

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MANYETİK Fe₃O₄ NANOPARTİKÜLLERİNE *Candida rugosa* LİPAZ ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU ve
RASEMİK ORGANİK ASİT ESTERLERİNİN
ENANTİYOSEÇİMLİ HİDROLİZİ**

Reşit ÇAKMAK

**DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

DİYARBAKIR

Şubat 2015

T.C
DİCLE UNIVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DIYARBAKIR

Reşit ÇAKMAK tarafından yapılan “Manyetik Fe₃O₄ Nanopartiküllerine *Candida rugosa* Lipaz Enziminin İmmobilizasyonu ve Bazı Rasemik Organik Asit Esterlerinin Enantiyoseçimli Hidrolizi” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir

Jüri Üyesinin

Ünvanı Adı Soyadı

Başkan: Prof. Dr. Halil HOŞGÖREN

Üye: Prof. Dr. Giray TOPAL (Danışman)

Üye: Prof. Dr. Ümit ÇAKIR

Üye: Prof. Dr. Mehmet KARAKAPLAN

Üye: Prof. Dr. Zübeyde BAYSAL

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 27/02/2015

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../...../2015

Doç.Dr. Mehmet YILDIRIM

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

(MÜHÜR)

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca, deneyim ve önerilerine ihtiyaç duyduğum her anda yanımda olan ilgi ve desteğini benden esirgemeyen, Danışman hocam Sayın Prof. Dr. Giray TOPAL'a saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tez izleme Komitesi (TİK) üyesi, Sayın Prof. Dr. Tahsin KILIÇOĞLU ve Sayın Doç. Dr. Mehmet KARAKAPLAN'a ilgi ve yardımlarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Tezin deneysel kısmında büyük yardımlarını gördüğüm, sonsuz bir sabırla her soruma ve sorunuma çare olan sevgili arkadaşım Öğr. Gör. Dr. Ercan ÇINAR'a çok teşekkür ederim. Ayrıca, Yrd. Doç. Dr. Murat SÜNKÜR, Doktora öğrencisi Murat AZİZOĞLU, Dr. Cezmi KAYAN, Okt.İhsan PLATİN ve Yrd. Doç. Dr. Musa KILIÇ'a çok teşekkür ederim.

Tezin yazım aşamasındaki yardımlarından dolayı Batman Üniversitesi Sağlık Yüksek Okulu Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Selami ERCAN, Doktora öğrencisi Önder AKSOY ve Yüksek Lisans öğrencileri Erdal ERTAŞ ve Muhammed ACAR'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamın son kısmında yorumları ve önerileri ile çalışmama ışık tutan Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Serpil TAKAÇ'a çok teşekkür ederim.

Laboratuvar imkânı sağladığı için Batman Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi ve Dicle Üniversitesi Ziya Gökalp Eğitim Fakültesi Dekanlığına çok teşekkür ederim. Ayrıca, analiz çalışmaları esnasında yardımlarını esirgemeyen bütün DÜBTAM ekibine ve ismini yazamadığım arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Beni ben yapan sevgili annem Hamdiye ÇAKMAK, sevgili babam İzzeddin ÇAKMAK, abim Şefik ÇAKMAK, kardeşim Selma ÇAKMAK ve ailemin diğer bütün üyelerine ve son üyesi Heja Zin ÇAKMAK'a sevgilerimi sunarım.

Ve doğumuyla beni inanılmaz mutlu eden biricik oğlum Emir Berken ÇAKMAK'a ve sabrı, ilgisi ve desteğinden dolayı sevgili eşim Hatice GÜNEŞ ÇAKMAK'a özel sevgilerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
KISALTMA VE SİMGELER.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kiralite, Kiral Bileşikler ve Kiralitenin Biyolojik Açıdan Önemi.....	4
1.1.1. Stereokimyasal Terimler ve Kavramlar.....	4
1.1.2. Enantiyomerler.....	5
1.1.3. Düzlem Polarize Işık ve Optikçe Aktivlik.....	7
1.1.4. Mutlak Konfigürasyon ve Fischer İzdüşüm Formülleri.....	7
1.1.5. Enantiyomerlerin Adlandırılması.....	9
1.1.6. Diastereomerler	11
1.1.7. Mezo Yapısı	13
1.1.8. Rasemik Karışımlar	13
1.2. Kiral Seçicilik ve Kiral Tanıma Mekanizması	14
1.3. Biyolojik Sistemler Üzerinde Kiralitenin Etkisi	15
1.4. Farmakolojik Etkinlikleri Yönünden Enantiyomerler.....	16
1.5. Pestisitler, Herbisitler ve İnsektisitler.....	20
1.6. Enantiyomerlerin Farklı Kokular Vermeleri.....	21
1.7. Enantiyomerlerin Farklı Davranışlar Göstermeleri.....	22
1.8. Kiral Havuz.....	23
1.9. Optikçe Saf Bileşikleri Sentezlenme Yöntemleri.....	24
1.9.1. Rasemik Karışımların Rezolüsyonu.....	24

1.9.1.1.	Tercihli Kristalizasyon.....	26
1.9.1.2.	Diastereomerik Tuzların Kristalizasyonu.....	26
1.9.1.3.	Rasemik Bileşiklerin Kinetik Rezolüsyonu.....	27
1.9.1.4.	Kromatografi.....	29
2.	KAYNAK ÖZETLERİ.....	31
2.1.	Enzimler ve Genel Özellikleri.....	31
2.1.1.	Lipaz Enzimleri (Triaçilgliserol Ester Hidrolaz, EC 3.1.1.3).....	33
2.1.1.1.	Ara Yüzeysel Aktivasyon.....	36
2.1.2.	CRL ve Kullanım Alanları.....	38
2.1.3.	Enzim İmmobilizasyonu.....	39
2.1.3.1.	İmmobilize Enzim Olgusunun Doğuşu.....	39
2.1.3.2.	Enzimlerin İmmobilizasyonu.....	40
2.1.3.3.	İmmobilize Enzimlerin Üstünlükleri.....	41
2.1.4.	Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılan Destek Maddeler.....	43
2.1.5.	Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri.....	43
2.1.5.1.	Kovalent Bağlanma Metodu İle Enzim İmmobilizasyonu.....	46
2.1.5.2.	Kovalent Bağlama Yönteminin Avantajlı ve Dezavantajlı Yönleri.....	49
2.2.	Nano, Nanoteknoloji ve Nanopartikül.....	50
2.2.1.	Demir Oksit Bileşiklerinin Yapısı ve Özellikleri.....	52
2.2.2.	Nanopartiküllerin Hazırlanma Yöntemleri.....	52
2.2.3.	Demir Oksit Nanopartiküllerin Kullanım Alanları.....	55
2.3.	Steroid Olmayan Antiinflamatuvar İlaçlar (NSAİİ).....	55
2.3.1.	İbuprofen.....	56
2.3.2.	Naproksen.....	57
2.3.3.	Mandelik Asit.....	59
3.	MATERYAL VE METOT.....	63
3.1.	Materyal.....	63
3.1.1.	Kullanılan Alet ve Cihazlar.....	63
3.1.2.	Kullanılan Kimyasal ve Biyokimyasal Maddeler.....	65

3.2.	Metot.....	66
3.2.1.	Manyetik Fe ₃ O ₄ Nanopartiküllerinin Hazırlanması.....	69
3.2.2.	Fe ₃ O ₄ @APTES=GA'nın Hazırlanması ve CRL'nin İmmobilizasyonu....	71
3.2.2.1.	Fe ₃ O ₄ @3-APTES'in Hazırlanması	71
3.2.2.2.	Fe ₃ O ₄ @APTES=GA'nın Hazırlanması.....	72
3.2.2.3.	Fe ₃ O ₄ @APTES=GA'ya CRL'nin İmmobilizasyonu.....	75
3.2.3.	Fe ₃ O ₄ @EP'nin Hazırlanması ve CRL'nin İmmobilizasyonu.....	76
3.2.3.1.	Fe ₃ O ₄ @EP'nin Hazırlanması.....	76
3.2.3.2.	CRL'nin Fe ₃ O ₄ @EP'ye Kovalent İmmobilizasyonu.....	77
3.2.4.	Serbest ve İmmobilize Lipazların Aktiviteleri.....	77
3.2.5.	Serbest ve İmmobilize Lipazların Optimum pH'ları.....	78
3.2.6.	Serbest ve İmmobilize Lipazların Optimum Sıcaklıkları.....	78
3.2.7.	Serbest ve İmmobilize Lipazların Termal Kararlılıkları.....	79
3.2.8.	Serbest ve İmmobilize Lipazların Depolama Kararlılıkları.....	79
3.2.9.	İmmobilize Lipazların Tekrar Kullanılabilirlikleri.....	79
3.3.	İmmobilize Lipazların Hidroliz Çalışmaları.....	80
3.3.1.	Rasemik Ibuprofen Ester'inin Hidroliz Çalışmaları.....	80
3.3.1.1.	Rasemik Ibuprofen Ester'inin Sentezlenmesi.....	80
3.3.1.2.	İmmobilize Lipazlar ile Rasemik Ibuprofen Metil Ester'inin Hidrolizi.....	83
3.3.2.	Rasemik Naproksen Ester'inin Hidroliz Çalışmaları.....	85
3.3.2.1.	Rasemik Naproksen Ester'inin Sentezlenmesi.....	85
3.3.2.2.	İmmobilize Lipazlar ile Rasemik Naproksen Ester'inin Hidrolizi.....	88
3.3.3.	Rasemik Bütıl Mandelat Ester'inin Hidroliz Çalışmaları.....	89
3.3.3.1.	Rasemik Bütıl Mandelat Ester'inin Sentezi.....	89
3.3.3.2.	İmmobilize Lipazlar ile Rasemik Bütıl Mandelat'ın Hidrolizi.....	91
3.4.	Dönüşüm ve Enantiyoseçimliliğin Hesaplanması.....	93
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA.....	95
4.1.	Manyetik Fe ₃ O ₄ Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu....	95
4.2.	Modifiye Nanopartiküllere CRL'nin Kovalent İmmobilizasyonu.....	103

