ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Deniz YILDIRIM

MUCOR MIEHEI VE *PSEUDOMONAS SP* LİPAZLARININ AKTİFLEŞTİRİLMİŞ FLORİSİL DESTEĞE GLUTARALDEHİT VE POLİSÜKSİNİMİD ÜZERİNDEN AYRI AYRI İMMOBİLİZASYONU VE İMMOBİLİZE LİPAZIN ESTERLEŞME REAKSİYONLARINDA KULLANIMI

KİMYA ANABİLİM DALI

ADANA, 2010

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MUCOR MIEHEI VE *PSEUDOMONAS SP* LİPAZLARININ AKTİFLEŞTİRİLMİŞ FLORİSİL DESTEĞE GLUTARALDEHİT VE POLİSÜKSİNİMİD ÜZERİNDEN AYRI AYRI İMMOBİLİZASYONU VE İMMOBİLİZE LİPAZIN ESTERLEŞME REAKSİYONLARINDA KULLANIMI

DENİZ YILDIRIM

DOKTORA TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu tez 18/ 10/ 2010 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği ile Kabul Edilmiştir.

İmza ……..……	İmza ……	İmza ……..……
Prof.Dr.S.Seyhan TÜKEL	Prof.Dr.Levent KAYRIN	Prof.Dr.Güzide YÜCEBİLGİÇ
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE

İmza …….	İmza ……..……
Prof. Dr. Nazan DEMİR	Doç. Dr. Ramazan BİLGİN
ÜYE	ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Kimya Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof. Dr. İlhami YEĞİNGİL
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FEF2005D15

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

ÖZ

DOKTORA TEZİ

MUCOR MIEHEI VE _PSEUDOMONAS SP_ LİPAZLARININ AKTİFLEŞTİRİLMİŞ FLORİSİL DESTEĞE GLUTARALDEHİT VE POLİSÜKSİNİMİD ÜZERİNDEN AYRI AYRI İMMOBİLİZASYONU VE İMMOBİLİZE LİPAZIN ESTERLEŞME REAKSİYONLARINDA KULLANIMI

Deniz YILDIRIM

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman : Prof.Dr. S.Seyhan TÜKEL
Yıl:2010, Sayfa:257
Jüri : Prof.Dr.S.Seyhan TÜKEL
: Prof.Dr.Levent KAYRIN
: Prof.Dr.Güzide YÜCEBİLGİÇ
: Prof.Dr.Nazan DEMİR
:Doç.Dr.Ramazan BİLGİN

Bu çalışmada, *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* lipazlarının aktifleştirilmiş florisile glutaraldehit ve polisüksinimid ara kolları üzerinden immobilizasyonları için en uygun immobilizasyon koşulları, serbest lipaz ve 4 farklı immobilize lipazın en yüksek aktivite gösterdikleri koşullar ve kinetik parametreleri belirlenmiştir. İmmobilize lipazların sentetik aktiviteleri L-askorbil palmitat ve enantiyosaf aminoalkollerin sentezleri ve rasemik mandelik asidin asimetrik amidasyonu reaksiyonları için araştırılmıştır. Serbest ve immobilize lipazlar arasında hidrolitik aktivite açısından en yüksek katalitik etkinliğin (k_{kat}/K_m) $6{,}91x10^5$ $s^{-1}M^{-1}$ olarak florisile polisüksinimid ara kolu üzerinden immobilize edilen *Pseudomonas sp.* lipazı için olduğu bulunmuştur. L-askorbil palmitat sentezinde tüm immobilize lipazlar için belirlenen optimum koşullarda yaklaşık %90 ürün verimine ulaşılmıştır. İmmobilize lipazların tümünün amino alkollerin kinetik rezolusyonunu %45-50 verimle ve %99 enantiyomerik aşırılıkta gerçekleştirdiği bulunmuştur. Florisile glutaraldehit ve polisüksinimid üzerinden immobilize edilen *Pseudomonas sp.* lipazlarının her ikisinin (R)-Mandelamid sentezini %50 verim %99 enantiyomerik aşırılıkta gerçekleştirdikleri belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Lipaz, İmmobilizasyon, L-Askorbil palmitat, Enantiyosaf Amino Alkol, Asimetrik Amidasyon.

ABSTRACT

PhD THESIS

IMMOBILIZATION OF *MUCOR MIEHEI* AND *PSEUDOMONAS SP* LIPASES ONTO FLORISIL VIA GLUTARALDEHYDE AND POLYSUCCINIMIDE AND THEIR USES IN ESTER SYNTHESIS

Deniz YILDIRIM

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

Supervisor :Prof.Dr. S.Seyhan TÜKEL
Year: 2010, Pages: 257
Jury : Prof.Dr.S.Seyhan TÜKEL
: Prof.Dr.Levent KAYRIN
: Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ
: Prof.Dr.Nazan DEMİR
: Assoc. Prof. Dr. Ramazan BİLGİN

In this study, the optimum immobilization conditions and the conditions in which free and 4 types of immobilized lipases showed their maximum activities and kinetic parameters were determined for immobilization of *Pseudomonas sp.* and *Mucor meihei* lipases onto activated florisil via glutaraldehyde and polysuccinimide spacer arms. The synthetic activities of immobilized lipases were also determined for the synthetic reactions such as L-ascorbyl palmitate synthesis and enantiopure amino alcohol synthesis and asymmetric amidation of racemic mandelic acid.It was found that the highest catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) in terms of hydrolytic activity was determined as $6.91x10^5$ $s^{-1}M^{-1}$ for *Pseudomonas sp.* lipase immobilized onto florisil via polysuccinime spacer arm among free and immobilized lipases. It was obtained about 90% yield in the synthesis of L-ascorbyl palmitate for all immobilized lipases under predetermined optimum conditions. It was found that all immobilized lipases were achieved the kinetic resolution of amino alcohols with 45-50% yield and 99% enantiomeric excess.It was determined that *Pseudomonas sp.* lipases immobilized onto florisil via glutaraldehyde and polysuccinimide both were achieved the (R)-Mandelamide synthesis with 50% yield and 99% enantiomeric excess.

KeyWords: Lipase, Immobilization, L-Ascorbyl palmitate, Enantiopure Amino Alcohol, Asymmetric Amidation.

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam boyunca bilgi, tecrübeleriyle bana yol gösteren, danışmanım sayın hocam Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarımda bana her zaman destek olan sayın hocalarım, Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ'e ve Doç. Dr. Ramazan BİLGİN'e, çalışmalarım sırasında bana her zaman çok destek olan arkadaşlarım Özlem ALPTEKİN'e ve Dilek ALAGÖZ'e çok teşekkür ederim. Ayrıca çalışmalarım sırasında beni manevi olarak destekleyen Kimya Bölümündeki arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Beni her zaman destekleyen sevgili eşim Özlem YILDIRIM'a, ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ……..I

ABSTRACT.....II

TEŞEKKÜR..... III

İÇİNDEKİLER IV

ÇİZELGELER DİZİNİ X

ŞEKİLLER DİZİNİ.....XII

SİMGELER VE KISALTMALAR.....XXII

1.GİRİŞ …… 1

1.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri 3

1.1.1. Taşıyıcıya Bağlama Yöntemleri..... 3

1.1.2. Çapraz Bağlama Yöntemleri 8

1.1.3. Tutuklama Yöntemleri 10

1.1.4. Enzim İmmobilizasyon Yöntemlerinin Kıyaslanması 14

1.2. Lipaz ……..15

1.3. C Vitamininin Yağ Asidi Esterleri ……..23

1.4. Enantiyosaf Amino Alkoller ……....24

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR ……..27

3.MATERYAL VE METOD ……....43

3.1. Materyal ……..43

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar ……43

3.1.2. Kullanılacak Cihaz ,Araç ve Gereçler ……...…….43

3.2. Metod ……..….44

3.2.1. Florisil Desteğinin Alkilamin Türevinin Lipaz İmmobilizasyonu İçin Hazırlanması …….. 44

3.2.2. Florisilin Alkilamin Türevinin Glutaraldehit İle Aktifleştirilmesi ve Schiff Bazının İndirgenmesi ……...44

3.2.3. *Pseudomonas sp*. ve *Mucor miehei* Lipazlarının Aktifleştirilmiş Florisile Glutaraldehit Ara Kolu Üzerinden Kovalent İmmobilizasyonu …….....46

3.2.4. Polisüksinimid Sentezi ve Florisilin Alkilamin Türevinin Polisüksinimid İle Aktifleştirilmesi ……..…...47

3.2.5. *Pseudomonas sp*. ve *Mucor miehei* Lipazlarının Aktifleştirilmiş Florisile Polisüksinimid Ara Kolu Üzerinden Kovalent İmmobilizasyonu …….48

3.2.6. Serbest ve İmmobilize *Pseudomonas sp*. ve *Mucor miehei* ……... Lipazlarının Hidrolitik Aktivitesinin Ölçümü ……..….49

3.2.7. *Pseudomonas sp*. ve *Mucor miehei* Lipazlarının Florisile Glutaraldehit .. veya Polisüksinimid Üzerinden Kovalent İmmobilizasyonu İçin ……. Optimum Koşullarının Belirlenmesi ……..50

3.2.8. Protein Tayini…….....51

3.2.9. Serbest ve İmmobilize *Pseudomonas sp*. ve Serbest ve İmmobilize *Mucor miehei* Lipazlarının Karakterizasyonu ……....52

3.2.10.İmmobilize *Pseudomonas sp*. ve *Mucor miehei* Lipazlarının Hidrolitik .. Aktiviteleri Açısından Tekrar Kullanım Kararlılıklarının Belirlenmesi 53

3.3.İmmobilize *Pseudomonas sp*. ve *Mucor miehei* Lipazlarının L-Askorbil ……. Palmitat Sentezi İçin Kullanılması …….54

3.3.1. L-Askorbil Palmitat Sentezi …...……..……..54

3.3.2.İmmobilize *Pseudomonas sp*. ve *Mucor miehei* Lipazları ile L-Askorbil .. Palmitat Sentezi İçin Optimum Koşulların Belirlenmesi…….……55

3.3.3. L-Askorbil Palmitat Sentezi İçin İmmobilize *Pseudomonas sp*.ve *Mucor miehei* Lipazlarının Tekrar Kullanım Kararlılıklarının Belirlenmesi 56

3.3.4. L-Askorbil Palmitatın Saflaştırılması …….....56

3.4.İmmobilize *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* Lipazları ile Enantiyosaf …….
Amino Alkol Sentezi ……..…57
3.4.1. Rasemik Amino Alkollerin Non-Enzimatik Sentezi ……. …57
3.4.2. Rasemik Amino Alkollerin Kinetik Rezolusyonu İçin İmmobilize ……..
Pseudomonas sp. ve *Mucor miehei* Lipazlarının Kullanılması ……..57
3.4.3. İmmobilize *Pseudomonas sp*. ve *Mucor miehei* Lipazları Kullanımı ile …
Rasemik Amino Alkollerin Kinetik Rezolusyonu İçin Optimum …….
Koşulların Belirlenmesi ……58
3.4.4. İmmobilize *Pseudomonas sp*. ve *Mucor miehei* Lipazları ile Rasemik ….
Amino Alkollerin Kinetik Rezolusyonunda Ürün Verimi ve ……..
Enantiyomerik Aşırılıkların Belirlenmesi ……...59
3.4.5. Enantiyosaf Amino Alkol Sentezi İçin İmmobilize *Pseudomonas sp*. ve
Mucor miehei Lipazlarının Tekrar Kullanım Kararlılığının Belirlenmesi
……60
3.5.İmmobilize *Pseudomonas sp*. ve *Mucor miehei* Lipazlarının Rasemik …….
Mandelik Asitin Asimetrik Amidasyonu İçin Kullanılması……61
3.5.1.Rasemik Mandelik Asitin Asimetrik Amidasyonu İçin Optimum …….
Koşulların Belirlenmesi……..…..61
3.5.2.Rasemik Mandelik Asitin Asimetrik Amidasyonu İçin Ürün Verimi ve …
Enantiyomerik Aşırılıkların Belirlenmesi ……..……..62
3.5.3.Farklı Primer Aminlerin Mandelik Asidin Asimetrik Amidasyonu İçin …
Kullanılması……..63
3.5.4.Enantiyosaf Mandelamid Sentezi İçin İmmobilize *Pseudomonas sp*. ……
Lipazlarının Tekrar Kullanım Kararlılıklarının Belirlenmesi ……..64
4. BULGULAR VE TARTIŞMA……...65
4.1.BULGULAR …….....65
4.1.1. *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* Lipazlarının Florisile Glutaraldehit
ve Polisüksinimid Ara Kolu Üzerinden Kovalent İmmobilizasyonları 65

4.1.1.1. *Pseudomonas sp.* Lipazının Florisile Glutaraldehit Ara Kolu ……..
Üzerinden Kovalent İmmobilizasyonu İçin İmmobilizasyon ……
Koşullarının Optimizasyonu …….65
4.1.1.2. *Mucor miehei* Lipazının Florisile Glutaraldehit Ara Kolu …….
Üzerinden Kovalent İmmobilizasyonu İçin İmmobilizasyon ……..
Koşullarının Optimizasyonu ……..70
4.1.1.3. *Pseudomonas sp*. Lipazının Florisile Polisüksinimid Ara Kolu …..
Üzerinden Kovalent İmmobilizasyonu İçin İmmobilizasyon ……..
Koşullarının Optimizasyonu ……..75
4.1.1.4. *Mucor miehei* Lipazının Florisile Polisüksinimid Ara Kolu ……
Üzerinden Kovalent İmmobilizasyonu İçin İmmobilizasyon ……..
Koşullarının Optimizasyonu ……..80
4.1.2.Serbest ve Florisile Glutaraldehit ve Polisüksinimid Ara Kolları …….
Üzerinden İmmobilize Edilmiş Olan *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei*
Lipazlarının Hidrolitik Aktivitelerinin Belirlenmesi ……..85
4.1.2.1.Serbest, Florisile Glutaraldehit ve Polisüksinimid Ara Kolları ……..
Üzerinden İmmobilize Edilmiş Olan *Pseudomonas sp.* Lipazlarının .
Maksimum Aktivite Gösterdiği Koşulların, Kinetik Parametrelerin, .
Termal, Depolama Kararlılıklarının ve İmmobilize *Pseudomonas sp.*
Lipazların Tekrar Kullanım Kararlılıklarının Belirlenmesi …….85
4.1.2.2. Serbest, Florisile Glutaraldehit ve Polisüksinimid Ara Kolları ……...
Üzerinden İmmobilize Edilmiş Olan *Mucor miehei* Lipazlarının …..
Maksimum Aktivite Gösterdiği Koşulların, Kinetik Parametrelerin, ..
Termal, Depolama Kararlılıklarının ve İmmobilize *Mucor miehei* ….
Lipazların Tekrar Kullanım Kararlılıklarının Belirlenmesi …….97
4.1.3.İmmobilize *Pseudomonos sp.* ve *Mucor miehei* Lipazların L-Askorbil ….
Palmitat Sentezinde Kullanımı ……..……..108
4.1.3.1. Florisile Glutaraldehit veya Polisüksinimid Ara Kolu Üzerinden …
İmmobilize Edilmiş Olan *Pseudomonos sp.* Lipazının L-Askorbil …

Palmitat Sentezi İçin Maksimum Aktivite Gösterdiği Koşulların ….
ve Tekrar Kullanım Kararlılıklarının Belirlenmesi ……..108
4.1.3.2. Florisile Glutaraldehit veya Polisüksinimid Ara Kolu Üzerinden …
İmmobilize Edilmiş Olan *Mucor miehei* Lipazının L-Askorbil …….
Palmitat Sentezi İçin Maksimum Aktivite Gösterdiği Koşulların …..
ve Tekrar Kullanım Kararlılıklarının Belirlenmesi …….....114
4.1.4. İmmobilize *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* Lipazlarının Rasemik ….
Aminoalkollerin Kinetik Rezolusyonunda Kullanımı ……..….119
4.1.4.1. Rasemik Amino Alkollerin Non-Enzimatik Sentezi ……...…..119
4.1.4.2. Florisile Glutaraldehit veya Polisüksinimid Ara Kolu Üzerinden …
İmmobilize Edilmiş Olan *Pseudomonos sp*. Lipazının Rasemik …...
Amino Alkollerin Kinetik Rezolusyonu İçin Maksimum Aktivite …
Gösterdiği Koşulların Belirlenmesi ……..…..123
4.1.4.3. Florisile Glutaraldehit veya Polisüksinimid Ara Kolu Üzerinden …
İmmobilize Edilmiş Olan *Pseudomonos sp*. Lipazı ile Rasemik …..
Amino Alkollerin Kinetik Rezolusyonu İçin Ürün Verimi, ……..
Enantiyomerik Aşırılıkların ve Tekrar Kullanım Kararlılığının ……
Belirlenmesi …….128
4.1.4.4.Florisile Glutaraldehit veya Polisüksinimid Ara Kolu Üzerinden …
İmmobilize Edilmiş Olan *Mucor miehei* Lipazının Rasemik Amino .
Alkollerin Kinetik Rezolusyonu İçin Maksimum Aktivite …….....
Gösterdiği Koşulların Belirlenmesi …….....138
4.1.4.5. Florisile Glutaraldehit veya Polisüksinimid Ara Kolu Üzerinden …
İmmobilize Edilmiş Olan *Mucor miehei* Lipazı ile Rasemik ……
Amino Alkollerin Kinetik Rezolusyonu ve Tekrar Kullanım ……....
Kararlılığı ……...….142
4.1.5.Florisile Glutaraldehit veya Polisüksinimid Ara Kolu Üzerinden ……
İmmobilizeEdilmiş Olan *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* Lipazları ile .
Rasemik Mandelik Asitin Asimetrik Amidasyon Reaksiyonu ……..153
4.1.5.1.Farklı Primer Aminlerin Mandelik Asidin Asimetrik Amidasyonu
İçin Kullanılması …….161

4.1.6. Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi ve Nükleer Magnetik Rezonans Spektroskopisi Analizleri …….163
4.2.TARTIŞMA ……...164
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER …….175
5.1.Sonuçlar …….175
5.2.Öneriler ……..177
KAYNAKLAR ……184
ÖZGEÇMİŞ …….195
EKLER ……. …...197

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge1.1.İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması …….. 14
Çizelge1.2.Endüstriyel uygulamalarda çok fazla kullanılan lipaz türleri ….. 19
Çizelge1.3.Ticari olarak satılan lipazların endüstriyel kullanım alanları ….. 20
Çizelge 4.1.GIPSL için farklı zincir uzunluğunda primer aminler kullanıldığında elde edilen ürün, konfigürasyon, verim ve enantiyomerik aşırılık ……. 161
Çizelge 4.2.PIPSL için farklı zincir uzunluğunda primer aminler kullanıldığında elde edilen ürün, konfigürasyon, verim ve enantiyomerik aşırılık ……. 162

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. Enzimlerin özelliklerini değiştirmek için kullanılan biyolojik ve kimyasal yöntemler ……..... 2
Şekil 1.2. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması …… 3
Şekil 1.3. Taşıyıcıya bağlama yöntemlerinin şematik gösterimi ……... 4
Şekil 1.4. Destek yüzeyindeki aktif fonksiyonel gruba (X) bağlı olarak enzim (EN) molekülünde bağlanmada kullanılabilecek artık aminoasit grupları …….. 6
Şekil 1.5. Kovalent bağlanmada çok sıklıkla kullanılan aktif fonksiyonel grupların şematik gösterimi ……... 6
Şekil 1.6. Reaktif amino asit artıkları …… 7
Şekil 1.7. CLEA hazırlama yönteminin şematik gösterimi 10
Şekil 1.8. Polimer bir matriks içerisinde enzim molekülünü tutuklanması ... 11
Şekil 1.9. Fiziksel jelleşme ile enzim immobilizasyonunun şematik gösterimi ……. 11
Şekil 1.10. Mikrokapsülleme ile enzim immobilizasyonunun şematik gösterimi ……... 12
Şekil 1.11. Lipozom tekniği ile enzim immobilizasyonu …….. 13
Şekil 1.12. Lipazların katalizlediği reaksiyonların şematik gösterimi ……... 15
Şekil 1.13. Lipazların katalitik bölgesinde oluşan reaksiyonların gösterimi . 16
Şekil 1.14. 2-(metilamino)-1-feniletanol'ün kimyasal yapısı …… 24
Şekil 3.1. Florisil desteğinin 3-APTES ile aktivite edilmesi ……. 44
Şekil 3.2. Aktifleştirilmiş florisil desteğinin glutaraldehit ile reaksiyonu …. 45
Şekil 3.3. Aktifleştirilmiş florisil desteğinin glutaraldehit ile reaksiyonu sonucu oluşan Schiff bazının indirgenmesi ……... 46
Şekil 3.4. Aktifleştirilmiş florisil desteğinin üzerine lipaz enziminin ……... glutaraldehit ara kolu üzerinden immobilizasyonu …… 47
Şekil 3.5. Aktifleştirilmiş florisil desteğinin polisüksinimid ile reaksiyonu .. 48
Şekil 3.6. Aktifleştirilmiş florisil desteğe lipazın polisüksinimid ara kolu üzerinden immobilizasyonu ……..... 49

Şekil 3.7. Lipaz tarafından katalizlenmiş p-nitrofenolpalmitat hidrolizi ….. 50
Şekil 3.8. Lipaz tarafından katalizlenmiş L-6-Askorbil palmitat sentezi ….. 54
Şekil 3.9. Rasemik Amino alkollerin enzimatik olmayan sentezi ……. 57
Şekil 3.10.Lipaz tarafından katalizlenmiş rasemik amino alkolün kinetik rezolusyonu ……... 58
Şekil 3.11.Rasemik Mandelik asitin asimetrik amidasyonu ……. 62
Şekil 3.12. Farklı primer aminler kullanılarak gerçekleştirilen mandelik …. asitin kinetik rezolusyonu …… 63
Şekil 4.1. İmmobilizasyon pH'sına bağlı olarak *Pseudomonas sp.* lipazının florisile glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent …… immobilizasyonunda aktivite ve bağlanma yüzdesindeki …… değişimler…… 66
Şekil 4.2. *Pseudomonas sp.* lipazının florisile glutaraldehit ara kolu …… üzerinden kovalent immobilizasyonunda immobilizasyon …… tamponunun derişimindeki değişikliğe bağlı olarak aktivite ve … bağlanma yüzdesindeki değişimler …… 67
Şekil 4.3. İmmobilizasyon sıcaklığına bağlı olarak *Pseudomonas sp.* …….. lipazının florisile glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent …….. immobilizasyonunda aktivite ve bağlanma yüzdesindeki …….. değişimler …….. 68
Şekil 4.4. *Pseudomonas sp.* lipazının florisile glutaraldehit ara kolu …… üzerinden kovalent immobilizasyonunda immobilizasyon …… süresine bağlı olarak aktivite ve bağlanma yüzdesindeki …….. değişimler …….. 69
Şekil 4.5. *Pseudomonas sp.* lipazının florisile glutaraldehit ara kolu …… üzerinden kovalent immobilizasyonunda lipaz derişimine bağlı ... olarak aktivite ve bağlanma yüzdesindeki değişimler ……... 70
Şekil 4.6. İmmobilizasyon pH'sına bağlı olarak *Mucor miehei* lipazının …. florisile glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent …… immobilizasyonunda aktivite ve bağlanma yüzdesindeki …… değişimler…… 71

Şekil 4.7. *Mucor miehei* lipazının florisile glutaraldehit ara kolu ……. üzerinden kovalent immobilizasyonunda immobilizasyon …… tamponunun derişimindeki değişikliğe bağlı olarak aktivite ve … bağlanma yüzdesindeki değişimler …… 72
Şekil 4.8. İmmobilizasyon sıcaklığına bağlı olarak *Mucor miehei* …… lipazının florisile glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent …….. immobilizasyonunda aktivite ve bağlanma yüzdesindeki …….. değişimler …….. 73
Şekil 4.9. *Mucor miehei* lipazının florisile glutaraldehit ara kolu ……. üzerinden kovalent immobilizasyonunda immobilizasyon …… süresine bağlı olarak aktivite ve bağlanma yüzdesindeki …….. değişimler …….. 74
Şekil 4.10. *Mucor miehei* lipazının florisile glutaraldehit ara kolu …… üzerinden kovalent immobilizasyonunda lipaz derişimine bağlı .. olarak aktivite ve bağlanma yüzdesindeki değişimler …….. 75
Şekil 4.11. İmmobilizasyon pH'sına bağlı olarak *Pseudomonas sp.* …… lipazının florisile polisüksinimid ara kolu üzerinden kovalent … immobilizasyonunda aktivite ve bağlanma yüzdesindeki ……. değişimler ……. 76
Şekil 4.12. *Pseudomonas sp.* lipazının florisile polisüksinimid ara kolu ….. üzerinden kovalent immobilizasyonunda immobilizasyon …….. tamponunun derişimindeki değişikliğe bağlı olarak aktivite ve .. bağlanma yüzdesindeki değişimler ……. 77
Şekil 4.13. İmmobilizasyon sıcaklığına bağlı olarak *Pseudomonas sp.* …… lipazının florisile polisüksinimid ara kolu üzerinden kovalent … immobilizasyonunda aktivite ve bağlanma yüzdesindeki …….. değişimler …….. 78
Şekil 4.14. *Pseudomonas sp.* lipazının florisile polisüksinimid ara kolu ….. üzerinden kovalent immobilizasyonunda immobilizasyon ……. süresine bağlı olarak aktivite ve bağlanma yüzdesindeki …… değişimler ……. 79

Şekil 4.15. *Pseudomonas sp.* lipazının florisile polisüksinimid ara kolu ….. üzerinden kovalent immobilizasyonunda kullanılan lipaz …….. derişimine bağlı olarak aktivite ve bağlanma yüzdesindeki ……. değişimler ……. 80
Şekil 4.16. İmmobilizasyon pH'sına bağlı olarak *Mucor miehei* lipazının … florisile polisüksinimid ara kolu üzerinden kovalent ……... immobilizasyonunda aktivite ve bağlanma yüzdesindeki …… değişimler …….. 81
Şekil 4.17. *Mucor miehei* lipazının florisile polisüksinimid ara kolu …… üzerinden kovalent immobilizasyonunda immobilizasyon …….. tamponunun derişimindeki değişikliğe bağlı olarak aktivite ve .. bağlanma yüzdesindeki değişimler …….. 82
Şekil 4.18. İmmobilizasyon sıcaklığına bağlı olarak *Mucor miehei* lipazının florisile polisüksinimid ara kolu üzerinden kovalent ……... immobilizasyonunda aktivite ve bağlanma yüzdesindeki …… değişimler ……. 83
Şekil 4.19. *Mucor miehei* lipazının florisile polisüksinimid ara kolu …… üzerinden kovalent immobilizasyonunda immobilizasyon …….. süresine bağlı olarak aktivite ve bağlanma yüzdesindeki ……... değişimler …… 84
Şekil 4.20. *Mucor miehei* lipazının florisile polisüksinimid ara kolu …… üzerinden kovalent immobilizasyonunda kullanılan lipaz ……... derişimine bağlı olarak aktivite ve bağlanma yüzdesindeki ……. değişimler ……. 85
Şekil 4.21. Serbest, GIPSL ve PIPSL lipazlarının aktivitelerinin pH'ya ….. bağlı değişimi ……... 86
Şekil 4.22. Serbest, GIPSL ve PIPSL lipazlarının aktivitelerinin tampon …. derişimine bağlı olarak değişimi …….. 87
Şekil 4.23. Serbest, GIPSL ve PIPSL'nin aktivitelerinin sıcaklıklığa bağlı .. olarak değişimi ……. 88
Şekil 4.24. Serbest *Pseudomonas sp.* lipazı için Lineweaver-Burk grafiği ... 89

Şekil 4.25. GIPSL için Lineweaver-Burk grafiği 90
Şekil 4.26. PIPSL için Lineweaver-Burk grafiği 90
Şekil 4.27. Serbest *Pseudomonas sp.* lipazının 35 ve 60 ºC'de aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı olarak değişimi …….. 91
Şekil 4.28. GIPSL için 35 ve 60 ºC'de aktivitesinin inkübasyon süresine … bağlı olarak değişimi ……... 92
Şekil 4.29. PIPSL için 35 ve 60 ºC'de aktivitesinin inkübasyon süresine …. bağlı olarak değişimi …… 93
Şekil 4.30. Serbest *Pseudomonas sp.* lipazının 5 ºC ve oda sıcaklığında ….. aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı olarak değişimi ……. 94
Şekil 4.31. GIPSL için 5 ºC ve oda sıcaklığındaki aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı olarak değişimi ……. 95
Şekil 4.32. PIPSL 5 ºC ve oda sıcaklığındaki aktivitesinin inkübasyon …… süresine bağlı olarak değişimi ……. 95
Şekil 4.33. GIPSL ve PIPSL'nin p-nitrofenil palmitat hidrolizi için tekrar .. kullanım sayısına bağlı olarak aktivitesindeki değişim …….. 96
Şekil 4.34. Serbest, GIMML ve PIMML lipazlarının aktivitelerinin pH'ya . bağlı değişimi……... 97
Şekil 4.35. Serbest, GIMML ve PIMML lipazlarının aktivitelerinin tampon derişimine bağlı olarak değişimi …….. 98
Şekil 4.36. Serbest, GIMML ve PIMML'nin aktivitelerinin sıcaklıklığa ….. bağlı olarak değişimi ……... 99
Şekil 4.37. Serbest *Mucor miehei* lipazı için Lineweaver-Burk grafiği 100
Şekil 4.38. GIMML için Lineweaver-Burk grafiği 101
Şekil 4.39. PIMML için Lineweaver-Burk grafiği 101
Şekil 4.40. Serbest *Mucor miehei* lipazının 35 ve 60 ºC'de aktivitesinin ….. inkübasyon süresine bağlı olarak değişimi …….. 102
Şekil 4.41. GIMML için 35 ve 60 ºC'de aktivitesinin inkübasyon süresine .. bağlı olarak değişimi ……... 103
Şekil 4.42. PIMML için 35 ve 60 ºC'de aktivitesinin inkübasyon süresine .. bağlı olarak değişimi ……... 104

Şekil 4.43. Serbest *Mucor miehei* lipazının 5 ºC ve oda sıcaklığında ……
aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı olarak değişimi …….. 105
Şekil 4.44. GIMML için 5 ºC' ve oda sıcaklığındaki aktivitesinin depolama
süresine bağlı olarak değişimi ……. 106
Şekil 4.45. PIMML için 5 ºC ve oda sıcaklığındaki aktivitesinin ……..
inkübasyon süresine bağlı olarak değişimi …….. 106
Şekil 4.46. GIMML ve PIMML'nin p-nitrofenil palmitat hidrolizi için …...
tekrar kullanım sayısına bağlı olarak aktivitesindeki değişim … 107
Şekil 4.47. GIPSL ve PIPSL için L-Askorbil palmitat veriminin ortamda …
bulunan su miktarına bağlı olarak değişimi …… 108
Şekil 4.48. GIPSL ve PIPSL için L-Askorbil palmitat veriminin ortamda …
bulunan moleküler elek miktarına bağlı olarak değişimi …… 109
Şekil 4.49. GIPSL ve PIPSL için L-Askorbil palmitat veriminin reaksiyon
sıcaklığına bağlı olarak değişimi ……. 110
Şekil 4.50. GIPSL ve PIPSL için L-Askorbil palmitat veriminin reaksiyon
zamanına bağlı olarak değişimi ……... 111
Şekil 4.51. Kullanılan immobilize GIPSL ve PIPSL miktarının L-Askorbil
palmitat verimine etkisi …… 112
Şekil 4.52. L-Askorbil palmitat sentezi için GIPSL ve PIPSL örneklerinin ..
tekrar kullanım kararlılıklarının belirlenmesi …….. 113
Şekil 4.53. GIMML ve PIMML için L-Askorbil palmitat veriminin ……
ortamda bulunan su miktarına bağlı olarak değişimi ……... 114
Şekil 4.54. GIMML ve PIMML için L-Askorbil palmitat veriminin…….
ortamda bulunan moleküler elek miktarına bağlı olarak değişimi 115
Şekil 4.55. GIMML ve PIMML için L-Askorbil palmitat veriminin ……
reaksiyon sıcaklığına bağlı olarak değişimi …… 116
Şekil 4.56. L-Askorbil palmitat veriminin reaksiyon zamanına bağlı olarak
değişimi …… 117
Şekil 4.57. Kullanılan immobilize GIMML ve PIMML miktarının L- …….
Askorbil palmitat verimine etkisi ……. 118

Şekil 4.58. L-Askorbil palmitat sentezi için GIMML ve PIMML …….
lipazlarının tekrar kullanım kararlılığının belirlenmesi ……... 119
Şekil 4.59. Rasemik 2-(metilamino)-1-feniletanol'ün kiral HPLC ……
kromatoğramı ……... 120
Şekil 4.60. Rasemik 2-(etilamino)-1-feniletanol'ün kiral HPLC ……..
kromatoğramı ……... 120
Şekil 4.61. Rasemik 2-(propilamino)-1-feniletanol'ün kiral HPLC ……..
kromatoğramı ……... 121
Şekil 4.62. Rasemik 2-(allilamino)-1-feniletanol'ün kiral HPLC …….
kromatoğramı ……... 121
Şekil 4.63. Rasemik 2-(butilamino)-1-feniletanol'ün kiral HPLC ……
kromatoğramı ……... 122
Şekil 4.64. Rasemik 2-(hekzilamino)-1-feniletanol'ün kiral HPLC ……..
kromatoğramı ……. 122
Şekil 4.65. GIPSL için rasemik 2-(etilamino)-1-feniletanol'ün kinetik ……
rezolusyonuna ortamda bulunan su miktarının etkisi …….. 123
Şekil 4.66. GIPSL için rasemik 2-(etilamino)-1-feniletanol'ün kinetik ……
rezolusyonuna reaksiyon sıcaklığının etkisi …… 124
Şekil 4.67. GIPSL için rasemik 2-(etilamino)-1-feniletanol'ün kinetik …..
rezolusyonuna vinil asetat/amino alkol molar oranının ürün ….
verimine etkisi ……. 125
Şekil 4.68. GIPSL için rasemik 2-(etilamino)-1-feniletanol'ün kinetik ……
rezolusyonuna reaksiyonda kullanılan organik çözücülerin etkisi 126
Şekil 4.69. GIPSL için rasemik 2-(etilamino)-1-feniletanol'ün kinetik ……
rezolusyonuna reaksiyonda kullanılan immobilize enzim ……...
miktarının etkisi ……... 127
Şekil 4.70. GIPSL tarafından katalizlenen rasemik 2-(metilamino)-1-……..
feniletanol'ün kinetik rezolusyonu ……... 129
Şekil 4.71. PIPSL tarafından katalizlenen rasemik 2-(metilamino)-1-……...
feniletanol'ün kinetik rezolusyonu ……... 129

Şekil 4.72. GIPSL tarafından katalizlenen rasemik 2-(etilamino)-1-…….
feniletanol'ün kinetik rezolusyonu ……... 130
Şekil 4.73. PIPSL tarafından katalizlenen rasemik 2-(etilamino)-1-……..
feniletanol'ün kinetik rezolusyonu ……... 130
Şekil 4.74. GIPSL tarafından katalizlenen rasemik 2-(propilamino)-1-…….
feniletanol'ün kinetik rezolusyonu ……... 131
Şekil 4.75. PIPSL tarafından katalizlenen rasemik 2-(propilamino)-1-……..
feniletanol'ün kinetik rezolusyonu ……... 132
Şekil 4.76. GIPSL tarafından katalizlenen rasemik 2-(allilamino)-1-……
feniletanol'ün kinetik rezolusyonu …….. 133
Şekil 4.77. PIPSL tarafından katalizlenen rasemik 2-(allilamino)-1-…….
feniletanol'ün kinetik rezolusyonu ……... 133
Şekil 4.78. GIPSL tarafından katalizlenen rasemik 2-(butilamino)-1-……...
feniletanol'ün kinetik rezolusyonu …….. 135
Şekil 4.79. PIPSL tarafından katalizlenen rasemik 2-(butilamino)-1-……
feniletanol'ün kinetik rezolusyonu ……... 135
Şekil 4.80. GIPSL tarafından katalizlenen rasemik 2-(hekzilamino)-1-…….
feniletanol'ün kinetik rezolusyonu ……... 136
Şekil 4.81. PIPSL tarafından katalizlenen rasemik 2-(hekzilamino)-1-…….
feniletanol'ün kinetik rezolusyonu ……... 136
Şekil 4.82. GIPSL'in rasemik aminoalkollerin kinetik rezolusyonu için …..
tekrar kullanım kararlılığı ……... 137
Şekil 4.83. PIPSL'in rasemik aminoalkollerin kinetik rezolusyonu için …..
tekrar kullanım kararlılığı …… 137
Şekil 4.84.GIMML için rasemik 2-(etilamino)-1-feniletanol'ün kinetik …..
rezolusyonuna ortamda bulunan su miktarının etkisi …….. 138
Şekil 4.85.GIMML için rasemik 2-(etilamino)-1-feniletanol'ün kinetik …..
rezolusyonuna reaksiyon sıcaklığının etkisi …… 139
Şekil 4.86.GIMML için rasemik 2-(etilamino)-1-feniletanol'ün kinetik ….
rezolusyonuna vinil asetat/amino alkol molar oranının etkisi ….. 140

Şekil 4.87.GIMML için rasemik 2-(etilamino)-1-feniletanol'ün kinetik ….
rezolusyonuna reaksiyonda kullanılan organik çözücülerin etkisi 141
Şekil 4.88.GIMML için rasemik 2-(etilamino)-1-feniletanol'ün kinetik ….
rezolusyonuna reaksiyonda kullanılan GIMML miktarının ürün .
verimine etkisi …….. 142
Şekil 4.89.GIMML tarafından katalizlenen rasemik 2-(metilamino)-1-…..
feniletanol'ün kinetik rezolusyonu …….. 143
Şekil 4.90. PIMML tarafından katalizlenen rasemik 2-(metilamino)-1-…...
feniletanol'ün kinetik rezolusyonu …….. 143
Şekil 4.91.GIMML tarafından katalizlenen rasemik 2-(etilamino)-1-…….
feniletanol'ün kinetik rezolusyonu …….. 144
Şekil 4.92. PIMML tarafından katalizlenen rasemik 2-(etilamino)-1-…….
feniletanol'ün kinetik rezolusyonu …….. 145
Şekil 4.93.GIMML tarafından katalizlenen rasemik 2-(propilamino)-1-….
feniletanol'ün kinetik rezolusyonu …….. 146
Şekil 4.94. PIMML tarafından katalizlenen rasemik 2-(propilamino)-1-…..
feniletanol'ün kinetik rezolusyonu …….. 146
Şekil 4.95.GIMML tarafından katalizlenen rasemik 2-(allilamino)-1-…….
feniletanol'ün kinetik rezolusyonu …….. 147
Şekil 4.96.PIMML tarafından katalizlenen rasemik 2-(allilamino)-1-…….
feniletanol'ün kinetik rezolusyonu …….. 148
Şekil 4.97.GIMML tarafından katalizlenen rasemik 2-(butilamino)-1-……
feniletanol'ün kinetik rezolusyonu …….. 149
Şekil 4.98.PIMML tarafından katalizlenen rasemik 2-(butilamino)-1-……
feniletanol'ün kinetik rezolusyonu …….. 149
Şekil 4.99.GIMML tarafından katalizlenen rasemik 2-(hekzilamino)-1-….
feniletanol'ün kinetik rezolusyonu …….. 150
Şekil 4.100.PIMML tarafından katalizlenen rasemik 2-(hekzilamino)-1-…..
feniletanol'ün kinetik rezolusyonu …….. 151
Şekil 4.101.GIMML'in rasemik aminoalkollerin kinetik rezolusyonu için…
tekrar kullanım kararlılığı ……... 152

Şekil 4.102.PIMML'in rasemik aminoalkollerin kinetik rezolusyonu için ... tekrar kullanım kararlılığı ……... 152
Şekil 4.103.Rasemik mandelik asitin asimetrik amidasyon reaksiyonu için kullanılan immobilize *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* ……. lipazları için elde edilen verim ve enantiyomerik aşırılıklar …... 153
Şekil 4.104.Rasemik mandelik asitin asimetrik amidasyon reaksiyonuna … ortam sıcaklığın etkisi ……. 154
Şekil 4.105.Rasemik mandelik asitin asimetrik amidasyon reaksiyonuna … amonyum bikarbonat/mandelik asit oranının etkisi ……... 155
Şekil 4.106.Rasemik mandelik asitin asimetrik amidasyon reaksiyonuna … reaksiyon ortamı olarak kullanılan organik çözücülerin etkisi ... 156
Şekil 4.107.Rasemik Mandelik asidin asimetrik amidasyon reaksiyonu için kullanılan immobilize enzim miktarının ürün verimine etkisi … 157
Şekil 4.108.GIPSL için tarafından katalizlenen rasemik mandelik asitin ..... asimetrik amidasyonu 158
Şekil 4.109.PIPSL için tarafından katalizlenen rasemik mandelik asitin ..... asimetrik amidasyonu 159
Şekil 4.110.Enantiyosaf Mandelamid sentezi için GIPSL lipazının tekrar … kullanım kararlılığı …….. 160
Şekil 4.111.Enantiyosaf Mandelamid sentezi için PIPSL lipazının tekrar … kullanım kararlılığı …….. 160
Şekil 4.112.Hızlı (a) ve yavaş (b) reaksiyon veren enantiyomerlerin lipazın aktif bölgesine bağlanmalarının gösterimi …….. 172

SİMGELER VE KISALTMALAR

3-APTES : 3-Aminopropiltrietoksisilan

DEE : Dietileter

DIPE : Diisopropileter

DIO : Dioksan

DMSO : Dimetilsülfoksit

FT-IR : Fourier Transform Infrared

HPLC : Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

GIMML :Florisile glutaraldehit ara kolu üzerinden immobilize edilmiş *Mucor miehei* lipazı

GIPSL : Florisile glutaraldehit ara kolu üzerinden immobilize edilmiş *Pseudomonas sp.* lipazı

İmm : İmmobilizasyon

k_{cat} : Turnover sayısı

K_m : Michealis Menten hız sabiti

NMR : Nükleer Manyetik Rezonans

PIMML :Florisile polisüksinimid ara kolu üzerinden immobilize edilmiş *Mucor miehei* lipazı

PIPSL: Florisile polisüksinimid ara kolu üzerinden immobilize edilmiş *Pseudomonas sp.* lipazı

TBME : tert-butil metil eter

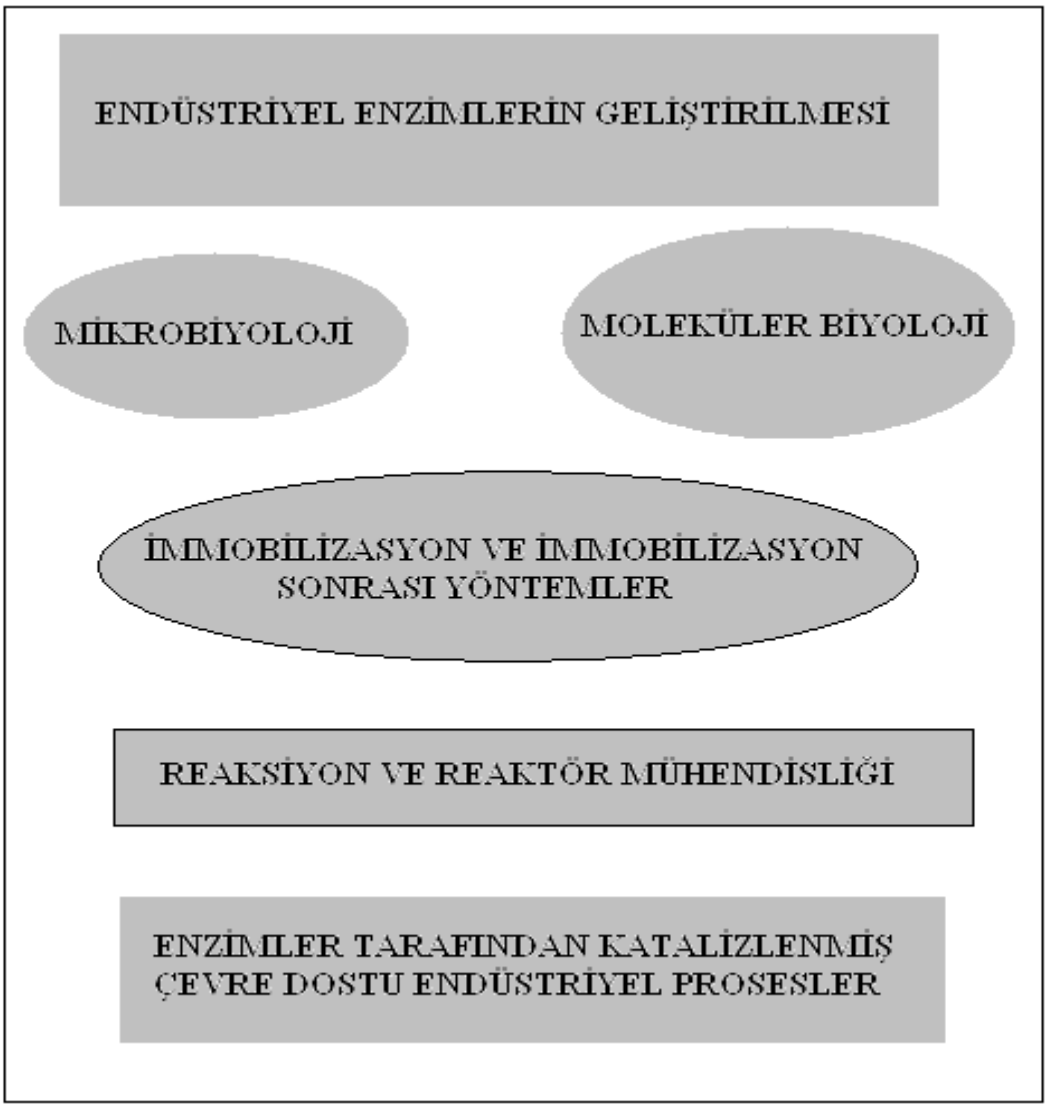
THF : Tetrahidrofuran

V_{max} : Maksimum hız

1.GİRİŞ

Enzimler, biyolojik sistemlerdeki kompleks reaksiyonların canlılığa zarar vermeyecek ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan ve çoğu protein yapısında olan son derece spesifik biyokatalizörlerdir. Yeterli in vitro koşulların sağlanması durumunda etkilerini gösterebiliyor olmaları, substratlarına karşı yüksek seçicilik göstermeleri, ılımlı reaksiyon koşullarında yüksek aktivite gösterebilmeleri ve yüksek geridönüşüm sayılarına sahip olmaları nedeniyle enzimlerden doğal ortamlarının dışındaki pek çok alanda yararlanabilme imkanını ortaya çıkarmaktadır. Enzimlerin teknik kimya ve biyoteknolojide çeşitli amaçlarla kullanılmaya başlanması, enzimlerin daha ekonomik ve kullanışlı hale getirme çalışmalarının artmasına neden olmuştur.

Enzimler canlılar tarafından üretildiklerinden endüstriyel veya analitik amaçlı kullanımları için doku, kan, mikroorganizma gibi canlı veya canlı kökenli kaynaklardan saflaştırılırlar. Enzim üretiminde hammadde olarak canlıların kullanımı ekonomik açıdan sınırlayıcı bir durum olsa da bu sorun mikrobiyal kaynaklar sayesinde büyük ölçüde çözülmüş görünmektedir. Bununla birlikte enzimlerin mikrobiyal kaynaklardan saflaştırılması oldukça masraflı bir iştir. Endüstriyel uygulamalarda serbest enzimin aktivitesini kaybetmeden geri kazanılması çok zordur. Serbest enzim, reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılamadığından reaksiyonun kontrolü çok güçtür. Reaksiyonun istenilen anda durdurulması için inhibitör kullanılması düşünülebilir. Ancak serbest enzim tarafından kirletilmiş olan reaksiyon ürünlerine böylece yeni bir kirlilik unsuru eklenmiş olacaktır. Ürün veya ürünlerin bu kirlilik unsurlarından arıtılması maliyeti çok arttırmaktadır. Katalizör olarak kullanılan serbest enzimi reaksiyon ortamından aktivitesini yitirmeden çıkarabilmek olanaksız olduğundan enzimin yeniden kullanılması da söz konusu değildir. Bu ise enzimlerin spesifik ama o ölçüde pahalı katalizör olmaları nedeniyle maliyeti yükselten önemli bir etmendir. Ayrıca serbest enzimler sürekli üretim sistemlerine de uygulanamazlar. Bu nedenle saflaştırılan enzimlerden endüstriyel proseslerde olabildiğince faydalanmak için farklı teknikler geliştirilmiştir.

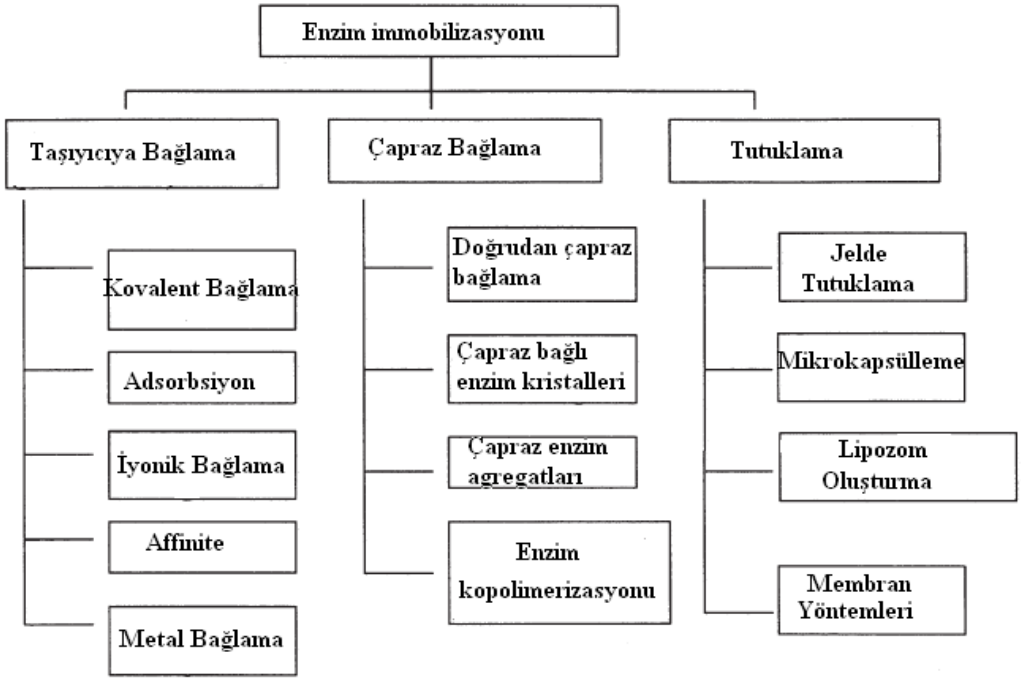


Şekil 1.1.Enzimlerin özelliklerini değiştirmek için kullanılan biyolojik ve kimyasal yöntemler (Guisan, 2006).

Endüstriyel uygulamalarda enzim tarafından katalizlenmiş reaksiyonlarda hem teknik hem de ekonomik nedenlerden dolayı kullanılan biyokatalizörün yeniden veya sürekli olarak kullanımı gerekmektedir (Katchalski-Katzir, 1993; Bickerstaff, 1995). Enzim immobilizasyonu çözünmüş durumdaki bir enzimin tekrar ve sürekli kullanımını mümkün kılmak, kararlılığını artırmak için enzimin organik veya inorganik desteğe bağlanması veya bir membran ile etrafının sarılmasıdır.

1.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

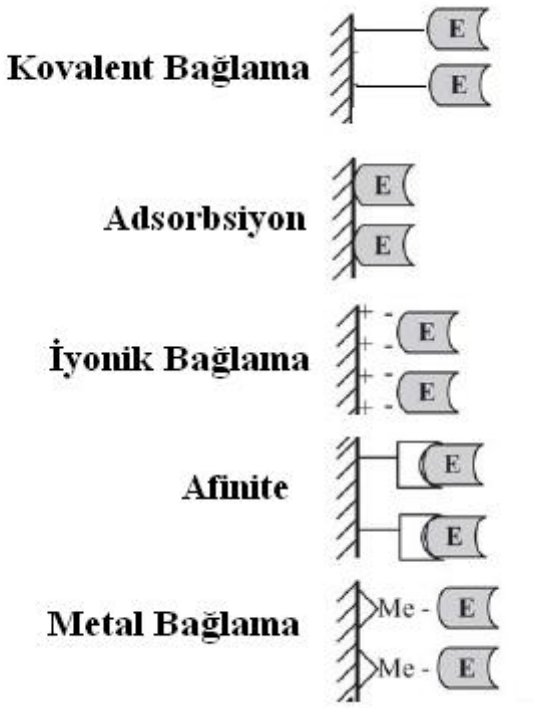
Enzim immobilizasyonu yöntemleri için çok farklı sınıflandırmalar olmakla beraber Şekil 1.2'de olduğu gibi bir sınıflandırma da yapmak mümkündür.



Şekil 1.2. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması (Tischer, 1998).

1.1.1. Taşıyıcıya Bağlama Yöntemleri

Taşıyıcıya bağlama yöntemleri kovalent bağlama, adsorpsiyon, iyonik bağlama, affinite, metal bağlama ve olmak üzere beş gruba ayrılır.



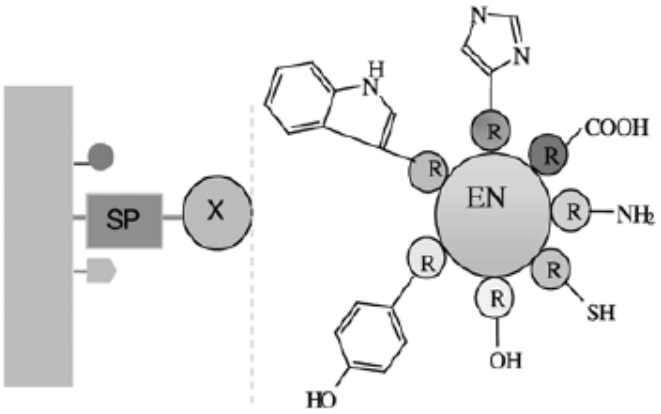
Şekil 1.3. Taşıyıcıya bağlama yöntemlerinin şematik gösterimi.

Enzim molekülünün yüzeyindeki fonksiyonel gruplar (iyonik, polar ve hidrofobik gruplar) bağlanmada rol oynarlar. İnorganik ve organik kökenli birçok materyal taşıyıcı olarak kullanılmaktadır. Enzim immobilizasyonunda kullanılacak bir taşıyıcıda suda çözünmeme, basınca karşı direnç, hidrofilik karakter, mikroorganizmalara karşı direnç, kolay türevleştirilebilme, ucuzluk, gözenekli yapı gibi nitelikler aranmaktadır (Trevan, 1980; Brodelius ve ark., 1987; Buchholz ve ark., 1987).

Kovalent Bağlama: Kovalent enzim immobilizasyonu kovalent bağın doğası gereği enzim molekülü ve destek arasındaki bağın kararlı olması ve bu yüzden enzimin destek yüzeyinden kolaylıkla ayrılmasının mümkün olmaması sebebiyle enzim immobilizasyonunda çok yaygın olarak kullanılan metodlardan birisidir. Ancak, kovalent enzim immobilizasyonunda dikkat edilecek önemli nokta bağlanmanın enzimin aktif bölgesinden olmaması ve bağlanma sırasındaki sterik engellemeler nedeni ile bu grupların rahatsız edilmemesidir (Guisan, 2006). İnorganik ve organik yapıda bir çok doğal ve yapay materyal kovalent immobilizasyonda destek materyali olarak kullanılabilmektedir. Destek suda çözünmemeli ancak büyük ölçüde hidrofobik karakterli de olmamalı, suda ıslanabilmeli, ayrıca mekanik etkilere karşı dayanıklı olmalıdır. Bu tür desteklerin seçiminde enzim ile destek arasındaki bağın aktivite için zorunlu gruplar üzerinden olmaması yanında desteğin enzim tarafından parçalanmaması, mikroorganizma üremesine olanak vermemesi, pH ve çözücülere karşı dayanıklı olması gibi özellikler taşımasına dikkat edilmelidir (Telefoncu, 1997). Seçilen desteğin fiziksel ve kimyasal özellikleri immobilize enzimin performansını (örneğin, aktivitesini, seçiciliğini, kararlılığını) doğrudan etkilemektedir (Cao, 2005). Desteğe kovalent bağlı immobilize enzimin performansını etkileyebilecek özellikler:

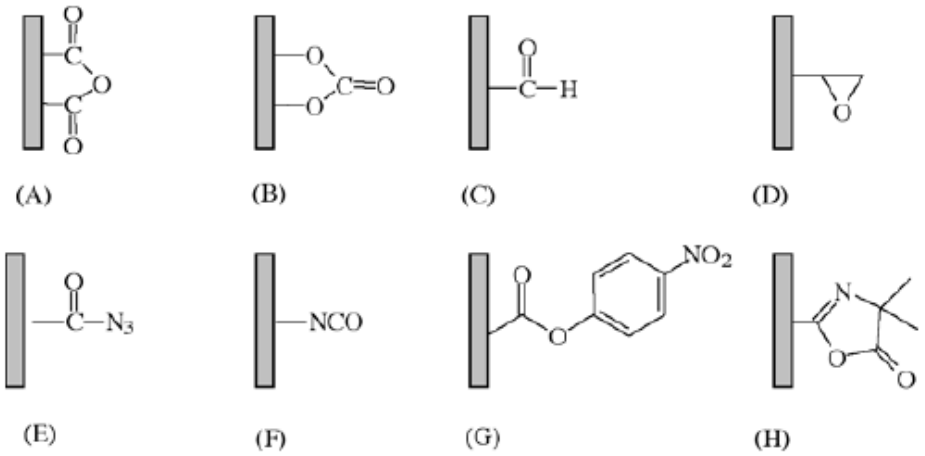
- Desteğin fiziksel özellikleri (gözenek büyüklüğü, partikül büyüklüğü, geçirgenliği, şekli vb.);
- Desteğin kimyasal yapısı (yapının kimyasal bileşimi, aktif fonksiyonel gruplar, aktif olmayan fonksiyonel gruplar);
- Kimyasal bağın yapısı;
- İmmobilizasyon sırasında ya da immobilizasyon sonrasında enzimin konformasyonu;
- Enzim yönlenmesi;
- Arakolun uzunluğu ve yapısı;
- Enzimin bağlanma ortamının özellikleri;
- Enzim ve destek arasında oluşan bağın sayısı;
- Desteğin yüzeyindeki ya da desteğin içindeki enzim dağılımı

Kovalent enzim immobilizasyonunda kullanılan desteğin yüzeyindeki aktif fonksiyonel gruplara bağlı olarak çok farklı bağlanma türleri meydana gelebilmektedir. Destek yüzeyinde aktif fonksiyonel grupların hazırlanmasında monomerlerin uygun koşullarda polimerleştirilmesi ve çeşitli aktivasyon yöntemleri ile gerçekleştirilmektedir (Cao, 2005).



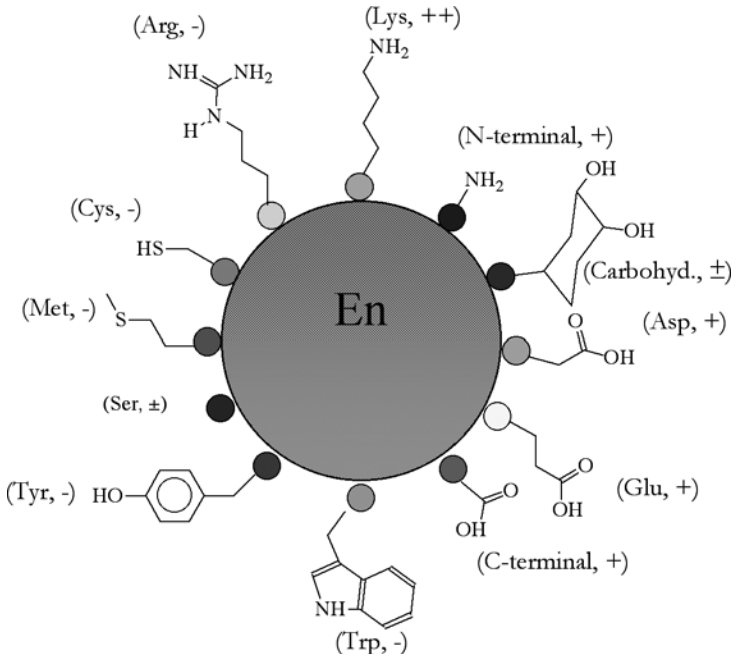
Şekil 1.4.Destek yüzeyindeki aktif fonksiyonel gruba (X) bağlı olarak enzim (EN) molekülünde bağlanmada kullanılabilecek artık aminoasit grupları (Cao,2005).

Destek yüzeyinde kovalent bağlanmada çok sıklıkla kullanılan aktif fonksiyonel gruplar Şekil 1.5'de gösterilmiştir.



Şekil 1.5.Kovalent bağlanmada çok sıklıkla kullanılan aktif fonksiyonel grupların şematik gösterimi (A: Anhidrit, B: Karbonat, C: Aldehit, D: Epoksit, E: Açilazid, F: İzosiyanat, G: Karboksilli asit fenil ester, H: Lakton).

Kovalent immobilizasyonda rol oynayan aminoasit artıkları ise Şekil 1.6'da gösterilmiştir.



Şekil 1.6. Reaktif amino asit artıkları : immobilizasyonda çok sık kullanılır (++), sıklıkla kullanılanır (+), sık kullanılmaz (±), kullanılmaz (-) (Cao, 2005).

Adsorpsiyon: Enzim immobilizasyonunda ilk kullanılan enzim immobilizasyon metodlarından birisidir. Fiziksel adsorbsiyonda enzim desteğe hidrojen bağları, Vander Waals ve hidrofobik etkileşimler gibi zayıf etkileşimlerdir. Adsorbsiyon yöntemi ile enzim immobilizasyonunda immobilizasyon işlemi ılımlı koşullarda gerçekleştirilir, kullanılan desteğin aktifleştirilmesini gerektirmez, ekonomik olarak avantajlıdır ve genellikle immobilizasyon işlemi sonunda enzim aktivitesini önemli ölçüde kaybetmez. Ancak, destek materyali ve enzim molekülü arasındaki etkileşimlerin zayıf olması nedeniyle ortam koşullarının değişmesi (pH, iyonik şiddet, sıcaklık gibi) ile destek yüzeyinden protein kaçışı mümkün olmaktadır (Messing, 1976; Rexova-Benkova ve ark., 1982; Woodward, 1985).

İyonik Bağlama: Bu yöntem, suda çözünmeyen ve net bir yüke sahip taşıyıcılara enzim molekülünün iyonik etkileşimlerle bağlanması temeline dayanır (Solas ve ark., 1994). İyonik bağlama ile enzim immobilizasyon yöntemleri basit olmakla beraber enzimin desteğe hem kuvvetli bağlandığı hem de çok aktif olduğu aynı şartları bulmak zordur (Bahulekar ve ark., 1991). İyonik bağlama çok yumuşak koşullarda

gerçekleştiğinden enzimin konformasyonunda ve aktif merkezde değişikliğe neden olmaz. Ancak enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ kovalent bağ kadar güçlü olmadığından enzim kaçışı söz konusudur.

Affinite: Enzimler ile antikorlar ve lektinler arasındaki biyospesifik etkileşimden yararlanarak enzim immobilize edilebilir (Hermanson ve ark., 1992). Lektinler spesifik karbohidrat artıklarını içeren enzimlere kuvvetlice bağlanırlar (Şekil 1.3).

Metal Bağlama: Bu immobilizasyon yönteminde geçiş metallerinin özellikle titanyum ve zirkonyumun tuzları veya hidroksitleri kullanılır (Kennedy ve ark., 1985;Cabral ve ark., 1986). Metalin tuzu veya hidroksit formu destek yüzeyine (selüloz, kitin, alginik asit, silikat gibi) ısıtma veya nötralizasyon yöntemi ile çöktürülür. İmmobilizasyon işlemi metalin boş d orbitali ile enzim molekülündeki artık aminoasit grupları arasında gerçekleşir. Şelat bağlama ile enzim immobilizasyon yöntemleri oldukça basit olup immobilizasyon işlemi sonunda enzimin başlangıç aktivitesi %30-80 arasında korunabilmektedir. Ancak, metalin destek yüzeyinden kaçmasından dolayı immobilize enzimin operasyonel stabilitesi değişken ve tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek zordur (Porath, 1992; Brena ve ark., 1994; Kagedal., 1998).

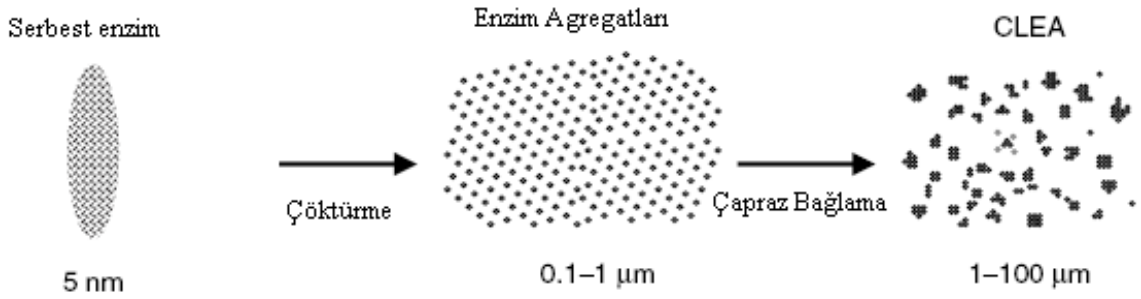
1.1.2. Çapraz Bağlama Yöntemleri

Çapraz bağlama ile immobilizasyon yönteminde küçük moleküllü bi- veya multi fonksiyonel reaktifler enzim molekülleri arasında bağlar yaparak suda çözünmeyen kompleksler oluşturmaktadır (Govardhan, 1999; Schoevaart ve ark., 2004; Sheldon ve ark., 2005; Shah ve ark., 2006). En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri; glutaraldehit, kloroformat ve karbonildiimidazol, heterosiklik halojenürler, bioksiranlar ve epiklorohidrinlerdir. Genellikle pahalı olmadığı ve ticari olarak kolay bulunduğu için glutaraldehit çapraz bağlama reaktifi olarak kullanılmaktadır. Çapraz bağlama yöntemleri doğrudan çapraz bağlama, çapraz bağlı enzim kristalleri (CLEC), çapraz bağlı enzim agragatları (CLEA) ve enzim kopolimerizasyonu olmak üzere 4 alt sınıfa ayrılabilir.

Doğrudan çapraz bağlama yönteminin prensibi protein yüzeyindeki reaktif amino grupları ile glutaraldehitin çapraz bağlanması prensibine dayanmaktadır. Ancak bu yöntem ile elde edilen immobilize enzimler serbest enzime göre düşük aktivite göstermeleri, elde edilen immobilize enzim veriminin düşük olması ve oluşan immobilize enzimlerin jelatinimsi yapıda olmaları nedeniyle mekanik stabilitesinin düşük olması gibi dezavantajlara sahiptir (Doscher ve ark., 1963).

CLEC yöntemi ile immobilize edilen enzimler ısı, organik çözücü ve proteolize son derece dayanıklı olmaları, partikül büyüklüklerinin kontrol edilebiliyor olmaları, elde edilen CLEC'in serbest enzimin aktivitesinin büyük bir kısmını koruyabiliyor olması, operasyonal stabilitesinin ve tekrar kullanım kararlığının iyi olması gibi avantajlara sahiptir. Ancak, CLEC yöntemi ile immobilizasyon için yüksek saflıkta enzim kristallerine ihtiyaç vardır ve bu enzim kristallerini elde etmek oldukça zor ve maliyet gerektirmektedir (Quiocho ve ark., 1964; Clair ve ark., 1992; Margolin ve ark., 2001).

CLEA yöntemi ile enzim immobilizasyonunda, enzim çözeltisi üzerine tuzlar (amonyum sülfat), organik çözücüler (aseton, t-butanol) ve noniyonik polimerler (polietilenglikol) eklenerek enzimin denatüre edilmeden çöktürülmesi sağlanır ve sonra ortama çapraz bağlayıcı bir ajanın eklenmesi ile CLEA'lar elde edilir (Şekil 1.7).CLEA yöntemi ile enzim immobilizasyonu çok saf bir enzim preparatını gerektirmemesi, basitliği, maliyeti, serbest enzimin aktivitesinin büyük bir kısmını koruyabiliyor olması, operasyonal stabilitesinin ve tekrar kullanım kararlığının iyi olması gibi avantajlara sahiptir. Ancak elde edilen CLEA'ların partikül büyüklüklerinin kontrol edilmesi zordur (Brown ve ark., 1987; Cao ve ark., 2000; Wegman ve ark., 2001; van Langen ve ark., 2003).



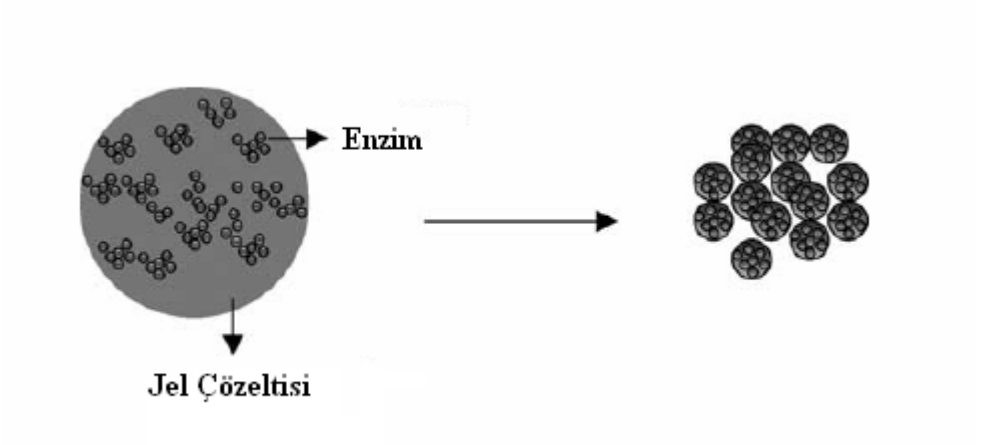
Şekil 1.7. CLEA hazırlama yönteminin şematik gösterimi (Sheldon, 2007)

Enzim kopolimerizasyonunda ise enzimler bir kopolimerizasyon reaksiyonunda monomerlerden biri gibi davranarak matrikse bağlanmış olur. Bu yöntem polimer matrikse tutuklamaya benzemekle birlikte enzim kaçışını önlemesi gibi üstünlüğü de vardır.

1.1.3. Tutuklama Yöntemleri

Tutuklama yönteminde enzim molekülleri substrat ve reaksiyon ürünlerini geçişine izin veren ancak enzim moleküllerinin dışarıya çıkmasını önleyen bir matriks içerisinde tutuklanması esasına dayanmaktadır (O'Driscoll, 1976). Polimerik matriks oluşumu kimyasal (çapraz bağlama) ve fiziksel yöntemlerle gerçekleştirilmektedir.

Polimer matrikste tutuklama yöntemi, monomer, ko-monomer ve enzim içeren çözeltide monomer ve ko-monomerin polimerleştirilmesi sonucu enzimin polimer içerisinde tutuklanması esasına dayanır. Bu yöntemde çok sıklıkla kullanılan monomerlerin bazıları akrilamid, akrilik asid ve glisidilakrilat, 2-hidroksietilmetilakrilat, N-vinilpirolidon, 2-hidroksi propilamid, polietilen glikol metilakrilat'dır.



Şekil 1.8. Polimer bir matriks içerisinde enzim molekülünü tutuklanması (Cao,2005).

Pre-polimerlerin çapraz bağlanmasında ise pre-polimer ve enzim molekülleri içeren çözeltide pre-polimer kimyasal bir çapraz bağlayıcı varlığında veya fiziksel yöntemler ile çapraz bağlanır.Polimerleşme sonucu enzim molekülleri çapraz bağ ağları arasında tutuklanmakta ve böylece ana çözeltiye geçmeleri engellenmektedir (Sperinde ve ark., 1997). Bu amaçla en çok kullanılan polimer N,N'-metilenbisakrilamid ile çapraz bağlanmış poliakrilamiddir.

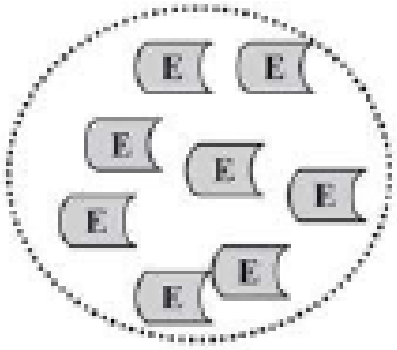
Fiziksel yöntemler ile çapraz bağlamada ise ortamın pH'sının, sıcaklığının veya iyonik şiddetinin değiştirilmesi ile enzim moleküllerinin doğal ve sentetik polimerler içerisinde tutuklanmasına prensibine dayanmaktadır.



Şekil 1.9.Fiziksel jelleşme ile enzim immobilizasyonunun şematikgösterimi.

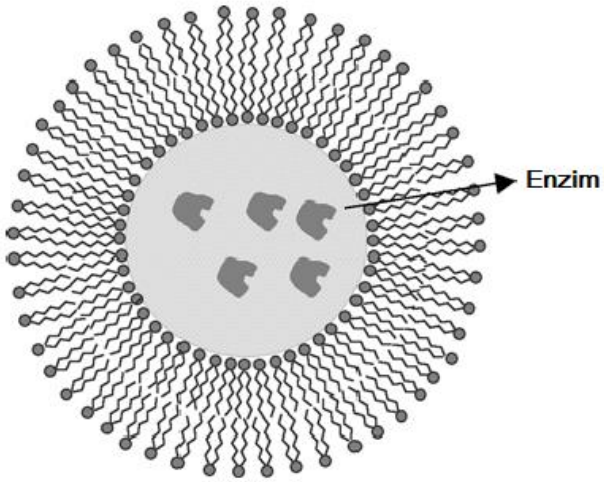
Mikrokapsülleme yöntemi enzim moleküllerinin yarı geçirgen bir membran içinde tutuklanması esasına dayanır (Şekil 1.10). Mikrokapsüllerin büyüklüğü 1-100 μm arasında değişmektedir. Yarıgeçirgen membranın gözenek çapları; substrat moleküllerinin kapsül içine girişine ve ürün moleküllerinin dışarı çıkışına olanak

verecek bir büyüklükte olmalıdır. Substrat molekülleri ne kadar küçükse bu yöntem ile immobilize edilmiş enzimin verimliliği o ölçüde yüksek olacaktır.



Şekil 1.10. Mikrokapsülleme ile enzim immobilizasyonunun şematik gösterimi (Guisan, 2006).

Lipozom tekniği, sıvı-yüzey yapıcı membran temeline dayanır (Şekil 1.11), (Regen ve ark., 1984). Çapı 1-100 μm arasında değişen enzim çözeltisi damlacıklarını içeren hidrokarbon çözücünün; çeşitli katkı maddeleri ve yüzey yapıcılarla enzim çözeltisi damlacıkları çevresinde oluşturduğu suda çözünmeyen faza sıvı yüzey yapıcı membranlar adı verilmektedir. Yöntemin en önemli üstünlüğü; süreksiz, dönüşümlü ve tamamen fiziksel oluşudur. Aynı anda bir adımda birçok enzimin immobilizasyonuna olanak sağlar ve oldukça büyük bir temas yüzeyine sahiptir. Önemli sakıncaları ise; substrat ve ürünün membranda geçişinin çözünürlüğe bağımlı olması, işlem sırasında enzimin inaktif olması ve sıvı olan membrandan enzimin kaçma olasılığıdır.



Şekil 1.11. Lipozom tekniği ile enzim immobilizasyonu (Cao, 2005).

Enzimin membran içerisinde immobilizasyonunda ise enzimin çok yarı geçirgen bir zarla çevrelendiği ve enzime geniş bir hareket alanının sağlandığı bir tekniktir (Weethall, 1976). Yarı geçirgen özellik gösteren oyuk elyaf membranları ve ultrafiltrasyon membranların kullanımı enzimlerin çözünür formda immobilizasyon yöntemlerinden biridir. Bu immobilizasyon yöntemi hiçbir kimyasal bileşiğin veya tekniğin kullanılmasının gerekmediği son derece kolay bir yöntemdir. Oyuk elyaf membranlar ile ultrafiltrasyon membranları enzimi geçirmezken substrat ve ürünün geçişine izin verir. Ayrıca mikropların enzime ulaşmasını engelleyerek koruyucu etki gösterirler. Enzim desteğe herhangi bir bölgesinden bağlanmadığı için moleküler geometrisi, esnekliği ve dolayısıyla katalitik etkinliği değişmez, ancak substratın membrandan geçip enzime ulaşmasındaki kısıtlamalar bu yöntemin en önemli dezavantajlarından birini oluşturur. Substrat molekülü ne kadar küçükse membrandan geçişi o denli kolay olacağından enzimin etkinliği de o oranda artacaktır.

1.1.4. Enzim İmmobilizasyon Yöntemlerinin Kıyaslanması

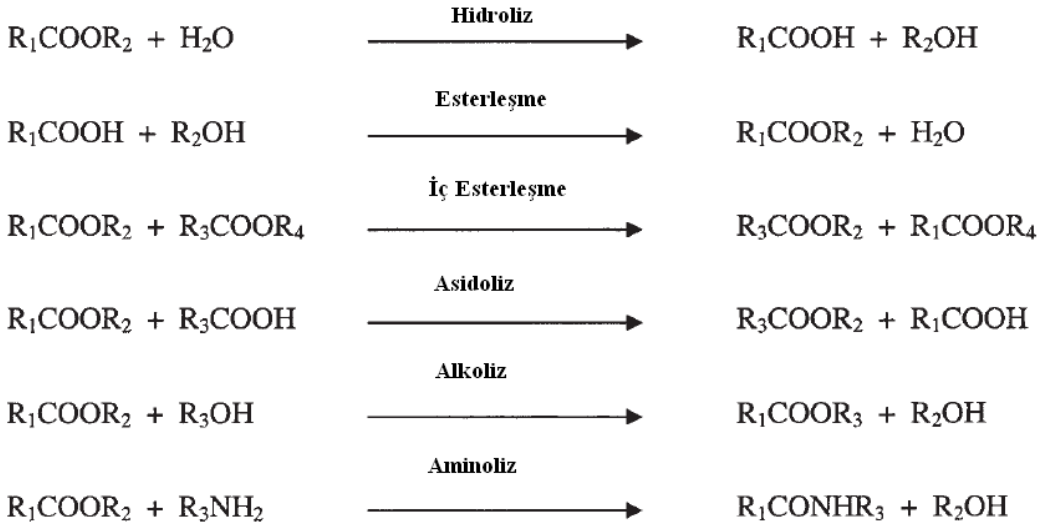
Enzimlerin çoğuna uygulanabilen çok sayıda immobilizasyon teknikleri geliştirilmesine karşın, enzimlerin bileşenlerinin ve kimyasal özelliklerinin oldukça geniş, ürünlerin ve substratların farklı özelliklerde olmaları nedeniyle bütün enzimler veya uygulamalar için geçerli tek bir yöntem belirlemek mümkün değildir. Bu nedenle immobilizasyonu düşünülen her farklı enzim için ve her farklı durumda bir veya birkaç değişik yöntem önerilebilir. Çizelge 1.1'de immobilizasyon yöntemlerinin karşı kıyaslanmaları gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması (Wiseman, A. 1986)

Karakteristik	Karşı Bağlama	Fiziki Adsorpsiyon	İyonik Bağlanma	Şelat veya Metale Bağlama	Kovalent Bağlanma	İçinde Tutma
Hazırlama	Orta	Kolay	Kolay	Kolay	Zor	Zor
Bağlanma Gücü	Güçlü	Zayıf	Orta	Orta	Güçlü	Orta
Enzim Aktivitesi	Düşük	Orta	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Düşük
Desteğin Tekrar Kullanılabilirliği	İmkansız	Mümkün	Mümkün	Mümkün	Nadiren	İmkansız
İmmobilizasyon Maliyeti	Orta	Düşük	Düşük	Orta	Yüksek	Orta
Kararlılık	Yüksek	Düşük	Orta	Orta	Yüksek	Yüksek
Genel Uygulanabilirlik	Hayır	Evet	Evet	Evet	Hayır	Evet
Enzimin Mikrobiyal Ataklara Karşı Korunabilmesi	Mümkün	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Evet

1.2. Lipaz

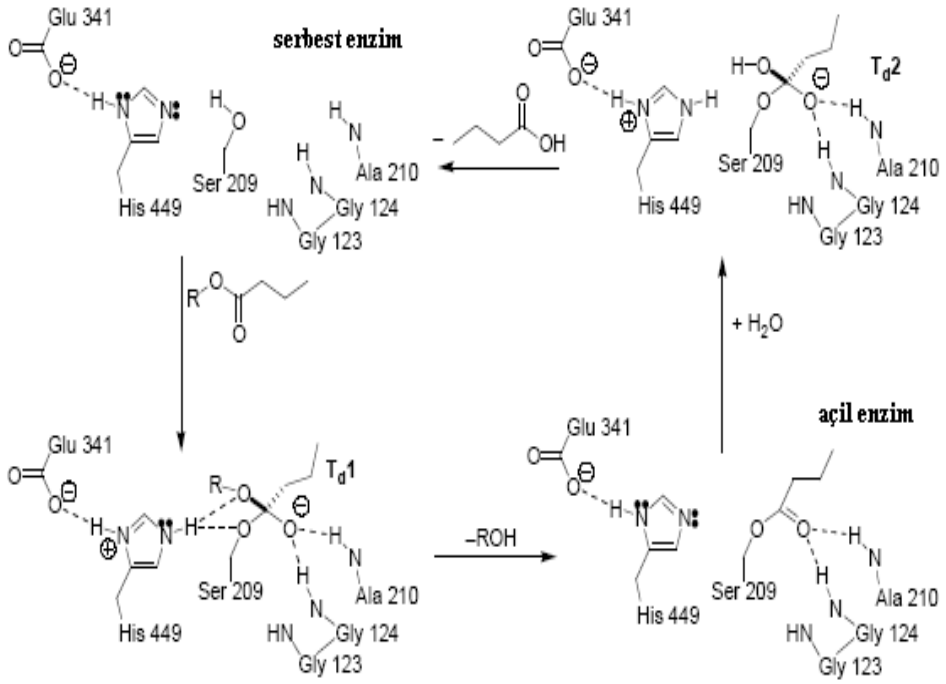
Lipazlar (triaçilgliserol hidrolaz, EC 3.1.1.3) hidrolaz sınıfı enzimlerinden karboksilli asit esterlerinin hidrolizini katalizlerler. Lipazlar temel olarak hayvanlarda pankreatik bezlerde oluşurken, bitkilerde ise hücre ve tohumlarda, tahıllarda, fasulyelerde bulunurlar ve mantarlar, bakteriler ve mayalar tarafından da sentezlenirler. Lipazların fizyolojik rolü ise trigliseridlerin yağ asidlerine ve gliserole hidrolizini katalizlemektir. Lipazlar karboksilli esterlerin hidrolizi dışında karboksilli ester sentezini, içesterleşme, transesterleşme ve amid sentezi gibi reaksiyonları katalizlerler. Çok yönlü fonksiyonları, ticari olarak bulanabilirliği, düşük maliyeti, geniş bir pH ve sıcaklık aralığında çalışabilirliği, stereo ve enantiyo seçiciliği biyoteknolojik uygulamalarda lipazı en önemli biyokatalizörlerden biri yapmıştır. Lipazların katalizlediği çeşitli reaksiyonlar Şekil 1.12'de verilmiştir.



Şekil 1.12. Lipazların katalizlediği reaksiyonların şematik gösterimi.

Lipazların aktif merkezi ile yapılan çalışmalar lipazların serin hidrolaz sınıfına ait olduğunu ortaya koymuştur (Dodson ve Wlodawer, 1998). Lipazların katalitik aktivitesinde serin amino asiti dışında histidin ve aspartik asit veya glutamik asitin görev aldığı rapor edilmiştir (Cygler ve ark., 1992; Cambillau ve Tilbeurgh,

1993; Derewenda ve ark.,1994). Lipazların katalitik bölgesinde oluşan reaksiyonlar Şekil 1.13'de verilmiştir.



Şekil 1.13. Lipazların katalitik bölgesinde oluşan reaksiyonların gösterimi (Bornscheuer, 2005).

Şekil 1.13'den görüleceği gibi aktif merkezde bulunan serin amino asitinin karbonil karbonuna atak yapması sonucu tetrahedral yapıda bir açil enzim ara ürününün meydana geldiği (T_d1), alkol salınımının bu basamakta gerçekleştiği ve bu basamakta lipazın alkole karşı seçiciliğinin belirlendiği bildirilmiştir. Yapıya su molekülünün katılması ile ikinci bir açil enzim ara ürünü oluşumu (T_d2) ve bu ara ürünün bozulduğu basamak ise lipazın karboksilli asite karşı spesifikliğinin belirlendiği basamaktır.

Lipazlar genellikle izole edildikleri kaynaklara göre sınıflandırılmaktadır. Fakat bu sınıflandırma yöntemi bazı güçlüklere neden olduğu için lipazların üç boyutlu yapılarını temel alan yeni bir sınıflandırma biçimi yapılmıştır. Bu sınıflandırmaya göre lipazlar memeli (pankreatik) lipazları, fungal lipazlar ve bakteriyel lipazlar olarak üç gruba ayrılmıştır. Memeli (pankreatik) lipazlarının

moleküler ağırlığı 50 kDa civarındadır (Weber ve ark., 1995). Fungal lipazlar kendi aralarında *Candida rugosa* ve *Rhizomucor* ailesi olmak üzere iki alt sınıfa ayrılmıştır. *Candida rugosa* ailesi *Candida rugosa* ve *Geotrichum candidum* lipazlarını içerirmektedir ve bu lipazların moleküler ağırlıkları 60-65 kDa arasında değişmektedir. *Rhizomucor* ailesi ise *Rhizopus, Rhizomucor, Penicillium camembertii, Humicola lanuginosa* ve *Candida antarctica-B* lipazlarını içermektedir. Bu lipazların moleküler ağırlığı ise 30-35 kDa arasında değişmektedir. (Huge-Jensen ve ark., 1987; Hoegh ve ark.,1995; Weber ve ark., 1995). Bakteriyel lipazlar ise *Pseudomonas* ve *Staphylococcus* olmak üzere iki alt sınıfa ayrılmaktadır. *Pseudomonas* ailesi tüm *Pseudomonas* türlerini ve *Chromobacterium viscosum* lipazını içermektedir ve moleküler ağırlıkları 30-35 kDa arasında değişmektedir. *Staphylococcus* lipazlarının moleküler ağırlıkları ise 40-45 kDa değişmektedir. Ancak, bu lipazlar ticari olarak satılmamaktadır (Hom ve ark., 1991; Lizumi ve ark., 1991; Jorgensen ve ark., 1991; Nakanishi ve ark., 1991).

Lipazlar için diğer bir sınflandırma ise interesterifikasyon reaksiyonundaki spesifitelerine göre yapılmıştır ve bu sınıflandırmaya göre lipazlar 3 gruba ayrılmıştır:

Spesifik olmayan lipazlar: Bu gruba giren lipazlar, trigliseritlerin tüm pozisyonundaki açil gruplarını koparabilme yeteneğine sahip olup, trigliseritleri gliserol ve serbest yağ asitlerine hidroliz ederler. Bu gruba giren lipazlara *Candida cylindraceae, Corynebacterium acnes* ve *Staphylococcus aureus* lipazları örnek olarak verilebilir (Macrae,1983; Gunstone, 1994).

Pozisyon spesifikliği veya regiospesifiklik gösteren lipazlar: Bu gruba giren lipazlar, 1,3-spesifik lipazlar ve 2-spesifik lipazlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. 1,3-spesifik lipazlar trigliseritleri eşdeğer konuma sahip olan 1 ve 3 pozisyonundan spesifik olarak hidroliz ederler. Bu grup lipazlara örnek olarak Pankreatik lipaz, *Aspergillus niger, Rhizopus arrhzus* ve *Mucor miehei* lipazları örnek olarak verilebilir. 2-spesifik lipazlar ise çok nadir olarak bulunmaktadır ve bu grup lipaza *Candida antarctica* A lipazı örnek olarak verilebilir (Macrae,1983).

Yağ asidinin yapısına bağlı olarak yağ asidi spesifikliği gösteren lipazlar: Bu gruba giren lipazlar, açilgliserinlerdeki bazı yağ asitlerine spesifik olup sadece bu yağ asitlerinin oluşturduğu ester bağlarını parçalarlar. *Penicillium roquefortii* lipazı ve erken doğmuş çoçuklardaki mide lipazı sadece kısa zincirli yağ asidlerini hidroliz ederler. *Geotrichum candidum* lipazı ise trigliseritlerdeki cis-9 pozisyonuna bağlı yağ asitlerini hidroliz ederler (Desnuelle,1972; Stamatis ve ark., 1993).

Yaklaşık 70'e yakın farklı lipaz türü ticari olarak satılmaktadır. Çizelge 1.2'de endüstriyel uygulamalarda çok fazla kullanılan lipaz türlerinin bir listesi verilmektedir.

Çizelge 1.2. Endüstriyel uygulamalarda çok fazla kullanılan lipaz türleri (Bornscheuer, 2005).

Kısaltılışı	Kaynağı	Diğer Adı	Ticari Kaynağı ve İsmi
	Memeli Lipaz		Amano, Fluka, Sigma
PPL	Porcine *pancreas*		
	Fungal Lipaz		
CRL	*Candida rugosa*	*Candida cylindracea*	Amano (lipase AY)
HLL	*Humicola lanuginosa*	*Thermomyces lanuginosa*	Fluka
PcamL	*Penicillium camembertii*	*Penicillium cyclopium*	Amano (lipase G)
RJL	*Rhizomucor javanicus*	*Mucor javanicus*	Amano (lipase M)
RML	*Rhizomucor miehei*	*Mucor miehei*	Fluka
ROL	*Rhizopus oryzae*	*Rhizopus javanicus*	Amano (lipase F)
CAL-A	*Candida antarctica A*		Novozymes (SP 526)
CAL-B	*Candida antarctica B*		Novozymes (Novozym435)
ANL	*Aspergillus niger*		Amano (lipase A)
CLL	*Candida lipolytica*		Amano (lipase L)
ProqL	*Penicillium roquefortii*		Amano (lipase R)
	Bakteriyel Lipaz		
PCL	*Pseudomonas cepacia*	*Burkholderia cepacia*	Fluka
PCL-AH	*Pseudomonas cepacia*		Amano (lipase AH)
PFL	*Pseudomonas fluorescens*		Amano (lipase AK)
PfragiL	*Pseudomonas fragi*		Wako Chemical,(lipase B)
CVL	*Chromobacterium viscosum*	*Pseudomonas glumae*	Sigma
	Pseudomonas sp.		Amano (K-10)
	Alcaligenes sp.		Meito Sangyo (lipase QL)

Lipazlar deterjan, gıda, yağ, ilaç, kozmetik, deri, tekstil ve kağıt endüstrisinde yaygın bir kullanım alanına sahiptir. Ticari olarak satılan lipazların endüstriyel kullanım alanları Çizelge 1.3'de verilmiştir.

Çizelge 1.3. Ticari olarak satılan lipazların endüstriyel kullanım alanları (Bornscheuer, 2005).

Endüstri	Uygulama	Ticari İsmi	Ticari Sağlayıcı
Gıda	Aroma Geliştirici	Lipase A "Amano" 6 (*Aspergillus niger*)	Amano
		Lipase M "Amano" 10 (*Mucor javanicus*)	Amano
		Lipase F-AP15 (*Rhizopus oryzae*)	Amano
		Lipase AY "Amano" 30 (*Candida rugosa*)	Amano
		Lipase G "Amano" 50 (*Penicillium camembertii*)	Amano
		Piccnate (*Mucor miehei*)	Gist-Brocades
		Lipomod™ 187P-L187P (fungal lipases)	Biocatalysts
		Lipomod™ 224P-L224P (porcine pancreas)	Biocatalysts
		Lipomod™ 338P-L338P (*Penicillium roquefortii*)	Biocatalysts
		Lipomod™ 34P-L034P (*Candida cylindracea* [*rugosa*])	Biocatalysts
		Lipomod™ 621P-L621 (*Penicillium* sp./*Aspergillus* sp.)	Biocatalysts
		Lipomod™ 29P-L029P (*Candida cylindracea* + porcine pancreas)	Biocatalysts
Yağ	Yağ kalitesinin değiştirilmesi	Palatase (*Rhizomucor miehei*)	Novozymes
		Lipase A "Amano" 6 (*Aspergillus niger*)	Amano
		Lipase M "Amano" 10 (*Mucor javanicus*)	Amano
		Lipase G "Amano" 50 (*Penicillium camembertii*)	Amano
		Lipase F-Ap15 (*Rhizopus oryzae*)	Amano
		Lipase AY "Amano" 30 (*Candida rugosa*)	Amano
		Newlase F (*Rhizopus niveus*)	Amano
		Lipozyme TL IM	Novozymes
İlaç	Enantiyomer Sentezi	Lipase MY (*Candida cylindracea* [*rugosa*])	Meito Sangyo
		Lipase ALC, Lipase ALG (*Achromobacter* sp.)	Meito Sangyo
		Lipase PLC, Lipase PLG,	Meito Sangyo
		Lipase SL (*Burkholderia cepacia*)	Meito Sangyo
		Lipase TL (*Pseudomonas stutzeri*)	Meito Sangyo
		Lipase UL (*Rhizopus* sp.)	Meito Sangyo
		Lipase AK "Amano" (*Pseudomonas fluorescens*)	Amano
		Lipase AYS "Amano" (*Candida rugosa*)	Amano
		Lipase PS "Amano" (*Pseudomonas cepacia*)	Amano
Deterjan	Yağ lekelerinin çıkartılması	Lipolase, Lipolase Ultra, Lipo Prime™, Lipex (*Thermomyces lanuginosus*)	Novozymes

Gıda endüstrisinde lipazlar surfaktan özelliği gösteren maddelerin, aroma tadı ve kokusu veren maddelerin sentezinde kullanılmaktadır. Monoaçil gliseroller gıdalarda, kozmetik ürünlerinde ve ilaçlarda çok sıklıkla kullanılan emülsülfiye edici ajanlardan birisidir. 2002 verilerine göre yıllık 60.000 tonluk bir kullanın alanına sahiptir. Kimyasal prosesler ile yüksek sıcaklıkta (220 ºC) ve bir alkali katalizörlüğünde iç yağı ve gliserolden % 40-50 arası bir verim ile sentezlenmektedir. Ancak kullanılan yüksek sıcaklık nedeniyle üründe istenmeyen renklenmeler ve yanık kokusu oluşabilmektedir. Bu sentezin *Penicillium camembertii* lipazı kullanılarak düşük sıcaklıkta ve % 70-90 arası bir verim ile sentezlendiği rapor edilmiştir (Yamane, 1991; McNeill ve ark., 1991).

Yağ asidlerinin şeker esterleri gıdalarda ve kozmetik ürünlerinde sürfaktan olarak kullanılmaktadır. Bu esterler alkali bir katalizör varlığında yüksek sıcaklıklarda sentezlenmektedir. Ancak bu prosesler yan ürün oluşumu ve yüksek sıcaklıklarda kullanılan şekerin karamelleşmesinden dolayı istenmeyen renk oluşumu gibi dezavantajlara sahiptir. Son yıllarda bu esterler lipaz kullanılarak düşük sıcaklıklarda ve yan ürün oluşturmaksızın sentezlenebilmektedir (Basheer ve ark., 1996; Sarney ve ark., 1996)

Yağ endüstrisinde lipazlar interesterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonları ile kakao yağına özdeş yağ üretimi, anne sütüne özdeş yağ üretimi, düşük kaloriye sahip yağların üretimi ve biyodizel üretimi amacıyla kullanılmaktadır. 1,3-spesifik lipazlar kalitesi değiştirilmiş yeni yağların eldesi için endüstriyel ölçekte kullanılmaktadır. Örneğin anne sütündeki trigiliseritlere eşdeğer trigliserit üretimi 1,3-spesifik lipaz varlığında tripalmitindeki 1. ve 3. pozisyondaki palmitik asitin oleik asit ile interesterifikasyonu ile elde edilmektedir (King ve Padley, 1990; Quinlan ve Moore, 1993; Schmid ve ark., 1998). Düşük kaloriye sahip trigliseritlerin üretimi yine 1,3-spesifik lipaz varlığında gerçekleştirilmektedir. İmmobilize *Rhizopus delemar* lipazı kullanılarak kaprilik asit içeren lipidlerin sentezi rapor edilmiştir (Shimada ve ark., 1996). Ayrıca lipaz kullanımı ile gliserol ve kaprik asitten isooktan içerisinde monokaprin, dikaprin ve trikaprin sentezleri rapor edilmiştir (Kwon ve ark., 1996).

Geraniol alkolün esterleri kozmetik sanayinde çok sıklıkla kullanılan güzel kokulu maddelerdir. Geleneksel olarak bu maddelerin eldesi bitkilerden ekstraksiyon metodu ile yapılmaktadır. Ancak bu proses yüksek maliyete ve düşük ürün verimine neden olmaktadır. Geranil asetat sentezi lipaz tarafından geraniol ve bir açil grubu vericisi kullanılarakda gerçekleştirilmektedir. Geranil asetat sentezinin *Mucor miehei* lipazı kullanılarak 3 günlük bir reaksiyon süresi sonunda hekzan içerisinde % 85 verimle elde edildiği bildirilmiştir (Claon ve Akoh, 1994). Bu sentez cam boncuklara immobilize edilmiş *Pseudomonas sp.* ve *Candida antartica* lipazı ile gerçekleştirildiğinde ürün veriminin %97'lere çıktığı rapor edilmiştir (Yee ve Akoh, 1996).

Makrosiklik laktonlar (C14-C16) kozmetik endüstrisinde kullanılan ve oldukça pahalı ve hoş kokulu maddelerdir. Kimyasal prosesler ile yüksek sıcaklık ve vakum gerektiren oldukça zor şartlar altında sentezlenebilmektedir. *Pseudomonas sp.* lipazının 12-16 arasında karbon sayısına sahip ω-hidroksi asitlerinin laktonlaşma reaksiyonlarında kullanıldığı bildirilmiştir (Makita ve ark., 1987). Ayrıca Pankreatik lipazın çeşitli γ-hidroksi asitlerin laktanlaşma reaksiyonlarını yüksek verim ile katalizlediği bildirilmiştir (Gutman ve ark., 1987).

Deterjan ündüstrisinde lipazlar yağ kökenli lekelerin çıkartılması amacıyla kullanılmaktadır. 1996 yılında deterjan endüstrisinde yıllık 1000 ton lipazın kullanıldığını bildirilmiştir (Godfrey ve West, 1996). Deterjan endüstrisi için ilk ticari lipaz Novozyme firması tarafından Lipolase ticari adı ile üretilmiştir. Lipolase'ın optimum çalışma pH'sı 9-10 arasında olup geniş bir sıcaklık aralığında aktivitesini koruyabilmektedir. Novozyme firması tarafından üretilen Lipolase Ultra, LipoPrime ve Lipex gibi farklı Lipolase varyantları bugün bir çok deterjan üreticisi tarafından deterjan içeriğine eklenmektedir (Houde ve ark.,2004).

İlaç endüstrisinde lipazlar optikçe aktif maddelerin sentezinde çok sıklıkla kullanılmaktadır. Taxol ovaryum ve göğüs kanserinde kullanılan bir ilaçtır. Yıllık 1 milyar dolarlık bir satış hacmine sahiptir. Taxol doğal olarak Pacific yew tree eksraktından elde edilmektedir. Taxolun optikçe aktif öncü maddesinin (3(*R*)-*cis*-asetiloksi-4-fenil-2-azetidinon) *Pseudomos cepacia* ve *Pseudomos sp.* lipazları ile

yüksek verimle ve sırasıyla %95 ve 99 enantiyomerik aşırılıkta elde edildiği bildirilmiştir (Patel, 1998).

Ibuprofen (2-(4-izobütilfenil) propiyonik asit) prostaglandin sentezini inhibe ettiğinden dolayı ağrı kesici olarak kullanılmaktadır. Amerikada Ibuprofen Advil veya Motrin ticari adıyla satılmaktadır ve sadece Motrin'in satış hacmi yıllık 290 milyon dolar civarındadır. (S)-Ibuprofen (R)-Ibuprofen'e göre yaklaşık 160 kat daha fazla ağrı kesici etki göstermektedir. Racemik Ibuprofen'in organik çözücülerde lipaz katalizli kinetik rezolusyonu sonucu (S)-Ibuprofen esteri haline dönmekte ve (R)-Ibuprofen'den ayrılmaktadır.

1.3. C Vitamininin Yağ Asidi Esterleri

Bütillenmişhidroksitoluen (BHT) ve Bütillenmişhidroksianizol (BHA) gıda maddelerinde antioksidan katkı maddesi olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, BHT ve BHA'ın degradasyonu sonucu oluşan karsinojenik maddelerden dolayı kullanımları sınırlandırılmıştır (Kaitaranta, 1992). Doğal bir antioksidan olan C vitamini özellikle depolama esnasında meyvelerin korunmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, C vitamininin yüksek hidrofilik karakterinden dolayı özellikle yağ kökenli gıda endüstrisinde kullanımı sınırlıdır. Bu sınırlama C vitamini daha hidrofobik olan yağ asidleri esterlerine dönüştürülerek giderilmiştir. Aynı zamanda elde edilen yağ asidlerinin C vitamini esterlerinin C vitaminine göre radikal tutucu özelliğinin daha fazla olduğu bildirilmiştir (Liu v*e* ark., 1996). Yağ asidlerinin C vitamini esterleri sodyum veya potasyum karbonat katalizörlüğünde 190-250 ºC arası reaksiyon sıcaklığında kimyasal metodlar ile sentezlenmektedir. Ancak bu prosesler kullanılan çevreye zararlı organik çözücüler, yan ürün oluşumu ve yüksek sıcaklıkta C vitamininin kararlı olmaması nedeniyle düşük verim eldesi gibi dezavantajlara sahip olduğu bildirilmiştir (Yan ve ark., 1999). Son yıllarda yağ asidlerinin C vitamini esterleri immobilize lipaz enzimi kullanılarak aseton, tert-butanol ve 2-metil-2-butanol içerisinde ılımlı koşullarda (50 ºC) yüksek verim ile sentezlendiği rapor edilmiştir (Yan ve ark., 1999; Song ve Wei, 2002; Adamczak ve ark., 2005; Hsieh ve ark., 2005).

1.4. Enantiyosaf Amino Alkoller

Enantiyosaf amino alkoller çok yönlü organik bileşikler olup özellikle antidiyabetik ajanların, β-blokırların, insan platelet fosfolipaz enzimi inhibitörlerin sentezinde kullanılmaktadır (Petrow ve ark. 1953; Smith ve ark. 1968; Hu ve ark. 2001; Kokotos ve ark. 1996).

İlk defa 1960 yılında kullanılan β-blokırlar, hızlı kalp atışına yol açabilen sempatik sinir sisteminin belli etkilerini bloke ederek kalbin iş yükünü azaltan ilaçlardır. Kalpteki β-reseptörler adı verilen bölgeleri bloke ettikleri için β-blokırlar olarak adlandırılırlar.β-blokırler, β-reseptörlere bağlanarak kalp atım hızını yavaşlatırlar ve kalp kaslarının kasılma gücünü azaltırlar. Ayrıca, kalp, beyin ve vücuttaki kan damarlarının spazmını (daralma) da azaltır. Ticari olarak rasemik formda satılan β-blokırların astım hastalarında ve yüksek tansiyonlu kişilerde yan etkilere neden olduğu ve bu yan etkilere daha çok R enantiyomerinin neden olduğu bildirilmiştir (Avila ve ark. 2005; Goodman ve ark. 1985; Baret 1985; Eber ve ark. 1990).

Ticari olarak halostakin adı ile rasemik formda satılan 2-(metilamino)-1-fenilethanol'ün literatürde β_2-adrenerjik reseptör blokırı olduğu bildirilmiştir (Liapakis ve ark. 2004).Ayrıca, enantiyosaf amino alkollerin β-bloker aktivitesinin amin grubuna bağlı alkil grubunun uzunluğu arttıkça arttığı bildirilmiştir (Lundell ve ark. 2004). Literatürde enantiyosaf halostakin ve türevlerinin sentezi ile ilgili herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır.

Şekil 1.14. 2-(metilamino)-1-feniletanol'ün kimyasal yapısı.

Lipazlar, karboksilli esterlerin hidrolizini, karboksilli esterlerin sentezini, içesterleşme, transesterleşme ve amid sentezi gibi reaksiyonları yüksek verim, stereo ve enantiyo seçicilikte gerçekleştirmeleri, geniş bir pH ve sıcaklık aralığında çalışabilirliği, ticari olarak bulanabilirliği ve düşük maliyeti nedeniyle gıda, yağ, ilaç ve deterjan endüstrisinde kullanımları ile ilgili çok sayıda araştırma ve uygulama bulunmaktadır.Ancak, serbest lipaz enzimlerinin hidrolitik aktivite gerektiren uygulamalar dışında, ester ve amid sentezleri için kullanımları reaksiyon koşullarında kolaylıkla denatüre olmaları ve tekrar kullanımlarının olmaması nedeniyle çok sınırlı veya hemen hemen hiç yoktur. Bu çalışmada *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* lipazlarının aktifleştirilmiş florisile glutaraldehit ve polisüksinimid ara kolları üzerinden kovalent olarak immobilizasyonları, immobilize lipaz örneklerinin aktivitelerinin birbirleriyle ve serbest haldeki aktiviteleriyle karşılaştırılması, kinetik parametrelerinin belirlenmesi, immobilize lipaz örneklerinin endüstriyel öneme sahip bir antioksidan olan L-Askorbil palmitat sentezi, literatürde daha önce hiç sentezi yapılmamış olan enantiyosaf amino alkollerin sentezi ve rasemik mandelik asitin asimetrik amidasyon reaksiyonu için kullanımları amaçlanmıştır.

