole cow s milk on hydroxyapatite microbeads. Materials Science and Engineering C, 68, 573-578.

Sarıkürkçü Cengiz, Tepe Bektaş, Solak Mehmet Halil, **Çetinkaya Serap** (2012). Metal Concentrations of Wild Edible Mushrooms from Turkey. Ecology of Food and Nutrition, 51(4), 346- 363.

### **Ulusal Makaleler**

Durna Daştan Sevgi, Daştan Taner, **Çetinkaya Serap**, Ateşşahin Dilek, Karan Tünay (2016). Evaluation of In Vitro Anticancer Effect of Plantago major L. and Plantago lanceolata L. Leaf Extracts from Sivas. Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi.

### **Kongre ve Bildiriler**

Kocabay Samet, Akkaya Birnur, Yenidünya Ali Fazıl, **Çetinkaya Serap** (2017). Organic Solvent Tolerant  $\alpha$ -Amylase From *Lactobacillus Fermentum*. 4th International Türk-Pak Conference Chemical Sciences (ITPCCS 2017).

Daştan Taner, Pektaş Ayşe Nur, Durna Daştan Sevgi, **Çetinkaya Serap**, Ateşşahin Dilek, Karan Tünay, Baral İnanç (2017). Sivas İli Plantago major ve Plantago lanceolata Bitki Yapraklarının In Vitro Antikanser Aktivitelerinin Değerlendirilmesi. II. International Academic Research Congress.

Kocabay Samet, **Çetinkaya Serap**, Akkaya Birnur, Yenidünya Ali Fazıl (2017). Screening of Potential Probiotic Properties Of Lactobacillus Fermentum Isolated From Newborn Baby Gaita. 8th International Advanced Technologies Symposium.

**Çetinkaya Serap**, Akkaya Birnur (2015). Hidroksiapatit Partiküller Kullanılarak Laktalbuminin İnek Sütünden Saflastırılması. Uygulamalı Biyokimyada Güncel Konular-2.

Akkaya Birnur, **Çetinkaya Serap**, Yenidünya Ali Fazıl (2014). Characterization of Enzyme Produced Isolates From Fecal Samples. 3rd International Congress of Molecular Biology and Biotechnology.

## **Araştırma Projeleri**

*Lactobacillus Fermentum* un Probiyotik Özelliklerinin Araştırılması, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı, 2016 (Ulusal).

Biyoaktif Molekül Analoglarının Yapımında Kullanılabilir Şeker Esterlerinin Sentezi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı, 2016 (Ulusal).

Fekal örneklerden Proteaz Üreten İzolatların Genotipik ve Fenotipik Karakterizasyonu, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı, 2015 (Ulusal).

Bazı Bitkisel Fenolik Asitlerin In Vitro Aktioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi, BAP, Araştırmacı, 2013 (Ulusal).