4.3.	Serbest ve İmmobilize Lipazların Yüksek Aktivite Gösterdiği Şartlar....	107
4.3.1.	Serbest ve İmmobilize Lipazların Aktivitelerine pH'ın Etkisi.....	107
4.3.2.	Serbest ve İmmobilize Lipazların Aktivitelerine Sıcaklığın Etkisi.....	108
4.3.3.	Serbest ve İmmobilize Lipazların Termal Kararlılıkları.....	109
4.3.4.	İmmobilize Lipazların Tekrar Kullanılabilirlikleri.....	111
4.3.5.	İmmobilize Lipazların Depolama Kararlılıkları.....	112
4.4.	(<i>S</i>)-(+)-Ibuprofen, (<i>S</i>)-(+)-Naproksen ve (<i>R</i>)-(-)-Mandelik Asit Üretimi...	113
4.4.1.	Enantiyomerik Safılıkta (<i>S</i>)-(+)-Ibuprofen Üretimi.....	116
4.4.2.	Enantiyomerik Safılıkta (<i>S</i>)-(+)-Naproksen Üretimi.....	117
4.4.3.	Enantiyomerik Safılıkta (<i>R</i>)-(-)-Mandelik Asit Üretimi.....	118
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	123
5.1.	Sonuçlar.....	123
5.2.	Öneriler.....	125
6.	KAYNAKLAR	127
	ÖZGEÇMİŞ	144

ÖZET

MANYETİK Fe₃O₄ NANOPARTİKÜLLERİNE *Candida rugosa* LİPAZ ENZİMİNİN
İMMOBİLİZASYONU ve RASEMİK ORGANİK ASİT ESTERLERİNİN
ENANTİYOSEÇİMLİ HİDROLİZİ

DOKTORA TEZİ

REŞİT ÇAKMAK

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

2015

Enantiyomerlerin farklı biyolojik aktivite göstermelerinden dolayı, farklı yöntemler kullanılarak enantiyomerikçe saf bileşiklerin elde edilmesi, başta ilaç endüstrisi olmak üzere zirai kimyasallar, gıda ve parfüm endüstrisi için oldukça önemlidir. Lipaz enzimleri, rasemik bileşiklerin rezolüsyonunda yüksek enantiyoseçicilik sağlamaları, kofaktöre ihtiyaç duymamaları, geniş substrat spesifikliği ve kiral tanıma yeteneğine sahip olmaları nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Saf enzim fiyatlarının pahalı oluşu, enzim saflaştırma işlemlerinin uzun zaman alması ve maliyet gerektiren bir işlem olması nedeniyle çalışmalarda, serbest enzim yerine immobilize enzimler kullanılmaktadır. Günümüzde, reaksiyon verimi yüksek ve düşük maliyetli çalışmalar yaparak saf ilaç etken maddelerinin üretimine yönelik araştırmaların devam ettiği bilinmektedir. Bu yüzden, bu araştırmalara katkı sunmak amacıyla bu çalışma doktora tezi olarak hazırlandı.

Bu çalışma üç bölümden oluşmaktadır. Birinci bölümde, manyetik Fe₃O₄ nanopartikülleri hazırlandı. Hazırlanan nanopartiküllere, enzimi immobilize etmek için iki farklı organik uzatma kolu takıldı. Birinci organik uzatma kolu için (3-aminopropil) trietoksisilan ve glutaraldehit kullanıldı. İkinci organik uzatma kolu için rasemik epiklorhidrin kullanıldı. Hazırlanan manyetik nanopartikül ve organik uzatma kollarına sahip manyetik nanopartiküllerin yapılarının aydınlatılması için SEM, XRD, TGA ve FT-IR kullanıldı. İkinci bölümde, organik uzatma kollarına sahip partiküllere kovalent bağlanma metoduna göre CRL immobilize edildi. Ardından; serbest ve immobilize enzimlerin: enzimatik aktiviteleri, optimum pH'ları, optimum sıcaklıkları, termal kararlılıkları ve depolama kararlılıkları belirlendi. Ayrıca, immobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirlikleri de belirlendi. Üçüncü bölümde, immobilize enzimler kullanılarak, rasemik bütil Mandelat esteri, rasemik İbuprofen metil esteri ve rasemik Naproksen metil esterinin enantiyoselektif hidroliz çalışmaları yapıldı. Hidroliz tepkimesi sonucu verim hesabı yapılarak, çalışmanın başarısı değerlendirildi.

Anahtar Kelimeler: Nanopartiküller, *Candida rugosa* lipaz, enantiyoselektif hidroliz

ABSTRACT

IMMOBILIZATION OF LIPASE FROM *Candida rugosa* ON MAGNETIC Fe₃O₄ NANOPARTICLES AND ENANTIOSELECTIVE HYDROLYSIS OF THE RACEMIC ORGANIC ACID ESTERS

PhD THESIS

REŞİT ÇAKMAK

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

2015

Since enantiomers show different biological activities, obtaining enantiomerically pure compounds using different methods is extremely important for especially pharmaceutical industry, agricultural chemicals, food and perfume industry. Lipase enzymes are widely used due to the fact that they provide high enantioselectivity for resolution of the racemic compounds, and they have wide substrate specificity and ability to recognize chirality, while do not need co-factor. Because of the fact that pure enzymes are expensive and that enzyme purification process takes a long time and that it is a process requiring high cost, immobilized enzymes are used instead of free enzymes. It is known that researches regarding with production of pure drug active compounds still continue carrying out reaction yielding high and economically low cost studies. Therefore, this study has been prepared as PhD dissertation so as to provide contribution to the issue.

This study consists of three parts. In the first part; magnetic Fe₃O₄ nanoparticles were prepared. These nanoparticles were attached the two different spacer arms to immobilize enzyme. For the first spacer arm, 3-Aminopropyl triethoxysilane and Glutaraldehyde were used. For the second spacer arm, racemic Epichlorohydrin was used. In order to characterize the magnetic nanoparticles structures having prepared nanoparticles and organic spacer arms, SEM, XRD, TGA and FT-IR were used. In the second part, CRL was immobilized to the particles possessing organic spacer arms in accordance with covalent connection method. Afterwards, enzymatic activities, optimum pHs, optimum temperatures, thermal stabilizations and storage stability of free and immobilized enzymes were determined. Furthermore, reusability of the immobilized enzymes was determined. In the third part, using immobilized enzymes, enantioselective hydrolysis studies of racemic butyl Mandelate ester, racemic Ibuprofen methyl ester and Naproxen methyl ester were carried out. The success of the study was evaluated by carrying out the yield calculation in the end of hydrolysis reaction.

Keywords: Nanoparticles, *Candida rugosa* lipase, enantioselective hydrolysis

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>		<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1.	(<i>R</i>)-(-)-2-Bütanol ve (<i>S</i>)-(+)-2-Bütanol'ün fiziksel özellikleri.....	6
Çizelge 2.1.	İmmobilize enzimler ile serbest enzimlerin karşılaştırılması.....	41
Çizelge 3.1.	Çalışmada kullanılan cihazlar.....	64
Çizelge 3.2.	Çalışmalarda kullanılan kimyasal ve biyokimyasal maddeler.....	65
Çizelge 4.1.	Optimum reaksiyon şartlarında serbest ve immobilize lipazların enziminin aktivitesi.....	106
Çizelge 4.2.	Substratların hidroliz çalışmalarında kullanılan optimum şartlar....	115
Çizelge 4.3.	Rasemik İbuprofen metil esterinin hidroliz çalışmaları ile ilgili sonuçlar.....	116
Çizelge 4.4.	Rasemik Naproksen metil esterinin hidroliz çalışmaları ile ilgili sonuçlar.....	117
Çizelge 4.5.	Rasemik Bütıl Mandelat'ın hidroliz çalışmaları ile ilgili sonuçlar.....	118

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1.	İzomerlerin sınıflandırılması.....	4
Şekil 1.2.	Stereoizomer bileşikler (a: cis izomer; b: trans izomer).....	5
Şekil 1.3.	2-Bütanol'ün enantiyomerleri (a: (R)-(-)-2-Bütanol; (S)-(+)-2-Bütanol).....	6
Şekil 1.4.	Laktik asit enantiyomerleri (a: L-(+)-Laktik Asit; b: D-(-)-Laktik Asit).....	8
Şekil 1.5.	D-(+)-Gliseraldehit.....	9
Şekil 1.6.	Fischer'e göre çizilen D-(+)-Glukoz'un yapısı.....	9
Şekil 1.7.	Cahn-İngold-Prelog sisteminin şekilsel gösterimi.....	10
Şekil 1.8.	(R)-(-)-2-Fenilglisin.....	11
Şekil 1.9.	Treonin'in Stereoizomerleri.....	12
Şekil 1.10.	Tartarik Asit (a: (+)-Tartarik Asit; b: (-)-Tartarik Asit; c ve d: Mezo-Tartarik Asit.....	13
Şekil 1.11.	(±)-3-Metil-2-Bütanol'ün oluşumu.....	14
Şekil 1.12.	Anahtar-Kilit Modeli.....	15
Şekil 1.13.	a: (S)-(-)-Propranolol; b: Noradrenalin.....	17
Şekil 1.14.	a: (R)-(+)-Talidomit; b: (S)-(-)-Talidomit.....	17
Şekil 1.15.	(S)-(-)-Talidomit'in teratojenik etkisi nedeniyle meydana gelen Doğum Anomalisi.....	18
Şekil 1.16.	a: (S)-(+)-Ketamin; b: (R)-(-)-Ketamin.....	18
Şekil 1.17.	a: (2R,3S)-(+)-Dekstropoksifen; b: (2S,3R)-(-)-Levopoksifen..	19
Şekil 1.18.	(R)-(-)-İndakrinon.....	19
Şekil 1.19.	İndol-3-Asetik Asit (IAA).....	20
Şekil 1.20.	(R)-(-)-Karbametamit.....	20
Şekil 1.21.	(αS, 2R, 3R)-Deltametrin.....	21
Şekil 1.22.	DDT.....	21
Şekil 1.23.	a: (S)-(-)-Limonen; b: (R)-(+)-Limonen.....	21
Şekil 1.24.	a: (R)-(-)-Karvon; b: (S)-(+)-Karvon.....	22
Şekil 1.25.	Üç Nokta Etkileşim Modeli.....	23