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Gillies ve ark., (1987), yaptıkları çalışmada *Candida cylindracea* lipazını silika jel üzerine adsorbsiyon yöntemi ile immobilize ederek n-hekzan içerisinde etilbütirat sentezi için kullanmışlardır. Subsrat konsantrasyonunun artırılmasının bir yere kadar aktiviteyi arttırdığını ve ayrıca tekrar kullanımlarda enzimin kararlığını kaybettiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca immobilize enzim için optimum sıcaklığın 20-30 ^{o}C arasında olduğunu ve daha yüksek sıcaklıklarda enzimin aktivitesini kaybettiğini bildirmişlerdir.

Omar ve ark., (1988), yaptıkları çalışmada *Humicola lanuginosa* lipazını Amberlite XAD-7 üzerine immobilize etmişler ve paket yatak kolon reaktöründe sürekli üretim prosesi ile ester sentezine ortamdaki su konsantrasyonunun etkisini araştırmışlardır.Ortamdaki su konsantrasyonunun %0,06'nın altında olmasının ürün oluşum yüzdesini arttırdığını rapor etmişlerdir.Ayrıca immobilize enzimin sürekli kullanımında yarı ömrünün 38 gün olduğunu rapor etmişlerdir.

Shaw ve ark., (1990), lipaz enzimini PVC, kitosan, kitin, agaroz, sefaroz ve trisakril olmak üzere altı değişik desteğe immobilize etmişlerdir. PVC üzerine immobilizasyondan sonra immobilize lipaz enziminin optimum pH'sının 7,5'den 8,5'e yükseldiğini ve optimum sıcaklığın 35 ^{o}C'den 45-55 ^{o}C'ye yükseldiğini bildirmişlerdir. PVC üzerine immobilize edilen lipaz enzimin en yüksek termal kararlılığı gösterdiği ve yarı ömrünün 30 ºC'de 400 saat olduğunu rapor etmişlerdir.

Malcata ve ark., (1992), *Aspergillus niger* lipazını tributirin hidrolizinde kullanmak üzere mikro gözenekli polipropilen şerit zar üzerine immobilize etmişlerdir. Tributirin hidroliz için en uygun pH'nın 7,0 olduğunu rapor etmişlerdir. İmmobilize enzimin yarı ömrünü 35 ^{o}C'de 19,9 gün olarak belirlemişlerdir.

Ruckenstein ve ark., (1993), *Candida rugosa* lipazını trigliseritlerinin hidrolizinde kullanmak üzere hidrofobik mikro gözenekli polisitirendivinilbenzen üzerine adsorbsiyon yolu ile immobilize etmişlerdir.Ortamdaki yüzey etken maddelerin miktarının destek üzerine tutunan enzim miktarını nasıl etkilediğini araştırmışlardır. İmmobilize enzim ile yapılan termal kararlılık ölçümlerinde her biri

24 saatlik süren 15 çalışma sonunda immobilize enzimin başlangıç aktivitesinin %90'nını koruduğunu bildirmişlerdir.

Castro ve ark., (1998), çeşitli ticari serbest ve immobilize lipaz kullanarak rasemik 1-feniletilaminin etilbütirat ile aminoliz reaksiyonunu gerçekleştirmişlerdir. Ürün verimine sıcaklığın, reaksiyon karışımının çalkalanma hızının, katalizör miktarının, organik çözücülerin, reaksiyon ortamında bulunan su miktarının ve reaksiyon süresinin etkilerini incelemişlerdir. Test edilen lipazlar arasında en yüksek ürün verimine (%66) Novozyme 435 immobilize lipazı ile gerçekleştirilen sentezde ulaştıklarını bildirmişlerdir. Ancak, Novozyme 435 ile gerçekleştirilen sentezde enantiyomerik aşırılığın %95 olarak belirlendiğini bildirmişlerdir. Tüm test edilen lipazların rasemik 1-feniletilaminin (R) enantiyomerine seçici olduğunu oluşan amidin optik konfigürasyonunun (R) olduğunu bildirmişlerdir.

Bradoo ve ark., (1999), domuz pankreası, *Rhizomucor miehei*, *Pseudomonas cepacia* ve *Candida rugosa* ticari lipazlarını ve *Bacillus stearothermophilus* SB 1'den izole ettikleri lipazı gözenekli yapıya sahip Accurel EP 100 desteği üzerine immobilize etmişler ve immobilize lipazları askorbil palmitat sentezi için kullanmışlardır. Maksimum ürün verimine (% 97) 2 saat reaksiyon süresi sonunda 60 ºC'de immobilize *Bacillus stearothermophilus* SB 1 lipazı tarafından katalizlenen reaksiyonda ulaştıklarını bildirmişlerdir. Askorbil palmitat sentezi için optimum palmitik asit/askorbik asit molar oranının 2,5 olduğunu bildirmişlerdir. 5g immobilize *Bacillus stearothermophilus* SB 1 lipazı, 50 mmol askorbik asit ve 250 mmol palmitik asit kullanarak 1L hekzan içerisinde gerçekleştirilen reaksiyonda % 95 ürün verimine ulaştıklarını ve immobilize *Bacillus stearothermophilus* SB 1 lipazının 5 kez kullanım sonunda başlangıç aktivitesini koruduğunu bildirmişlerdir.

Yan ve ark., (1999), Chirazyme L-2 ticari immobilize lipazını kullanarak askorbil palmitat sentezini t-butanol ve aseton içerisinde gerçekleştirmişlerdir. Kullanılan yağ asidinin karbon sayısının uzunluğunun ürün verimine etkisini incelemek amacıyla karbon sayıları C8-16 arasında değişen farklı yağ asidleri kullanmışlar ve en yüksek verime palmitik asitin yağ asidi olarak kullanıldığı denemelerde elde ettiklerini bildirmişlerdir. Sentez için optimum yağ asidi/askorbik asit molar oranını 3/1 olarak belirlemişlerdir. Belirledikleri optimum koşullarda

yaptıkları askorbil palmitat sentezi için 48 saat reaksiyon süresi sonunda elde ettikleri ürün verimini %91 olarak belirlemişlerdir.

Kamori ve ark., (2000), kilden asidik koşullarda hidrotermal yöntemle hazırladıkları Toyonit 200-M (TN-M) adlı gözenekli seramik desteğe *Pseudomonas cepacia* lipazını adsorbsiyon yoluyla immobilize etmişler ve immobilize lipazı vinilasetatın açil vericisi olarak kullanıldığı reaksiyonda 10 farklı rasemik alkollerin dietileter içerisinde gerçekleştirilen kinetik rezolusyonunda kullanmışlardır. İmmobilize lipaz ile gerçekleştirilen kinetik rezolusyonda kullanılan rasemik alkollerin çoğu için yaklaşık 20 dakika reaksiyon süresi sonunda %50 ürün verimine ve %99 enantiyomerik aşırılığa ulaştıklarını, ancak serbest *Pseudomonas cepacia*'ın kullanıldığı reaksiyonlarda ise 1 saat reaksiyon süresi sonunda %50 ürün verimine ve %99 enantiyomerik aşırılığa ulaştıklarını bildirmişlerdir. desteğe *Pseudomonas cepacia* lipazını TN-M dışında Selit, Cam boncuklar ve Amberlit üzerine immoblize etmişler ve rasemik alkollerin kinetik rezolusyonunda kullanmışlardır. TN-M üzerine immobilize edilen *Pseudomonas cepacia* lipazının diğer immobilize *Pseudomonas cepacia* lipazlarına göre daha yüksek aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca TN-M üzerine immobilize edilen *Pseudomonas cepacia* lipazının 12 tekrar kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin %70'ini koruduğunu bildirmişlerdir.

Song ve ark., (2002), *Candida sp.* lipazını selit üzerine adsorbsiyon yolu ile immobilize etmişler ve immobilize lipazı askorbil oleat sentezi için kullanmışlardır. Reaksiyon verimine moleküler elek miktarının, reaksiyon sıcaklığının, reaksiyon ortamı olarak kullanılan organik çözücülerin, başlangıç oleik asit derişiminin, kullanılan zamanın ve immobilize enzim miktarının etkilerini incelemişlerdir. Reaksiyon için gerekli optimum moleküler elek miktarının 50 g/L ve sıcaklığının 55 ºC olduğunu bildirmişlerdir. Askorbil oleat sentezini etanol, tetrahidrofuran, piridine, bütanol, 2-metil-2-bütanol, hekzanol, oktanol and hekzan içerisinde gerçekleştirmişler ve en yüksek ürün verimini 2-metil-2-bütanol içerisinde gerçekleştirdikleri sentezde elde ettiklerini bildirmişlerdir. İmmobilize Candida sp. lipazı tarafından katalizlenen reaksiyonun kinetiğini incelemişler ve reaksiyon kinetiğinin Ping-Pong mekanizmasına uyduğunu bildirmişlerdir. Sentezlenen

askorbil oleatın yapısal karakterizasyonunu ise FT-IR, ^{1}H NMR ve kütle spektrofotometreleri ile gerçekleştirmişler.

Queiroz ve ark., (2002), serbest ve polietilenoksit üzerine immobilize edilmiş *Pseudomonas sp.* lipazını kullanarak rasemik metilmandelatın vinil asetatın açil vericisi olarak kullanıldığı reaksiyonda asimetrik açilasyon reaksiyonunu gerçekleştirmişlerdir. Ürün verimine organik çözücü olarak kullanılan diizopropileter, hekzan, t-butanol ve asetonun etkisini incelemişler ve 24 saat reaksiyon süresi sonunda immobilize enzim için en yüksek verime (%25) diizopropileterin organik çözücü olarak kullanıldığı reaksiyonda ulaştıklarını bildirmişlerdir. Serbest enzim için ise diizopropileterin organik çözücü olarak kullanıldığı reaksiyonda %1 verim, diğer organik çözücülerde ise herhangi bir ürün verimi elde edemediklerini bildirmişlerdir. 96 saat reaksiyon süresi sonunda immobilize *Pseudomonas sp.* lipazının kullanıldığı reaksiyonda %50 verime ulaştıklarını, aynı şartlarda serbest *Pseudomonas sp.* ile %13 ürün verimine ulaştıklarını bildirmişlerdir.

Bai ve ark., (2004), domuz pankreası lipazını (PPL) silikajel üzerine polisüksinimid ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize etmişlerdir. İmmobilizasyon işlemi sonucunda immobilize enzimin termal kararlılığında serbest enzime göre önemli derecede bir artışın olduğunu bildirmişlerdir. Serbest ve immobilize PPL için optimum sıcaklık değerlerini sırasıyla 35 ve 40 ºC olarak belirlemişler. Serbest PPL'ın 55 ºC aktivitesini tamamen kaybettiğini ancak immobilize PPL'nin aynı sıcaklıkta başlangıç aktivitesinin yaklaşık %80'ını koruduğunu bildirmişlerdir. Serbest PPL'in oldukça dar bir pH aralığında (7,0-8,0) aktif olduğunu ancak immobilizasyon işlemi sonucunda immobilize PPL'in oldukça geniş bir pH (7,0-12,0) aralığında kararlı olduğunu bildirmişlerdir. İmmobilize PPL'nin 5 ve 37 ºC'deki depolama kararlılığını araştırmışlar ve immobilize PPL'nin 37 ºC'deki depolama kararlılığının 5 ºC'kine göre daha iyi olduğunu bildirmişlerdir.

Wu ve ark., (2004), yılında yaptıkları çalışmada, *Pseudomonas fluorescens* CCRC-17015 lipazını kullanarak tribütirinin hidroliz kinetiğini yatak tipli reaktörde sıvı-sıvı ve sıvı-katı-sıvı reaksiyon sistemi içerisinde incelemişlerdir. Lipazı kovalent olarak gözenekli polimetil akrilamide çapraz bağlayıcı N,N-bisakrilamid varlığında

ve glutaraldehit ile aktifleştirilmiş etilendiamin arakolu üzerinden immobilize etmişlerdir. Tribütirin konsantrasyonu, sıcaklık, çalkalama hızı ve pH değerleri için en uygın koşullar serbest ve immobilize lipaz için incelemişlerdir. Serbest ve immobilize lipaz için geri dönüşüm sayıları sırasıyla 29 ve 5,7 sn^{-1} olarak rapor etmişlerdir.

Sorgedrager ve ark., (2004), çeşitli ticari serbest ve immobilize lipaz kullanarak rasemik 1-nitro-2- alkanollerin süksinik anhidridin açil vericisi olarak kullanıldığı reaksiyonda kinetik rezolusyonunu gerçekleştirmişlerdir. Kullanılan lipazlar arasında en yüksek ürün verimine Novozym 435 ticari immobilize lipazı ile gerçekleştirilen reaksiyonda ulaştıklarını bildirmişleridir. 24 saat reaksiyon süresi sonunda %54 verim ve %93 enantiyomerik aşırılığın elde edildiğini bildirmişlerdir. Serbest *Candida rugosa* ve *lipolytica* lipazlarının kullanıldığı denemelerde ise sırasıyla %3 ve 1 ürün veriminin elde edildiğini bildirmişlerdir. Ürün verimine reaksiyon ortamı olarak kullanılan organik çözücülerin etkisini incelemek amacıyla sentezi 5 farklı organik çözücü içerisinde gerçekleştirmişler ve en yüksek ürün verimine diizopropileter içerisinde gerçekleştirilen reaksiyonda elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Adamczak ve ark., (2005), ticari Chirazyme L-2 immobilize lipazını kullanarak askorbil oleat sentezini gerçekleştirmişlerdir. Ürün verimine reaksiyon ortamı olarak kullanılan organik çözücülerin, başlangıç su ve moleküler elek miktarının, oleik asit/askorbik asit molar oranının ve reaksiyon zamanın etkisini incelemişlerdir. Reaksiyon ortamı olarak etanol, hekzan, petrol eteri ve asetonu kullanmışlar ve en yüksek verime aseton içerisinde gerçekleştirilen sentezde ulaştıklarını bildirmişlerdir. Askorbil oleat sentezi için optimum başlangıç oleik asit/askorbik asit molar oranını 4 olarak bulmuşlardır. İmmobilize lipaz enzimini kesikli reaktörde her biri 24 saatlik 10 reaksiyon için kullanmışlar ve başlangıç ürün veriminin 10 kullanım sonunda % 63'ten 25'e düştüğünü bildirmişlerdir.

Kaewthong ve ark., (2005), 9 ticari lipaz örneğini monoaçil gliserol üretimi için test etmişlerdir. *Pseudomonas sp.* lipazının (PS) 45 ºC'de %28,05 oranında monoaçilgliserol ürettiğini rapor etmişlerdir. Araştırıcılar tarafından bu lipaz selit, silikajel, $CaCO_3$, Accurel EP100 ve aktifleştirilmiş odun kömürü desteklerine

immobilize edilmiş ve Accurel EP 100 (<200 μm)'nün deney şartlarında en iyi destek olarak performans gösterdiğini rapor etmişlerdir. 5 ml enzim çözeltisi (50 U/ml) 0,5 g destek ile immobilize edildiğinde immobilize enzimin aktivitesini 0,23 U/mg destek, immobilizasyon verimini ise %45,38 olarak rapor etmişlerdir. Accurel üzerine immobilize edilmiş enzimin 45 ºC'de optimum aktivite gösterdiği ve 45 ºC'de 24 saat inkübasyon süresince başlangıç aktivitesinin %90'nını koruduğunu bildirmişlerdir.

Rodriguez-Nogalez ve ark., (2005), yüzey yanıt yöntemini kullanarak etanol ve butirik asitin reaksiyonu sonucu oluşan tat verici esterlerin üretimi için gerekli optimum şartları araştırmışlardır. Asit ve alkol konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, sıcaklık ve reaksiyon zamanı gibi etil butiratın sentezine etki eden parametreleri incelemişlerdir. Esterifikasyon verimine etki eden parametrelerin sıcaklık ve substrat konsantrasyonu olduğunu bildirmişlerdir. Enzim reaksiyonu için optimum koşulların %7'lik enzim konsantrasyonu kullanıldığında 34 ºC'de ve 96 saatte 0,04 M substrat konsantrasyonu olduğunu bildirmişlerdir.Bu koşullar altında esterleşme yüzdesinin %72,9 olduğunu rapor etmişlerdir.

Desai ve ark., (2005), domuz pankreas lipazını kitosan üzerine immobilize etmişler ve immobilize enzimin tekrar kullanımını araştırmışlardır. Serbest ve immobilize enzimin pH:9,0'da optimum aktivite gösterdiği ve 5 kullanımdan sonra immobilize enzimin başlangıç aktivitesinin %50'sini koruduğunu rapor etmişlerdir. Salicornia yağının alkolizini 25 ºC'de metanol içeren hekzan ve aseton içerisinde gerçekleştirmişler ve hekzan içeren ortamda serbest ve immobilize enzim tarafından gerçekleştirilen alkoliz reaksiyonu için ürün verimini sırasıyla %45 ve %55 olarak belirlediklerini bildirmişlerdir.

Dalla-Vecchia ve ark., (2005), farklı 10 kaynaktan sağlanan lipaz enzimini polivinilalkol, karboksimetil selüloz ve polivinilalkol/karboksimetil selülozun kütlece eşit karışımlarına immobilize etmişlerdir. İmmobilize edilen lipaz enzimleri karbosiklik asitlerin n-pentanol ile organik ortamda esterleşme reaksiyonları için kullanılmışlardır. Test edilen lipazlar arasında n-pentil laurat oluşumunu en yüksek miktarda *Rhyzopus oryzae* lipazının (ROL) gerçekleştirdiğini belirlemişler. ROL 80 gün süresince 10 kez kullanıldığında enzim aktivitesinin ve enzimin makroskobik

özelliklerinin korunduğunu rapor etmişlerdir. Serbest enzimin ise 6 defalık kullanım sonucunda aktivitesini tamamen kaybettiğinin bildirmişlerdir.

Noureddini ve ark., (2005), soyafasulyesi yağının metanol ve etanol ile transesterifikasyon reaksiyonu incelemişlerdir. 9 lipaz türü başlangıç aktivitesi için test edilmiş ve *Pseudomonas cepacia* lipaz (PS) en yüksek oranda alkil ester ürünü vermiştir. PS lipazı, kimyasal olarak inert olan hidrofobik sol-gel desteğine immobilize edilerek ileriki aşamalar için kullanılmıştır. İmmobilize lipaz tetrametoksi silan ve izo-butiltrimetoksi silanın polikondensasyon reaksiyonu sonucu hazırlamışlardır. İmmobilize lipaz kullanılarak su ve alkol konsantrasyonu, enzim yükleme kapasitesi, enzimin termal stabilitesi ve sıcaklığın transesterifikasyon reaksiyonuna etkilerini incelenmiştir. 10 g soyafasulyesi yağı kullanıldığında metanol için 35 ºC'de, 1:7,5 yağ/metanol molar oranı, 0,5 g su ve 475 mg lipaz , etanol için 35 ºC'de, 1:15.2 yağ/etanol molar oranı, 0,3 g su ve 475 mg lipaz miktarlarını rapor etmişlerdir.1 saat reaksiyon süresi boyunca %67 ve 65 oranında metil ve etil ester oluşumunu bildirmişlerdir.

Yadav ve ark., (2005), Novozym 435, Lipozyme RM IM ve Lipozyme TL IM lipazlarını kullanarak, metil asetoasetat ve n-butanol arasındaki transesterifikasyon reaksiyonu ile n-butil asetoasetat sentezini gerçekleştirmişlerdir. Bu enzimler arasında en fazla aktiviteye Novozym 435'in sahip olduğunu bildirmişlerdir. Reaksiyon koşullarına etki eden çeşitli parametreleri incelemişler ve reaksiyonun ping pong bi-bi mekanizmasına uyduğunu rapor etmişlerdir.

Lohith ve ark., (2005), D-glukozun L-Fenilalanin esterini organik çözücü içerisinde *Rhizomucor miehei* (RML) ve domuz pankreas lipazı (PPL) kullanarak gerçekleştirmişlerdir.Deneysel koşullar altında her iki enzimin iyi derecede esterifikasyon potansiyeli gösterdiğini, fakat RML'ın (%98 ürün oluşumu) PPL'den (%75.6 ürün oluşumu) daha üstün esterifikasyon potansiyeline sahip olduğunu bildirmişlerdir. HSQCT NMR ile yapılan analizlerde 5 diastereomik ester sentezinin gerçekleştiğini rapor etmişlerdir.

Bruno ve ark., (2005), *Mucor miehei* lipazını manyetik polisilokzan-polivinil alkol partikülleri üzerine kovalent olarak immobilize etmişlerdir. İmmobilizasyon işlemi sonunda immobilize enzimin optimum pH'sının 7,0'dan 8,0'a çıktığını fakat

optimum sıcaklığının (45 ºC) değişmediğini bildirmişlerdir. İmmobilize enzim için K_m ve V_{max} değerlerinin sırasıyla 228,3 μM ve 36,1 U/mg protein bulunduğunu rapor etmişlerdir. İmmobilize enzimin 7 tekrar kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin % 10'u gösterdiğini bildirmişlerdir.

Pilissao ve ark., (2006), rasemik metilmandelatın butilamin ile lipaz katalizli asimetrik amidasyon reaksiyonunu organik çözücülerde ve iyonik sıvılarda incelemişlerdir. Lipaz olarak *Pseudomonas cepacia* (PSL), *Rhizomucor miehei* (RML), *Thermomyces lanuginosus* (TLL) ve *Candida antarctica* B (CAL-B) lipazlarının serbest ve polietilenoksit üzerine immobilize formlarını kullanmışlardır. PSL, RML ve TLL lipazlarının serbest ve immobilize formlarıyla gerçekleştirilen reaksiyon sonunda herhangi bir ürün veriminin elde edilmediğini fakat CAL-B ile gerçekleştirilen reaksiyonda ise %17-99 arasında değişen ürün verimlerine ulaştıklarını bildirmişlerdir. Hekzan içerisinde gerçekleştirlen sentezde 3,5 saat reaksiyon süresi sonunda %99 ürün verimine ulaşıldığını ancak elde edilen ürünün rasemik olduğunu bildirmişlerdir. Organik çözücü olarak kloroform ve t-bütanol kullanıldığında ise ürün veriminin düştüğünü ve enantiyomerik aşırılığın arttığını bildirmişlerdir. 1-bütil-3-metil imidazolyum tetrafloroborat [BMIm][BF4] ve 1-bütil-3-metil imidazolyum hekzaflorofosfat [BMIm][PF6] iyonik sıvılarının hekzan, kloroform ve t-butanol ile 1/10 (v/v) oranındaki karışımı ayrı ayrı çözücü ortamı olarak kullanılmış ve t-butanol/[BMIm][BF4] karışımında reaksiyon zamanına bağlı olarak %14-48 arasında ürün verimi ve ürün için %99 enantiyomerik aşırılık elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Yu ve ark., (2007), mezoporöz silika moleküler eleği üzerine *Pseudomonas sp.* lipazı adsorbsiyon yöntemiyle immobilize etmişler ve immobilize lipazı vinil asetatın açil vericisi olarak kullanıldığı ortamda rasemik 2-oktanolün kinetik rezolusyonunda kullanmışlardır. Kinetik rezolusyona kullanılan organik çözücülerin, sıcaklığın, su miktarının ve substrat miktarının etkilerini incelemişlerdir. İmmobilize lipazın serbest lipaza göre daha iyi enantiyoseçicilik gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Csajagi ve ark., (2008), rasemik 1-feniletanol, 1-siklohekziletanol ve 1-fenilpropan-2-ol'ün vinilasetat ile açilasyonunu çeşitli ticari lipaz preparatları ile çelikten yapılma paket yataklı reaktörde gerçekleştirmişlerdir. Reaksiyon hızına

sıcaklığın ve basıncın etkisini incelemişler ve basıncın reaksiyon hızına herhangi bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Enantiyoseçiciliğin düşük sıcaklıklarda daha iyi olduğunu rapor etmişlerdir.

Pahujani ve ark., (2008), *Bacillus coagulans* BTS-3'den izole ettikleri ekstraselüler lipazını glutaraldehit ile aktifleştirilmiş Naylon-6 üzerine kovalent olarak immobilize etmişlerdir. İmmobilize enzimin optimum sıcaklığını 55 ºC ve optimum pH'sını 7,5 olarak belirlemişlerdir. İmmobilize enzimin 55 ºC'de 2 saat boyunca inkübe edildiğinde başlangıç aktivitesinin % 88'ini ve 8 kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin % 85'ini koruduğunu bildirmişlerdir. Serbest ve immobilize lipaz enzimleri için K_m ve V_{max} değerlerini sırsıyla 4 mM ve 10 μmol/min/ml, 3,8 mM ve 0,72 μmol/min/ml olarak belirlemişlerdir.

Kawakami ve ark., (2009), yılında iki basamaklı sol-jel metodu kullanılarak immobilize edilmiş *Rhizopus oryzae* lipazı yüklü oldukça etkin bir biyoreaktör geliştirmişlerdir. Bu yöntemle lipazın immobilizasyonunda metiltrimetoksisilan (MTMS) bazlı silika monolit ve daha hidrofobik alkil-substitue silikat olan tetrametoksisilan (TMOS), propiltrimetoksisilan (PTMS), etiltrimetoksisilan (ETMS), n-bütiltrimetoksisilan (BTMS), n-hekziltrimetoksisilan (HTMS) kullanarak iki tabaka oluşturmuşlardır. Hazırladıkları bu biyoreaktörü n-hekzan içerisinde trigliseridlerin metanolizi ile yağ asidi metil esterlerinin sentezinde kullanmışlardır. Yaptıkları araştırmalar sonucunda en iyi performansın propiltrimetoksisilan (PTMS) ve tetrametoksisilan (TMOS) kullanarak hazırlanan immobilize lipaza ait olduğunu ve bu preparatın serbest lipaza göre 10 kat daha yüksek aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir. En yüksek dönüşüm oranı 100 mol suya 0,4 mol silanın eklenmesiyle elde edildiğini bildirmişlerdir ve PTMS ve TMOS için en etkin molar oranın 4:1 olduğunu belirlemişler. Ayrıca sürekli monolit biyoreaktördeki dönüşüm oranınn kesikli reaktördekinden yaklaşık 1,5 kat daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir.

Li ve ark., (2009), domuz pankreas lipazını ((DPL, 4.6nm×2.6nm×1.1 nm) fiber benzeri SBA-15 destek materyaline hidrojen bağları ile immobilize etmişlerdir. Lipazın fiber benzeri SBA-15 destek materyaline fiziksel adsorpsiyonu çalışmalarında farklı pH değerlerindeki (pH 5,0-10,0) tampon çözeltilerinde ve farklı zaman aralıklarında (0-36 saat) denemeler yapmışlar ve en yüksek bağlanan lipaz

miktarı 926 mg/destek olarak belirlemişlerdir. Lipazın desteğe immobilizasyonunda en yüksek aktivite pH 6,0 ve 3 saat immobilizasyon koşullarında olduğunu rapor etmişledir. İmmobilize ve serbest lipazın triasetini hidrolizi için optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 7,0 ve 35°C olarak belirlemişlerdir. Triasetinin enzimatik hidrolizinde immobilize lipaz, serbest lipaz ile karşılaştırıldığında pH 6,0 ile 9,0 arasında immobilize enzimin kararlılığının daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Bu arada, serbest ve immobilize lipazın 60°C deki termal karalılığını araştırmışlar ve immobilize lipazın serbest lipaza göre daha yüksek termal karalılık gösterdiğini rapor etmişlerdir. İmmobilize lipazın tekrar kullanılabilirliğinin araştırılması deneyinde kesikli reaktörde 5 kullanımdan sonra aktivitenin hızla %40'a kadar düştüğünü bildirmişlerdir. Bunun nedeninin lipazın desteğe zayıf adsorpsiyonla bağlanması ve desteğin yapısını oluşturan kanallardan kolayca ayrılmış olabileceği şeklinde açıklamışlardır.

Ghiaci ve ark., (2009), yılında *Candida rugosa* lipazını modifiye edilmiş ve edilmemiş bentonite immobilize etmişlerdir. İmmobilize lipazın kinetik özelliklerini, tekrar kullanılabilirliğini ve desteğin hidrofilik ve hidrofobik etkilerini araştırmışlardır. Tek tabakalı sürfaktan ile kaplanarak modifiye edilmiş bentonitin çift tabakalı kaplama ile modifiye edilmiş göre immobilizasyon için en iyi destek olduğunu rapor etmişlerdir. n-hekzan içerisinde hazırlanmış zeytin yağını kullanarak pH'nın, sıcaklığın, çeşitli termodinamik parametrelerin ve enzim çözeltisinin konsantrasyonu gibi çeşitli faktörlerin etkilerini araştırmışlardır. Na-bentonite, tek tabakalı sürfaktanla kaplanmış bentonite (BMS) ve çift tabakalı sürfaktanla kaplanmış bentonite (BBS) immobilize ettikleri lipaz için pH 7,0'deki (optimum pH) aktiviteleri sırasıyla % 7,2, 56,6 ve 3,6 olarak rapor etmişlerdir. Serbest ve immobilize enzimler için en yüksek aktivite 37 °C'de belirlemişlerdir ve daha yüksek sıcaklıklarda ise hızlı bir aktivite kaybını gözlemlemişlerir. 50 ve 70 °C'de serbest enzim aktivitesinin sırasıyla yaklaşık % 88 ve 42'sini koruduğunu bildirmişlerdir ve BMS'ye immobilize edilen lipaz da aynı termal kararlılığı gösterdiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca BMS'ye immobilize edilen lipazın modifiye edilmemiş bentonite immobilize edilen lipaza göre daha kararlı olduğunu da bildirmişlerdir. Adsorpsiyon izotermini Langmiur eşitliğine göre hesaplamışlar, Na-

bentonit, BMS ve BBS'ye immobilize edilen lipaz için bağlanan protein miktarının başlangıçta yüklenen protein miktarının sırasıyla % 42,6, 61,2 ve 28,3'ü olduğunu belirleişlerdir. Serbest ve immobilize enzimin aktivitesine substrat konsantrasyonunun etkisini araştırmışlar ve Michaelis-Menten kinetiğine uyduğunu rapor etmişlerdir.

Tutar ve ark., (2009), yılında *Candida rugosa* lipazını (CRL) sporopollenin üzerine adsorpsiyon metodu ile immobilize etmişlerdir. İmmobilize enzimin adsorpsiyon kapasitesi, aktivitesi ve termal kararlılığını araştırmışlardır. En uygun enzim/destek oranını bulabilmek için 1 g sporopolenin için farklı miktarlarda lipaz ile immobilizasyon çalışmaları yapılmış ve en yüksek aktivite için en uygun enzim/destek oranı 0,3 olarak rapor etmişlerdir. Bu oran için immobilize lipazın gösterdiği spesifik aktivitenin maksimum değeri 16,3 U/mg protein olarak hesaplamışlardır. Hesaplanan bu değerin serbest lipaz için hesaplanan spesifik aktivite değerinden 0,46 kez daha büyük olduğunu bildirmişlerdir. İmmobilize enzim için maksimum aktivite gösterdiği pH ve sıcaklık değeri sırasıyla 6,0 ve 40ºC olarak belirlemişler ve bu koşullarda hesaplanan K_m değerini 7,54 mM ve V_{max} değerini ise 145 U/mg protein olarak rapor etmişlerdir. Böylece CRL lipazının sporopollenin üzerine adsorpsiyonu ile K_m değerinin artarken V_{max} değerinin azaldığını bildirmişlerdir.

Liu ve ark., (2009), yılında *Burkholderia sp.*'den izole ettikleri lipazı pratik uygulamalardaki kullanılabilirliğini zenginleştirmek için selit üzerine kovalent olarak immobilize etmişlerdir. İmmobilizasyon koşullarını optimize etmişler ve sonuç olarak en yüksek immobilizayon etkinliği için lipaz derişimini, reaksiyon pH'sını ve reaksiyon zamanını sırasıyla 70 g/L, 7,0 ve 3 saat olarak rapor etmişlerdir. Selite immobilize edilen lipazın miktarını 62,9 mg/g selit ve immobilize lipazın maksimum aktivitesini 273,5 U/g selit olarak hesaplamışlardır. İmmobilize lipazın lipolitik aktivitesi için optimum pH ve sıcaklık değerlerinin serbest lipaz ile benzer olduğu görülmüş ve sırasıyla 10,0 ve 55ºC olarak bildirilmiştir. İmmobilize lipazın termal kararlılığı için yaptıkları çalışmada 55ºC 120 dk bekletilen immobilize lipazın başlangıç aktivitesinin yaklaşık %83'ünü koruduğunu fakat serbest lipazın aynı koşullarda başlangıç aktivitesinin %60'ını koruduğunu bildirmişlerdir. İmmobilize

lipaz için K_m ve V_{max} değerlerini sırasıyla 12,06 mM ve 11,29 U/mg protein olarak hesaplamışlardır.

Yi ve ark., (2009), kitosan boncukları glisin, glutamik asit, lizin, lösin, alanin, fenilalanin, serin ve tirozin amino asitleri ile modifiye etmişler ve elde edilen desteği epiklorohidrin ile aktifleştirmişlerdir. Hazırlanan bu desteğe *Candida rugosa* lipazını immobilize etmişlerdir. Hazırlanan boncuklar elemental analiz ve NMR ile analiz edilmiş ve %15-60 oranında aminoasit bağlandığını bildirmişlerdir. Modifiye edilmemiş desteğe immobilize edilen lipazın immobilizasyon veriminin %92,7 ve serbest lipazın aktivitesinin %10,4'ünü gösterdiğini rapor etmişlerdir. Aminoasit ile modifiye edilmiş kitosana bağlanan lipazın immobilizasyon verimleri daha düşük (%15-60) olmasına rağmen modifiye edilmemiş desteğe göre daha yüksek aktivite göstermiştir. Özellikle alanin (Ala-KB) ve lösin (Leu-KB) ile modifiye edilmiş kitosana immobilize edilen lipazlar serbest lipazın aktivitesinin sırasıyla % 49 ve 51'ni gösterdiğini bildirmişlerdir. Ala-KB, modifiye edilmemiş kitosana immobilize edilen ve serbest lipazın 55ºC'deki termal kararlılıkları karşılaştırılmış ve Ala-KB lipazın diğerlerinne oranla daha yüksek termal kararlılık gösterdiğini rapor etmişlerdir. Ala-KB lipaz 4 ºC'de 4 hafta boyunca depo edildiğinde başlangıç aktivitesinin %93'ünü koruduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca Ala-KB lipaz 10 kullanımdan sonra başlangıç aktivitesinin %77'sini korumuştur.

Jegannathan ve ark., (2009), *Burkholderia cepacia* lipazını κ-carrageenan içerisine kapsülleme metodu ile immobilize etmişlerdir. Kapsüllenen lipazın yarıçapının 1,3-1,8 mm aralığında ve membran kalınlığının ise 200 μm olduğunu bildirmişlerdir. İmmobilize lipazın pH 6,0 ve 9,0 aralığında ve 50 ºC'ye kadar stabilitesini koruduğunu bildirmişlerdir. İmmobilize lipaz p-NPP hidrolizi için kullanıldığında 6 tekrar kullanımın sonunda başlangıç aktivitesin %72,3'ünü koruduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca immobilize lipazın metanol, etanol, izopropanol, n-hekzan ve n-heptan içeren çeşitli çözücü ortamlarında da kararlılığını koruduğunu bildirmişlerdir. Bunların yanı sıra serbest ve immobilize lipaz için kinetik parametreleri hesaplamışlar, K_m ve V_{max} değerlerini serbest lipaz için sırasıyla 0,22 mM ve 0,06 μmol/dk, immobilize lipaz için 0,25mM ve 0,05 μmol/dk olarak rapor etmişlerdir.

Özmen ve ark., (2009), *Candida rugosa* lipazını immobilize etmek için çapraz bağlı β-siklodekstrin polimerleri hazırlamışlardır. Sentezlenen makrosiklik bileşiklerin yapısını Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi (FT-IR), Termal Gravimetrik Analiz (TGA) ve Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) teknikleri ile incelemişlerdir. Lipaz desteğe glutaraldehit ve hekzametilen diizosiyanat ara kollarının üzerinden immobilize edilmiş ve immobilize lipazların hidrolitik aktiviteleri serbest lipaz ile karşılaştırılmıştır. Glutaraldehit ara kolu kullanılarak immobilize edilen lipazın spesifik aktivitesinin (62,75 U/mg.protein) hekzametilen diizosiyanat ara kolu kullanılarak immobilize edilen lipazın spesifik aktivitesinden 28,1 kat daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Serbest lipazın 60 ºC'de 80 dk sonunda aktivitesini tamamen kaybettiğini buna karşın glutaraldehit ve hekzametilen diizosiyanat ara kolu kullanılarak immobilize edilen lipazların 120 dk sonunda başlangıç aktivitelerinin sırasıyla % 82 ve 56'sını koruduğunu bildirmişlerdir.

Ji ve ark., (2010), lipazı *Pseudomonas aeruginosa* LX1'den amonyum sülfat çöktürmesi ve iyon değiştirici kromatografi kullanarak saflaştırmışlar ve biyodizel üretimi için kullanmışlardır. Saflaştırılan lipaz enzimi için optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 7,0 ve 40 ºC olarak belirlemişlerdir. Saflaştırılan lipazın pH 4,5-12 arasında ve 50 ºC'nin altındaki sıcaklıklarda kararlı olduğunu bildirmişlerdir. Saflaştırılan lipazın substrat spesifitesini p-nitrofenil esterleri (asetat, bütirat, kaproat, dekanoat, miristat, palmitat ve stearat) kullanarak incelemişler ve lipazın en yüksek hidrolitik aktivitesini p-nitrofenil palmitat için gösterdiğini bildirmişlerdir. Lipazın çeşitli organik çözücülerdeki (hekzadekan, izooktan, hekzan, t-butanol, asetonitril, dimetilsulfoksit, dimetilformamid gibi) kararlılığını incelemişler ve lipazın hekzadekan ve t-butanol ve asetonitril içerisinde oldukça kararlı olduğunu bildirmişlerdir. Serbest ve Selit üzerine immobilize ettikleri *Pseudomonas aeruginosa* LX1 lipazının transesterifikasyon aktivitesini biyodizel üretimi için test etmişler ve serbest ve immobilize lipazın %71,5 ve 80 verimle biyodizel üretimini gerçekleştirdiğini bildirmişlerdir.

Barbosa ve ark., (2010), *Candida antartica B* lipazını Eupergit C ve modifiye edilmiş Eupergit C üzerine kovalent olarak immobilize etmişlerdir. İmmobilize lipazları kullanarak vinil asetatın açil verici olarak kullanıldığı reaksiyonda rasemik

propranololün kinetik rezolusyonunu toluen içerisinde gerçekleştirmişlerdir. Başlangıç propranolol miktarının, vinil asetat miktarının ve immobilize lipaz miktarının ürün verimine etkisini incelemişler ve reaksiyon için başlangıç propranolol, vinil asetat ve immobilize lipaz miktarını sırasıyla 0,1 mmol, 0,3 mmol ve 50 U olarak belirlemişlerdir. Bu şartlar altında 3 saatlik reaksiyon süresi sonunda %20-30 arasında ürün verimi elde ettiklerini bildirmişlerdir. Kullanılan immobilize *Candida antartica B* lipazları arasında en yüksek ürün verimine (%30) ve enantiomerik aşırılığa (%96) modifiye edilmemiş Eupergit C üzerine immobilize edilen *Candida antartica B* lipazı ile ulaştıklarını bildirmişlerdir.

Yiğitoğlu ve ark., (2010), *Candida rugosa* lipazını akrilamid içeren polietilentereftalat üzerine immobilize etmişlerdir. Zeytinyağını substrat olarak kullanmışlar ve zeytinyağı hidrolizi için serbest ve immobilize lipazların maksimum aktivite gösterdiği pH, sıcaklık ve kinetik parametreleri belirlemişlerdir. İmmobilizasyon işlemi sonucunda serbest lipaz enziminin optimum pH'sının 6,0'dan 7,0'a değiştiğini ancak maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığın değişmediğini (40 °C) bildirmişlerdir. Serbest ve immobilize lipaz enzimi için K_m ve V_{max} değerlerini sırasıyla 47,2 mg/mL ve 48,1 U/mg protein, 151,6 mg/mL ve 10,9 U/mg protein olarak rapor etmişlerdir. İmmobilize lipaz enziminin 4 °C'de 60 gün depolama süresi sonunda başlangıç aktivitesinin %90'ını koruduğu ancak aynı koşullarda serbest lipaz enziminin başlangıç aktivitesinin %75'ini koruğunu bildirmişlerdir. İmmobilize lipaz enziminin zeytinyağı hidrolizi için kesikli reaktörde 10 kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin %26'sını koruduğunu rapor etmişlerdir.

Zaidan ve ark., (2010), asit ile etkileştirilmiş Mika desteğini aminopropil, oktil, vinil, merkapto, glisidoksi trietoksisilan ile ayrı ayrı aktifleştirmişlerdir. Amino propil trietoksisilan ile aktifleştirilen desteği ise daha sonra glutaraldehit ile etkileştirmişler ve elde edilen modifiye desteklerin tümünün karakterizasyonunu X-ray difraksiyon, infa-red spektroskopisi, taramalı elektron mikroskopisi, transmisyon elektron mikroskopisi ile yapmışlardır. Elde edilen modifiye destekleri *Candida rugosa* lipazının immobilizasyonu için kullanmışlardır. İmmobilize lipazları laurik asitin propanol ile hekzan içerisinde gerçekleştirilen esterifikasyon reaksiyonu için kuallanmışlardır. İmmobilize lipazlar arasında en yüksek aktiviteyi aminopropil ile

aktifleştirilen mika desteğe immobilize edilen lipazın gösterdiğini, bu desteğe gram destek başına 8,22 mg proteinin bağlandığını bildirmişlerdir.

Kandasamy ve ark., (2010), mezoporöz yapıdaki aktive karbon üzerine *Pseudomonas gessardii*'den saflaştırılan lipazı immobilize etmişlerdir. Saflaştırılan lipazın spesifik aktivitesini ve moleküler ağırlığını sırasıyla 1473 U/mg protein ve 94 kDa olarak rapor etmişlerdir. İmmobilizasyon süresinin, pH'nın, sıcaklığın, başlangıç lipaz aktivitesinin immobilizasyona olan etkilerini incelemişler ve en uygun immobilizasyon koşullarını 120 dakika, pH:3,5, 30 °C olarak belirlemişlerdir. Serbest enzimin termal kararlılığının immobilizasyon sonucu arttığını bildirmişlerdir. Serbest ve immobilize enzimler için K_m değerlerini sırasıyla 0,665 ve 0,243 mM olarak belirlemişlerdir.

Bu doktora tez çalışmasının amacı;

1) *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* lipazlarının aktifleştirilmiş florisile glutaraldehit ve polisüksinimid ara kolları üzerinden immobilizasyonları için optimum koşulların belirlenmesi,
2) Hidrolitik aktiviteleri ile ilgili çok kısıtlı sayıda literatür bulunan *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* lipazlarının hidrolitik aktiviteleri yönünden karakterizasyonu,
3) İmmobilize *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* lipazlarının kullanımı ile özellikle yağ ve kozmetik endüstrilerinde antioksidan olarak kullanılan L-Askorbil palmitat'ın sentezlenebilmesi için optimum reaksiyon koşullarının belirlenmesi ve sentezlenen L-Askorbil palmitat'ın Fourier Transform İnfrared (FT-IR) ve Nükleer Magnetik Rezonans (NMR) Spektroskopileri ile karakterizasyonu,
4) İmmobilize *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* lipazları kullanılarak ilaç endüstrisinde β-Blokır olarak kullanılan 2-(metilamino)-1-feniletanol, 2-(etilamino)-1-feniletanol, 2-(propilamino)-1-feniletanol, 2-(allilamino)-1-feniletanol, 2-(butilamino)-1-feniletanol ve 2-(hekzilamino)-1-feniletanol gibi enantiyosaf amino alkollerin rasemik karışımlarından doğrudan kinetik rezolusyon ile ilk defa gerçekleştirilecek eldesi için bu amino alkollerin rasemik

karışımlarının kimyasal yöntemler ile sentezi, kinetik rezolusyon için optimum reaksiyon koşullarının belirlenmesi, belirlenen optimum reaksiyon koşullarında kinetik rezolusyonlarının gerçekleştirilmesi, ürün verimlerinin ve enantiyomerik aşırılıkların belirlenmesi ve elde edilen ürünlerin FT-IR ve NMR Spektroskopileri ile karakterizasyonları,

5) İmmobilize *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* lipazlarının kullanılarak rasemik mandelik asitin ilk defa gerçekleştirilecek olan asimetrik amidasyon reaksiyonu için optimum reaksiyon koşullarının belirlenmesi, belirlenen optimum reaksiyon koşullarında asimetrik amidasyon reaksiyonunun gerçekleştirilmesi, ürün verimlerinin ve enantiyomerik aşırılıkların belirlenmesi ve elde edilen ürünlerin FT-IR ve NMR Spektroskopileri ile karakterizasyonlarının araştırılmasıdır.

3.MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Lipaz Enzimleri ve Kimyasallar

Lipaz Enzimleri: *Mucor miehei* (4130 Ünite/mg katı) ve *Pseudomonas sp.* (15 Ünite/mg katı) lipazları

Kimyasallar: Florisil (magnezyum silikat, partikül büyüklüğü 150-250 μm, gözenek büyüklüğü 6-8 nm ve yüzey alanı 170-300 m^2/g), 3-aminopropiltrietoksisilan (3-APTES), glutaraldehit, sodyum siyanoborhidrür ($NaCNBH_3$), L-Aspartik asit, p-nitrofenol, p-nitrofenol palmitat, sodyum karbonat (Na_2CO_3), L-Askorbik asit (C vitamini), palmitik asit, 2-metil-2-butanol, rasemik sitiren oksit (%97,v/v), amonyumbikarbonat (NH_4HCO_3), metilaminhidroklorür, etilamin (%70,v/v), propilamin (%99,v/v), allilamin (%99,v/v), butilamin (%99,v/v),hekzilamin (%99,v/v), rasemik mandelik asit (%98), sodyum hidroksit, glasiyel asetik asit, fosforik asit (%85,v/v), hidroklorik asit(%37,v/v),asetonitril, kloroform, metanol, diizopropileter (DIPE), dietileter (DEE), dioksan (DIO), tetrahidrofuran (THF), tersiyerbütilmetileter (TBME), hekzan, aseton, trietilamin (%99,v/v).

3.1.2. Kullanılan Cihaz, Araç ve Gereçler

Unicam UV Spektrofotometre: Lipaz örneklerinin hidrolitik aktivitelerinin tayininde ve protein tayinlerinde kullanılmıştır.

Hanna pH metre: Tampon çözeltilerinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

Shimadzu Yüksek Basınçlı Likit Kromatografi Sistemi (HPLC): Lipaz örneklerinin sentetik aktivitelerinin tayininde kullanılmıştır.

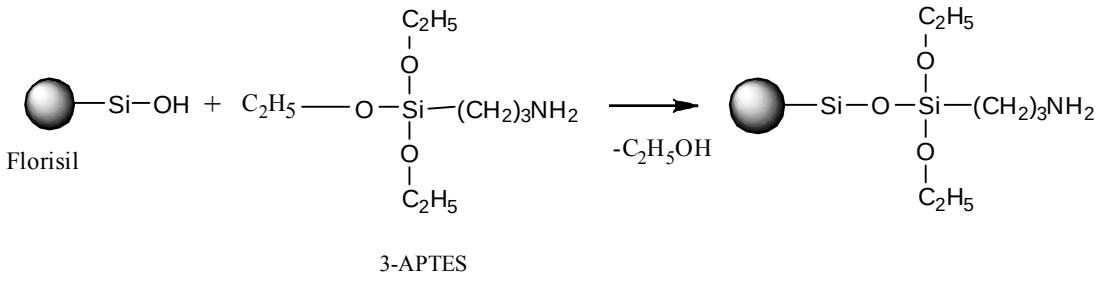
Perkin Elmer RX I Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi (**FTIR):** Çalışmada sentezlenen ürünlerin karakterizasyonunda kullanılmıştır.

Bruker Nükleer Magnetik Rezonans Spektroskopisi (NMR): Çalışmada sentezlenen ürünlerin karakterizasyonunda kullanılmıştır.

3.2. METOD

3.2.1. Florisil Desteğinin Lipaz İmmobilizasyonu İçin Hazırlanması

Lipazın Florisil üzerine immobilizasyonununda önce kullanılacak Florisil desteğinin yüzeyinin aktifleştirilmesi daha sonra glutaraldehit ve polisüksinimid ile muamele edilmesi gerekmektedir. Florisilin aktifleştirilmesi literatürde Weethall (1976) tarafından bildirilen yönteme göre yapılmıştır. 10 g destek materyali 50 mL %5'lik HNO_3 ile 80-90 ºC'de 60 dakika boyunca yıkandıktan sonra nötralize edilinceye kadar saf su ile yıkanmış ve 120 ºC'de kurutulmuştur. Kurutulmuş desteğin 1 gramı %4'lük (v/v) 3-APTES'in aseton içerisinde hazırlanmış çözeltisine eklenerek 45 ºC'de 24 saat etkileştirilmiştir (Şekil 3.1). Daha sonra aktifleştirilen destek saf su ile yıkanarak etüvde 115 ºC'de 1 gece kurutulmuştur. Desteğe bağlanan 3-APTES ile aktifleştirilen florisil desteğindeki serbest amino grubunun miktarının belirlenmesinde Alptekin ve ark., (2009) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır.

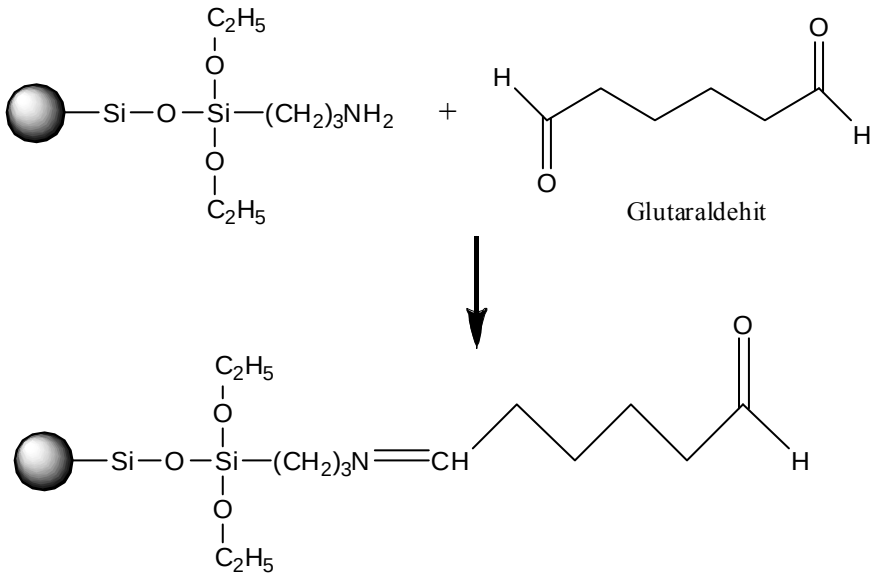


Şekil 3.1. Florisil desteğinin 3-APTES ile aktivite edilmesi.

3.2.2. Florisilin Alkilamin Türevinin Glutaraldehit İle Aktifleştirilmesi ve Schiff Bazının İndirgenmesi

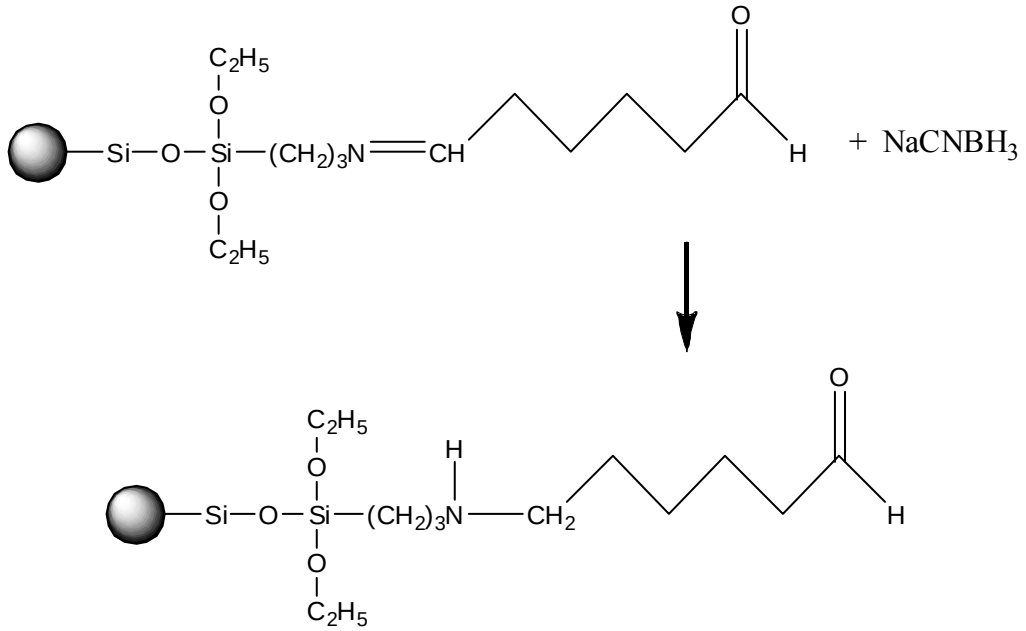
Alkilamin türevine glutaraldehitin bağlanmasında Cho ve Rhee (1993) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. 1 g aktifleştirilmiş destek üzerine 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda %2,5 (w/v) olacak şekilde hazırlanmış glutaraldehit çözeltisinin 25 mL'si eklenerek oda sıcaklığında 2 saat boyunca karıştırılmıştır (Şekil

3.2). Destek saf su ile süzüntüde glutaraldehit gözlenmeyinceye kadar iyice yıkanmış ve 50 ºC'de 1 gece kurutulmuştur. Süzüntüde glutaraldehit olup olmadığını kontrol etmek için literatürde Boratynski ve Zal'ın (1990) önerdiği yöntem kullanılmıştır. Alkilamin türevine glutaraldehitin bağlanması sonrasında arta kalan serbest amino grubu miktarının tayini Alptekin ve ark., (2009) tarafından önerilen yönteme göre yapılmıştır.



Şekil 3.2. Aktifleştirilmiş florisil desteğinin glutaraldehit ile reaksiyonu.

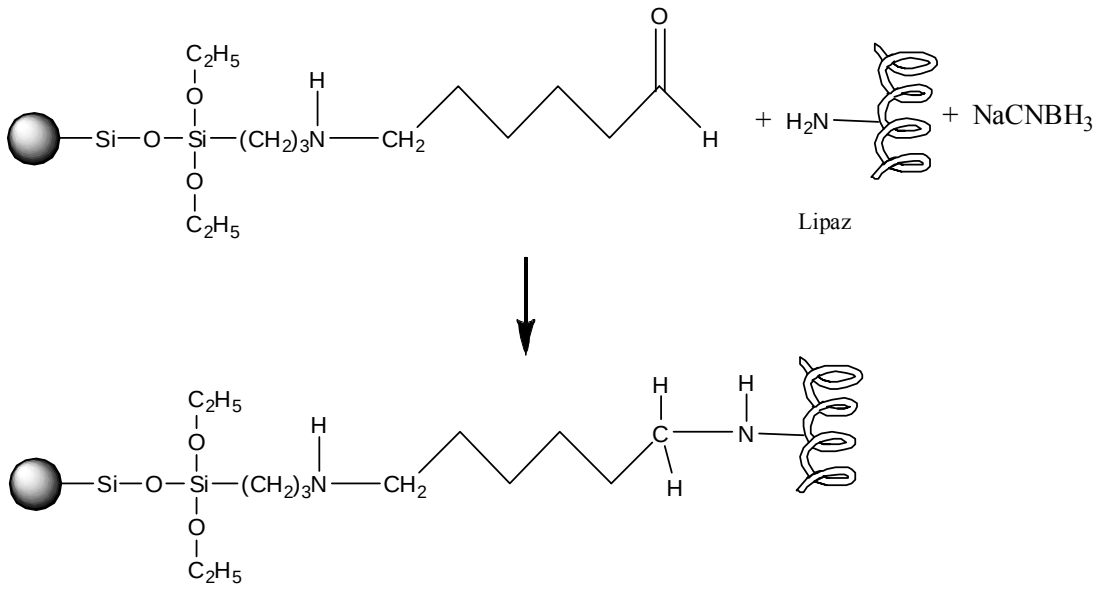
Kurutulan desteğin 1 gramı üzerine 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda hazırlanmış 0,25 M $NaCNBH_3$ çözeltisinin 10 mL'si eklenerek oda sıcaklığında 12 saat boyunca karıştırılarak Schiff bazının indirgenmesi sağlanmıştır (Şekil 3.3). Elde edilen destek saf su ile yıkanarak oda sıcaklığında 1 gece kurutulmuştur.



Şekil 3.3. Aktifleştirilmiş florisil desteğinin glutaraldehit ile reaksiyonu sonucu oluşan Schiff bazının indirgenmesi.

3.2.3. *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* Lipazlarının Aktifleştirilmiş Florisile Glutaraldehit Ara Kolu Üzerinden Kovalent İmmobilizasyonu

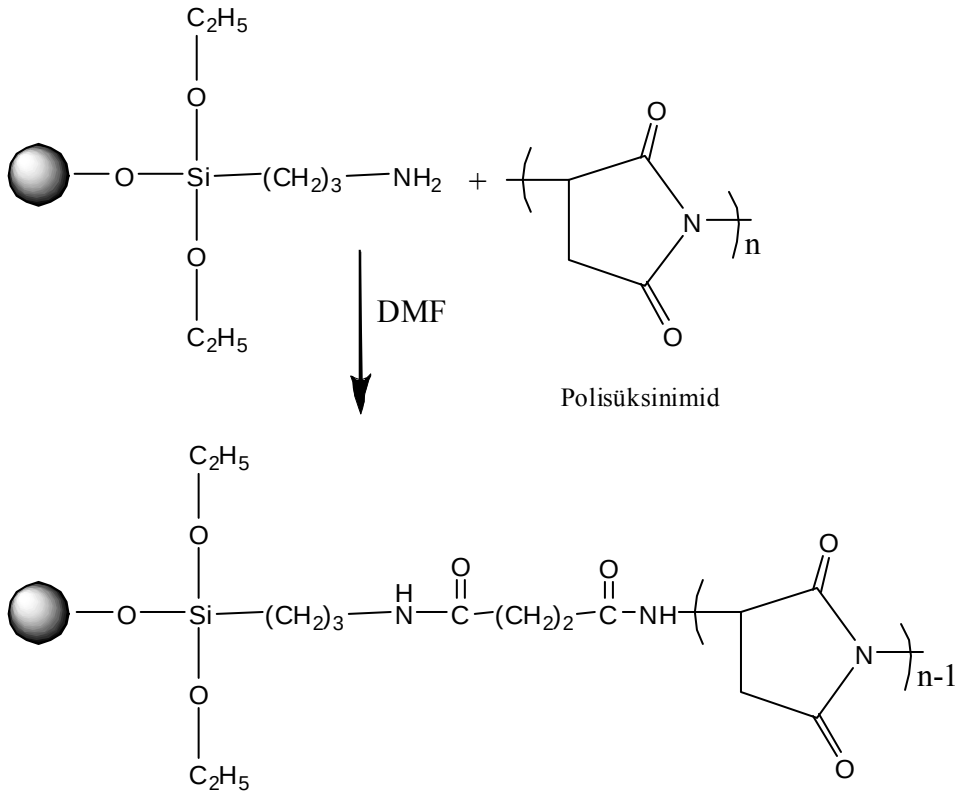
Lipazın florisile kovalent immobilizasyonunda Costa ve ark. (2001) önerdiği yöntem kullanılmıştır. 1g destek üzerine derişimi 1 mg/mL olacak şekilde 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda hazırlanmış lipaz çözeltilerinin 4 mL'si ve0,25 M $NaCNBH_3$ çözeltisinin 10 mL'si ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 2 saat karıştırılmıştır. İmmobilizasyon süresi sonunda immobilize lipaz örnekleri tampon ile yıkanarak desteğe bağlanmayan serbest lipaz enzimlerinin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Süzüntülerde protein miktarı tayini Lowry ve ark. (1951) önerdiği yöntemine göre yapılmış ve başlangıçta ortama ilave edilen protein miktarından süzüntüde bulunan bağlanmayan protein miktarı çıkartılarak desteğe bağlanan protein miktarı hesaplanmıştır.



Şekil 3.4. Aktifleştirilmiş florisil desteğinin üzerine lipaz enziminin glutaraldehit ara kolu üzerinden immobilizasyonu.

3.2.4. Polisüksinimid Sentezi ve Alkilamin Türevinin Polisüksinimid İle Aktifleştirilmesi

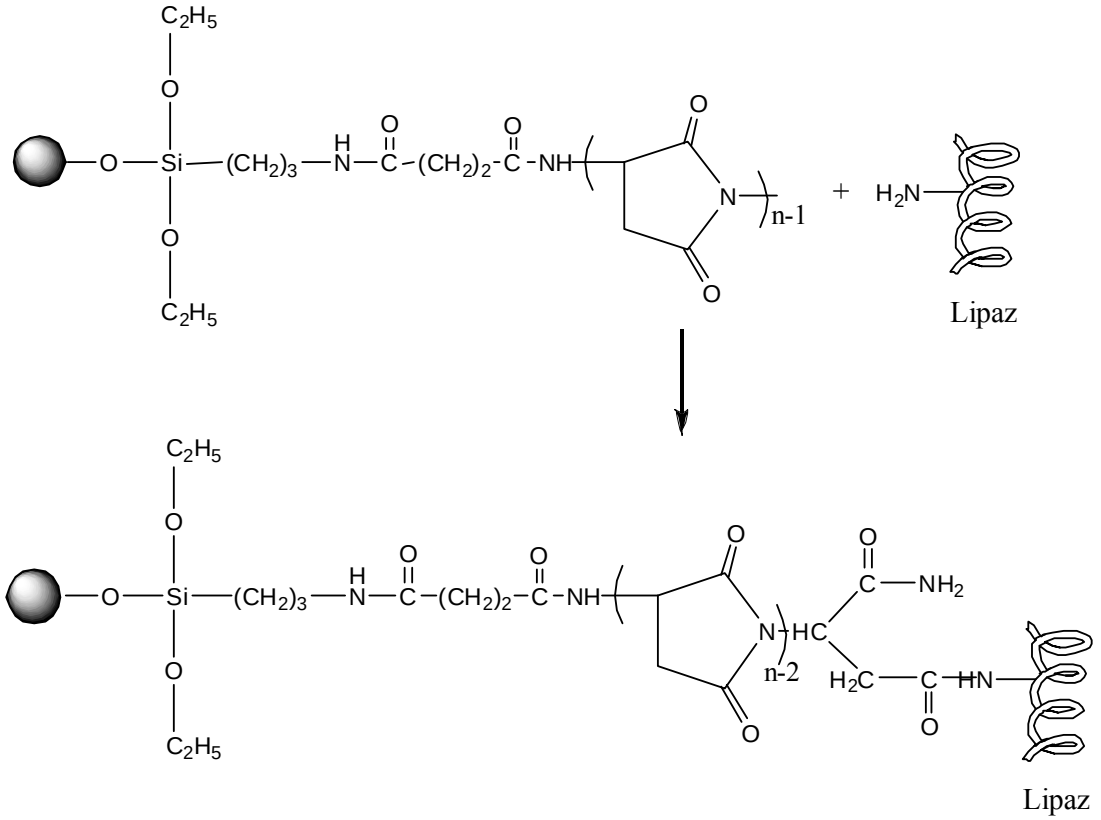
Polisüksinimid sentezinde Bai ve ark. (2005) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. 1,32 gram aspartik asit üzerine 13,2 mL 1 M HCl çözeltisi ilave edilmiştir. Çözelti polimerizasyon için etüv içerisinde 230 ºC'de 1 gece boyunca bekletilmiştir. Sentezlenen polisüksinimidin karakterizasyonu FT-IR kullanılarak yapılmıştır. Alkilamin türevine polisüksinimidin bağlanmasında ise 5 gram polisüksinimid 15 mL dimetilformamid (DMF) ile çözünmüş ve üzerine 5 g alkilamin türevi ilave edilerek oda sıcaklığında 12 saat boyunca karıştırılmıştır (Şekil 3.5).Elde edilen destek 100 mL DMF ile yıkanarak reaksiyona girmeyen polisüksinimidin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Destek oda sıcaklığında 1 gece boyunca kurumaya bırakılmıştır.



Şekil 3.5. Aktifleştirilmiş florisil desteğinin polisüksinimid ile reaksiyonu.

3.2.5. *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* Lipazlarının Aktifleştirilmiş Florisile Polisüksinimid Ara Kolu Üzerinden Kovalent İmmobilizasyonu

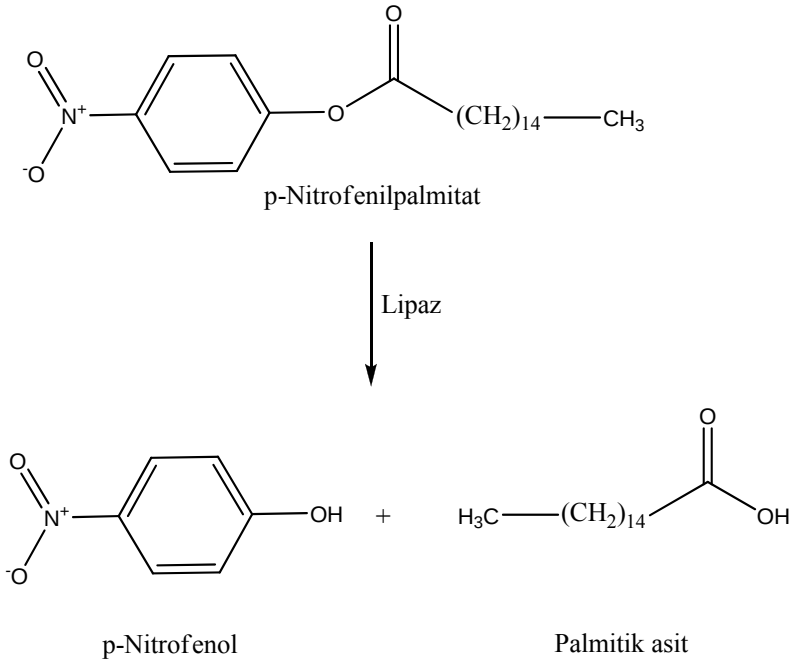
Lipazın florisile polisüksinimid ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonunda Bai ve ark. (2005) önerdiği yöntem kullanılmıştır. 1g destek üzerine derişimi 1 mg/mL olacak şekilde 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda hazırlanmış lipaz çözeltisinin 4 mL'si ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 6 saat karıştırılmıştır (Şekil 3.6). İmmobilizasyon süresi sonunda immobilize lipaz örnekleri tampon ile yıkanarak desteğe bağlanmayan serbest lipaz enzimlerinin uzaklaştırılması sağlanmıştır.



Şekil 3.6. Aktifleştirilmiş florisil desteğe lipazın polisüksinimid ara kolu üzerinden immobilizasyonu.

3.2.6. Serbest ve İmmobilize *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* Lipazlarının Hidrolitik Aktivitelerinin Ölçümü

Lipaz aktivitesinin ölçümünde Wu ve ark. (2004) önerdiği yöntem kullanılmıştır. 0,9 mL fosfat tamponu (50 mM, pH 7,0) içerisine derişimi 1 mg/mL olacak şekilde hazırlanmış lipaz çözeltisinin 0,1 mL'si veya 10 mg immobilize lipaz ilave edilmiştir. Reaksiyon derişimi 0,2 mg/mL olacak şekilde etanol içerisinde hazırlanmış p-nitrofenil palmitat (p-NPP) çözeltisinin 1 mL'sinin ilavesi ile 35 ºC'de başlatılmıştır. 5 dakika reaksiyon süresi sonunda reaksiyon 2 mL, 0,5 N Na_2CO_3 ilavesi ile durdurulduktan sonra açığa çıkan p-nitrofenol (p-NP)'ün absorbansı 410 nm'de ölçülmüştür.



Şekil 3.7. Lipaz tarafından katalizlenmiş p-nitrofenol palmitat hidrolizi.

3.2.7. *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* Lipazlarının Florisile Glutaraldehit ve Polisüksinimid Üzerinden Kovalent İmmobilizasyonu İçin Optimum Koşullarının Belirlenmesi

Lipazın desteğe en uygun immobilize olduğu koşulların belirlenmesi için tüm immobilizasyon çalışmalarında aşağıdaki optimizasyon işlemleri yapılmıştır.

- En uygun immobilizasyon pH'sının belirlenmesi için pH 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 ve 8,0'da immobilizasyonlar yapılmıştır.
- En uygun tampon derişiminin belirlenmesi için belirlenen uygun pH'da 25, 50, 75 ve 100 mM tampon derişimlerinde immobilizasyonlar yapılmıştır.
- En uygun immobilizasyon sıcaklığının belirlenmesinde belirlenen pH ve tampon derişiminde 5, 15 ve 25 ºC'de immobilizasyonlar yapılmıştır.

- En uygun immobilizasyon süresinin belirlenmesinde 1, 2, 3, 6, 12 ve 24 saat süre için immobilizasyonlar yapılmıştır.
- En uygun enzim derişiminin belirlenmesinde 0,25, 0,5, 1,0, 1,5 ve 2 mg/mL enzim derişimlerinde immobilizasyonlar yapılmıştır.

Desteğe bağlanan lipaz miktarı, gram desteğe bağlanan lipazın immobilizasyon sırasında ortama eklenen toplam lipaz miktarına oranı (%) şeklinde verilmiştir.

3.2.8. Protein Tayini

Protein tayini için Lowry ve ark.(1951) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Bunun için içerikleri bildirilen A, B ve C çözeltileri hazırlanmıştır.

1) Çözelti A: Bu çözelti 20 g Na_2CO_3, 4 g NaOH saf suda birlikte çözülerek son hacim 1 L'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
2) Çözelti B: 0,5 g $CuSO_4.5H_2O$, % 1'lik sodyum sitrat çözeltisinde çözülerek son hacim aynı çözelti ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
3) Çözelti C: 50 mL A çözeltisi ile 1 mL B çözeltisi karıştırılarak hazırlanmıştır. (Kullanılacağı zaman hazırlanmasına dikkat edilmiştir.)
4) Folin-Ciocalteu çözeltisi: Folin-Ciocalteu saf su ile 1:2 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır.
5) Standart protein çözeltisi: 100 mL'de 3,95 mg sığır albümini olacak şekilde % 0,9'luk NaCl çözeltisi ile hazırlanmıştır.
6) Standart protein eğrisinin çizimi: 8 adet deney tüpü alınarak tüplere sırasıyla 0,0 50,0, 100,0, 125,0, 250,0, 500,0, 750,0 ve 1000,0 μL olacak şekilde standart protein çözeltisinden konulmuştur. Her tüp içeriğinin hacmi serum fizyolojik ile 1 mL'ye tamamlanmış, her tüpe 5 mL C çözeltisi ilave edilmiştir. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra her tüpe 1:2 oranında seyreltilmiş Folin-Ciocalteu çözeltisinden 0,5 mL eklenmiştir. 30 dakika oda sıcaklığında bekletilip tüp içeriklerinin absorbansları köre karşı 750 nm'de okunmuştur, bu değerler derişime karşı grafiğe geçirilmiştir. Örneklerin protein içerikleri aynı yöntemle standart protein grafiği kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.2.9. Serbest ve İmmobilize *Pseudomonas sp.* ve Serbest ve İmmobilize *Mucor miehei* Lipazlarının Karakterizasyonu

Lipazın desteğe en iyi bağlandığı immobilizasyon koşulları belirlendikten sonra immobilize lipazın maksimum aktivite gösterdiği koşullar ve bu koşullardaki kinetik parametreleri belirlenmiştir.

- Serbest ve immobilize lipaz için optimum pH'nın belirlenmesinde pH 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 ve 9,0' da aktiviteler ölçülmüştür.
- Serbest ve immobilize lipaz örnekleri için en uygun tampon derişiminin belirlenmesinde optimum pH'da 25, 50, 75 ve 100 mM tampon derişiminde lipaz aktivitesi ölçülmüştür.
- Serbest ve immobilize lipaz örnekleri için optimum sıcaklığın belirlenmesi için 20, 25, 30, 35, 40, 50 ve 60 ºC'de lipaz aktivitesi ölçülmüştür. Aşağıda verilen Arrhenius eşitliği kullanılarak serbest ve immobilize lipazların aktivasyon enerjileri hesaplanmıştır.

$$V=k.e^{-Ea/RT} \quad \text{(Arrhenius eşitliği)}$$

V; reaksiyon hızı, E_a; aktivasyon enerjisi;R gaz sabiti, k bir katsayısıdır. Bu denklem;

$$\ln V = \ln k - Ea/RT$$

şeklinde yazılırsa, InV ile 1/T arasında çizilen grafikten aktivasyon enerjisi bulunmuştur.

- Belirlenmiş olan optimum koşullarda, 0,1-16 mM p-nitrofenilpalmitat derişimleri için serbest ve immobilize lipaz aktiviteleri ölçülmüştür. Maksimum aktivite (V_{max}) ve Michaelis-Menten sabitinin (K_m), grafiksel değerlendirilmesinde, 1/V'ye karşı 1/[S] değerlerinin çizilmesi ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği kullanılmıştır. Ayrıca serbest ve immobilize lipazlar için geri dönüşüm sayısı($k_{cat}=V_{max}/[E]_T$) ve katalitik etkinlik (kcat/Km) hesaplanmıştır.

- Serbest ve immobilize lipaz örneklerinin termal kararlılığının belirlenebilmesi için, serbest ve immobilize lipazlar maksimum aktivete gösterdikleri sıcaklıkta ve 60 ºC'de belirli sürelerde bekletildikten sonra kalan aktiviteleri ölçülmüştür. Serbest ve immobilize lipaz örneklerinin yarı ömrü ($t_{1/2}$), aşağıdaki matematiksel eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\ln V = \ln V_0 - k_i t$$

V_0 : Başlangıçtaki enzim aktivitesi; V: t süre sonunda ölçülen aktivite k_i: 1. dereceden inaktivasyon sabiti.

- Serbest ve immobilize lipazların depolama kararlılığının belirlenmesinde lipaz örnekleri 5 ºC ve oda sıcaklığında bekletilerek belirli aralıklarla belirli günlerde kalan aktivitesi ölçülmüştür.

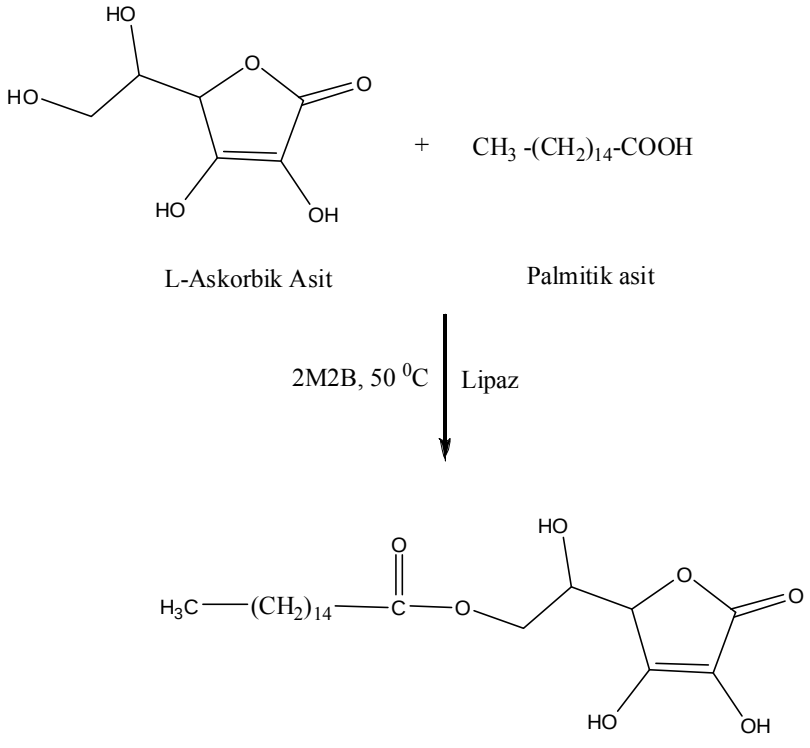
3.2.10. İmmobilize *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* Lipazlarının Hidrolitik Aktiviteleri Açısından Tekrar Kullanım Kararlılıklarının Belirlenmesi

İmmobilize lipazların tekrar kullanımı ile ilgili çalışmalar kesikli reaktörde (1,1x5 cm) ve belirlenen optimum koşullarda yapılmıştır. 50 mg immobilize lipaz enzimi üzerine 1 mL sitrat tamponu (50 mM pH:6,0) ve 1 mL p-NPP substrat çözeltisi ilave edilmiştir. Reaksiyon 5 dakika sonra 2 mL 0,5 N Na_2CO_3 ilavesi ile durdurulmuştur. Kolon musluğu açılarak reaksiyon karışımı immobilize enzimden ayrılmış ve absorbansı 410 nm'de okunmuştur. İmmobilize enzim 5 mL tampon ile yıkandıktan sonra üzerine yeniden tampon ve substrat çözeltisi yüklenmiştir. Bu işlemler 25 kez tekrarlanmıştır.

3.3. İmmobilize *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* Lipazlarının L-Askorbil Palmitat Sentezi İçin Kullanılması

3.3.1. L-Askorbil Palmitat Sentezi

L-Askorbil palmitat sentezi için esası literatürde Yan ve ark., (1999) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. 0,1 mmol (17,6 mg) C vitamini üzerine 0,3 mmol (76,8 mg) palmitik asit, 25 mg/mL moleküler elek ve 1 mL 2-metil-2-butanol (2M2B) eklenmiştir. Reaksiyon 25 mg immobilize lipazın eklenmesiyle 50 ºC'de başlatılmıştır. Reaksiyon karışımından 24 saat sonunda alınan 10 µL örnek HPLC ile C18 kolonu (0,46 x 25 cm) kullanılarak 245 nm'de analiz edilmiştir. Hareketli faz olarak akış hızı 0,5 mL/dk olan ve pH'sı fosforik asit ile 3'e ayarlanmış asetonitril/kloroform/metanol/su (%40/40/10/10,v/v/v/v) karışımı kullanılmıştır. Analiz boyunca kolon sıcaklığı 40 ºC'de sabit tutulmuştur.



Şekil 3.8. Lipaz tarafından katalizlenmiş L-6-Askorbil palmitat sentezi.

3.3.2.İmmobilize *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* Lipazları ile L-Askorbil Palmitat Sentezinde Optimum Koşulların Belirlenmesi

L-Askorbil palmitat sentezinde maksimum ürün verimine ulaşabilmek için reasiyon şartları aşağıdaki şekilde optimize edilmiştir.

- Sentez için optimum su miktarının belirlenmesinde reaksiyon ortamının su içeriği reaksiyon hacminin yüzde 0-10 arasında değiştirilmiştir.
- Sentez sırasında açığa çıkan suyun tutulması için kullanılan moleküler elek miktarının belirlenmesinde belirlenen optimum su miktarında reaksiyon ortamının moleküler elek içeriği 0-100 mg/mL arasında değiştirilmiştir.
- Sentez için optimum sıcaklığın belirlenmesinde belirlenen optimum su ve moleküler elek miktarlarında reaksiyon ortamının sıcaklığı 40-60 ºC arasında değiştirilmiştir.
- Sentez için optimum zamanın belirlenmesinde optimum koşullarda reaksiyon zamanı 12-48 saat arasında değiştirilmiştir.
- Sentez için optimum enzim miktarının belirlenmesinde belirlenen optimum koşullarda enzim miktarı 10-100 mg/mL arasında değiştirilmiştir.

L-Askorbil palmitat veriminin hesaplanmasında ise aşağıda verilen formülden yararlanılmıştır.

$$\text{Verim (\%)} = \left(1 - \frac{[\text{C vitaminin reaksiyona girmeden kalan miktarı}]}{[\text{C vitamininin başlangıç miktarı}]}\right) \times 100$$

C vitamininin reaksiyona girmeden kalan miktarı HPLC kullanılarak çizilen standart C vitamini grafiğinden hesaplanmıştır.

3.3.3. L-Askorbil Palmitat Sentezi İçin İmmobilize *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* Lipazlarının Tekrar Kullanım Kararlılıklarının Belirlenmesi

İmmobilize lipaz örneklerinin L-Askorbil palmitat sentezi için tekrar kullanım çalışmaları belirlenen optimum koşullarda gerçekleştirilmiştir. 1 mmol C vitamini (176 mg), 3 mmol palmitik asit (768 mg) ve 500 mg moleküler elek 20 mL hacminde kapaklı polipropilen tüp içerisine ilave edilmiş ve üzerine 10 mL 2M2B eklenmiştir. Reaksiyon 500 mg immobilize lipazların ilavesiyle 50 ºC'de başlatılmıştır. 24 saat reaksiyon süresi sonunda reaksiyon karışımından alınan 100 uL'lik örnek HPLC ile bölüm 3.3.1'de anlatıldığı şekilde analiz edilmiştir. İmmobilize lipaz enzimi tekrar kullanım için reaksiyon ortamından süzülerek ayrılmış ve 10 mL aseton ile yıkandıktan sonra kuruyuncaya kadar soğutmalı inkübatörde 5 ºC'de bekletilmiştir. Bu işlemler 10 kullanım boyunca tekrarlanmıştır.

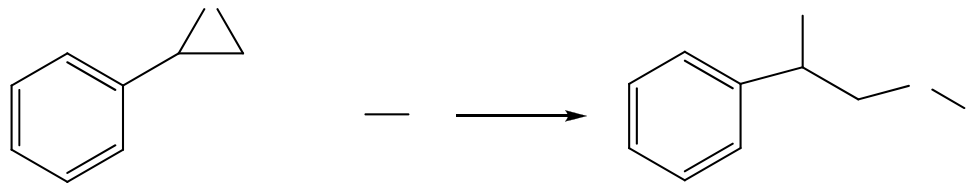
3.3.4. L-Askorbil Palmitatın Saflaştırılması

L-Askorbil palmitatın saflaştırılmasında Yan ve ark. (1999) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. 24 saat reaksiyon süresi sonunda immobilize enzim ve moleküler elek ortamdan süzülerek ayrıldıktan sonra, çözücü vakum altında uzaklaştırılmıştır. Palmitik asit, C vitamini ve askorbil palmitat içeren katı karışımdan reaksiyona girmeyen yağ asidleri hekzan ile uzaklaştırılmıştır. Elde edilen reaksiyona girmemiş C vitamini, palmitik asit ve oluşan ürünü içeren katı karışımdan reaksiyona girmeyen C vitamininin uzaklaştırılması amacıyla karışım su ile yıkanmış, reaksiyona girmeyen yağ asitlerini uzaklaştırmak amacıyla arta kalan karışım 60 mL n-hekzan ile yıkanmıştır. Geriye kalan askorbil palmitat etanol ile çözüldükten sonra etanol fazı vakum altında uzaklaştırılarak tekrar kristallendirilmiştir. Elde edilen ürünün karakterizasyonu FT-IR ve NMR spektrofotometreleri ile yapılmıştır.

3.4. İmmobilize *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* Lipazları ile Enantiyosaf Amino Alkol Sentezi

3.4.1. Rasemik Amino Alkollerin Non-Enzimatik Sentezi

Rasemik amino alkollerin enzimatik olmayan sentezinde çıkış maddesi olarak rasemik sitiren oksit ve 6 tane primer amin (metil, etil, propil, allil, butil ve hekzil amin) kullanılmıştır. 0,02 mol rasemik sitiren oksit üzerine 0,025 mol primer amin ilave edilmiş ve 12 saat boyunca oda sıcaklığında reaksiyona sokulmuştur (Şekil 3.9). Reaksiyon süresi sonunda reaksiyona girmeyen aşırı primer aminin uzaklaştırılması amacıyla karışım 10 mL saf su ile yıkanmıştır ve ürün Na_2SO_4 üzerinde kurutulmuştur. Elde edilen rasemik amino alkollerin karakterizasyonu FT-IR ve NMR spektrofotometreleri ile yapılmıştır.

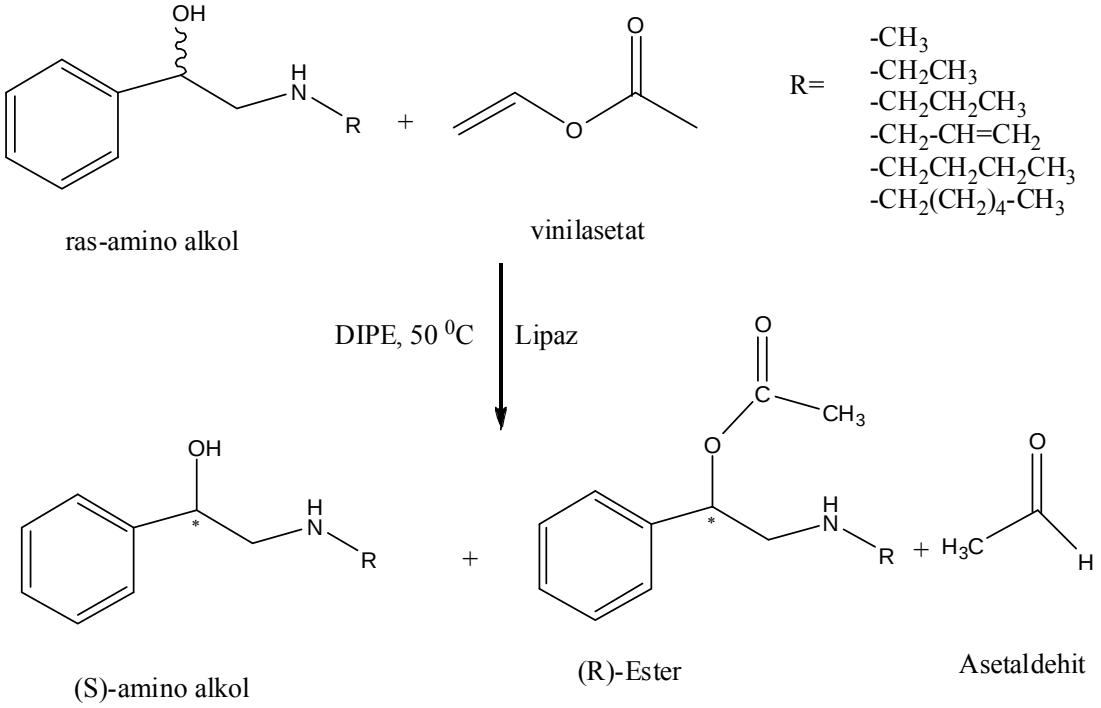


Şekil 3.9. Rasemik Amino alkollerin enzimatik olmayan sentezi.

3.4.2.Rasemik Amino Alkollerin Kinetik Rezolusyonu İçin İmmobilize *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* Lipazlarının Kullanılması

800 µL DIPE üzerine 100 µL derişimi 1M olacak şekilde DIPE içerisinde hazırlanmış ras aminoalkol çözeltisi ve 100 µL derişimi 1 M olacak şekilde yine DIPE içerisinde hazırlanmış vinilasetat çözeltisi ilave edilmiştir. Karışım 50 ºC'de su banyosunda 5 dakika boyunca inkübe edildikten sonra, reaksiyon 10 mg immobilize lipaz enzimin ilavesi ile başlatılmıştır. Reaksiyon boyunca karışım 100 rpm'de

çalkalayıcı su banyosunda çalkalanmıştır. 2 saat reaksiyon süresi sonunda reaksiyon karışımından alınan 100 µL örnek asetonitril/su (20/80, v/v) karışımı ile 500 µL'ye seyreltilmiş ve HPLC ile Shodex ORPak CDC kiral kolonu (4,6 x 150 mm) kullanılarak 220 nm'de analiz edilmiştir. Hareketli faz olarak akış hızı 0,25 mL/dk olan %1,4 asetik asit ve %0,7 trietilamin içeren asetonitril/su karışımı (20/80, v/v) kullanılmış ve kolon sıcaklığı 25 ºC'de sabit tutulmuştur.



Şekil 3.10.Lipaz tarafından katalizlenmiş rasemik amino alkolün kinetik rezolusyonu

3.4.3.İmmobilize *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* Lipazları Kullanımı ile Rasemik Amino Alkollerin Kinetik Rezolusyonu İçin Optimum Koşulların Belirlenmesi

Rasemik amino alkollerin kinetik rezolusyonunda maksimum verime ulaşabilmek için reasiyon şartları aşağıdaki şekilde optimize edilmiştir.

- Sentez için optimum su miktarının belirlenmesinde reaksiyon ortamının su içeriği reaksiyon hacminin yüzde 0-10'u arasında değiştirilmiştir.

- Sentez için optimum sıcaklığın belirlenmesinde belirlenen optimum su miktarında reaksiyon ortamının sıcaklığı 40-60 ºC arasında değiştirilmiştir.
- Sentez için optimum vinil asetat/amino alkol molar oranını belirlemek için belirlenen optimum su ve sıcaklık değerlerinde vinil asetat/ amino alkol molar oranı (1/1, 1,5/1, 2/1) oranında değiştirilmiştir.
- Enzim miktarının optimizasyonu için reaksiyonda kullanılan immobilize enzim miktarı belirlenen optimum koşullarda 10-50 mg arasında değiştirilmiştir.
- Reaksiyon için uygun organik çözücü ortamının bulunması amacıyla dietileter (DEE) , diisopropil eter (DIPE), tert-butil metil eter (TBME), dioksan (DIO) ve tetrahidro furan (THF) organik çözücüleri kullanılmıştır.

3.4.4.İmmobilize *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* Lipazları ile Rasemik Amino Alkollerin Kinetik Rezolusyonu İçin Ürün Verimi ve Enantiyomerik Aşırılıkların Belirlenmesi

760 µL TBME üzerine 40 µL distile su, 100 µL derişimi 1 M olacak şekilde TBME içerisinde hazırlanmış ras-amino alkol çözeltisi ve 100 µL derişimi 1,5 M olacak şekilde yine TBME içerisinde hazırlanmış vinilasetat çözeltisin ilave edilmiştir. Karışım 50 ºC'de su banyosunda 5 dakika boyunca inkübe edildikten sonra, reaksiyon 30 mg immobilize lipaz enzimin ilavesi ile başlatılmıştır. Reaksiyon boyunca karışım 100 rpm'de çalkalayıcılı su banyosunda çalkalanmıştır. Belirli zaman aralıklarında (15, 30, 60,120 ve 240 dakika) reaksiyon karışımından alınan 100 µL örnek asetonitril/su (20/80 v/v) karışımı ile 500 µL'ye seyreltilmiş ve HPLC ile Shodex ORPak CDC kiral kolonu kullanılarak bölüm 3.4.2.'de anlatıldığı şekilde analiz edilmiştir.

Oluşan (R) esterin ve (S) alkolün enantiyomerik aşırılıkları aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$(\%)ee_{ester} = \frac{[R]_{ester} - [S]_{ester}}{[R]_{ester} + [S]_{ester}} \times 100$$

ee_{ester}= Esterin enantiyomerik aşırılığı, $[R]_{ester}$= (R) enantiyomerinin konsantrasyonu, $[S]_{ester}$= (S) enantiyomerinin konsantrasyonunu ifade etmektedir.

$$(\%)\, ee_{alkol} = \frac{[S]_{alkol} - [R]_{alkol}}{[S]_{alkol} + [R]_{alkol}} \times 100$$

ee_{alkol}= Alkolün enantiyomerik aşırılığı, $[S]_{alkol}$= (S) enantiyomerinin konsantrasyonu $[R]_{alkol}$= (R) enantiyomerinin konsantrasyonunu ifade etmektedir.

Ürün verimi ise aşağıda verilen eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Verim}\,(\%) = \left(1 - \frac{[\text{Amino alkolün reaksiyona girmeden kalan miktarı}]}{[\text{Amino alkolün başlangıç miktarı}]}\right) \times 100$$

Kullanılan katalizörün enantiyoseçiciliğini ifade eden enantiyomerik oranın (E) hesaplanmasında Faber ve çalışma grubu tarafından yaratılan ve internet üzerinden ücretsiz olarak dağıtılan, E değerini ürünün ve substratın enantiyomerik aşırılığı ve ürün verimini kullanarak hesaplayan bir bilgisayar programından yararlanılmıştır (http://www.orgc.tugraz.at).

3.4.5.Enantiyosaf Amino Alkol Sentezi İçin İmmobilize *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* Lipazlarının Tekrar Kullanım Kararlılığının Belirlenmesi

8 mL TBME üzerine 1 mL 1-fenil-2-(etilamino) etanol (8,5 M) çözeltisi ve 1 mL vinilasetat (10,5 M) ilave edilmiş ve reaksiyon 1 g immobilize lipazın eklenmesi ile 50 ºC'de başlatılmıştır. 4 saat reaksiyon süresi sonunda immobilize enzim reaksiyon ortamından süzülerek ayrılmış ve TBME ile yıkandıktan sonra 5 ºC'de soğutmalı inkübatörde kurutulmuştur. Bu işlemler 10 kullanım boyunca tekrarlanmıştır.

3.5. İmmobilize *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* Lipazlarının Rasemik Mandelik Asitin Asimetrik Amidasyonu İçin Kullanılması

10 mg immobilize lipaz enzimi üzerine 800 µL DIPE, 100 µL DMSO içerisinde hazırlanmış 0,5 M rasemik mandelik asit ve 100 µL saf su içerisinde hazırlanmış 1M amonyumbikarbonat ilave edilmiştir. 24 saat reaksiyon süresi sonunda reaksiyon karışımından alınan 100 µL örnek HPLC ile kiral ORPak CDC kolonu ile 220 nm'de analiz edilmiştir. Hareketli faz olarak akış hızı 0,4 mL/dk olan %1 asetik asit içeren asetonitril/su karışımı (20/80 v/v) kullanılmıştır.

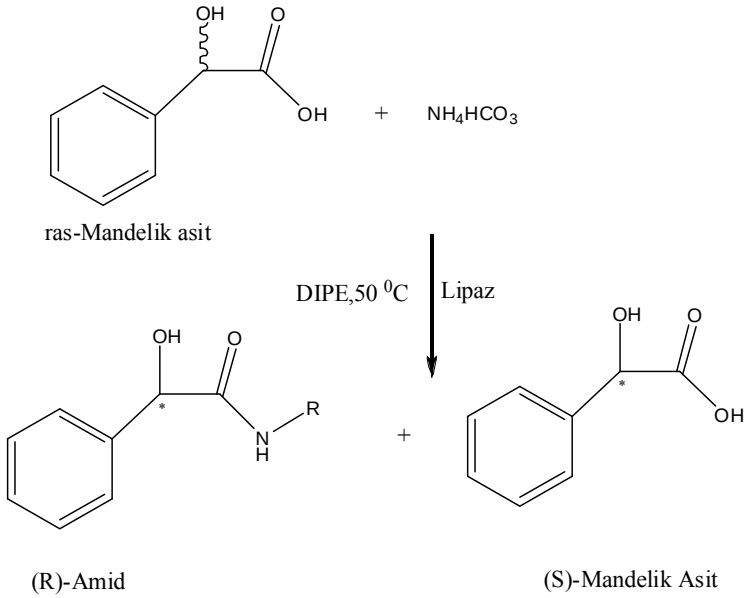
3.5.1. Rasemik Mandelik Asitin Asimetrik Amidasyonu İçin Optimum Koşulların Belirlenmesi

Rasemik mandelik asitin kinetik rezolusyonunda maksimum verime ulaşabilmek için reasiyon şartları aşağıdaki şekilde optimize edilmiştir.

- Sentez için uygun immobilize lipaz örneğinin belirlenmesinde GIPSL, PIPSL, GIMML ve PIMML örnekleri asimetrik amidasyon reaksiyonu için kullanılmıştır.
- Sentez için optimum sıcaklığın belirlenmesinde reaksiyon ortamının sıcaklığı 40-60 ºC arasında değiştirilmiştir.
- Sentez için optimum amonyumbikarbonat/mandelik asit oranının belirlenmesi için belirlenen optimum sıcaklıkta amonyumbikarbonat/mandelik asit oranı 1/1, 1,5/1 ve 2/1 oranında değiştirilmiştir.
- Reaksiyon için uygun organik çözücü ortamının bulunması amacıyla dietileter, diisopropil eter, tert-butil metil eter, dioksan ve tetrahidro furan organik çözücüleri kullanılmıştır.
- Enzim miktarının optimizasyonu için reaksiyonda kullanılan immobilize enzim miktarı 5-50 mg arasında değiştirilmiştir.

3.5.2.Rasemik Mandelik Asitin Asimetrik Amidasyonu İçin Ürün Verimi ve Enantiyomerik Aşırılıkların Belirlenmesi

800 µL TBME üzerine, derişimi 0,5 M olacak şekilde DMSO içerisinde hazırlanmış ras-Mandelik asit çözeltisinden 100 µL ve derişimi 1 M olacak şekilde saf su içerisinde hazırlanmış amonyumbikarbonat çözeltisinden 100 µL ilave edilmiştir. Karışım 50 ºC'de su banyosunda 5 dakika boyunca inkübe edildikten sonra, reaksiyon 10 mg immobilize *Pseudomonas sp.* lipazlarının ilavesi ile başlatılmıştır. Reaksiyon boyunca karışım 100 rpm'de çalkalanmıştır. Belirli zaman aralıklarında (1,2, 4, 8, 16 ve 24 saat) reaksiyon karışımından alınan 100 µL örnek asetonitril/su (20/80 v/v) karışımı ile 500 µL'ye seyreltilmiş ve HPLC ile Shodex ORPak CDC kiral kolonu kullanılarak bölüm 3.2.20'de anlatıldığı şekilde analiz edilmiştir.



Şekil 3.11. Rasemik Mandelik asitin asimetrik amidasyonu.

Oluşan (R) amidin ve (S) asitin enantiyomerik aşırılıkları aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$(\%)ee_{amid} = \frac{[R]_{amid} - [S]_{amid}}{[R]_{amid} + [S]_{amid}} \times 100$$

ee_{amid}= Amidin enantiyomerik aşırılığı, $[R]_{amid}$= (R) enantiyomerinin konsantrasyonu, $[S]_{amid}$= (S) enantiyomerinin konsantrasyonunu ifade etmektedir.

$$(\%)\, ee_{asit} = \frac{[S]_{asit} - [R]_{asit}}{[S]_{asit} + [R]_{asit}} \times 100$$

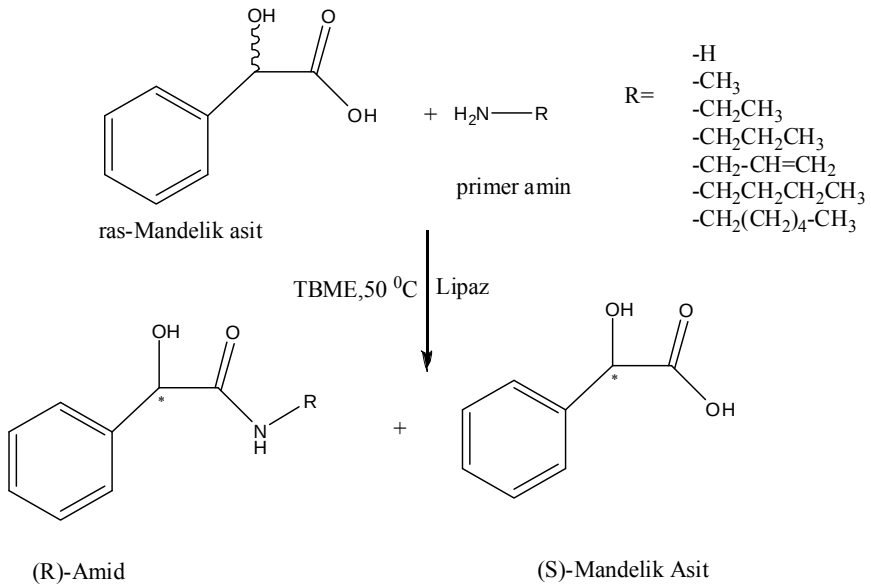
ee_{asit}= Amidin enantiyomerik aşırılığı, $[S]_{asit}$= (S) enantiyomerinin konsantrasyonu, $[R]_{asit}$= (R) enantiyomerinin konsantrasyonunu ifade etmektedir.

Ürün verimi ise aşağıda verilen eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Verim}\,(\%) = \left(1 - \frac{[\text{Mandelik Asidin reaksiyona girmeden kalan miktarı}]}{[\text{Mandelik Asidin başlangıç miktarı}]}\right) \times 100$$

3.5.3.Farklı Primer Aminlerin Mandelik Asidin Asimetrik Amidasyonu İçin Kullanılması

Farklı primer aminlerin asimetrik amidasyon sentezine etkilerini incelemek için metilamin, etilamin, propilamin, allilamin, butilamin ve hekzilamin primer amin kaynağı olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.12. Farklı primer aminler kullanılarak gerçekleştirilen mandelik asitin kinetik rezolusyonu.

3.5.4. Enantiyosaf Mandelamid Sentezi İçin İmmobilize *Pseudomonas sp.* Lipazlarının Tekrar Kullanım Kararlılıklarının Belirlenmesi

8 mL TBME üzerine 1 mL DMSO içerisinde hazırlanmış ras-Mandelik asit (5 mmol, 0,7625 g) ve 1 mL saf su içerisinde amonyumbikarbonat (10 mmol, 0,79 g) ilave edilmiş ve reaksiyon 1 g immobilize *Pseudomonas sp.* lipazlarının eklenmesi ile başlatılmıştır. 24 saat reaksiyon süresi sonunda immobilize enzim reaksiyon ortamından süzülerek ayrılmış ve 10 mL TBME ile yıkandıktan sonra 5 ºC'de soğutmalı inkübatörde kurutulmuştur. Bu işlemler 10 kullanım boyunca tekrarlanmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. BULGULAR

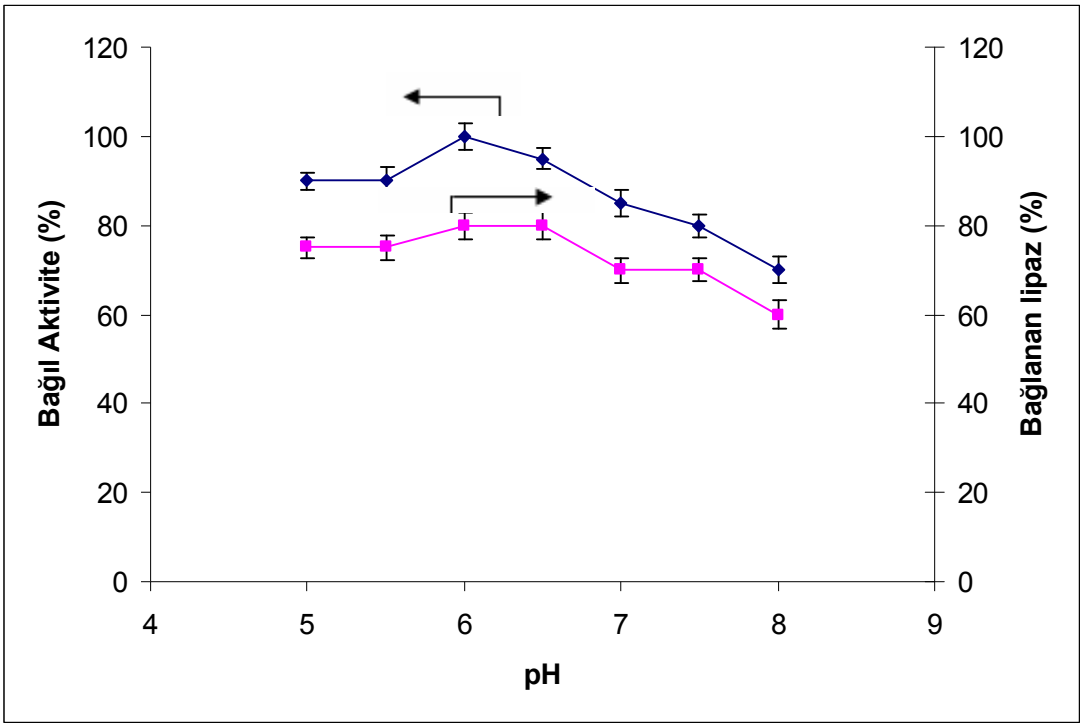
Bu çalışmada *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* lipazlarının aktifleştirilmiş florisile glutaraldehit ve polisüksinimid ara kolu üzerinden immobilizasyonu araştırılmıştır. İmmobilizasyon için optimum koşullar (pH, tampon derişimi, sıcaklık, immobilizasyon süresi ve enzim derişimi) belirlenmiştir. Serbest ve immobilize lipaz örneklerinin karakterizasyonu (optimum pH, tampon derişimi, sıcaklık, kinetik parametreler, termal ve depolama kararlılıkları) lipaz örneklerinin belirlenen optimum koşullarda hidrolitik aktiviteleri ölçülerek yapılmıştır. İmmobilize lipaz örnekleri L-Askorbil palmitat sentezi, rasemik amino alkollerin kinetik rezolusyonu ve rasemik mandelik asitin asimetrik amidasyonunda kullanılarak sentetik aktiviteleri araştırılmıştır. İmmobilize lipaz örnekleri ile gerçekleştirilen L-Askorbil palmitat sentezi, rasemik amino alkolerin kinetik rezolusyonu ve rasemik mandelik asitin asimetrik amidasyonu reaksiyonlarında sentezler optimize edilen reaksiyon koşullarında gerçekleştirilmiştir. Bu araştırma sonuçları aşağıda verilen alt başlıklarda detaylı bir şekilde verilmiştir.

