ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Pınar BASIM

FRUKTOZ-STEARATIN T-BUTANOL:DMSO ÇÖZÜCÜ KARIŞIMI VE İYONİK SIVILARDA LİPAZ KATALİZLİ SENTEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

ADANA, 2009

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FRUKTOZ-STEARATIN T-BUTANOL:DMSO ÇÖZÜCÜ KARIŞIMI VE İYONİK SIVILARDA LİPAZ KATALİZLİ SENTEZİ

Pınar BASIM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu tez ...../ ...../..... Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oy Birliği/Oy Çokluğu İle Kabul Edilmiştir.

İmza..... İmza..... İmza.....

Prof.Dr.S.Seyhan TÜKEL Prof.Dr.Nuray GÜZELER Yrd.Doç.Dr. Ramazan BİLGİN

Danışman Üye Üye

Bu tez Enstitümüz Kimya Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:.....

Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ
Enstitü Müdürü
İmza ve Mühür

Bu Çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: FEF.2008.YL.4

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FRUKTOZ-STEARATIN T-BUTANOL:DMSO ÇÖZÜCÜ KARIŞIMI VE İYONİK SIVILARDA LİPAZ KATALİZLİ SENTEZİ

Pınar BASIM

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
Yıl : 2009, **Sayfa:** 55
Jüri : Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
Prof. Dr. Nuray GÜZELER
Yrd. Doç. Dr. Ramazan BİLGİN

Fruktozun stearik asit ile açilasyonu *C.antarctica* ve *M.miehei* lipazları kullanılarak, organik çözücü karışımı (t-butanol:DMSO) ve iyonik sıvılarda (1-bütil-3-metilimidazolyum triflorometansülfonat [Bmim][TfO] ve 1-bütil-3-metilimidazolyum hekzaflorofosfat [Bmim][PF_6]) araştırılmıştır. T-butanol:DMSO çözücü karışımının fruktoz-stearat sentezi için uygun bir çözücü olduğu fakat [Bmim][TfO] ve [Bmim][PF_6]'ın sentez için uygun çözücü olmadıkları belirlenmiştir. Fruktozun açilasyonu, reaksiyon süresince açığa çıkan suyun aktive edilmiş moleküler elek kullanılarak reaksiyon karışımından sürekli olarak uzaklaştırılması ile hızlandırılmıştır. Sıcaklık, reaksiyon süresi, enzim konsantrasyonu, moleküler elek konsantrasyonu, su miktarı, çeşitli metal iyonları (Ca^{+2}, Cu^{+2}, Mg^{+2}, Mn^{+2} ve Hg^{+2})'nın varlığı ve fruktoz/stearik asit mol oranı gibi farklı reaksiyon parametrelerinin fruktoz-stearat oluşumu üzerine etkisi incelenmiştir. En yüksek fruktoz-stearat verimi, fruktoz-stearata dönüşen stearik asit cinsinden, % 51 olarak fruktoz/stearik asit mol oranı 0,3/0,06 olduğunda, 1mM Ca^{+2} içeren t-butanol:DMSO çözücü karışımı içerisinde 55°C'de 48 saat reaksiyon süresinde tespit edilmiştir. Sentezlenen fruktoz-stearatın varlığı volumetrik titrasyon, HPLC, TLC ve FT-IR gibi yöntemlerle incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Fruktoz-stearat, *C.antarctica* lipazı, esterifikasyon, t-butanol:DMSO

ABSTRACT

MSc THESIS

LIPASE-CATALYZED SYNTHESIS OF FRUCTOSE-STEARATE IN T-BUTANOL:DMSO SOLVENT MIXTURE AND IONIC LIQUIDS

Pınar BASIM

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

Supervisor : Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
Year : 2009, **Pages:** 55
Jury : Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
Prof. Dr. Nuray GÜZELER
Asist. Prof. Ramazan BİLGİN

The acylation of fructose with stearic acid in a reaction catalysed by immobilized *C.antarctica* and *M.miehei* lipases in organic solvent mixture (t-butanol:DMSO) and ionic liquids (ILs) (1-butyl-3-methylimidazolium trifluoromethanesulfonate [Bmim][TfO] and 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate [Bmim][PF_6]) was investigated. T-butanol:DMSO mixture was determined as a suitable reaction solvent, however, [Bmim][TfO] and [Bmim][PF_6] were not suitable. Acylation of fructose was accelerated by continuous removal of water, generated during the esterification, from the reaction mixture with activated molecular sieve. Influence of different reaction parameters, such as temperature, reaction time, enzyme concentration, molecular sieve concentration, fructose/stearic acid molar ratio, water content and various metal ions (Ca^{2+}, Cu^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+} and Hg^{2+}) were studied. The highest fructose-stearate yield of 51 % (as stearic acid converted to fructose-stearate) was obtained when fructose to stearic acid ratio was 0.3/0.06 by mole in t-butanol:DMSO solvent mixture containing 1mM of Ca^{2+} at 55°C in 48 h. The presence of synthesized fructose-stearate was investigated with volumetric titration, HPLC, TLC and FT-IR methods.

Key Words: Fructose-stearate, *C.antarctica* lipase, esterification, t-butanol:DMSO

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam boyunca engin bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, sabır ve ilgisini esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarımda bana her zaman destek olan hocalarım, Doç. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ'e ve Yrd. Doç. Dr. Ramazan BİLGİN'e, Deniz YILDIRIM'a, Arş.Gör. Özlem ALPTEKİN'e, Arş.Gör. Özlem ÖZCAN'a, Arş.Gör. Murat TÜRK'e ve laboratuardaki tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince manevi desteğini esirgemeyen, çözemediğim noktalarda elinden geldiğince benimle birlikte kafa yorup çıkış noktaları arayan değerli hocam Deniz YILDIRIM'a bir kez daha teşekkürü bir borç bilirim.

Maddi ve manevi her konuda beni destekleyen, sevgi ve ilgisini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ…….. I
ABSTRACT…….. II
TEŞEKKÜR……. III
İÇİNDEKİLER DİZİNİ…….. IV
ÇİZELGELER DİZİNİ……... VI
ŞEKİLLER DİZİNİ……. VII
SİMGE VE KISALTMALAR……. VIII
1. GİRİŞ…… 1
1.1. Şeker Esterlerinin Sentezi…..... 2
1.1.1. Şeker Esterlerinin Enzimatik Sentezi…..…… 3
1.2. Fruktoz.....…….....……..…….. 6
1.3. Yağ Asitleri……..…….. 7
1.3.1. Doymuş Yağ Asitleri…..……...…….....……. 7
1.3.2. Doymamış Yağ Asitleri…….……...……..... 8
1.4. Lipazlar…….…….....……..... 8
1.4.1. Lipazların Uygulama Alanları……..……... 11
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR……... 14
3. MATERYAL VE METOD……..... 22
3.1. Materyal……..... 22
3.2. Metod…….……. 22
3.2.1. İyonik Sıvılarda Fruktoz-stearat Sentezi…….…….. 22
3.2.2. T-butanol:DMSO Çözücü Karışımında Fruktoz-stearat Sentezi.. 23
3.2.3. Fruktoz-stearat Oluşumunun Belirlenmesi…….…..... 23
3.2.3.1. Volumetrik Titrasyon……... 23
3.2.3.2. HPLC Analizleri…….. 24
3.3. Reaksiyon Koşullarının Optimizasyonu……. 25
3.3.1. Sıcaklık……... 25

3.3.2. Reaksiyon Süresi…… 25
3.3.3. Enzim Miktarı..…….. 25
3.3.4. Moleküler Elek Miktarı…….. 25
3.3.5. Reaksiyon Ortamına Eklenen Su Miktarı…….. 25
3.3.6. Metal İyonları……. 26
3.3.7. Fruktoz/Stearik Asit Mol Oranı……. 26
3.4. İnce Tabaka Kromatografi (TLC) Analizi……..…… 26
3.5. Fruktoz-stearatın Saflaştırılması……..... 26
4. BULGULAR VE TARTIŞMA……..... 28
4.1. Bulgular.....……... 28
4.1.1. Standart Stearik Asit Grafiğinin Çizilmesi……... 28
4.2. Reaksiyon Koşullarının Optimizasyonu……. 30
4.2.1. Sıcaklık…….. 30
4.2.2. Reaksiyon Süresi……... 31
4.2.3. Enzim Derişimi……. 32
4.2.4. Moleküler Elek Miktarı……. 32
4.2.5. Reaksiyon Ortamına Eklenen Su Miktarı……. 33
4.2.6. Metal İyonları…… 34
4.2.7. Fruktoz/Stearik Asit Mol Oranı…… 35
4.3. TLC Analizi……..... 37
4.4. Fruktoz-stearatın Saflaştırılması ve FT-IR Analizi……. 38
4.5. Tartışma…… 39
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER..... 47
5.1. Sonuçlar..... 47
5.2. Öneriler..... 48
KAYNAKLAR…… 49
ÖZGEÇMİŞ……..... 55

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 1.1.	Kullanımı Yaygın Bazı Ticari Lipazlar.....	12
Çizelge 1.2.	Mikrobiyal Lipazların Endüstriyel Uygulamaları….....	13
Çizelge 4.1.	Metal İyonlarının Fruktoz-stearat Oluşumu Üzerine Etkisi…..	35
Çizelge 4.2.	Fruktoz/Stearik Asit Mol Oranının Fruktoz-stearat Oluşumu Üzerine Etkisi…….	36

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1.	Fruktoz (β-D-fruktofuranoz)……	6
Şekil 1.2.	Fruktozun sudaki çözeltisindeki furanoz ve piranoz yapıları….....	7
Şekil 1.3.	Lipaz tarafından katalizlenen bir ester-hidroliz sentez reaksiyonu……..	9
Şekil 1.4.	Lipaz esterifikasyon mekanizması…….	11
Şekil 4.1.	Stearik asite ait bir kromatogram……...	28
Şekil 4.2.	Stearik asit miktarına bağlı olarak pik alanlarındaki değişim……...	29
Şekil 4.3.	Sentez işlemi sonrası HPLC'de analizi yapılan örneğe ait bir kromatogram örneği……..	29
Şekil 4.4.	Reaksiyon sıcaklığının fruktoz-stearat oluşumu üzerine etkisi…..	30
Şekil 4.5.	Reaksiyon süresinin fruktoz-stearat oluşumu üzerine etkisi……..	31
Şekil 4.6.	Enzim miktarının fruktoz-stearat oluşumu üzerine etkisi…….	32
Şekil 4.7.	Moleküler elek miktarının fruktoz-stearat oluşumu üzerine etkisi……...	33
Şekil 4.8.	Başlangıç su miktarının fruktoz-stearat oluşumu üzerine etkisi…	34
Şekil 4.9.	Fruktoz/Stearik asit mol oranının fruktoz-stearat oluşumu üzerine etkisi……..	36
Şekil 4.10.	Fruktoz (F) ve sentez sonrası reaksiyon karışımından alınan örneğe (Ö) ait TLC kromatogramı…….....	37
Şekil 4.11.	Sentezlenen fruktoz-stearatın IR spektrumu……..	38
Şekil 4.12.	Fenil boronik asit varlığında fruktoz-stearat sentezi……..	41

SİMGELER VE KISALTMALAR

[Bmim][PF_6] : 1-bütil-3-metilimidazolyum hekzaflorofosfat

[Bmim][TfO] : 1-bütil-3-metilimidazolyum triflorometansülfonat

DMF **:** Dimetil formamid

DMP **:** Dimetil pirolidon

DMSO **:** Dimetil sülfoksit

DNSA **:** Dinitrosalisilik asit

FT-IR **:** Fourier Transform Infrared Spectroscopy

HPLC **:** Yüksek performanslı sıvı kromatografi

IL **:** Ionic Liquid (İyonik sıvı)

NMR **:** Nükleer Magnetik Rezonans

$SCCO_2$ **:** Süperkritik karbondioksit

THF **:** Tetrahidrofuran

TLC **:** İnce tabaka kromatografi

1. GİRİŞ

Şekerlerin yağ asidi esterleri hidrofilik grup olarak şeker, lipofilik grup olarak da bir ya da daha fazla sayıda yağ asidi içeren, iyonik olmayan yüzey aktif (non-iyonik surfaktan) maddelerdir. Yüzey aktif maddeler, içinde bulundukları sıvının yüzey gerilimini azaltan, bunun sonucunda da sıvının dağılma ve ıslatma özelliğini arttıran maddelerdir. Yüzey aktif maddelerin hidrofilik kısımları suda çözünürken, hidrofobik kısımları da yağ ya da lipid içerisinde çözünebilir ve su/yağ ara yüzeyinde yoğunlaşarak emülsiyonlaştırıcı ya da köpük oluşturucu olarak işlev görür.

Yüzey aktif maddeler gıda, ilaç, deterjan ve kozmetik gibi endüstrinin çeşitli alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu moleküllerden bazılarının (dallanmış alkil benzen sülfonatlar vb.) biyolojik parçalanabilirlikleri az olduğundan, kullanımları sağlık ve çevre açısından olumsuz sonuçlar doğurmaktadır. Daha az kirlilik oluşumuna neden olacak yeni yüzey aktif maddelerin sentezlenmesine ve geliştirilmesine çalışılmaktadır ki bu yeni yüzey aktif maddelerin bir bölümünü de şeker esterleri oluşturmaktadır. Şekerlerin yağ asit esterleri toksik değildir, cildi tahriş etmez, sindirilebilir, absorbe edilebilir, kokusuz ve tatsızdırlar, yenilenebilir ve ucuz kaynaklardan elde edilirler, oksijenli ve oksijensiz koşullarda biyolojik olarak tamamen parçalanabilirler (Soultani ve ark., 2001; Sabeder ve ark., 2005). Bu nedenlerle şekerlerin yağ asit esterleri gıda, kozmetik, tarım ürünleri, deterjan ve ilaç endüstrisinde geniş kullanım alanına sahiptirler. Özellikle gıda üretiminde emülgatör, stabilizatör, kıvam arttırıcı ve jelleştirici özellikleri sebebiyle katkı maddesi olarak kullanılırlar. Dondurma, çorba, mayonez gibi gıda ürünlerinde yağ asitlerinin sükroz esterleri, poligliserol esterleri E 473 kodu ile belirtilmekte ve kullanılmaktadırlar. Kozmetik endüstrisinde özellikle diş macunu, losyon, dudak boyası ve şampuanlarda olmak üzere yaygın bir kullanıma sahiptirler. Şeker esterlerinden biri olan fruktoz monoesterleri, diş çürümelerine neden olan *Streptococcus mutans* bakterilerinin gelişimini önlemek amacıyla antibakteriyel ajan olarak kullanılmaktadır (Soultani ve ark., 2003; Sabeder ve ark., 2005). Şeker esterlerinin, gıdaların depolanmasında antimikrobiyal özelliği, dokulardaki tümörü inhibe etmesiyle anti-kanser ajan olma özelliği ve böcek öldürücü özelliği sebebiyle de çok yönlü kullanım alanları

bulunmaktadır (Okabe ve ark., 1999; Reyes-Duarte ve ark., 2004; Devulapalle ve ark., 2004; Ferrer ve ark., 2005).

1.1. Şeker Esterlerinin Sentezi

Şeker esterleri kimyasal ya da enzimatik yollarla sentezlenebilmektedir. Şeker esterlerinin kimyasal sentezi ile ilgili çalışmalara 1950'li yıllarda başlanmıştır. Şeker yağ asidi esterlerinin (mono ve diesterlerinin) sentezi ilk başlarda hem şekerin hem de serbest yağ asitlerinin çözünürleştirilebildiği dimetil sülfoksit (DMSO), dimetil formamid (DMF), dimetil pirolidon (DMP) gibi toksik çözücülerde gerçekleştirilmekteydi. Hass-snell prosesi olarak bilinen bu proses, ilk olarak Dai Nippon isimli bir Japon firması tarafından (1952) şeker yağ asidi esterlerinin gıda katkı maddesi olarak üretimi için ticarileştirilmiştir. Ancak bu metodla üretilen şeker yağ asidi esterlerinin toksik ve kokulu kalıntılar içermesi nedeniyle Almanya ve Amerika gibi birçok gelişmiş ülkede kullanılmalarına izin verilmemektedir.

Şeker yağ asidi esterlerinin sentezi için ilk ticari proses 1967'de Osipow ve Rosenblatt tarafından DMF'de çözünmüş yağ asidi metil esterlerinden yola çıkılarak gerçekleştirilmiştir. Daha sonra güvenilir bir proses olarak bilinen Nebraska-Snell prosesi geliştirilmiştir. Bu proses propilen glikolde, potasyum karbonat katalizörü varlığında sükroz ve yağ asidi metil esterlerinin reaksiyonunu içerir. Feuge ve ark. (1970) 170-187°C'de çözücüsüz ortamda, çözünürleştirici ve katalizör olarak lityum, potasyum ve sodyum tuzlarının varlığında erimiş sükroz (E.N. 185°C) ile yağ asidi metil esterlerini kullanarak, bir interesterifikasyon prosesi geliştirmişlerdir. Bu yöntemin dezavantajı, erimiş sükrozun bu kadar yüksek sıcaklıkta hızla bozularak siyah katranımsı bir maddeye dönüşmesidir (Yan ve ark., 2001).

Günümüzde sükroz ve sorbitanın çeşitli esterleri ticari olarak üretilmektedir. Ancak kimyasal metodlarla üretilen emülgatörler, gıda uygulamalarında kullanılamayabilirler. Çünkü şekerlerin çözünürleştirilebilmeleri için kullanılan DMSO, DMF ve THF gibi toksik organik çözücülerin reaksiyon ortamından tamamen uzaklaştırılması oldukça güçtür.

Şekerlerin yağ asitleriyle esterifikasyonu kimyasal yolla gerçekleştirildiğinde gözlenen en büyük sorun, şekerlerin içermiş olduğu çok sayıda hidroksil grubunun varlığı nedeniyle reaksiyonun düşük seçimlilikle gerçekleşmesi, çok sayıda ürünün yani mono, di, tri ve daha yüksek esterlerin meydana gelmesidir. Bu şekilde elde edilen ve çok sayıda esteri içeren reaksiyon karışımı saflaştırılabilse de bu saflaştırma işlemi şeker esterlerinin sanayideki kullanımları açısından oldukça pahalı bir prosestir.

Şeker esterlerinin sentezi için kullanılan kimyasal proseslerin, toksik organik çözücü gerektirmesi, düşük seçimliliği, yüksek enerji tüketimi, yüksek sıcaklıkta şekerin bozunması gibi dezavantajları biyolojik katalizörlerin kullanımıyla aşılabilmektedir (Arcos ve ark., 1998; Coulon ve ark., 1999; Yan ve ark., 2001; Reyes-Duarte ve ark., 2004).