Şekil 1.26.	Saf enantiyomerlerin elde edilme yöntemleri.....	24
Şekil 1.27.	Optikçe saf bileşiklerin sentezlenme yöntemleri	25
Şekil 1.28.	Kloramfenikol	26
Şekil 1.29.	α -Metil-L-Dopa.....	26
Şekil 1.30.	Katalitik kinetik rezolüsyon.....	28
Şekil 1.31.	Dinamik kinetik rezolüsyon.....	29
Şekil 2.1.	Triaçilgliserol'ün hidrolizi.....	35
Şekil 2.2.	Lipaz enzimlerinin katalizlediği tepkimeler.....	36
Şekil 2.3.	CRL enzimi.....	37
Şekil 2.4.	Aktif bölgenin ara yüzeyinde enzimin etkin hale dönüşmesi.....	38
Şekil 2.5.	Enantiyomerlerin lipazın aktif bölgesine bağlanmaları.....	39
Şekil 2.6.	Enzim immobilizasyon yöntemleri (Yılmaz 2010).....	45
Şekil 2.7.	Enzimin taşıyıcı desteğe kovalent immobilizasyonu: (a) aktif amino asit artığı; (b) taşıyıcı desteğin fonksiyonel bağ yapacak grubu; (c) taşıyıcı destek maddesi; (d) organik uzatma kolu.....	47
Şekil 2.8.	Gözenekli destek maddesinin iç ve dış yüzeyi.....	48
Şekil 2.9.	Enzim ve gözenek büyüklüğü arasındaki ilişki (Cao 2005).....	48
Şekil 2.10.	Enzimin taşıyıcı destek maddesine doğrudan (a), organik uzatma kolu ile (b), dallanmış organik uzatma kolu ile (c) ve yüklü uzatma kolu (d) üzerinden immobilizasyonu (Cao 2005).....	49
Şekil 3.1.	Standart BSA grafiği.....	68
Şekil 3.2.	Standart <i>p</i> -Nitrofenol grafiği.....	69
Şekil 3.3.	Manyetik Fe ₃ O ₄ partiküllerin hazırlanması (I), Fe ₃ O ₄ @3-APTES'in hazırlanması (II), Fe ₃ O ₄ @3- APTES=GA'nın hazırlanması (II), Fe ₃ O ₄ @3- APTES=GA-CRL'nin hazırlanması (IV)	70
Şekil 3.4	Ninhidrinin ile R-NH ₂ grubu arasındaki reaksiyon	72
Şekil 3.5.	Standart 3-Aptes grafiği.....	73
Şekil 3.6.	Standart GA grafiği.....	74
Şekil 3.7.	Soldan sağa doğru Fe ₃ O ₄ @3-APTES, Fe ₃ O ₄ @3-APTES=GA ve körün Ninhidrinin ile etkileşmesi sonucu oluşan mor renkli kompleks.....	75
Şekil 3.8.	Manyetik Fe ₃ O ₄ partiküllerin hazırlanması (I), Fe ₃ O ₄ @EP'nin hazırlanması (II), Fe ₃ O ₄ @EP-CRL'nin hazırlanması (III).....	76

Şekil 3.9.	$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{EP}$ 'nin Sodyum tiyosülfat ile reaksiyonu.....	77
Şekil 3.10.	CRL tarafından katalizlenmiş <i>p</i> -nitrofenilpalmitat'ın hidrolizi.....	78
Şekil 3.11.	(<i>S</i>)-(+)-Ibuprofen'in rasemleştirilmesi (I), rasemik Ibuprofen metil esterinin sentezlenmesi (II), rasemik Ibuprofen metil esterinin enantiyoselektif hidrolizi (III)	81
Şekil 3.12.	Rasemik Ibuprofen metil esterinin ^1H -NMR spektrumu.....	82
Şekil 3.13.	Rasemik Ibuprofen metil esterinin ^{13}C -NMR spektrumu.....	83
Şekil 3.14.	İnkübasyonun hemen ardından immobilize enzimlerin ortamdan uzaklaştırılması.....	84
Şekil 3.15.	(<i>S</i>)-(+)-Naproksen'in rasemleştirilmesi (I), rasemik Naproksen metil esterinin sentezlenmesi (II) ve rasemik Naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizi (III).....	86
Şekil 3.16.	Rasemik Naproksen Metil Ester'inin ^1H -NMR spektrumu.....	87
Şekil 3.17.	Rasemik Naproksen Metil Ester'inin ^{13}C -NMR spektrumu.....	88
Şekil 3.18.	Rasemik Bütil Mandelat'ın sentezi (I) ve enantiyoseçimli hidrolizi (II)	92
Şekil 3.19.	Rasemik Bütil Mandelat'ın ^1H -NMR spektrumu.....	90
Şekil 3.20.	Rasemik Bütil Mandelat'ın ^{13}C -NMR spektrumu.....	91
Şekil 4.1.	Manyetik Fe_3O_4 nanopartiküllerin X-ray diffractometer spektrumu...	96
Şekil 4.2.	X-ray spektrumunda piklerin görüldüğü bölgelere ait 2θ değerleri...	96
Şekil 4.3.	Manyetik Fe_3O_4 nanopartiküllerine ait FT-IR spektrumu.....	97
Şekil 4.4.	Manyetik $\text{Fe}_3\text{O}_4@3\text{-APTES}$ 'e ait FT-IR spektrumu.....	97
Şekil 4.5.	Manyetik $\text{Fe}_3\text{O}_4@3\text{-APTES=GA}$ 'ya ait FT-IR spektrumu.....	98
Şekil 4.6.	Manyetik $\text{Fe}_3\text{O}_4@3\text{-APTES=GA-CRL}$ 'ye ait FT-IR spektrumu.....	98
Şekil 4.7.	$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{EP}$ 'ye ait FT-IR spektrumu.....	99
Şekil 4.8.	$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{EP-CRL}$ 'nin FT-IR spektrumu.....	99
Şekil 4.9.	Manyetik Fe_3O_4 nanopartiküllerinin termogramı.....	100
Şekil 4.10.	Manyetik $\text{Fe}_3\text{O}_4@3\text{-APTES=GA}$ 'nin termogramı.....	101
Şekil 4.11.	Manyetik Fe_3O_4 nanopartiküllerin SEM fotoğrafları (mag:8 000x)...	101
Şekil 4.12.	$\text{Fe}_3\text{O}_4@3\text{-APTES}$ 'in SEM fotoğrafı (mag:8 000x).....	102
Şekil 4.13.	$\text{Fe}_3\text{O}_4@3\text{-APTES=GA}$ 'nin SEM fotoğrafı (mag:2 000x).....	102
Şekil 4.14.	$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{EP}$ 'nin SEM fotoğrafı (mag:8 000x).....	103

Şekil 4.15.	Serbest lipaz (▲), Fe ₃ O ₄ @3-APTES=GA-CRL (◆) ve Fe ₃ O ₄ @EP-CRL (■).....	107
Şekil 4.16.	Serbest lipaz (▲), Fe ₃ O ₄ @3-APTES-GA-CRL(■) ve Fe ₃ O ₄ @EP-CRL (◆)	109
Şekil 4.17.	Serbest lipaz (▲), Fe ₃ O ₄ @3-APTES=GA-CRL (◆) ve Fe ₃ O ₄ @EP-CRL (■).....	110
Şekil 4.18.	Fe ₃ O ₄ @3-APTES=GA-CRL (◆) ve Fe ₃ O ₄ @EP-CRL (■).....	111
Şekil 4.19.	Fe ₃ O ₄ @3-APTES=GA-CRL (◆), Fe ₃ O ₄ @EP-CRL (■), serbest lipaz (▲).....	113
Şekil 4.20.	Substrata (a) ve ürüne (b) ait kromatogramlar.....	116
Şekil 4.21.	Substrata (a) ve ürüne (b) ait kromatogramlar.....	118
Şekil 4.22.	Substrata (a) ve ürüne (b) ait kromatogramlar.....	118
Şekil 4.23.	Rasemik Mandelik Asit'e ait kromatogram.....	119
Şekil 4.24.	Rasemik Mandelik asit + (S)-(+)-Mandelik asit çözeltisine ait kromatogram.....	120
Şekil 4.25.	Rasemik Mandelik asit + (R)-(-)-Mandelik asit çözeltisine ait kromatogram.....	120
Şekil 4.26.	Fe ₃ O ₄ @EP-CRL kullanılarak yapılan hidroliz tepkimesine ait kromatogram.....	121
Şekil 4.27.	Fe ₃ O ₄ @3-APTES=GA-CRL kullanılarak yapılan hidroliz tepkimesine ait kromatogram.....	121

KISALTMA VE SİMGELER

3-APTES	: 3-Aminopropiltrioksisilan
CRL	: <i>Candida rugosa</i> lipaz
EP	: Epiklorhidrin
GA	: Glutaraldehit
p-NPP	: <i>p</i> -Nitrofenil palmitat
C_R	: (<i>R</i>)-enantiyomerin derişimi
C_S	: (<i>S</i>)-enantiyomerin derişimi
E	: Enantiyomerik oran
ee_s	: Substrat enantiyomerik aşırılığı
ee_p	: Ürün enantiyomerik aşırılığı
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
NSAID	: NSAID Steroidal olmayan iltihap giderici ilaç (non-steroidal anti-inflammatory drug)
T	: Sıcaklık (°C)
U	: Aktivite
x	: Dönüşüm oranı
λ	: Dalga boyu (nm)
mL	: Mililitre
mg	: Miligram
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
XRD	: X-ray diffractometer
nm	: Nanometre
TGA	: Termal gravimetrik analiz
FT-IR	: Fourier transform infrared spektrofotometresi
UV-vis	: Ultraviyole/Mor ötesi görünür bölge absorpsiyon spektrofotometresi

1. GİRİŞ

Günümüzde farklı yöntemler kullanılarak, yüksek enantiyomerik saflıkta bileşiklerin elde edilmesi, başta ilaç endüstrisi olmak üzere, insektisit, herbisit ve fungisit gibi zirai kimyasallar ile gıda ve parfüm endüstrisi için oldukça önemlidir. Yüksek enantiyomerik saflıkta bileşiklere olan ilginin artmasının en önemli nedeni, enantiyomerlerin farklı biyolojik aktivite göstermeleridir. Enantiyomerlerin farklı biyolojik aktivite göstermelerinden dolayı, ilaçlarda sadece bir enantiyomer istenen aktiviteyi sağlar ve bu nedenle bu enantiyomer farmakolojik açıdan önemlidir. Diğer enantiyomer ise biyolojik aktivite göstermez ve safsızlık olarak nitelendirilir. Aynı zamanda bu enantiyomer yan ve toksik etki gösterebilir ya da diğer enantiyomerin etkisini azaltacak yönde etki gösterebilir. Bu gibi nedenlerden dolayı, enantiyomerlerin saflaştırılması özellikle ilaç endüstrisi için büyük öneme sahiptir. İlaç etken maddesinde istenmeyen enantiyomerin % 0.1 seviyesine düşürülmesi istenir. Çünkü ilaç olarak kullanılabilen aktif enantiyomeri saflaştırmak, diğer enantiyomerin hastada oluşturduğu olumsuz etkileri engellemek açısından büyük önem taşır (Williams ve ark. 1998, Kordikowski ve ark. 1999, Maier ve ark. 2001, Ong ve ark. 2006).