4.1.1.*Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* Lipazlarının Florisile Glutaraldehit ve Polisüksinimid Ara Kolu Üzerinden Kovalent İmmobilizasyonları

4.1.1.1.*Pseudomonas sp.* Lipazının Florisile Glutaraldehit Ara Kolu Üzerinden Kovalent İmmobilizasyonu İçin İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

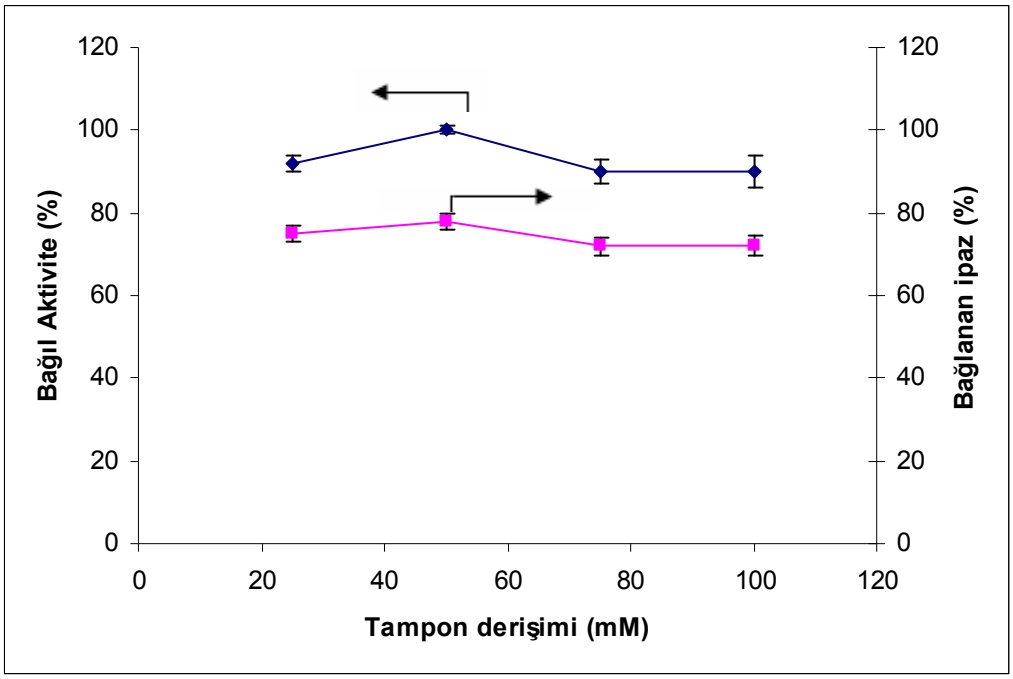
Pseudomonas sp. lipazının florisile glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonunda en uygun bağlanma pH'sının belirlenmesi amacıyla farklı pH'larda immobilizasyon çalışması yapılmış ve immobilize *Pseudomonas sp.* lipazının (GIPSL) aktiviteleri belirlenmiştir. Şekil 4.1'den görüldüğü gibi en yüksek

aktivite ve birim desteğe en yüksek bağlanma oranı 50 mM pH 6,0 sitrat tamponunda immobilize edilen *Pseudomonas sp.* lipazı örneklerinde görülmüştür.



Şekil 4.1.İmmobilizasyon pH'sına bağlı olarak *Pseudomonas sp.* lipazının florisile glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonunda aktivite (♦) ve bağlanma yüzdesindeki (■) değişimler.

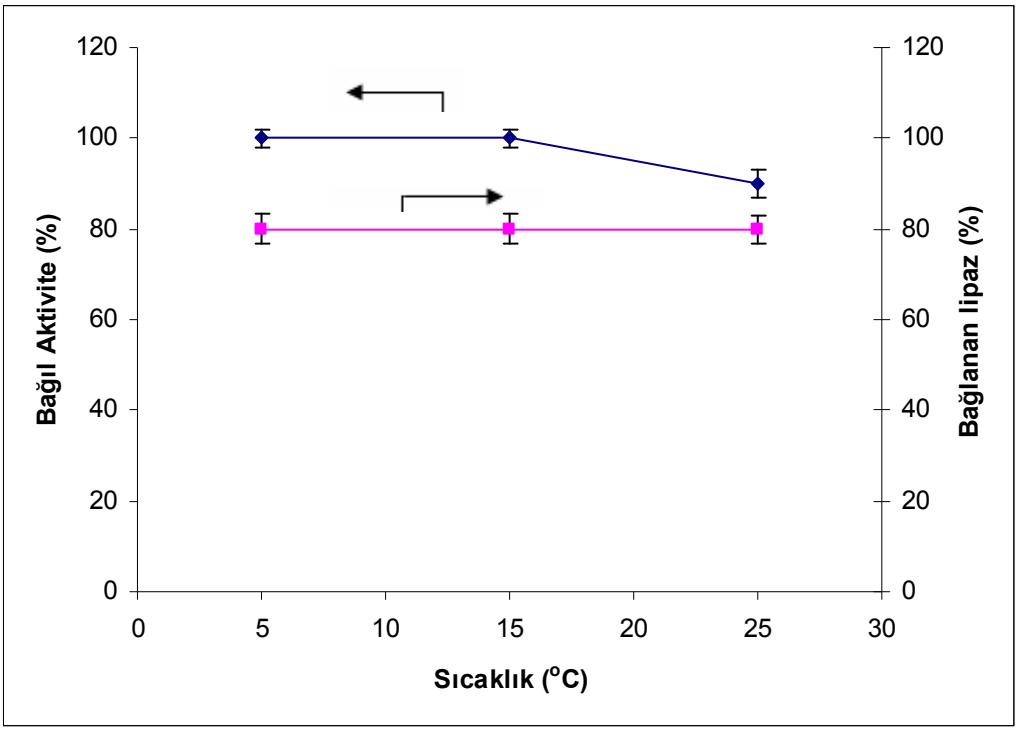
Tampon derişiminin *Pseudomonas sp.* lipazının florisile glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonuna etkisini belirlemek için farklı derişimlerdeki (25-100 mM) sitrat tamponunda immobilizasyon çalışmaları yapılmış ve sonuçlar Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2. *Pseudomonas sp.* lipazının florisile glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonunda immobilizasyon tamponunun derişimindeki değişikliğe bağlı olarak aktivite (♦) ve bağlanma yüzdesindeki (■) değişimler.

En yüksek aktivite 50mM sitrat tamponunda immobilize edilen GIPSL örneklerinde belirlenmiştir. İmmobilizasyon tamponunun derişiminin 75 mM'a çıkartılması ile aktivitede %10 kadar bir azalma olmuş, bu oran tampon derişimi 100 mM'a çıkartıldığında da aynı kalmıştır.

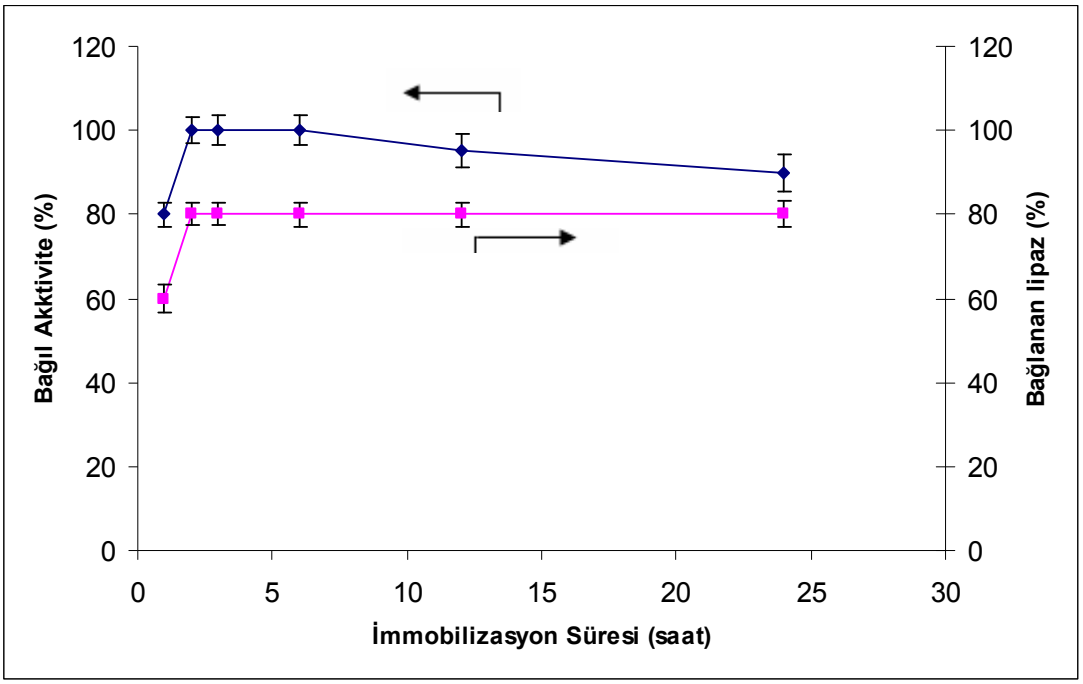
Pseudomonas sp. lipazının florisile glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonunda en uygun bağlanma sıcaklığının belirlenmesi amacıyla 5-25 ºC'de immobilizasyon çalışmaları yapılmıştır.



Şekil 4.3.İmmobilizasyon sıcaklığına bağlı olarak *Pseudomonas sp.* lipazının florisile glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonunda aktivite (♦) ve bağlanma yüzdesindeki (■) değişimler.

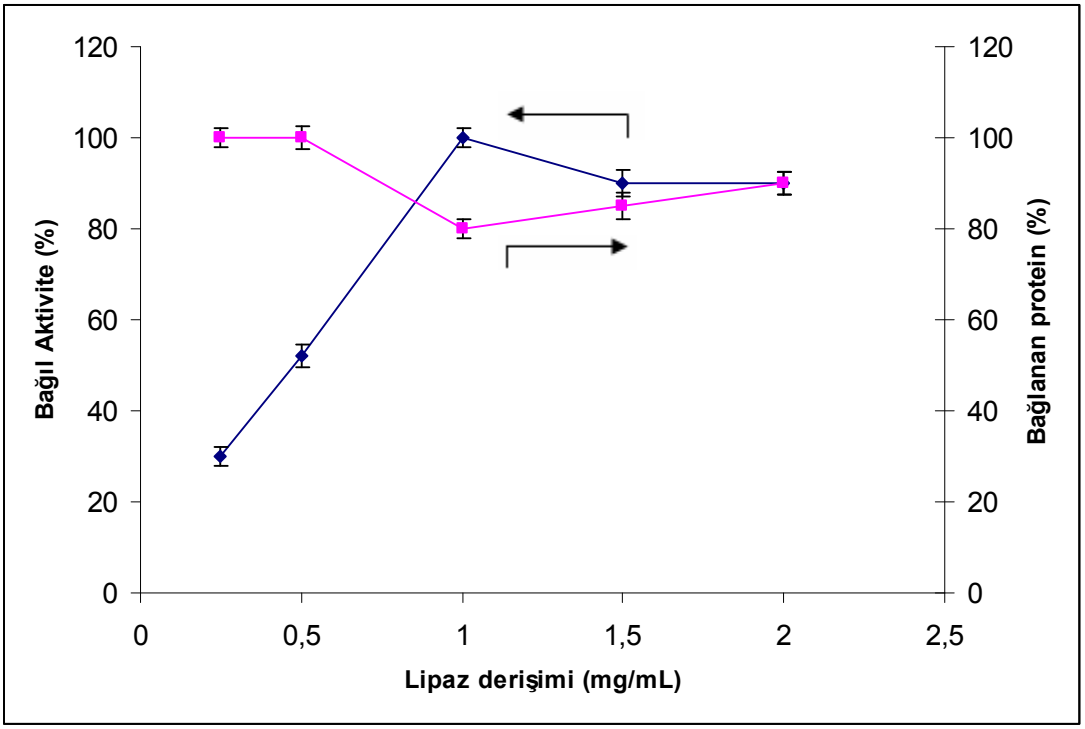
Şekil 4.3'den görüldüğü gibi immobilizasyon sıcaklığının değiştirilmesinin *Pseudomonas sp.* lipazının bağlanma yüzdesinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı ancak 5 veya 15 ºC immobilize edilmiş GIPSL örneklerinin 25 ºC'de immobilize edilmiş karşıtlarına göre daha yüksek aktiviteyi gösterdiği belirlenmiştir.

En uygun immobilizasyon süresinin belirlenmesi amacıyla daha önce belirlenen koşullarda farklı zamanlarda immobilizasyon çalışmaları yapılmıştır. 2 saat immobilizasyon süresi sonunda %80 olarak maksimum bağlanma yüzdesine ulaşılmış ve immobilizasyon süresinin daha da artırılması ile bağlanma yüzdesinde herhangi daha fazla bir artış olmamıştır (Şekil 4.4). Diğer taraftan 3 saatten daha uzun immobilizasyon süresinin GIPSL örneklerinin aktivitesinde azalmaya neden olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.4. *Pseudomonas sp.* lipazının florisile glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonunda immobilizasyon süresine bağlı olarak aktivite (♦) ve bağlanma yüzdesindeki (■) değişimler.

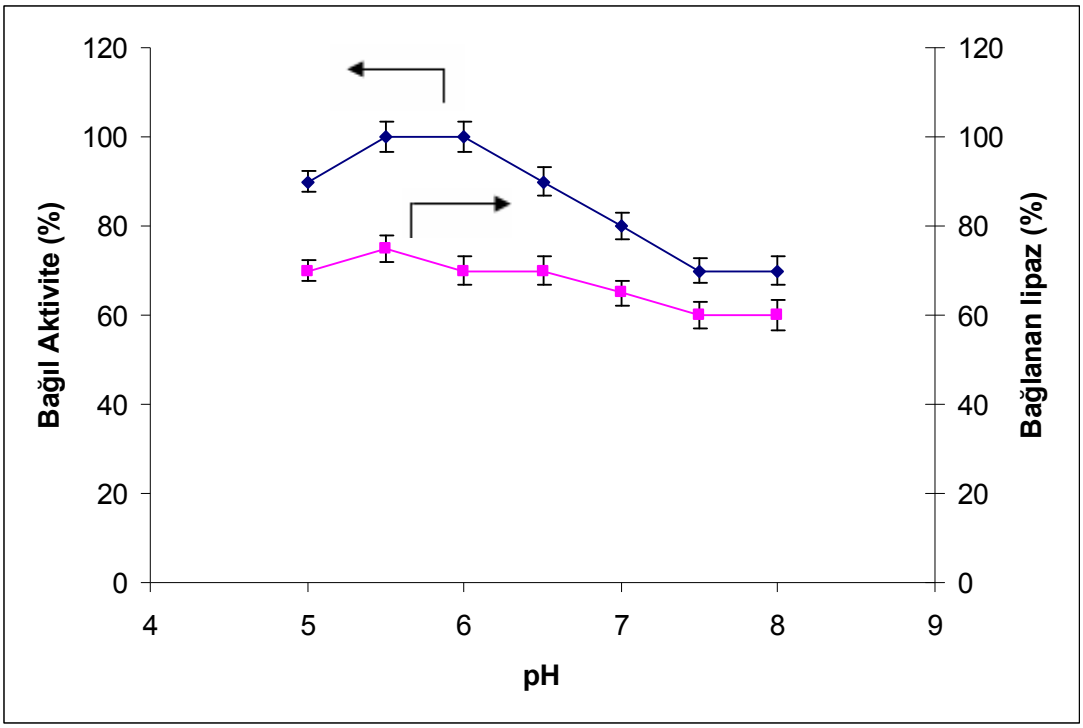
Pseudomonas sp. lipazının florisile glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonunda En uygun enzim derişiminin belirlenmesinde 0,25, 0,5, 1,0, 1,5 ve 2 mg/mL enzim derişimlerinde immobilizasyon çalışmaları yapılmış ve sonuçlar 4.5'de gösterilmiştir. 1g desteğe bağlanan protein miktarları sırasıyla 0,25, 0,5, 1,0, 1,5 ve 2 mg/mL derişimleri için sırasıyla 1, 2, 3,2, 5,1 ve 7,2 mg protein olarak belirlenmiştir. En yüksek spesifik aktiviteye 1 mg/mL derişiminde yapılan immobilizasyon çalışmasında ulaşılmıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. *Pseudomonas sp.* lipazının florisile glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonunda lipaz derişimine bağlı olarak aktivite (♦) ve bağlanma yüzdesindeki (■) değişimler.

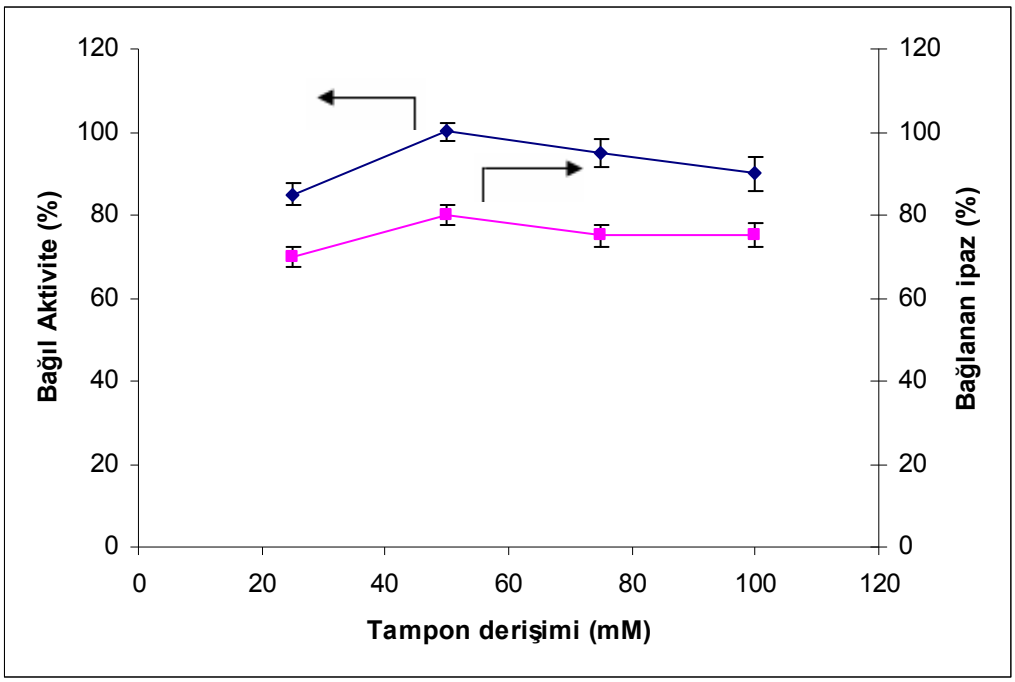
4.1.1.2.*Mucor miehei* Lipazının Florisile Glutaraldehit Ara Kolu Üzerinden Kovalent İmmobilizasyonu İçin İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

Mucor miehei lipazının florisile glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonunda en yüksek aktivite pH 5,5 ve 6,0'da immobilize edilen *Mucor miehei* lipazı (GIMML) örneklerinde belirlenmiştir (Şekil 4.6). İmmobilizasyon pH'sının daha yüksek olduğu immobilizasyonlarda elde edilen immobilize *Mucor miehei* lipazların aktiviteleri düşük bulunmuştur. *Mucor miehei* lipazının florisil desteğine en yüksek bağlandığı pH değeri ise 5,5 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar dikkate alındığında *Mucor miehei* lipazının florisile glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonu için en uygun pH 5,5 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.6.İmmobilizasyon pH'sına bağlı olarak *Mucor miehei* lipazının florisile glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonunda aktivite (♦) ve bağlanma yüzdesindeki (■) değişimler.

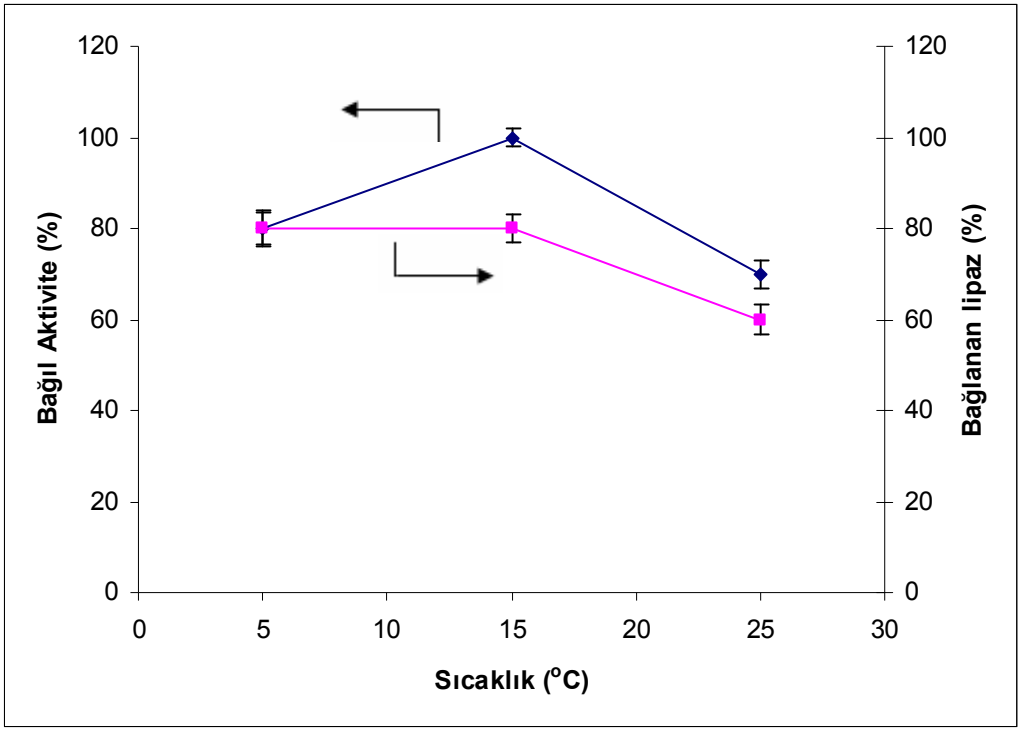
Tampon derişiminin *Mucor miehei* lipazının florisile glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonuna etkisini belirlemek için farklı derişimlerdeki (25-100 mM) pH 5,5 asetat tamounda immobilizasyon çalışmaları yapılmış ve sonuçlar Şekil 4.7'de verilmiştir.



Şekil 4.7.*Mucor miehei* lipazının florisile glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonunda immobilizasyon tamponunun derişimindeki değişikliğe bağlı olarak aktivite (♦) ve bağlanma yüzdesindeki (■) değişimler.

Tampon derişiminin 50 mM olduğu durumunda GIMML örnekleri maksimum aktiviteyi göstermiştir. Tampon derişiminin 50 mM'dan daha yüksek olduğu immobilizasyon çalışmalarında ise aktivitede bir azalmanın olduğu belirlenmiştir.

Mucor miehei lipazının florisile glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonunda en uygun bağlanma sıcaklığının belirlenmesi amacıyla 5-25 ºC'de immobilizasyon çalışmaları yapılmıştır.

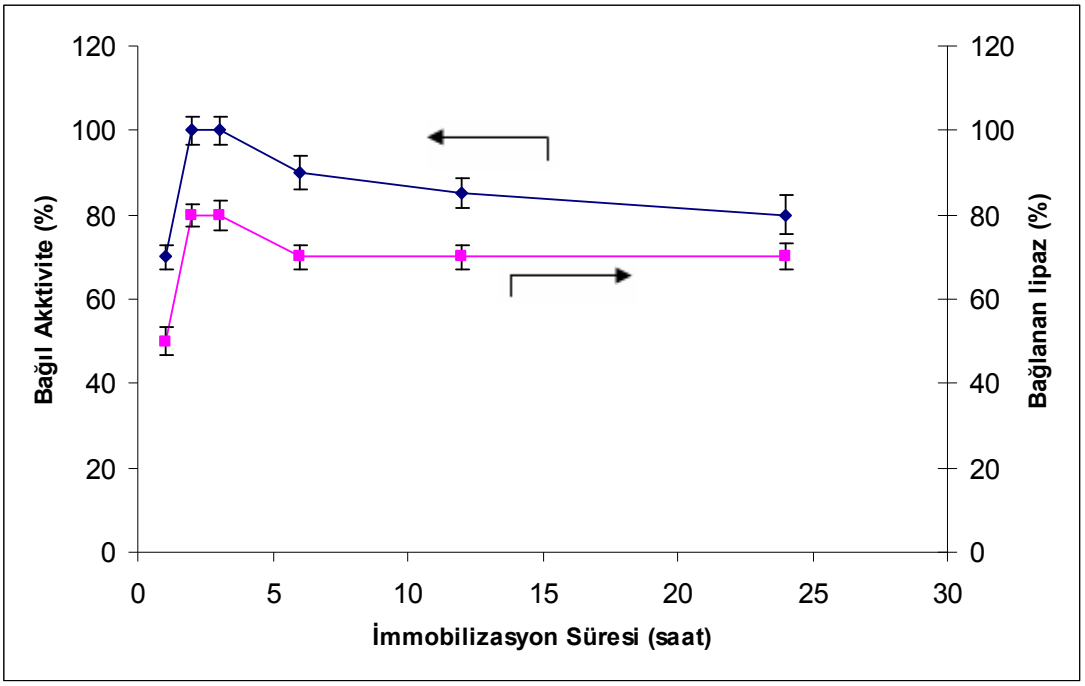


Şekil 4.8. İmmobilizasyon sıcaklığına bağlı olarak *Mucor miehei* lipazının florisile glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonunda aktivite (♦) ve bağlanma yüzdesindeki (■) değişimler.

Şekil 4.8'den görüldüğü gibi immobilizasyon sıcaklığının 5 ºC'den 15 ºC'ye çıkartılması durumunda GIMML örnekleri maksimum aktivite göstermiştir. İmmobilizasyon sıcaklığının daha da artırılmasının GIMML örneklerinin aktivitesinde bir azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. 5 ve 15 ºC'de yapılan immobilizasyon çalışmalarında ise *Mucor miehei* lipazının florisile bağlanma yüzdesinin maksimum olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar dikkate alındığında *Mucor miehei* lipazının florisile glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonu için en uygun immobilizasyon sıcaklığı 15 ºC olarak belirlenmiştir.

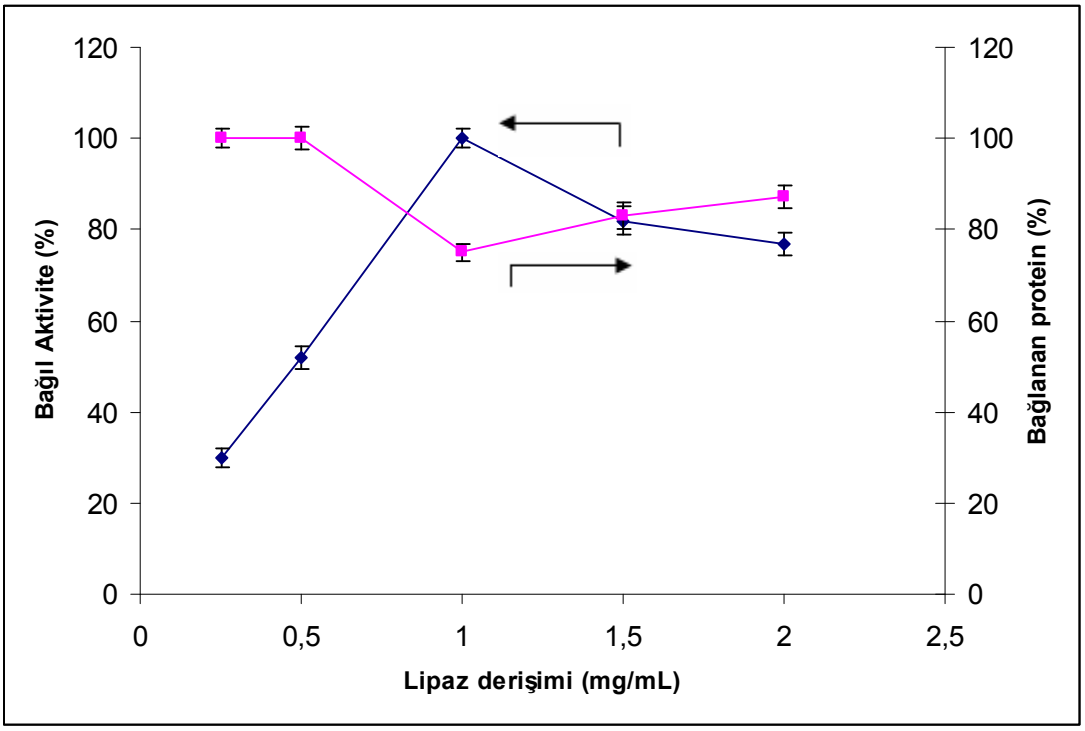
En uygun immobilizasyon süresinin belirlenmesi amacıyla daha önce belirlenen koşullarda farklı zamanlarda immobilizasyon çalışmaları yapılmıştır. İmmobilizasyon süresinin 1 saatten 2 saate çıkartılması ile GIMML örnekleri için maksimum aktivite değerine ulaşılmıştır (Şekil 4.9). 3 saatten daha fazla immobilizasyon sürelerinin ise GIMML örneklerinin aktivitelerinde azalmaya neden

olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, en yüksek bağlanma yüzdesinin 2 ve 3 saatlik immobilizasyon çalışmalarında olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.9.*Mucor miehei* lipazının florisile glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonunda immobilizasyon süresine bağlı olarak aktivite (♦) ve bağlanma yüzdesindeki (■) değişimler.

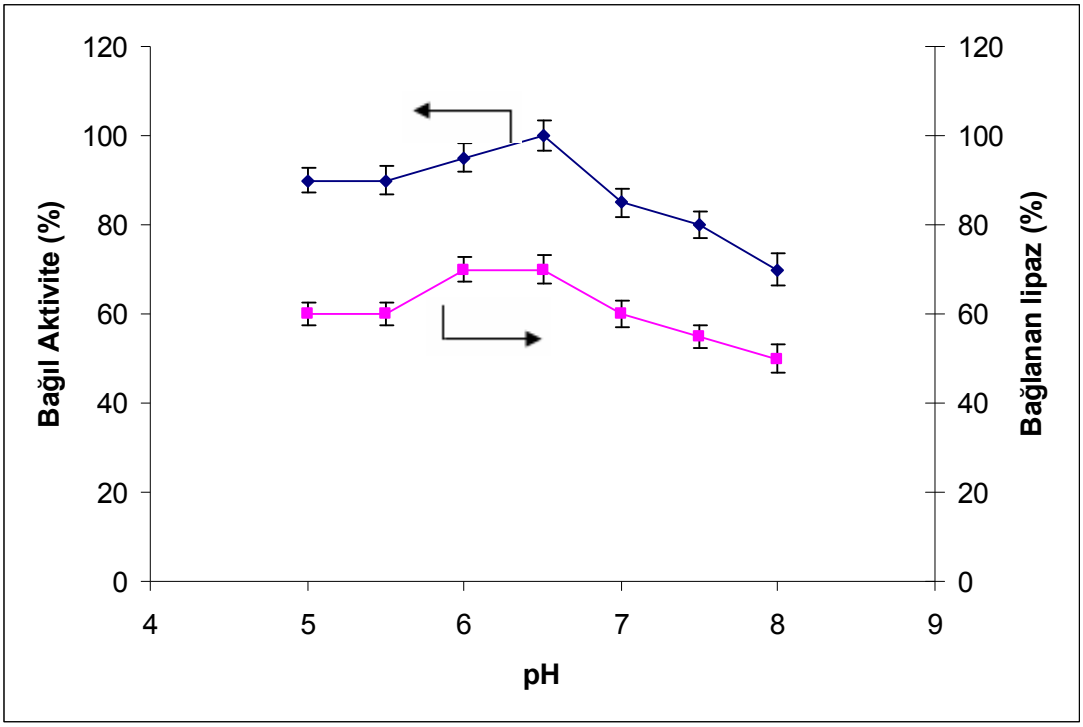
Şekil 4.10 *Mucor miehei* lipazının florisile glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonunda kullanılan protein derişimine bağlı olarak aktivite ve bağlanma yüzdesindeki değişimleri göstermektedir. En yüksek bağlanma yüzdeleri 0,25 ve 0,5 mg/mL enzim derişimlerinde elde edilmesine rağmen en yüksek spesifik aktivite 1 mg/mL derişiminde immobilize edilen *Mucor miehei* örneklerinde belirlenmiştir.



Şekil 4.10.*Mucor miehei* lipazının florisile glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonunda kullanılan lipaz derişimine bağlı olarak aktivite (♦) ve bağlanma yüzdesindeki (■) değişimler.

4.1.1.3.*Pseudomonas sp.* Lipazının Florisile Polisüksinimid Ara Kolu Üzerinden Kovalent İmmobilizasyonu İçin İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

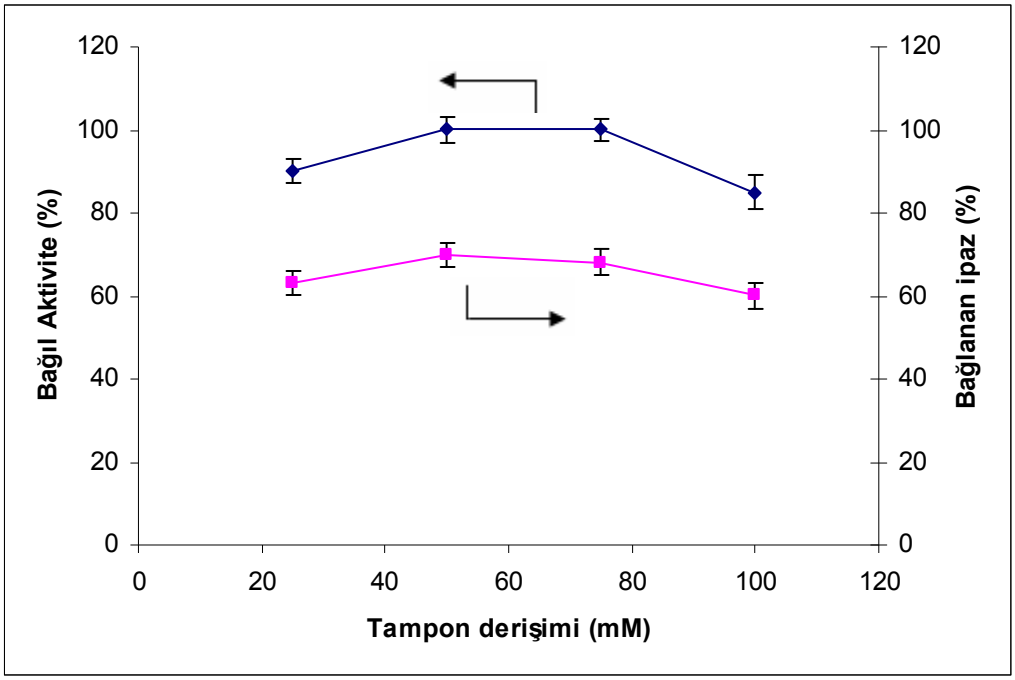
Pseudomonas sp. lipazının florisile polisüksinimid ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonunda bağlanma pH'sına bağlı olarak bağıl aktivitenin ve bağlanma yüzdesinin değişimi Şekil 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.11.İmmobilizasyon pH'sına bağlı olarak *Pseudomonas sp.* lipazının florisile polisüksinimid ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonunda aktivite (♦) ve bağlanma yüzdesindeki (■) değişimler.

En yüksek aktivite 50 mM pH 6,5 fosfat tamponu varlığında immobilize edilen *Pseudomonas sp.* lipazı (PIPSL) örneklerinde görülmüştür. İmmobilizasyon tamponu olarak 50 mM pH 8,0 fosfat tamponu kullanıldığında ise immobilize *Pseudomonas sp.* lipazının maksimum aktivitesinin %70'ini gösterdiği belirlenmiştir. En yüksek bağlanma yüzdesine ise pH 6,0 sitrat ve 6,5 fosfat tamponunda yapılan immobilizasyon çalışmalarında ulaşılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde *Pseudomonas sp.*lipazının florisile polisüksinimid ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonunda immobilizasyon pH'sı 6,5 olarak belirlenmiştir.

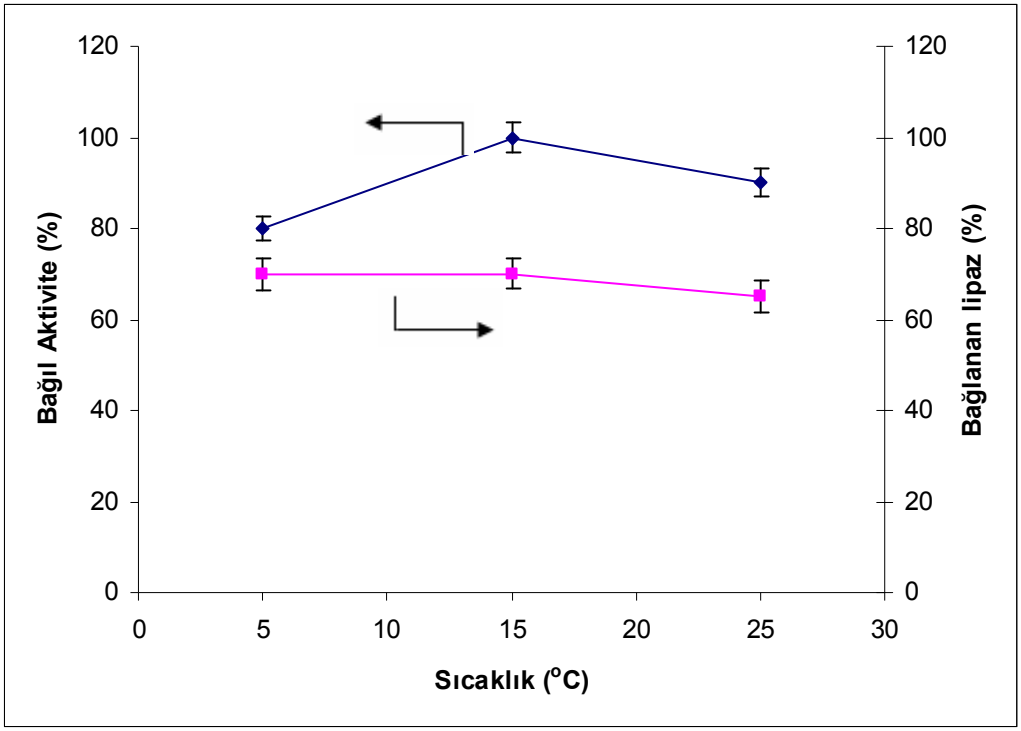
Tampon derişiminin *Pseudomonas sp.* lipazının florisile polisüksinimid ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonuna etkisini belirlemek için farklı derişimlerdeki (25-100 mM) pH 6,5 fosfat tamponu içerisinde immobilizasyon çalışmaları yapılmış ve sonuçlar Şekil 4.12'de verilmiştir.



Şekil 4.12.*Pseudomonas sp.* lipazının florisile polisüksinimid ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonunda immobilizasyon tamponunun derişimindeki değişikliğe bağlı olarak aktivite (♦) ve bağlanma yüzdesindeki (■) değişimler.

Şekil 4.12'den görüldüğü gibi en yüksek aktivite gösteren PIPSL örnekleri 50 ve 75 mM pH 6,5 fosfat tamponunda immobilize edilen *Pseudomonas sp.* lipazı örneklerinde belirlenmiştir. Bağlanma yüzdesi dikkate alındığında ise *Pseudomonas sp.* lipazının florisile polisüksinimid ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonu için en uygun tampon derişimi 50 mM olarak belirlenmiştir.

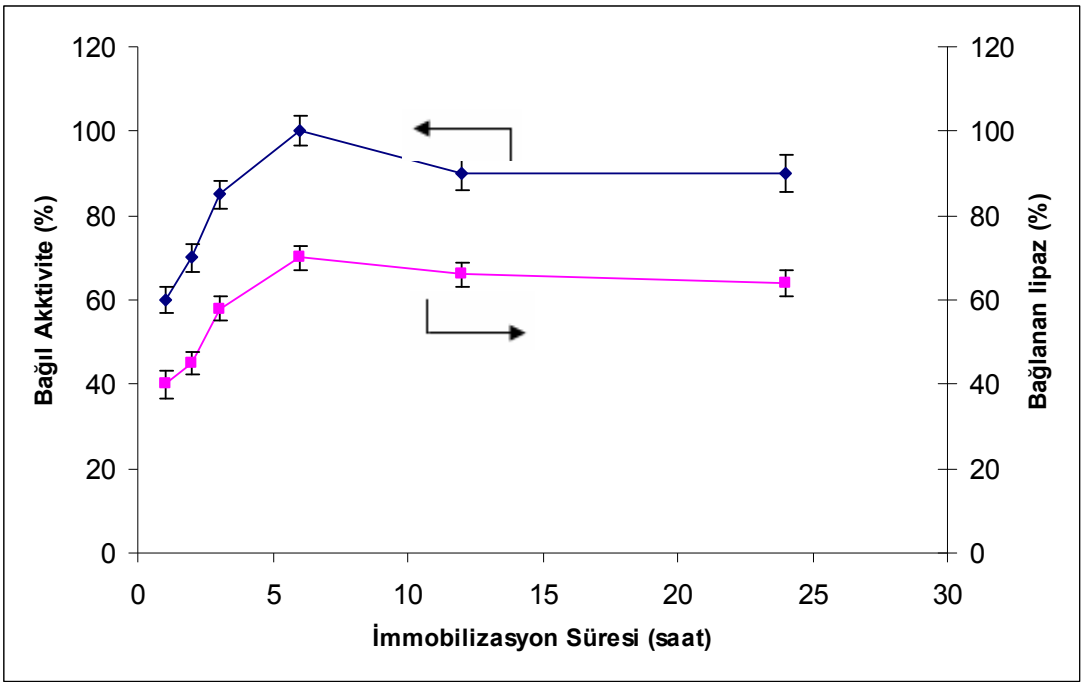
Pseudomonas sp. lipazının florisile polisüksinimid ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonunda en uygun bağlanma sıcaklığının belirlenmesi amacıyla 50 mM pH 6,5 fosfat tamponu içerisinde, 5-25 ºC'lerde immobilizasyon çalışmaları yapılmıştır.



Şekil 4.13. İmmobilizasyon sıcaklığına bağlı olarak *Pseudomonas sp.* lipazının florisile polisüksinimid ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonunda aktivite (♦) ve bağlanma yüzdesindeki (■) değişimler.

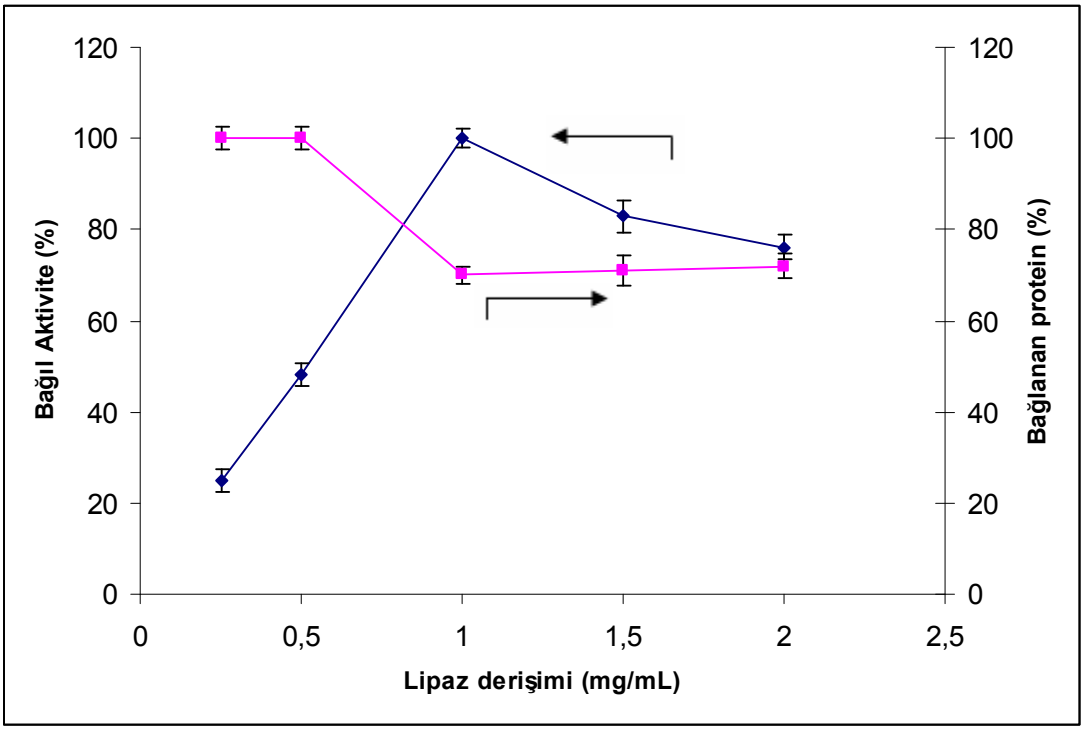
Şekil 4.13'den görüldüğü gibi en yüksek aktiviteyi 15 ºC'de immobilize edilen *Pseudomonas sp.* lipazı göstermiştir. 5 ve 15 ºC immobilize edilmiş *Pseudomonas sp.* lipazının florisile bağlanma yüzdelerinin maksimum olduğu belirlenmiştir.

Şekil 4.14'den görüldüğü gibi florisile polisüksinimid ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen *Pseudomonas sp.* lipazının hem aktivitesi hem de bağlanma yüzdesi zamana bağlı olarak artmış ve 6 saat immobilizasyon süresi sonunda maksimum aktivite ve bağlanma yüzdesine ulaşılmıştır. İmmobilizasyon süresinin daha da artırılmasının bağlanma yüzdesinde hafif bir azalışa neden olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.14.*Pseudomonas sp.* lipazının florisile polisüksinimid ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonunda immobilizasyon süresine bağlı olarak aktivite (♦) ve bağlanma yüzdesindeki (■) değişimler.

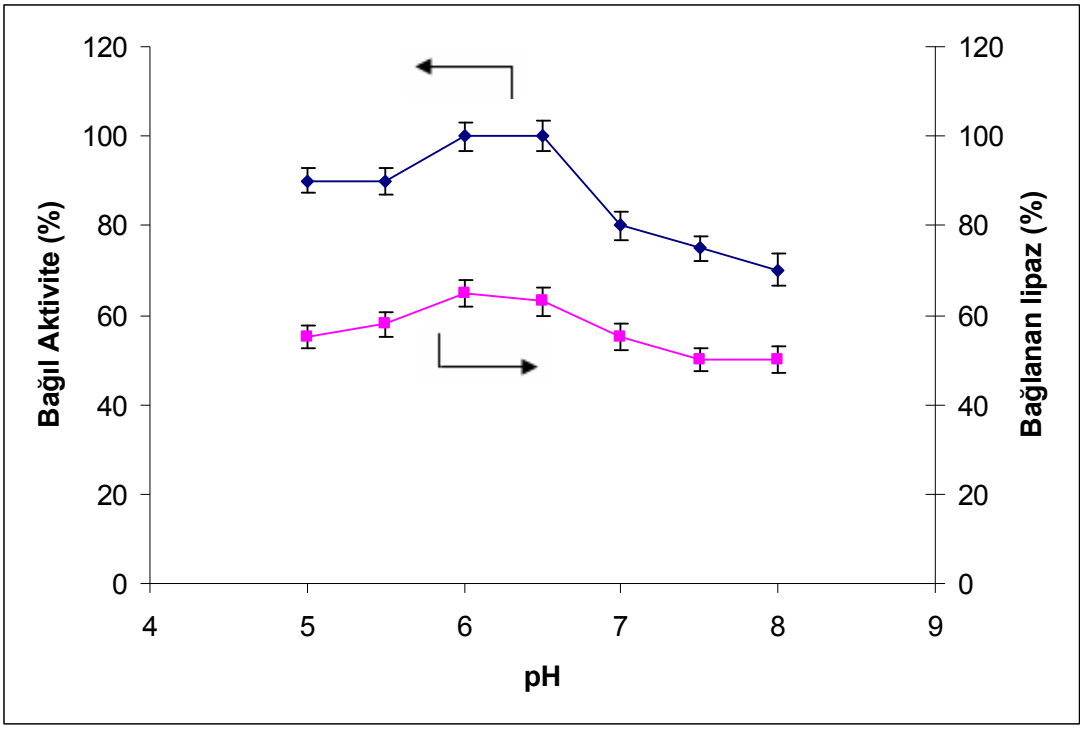
Şekil 4.15 *Pseudomonas sp.* lipazının florisile polisüksinimid ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonunda kullanılan lipaz derişimine bağlı olarak aktivite ve bağlanma yüzdesindeki değişimleri göstermektedir. En yüksek bağlanmalar 0,25 ve 0,5 mg/mL enzim derişimlerinde elde edilmesine rağmen bu derişimdeki aktiviteler maksimum aktivitenin %25 ve %48'i kadardır. 1 mg/mL derişiminde ortama eklenen proteinin % 70'i desteğe bağlanmasına rağmen en yüksek aktivide bu derişimde immobilize edilen *Pseudomonas sp.* lipazı örneklerinde belirlenmiştir.



Şekil 4.15.*Pseudomonas sp.* lipazının florisile polisüksinimid ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonunda kullanılan lipaz derişimine bağlı olarak aktivite (♦) ve bağlanma yüzdesindeki (■) değişimler.

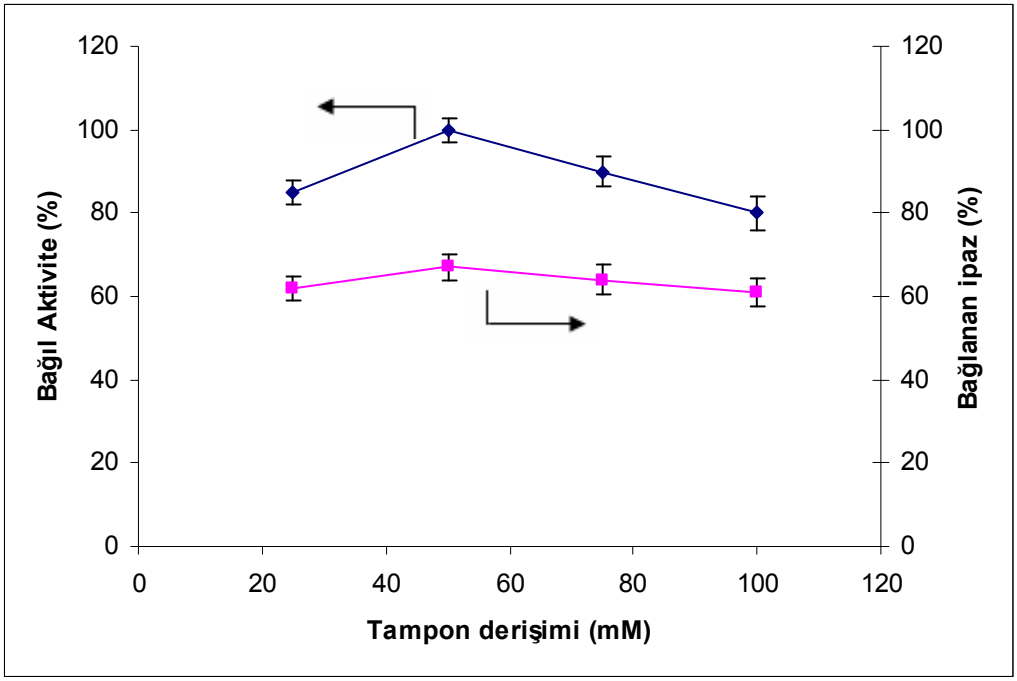
4.1.1.4.*Mucor miehei* Lipazının Florisile Polisüksinimid Ara Kolu Üzerinden Kovalent İmmobilizasyonu İçin İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

Şekil 4.16'da *Mucor miehei* lipazının florisile polisüksinimid ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonunda bağlanma pH'sına bağlı olarak bağıl aktivitenin ve bağlanma yüzdesinin değişimi verilmiştir. En yüksek aktivite ve bağlanma miktarı 50 mM pH 6,0 sitrat tamponu varlığında immobilize edilen *Mucor miehei* lipazı (PIMML) örneklerinde görülmüştür.



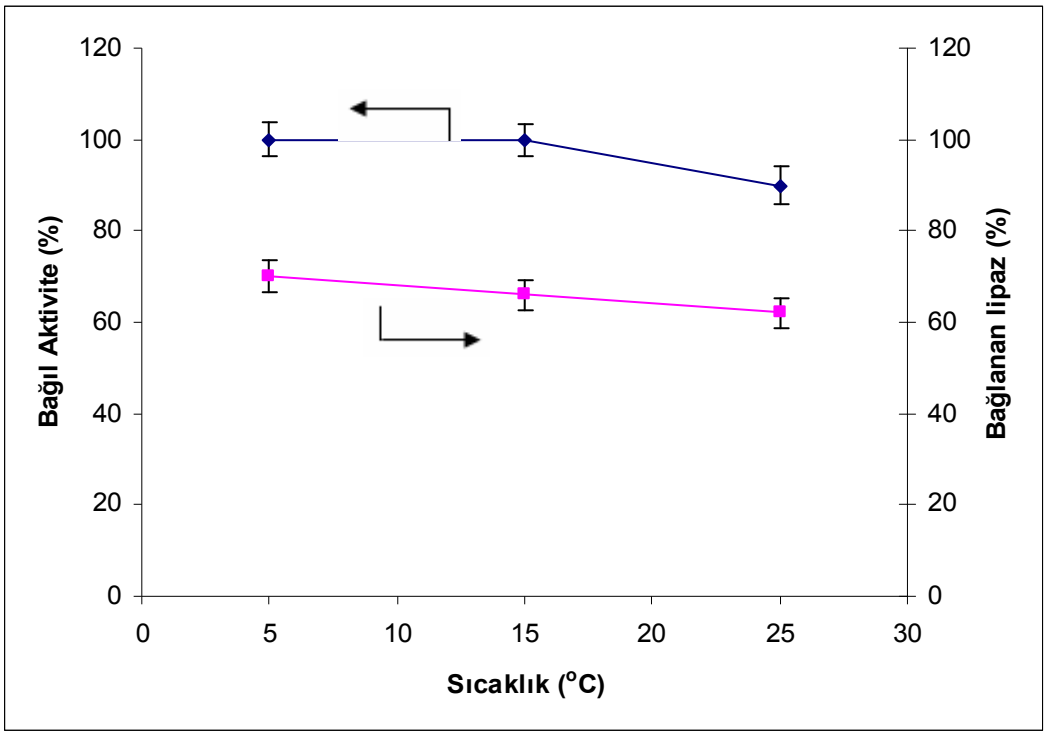
Şekil 4.16.İmmobilizasyon pH'sına bağlı olarak *Mucor miehei* lipazının florisile polisüksinimid ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonunda aktivite (♦) ve bağlanma yüzdesindeki (■) değişimler.

Mucor miehei lipazının florisile polisüksinimid ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonu için en uygun tampon derişimini belirlemek amacıyla derişimi 25-100 mM arasında değişen pH 6,0 sitrat tamponu içerisinde immobilizasyon denemeleri yapılmıştır. En yüksek aktivite ve bağlanma yüzdesi 50 mM pH 6,0 sitrat tamponu içerisinde immobilize edilen *Mucor miehei* örneklerinde görülmüştür ve bu sebeple immobilizasyon için optimum tampon derişimi 50 mM olarak belirlenmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17.*Mucor miehei* lipazının florisile polisüksinimid ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonunda immobilizasyon tamponunun derişimindeki değişikliğe bağlı olarak aktivite (♦) ve bağlanma yüzdesindeki (■) değişimler.

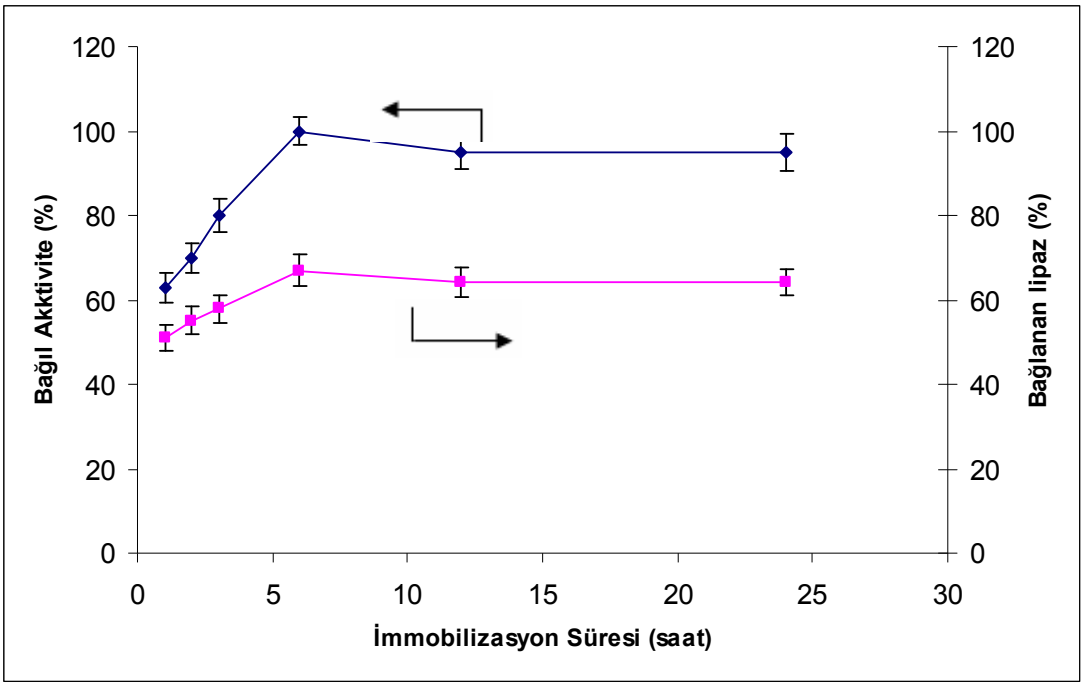
Mucor miehei lipazının florisile polisüksinimid ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonunda en uygun bağlanma sıcaklığının belirlenmesi amacıyla 50 mM pH 6,0 sitrat tamponu içerisinde, 5-25 ºC'lerde immobilizasyon çalışmaları yapılmıştır.



Şekil 4.18.İmmobilizasyon sıcaklığına bağlı olarak *Mucor miehei* lipazının florisile polisüksinimid ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonunda aktivite (♦) ve bağlanma yüzdesindeki (■) değişimler.

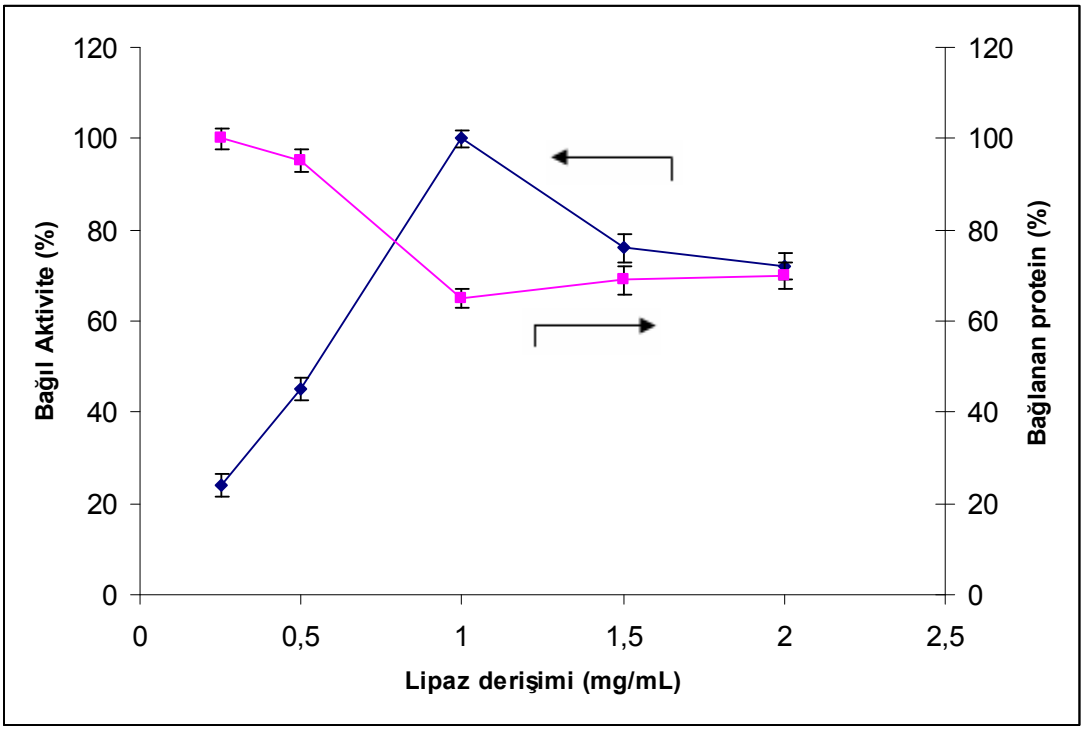
Şekil 4.18'den görüldüğü gibi 5 ve 15 ºC'de immobilize edilen PIMML örnekleri en yüksek aktiviteyi göstermişlerdir. 5-25 ºC immobilize edilmiş *Mucor miehei* lipazlarının florisile bağlanma yüzdelerinde ise hafif bir azalmanın olduğu belirlenmiştir.

Florisile polisüksinimid ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilen *Mucor miehei* lipazının aktivitesinin ve bağlanma yüzdesinin immobilizasyon süresine bağlı olarak değişimi Şekil 4.19'da verilmiştir. İmmobilizasyon süresinin artmasına parelel olarak *Mucor miehei* lipazının hem aktivitesi hem de bağlanma yüzdesi zamanla artmış ve 6 saat immobilizasyon süresinde maksimuma ulaşmıştır. 6 saatten daha uzun immobilizasyon sürelerinde ise hem aktivite hem de bağlanma yüzdelerinde hafif bir azalmanın olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.19.*Mucor miehei* lipazının florisile polisüksinimid ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonunda immobilizasyon süresine bağlı olarak aktivite (♦) ve bağlanma yüzdesindeki (■) değişimler.

Mucor miehei lipazının florisile polisüksinimid ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonunda kullanılan lipaz derişimine bağlı olarak aktiviteleri incelendiğinde en yüksek aktiviteye 1 mg/mL protein derişiminde immobilize edilen *Mucor miehei* lipazı için ulaşılmıştır (Şekil 4.20).

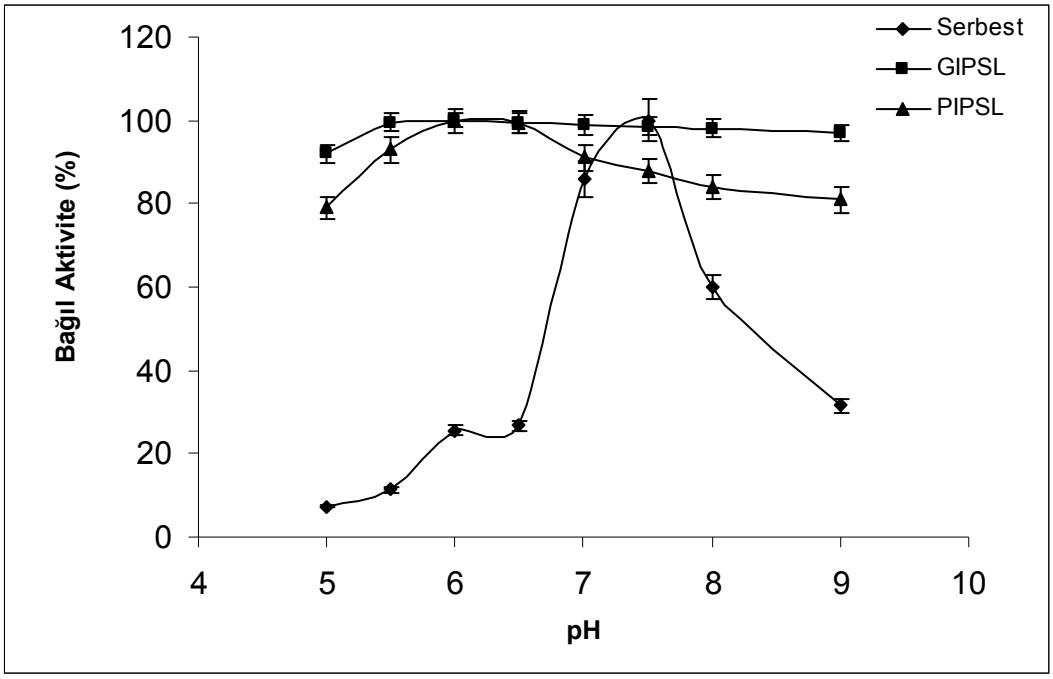


Şekil 4.20.*Mucor miehei* lipazının florisile polisüksinimid ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonunda kullanılan lipaz derişimine bağlı olarak aktivite (♦) ve bağlanma yüzdesindeki (■) değişimler.

4.1.2.Serbest ve Florisile Glutaraldehit ve Polisüksinimid Ara Kolları Üzerinden İmmobilize Edilmiş Olan *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* Lipazlarının Hidrolitik Aktivitelerinin Belirlenmesi

4.1.2.1.Serbest, Florisile Glutaraldehit ve Polisüksinimid Ara Kolları Üzerinden İmmobilize Edilmiş Olan *Pseudomonas sp.* Lipazlarının Maksimum Aktivite Gösterdiği Koşulların, Kinetik Parametrelerin, Termal, Depolama Kararlılıklarının ve İmmobilize *Pseudomonas sp.* Lipazların Tekrar Kullanım Kararlılıklarının Belirlenmesi

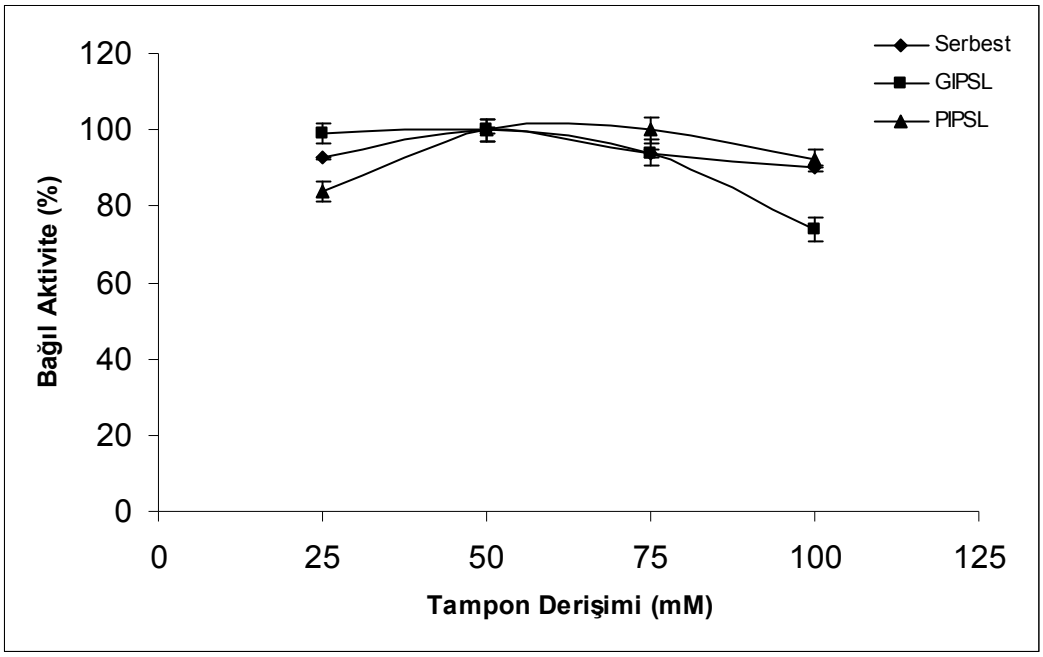
Serbest *Pseudomonas sp.*, GIPSL ve PIPSL'nin optimum pH'sının belirlenmesinde pH'sı 5,0 ile 9,0 arasında değişen 50 mM farklı tampon çözeltileri (5,0, 5,5 asetat, 6,0 sitrat, 7,0, 7,5, 8,0 fosfat, 9,0 borat) kullanılmıştır ve sonuçlar Şekil 4.21'de gösterilmiştir.



Şekil 4.21.Serbest, GIPSL ve PIPSL lipazlarının aktivitelerinin pH'ya bağlı değişimi.

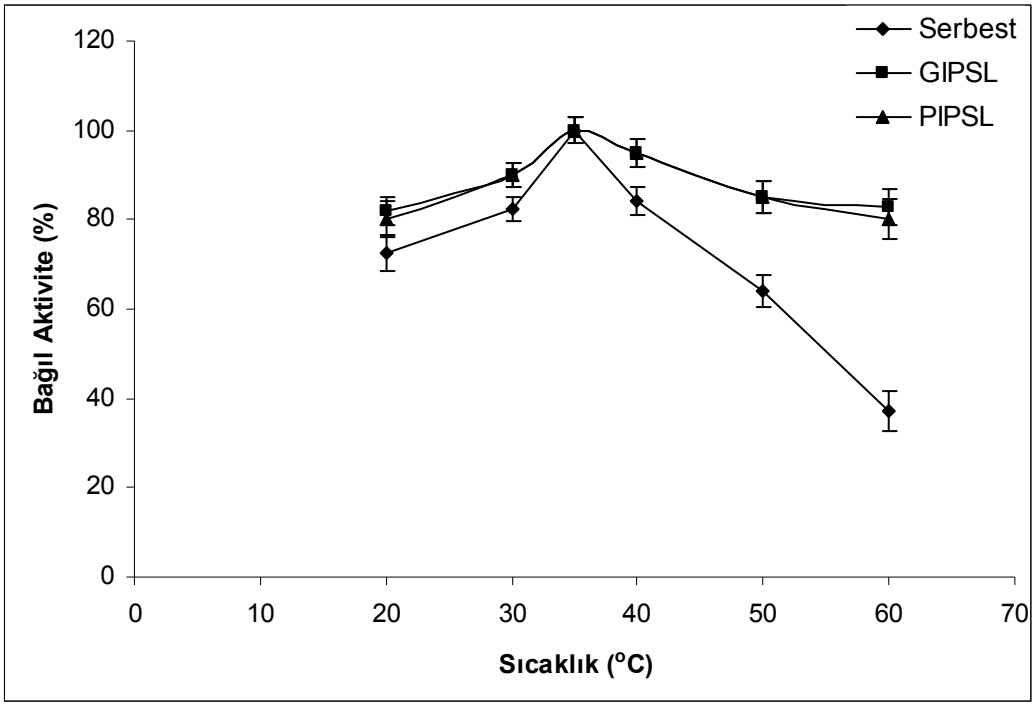
Şekil 4.21'den görüleceği gibi serbest *Pseudomonas sp.* lipazı için optimum pH 7,5 olarak belirlenmiştir. Serbest *Pseudomonas sp.* lipazı dar bir pH aralığında (pH 7-8) yüksek aktivite gösterirken pH 6 ve 9'da gösterdiği aktivite maksimum aktivitesinin yaklaşık %30'u kadardır. GIPSL'nin optimum aktivitesini pH 6,0 sitrat tamponunda gösterdiği ve oldukça geniş bir pH aralığında (5,5-9,0) kararlı olduğu PIPSL'nin ise optimum aktivitesini pH 6,0-6,5 aralığında gösterdiği belirlenmiştir.

Belirlenen optimum pH'larda farklı derişimlerde (25, 50, 75 ve 100 mM) tampon çözeltileri hazırlanarak serbest *Pseudomonas sp.*, GIPSL ve PIPSL'nin aktiviteleri ölçülmüştür. Şekil 4.22'den görüldüğü gibi serbest ve immobilize *Pseudomonas sp.* lipazları için optimum tampon derişimi 50 mM olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.22.Serbest, GIPSL ve PIPSL lipazlarının aktivitelerinin tampon derişimine bağlı olarak değişimi.

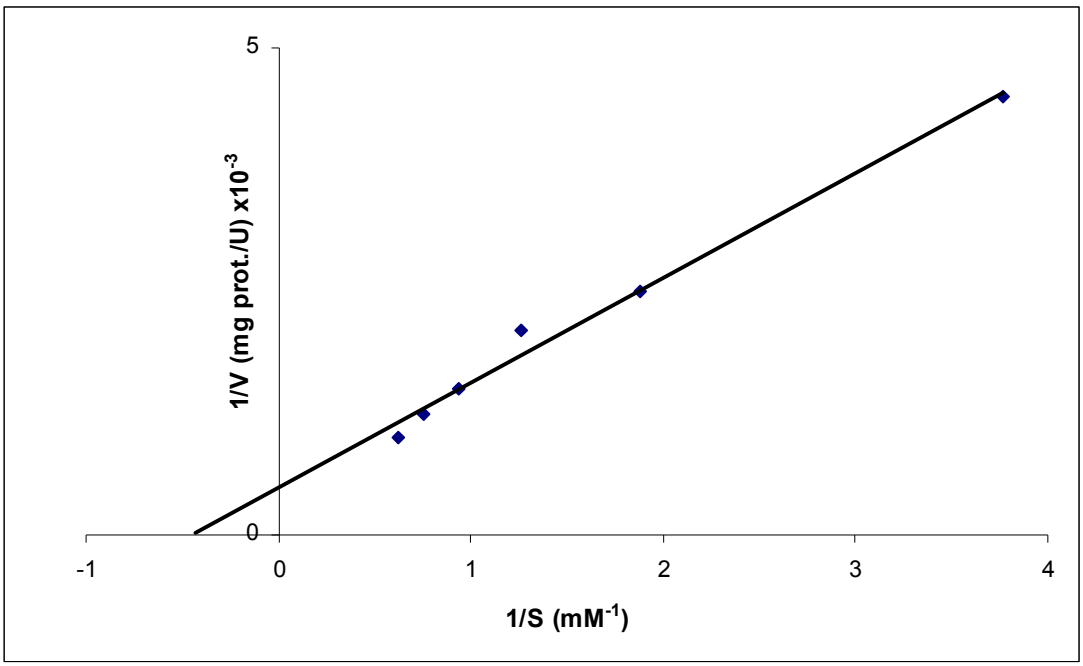
Serbest *Pseudomonas sp.*, GIPSL ve PIPSL'in belirlenen optimum pH ve tampon derişimlerinde farklı sıcaklıklardaki (20-60 ºC) aktiviteleri Şekil 4.23'de gösterilmiştir.



Şekil 4.23.Serbest, GIPSL ve PIPSL'nin aktivitelerinin sıcaklıklığa bağlı olarak değişimi.

Serbest *Pseudomonas sp.* lipazının optimum çalışma sıcaklığı 35 ºC olarak belirlenmiştir. 40 ºC'nin üstündeki sıcaklık değerlerinde serbest *Pseudomonas sp.* lipazının aktivitesi keskin bir şekilde düşmektedir ve 60 ºC'de serbest *Pseudomonas sp.* lipazın aktivitesi maksimum aktivitesinin yaklaşık % 37'si kadardır. Serbest *Pseudomonas sp.* lipazı için aktivasyon enerjisi ise 15,4 kJ/mol olarak belirlenmiştir. GIPSL ve PIPSL'nin her ikiside maksimum aktivitesini 35 ºC'de göstermişlerdir. GIPSL'nin yüksek sıcaklıklarda (50-60 ºC) oldukça kararlı olduğu ve 60 ºC'de başlangıç aktivitesinin yaklaşık %85'ini koruduğu, PIPSL'nin ise 60 ºC'de başlangıç aktivitesinin % 60'ını koruduğu belirlenmiştir. GIPSL için aktivasyon enerjisi 0,95 kJ/mol, PIPSL için ise 11,1 kJ/mol olarak belirlenmiştir.

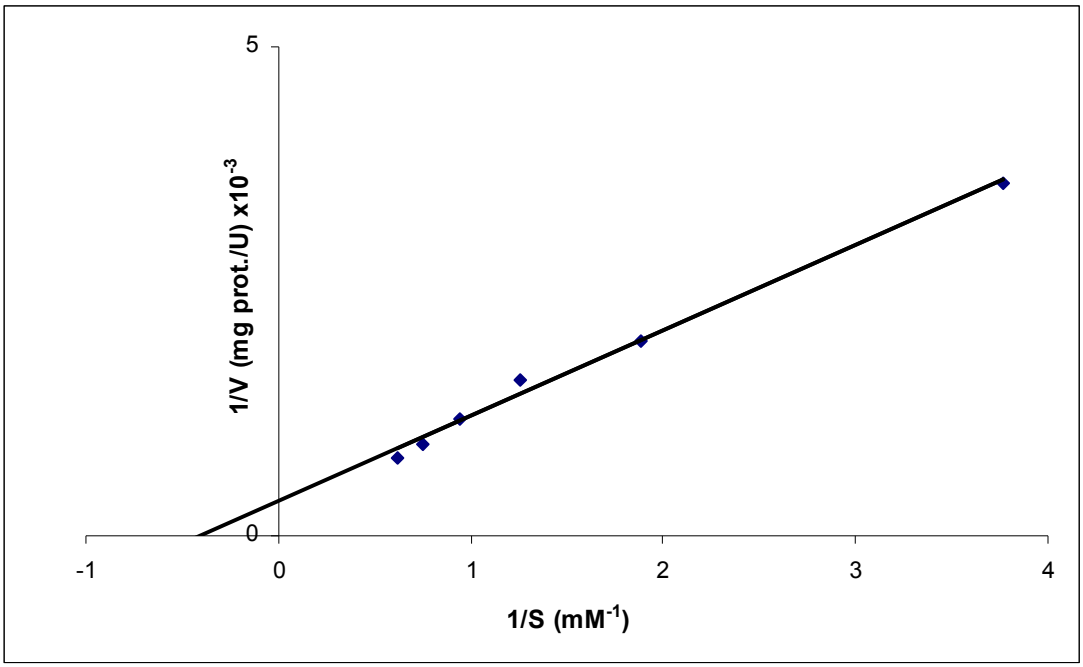
Belirlenmiş olan optimum koşullarda farklı p-nitrofenilpalmitat derişimlerinde serbest *Pseudomonas sp.*, GIPSL ve PIPSL'nin aktiviteleri ölçülerek Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir ve sonuçlar Şekil 4.24-4.26'da gösterilmiştir.



Şekil 4.24. Serbest *Pseudomonas sp.* lipazı için Lineweaver-Burk grafiği.

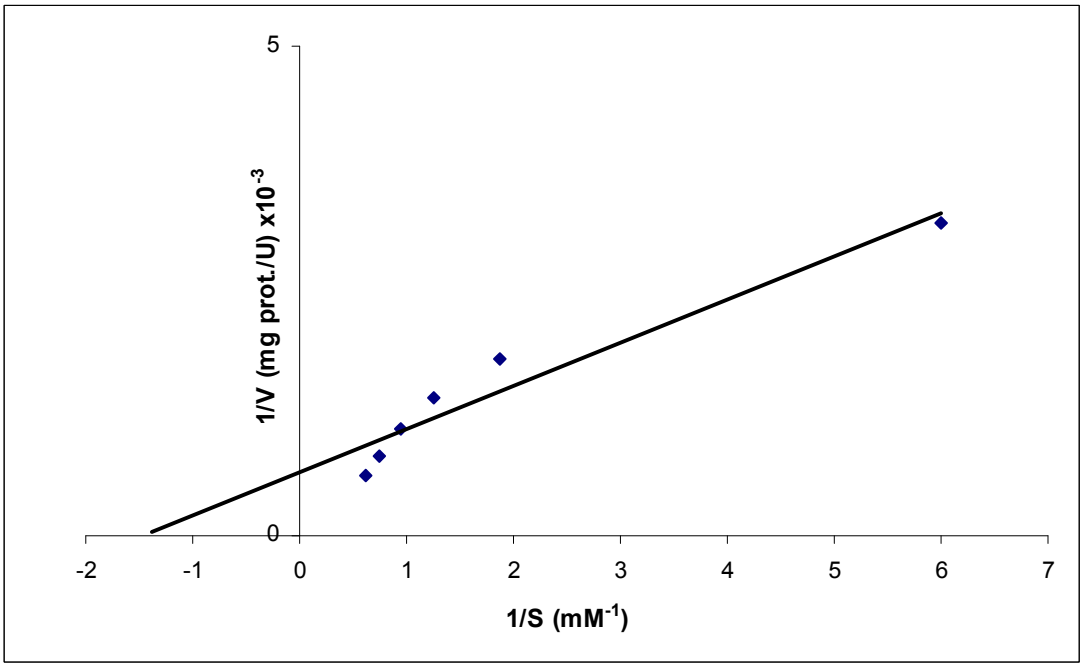
Serbest *Pseudomonas sp.* lipazı için V_{max}= 3,4x10^3 U/mg prot., K_m= 4,46 mM, geri dönüşüm sayısı (k_{kat}) = 1,7x10^3 s^{-1} ve katalitik etkinlik (k_{kat}/K_m) = 3,8x10^5 $s^{-1}M^{-1}$ olarak bulunmuştur.

GIPSL için V_{max}= 1351 U/mg prot., K_m= 1,19 mM, geri dönüşüm sayısı (k_{kat}) = 0,675x10^3 s^{-1} ve katalitik etkinlik (k_{kat}/K_m) = 5,67x10^5 $s^{-1}M^{-1}$ olarak bulunmuştur (Şekil 4.25).



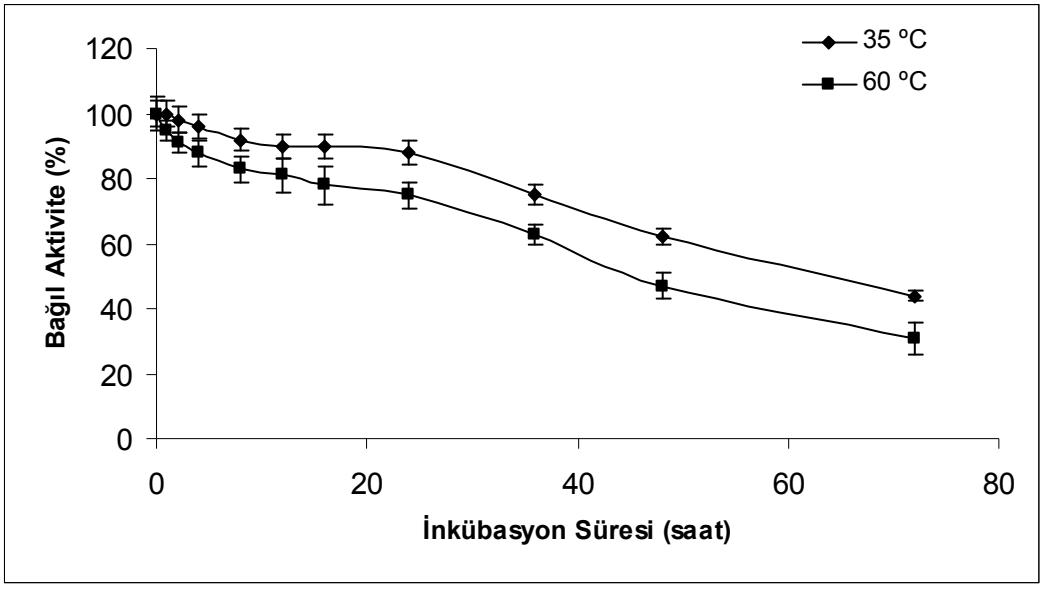
Şekil 4.25. GIPSL için Lineweaver-Burk grafiği.

PIPSL için ise V_{max}= 1,2x10^3 U/mg prot., K_m= 0,9 mM, geri dönüşüm sayısı (k_{kat}) = 0,622x10^3 s^{-1} ve katalitik etkinlik (k_{kat}/K_m) = 6,91x10^5 $s^{-1}M^{-1}$ olarak bulunmuştur.



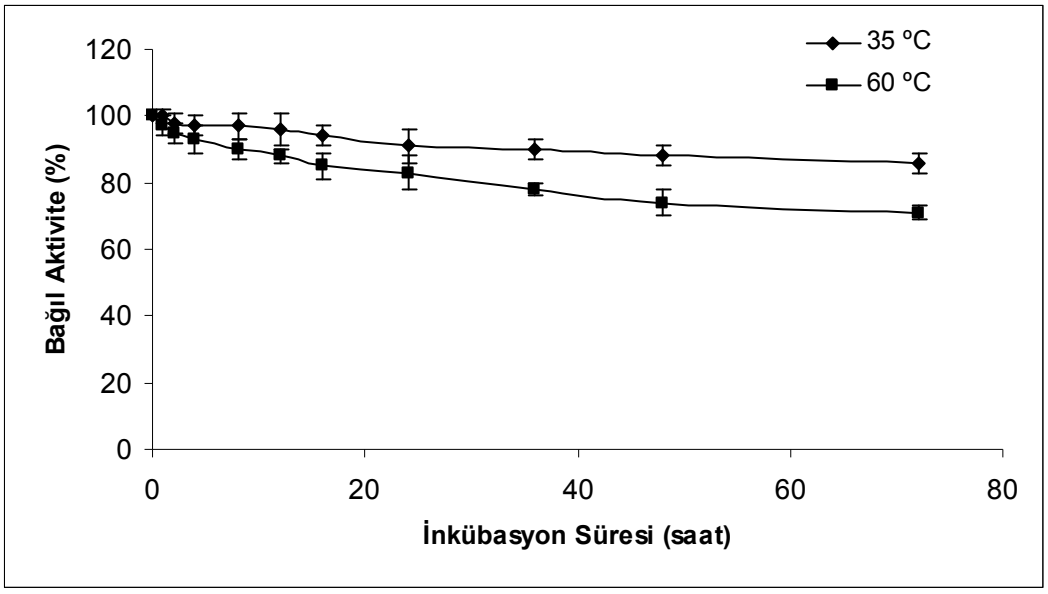
Şekil 4.26. PIPSL için Lineweaver-Burk grafiği.

Serbest *Pseudomonas sp.* lipazının termal kararlılığının belirlenmesi için fosfat tamponu içerisinde (50 mM, pH 7,5) derişimi 1 mg/mL olacak şekilde hazırlanmış *Pseudomonas sp.* lipazı 35 ve 60 ºC'de 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. Belirli zaman aralıklarında (1, 2, 4, 8, 12, 16, 24, 36, 48 ve 72 saat) *Pseudomonas sp.* lipazından 100 µL örnekler alınarak belirlenen optimum koşullarda kalan aktiviteleri ölçülmüştür (Şekil 4.27). 72 saat inkübasyon süresi sonunda serbest *Pseudomonas sp.* lipazının 35 ve 60 ºC'de başlangıç aktivitesinin sırasıyla % 44 ve 31'ini koruduğu belirlenmiştir. Serbest *Pseudomonas sp.* lipazının 35 ve 60 ºC'deki termal inaktivasyon sabitleri (k_i) sırasıyla 0,0101 ve 0,0155 $saat^{-1}$ ve yarı ömürleri ($t_{1/2}$) ise 68,6 ve 44,7 saat olarak belirlenmiştir.



Şekil4.27.Serbest *Pseudomonas sp.* lipazının 35 ve 60 ºC'de aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı olarak değişimi.

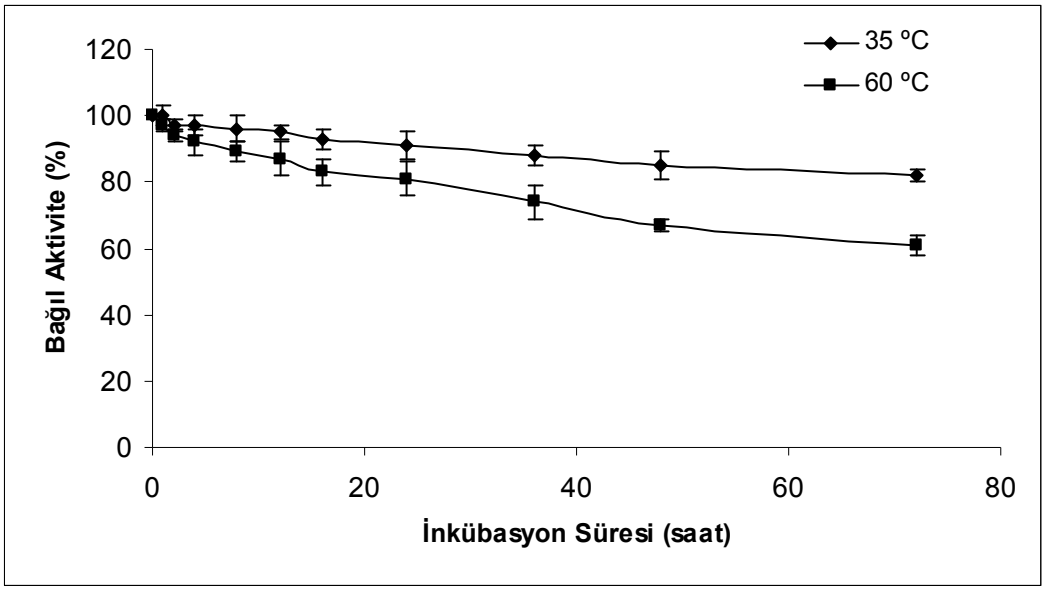
GIPSL ve PIPSL için termal kararlılığın belirlenmesinde 35 ve 60 ºC'de 72 saat boyunca inkübe edilen GIPSL'den belirli zaman aralıklarında 10 mg'lık örnekler alınarak kalan aktiviteleri ölçülmüştür (Şekil 4.28-4.29).



Şekil 4.28.GIPSL için 35 ve 60 ºC'de aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı olarak değişimi.

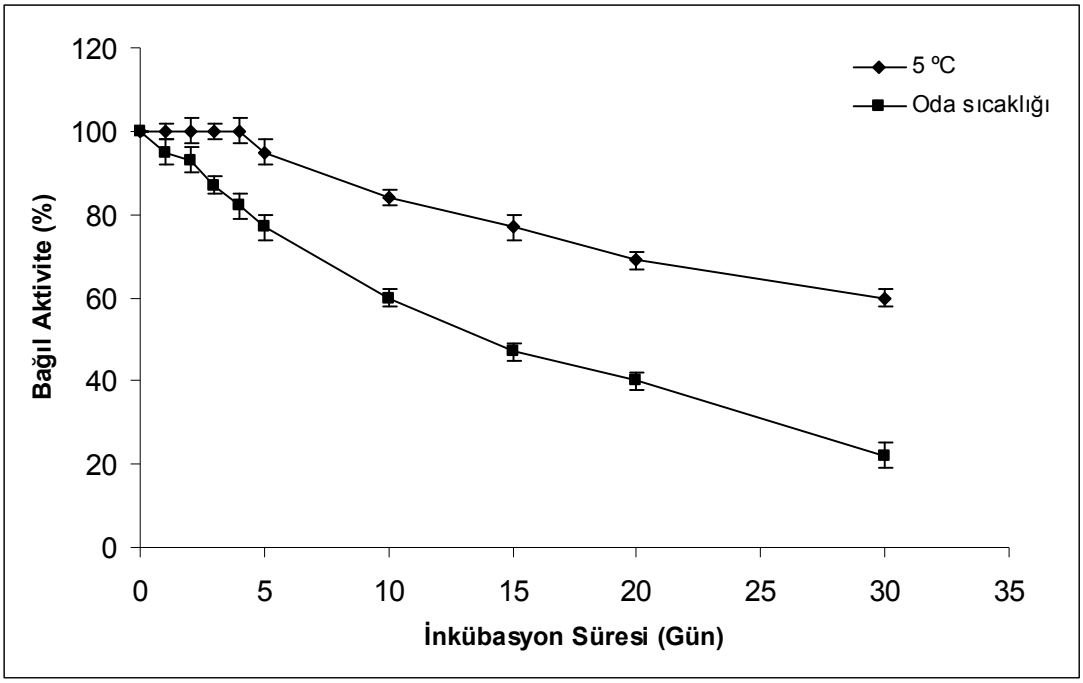
GIPSL 35 ve 60 ºC'de 72 saat inkübasyon süresi sonunda başlangıç aktivitesinin sırasıyla %86 ve %71'ini koruduğu belirlenmiştir. GIPSL'ın 35 ve 60 ºC'deki k_i sabitleri sırasıyla 0,0025 ve 0,0059 saat^{-1} ve $t_{1/2}$ değerleri ise 277,2 ve 117,4 saat olarak belirlenmiştir.

PIPSL'nin ise 72 saat inkübasyon süresi sonunda 35 ve 60 ºC'de başlangıç aktivitesinin sırasıyla %82 ve %61'ini koruduğu belirlenmiştir. PIPSL'ın 35 ve 60 ºC'deki k_i sabitleri sırasıyla 0,0032 ve 0,0078 saat^{-1} ve $t_{1/2}$ değerleri ise 216,6 ve 88,8 saat olarak belirlenmiştir.



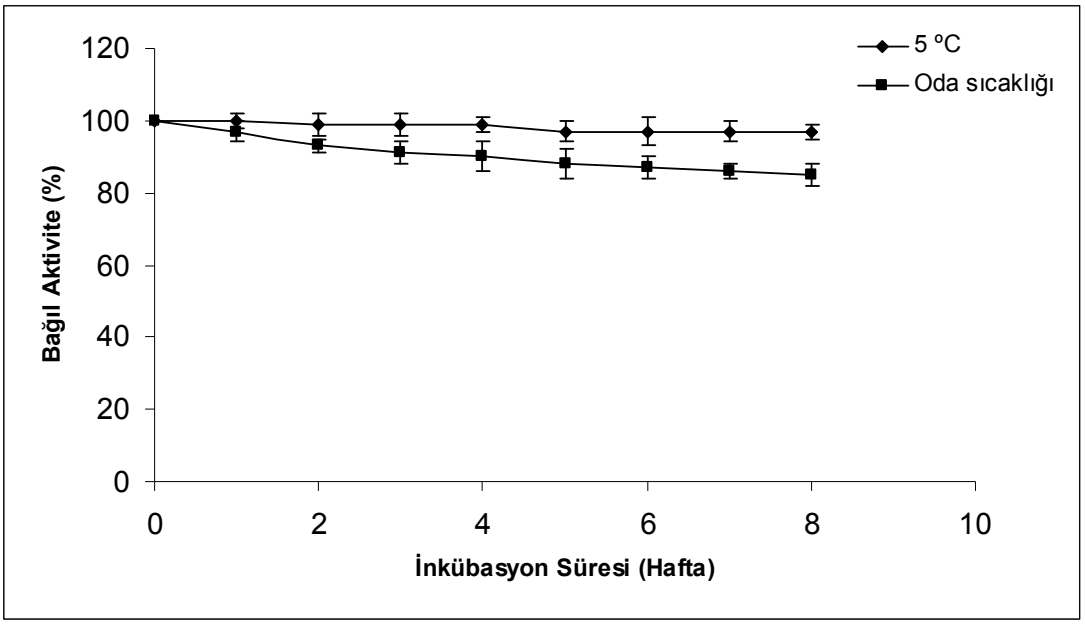
Şekil 4.29. PIPSL için 35 ve 60 ºC'de aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı olarak değişimi.

Serbest *Pseudomonas sp.* lipazının depolama kararlılığının belirlenmesi amacıyla derişimi 1 mg/mL olacak şekilde fosfat tamponu (50 mM, pH 7,5) içerisinde hazırlanmış *Pseudomonas sp.* lipazı 5 ºC ve oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve belirli zaman aralıklarında 100 µL örnekler alınarak *Pseudomonas sp.* lipazın kalan aktivitesi ölçülmüştür. 30 gün depolama süresi sonunda *Pseudomonas sp.* lipazının 5 ºC ve oda sıcaklığında başlangıç aktivitesinin sırasıyla % 60 ve 22'sini korudukları belirlenmiştir (Şekil 4.30).



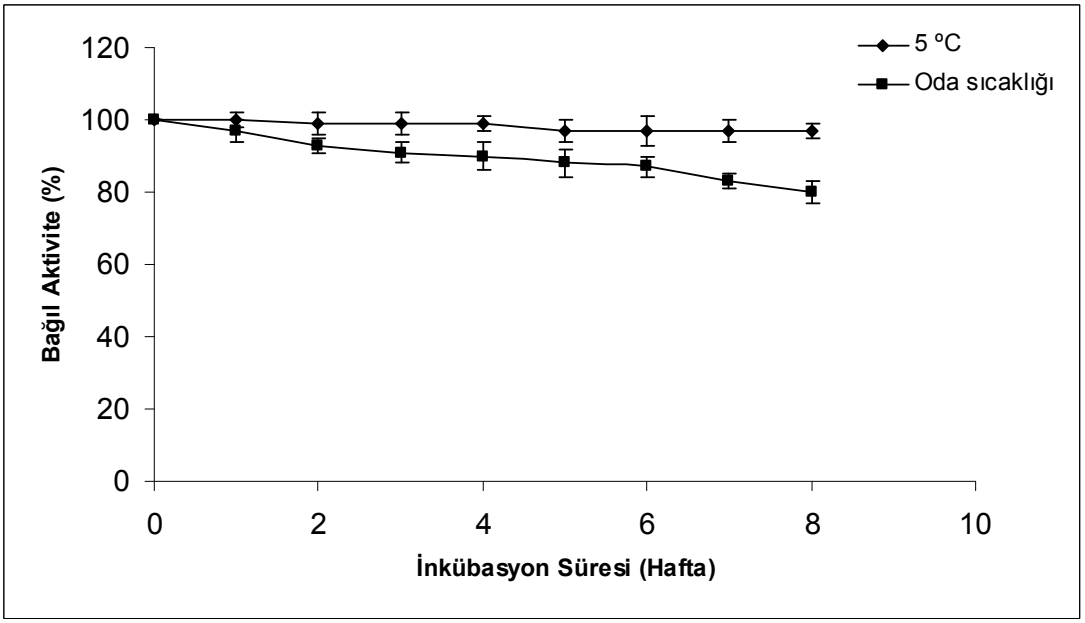
Şekil 4.30.Serbest *Pseudomonas sp.* lipazının 5 ºC ve oda sıcaklığında aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı olarak değişimi.

GIPSL ve PIPSL örneklerinin depolama kararlılıklarının belirlenmesinde ise 5 ºC ve oda sıcaklığında inkübe edilmiş örneklerden belirli zaman aralıklarında 10 mg örnekler alınarak aktiviteleri ölçülmüştür. Her iki sıcaklıkta yapılan 8 haftalık depolama süresi sonunda 5 ºC'de depolanan GIPSL başlangıç aktivitesinin neredeyse tamamını, oda sıcaklığında depolanan GIPSL ise başlangıç aktivitesinin yaklaşık %85'ini korumuştur (Şekil 4.31).



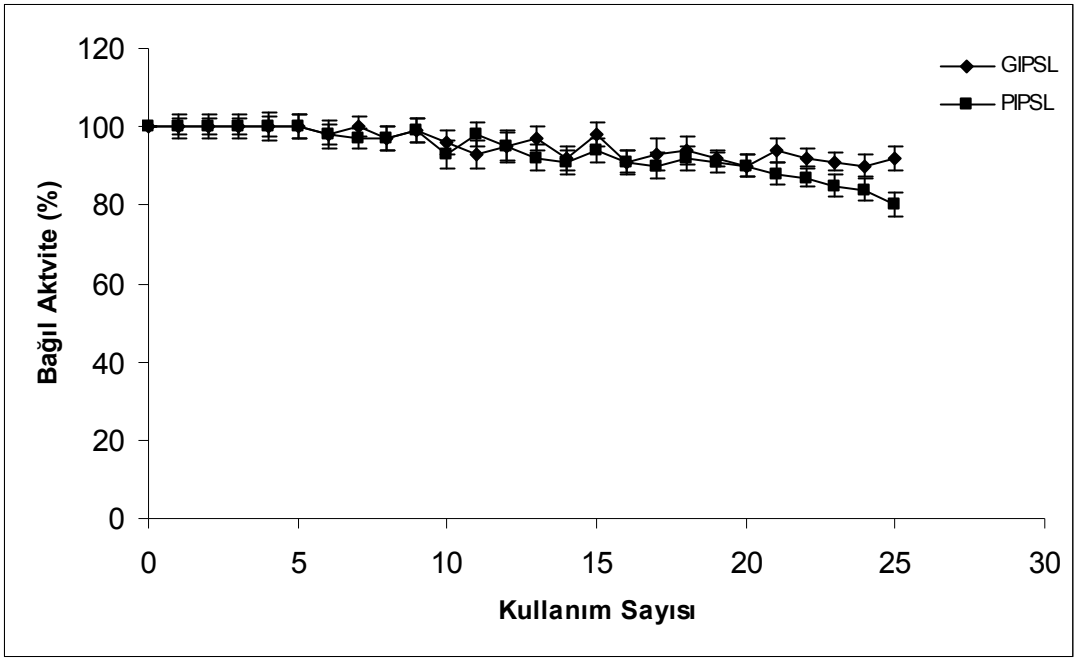
Şekil 4.31.GIPSL için 5 ºC ve oda sıcaklığındaki aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı olarak değişimi.

8 haftalık depolama süresi sonunda 5 ºC'de depolanan PIPSL ise başlangıç aktivitesinin %98'ini, oda sıcaklığında depolanan PIPSL'nin ise başlangıç aktivitesinin yaklaşık %82'sini koruduğu belirlenmiştir (Şekil 4.32).



Şekil 4.32.PIPSL 5 ºC ve oda sıcaklığındaki aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı olarak değişimi.

GIPSL ve PIPSL'nin p-NPP hidrolizi için tekrar kullanım kararlılığı Şekil 4.33'de gösterilmiştir. 25 kez kesikli reaktörde kullanım sonunda GIPSL lipazının başlangıç aktivitesinin yaklaşık %92'sini koruduğu, PIPSL'nin ise 25 kez kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin % 80'ını koruduğu belirlenmiştir.

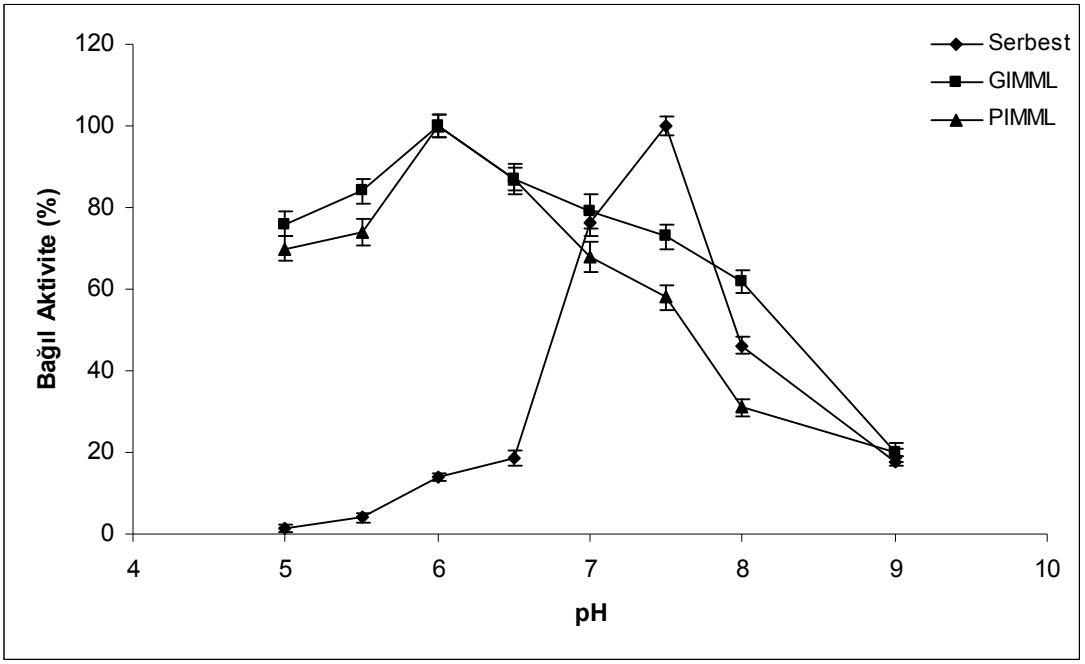


Şekil 4.33.GIPSL ve PIPSL'nin p-nitrofenil palmitat hidrolizi için tekrar kullanım sayısına bağlı olarak aktivitesindeki değişim.

4.1.2.2.Serbest, Florisile Glutaraldehit ve Polisüksinimid Ara Kolları Üzerinden İmmobilize Edilmiş Olan *Mucor miehei* Lipazlarının Maksimum Aktivite Gösterdiği Koşulların, Kinetik Parametrelerin, Termal, Depolama Kararlılıklarının ve İmmobilize *Mucor miehei* Lipazların Tekrar Kullanım Kararlılıklarının Belirlenmesi

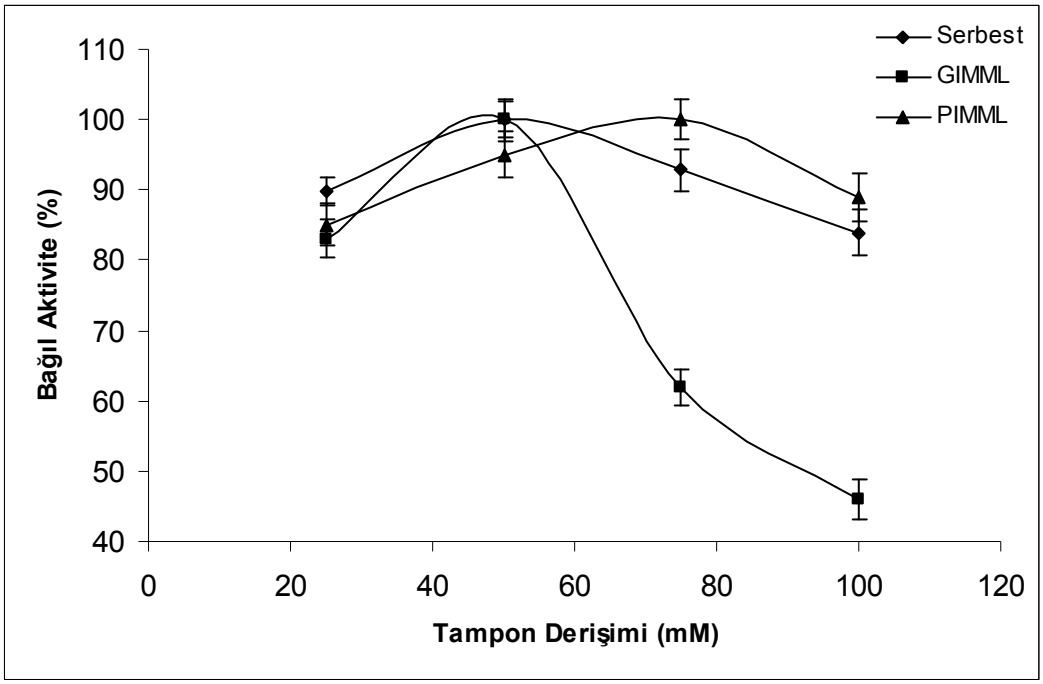
Serbest *Mucor miehei*, GIMML ve PIMML'nin optimum pH'sının belirlenmesinde pH'sı 5,0 ile 9,0 arasında değişen 50 mM farklı tampon çözeltileri (5,0, 5,5 asetat, 6,0 sitrat, 7,0, 7,5, 8,0 fosfat, 9,0 borat) kullanılmıştır ve sonuçlar Şekil 4.34'de verilmiştir.