1.1.1. Şeker Esterlerinin Enzimatik Sentezi

Şeker yağ asidi mono esterlerinin üretimi için enzim kullanımı ile ilgili çalışmalar 1986'dan beri gerçekleştirilmektedir (Therisod ve ark., 1986). Enzimatik prosesler şeker yağ asidi esterlerinin üretimi için alternatif oluşturmakta ve organik çözücü ortamında hidrolazların kullanılmasıyla gerçekleştirilmektedir, zira düşük su aktivitesi ortamında hidrolazlar, hidroliz yapmak yerine ester bağı oluşturma aktivitesi göstermektedirler. Bu özellikleri nedeniyle son yıllarda lipaz (triaçilgliserol açilhidrolaz EC 3.1.1.3) ve proteazların şeker esteri sentezi reaksiyonlarında biyolojik katalizör olarak kullanılmaları ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmaktadır (Ward ve ark., 1997; Cao ve ark., 1999; Coulon ve ark., 1999; Tsuzuki ve ark., 1999).

Enzimatik reaksiyonların başlıca avantajı yüksek seçimliliğin olması ve mono ester sentezinin yüksek oranda gerçekleştirilmesine olanak vermesidir. Ayrıca enzimatik yolla sentez daha ılımlı koşullarda gerçekleşir, substrat ve ürünün denaturasyonu söz konusu değildir, yan ürün oluşumu gözlenmez (Coulon ve ark., 1999; Tsuzuki ve ark., 1999; Soultani ve ark., 2001; Şekeroğlu ve ark., 2002; Kennedy ve ark., 2006).

Şeker esterlerinin enzimatik sentezinde başlıca problem reaksiyon ortamındaki farklı polariteye sahip substratların hepsinin çözünürleştirilememesi yani reaksiyona giren substratların, reaksiyona uygun çözücülerde çözünürlüklerinin farklı olmasıdır. Bazı araştırmacılar bu problemi ya polar organik çözücülerde aktive edilmiş yağ asitlerini kullanarak ya da apolar organik çözücülerde aktive edilmiş şekerleri kullanarak aşmışlardır. Alternatif olarak şeker türevlerinin (alkil, asetal) kullanımının çözünürlük problemini ortadan kaldıracağı bildirilmiş (Björkling ve ark., 1991; Fregapane ve ark., 1991) ancak bu işlemlerde pahalı substratlara gereksinim duyulduğu ve oluşan ürünün, doğrudan glukozla elde edilen estere kıyasla farklı özellikler gösterebildiği literatürlerde bildirilmiştir (Cao ve ark., 1999; Ganske ve Bornscheuer, 2005). Boronik asit türevleriyle kompleks oluşturmak suretiyle şekerlerin çözünürlüğü arttırılmış ancak boronik asit türevi olan fenil boronik asidin lipaz aktivitesini inhibe edici özellik gösterdiği saptanmıştır (Schlotterbeck et al. 1993). Piridin, pirolidon ve DMF gibi bazı organik çözücülerin kullanımıyla polar olan şekerler ile apolar olan yağ asitlerinin çözünürleştirilebildiği literatürde bildirilmiştir (Janssen ve ark., 1991). Ancak bu çözücülerin, enzimin inaktif olmasına sebep olmaları ve üründe toksik kalıntılar bırakmaları nedeniyle özellikle gıda uygulamalarında kullanımlarının uygun olmadığı belirtilmiştir (Flores ve ark., 2002; Ganske ve Bornscheuer, 2005; Sabeder ve ark., 2005). Bu nedenle, asetonitril, aseton, t-butanol ve 2-metil-2-butanol gibi daha az zararlı organik çözücüler kullanılabileceği literatürlerde bildirilmiştir (Cao ve ark., 1996; Degn ve ark., 1999; Degn ve Zimmermann, 2001; Flores ve ark., 2002).

Süperkritik karbondioksitin ($SCCO_2$) organik çözücülere alternatif olarak kullanılabileceği literatürlerde bildirilmiştir (Tsitsimpikou ve ark., 1998, Heo ve ark., 2000, Stamatis ve ark., 2001, Sabeder ve ark., 2005; Kumar ve ark., 2005). Ancak $SCCO_2$ temel olarak nonpolar bileşenler için uygundur. Polar substratlar, örneğin şekerler bu ortamda oldukça düşük çözünürlüğe sahiptir, bunların $SCCO_2$ ortamında çözünürlüğünü arttırmak için iki metod önerilir: Birincisi organoboratların substratlarla kompleks oluşturması, diğeri ise substratların poröz silika gibi katı desteklere tutturulmasıdır. Ancak bu metodlar da pahalı substratlar ve ürünün saflaştırılabilmesi için ekstra işlem basamakları gerektirmektedir. Kullanılan

organoboratların lipaz enzimi üzerinde inhibe edici özelliği olduğu literatürlerde bildirilmiştir (Schlotterbeck et al. 1993).

Biyokataliz işlemlerinde, çevre için zararlı olan, uçucu organik çözücülere alternatif olarak iyonik sıvıların kullanımı ile ilgili bilimsel çalışmalar 1990'lı yılların sonlarına doğru başlamıştır (Kim ve ark., 2001; Sheldon ve ark., 2002). İyonik sıvıların öneminin giderek artmasına sebep olan özellikler; çok düşük buhar basıncı, düşük uçuculuk, kokusuz olmaları ve yanıcı olmamaları, termal, kimyasal ve elektrokimyasal kararlılıkları ve geri kazanılabilirlikleridir (Sheldon ve ark., 2002; Murugesan ve Linhardt, 2005; Ganske ve Bornscheuer, 2005). Yoğunluk, viskozite, erime noktası, polariteleri, kırılma indisleri gibi özellikleri, katyon ve anyonlarında yapılabilecek değişikliklerle ayarlanabilmektedir. İyonik sıvıların katyon kısmı genellikle organik olurken, anyon kısmı ise genellikle inorganiktir. Bu nedenle bu tuzlar sıkı istiflenemezler. Bunun sonucu olarak iyonik sıvılar kolayca kristalize olmaz, geniş sıcaklık aralıklarında sıvı halini korur. Çoğu iyonik sıvı çok düşük erime noktasına sahiptir ve oda sıcaklığında sıvı halde bulunur (Murugesan and Linhardt, 2005). İyonik sıvıların yapılarında yer alan başlıca katyonlar; amonyum, sülfonyum, fosfonyum, lityum, imidazolyum, piridinyum, pikolinyum, pirolidinyum, tiazolyum, triazolyum, pirazolyum iyonlarıdır. İyonik sıvılarda kullanılan başlıca anyonlar; tetrafloroborat, hekzaflorofosfat, hekzafloro antimonat, nitrat, tosilat, triflat, bromit, klorit, trifloroasetat, perklorat, germanyum klorit, alüminyum klorit, alüminyum tetraklorit, asetat, benzoat iyonlarıdır.

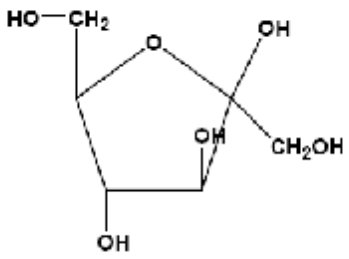
Kimyasal proseslerde iyonik sıvılar; polar, apolar organik, inorganik ve polimerik bileşenlerin çözünmesini sağladığı için, şekerlerin çözünmesinde çözücü olarak kullanılmaktadır. (Sheldon ve ark., 2002; Rantwijk ve ark., 2003; Murugesan ve Linhardt, 2005; Lee ve ark., 2007). Yapıları gereği su ile karışmamaları, iki fazlı sistemlerde gerçekleşen reaksiyonlar için oldukça yararlı olmalarını sağlayabilmektedir (Sheldon ve ark., 2002).

Çözücü olarak iyonik sıvıların kullanımı şeker ve yağ asidini aynı anda çözebilme avantajını sağlamakla birlikte bu bileşiklerin yüksek maliyet gerektirmesi bir dezavantajdır. Ancak, klasik yöntemlerle kıyaslandığında literatürlerde iyonik

sıvıların kullanımıyla daha yüksek verimle ürün elde edildiği bildirilmiştir (Lee ve ark., 2007; Rios ve ark., 2008).

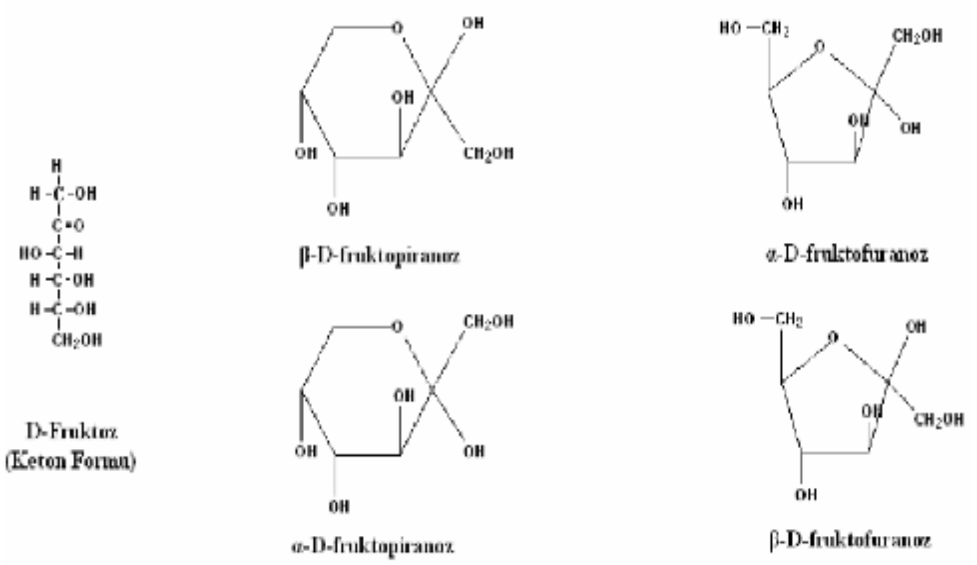
1.2. Fruktoz

Fruktoz meyve şekeri olarak bilinir. En tatlı monosakkarittir. Meyvelerde ve balda bulunur. Suda çok kolay çözünür. Polarize ışığı sola çevirir (-90°). Bu özelliği nedeniyle levüloz olarak da adlandırılmaktadır. Organizmada, karaciğer ve bağırsaklarda glukoza çevrilerek kullanılır. İndirgendir. Glukozla aynı osazonu oluşturur. Şekil 1.1' de fruktozun furanoz halkası formu gösterilmiştir.



Şekil 1.1. Fruktoz (β-D-fruktofuranoz)

Bir keto heksoz olan fruktoz suda çözününce hemiketal oluşturur. Hemiketallerde bir keton grubu ile bir alkol grubu arasında oluşur ve oluşum mekanizması açısından aynen hemiasetallere benzer. Fruktozun sudaki çözeltisinde çoklukla β-fruktofuranoz ve daha az oranda α-fruktofuranoz meydana gelir. Şekil 1.2'de fruktozun sulu çözeltideki olası furanoz ve piranoz yapıları gösterilmiştir (Nelson, D. L. and Cox, M. M., 2000).



Şekil 1.2. Fruktozun sudaki çözeltisindeki furanoz ve piranoz yapıları

1.3. Yağ Asitleri

Yağ asitleri genel olarak çift karbon sayılı, doymuş veya doymamış (cis konfigürasyonda), dallanmamış ve düz zincirli (asiklik) mono karboksilik asitlerdir. Doymamış yağ asitleri kolaylıkla okside olabilirler. Özellikle çift bağın sayısının artması oksidasyonu kolaylaştırmaktadır. Metaller, ısı, ışık vb. oksidasyonu hızlandırmaktadır. Yağ asitleri doğal sıvı ve katı yağlar içinde esterler halinde bulunurlar. Bir yağın karakteri temel yağ asitleri içeriğine bağlıdır (Nelson, D. L. and Cox, M. M., 2000).

1.3.1. Doymuş Yağ Asitleri

Karbon atomları arasında çift bağ içermeyen uzun zincirli yağ asitleridir. Üç ve dört karbon sayılı yağ asitleri propiyonik asit ve butirik asite uçucu yağ asitleri denir. Palmitik ve stearik asitler hayvansal lipidlerde en çok bulunan yağ asitleridir.

Çalışmamızda ester sentezinde açil verici olarak stearik asit seçilmiştir. Stearik asit, $CH_3(CH_2)_{16}COOH$ formülüyle gösterilen doymuş bir yağ asididir. Stearik asit ve bileşikleri, özellikle tuzları ticari olarak büyük öneme sahiptir. Uzun zincirli alkol esterleri, mum olarak bilinmektedir. Şeker esterleri iyonik olmayan yüzey aktif maddelerin üretiminde kullanılmaktadır. Alkali metal tuzları suda çözünebilir. Bunlar oleatlar ve palmitatlar gibi, tuvalet ve çamaşır sabunlarının esas

maddeleridir. Çinko stearatlar kozmetikte, diğer metal tuzları boyalarda, eczacılıkta ve mantar öldürücü imalatında kullanılır. Stearik asit amidleri, su geçirmez kumaşların imalatında kullanılır ((Nelson, D. L. and Cox, M. M., 2000).

1.3.2. Doymamış Yağ Asitleri

Karbon atomları arasında bir veya daha fazla çift bağ içeren uzun zincirli yağ asitleridir. Doymamış yağ asitleri, organizma tarafından bazı önemli biyolojik maddelerin yapımı için kullanılır. Araşidonik asitten sentezlenen prostaglandinler, düz kaslar üzerine olan etkileri, yağ dokuları metabolizması, adrenalin ve glikojen üzerine olan etkileri nedeniyle önemli maddelerdir.

Yağ asitlerinin karboksil grupları alkollerle geri dönüşümlü olarak esterleşebilir. Esterleşme kendiliğinden yavaş, fakat ısı veya asit varlığında hızlı gerçekleşir (Nelson, D. L. and Cox, M. M., 2000).

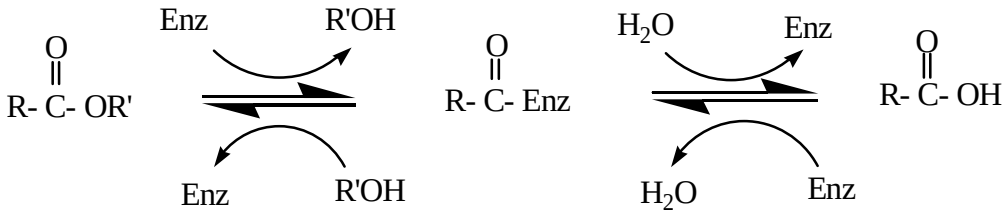
1.4. Lipazlar

Lipazlara biyoteknoloji çalışmalarında çok amaçlı kullanılabilirlikleri, spesifikliğin olmadığı kimyasal proseslere spesifiklik kazandırmaları, yan reaksiyonları önlemeleri ve reaksiyon ürünlerinin ayrılmasıyla ilgili problemleri kolaylaştırmaları gibi birçok özellikleri nedeniyle her geçen gün artan bir ilgi ve talep vardır. Lipazların enzim pazarındaki payının büyümesinde, bu enzimlerin enantio seçicilik, bölgesel seçiciliği ve geniş substrat özgüllüğü gibi özellikleri etkili olmuştur. Lipaz enzimleri yeryüzü flora ve faunasında geniş bir yere sahip olmalarına karşın daha çok bakteri, mantar ve mayalardan oluşan mikrobiyal florada yer almaktadırlar. Lipazlar, domuz ve insan gibi memelilerde, kene otu tohumu (*Ricinus communis*) ve kolza tohumu (*Brassica napus*) gibi yüksek yapılı bitkilerde de bulunmaktadır. Enzim üretiminde daha çok mikrobiyal kaynak tercih edilmekle birlikte, *Candida sp.* , *Pseudomonas sp.* ve *Rhizopus sp.* ön planda yer alan enzim kaynaklarıdır. Lipazlarla yapılan endüstriyel uygulamalarda genellikle saflaştırılmış ticari enzimler tercih edilmektedir (Pandey ve ark., 1999). 1960'ların sonuna doğru lipaz, tıpta sindirim yardımcısı olarak kullanılıyordu. Gelişen teknoloji ile beraber lipazların kullanım alanı da artmıştır (Çizelge 1.2).

Lipazlar, yağ asit esterlerinin hem hidrolizini hem de sentezini katalizleyebilirler. Esterazların aksine, lipazlar sadece su-yağ arayüzeylerine adsorbe olduklarında aktive edilirler. Katalizleme, su ile çözünmez substratın oluşturduğu ara yüzeyde gerçekleşir. Su ve yağın oluşturduğu bu arayüzey enzim aktivitesi için gereklidir. Lipazın immobilizasyonu sırasında lipaz ile birlikte immobilize edilmiş olan su, bu arayüzeyin oluşmasını sağlar.

Lipazlar, su-yağ arayüzeyinde suya karışmayan trigliseridlerin hidrolizini katalize eder. Belirli koşullar altında reaksiyon karışımındaki su miktarı, lipaz tarafından katalize edilen reaksiyonun yönünü belirler. Suyun çok az miktarda olduğu ya da hiç olmadığı zamanlarda yalnızca esterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonları meydana gelirken su içeriğinin yüksek olduğu koşullarda hidroliz reaksiyonları oluşur (Rubin ve Dennis, 1997).

Lipaz tarafından katalizlenen bir ester-hidroliz sentez reaksiyonu aşağıdaki gibi verilebilir:



Şekil 1.3. Lipaz tarafından katalizlenen bir ester-hidroliz sentez reaksiyonu

Başta hidroliz olmak üzere esterifikasyon, transesterifikasyon (iki açilgliserol arasında açil gruplarının değişimi), alkoliz (bir açil grubunun, bir açil gliserol ve bir alkol arasında yer değiştirmesi) ve asidoliz (bir açil grubunun, bir açil gliserol ve bir karboksilik asit arasında yer değiştirmesi) gibi birçok reaksiyonu katalizleme özelliğine sahip lipazlar, ılımlı reaksiyon koşulları altında çalışırlar. Organik çözücülerde kullanılabilirler ve spesifik reaksiyonlara seçicilik gösterirler.

Lipaz katalizli biyoteknolojik uygulamalara aşağıda bazı örnekler verilmiştir:

1. Sentez Reaksiyonları

a) Balmumu sentezi

b) Poliol-yağ asidi esterlerinin sentezi

c) Mikroemülsiyon içerisindeki lipaz katalizli esterifikasyon reaksiyonları

d) Şeker esterlerinin sentezi

e) Açillenmiş glukoz sentezi gibi.

2. İnteresterifikasyon ve Transesterifikasyon

a) Tereyağının interesterifikasyonu

b) Trigliseritlerin interesterifikasyonu

c) Süt yağının oleik asitle interesterifikasyonu

d) Hurma yağının transesterifikasyonu

e) Kilogram ölçekli ester sentezi gibi.

3. Hidroliz

a) Zeytin yağının hidrolizi

b) Balık yağı ile zenginleştirilmiş doymamış yağ asidi sentezi gibi.