Son yıllarda, kimyasal yöntemler yerine biyoteknolojik proseslerle enantiyomerik saflıkta bileşiklerin üretilmesine yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Enantiyomerik saflıkta bileşiklerin üretilmesinde immobilize enzimler kullanılmaktadır. Enantiyomerik saflıkta bileşiklerin daha kolay ve ekonomik üretimi için enzimatik rezolüsyon yöntemlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar devam etmektedir. Bu çalışmalar hala araştırma-geliştirme aşamasındadır. Bu durum bizi bu çalışmayı yapmaya iten en önemli etkidir (Benjamin ve Padney 1998, Faber 2000, Takaç ve Bakkal 2007). İmmobilize enzimler kullanılarak yapılan rezolüsyon çalışmalarının, klasik ayırma yöntemlerine (kapılar elektroforez yöntemi, kromatografik yöntemler, kristalizasyon yöntemi ve ekstraksiyon yöntemi vb.) göre daha avantajlı ve başarılı sonuçlar verdiği bilinmektedir (Benjamin ve Padney 1998, Faber 2000, Mutlu 2006, Yılmaz 2010). Bu bilgiler ışığında bu çalışmada immobilize enzimler (lipaz) kullanılarak rasemik İbuprofen metil esterinin, rasemik Naproksen metil esterinin ve rasemik Bütil Mandelat'ın enantiyoselektif hidroliz çalışmaları gerçekleştirildi. Bu bileşikler tıpta ve ilaç sanayinde uzun yıllardan beri yaygın bir kullanım alanı bulan ve

1. GİRİŞ

(*R*) ve (*S*) enantiyomerlerinin farklı farmakolojik özellik göstermeleri nedeniyle önemli ilaç etken maddeleri olmaları sebebiyle bu çalışmada enzimatik hidroliz çalışmaları yapılmıştır. Bu bileşiklerin rasemik karışımlarının enantiyomerlerine ayrılması ile ilgili olarak yapılan literatür araştırmasında, özellikle immobilize lipazlar kullanılarak rasemik Bütıl Mandelat'ın veya rasemik Mandelik asit esterlerinin enantiyomerlerine ayrılmasına yönelik son yıllarda yayınlanmış birkaç çalışmaya rastlanıldı (Fernandez-Lorente ve ark. 2001, Palomo ve ark. 2002). Literatürde; immobilize enzimler kullanılarak rasemik İbuprofen metil esterinin enantiyomerlerine ayrılmasına yönelik ise son yıllarda çok az sayıda çalışma yayınlanmıştır. Bu çalışmalarda ya serbest enzim ya da immobilize enzimler kullanılarak rasemik İbuprofen ya hidroliz tepkimesi ya da esterleşme tepkimesi üzerinden enantiyomerlerine ayrılmıştır. Rasemik İbuprofen'in enantiyomerlerine ayrılmasına yönelik olarak sadece birkaç çalışmada manyetik nanopartiküller kullanılmıştır (Goto ve ark. 1996, Yu ve ark. 2004, Marszałł ve Siodmiak 2012, Habibi ve ark. 2013, Siódmiak ve ark. 2013, Yousefi ve ark. 2014). Rasemik Naproksen'in enzimatik hidroliz veya esterleşme tepkimesi üzerinden enantiyomerlerine ayrılmasına yönelik ise çok sayıda çalışma bulunmaktadır ve çalışmaların bazılarında manyetik nanopartiküller kullanılmıştır (Lee ve ark. 2001, Cernia ve ark. 2002, Takaç ve Bakkal 2007, Şahin ve ark. 2009, Yılmaz ve ark. 2011, Uyanık ve ark. 2011).

Bu çalışma, enantiyomerik saflıkta (*S*)-(+)-İbuprofen, (*S*)-(+)-Naproksen ve (*R*)-(-)-Mandelik asit üretiminde, taşıyıcı destek materyali olarak modifiye manyetik Fe₃O₄ nanopartikülleri kullanılarak hazırlanan immobilize lipazların (CRL) kullanılabilirliğini ortaya koymaya yönelik model bir çalışmadır. *Candida rugosa* lipaz (CRL) daha önce ya serbest halde ya da farklı destek materyallerine immobilize edilerek özellikle rasemik Naproksen ve rasemik İbuprofen'in enantiyomerlerine ayrılması çalışmalarında kullanılmıştır. Bu çalışmayı daha önceki çalışmalardan ayıran en önemli özellik ise bu üç önemli bileşiğin enantiyomerlerine ayrılması işlemlerinde kullanılan Glutaraldehit ve Epoksit grubu ile modifiye edilen manyetik nanopartiküller ilk defa bizim tarafımızdan hazırlandı ve bu çalışmada kullanıldı. Literatürde, hazırladığımız bu immobilize enzimlerin, bu esterlerin hidroliz işlemlerinde kullanıldığına ait herhangi yayınlanmış bir araştırmaya rastlanılmadı.

Bu çalışma kapsamında, öncelikle manyetik özellik gösteren Fe_3O_4 nanopartikülleri hazırlandı. Hazırlanan bu partiküllere enzimi immobilize etmek için iki farklı organik uzatma kolu takıldı. Aktifleştirilen partiküllere, CRL enzimi kovalent bağlanma yöntemine göre immobilize edildi. Ardından; serbest ve immobilize enzimlerin: enzimatik aktiviteleri, optimum pH'ları, optimum sıcaklıkları, termal kararlılıkları ve depolama kararlılıkları belirlendi. Ayrıca, immobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirlikleri de belirlendi. Son olarak, immobilize enzimler kullanılarak rasemik İbuprofen metil esterinin, rasemik Naproksen metil esterinin ve rasemik Bütıl Mandelat'ın enantiyoselektif hidroliz çalışmaları gerçekleştirildi.

Enzim immobilizasyonunda taşıyıcı destek materyali olarak çok farklı maddeler kullanılmaktadır. Bu çalışmada, sahip oldukları kimyasal, fiziksel, termal ve mekanik özelliklerinden dolayı ve ayrıca işlemlere getirdikleri kolaylıklar ve kazandırdıkları üstün nitelikler nedeniyle başta yaşam bilimleri ve biyomedikal uygulamalarda kullanımı hızla yaygınlaşan manyetik Fe_3O_4 nanopartikülleri kullanıldı (Tartaj ve ark. 2003, Scherer ve Figueiredo 2005).

İmmobilizasyon işleminde CRL enzimi kullanıldı. CRL enzimi, stereoseçiciliğe sahip olması nedeniyle, birbiriyle karışmayan sistemlerde çeşitli rasemik organik asit esterlerinin hidroliz çalışmalarında kullanılmaktadır. CRL'nin (S)-sterospesifikliği sayesinde, sterospesifik hidrolizlerde ve maksimum optik saflıkta saf enantiyomerlerin sentezinde bu enzim oldukça ilgi görmektedir (Yu ve ark. 2004, Bakkal 2006, Takaç ve Bakkal 2007, Yılmaz 2010, Habibi ve ark. 2013).

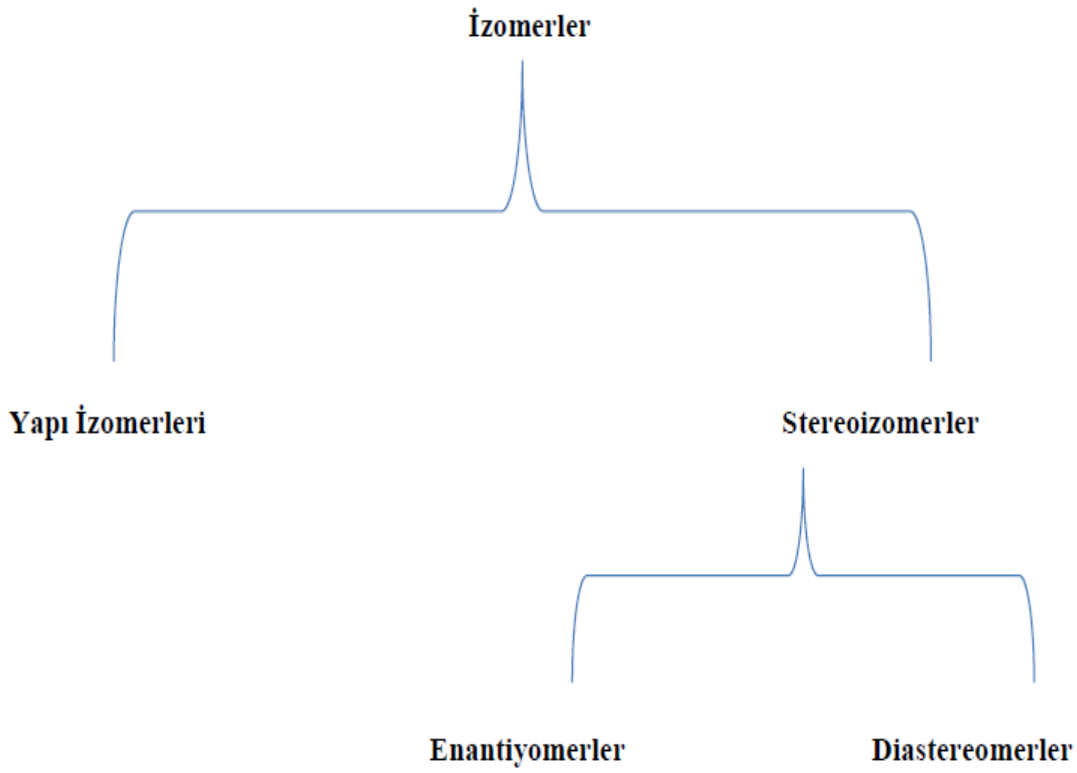
Bu doktora tez çalışması, Tübitak 1002-Hızlı Destek Programı çerçevesinde 113Z773 No'lu “Süper paramanyetik Fe_3O_4 nanopartiküllerine *Candida rugosa* lipaz enziminin immobilizasyonu ve rasemik ibuprofen metil esterinin enantiyoselektif hidrolizi” ve Dicle Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından 14-ZEF-16 No'lu ve “ Fe_3O_4 nanopartiküllerine *Candida rugosa* lipaz enziminin immobilizasyonu ve rasemik mandelik asit metil esterinin enantiyoselektif hidrolizi ” konulu projeler ile desteklendi.