Şekil 4.34'den görüleceği gibi serbest *Mucor miehei* lipazı oldukça dar bir pH aralığında (7-7,5) yüksek aktivite göstermekte özellikle asidik pH'lardaki aktivitesinin oldukça düşük olduğu görülmektedir. GIMML ve PIMML'nin her ikiside maksimum aktivitesini pH 6,0 sitrat tamponunda göstermiştir. GIMML ve PIMML'nin aktivitelerinin pH 7,0-9,0 aralığında keskin bir şekilde azaldığı, pH 9,0 GIMML ve PIMML'nin her ikisinin maksimum aktivitelerinin yaklaşık %20'sini gösterdikleri belirlenmiştir.



Şekil 4.34.Serbest, GIMML ve PIMML lipazlarının aktivitelerinin pH'ya bağlı değişimi.

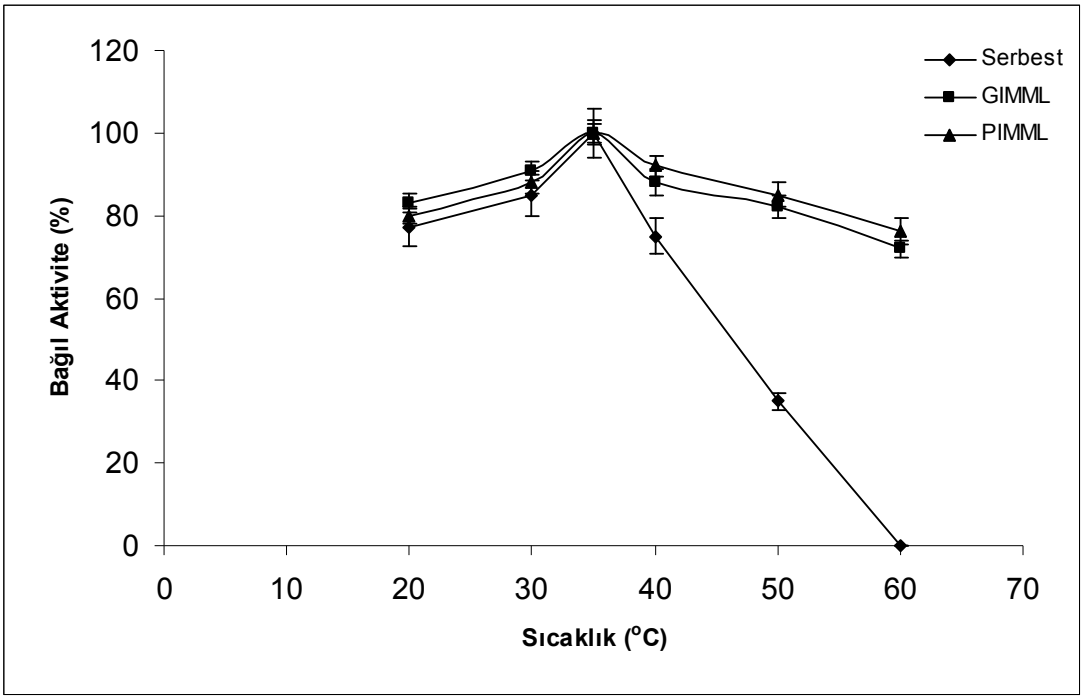
Serbest *Mucor miehei*, GIMML ve PIMML'nin aktivitelerine tampon derişiminin etkisi Şekil 4.35'de gösterilmiştir. Serbest *Mucor miehei* lipazı için optimum tampon derişimi 50 mM olarak belirlenmiştir. GIMML'ın maksimum aktivitesini 50 mM sitrat tamponu içerisinde gösterdiği belirlenmiştir. Şekil 4.35'den görüleceği gibi tampon derişiminin 50 mM'ın üzerine çıkartılmasının aktivitede keskin bir düşüşe neden olduğu belirlenmiştir. PIMML'ın ise maksimum aktivitesini 75 mM sitrat tamponu içerisinde gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.35. Serbest, GIMML ve PIMML lipazlarının aktivitelerinin tampon derişimine bağlı olarak değişimi.

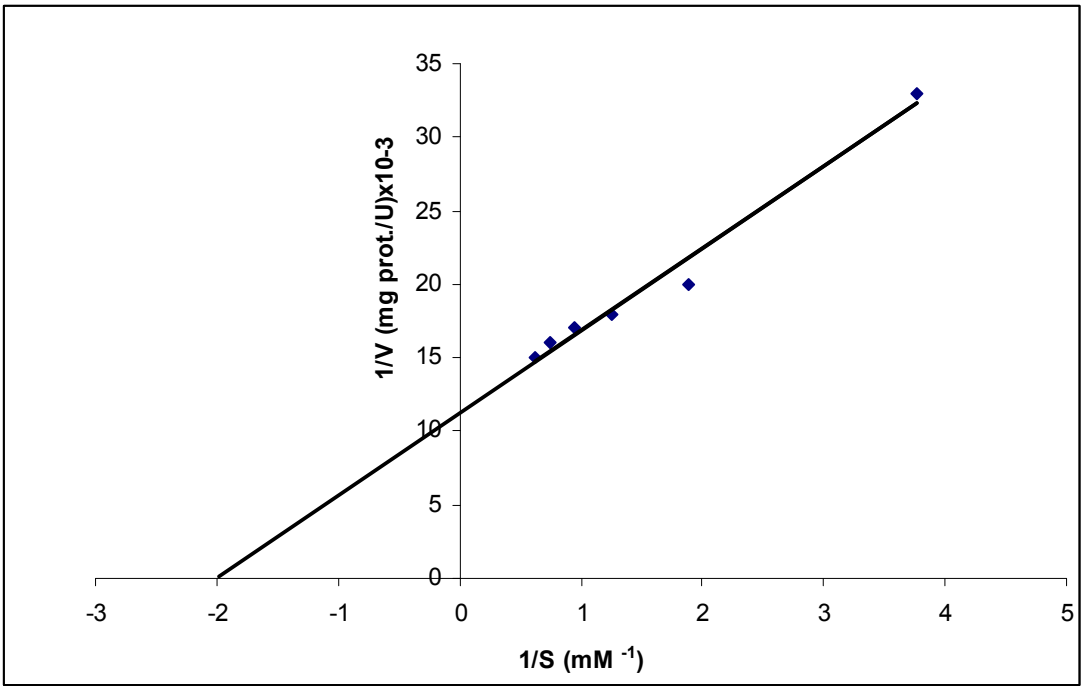
Serbest *Mucor miehei*, GIMML ve PIMML'nin farklı sıcaklıklarda (20-60 ºC) belirlenen optimum pH ve tampon derişimlerinde ölçülmüş aktiviteleri Şekil 4.36'da verilmiştir. Şekil 4.36'dan görüleceği gibi serbest ve immobilize *Mucor miehei* lipazlarının optimum çalışma sıcaklığı 35 ºC olarak belirlenmiştir. Serbest *Mucor miehei* lipazı 30-40 ºC sıcaklık aralığında kararlı olup 40 ºC'nin üstündeki sıcaklıklarda aktivitesinde keskin bir düşme gözlemlenmiştir. 60 ºC'de *Mucor miehei* lipazının aktivitesini tamamen kaybettiği GIMML ve PIMML'nin ise 60 ºC'de ise maksimum aktivitelerinin sırasıyla %72'sini ve %76'sını korudukları belirlenmiştir.

Serbest *Mucor miehei*, GIMML ve PIMML için aktivasyon enerjileri ise sırasıyla 12,6, 0,87, 10,9 kJ/mol olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.36.Serbest, GIMML ve PIMML'nin aktivitelerinin sıcaklıklığa bağlı olarak değişimi.

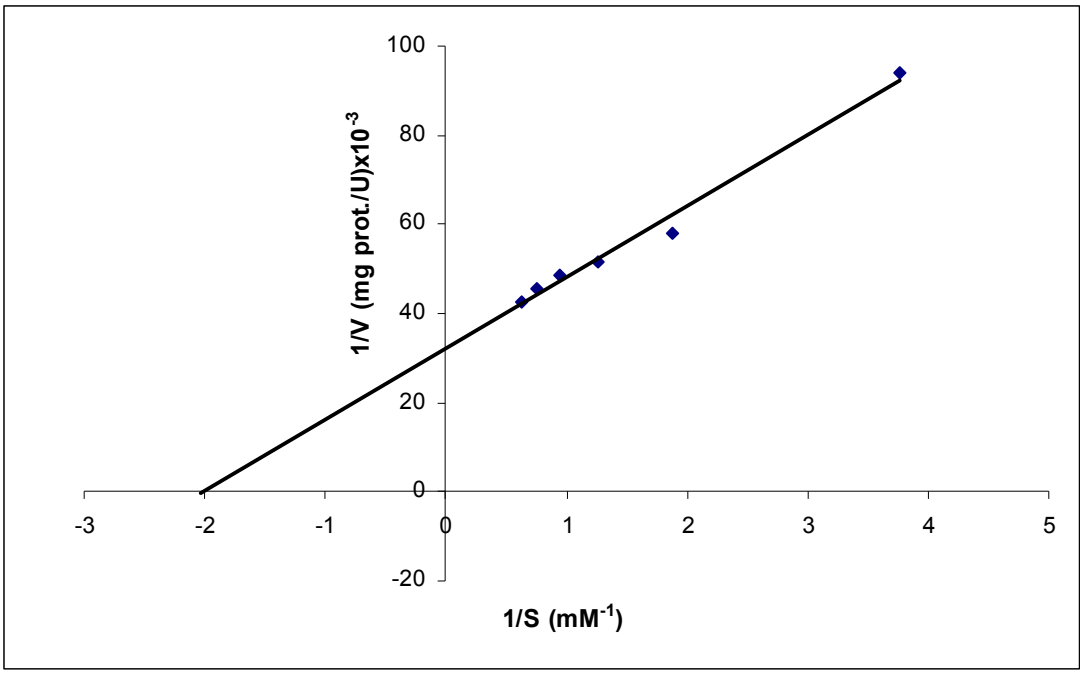
Belirlenmiş olan optimum koşullarda farklı p-nitrofenilpalmitat derişimlerinde serbest *Mucor miehei*, GIMML ve PIMML'nin aktiviteleri ölçülerek Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir ve sonuçlar Şekil 4.37-4.39'da gösterilmiştir.



Şekil 4.37. Serbest *Mucor miehei* lipazı için Lineweaver-Burk grafiği.

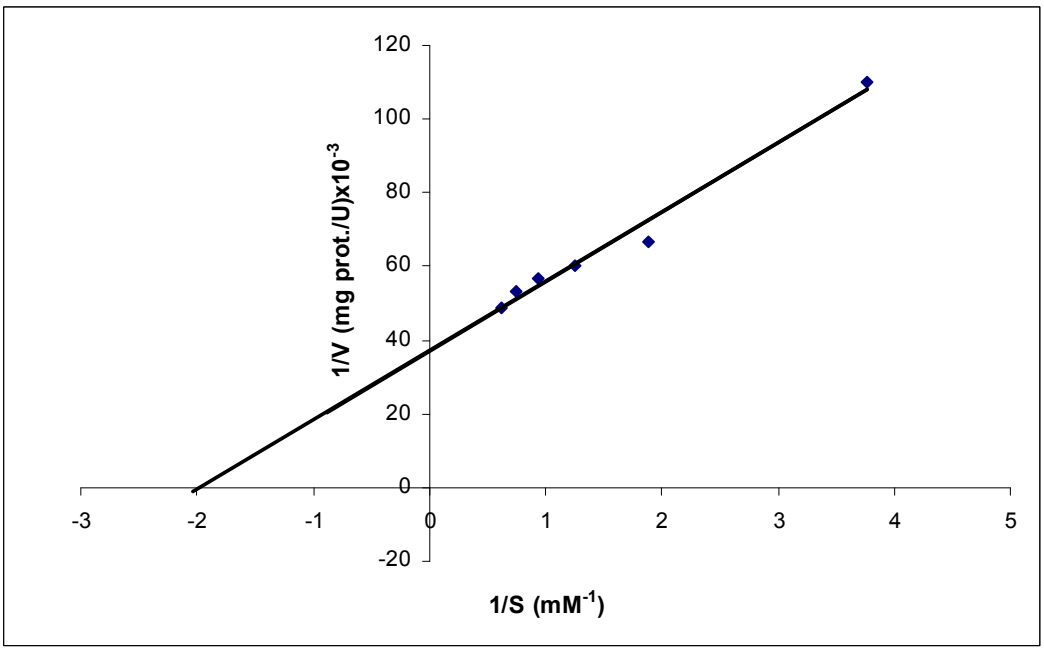
Serbest *Mucor miehei* lipazı için V_{max}= 118,9 U/mg prot., K_m= 1,09 mM, geri dönüşüm sayısı (k_{kat}) = 6,93x10^2 s^{-1} ve katalitik etkinlik (k_{kat}/K_m) = 6,36x10^5 $s^{-1}M^{-1}$ olarak bulunmuştur.

GIMML için V_{max}= 42 U/mg prot., K_m= 1,09 mM, geri dönüşüm sayısı (k_{kat}) = 0,245x10^2 s^{-1} ve katalitik etkinlik (k_{kat}/K_m) = 2,24x10^4 $s^{-1}M^{-1}$ olarak bulunmuştur.



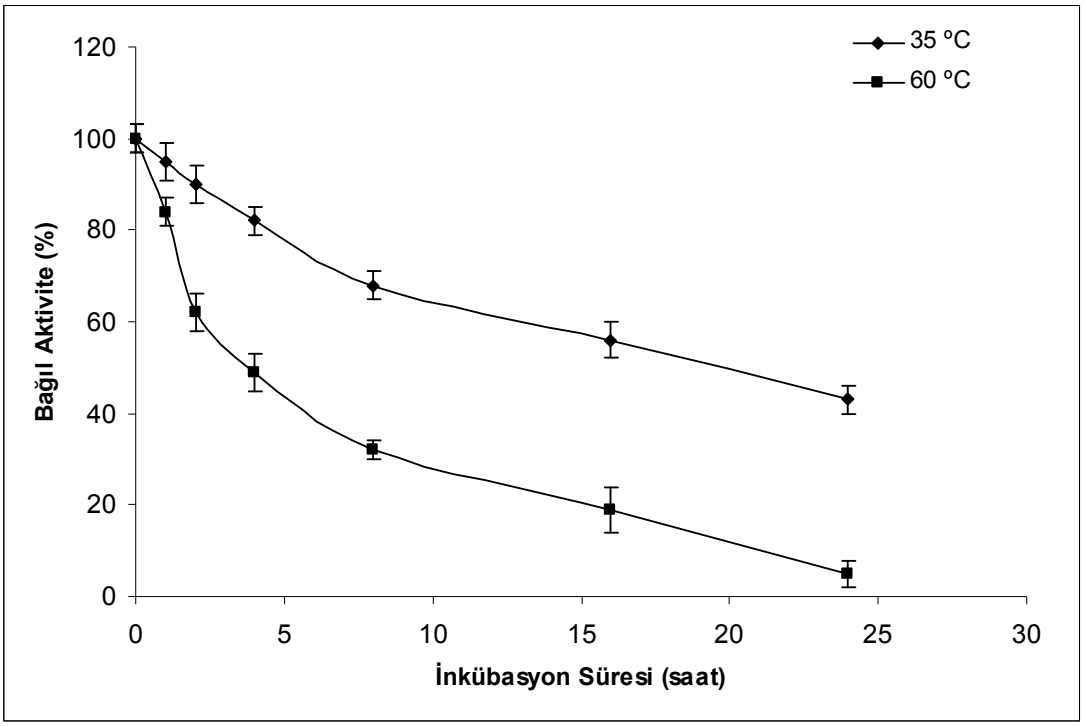
Şekil 4.38. GIMML için Lineweaver-Burk grafiği.

PIMML için ise V_{max}= 36,2 U/mg prot., K_m= 1,1 mM, geri dönüşüm sayısı (k_{kat}) = 0,211x10^3 s^{-1} ve katalitik etkinlik (k_{kat}/K_m) = 1,92x10^4 $s^{-1}M^{-1}$ olarak bulunmuştur.



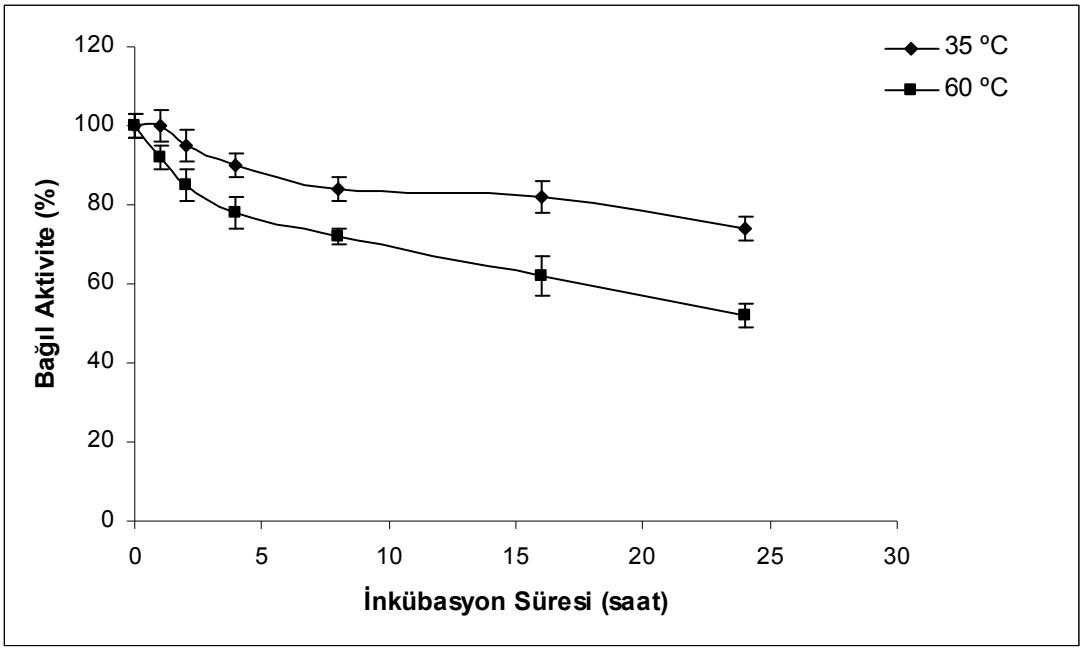
Şekil 4.39. PIMML için Lineweaver-Burk grafiği.

Serbest *Mucor miehei* lipazının termal kararlılığının belirlenmesi için fosfat tamponu içerisinde (50 mM, pH 7,5) derişimi 1 mg/mL olacak şekilde hazırlanmış *Mucor miehei* lipazı 35 ve 60 ºC'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Belirli zaman aralıklarında *Mucor miehei* lipazından 100 µL örnekler alınarak belirlenen optimum koşullarda kalan aktiviteleri ölçülmüştür. 24 saat inkübasyon süresi sonunda serbest *Mucor miehei* lipazının 35 ve 60 ºC'de başlangıç aktivitesinin sırasıyla % 43 ve %5' ini koruduğu belirlenmiştir (Şekil 4.40). Serbest *Mucor miehei* lipazının 35 ve 60 ºC'deki termal inaktivasyon sabitleri (k_i) sırasıyla 0,0344 ve 0,1144 saat^{-1} ve yarı ömürleri ($t_{1/2}$) ise 20,8 ve 4,91 saat olarak belirlenmiştir.



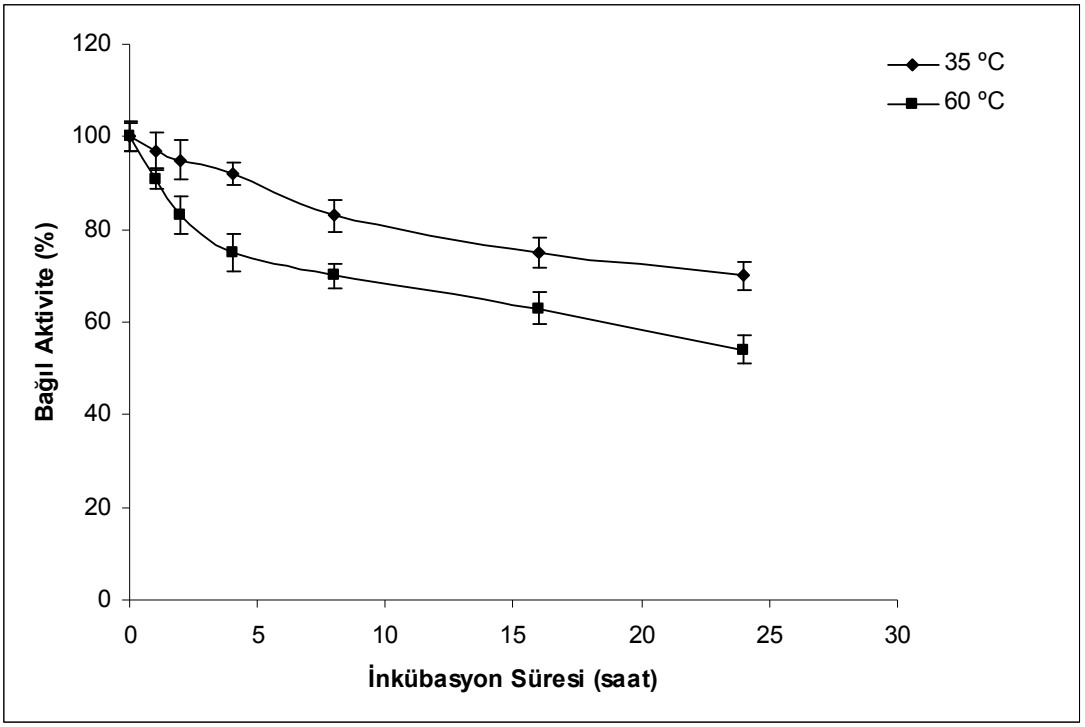
Şekil 4.40.Serbest *Mucor miehei* lipazının 35 ve 60 ºC'de aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı olarak değişimi.

GIMML'ın aktivitesinin zamana bağlı olarak 35 ve 60 ºC'lerdeki değişimi Şekil 4.41'de verilmiştir. Şekil 4.41'den görüleceği gibi GIMML 35 ve 60 ºC'de 24 saat inkübasyon süresi sonunda başlangıç aktivitesinin sırasıyla %74 ve %52'ini koruduğu belirlenmiştir. GIMML için 35 ve 60 ºC'deki termal inaktivasyon sabitleri (k_i) sırasıyla 0,0119 ve 0,0298 saat^{-1} ve yarı ömürleri ($t_{1/2}$) ise 58,2 ve 23,2 saat olarak belirlenmiştir.



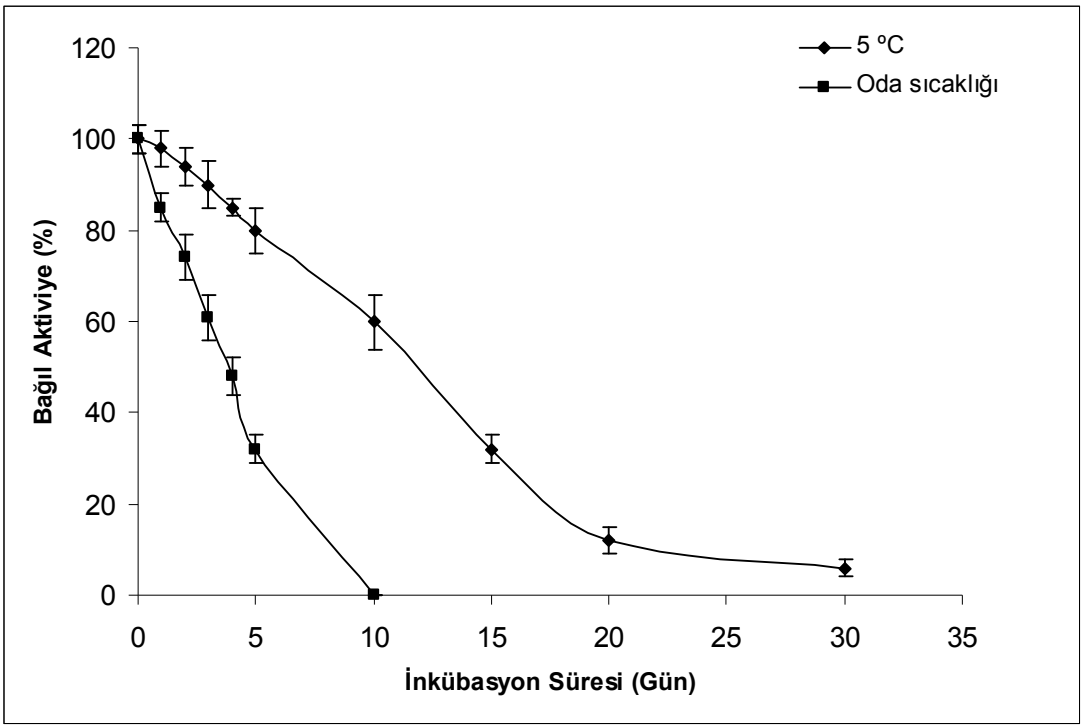
Şekil 4.41.GIMML için 35 ve 60 ºC'de aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı olarak değişimi.

Şekil 4.42'den görüleceği gibi PIMML 35 ve 60 ºC'de 24 saat inkübasyon süresi sonunda başlangıç aktivitesinin sırasıyla %70 ve %54'ünü koruduğu belirlenmiştir. PIMML için 35 ve 60 ºC'deki termal inaktivasyon sabitleri (k_i) sırasıyla 0,0169 ve 0,029 sa^{-1} ve yarı ömürleri ($t_{1/2}$) ise 42 ve 23,9 saat olarak belirlenmiştir.



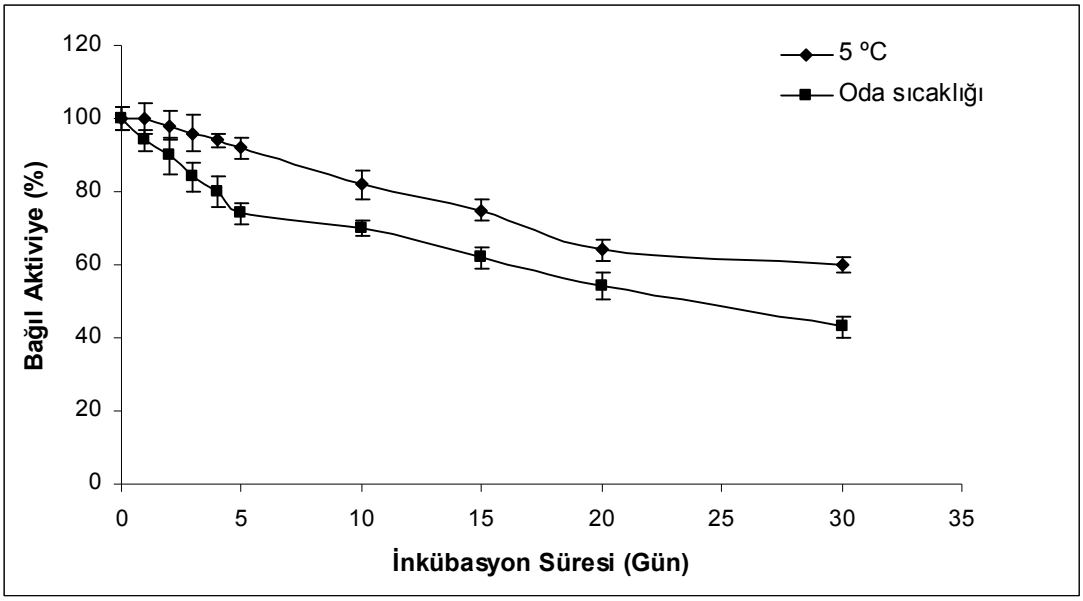
Şekil 4.42.PIMML için 35 ve 60 ºC'de aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı olarak değişimi.

Serbest *Mucor miehei* lipazının depolama kararlılığının belirlenmesi amacıyla derişimi 1 mg/mL olacak şekilde fosfat tamponu (50 mM, pH 7,5) içerisinde hazırlanmış *Mucor miehei* lipazı 5 ºC ve oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve belirli zaman aralıklarında 100 µL örnekler alınarak *Mucor miehei* lipazının kalan aktivitesi ölçülmüştür. *Mucor miehei* lipazı oda sıcaklığında 10 gün sonunda başlangıç aktivitesinin tamamını kaybetmiş, 5 ºC ise 10 gün sonunda başlangıç aktivitesinin %60'ını korumuş, 30 gün sonunda başlangıç aktivitesinin ancak %6'sını korumuştur (Şekil 4.43).

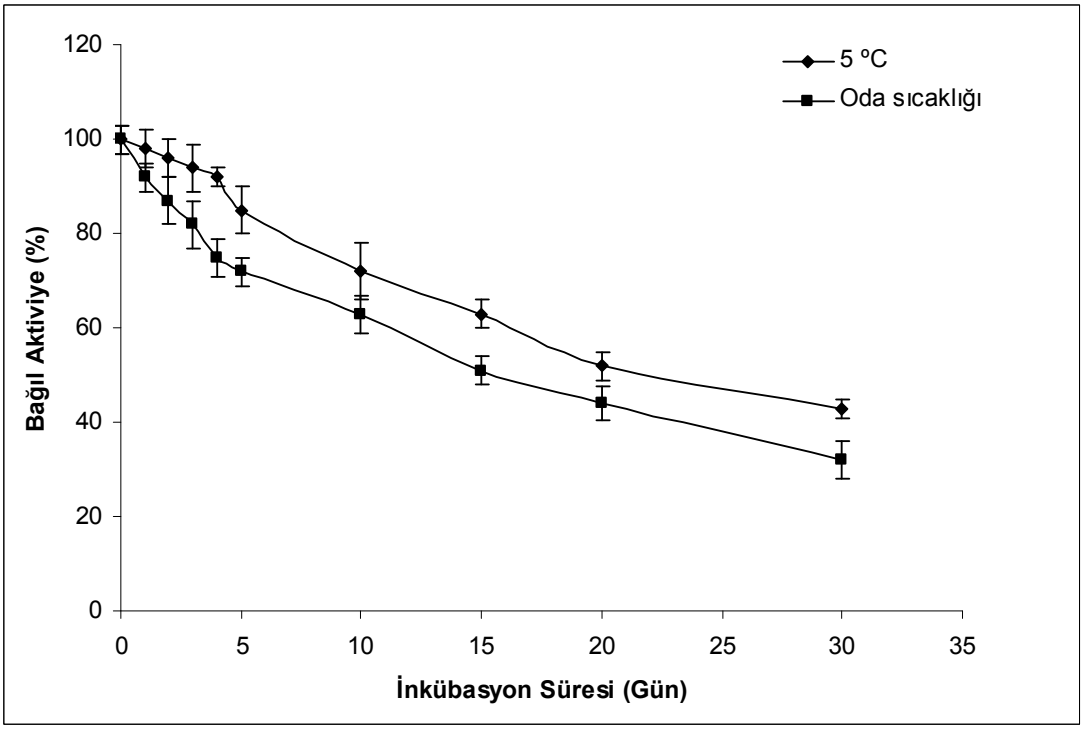


Şekil 4.43.Serbest *Mucor miehei* lipazının 5 ºC ve oda sıcaklığında aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı olarak değişimi.

GIMML've PIMML'nin aktivitesinin 5 ºC ve oda sıcaklığında depolama zamanına bağlı olarak değişimi Şekil 4.44-4.45'de verilmiştir. GIMML 30 gün depolama süresi sonunda 5 ºC ve oda sıcaklığında başlangıç aktivitesinin sırasıyla %60 ve %43'ünü gösterdiği, PIMML ise 30 gün depolama süresi sonunda 5 ºC ve oda sıcaklığında başlangıç aktivitesinin sırasıyla %43 ve %32'sini gösterdiği belirlenmiştir.

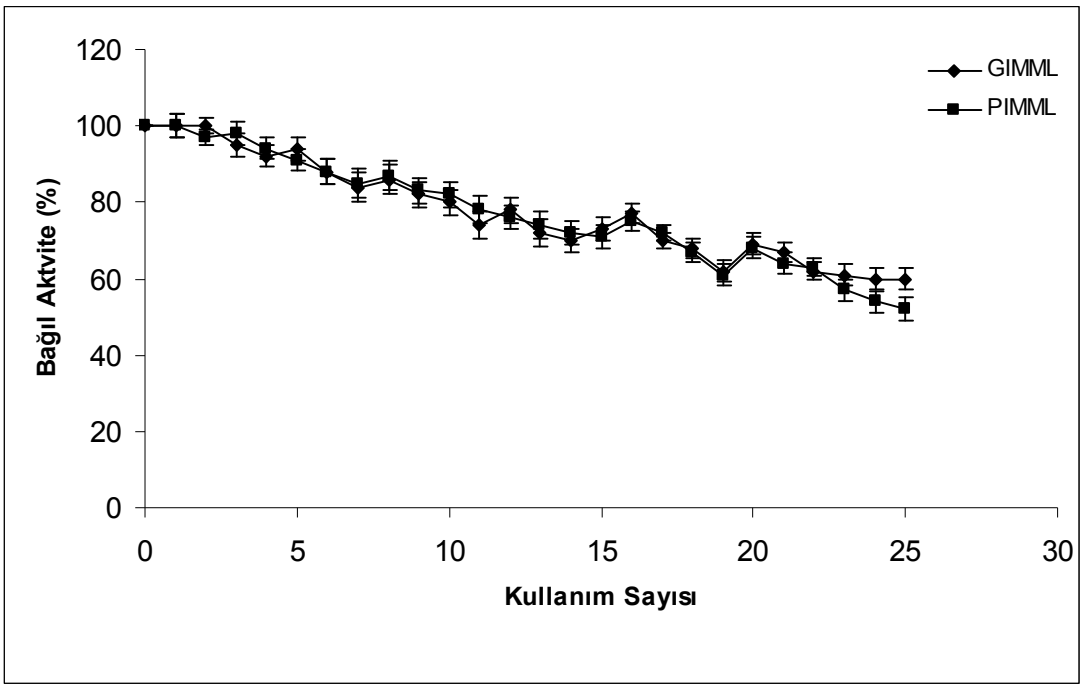


Şekil 4.44.GIMML için 5 ºC' ve oda sıcaklığındaki aktivitesinin depolama süresine bağlı olarak değişimi.



Şekil 4.45.PIMML için 5 ºC ve oda sıcaklığındaki aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı olarak değişimi.

GIMML ve PIMML örneklerinin p-NPP hidrolizi için tekrar kullanım sayısına bağlı olarak aktivitelerindeki değişim Şekil 4.46'da gösterilmiştir. GIMML örnekleri kesikli reaktörde 25 kez kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin %60'ını gösterdiği, PIMML'nin ise kesikli reaktörde 25 kez kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin %52'sini koruduğu belirlenmiştir.

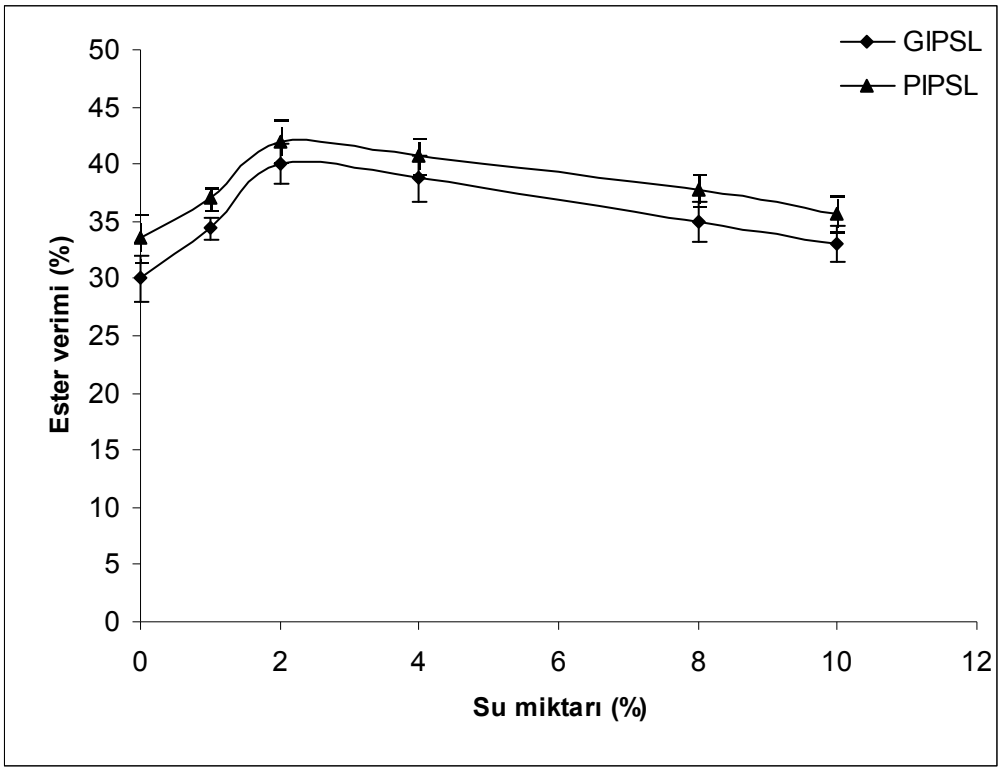


Şekil 4.46.GIMML ve PIMML'nin p-nitrofenil palmitat hidrolizi için tekrar kullanım sayısına bağlı olarak aktivitesindeki değişim.

4.1.3.İmmobilize *Pseudomonos sp.* ve *Mucor miehei* Lipazların L-Askorbil Palmitat Sentezinde Kullanımı

4.1.3.1.Florisile Glutaraldehit veya Polisüksinimid Ara Kolu Üzerinden İmmobilize Edilmiş Olan *Pseudomonos sp.* Lipazının L-Askorbil Palmitat Sentezi İçin Maksimum Aktivite Gösterdiği Koşulların ve Tekrar Kullanım Kararlılıklarının Belirlenmesi

GIPSL veya PIPSL kullanılarak gerçekleştirilen L-Askorbil palmitat sentezinde reaksiyon ortamına eklenen su miktarının sentez veriminine etkisi Şekil 4.47' de verilmiştir.

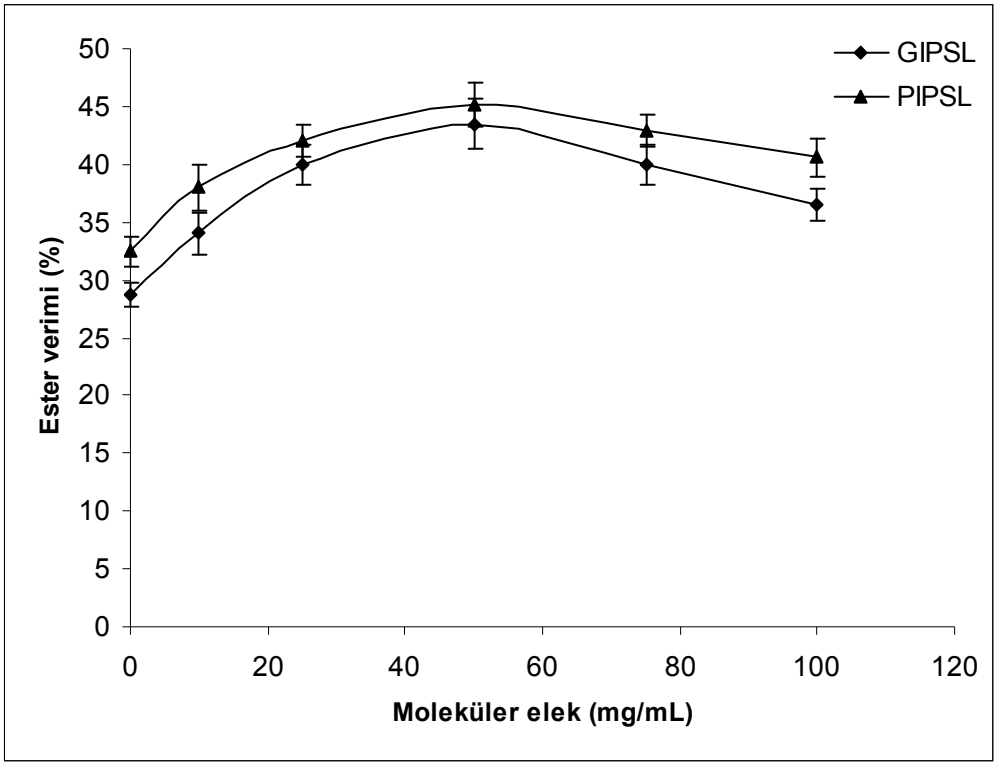


Şekil 4.47.GIPSL ve PIPSL için L-Askorbil palmitat veriminin ortamda bulunan su miktarına bağlı olarak değişimi.

Şekil 4.47'den görüleceği gibi GIPSL ve PIPSL için optimum su miktarı % 2 olarak bulunmuştur. Bu değerde elde edilen L-Askorbil palmitat verimi GIPSL ve PIPSL için sırasıyla % 40 ve 42 olarak bulunmuştur. Reaksiyon ortamında bulunan

su miktarı % 2'den % 10'a çıkartıldığında GIPSL ve PIPSL için L-Askorbil palmitat verimleri azalmış ve sırasıyla % 33 ve %35,7 olarak bulunmuştur.

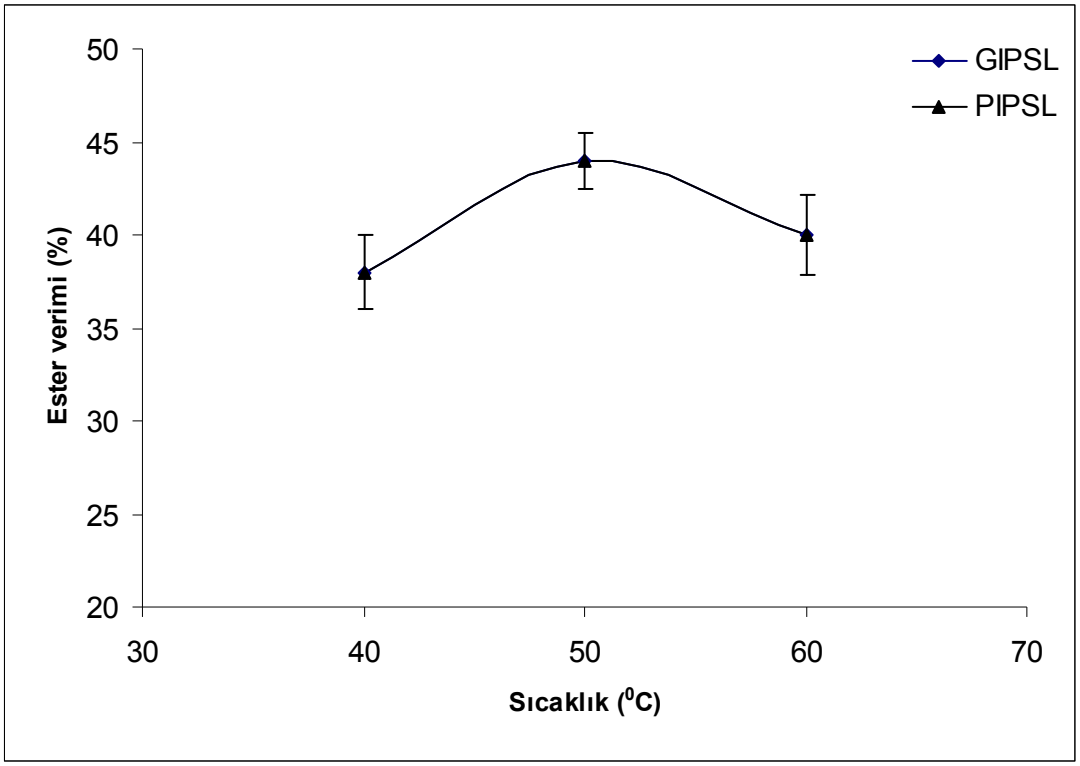
L-Askorbil palmitat sentezi sırasında açığa çıkan suyun tutulması amacıyla reaksiyon ortamına farklı miktarlarda moleküler elek eklenmiş (0-100 mg) ve L-Askorbil palmitat sentezinde kullanılacak optimum moleküler elek miktarı belirlenmeye çalışılmıştır. Sonuçlar Şekil 4.48'de gösterilmiştir.



Şekil 4.48.GIPSL ve PIPSL için L-Askorbil palmitat veriminin ortamda bulunan moleküler elek miktarına bağlı olarak değişimi.

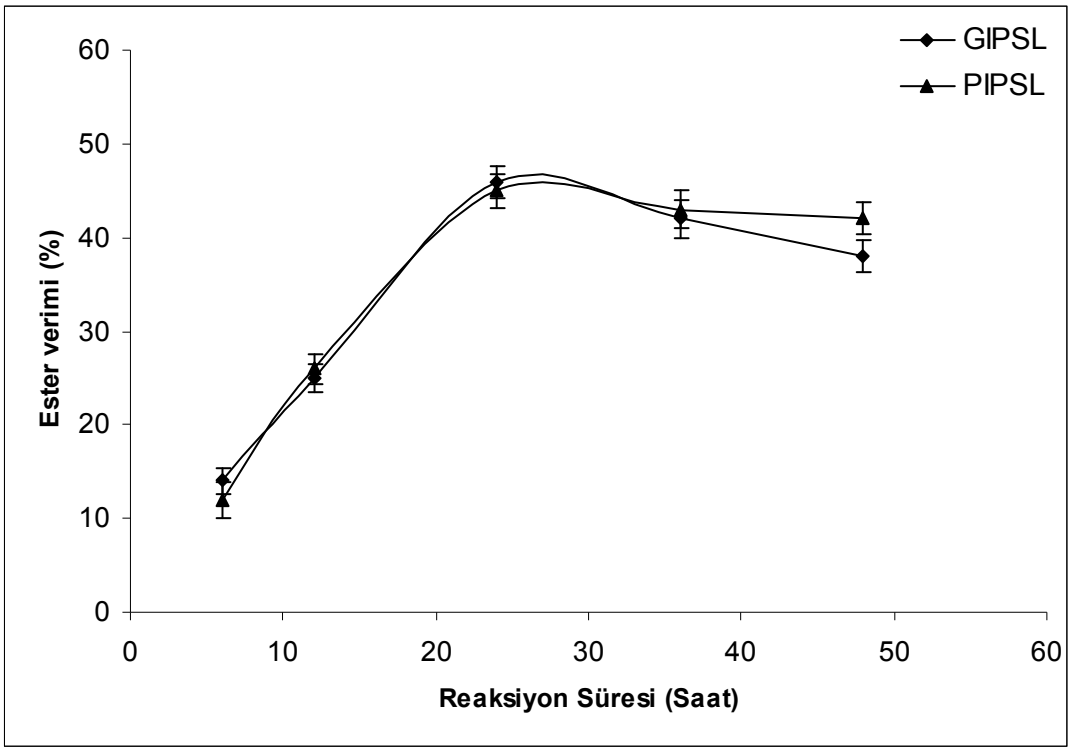
Reaksiyon ortamına hiç moleküler elek eklenmediği durumda L-Askorbil palmitat verimi GIPSL ve PIPSL için sırasıyla % 28,7 ve 32,5 olarak bulunmuştur. Şekil 4.48'den de görüleceği gibi reaksiyon ortamında bulunan moleküler elek miktarı artırıldığında L-Askorbil palmitat verimleri artmış ve 50 mg/mL moleküler elek derişiminde maksimuma ulaşmıştır. Bu değerde elde edilen L-Askorbil palmitat verimi GIPSL ve PIPSL preparatları için sırasıyla % 43,5 ve %45,2 olarak bulunmuştur. Moleküler elek miktarının daha fazla artırılması (100 mg/mL) L-Askorbil palmitat verimlerinde azalmaya neden olduğu belirlenmiştir.

Reaksiyon sıcaklığının L-Askorbil palmitat verimine etkisini araştırmak amacıyla %2 su ve 50 mg/mL moleküler elek içeren ortamda 40-60 ºC arasında L-Askorbil palmitat sentezleri yapılmıştır. Şekil 4.49'dan görüldüğü gibi GIPSL ve PIPSL için benzer sıcalık profili elde edilmiştir. GIPSL ve PIPSL için maksimum verime 50 ºC'de yapılan sentez sonucunda ulaşılmıştır ve L-Askorbil palmitat verimi bu sıcaklıkta GIPSL ve PIPSL için sırasıyla % 44 ve %45 olarak belirlenmiştir.



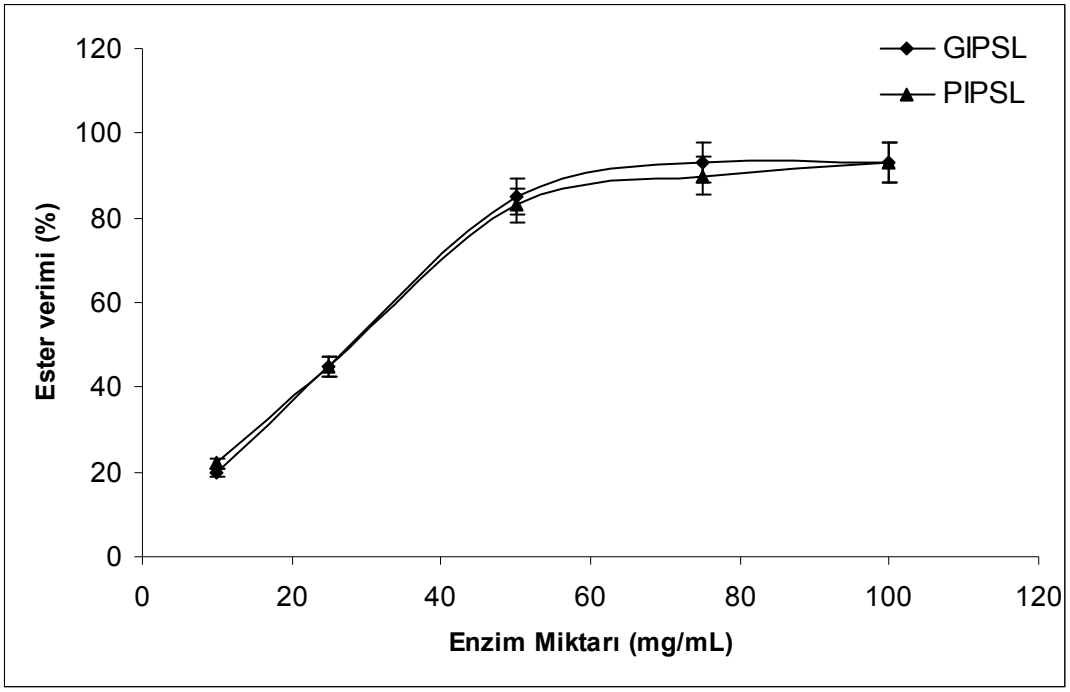
Şekil 4.49.GIPSL ve PIPSL için L-Askorbil palmitat veriminin reaksiyon sıcaklığına bağlı olarak değişimi.

Reaksiyon süresinin L-Askorbil palmitat sentezi verimine etkisi belirlenen optimum koşullarda farklı reaksiyon süreleri (6-48 saat) için araştırılmıştır. 6 saat reaksiyon süresi sonunda her iki immobilize enzim için yaklaşık % 12'lik bir verime ulaşılmıştır. Reaksiyon süresinin 24 saate çıkartılması L-Askorbil palmitat veriminde artışa neden olmuş ve her ikisi içinde yaklaşık % 45' lik bir verime ulaşılmıştır. Reaksiyon süresinin daha da artılması L-Askorbil palmitat veriminde bir düşmeye neden olmuştur. Bu yüzden GIPSL ve PIPSL için optimum reaksiyon süresi 24 saat olarak belirlenmiştir (Şekil 4.50).



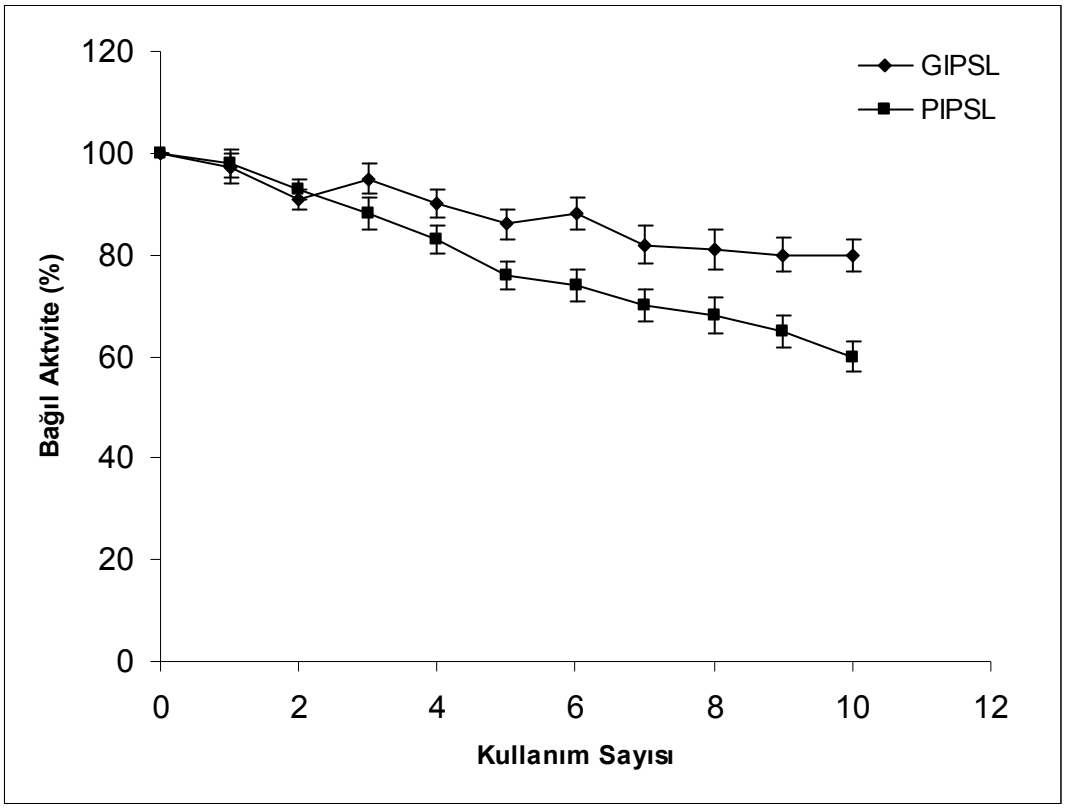
Şekil 4.50.GIPSL ve PIPSL için L-Askorbil palmitat veriminin reaksiyon süresine bağlı olarak değişimi.

Ortama eklenen enzim miktarının L-Askorbil palmitat verimine etkisi, belirlenen optimum koşullarda, farklı miktarlarda (10-100 mg) GIPSL ve PIPSL kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar Şekil 4.51'de verilmiştir. GIPSL ve PIPSL miktarının artırılmasının L-Askorbil palmitat verimini önemli bir ölçüde değiştirdiği bulunmuştur. GIPSL ve PIPSL için ortamda bulanan immobilize enzim miktarının 10 mg'dan 50 mg'a çıkartılması L-Askorbil palmitat verimini yaklaşık % 20'den % 80'e çıkartmıştır. Ortamda bulunan GIPSL ve PIPSL miktarının 100 mg'a kadar çıkartılması L-Askorbil palmitat veriminde hafif bir artışa neden olmuş ve her iki immobilize enzim preparatı için yaklaşık % 93'lük bir verime ulaşılmıştır.



Şekil 4.51.Kullanılan immobilize GIPSL ve PIPSL miktarının L-Askorbil palmitat verimine etkisi.

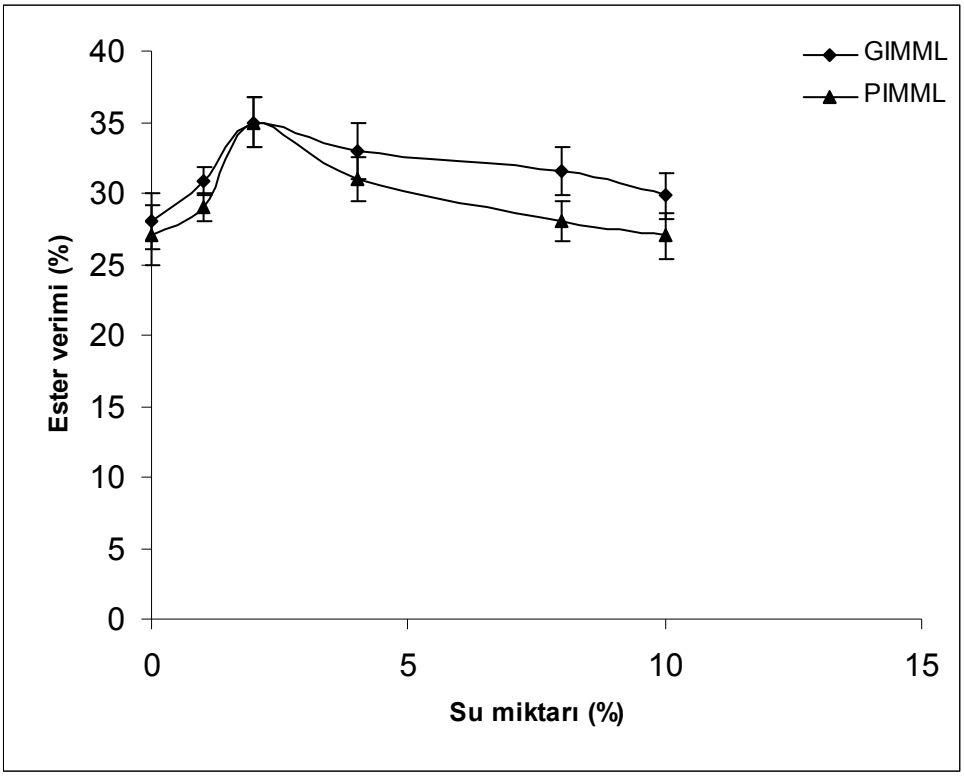
GIPSL ve PIPSL lipazlarının L-Askorbil palmitat sentezi için tekrar kullanım kararlılığı Şekil 4.52'de verilmiştir. GIPSL lipazının 10 kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin %80'nını koruduğu belirlenirken PIPSL lipazının aynı şartlarda başlangıç aktivitesinin % 60'ını koruduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.52.L-Askorbil palmitat sentezi için GIPSL ve PIPSL örneklerinin tekrar kullanım kararlılıklarının belirlenmesi.

4.1.3.2. Florisile Glutaraldehit veya Polisüksinimid Ara Kolu Üzerinden İmmobilize Edilmiş Olan *Mucor miehei* Lipazının L-Askorbil Palmitat Sentezi İçin Maksimum Aktivite Gösterdiği Koşulların ve Tekrar Kullanım Kararlılıklarının Belirlenmesi

L-Askorbil palmitat verimine reaksiyonda kullanılan başlangıç su miktarının etkisini araştırmak için reaksiyon ortamına toplam reaksiyon hacminin % 1 ile %10 arasında su eklenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.53'de verilmiştir.

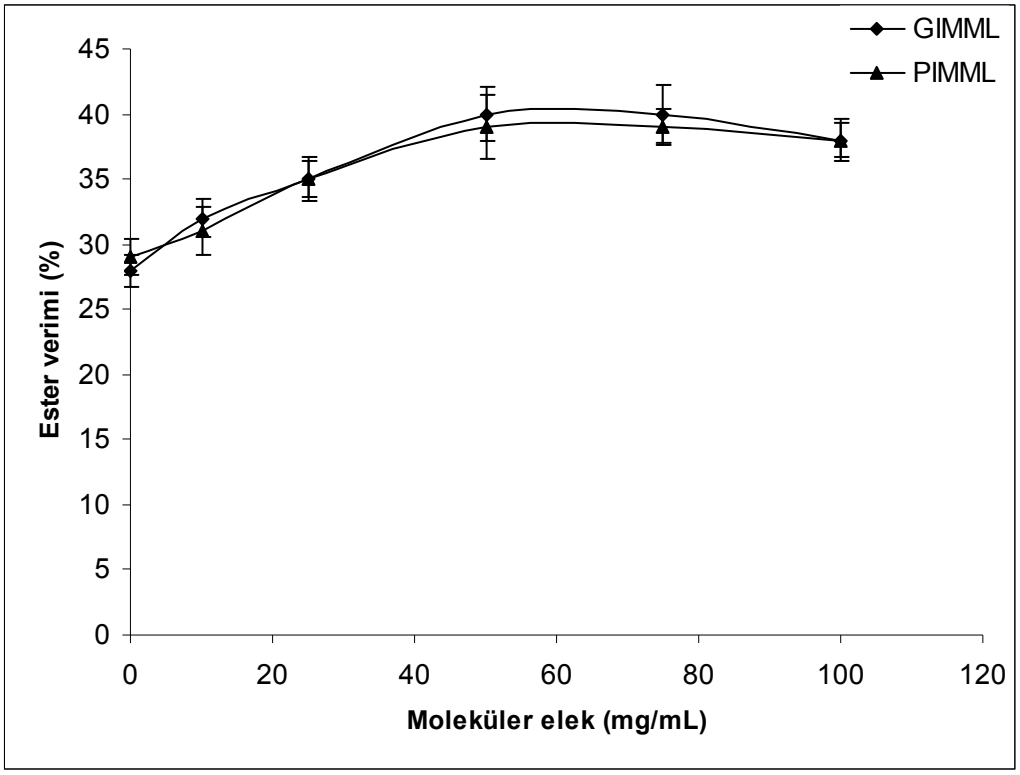


Şekil 4.53.GIMML ve PIMML için L-Askorbil palmitat veriminin ortamda bulunan su miktarına bağlı olarak değişimi.

Reaksiyon ortamına hiç su eklenmediği durumda GIMML ve PIMML için L-Askorbil palmitat verimi sırasıyla % 28 ve % 27 olarak belirlenmiştir. Reaksiyon ortamındaki su miktarı % 2'ye çıkartıldığında ise GIMML ve PIMML'ın her ikisi için maksimum L-Askorbil palmitat verimine (%35) ulaşılmıştır. Reaksiyon ortamındaki su miktarının % 10'lara çıkartılması L-Askorbil palmitat veriminde bir azalmaya neden olmuş ve verim GIMML ve PIMML için sırasıyla %29,8 ve %

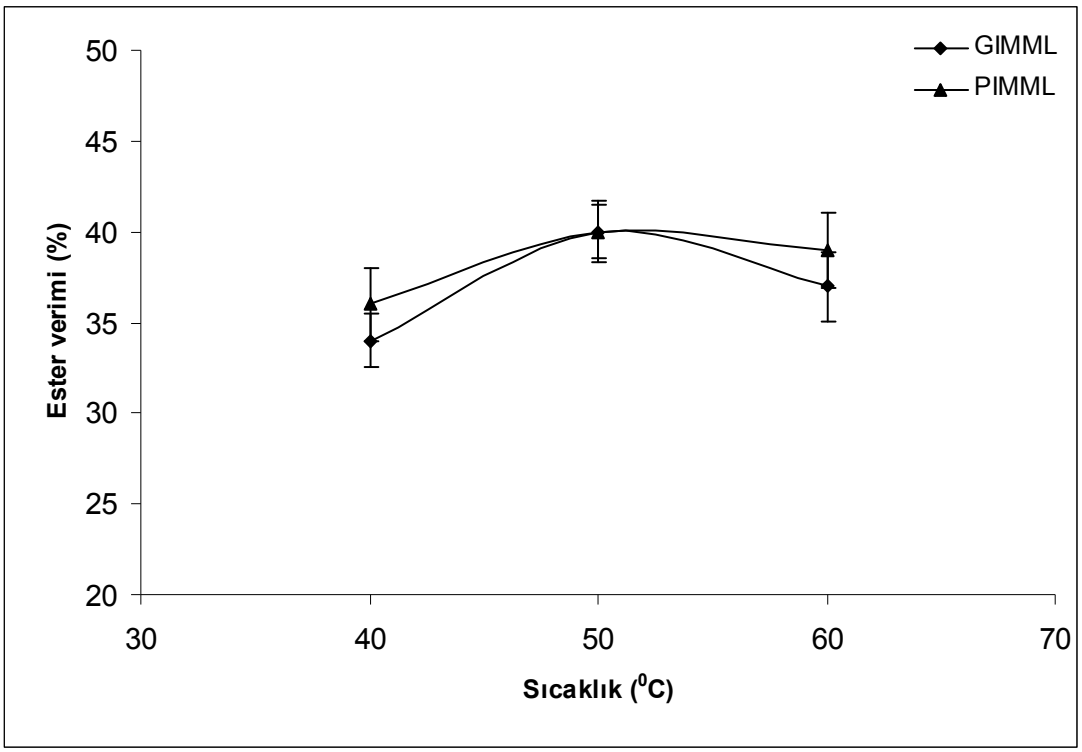
27'ye düşmüştür. Bu nedenle L-Askorbil palmitat sentezi için başlangıç su miktarı GIMML ve PIMML için % 2 olarak belirlenmiştir.

GIMML ve PIMML için ortama eklenen moleküler elek miktarının L-Askorbil palmitat verimine etkisi Şekil 4.54'de verilmiştir. GIMML ve PIMML'nin her ikisi için maksimum L-Askorbil palmitat verimine (%40) 50 mg/mL moleküler elek derişiminde ulaşılmıştır.



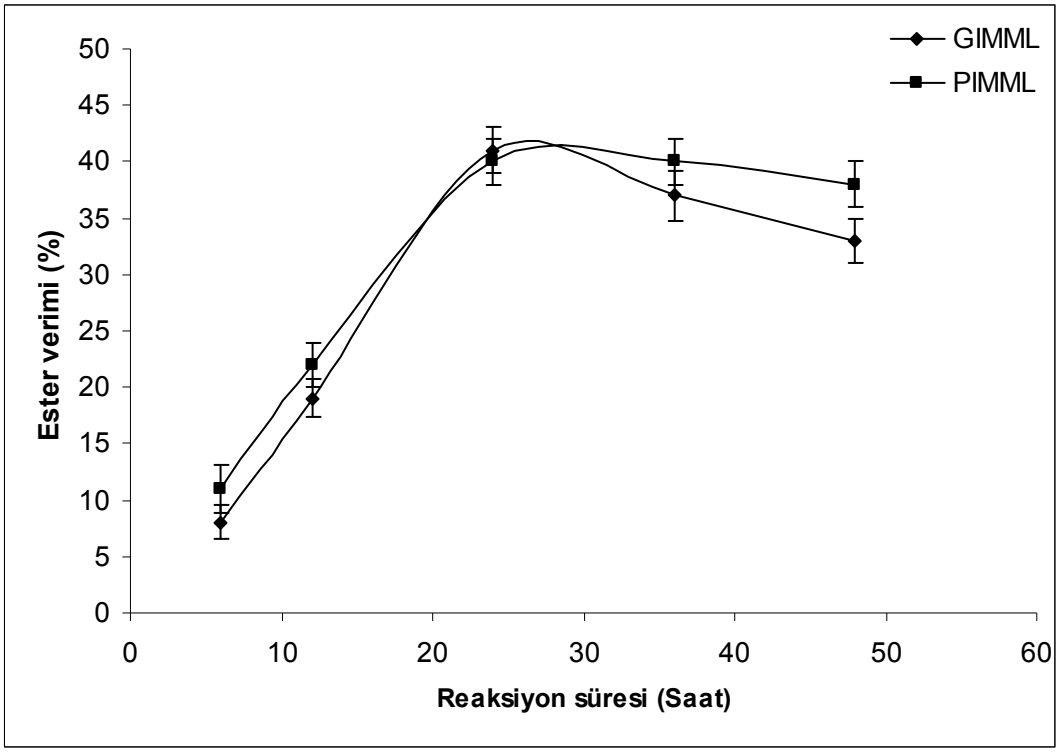
Şekil 4.54.GIMML ve PIMML için L-Askorbil palmitat veriminin ortamda bulunan moleküler elek miktarına bağlı olarak değişimi.

Şekil 4.55'den görüldüğü gibi GIMML ve PIMML için maksimum L-Askorbil palmitat verimine 50 ºC'de yapılan sentez sonucunda ulaşılmıştır ve L-Askorbil palmitat verimi bu sıcaklıkta GIMML ve PIMML için sırasıyla % 44 ve % 45 olarak belirlenmiştir.



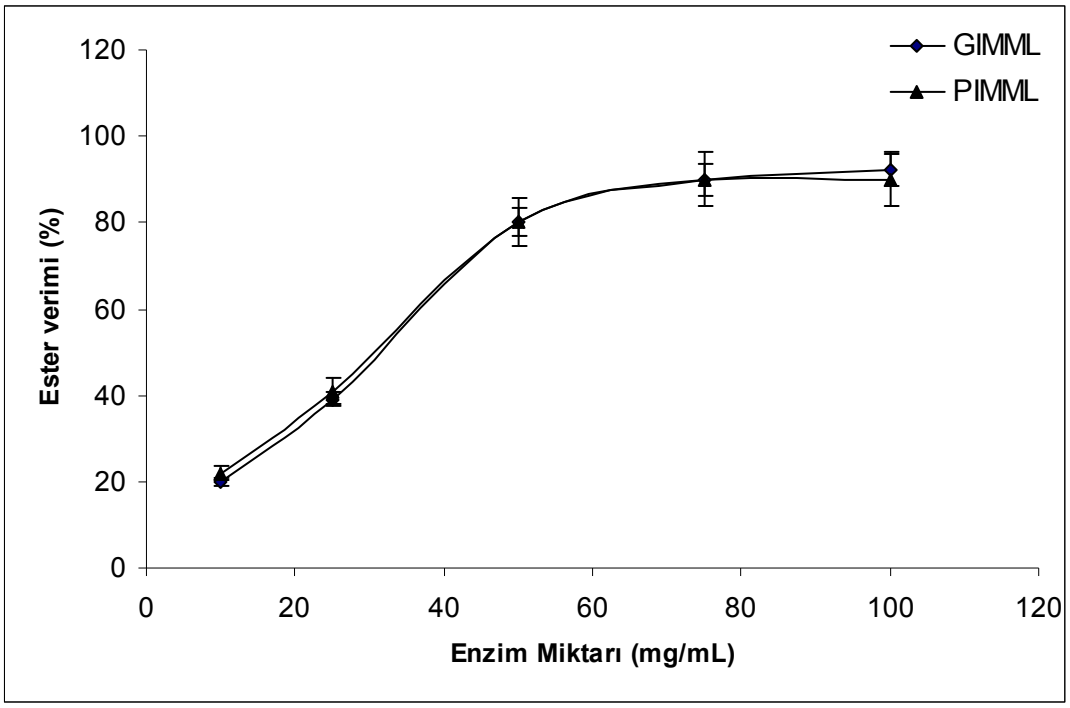
Şekil 4.55. GIMML ve PIMML için L-Askorbil palmitat veriminin reaksiyon sıcaklığına bağlı olarak değişimi.

Şekil 4.56'dan da görüleceği gibi 6 saat reaksiyon süresi sonunda GIMML ve PIMML için sırasıyla % 8 ve 11'lik bir L-Askorbil palmitat verimine ulaşılmıştır. 24 saat reaksiyon süresi sonunda GIMML ve PIMML için maksimum L-Askorbil palmitat verimine (%40) ulaşılmıştır. PIMML için reaksiyon süresinin 48 saate çıkartılmasının L-Askorbil palmitat veriminde anlamlı bir değişmeye neden olmadığı bulunmuştur. GIMML örneklerinin kullanıldığı durumda ise aynı şartlarda L-Askorbil palmitat veriminin % 41'den % 33'e düştüğü belirlenmiştir.



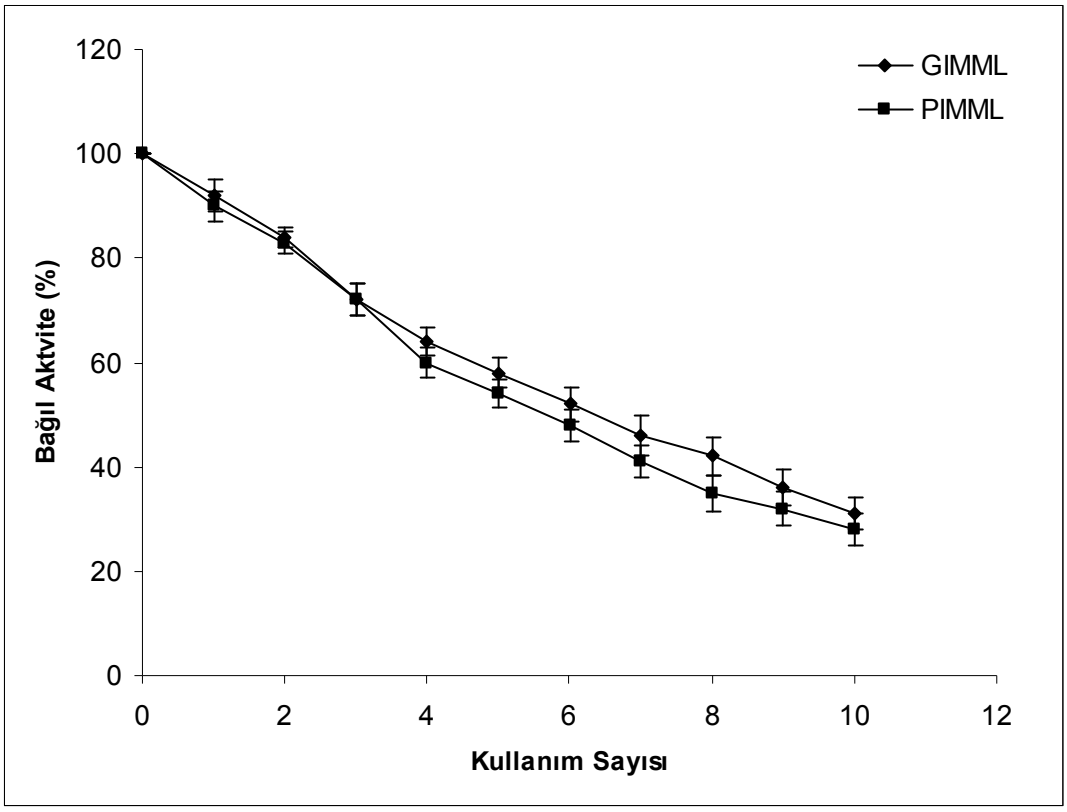
Şekil 4.56.GIMML ve PIMML için L-Askorbil palmitat veriminin reaksiyon süresine bağlı olarak değişimi.

Reaksiyonda kullanılan GIMML ve PIMML miktarlarının ester verimine etkisi Şekil 4.57'de gösterilmiştir. GIMML ve PIMML için ortamda bulanan immobilize enzim miktarının 10 mg'dan 50 mg'a çıkartılması L-Askorbil palmitat verimini her iki immobilize enzim örneği için yaklaşık % 20'den % 80'e yükselttiği belirlenmiştir. Reaksiyonda kullanılan GIMML ve PIMML miktarlarının 100 mg'a kadar çıkartılması durumunda ise her iki immobilize enzim örneği için yaklaşık % 90'lık bir ürün verimine ulaşıldığı belirlenmiştir.



Şekil 4.57. Kullanılan immobilize GIMML ve PIMML miktarının L-Askorbil palmitat verimine etkisi.

GIMML ve PIMML örneklerinin L-Askorbil palmitat sentezi için tekrar kullanım kararlılığı Şekil 4.58'de verilmiştir. GIMML örneklerinin 10 kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin %31'ini koruduğu belirlenirken PIMML örneklerinin aynı şartlarda başlangıç aktivitesinin % 28'ini koruduğu belirlenmiştir.



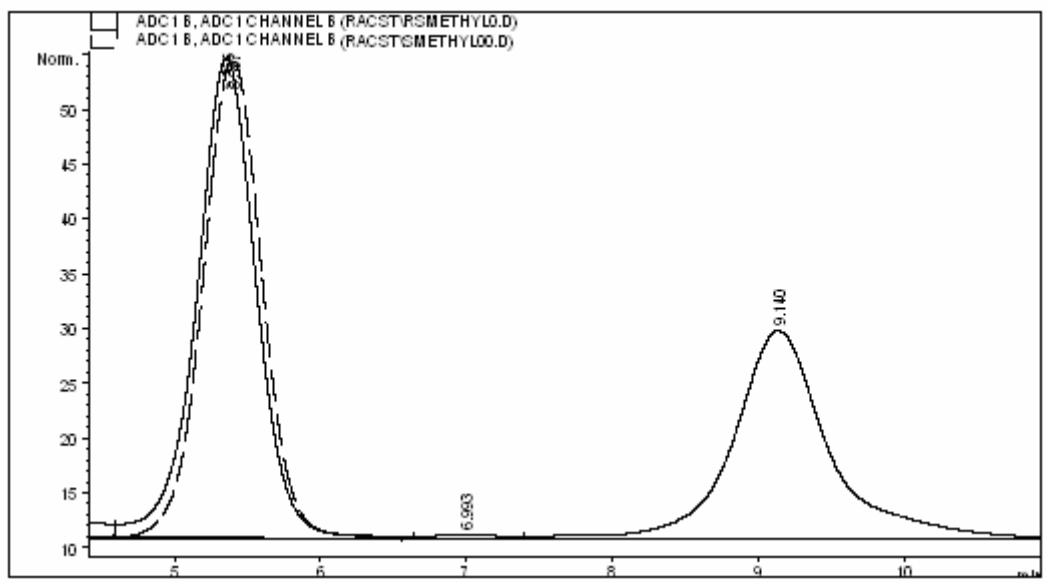
Şekil 4.58.L-Askorbil palmitat sentezi için GIMML ve PIMML lipazlarının tekrar kullanım kararlılığının belirlenmesi.

4.1.4.İmmobilize *Pseudomonas sp. ve Mucor miehei* Lipazlarının Rasemik Aminoalkollerin Kinetik Rezolusyonunda Kullanımı

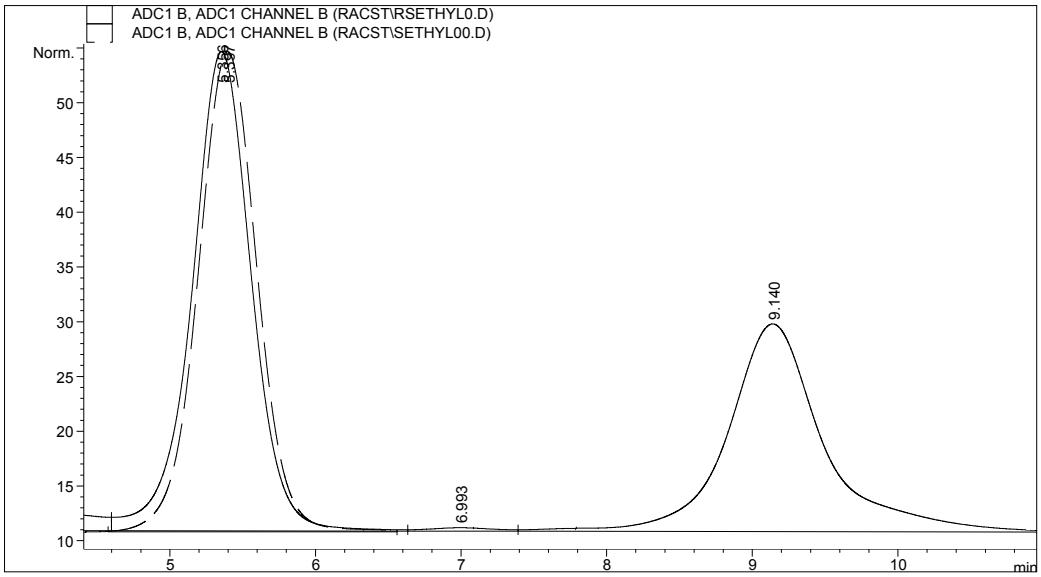
4.1.4.1. Rasemik Amino Alkollerin Non-Enzimatik Sentezi

Rasemik aminoalkollerin sentezinde sitiren oksitin primer aminler ile reaksiyonundan yararlanılmıştır.Sentezlenen aminoalkoller yüksek verim (%99) ile elde edilmiştir. Sentezlenen 2-(metilamino)-1-feniletanol, 2-(etilamino)-1-feniletanol, 2-(propilamino)-1-feniletanol, 2-(allilamino)-1-feniletanol, 2-

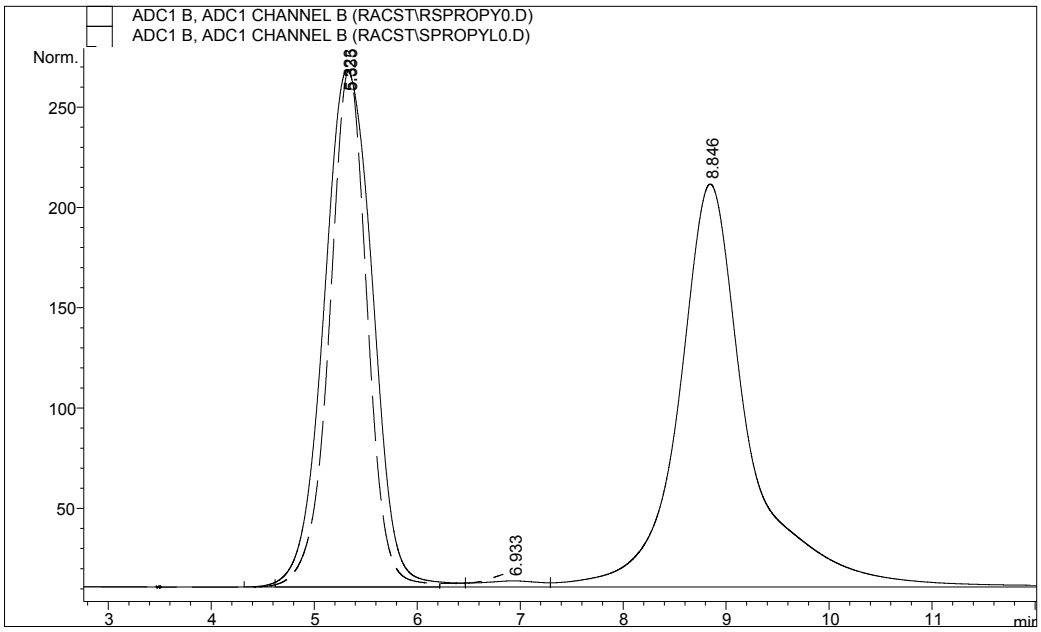
(butilamino)-1-feniletanol ve 2-(hekzilamino)-1-feniletanol kiral HPLC ile ilgili ayırım sonuçları sırasıyla Şekil 4.59-64'de gösterilmiştir.



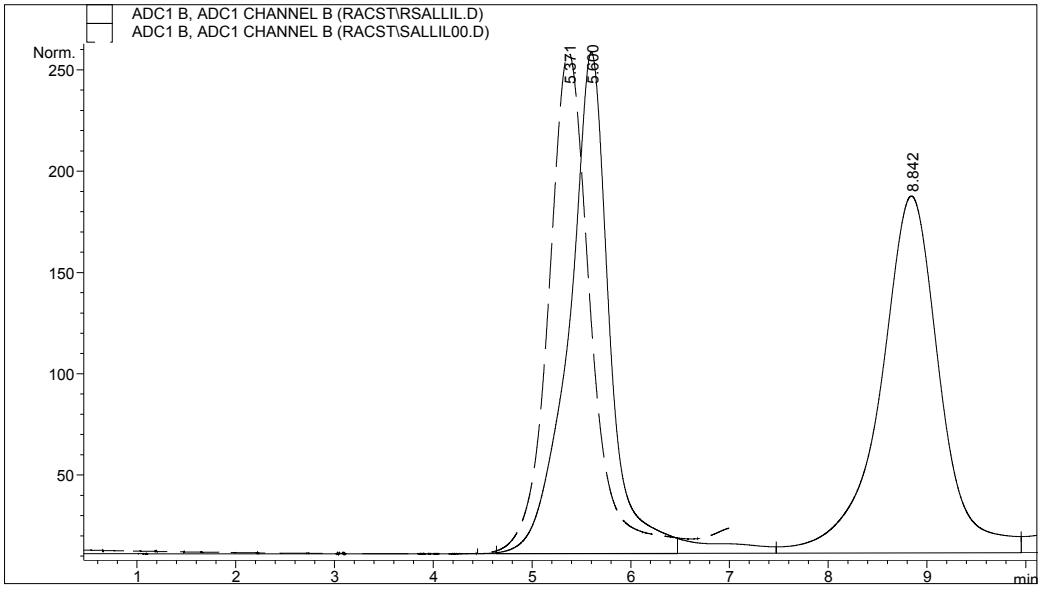
Şekil 4.59. Rasemik 2-(metilamino)-1-feniletanol'ün kiral HPLC kromatogramı.



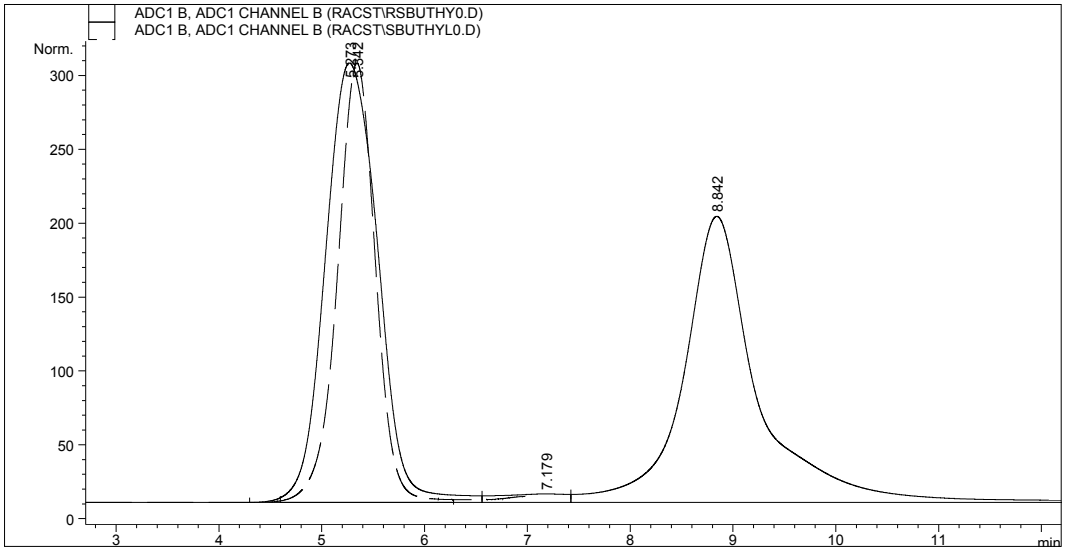
Şekil 4.60. Rasemik 2-(etilamino)-1-feniletanol'ün kiral HPLC kromatogramı.



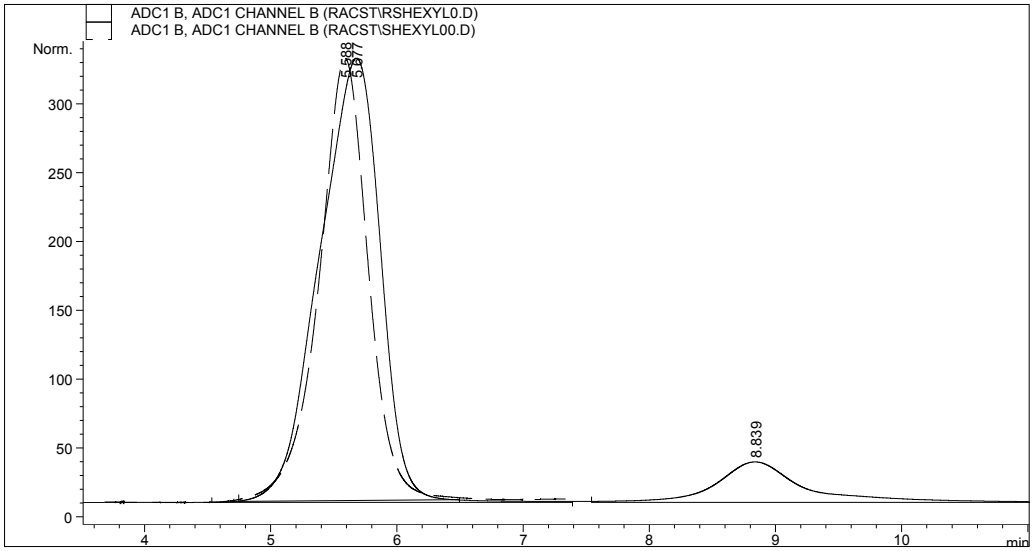
Şekil 4.61. Rasemik 2-(propilamino)-1-feniletanol'ün kiral HPLC kromatogramı.



Şekil 4.62. Rasemik 2-(allilamino)-1-feniletanol'ün kiral HPLC kromatogramı.



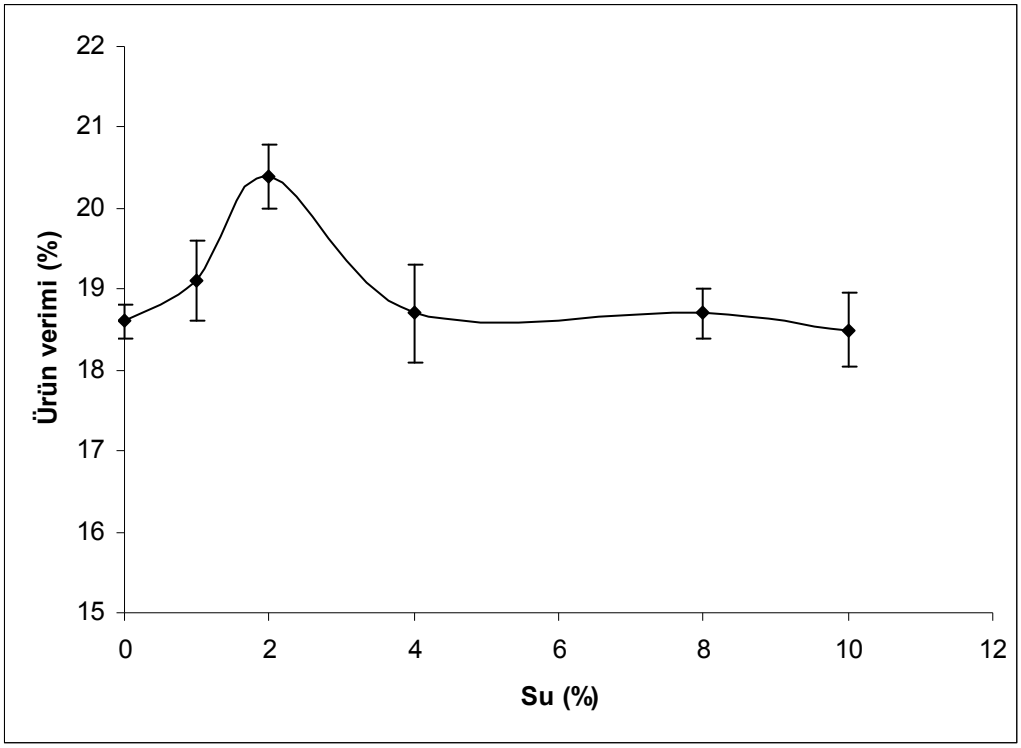
Şekil 4.63. Rasemik 2-(butilamino)-1-feniletanol'ün kiral HPLC kromatogramı.



Şekil 4.64. Rasemik 2-(hekzilamino)-1-feniletanol'ün HPLC kromatogramı.

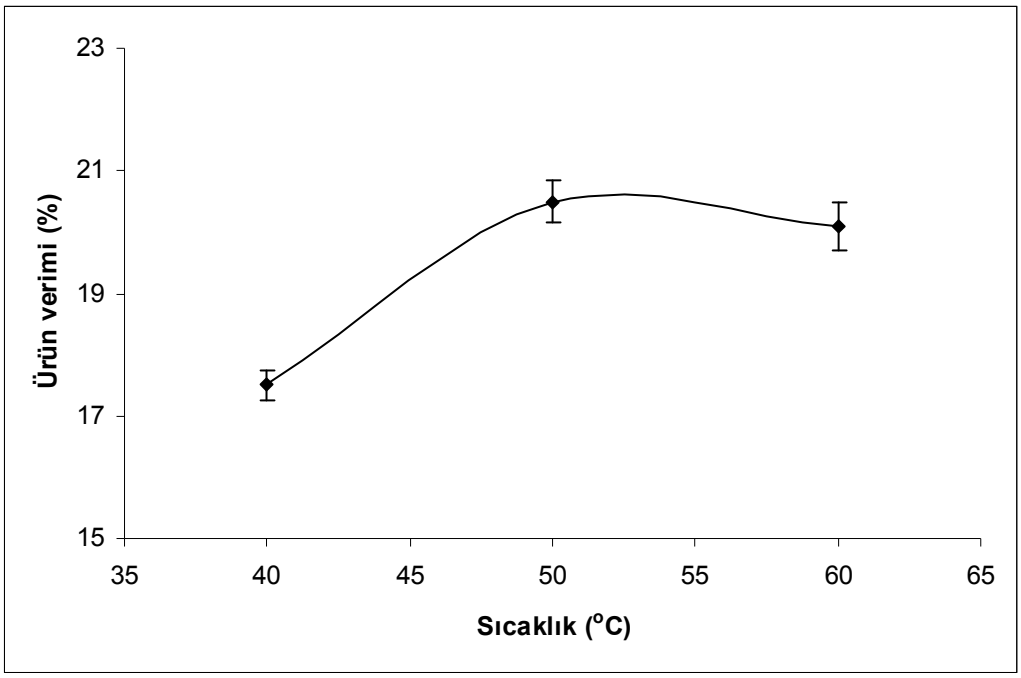
4.1.4.2. Florisile Glutaraldehit veya Polisüksinimid Ara Kolu Üzerinden İmmobilize Edilmiş Olan *Pseudomonos sp.* Lipazının Rasemik Amino Alkollerin Kinetik Rezolusyonu İçin Maksimum Aktivite Gösterdiği Koşulların Belirlenmesi

İmmobilize *Pseudomonas sp.* lipazları için rasemik aminoalkollerin kinetik rezolusyonu için optimum koşullar GIPSL lipazı kullanılarak belirlenmiştir. Reaksiyon ortamına eklenen su miktarının optimizasyonu için reaksiyon ortamına % 0-10 arasında değişen miktarlarda su eklenmiştir. Şekil 4.65'den de görüldüğü gibi kinetik rezolusyon için optimum su miktarı % 2 (v/v) olarak belirlenmiş elde edilen ürün verimi ise % 20,4 olarak bulunmuştur.



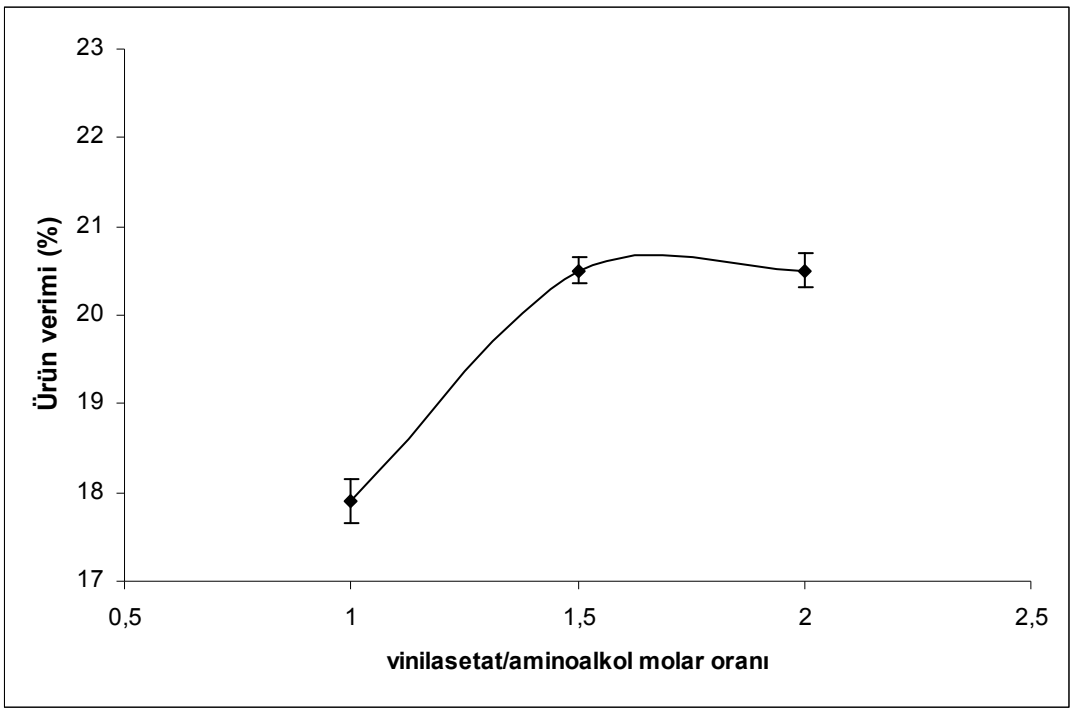
Şekil 4.65.GIPSL için rasemik 2-(etilamino)-1-feniletanol'ün kinetik rezolusyonuna ortamda bulunan su miktarının etkisi.

Kinetik rezolusyon için optimum sıcaklığın belirlenmesinde %2 su miktarında farklı sıcaklıklarda (40-60 ºC) reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.66'dan görüleceği gibi reaksiyon sıcaklığının 40 ºC'den 50 ºC'ye çıkartılması reaksiyon verimini %17,5'dan 20,5'e yükseltmiştir. Reaksiyon sıcaklığının 50 ºC'den 60 ºC'ye çıkartılmasının ise ürün verimini anlamlı bir ölçüde değiştirmediği belirlenmiştir.



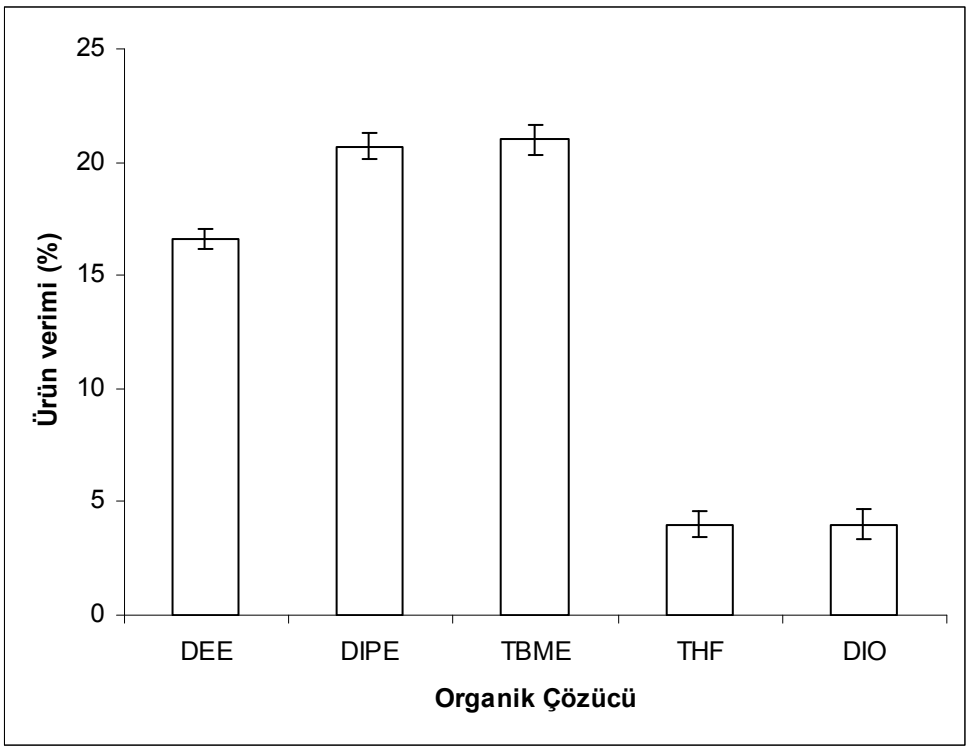
Şekil 4.66.GIPSL için rasemik 2-(etilamino)-1-feniletanol'ün kinetik rezolusyonuna reaksiyon sıcaklığının etkisi.

Ürün verimine vinil asetat/amino alkol molar oranının etkisini belirlemek için %2 su ve 50 ºC'de vinil asetat/amino alkol molar oranı 1/1, 1,5/1 ve 2/1 şeklinde değiştirilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.67'de gösterilmiştir. Başlangıç vinil asetat/amino alkol molar oranının 1/1'den 1,5/1 oranına çıkartılması ile ürün veriminin % 17,9'dan 20,5'e yükseldiği belirlenmiştir. Vinil asetat/amino alkol molar oranının 1,5/1'den 2/1'e çıkartıldığında ise ürün verimi açısından anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur.



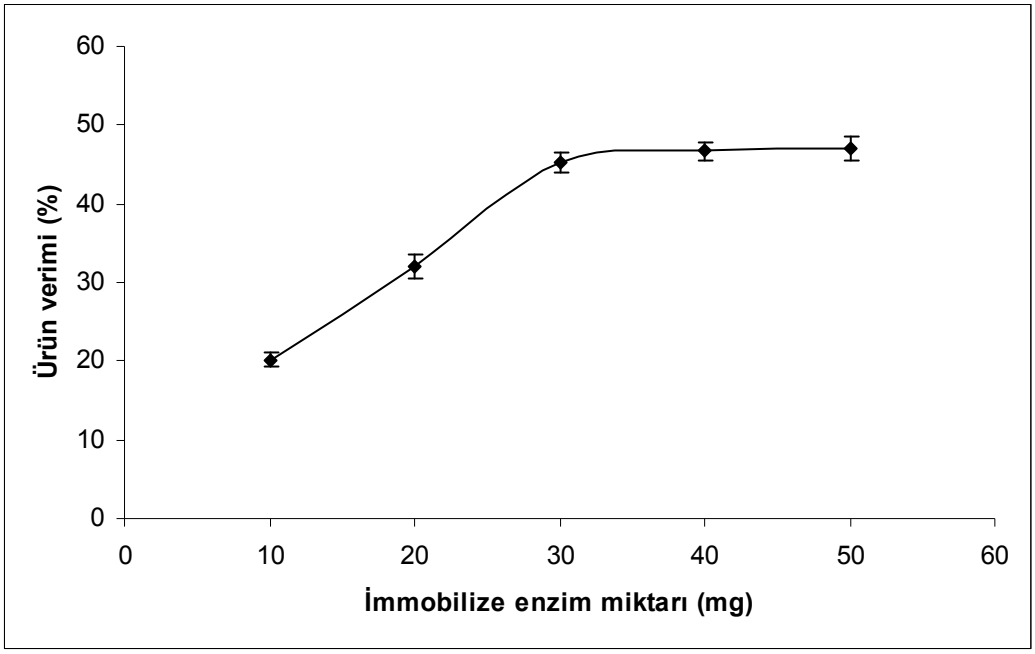
Şekil 4.67.GIPSL için rasemik 2-(etilamino)-1-feniletanol'ün kinetik rezolusyonuna vinil asetat/amino alkol molar oranının ürün verimine etkisi.

Reaksiyon ortamında kullanılan organik çözücülerin ürün verimine etkilerini incelemek için reaksiyon dietileter (DEE), diizopropil eter (DIPE), tert-butil metil eter (TBME), tetrahidrofuran (THF) ve dioksan (DIO) içerisinde gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.68'den de görüleceği gibi en fazla verim (% 21) TBME içerisinde gerçekleştirilen reaksiyonda elde edilmiştir. Reaksiyon ortamı olarak DIO ve terahidrofuran THF kullanıldığında ise reaksiyon veriminin keskin bir şekilde azaldığı ve % 4'lere düştüğü belirlenmiştir.



Şekil 4.68.GIPSL için rasemik 2-(etilamino)-1-feniletanol'ün kinetik rezolusyonuna reaksiyonda kullanılan organik çözücülerin etkisi.

Reaksiyonda kullanılan GIPSL miktarının reaksiyon verimine etkisini incelemek için GIPSL miktarı 10-50 mg arasında değiştirilmiştir. GIPSL miktarının 10 mg'dan 30 mg'a çıkartılması ürün verimini % 21 oranından %45 oranına yükselttiği belirlenmiştir. İmmobilize enzim miktarının 40 mg'a çıkartıldığında ise ürün verimi % 47 olmuştur (Şekil 4.69).

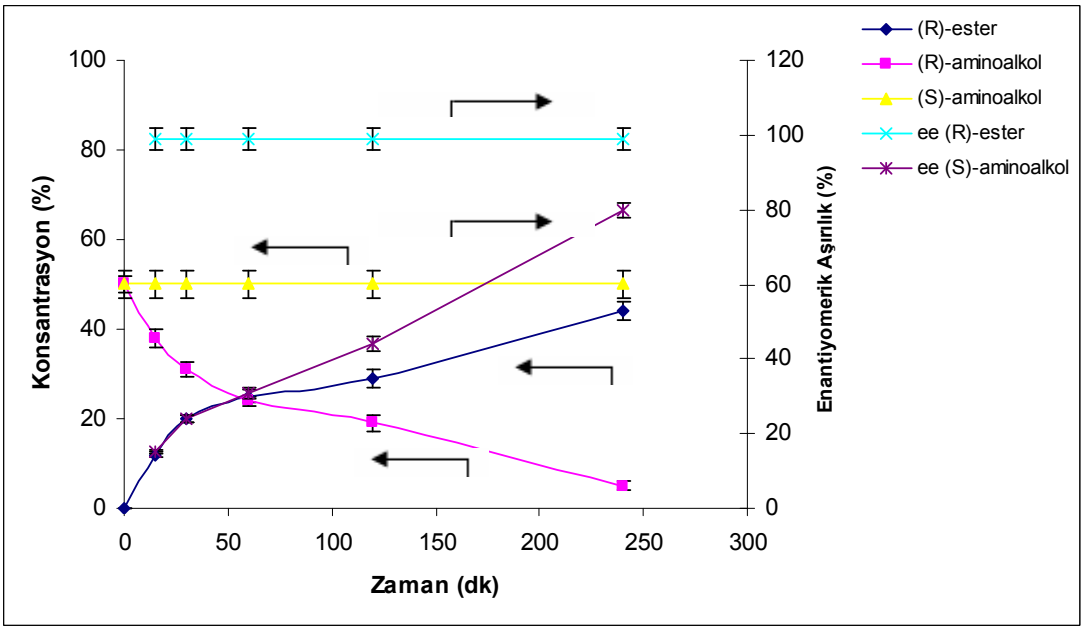


Şekil 4.69.GIPSL için rasemik 2-(etilamino)-1-feniletanol'ün kinetik rezolusyonuna reaksiyonda kullanılan immobilize enzim miktarının etkisi.