Lipaz katalizli transesterifikasyon reaksiyonlarına bazı örnekler aşağıda verilmiştir:

Yağ asiti esterleri, yağ alkolleri ve bilinen diğer yağ asidi ester türevlerinin hazırlanmasında kullanılan ham maddelerdir. Ayrıca gıda endüstrisinde katkı maddesi olarak ve kozmetik endüstrisinde koku veren maddelerin sentezlenmesinde kullanılmaktadır. Endüstride yağ asidi esterleri genel olarak yağların metanol içerisinde 100-200°C'de ısıtılmasıyla elde edilir.

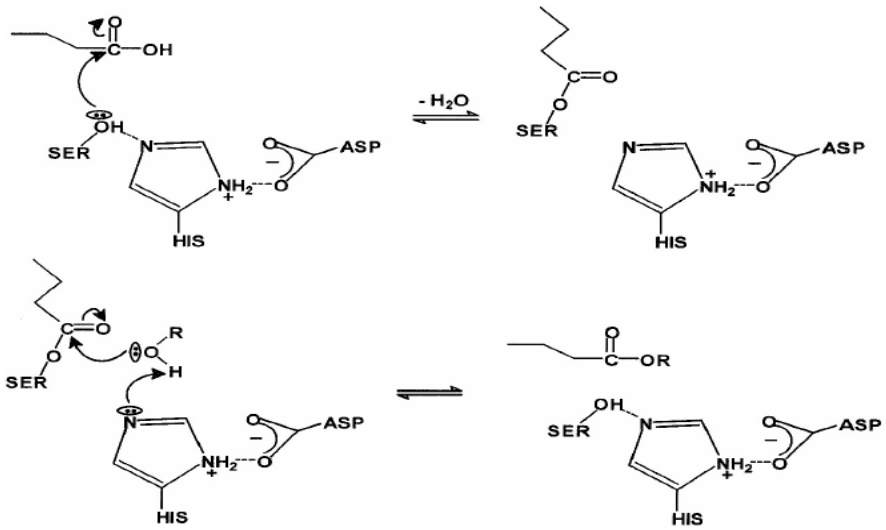
Kısmen açillenmiş sakkarit esterlerinin yüzey aktif, antitümör aktivitesi gösteren ve bitki büyümesini inhibe eden aktiviteleri verilebilir.

Propilen glikol monoesterleri iyi özellikte emülsifiye edici ajanlardır. Bu bileşikler gıdalarda özellikle keklerde, kek karışımlarında ve ekmeklerde kullanılırlar. Bunlar monogliseritlerle beraber kek hacminin arttırılmasında ve homojen bir yapı elde edilmesi amacıyla kullanılır.

Lipazların büyük bir çoğunluğu aktif bölgelerini örten bir helikal segmente (kapak/lid) sahiptir. Lipid kümelerinin varlığında bu kapak açılır ve yüzeylerarası aktivasyon gerçekleşir. Sulu ortamda lipazlar için baskın konformasyon kapalı formdur. Aktif bölge, kapak yapısını oluşturan bir ya da daha fazla "loop" tarafından çözücüden korunmuştur. Kapağın dış parçası hidrofiliktir. Bu konformasyon elektrostatik etkileşimler aracılığıyla kararlı kılınmıştır. Bir su-yağ emülsiyonunda

kapağın açılması, substratların aktif bölgeye girişine izin verir (açık konformasyon). Kapağın açılmasıyla, nükleofilik serin artığı büyük hidrofobik yüzeyler ile etkileşir ve lipaz enziminin aktif forma geçmesi sağlanır (Jaeger ve Reetz, 1999).

C.antartica B enziminin aktif bölgesinde bulunan ve esterifikasyona katılan aminoasitler sırasıyla Ser-152, Asp-176, His-263'dir. Lipaz enziminin esterifikasyon mekanizması aşağıdaki gibi gösterilebilir;



Şekil 1.4. Lipaz esterifikasyon mekanizması (Jaeger ve ark., 1999)

1.4.1. Lipazların Uygulama Alanları

Çok yönlü mikrobiyal lipazlar hızla gelişmekte olan modern biyoteknolojide vazgeçilmez bir role sahip olmuşlardır. Biyolojik önemlerinin yanında lipazlar, yağların işlenmesi, deterjan ve yağ temizleyicilerin üretimi, gıdaların işlenmesi, ilaç ve kimyasal madde sentezleri, kağıt üretimi ve kozmetik ürünlerinin sentezi gibi pek çok alanda karşımıza çıkmaktadır. Lipazlar aynı zamanda yağ atıkları ve poliüretanın parçalanmasını hızlandırmak için kullanılabilmektedir. Kullanımı yaygın bazı ticari lipazlar Çizelge 1.1'de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Kullanımı yaygın bazı ticari lipazlar

Tip	Kaynak	Uygulama Alanı	Üretici Firma
Fungal	*C.rugosa*	Organik sentez	Amano, Biocatalysists, Boehringer
			Mannheim, Fluka, Sigma, Genzyme
	C.antarctica	Organik sentez	Boehringer Mannheim, Novo Nordisk
	T.lanuginosus	Deterjan katkısı	Boehringer Mannheim, Novo Nordisk
	R.miehei	Gıda işlenmesi	Novo Nordisk, Biocatalysists, Amano
Bakteriyel	*B.cepacia*	Organik sentez	Amano, Fluka, Boehringer Mannheim
	P.alcaligenes	Deterjan katkısı	Genencor
	P.mendocina	Deterjan katkısı	Genencor
	Ch. Viscosum	Organik sentez	Asahi, Biocatalysists

Hidrolitik lipazların en önemli ticari uygulamalarının başında çamaşır deterjanlarındaki kullanımları gelmektedir. Toplam lipaz satışının % 32'sini deterjan enzimleri oluşturmaktadır. Tahmini olarak her yıl yaklaşık 1000 ton lipaz katkılı 13 milyar ton deterjan üretilmektedir (Jaeger ve Reetz, 1999).

Günümüzde endüstriyel enzimler, özellikle de lipazlar meyve sularından pişirilmiş hazır gıdalara ve süt ve süt ürünlerinin zenginleştirilmesi gibi alanlarda ve çok çeşitli ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır. Katı ve sıvı yağlar gıdaların önemli bileşenleridir. Trigliseritlerin fiziksel özellikleri, besin değeri ve lezzet; gliserol omurgasındaki yağ asitinin konumundan, zincir uzunluğundan ve doymamışlık derecesinden etkilenir. Lipazlar, gliseritlerdeki yağ asiti zincirinin konumunun değiştirilmesiyle, lipitlerin özelliklerinin değişmesine olanak sağlar. Göreceli olarak ucuz olan bu yöntem, yağın daha değerli bir yağa dönüşümüne olanak tanır.

Çizelge 1.2. Mikrobiyal lipazların endüstriyel uygulamaları

Endüstri	Görevi	Ürün ya da Uygulama
Deterjan	Yağların Hidrolizi	Kumaşlardan yağ lekelerinin uzaklaştırılması
Sür ürünleri	Süt yağının hidrolizi	Peynir ve tereyağındaki tatlandırıcı ajanların geliştirilmesi
	Hızlı olgunlaştırma	Peynir
	Yağların modifikasyonu	Tereyağ
Kozmetik	Sentez	Emülsifiye ediciler, nemlendiriciler
Kağıt	Hidroliz	Geliştirilmiş kalitede kağıt
Deri	Hidroliz	Deri ürünleri
Temizlik	Hidroliz	Yağların uzaklaştırılması
İlaç	Transesterifikasyonu	Sindirimi kolaylaştırıcı düzenleyiciler
	Hidroliz	Özel lipidler
Yağ	Transesterifikasyon	Kakao yağı, margarin, yağ asitleri, gliserol
	Hidroliz	Mono ve diaçil gliseroller
İçecek	Aroma geliştirilmesi	İçecekler
Ekmek	Tat geliştirilmesi	Raf ömrünün uzatılması

Stereo seçici özelliklerinden dolayı lipazlar, birbiriyle karışmayan tek fazlı sistemlerde çeşitli rasemik organik asit karışımlarını çözmek için kullanılmaktadır. Rasemik alkoller aynı zamanda, lipazların kataliz ettiği transesterifikasyon reaksiyonları ile oluşturulan saf enantiyomerler içinde de çözülebilirler (Pandey ve ark., 1999).

Bu çalışmada şeker esterlerinin, şekerler ve yağ asitleri gibi doğal yenilenebilir kaynakların kullanımıyla sentezlenmesi suretiyle, pahalı açil donörlerin ya da modifiye edilmiş şekerlerin kullanımının önüne geçilerek üretim maliyetlerinin düşürülmesi hedeflenmiştir. Çalışmanın amacı, fruktoz-stearatın t-butanol:DMSO çözücü karışımı ve iyonik sıvılar içinde *C.antarctica* ve *M.miehei* immobilize lipazları katalizörlüğünde sentezlenmesidir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Schlotterbeck ve ark. (1993), immobilize *Mucor miehei* (Lipozyme IM 60) lipazını kullanarak hekzan içerisinde fruktozun stearik asit esterinin sentezini, çözünürleştirici ajan olarak kullandıkları fenilboronik asit varlığında gerçekleştirmişlerdir. 60°C'de, fenilboronik asit / fruktoz molar oranı 1,5/1; stearik asit / fruktoz molar oranı 1/3 olduğu koşullarda, 12 saat reaksiyon süresi sonunda ürün dönüşümünü % 40 olarak gözlemlemişlerdir. Dönüşümü kantitatif olarak metanol/su (85/15, v/v) çözücü sisteminde, örnekleri görünür hale getirmek üzere α-naftol/sülfürik asit kullanarak TLC ile belirlemişlerdir. Oluşan fruktoz monostearatın yapısını tayin etmek için ^{1}H ve ^{13}C NMR kullanmışlardır.

Oguntimein ve ark. (1993), SP 382 (*Candida sp.*) ve Lipozyme TM 20 (*M.miehei*) immobilize enzimlerini kullanarak, fruktoz ve glukozun stearik asit esterlerinin sentezini t-butanol içerisinde gerçekleştirmişlerdir. Şeker ve yağ asidi molar oranı 1:1 olduğunda, 40°C'de ve 24 saat süre sonunda ürün dönüşümünü % 10-24 arasında belirlemişlerdir. Bütil veya fenilboronik asit varlığında glukoz esteri sentezini hekzan, heptan, benzen ve toluen içerisinde gerçekleştirmişlerdir. *M.miehei* (20 mg lipaz/mL t-butanol) ile fruktoz dönüşümünü % 8,9, glukoz dönüşümünü % 5,3; *Candida sp.* (20 mg lipaz/mL t-butanol) ile fruktoz dönüşümünü % 8,6 ve glukoz dönüşümünü % 4,3 olarak belirlemişlerdir. Örneklerin kantitatif analizini HPLC ile metanol/asetik asit (99,7/0,3 v/v) hareketli fazı kullanarak 20°C'de, 1,0mL/dk akış hızında gerçekleştirmiş ve hesaplamada pik alanlarından yararlanmışlardır. Fruktoz esterini HPLC ile saflaştırmış ve yapı tayinini NMR ile yapmışlardır.

Tsitsimpikou ve ark. (1998), glukoz, fruktoz, mannoz ve arabinoz gibi monosakkaritlerin laurik asit ile yer seçimli açilasyonunu hekzan içerisinde ticari *C.rugosa* ve *C.antarctica* immobilize lipazlarını kullanarak 24 saat reaksiyon süresinde ve 40°C'de gerçekleştirmişlerdir. Şekerlerin hekzan içerisindeki düşük çözünürlüğünün üstesinden gelmek için şekerleri silika jel üzerine absorbe etmişlerdir. Her iki enzim için de sentez işleminde heksozların pentozlara oranla daha tercih edilebilir sonuçlar verdiğini rapor etmişlerdir. Enzim aktiviteleri üzerine

sıcaklık, su miktarı ve şeker/yağ asidi molar oranının etkisini araştırmışlardır. Her iki enzimin düşük su aktivitesinde aktif olduklarını ve su aktivitesinin *C.rugosa* için 0,53; *C.antarctica* için ise 0,75 olduğunu bildirmişlerdir. *C.rugosa* için şeker/yağ asidi molar oranını 1/2,5; *C.antarctica* için ise 1/6 olarak belirlemişlerdir. Her iki enzim için de sıcaklık 30°C'den 50°C'ye çıkarıldığında ürün oluşumunda artış olduğunu gözlemlemişlerdir. Şeker olarak fruktoz kullanıldığında *C.antarctica* ile en yüksek verim % 89, *C.rugosa* ile ise % 48 olarak elde ettiklerini rapor etmişlerdir. Ürünün kantitatif analizini HPLC ile C18 kolonu ve refraktif indeks dedektörü kullanarak, asetonitril/metanol/su (50/15/35, v/v/v) çözücü karışımı ile 1mL/dk akış hızında gerçekleştirmişlerdir.

Tsuzuki ve ark. (1999), *Pseudomonas sp.* lipazını tetrahidrofuran ortamında sentetik bir deterjan olan didodesil glukosilglutamat ile modifiye etmiş ve elde ettikleri modifiye lipazı kullanarak susuz ortamda şekerlerin yağ asit esterlerini elde etmişlerdir. Organik çözücü olarak n-hekzan kullanmışlardır. Çalışmada glukoz ve palmitik asit (1:1 mol) kullanarak, 16 saat inkübasyon sonunda glukozun % 90'dan fazlasının dönüşüme uğradığını gözlemlemiş ve 6-O-palmitoilglukoz sentezlemişlerdir. Diğer mono (mannoz, arabinoz, galaktoz, ksiloz) ve disakkaritlerin de (sükroz, maltoz, laktoz, trehaloz) n-hekzan ortamında, modifiye lipaz katalizörlüğünde palmitik asit esterlerini yüksek verimle elde etmişlerdir. Organik çözücü ortamında (n-hekzan, n-oktan, iso-oktan, n-dodekan) modifiye lipazın katalitik etkisini, serbest lipaz ile kıyaslamış ve serbest lipazın organik çözücü ortamında % 2'lik bir ürün oluştururken, modifiye lipazın % 90'larda ürün oluşturduğunu rapor etmişlerdir. Glukoz esterinin analizini asetonitril/etanol/su (95/95/10, v/v/v) hareketli fazını kullandıkları HPLC cihazı ile yapmış ve ürünün 10,8. dk'da geldiğini rapor etmişlerdir. Ürünün saflaştırılması için TSK-jel ODS kolonu kullanmışlardır. Ayırma işlemini asetonitril/etanol/su (10/10/0,5 v/v/v) çözücü karışımı ile gerçekleştirmiş ve sentezlenen ürünün yapısını ^{13}C-NMR ile tayin etmişlerdir.

Degn ve ark. (1999), *C.antarctica* (Novozym 435) ve *M.miehei* (Lipozym IM) immobilize lipazlarını kullanarak, t-butanol ortamında % 90 verimle 6-O-açilat-α-D-glukopiranozun sentezini gerçekleştirmişlerdir. Açil donör olarak asetik asit,

bütanoik asit, kapronik (6:0), kaprilik (8:0), kaprik (10:0), laurik (12:0), palmitik asit (16:0), miristik asit (14:0), stearik asit (18:0) kullanmışlardır. Asetik asit dışında, *C.antarctica* lipazının aktivitesini, açil donörün zincir uzunluğundan bağımsız ve 3,9 ± 0,4 µmol glukoz / dk g enzim olarak belirlemişlerdir. *Mucor miehei* lipazının katalitik aktivitesinin ise açil donörün zincir uzunluğunun artmasıyla arttığını gözlemlemiş ve stearik asit kullanımında maksimum olduğunu (0,45 µmol glukoz / dk g enzim) rapor etmişlerdir. Substrat olarak maltoz kullandıklarında *C.antarctica* and *M.miehei* lipazlarının katalitik aktivitelerinde azalma gözlemlemiş, maltotrioz kullanıldığında ise hiç aktivite görülmediğini belirtmişlerdir. Saflaştırma işlemi için, su ile ekstraksiyon yaparak reaksiyona girmeden kalan glukozu uzaklaştırmış, ardından kalan yağ asidi ve ester karışımını slikajel 60 kolonuna uygulamış, kloroform/metanol (95/15, v/v) çözücü karışımı ile yağ asitlerini ayırmış ve metanol ile glukoz esterini kolondan uzaklaştırmışlardır. Elde edilen ürünlerin analizini TLC, ^{1}H ve ^{13}C NMR kullanarak yapmışlardır.

Coulon ve ark. (1999), immobilize *C.antarctica* lipazını kullanarak, 2-metil-2-bütanol ortamında, farklı açil donörlerinin varlığında (oleik asit, oleik asit metil esteri, kolza tohumu) düşük basınçlı reaktörde fruktoz esterlerini sentezlemişlerdir. Basıncın, açil donörlerin, şeker/açil donör molar oranının dönüşüme etkisini incelemişlerdir. Basıncın çok büyük etkisi olduğunu gözlemlemişlerdir. 200 mbar basınçta, yarı atmosferik basınca kıyasla fruktozun % 90'ından fazlasının açillendiğini rapor etmişlerdir. Açil donör olarak oleik asit, oleik asit metil esteri ve kolza tohumu kullandıklarında ürün dönüşümünü sırasıyla % 83,7; 91,2; 86,4 şeklinde bulduklarını bildirmişlerdir. Her iki substratında eş molar konsantrasyonda kullanılmasıyla en iyi sonucu gözlemlemişlerdir. Ürünün kantitatif analizini HPLC kullanımıyla metanol:su hareketli fazı varlığında gerçekleştirmişlerdir.

Ferrer ve ark. (1999), laurik asit ve palmitik asit vinil esterlerini kullanarak transesterifikasyonla organik çözücü karışımında 6-O-lauroilsükroz ve 6-O-palmitoilsükroz esterlerinin enzimatik sentezini gerçekleştirmişlerdir. Esterifikasyon işleminde 2-metil-2-bütanol:DMSO (4:1, v/v) çözücü karışımını ve *Humicola lanuginosa* (diatome toprağına adsorbe) immobilize lipazını kullanmışlardır. 24 saat içerisinde, sükroz/vinil ester molar oranı 1:10 olduğunda, 40°C'de 50 mg lipaz/mL

varlığında sükrozun % 70'inin 6-O-lauroilsükroza dönüştüğünü gözlemlemişlerdir. 48 saat içerisinde 25 mg lipaz/mL varlığında sükrozun % 80'ının 6-O-palmitoilsükroza dönüştüğünü bildirmişlerdir. Ürün oluşumunu HPLC ile incelemiş, saflaştırmayı slika jel 60 kolonu ile kloroform/metanol (20/1, v/v) çözücü karışımı ile gerçekleştirmişlerdir.