Bu çalışma, Dicle Üniversitesi Ziya Gökalp Eğitim Fakültesi Kimya Eğitimi Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Giray TOPAL yönetiminde yapılarak Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne Doktora Tezi olarak sunulmuştur.

1.1. Kiralite, Kiral Bileşikler ve Kiralitenin Biyolojik Açıdan Önemi

1.1.1. Stereokimyasal Terimler ve Kavramlar

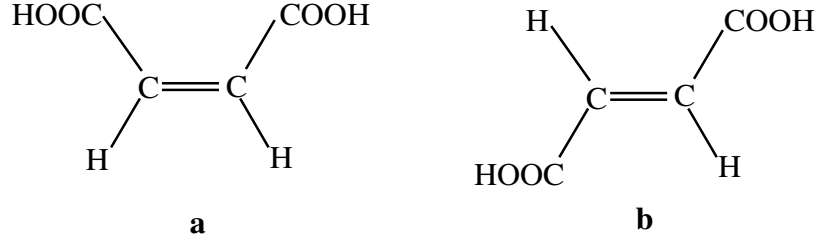
Doğada özellikle de canlı organizmalarda meydana gelen kimyasal olaylar moleküller arası üç boyutlu ilişkilerden etkilenir. Atomların ve moleküllerin uzaysal (üç boyutlu) düzenlenmeleri ile ilgili çalışmalar Stereokimya olarak adlandırılır. Aynı molekül formülüne sahip farklı atom dizilişlerine sahip bileşiklere izomer denilmektedir. İzomerler yapı izomeri ve stereoizomer olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. İzomerlerin sınıflandırılması

Yapı izomerlerinde, atomların bağlanma yeri ve sırası farklıdır. Dolayısıyla, fiziksel ve kimyasal özellikleri de farklıdır. Hâlbuki stereoizomerlerde atomların bağlanma yeri ve sırası aynıdır. Stereoizomer terimi, aynı yapıya sahip, ancak atomların uzaydaki düzenlenmeleri farklı molekülleri ifade eder. Atomlarının uzaydaki yönelimleri bakımından stereoizomerler birbirinden farklıdır. Stereoizomerler, enantiyomer ve diastereomerler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Şekil 1.1).

Stereoizomerlere örnek olarak verilen aşağıdaki bileşikler birbirinin yapı izomeri olmayıp birbirinin stereoizomeridir (Şekil 1.2.). Alkenlerin cis ve trans izomerleri de stereoizomerlerdir. Latince cis "aynı tarafta", trans "diğer tarafta" anlamına gelir. IUPAC'a göre "geometrik izomer" ifadesi daha doğrudur (Solomons 1997).



Şekil 1.2. Stereoizomer bileşikler (a: cis izomer; b: trans izomer)

1.1.2. Enantiyomerler

Kiral sözcüğü Yunanca'da el anlamına gelen "chiro" kelimesinden gelmektedir. Ayna görüntüsü ile üst üste çakışmayan nesne ya da moleküller kiral olarak tanımlanır. Ayna görüntüsü ile üst üste çakışan nesne ya da moleküller kiral olmayıp akiraldir. Akiral bir nesne ya da molekül aynı ayna görüntüsüne sahiptir. Kiralite olgusu canlı sistemlerde yaygındır. Amino Asitler, Nükleik Asitler, Lipitler, Karbonhidratlar, metabolik ara bileşikler ve diğer birçok Biyomolekül kiraldir (Nejem 2006).

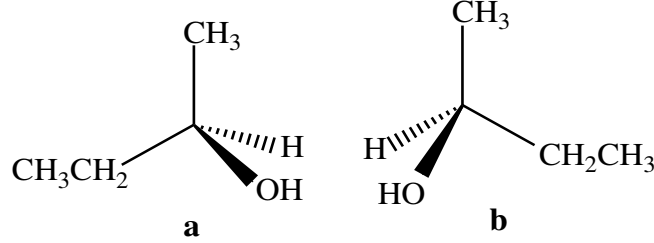
Kiralite geometrik bir özelliktir. sp^3 hibritleşmesi yapmış olan herhangi bir karbon atomuna (veya tetrahedral yapıda olan Si, N, P, S gibi atomlar) dört farklı atom ya da grubun bağlı olduğu bileşikler kiral bileşik olarak adlandırılır. Kirallığın olmasını sağlayan atomun bulunduğu yer, stereojenik merkez olarak adlandırılır. Stereojenik merkez ayrıca kiral merkez, asimetrik merkez ve stereomerkez olarak da isimlendirilmektedir.

Enantiyomerler, kiral merkeze bağlı grupların farklı düzenlenmelerinden ileri gelen Stereoizomerlerdir. Enantiyomer sözcüğü Yunanca kökenli bir kelime olup karşıt anlamındaki "enantios" ve parça anlamına gelen "meros" kelimelerinin birleşiminden meydana gelmektedir (Burke ve Henderson 2002).

Enantiyomerler molekül içi simetri düzlemine sahip değildirler. Kendileri ve ayna görüntüleri üst üste çakışmayabilir. Bu yapılara "Konfigürasyon" adı verilir. Enantiyomerler, konfigürasyon (bir atoma bağlanmış grupların üç boyutlu

1. GİRİŞ

düzenlenmesidir.) izomerleridir ve zıt konfigürasyona sahiptirler (Solomons 1997). Örnek olarak, kiral bir alkol olan 2-Bütanol verilebilir. Bu kiral alkolün 2 enantiyomeri vardır (Şekil 1.3.).



Şekil 1.3. 2-Bütanol'ün enantiyomerleri (a: (*R*)-(-)-2-Bütanol;
b: (*S*)-(+)-2-Bütanol)

Enantiyomerler birbirine dönüşemez. Çünkü kovalent bağların kırılıp atomların yer değiştirmesi için çok büyük bir enerji gerekir. Enantiyomerlere, dışardan herhangi bir asimetric etki yoksa aynı kimyasal ve fiziksel özelliklere sahiptirler. Yani, yoğunluk, kaynama noktası, erime noktası, kiral olmayan çözücülerdeki çözünürlükleri ve spektrumları gibi özellikleri bir kiral bileşiğin her iki enantiyomeri için aynıdır. Buna örnek olarak, 2-Bütanol'ün enantiyomerlerinin bazı fiziksel özellikleri verilebilir (Çizelge 1.1.)

Çizelge 1.1. (*R*)-(-)-2-Bütanol ve (*S*)-(+)-2-Bütanol'ün fiziksel özellikleri

Fiziksel özellik	(<i>R</i>)-(-)-2-Bütanol	(<i>S</i>)-(+)-2-Bütanol
Kaynama noktası(1 atm.)	99.5 °C	99.5 °C
Yoğunluk (g.mL ⁻¹ , 20 °C'de	0.808	0.808
Kırma indisi (20 °C)	1.397	1.397

Çizelge 1.1.'den de görüldüğü gibi bu iki enantiyomer aynı kaynama noktasına, aynı yoğunluk ve aynı kırılma indisine sahiptirler. Ayrıca, aynı çözünürlük, aynı kromatografik alıkonma zamanı ve aynı spektroskopik özelliklere de sahiptirler (Solomons ve Fryhle 2000).

Enantiyomerlerin polarize ışık düzlemini çevirme yönleri, uzaydaki üç boyutlu düzenlenmeleri ve başka kiral moleküller varlığındaki davranışları farklıdır. Buna bağlı olarak biyolojik aktiviteleri farklılık göstermektedir (Solomons 1997).

1.1.3. Düzlem Polarize Işık ve Optikçe Aktiflik

Normal ışık, değişik dalga boylarında ve dalgaların bütün yönlerde doğru saçılmasıyla oluşur. Dalga hareketi ışığın doğrultusuna diktir. Işık kaynağından çıkan bir ışık demeti polarizatör denen bir alet içerisinden geçirildiğinde bu alet ışık dalgalarının yalnızca bir düzlem üzerine titreşimini sağlar. Bu ışık da düzlem polarize ışık olarak adlandırılır.