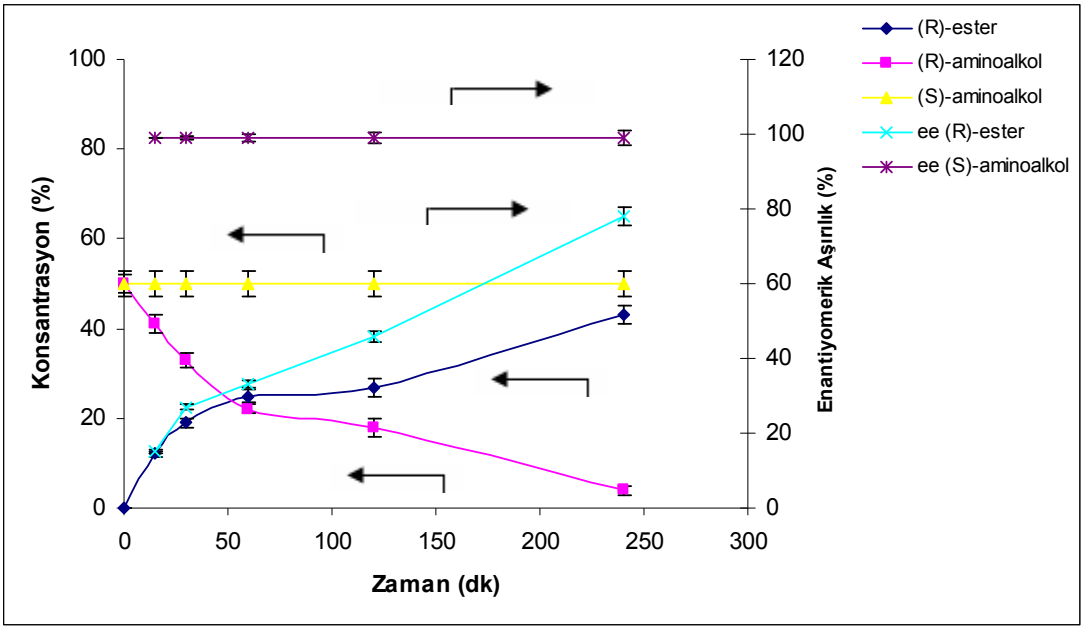
4.1.4.3. Florisile Glutaraldehit veya Polisüksinimid Ara Kolu Üzerinden İmmobilize Edilmiş Olan *Pseudomonos sp.* Lipazları ile Rasemik Amino Alkollerin Kinetik Rezolusyonda Ürün Verimi, Enantiyomerik Aşırılıkların ve Tekrar Kullanım Kararlılığının Belirlenmesi

Rasemik 2-(metilamino)-1-feniletanol'ün GIPSL ve PIPSL tarafından katalizlenen kinetik rezolusyonu daha önce belirlenen optimum koşullarda gerçekleştirilmiş HPLC analizlerine göre hesaplanan ürün verimleri ve enantiyomerik aşırılıklarla ilgili sonuçlar sırasıyla Şekil 4.70 ve 4.71'de verilmiştir.

GIPSL ve PIPSL örneklerinin katalizlediği reaksiyon sonunda reaksiyona daha hızlı giren (R)-2-(metilamino)-1-feniletanol'ün konsantrasyonunun zamanla azaldığı ve oluşan (R)-2-(metilamino)-1-feniletil asetatın konsantrasyonu ise zamanla arttığı belirlenmiştir. GIPSL ve PIPSL'nin her ikisi için 240 dakika reaksiyon süresi sonunda (R)-2-(metilamino)-1-feniletil asetat yaklaşık % 44 verimle ve % 99> enantiyomerik aşırılıkta elde edilmiştir. Reaksiyona girmeden kalan (S)-2-(metilamino)-1-feniletanol'ün konsantrasyonunda ise herhangi bir azalma gözlemlenmemiş ve 240 dakika reaksiyon süresi sonunda GIPSL ve PIPSL örnekleri için % 50 verim ve sırasıyla % 80 ve 78 enantiyomerik aşırılıkta elde edildiği belirlenmiştir. Enantiyomerik oran (E) ise GIPSL ve PIPSL için sırasıyla 251 ve 259 olarak hesaplanmıştır.

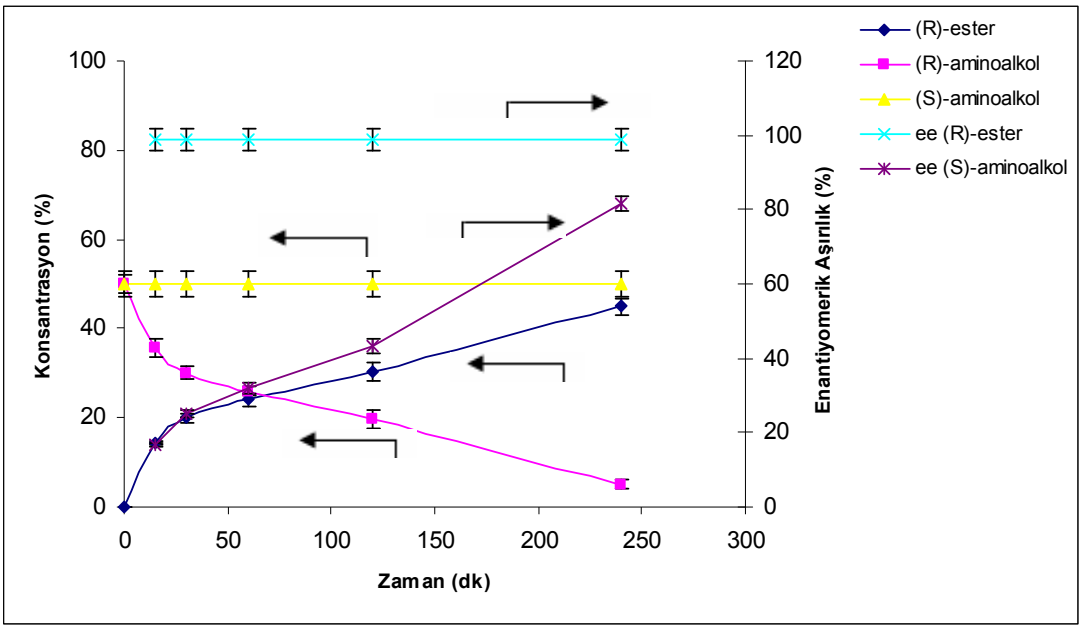


Şekil 4.70.GIPSL tarafından katalizlenen rasemik 2-(metilamino)-1-feniletanol'ün kinetik rezolusyonu.

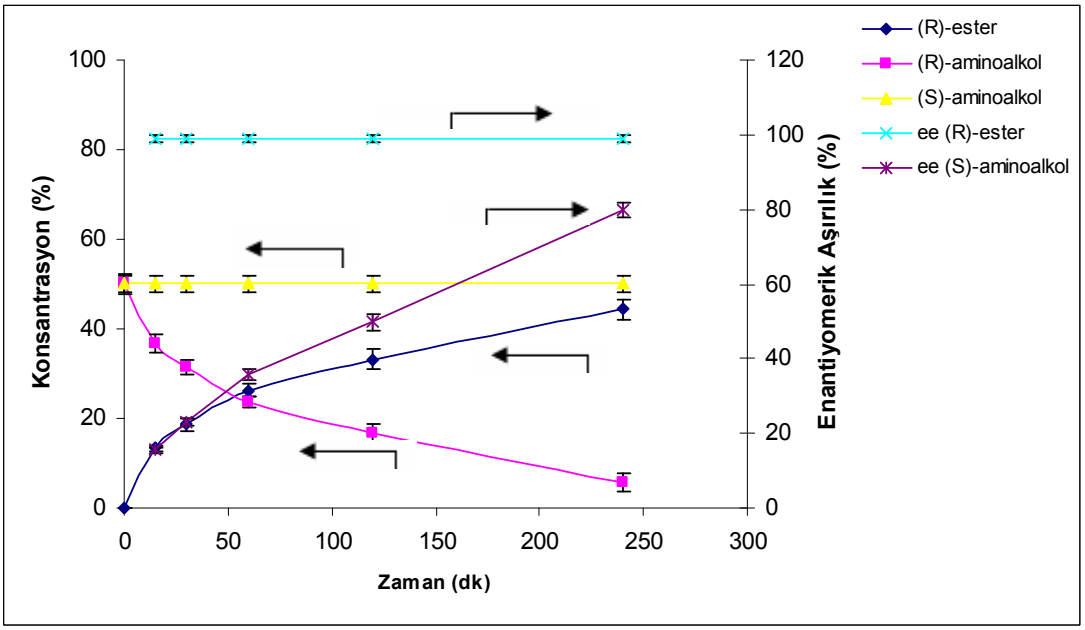


Şekil 4.71.PIPSL tarafından katalizlenen rasemik 2-(metilamino)-1-feniletanol'ün kinetik rezolusyonu.

Rasemik 2-(etilamino)-1-feniletanol'ün GIPSL ve PIPSL tarafından katalizlenen kinetik rezolusyonu daha önce belirlenen optimum koşullarda gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Şekil 4.72 ve 4.73'de verilmiştir.



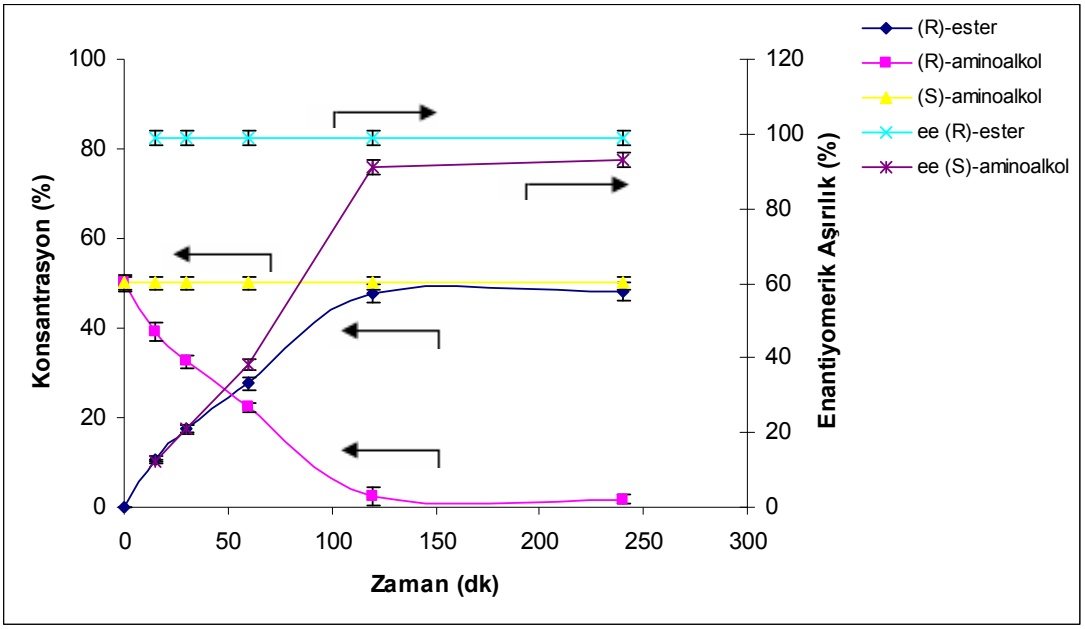
Şekil 4.72. GIPSL tarafından katalizlenen rasemik 2-(etilamino)-1-feniletanol'ün kinetik rezolusyonu.



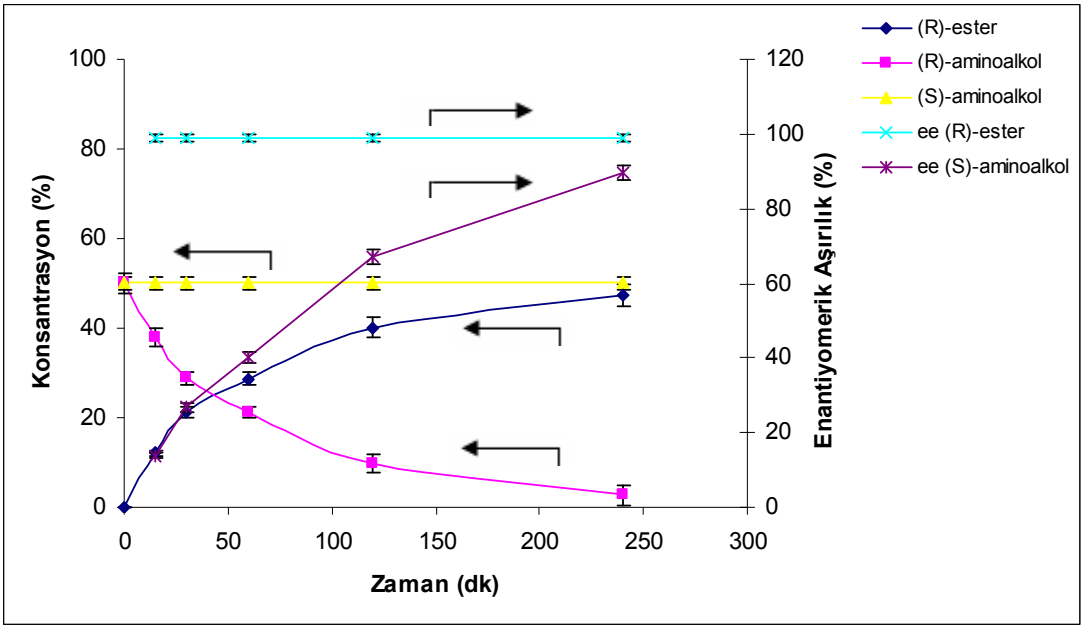
Şekil 4.73. PIPSL tarafından katalizlenen rasemik 2-(etilamino)-1-feniletanol'ün kinetik rezolusyonu.

GIPSL ve PIPSL'nin her ikisi için 240 dakika reaksiyon süresi sonunda (R)-2-(etilamino)-1-feniletil asetat yaklaşık % 45 verimle ve % 99> enantiyomerik aşırılıkta elde edilmiştir. Reaksiyona girmeden kalan (S)-2-(etilamino)-1-feniletanol'ün konsantrasyonunda ise herhangi bir azalma gözlemlenmemiş ve 240 dakika reaksiyon süresi sonunda her iki GIPSL ve PIPSL örnekleri için % 50 verim ve yaklaşık % 80 enantiyomerik aşırılıkta elde edildiği belirlenmiştir. E değerleri ise GIPSL ve PIPSL için sırasıyla 254 ve 235 olarak hesaplanmıştır.

Rasemik 2-(propilamino)-1-feniletanol'ün GIPSL ve PIPSL tarafından katalizlenen kinetik rezolusyonu Şekil 4.74 ve 4.75'de verilmiştir.



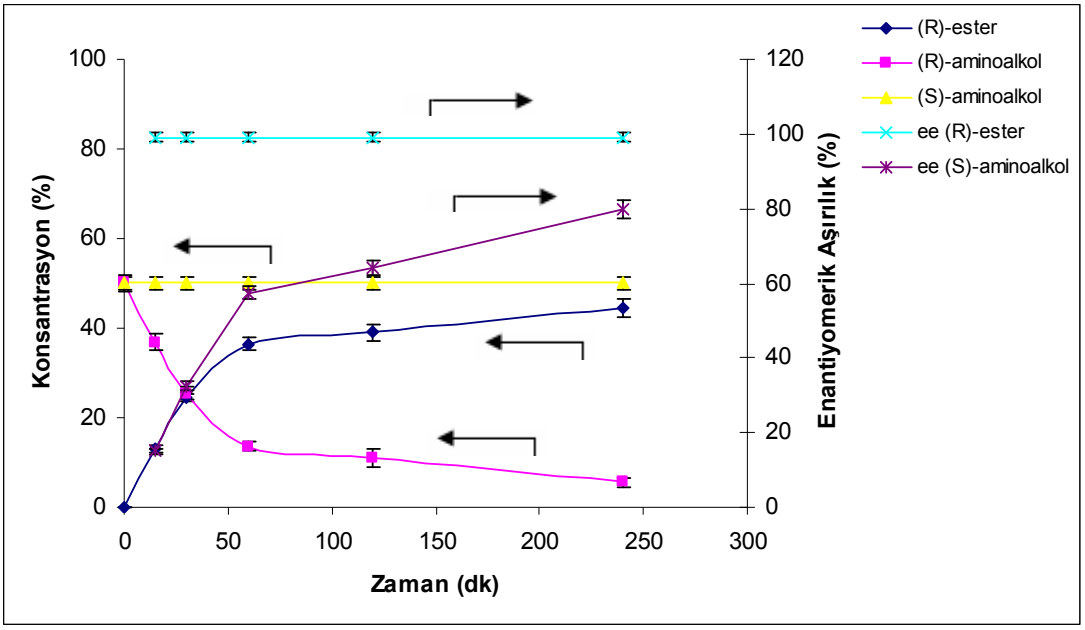
Şekil 4.74.GIPSL tarafından katalizlenen rasemik 2-(propilamino)-1-feniletanol'ün kinetik rezolusyonu.



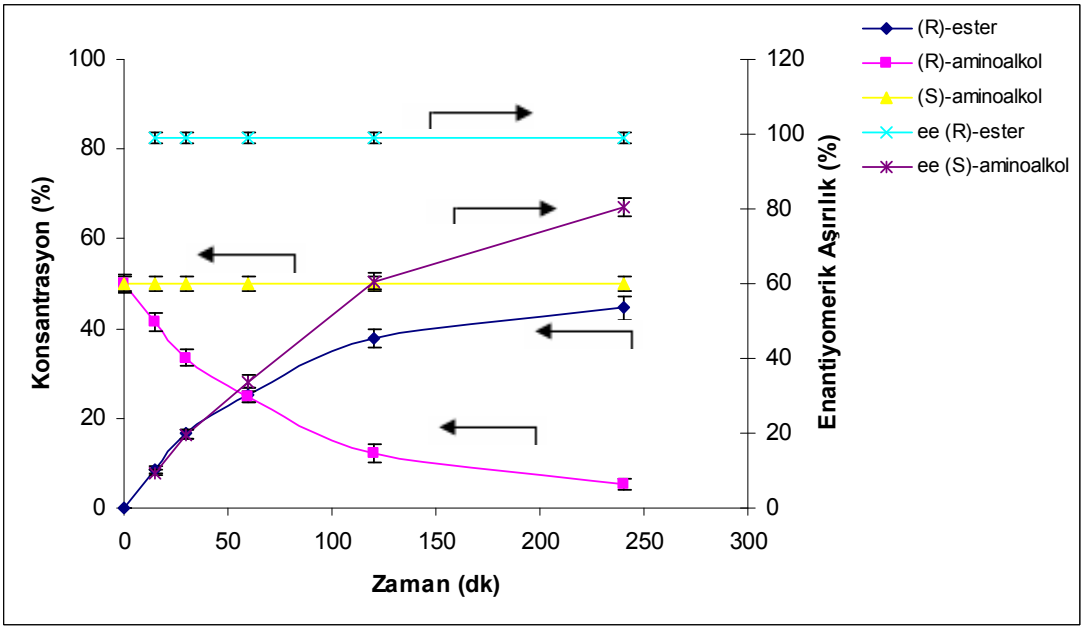
Şekil 4.75.PIPSL tarafından katalizlenen rasemik 2-(propilamino)-1-feniletanol'ün kinetik rezolusyonu.

GIPSL ve PIPSL immobilize lipazları tarafından katalizlenen reaksiyon ile 240 dakika reaksiyon süresi sonunda (R)-2-(propilamino)-1-feniletil asetat GIPSL ve PIPSL için sırasıyla % 48 verim ve % 99> enantiyomerik aşırılık, % 46 verim ve % 99> enantiyomerik aşırılıkta elde edilmiştir. (S)-2-(propilamino)-1-feniletanol ise 240 reaksiyon süresi sonunda GIPSL ve PIPSL preparatları için %50 verim ve sırasıyla % 93 ve 86 enantiyomerik aşırılıkta elde edildiği belirlenmiştir. E değerleri ise GIPSL ve PIPSL için sırasıyla 244 ve 242 olarak hesaplanmıştır.

Rasemik 2-(allilamino)-1-feniletanol'ün GIPSL ve PIPSL tarafından katalizlenen kinetik rezolusyonu Şekil 4.76 ve 4.77'de verilmiştir.



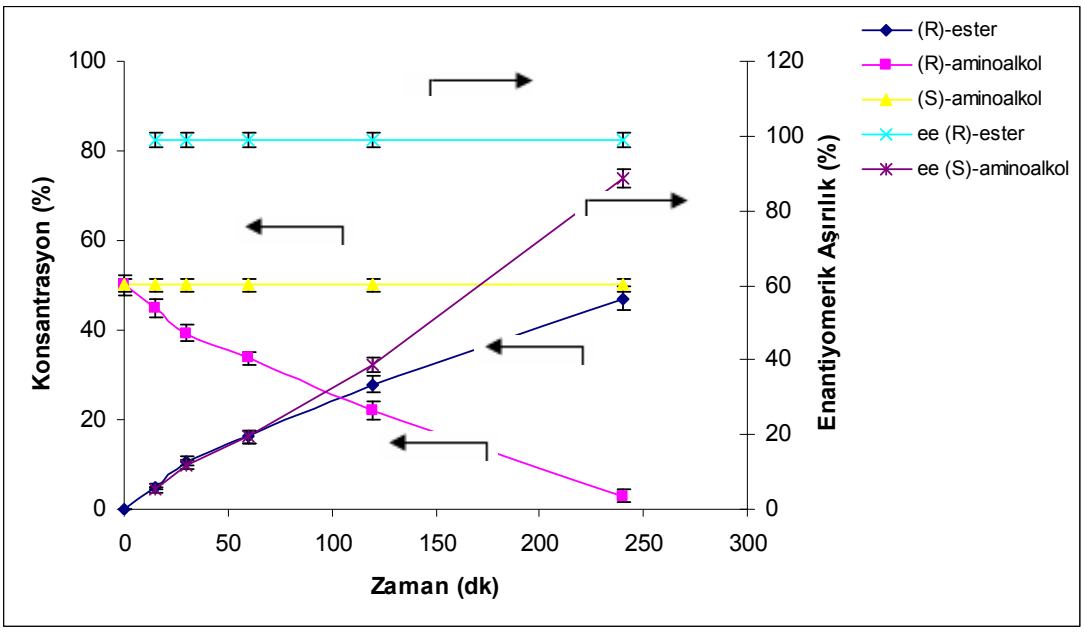
Şekil 4.76.GIPSL tarafından katalizlenen rasemik 2-(allilamino)-1-feniletanol'ün kinetik rezolusyonu.



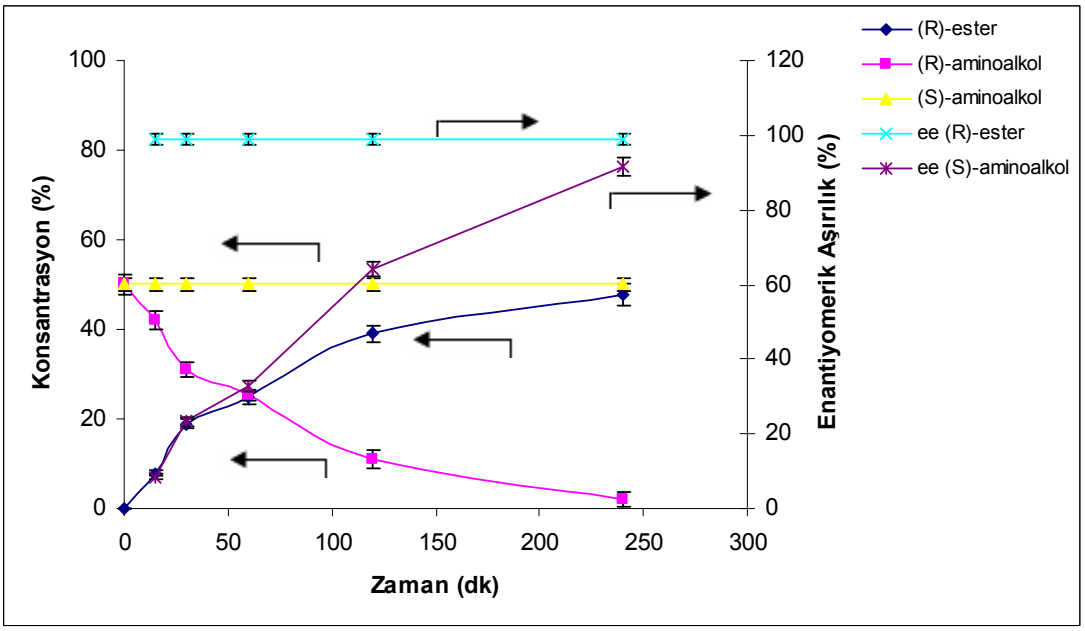
Şekil 4.77.PIPSL tarafından katalizlenen rasemik 2-(allilamino)-1-feniletanol'ün kinetik rezolusyonu.

GIPSL ve PIPSL örnekleri ile gerçekleştirilen kinetik rezolusyon ile 240 dakika reaksiyon süresi sonunda (R)-2-(allilamino)-1-feniletil asetat her iki enzim preparatı için yaklaşık % 44,5 verim ve % 99> enantiyomerik aşırılıkta elde edilmiştir. Yine (S)-2-(allilamino)-1-feniletanol'ün reaksiyona hiç girmediği ve reaksiyon sonunda her iki preparat için % 50 verim ve yaklaşık % 80 enantiyomerik aşırılıkta elde edildiği belirlenmiştir. E değerleri ise GIPSL ve PIPSL örnekleri için sırasıyla 272 ve 242 olarak hesaplanmıştır.

GIPSL ve PIPSL örneklerinin katalizlediği reaksiyon sonunda reaksiyona daha hızlı giren (R)-2-(butilamino)-1-feniletanol'ün konsantrasyonunun zamanla azaldığı ve oluşan (R)-2-(butilamino)-1-feniletil asetatın konsantrasyonu ise zamanla arttığı bulunmuştur (Şekil 4.92-4.93). GIPSL ve PIPSL her ikisi için 240 dakika reaksiyon süresi sonunda (R)-2-(butilamino)-1-feniletil asetat yaklaşık % 47 verimle ve % 99> enantiyomerik aşırılıkta elde edilmiştir. Reaksiyona girmeden kalan (S)-2-(butilamino)-1-feniletanol'ün konsantrasyonunda ise herhangi bir azalma gözlemlenmemiş ve 240 dakika reaksiyon süresi sonunda her iki GIPSL ve PIPSL preparatları için % 50 verim ve yaklaşık % 90 enantiyomerik aşırılıkta elde edilmiştir. E değerleri ise GIPSL ve PIPSL örnekleri için sırasıyla 223 ve 249 olarak hesaplanmıştır.



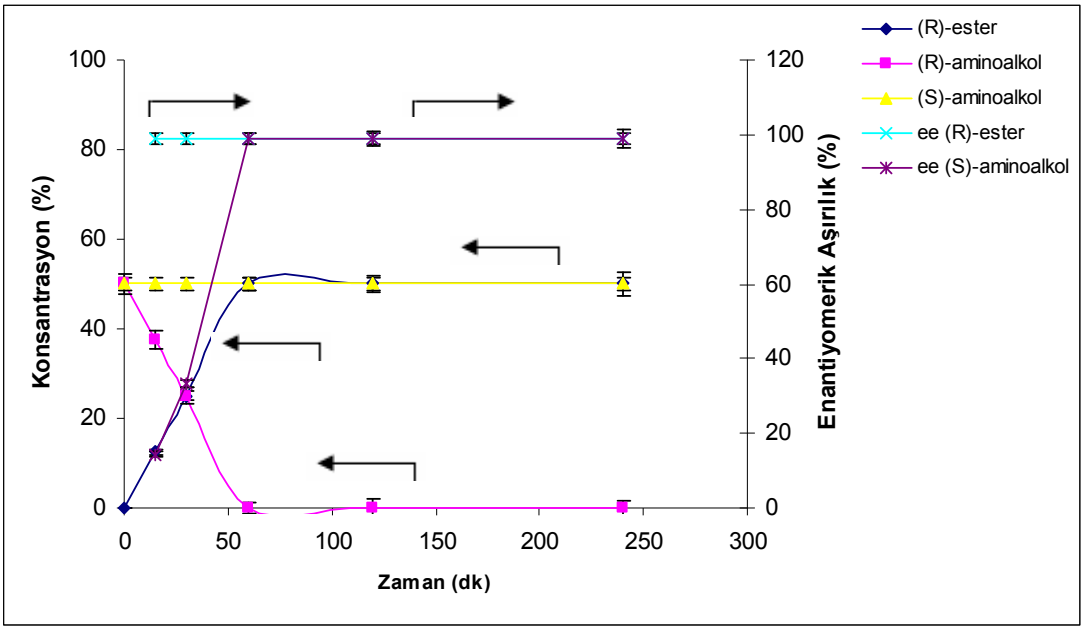
Şekil 4.78. GIPSL tarafından katalizlenen rasemik 2-(butilamino)-1-feniletanol'ün kinetik rezolusyonu.



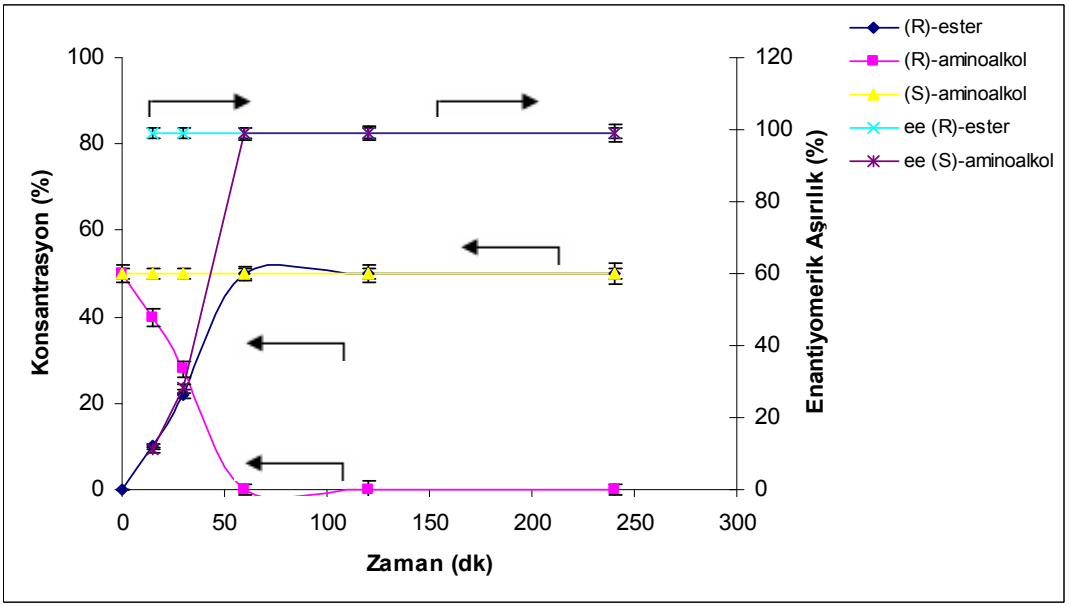
Şekil 4.79.PIPSL tarafından katalizlenen rasemik 2-(butilamino)-1-feniletanol'ün kinetik rezolusyonu.

GIPSL ve PIPSL immobilize lipazları tarafından katalizlenen reaksiyon ile 240 dakika reaksiyon süresi sonunda (R)-2-(hekzilamino)-1-feniletil asetat GIPSL ve PIPSL için % 50 verim ve % 99> enantiyomerik aşırılık elde edilmiştir (Şekil 4.80-

4.81). (S)-2-(hekzilamino)-1-feniletanol ise 240 reaksiyon süresi sonunda GIPSL ve PIPSL preparatları için %50 verim ve sırasıyla % 99> enantiyomerik aşırılıkta elde edilmiştir. E değerleri ise GIPSL ve PIPSL örnekleri için sırasıyla 274 ve 261 olarak hesaplanmıştır.

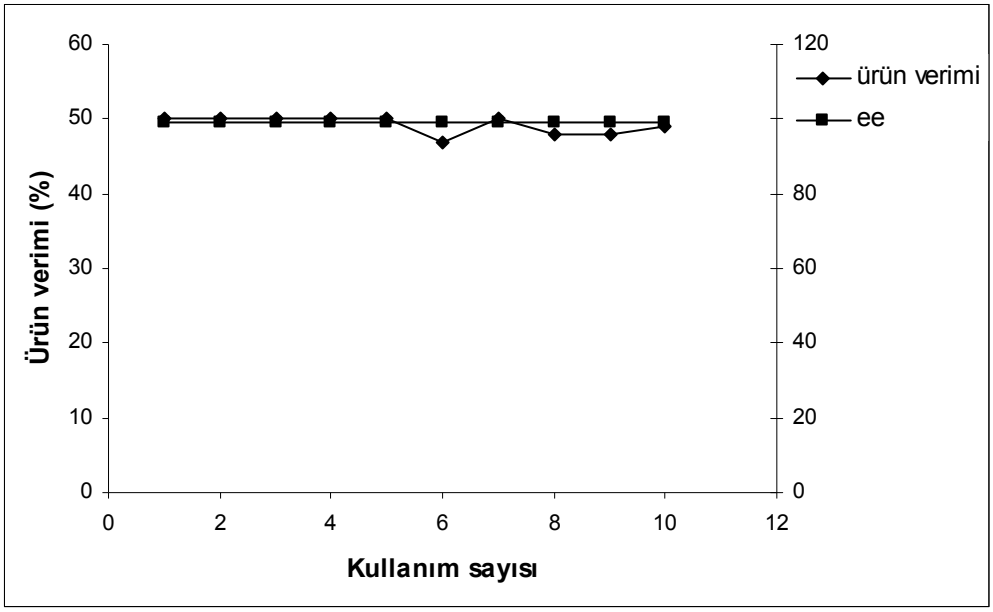


Şekil 4.80.GIPSL tarafından katalizlenen rasemik 2-(hekzilamino)-1-feniletanol'ün kinetik rezolusyonu.

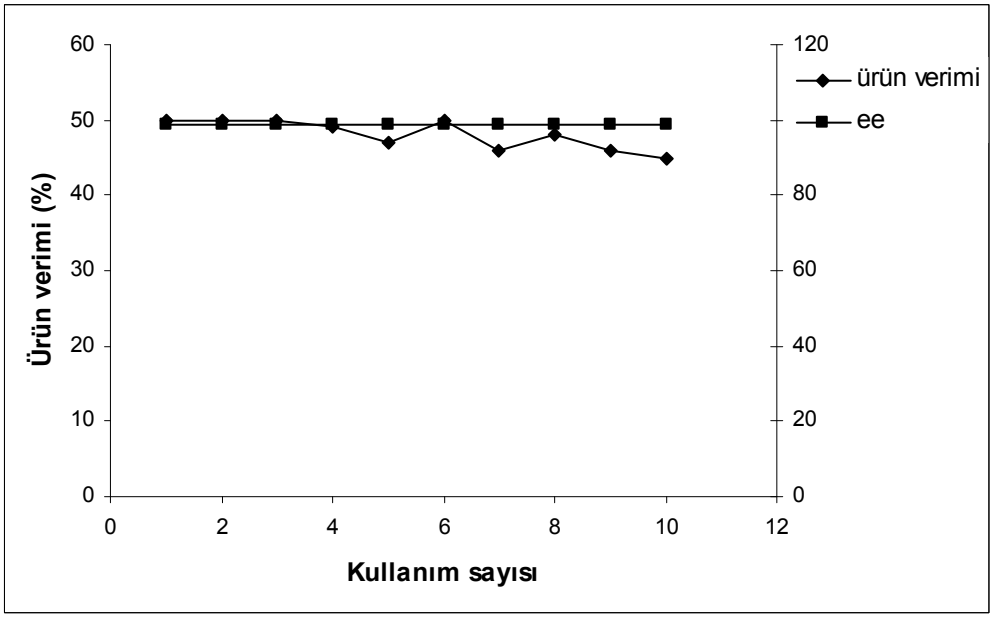


Şekil 4.81.PIPSL tarafından katalizlenen rasemik 2-(hekzilamino)-1-feniletanol'ün kinetik rezolusyonu.

GIPSL ve PIPSL örneklerinin rasemik 2-(etilamino)-1-feniletanolün kinetik rezolusyonu için tekrar kullanım kararlılıkları Şekil 4.82 ve 4.83'de verilmiştir. GIPSL 10 kullanım sonunda %49 verim ve %99 enantiyomerik aşırılıkla reaksiyonu gerçekleştirirken PIPSL ise aynı şartlarda %45 verim ve %99 enantiyomerik aşırılıkta reaksiyonu gerçekleştirmiştir.



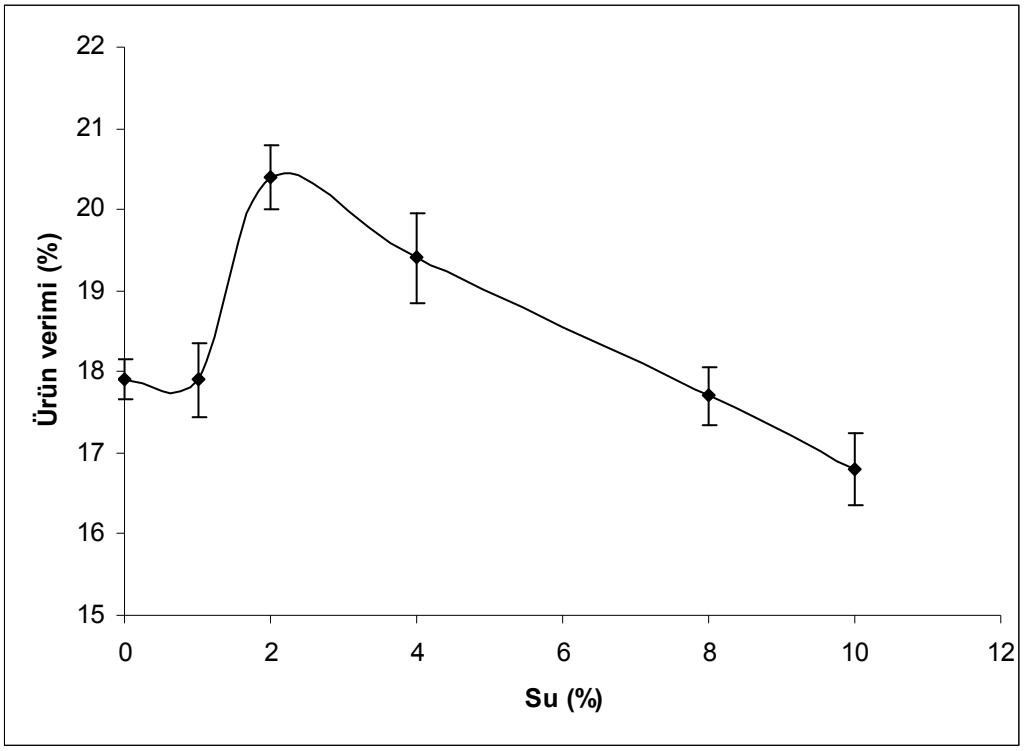
Şekil 4.82.GIPSL'in rasemik 2-(etilamino)-1-feniletanolün kinetik rezolusyonu için tekrar kullanım kararlılığı.



Şekil 4.83.PIPSL'in rasemik 2-(etilamino)-1-feniletanolün kinetik rezolusyonu için tekrar kullanım kararlılığı.

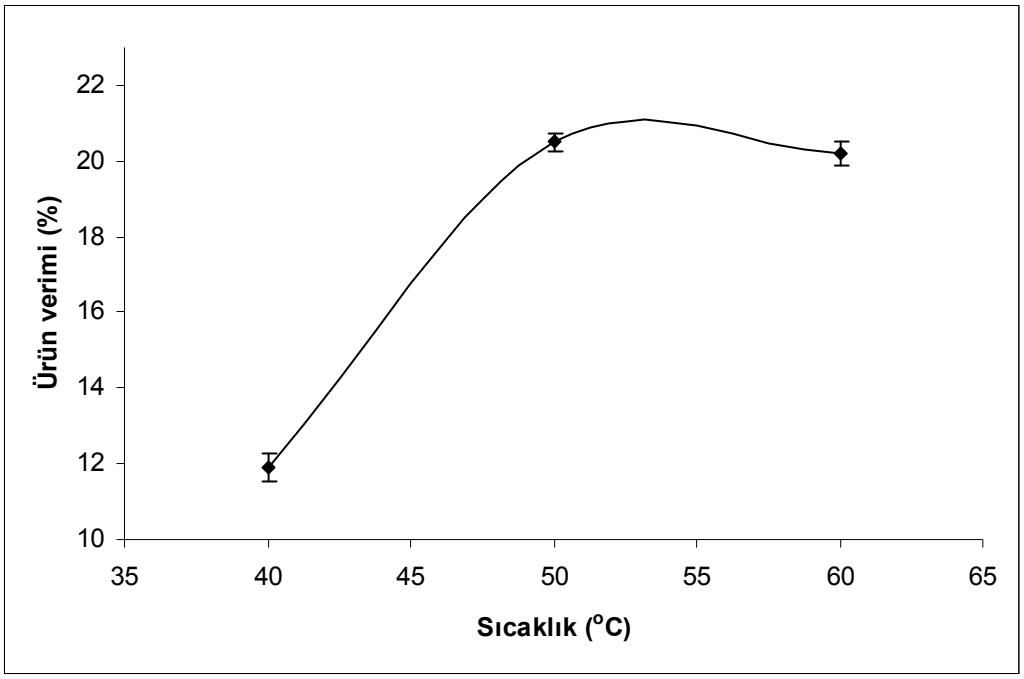
4.1.4.4.Florisile Glutaraldehit veya Polisüksinimid Ara Kolu Üzerinden İmmobilize Edilmiş Olan *Mucor miehei* Lipazının Rasemik Amino Alkollerin Kinetik Rezolusyonu İçin Maksimum Aktivite Gösterdiği Koşulların Belirlenmesi

İmmobilize *Mucor miehei* lipazları için rasemik aminoalkollerin kinetik rezolusyonu için optimum koşullar GIMML lipazı kullanılarak belirlenmiştir. Şekil 4.84'den de görüldüğü gibi kinetik rezolusyon için optimum su miktarı % 2 (v/v) olarak belirlenmiştir. Bu değerde elde edilen ürün verimi ise % 20,4 olarak bulunmuştur. Reaksiyon ortamına eklenen su miktarının % 10'a çıkartılmasının ürün verimini azalttığı (%16,8) belirlenmiştir.



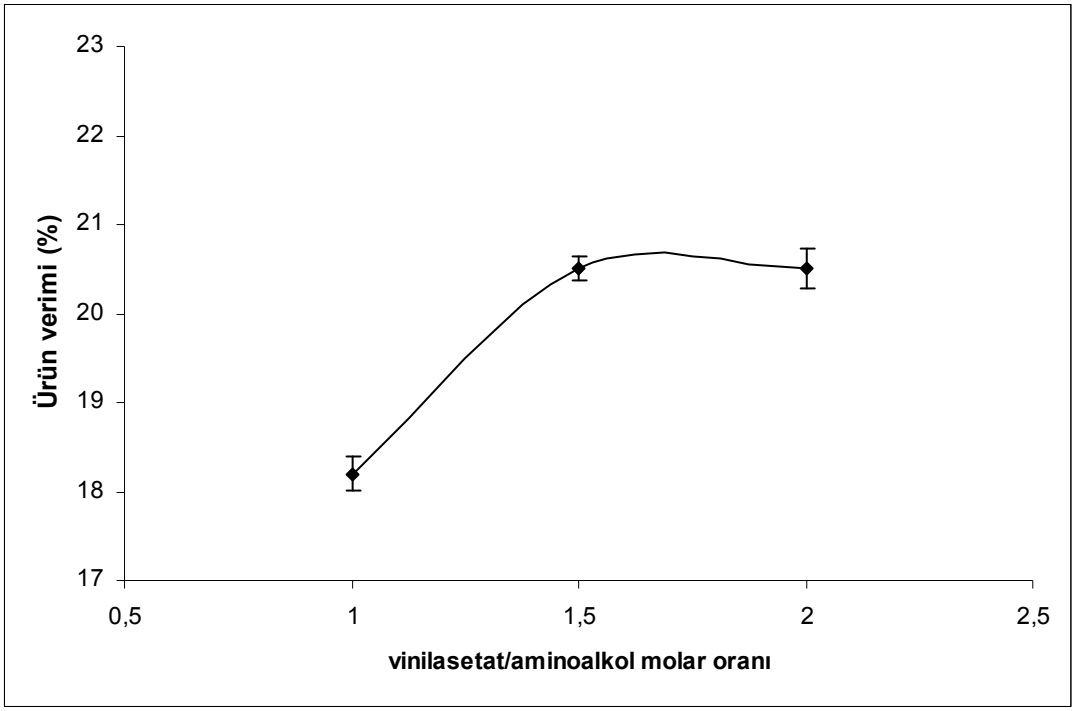
Şekil4.84.GIMML için rasemik 2-(etilamino)-1-feniletanol'ün kinetik rezolusyonuna ortamda bulunan su miktarının etkisi.

Şekil 4.85'den görüleceği gibi reaksiyon sıcaklığının 40 ºC'den 50 ºC'ye çıkartılması reaksiyon verimini %11,9'dan %20,5'e yükseltmiştir. Reaksiyon sıcaklığı 50 ºC'den 60 ºC'ye çıkartıldığına ise ürün verimi anlamlı şekilde değişmemiştir.



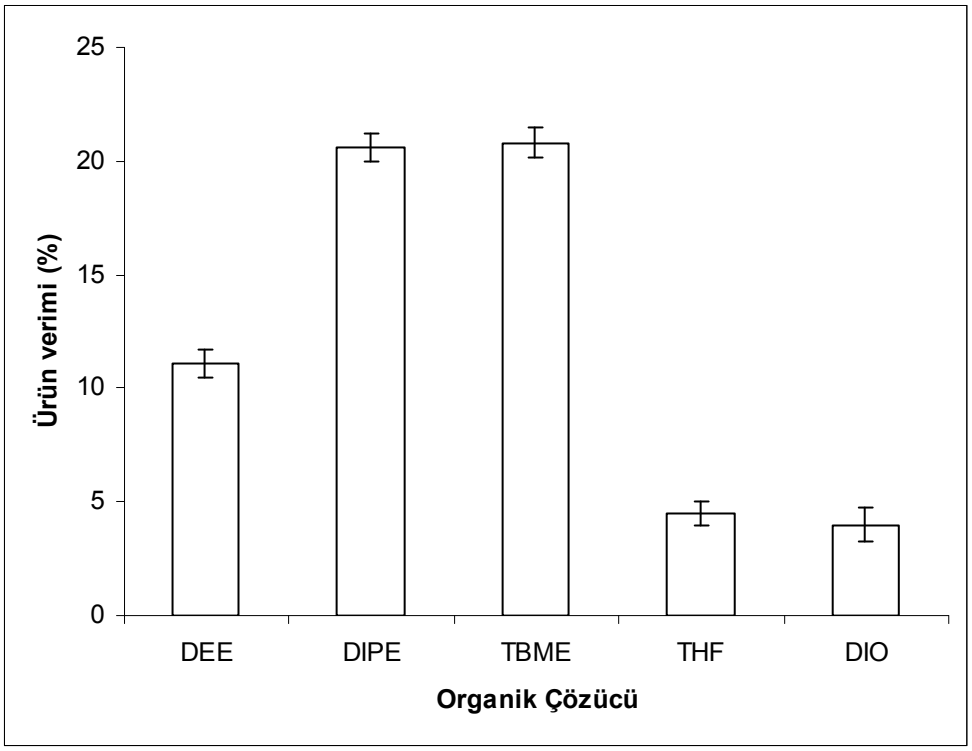
Şekil4.85.GIMML için rasemik 2-(etilamino)-1-feniletanol'ün kinetik rezolusyonuna reaksiyon sıcaklığının etkisi.

Reaksiyon verimine vinil asetat/amino alkol molar oranının etkisi Şekil 4.86'da gösterilmiştir. Başlangıç vinil asetat/amino alkol molar oranının 1/1'den 1,5/1 oranına çıkartılması ile ürün veriminin %18,2'den %20,5'e yükseldiği bulunmuştur. Vinil asetat/amino alkol molar oranının 1,5/1'den 2/1'e çıkartılmasının ise ürün verimini değiştirmediği bulunmuştur.



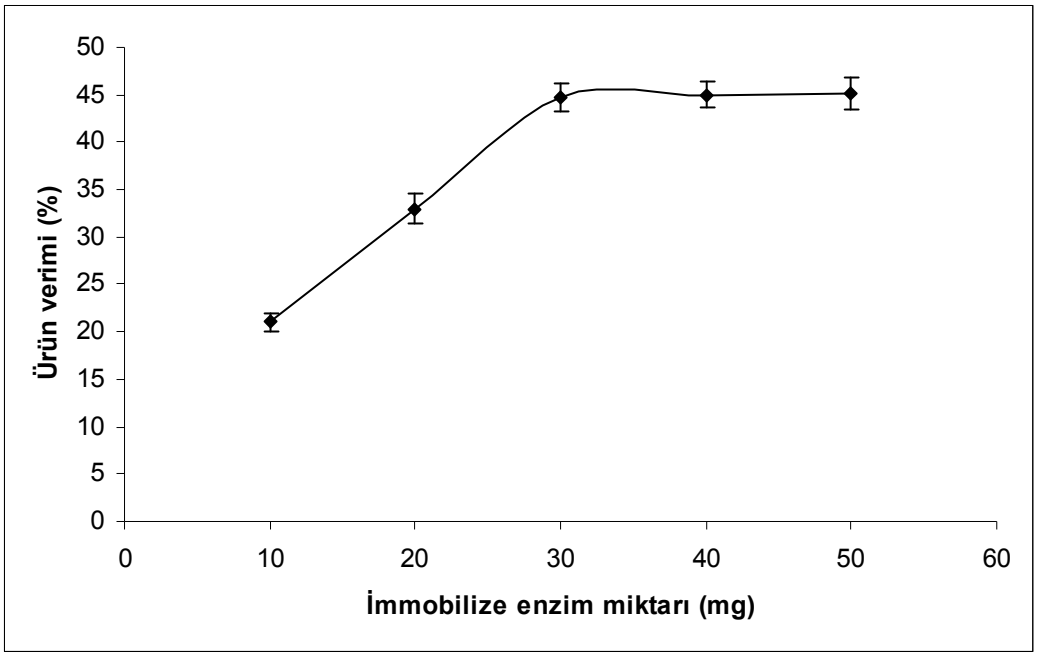
Şekil4.86.GIMML için rasemik 2-(etilamino)-1-feniletanol'ün kinetik rezolusyonuna vinil asetat/amino alkol molar oranının etkisi.

Şekil 4.87'den de görüleceği gibi en fazla verim (% 23,2) TBME içerisinde gerçekleştirilen reaksiyonda elde edilmiştir. Reaksiyon ortamı olarak dioksan DIO ve THF kullanıldığında ise reaksiyon veriminin anlamlı bir şekilde azaldığı ve sırasıyla % 4' ve 4,5'lere düştüğü belirlenmiştir.



Şekil4.87.GIMML için rasemik 2-(etilamino)-1-feniletanol'ün kinetik rezolusyonuna reaksiyonda kullanılan organik çözücülerin etkisi.

Reaksiyonda kullanılan GIMML miktarının reaksiyon verimine etkisini incelemek için GIMML miktarı 10-50 mg arasında değiştirilmiştir. GIMML miktarının 10 mg'dan 30 mg'a çıkartılması ile reaksiyon verimini doğrusal olarak artırmış ve %45 değerine ulaşmıştır. Ancak, 40 ve 50 mg GIMML kullanıldığında reaksiyon veriminde anlamlı bir fark olmamıştır.

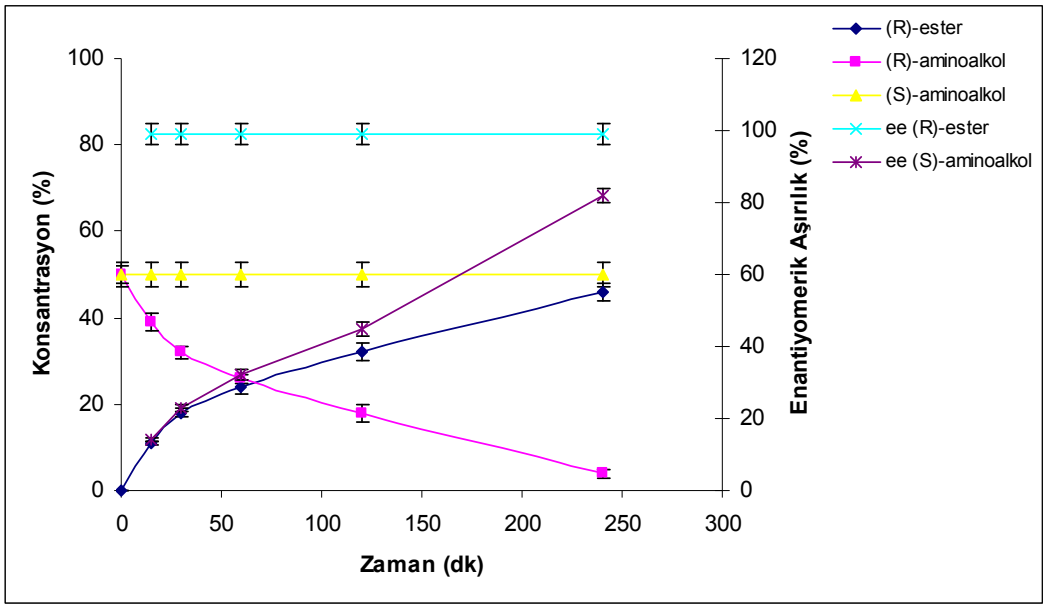


Şekil4.88.GIMML için rasemik 2-(etilamino)-1-feniletanol'ün kinetik rezolusyonuna reaksiyonda kullanılan GIMML miktarının ürün verimine etkisi.

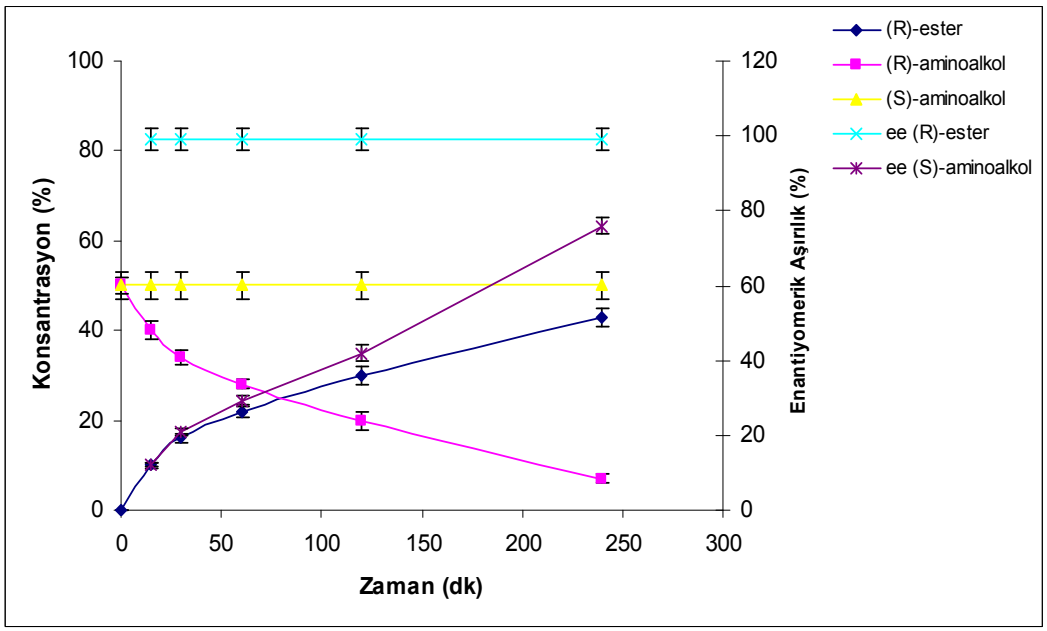
4.1.4.5.Florisile Glutaraldehit veya Polisüksinimid Ara Kolu Üzerinden İmmobilize Edilmiş Olan *Mucor miehei* Lipazları ile Rasemik Amino Alkollerin Kinetik Rezolusyonda Ürün verimi, Enantiyomerik Aşırılıkların ve Tekrar Kullanım Kararlılığının Belirlenmesi

Rasemik 2-(metilamino)-1-feniletanol'ün GIMML ve PIMML tarafından katalizlenen kinetik rezolusyonu Şekil 4.89 ve 4.90'da verilmiştir. GIPSL ve PIPSL'nin her ikisi için 240 dakika reaksiyon süresi sonunda (R)-2-(metilamino)-1-feniletil asetat sırasıyla % 46 ve 43 verimle ve % 99> enantiyomerik aşırılıkta elde edilmiştir. Reaksiyona girmeden kalan (S)-2-(metilamino)-1-feniletanol'ün konsantrasyonunda ise herhangi bir azalma gözlemlenmemiş ve GIMML ve PIMML

örnekleri için 240 dakika reaksiyon süresi sonunda % 50 verim ve sırasıyla % 82 ve %76 enantiyomerik aşırılıkta elde edildiği belirlenmiştir. E değerleri ise GIMML ve PIMML örnekleri için sırasıyla 249 ve 244 olarak hesaplanmıştır.

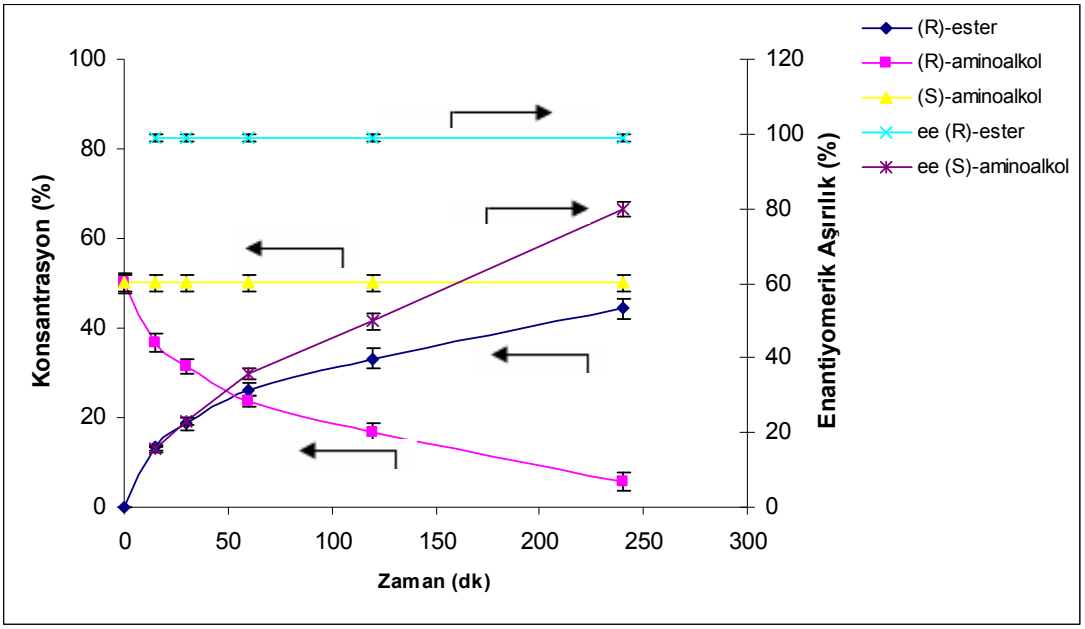


Şekil 4.89.GIMML tarafından katalizlenen rasemik 2-(metilamino)-1-feniletanol'ün kinetik rezolusyonu.

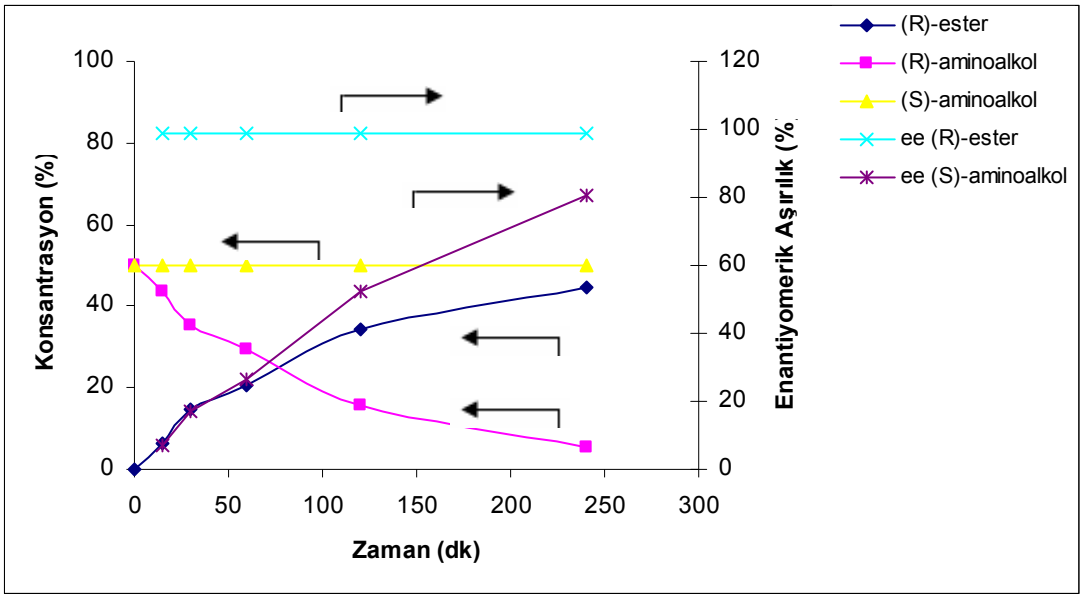


Şekil 4.90.PIMML tarafından katalizlenen rasemik 2-(metilamino)-1-feniletanol'ün kinetik rezolusyonu.

GIMML ve PIMML her ikisi için 240 dakika reaksiyon süresi sonunda (R)-2-(etilamino)-1-feniletil asetat yaklaşık % 45 verimle ve % 99> enantiyomerik aşırılıkta elde edilmiştir. Reaksiyona girmeden kalan (S)-2-(etilamino)-1-feniletanol'ün konsantrasyonunda ise herhangi bir azalma gözlemlenmemiş ve 240 dakika reaksiyon süresi sonunda her iki GIMML ve PIMML örnekleri için % 50 verim ve yaklaşık % 80 enantiyomerik aşırılıkta elde edilmiştir. E değerleri ise GIMML ve PIMML örnekleri için sırasıyla 249 ve 247 olarak hesaplanmıştır.

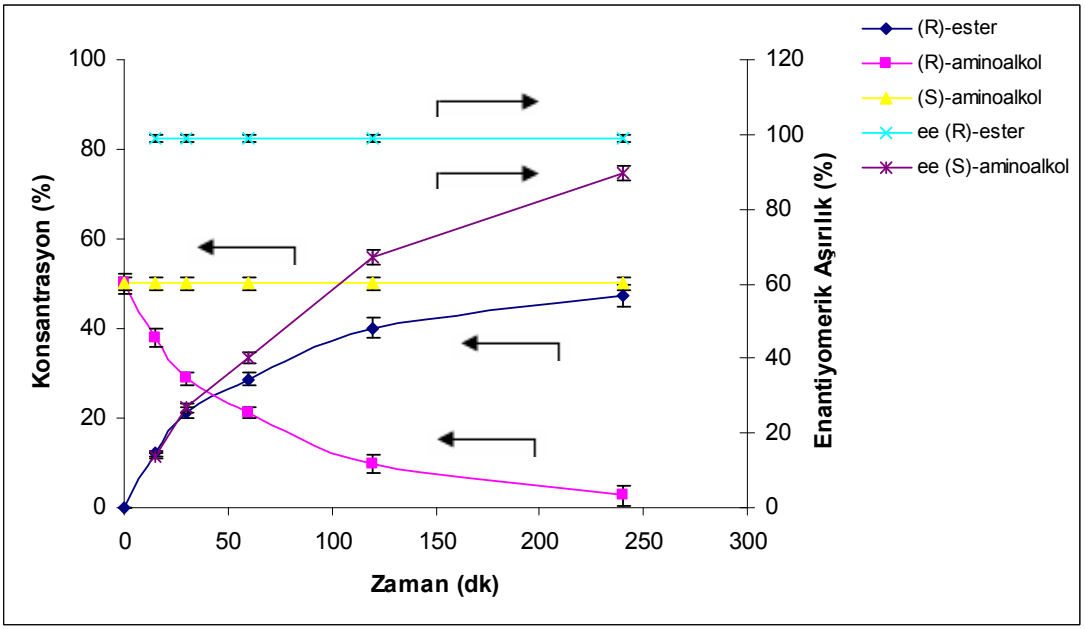


Şekil 4.91.GIMML tarafından katalizlenen rasemik 2-(etilamino)-1-feniletanol'ün kinetik rezolusyonu.

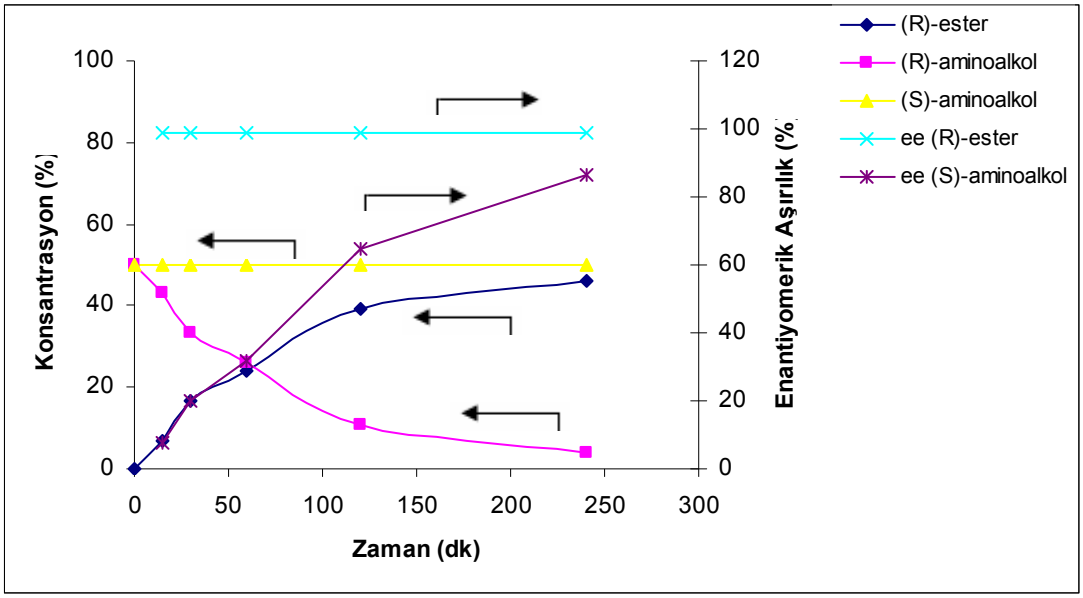


Şekil 4.92.PIMML tarafından katalizlenen rasemik 2-(etilamino)-1-feniletanol'ün kinetik rezolusyonu.

Rasemik 2-(propilamino)-1-feniletanol'ün GIMML ve PIMML tarafından katalizlenen kinetik rezolusyonu Şekil 4.93 ve 4.94'de verilmiştir.



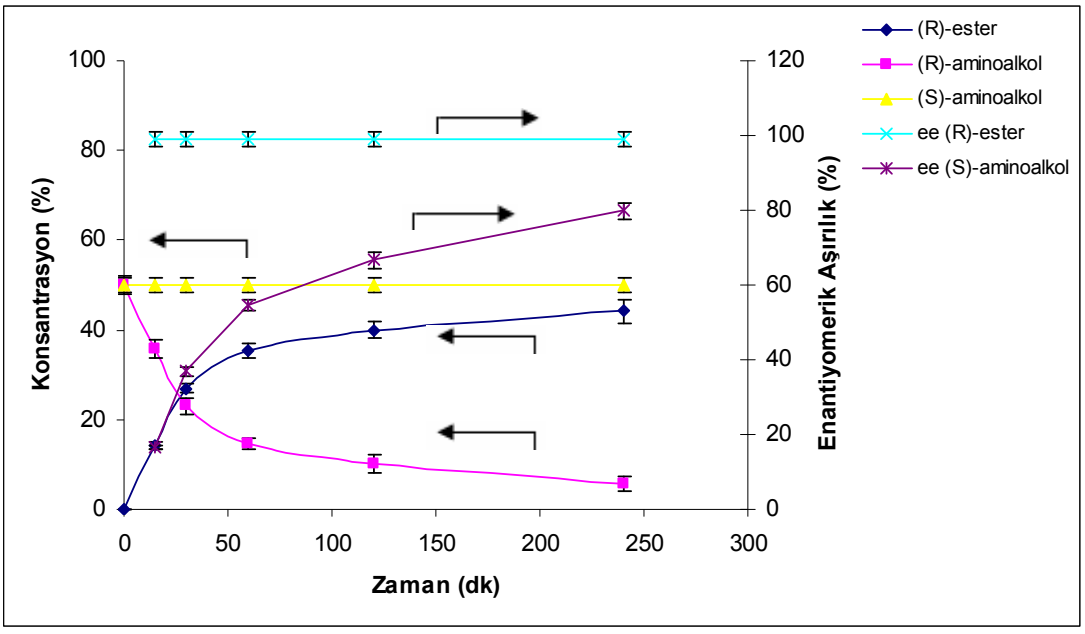
Şekil 4.93.GIMML tarafından katalizlenen rasemik 2-(propilamino)-1-feniletanol'ün kinetik rezolusyonu.



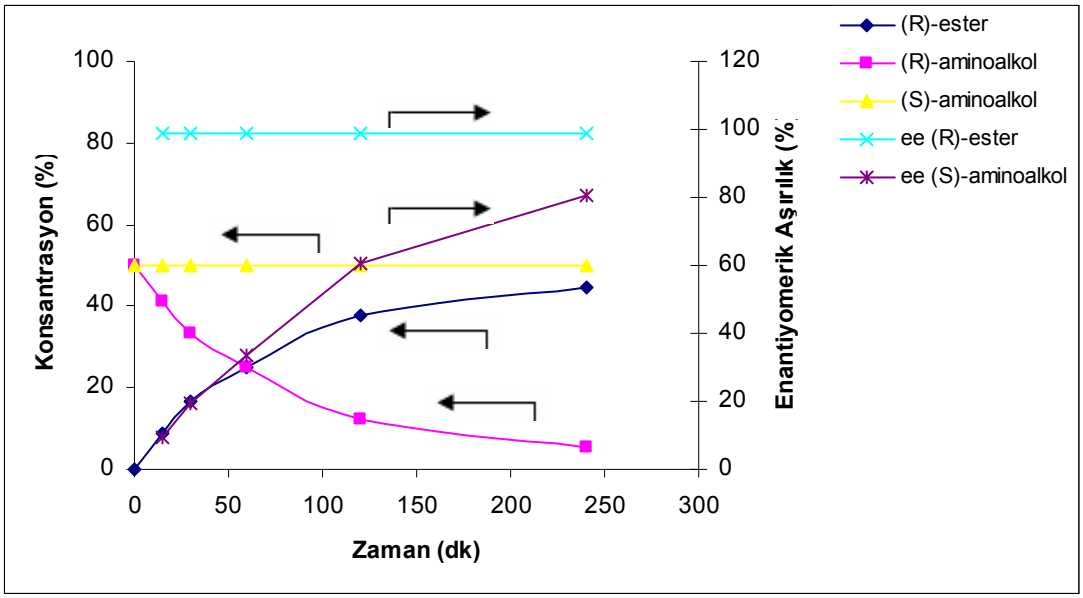
Şekil 4.94.PIMML tarafından katalizlenen rasemik 2-(propilamino)-1-feniletanol'ün kinetik rezolusyonu.

240 dakika reaksiyon süresi sonunda (R)-2-(propilamino)-1-feniletil asetat GIMML ve PIMML'nin her ikisi içinde yaklaşık % 47 verim ve % 99> enantiyomerik aşırılıkda elde edilmiştir. (S)-2-(propilamino)-1-feniletanol ise 240 dakika reaksiyon süresi sonunda GIMML ve PIMML örnekleri için %50 verim ve sırasıyla % 89 ve 86 enantiyomerik aşırılıkta elde edilmiştir. E değerleri ise GIMML ve PIMML örnekleri için sırasıyla 259 ve 250 olarak hesaplanmıştır.

Şekil 4.95 ve 4.96'dan da görüleceği gibi (R)-2-(allilamino)-1-feniletil asetat 240 dakika reaksiyon süresi sonunda her iki immobilize enzim örneği için yaklaşık % 44 verim ve % 99 enantiyomerik aşırılıkta elde edilmiştir. Şekil 4.109-110'dan görüleceği gibi (S)-2-(allilamino)-1-feniletanol'ün reaksiyona hiç girmediği ve reaksiyon sonunda her iki immobilize enzim örneği için % 50 verim ve yaklaşık % 80 enantiyomerik aşırılıkta elde edildiği bulunmuştur.

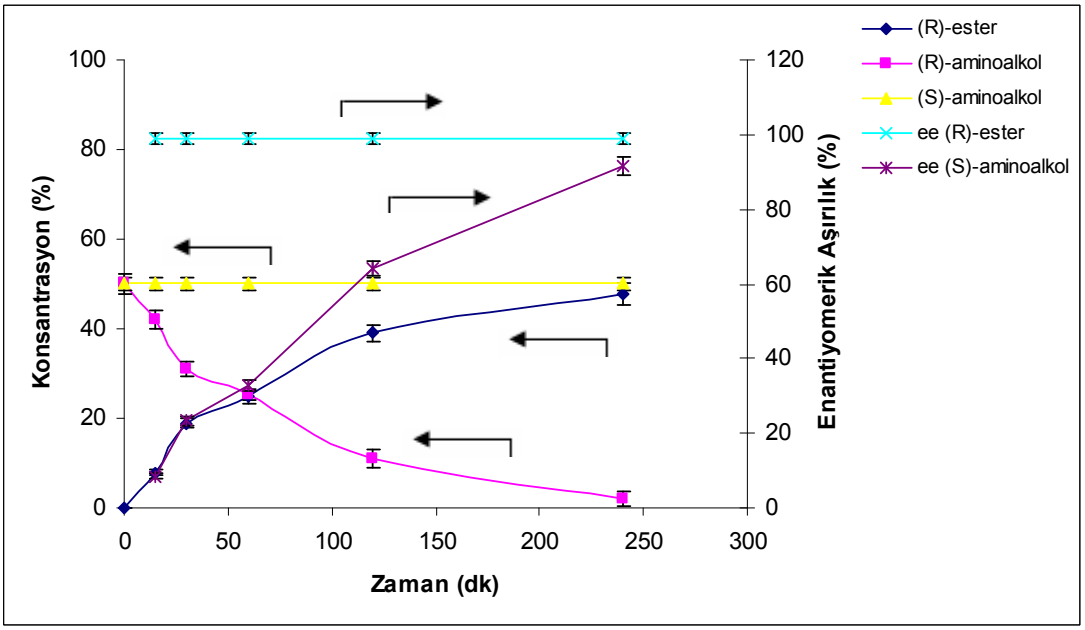


Şekil 4.95.GIMML tarafından katalizlenen rasemik 2-(allilamino)-1-feniletanol'ün kinetik rezolusyonu.

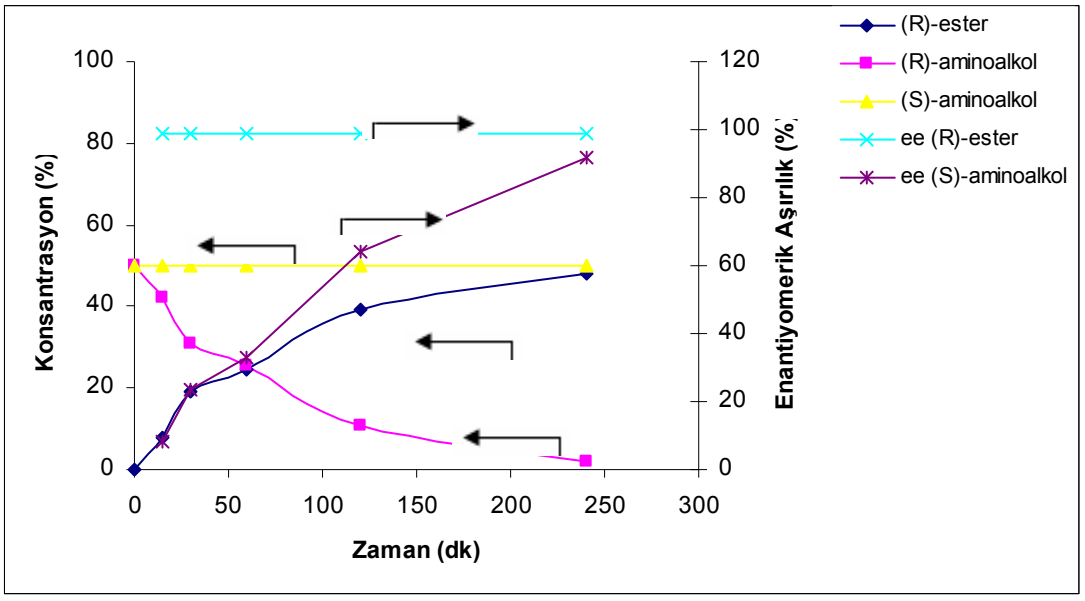


Şekil 4.96.PIMML tarafından katalizlenen rasemik 2-(allilamino)-1-feniletanol'ün kinetik rezolusyonu.

Rasemik 2-(butilamino)-1-feniletanol'ün GIMML ve PIMML tarafından katalizlenen kinetik rezolusyonu Şekil 4.97 ve 4.98'de verilmiştir. GIMML ve PIMML her ikisi için 240 dakika reaksiyon süresi sonunda (R)-2-(butilamino)-1-feniletil asetat yaklaşık % 48 verimle ve % 99> enantiyomerik aşırılıkta elde edilmiştir. Reaksiyona girmeden kalan (S)-2-(butilamino)-1-feniletanol'ün konsantrasyonunda ise herhangi bir azalma gözlemlenmemiş ve GIMML ve PIMML örnekleri için 240 dakika reaksiyon süresi sonunda % 50 verim ve yaklaşık % 92 enantiyomerik aşırılıkta elde edilmiştir. E değerleri ise GIMML ve PIMML örnekleri için sırasıyla 242 ve 245 olarak hesaplanmıştır.

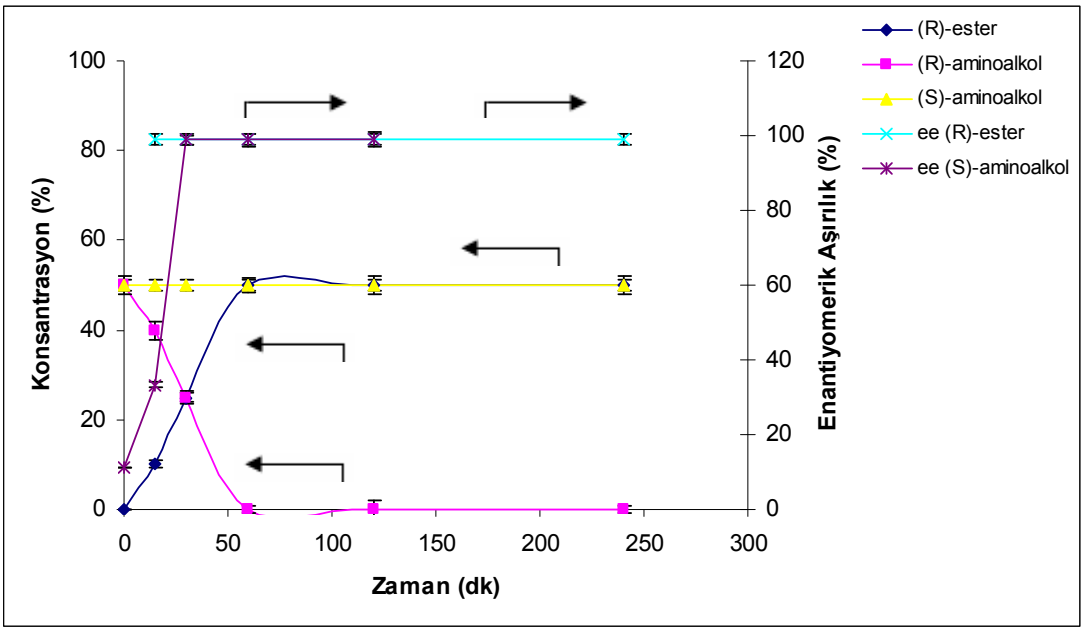


Şekil 4.97.GIMML tarafından katalizlenen rasemik 2-(butilamino)-1-feniletanol'ün kinetik rezolusyonu.

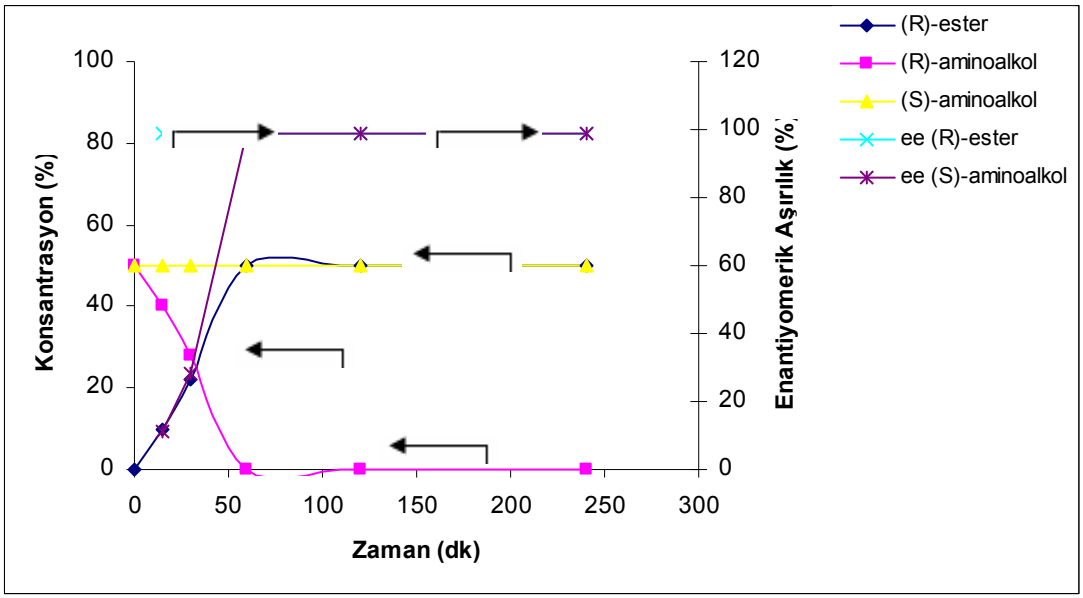


Şekil 4.98.PIMML tarafından katalizlenen rasemik 2-(butilamino)-1-feniletanol'ün kinetik rezolusyonu.

GIMML ve PIMML örnekleri tarafından katalizlenen reaksiyon ile 240 dakika reaksiyon süresi sonunda (R)-2-(hekzilamino)-1-feniletil asetat GIMML ve PIMML preparatları için % 50 verim ve % 99> enantiyomerik aşırılık elde edilmiştir. (S)-2-(hekzilamino)-1-feniletanol ise 240 reaksiyon süresi sonunda GIMML ve PIMML örneklerinin her ikisi için %50 verim ve sırasıyla % 99 enantiyomerik aşırılıkta elde edilmiştir. E değerleri ise GIMML ve PIMML örnekleri için sırasıyla 274 ve 270 olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.99 ve 4.100'de gösterilmiştir.

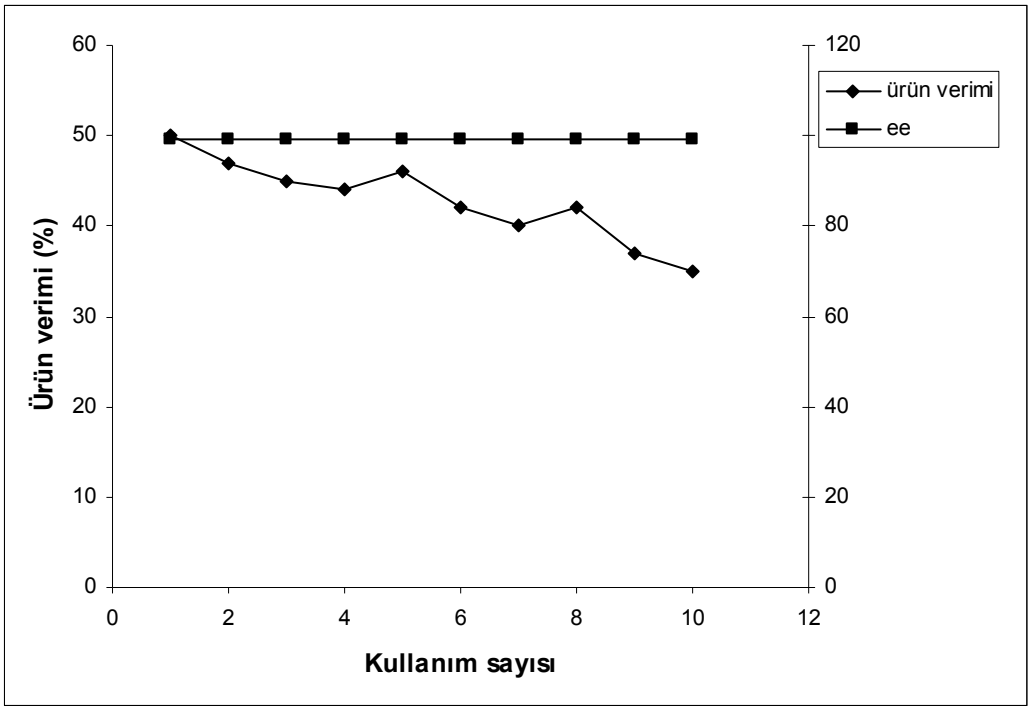


Şekil 4.99.GIMML tarafından katalizlenen rasemik 2-(hekzilamino)-1-feniletanol'ün kinetik rezolusyonu.

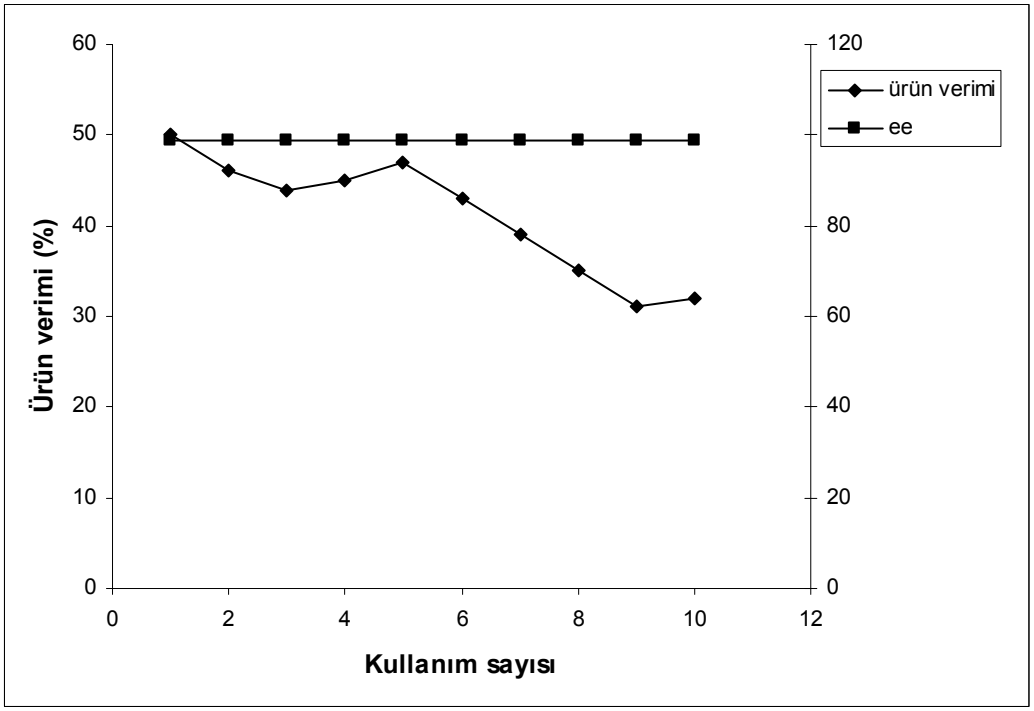


Şekil4.100.PIMML tarafından katalizlenen rasemik 2-(hekzilamino)-1-feniletanol'ün kinetik rezolusyonu.

GIMML ve PIMML örneklerinin rasemik 2-(etilamino)-1-feniletanolün kinetik rezolusyonu için tekrar kullanım kararlılıkları Şekil 4.101 ve 4.102'de verilmiştir. GIMML 10 kullanım sonunda % 35 verim ve %99 enantiyomerik aşırılıkla reaksiyonu gerçekleştirirken PIMML ise aynı şartlarda % 32 verim ve %99 enantiyomerik aşırılıkta reaksiyonu gerçekleştirmiştir.



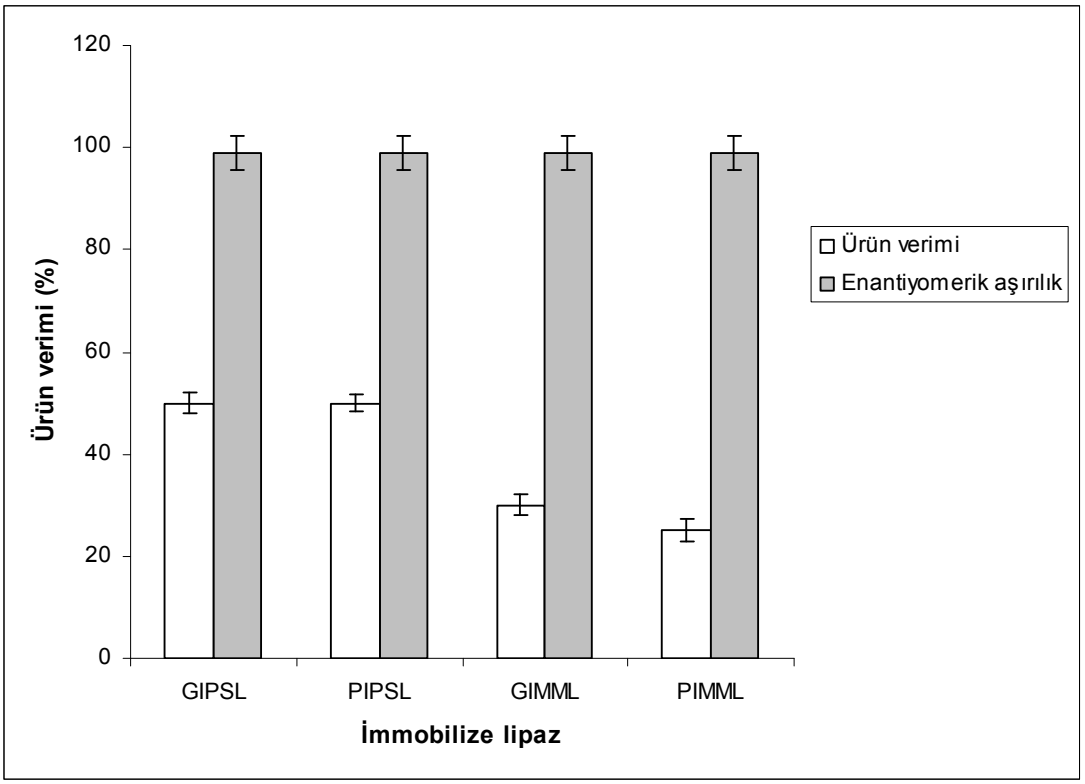
Şekil 4.101.GIMML'in rasemik 2-(etilamino)-1-feniletanolün kinetik rezolusyonu için tekrar kullanım kararlılığı.



Şekil 4.102.PIMML'in rasemik 2-(etilamino)-1-feniletanolün kinetik rezolusyonu için tekrar kullanım kararlılığı.

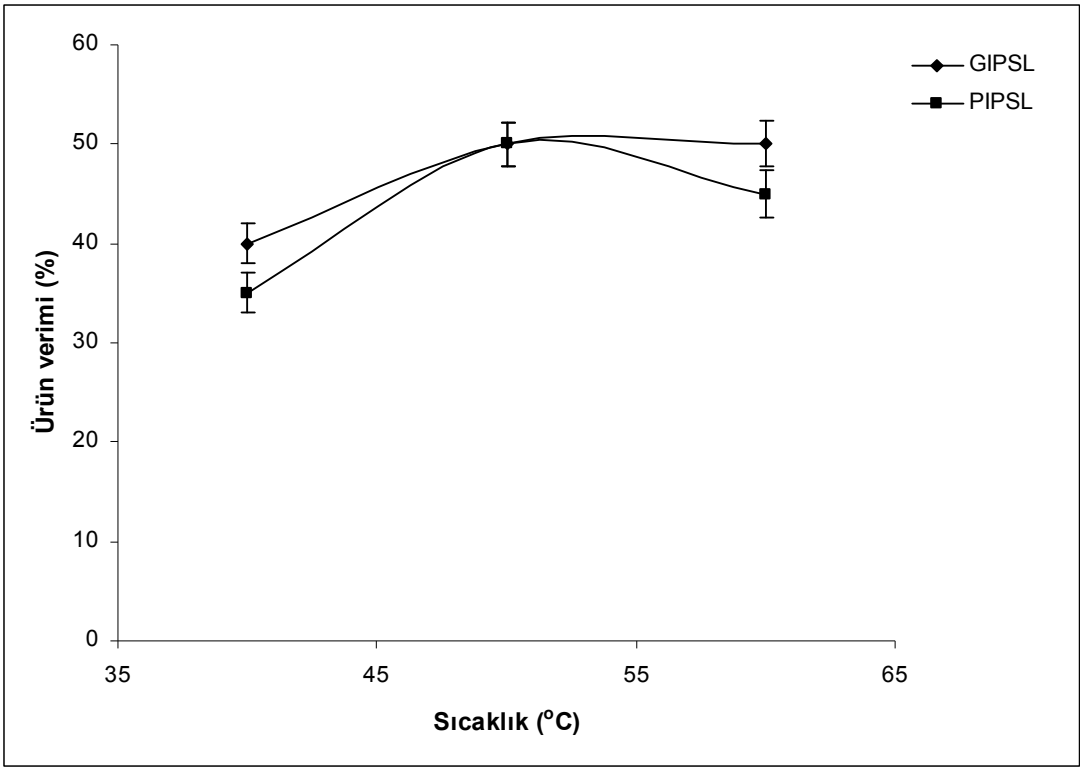
4.1.5.Florisile Glutaraldehit ve Polisüksinimid Ara Kolu Üzerinden İmmobilize Edilmiş Olan *Pseudomonas sp. ve Mucor miehei* Lipazları ile Rasemik Mandelik Asitin Asimetrik Amidasyon Reaksiyonu

Rasemik Mandelik asitin asimetrik amidasyon reaksiyonu için en uygun immobilize lipaz örneğini belirlemek için yapılan denemelerden elde edilen sonuçlar Şekil 4.103'de gösterilmiştir. GIPSL ve PIPSL immobilize lipazları ile yapılan denemelerde %50 verime ve % 99 enantiyomerik aşırılığa ulaşılmış, GIMML ve PIMML ile yapılan denemelerde ise % 99 enantiyomerik aşırılığa ulaşılmasına rağmen ürün verimleri sırasıyla % 30 ve 25 olarak elde edilmiştir. GIMML ve PIMML ile elde edilen ürün veriminin düşük olması nedeniyle bundan sonraki çalışmalarda GIPSL ve PIPSL örnekleri kullanılarak araştırmalara devam edilmiştir.



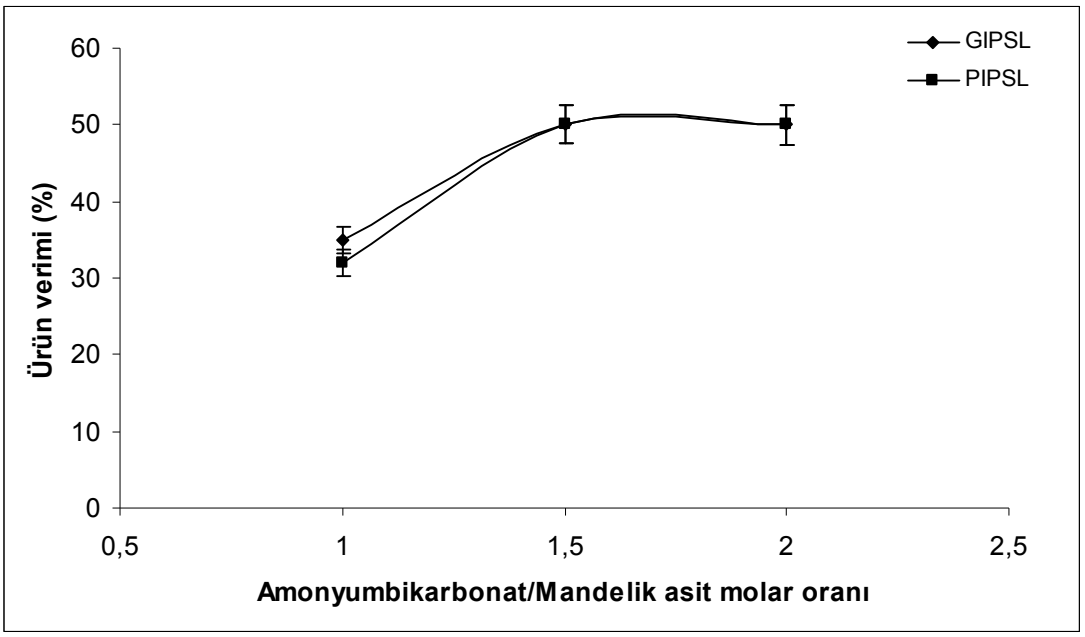
Şekil 4.103. Rasemik mandelik asitin asimetrik amidasyon reaksiyonu için kullanılan immobilize *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* lipazları için elde edilen verim ve enantiyomerik aşırılıklar.

Rasemik mandelik asidin immobilize GIPSL lipazı kullanılarak gerçekleştirilen asimetrik amidasyon reaksiyonunda reaksiyon ortamının sıcaklığı 40-60 ºC arasında değiştirilmiş ve bu sıcaklıklarda elde edilen ürün verimleri belirlenmiştir. Şekil 4.104'den görüldüğü gibi maksimum ürün verimine GIPSL ve PIPSL örnekleri için 50 ºC'de gerçekleştirilen reaksiyonlarda ulaşılmıştır.



Şekil 4.104.Rasemik mandelik asitin asimetrik amidasyon reaksiyonuna ortam sıcaklığın etkisi.

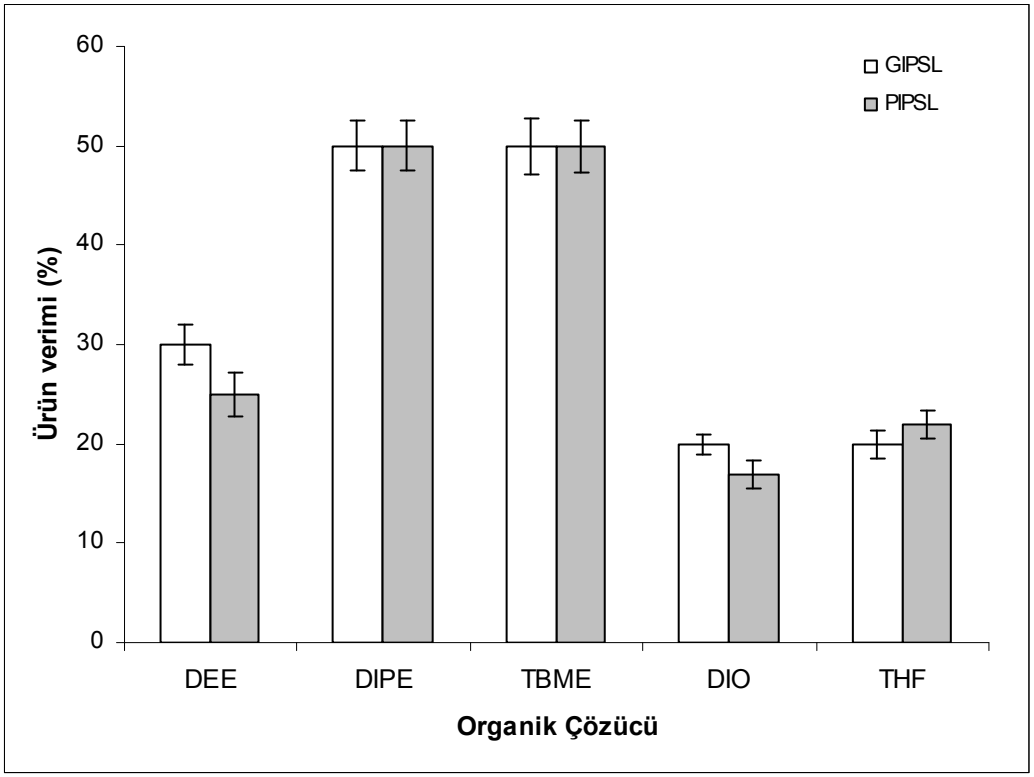
Optimum amonyumbikarbonat/mandelik asit oranının belirlenmesinde belirlenen optimum sıcaklık değerinde amonyumbikarbonat/mandelik asit oranı 1/1, 1,5/1 ve 2/1 oranında değiştirilmiştir ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.105'de verilmiştir.



Şekil 4.105.Rasemik mandelik asitin asimetrik amidasyon reaksiyonuna amonyum bikarbonat/mandelik asit oranının etkisi.

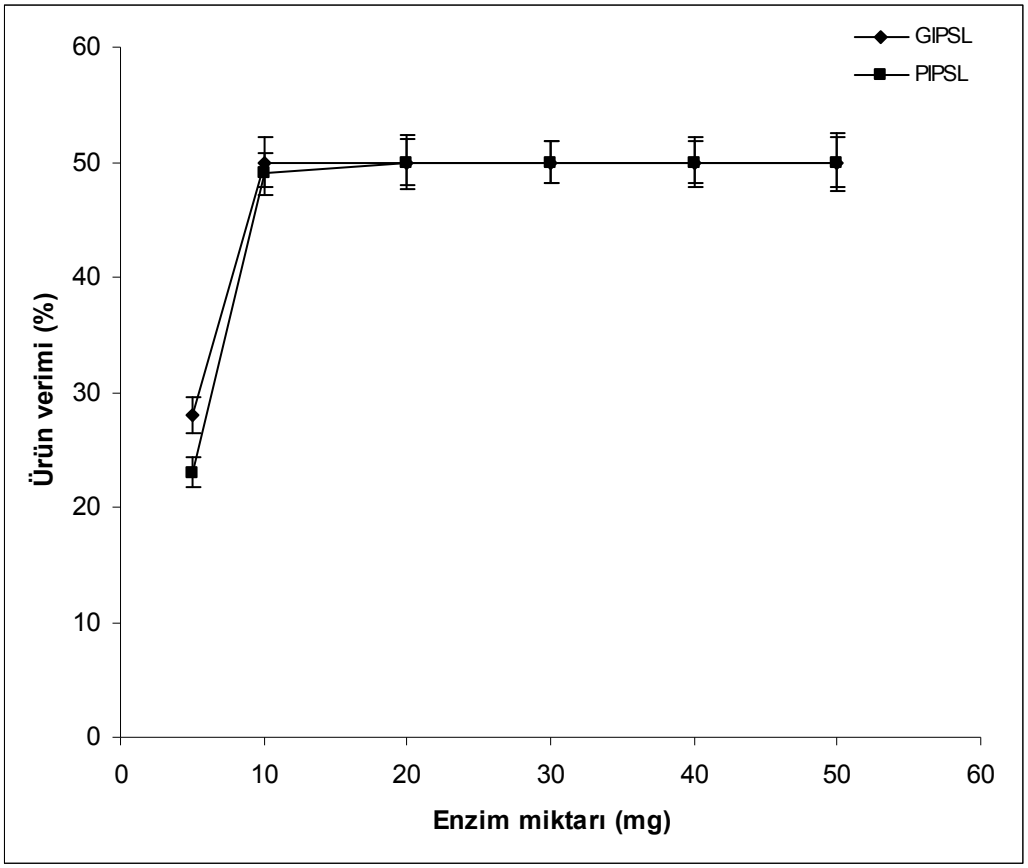
GIPSL ve PIPSL örnekleri için en yüksek ürün verimine amonyumbikarbonat/mandelik asit oranının 1,5/1 olduğu değerde ulaşılmış, amonyumbikarbonat/mandelik asit oranının daha da artırılmasının ürün verimine herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Rasemik Mandelik asitin asimetrik amidasyon reaksiyonu için uygun organik çözücünün belirlenmesinde belirlenen optimum sıcaklık ve amonyumbikarbonat/mandelik asit oranında reaksiyon için 5 farklı organik çözücü ((DEE), (DIPE), (TBME), (DIO) ve (THF)) kullanılmıştır. En yüksek ürün verimine DIPE ve TBME'in organik çözücü olarak kullanıldığı reaksiyonlarda ulaşılmıştır.



Şekil 4.106.Rasemik mandelik asitin asimetrik amidasyon reaksiyonuna reaksiyon ortamı olarak kullanılan organik çözücülerin etkisi.