Rahman ve ark. (2000), fruktozun palm yağ asitleri ile esterifikasyonunu 2-metil-2-propanol içerisinde *Lipozyme IM* immobilize lipazı katalizörlüğünde, 24 saat ve 55°C'de gerçekleştirmişlerdir. Örneklerin kalitatif analizini HPLC cihazında C18 kolonu kullanarak, metanol/asetik asit (99,7:0,3, v/v) hareketli fazı ve 0,7 dk/mL akış hızı kullanarak belirlemişlerdir. Silikajel 60 kolon dolgu maddesini kullanarak ürünü, reaksiyona girmeden kalan yağ asitlerinden ayırmışlardır. Kloroform kullanarak serbest yağ asitlerini, kloroform/metanol/su (64/10/1, v/v/v) çözücü karışımı ile de fruktoz esterini ayırdıklarını rapor etmişlerdir. Elde ettikleri ürünün erime noktası, hidrofilik/lipofilik denge (HLB) değeri, görünüşü, sabunlaşma sayısı, farklı polariteye sahip çözücülerdeki (su, aseton, kloroform, metanol) çözünürlükleri gibi bazı fiziksel ve kimyasal özelliklerini incelemişlerdir.

Watanabe ve ark. (2000), 23 adet karbohidratın laurik asit monoesterlerini aseton ortamında immobilize lipaz (*Alcaligenes sp., Pseudomonas cepacia*) ve proteaz (*Bacillus sp.*) katalizörlüğünde sentezleyerek, *Streptococcus mutans* bakterilerinin gelişimi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Ester sentezini 60°C'de 48 saat içerisinde gerçekleştirmiş ve fruktoz lauratı % 51 verimle sentezlemişlerdir. Fruktoz lauratı silika jel kolonu kullanarak asetonitril:metanol (12/7, v/v) çözücü karışımı ile saflaştırmışlardır. Sentezlenen karbohidrat esterleri arasında galaktoz ve fruktoz lauratın en yüksek inhibitör etki gösterdiğini fakat diğer heksoz lauratların antibakteriyel aktivite göstermediğini rapor etmişlerdir.

Soultani ve ark. (2001), 2-metil-2-butanol ortamında fruktozun farklı zincir uzunluğundaki (C8-C18) yağ asitleri ile esterifikasyonunu *C.antarctica* lipazı katalizörlüğünde gerçekleştirmişlerdir. Başlangıç fruktoz/yağ asidi molar oranının, yağ asidinin karbon zincir uzunluğunun reaksiyon performansına etkisini incelemişlerdir. Bunu belirlemek amacıyla; 1:1'den 1:5'e kadar değişen molar oranlarda fruktoz/yağ asidi ve karbon zincirinin uzunluğunun etkisini incelemek

amacıyla da C8'den C18'e kadar olan yağ asitleriyle çalışmışlardır. Hangi molar oranı kullanılırsa kullanılsın, C18'li yağ asidi kullanıldığında en yüksek konsantrasyonu 73 g/l, fruktoz ve yağ asidi dönüşümünü % 100 ve % 80, ilk reaksiyon hızını 40 g/l dk olarak elde etmişlerdir. En iyi yağ asidi dönüşümü ve başlangıç reaksiyon hızını, en düşük molar oranının verdiğini gözlemlemişlerdir. Ürünün kalitatif analizini TLC ile kloroform/metanol/asetik asit/su (80/15/8/2, v/v/v/v) karışımı kullanarak silikajel tabakada gerçekleştirmişlerdir. Ürün konsantrasyonu HPLC ile metanol:su karışımı kullanarak 1mL/dk akış hızında ve 55°C' de oluşan piklerin alanlarından yararlanarak belirlemişlerdir.

Şekeroğlu ve ark. (2002), immobilize lipaz kullanarak (*C.antarctica B*, Novozym 435) fruktozun laurik asit esterini aseton ortanında sentezlemişlerdir. Reaksiyonun ester sentezi yönüne kayması moleküler elek kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Fruktozun laurik asitle mono- di- ve daha yüksek esterlerini sentezleyerek, elde edilen ürünlerin analizini yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) ile yapmışlardır. Laurik asit : fruktoz molar oranı 5:1 olduğunda, mono-, di- ve daha yüksek esterlerin 96 saat reaksiyon süresi sonunda 37, 53 ve 98 mg elde edildiğini gözlemlemişlerdir. Ürünlerin kalitatif analizini HPLC'de C18 kolonu ve asetonitril:su.tetrahidrofuran:asetik asit (70/25/5/0,1, v/v/v/v) çözücü karışımı kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Silika jel ile paketledikleri kolon yardımıyla kloroform:metanol hareketli fazını kullanarak ürünleri saflaştırmış ve ardından elde ettikleri esterlerin sürfaktan özelliklerini incelemişlerdir. Fruktoz monolaurat ve fruktoz dilauratın hidrofilik/lipofilik denge değerini 8,95 ve 5,3 olarak belirlemiş, kritik miçel derişimlerini (CMC) ise, sırasıyla 7,20 x 10^{-5} ve 6,40 x 10^{-5} M olarak hesaplamışlardır. Esterlerin, geçirgenlik ve yüzey gerilimi eğrilerinden elde edilen kritik miçel derişimlerini hemen hemen benzer bulmuşlardır. Surfaktanın konsantrasyonu % 0,25'ten % 0,50 (w/v)'ye arttığı zaman, emülsiyon kararlılığının da arrttığını gözlemlemişlerdir. Fruktoz dilauratın diğer esterlere göre en iyi emülsiyon kararlılığı gösterdiğini bildirmişlerdir.

Reyes-Duarte ve ark. (2004), sükroz palmitatın sentezini, 2-metil-2-butanol:DMSO karışımında *C.antarctica* B (Novozym 435) immobilize lipazını kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Sükroz ve açil grubu vericisinin miktarı, karışıma

eklenen DMSO yüzdesi gibi parametreleri incelemişlerdir. En iyi deneysel koşullar altında (% 15 DMSO, 0,1 mol/L sukroz, 0,3 mol/L vinil palmitat) 120 saat inkübasyon süresinde maksimum ürün olarak 45 g/L sükroz palmitat elde etmişlerdir. 0,6 mol/L metil veya etil palmitat, 0,2 mol/L sukroz ile % 20 DMSO ortamında 120 saat inkübasyon sonunda en yüksek verimi 7,3 g/L olarak belirlemişlerdir. Serbest yağ asidinin ve DMSO'nun ortamdaki yüzdesinin monoester/diester seçimliliğine etkisi incelemişlerdir. Ürünün kantitatif analizini HPLC'de C18 kolonu ve % 0,1 (v/v) oranında asetik asit içeren metanol/su (95/5, v/v) çözücü karışımı kullanarak gerçekleştirmişlerdir.

Ferrer ve ark. (2005), şekerlerin yağ asidi vinil esterleriyle transesterifikasyonunu 2-metil-2-butanol:DMSO (5:1, v/v) çözücü karışımı içerisinde, 40°C'de, 100 mg enzim/mL katalizörlüğünde gerçekleştirmişlerdir. Reaksiyon *Thermomyces lanuginosus* (silikaya immobilize) ve *C.antarctica B* (Lewatit'e adsorbe) lipazlarının kullanımıyla gerçekleştirilmiştir. *C.antarctica B* lipazının özellikle 6,6′-diaçilsukrozun sentezini, *Thermomyces lanuginosus* lipazının ise 6-O-açilsukrozun sentezlenmesini seçimli olarak katalizlediğini rapor etmişlerdir. *Thermomyces lanuginosus* 'un 20 tekrar kullanımı sonucunda başlangıç aktivitesinin % 80'den fazlasını koruduğunu gözlemlemişlerdir. Her iki lipazın da, 6′-O-palmitoilmaltoz ve 6-O-lauroilglukozun yerseçimli sentezinde benzer etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Çeşitli mikroorganizmaların (gram-pozitif, gram-negatif bakteriler ve maya) gelişimine şeker esterlerinin etkisini incelemiş, 6′-O-lauroilmaltoz ve 6-O-lauroilsukroz ortamında, konsantrasyonu 4 mg/mL olan *Lactobacillus plantarum* ve 0.8 mg/mL olan *Bacillus sp.*'nin gelişiminin inhibe olduğunu gözlemlemişlerdir. Sukroz dilaurat ve 6-O-lauroilglukoz, antimikrobiyal aktivite göstermemiş, bunun sebebini ise onların sulu ortamdaki düşük çözünürlüğüne dayandırmışlardır. Mayaların inhibisyonuna baktıklarında, karbohidrat esterlerinin hiçbirinin maya (*Zygosaccharomyces rouxii* ve *Pichia jadinii*) gelişimini yeterli ölçüde inhibe edemediğini gözlemlemişlerdir. Ürün oluşumunu HPLC'de C18 kolonu kullanarak metanol/su (90/10, v/v) çözücü karışımında takip etmiş, ürünü kolon kromatografisi ile saflaştırmış ve spektroskopik tekniklerle (NMR, FT-IR) karakterize etmişlerdir.

Sabeder ve ark. (2005), fruktozun palmitik asit esterinin lipaz katalizli sentezini, dört farklı organik çözücü (t-butanol, etil metil keton, aseton ve 2-metil-2-butanol) ortamında, 3 farklı immobilize enzim (Novozym 435 *C.antarctica B*, SP 382 *C.antartica B* ve Lipozym IM *R.miehei*) kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Enzim konsantrasyonu, moleküler elek konsantrasyonu, sıcaklık ve karıştırma hızının reaksiyona etkisini incelemişlerdir. Optimum koşulları; fruktoz: palmitik asit molar oranı 0,5:0,5 ve substratların % 10 (w/w substrat)'u kadar *C.antarctica* B (Novozym 435) immobilize lipazı, % 12,1 (w/w) moleküler elek, 600 rpm karıştırma hızı ve sıcaklığı 60^0C olarak belirlemişlerdir. En yüksek dönüşüm *C.antarctica* B (Novozym 435) enzimi varlığında 72 saat sonunda 60^0C'de etil metil keton varlığında % 82 olarak elde etmişlerdir. Aynı koşullarda aseton içerisinde dönüşümü % 69, t-butanol içerisinde % 64 ve 2-metil-2-butanol içerisinde ise % 78 olarak belirlemişlerdir.

Ganske ve Bornscheuer (2005), glukozun yağ asidi vinil esterleri ile transesterifikasyonunu, iyonik sıvı (1-butil-3-metil imidazolyum tetrafloroborat [BMIM][BF_4] veya 1-butil-3-metil imidazolyum hekzaflorofosfat [BMIM][PF_6]) ve organik bir çözücü olan t-butanol içeren iki fazlı sistem içerisinde enzimatik olarak gerçekleştirmişlerdir. En iyi sonuç veren enzimi, ticari olarak mevcut olan *C.antarctica* (CAL-B) olarak belirlemiş, fakat aynı zamanda *Thermomyces lanuginosa* (TLL) lipazınında, dönüşüm için iyi bir sonuç verdiğini belirtmişlerdir. Reaksiyon koşullarını; zincir uzunluğu, açil donörün türü, sıcaklık, reaksiyon süresi ve eklenen kosolventin yüzdesine göre optimize etmişlerdir. Glukoz/yağ asidi vinil ester molar oranı 1:2 olduğunda, 60°C'de, 72 saat reaksiyon süresinde [BMIM][PF_6]:t-butanol (60/40, v/v) çözücü karışımında dönüşümü % 62 olarak belirlemişlerdir. Saf t-butanol ortamında ise dönüşümün % 77 olduğunu, sadece iyonik sıvı ortamında ise hiçbir dönüşüm gözlemlemediklerini rapor etmişlerdir. Ürün analizini HPLC'de C18 kolonu kullanımıyla kloroform:metanol:asetonitril:su (70/20/8/2, v/v/v/v) çözücü karışımı ile gerçekleştirmişlerdir.

Afach ve ark. (2005), D-allozun çeşitli yağ asitlerinin vinil esterleriyle *C.antarctica* katalizli transesterifikasyonunu asetonitril içerisinde 48 saat ve 45°C'de gerçekleştirmişlerdir. D-alloz 6-alkanoatları yüksek seçimlilikle sentezlemişlerdir. D-alloz kaprilatı % 90, D-alloz kaprat ve D-alloz lauratı sırasıyla % 73 ve % 56

oranında elde ettiklerini rapor etmişlerdir. Ürünü silika jel kolonu kullanarak etil asetat:metanol:su (20/2/1, v/v/v) çözücü karışımı ile saflaştırmış, ^{1}H- ve ^{13}C-NMR ile yapı tayini yapmışlardır.

Yoo ve ark. (2007), çeşitli şekerlerin (ksilitol, fruktoz, sükroz, sorbitol, glukoz, metil-glikozid) oleik asit esterlerinin sentezini, 2-metil 2-bütanol ortamında, 60°C'de, 12 saat reaksiyon süresinde, immobilize *C.antarctica* B lipazını kullanarak gerçekleştirmişlerdir. En yüksek ürün eldesini, şeker olarak ksilitol kullandıklarında % 98 olarak gözlemlemişlerdir. Optimum ksilitol:oleik asit molar oranını 3:1 bulmuşlardır. En yüksek ürün eldesi için reaksiyon ortamındaki su içeriğinin % 0,15'in altında tutulması gerektiğini rapor etmişlerdir. Çalışmada kullandıkları enzimin yarı ömrünü 9 tekrar kullanımdan sonra gözlemlediklerini bildirmişlerdir. Yağ asidi analizlerini C18 kolonu ve refraktif indeks dedektörünü kullandıkları HPLC cihazı yardımıyla gerçekleştirmiş olup, analiz esnasında aseton:metanol:su (65/15/20, v/v/v) hareketli fazını kullanmışlardır.

Lee ve ark. (2007), glukoz, fruktoz ve sükrozun vinil laurat ve laurik asit esterlerini *C.antarctica* immobilize lipazı katalizörlüğünde iyonik sıvılar ([Bmim][TfO] ve 1-etil-3-metil imidazolyum triflorometansülfonat [Emim][TfO]) içerisinde gerçekleştirmişlerdir. Aşırı doygun iyonik sıvılardaki glukoz konsantrasyonunun (60°C), glukozun bu iyonik sıvılar içerisinde 25°C'deki çözünürlüklerinden yaklaşık 10-20 kat daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. [Bmim][TfO]'da aşırı doygun çözeltisi hazırlanan glukozun, vinil laurat ve laurik asit ile esterifikasyonunda 50°C'de 24 saat sonunda % 96'ya varan bir dönüşüm gözlemlediklerini rapor etmişlerdir. Reaksiyon ortamındaki glukoz miktarını DNSA metodu ile takip ederek, azalan glukoza bağlı olarak ürün dönüşümünü hesaplamışlardır. Oluşan 6-O-lauroil-D-glukoz konsantrasyonunu C18 kolonu ve refraktif indeks dedektörü ile kombine olmuş HPLC cihazı ile metanol:su (90/10, v/v) hareketli fazını kullanarak 1,0 mL/dk akış hızında belirlemişlerdir. Ürünün alıkonma süresini 4,5 dk olarak belirlemişlerdir. Reaksiyon ortamındaki su miktarının ürün oluşum üzerine etkisini araştırmışlardır. İyonik sıvılar içerisindeki su miktarının, dönüşümü hızla düşürdüğünü bildirmişler ve bu durumu ortamdaki suyun, lipaz enziminin esterifikasyon aktivitesini azaltmasıyla açıklamışlardır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Araştırmada kullanılan tüm reaktifler analitik saflıkta olup Merck, Fluka veya Sigma-Aldrich firmalarından sağlanmıştır. Araştırmada kullanılan kimyasallar, araç ve gereçler şunlardır:

Kimyasallar: Akrilik reçine üzerine immobilize *C.antarctica B* lipazı (Novozym 435, ester sentez aktivitesi propil laurat cinsinden 10,000 PLU/g), büyük gözenekli iyon-değiştirici reineler üzerine immobilize *M.miehei* (Lipozyme, 1U tristearinin başlangıç dönüşüm hızı olarak, aktivitesi 86,8 U/g), fruktoz, t-butanol, moleküler elek (3 A°), stearik asit, metanol, kloroform, sülfürik asit, α-naftol, fenol ftalein, sodyum hidroksit, DMSO, [Bmim][TfO], [Bmim][PF_6], dinitrosalisilik asit (DNSA), fenol, sodyum sülfit, sodyum hidroksit, sodyum-potasyum tartarat, piridin, bakır (II) asetat, etanol, α-naftol.

Araç ve gereçler: Magnetik karıştırıcı, termostatlı çalkalayıcılı su banyosu, analitik terazi, büret, otomatik pipet (Eppendorf), inkübatör (ES 500), santrifüj, HPLC (Shimadzu), TLC Silika jel 60, FT-IR Spektrometresi (Perkin Elmer).

3.2. Metod

3.2.1. İyonik Sıvılarda Fruktoz-stearat Sentezi

İyonik sıvı ortamında esterifikasyon için literatürde Lee ve ark. (2007) tarafından önerilen yöntem esas alınmıştır. [Bmim][TfO] ve [Bmim][PF_6] çözücülerinin 1mL'si içerisine ayrı ayrı 50 mg fruktoz eklenir. Karışım 60°C'de 12 saat boyunca termostatlı çalkalayıcılı su banyosunda karıştırılır. Çözünmeden kalan fruktozu ayırabilmek amacıyla karışım 5 dk boyunca 10.000 rpm'de santrifüj edilir.

Fruktoz içeriği belirlenmek üzere süpernatant ayrılır. DNSA metodu (Miller, 1959) ile bir fruktoz standardı kullanılarak çözünen fruktoz miktarı belirlenir.

3.2.2. T-butanol:DMSO Çözücü Karışımında Fruktoz-stearat Sentezi

T-butanol ortamında fruktozun stearik asitle lipaz katalizli esterifikasyonu için literatürde Oguntimein ve ark. (1993) tarafından önerilen yöntem esas alınmıştır. Fruktozun t-butanol içerisindeki düşük çözünürlüğü sebebiyle reaksiyon ortamına yardımcı çözücü olarak düşük miktarda DMSO eklenmiştir. Çeşitli oranlar denenerek hem fruktozun hem de stearik asitin çözünürleştirilebildiği ve karışımın tek fazlı görünüme sahip olduğu t-butanol:DMSO oranı 5/0,5 (v/v) olarak belirlenmiştir.

0,3 mmol fruktoz (54 mg) 500 µL DMSO içerisinde çözündükten sonra üzerine 5 mL t-butanol takiben 0,3 mmol (85,344 mg) stearik asit eklenerek her ikisinin de çözünmesi sağlanmıştır. Reaksiyon süresince oluşan suyu uzaklaştırmak için moleküler elek kullanılmıştır.

3.2.3. Fruktoz Stearat Oluşumunun Belirlenmesi

Fruktoz-stearat oluşumu kantitatif olarak volumetrik titrasyon ve HPLC ile belirlenmiştir. Ester içeriği reaksiyon ortamında kalan serbest stearik asit miktarından gidilerek % dönüşüm olarak verilmiştir.