Optikçe aktiflik, düzlem polarize ışık tek bir enantiyomer içeren bir çözeltiden geçirildiğinde ışığın polarizasyon düzlemini çevirme yeteneğidir. Optikçe aktiflikten kastedilen işte bu çevirmedir. Bir maddenin optikçe aktifliği özgül çevirme olarak ifade edilir ve $[\alpha]$ sembolü ile gösterilir. Bir kiral molekülün her bir enantiyomeri optikçe aktiflik gösterir (Atkins ve Carey 1999). Eğer bir madde düzlem polarize ışık içinden geçtiğinde, polarlanma düzlemini sağa ya da sola doğru çeviriyorsa o maddeye optikçe aktif madde denir. Böyle maddeler organik veya inorganik olabilir. Örneğin; Kuvars, Kalsit, Aragonit gibi mineraller ile doğal Laktik Asit, Malik Asit gibi birçok organik bileşik bu özelliği gösterir. İnorganik bileşiklerin bu özellikleri sadece kristal yapıları ile ilgilidir. Örneğin; inorganik bileşikler eritildiğinde veya bir çözücüde çözüldüklerinde kristal yapıları değiştiğinden dolayı bu özelliklerini yitirirler. Oysa organik bileşiklerin optikçe aktiflik özellikleri, kristal yapılarına bağlı olmayıp molekül yapılarıyla ilgili bir özelliktir. Optikçe aktif organik bir bileşik eritilse, bir çözücüde çözünürse veya buhar haline getirilse bu özelliğini yitirmez. Enantiyomerleri birbirinden ayıran iki özellik vardır. Bunlardan biri düzlem polarize ışığın düzlemini değiştirme yönü, diğeri ise kiral ortamlarda farklı davranmalarıdır (Tüzün 1996).

1.1.4. Mutlak Konfigürasyon ve Fischer İzdüşüm Formülleri

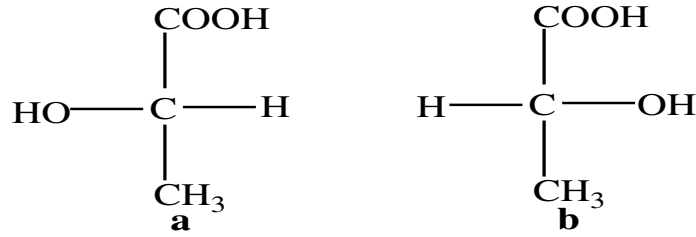
Bir kiral molekülün polarize ışık düzlemini çevirme yönüne göre bileşiklerin isimlerinden önce (-) ve (+) gösterimi (*d* ve *l*) kullanılmaktadır. Bir bileşiğin çözeltisi, polarize ışık düzlemini saat yönünde çeviriyor ise bu çevirme (+) veya *d* (dekstro), saat yönünün tersi yönde çeviriyorsa (-) veya *l* (levo) olarak adlandırılır.

Optik çevirme açısı; enantiyomerlerin *d*-(-) ve *l*-(-) formunun tek farklılığını gösterir. Fakat bu bize asimetric merkez atomuna bağlanan grup veya atomların uzaydaki yönelimi hakkında bir fikir vermez. Çünkü konfigürasyonla çevirme açısı arasında bir ilişki yoktur. Bir enantiyomer, tek bağın etrafındaki grupların dönmesi ile

1. GİRİŞ

değişik konformasyonlarda olabilir, ancak konfigürasyondaki bir değişme için asimetrik karbondaki bağların kırılması gerekir. Yani, bir enantiyomerin konfigürasyonu değişmez.

Laktik asidin iki enantiyomerini ele alarak bunu incelersek; laktik asidin bir formu düzlem polarize ışığı sağa çevirirken, diğer formu düzlem polarize ışığı sola çevirmekte ve sırasıyla (+) veya (-) olarak etiketlenmektedir. Laktik Asit'in bu iki konfigürasyonunu Şekil 1.4.'de gösterilmiştir.



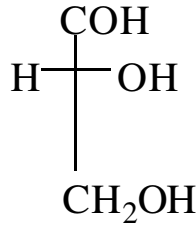
Şekil 1.4. Laktik asit enantiyomerleri (a: L-(+)-Laktik Asit; b: D-(-)-Laktik Asit)

Bu konuda sorun şu; hangi yapı, (+) – laktik asidi; hangi yapı, (-)- laktik asidi belirler. Diğer bir deyişle, konfigürasyonlar nasıl ayrılır. Van't Hoff'dan sonra neredeyse yüzyıla yakın bir süre, enantiyomerlerin mutlak konfigürasyonlarının kesin olarak nasıl belirleneceği tanımlanamadan kaldı. Bu durum 1951'de Bijvoet tarafından, enantiyomerlerin mutlak konfigürasyonlarının X-ışınları spektroskopisi ile belirlenebileceğinin bildirilmesi ile değişti.

Mutlak konfigürasyonun X-ışınları ile belirlenebileceğinin bilinmesinden çok önce, kiral moleküllerin asimetrik merkezlerinin konfigürasyonunun belirlenebilmesi için, tümü ile keyfi olarak, (+)-Gliseraldehit'in standart olarak seçilmesi, yerleşik bir kural halini almıştı. Konfigürasyonun belirlenebilmesi için ilk olarak Alman kimyager Emil Fischer tarafından önerilen Fischer izdüşüm formülleri temel alınmıştı. Fischer bunu ilk olarak Glukoz molekülünün D-enantiyomerinin stereokimyasal düzenlemesi için kullanmıştı.

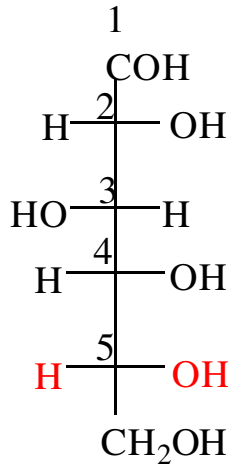
Fischer izdüşümünde, moleküldeki bütün bağlar yatay ve dikey çizgilerle gösterilir. Yatay çizgilerin gözleyene doğru, dikey çizgilerin gözleyenden uzakta olduğu varsayılır. Uzun karbon zinciri dikey olarak gösterilir ve yüksek değerli karbon en üste yazılır. Fischer, molekül konfigürasyonlarını ayırmada tümüyle keyfi olarak, asimetrik merkeze bağlı -OH grubunu sağa yönelen (+)-Gliseraldehit'i, D-(+)-Gliseraldehit

olarak isimlendirdi (Şekil 1.5.).



Şekil 1.5. D-(+)-Gliseraldehit

Bütün kiral moleküllerin konfigürasyonlarında, D-(+)-Gliseraldehit ve L-(-)-Gliseraldehit referans alınarak, konfigürasyonları D ve L olarak belirlenir. Fischer izdüşüm formülüne göre 5. Karbon atomuna bağlı –OH sağda ise D-, solda ise L- olarak belirlenir. Şekil 1.6.’da Fischer’e göre çizilen D-(+)-Glukoz yapısı verildi.



Şekil 1.6. Fischer’e göre çizilen D-(+)-Glukoz’un yapısı

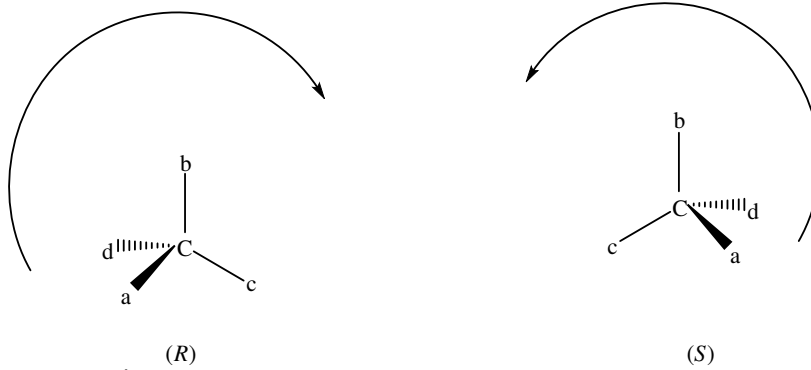
1.1.5. Enantiyomerlerin Adlandırılması

X-ışınları analizi ile mutlak konfigürasyonun belirlenebileceğinin ortaya konulmasından önce, Fischer’in ortaya koyduğu D ve L sistemi bağıl konfigürasyon hakkında bilgi vermekteydi. Ayrıca D ve L sistemi bazı karışıklıklara yol açmaktaydı. Bu nedenle mutlak konfigürasyonun belirlenmesi için yeni bir sisteme ihtiyaç duyuldu. Bağıl konfigürasyonda, stereojenik merkeze bağlı atom veya grupların üç boyutlu düzenlenmesi mutlak bazda değil karşılaştırmalı olarak belirleniyordu.

Yeni sistem, (R)–(S) ya da “Chan-Ingold-Prelog” sistemidir. Mutlak konfigürasyonu belirlemek için kullanılan bu sistem 1956 yılında iki İngiliz kimyacı R.S. Cahn, Sir Christoper Ingold ve İsviçreli meslektaşları Vladimir Prelog’un işbirliği ile geliştirildi. (R) latince Recktus (sağ), (S) latince Sinistre (Sol) sözcüklerinin baş

1. GİRİŞ

harfleridir. (R)-(S) sistemi, konfigürasyonun kesin düzenlenişi hakkında bilgi vermektedir. (R)-(S) sistemi, asimetric merkeze bağlı grupların önceliğine göre belirlenir. Örnekte bağlı gruplar, azalan önceliğe göre, $a > b > c > d$ şeklinde sıralanmıştır (Şekil 1.7.). Bağlanan grupların önceliği, *cis-trans* izomerliğini belirlemede kullanılan E-Z sistemindeki gibi bulunur.

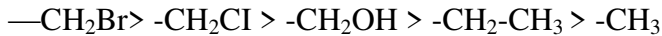


Şekil 1.7. Cahn-İngold-Prelog sisteminin şekilsel gösterimi

Mutlak konfigürasyonda grupların öncelik sıralaması aşağıdaki kurallara göre belirlenir;

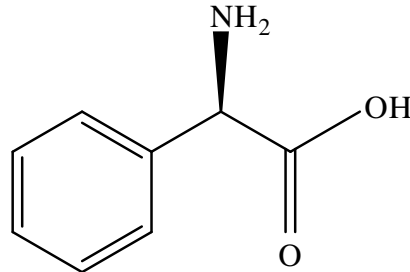
1. Atom numarası en büyük olan ve doğrudan stereojenik merkeze bağlı atomlar yüksek öncelik sırasına sahiptir. Örneğin;
 $I > Br > Cl > S > P > Si > F > O > N > C > H$

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



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

Şekil 1.7.'ye göre konfigürasyon belirlemek gerekirse, en düşük öncelikli grup (d) gözleyenden uzak bir şekilde çizilir ve diğer gruplara bakılır. Eğer öncelikli gruplar $a > b > c$ saat yönünde ilerliyorsa konfigürasyon (*R*) olarak, saat yönünün tersine ilerliyorsa konfigürasyon (*S*) olarak adlandırılır.