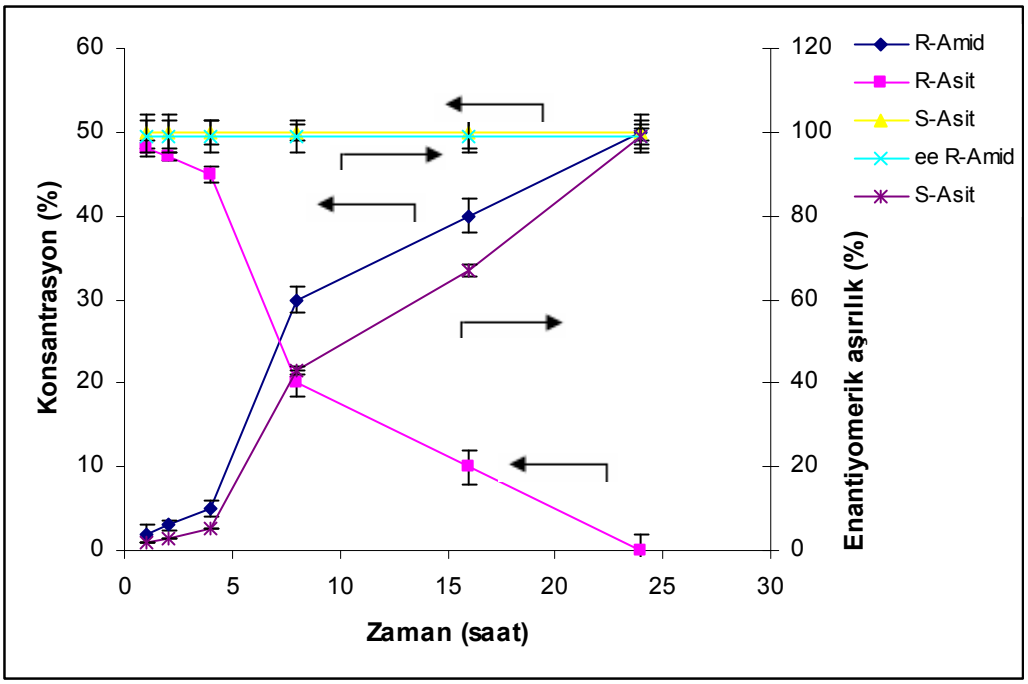
Rasemik Mandelik asidin asimetrik amidasyon reaksiyonu için en uygun GIPSL vePIPSL miktarlarının belirlenmesi amacıyla farklı miktarlarda (5-50 mg) enzim örnekleri kullanılmıştır ve sonuçlar Şekil 4.107'de verilmiştir.



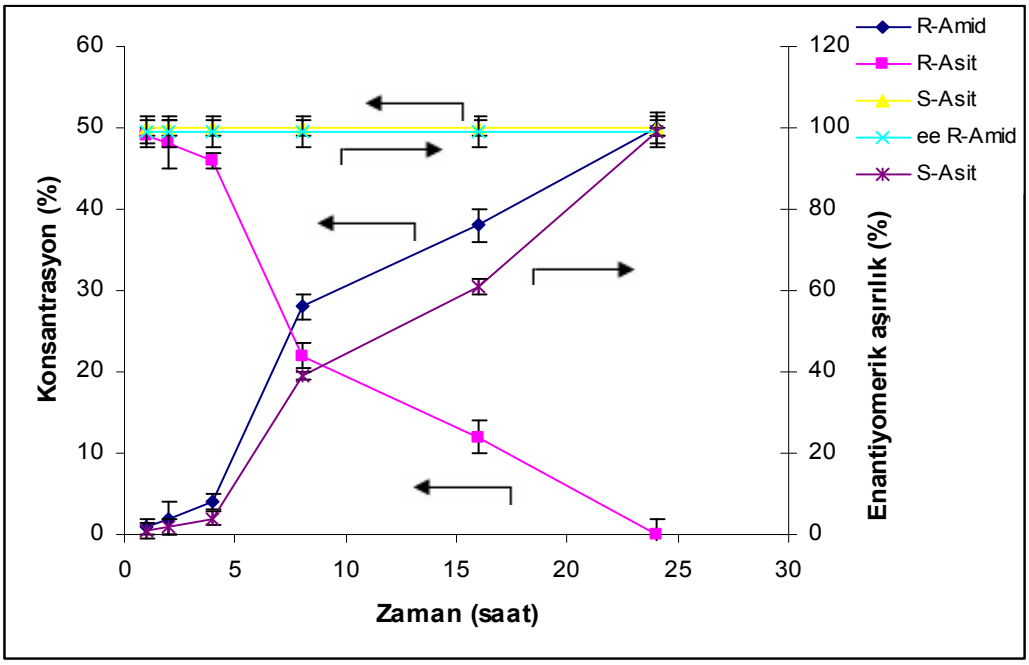
Şekil 4.107.Rasemik Mandelik asidin asimetrik amidasyon reaksiyonu için kullanılan immobilize enzim miktarının ürün verimine etkisi.

5 mg immobilize GIPSL veya PIPSL örneği kullanıldığında ürün verimi sırasıyla % 28 ve %23 olarak belirlenmiştir. İmmobilize enzim miktarları 2 katına çıkartıldığında ise ürün veriminin % 50'ye çıktığı belirlenmiş ve immobilize enzim miktarının daha da artırılmasının ürün verimine herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

GIPSL ve PIPSL örnekleri tarafından katalizlenen rasemik mandelik asitin asimetrik amidasyonu belirlenen optimum koşullarda gerçekleştirilmiş ve sonuçlar sırasıyla Şekil 4.108 ve 4.109'da verilmiştir. GIPSL ve PIPSL örnekleri ile katalizlenen reaksiyonda reaksiyona hızlı giren enantiyomer olan R-Mandelik asitin konsantrasyonunun zamanla azaldığı ve oluşan R-Mandelamidin konsantrasyonunun ise zamanla arttığı belirlenmiştir. GIPSL ve PIPSL örnekleri için 24 saat reaksiyon süresi sonunda R-Mandelamid ve S-Mandelik asit %50 verim ve %99> enantiyomerik aşırılıkta elde edilmiştir.

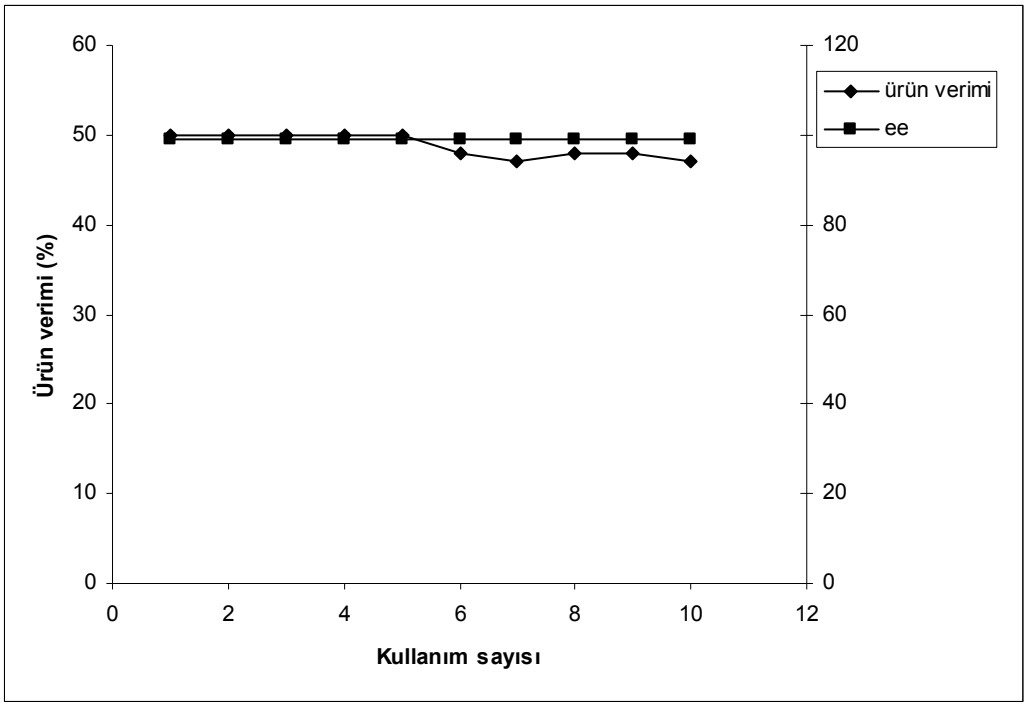


Şekil 4.108.GIPSL tarafından katalizlenen rasemik mandelik asitin asimetrik amidasyonu.

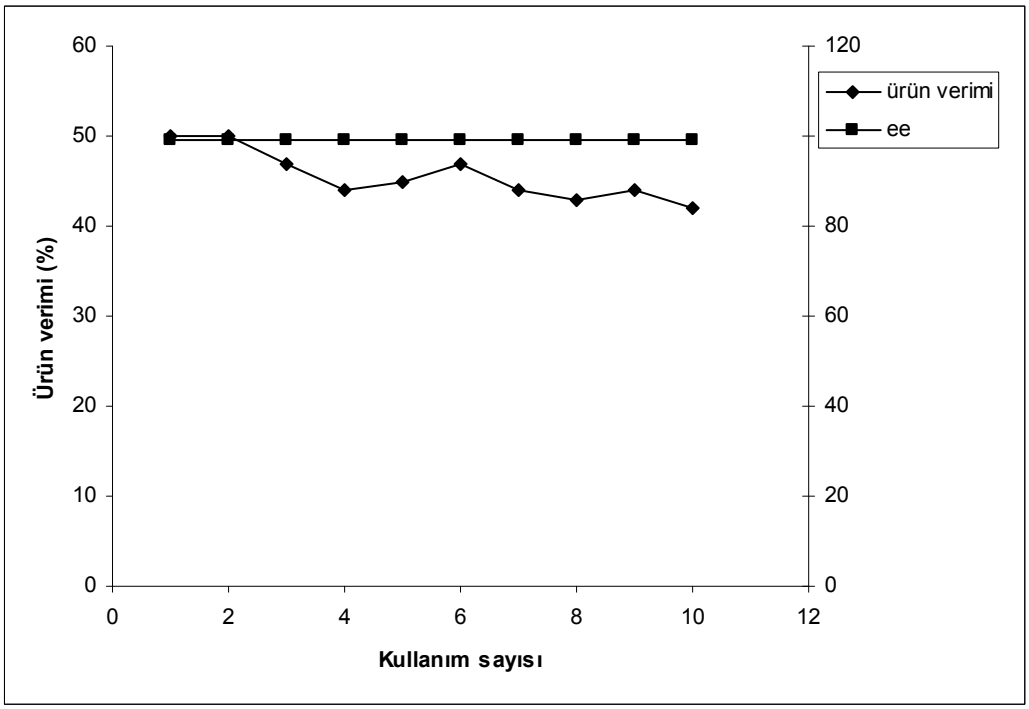


Şekil 4.109.PIPSL tarafından katalizlenen rasemik mandelik asitin asimetrik amidasyonu.

Enantiyosaf Mandelamid sentezi için immobilize *Pseudomonas sp.* lipazlarının tekrar kullanım kararlılıkları 4.110 ve 4.111'de verilmiştir. GIPSL örneği ile kesikli reaktörde gerçekleştirilen reaksiyonda 10 kullanım sonunda (R)-Mandelamidin % 47 verim ve % 99 enantiyomerik aşırılıkta elde edildiği, PIPSL örneği kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyonda ise 10 kullanım sonunda (R)-Mandelamidin % 42 verim ve % 99 enantiyomerik aşırılıkta elde edildiği belirlenmiştir.



Şekil 4.110.Enantiyosaf Mandelamid sentezi için GIPSL lipazının tekrar kullanım kararlılığı.

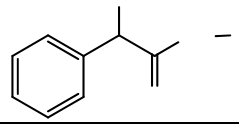
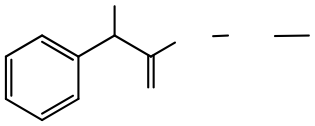
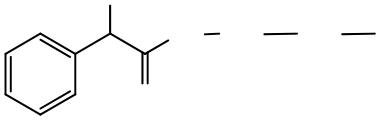
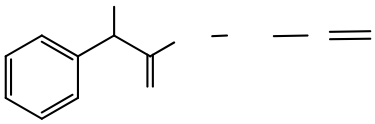
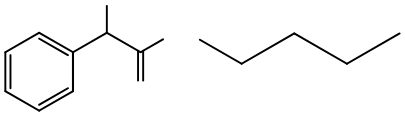
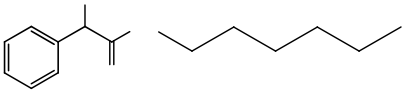


Şekil 4.111.Enantiyosaf Mandelamid sentezi için PIPSL lipazının tekrar kullanım kararlılığı.

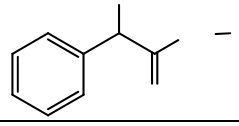
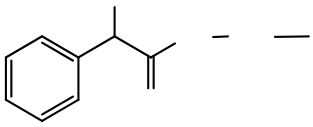
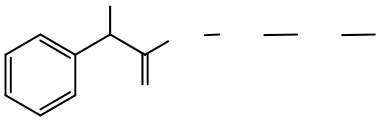
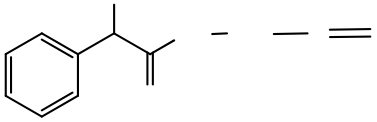
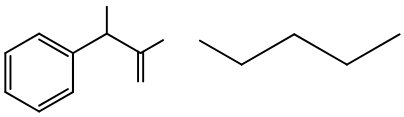
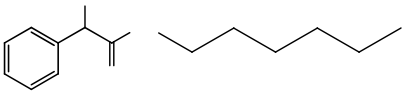
4.1.5.1.Farklı Primer Aminlerin Mandelik Asidin Asimetrik Amidasyonu İçin Kullanılması

GIPSL ve PIPSL kullanımı ile Mandelik asidin asimetrik amidasyonunda farklı primer aminlerin kullanılmasıyla elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2'de özetlenmiştir. GIPSL ve PIPSL için farklı zincir uzunluğunda primer aminler kullanıldığında elde edilen ürünler için sentez veriminin ve enantiyomerik aşırılığın değişmediği belirlenmiştir.

Çizelge 4.1.GIPSL için farklı zincir uzunluğunda primer aminler kullanıldığında elde edilen ürün, konfigürasyon, verim ve enantiyomerik aşırılık.

Amin	Ürün	Konfigürasyon	Verim (%)	ee (%)
Metilamin		(R)-2-hidroksi-N-metil-2-fenil asetamid	50	99
Etilamin		(R)-2-hidroksi-N-etil-2-fenil asetamid	50	99
Propilamin		(R)-2-hidroksi-N-propil-2-fenil asetamid	50	99
Allilamin		(R)-2-hidroksi-N-allil-2-fenil asetamid	50	99
Butilamin		(R)-2-hidroksi-N-butil-2-fenil asetamid	50	99
Hekzilamin		(R)-2-hidroksi-N-hekzil-2-fenil asetamid	50	99

Çizelge 4.2. PIPSL için farklı zincir uzunluğunda primer aminler kullanıldığında elde edilen ürün, konfigürasyon, verim ve enantiyomerik aşırılık.

Amin	Ürün	Konfigürasyon	Verim (%)	ee (%)
Metilamin		(R)-2-hidroksi-N-metil-2-fenil asetamid	50	99
Etilamin		(R)-2-hidroksi-N-etil-2-fenil asetamid	50	99
Propilamin		(R)-2-hidroksi-N-propil-2-fenil asetamid	50	99
Allilamin		(R)-2-hidroksi-N-allil-2-fenil asetamid	50	99
Butilamin		(R)-2-hidroksi-N-butil-2-fenil asetamid	50	99
Hekzilamin		(R)-2-hidroksi-N-hekzil-2-fenil asetamid	50	99

4.1.6.Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi ve Nükleer Magnetik Rezonans Spektroskopisi Analizleri

İmmobilizasyon çalışmalarında ara kol olarak kullanılan polisüksinimid aspartik asidin HCl içeren ortamda 250 ºC'de polimerize edilmesi ile hazırlanmıştır. Sentezlenen polisüksinimidin karakterizasyonu FT-IR spekstroskopisi kullanılarak yapılmıştır. Polisüksinimidin FT-IR spektrumu değerlendirildiğinde 1713 cm^{-1}'deki pikin karbonil grubuna, 2953 cm^{-1}'deki pikin –CH veya $–CH_2$ grubuna ait olduğu, 1420-1335 ve 1200-1125 cm^{-1}'deki piklerin ise N-Sübstitüye süksinimid yapısına ait olduğu belirlenmiştir (EK 1).

L-Askorbil palmitatın FT-IR analizi sonucu elde edilen spektrum değerlendirildiğinde 3381-3407 cm^{-1} arasında elde edilen pikin –OH bağına, 2851-2919 cm^{-1} arasında elde edilen pikin C-H bağına (-CH veya $–CH_3$), 1756-1731 cm^{-1} arasında elde edilen pikin ester bağına, 1688-1651 cm^{-1} arasında elde edilen pikin karbonil bağına, 1468 cm^{-1} elde edilen pikin $–CH_2$ veya $–CH_3$ grubuna, 721 cm^{-1} elde edilen pikin $-(CH)_2$ grubuna ait olduğu belirlenmiştir (EK 2). L-Askorbil palmitatın sentezi ^1H ve ^{13}C NMR spektrumu ile elde edilen sonuçlar ile de desteklenmiştir. (EK 3-4).

Çalışmamızda elde edilen amino alkollerin FT-IR spektrumları incelendiğinde 3400 ve 3012 cm^{-1}'de sekonder alkol ve amin gruplarına ait pikler görülmektedir. Sekonder alkol grubunun immobilize lipaz ile açillenmesi sonucunda ürünlere ait FT-IR spektrumlarında 3400 cm^{-1}'de görülen sekonder alkol grubuna ait pikin yok olduğu ve açilleme sonucu oluşan karbonil pikinin 1713 cm^{-1}'de' oluştuğu belirlenmiştir (EK 5-16). Amino alkollerin ^1H spektrumları icelendiğinde sekonder alkol grubuna ait H atomunun 3,6-3,7 ppm arasında pik verdiği belirlenmiştir. Ürünlere ait ^1H spektrumları incelendiğinde ise sekonder alkol grubunun açillenmesi sonucu bu gruba ait pikin yok olduğu belirlenmiştir (EK 17-28). Açillemenin hidroksil grubundan olduğu amino alkollere ve ürünlere ait ^{13}C NMR spektrum sonuçları ile de desteklenmiştir (EK 29-40).

Sentezlenen amidlerin FT-IR spektrumları incelendiğinde amid grubuna ait pikin 1654 cm^{-1}'de oluştuğu belirlenmiştir (EK 41-47). Amid bağının varlığı ^{1}H (EK 48-54) ve ^{13}C NMR spektrumları ile de doğrulanmıştır (EK 55-61).

4.2. TARTIŞMA

Serbest lipazların karboksilli ester ve amid sentezi reaksiyonlarında kullanımlarının, reaksiyon ortamında bulunan organik çözücülerle denatüre ediliyor olmaları nedeniyle, pratik olmadığı bildirilmiştir. (Jansen ve ark., 1992; Lily ve Woodley, 1996; Woodley ve ark., 1991; Van Sonsbeek ve ark., 1993). Diğer taraftan lipazlar immobilize edilerek reaksiyon koşullarında kararlılıkları artırılmaya çalışılmakta böylece serbest lipazların kullanım alanlarının sınırlı olduğu karboksilli ester ve amid sentezlerinde, rasemik alkol, karboksilli asit ve aminlerin kinetik rezolusyonu alanlarında kullanımları araştırılmaktadır. Bu çalışmada *Pseudomonas sp*. ve *Mucor miehei* lipazlarının immobilizasyonunda mekanik ve termal kararlılığının yüksek olması, mikrobiyal ataklara ve organik çözücülere direçli olması, kolay bulunabilirliği ve ucuz olması nedeniyle destek olarak florisil, immobilizasyon yöntemi olarak kovalent immobilizasyon seçilmiştir. İmmobilize lipaz enzimlerin L-Askorbil palmitat sentezi, 6 farklı rasemik amino alkolün kinetik rezolusyonu ve rasemik mandelik asitin asimetrik amidasyon reaksiyonlarındaki kullanım alanları araştırılmıştır.

Florisil destek 3-APTES ile aktifleştirilmiş ve yüzeyinde primer amin grupları oluşturulmuştur. Primer amin grubu içeren desteklerin glutaraldehit ile muamele edilmesi ve sonrasında enzimin immobilizasyonu çoğu araştırıcı tarafından yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Tükel ve Alptekin, 2004; Taylor ve ark., 2005; Gomez ve ark., 2006, Kahraman ve ark., 2007; Alptekin ve ark., 2009). Destekte yapılan modifikasyonlardan sonra destekteki fonksiyonel grupların sayısı desteğe bağlanan enzim moleküllerinin miktarını etkileyen en önemli parametrelerden biridir. Florisil desteğinin 3-APTES ile aktifleştirilmesi sonucunda 1g destekte bulunan $-NH_2$ grubu miktarının yaklaşık 270 μmol/g destek olup aktive edilen desteğin glutaraldehit ile muamelesi sonrasında primer amin grubunun %90'nı glutaraldehit

ile modifiye edilebilmektedir. Literatürde, primer amin grubu ile glutaraldehitin reaksiyonu sonucu oluşan Schiff bazının kararlı olmadığı ve stabilizasyonu için sodyumborhidrür veya sodyumsiyanoborhidrür kullanılarak sekonder amine dönüştürülmesi gerektiği, ancak sodyumborhidrürün Schiff bazının yanında aldehit grubunu da indirgediği ve asidik pH'larda parçalandığı, sodyumsiyanoborhidrürün ise seçimsel olarak sadece Schiff bazını indirgediği ve pH 4-10 aralığında etkili bir şekilde kullanılabileceği bildirilmiştir (Borch, 1971). Bu nedenle sodyumsiyano borhidrür Schiff bazlarının indirgenmesi amacıyla seçilmiştir.

Literatürde, *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* lipazlarının florisile immobilizasyonu ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Aktifleştirilmiş florisile glutaraldehit ara kolu üzerinden immobilize edilen *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* lipazları için en uygun bağlanma pH'sı sırasıyla 6,0 ve 5,5 olup bu pH'lardaki en yüksek bağlanma miktarları sırasıyla 3,2 ve 3 mg prot./g destektir. (Şekil 4.1 ve 4.6). Aktifleştirilmiş florisile polisüksinimid ara kolu üzerinden immobilize edilen *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* lipazları için ise en uygun bağlanma pH'sı sırasıyla 6,5 ve 6,0 olup bu pH'lardaki en yüksek bağlanma miktarları ise sırasıyla 2,8 ve 2,6 mg prot./g destektir. Bai ve Zhou (2004) silika jele polisuksinimid üzerinden immobilize edilen domuz pankreası lipazının 1g desteğe bağlanma miktarının 2,3 mg olduğunu bildirmişlerdir. Sonuçlar polisüksinimid ile aktifleştirilmiş florisil ve silikajelin gram destek başına protein bağlama kapasitelerinin birbirine yakın olduğunu göstermektedir. *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* lipazları için en yüksek aktivite gösterdiği pH'lar bağlanma pH'ları ile aynıdır. Bu sonuçlar *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* lipazlarının aktifleştirilmiş florisile glutaraldehit ve polisüksinimid ara kolu üzerinden immobilizasyonunda asidik pH'larda (5,5-6,5) desteğe en uygun konformasyonla bağlandığını göstermektedir.

Pseudomonas sp. ve *Mucor miehei* lipazları ile 3 farklı sıcaklıkta (5, 15 ve 25ºC) yapılan immobilizasyon çalışmalarında immobilizasyon sıcaklığının 25 ºC'nin altında olduğu sıcaklıklarda (5 ve 15 ºC) genel olarak tüm destekler için lipaz bağlanma yüzdelerinin ve immobilize lipaz aktivitelerinin daha yüksek olduğu görülmüştür.

Pseudomonas sp. ve *Mucor miehei* lipazlarının aktifleştirilmiş florisile glutaraldehit ara kolundan immobilizasyonu için en uygun immobilizasyon süresi her iki lipaz örneği için 2 saat olarak bulunmuştur. *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* lipazlarının aktifleştirilmiş florisile polisüksinimid ara kolu üzerinden immobilizasyonu için ise en uygun immobilizasyon süresi yine her iki lipaz örneği için 6 saat olarak belirlenmiştir. Glutaraldehit ara kolu üzerinden yapılan immobilizasyon için immobilizasyon süresinin daha kısa olması aldehit grubu ile enzimin serbest primer amin grubu (ları) arasındaki reaksiyonun bu grupların polisüksinimid ile verdiği reaksiyondan daha hızlı olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.21'den görüleceği gibi GIPSL örneğinin geniş bir pH (5,5-9,0) aralığında aktivitesinin önemli ölçüde değişmemesi immobilizasyon sonucu *Pseudomonas sp.* lipazının pH değişimine karşı bir stabilite kazandığını göstermektedir. PIPSL, GIMML ve PIMML örneklerinin optimum pH değerlerinin serbest formlarına göre daha asidik pH'lara kayması florisil desteğinin bazik özelliği ile açıklanabilir. Literatürde genel olarak bazik karakter gösteren desteklere yapılan enzim immobilizasyonu sonucu serbest enzimin optimum pH değerinin asidik bölgelere kayacağı bildirilmiştir (Wiseman, 1986). Benzer sonuçlar aktifleştirilmiş florisile ve cam boncuklara glutaraldehit ara kolu üzerinden yapılan katalaz immobilizasyonları sonucunda da görülmüş ve serbest enzimin optimum pH'sının immobilizasyon sonucu asidik bölgeye kaydığı bildirilmiştir (Tükel ve Alptekin, 2004; Alptekin ve ark., 2009).

Serbest ve immobilize *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* lipazlarının aktivitelerinin tampon derişimine bağlı değişimleri incelendiğinde serbest ve immobilize *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* örneklerinin aktivitelerinin denenen aralıklardaki tampon derişiminden etkilendiği belirlenmiştir, bu durum reaksiyon ortamının iyonik şiddetinin lipazın stabilizasyonunu sağlamada önemli bir rol aldığını göstermektedir.

Serbest ve immobilize *Pseudomonas sp.* lipazları için optimum sıcaklık değeri 35 ºC olarak belirlenmiştir. GIPSL ve PIPSL'in 50-60 ºC aralığındaki bağıl aktivitelerinin serbest *Pseudomonas sp.* lipazına göre oldukça yüksek olması immobilizasyon sonucu *Pseudomonas sp.* lipazının yüksek sıcaklıklarda

stabilitesinin arttığını göstermektedir. Benzer durum serbest ve immobilize *Mucor miehei* lipazları için de belirlenmiştir. Serbest *Mucor miehei* lipazının 60 ºC aktivitesini tamamen kaybetmişken immobilize *Mucor miehei* lipazların 60 ºC'de aktivitelerini önemli ölçüde koruyor olmaları immobilizasyon sonucu *Mucor miehei* lipazının 60 ºC'de stabilitesinin arttığını göstermektedir. Bu durum immobilizasyon için kullanılan destekle *Mucor miehei* lipazının etkileşmesi sonucunda rijit bir yapının oluşması ile açıklanabilir (Bayramoğlu ve ark., 2002; Phadtare ve ark., 2004). Ayrıca, immobilize *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* lipazlarının aktivasyon enerjilerinin serbest *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* lipazlarından daha düşük olması immobilizasyon işlemi sonrasında enzim stabilitesinin artması ile açıklanabilir (Rogalski ve ark., 1997).

GIPSL ve PIPSL örneklerinin V_{max} değerleri ($1,3x10^3$ U/mg prot. ve $1,2x10^3$ U/mg prot.) serbest *Pseudomonas sp.* lipazının V_{max} değerinin ($3,4x10^3$ U/mg prot.) sırasıyla %38'i ve 35'i kadardır. GIMML ve PIMML örneklerinin V_{max} değerleri (42 U/mg prot. ve 36,2 U/mg prot.) ise serbest *Mucor miehei* lipazının V_{max} değerinin (118,9 U/mg prot.) % 35'i ve 30'u kadardır. İmmobilize lipaz örneklerinin V_{max} değerlerinin serbest lipaz örneklerinden düşük olmasının nedeni immobilizasyon sonucu enzimin hareket sınırlandırılmasının artması ve/veya immobilizasyon sonucu enzim konformasyonunun değişmesi ile açıklanabilir. Literatürde çeşitli lipaz enzimlerinin çeşitli desteklere immobilizasyonları sonucunda V_{max} değerlerinin serbest türlerinin V_{max} değerine göre %20'si ile 83'ü arasında değiştiğini bildiren çalışmalar mevcuttur (Knezevic ve ark, 2007; Ghiaci ve ark., 2009; Jegannathan ve ark., 2009; Tutar ve ark., 2009). GIPSL ve PIPSL örneklerinin K_m değerleri (1,19 ve 0,9 mM) serbest *Pseudomonas sp.* lipazının K_m değerinden (4,46 mM) daha düşük bulunmuştur. GIPSL ve PIPSL örneklerinin K_m değerlerinin serbest *Pseudomonas sp.* lipazından küçük olmasının nedeni immobilizasyon sonucu enzimin substrata olan ilgisinin artması ile açıklanabilir. GIPSL ve PIPSL örneklerinin k_{kat}/K_m değerleri serbest *Pseudomonas sp.* lipazının k_{kat}/K_m değerinden sırasıyla 1,5 ve 1,8 kat daha yüksek bulunmuştur. *Mucor miehei* lipazının K_m değerinin ise immobilizasyon işlemi sonucunda değişmemesi immobilizasyon sonunda enzimin substrata olan ilgisinin değişmemesi ile açıklanabilir. GIMML ve PIMML

örneklerinin k_{kat}/K_m değerleri ise serbest lipazın yaklaşık %3'ü kadardır. Bu sonuçlar özellikle *Pseudomonas sp.* lipazı için immobilizasyonun etkinliğinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Serbest, FIPSL ve PIPSL örneklerinin 60 ºC'deki yarı ömürleri sırasıyla 44,7, 117,4, 88,8 saat olarak belirlenmiştir. Bu değerler *Mucor miehei* örnekleri için sırasıyla 4,91, 23,2 ve 23,9 saat olarak belirlenmiştir. Sonuçlar immobilizasyon ile lipazın termal kararlılığının arttığını göstermektedir. Bai ve Zhou (2004) domuz pankreas lipazının silika jele polisüksinimid ara kolu üzerinden immobilizasyonunda lipaz enziminin polisüksinimide bağlanmasıyla süksinimid ünitesinin türevi olan aspartamide dönüşebileceğini ve aspartamid birimlerinin lipaz enzimi ile hidrojen bağları ile bağlanarak protein benzeri rijit yapılar oluşturabileceğini bildirmişlerdir. Literatürde çeşitli lipazların çeşitli desteklere immobilizasyonu sonucunda termal kararlılığının arttığını bildiren çalışmalar mevcuttur (Bayramoğlu ve ark., 2005; Ghiaci ve ark., 2009; Özmen ve ark., 2009; Yiğitoğlu ve ark. 2010; Kandasamy ve ark., 2010).

İmmobilize lipaz örneklerinin tekrar kullanım kararlılıkları kesikli reaktör sisteminde incelenmiş ve 25 kullanım sonunda GIPSL, PIPSL, GIMML ve PIMML örneklerinin başlangıç aktivitelerinin sırasıyla %92, 80, 60 ve 52'sini korudukları belirlenmiştir. Sonuçlar GIPSL örneğinin hidrolitik aktivite yönünden tekrar kullanım kararlılığının daha yüksek olduğunu göstermektedir.

Yağ asitlerinin C vitamini esterlerinin immobilize lipaz kullanımı ile sentezi sahip oldukları ticari önemden dolayı oldukça araştırılmaktadır (Yan ve ark., 1999; Watanabe ve ark., 2001;Song ve ark., 2002; Adamczak ve ark., 2005). Bu sentezlerde hem kullanılan C vitaminini hem de yağ asidini çözmek amacıyla çeşitli organik çözücüler kullanılmaktadır. Song ve ark. (2002) selit üzerine immobilize ettikleri *Candida sp.* lipazı ile L-Askorbil oleat sentezini etanol, tetrahidrofuran, piridin, butanol, 2-metil-2-butanol, hekzanol, oktanol ve hekzan içerisinde gerçekleştirmişler ve sadece 2-metil-2-butanol içerisinde gerçekleştirilen sentezde ürün elde ettiklerini bildirmişlerdir. Lipaz katalizli esterifikasyon reaksiyonlarında hem enzimi aktif formda tutabilmek hem de dengeyi ürünler tarafına kaydırmak amacıyla ortama eklenen su miktarının optimize edilmesi gerekmektedir. İmmobilize

Pseudomonas sp. ve *Mucor miehei* lipazları ile gerçekleştirilen L-Askorbil palmitat sentezinde kullanılan tüm immobilize enzimler için optimum su miktarı reaksiyon hacminin %2'sine denk gelen miktar olarak bulunmuştur. Reaksiyon ortamına eklenen su miktarının reaksiyon hacminin %2'sinin üzerine çıkartılması dengeyi girenler yönüne kaydırmıştır. Esterleşme reaksiyonu sırasında açığa çıkan suyun sürekli olarak uzaklaştırılmasının ester verimi açısından önemli bir parametre olduğu bildirilmiştir (Song, 2002). Esterleşme reaksiyonda açığa çıkan suyun uzaklaştırılması amacıyla reaksiyon ortamına moleküler elek eklenmesi yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. İmmobilize *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* lipazları ile gerçekleştirilen L-Askorbil palmitat sentezinde optimum moleküler elek miktarı 50 mg/mL olarak ve moleküler elek miktarının 50 mg/mL'nin üzerine çıkartılmasının L-Askorbil palmitat verimini arttırmadığı belirlenmiştir. Benzer sonuç Song ve ark. (2002) tarafından yapılan çalışmada da rapor edilmiştir.

L-Askorbil palmitat sentezinde optimum reaksiyon süresi ve sıcaklığı tüm lipaz örnekleri için 24 saat ve 50 ºC olarak bulunmuştur. Daha uzun reaksiyon süreleri sonunda ürün veriminde meydana gelen azalma L-Askorbil palmitatın uzun reaksiyon sürelerinde hidroliz hızında (geri reaksiyon) bir artışın meydana geldiğini göstermektedir. Reaksiyonda kullanılan immobilize lipaz miktarlarının artması (10-30 mg) ürün veriminde doğrusal bir artışa neden olmuş ve 50 mg immobilize lipaz örnekleri ile maksimum ürün verimine (%90-95) ulaşılmıştır. Yan ve ark., (1999) 50 mg ticari Chirazyme L-2 immobilize lipazı kullandıklarında 48 saat reaksiyon süresi sonunda L-Askorbil palmitat için ürün verimini %91 olarak belirlemişlerdir.

İmmobilize lipaz örneklerinin L-Askorbil palmitat sentezi için tekrar kullanım kararlılıkları incelendiğinde GIPSL örneklerinin 10 kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin %80'ını koruduğu ve çalışmada kullanılan diğer immobilize lipaz örneklerinden daha yüksek tekrar kullanım kararlılığı gösterdiği belirlenmiştir.

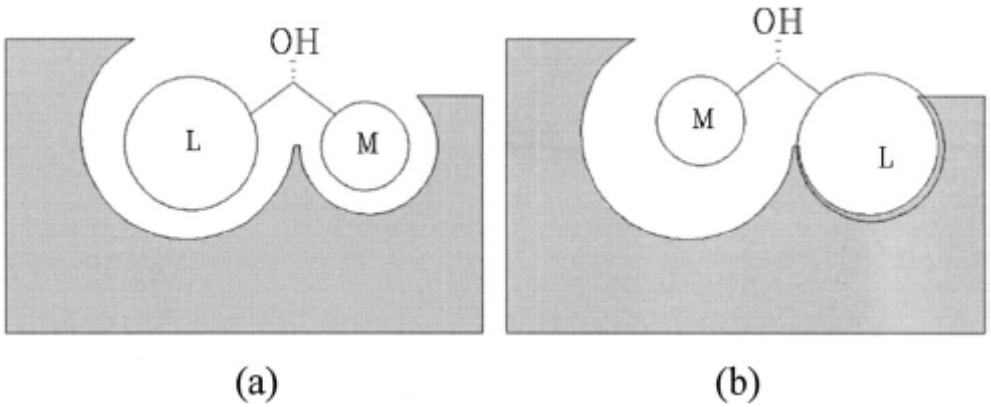
L-Askorbil palmitatın FT-IR, ^{1}H ve ^{13}C NMR spektrum sonuçları değerlendirildiğinde immobilize lipaz örnekleri ile gerçekleştirilen L-askorbil palmitat sentezinin pozisyona spesifik olduğu ve esterleşmenin askorbik asitin 6. karbonundaki –OH grubu üzerinden gerçekleştiği bulunmuştur. Benzer sonuçlar farklı araştırıcılar tarafından immobilize lipazlar kullanılarak sentezi gerçekleştirilen

L-Askorbil laurat, miristat, palmitat, stearat ve oleat sentezleri için de bulunmuş ve yağ asitlerinin askorbik asite 6. karbonundaki –OH grubu üzerinden bağlandığı bildirilmiştir (Yan ve ark., 1999; Song ve ark., 2002; Adamczak ve ark., 2005).

β-blokırlar kardiyovasküler rahatsızlıkların tedavisinde yaygın bir kullanım alanına sahiptirler (Kennedy, 2001; Mehvar ve ark., 2001). β-blokırların bir çoğu ticari olarak rasemik formda satılmakta ve bu rasemik formun kullanımının zararlı yan ve toksik etkilerinin olduğu ve bu etkilerin daha çok amino alkolün R enantiyomerinden kaynaklandığı bildirilmektedir (Eber, 1990, Zelaszczyk ve ark., 2007). Rasematların birbirinden ayrılmasında kinetik rezolusyon, seçimsel kristalizasyon ve kromatografik yöntemler kullanılmaktadır (Ghanem ve Aboul-Enein, 2005).Lipazlar sekonder alkol grubuna olan enantiyoseçiciliklerinin çok yüksek olması nedeniyle özellikle sekonder alkol grubu taşıyan rasemik moleküllerin kinetik rezolusyonu için kullanılmaktadır. (Habulin ve ark., 2009, Wlelechowska ve ark., 2005, Jacobsen ve ark., 2005, Wang ve ark., 2005). Çalışmamızda amino alkollerin kinetik rezolusyonları yüksek verim ve enantiyomerik aşırılıkta gerçekleştirilmiştir.Rasemik sekonder akollerin lipaz katalizli kinetik rezolusyonunda açilleme reaktifi olarak süksinik anhidrit, izoprenil asetat ve vinil asetat yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Ema ve ark., 1998). Literatürde vinil asetatın lipazın aktif merkezinde bulunan serin aminoasiti üzerine yüksek reaktivite gösterdiği ve açilleme sonrası oluşan vinil alkolün keto-enol tautomerisi ile geri dönüşümsüz olarak asetaldehite döndüğü bildirilmiştir (Wielechowska ve ark., 2005; Ema ve ark., 1998; Kamal ve ark., 2007; Yadav ve ark., 2007). Bu nedenlerden dolayı çalışmamızda vinil asetat açilleme reaktifi olarak denenmiştir. Chiou ve ark., (1997), rasemik propranolün *Candida cylindracea* lipazı ile gerçekleştirdikleri kinetik rezolusyonunda açilleme reaktifi olarak asetik anhidrit, vinil asetat ve izoprenil asetatı kullanmışlardır. Vinil asetat ve izoprenil asetatın açilleme reaktifi olarak kullanıldığı durumda açillemenin sekonder amin üzerinden olduğunu ve vinil asetatın kullanıldığı durumda istenmeyen yan ürünlerin meydana geldiğini bildirmişlerdir. Ancak, bizim yaptığımız çalışmada ise herhangi bir yan ürünün oluşmadığı ve ^{1}H ve ^{13}C NMR spektroskobileri ile yapılan analizler sonucu ise açillemenin amin grubu üzerinden değilde alkol grubu üzerinden olduğu belirlenmiştir (Ek 17-40).

İmmobilize *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* örnekleri ile gerçekleştirilen rasemik amino alkollerin kinetik rezolusyonu, reaksiyonda kullanılan substrat ve ürünleri kolaylıkla çözebilen ve reaksiyon ortamından kolaylıkla uzaklaştırılabilen farklı eter çözücüleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan eter çözücülerinin log P değerleri dioksan için -0,31, tetrahidrofuran için 0,4, dietileter için 0,76 tersiyer butil metil eter için 0,96 ve diisopropil eter için ise 1,4'tür. Çalışmamızda en yüksek ürün verimleri DIPE ve TBME'in çözücü ortamı olarak kullanıldığı reaksiyonlarda elde edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde log P değeri 0,96-1,4 aralığında olan organik çözücülerin rasemik amino alkollerin kinetik rezolusyonu için uygun çözücüler olduğu, log P değeri 0,4'ün altında olan organik çözücülerin ise reaksiyon için uygun çözücü ortamı olmadığı söylenebilir.

Çalışmada GIPSL, PIPSL, GIMML ve PIMML örneklerinin kinetik rezolusyonu %44-50 arası verim ve %99 enantiyomerik aşırılıkta gerçekleştirdiği ve amino alkoldeki amin grubuna bağlı alkil grubunun zincir uzunluğu arttıkça reaksiyona girmeden kalan S-Alkolün ürün verimi ve enantiyomerik aşırılığının arttığı bulunmuştur.Çalışmada kullanılan tüm immobilize lipaz örnekleri için yaklaşık benzer sonuçların elde edilmesi immobilize *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* lipazlarının rasemik alkoller üzerine aynı enantiyoseçiciliğe sahip olduğunu göstermektedir. Kazlauskaz ve ark., (1991) sekonder alkol grubu içeren, yapıları birbirinden farklı rasemik organik bileşikleri kullanarak ve *Pseudomonas cepacia* lipazının üç boyutlu yapısını inceleyerek yaptıkları çalışmada lipazın enantiyoseçiciliğinin aktif bölgelerinde bulanan büyüklükleri birbirinden farklı 2 cep ile ilişkili olduğunu ve iyi bir enantiyoseçicilik için asimetrik karbon atomuna bağlı grupların (L ve M) büyüklüklerinin birbirinden farklı olması gerektiğini bildirmişlerdir (Şekil 4.112). Bu şekilde gösterildiği gibi enantiyomerin aktif bölgeye uyumlu bir biçimde bağlanması daha hızlı bir biçimde reaksiyona girmesine neden olmaktadır.



Şekil 4.112.Hızlı (a) ve yavaş (b) reaksiyon veren enantiyomerlerin lipazın aktif bölgesine bağlanmalarının gösterimi (Ghanem ve Aboul-enein, 2005).

E değeri katalizörün enantiyomerin birine olan enantiyoseçiciliğini ifade etmektedir ve değeri 1 ise katalizörün enantiyoseçiciliğinin olmadığı dolayısıyla oluşan ürünün rasemik olacağını ifade etmektedir. Endüstriyel uygulamalarda E değerinin en az 20 olması istenmektedir (Bornscheuer ve Kazlauskas, 1999). Literatürde, β-Blokır sentezi için rasemik amino alkollerin direkt olarak lipaz katalizli rezolusyonu, β-Blokırların sentezinde çıkış maddesi olarak kullanılan optikçe aktif klorohidrin, diol, hidroksiesterler üzerinden sentezi ve β-Blokır öncüsü çeşitli aldehit ve ketonların enantiyoseçici olarak indirgenmesi gibi yöntemler bildirilmiştir (Zelaszczyk ve Kononowicz, 2007). Barbosa ve ark., (2010), rasemik propranolol'ün Eupergit C üzerine immobilize edilmiş *Candida antartica* B lipazı ile gerçekleştirdikleri kinetik rezolusyonunda E değerini 57 olarak belirlemişlerdir. Maciejewski ve ark., (2010), çeşitli β-blokırların sentezinde çıkış maddesi olarak kullanılan 3-ariloksi-1-halojenopropan-2-ol'lerin kinetik rezolusyonunu ticari Lipozyme TL immobilize lipazı ile gerçekleştirmişler ve denenen farklı substratlar için 60-99 arasında değişen E değerlerine ulaştıklarını bildirmişlerdir.Çalışmamızda rasemik amino alkollerin immobilize lipaz örnekleri ile gerçekleştirilen direkt kinetik rezolusyonları sonucunda E değeri tüm örnekler için 200'ün üstünde hesaplanmıştır. Bu sonuç GIPSL, PIPSL, GIMML ve PIMML örneklerinin oldukça yüksek bir enantiyoseçiciliğe sahip olduklarını göstermektedir.

İmmobilize lipaz örneklerinin rasemik 2-(etilamino)-1-feniletanolün kinetik rezolusyonunda tekrar kullanım kararlılıkları incelendiğinde ise GIPSL örneğinin

tekrar kullanım açısından daha iyi performans gösterdiği belirlenmiştir. İmmobilize *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* lipazları ile gerçekleştirilen rasemik aminoalkollerin kinetik rezolusyonunda amino grubuna bağlanan alkil grubunun uzunluğu arttıkça ürünün ve reaksiyona girmeden kalan enantiyomerin enantiyomerik aşırılığının arttığı bulunmuştur. Lundell ve ark., (2004) enantiyosaf amino alkollerin β-bloker aktivitesinin amin grubuna bağlı alkil grubunun uzunluğu arttıkça arttığını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda kinetik rezolusyonları gerçekleştirilen amino alkollerin FT-IR ^{1}H ve ^{13}C NMR spektrum sonuçları da elde edilen ürünlerin varlığını doğrulamıştır.

Karboksilli asitlerin primer aminler ile kimyasal katalizörler varlığında reaksiyona sokularak amidlere dönüştürülmesi çok yaygın olarak kullanılan bir yöntem olmasına rağmen, reaksiyon koşullarının çok sert olması, uzun reaksiyon süreleri ve kuvvetli alkali metal katalizörü kullanımı gibi dezavantajlara sahiptir (Hayes, 2001). Bu nedenlerden dolayı karboksilli asit esterlerinin lipazlar katalizli aminoliz reaksiyonları ılımlı koşullarda gerçekleşmesi ve çok farklı amidlerin yüksek rejio, kemo ve enantiyoseçicilikte hazırlanabilmeleri nedeniyle kimyasal yöntemlere alternatif bir yöntem olmuştur (Maderia ve ark., 2000; Irimescu ve Kato, 2004; Liljeblad ve Kanerva, 2006;Tufvesson ve ark., 2007; Gotor, 2008). Bu reaksiyonlarda karboksilli asit esterleri yerine karboksilli asitlerin kullanımının karboksilli asitlerin amonyum tuzları şeklinde çökebilmeleri nedeniyle sınırlı olduğu bildirilmiştir (Gotor, 2008). Ancak, Litjens ve ark., (1999) lipazlar tarafından katalizlenen karboksilli asitlerin amonyak ile amidasyon reaksiyonunun mümkün olduğunu bildirmişlerdir. Levinson ve ark., (2005) organik çözücüler içerisinde çeşitli karboksilli asitlerin amonyak ile *Candida antartica* B lipazı tarafından katalizlenmiş amidasyon reaksiyonunu incelemişler ve kullanılan karboksilli asitlerin çoğu için 55 ºC'de 1 gün reaksiyon süresi sonunda %95'in üzerinde ürün verimi elde ettiklerini bildirmişlerdir. Enantiyosaf mandelik asitler anti-tümör ve anti-obezite ajanlarının sentezlenmesinde çıkış maddesi olarak kullanılmaktadır (Choi ve ark., 2007). Mandelamid ve türevlerinin ise Muskarinik M_3 reseptör antagonistlerinin sentezinde kullanıldıkları bildirilmiştir (Mitsuya ve ark., 2000). Çalışmamızda rasemik mandelik asidin amonyum bikarbonat ve çeşitli primer aminler ile organik

çözücüler içerisinde immobilize *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* örnekleri tarafından katalizlenen asimetrik amidasyon reaksiyonu incelenmiştir. Literatürde bu şekilde benzer bir çalışmaya rastlanılmamıştır ve ilk olarak rasemik mandelik asitten R-Mandelamid ve türevleri asimetrik amidasyon ile çalışmamızda sentezlenmişlerdir.

Şekil 4.117'den görüleceği gibi GIPSL, PIPSL, GIMML ve PIMML örnekleri mandelik asidin asimetrik amidasyonunu yüksek enantiyoseçicilikte gerçekleştirmektedir. Ancak, ürün verimleri açısından bir kıyaslama yapıldığında GIPSL ve PIPSL örneklerinin mandelamid sentezi için daha uygun olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç GIPSL ve PIPSL örneklerinin amid sentezi aktivitesinin GIMML ve PIMML örneklerinden daha yüksek olduğunu göstermektedir.

Rasemik mandelik asidin asimetrik amidasyonu polariteleri birbirinden farklı 5 eter çözücüsü ile gerçekleştirilmiş ve rasemik amino alkollerin kinetik rezolusyonunda olduğu gibi TBME ve DIPE'in diğer kullanılan eter çözücülerinden asimetrik amidasyon için daha iyi olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.120). Bu sonuç daha apolar çözücülerin asimetrik amidasyon için uygun olduğunu göstermektedir.

GIPSL veya PIPSL ile gerçekleştirilen asimetrik amidasyon reaksiyonunda primer amin kaynağı olarak amonyum bikarbonat yerine farklı zincir uzunluğuna sahip primer aminler kullanıldığında elde edilen sonuçlar kullanılan primer amin uzunluğunun değişmesinin reaksiyon verimi ve lipazların enantiyoseçiciliği üzerine bir etkilerinin olmadığı göstermektedir (Çizelge 4.1 ve 4.2).

GIPSL ve PIPSL örneklerinin rasemik mandelik asitin asimetrik amidasyonu için tekrar kullanım kararlılığı incelendiğinde ise GIPSL'in tekrar kullanım kararlılığının PIPSL'ye oranla daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

GIPSL ve PIPSL tarafından katalizlenen rasemik mandelik asitin asimetrik amidasyon reaksiyonunda sentezlenen amidlerin karakterizasyonu FT-IR, ^{1}H ve ^{13}C NMR spekstrokopileri ile yapılmış ve spektrum sonuçları sentezlenen moleküllerin yapılarını doğrulamıştır (Ek 41-61).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

1. Serbest *Pseudomonas sp.* lipazı için optimum pH, tampon derişimi, sıcaklık, K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 7,5, 50 mM, 35 ºC, 4,46 mM ve $3,4x10^3$ U/mg prot., olarak belirlenmiştir.
2. *Pseudomonas sp.* lipazının aktifleştirilmiş florisile glutaraldehit ara kolu üzerinden immobilizasyonunda en uygun immobilizasyon pH'sı, tampon derişimi, sıcaklık, immobilizasyon süresi ve lipaz derişimi sırasıyla 6, 50 mM, 5 ºC, 2 saat ve 1,0 mg/mL olarak belirlenmiştir.
3. *Pseudomonas sp.* lipazının aktifleştirilmiş florisile polisüksinimid ara kolu üzerinden immobilizasyonunda en uygun immobilizasyon pH'sı, tampon derişimi, sıcaklık, immobilizasyon süresi ve lipaz derişimi sırasıyla 5,5, 50 mM, 15 ºC, 6 saat ve 1,0 mg/mL olarak belirlenmiştir.
4. Serbest *Mucor miehei* lipazı için optimum pH, tampon derişimi, sıcaklık, K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 7,5, 50 mM, 35 ºC, 1,09 mM ve 118,9 U/mg prot., olarak belirlenmiştir.
5. *Mucor miehei* lipazının aktifleştirilmiş florisile glutaraldehit ara kolu üzerinden immobilizasyonunda en uygun immobilizasyon pH'sı, tampon derişimi, sıcaklık, immobilizasyon süresi ve lipaz derişimi sırasıyla 6,5, 50 mM, 15 ºC, 2 saat ve 1,0 mg/mL olarak belirlenmiştir.
6. *Mucor miehei* lipazının aktifleştirilmiş florisile polisüksinimid ara kolu üzerinden immobilizasyonunda en uygun immobilizasyon pH'sı, tampon derişimi, sıcaklık, immobilizasyon süresi ve lipaz derişimi sırasıyla 6, 50 mM, 5ºC, 6 saat ve 1,0 mg/mL olarak belirlenmiştir.
7. GIPSL için optimum pH, tampon derişimi, sıcaklık, K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 6,0, 50 mM, 35 ºC, 1,19 mM ve $1,3x10^3$ U/mg prot., olarak belirlenmiştir.
8. PIPSL için optimum pH, tampon derişimi, sıcaklık, K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 6,0, 50 mM, 35 ºC, 0,9 mM ve $1,2x10^3$ U/mg prot., olarak belirlenmiştir.

9. GIMML için optimum pH, tampon derişimi, sıcaklık, K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 6,0, 50 mM, 35 ºC, 1,1 mM ve 42 U/mg prot., olarak belirlenmiştir.

10. PIMML için optimum pH, tampon derişimi, sıcaklık, K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 6,0, 75 mM, 35 ºC, 1,1 mM ve 36,2 U/mg prot., olarak belirlenmiştir.

11. Hidrolitik aktivite yönünden tekrar kullanım kararlılığı en yüksek örnek GIPSL olarak belirlenmiştir.

12. İmmobilize *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* lipazları kullanılarak gerçekleştirilen askorbil palmitat sentezi için optimum su, moleküler elek, sıcaklık, reaksiyon zamanı ve immobilize enzim miktarı çalışmada kullanılan tüm immobilize lipazlar için %2 (v/v), 50 mg/mL, 50 ºC, 24 saat ve 100 mg olarak belirlenmiştir.

13. L-Askorbil palmitat sentezinde çalışmada kullanılan tüm immobilize lipaz örnekleri için %90'ın üzerinde bir verime ulaşılmıştır.

14. L-Askorbil palmitat sentezi için tekrar kullanım kararlılığı en yüksek immobilize örnek GIPSL olarak belirlenmiştir.

15. FT-IR ve NMR spektrumları ile immobilize lipazı örneklerinin pozisyona son derece spesifik olduğu ve esterleşme reaksiyonun askorbik asitin 6.karbonundaki primer alkol grubu üzerinden gerçekleştiği belirlenmiştir.

16. İmmobilize *Pseudomonas sp.* ve *Mucor miehei* lipazları kullanılarak gerçekleştirilen rasemik aminoalkollerin kinetik rezolusyonu için optimum su, sıcaklık, vinilasetat/amino alkol molar oranı, organik çözücü ve immobilize enzim miktarı %2, 50 ºC, 1,5, TBME ve 30 mg immobilize enzim olarak belirlenmiştir.

17. Rasemik amino alkollerin kinetik rezolusyonunda amino grubuna bağlı alkil zincirinin uzunluğu arttıkça reaksiyona girmeden kalan S-aminoalkolün enantiyomerik aşırılığının yaklaşık %20 kadar arttığı belirlenmiştir.

18. Rasemik amino alkollerin kinetik rezolusyonunda tekrar kullanım kararlılığı en yüksek immobilize örnek GIPSL olarak belirlenmiştir.

19. FT-IR ve NMR spektrum sonuçları ile açilleme reaksiyonunun sekonder alkol grubu üzerinden olduğu belirlenmiştir.

20. Rasemik mandelik asitin asimetrik amidasyonunda çalışmada kullanılan GIPSL ve PIPSL örneklerinin ürün veriminin GIMML ve PIMML örneklerine göre yaklaşık 2 kat daha yüksek olması nedeniyle rasemik mandelik asitin asimetrik amidasyonunu için daha uygun biyokatalizörler olduğu belirlenmiştir.

21. Rasemik mandelik asitin asimetrik amidasyonunda amin kaynağı olarak kullanılan primer aminin zincir uzunluğu arttıkça sentez verimi ve enantiyomerik aşırılıkta bir değişmenin olmadığı belirlenmiştir.

22. Rasemik mandelik asitin asimetrik amidasyonu için tekrar kullanım kararlılığı en yüksek immobilize örnek GIPSL olarak belirlenmiştir.

5.2. Öneriler

1. L-Askorbil palmitat sentezi için yağ asidi kaynağı olarak palmitik asit dışında elzem yağ asitleri kullanılabilir.

2. GIPSL, PIPSL, GIMML ve PIMML örnekleri halostakin ve türevleri dışında β-Blokır özelliği gösteren diğer rasemik amino alkollerin direkt kinetik rezolusyonunda kullanılabilir.

3. Halostakin dışında sentezi gerçekleştirilen diğer enantiyosaf amino alkollerin β-Blokır özellikleri araştırılabilir.

4. GIPSL ve PIPSL örnekleri endüstride korozyon inhibitörü ve lubrikant olarak kullanılan oleamid sentezinde kullanım alanı bulabilirler.

5. Çalışmada sentezlenen L-Askorbil palmitat, enantiyosaf amino alkollerin ve enantiyosaf amidlerin gram düzeyinde sentezi çalışılabilir.

KAYNAKLAR

ADAMCZAK, M., BORNSCHEUER,U.T., and BEDNARSKI, W., 2005. Synthesis of ascorbyloleate by immobilized *Candida antarctica* lipases, Process Biochemistry, 40:3177-3180.

ALPTEKİN, Ö., TÜKEL, S.S., YILDIRIM, D., and ALAGÖZ, D., 2009. Characterization and properties of catalase ımmobilized onto controlled pore glass and its application in batch and plug-flow type reactors, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 58:124-131.

AVILA, R., 2005. Increased racemate resolution of propranolol esters by lipase immobilized catalysis, Latin American Applied Research, 35:307-311.

BAHULEKAR, R., AYYANGAR, N. R., and PONRATHNAM, S., 1991. Polyethyleneimine in immobilization of biocatalysts, Enzyme and Microbial Technology,13:858-868.

BAI, Z.W., and ZHOU, Y.K., 2004. A novel enzyme support derived from aminated silica gel and polysuccinimide: preparation and application for the ımmobilization of *Porcine pancreatic* lipase, Reactive and Functional Polymers, 59:93-98.

BARBOSA, O., ARIZA,C., ORTIZ, C., and TORRES, R.,2010. Kinetic resolution of (R/S) propranolol (1-isopropylamino-3-(1-naphtoxy)-2-propanolol catalyzed by immobilized preparations of *Candida antartica* lipase B:(CAL-B), New Biotechnology, doi:10.1016/j.nbt.2010.07.015.

BARRET,A.M., 1985. Cardio beta-adrenoceptor blockade:the guest for selectivity, Journal of Pharmacology, 2:95-108.

BASHEER, S., NAKAJIMA, M., and COGAN, U., 1996. Sugar ester-modified lipase for the esterification of fatty acids and long-chain alcohols, Journal of the American Oil Chemists' Society,73:1475–1479.

BAYRAMOĞLU, G., KAÇAR, Y., DENİZLİ, A., and ARICA, M.Y., 2002. Covalent immobilization of lipase onto hydrophobic group incorporated

poly(2-hydroxyethyl methacrylate) based hydrophilic membrane matrix, Journal of Food Engineering, 52:367-374.

BICKERSTAFF, G. F., 1995. Impact of genetic technology on enzyme technology, Genetic Engineering Biotechnologist, 15:13-30.

BORATYNSKI, J., and ZAL, T., 1990. Colorimetric micromethods for glutaraldehyde determination by means phenol and sulfuric acid or perchloric acid. Analytic Biochemistry,184:259-262.

BORCH, R.F., BERNSTEIN, M.D., and DURST, H.D., 1971. The cyanohydridoborate anion as a selective reducing agent, Journal of the American Chemical Society, 93:2897-2904.

BORNSCHEUER, U. T., and KAZLAUSKAS, R. J., 1999. Hydrolases in organic synthesis; Wiley-Vch: Weinheim, Germany.

BRADOO, S., SAXENA, R.K., and GUPTA, R., 1999. High yields of ascorbyl palmitate by thermostable lipase-mediated esterification, Journal of the American Oil Chemists' Society, 76:1291-1295.

BRENA, B., RYDEN, L., and PORATH, J., 1994. Immobilization of β-galactosidase on metal- chelated- substituted gels, Biotechnology and Applied Biochemistry, 19:217-231.

BRODELUUS, P., and MOSBACH, K., 1987. Immobilization techniques for cells/organelles, Methods in Enzymology, 135:173-454.

BROWN, D. L., and GLATZ, C. E., 1987. Aggregate breakage in protein precipitation, Chemical Engineering Science, 42, 1831-1839.

BRUNO, L.M., COELHO, J.S., MELO, E.H.M., and LIMA-FILHO, J.L., 2005. Characterization of *Mucor miehei* lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic particles, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 21:189-192.

BUCHHOLZ, K., and KLEIN, J., 1987. Characterization of immobilized biocatalysts, Methods in Enzymology,135:3-30.

CABRAL, J. M. S., NOVAIS, J. M., and KENNEDY J. F., 1986. Immobilization studies of whole microbial cells on transition metal activated inorganic supports, Applied Microbiology and Biotechnology, 23:157-162.

CAMBILLAU, C., and VAN TILBEURGH, H., 1993. Structure of hydrolases-lipases and cellulases, Current Opinion in Structural Biology, 3:885-895.

CAO, L., VAN RANTWIJK, F., and SHELDON, R. A., 2000. Cross-linked enzyme aggregates:a simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase,Organic Letters, 2:1361-1364.

CAO, L., 2005. Carrier-bound immobilized enzymes: principles, application and design. Wiley-Vch Verlag Gmbh & Co. Kgaa, Weinheim.

CASTRO, M.S., and GAGO, J.V.S., 1998. Lipase-catalyzed synthesis of chiral amides. A systematic study of the variables that control the synthesis, Tetrahedron, 54:2877-2892.

CLAIR, N. L., and NAVIA, M. A., 1992. Cross-linked enzyme crystals as robust biocatalysts, Journal of the American Chemical Society, 114:7314-7316.

CLAON, P.A., and AKOH, C.C., 1994. Enzymatic synthesis of geranyl acetate in n-hexane with *Candida antarctica* lipases, Journal of the American Oil Chemists' Society,71:575-578.

CSAJAGI, C., SZATZKER, G., TOKE, E.R., URGE, L., DARVAS, F., and POPPE, L.,2008. Enantiomer selective acylation of racemic alcohols by lipases in continuous-flow bioreactors, Tetrahedron: *Asymmetry*, 19:237-246.

CHO, S.W., and RHEE, J.S., 1993. Immobilization of lipase for effective interestification of fats and oils in organic solvents, Biotechnology and Bioengineering, 41:204-210.

CYGLER, M., SCHRAG, J. D., and ERGAN, F., 1992. Advances in structural understanding of lipases, Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 10:143-184.

DALLA-VECCHIA, R., SEBRAO, D., NASCIMENTO, M.G., and SOLDI, V., 2005. Carboxymethylcellulose and poly(vinyl alcohol) used as a film support for lipases immobilization, Process Biochemistry, 40:2677-2682.

DEREWENDA, U., SWENSON, L., GREEN, R., WEİ, Y., DODSON, G.G., YAMAGUCHİ, S., HAAS, M. J., and DEREWENDA, Z. S., 1994. An

unususal buried polar cluster in a family of fungal lipases, Nature Structural and Molecular Biology,1:36-47.

DESAI, P.D. , DAVE, A.M., and DEVI, S., 2005. Alcoholysis of salicornia oil using free and covalently bound lipase onto chitosan beads, Food Chemistry, 97:280-288.

DESNUELLE, P. 1972. The Lipases, The Enzymes, 7:575–616.

DODSON, G., and WLODAWER, A., 1998. Catalytic triads and their relatives, Trends in Biochemical Sciences, 23:347-352.

DOSCHER, M. S., and RICHARDS, F. M., 1963. The actvitiy of an enzyme in the crystalline state: Ribonuclease S, Journal of Biological Chemistry, 238: 2399-2406.

EBER, O., 1990. Additional features of beta-blockers, Clinical Endocrinology, 32:363-370.

EMA,T., JITTANI, M., SAKAI, T., and UTAKA, M., 1998. Lipase-catalyzed kinetic resolution of large secondary alcohols having tetraphenylporphyrin, Tetrahedron Letters, 39:6311-6314.

GHANEM, A., and ABOUL-ENEIN, H.Y., 2005. Application of lipases in kinetic resolution of racemates, Chirality, 17:1-15.

GHIACI, M., AGHAEI, H., SOLEIMANIAN, S., and SEDAGHAT, M.E.,2009. Modified bentonite as a new and efficient support for immobilization of *Candida rugosa* lipase, Applied Clay Science, 43:289-295.

GILLIES, B., YAMAZAKI, H., and ARMSTRONG, D.W., 1987. Production of flavor esters by immobilized lipase, Biotechnology Letters, 9(10):709-714.

GODFREY, T., and WEST, S., 1996. Industrial Enzymology, 2:1-8.

GOMEZ, J.L., BODALO, A., GOMEZ, E., BASTIDA, J., HIDALGO, A.M., and GOMEZ, M., 2006. Immobilization of Peroxidases on Glass Beads: An Improved Alternative for Phenol Removal, Enzyme and Microbial Technology, 39:1016–1022.

GOODMAN,L., and GILLMAN, A.,1985.The Pharmacological Basis of Therapeutics, 4:1049-1057.

GOTOR-FERNANDEZ, V., and GOTOR, V., 2008. Aminolysis and ammonolysis of carboxylic acid derivatives, Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes, pp:171-178.

GOVARDHAN, C.P., 1999. Crosslinking of enzymes for improved stability and performance, Current Opinion in Biotechnology, 10:331-335.

GUISAN, J.M, 2006. Immobilization of enzymes and cells, Humana Press Inc. Totowa, New Jersey.

GUNSTONE F.D., 1994. Chemical Properties,The Lipid Handbook, 2:594-595.

GUTMAN, A., ZUOBI, K., and BOLTANSKY, A., 1987. Enzymatic lactonisation of γ-hydroxyesters in organic solvents. Synthesis of optically pure γ-methylbutyrolactones and γ-phenylbutyrolactone, Tetrahedron Letters, 28:3861-3964.

HABULIN, M., and KNEZ, Z., 2009. Optimization of (R,S)-1-phenylethanol kinetic resolution over *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 58:24-28.

HAYES, K.S., 2001. Industrial processes for manufacturing amines,Applied Catalysis A-General, 221:187-195.

HERMANSON, G.T., MALLIA, A.K., and SMITH, P.K., 1992. Immobilized affinity ligand techniques, Academic Press, London, pp: 283-284.

HOEGH, I., PATKAR, S., HALKIER, T., and HANSEN, M. T., 1995. Two lipases from *Candida antarctica*-cloning and expression in *Aspergillus oryzae*, Canadian Journal of Botany, 73:869-875.

HOM, S. S. M., SCOTT, E. M., ATCHISON, R. E., PICATAGGIO, S., and MIELENZ, J. R., 1991. Characterization and over-expression of a cloned *Pseudomonas* lipase gene, GBF Monographs,16:267-270.

HOUDE, A., KADEMI, A., and LEBLANC, D., 2004, Lipases and their industrial applications, Applied Biochemistry and Biotechnology, 118:155-170.

HSIEH, H.J., CHEN, J.W., GIRIDHAR, R., and WU, W.T., 2005. Synthesis of Mixed esters of ascorbic acid using methyl esters of palm and soybean oils, Preparative Biochemistry and Biotechnology, 35:113-118.

HUGE-JENSEN, B., GALLUZZO, D. R., and JENSEN, R. G., 1987. Partial purification and characterization of free and immobilized lipases from *Mucor miehei*, Lipids, 22:559-565.

IRIMESCU, R., and KATO, K., 2004. Investigation of ionic liquids as reaction media for enzymatic enantioselective acylation of amines, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 30: 189-194.

JACOBSEN, E.E., Andresen, L.S., and Anthonsen, T., 2005. Immobilization does not influence the enantioselectivity of CAL-B catalyzed kinetic resolution of secondary alcohols, Tetrahedron:*Asymmetry*,16:847-850.

JANSSENS, L., DEPOOTER, H. L., SCHAMP, N. M., and VANDAMME, E. J., 1992. Production of flavours by micro-organisms. Process Biochemistry, 27:195-215.

JEGANNATHAN, K.R., CHAN, E.S., and RAVINDRA, P., 2009. Physical and stability characteristics of *Burkholderia cepacia* lipase encapsulated in κ-carrageenan, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 58:78-83.

JORGENSEN, S., SKOV, K. W., and DIDERICHSEN, B., 1991. Cloning, sequence, and expression of a lipase gene from *Pseudomonas cepacia*: lipase production in heterologous hosts requires two *Pseudomonas* genes, Journal of Bacteriology, 173:559-567.

KAEWTHONG,W., SIRISANSANEEYAKUL, S., PRASERTSAN, P., and KITTIKUN, A., 2005. Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase, Process Biochemistry, 40:1525–1530.

KAGEDAL, L., 1998. Immobilized metal ion affinity chromatography, Protein Purification, pp:311-342.

KAHRAMAN, M.V., BAYRAMOĞLU, G., APOHAN, N.K., and GÜNGÖR, A., 2007. α-Amylase Immobilization on Functionalized Glass Beads by Covalent Attachment, Food Chemistry, 104:1385–1392.

KAITARANTA, K.J., 1992. Control of lipid oxidation in fish oil with various antioxidative compounds. Journal of the American Oil Chemists' Society, 69:810-813.

KAMAL, A., KRISHNAJI, T., and KHAN M.N.A., 2007. A Lipase-catalysed resolution of N-(3-cyano-2-hydroxy propan-1-yl) phthalimide:synthesis of (R)-GABOB and (R)-Carnitine, Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic, 47:1-5.

KAMORI, M., HORI, T., YAMASHITA, Y., HIROSE,Y., and NAOSHIMA, Y., 2000. Immobilization of lipase on a new inorganic ceramics support, toyonite, and the reactivity and enantioselectivity of the immobilized lipase, Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic, 9:269-274.

KANDASAMY, R., KENNEDY, L.J., VIDYA, C., BOOPATHY,R., and SEKARAN, G., 2010. Immobilization of acidic lipase derived from *Pseudomonas gessardii* onto mesoporous activated carbon for the hydrolysis of olive oil, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 62: 59-66.

KATCHALSKI-KATZIR, E., 1993. Immobilized enzymes: Learning from past successes and failures, Trends of Biotechnology, 11:471-478.

KAWAKAMI, K., TAKAHASHI, R., SHAKERI, M., and SAKAI, S., 2009. Application of a lipase-immobilized silica monolith bioreactor to the production of fatty acid methyl esters, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 57:194-197.

KAZLAUSKAS, R.J., WEISSFLOCH, A.N.E., RAPPAPORT, A.T., and CUCCIA, L.A., 1991. A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*, Journal of Organic Chemistry, 56:2656-2665.

KENNEDY, J.F., and CABRAL, J.M.S., 1985. Immobilization of biocatalysts by metallink/chelation processes, Immobilized Cells and Enzymes, 1:19-37.

KING, D.M., and PADLEY, F.B., 1990.European Patent 0209327.

KWON, D.Y., SONG, H.N., and YOON, S.H., 1996. Synthesis of medium-chain glycerides by lipase in organic solvent, Journal of the American Oil Chemists' Society, 73:1521-1525.

LEVINSON, W.E., KUO, T.M., and KURTZMAN, C.P., 2005. Lipase-catalyzed production of novel hydroxylated fatty amides in organic solvent, Enzyme and Microbial Technology, 37:126-130.

LI,Y., ZHOU, G., QIAO,W., and WANG, Y., 2009. Immobilization of *Porcine pancreas* lipase on fiber-like SBA-15 mesoporous material, Materials Science and Engineering B, 162:120-126.

LIAPAKIS, G., CHAN,W.C., PAPADOKOSTAKI, M., and JAVITCH, J.A., 2004. Synergistic contributions of the functional groups of epinephrine to its affinity and efficacy at the β2 adrenergic receptor, Molecular Pharmacology, 65:1181-1190.

LILJEBLAD, A., and KANERVA, L.T., 2006. Biocatalysis as a profound tool in the preparation of highly enantiopure β-amino acids, Tetrahedron, 62:5831-5854.

LILLY, M. D., and WOODLEY, J. M., 1996. A structured approach to design and operating of biotransformation processes, Journal of Industrial Microbiology, 17:24-29.

LITJENS, M.J.J., STRAATHOF, A.J.J., JONGEJAN, J.A., and HEIJNEN J.J., 1999. Exploration of lipase-catalyzed direct amidation of free carboxylic acids with ammonia in organic solvents, Tetrahedron, 55:12411-12418.

LIU, X.Y., GUO, F.L., WU, L.M., LIU, Y.C., and LIU, Z.L., 1996. Remarkable enhancement of antioxidant activity of vitamin C in an artificial bilayer by making it lipo-soluble, Chemistry and Physics of Lipids, 83:39-43.

LIU, C.H., LIN, Y.H., CHEN, C.Y., and CHANG, J.S., 2009. Characterization of *Burkholderia* lipase immobilized on celite carriers, Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 40:359-363.

LOHITH, K., and DIVAKAR, S., 2005. Lipase-catalyzed synthesis of l-phenylalanyl-d-glucose, Journal of Biotechnology, 117:49-56.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., and RONDALL, R.J, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193: 261-275.

LUNDELL, K., KATAİNEN, E., KIVINIEMI, A., AND KANERVA, L.T., 2004. Enantiomers of adrenaline-type amino alcohols by *Burkholderia cepacia* lipase-catalyzed asymmetric acylation, Tetrahedron:*Asymmetry*, 15:3723-3729.

MACRAE, A.R., 1983. Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats, Journal of the American Oil Chemists' Society, 60:291-294.

MADEIRA RAU, R., RANTWIJK, F.V., SEDDON, K.R., and SHELDON, R.A., 2000. Lipase-Catalyzed Reactions in Ionic Liquids, Organic Letters, 2: 4189-4191.

MALCATA, F.X., HILL C.G., and AMUNTSON, C.H., 1991. Use of a lipase immobilized in a membrane reactor to hydrolyze the glycerides of butteroil, Biotechnology and Bioengineering, 38(8):853-868.

MAKITA, A., NIHIRA, T., and YAMADA, Y., 1987. Lipase catalyzed synthesis of macrocyclic lactones in organic solvents, Tetrahedron Letters, 28:805-808.

MARGOLIN, A. L., and NAVIA, M. A., 2001. Protein crystals as novel catalytic materials, Angewandte Chemie, International Edition, 40:2204-2222.

MCNEILL, G.P., AND YAMANE, T., 1991. Further improvements in the yield of monoglycerides during enzymatic glycerolysis of fats and oils, Journal of the American Oil Chemists' Society, 68:6-10.

MESSING, R. A., 1976. Adsorption and inorganic bridge formations, Methods in Enzymology, 44:148-169.

NAKANISHI, Y., WATANABE, H., WASHIZU, K., NARAHASHI, Y., and KURONO, Y., 1991. Cloning, sequencing and regulation of the lipase gene from *Pseudomonas sp.* M-12-33, Lipases,16:263-266.

NOUREDDINI, H., GAO, X., and PHILKANA, R.S., 2005. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil, Bioresource Technology, 96:769-777.

O'DRISCOLL, K. F., 1976. Techniques of enzyme entrapment in gels, Methods in Enzymology, 44:169-183.

OMAR, I.C., SAEKI, H., NISHIO, N., and NAGAI, S., 1988. Hydrolysis of triglycerides by immobilized thermostable lipase from *Humicola lanuginosa*, Agricultural Biological Chemistry, 52(1):99-105.

ÖZMEN, E.Y., SEZGİN, M., and YILMAZ, M., 2009. Synthesis and characterization of cyclodextrin-based polymers as a support for immobilization of *Candida rugosa* lipase, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 57:109-114.

PATEL, R. N., 1998. Annual Review of Microbiology, 98:361-395.

PHADTARE, S., D'BRITTO, V., PUNDLE, A., PRABHUNE, A., and SASTRY, M.,2004. Invertase-lipid biocomposite films: preparation, characterisation and enzymatic activity, Biotechnology Progress, 20,156-161.

PAHUJANI, S., KANWAR, S.S., CHAUHAN, G., and GUPTA, R., 2008. Glutaraldehyde activation of polymer nylon-6 for lipase immobilization: enzyme characteristics and stability, Bioresource Technology, 99:2566-2570.

PILISSAO, C., and NASCIMENTO, M.G., 2006. Effects of organic solvents and ionic liquids on the aminolysis of (RS)-methyl mandelate catalyzed by lipases, Tetrahedron: *Asymmetry*, 17:428-433.

PORATH, J., 1992. Immobilized metal ion affinity chromatography, Protein Expression and Purification, 3:263-281.

QINGCHUN, J., SUJING, X., BINGFANG, H., and XIAONING, L., 2010. Purification and characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LX1 and its application for biodiesel production, Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic, 66: 264-269.

QUERIOZ, N., and NASCIMENTO, M.G., 2002. Pseudomonas sp. lipase immobilized in polymers versus the use of free enzyme in the resolution of (R,S)-methyl mandelate, Tetrahedron Letters, 43: 5225-5227.

QUIOCHO, F. A., and RICHARDS, F. M., 1964. Intermolecular cross-linking of a protein in the crystalline state: carboxypeptidase, Proceedings of the

National Academy of Sciences of the United States of America, 114:7314-7316.

REGEN, S.L., SINGH, M., and SAMEUL, N.K., 1984. Functionalized polymeric liposomes, efficient immobilisation of α-Chymotrypsin, Biochemical and Biophysical Research Communications, 119:646-651.

REXOVA-BENKOVA, L., OMELKOVA, J., and KUBANEK, V., 1982. Endo-d-Galacturonanase immobilised by adsorption on porous poly(ethylene terephthalate), Collection of Czechoslovak Chemical Communications, 47:2716-2723.

RODRIGUEZ-NOGALES, J.M., ROURA, E., and CONTRERAS, E., 2005. Biosynthesis of ethyl butyrate using immobilized lipase: a statistical approach, Process Biochemistry, 40:63-68.

ROGALSKI, J., SZCZODRAK, J., PLESZCZYNSKA, M., and FIEDUREK, J., 1997. Immobilisation and kinetics of *Penicillium notatum dextranase* on controlled porous glass, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 3:271-283.

RUCKENSTEIN, E., and WANG, X., 1993. Lipase immobilized on hydrophobic porous polymer supports prepared by concentrated emulsion polymerization and their activity in the hydrolysis of triacylglycerides, Biotechnology and Bioengineering, 42(7):821-828.

SARNEY, D.B., BARNARD, M.J., MCMANUS, D.A., and VULFSON E.N., 1996. Application of lipases to the regioselective synthesis of sucrose fatty acid monoesters, Journal of the American Oil Chemists' Society, 73:1481-1487.

SCHMID, U., BORNSCHEUER, U.T., SOUMANOU, M.M., MCNEILL, G.P. and SCHMID, R.D., 1998. Optimization of the reaction conditions in the lipase-catalyzed synthesis of structured triglycerides, Journal of the American Oil Chemists' Society, 75:1527-1531.

SCHOEVAART, R., WOLBERS, M.W., GOLUBOVIC, M., OTTENS, M., KIEBOOM, A.P.G., RANTWIJK, F.V., VAN DER WIELEN, L.A.M., and SHELDON, R.A., 2004. Preparation, Optimization, and Structures of

cross-linked enzyme aggregates (CLEAs), Biotechnology and Bioengineering, 6(20):754-762.

SHAH, S., SHARMA, A, and GUPTA, M.N.,2006. Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder, Analytical Biochemistry, 351:207-213.

SHAW, J.F., CHANG, R.C., WANG, F.F., and WANG, Y.J., 1990. Lipolytic activities of a lipase immobilized on six selected supporting materials, Biotechnology and Bioengineering, 35(2):132-137.

SHELDON, R.A., SCHOEVAART, R., and VAN LANGEN, L.M., 2005. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization a review, Biocatalysis and Biotransformation, 23(3/4):141-147.

SHIMADA, Y., SUGIHARA, A., NAKANO, H., YOKOTA, T., NAGAO, T., KOMEMUSHI, S., AND TOMINAGA, Y., 1996. Production of structured lipids containing essential fatty acids by immobilized *Rhizopus delemar* lipase, Journal of the American Oil Chemists' Society,73:1415-1420.

SOLAS, M.T, VICENTE C, XAVIES L, and LEGAZ M.E, 1994. Ionic adsorption of catalase on bioskin: Kinetic and ultrastructural studies, Journal of Biotechnology, 33:63-70.

SORGEDRAGER, M.J., MALPIQUE, R., VAN RANTWIJK, F., and SHELDON, R.A., 2004. Lipase catalysed resolution of nitro aldol adducts, Tetrahedron: *Asymmetry*, 15:1295-1299.

SONG, Q.X., and WEI, D.Z., 2002. Study of vitamin C ester synthesis by immobilized lipase from *Candida sp.*, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 18: 261-266.

SPERINDE, J.J., and GRIFFITH, L.G., 1997. Synthesis and characterization of enzymatically crosslinked poly(ethylene glycol) hydrogels, Macromolecules, 30:5255-5264.

STAMATIS, H., XENAKIS, A., PROVELEGIOU, M., and KOLISIS, F.N.,1993. Esterification reactions catalyzed by lipases in microemulsions: The role

of enzyme localization in relation to its selectivity,Biotechnology and Bioengineering, 42:103-110.

TAYLOR, R., FOURNIER, S.M., SIMONS, B.L., KAPLAN, H., and HEFFORD, M.A., 2005. Covalent Protein Immobilization on Glass Surfaces:Application to Alkaline Phosphatase, Journal of Biotechnology, 118:265-269.

TISCHER, W., and WEDEKIND, F., 1998. Immobilized enzymes: Methods and applications, Topics in Current Chemistry, 20: 96-126.

TREVAN, M., 1980. Techniques of immobilization, Immobilized Enzymes: An Introduction and Applications in Biotechnology, Wiley, Chichester-New York, pp: 1-9.

TUFVESSON, P., ANNERLING, A.,HATTI-KAUL, R., and ADLECREUTZ, D., 2007.Solvent-free enzymatic synthesis of fatty alkanolamides, Biotechnology and Bioengineering, 97:447-453.

TUTAR, H., YILMAZ, E., PEHLIVAN, E., and YILMAZ, M., 2009. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on sporopollenin from *Lycopodium clavatum*, International Journal of Biological Macromolecules, 45:315-320.

TÜKEL, S.S., and ALPTEKİN, Ö., 2004. Immobilization and kinetics of catalase onto magnesium silicate, Process Biochemistry, 39(12): 2149-2155.

VAN LANGEN, L. M., OOSTHOEK, N. H. P., VAN RANTWIJK, F., and SHELDON, R. A., 2003.Pencillin acylase catalysed synthesis of ampicillin in hydrophilic organic solvents, Advanced Synthesis and Catalysis, 345:797-801.

VAN SONSBEEK, H. M., BEEFTINK, H. H., and TRAMPER, J., 1993. Two-liquid-phase bioreactors, Enzyme and Microbial Technology, 15:722-729.

MACIEJEWSKI, M., POLTORAK, K., and KAMINSKA, J.E., 2010. Lipase resolution of new (±)-3-aryloxy-1-halogenopropan-2-ols: Versatile building blocks for β-adrenergic receptor antagonists, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 62:248-256.

WANG, D.L., NAG, A., LEE, G.C., and SHAW, J.F., 2002. Factors affecting the resolution of dl-menthol by immobilized lipase catalyzed esterification in organic solvent, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50:262-265.

WATANABE,Y., ADACHI, S., NAKANISHI, K., and MATSUNO, R., 2001, Lipase-catalyzed synthesis of unsaturated acyl L-ascorbates and their ability to suppress the autoxidation of polyunsaturated fatty acids, Journal of the American Oil Chemists' Society, 78:823-826.

WEBER, H. K., STECHER, H., and FABER, K., 1995. Some properties of commercially available crude lipase preparations, Preparative Biotransformations, Wiley, New York.

WEETHALL, H.H., 1976. Covalent coupling methods for inorganic support materials, Methods of Enzymology, 44:134-148.

WEGMAN, M. A., JANSSEN, M. H. A., VAN RANTWIJK, F., and SHELDON, R. A., 2001.Towards biocatalytic synthesis of β-lactam antibiotics, Advanced Synthesis and Catalaysis, 343:559–576.

WIELECHOWSKA, M,. and PLENKIEWICZ, J., 2005. Lipase-catalyzed separation of the enantiomers of 1-substituted-3-arylthio-2-propanols, Tetrahedron: Asymmetry, 16:1199–1205.

WISEMAN, A. 1986. Handbook of Enzyme Biotechnology, 2nd Edit., John Wiley & Sons, Chichester, England.

WOODLEY, J. M., CUNNAH, P. J., and LILLY, M. D.,1991. Stirred tank 2-liquid phase biocatalytic reactor studies:kinetics, evaluation and modelling of substrate mass transfer, Biocatalysis, 5:1-12.

WOODWARD, J., 1985. Immobilized enzymes: adsorption and covalent coupling, Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach, IRL, Oxford, UK, pp: 3-17.

WU, H.S., and TSAI, M.J., 2004. Kinetics of tributyrin hydrolysis by lipase, Enzyme and Microbial Technology, 35:488-493.

YADAV, G.D., and LATHI, P.S., 2005. Lipase catalyzed transesterification of methyl acetoacetate with n-butanol, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 32:107-113.

YADAV, J., REDDY, B.V.S., PADMAVANI, B., VENUGOPAL,C., and RAO, A.B., 2007. Enzymatic kinetic resolution of racemic 4-tetrahydropyranols by *Candida rugosa* lipase, Tetrahedron Letters, 48:4631-4633.

YAN,Y., BORNSCHEUER, U.T., and SCHMID, R.D., 1999. Lipase-catalyzed synthesis of vitamin C fatty acid esters, Biotechnology Letters, 21:1051-1054.

YEE, L.N., and AKOH, C.C., 1996. Enzymatic synthesis of geranyl acetate by transesterification with acetic anhydride as acyl donor, Journal of the American Oil Chemists' Society, 73:1379-1384.

YI, S.S., NOH, J.M., and LEE, Y.S., 2009. Amino acid modified chitosan beads: improved polymer supports for immobilization of lipase from *Candida rugosa*, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 57:123-129.

YİĞİTOĞLU, M., and TEMOÇİN, Z ., 2010. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on glutaraldehyde-activated polyester fiber and its application for hydrolysis of some vegetable oils, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 66:130-135.

YU, D., WANG, Z., ZHAO, L., CHENG, Y., and CAO, S., 2007. Resolution of 2-octanol by SBA-15 immobilized *Pseudomonas sp.* lipase, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 48: 64-69.

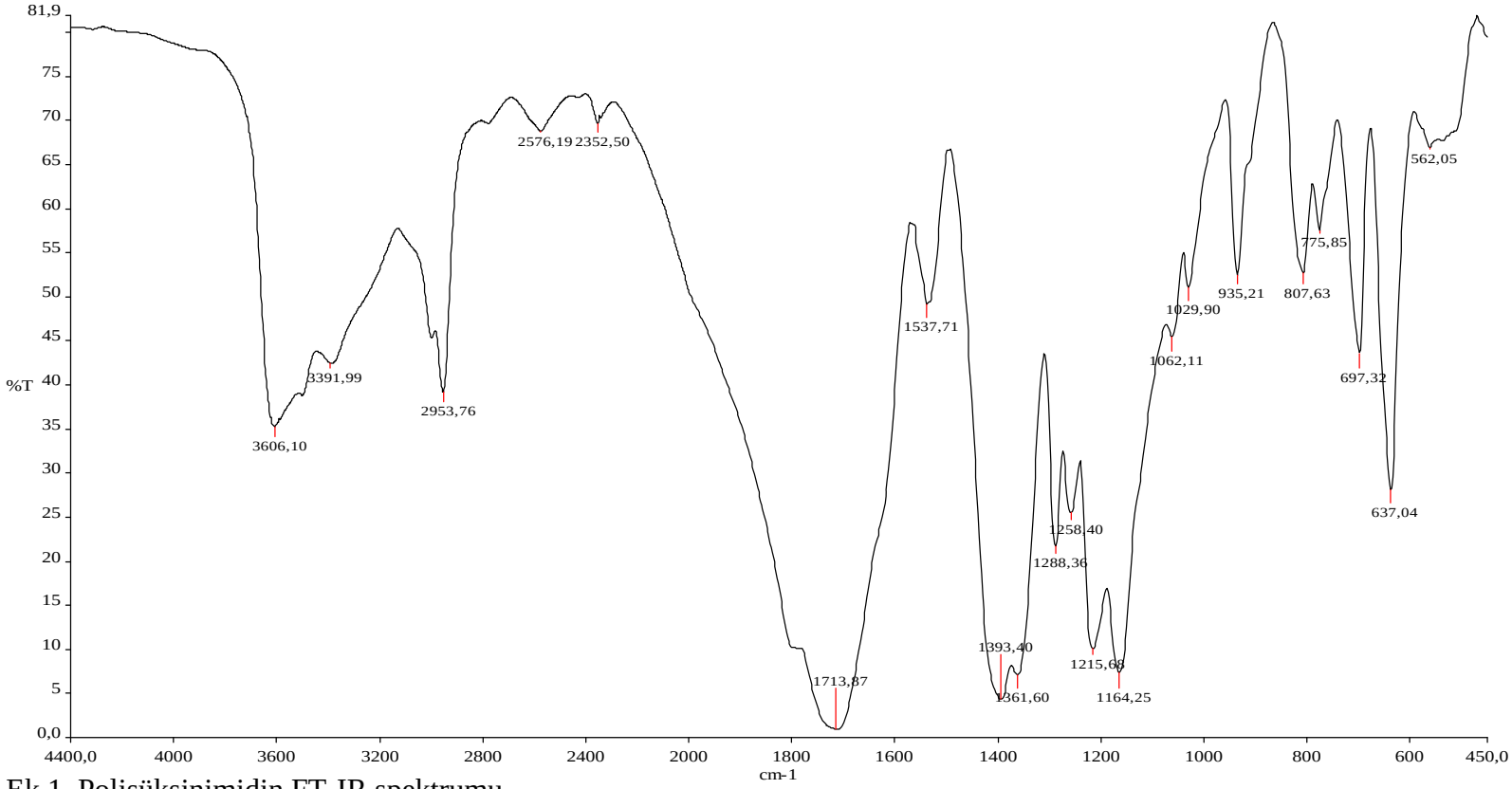
ZAIDAN, U.H., RAHMAN, M.B.A., BASRI, M., OTHMAN, S.S., RAHMAN, R.N.Z.R.A., and SALLEH, A. B., 2010. Silylation of mica for lipase immobilization as biocatalysts in esterification, Applied Clay Science, 47: 276-282.

ÖZGEÇMİŞ

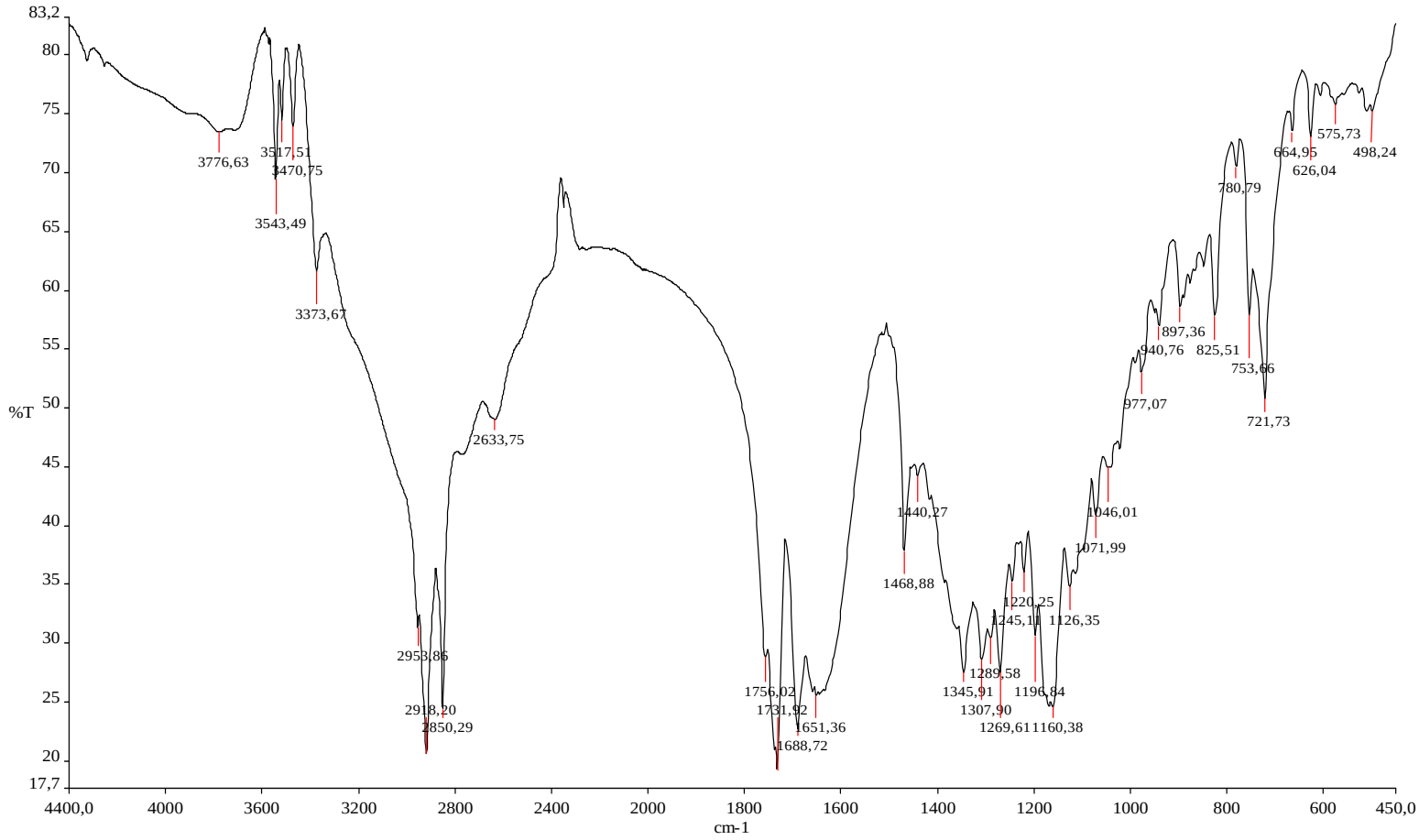
1977 yılında Adana'da doğdu. Lise öğrenimimi Adana Erkek Lisesi'nde tamamladı.1999 yılında Marmara Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden mezun oldu. 2003 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde yüksek lisans eğitimimi tamamlayarak aynı yıl doktora eğitimime başladı. Evli ve bir erkek çocuğu babasıdır.

EKLER

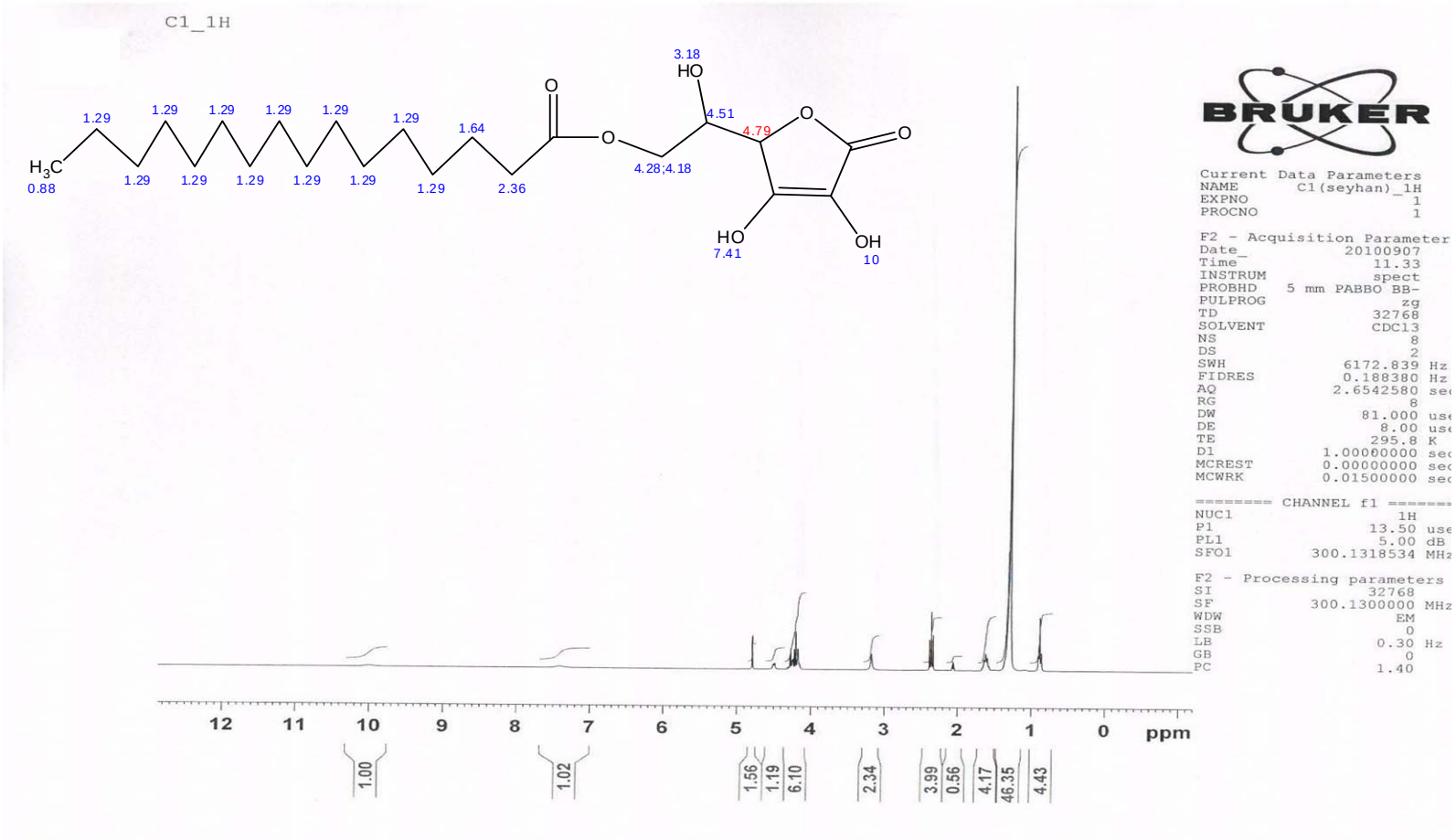
FT-IR ve NMR Spektrumları



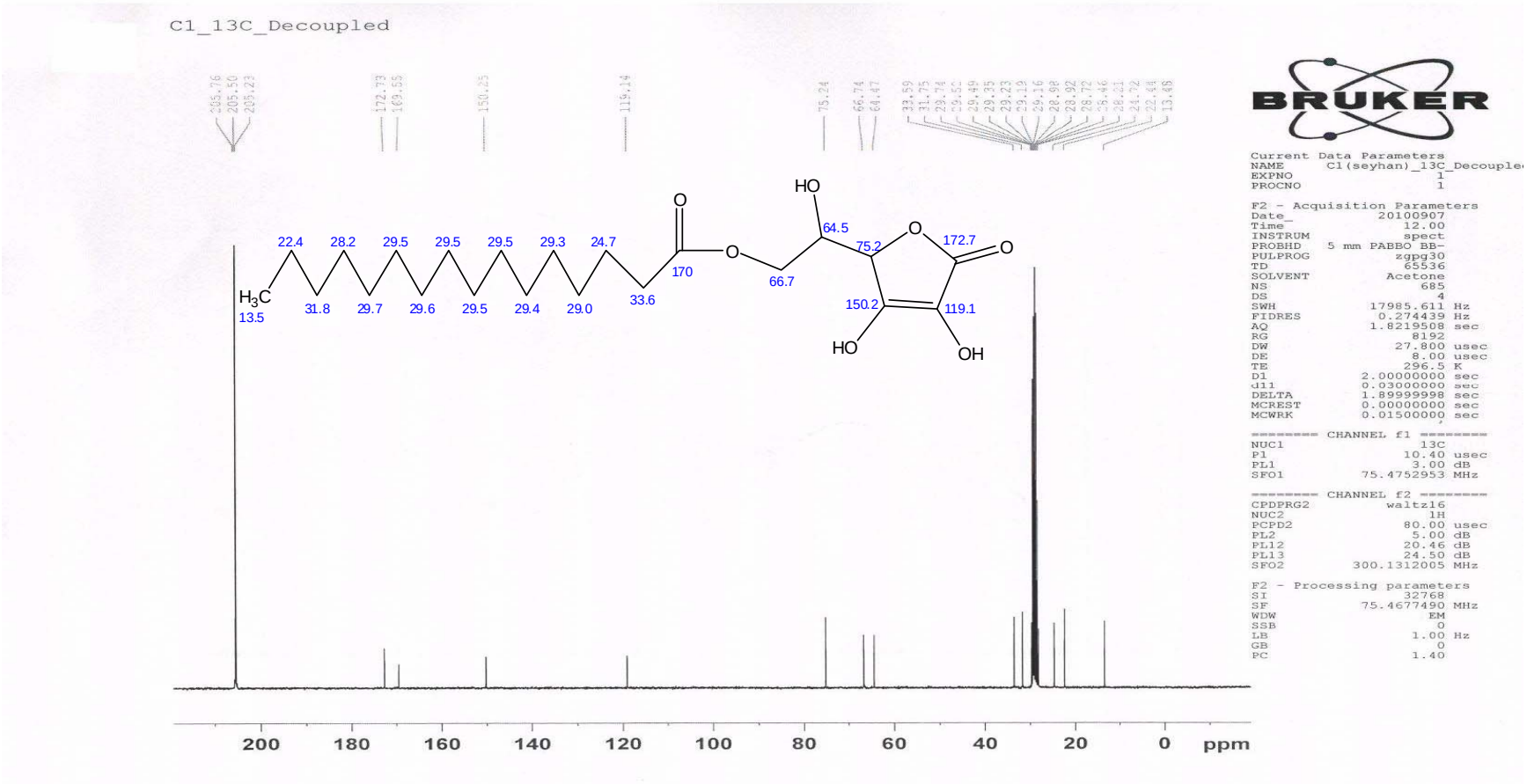
Ek 1. Polisüksinimidin FT-IR spektrumu.



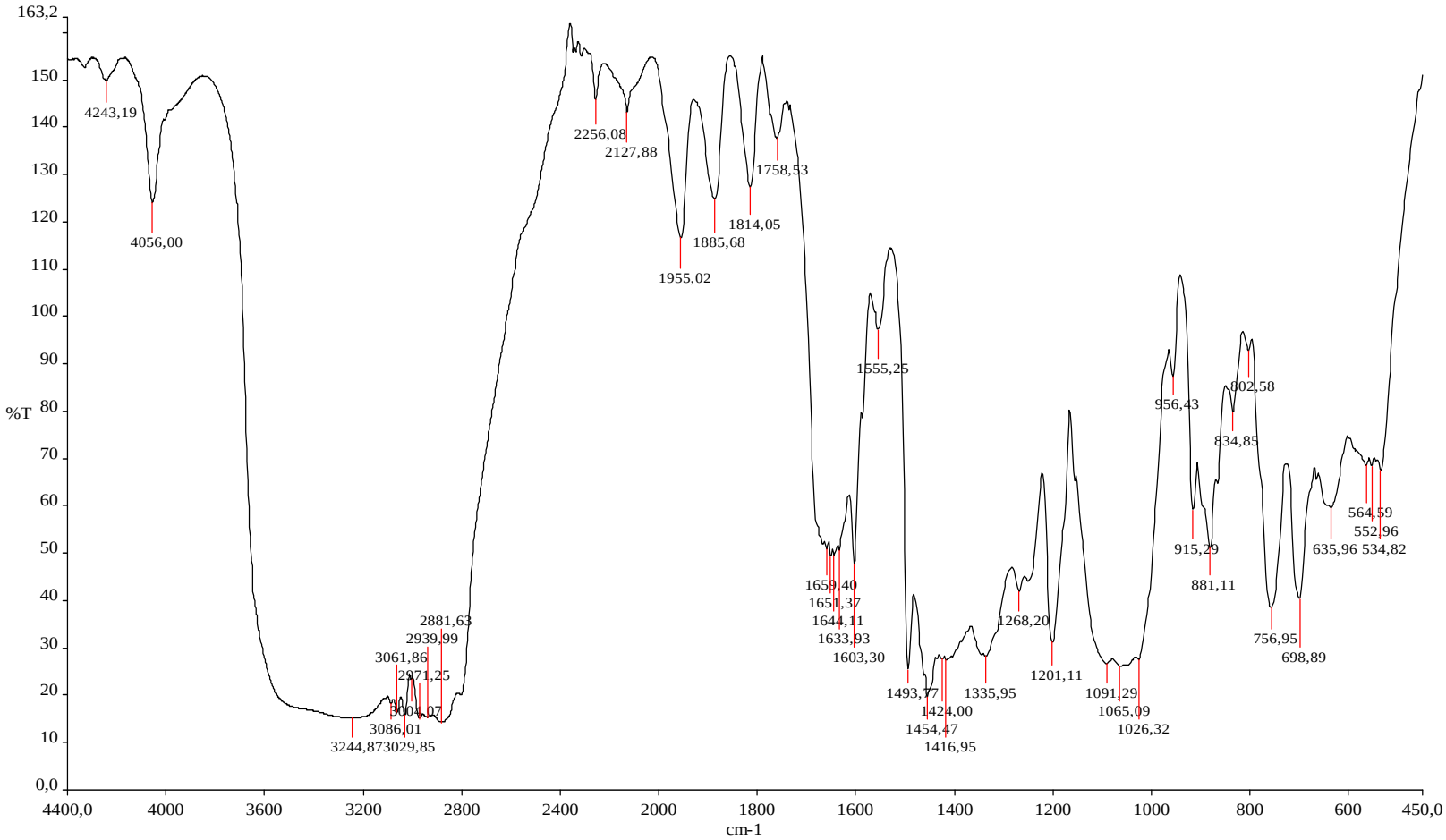
Ek 2. L-Askorbil palmitatın FT-IR spektrumu.