3.2.3.1. Volumetrik Titrasyon

Örneklerin ester içeriği kantitatif olarak literatürde Sabeder ve ark. (2005) tarafından önerilen titrimetrik yöntem kullanılarak belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı içerisindeki enzim ve moleküler elek gibi katı partiküller reaksiyon ortamından uzaklaştırıldıktan sonra ortamda reaksiyona girmeden kalan stearik asit miktarı 0,05 M NaOH çözeltisi ile titre edilerek belirlenmiştir. Aynı yöntemle kör deneme yapılmak suretiyle, reaksiyon sonunda oluşan fruktoz-stearat miktarı, reaksiyon

ortamındaki azalan stearik asit miktarı üzerinden hesaplanmış ve % dönüşüm olarak tanımlanmıştır.

$$\% \text{ Dönüşüm} = \frac{\text{Reaksiyona giren stearik asit miktarı - Reaksiyon sonunda kalan stearik asit miktarı}}{\text{Reaksiyona giren stearik asit miktarı}} \times 100$$

3.2.3.2. HPLC Analizleri

HPLC analizleri Shimadzu marka cihaz ile yapılmıştır. Sitem LC-20AD dual pompa, CTO-20A kolon fırını ve RID-10A refraktif indeks dedektör ile konfigüre edilmiştir. Analizler Nukleosil C18, 5 μm kolonunda (250 x 4.6 mm), 0,5 mL/dk akış hızında 40°C'de yapılmıştır. Hareketli faz olarak kloroform/metanol/su (1/2/0,8 v/v/v) çözücü karışımı kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar sıvı kromatografi çözümleyici (LC solution) yazılım programı ile değerlendirilmiştir. Standart olarak stearik asit kullanılmıştır.

3.2.2'de belirtilen metoda göre sentez işlemi yapılır. Enzim ve moleküler elek gibi katı partiküller reaksiyon ortamından ayrıldıktan sonra, çözücü ortamdan buharlaştırılarak uzaklaştırılır. Reaksiyona girmeden kalan fruktoz ortamdan su ile ekstrakte edilir. Su fazı süzülürek katı maddeden ayrılır. Fruktoz-stearat ve stearik asit karışımını içeren katı, HPLC'de kullanılan hareketli faz içerisinde çözülerek, HPLC'de ürünün analizi kantitatif olarak yapılır. Diğer taraftan standart olarak kullanılmak üzere farklı konsantrasyonlarda stearik asit çözeltileri hazırlanır. Stearik asitin HPLC'de vermiş olduğu piklerin alanlarından yararlanılarak, konsantrasyonlara karşı alanların grafiğe geçirilmesiyle bir standart grafik elde edilir. Reaksiyon sonunda oluşan ürün miktarı, reaksiyon ortamındaki azalan stearik asit miktarı üzerinden hesaplanarak % dönüşüm olarak verilir.

3.3. Reaksiyon Koşullarının Optimizasyonu

3.3.1. Sıcaklık

Sıcaklık değişiminin fruktoz-stearat oluşumu üzerine etkisini incelemek amacıyla sentez işlemi 3.2.2'de belirtilen koşullarda 5 farklı sıcaklıkta (45, 50, 55, 60, 65°C) gerçekleştirilir.

3.3.2. Reaksiyon Süresi

Fruktoz-stearat oluşumu üzerine reaksiyon süresinin etkisini incelemek amacıyla sentez işlemi farklı zaman aralıklarında (24, 48, 72 sa) gerçekleştirilir.

3.3.3. Enzim Miktarı

Belirlenen optimum koşullarda, reaksiyon karışımının mililitresi başına sırasıyla 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 ve 100 mg lipaz enzimi ilaveleriyle sentez işlemi yapılarak, enzim derişimindeki değişimin fruktoz-stearat oluşumu üzerine etkisi incelenir.

3.3.4. Moleküler Elek Miktarı

Reaksiyon süresince oluşan suyu uzaklaştırmak amacıyla, belirlenen optimum koşullarda, reaksiyon karışımının mililitresi başına sırasıyla 10, 15, 20 ve 25 mg olmak üzere artan miktarlarda moleküler elek eklenerek sentez işlemi gerçekleştirilir.

3.3.5. Reaksiyon Ortamına Eklenen Su Miktarı

Başlangıç su miktarının fruktoz-stearat oluşumu üzerine etkisini incelemek amacıyla sentez öncesi t-butanol:DMSO karışımına % 1, 2, 4, 6, 8, 10 (%) oranında olacak şekilde saf su eklenerek, belirlenen optimum koşullarda sentez gerçekleştirilir.

3.3.6. Metal İyonları

Belirlenen optimum koşullarda, reaksiyon ortamına derişimi 1mM olacak şekilde metal tuzları ($CaCl_2$, $MgCl_2$, $MnCl_2$, $CuCl_2$ ve $HgCl_2$) eklenerek, metal iyonlarının fruktoz-stearat oluşumu üzerine etkisi incelenir.

3.3.7. Fruktoz / Stearik Asit Mol Oranı

Her bir denemede reaksiyon karışımının mililitresi başına fruktoz/stearik asit mol oranı 0,06/0,06; 0,18/0,06; 0,3/0,06; 0,3/0,1; 0,3/0,2; 0,3/0,6 olacak şekilde arttırılmak suretiyle, belirlenen optimum koşullarda reaksiyon gerçekleştirilerek, substrat miktarlarındaki değişimin fruktoz-stearat oluşumu üzerine etkisi incelenir.

3.4. İnce Tabaka Kromatografi (TLC) Analizi

Optimum koşullarda sentez işlemi yapıldıktan sonra reaksiyon ortamından çözücü uçurulur ve kalan katı madde toluen:etilasetat:metanol:su (10:5:4,5:0,4 v:v:v:v) çözücü karışımında çözülür. Hazırlanan karışımdan alınan numune TLC silika jel 60 plaka üzerine uygulanır. Standart olarak aynı çözücü karışımında çözeltisi hazırlanan fruktoz kullanılır. Her iki örnek ayrı ayrı plakaya uygulandıktan sonra toluen:etilasetat:metanol:su (10:5:4,5:0,4 v:v:v) yürütücü sisteminde yürütülür. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra görüntüleme reaktifine [% 5 H_2SO_4 (v/v) ve % 0,5 (w/v) α-naftol içeren etil alkol] daldırılır. Etüvde 150°C'de 10 dk. yakılarak fruktoz-stearat oluşumu gözlenir.

3.5. Fruktoz-stearatın Saflaştırılması

Belirlenen optimum koşullarda sentez işlemi gerçekleştirildikten sonra reaksiyon ortamındaki enzim ve moleküler elek santrifüj ile karışımdan ayrılır. T-butanol:DMSO uçurulur ve kalan katı içerisinden reaksiyona girmeden kalan fruktoz su ile ekstrakte edilir. Su fazı ayrılır ve ortamda kalan fruktoz-stearat ile stearik asit

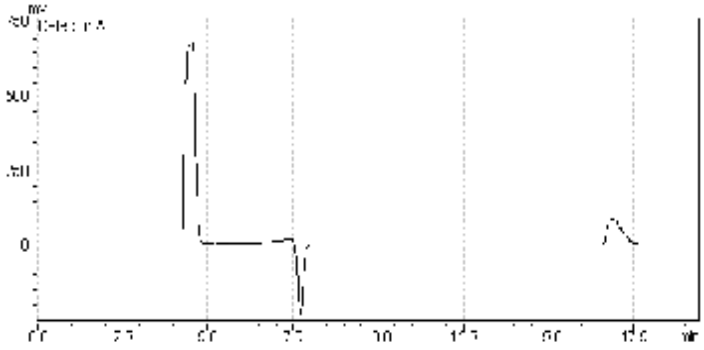
metanol:kloroform:su (2:1:0,8 v/v/v) çözücü karışımı içerisinde çözülür. Fruktoz-stearatın saflaştırılması oktadesil silan ile modifiye edilmiş silika kullanılarak paketlenmiş (C18) flash kolon (gözenek çapı 60 A°, partikül boyutu 45 μm) kullanımıyla gerçekleştirilmiştir. Akış hızı bir peristaltik pompa yardımıyla 1,4 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Kolon, metanol:kloroform:su (2:1:0,8 v/v/v) çözücü karışımı ile dengeye getirilmiştir. Fruktoz-stearatın kolondan elue edilebilmesi için, kullanılan çözücü karışımının çeşitli oranları denenmiştir. Toplanan fraksiyonların her birine karbohidrat belirleme testlerinden biri olan molisch testi uygulanmıştır. Testin prensibi, derişik H_2SO_4 ile ısıtılan karbohidratlar dehidrate olarak furfural veya furfural türevlerini oluştururlar ve bunlar fenollerle kondensasyon reaksiyonu vererek renkli bileşikler meydana getirirler. Toplanan fraksiyonlara derişik H_2SO_4 ve etil alkolde çözeltisi hazırlanmış % 10'luk α-naftol eklenerek molisch testi uygulanmıştır. Metanol:kloroform:su oranı 1:1:0,25 (v/v/v) olarak kullanıldığında toplanan fraksiyonlardan pozitif sonuç alınmıştır ve bu sonuca bağlı olarak bu fraksiyonlarda fruktoz-stearat olduğu düşünülmüştür. Aynı fraksiyonlarda reaksiyona girmeden kalan stearik asitin var olup olmadığını anlayabilmek amacıyla bu fraksiyonlara serbest yağ asidi testi uygulanmıştır. Testin prensibi, pH'ı piridin ile 6,0-6,2'ye ayarlanmış % 5'lik bakır (II) asetat çözeltisi ile serbest yağ asitleri renkli kompleksler meydana getirirler. Fruktoz-stearat içerdiği düşünülen fraksiyonlara serbest yağ asidi testi uygulandığında negatif sonuç alınmıştır. Bu sonuç, fruktoz-stearat ile stearik asitin ayrılmış olduğunu kalitatif olarak göstermiştir. Ancak sonucu destekleyebilmek ve fruktoz-stearata ait ester bağının varlığını görebilmek amacıyla bu fraksiyonlarda FT-IR analizi yapılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

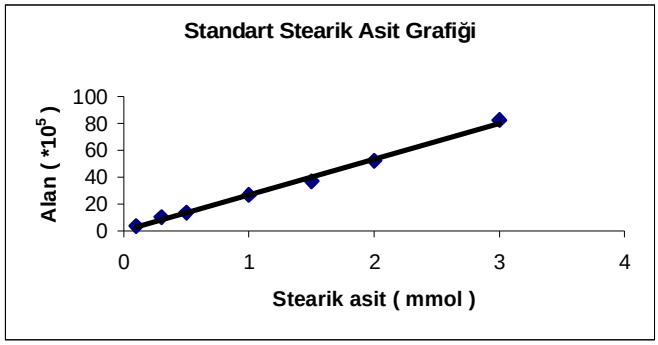
4.1.1. Standart Stearik Asit Grafiğinin Çizilmesi

Fruktoz-stearatın standardı ticari olarak mevcut olmadığı için, sentezlenen fruktoz-stearatı takip edebilmek amacıyla substratlardan biri olan stearik asitin reaksiyonda tüketilen miktarından yola çıkılarak hesaplama yapılmıştır. HPLC cihazında hareketli faz olarak kullanılan metanol:kloroform:su (2/1/0,8 v/v/v) çözücü karışımı içerisinde farklı derişimlerde stearik asit çözeltileri hazırlanarak HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Stearik asite ait bir kromatogram Şekil 4.1'de verilmiştir.



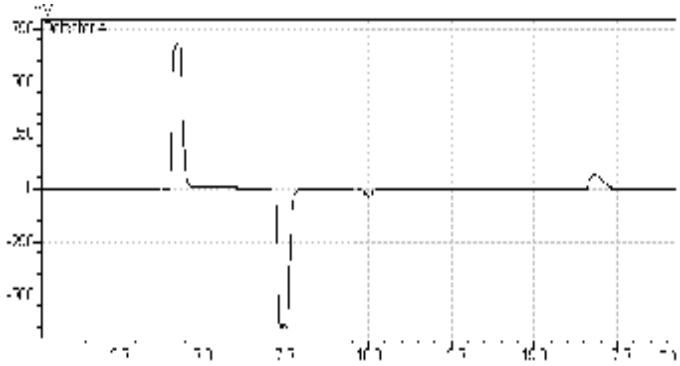
Şekil 4.1. Stearik asite ait bir kromatogram

Hareketli faza ait alıkonma sürelerini belirleyebilmek amacıyla, örnek enjekte edilmeden önce yalnızca hareketli faz kolonda yürütülmüş ve hareketli faza ait alıkonma zamanları 5. ve 7,5. dk.'larda gözlenmiştir. Şekil 4.1'de görülen 5. ve 7,5. dk.'larda gelen pikler hareketli fazdan kaynaklanan piklerdir. Stearik asitin kolondaki alıkonma süresi ise 17-17,5. dk. olarak saptanmıştır. Elde edilen stearik asit piklerinin altında kalan alanlardan yararlanarak kullanılan stearik asit miktarına karşı alan grafiği çizilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Stearik asit miktarına bağlı olarak pik alanlarındaki değişim

Şekil 4.2'de görüldüğü gibi stearik asit miktarı arttıkça pik alanları doğrusal olarak bir artış göstermektedir. Fruktoz-stearat oluşumu, stearik asit miktarındaki azalma takip edilerek hesaplanmıştır. Sentez işlemi gerçekleştirildikten sonra reaksiyon çözücüsü olan t-butanol:DMSO uçurulmuş, kalan katı madde içerisindeki reaksiyona girmeden kalan fruktoz su ile ekstrakte edilmiş ve geriye kalan fruktoz stearat ve reaksiyona girmeden kalan stearik asit hareketli faz içerisinde çözülerek kolona enjekte edilmiştir (Şekil 4.3)



Şekil 4.3. Sentez işlemi sonrası HPLC'de analizi yapılan örneğe ait bir kromatogram örneği

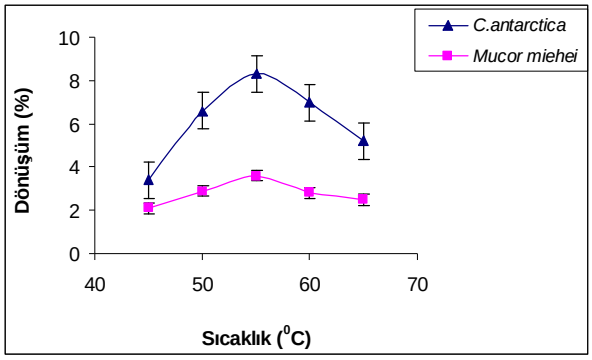
Şekil 4.3'de görüldüğü gibi kolondaki alıkonma süresi 10. dk. olan yeni bir pik meydana gelmiştir. Sentez işlemi farklı reaksiyon parametrelerinde gerçekleştirilmiş ve her biri için ayrı ayrı kromatogramlar elde edilmiştir. Çalışılan parametrelerin lipaz aktivitesini arttırdığı ölçüde sentez işleminde kullanılan ve fruktoz-stearat

haline dönüşen stearik asit miktarı artmış buna bağlı olarak sentez sonrası reaksiyona girmeden kalan stearik asit miktarı giderek azalmıştır. Bu azalma, elde edilen kromatogramlardaki 17-17,5. dk.da gelen stearik asit pikinin alanındaki azalma ile takip edilmiştir. Stearik asit miktarındaki azalmaya bağlı olarak 10. dk.da giderek artan bir pik gözlenmesi, bu pikin fruktoz-stearata ait olduğu hakkında bir fikir vermiştir.

4.2. Reaksiyon Koşullarının Optimizasyonu

4.2.1. Sıcaklık

Materyal ve metod bölümünde 3.2.2'de belirtilen şekilde fruktoz stearat sentezi yapılmıştır. Sentez işlemlerinde sıcaklığın fruktoz-stearat oluşumu üzerine etkisini inceleyebilmek amacıyla 5 farklı sıcaklıkta (45, 50, 55, 60, 65 °C) reaksiyon gerçekleştirilmiş olup, dönüşümün sıcaklığa bağlı olarak değişimi Şekil 4.4'de verilmiştir.



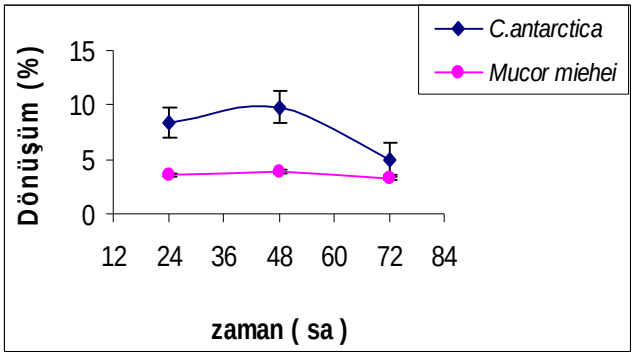
Şekil 4.4. t-butanol:DMSO (5:0,5 v/v) içerisinde 24 sa süre sonunda reaksiyon sıcaklığının fruktoz-stearat oluşumu üzerine etkisi. Reaksiyon karışımının mL'si başına içeriği; 0,06 mmol fruktoz, 0,06 mmol stearik asit, 20 mg moleküler elek, 10 mg lipaz

Sentez işlemi, kaynakları farklı olan iki lipaz enzimi (*C.antarctica* ve *M.miehei*) ile ayrı ayrı yapılmıştır. Şekil 4.4'den görüldüğü gibi en yüksek stearik asit dönüşümü,

C.antarctica ve *M.miehei* enzimleriyle gerçekleştirilen her iki sentez işlemindede 55°C'de gözlenmiştir. *C.antarctica* ve *M.miehei* immobilize lipazları ile gerçekleştirilen sentez işlemlerinde stearik asit dönüşümü sırasıyla % 8,3 ve % 3,6 olarak belirlenmiştir.

4.2.2. Reaksiyon Süresi

Reaksiyon süresinin fruktoz-stearat oluşumu üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla sentez işlemi 24, 48 ve 72 saat olmak üzere üç farklı zaman aralığında gerçekleştirilmiştir. Zamana bağlı olarak stearik asit dönüşümündeki değişim Şekil 4.5'de verilmiştir.