Şekil 1.8. (*R*)-(-)-2-Fenilglisin

Şekil 1.8' de gösterilen yapı Fenilglisin'in ticari kullanımı olan levorotatori yani (-) ya da (L) izomeridir. Fischer izdüşüm formülüne göre D-konfigürasyonundandır. Bu da D ve L ayırmalarında karışıklıklara yol açar. Bu karışıklıklardan kurtulmak için (*R*)-(*S*) sistemi kullanıldığında ise, molekül (*R*)-konfigürasyonundadır. Fischer izdüşüm formülü karışıklıklara yol açmasına rağmen amino asit kimyasında yerleşik bir kural halini aldığından, amino asitler hala D, L sistemine göre adlandırılırlar.

(*R*)-(*S*) gösterim şekli çoğunlukla ilaçların ve metabolitlerin adlandırılmasında kullanılır. Birden çok kiral merkeze sahip moleküllerin isimlendirilmesi bu yöntemle mümkün olmaktadır (Nejem 2006).

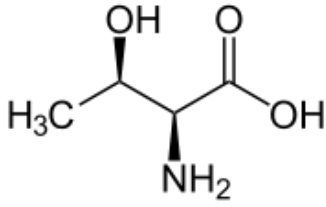
Mutlak konfigürasyon, bağıl konfigürasyon ve spesifik konfigürasyon arasında bir bağıntı yoktur. Yani konfigürasyonu D veya L olan aynı zamanda (+) veya (-), (*R*) veya (*S*) olabilir (Atkins ve Carey 1999).

1.1.6. Diastereomerler

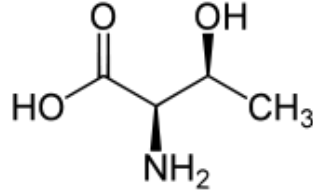
Bir stereojenik merkeze sahip bir bileşiğin iki stereoizomeri vardır ve bunlar birbirinin enantiyomerleridir. Ancak pek çok kiral bileşikte, iki veya daha fazla stereojenik merkez bulunmaktadır. İki'den fazla asimetric atoma sahip kiral bileşiklerin sahip olduğu stereoizomer sayısı 2^n formülüyle belirlenmektedir. Buna göre eğer kiral bir bileşikte 2 tane asimetric karbon atomu varsa bileşiğin sahip olduğu maksimum stereoizomer sayısı $2^2 = 4$ tür. Bu dört stereoizomerden ikisi birbirinin ayna görüntüsü olmayan stereoizomerlerdir. Bunlara diastereomer denilmektedir. Birbirinin ayna

1. GİRİŞ

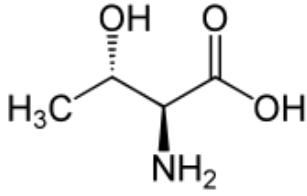
görüntüsü olan enantiyomerlerin yalnızca kiral özellikleri farklıdır. Buna karşın diastereomerlerin, kiral ve kiral olmayan özellikleri birbirinden farklı olabilmektedir. Diastereomerler benzer kimyasal tepkime verebilmelerine rağmen, erime noktaları, kaynama noktaları, çözünürlükleri, düzlem polarize ışığı çevirme yönleri ve çevirme açıları farklılık gösterebilir. Kısacası, diastereomerler iki farklı bileşik gibi davranır. Örneğin, optikçe aktif bileşiklerle tepkime hızları farklıdır. Kristallendirme, destilasyon veya kromatografik metotlarla birbirinden ayrılabilirler. Biyolojik aktiflikleri farklıdır (Solomons ve Fryhle 2000). Şekil 1.9.'da Treoninin enantiyomerleri ve diastereomerleri arasındaki ilişki (a ve b, c ve d enantiyomer; a ve c, b ve d diastereomer) gösterildi.



a
L-Treonin (2*S*,3*R*)

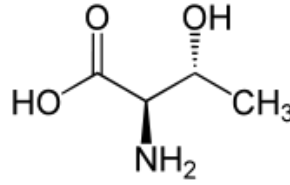


b
D-Treonin (2*R*,3*S*)



c

L-allo-Treonin (2*S*,3*S*)



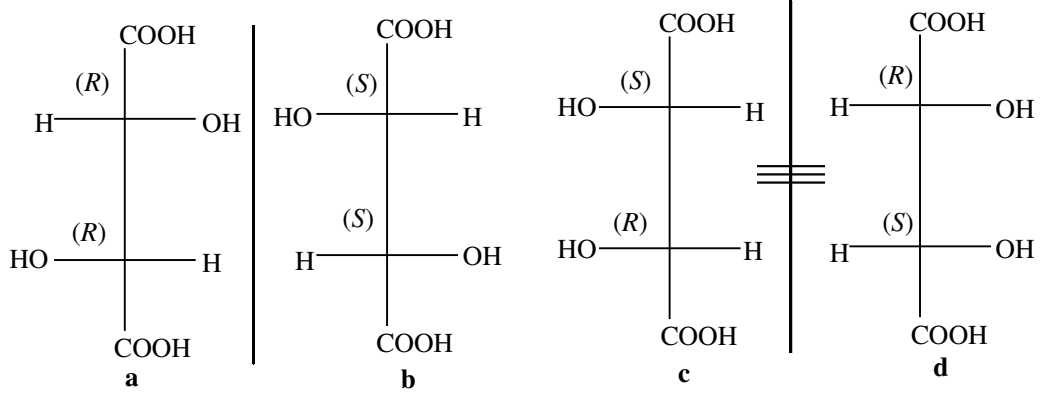
d

D-allo-Treonin (2*R*,3*R*)

Şekil 1.9. Treonin'in Stereoizomerleri

1.1.7. Mezo Yapısı

Yapısında iki asimetric karbon atomu bulunan Tartarik asidin 2ⁿ formülüne göre 4 stereoizomeri olması beklenirken; 3 stereoizomeri vardır (Şekil 1.10.).



Şekil 1.10. Tartarik Asit (a: (+)-Tartarik Asit; b: (-)-Tartarik Asit; c ve d: Mezo Tartarik Asit)

Şekil 1.10.'da (*S,R*) ve (*R,S*) yapısında olan stereoizomerler incelendiğinde (c ve d yapıları), bu moleküllerin bir iç simetri düzlemine sahip oldukları görülmektedir. Birbirinin ayna görüntüsü olan bu moleküllerden birini sabit tutup diğer molekülü kâğıt düzleminde 180° çevirirsek sabit tutulan molekül elde edilmektedir. Dolayısıyla, bu moleküller iki ayrı bileşik değil, aynı bileşiklerdir. Bu moleküllerde, molekülün üst kısmı, alt kısmının ayna görüntüsüdür. Bu yüzden, (*S,R*) ve (*R,S*) yapıları, birbirinin çevirme açısını yok etmektedir. Asimetric merkezleri olmasına rağmen ayna görüntüleri çakışan ve iç simetri düzlemine sahip olan stereoizomerlere mezo şekli (yapısı) denilmektedir. Tartarik asidin c ve d formları, aynı molekül olup Mezo-Tartarik asittir (Tümerdem 2004).

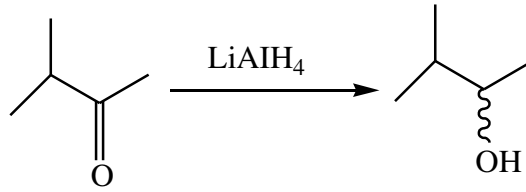
1.1.8. Rasemik Karışımlar

Rasemik karışımlarda, enantiyomerler eşit oranda (1:1) bulunmaktadır. Rasemik karışıma rasemat da denilmektedir. Rasemik karışımlar, optikçe aktiflik göstermezler. Çünkü enantiyomer çiftleri, polarize ışık düzlemini eşit ve zıt yönde çevirdikleri için, birbirinin çevirme açısını yok etmektedirler. Böylece, gözlenen çevirme açısı “sıfır” olur. Bu nedenle rasematlar, optikçe inaktiftir. Akiral yapıda moleküller de optikçe aktiflik göstermez. Bir molekülün optikçe aktiflik gösterebilmesi için molekülün kiral olması ve enantiyomerlerden birinin miktarının diğerinin miktarından fazla olması gerekmektedir.

1. GİRİŞ

Çevirme yönünü göstermek için simgeleme ($\pm$) veya (d, l) şeklinde olabilir ve bu simgeler sadece çevirme yönü hakkında bilgi verir. Rasem bileşik basit bir karışım değildir. Çünkü enantiyomerlerin polarize ışığa karşı davranışları dışında diğer özellikleri aynıdır. Bu sebepten dolayı, moleküller arasında daha farklı bir etkileşme vardır; bu nedenle rasem bileşiğin enantiyomerlerine ayrılması basit karışımların ayrılmasından daha güçtür.

Sıvı veya gaz halinde rasem şekli ile optikçe aktif şekiller arasında fark yoktur. Yoğunluk, kaynama noktası, kırma indisi, UV, NMR ve IR gibi spektroskopik özellikler birbirinin aynıdır. Bir kimyasal reaksiyonda asimetric bir karbon atomu oluşuyorsa pek çok durumda oluşan ürün rasem şeklindedir (Şekil 1.11.).