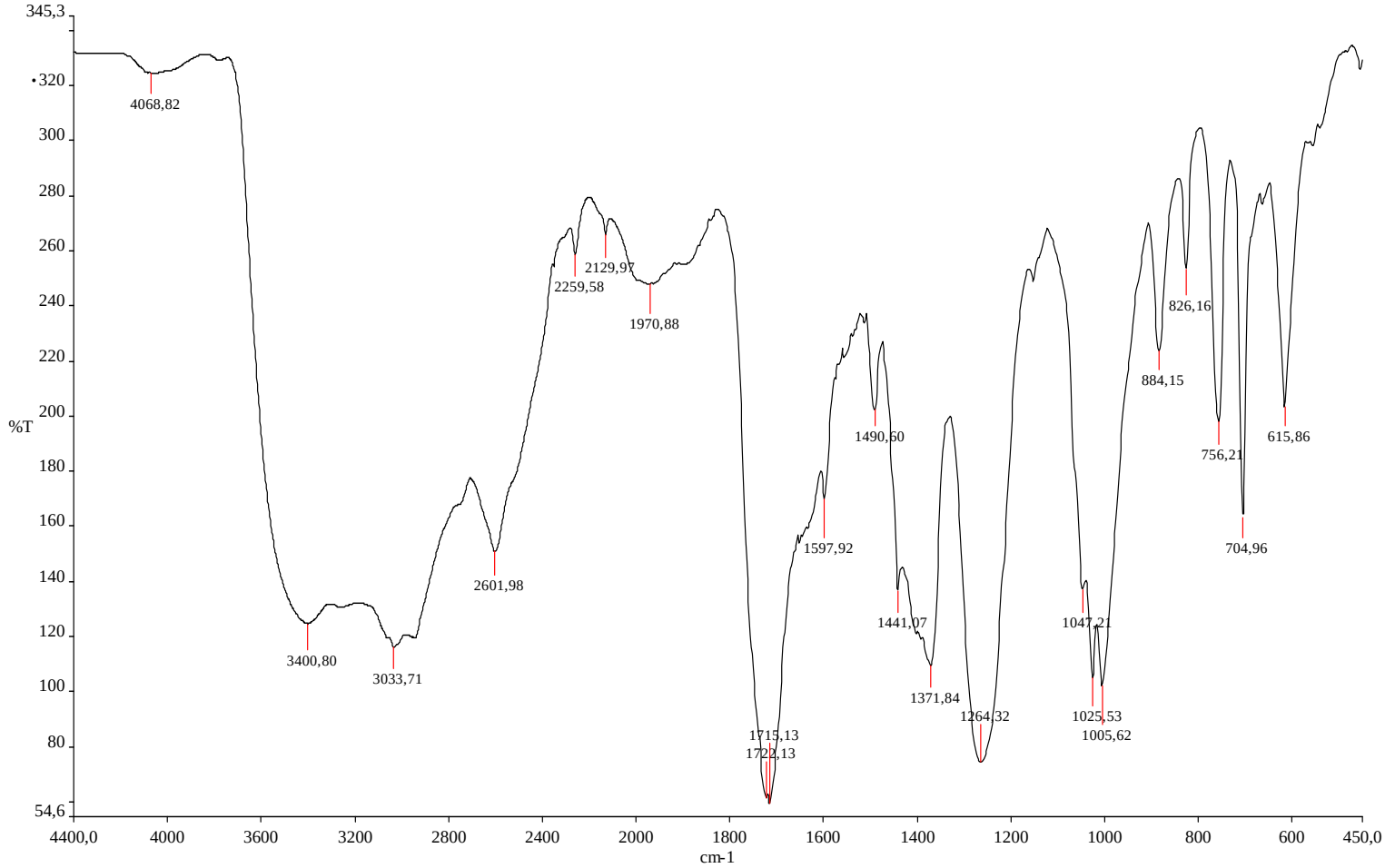
Ek 3. L-Askorbil palmitatın ^{1}H NMR spektrumu.



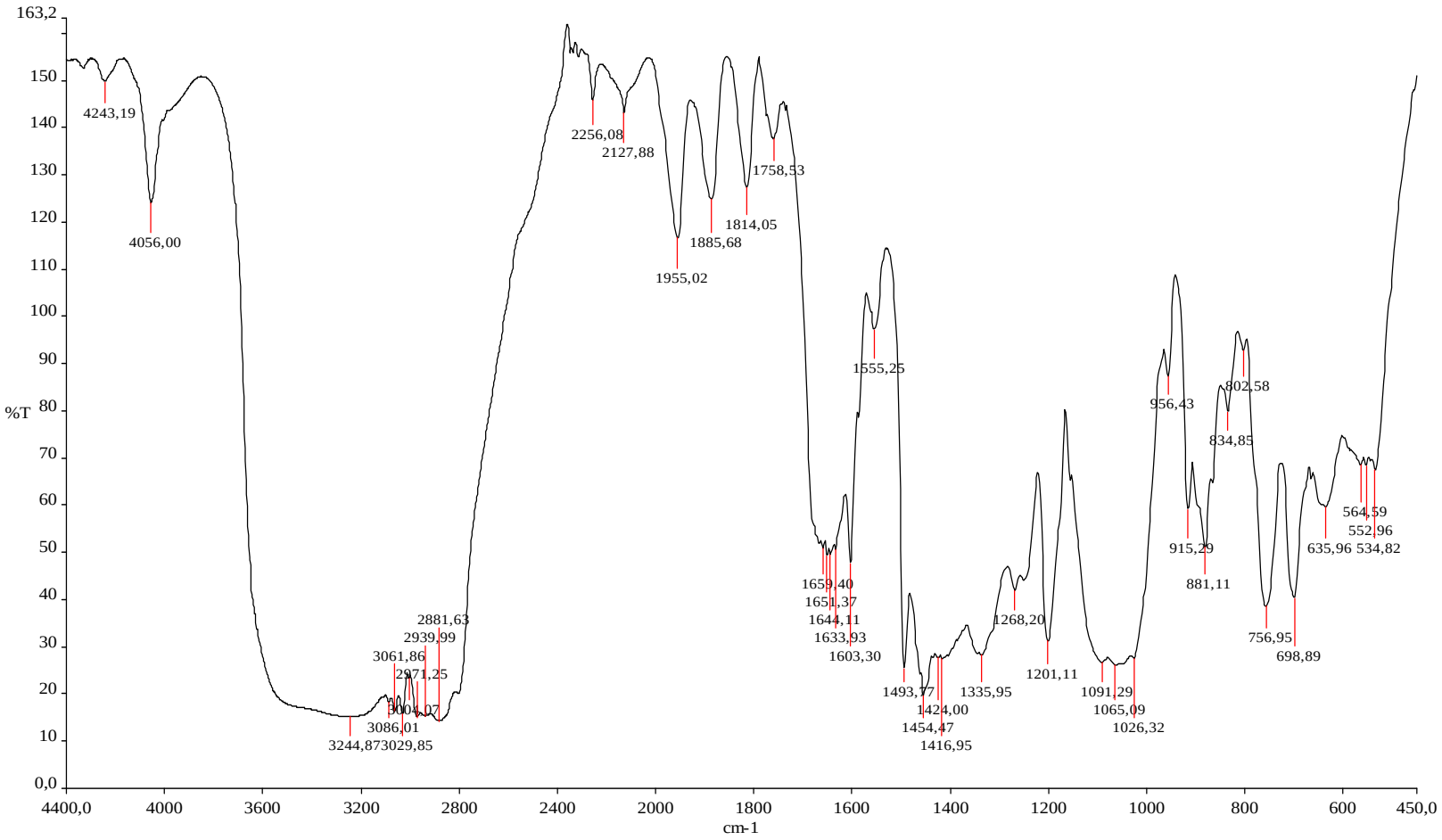
Ek 4.L-Askorbil palmitat'ın ^{13}C NMR spektrumu.



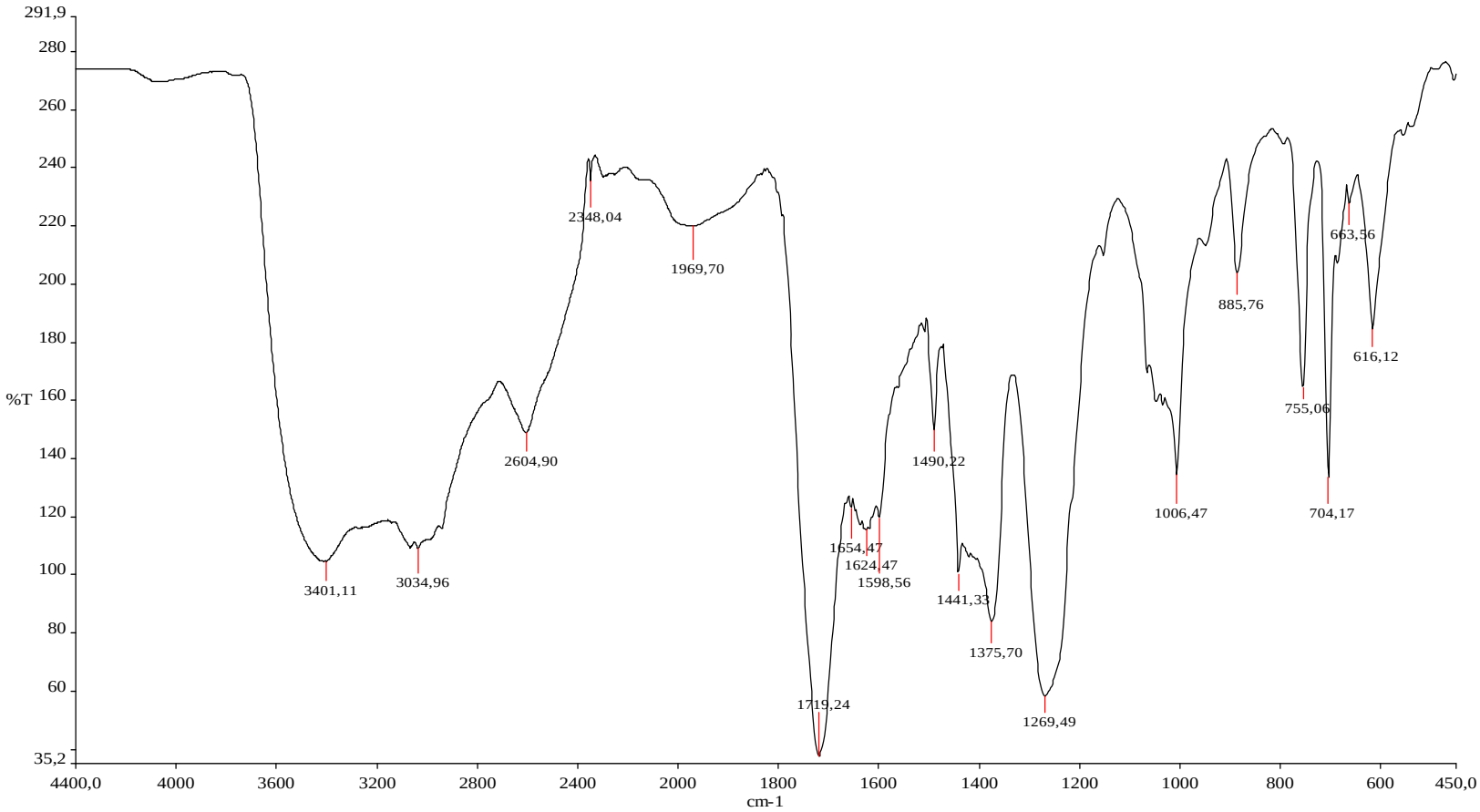
Ek 5. 2-(metilamino)-1-feniletanol'ün FT-IR spektrumu.



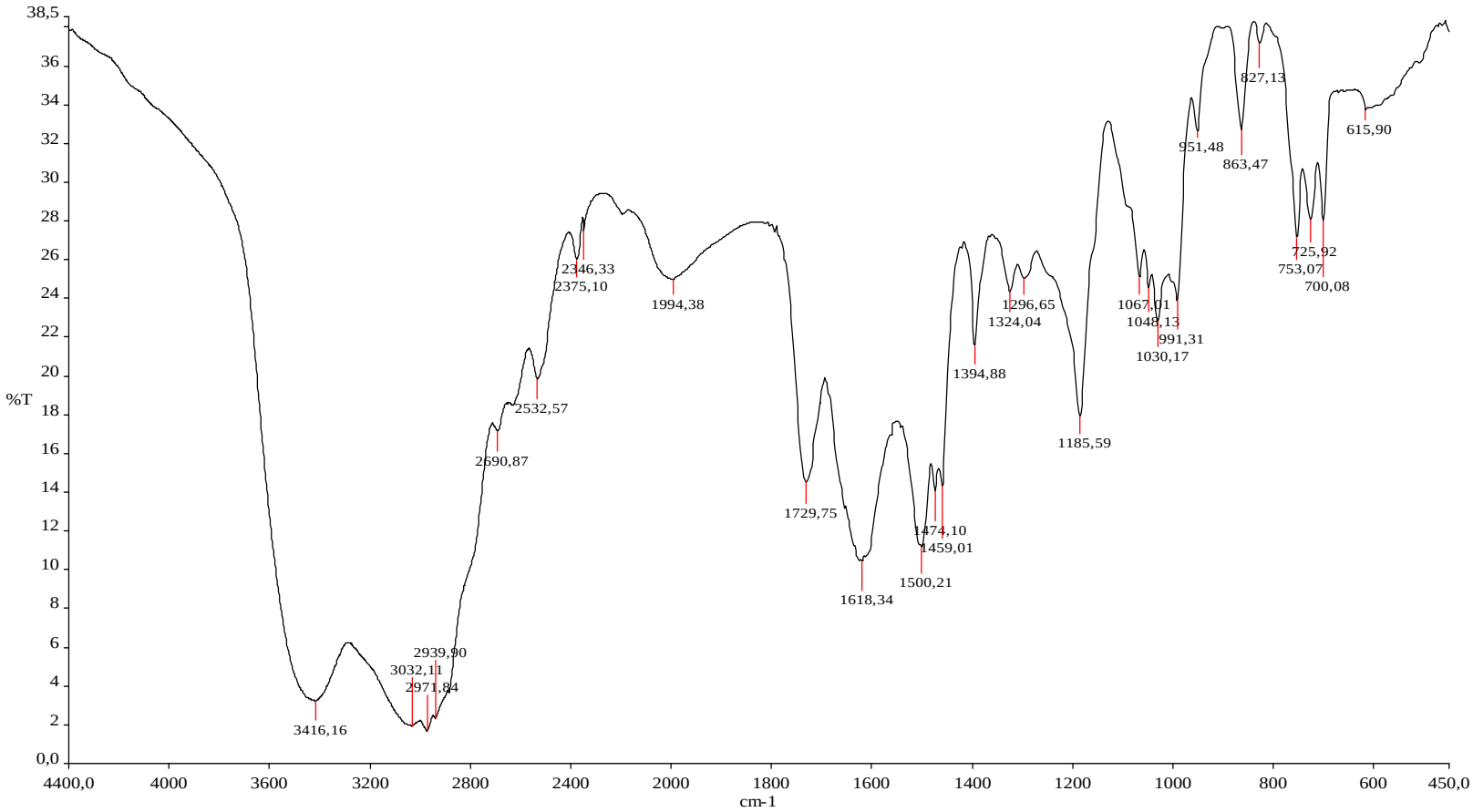
Ek 6. 2-(metilamino)-1-feniletil asetat'ın FT-IR spektrumu.



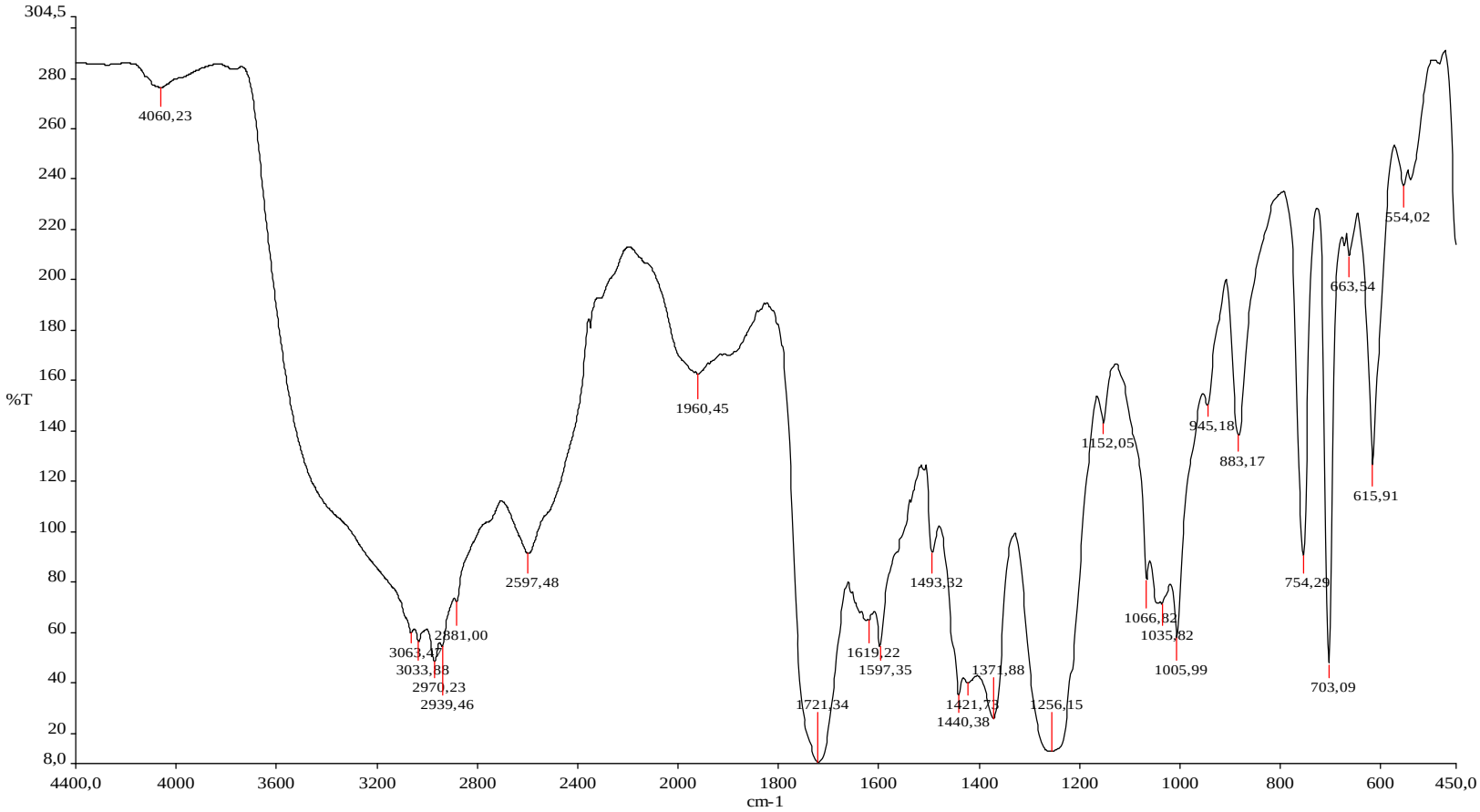
Ek 7. 2-(etilamino)-1-feniletanol'ün FT-IR spektrumu.



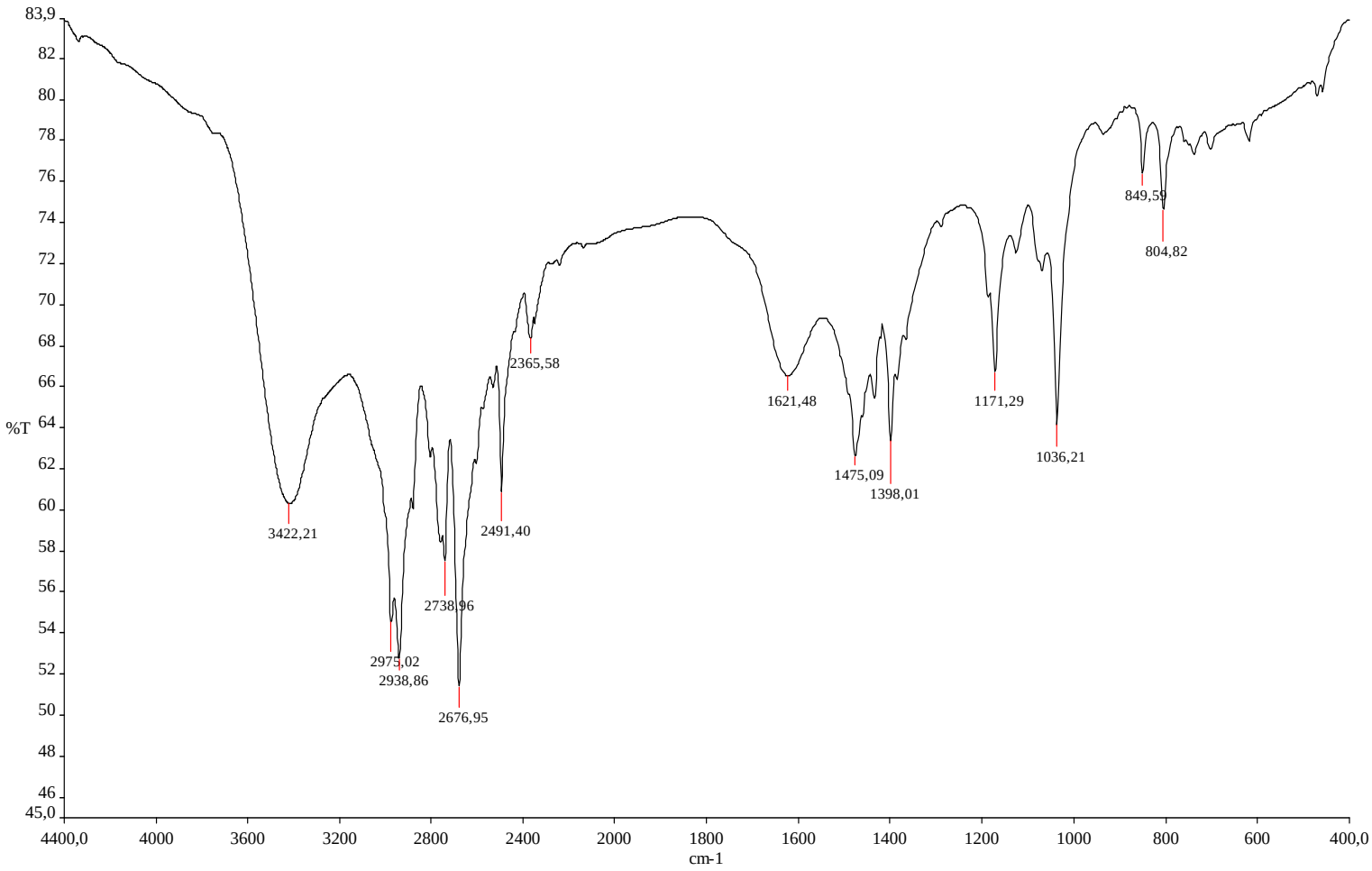
Ek 8. 2-(etilamino)-1-feniletil asetat'ın FT-IR spektrumu.



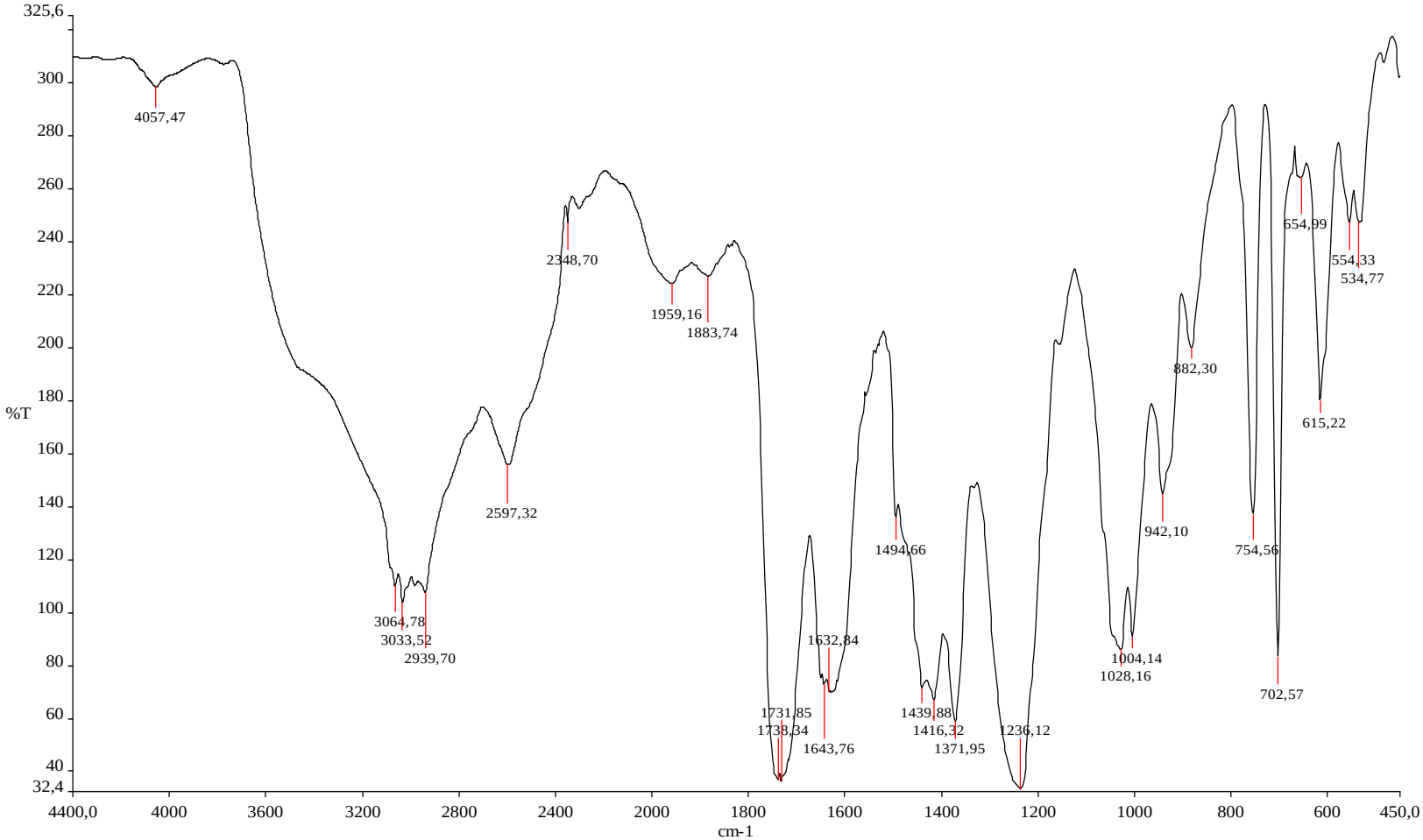
Ek 9. 2-(propilamino)-1-feniletanol'ün FT-IR spektrumu.



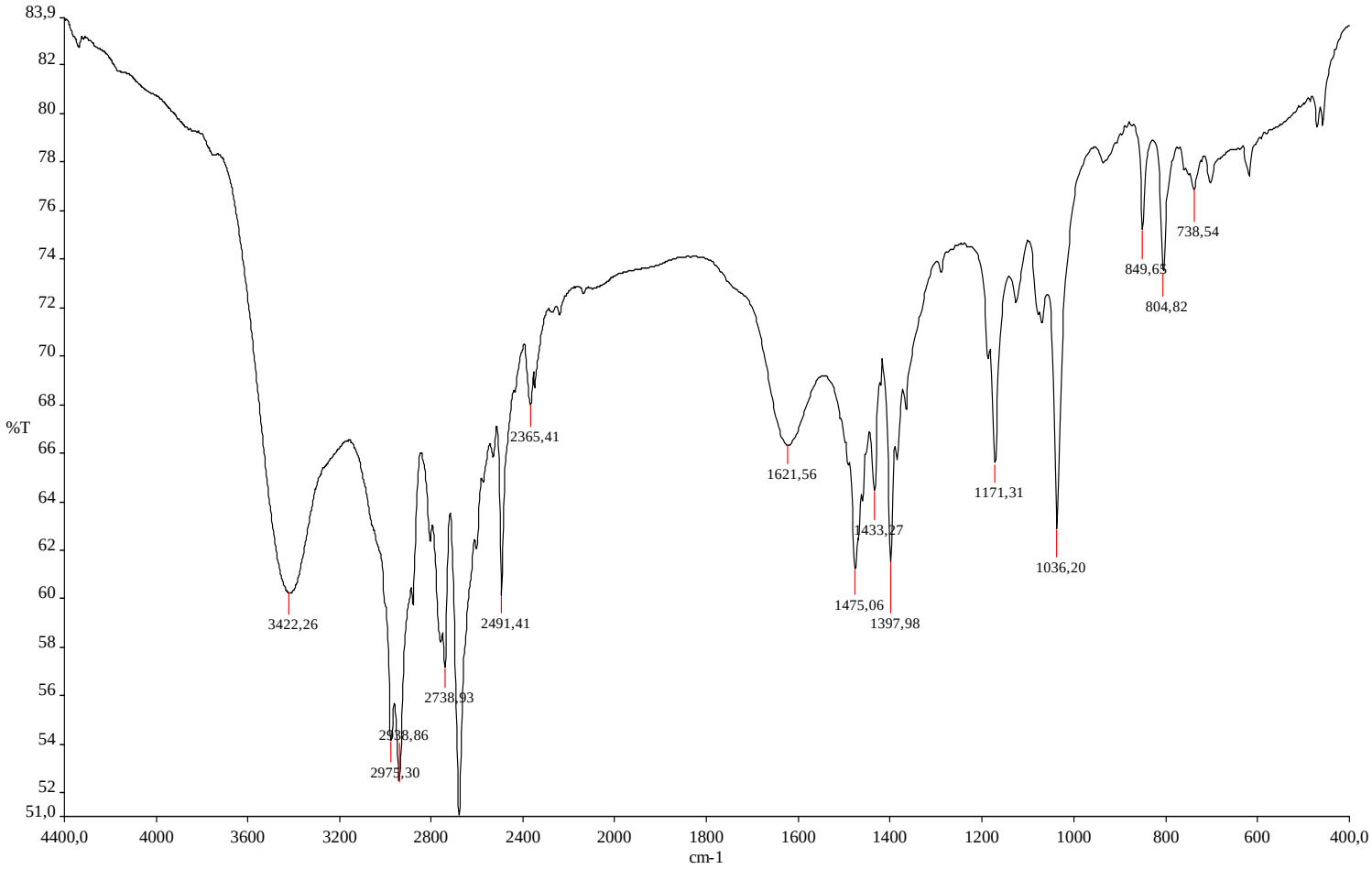
Ek 10. 2-(propilamino)-1-feniletil asetat'ın FT-IR spektrumu.



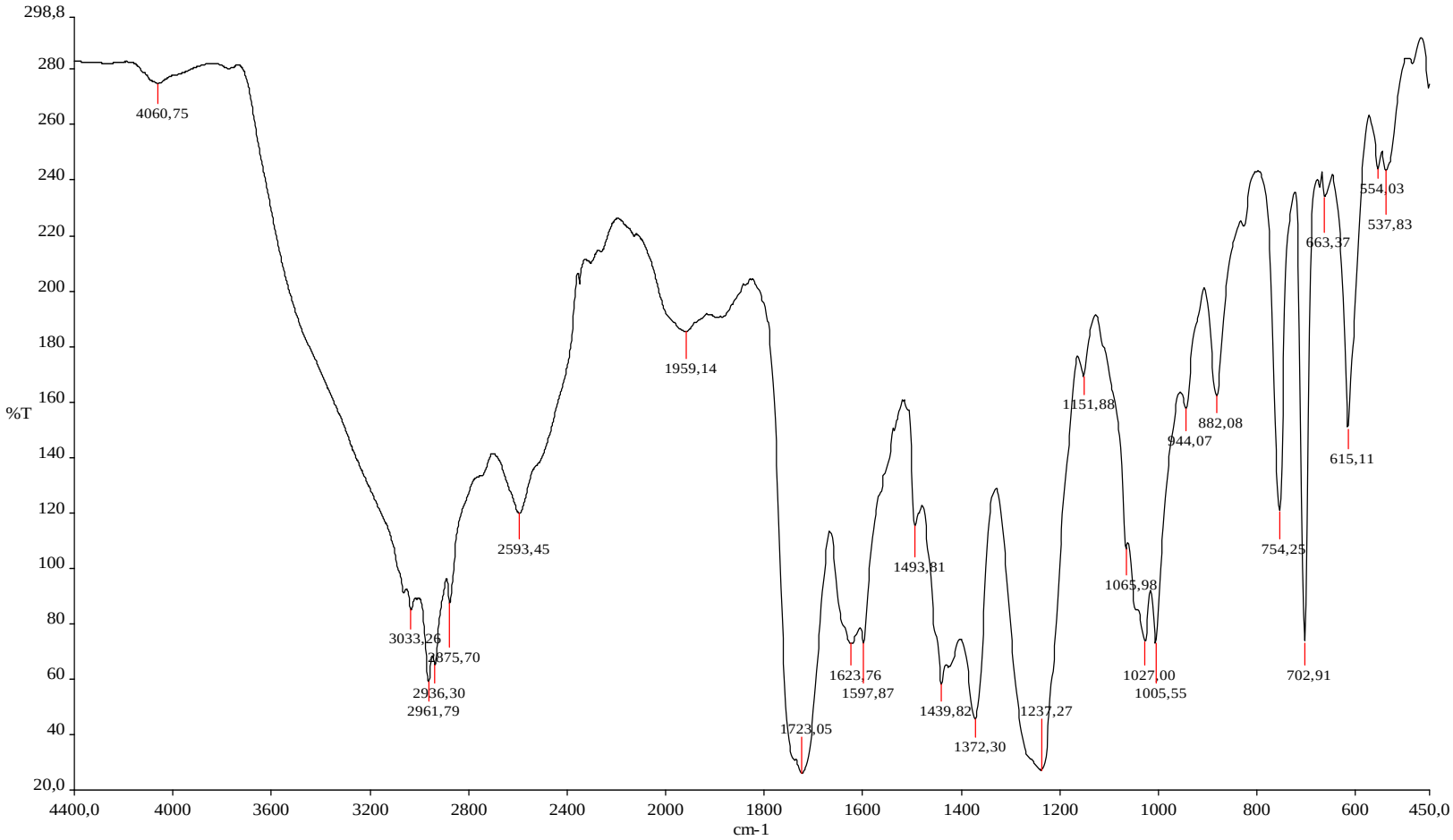
Ek 11. 2-(allilamino)-1-feniletanol'ün FT-IR spektrumu.



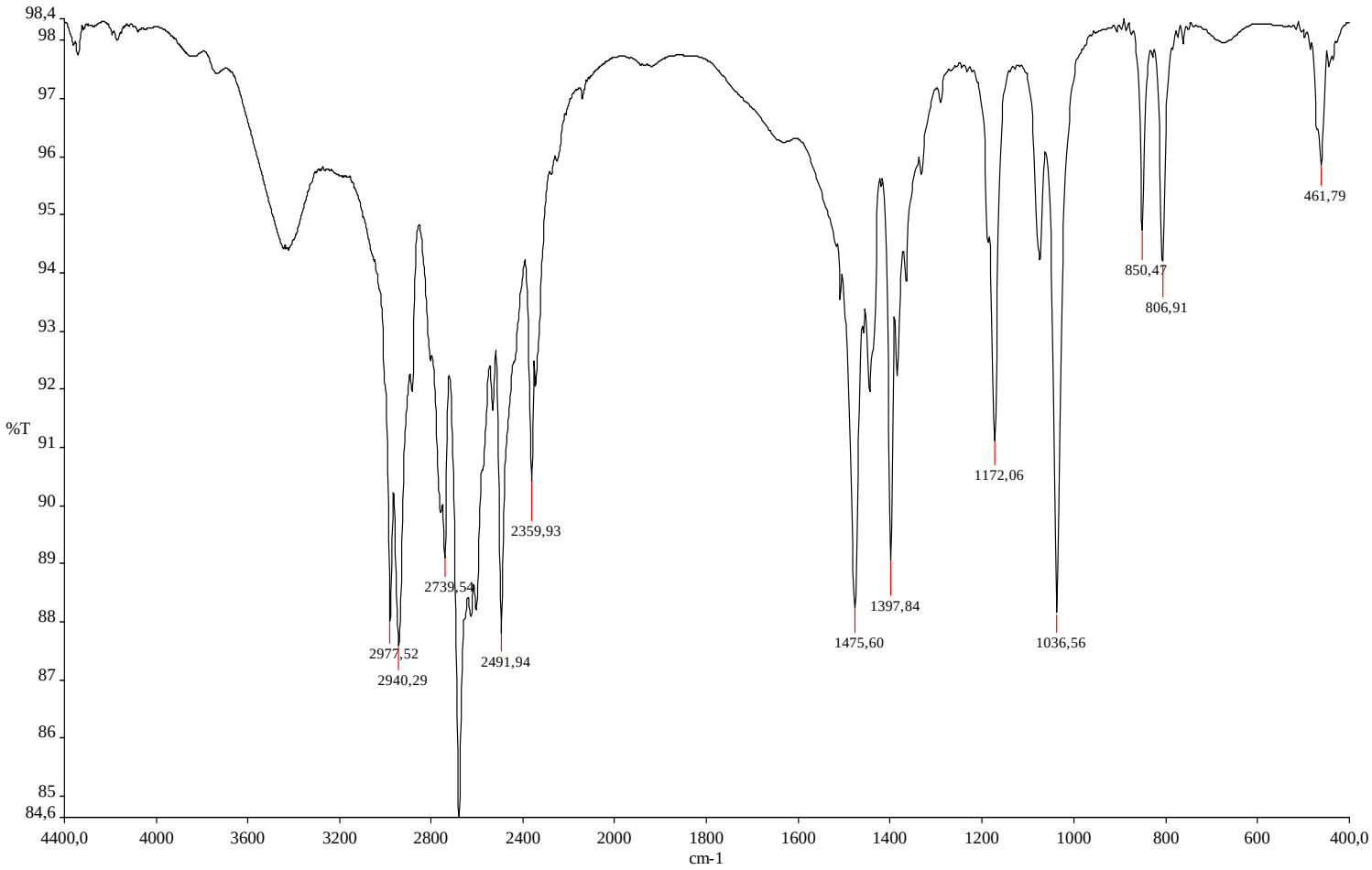
Ek 12. 2-(allilamino)-1-feniletil asetat'ın FT-IR spektrumu.



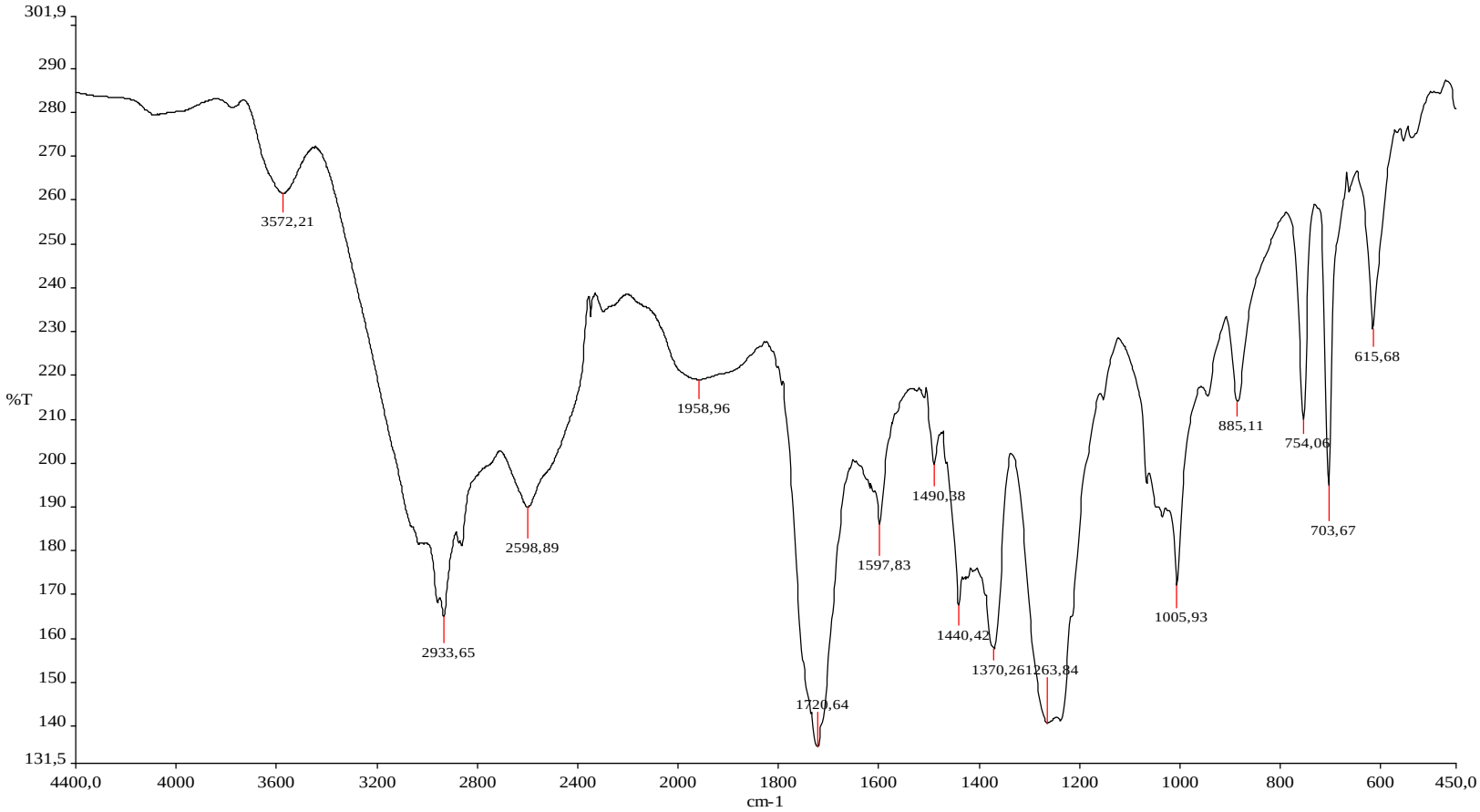
Ek 13. 2-(butilamino)-1-feniletanol'ün FT-IR spektrumu.



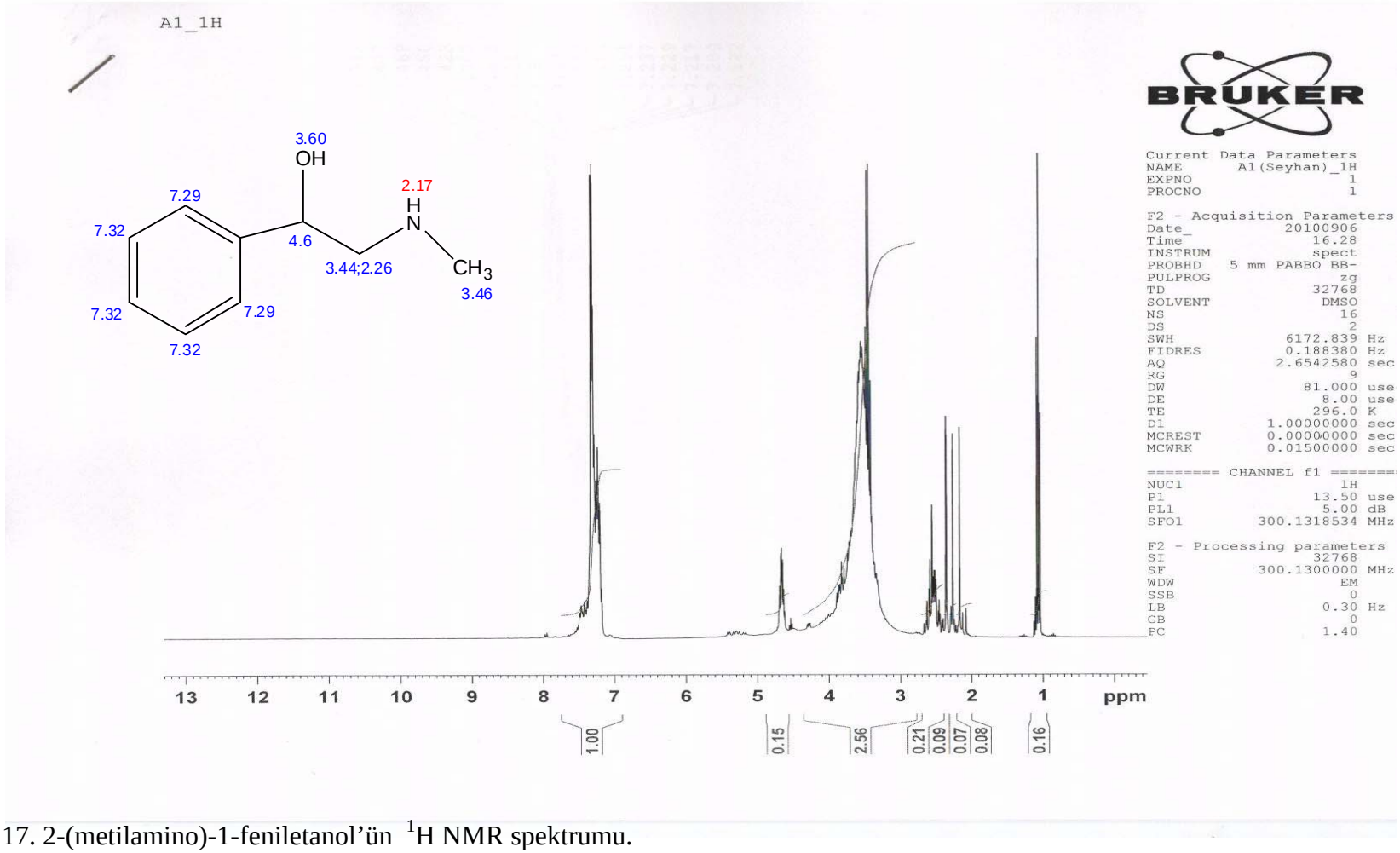
Ek 14. 2-(butilamino)-1-feniletil asetat'ın FT-IR spektrumu.



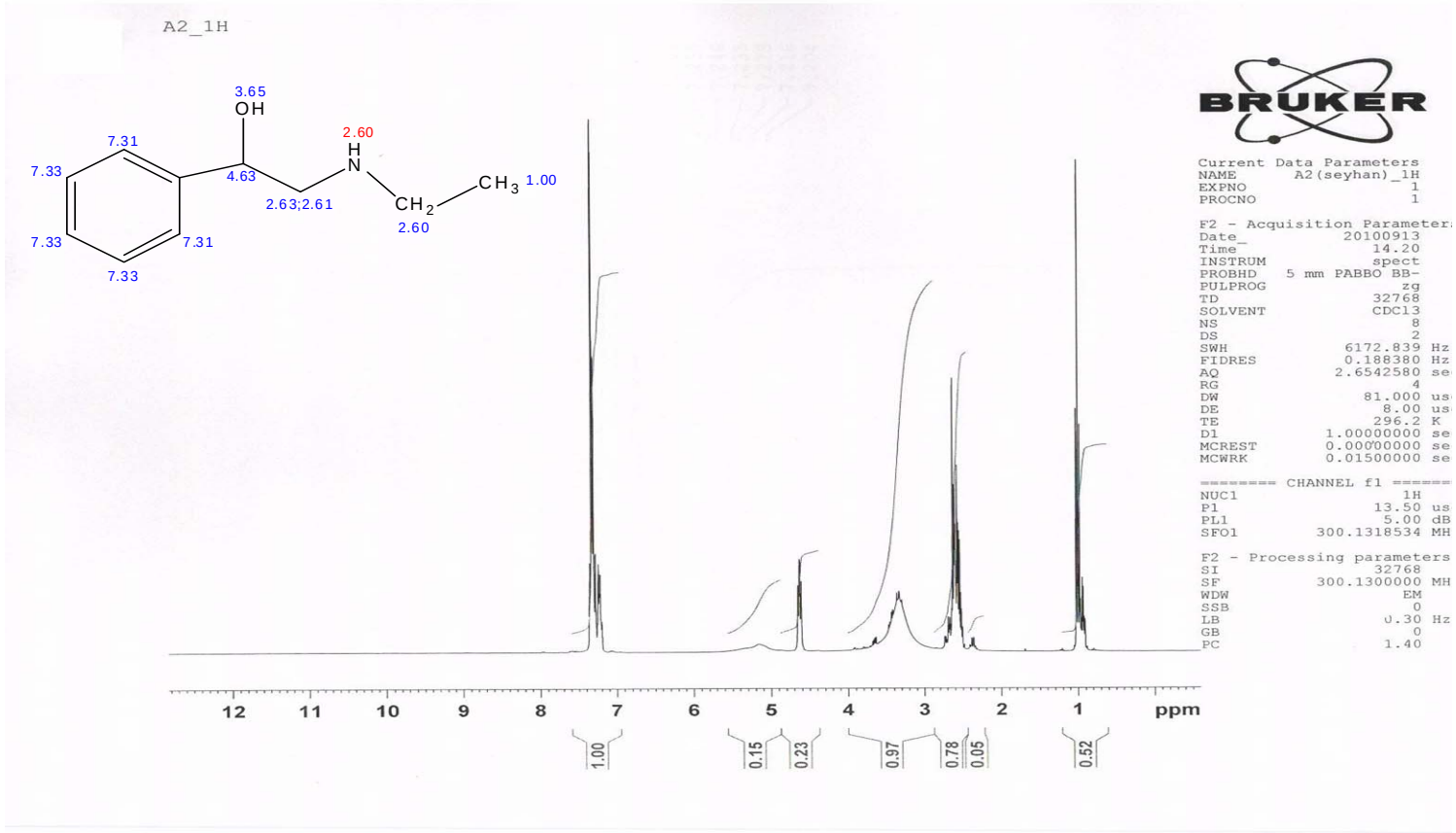
Ek 15. 2-(hekzilamino)-1-feniletanol'ün FT-IR spektrumu.



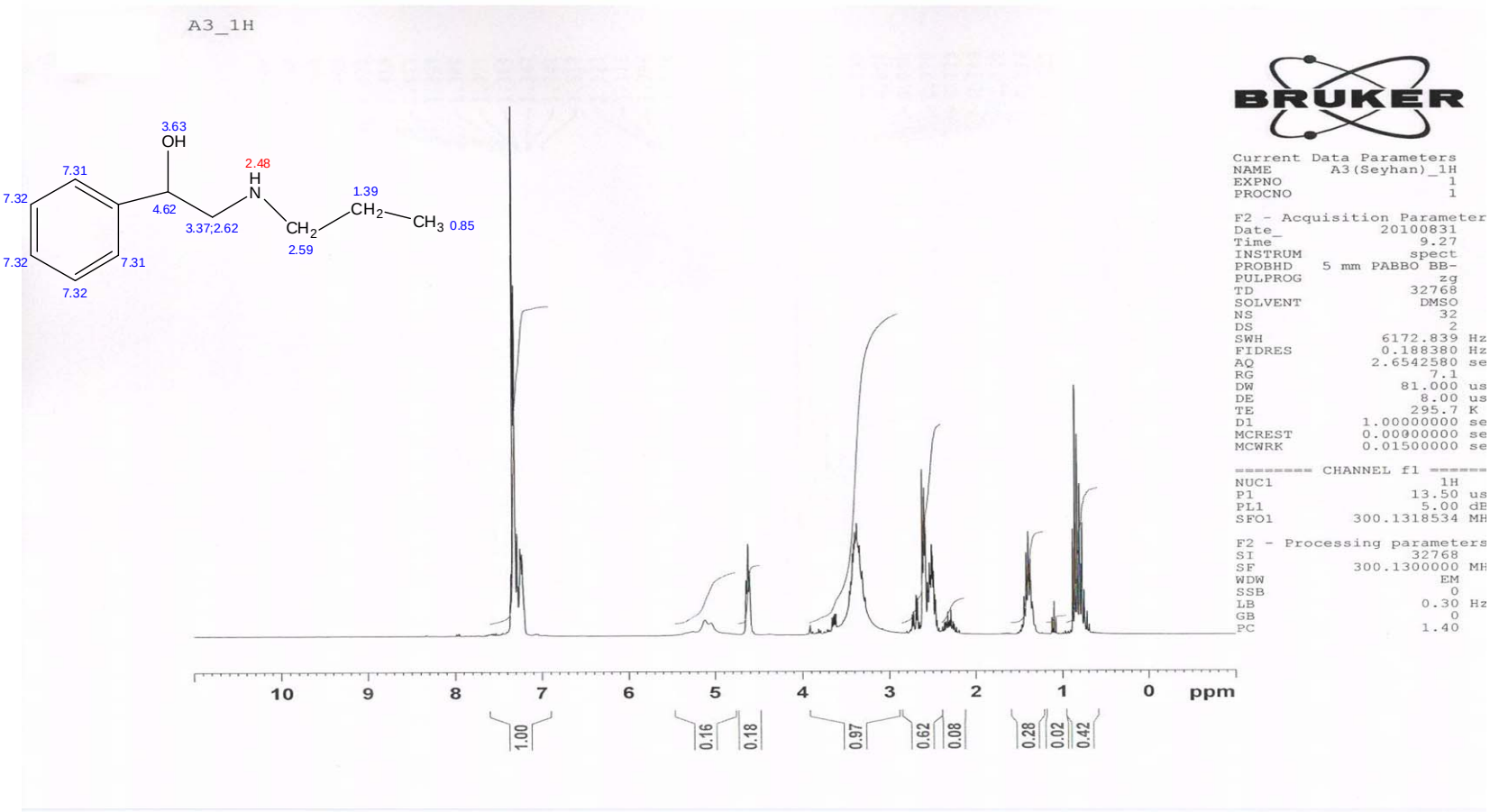
EK 16. 2-(hekzilamino)-1-feniletil asetat'ın FT-IR spektrumu.



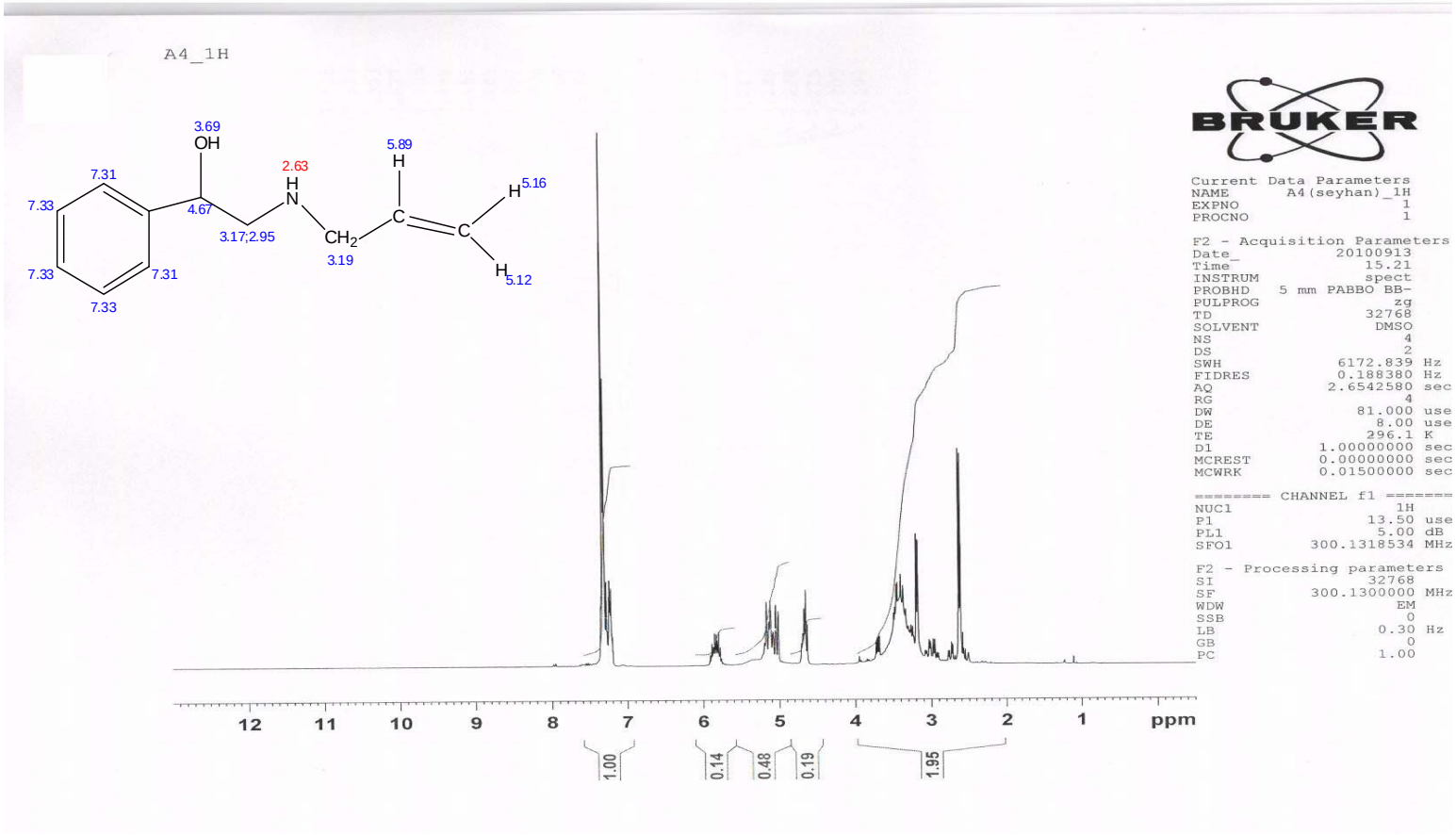
Ek 17. 2-(metilamino)-1-feniletanol'ün ^{1}H NMR spektrumu.



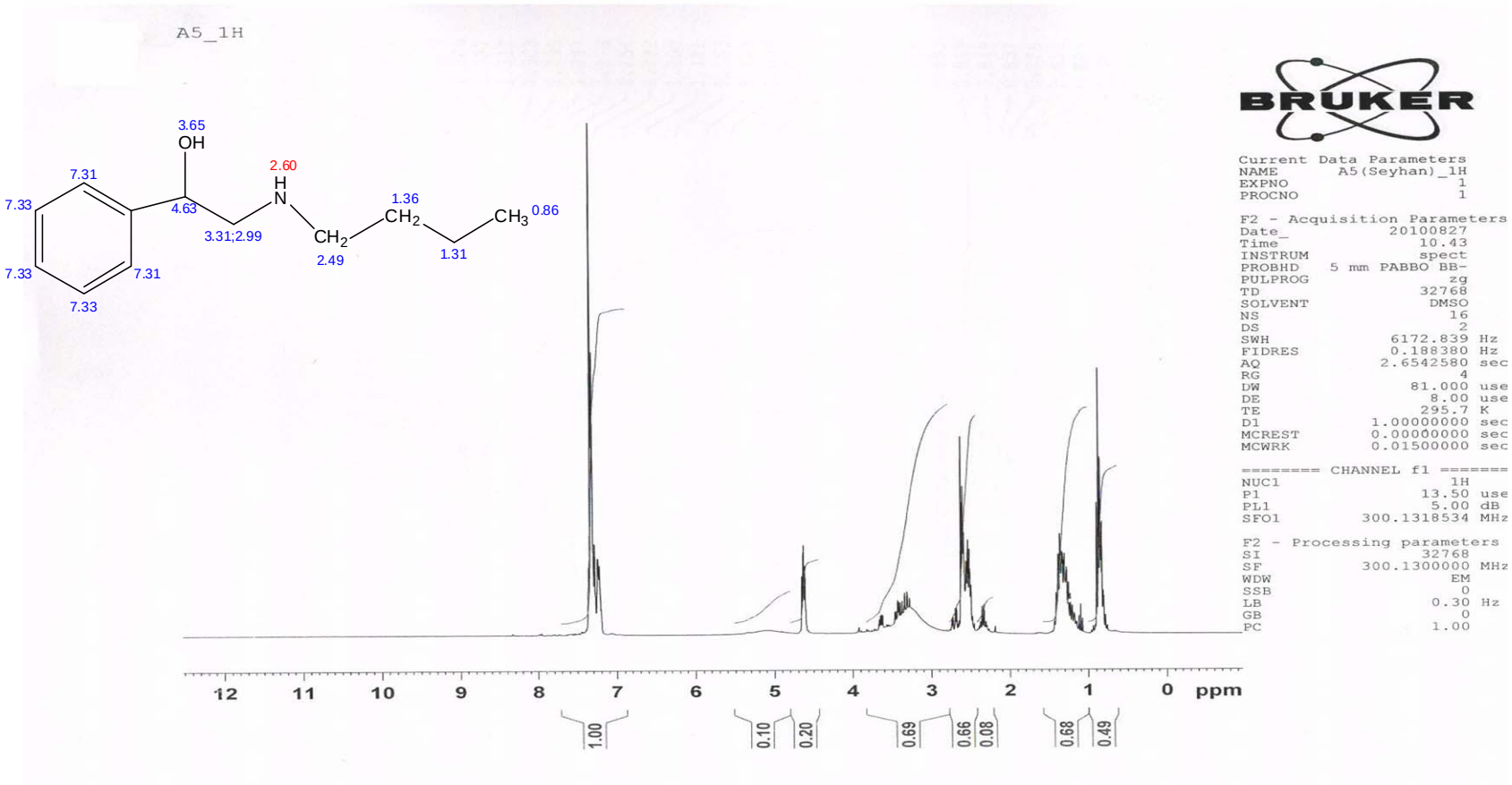
Ek 18. 2-(etilamino)-1-feniletanol'ün ^{1}H NMR spektrumu.



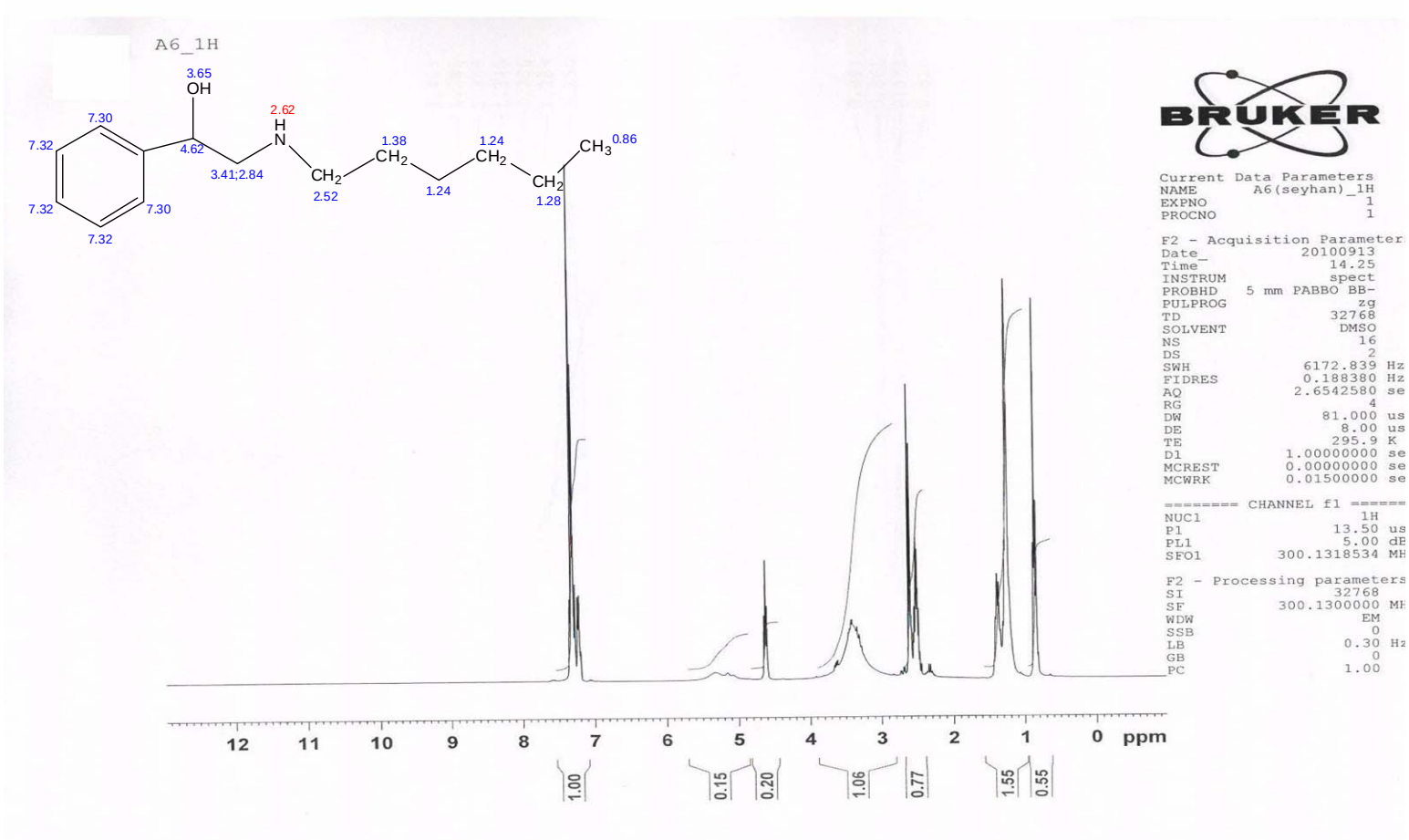
Ek 19. 2-(propilamino)-1-feniletanol'ün ^{1}H NMR spektrumu.



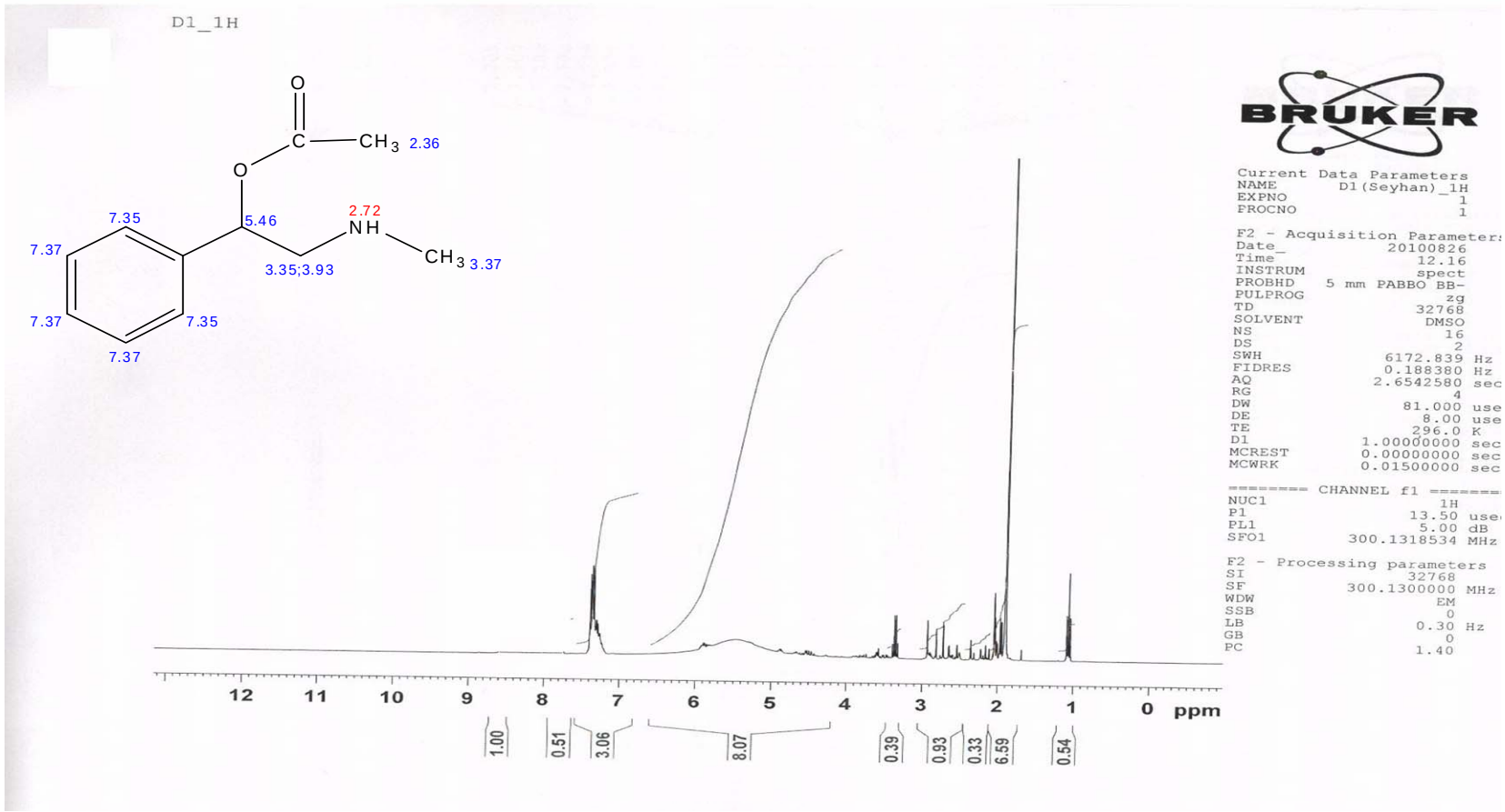
Ek 20. 2-(allilamino)-1-feniletanol'ün ^{1}H NMR spektrumu.



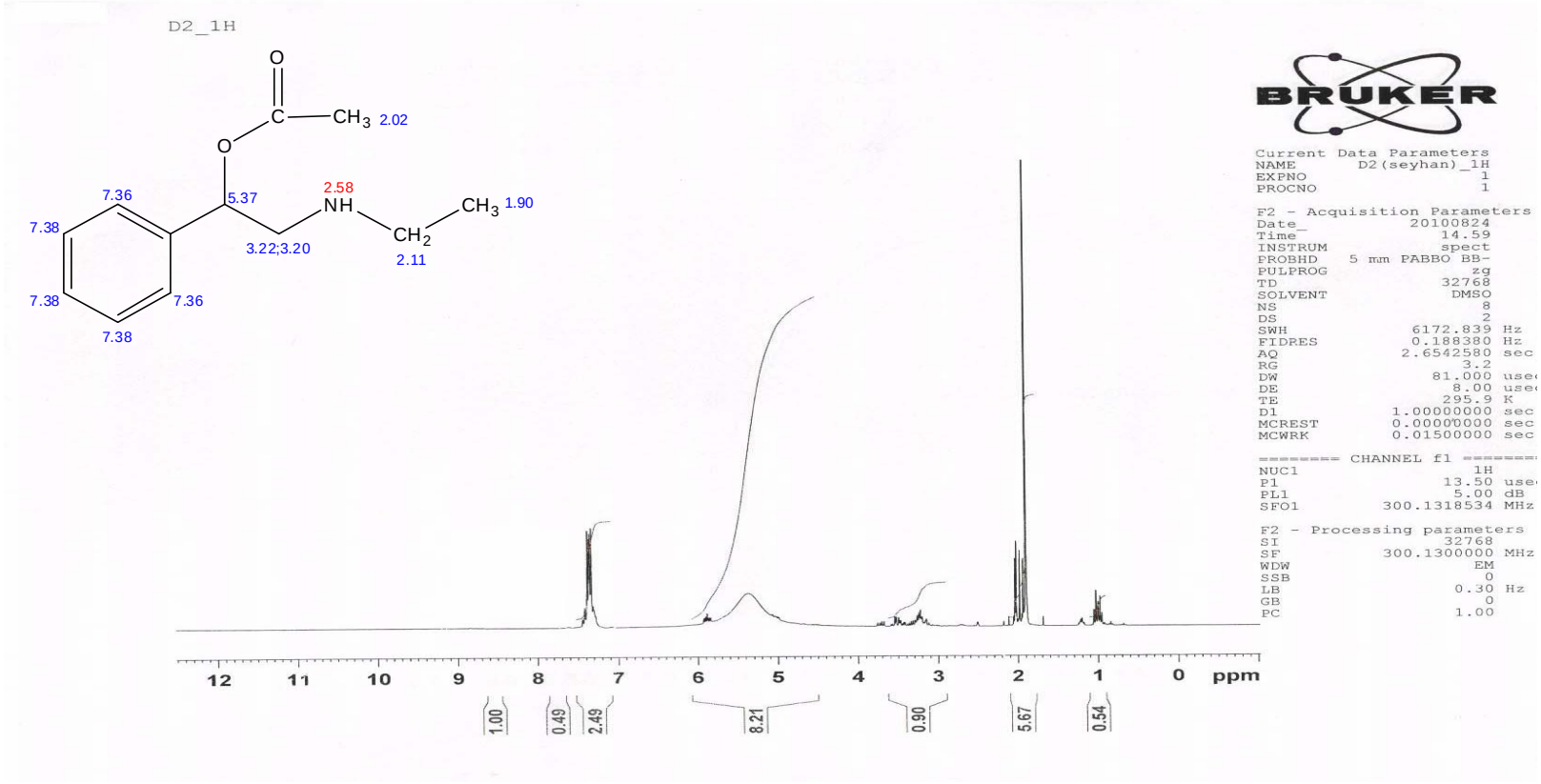
Ek 21. 2-(butilamino)-1-feniletanol'ün ^{1}H NMR spektrumu.



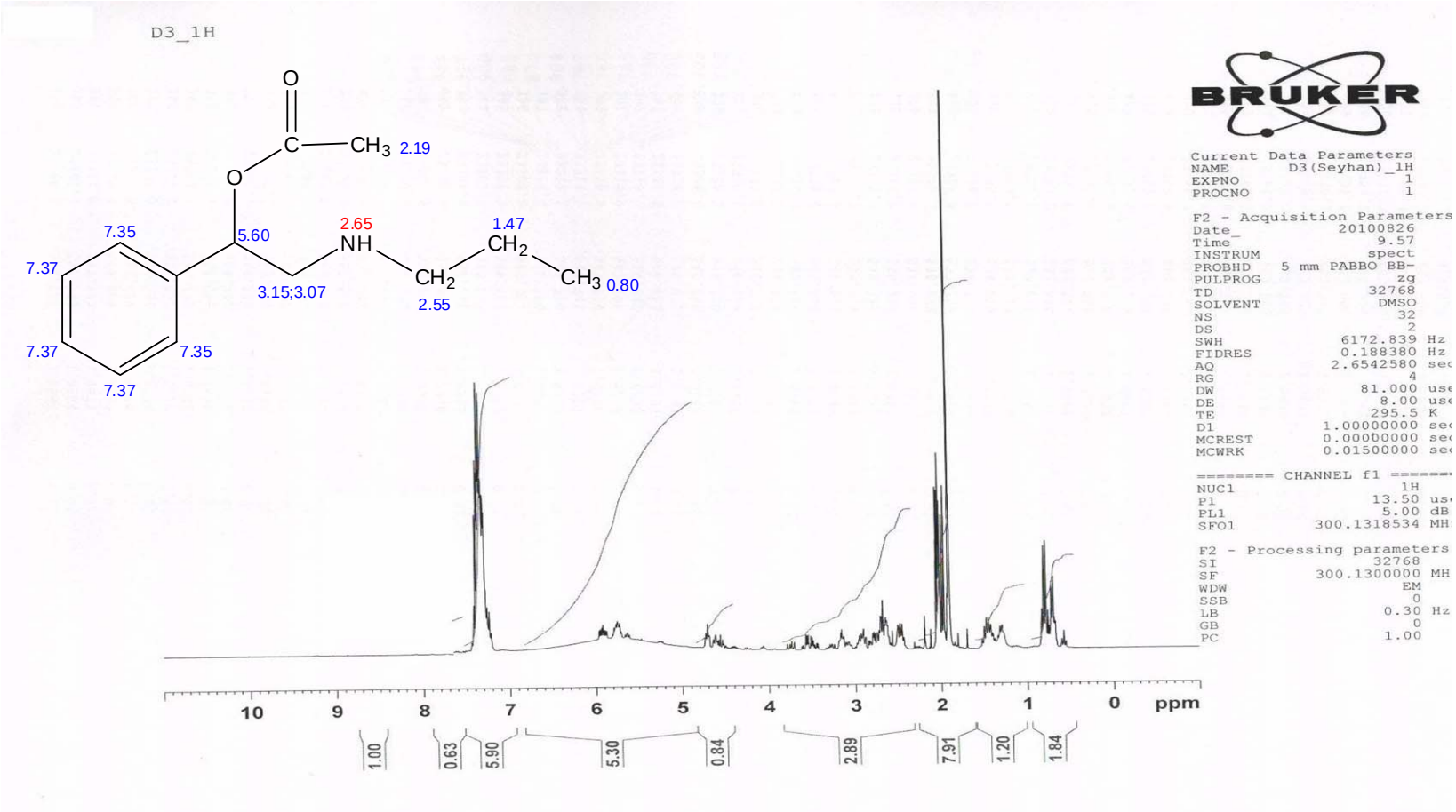
Ek 22. 2-(hekzilamino)-1-feniletanol'ün ^{1}H NMR spektrumu.



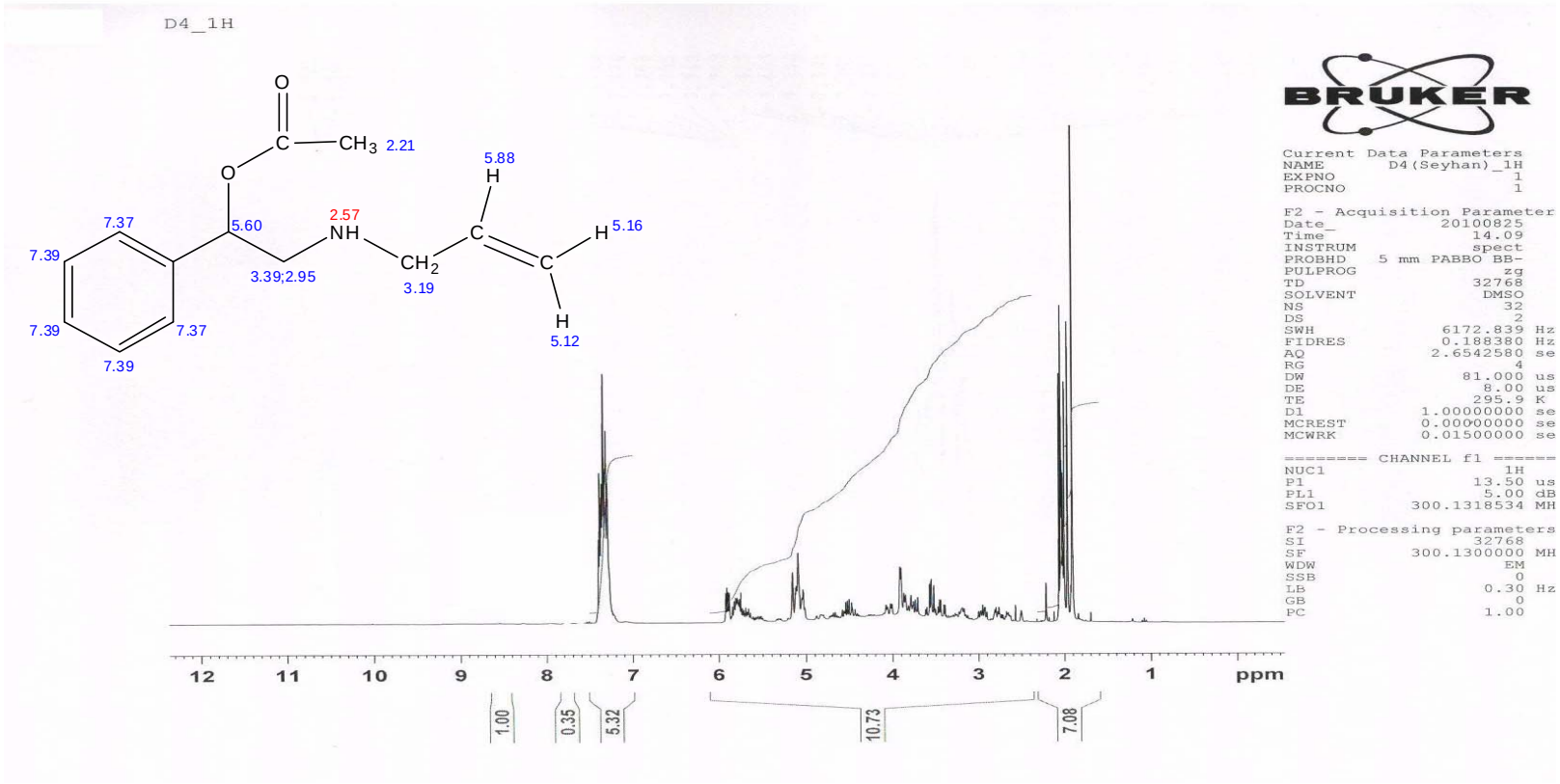
Ek 23.2-(metilamino)-1-fenil etil asetat'ın ^{1}H NMR spektrumu.



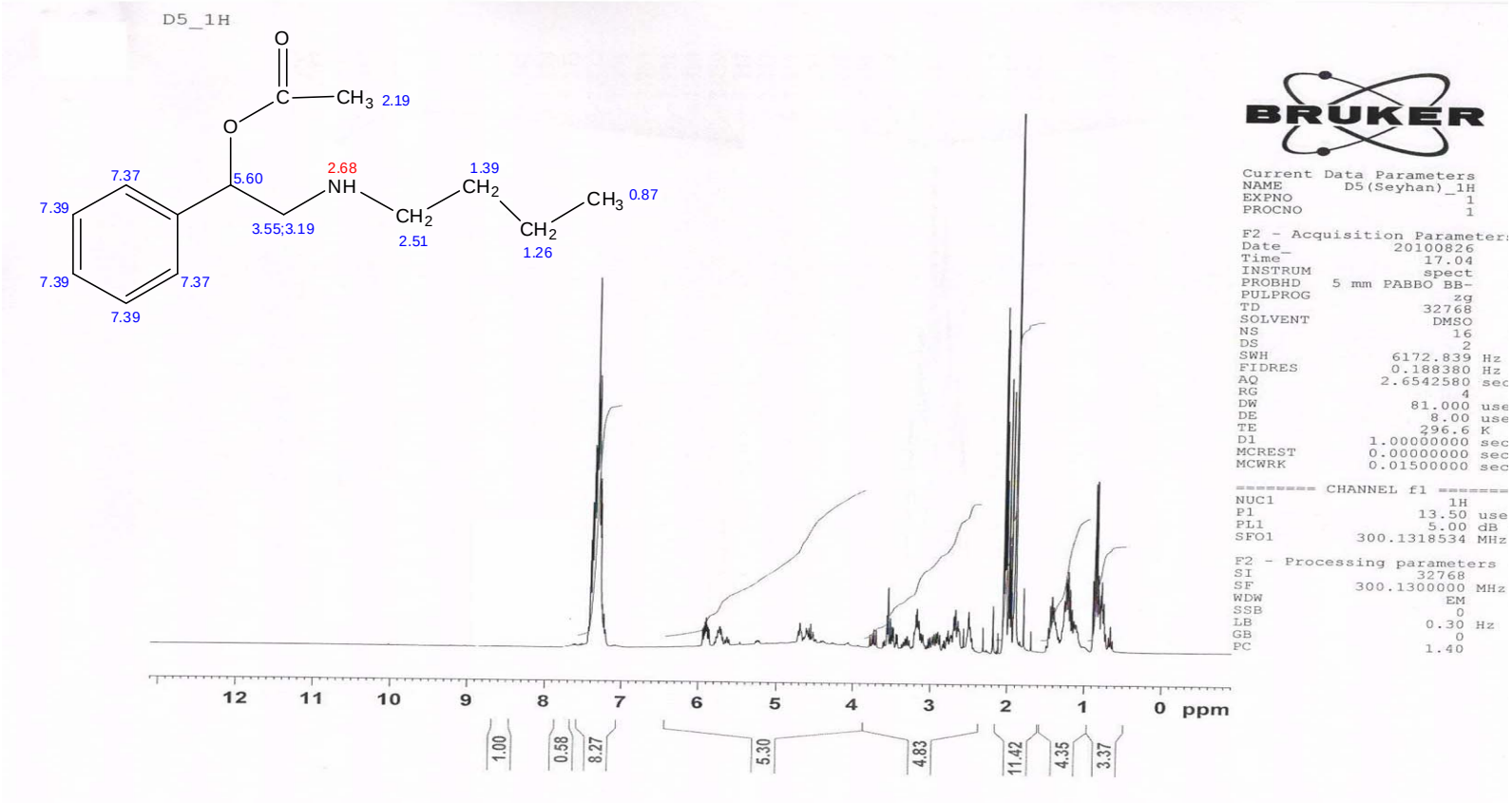
Ek 24. 2-(etilamino)-1-fenil etil asetat'ın ^{1}H NMR spektrumu.



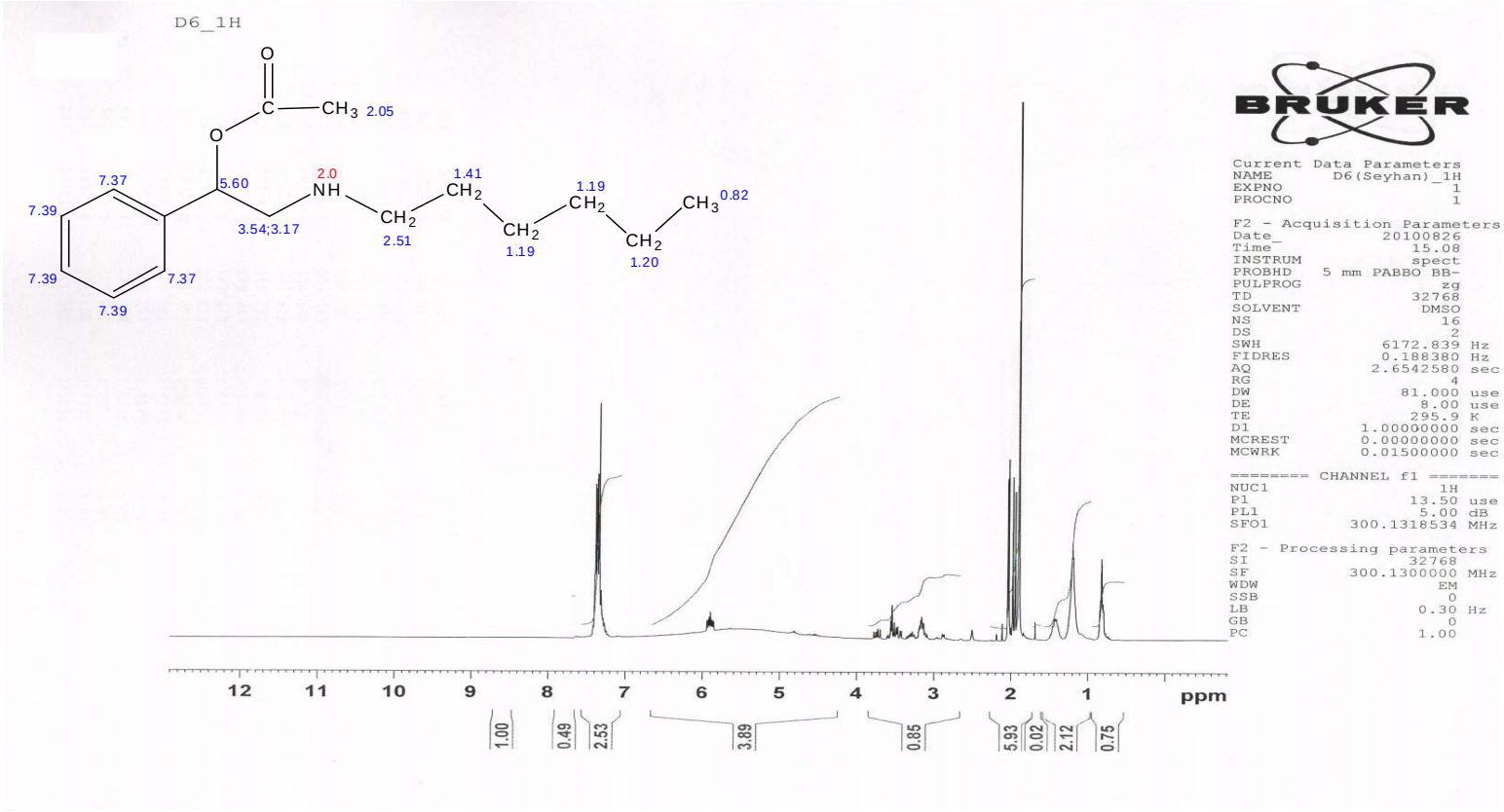
Ek 25. 2-(propilamino)-1-fenil etil asetat'ın ^{1}H NMR spektrumu.



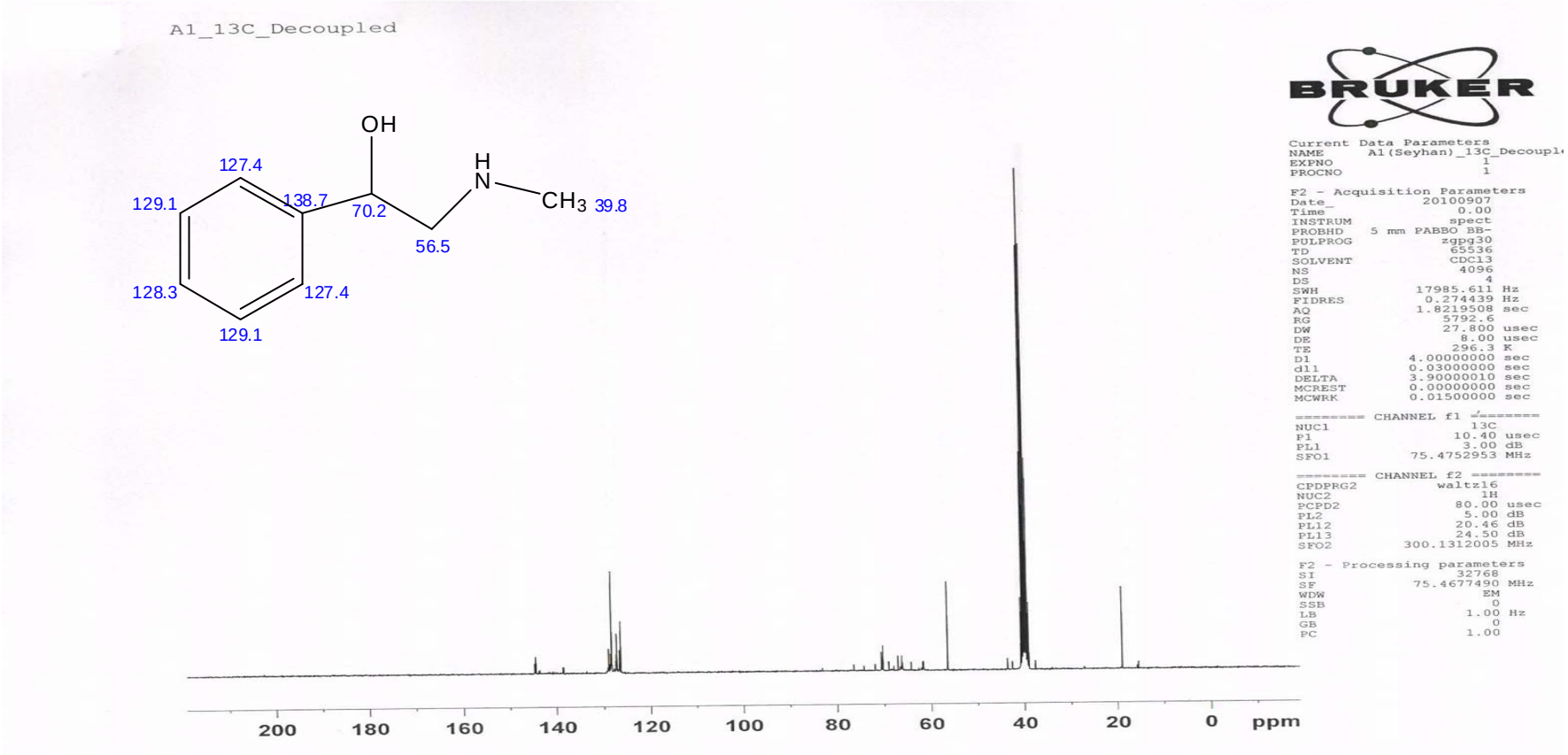
Ek 26. 2-(allilamino)-1-fenil etil asetat'ın ^{1}H NMR spektrumu.



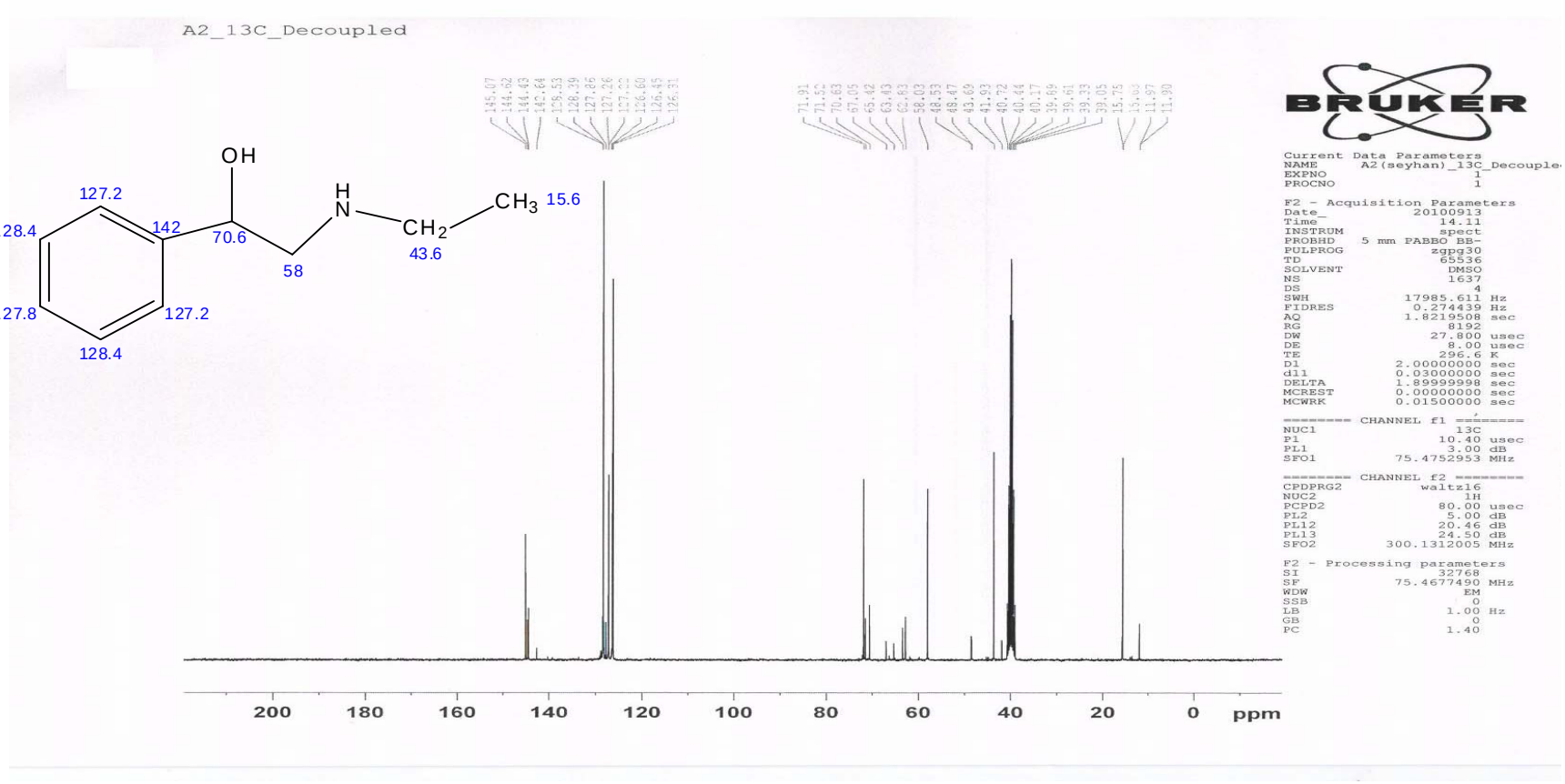
Ek 27.2-(butilamino)-1-fenil etil asetat'ın ^{1}H NMR spektrumu.



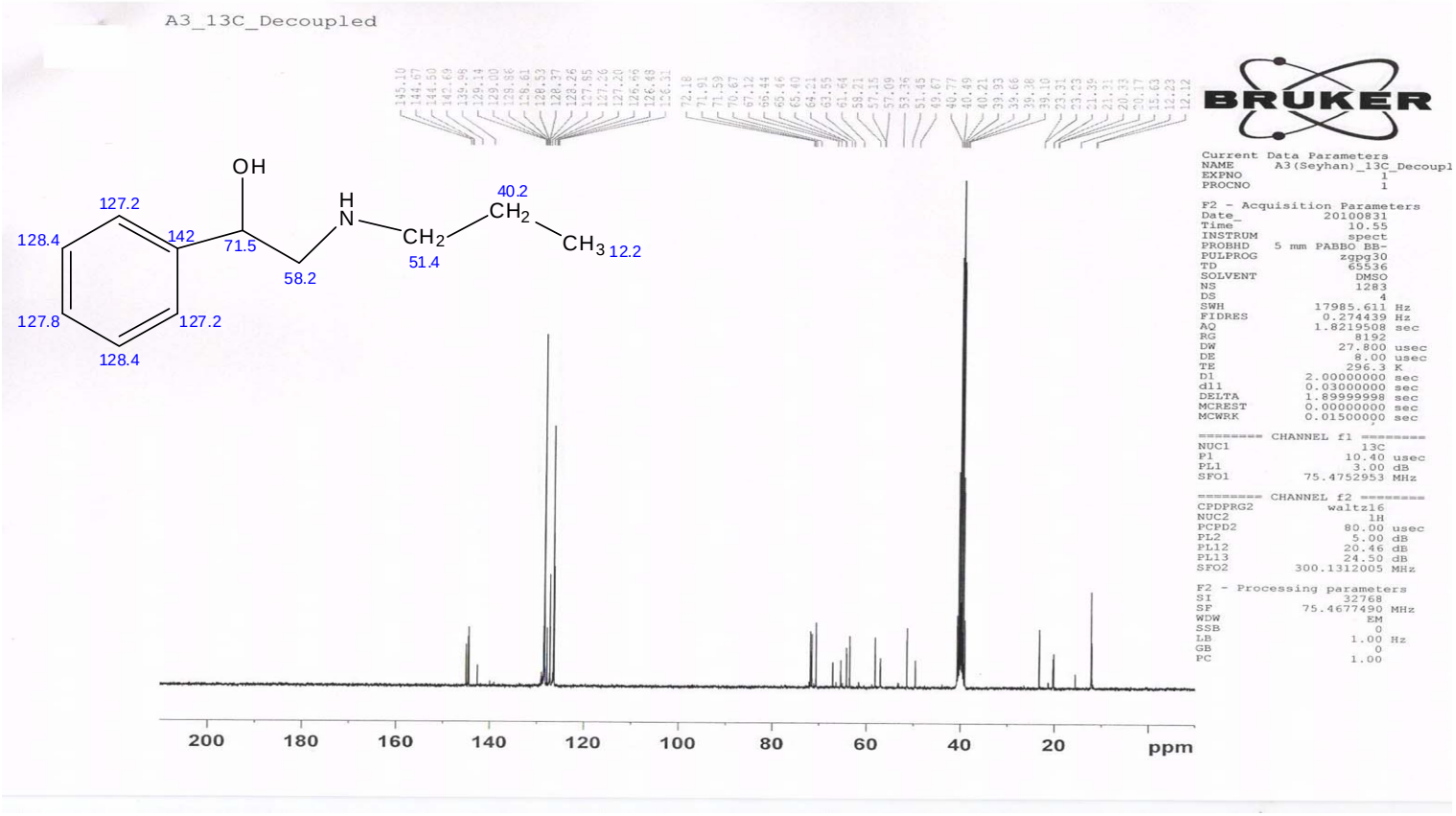
Ek 28. 2-(hekzilamino)-1-fenil etil asetat'ın ^{1}H NMR spektrumu.



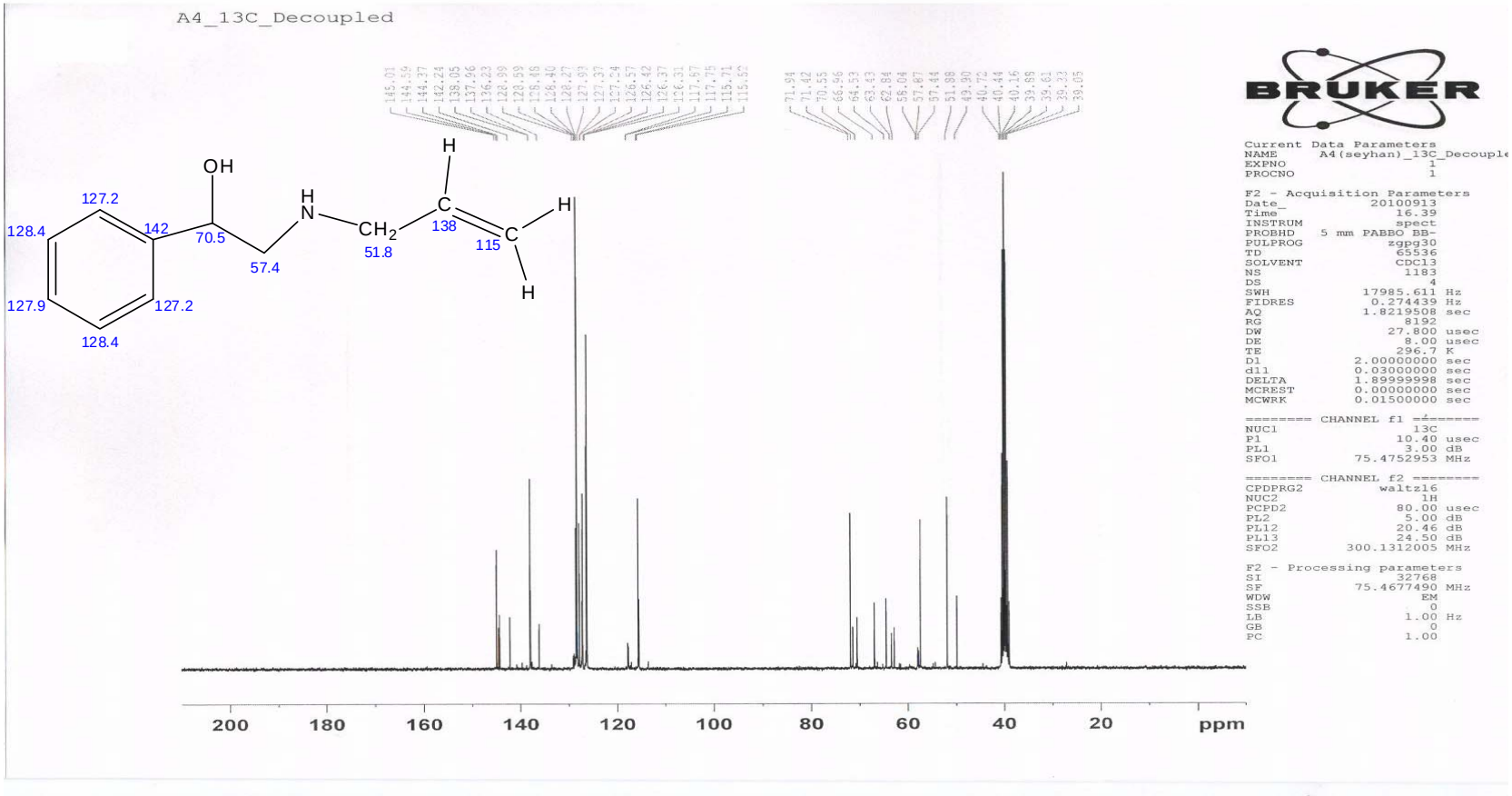
Ek 29. 2-(metilamino)-1-feniletanol'ün ^{13}C NMR spektrumu.



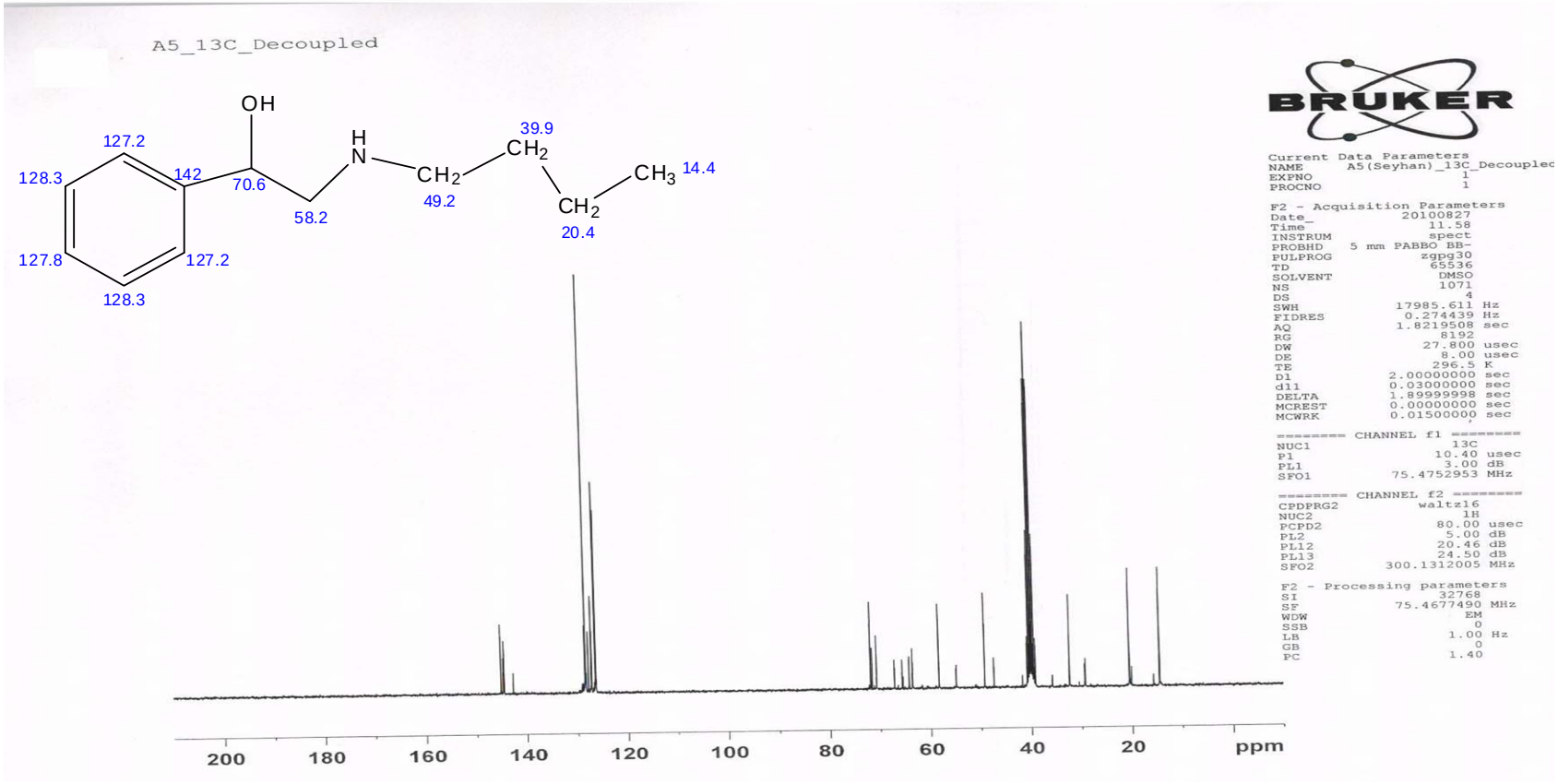
Ek 30. 2-(etilamino)-1-feniletanol'ün ^{13}C NMR spektrumu.