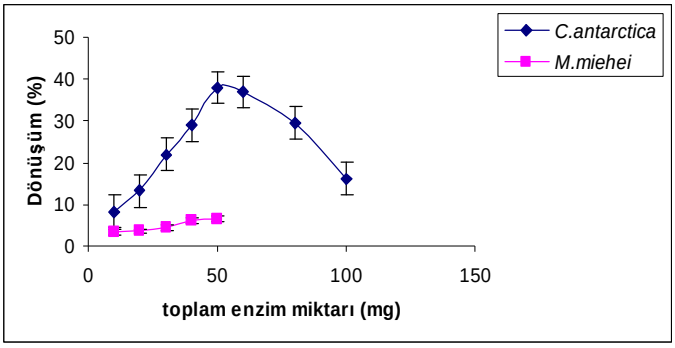


Şekil 4.5. t-butanol:DMSO (5:0,5 v/v) içerisinde, 55°C'de reaksiyon süresinin fruktoz-stearat oluşumu üzerine etkisi. Reaksiyon karışımının mL'si başına içeriği; 0,06 mmol fruktoz, 0,06 mmol stearik asit, 20 mg moleküler elek, 10 mg lipaz

Şekil 4.5'de görüldüğü gibi stearik asit dönüşümünün *C.antarctica* immobilize lipaz ile gerçekleştirilen reaksiyonda 48 saat içerisinde artmış olduğu gözlenmektedir. *M.miehei* ile yapılan sentez incelendiğinde anlamlı bir artış olmadığı görülmüştür. *C.antarctica* ve *M.miehei* enzimleri ile stearik asit dönüşümü sırasıyla % 9,8 ve 3,9 olarak belirlenmiştir.

4.2.3. Enzim Derişimi

48 sa reaksiyon süresinde, 55°C'de reaksiyon ortamına karışımın ml'si başına farklı miktarlarda (10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100 mg) immobilize *C.antarctica* ve *M.miehei* immobilize lipazları eklenerek sentez işlemleri gerçekleştirilmiştir. Enzim miktarındaki değişimin stearik asit dönüşümü üzerine etkisi Şekil 4.6'da verilmiştir.



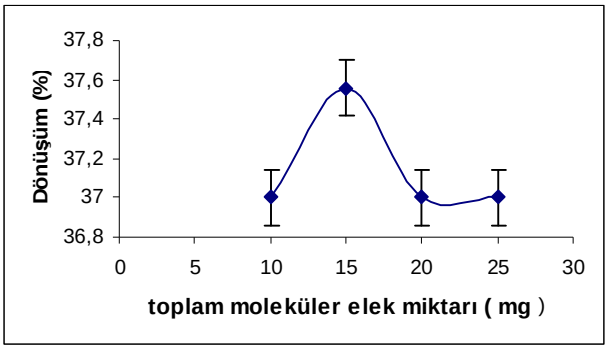
Şekil 4.6. Sentez ortamına reaksiyon karışımının mL'si başına değişik miktarlarda eklenen lipaz enzimlerinin fruktoz-stearat oluşumu üzerine etkisi. Reaksiyon karışımının mL'si başına içeriği; 0,06 mmol fruktoz, 0,06 mmol stearik asit, 20 mg moleküler elek

Şekil 4.6'dan görüldüğü gibi reaksiyon karışımının mL'si başına 50 mg *C.antarctica* enzimi ilave edildiğinde stearik asit dönüşümü % 9,8'den % 37'ye artmış ancak enzim miktarı 100 mg'a çıkarıldığında dönüşümün % 16,2 ye kadar azaldığı gözlenmiştir. *M.miehei* ile yapılan çalışmada enzim miktarı arttırıldığında stearik asit dönüşümünde anlamlı bir artış gözlenmediği için çalışmanın kalan kısımlarına *C.antarctica* enzimi ile devam edilmiştir.

4.2.4. Moleküler Elek Miktarı

Esterifikasyon süresince açığa çıkan suyun reaksiyon ortamından uzaklaştırılması amacıyla reaksiyon ortamına reaksiyon karışımının her bir

mililitresinde 10, 15, 20, 25 mg olacak şekilde moleküler elek eklenerek yapılan deneme sonuçları Şekil 4.7'de verilmiştir.

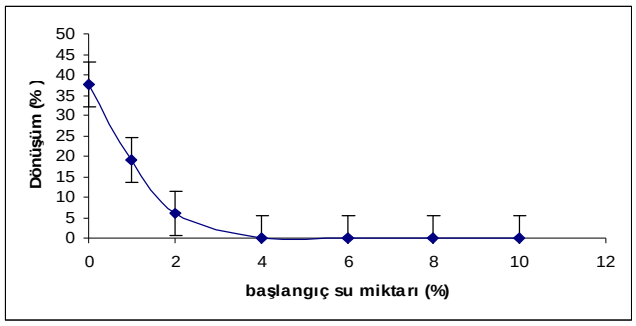


Şekil 4.7. Sentez ortamına reaksiyon karışımının mL'si başına artan miktarlarda eklenen moleküler eleğin fruktoz-stearat oluşumu üzerine etkisi. Reaksiyon karışımının ml'si başına içeriği; 0,06 mmol fruktoz, 0,06 mmol stearik asit, 50 mg *C.antarctica* lipazı

Şekil 4.7'de görüldüğü gibi fruktoz-stearat oluşumu reaksiyon ortamındaki moleküler elek miktarından etkilenmektedir. Belirlenen optimum sıcaklık ve reaksiyon süresinde, 0,06 mmol fruktoz, 0,06 mmol stearik asit, 50 mg *C.antarctica* lipazı varlığında, optimum moleküler elek miktarı reaksiyon karışımının mL'si başına 15 mg olarak belirlenmiştir. Stearik asit dönüşümü ise *C.antarctica* immobilize lipazının kullanıldığı reaksiyonda % 37,6 olarak belirlenmiştir.

4.2.5. Reaksiyon Ortamına Eklenen Su Miktarı

Reaksiyon ortamındaki başlangıç su miktarının fruktoz-stearat oluşumu üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla (reaksiyon koşulları karışımın her bir mililitresinde 0,06 mmol fruktoz, 0,06 mmol stearik asit, 15 mg moleküler elek, 50 mg *C.antarctica* immobilize lipazı, 48 sa ve 55°C olduğunda) reaksiyon karışımına %1 den % 10'a (v/v) kadar değişen oranlarda su eklenerek stearik asit dönüşümünün su miktarına bağlı olarak değişimi incelenmiş ve bulgular Şekil 4.8' de verilmiştir.



Şekil 4.8. t-butanol/DMSO (5/0,5 v/v) içerisinde 55°C'de 48 sa süre sonunda reaksiyon ortamındaki başlangıç su miktarının fruktoz-stearat oluşumu üzerine etkisi. Reaksiyon karışımının mL'si başına içeriği; 0,06 mmol fruktoz, 0,06 mmol stearik asit, 15 mg moleküler elek, 50 mg lipaz

Şekil 4.8'den görüldüğü gibi reaksiyon ortamına %1'den %10' a değişen oranlarda su eklenerek sentez işlemi yapıldığında stearik asit dönüşümünün giderek azaldığı ve reaksiyon ortamındaki su miktarı % 4 olduğunda fruktoz-stearat oluşmadığı gözlenmiştir.

4.2.6. Metal İyonları

Reaksiyon ortamına eklenen metal iyonlarının fruktoz-stearat oluşumu üzerine etkisini incelemek amacıyla, DMSO içerisinde çözeltileri hazırlanan ve reaksiyon ortamındaki derişimi 1mM olacak şekilde karışıma eklenen metal tuzlarının, dönüşüm üzerine etkileri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Metal iyonlarının fruktoz-stearat oluşumu üzerine etkisi

Metal iyonu (1mM)	Dönüşüm (%)
- (Kontrol)	100
Ca^{+2}	110,5
Mg^{+2}	106,3
Mn^{+2}	100
Cu^{+2}	84,2
Hg^{+2}	66,8

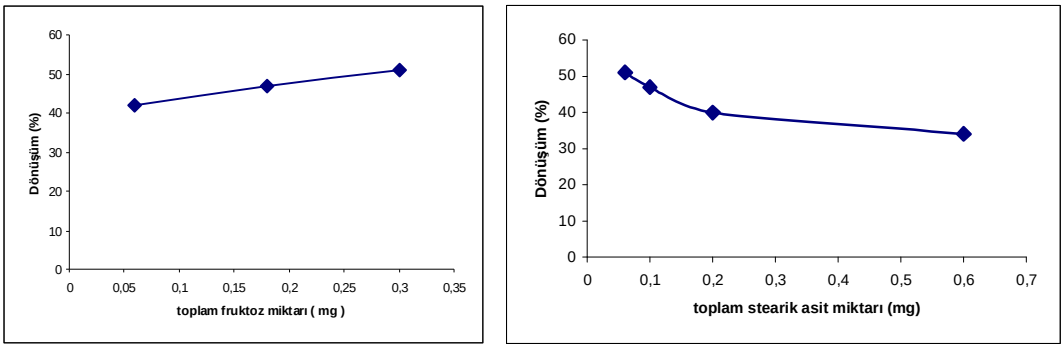
Çizelge 4.1'den görüldüğü gibi stearik asit dönüşümü reaksiyon ortamına ilave edilen metal iyonlarından etkilenmektedir. Reaksiyon ortamına hiç metal iyonu eklenmeden optimum koşullarda sentez yapıldığında en yüksek stearik asit dönüşümü % 38 olarak belirlenmiştir. Optimum koşullarda reaksiyon ortamına derişimi 1mM olacak şekilde Ca^{+2}, Mg^{+2}, Mn^{+2}, Cu^{+2}, Hg^{+2} iyonları eklendiğinde stearik asit dönüşümü sırasıyla % 42, 40, 38, 32 ve 25 olarak belirlenmiştir. Çizelge 4.1 incelendiğinde metal iyonu yokluğunda yapılan sentez sonucu elde edilen dönüşüm % 100 olarak kabul edilmiş olup, diğer dönüşümler de aynı şekilde % olarak ifade edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde Ca^{+2}, Mg^{+2} iyonlarının dönüşümü arttırdığı, Mn^{+2} iyonunun dönüşüme bir etkisi olmadığı, Cu^{+2} ve Hg^{+2} iyonlarının stearik asit dönüşümünü azalttığı gözlenmiştir.

4.2.7. Fruktoz/Stearik Asit Mol Oranı

Enzimatik fruktoz stearat sentezi reaksiyon ortamındaki fruktoz/stearik asit mol oranları değiştirilerek yapılmıştır. Sentez işlemleri fruktoz/stearik asit mol oranı reaksiyon karışımının ml'si başına sırasıyla 0,06/0,06; 0,18/0,06; 0,3/0,06; 0,3/0,1; 0,3/0,2; 0,3/0,6 olmak üzere optimum koşullarda gerçekleştirilmiştir. İmmobilize *C.antarctica* lipazının her iki substratınında miktarlarındaki artış veya azalışın, fruktoz-stearat oluşumu üzerine etkisi Çizelge 4.2 ve Şekil 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.2. t-butanol:DMSO içerisinde belirlenen optimum koşullarda fruktoz/stearik asit mol oranının stearik asit dönüşümü üzerine etkisi

Fruktoz/ Stearik asit Oranı (mmol/mmol)	Dönüşüm (%)	Fruktoz-stearata Dönüşen Stearik Asit Miktarı (mmol)
0,06/0,06	42	0,025
0,18/0,06	47	0,028
0,3/0,06	51	0,031
0,3/0,1	48	0,048
0,3/0,2	40	0,080
0,3/0,6	34	0,204

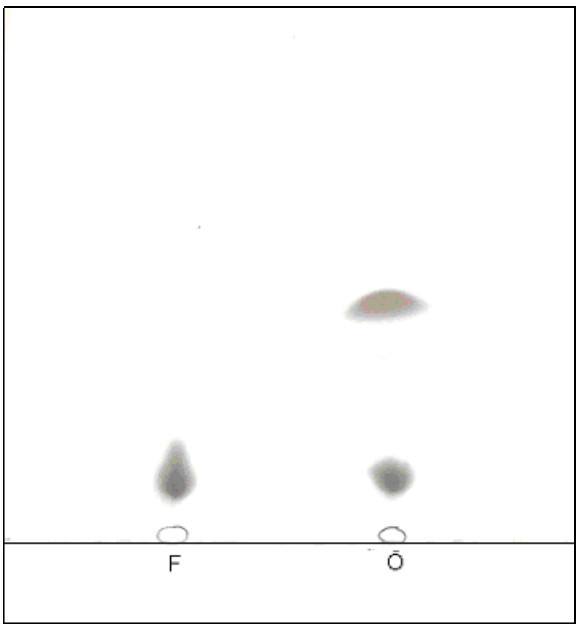


Şekil 4.9. Optimum reaksiyon koşullarında sabit stearik asit miktarında artan fruktoz ve sabit fruktoz miktarında artan stearik asit miktarlarının fruktoz-stearat oluşumu üzerine etkisi

Çizelge 4.2 ve Şekil 4.9'da görüldüğü gibi, sabit stearik asit miktarında reaksiyon ortamındaki fruktoz miktarı arttırıldığı zaman stearik asit dönüşümünün % 42'den % 51'e çıktığı gözlenmiştir. Maksimum fruktoz miktarı belirlendikten sonra, bu miktardaki fruktoz sabit tutularak bu kez stearik asit miktarı arttırılmıştır, dönüşüm hesaplandığında kullanılan stearik asitin % 34'ünün frutoz-stearata dönüştüğü gözlenmiştir.

4.3. TLC Analizi

Belirlenen optimum koşullarda sentez işlemi yapılmış olup, reaksiyon karışımından alınan numune TLC plakaya uygulanmıştır. Standart olarak fruktoz kullanılmıştır. Yürütme işlemi tamamlanıp, örnekleri görünür hale getirmek için gereken reaktifler kullanıldıktan sonra elde edilen kromatogram Şekil 4.10'da verilmiştir.

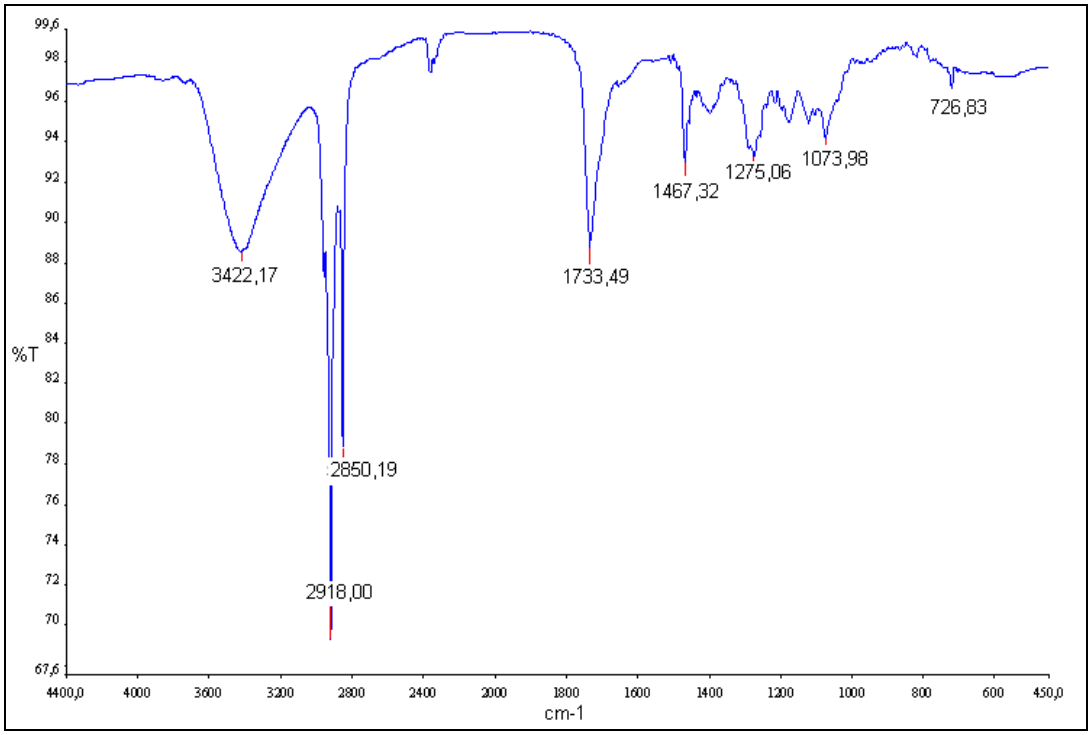


Şekil 4.10. Fruktoz (F) ve sentez sonrası reaksiyon karışımından alınan örneğe (Ö) ait TLC kromatogramı

Şekil 4.10'da görüldüğü gibi standart olarak kullanılan fruktozun uygulandığı bölgede tek bir bant oluşmuştur. Reaksiyon karışımından alınan numunede ise iki bant meydana gelmiştir. Örneğin uygulandığı bölgede üst kısımda meydana gelen ikinci bandın fruktoz-stearattan ileri geldiği düşünülmektedir.

4.4. Fruktoz-stearatın Saflaştırılması ve FT-IR Analizi

Fruktoz-stearatın saflaştırılması oktadesil silan ile modifiye edilmiş silika kullanılarak paketlenmiş (C18) flash kolon (gözenek çapı 60 A°, partikül boyutu 45 µm) kullanımıyla gerçekleştirilmiştir. Fruktoz-stearatın kolondan elue edilebilmesi için, yürütücü faz olarak kullanılan metanol:kloroform:su (v/v/v) çözücü karışımının çeşitli oranları denenmiş ve fruktoz-stearatın ayrımının gerçekleştiği oran 1:1:0,25 (metanol:kloroform:su, v/v/v) olarak belirlenmiştir. Sentezlenen fruktoz-stearatın oluşumunun doğrulanması için kolon kromatografisi ile saflaştırılan maddenin IR spektrumu çekilmiştir. Fruktoz-stearatın IR spektrumu Şekil 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.11. Sentezlenen fruktoz-stearatın IR spektrumu

Şekil 4.11'de görüldüğü gibi 1733,49 cm^{-1}'de görülen ve karbonil grubunun (C=O) varlığına işaret eden pik, ester oluşumunu doğrulamıştır. Ester varlığını doğrulayan diğer bantlar; 3422,17 cm^{-1} (OH bağı için); 2850,19-2918,00 cm^{-1} (-CH_2 ve –CH_3'ler

içindeki C-H bağı için); 1467,32 cm^{-1} (-CH_2 ve –CH_3 için); 1275,06 cm^{-1} (C-O-C gerilmesi için), 1073 cm^{-1} (C-O ester bağı için) ve 726,83 cm^{-1} [$(CH)_2$ bağı için] şeklinde belirlenmiştir.

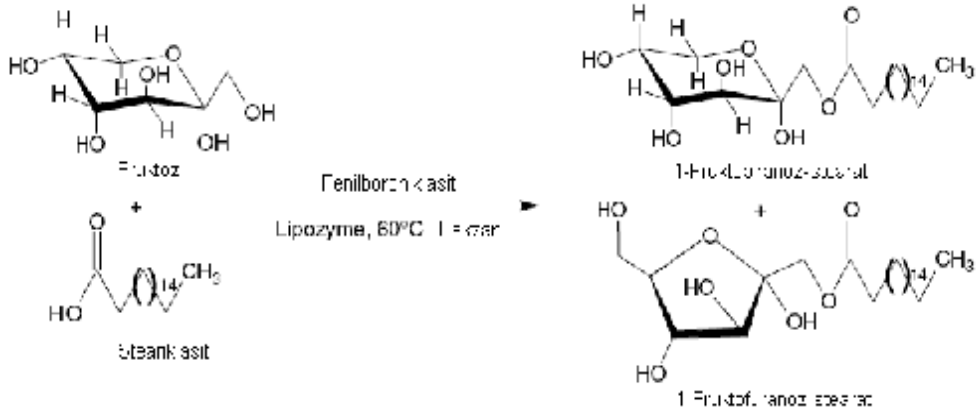
4.5. Tartışma

Bu çalışmada birçok kullanım alanı bulunan şeker esterlerinin serbest yağ asidi ve modifiye olmamış şekerlerin kullanımıyla enzimatik sentezi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada fruktozun stearik asit esteri, düşük su aktivitesi ortamında hidroliz yerine esterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonlarını meydana getirme eğilimi gösteren lipaz enzimleri (*C.antarctica* ve *M.miehei* lipazları) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Reaksiyon çözücüsü olarak başlangıçta iki farklı iyonik sıvı kullanılmıştır. Ancak deneysel çalışmalar sonucunda bu iyonik sıvılar içerisinde fruktozun çözünürlüğünün düşük olduğu gözlemlenmiş ve eklenen fruktozun çözünen miktarı DNSA metodu kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Bu yöntem uygulandığında kaynatma işlemi sırasında iyonik sıvılar siyahımsı bir renge dönüşmüştür. Yapılan yüksek orandaki seyreltme işlemlerine rağmen okunan örneklerin absorbansları oldukça yüksek çıkmıştır ve fruktoz ile çizilmiş olan standart grafikten iyonik sıvılar içerisinde çözünmüş olan fruktoz miktarı belirlenememiştir. İyonik sıvılar içerisinde çözünmüş olan fruktoz miktarı spektrofotometrik yöntemle belirlenemeyince HPLC'de deneme yapılmıştır. Çalışmada kullanılan iyonik sıvıların yüksek viskoziteye sahip olması ve suyla yada diğer organik çözücülerle karışabilirliklerinin oldukça az olması sebebiyle, karışım HPLC cihazına enjekte edildiğinde kolonun tıkandığı gözlenmiştir. Her iki iyonik sıvının da HPLC'de kullanımlarının uygun olmadığı saptanmıştır. İyonik sıvılar içerisinde çözünen fruktoz miktarı belirlenemediği için sentez işleminin diğer basamaklarına bu çözücüler içerisinde devam edilememiştir. Sentez işlemine toksik olmayan bir organik çözücü olan t-butanol kullanılarak devam edilmiştir. t-butanol yapısı itibariyle yüksek sterik etkiye sahip olduğundan lipaz enzimi için bir substrat olarak davranamaz ve lipaz enzimi bu nedenle çözücü içerisinde oldukça kararlıdır (Oguntimein ve ark., 1993;

Woudenberg-van Oosterom ve ark., 1996; Degn ve ark., 1999). Çalışmada karşılan en büyük sorun, fruktozun t-butanol ortamındaki düşük çözünürlüğü olmuştur. Bu nedenle fruktozun tamamen çözünmesini sağlayan DMSO, yardımcı çözücü olarak düşük miktarda reaksiyon ortamına eklenmiştir. Ancak t-butanol ve DMSO yapıları gereği birbirleriyle her oranda karışmayan ve iki faz oluşturan çözücülerdir. Çalışmada farklı oranlarda denemeler yapılarak t-butanol:DMSO çözücülerinin karışabildiği ve tek fazlı görünüme sahip olduğu oran 5/0,5 (v/v) olarak optimize edilmiştir. Ferrer ve ark. (1999) laurik asit ve palmitik asit vinil esterlerini kullanarak transesterifikasyonla 6-O-lauroilsükroz ve 6-O-palmitoilsükroz esterlerinin enzimatik sentezini 2-metil-2-butanol:DMSO (4:1, v/v) çözücü karışımı içerisinde gerçekleştirmişlerdir. Degn ve Zimmermann (2001) farklı karbohidratların miristik asit esterlerinin lipaz katalizli sentezini % 2 oranında DMSO içeren t-butanol:piridin (55:45, v/v) çözücü karışımı içerisinde gerçekleştirmişlerdir. Reyes-duarte ve ark. (2004) sükroz palmitatın *C.antarctica* B (Novozym 435) immobilize lipazı katalizörlüğünde sentezini 2-metil-2-butanol:DMSO (85:15, v/v) çözücü karışımında gerçekleştirmişlerdir.

Fruktoz-stearat sentezi ile ilgili çok az literatüre rastlanmıştır (Schlotterbeck ve ark., 1993., Oguntimein ve ark., 1993). Bu literatürlerde şekerlerin organik çözücü ortamında çözünürlüğünü arttırabilmek amacıyla organoboronik asit kullanılmıştır. Organoboronik asitlerin karbohidratlarla geri dönüşümlü kondensasyon ürünü olan karbohidrat-boronat kompleksinin organik çözücüler içerisinde çözünebilen bir kompleks olduğu ve karbohidratların organik çözücülerdeki zayıf çözünürlükleri problemini ortadan kaldırdığı literatürde bildirilmiştir (Kennedy ve ark. 2006)



Şekil 4.12. Fenilboronik asit varlığında fruktoz-stearat sentezi

Schlotterbeck ve ark. (1993), fruktozun stearik asit esterini hekzan içerisinde ticari immobilize lipaz olan *M.miehei* (Lipozyme IM 60) enzimi katalizörlüğünde gerçekleştirmişlerdir. Fruktozun hekzan içerisindeki çözünürlüğünü arttırmak amacıyla reaksiyon ortamına fenilboronik asit eklemişlerdir. Fenilboronik asitin ortamda fazla miktarda bulunması halinde lipaz enzimini inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Fenilboronik asit/fruktoz molar oranını optimize etmiş ve 1,5/1 olarak belirlemişlerdir. Sentez işleminde fruktoz/stearik asit molar oranı 3/1 olduğunda maksimum dönüşümü % 40 olarak gözlemlediklerini rapor etmişlerdir.

Oguntimein ve ark. (1993), fruktoz ve glukozun stearik asit esterlerini t-butanol içerisinde *Candida sp.* (SP 382) ve *M.miehei* (Lipozyme TM 20) immobilize lipazlarını kullanarak sentezlemişlerdir. *M.miehei* (20 mg lipaz/mL t-butanol) ile fruktoz-stearatı % 8,9, glukoz-stearatı % 5,3; *Candida sp.* (20 mg lipaz/mL t-butanol) ile fruktoz-stearatı % 8,6 ve glukoz-stearatı % 4,3 verimle elde etmişlerdir. Örneklerin kantitatif analizini HPLC'de C18 kolonu ile metanol:asetik asit (99,7:0,3 v/v) hareketli fazını kullanarak 20°C'de, 1,0mL/dk akış hızında gerçekleştirmiş ve hesaplamada standart olarak kullandıkları stearik asite ait pik alanlarından yararlanmışlardır. Çalışmamızda fruktoz-stearat oluşumu benzer şekilde HPLC'de C18 kolonunda stearik asitin vermiş olduğu pik alanındaki azalmadan yararlanılarak takip edilmiştir. Hareketli faz olarak literatürde (Oguntimein ve ark., 1993) bildirildiği gibi metanol:asetik asit (99,7/0,3 v/v) de denenmiştir ancak bu çözücü karışımı içerisinde stearik asitin çözünmediği gözlenmiştir. Stearik asitin kolonda

çökmemesi, reaksiyon ortamında yeterince çözünebilmesi amacıyla kloroform kullanılmış olup, aynı şekilde ortamdaki şekerinde çözünürlüğünü arttırabilmek amacıyla hareketli faz içerisinde düşük bir yüzdeyle su kullanılmıştır (metanol/kloroform/su, 2/1/0,8 v/v/v). Reaksiyon karışımında yer alan maddelerin kolondan çıkış sıraları literatürle uyumlu olarak sırasıyla fruktoz stearat ve stearik asit şeklinde olmuştur. Yapmış olduğumuz çalışma bir ters faz kromatografidir. Durgun faz apolar, hareketli faz polar özelliktedir. Bu yüzden stearik asit, fruktoz-stearata oranla daha apolar olduğu için kolonda daha uzun süre alıkonacak ve çıkış süresi daha geç olacaktır. Fruktoz-stearat ve stearik asitin alıkonma zamanları sırasıyla 10. ve 17,5. dk. olarak belirlenmiştir.

Optimizasyon çalışmalarında ilk olarak sıcaklık optimize edilmiştir (Şekil 4.4). 45°C'de düşük bir dönüşüm gözlemlenmiş, sıcaklık 45°C'den 55°C'ye arttırıldığında stearik asit dönüşümünün *C.antarctica* enzimi için % 3,4'ten % 8,3'e, *Mucor miehei* enzimi için ise % 2,1'den % 3,6'ya yükseldiği gözlenmiştir. Stearik asit dönüşümü her iki enzim için de 60 ve 65°C'de hızla azalmıştır. Bu durum, yüksek reaksiyon sıcaklıklarında enzim stabilitesindeki azalma ile açıklanabilir. Her iki lipaz enzimi için de optimum reaksiyon sıcaklığı 55°C olarak belirlenmiştir. Çalışmada stearik asit dönüşümünün zamana bağlı olarak değişimi incelenmiştir (Şekil 4.5). *C.antarctica* enzimi ile 48 sa reaksiyon süresi sonunda fruktoz-stearata dönüşen stearik asit miktarında artış gözlenmiştir. Reaksiyon süresi 48 saatten fazla olduğunda stearik asit dönüşümünde azalma gözlenmiştir. Bu durumun, oluşan fruktoz-stearatın hidrolizinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Çünkü reaksiyon ürünleri su ve fruktoz-stearattır. Oluşan su varlığında lipaz enzimi hidrolaz aktivitesini göstermekte ve oluşan fruktoz-stearatın hidrolizi gerçekleşmektedir. Bu durum reaksiyon termodinamik dengeye ulaşıncaya dek devam eder ve bu denge tamamen oluşan ürünlerin konsantrasyonlarıyla ilişkilidir. *M.miehei* enzimi ile yapılan çalışmada ise reaksiyon süresindeki değişimin fruktoz-stearat oluşumu üzerine pek fazla bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir.

Stearik asit dönüşümü üzerine enzim miktarının etkisi incelenmiştir (Şekil 4.6). Reaksiyon karışımının ml'si başına 10 mg'dan 100 mg'a kadar artan miktarlarda lipaz eklenerek yapılan sentez işlemlerinde, stearik asit dönüşümündeki

artış 50 mg enzime kadar doğru orantılı olarak artmıştır. Ancak daha yüksek enzim miktarlarında stearik asit dönüşümünde azalma gözlenmiştir. Bu durumun sebebi, sentez sırasında açığa çıkan suyun reaksiyon ortamındaki miktarının artması olarak düşünülmüştür. Su, geri dönüşümlü esterifikasyon reaksiyonunun ürünlerinden biridir ve reaksiyonun hidroliz yönüne kaymasına sebep olur. Bu durum ürün haline dönüşen stearik asit miktarını azaltır. En yüksek stearik asit dönüşümü *C.antarctica* enzimi ile % 37 olarak, *M.miehei* enzimi ile ise % 8,3 olarak elde edilmiştir. *M.miehei* enzimi ile yüksek enzim konsantrasyonunda dahi anlamlı bir dönüşüm elde edilemediği için çalışmaya *C.antarctica* enzimi ile devam edilmiştir. Sabeder ve ark. (2006) fruktoz palmitatın enzimatik sentezini 2-metil-2-bütanol ortamında sentezlemişlerdir. Sentez işlemlerini reaksiyon ortamına substratların miktarlarının % 8'inden % 20'sine (w/w) kadar değişen oranlarda enzim ekleyerek gerçekleştirmişlerdir. Ezim miktarı % 12 oranında eklendiğinde dönüşümün arttığını, ancak daha yüksek miktarlarda enzim eklediklerinde dönüşümün giderek azaldığını bildirmişlerdir. Reaksiyon ortamındaki lipaz konsantrasyonunun artmasının, sentez ürünlerinden biri olan suyun artmasına neden olduğu ve oluşan suyun da geri dönüşümlü olan esterifikasyon reaksiyonunu hidroliz yönüne kaydırdığını bildirmişlerdir.

Esterifikasyon süresince açığa çıkan suyun, reaksiyon ortamından uzaklaştırılabilmesi amacıyla karışımın mL'si başına 10, 15, 20 ve 25 mg moleküler elek eklenmesiyle sentez işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.7). 15 mg moleküler elek eklenmesiyle stearik asit dönüşümünde çok küçük bir artış gözlenmiş ancak artan moleküler elek miktarlarında stearik asit dönüşümünde azalma belirlenmiştir. Lipaz enzimi düşük su ortamında yada tamamen susuz ortamda esterifikasyon aktivitesi göstermektedir, ancak bunun için çok az da olsa (% 1-2) suya ihtiyaç duymaktadır. Ortama eklenen moleküler eleğin fazlası, lipazın aktivite göstermesi için gereken suyun tamamını uzaklaştırmakta ve dolayısıyla enzimin aktivitesinde azalma meydana gelmektedir.

Lipaz enzimlerinin esterifikasyon aktivitelerinin, reaksiyon ortamındaki çok düşük su miktarlarında arttığı literatürde bildirilmiştir (Tsitsimpikou ve ark., 1998). Bu amaçla sentez işlemi, reaksiyon karışımı % 1'den % 10'a kadar değişen

miktarlarda su içerecek şekilde gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.8). Ancak reaksiyon karışımındaki su yüzdesi % 0'dan % 4'e çıktığında stearik asit dönüşümü hızla azalmış ve % 4'ten itibaren artık dönüşüm gözlenmemiştir. Tsuzuki ve ark. (1999) susuz hekzan ortamında ve %1 oranında su içeren hekzan ortamında, didodesil glutamat ile modifiye ettikleri *Pseudomonas sp*. lipazını kullanarak glukozun palmitik asit esterini sentezlemişlerdir. Ancak reaksiyon ortamına eklenen suyun, ürün için inhibitör etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Lee ve ark. (2007), iyonik sıvılar içerisinde glukozun vinil laurat ile lipaz katalizli transesterifikasyonunda, reaksiyon ortamındaki su miktarının ürün oluşumu üzerine etkisini araştırmışlardır. İyonik sıvılar içerisindeki su miktarının, dönüşümü hızla düşürdüğünü bildirmişler ve bu durumu ortamdaki suyun, lipaz enziminin esterifikasyon aktivitesini azaltmasıyla açıklamışlardır. Çalışmamızda, reaksiyon ortamındaki su varlığının stearik asit dönüşümünü azaltması nedeniyle sonraki işlem basamakları su eklenmeden gerçekleştirilmiştir.

Metal iyonlarının lipazın hidrolitik aktivitesi üzerine etkisinin incelendiği pek çok çalışma bulunmakla (Saeed ve ark., 2005; Okamoto ve ark., 2006; Liu ve ark., 2008) beraber esterifikasyon aktivitesi üzerine etkisi incelenmemiştir. Çalışmamızda çeşitli metal iyonlarının (Ca^{+2}, Cu^{+2}, Mg^{+2}, Mn^{+2} ve Hg^{+2}), lipaz enziminin esterifikasyon aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir (Çizelge 4.1). Lipaz enziminin Cu^{+2} varlığında aktivitesinin yaklaşık % 15'ini, Hg^{+2} varlığında ise aktivitesinin yaklaşık % 35'ini kaybettiği belirlenmiştir. Bu metal iyonlarının enzimin konformasyonunu değiştirmiş olabileceği dolayısıyla enzimi inhibe ettiği söylenebilir. Mn^{+2} iyonunun enzim aktivitesi üzerine bir etkisi görülmemekle birlikte, Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarının sırasıyla % 10,5 ve % 6,3 oranlarında arttırdığı gözlenmiştir.

Lipaz katalizli fruktoz-stearat sentezi farklı mol oranlarında fruktoz/stearik asit kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.2, Şekil 4.9). Reaksiyon ortamındaki stearik asit miktarı sabit tutularak fruktoz miktarı arttırılmış ve fruktoz/stearik asit mol oranı 0,3/0,06 olduğunda dönüşüm % 51 olarak hesaplanmıştır. Fruktoz miktarı daha fazla arttırılamamıştır, çünkü fruktozun çözünmesini sağlayan DMSO'nun reaksiyon karışımında kullanılan miktarı (0,5 mL) içerisinde fruktozun daha yüksek

miktarları çözünmemiştir. t-butanol:DMSO karışımındaki 5/0,5 (v/v) oranından ayrılıp fruktozu çözebilmek amacıyla DMSO miktarı arttırıldığında bu kez t-butanol ve DMSO'in iki fazlı bir sistem oluşturduğu gözlenmiştir. Bu yüzden fruktoz miktarı mL çözücü başına 0,3 mmol'de sabit tutulmuş ve stearik asit miktarının etkisini inceleyebilmek amacıyla ortamdaki stearik asit miktarı arttırılmıştır. Stearik asit miktarı arttıkça, dönüşüm giderek azalmış ve dönüşüm % 34 olarak belirlenmiştir. Oluşan ürün bazında bakıldığında fruktoz/stearik asit mol oranı 0,3/0,06 olduğunda dönüşüm % 51 olarak gerçekleşmiş ve kullanılan stearik asitin 0,031 mmolü fruktoz-stearata dönüşmüştür. Fruktoz/stearik asit mol oranı 0,3/0,6 olduğunda dönüşüm % 34 olarak gerçekleşmiş ve kullanılan stearik asitin 0,204 mmolü fruktoz-stearata dönüşmüştür. % 34'lük verime bakıldığında oluşan fruktoz-stearat miktarı % 51'lik dönüşüme göre daha fazladır. Ancak sabit stearik asit miktarında verim incelenecek olursa; 0,3/0,06 oranı 10 kat arttırılarak 3/0,6 oranı kullanıldığında 0,6 mmol yağ asidinin oluşturacağı fruktoz-stearat miktarı 0,31 mmol olarak belirlenir. Yani aynı miktardaki stearik asit ile, ortamda bulunan fruktozun farklı miktarları için elde edilen fruktoz-stearat miktarları farklı görünmektedir ve fruktozun stearik asite göre mol bakımından fazla bulunduğu ortamda daha fazla fruktoz-stearat elde edildiği gözlenmektedir.