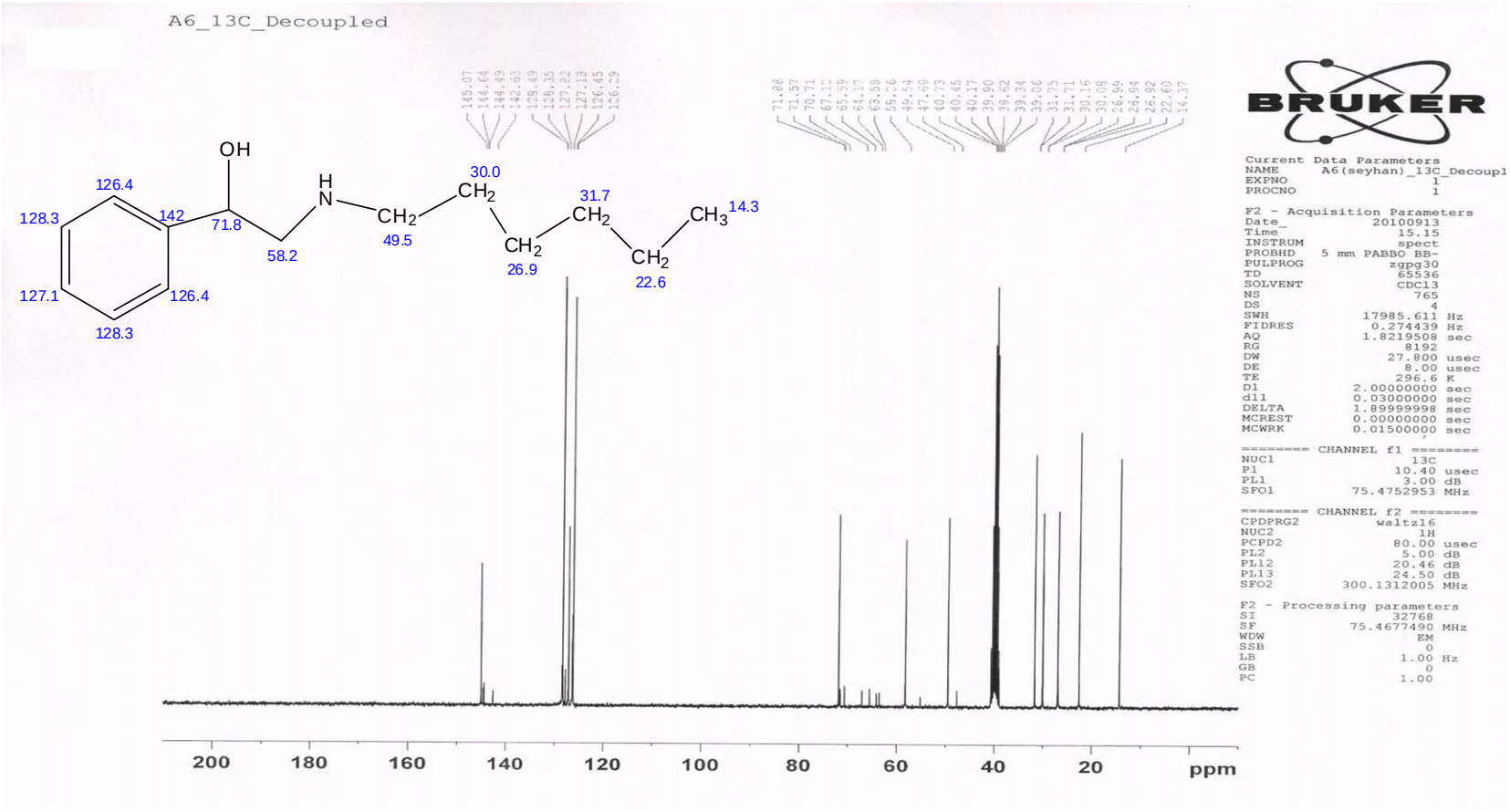
Ek 31. 2-(propilamino)-1-feniletanol'ün ^{13}C NMR spektrumu.



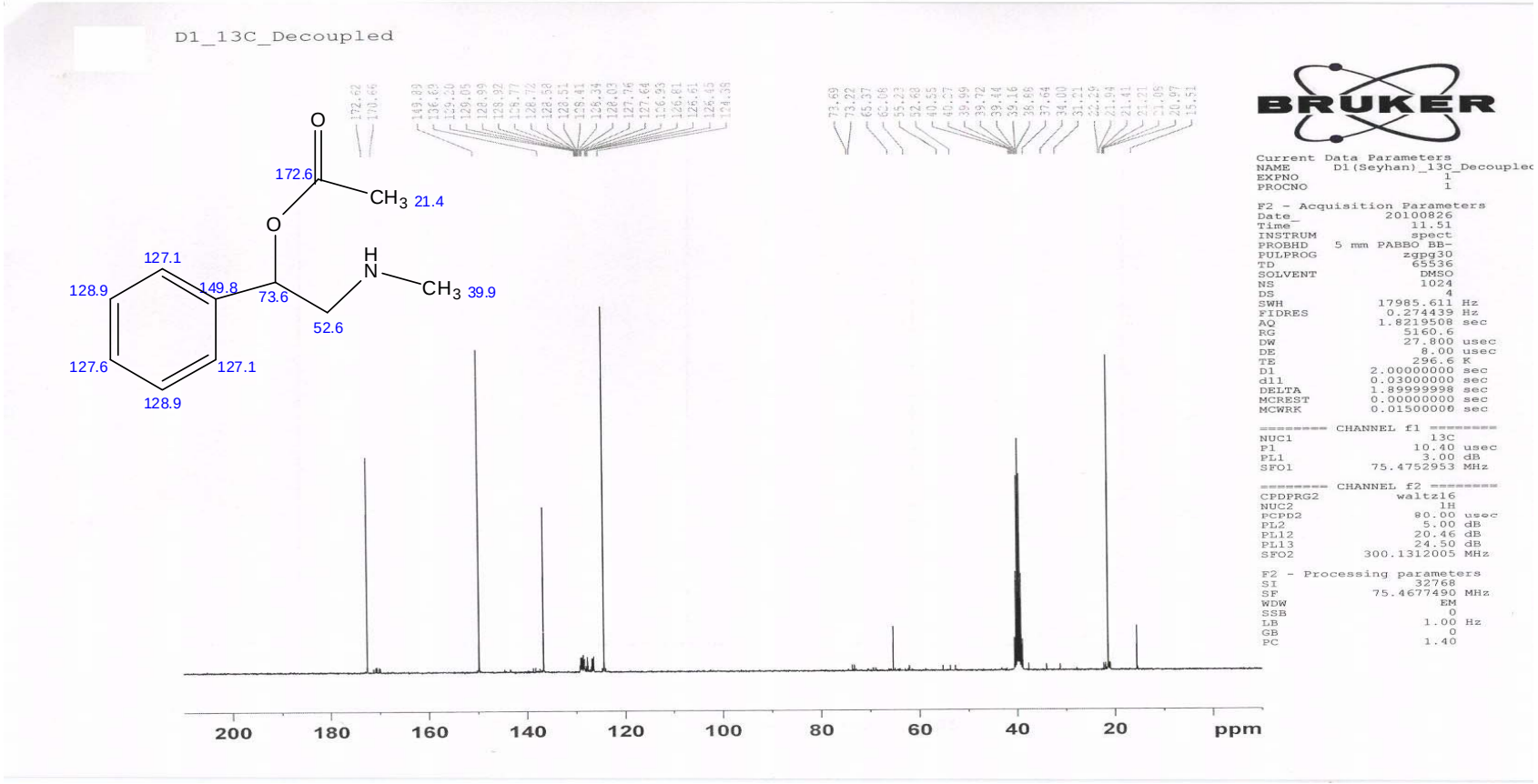
Ek 32. 2-(allilamino)-1-feniletanol'ün ^{13}C NMR spektrumu.



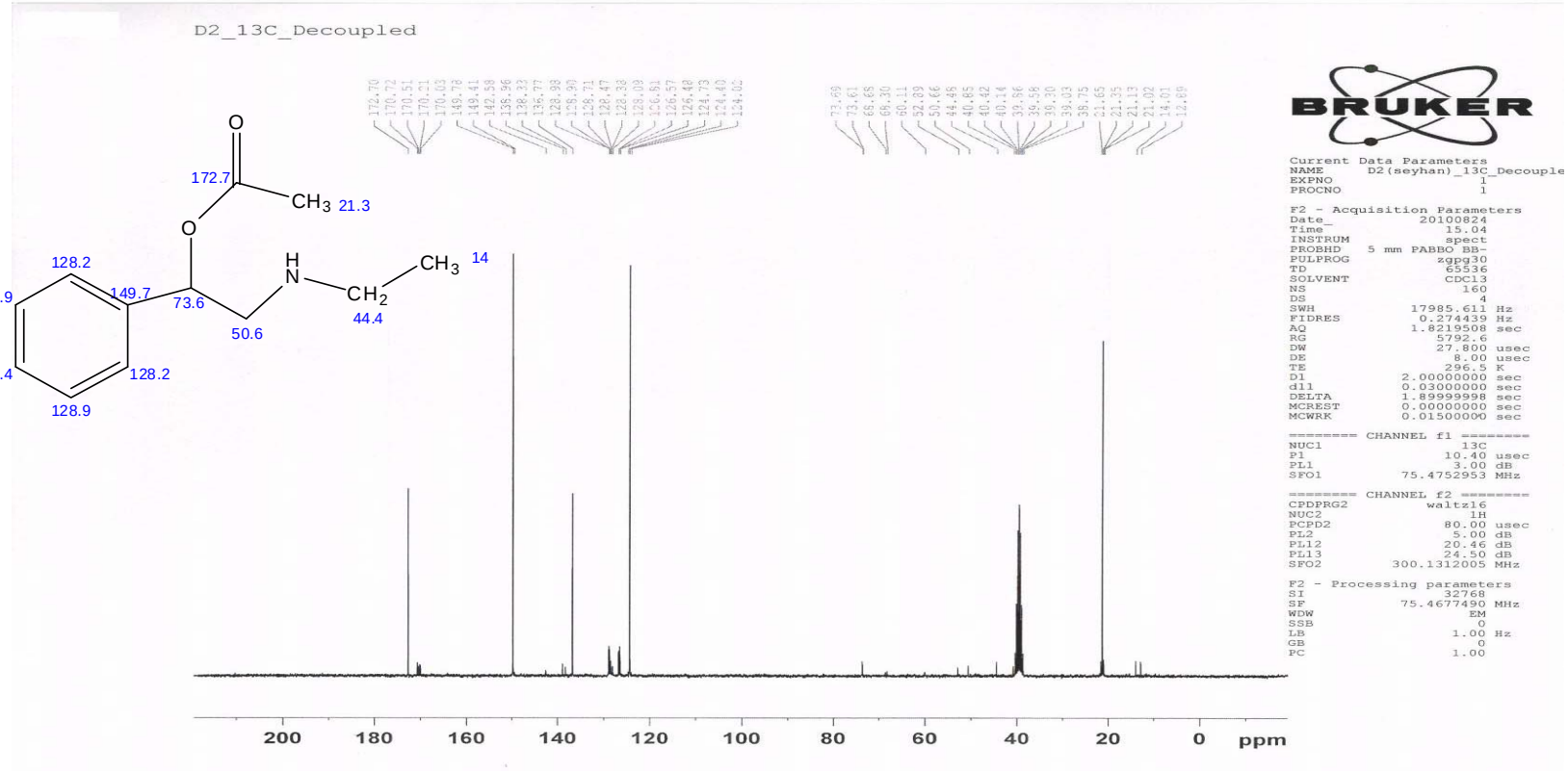
Ek 33. 2-(butilamino)-1-feniletanol'ün ^{13}C NMR spektrumu.



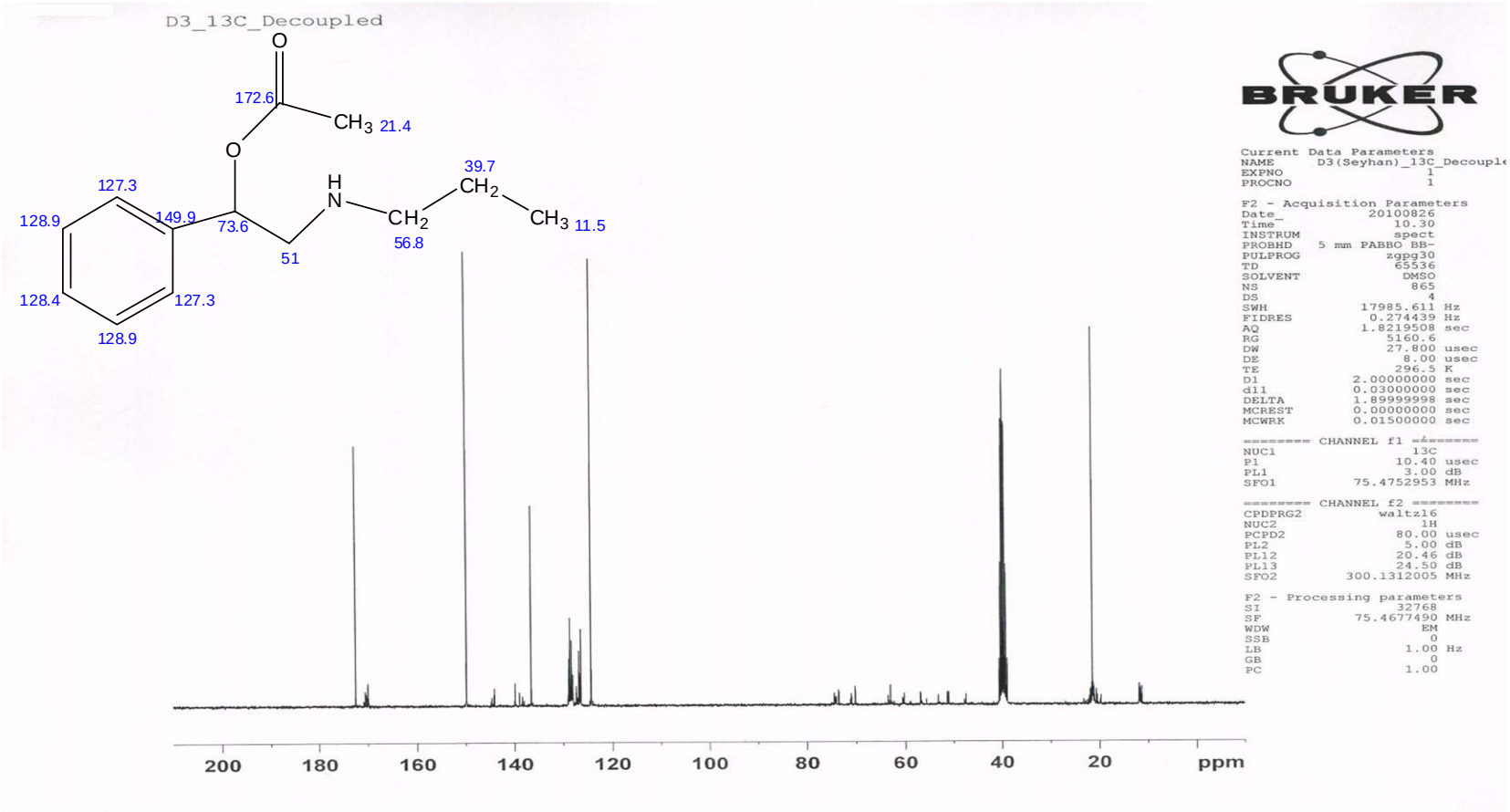
Ek 34. 2-(hekzilamino)-1-feniletanol'ün ^{13}C NMR spektrumu.



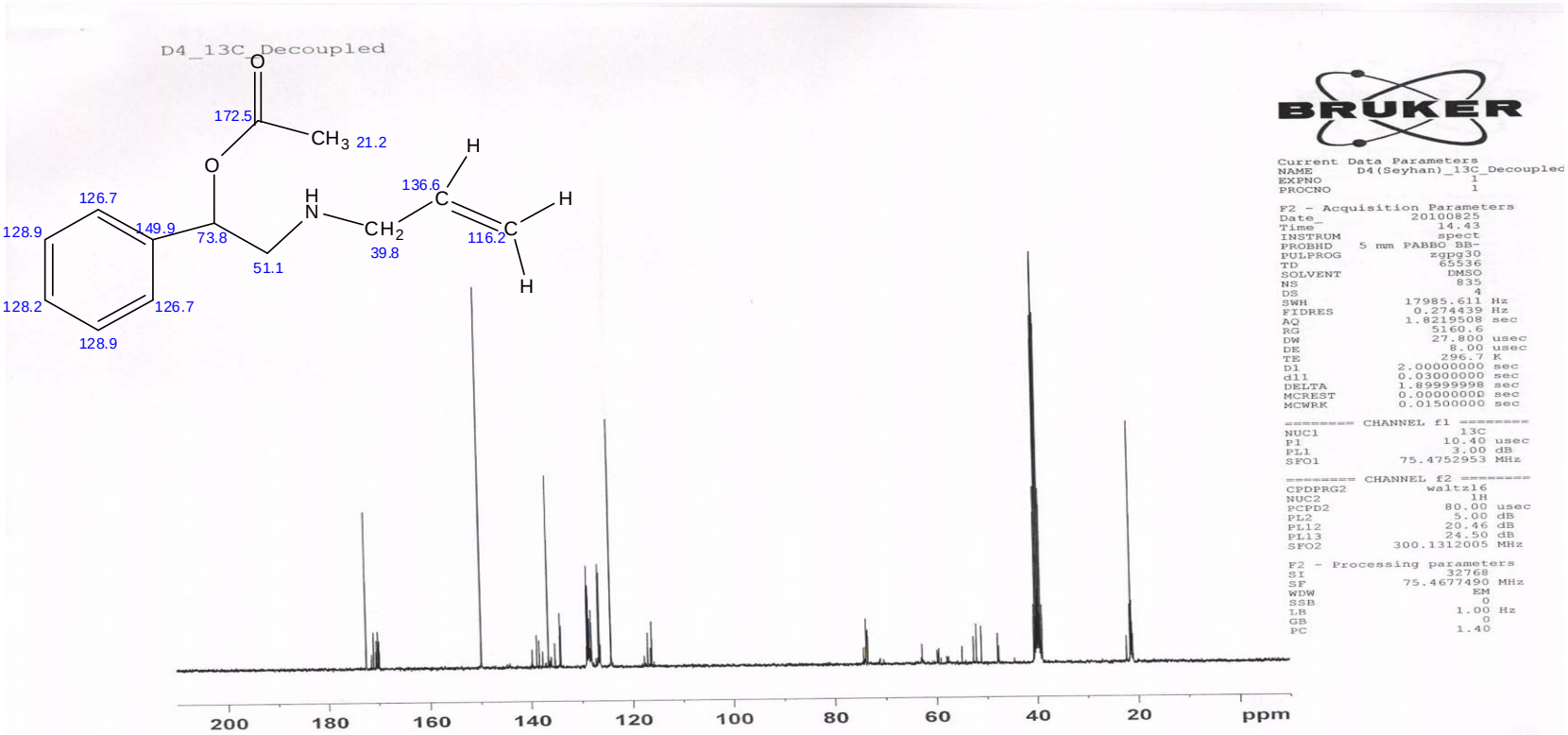
Ek 35. 2-(metilamino)-1-fenil etil asetat'ın ^{13}C NMR spektrumu.



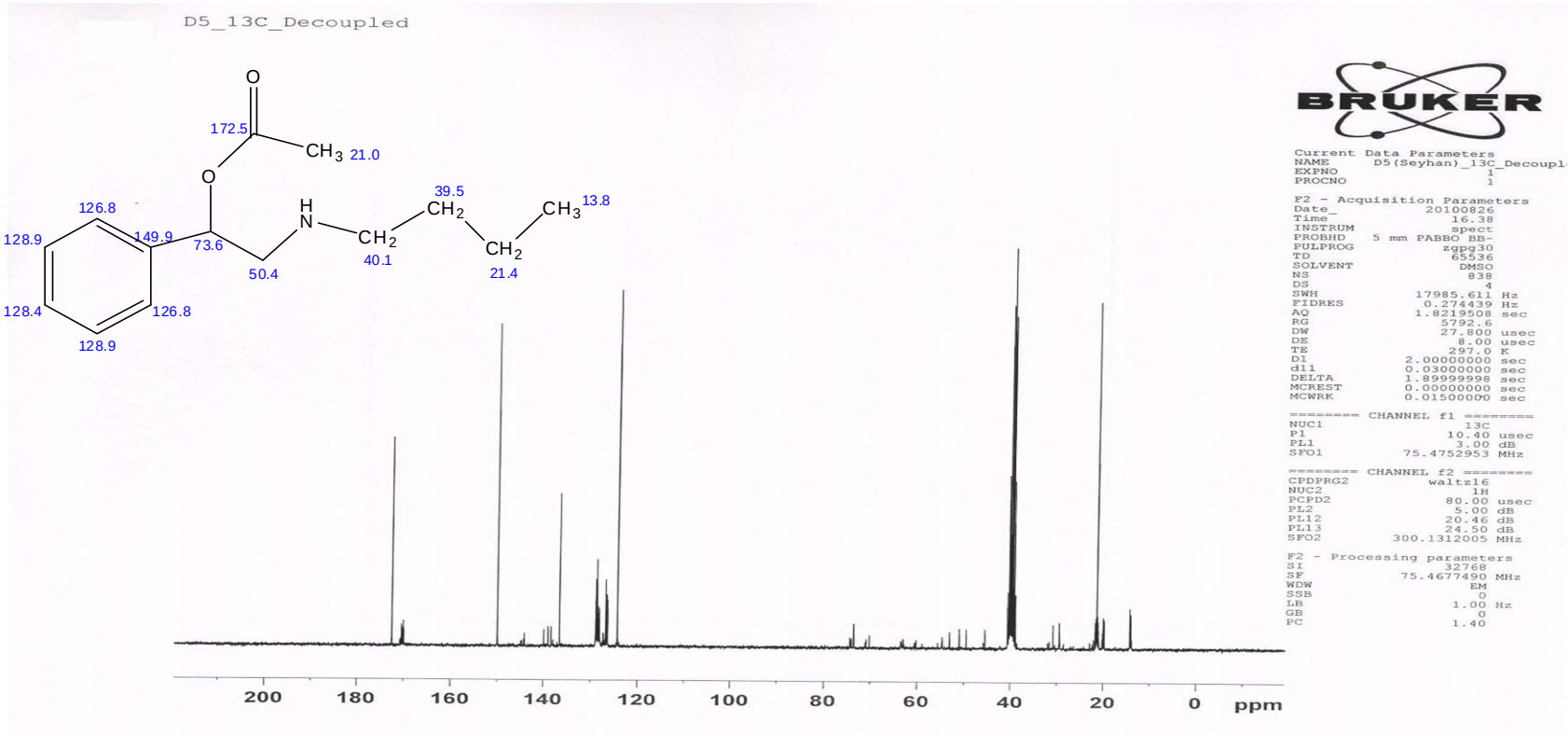
Ek 36. 2-(etilamino)-1-fenil etil asetat'ın ^{13}C NMR spektrumu.



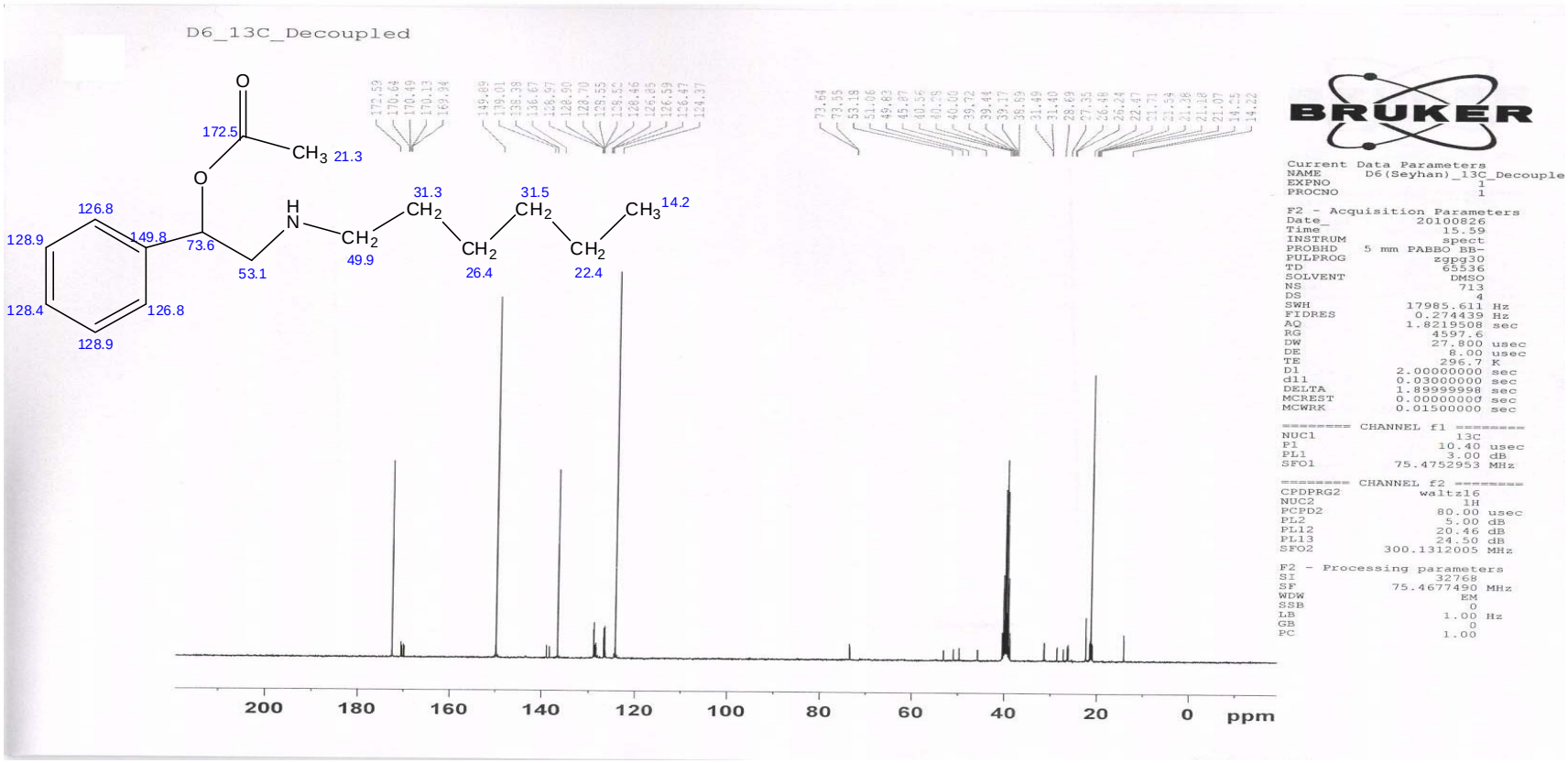
Ek 37. 2-(propilamino)-1-fenil etil asetat'ın ^{13}C NMR spektrumu.



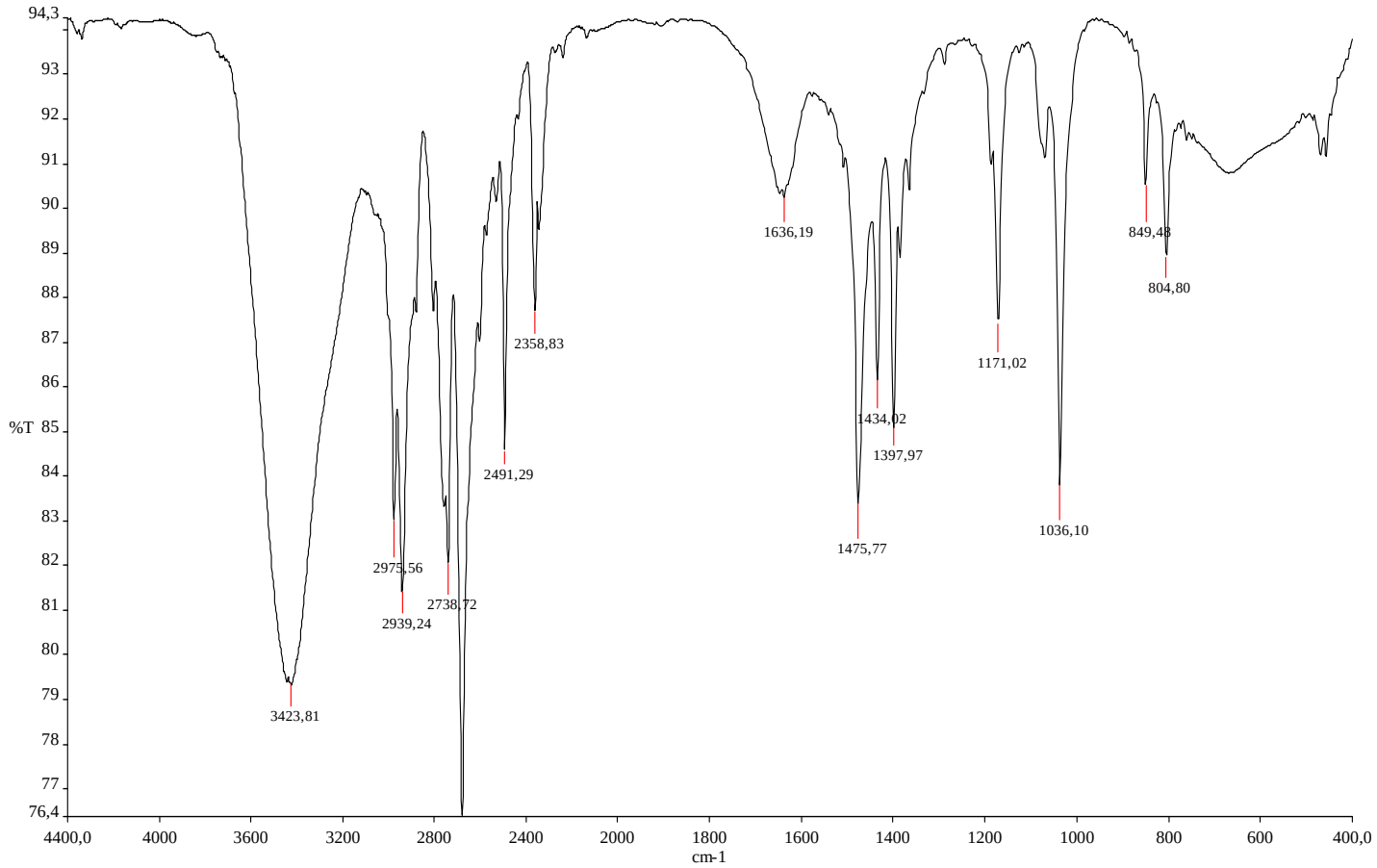
Ek 38. 2-(allilamino)-1-fenil etil asetat'ın ^{13}C NMR spektrumu.



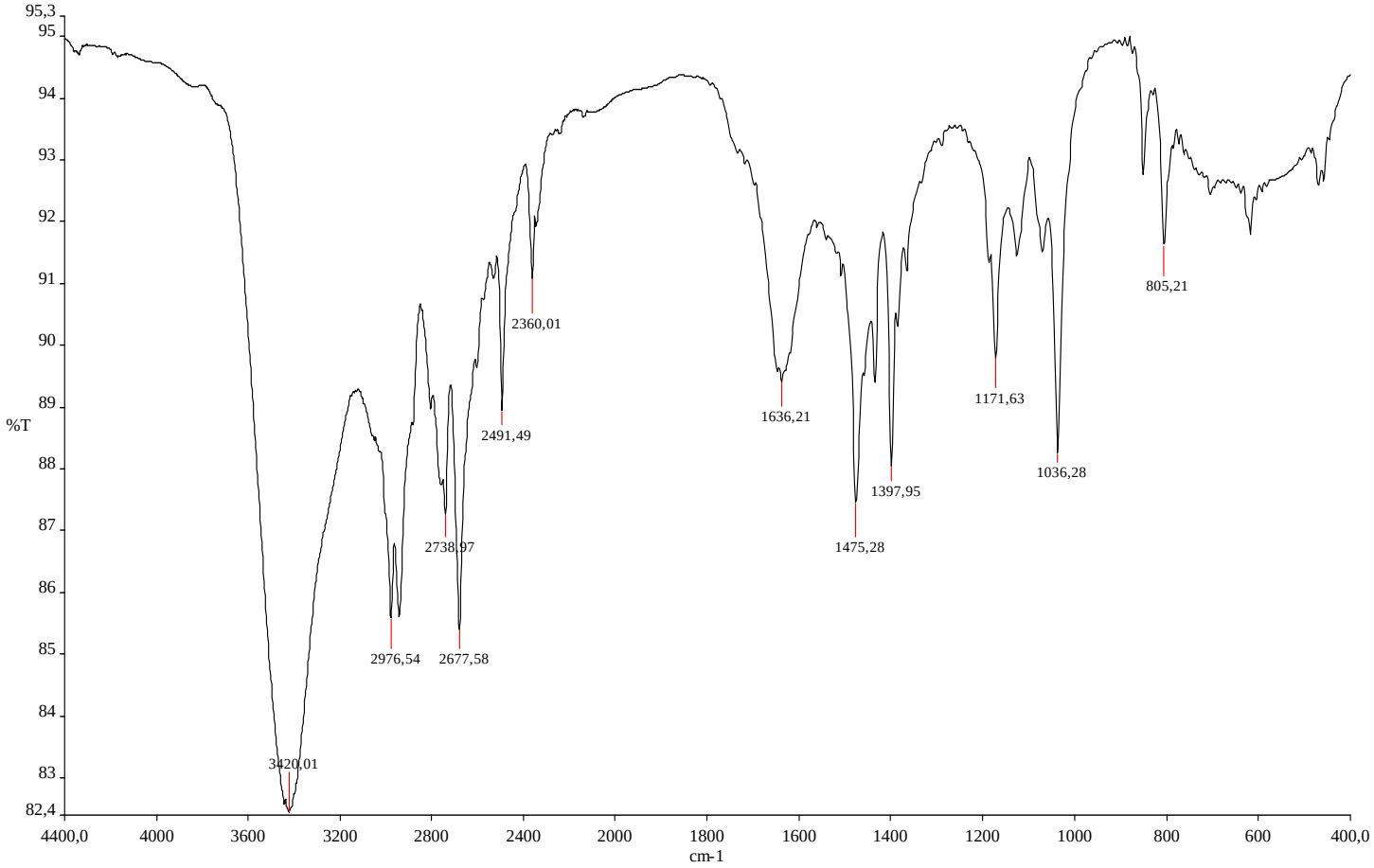
Ek 39. 2-(butilamino)-1-fenil etil asetat'ın ^{13}C NMR spektrumu.



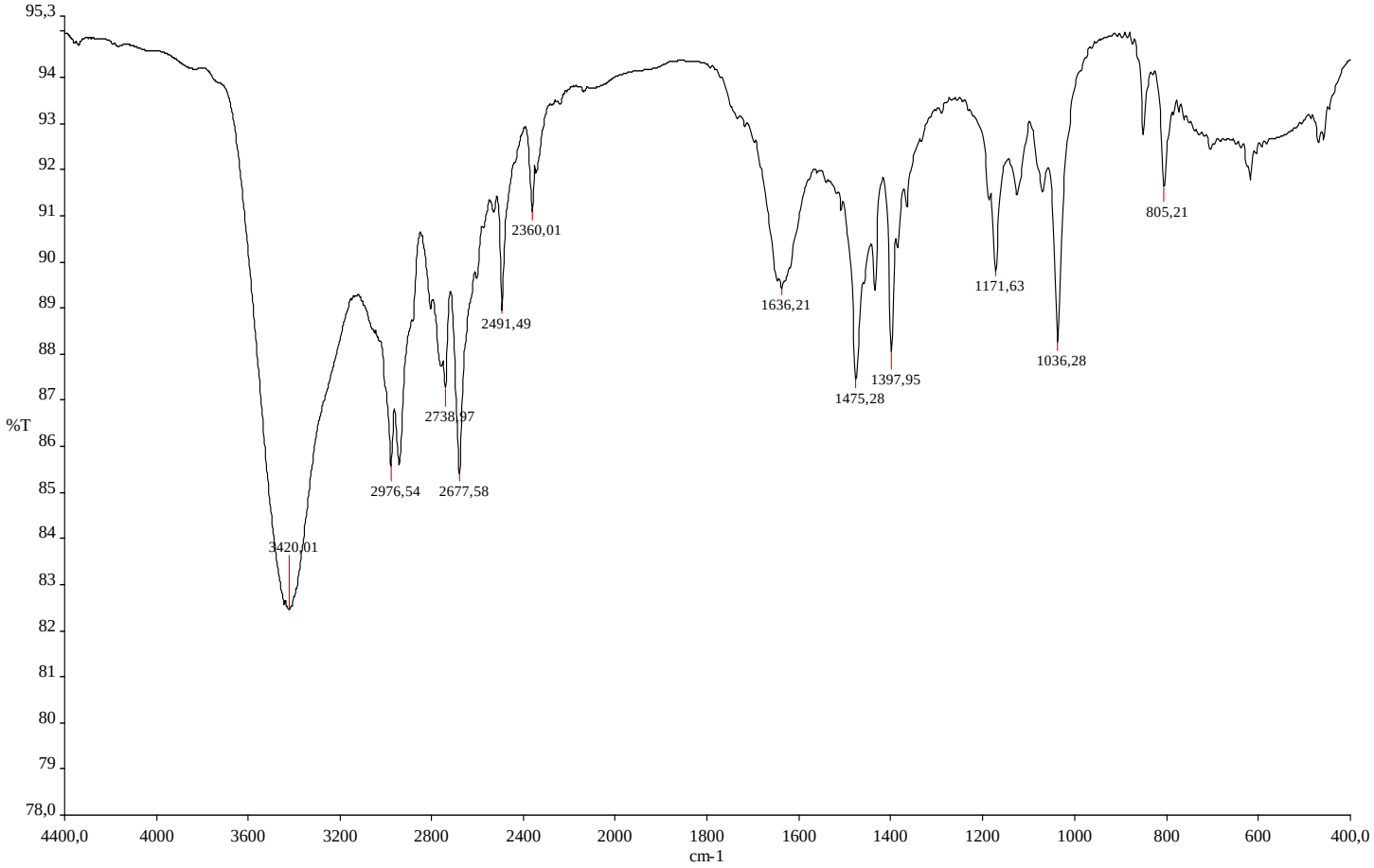
Ek 40. 2-(hekzilamino)-1-fenil etil asetat'ın ^{13}C NMR spektrumu.



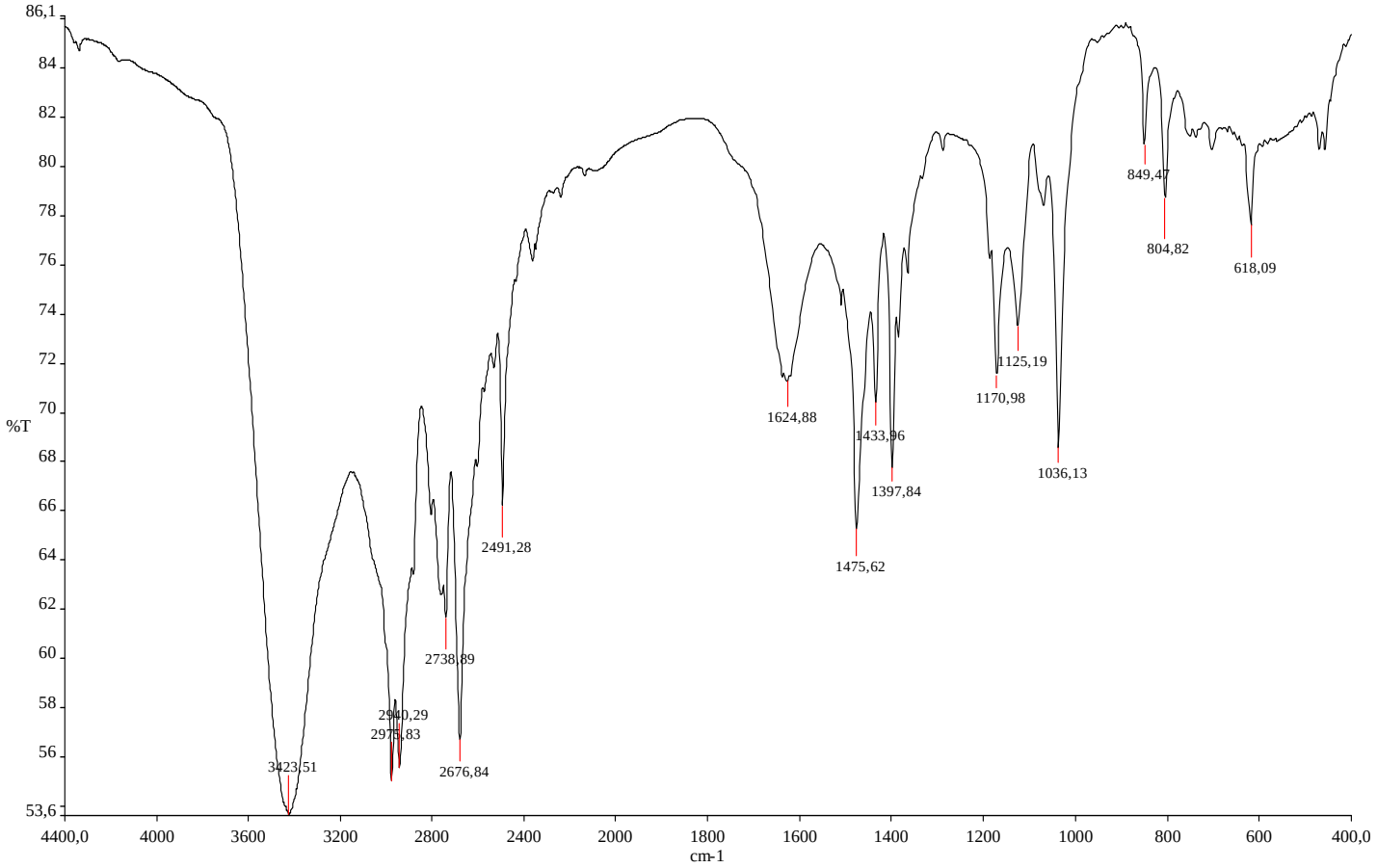
Ek 41. 2-hidroksi-2-fenil asetamid'in FT-IR spektrumu.



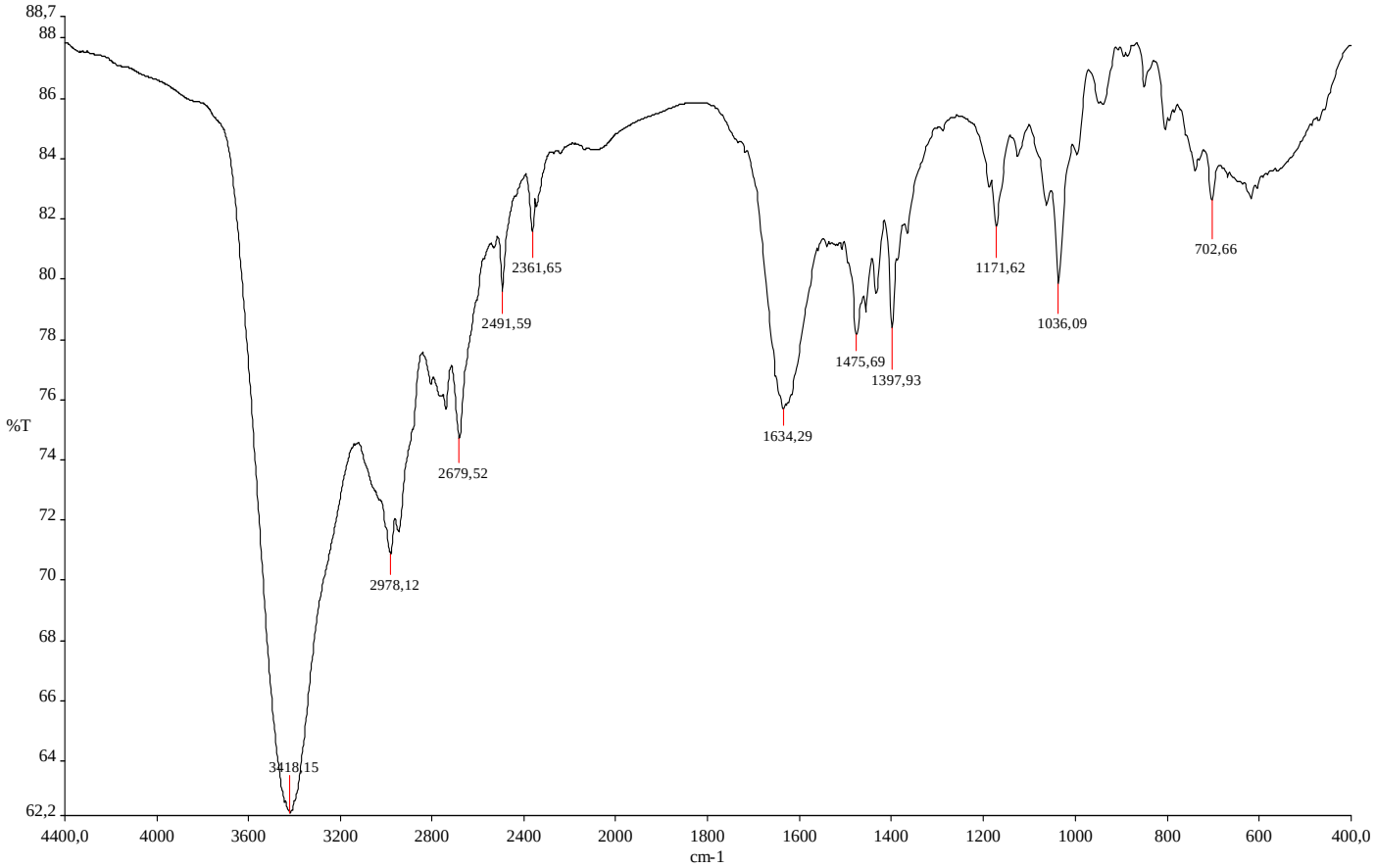
Ek 42. 2-hidroksi-N-Metil-2-fenil asetamid'in FT-IR spektrumu.



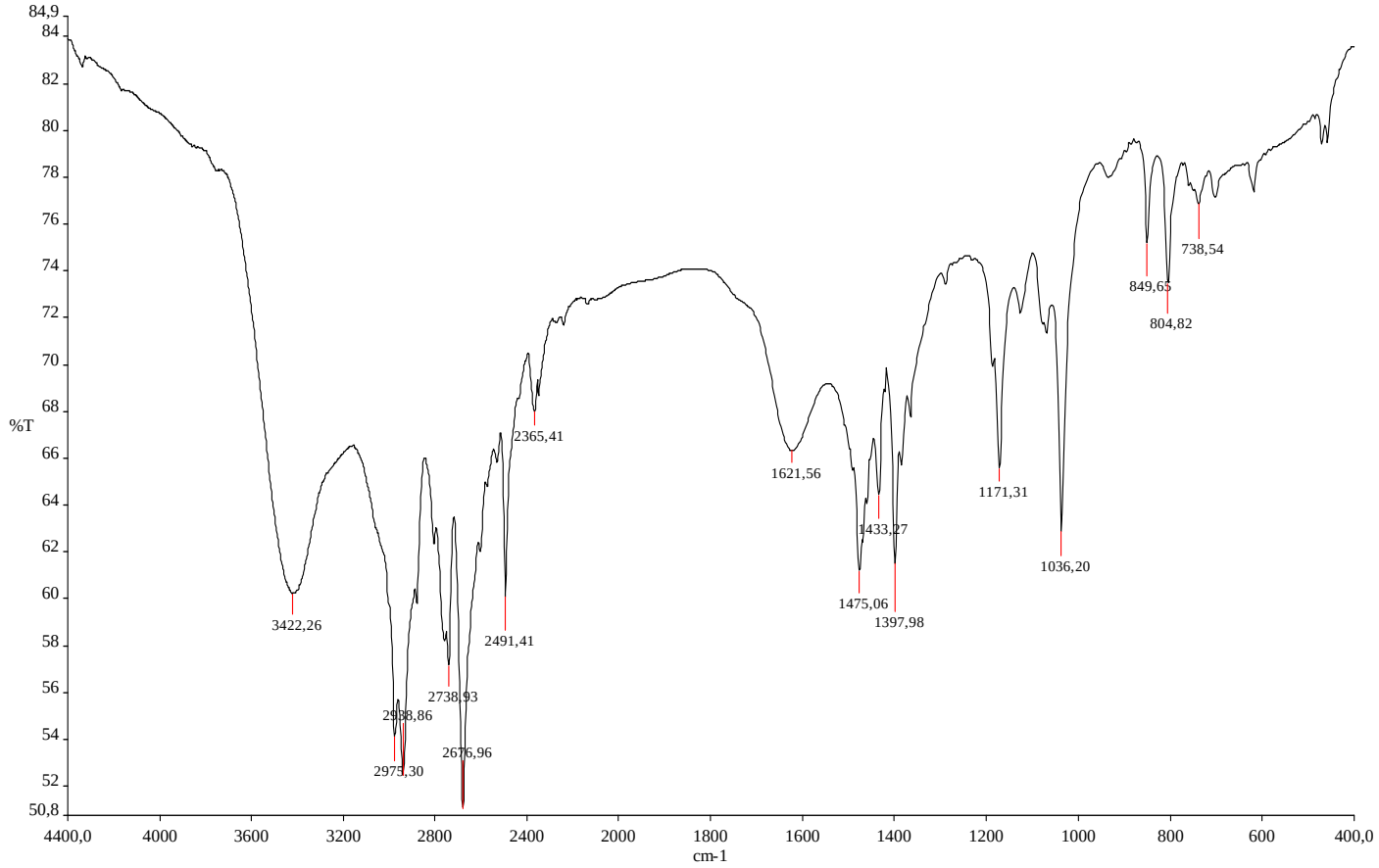
Ek 43. 2-hidroksi-N-Etil-2-fenil asetamid'in FT-IR spektrumu.



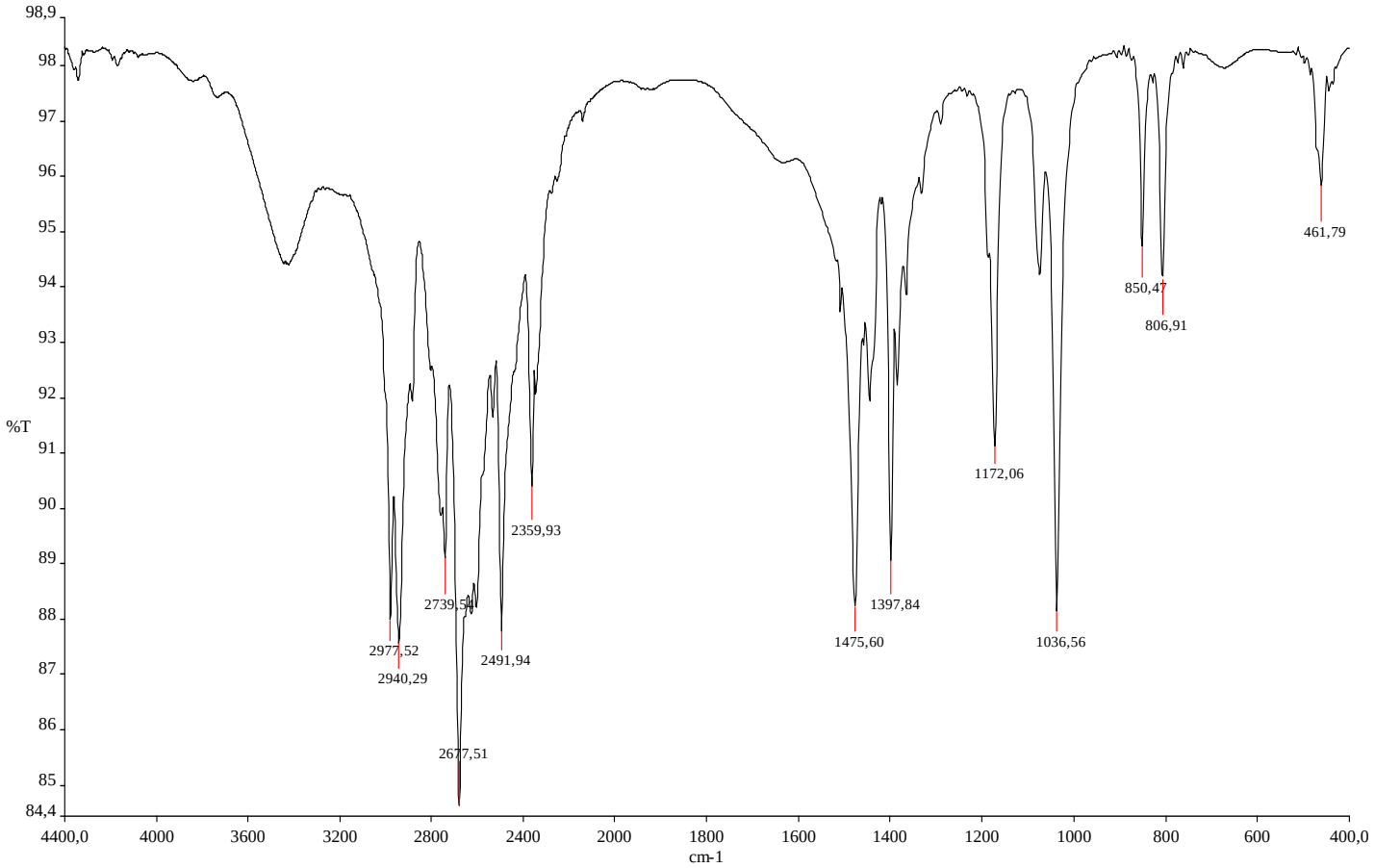
Ek 44. 2-hidroksi-N-Propil-2-fenil asetamid'in FT-IR spektrumu.



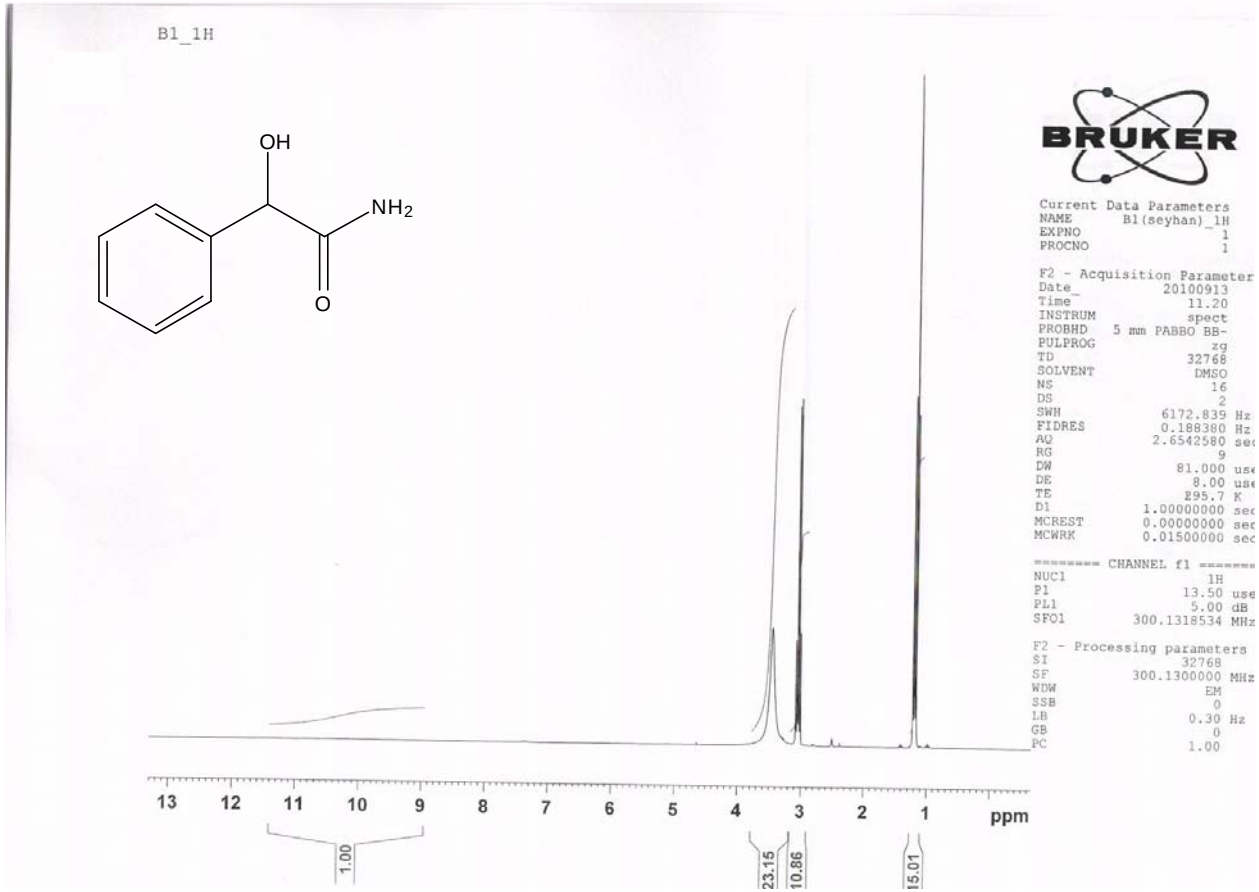
Ek 45. 2-hidroksi-N-Allil-2-fenil asetamid'in FT-IR spektrumu



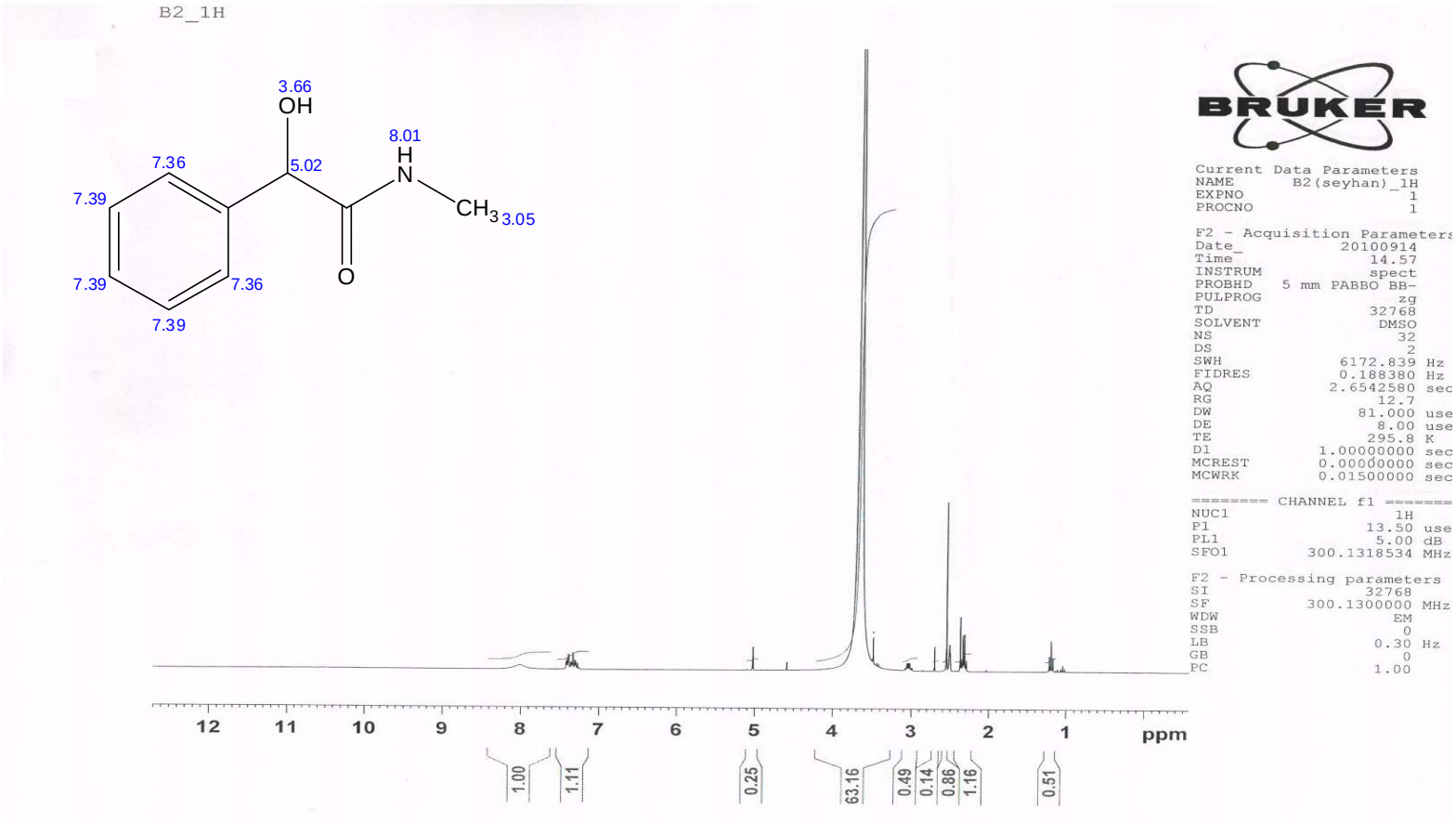
Ek 46. 2-hidroksi-N-Butil-2-fenil asetamid'in FT-IR spektrumu.



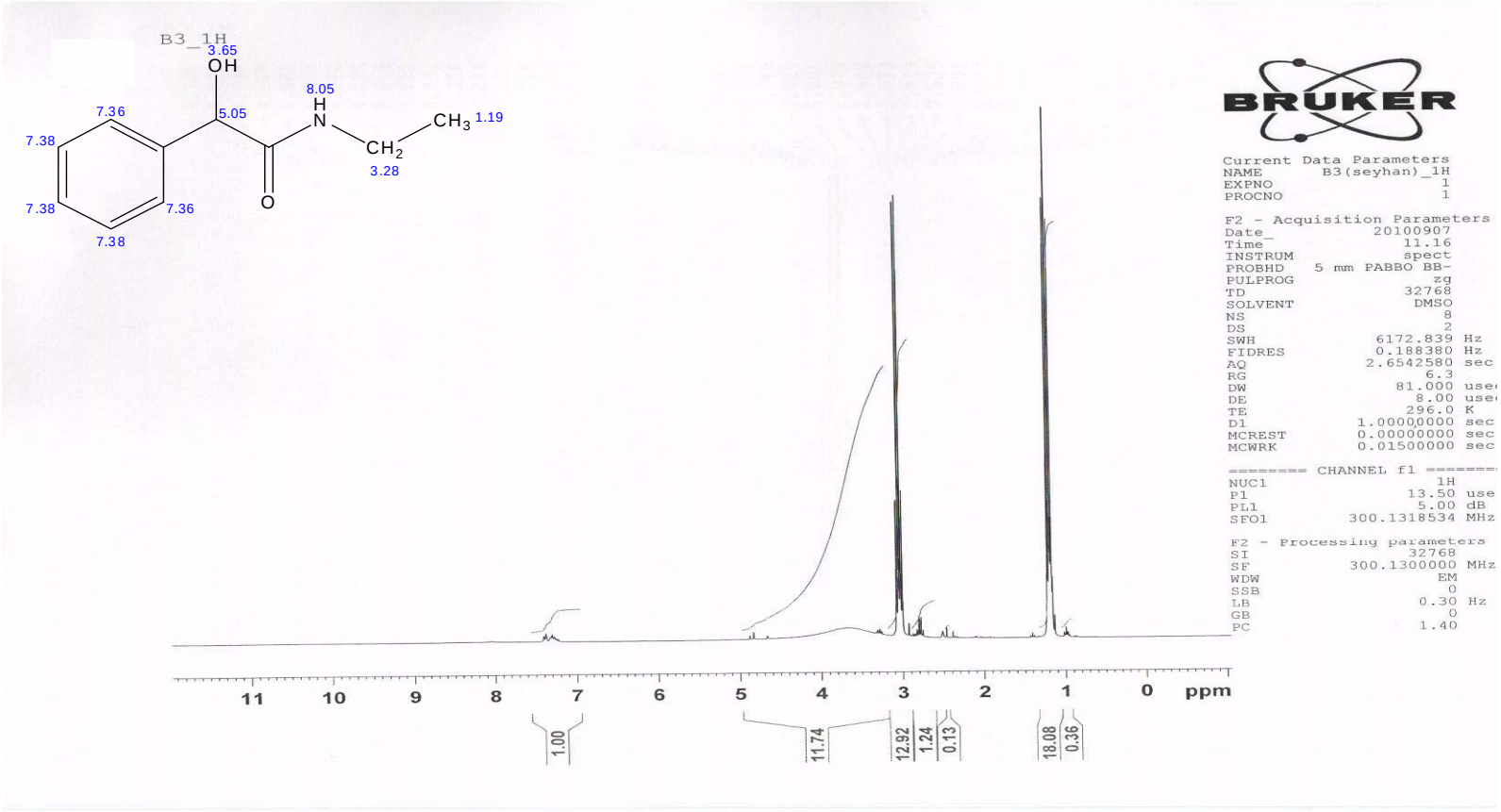
Ek 47. 2-hidroksi-N-Hekzil-2-fenil asetamid'in FT-IR spektrumu.



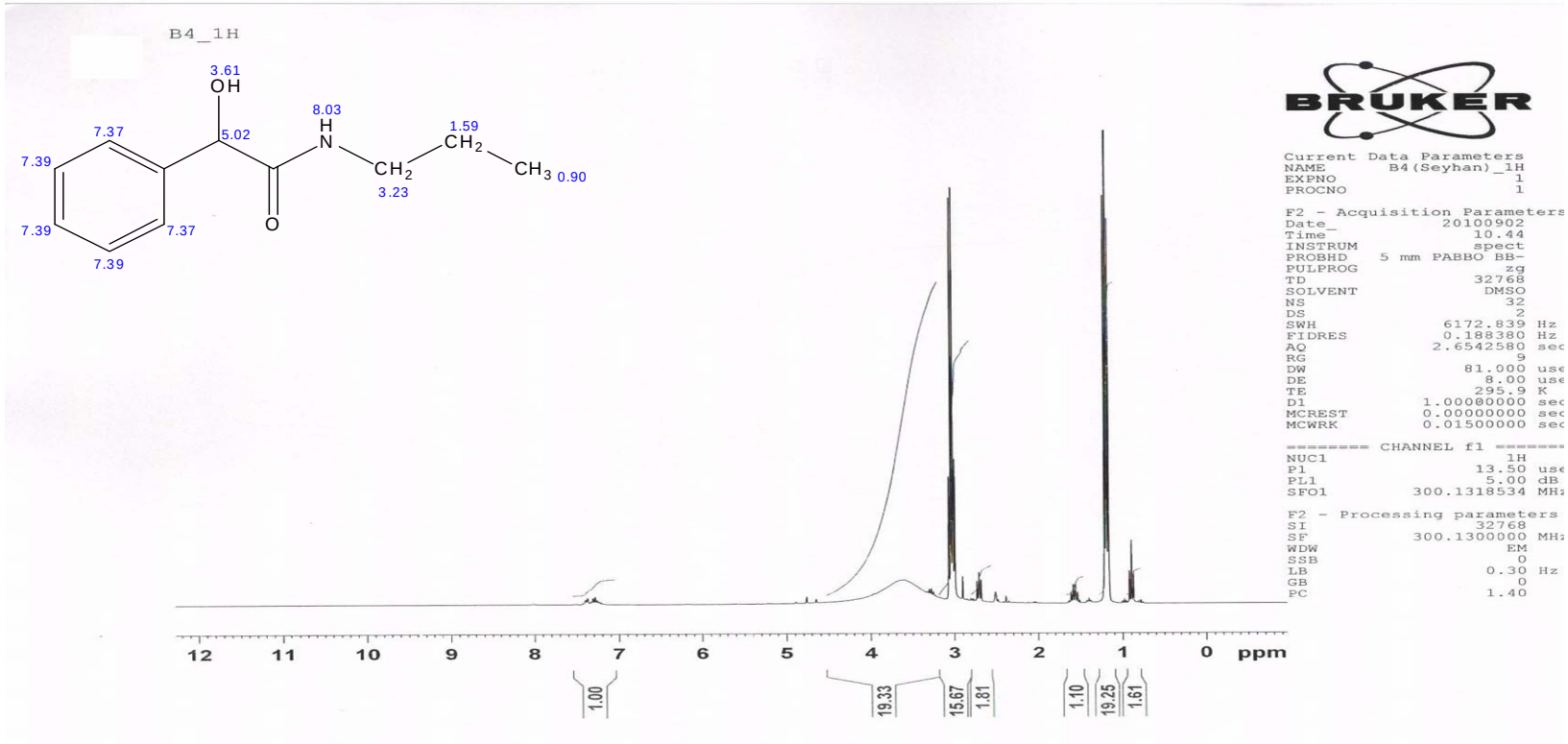
Ek 48. 2-hidroksi-2-fenilasetamid'in ^{1}H NMR spektrumu.



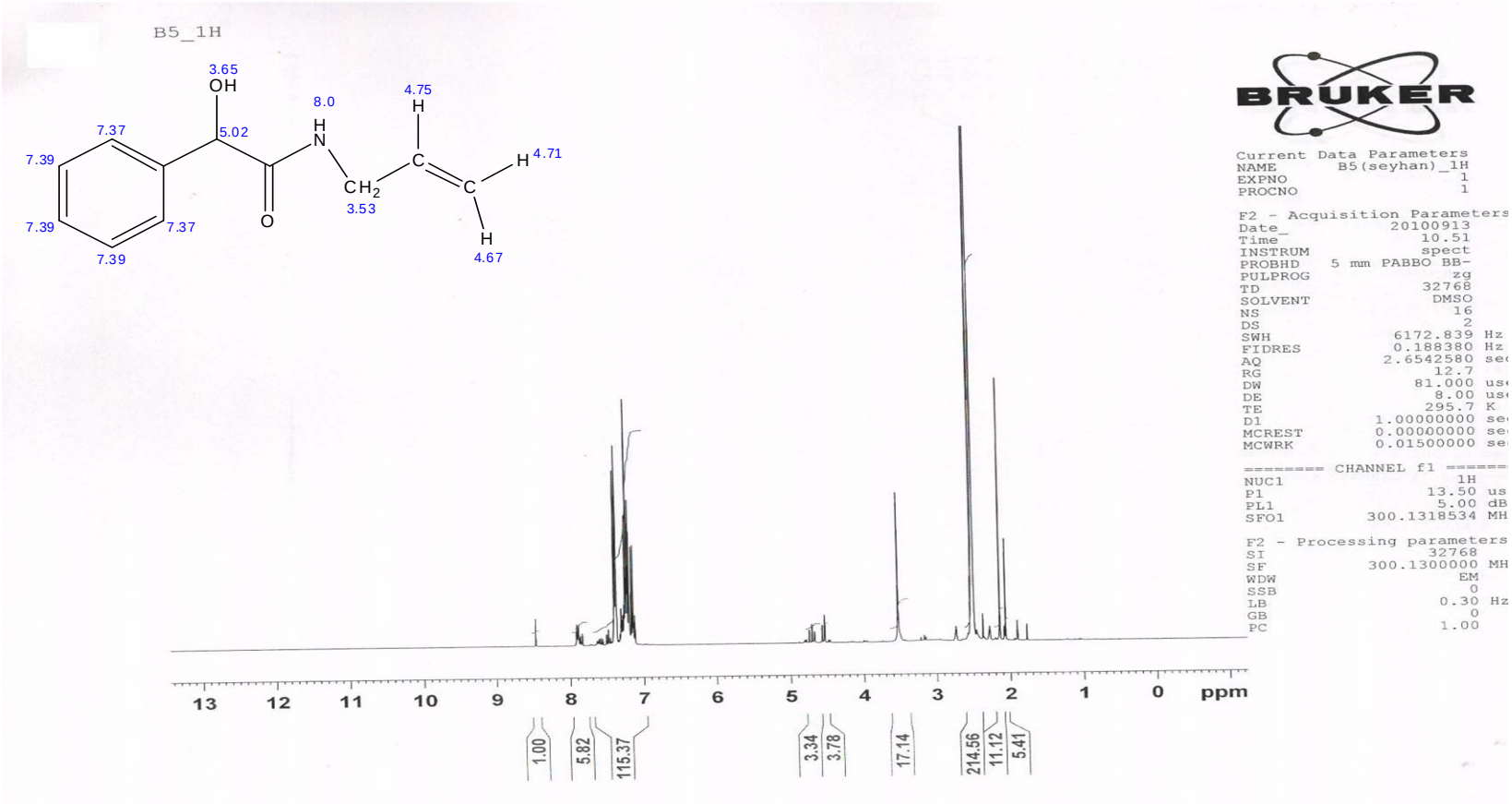
Ek 49. 2-hidroksi-N-metil-2-fenilasetamid'in ^{1}H NMR spektrumu.



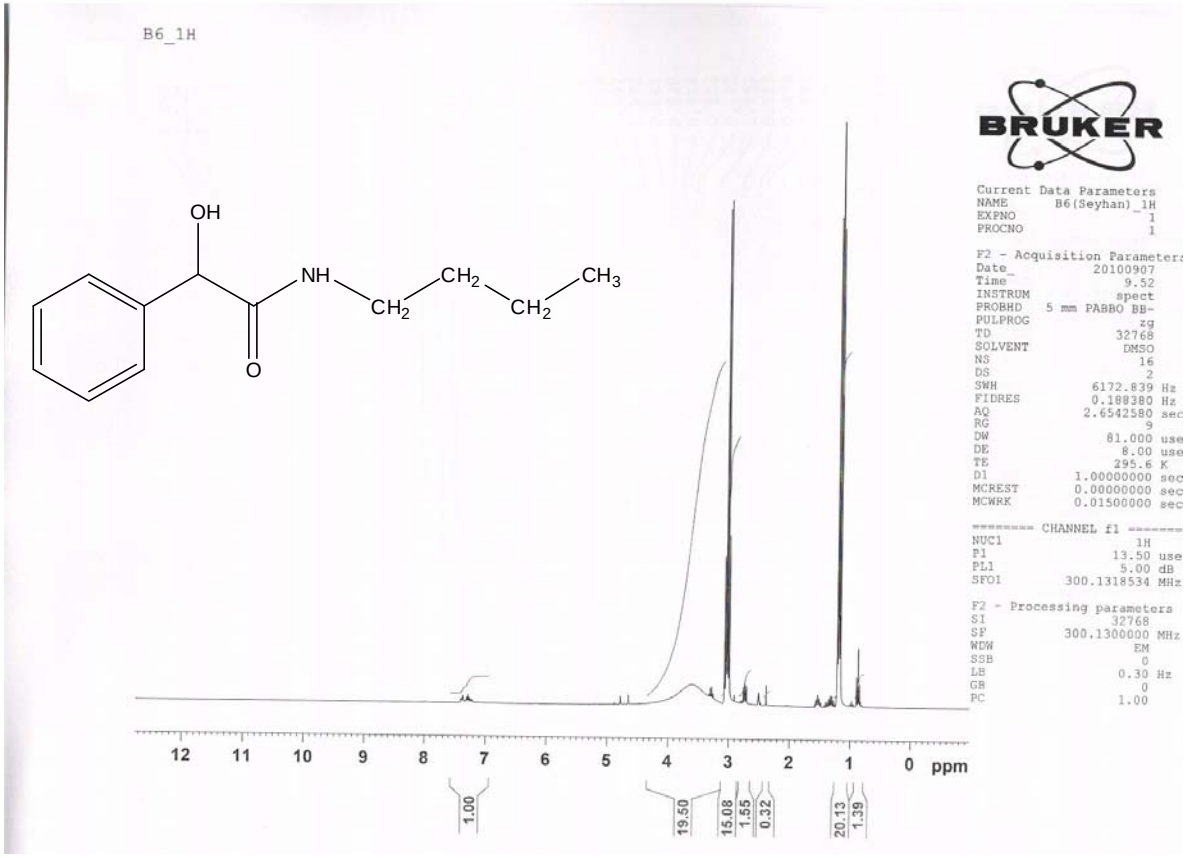
Ek 50. 2-hidroksi-N-etil-2-fenilasetamid'in ^{1}H NMR spektrumu.



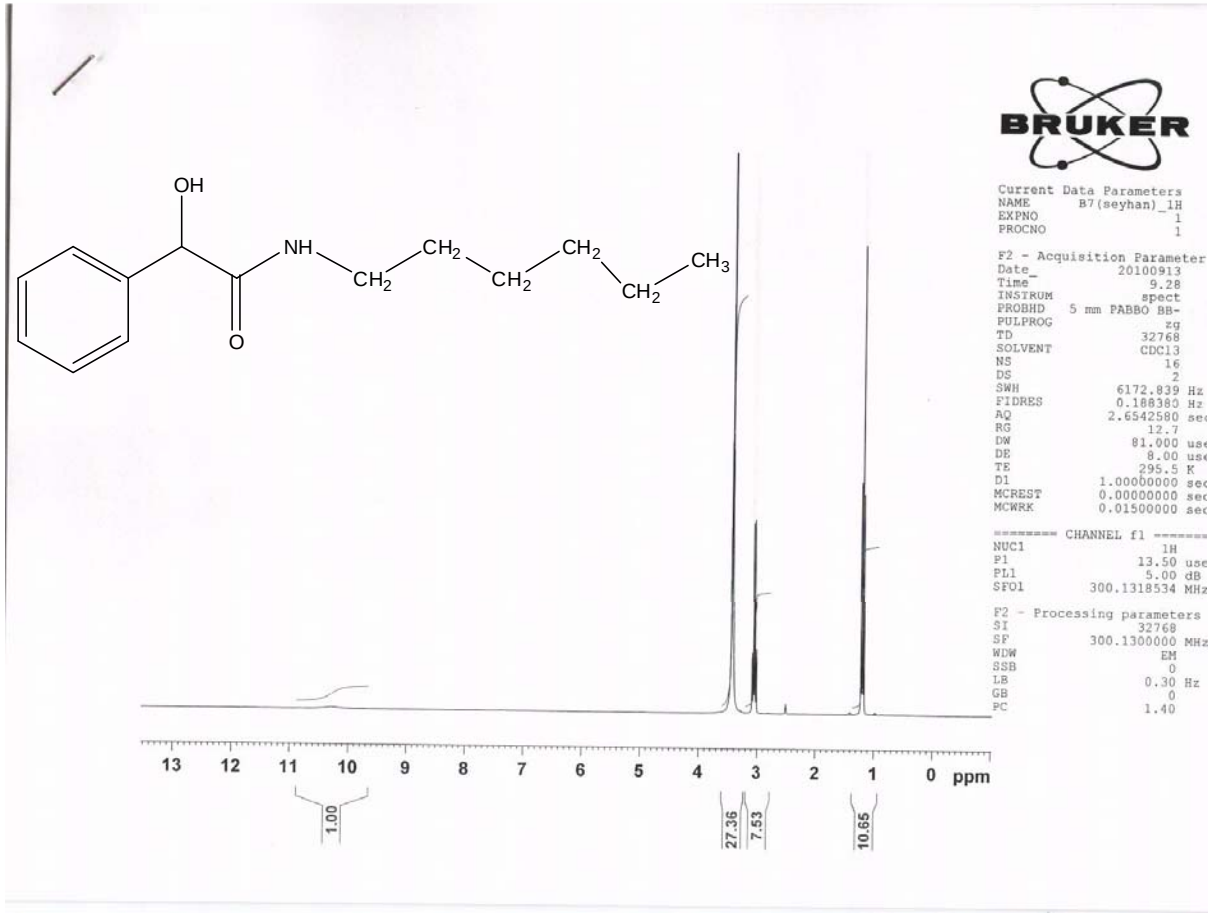
Ek 51. 2-hidroksi-N-propil-2-fenilasetamid'in ^{1}H NMR spektrumu.



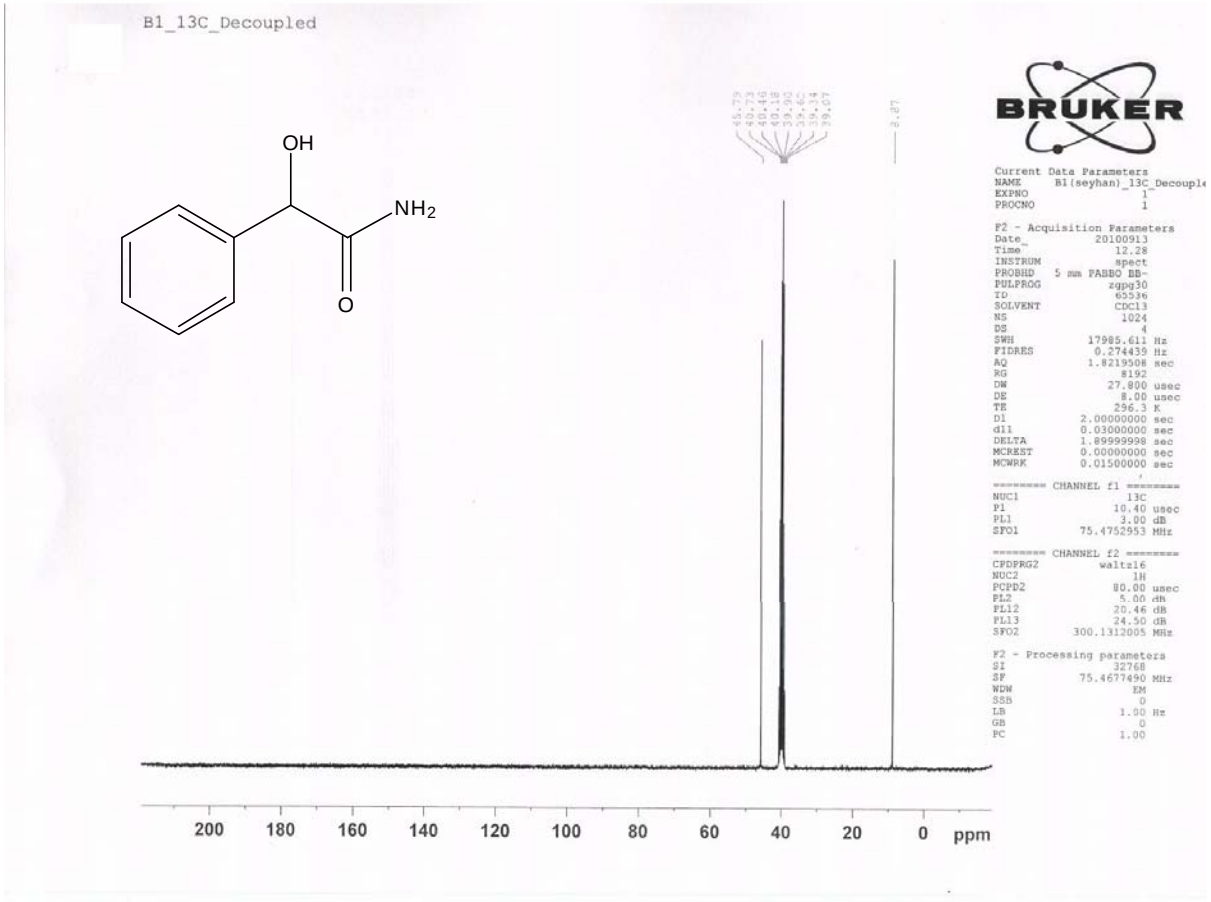
Ek 52. 2-hidroksi-N-allil-2-fenilasetamid'in ^{1}H NMR spektrumu.



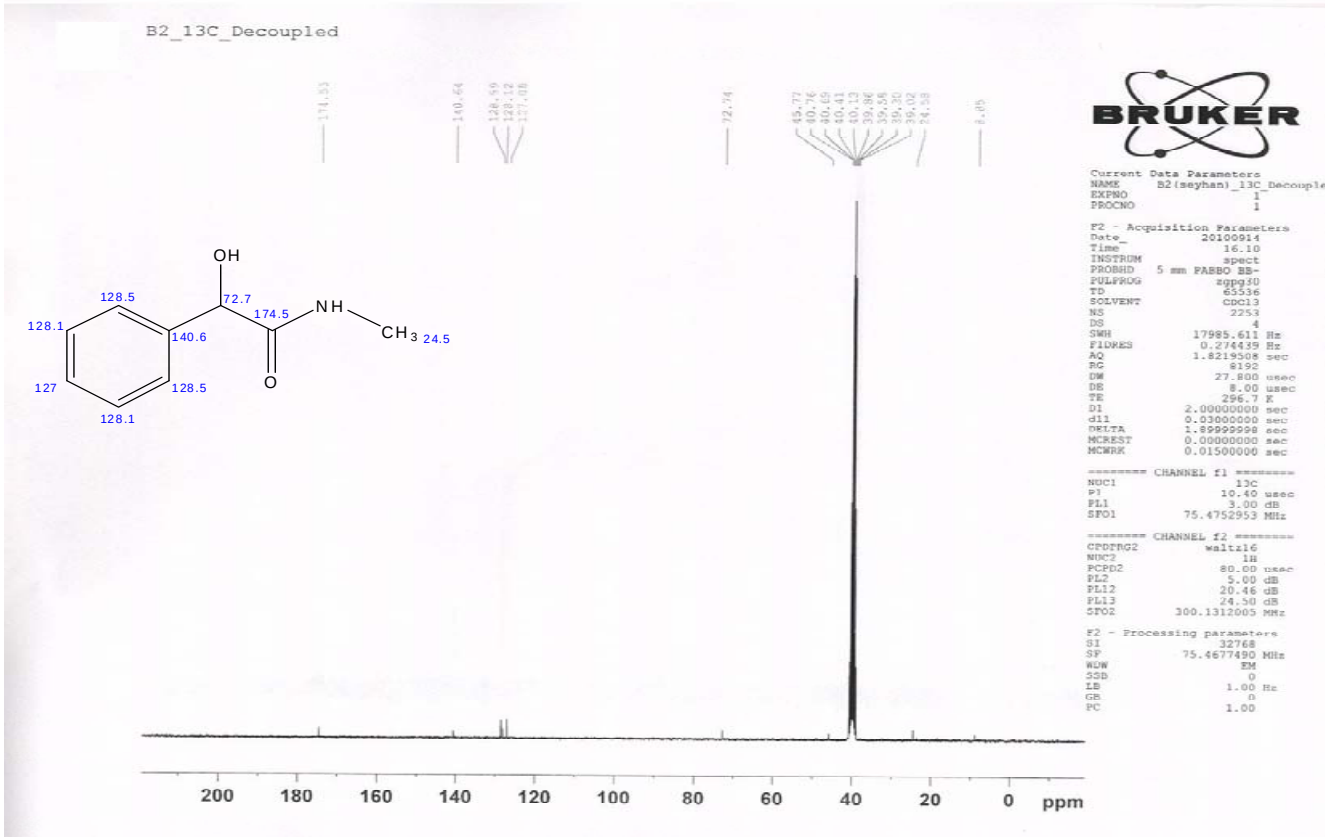
Ek 53. 2-hidroksi-N-butil-2-fenilasetamid'in ^{1}H NMR spektrumu.



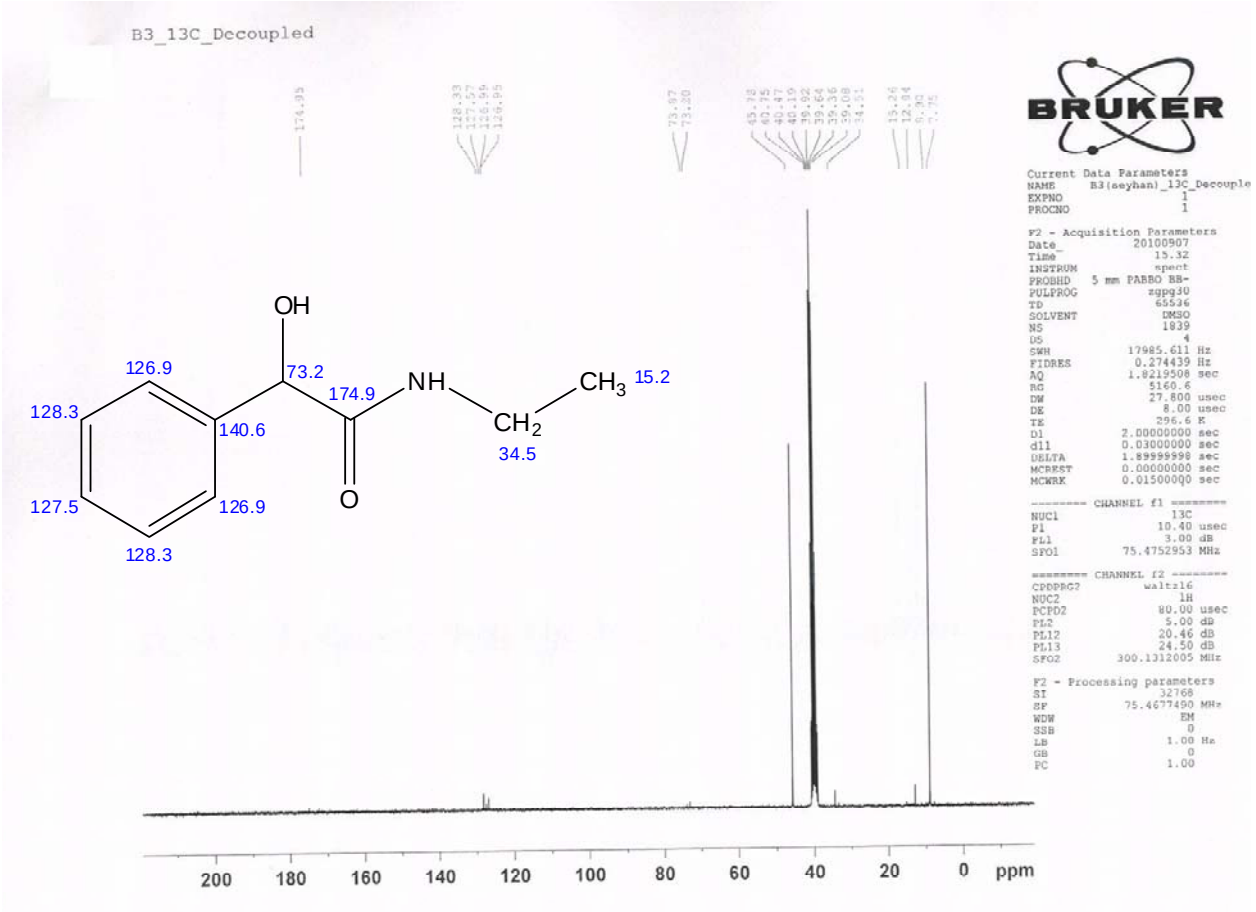
Ek 54. 2-hidroksi-N-butil-2-fenilasetamid'in ^{1}H NMR spektrumu.



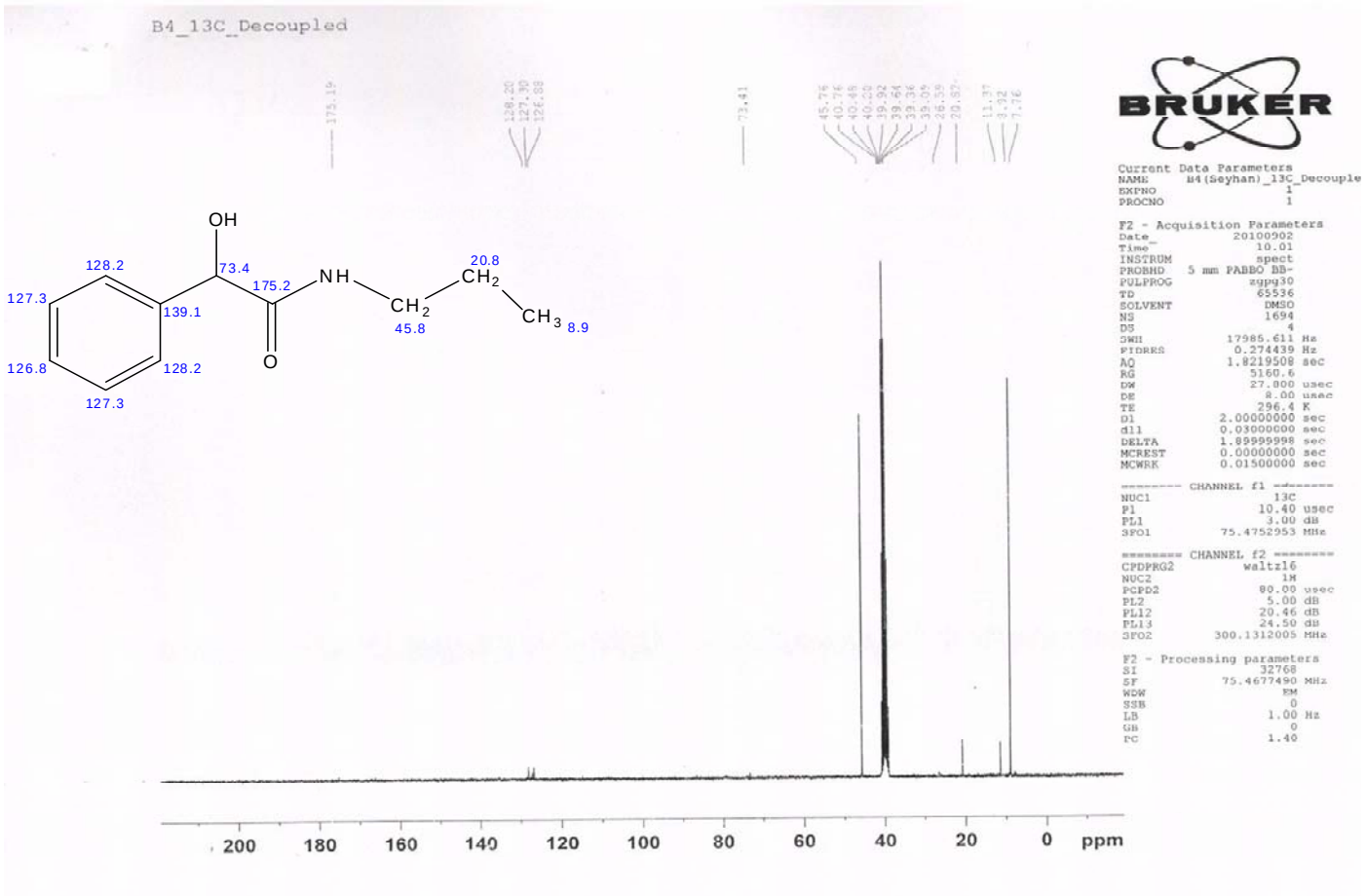
Ek 55.2-hidroksi-2-fenilasetamid'in ^{13}C NMR spektrumu.



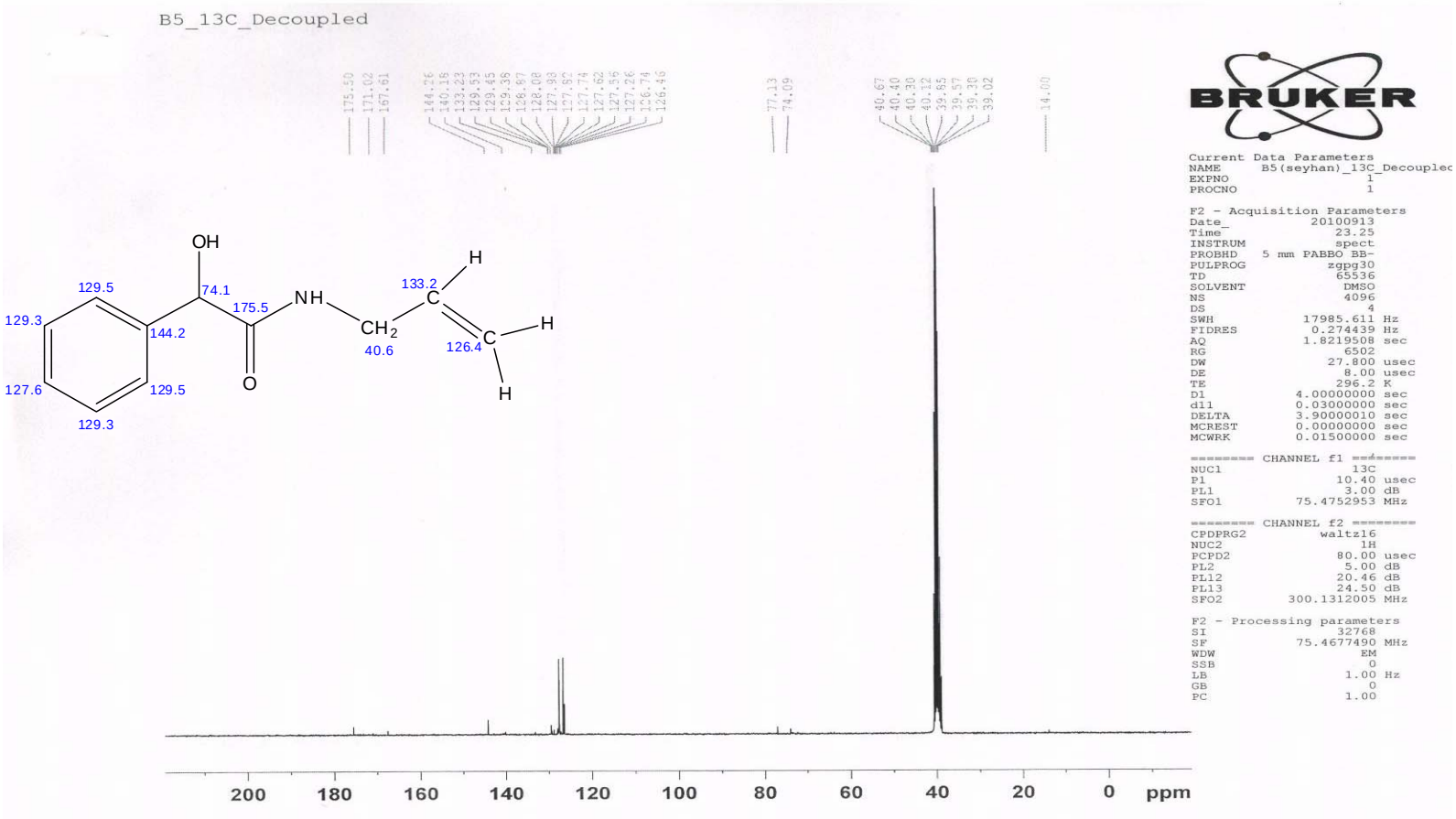
Ek 56.2-hidroksi-N-metil-2-fenilasetamid'in ^{13}C NMR spektrumu.



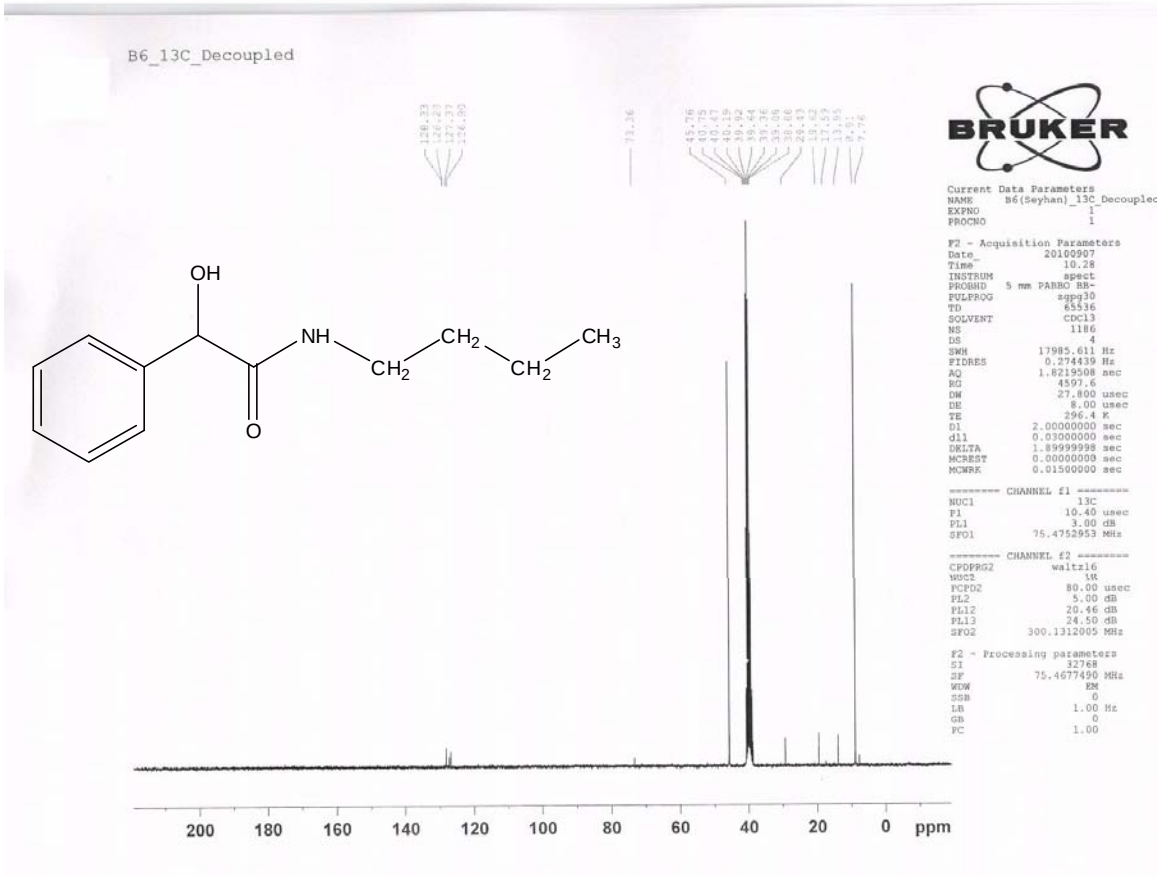
Ek 57.2-hidroksi-N-etil-2-fenilasetamid'in ^{13}C NMR spektrumu.



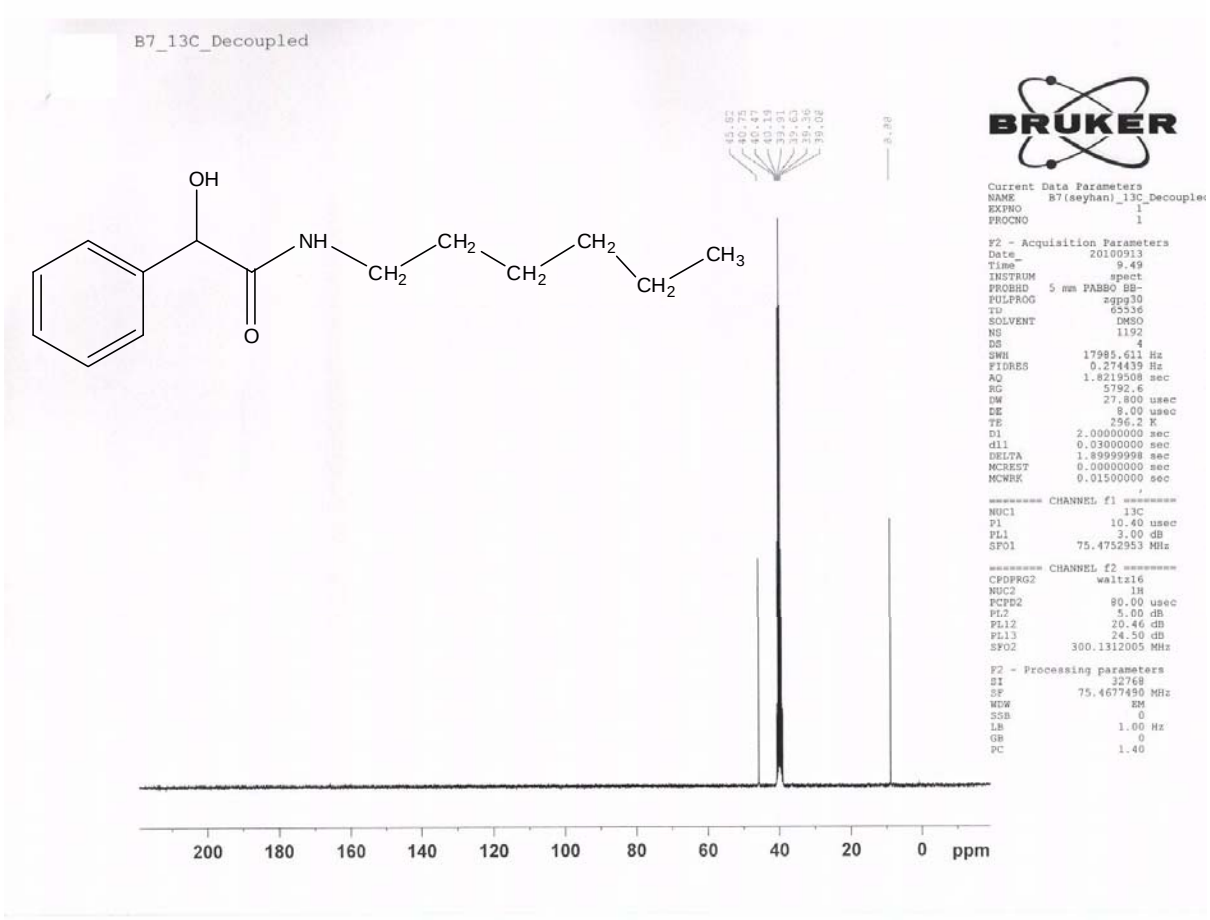
Ek 58.2-hidroksi-N-propil-2-fenilasetamid'in ^{13}C NMR spektrumu.



Ek 59. 2-hidroksi-N-allil-2-fenilasetamid'in ^{13}C NMR spektrumu.



Ek 60. 2-hidroksi-N-butil-2-fenilasetamid'in ^{13}C NMR spektrumu.



Ek 61. 2-hidroksi-N-hekzil-2-fenilasetamid'in ^{13}C NMR spektrumu.