Çalışmamızda kullanılan TLC plakası, silika dolgu maddesine sahip bir tabakadır. Dolgu maddesi polar karakterlidir ve polar olan bileşenler tabaka üzerinde daha uzun süre alıkonur. Çalışmada yürütücü faz olarak, dolgu maddesine oranla daha apolar özellikte olan toluen:etilasetat:metanol:su (10:5:4,5:0,4 v:v:v:v) kullanılmıştır. Yürütme işleminden sonra standart olarak kullanılan fruktozun uygulandığı bölgede tek bant gözlenirken, reaksiyon karışımından alınan numunenin uygulandığı bölgede iki bant meydana gelmiştir. Numune içerisinde reaksiyona girmeden kalan fruktoz, reaksiyona girmeden kalan stearik asit ve oluşan fruktoz-stearat bulunmaktadır. Örnek kısmı incelendiği zaman fruktoz ile aynı noktada gelen bant reaksiyon ortamındaki reaksiyona girmeden kalan fruktoza aittir. İkinci bandın ise fruktoz-stearata ait olduğu düşünülmektedir. Polariteleri göz önüne alındığında fruktozun silika tabaka üzerinde fruktoz-stearata oranla daha fazla tutunacağı

söylenebilir. Çalışma sonucunda örnek içerisinde fruktozdan daha ileride çıkan bir bant gözlenmiştir ve bu bandın fruktoz-stearata ait olduğu düşünülmektedir.

Sentezlenen fruktoz-stearatın saflaştırılabilmesi amacıyla çalışmamızda kolon kromatografisinden yararlanılmıştır. Oktadesil silan ile modifiye edilmiş silika kullanılarak paketlenmiş C18 flash kolonu yardımıyla metanol:kloroform:su (1:1:0,25 v/v/v) çözücü karışımı ile fruktoz-stearat saflaştırılmıştır. Fruktoz-stearatın varlığı toplanan fraksiyonlardan kalitatif tayin yöntemi olan molisch testi ile doğrulanmıştır. Elde edilen esterin varlığını doğrulayabilmek amacıyla, örneğin IR spektrumu çekilmiştir (Şekil 4.11). Spektrumda yer alan 1733 cm^{-1}'de yer alan ve karbonil grubunun (C=O) varlığını bildiren pik ester oluşumunu doğrulamıştır. Rahman ve ark. (2000) çalışmalarında sentezledikleri fruktoz esterinin oluşumunu IR spektroskopisiyle belirlemişlerdir. Yaptıkları çalışmada ester bağı oluşumu neticesinde gözlenen absorbsiyon bantları; 3381-3407 cm^{-1} (OH bağı için), 2851-2919 cm^{-1} (-CH_2 ve –CH_3'ler içindeki C-H bağı için), 1735 cm^{-1} (C=O, ester bağı için), 1468 cm^{-1} (-CH_2 ve –CH_3), 1055-1083 cm^{-1} (C-O, ester bağı için) ve 723 cm^{-1} [$(CH)_2$ bağı için] olarak rapor edilmiştir. Bu değerler sentezlemiş olduğumuz fruktoz-stearatın IR'sinde gözlenen değerlerle uyum içindedir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

1) *M.miehei* lipazı ile yapılan sentez işlemlerinde verimin % 3,6 olarak elde dildiği optimum sıcaklık 55°C olarak belirlenmiştir. Reaksiyon süresi 48 saate çıkarıldığında ve enzim miktarı 5 kat arttırıldığında *M.miehei* ile yapılan sentezde fruktoz-stearat veriminde anlamlı bir değişme gözlenmemiştir. *C.antarctica* ile yapılan sentezde optimum sıcaklık 55°C, optimum reaksiyon süresi 48 saat, optimum enzim miktarı reaksiyon karışımının mL'si başına 50 mg olarak belirlenmiş olup fruktoz stearat verimi % 37 olarak elde edilmiştir. Sonuç olarak ester sentezinde *C.antarctica* enziminin kullanımının *M.miehei* kullanımına göre daha uygun olduğu söylenebilir.
2) *C.antarctica* enzimi kullanılan reaksiyonda optimum moleküler elek miktarı reaksiyon karışımının mL'si başına 15 mg olarak belirlenmiştir. Optimum koşullarda 1mM Ca^{+2} içeren t-butanol:DMSO çözücü karışımında dönüşümün % 42'ye çıktığı bulunmuştur. Belirlenen optimum koşullarda fruktoz/stearik asit mol oranı 0,3/0,06 olarak kullanıldığında, fruktoz-stearat veriminin % 42'den % 51'e arttığı saptanmıştır.
3) Sentez sonrasında örneğin HPLC'de analizi yapıldığında elde edilen kromatogramda (Şekil 4.3) 17,5.dk'da gelen stearik asit pikine ilaveten alıkonma süresi 10.dk olan yeni bir pikin varlığı fruktoz-stearat sentezinin gerçekleştiği fikrini vermiştir.
4) Silika dolgu maddesine sahip TLC plaka üzerinde yürütülen örnek ve standart fruktoza ait bantlar incelendiğinde; standart fruktoz kısmında tek bant oluşurken örnek yürütülen kısımda iki bant meydana gelmiştir. Örnek kısmındaki banlardan birisi standart fruktoz ile aynı noktada gelen, reaksiyona girmeden kalan fruktoza aittir. Daha ileride gelen 2. bant ile fruktoz-stearat varlığı belirlenmiştir.
5) Fruktoz-stearat, kolon kromatografisi ile metanol:kloroform:su (1:1:0,25 v/v/v) çözücü karışımı kullanılarak saf olarak elde edilmiştir. Saflaştırılan

fruktoz-stearatın IR spektrumu alınmıştır. IR spektrumu incelendiğinde ester varlığını doğrulayan karbonil grubuna ait (C=O) 1733,49 cm^{-1}'deki pik ile fruktoz-stearat varlığı saptanmıştır.

6) Sentezlenen fruktoz-stearatın varlığı sırasıyla; titrimetrik olarak, HPLC, TLC ve FT-IR'de alınan verilerle desteklenmiştir.

5.2. Öneriler

1) Endüstrideki kullanımlarına bağlı olarak farklı şeker ve farklı zincir uzunluğundaki yağ asitlerinin esterleri sentezlenebilir.
2) Elde edilen şeker yağ asidi esterlerinin bazı sürfaktan özellikleri (kritik miçel derişimi, emülsiyon kararlılığı, sabunlaşma sayısı) ve antibakteriyel etkileri araştırılabilir.

KAYNAKLAR

AFACH, G., KAWANAMI, Y. and IZUMORI, K., 2005. Synthesis of D-Allose Fatty Acid Esters via Lipase-Catalyzed Regioselective Transesterification, Biosci. Biotechnol. Biochem. 69(4): 833-835.

ARCOS, J. A., BERNABE, M. and OTERO, C., 1998. Quantitative Enzymatic Production of 1,6-diacyl Fructofuranoses, Enzyme and Microbial Technology 22:27-35.

BJORKLING, F., GODTFREDSEN, S. E. and KIRK, O., 1991. The Future Impact of Industrial Lipases, Trends Biotechnology 9:360-363.

CAO, L., BORNSCHEUER, U.T. and SCHMID, R.D., 1996. Lipase-catalyzed Solid Phase Synthesis of Sugar Esters, Fett/Lipid 10:332-335.

CAO, L., BORNSCHEUER, U.T. and SCHMID, R.D., 1999. Lipase-catalyzed Solid-phase Synthesis of Sugar Esters. Influence of Immobilization on Productivity and Stability of the Enzyme, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 6: 279-285.

COULON, D., GIRARDIN, M. and GHOUL, M., 1999. Enzymic Synthesis of Fructose Monooleate in a Reduced Pressure Pilot Scale Reactor Using Various Acyl Donors, Process Biochemistry 34: 913-918.

DEGN, P., PEDERSEN, L.H., DUUS, J.Ø. and ZIMMERMANN, W., 1999. Lipase-catalysed Synthesis of Glucose Fatty Acid Esters in tert-butanol, Biotechnology Letters 21: 275-280.

DEGN, P. and ZIMMERMANN, W., 2001. Optimization of Carbohydrate Fatty Acid Ester Synthesis in Organic Media by a Lipase from *Candida Antarctica*, 2001 John Wiley & Sons, Inc. Biotechnol Bioeng 74: 483-491.

DEVULAPALLE, K.S., SEGURA, A.G., FERRER, M., ALCALDE, M., MOOSER, G. and PLOU, F. J., 2004. Effect of Carbohydrate Fatty Acid Esters on *Streptococcus sobrinus* and Glucosyltransferase Activity, Carbohydrate Research 339: 1029-1034.

FERRER, M., CRUCES, M. A., BERNABE, M., BALLESTEROS, A. and PLOU, F. J., 1999. Lipase-catalyzed Regioselective Acylation of Sucrose in Two-Solvent Mixtures, Biotechnology and Bioengineering 65(1): 10-16.

FERRER, M., SOLIVERI, J., PLOU, F. J. and LOPEZ-CORTES, N., 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.

FLORES, M. V., NARAGHI, K., ENGASSER, J-M. and HALLING, P. J., **2002.** Influence of Glucose Solubility and Dissolution Rate on the Kinetics of Lipase Catalyzed Synthesis of Glucose Laurate in 2-Methyl-2-Butanol, 2002 Wiley Periodicals, Inc. Biotechnol Bioeng 78: 815-821.

FREGAPANE, G., SARNEY, D. B. and VULFSON, E. N., 1991. Enzymic Solvent-free Synthesis of Sugar Acetal Fatty Acid Esters, Enzyme Microb. Technol. 13:796-800.

GANSKE, F. and BORNSCHEUER, U. T., **2005**. Optimization of Lipase-Catalyzed Glucose Fatty Acid Ester Synthesis in a Two-Phase System Containing Ionic Liquids and t-BuOH, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 36: 40-42.

GANSKE, F. and BORNSCHEUER, U. T., **2005**. Lipase-Catalyzed Glucose Fatty Acid Ester Synthesis in Ionic Liquids, Organic Letters, 7(14): 3097-3098.

HEO, J-H., KIM, S. Y., KIM, H-S. and YOO, K-P., 2000. Enzymatic Preparation of a Carbohydrate Ester of Medium-chain Fatty Acid in Supercritical Carbon Dioxide, Biotechnology Letters 22(12):995-998.

JAEGER, K-E., **DIJKSTRA, B. W. and REETZ, M.T., 1999.** Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases, Annu. Rev. Microbiol. 53:315-351.

JANSSEN, A. E. M., KLABBERS, C., FRANSSEN, M. C. R. and K. Van't Riet., 1991. Enzymatic Synthesis of Carbohydrate Esters in 2-pyrrolidone, Enzyme Microb. Technol., 13:565-571.

KENNEDY, J. F., KUMAR, H., PANESAR, P. S., MARWAHA, S. S., GOYAL, R., PARMAR, A. and KAUR, S., 2006. Enzyme-catalyzed Regioselective Synthesis of Sugar Esters and Related Compounds, Journal of Chemical Technology and Biotechnology 81:866-876.

KIM, K-W., SONG, B., CHOI, M-Y. and KIM, M. J., 2001. Biocatalysis in Ionic Liquids: Markedly Enhanced Enantioselectivity of Lipase, Organic Letters, 3(10): 1507-1509.

KUMAR, R., MODAK, J. and MADRAS, G., **2005**. Effect of the Chain Length of the Acid on the Enzymatic Synthesis of Flavors in Supercritical Carbon Dioxide, Biochemical Engineering Journal 23: 199-202.

LEE, S. H., DANG, D. T., HA, S. H., CHANG, W-J. and KOO, Y-M., **2007**. Lipase-Catalyzed Snthesis of Fatty Acid Sugar Ester Using Extremely Supersatured Sugar Solution in Ionic Liquids, Biotechnol. Bioeng. 99: 1-8.

LIU, Z., CHI, Z., WANG, L. and LI, J., 2008. Production, Purification and Characterization of an Extracellular Lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with Potential Application for the Hydrolysis of Edible Oils, Biochemical Engineering Journal 40:445-451.

MILLER, G. L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, Anal. Chem. 31(2):426-428.

MURUGESAN, S. and LINHARDT, R.J., 2005. Ionic Liquids in Carbohydrate Chemistry-Current Trends and Future Directions, Current Organic Synthesis, 2: 437-451.

NELSON, D. L. and **COX, M. M., 2000.** Lehninger Principles of Biochemistry, Third Edition, P: 296-299, 363-366.

OGUNTIMEIN, G. B., ERDMANN, H. and SCHMID, R. D., 1993. Lipase Catalysed Synthesis of Sugar Ester in Organic Solvents, Biotechnology letters 15(2):175-180.

OKABE, S., SUGANUMA , M., TADA , Y., OCHIAI, Y., SUEOKA, E., KOHYA, H., SHIBATA, A., TAKAHASHI, M., MIZUTANI, M., MATSUZAKI, T. and FUJIKI, H., 1999. Disaccharide Esters Screened for

Inhibition of Tumor Necrosis Factor-α Release Are New Anti-cancer Agents, Jpn. J. Cancer Res. 90: 669-676.

OKAMOTO, T., YASUHITO, E. and UEJI, S., 2006. Metal Ions Dramatically Enhance the Enantioselectivity for Lipase-catalysed Reactions in Organic Solvents, Organic & Biomolecular Chemistry 4:1147-1153.

PANDEY, A., BENJAMIN, S., SOCCOL, S., NIGAM, C. R., KRIEGER, P. and SOCCOL, V. T., 1999. The Realm of Microbial Lipases in Biotechnology. Biotecnol. Appl. Biochem. 29:119-131.

RAHMAN, R. A. and HERAWAN, T., 2000. Properties of Biosurfactant Enzimatically Prepared from Fructose and Palm Fatty Acid, Journal of Oil Palm Research, 12(1):117-122.

RANTWIJK, F.V., LAU, R.M. and SHELDON R.A., 2003. Biocatalytic Transformation in Ionic Liquids, Trends in Biotechnology Vol.21 No.3.

REYES-DUARTE, D., LOPEZ-CORTES, N., FERRER, M., PLOU, F. J. and BALLESTEROS, A., 2004. Parameters Affecting Productivity in the Lipase-Catalysed Synthesis of Sucrose Palmitate, Biocatalysis and Biotransformation; 23(1): 19-27.

RIOS, A. P., HERNANDEZ-FERNANDEZ, F. J., TOMAS-ALONSO, F., GOMEZ, D. and VILLORA, G., 2008. Synthesis of Esters in Ionic Liquids The Effect of Vinyl Esters and Alcohols, Process Biochemistry 43:892-895.

RUBIN, B. and DENNIS, E.A., 1997. Lipases (Part B: Enzyme Characterization and Utilization), Methods in Enzymology , Vol. 286., P:50-65

SABEDER, S., HABULIN, M. and KNEZ, Z., 2005. Comparison of the Esterification of Fructose and Palmitic Acid in Organic Solvent and in Supercritical Carbon Dioxide, Ind. Eng. Chem. Res. 44: 9631-9635.

SABEDER, S., HABULIN, M. and KNEZ, Z., 2006. Lipase-catalyzed Synthesis of Fatty Acid Fructose Esters, Journal of Food Engineering 77: 880-886.

SAEED, H. M., ZAGHLOUL, T. I., KHALIL, A. I. and ABDELBAHETH, M. T., 2005. Purification and Characterization of Two Extracellular Lipases from *Pseudomonas aeruginosa* Ps-x, Polish Journal of Microbiology 54(3): 233-240.

SCHLOTTERBECK, A., LANG, S., WRAY, V. and WAGNER, F., 1993. Lipase-catalyzed Monoacylation of Fructose, Biotechnology Letters 15(1):61-64.

SHELDON, R.A., LAU, R.M., SORGEDRAGER, M.J., RANTWIJK, F.V. and SEDDON, K.R., **2002.** Biocatalysis in Ionic Liquids, Green Chemistry, 4:147-151.

SOULTANI, S., EGNASSER, J-M. and GHOUL, M., 2001. Effect of Acyl Donor Chain Length and Sugar/ Acyl Donor Molar Ratio on Enzymatic Synthesis of Fatty Acid Fructose Esters, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 11: 725-731.

SOULTANI, S., OGNIER, S., EGNASSER, J-M. and GHOUL, M., **2003.** Comparative Study of Some Surface Active Properties of Fructose Esters and Commercial Sucrose Esters, Colloids and Surface A: Physicochem. Eng. Aspects 227: 35-44.

STAMATIS, H., **SERETI, V. and KOLISIS, F. N., 2001.** Lipase-catalyzed Synthesis of Sugar Fatty Acid Esters in Supercritical Carbon Dioxide, Methods in Biotechnology 15:517-522.

SEKEROGLU, G., FADILOGLU, S. and IBANOGLU, E., **2002.** Production and Characterization of Enzymatically Produced Lauric Acid Esters of Fructose, Journal of the Science of Food and Agriculture 82: 1516-1522.

THERISOD, M., **KLIBANOV, A. M., 1986** Facile Enzymatic Preparation of Monoacylated Sugars in Pyridine, J. Am. Chem. Soc. 108:5638-5640.

TSITSIMPIKOU, C., STAMATIS, H., SERETI, V., DAFLOS, H. and KOLISIS, F. N., **1998.** Acylation of Glucose Catalysed by Lipases in Supercritical Carbon Dioxide, J.Chem. Technol. Biotechnol. 71:309-314.

TSUZUKI, W., KITAMURA, Y., SUZUKI, T. and KOBAYASHI, S., **1999.** Synthesis of Sugar Fatty Acid Esters by Modified Lipase, John Wiley & Sons, Inc. Biotechnol Bioeng 64: 267-271.

YAN, Y., BORNSCHEUER, U. T., STADLER, G., LUTZ-WAHL, S., OTTO, R. T., REUSS, M. and SCHMID, R. D., 2001. Regioselective lipase-

catalyzed Synthesis of Glucose Ester on a Preparative Scale, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 103: 583-587.

YOO, S. I., PARK, S. J. and YOON, H. H., 2007. Enzymatic Synthesis of Sugar Fatty Acid Esters, J. Ind. Eng. Chem., 13(1): 1-6.

WARD, O. P., FANG, J. and LI, Z., 1997. Lipase-catalyzed Synthesis of a Sugar Ester Containing Arachidonic Acid, Enzyme and Microbial Technology 20:52-56.

WATANABE, T., **KATAYAMA, S., MATSUBARA, M., HONDA, Y. and KUWAHARA, M., 2000.** Antibacterial Carbohydrate Monoesters Suppressing Cell Growth of *Streptococcus mutans* in the Presence of Sucrose, Current Microbiology, 41:210-213.

WOUDENBERG-VAN OOSTEROM, M., VAN RANTWIJK, F. and SHELDON, R. A., 1996. Regioselective Acylation of Disaccharides in tert-Butyl Alcohol Catalyzed by *Candida antarctica* Lipase, Biotechnology and Bioengineering 49: 328-333.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Adana'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi burada tamamladım. 2001 yılında Çukurova Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümünde üniversite eğitimime başladım. 2005 yılında mezun oldum ve aynı yıl Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde tezli yüksek lisans eğitimime başladım. 2007 yılı Ekim ayından itibaren Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalında araştırma görevlisi olarak görev yapmaktayım.