Şekil 1.11. ($\pm$)-3-Metil-2-Bütanol'ün oluşumu

1.2. Kiral Seçicilik ve Kiral Tanıma Mekanizması

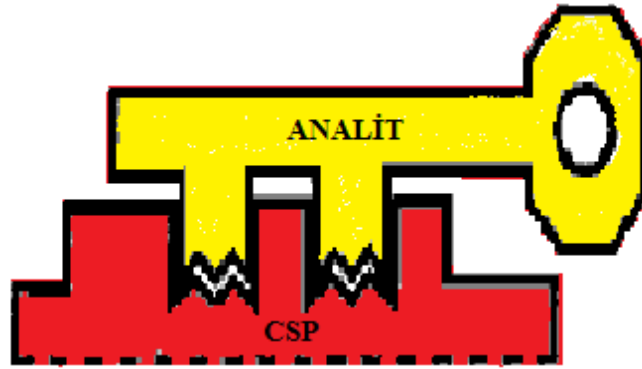
Kiral tanıma ya da diğer bir deyişle kiral seçicilik, canlı sistemlerdeki kiral alıcıların veya bileşiklerin, bir kiral molekülün enantiyomerlerinden biri ile seçici olarak etkileşmesi olarak tanımlanabilir (özellikle biyolojik etkileşimlerde kiral seçicilik baskın şekilde rol oynar). Canlı sistemlerde bir kiral molekülün enantiyomerlerini ayırt edebilen yapılar enzim ve reseptörlerdir (Atkins ve Carey 1999, Karaküçük 2006).

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

Bütün kiral selektörlerde (ligand değiştiriciler hariç), kiral tanıma mekanizması oldukça benzerdir. Ayrıca, enantiyomerler için kiral bir yüzey bulunmaktadır. Enantiyomerler bu kiral yüzeylere farklı bağ enerjisi ile bağlanarak geçici kompleksler oluştururlar. Enantiyomerlerin farklı stereokonfügrasyonları, kiral selektör yüzeyine

farklı bağ enerjileriyle tutunmanın başlıca nedenidir. Geçici kompleksler bir seri etkileşim ile dengededir. Bu etkileşimler; hidrojen bağı, π - π etkileşimleri, dipol-indüklenmiş dipol etkileşimi, iyonik etkileşimler ve sterik etkileşimlerdir. Ayrıca Van der Waals ve yük değişim etkileşimleri gibi zayıf kuvvetler de kiral tanıma mekanizmasında başlıca rol oynar. Ligand değişim selektörlerinde, kiral tanıma mekanizması diğer selektörlerden farklılık göstermektedir. Bu selektörlerde bulunan metal iyonlarıyla enantiyomerlerin yer değiştirmesiyle kiral ayırmanın sağlanabildiği bilinmektedir.

Kiral selektör yüzeyinde yer alan kiral tanıma mekanizması anahtar-kilit modeline göredir (Şekil 1.12.). Enantiyomerlerden biri kiral selektör yüzeyine uygun bir şekilde tutunurken; diğer enantiyomer tam olarak tutunmaz ve böylece enantiyomerik rezolüsyon gerçekleşmektedir (Erdoğan 2014).



Şekil 1.12. Anahtar-Kilit Modeli

1.3. Biyolojik Sistemler Üzerinde Kiralitenin Etkisi

Canlı sistemlerde bulunan protein ve karbonhidrat gibi biyolojik makromoleküllerin yapı taşları kiral bileşiklerden oluşmaktadır. Kiral olmayan bir çevrede, rasemik karışımın enantiyomerleri aynı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahiptir. Ancak, enantiyomerler, kiral ortamda farklı iki bileşik olarak davranırlar ve dolayısıyla bunların kiral çevrelerdeki kimyasal özellikleri de tamamen farklıdır. Enantiyomerlerin farklı çevirme açısına sahip olmaları ve diğer fiziksel özelliklerinin ise aynı olması (erime noktası, kaynama noktası, yoğunluk, kırılma indisi v.b.) birbirleriyle veya diğer bileşiklerin enantiyomerleriyle olan etkileşimlerini etkilemektedir. Bu özellik kiral bileşiklere vücutta veya metabolizmada farklı bir

1. GİRİŞ

işlevsel özellik kazandırır. İlaçların her bir enantiyomerinin etki mekanizması farklı olduğu için vücuttaki fonksiyonu da farklı olur.

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

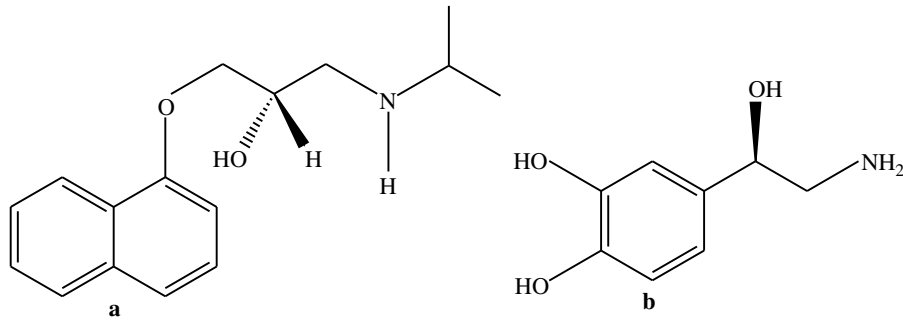
1.4. Farmakolojik Etkinlikleri Yönünden Enantiyomerler

Doğal olarak bulunan tedavi edici reaktiflerin büyük çoğunluğunu kiral moleküller oluşturmaktadır ve üstelik bunlar doğada tek enantiyomer şeklinde bulunur. Buna karşılık, uzun yıllar boyunca sentetik kiral ilaçlar rasemat şeklinde satışa sunulmuştur. Ancak bu durum zaman geçtikçe değişmiştir.

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

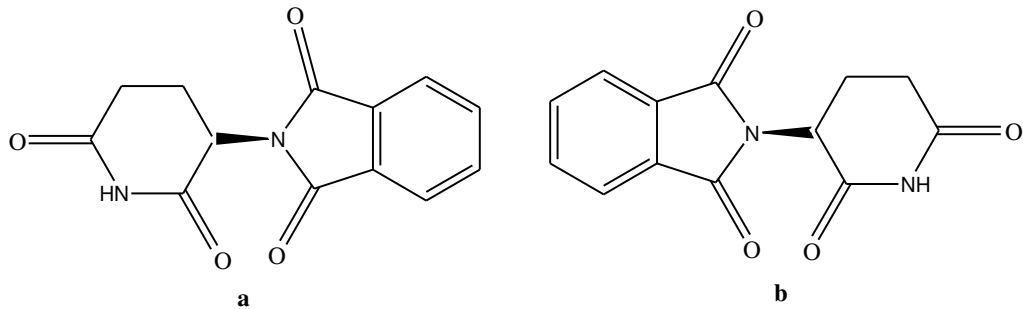
Farmakolojik etkilerine göre enantiyomerler eutomer ve distomer olarak adlandırılır. Tedavi edici aktif izomer için “*eutomer*”, daha az etkili inaktif izomer için “*distomer*” terimi kullanılır. Bir rasemik ilacın tedavi edici olmayan inaktif izomeri (distomer), istenmeyen safsızlık olarak nitelendirilir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

Bazı durumlarda distomer ciddi yan etki göstermediği için kiral ilaçlar rasemat şeklinde uygulanır. β -blokerler buna örnek olarak verilebilirler. β -blokerler adrenerjik reseptörlerin bloke edilmesi yoluyla antihipertansif etki gösterirler. Bu bileşiklerin neredeyse tümünde bileşiğin (*S*)-enantiyomeri tedavi edici etkiye sahiptir. Bunun nedeni ise (*S*)-enantiyomerinin adrenerjik hormon olan Noradrenalin'e yapısal olarak çok benzemesidir. Bir β -bloker olan (*S*)-(-)-Propanolol Şekil 1.13.'de verilmektedir. Üç önemli β -bloker olan propanolol, atenolol ve metoprolol rasemat şeklinde piyasada satılmaktadır. Bu ilaçların rasemat şeklinde satılmasının nedeni klasik yöntemler ile ayrılmasının zor olması ve distomerlerin ciddi yan etkiler göstermemesidir. Eğer β -blokerler yeni ilaçlar olarak bugün tanımlanmış olsaydı, hemen hemen hepsi tek bir enantiyomer şeklinde satılırdı. Çünkü rasemat şeklinde satılanlarda distomer gereksiz bir izomerik yük oluşturmaktadır.



Şekil 1.13. a: (*S*)-(-)-Propanolol; b: Noradrenalin

Bazı durumlarda distomer istenmeyen yan etkiler gösterebilir. Distomerin ciddi yan etkilere sebep olduğu bilinen ilaçlara en iyi örnek Talidomit'tir (Şekil 1.14.).



Şekil 1.14. a: (*R*)-(+)-Talidomit; b: (*S*)-(-)-Talidomit

Talidomit, 1960'lı yıllarda rasemat şeklinde piyasaya sürülmüş ve hamile bayanlar tarafından yatıştırıcı ve mide bulantılarını önleyici bir ilaç olarak kullanılmıştır. Ancak daha sonraki yıllarda, (*R*)-(-)-Talidomit'in yatıştırıcı etkisi

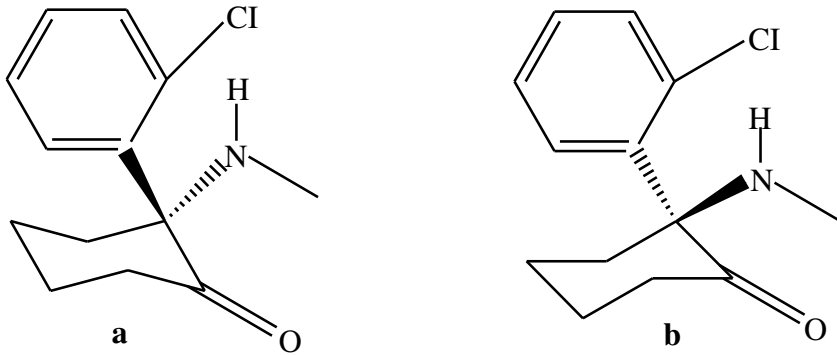
1. GİRİŞ

olmasına karşın, (S)-(-)-Talidomit'in yüksek teratojenik etkisinin olduğu ve doğum anomalliklerine yol açtığı tespit edildi (Şekil 1.15.).



Şekil.1.15. (S)-(-)-Talidomit'in teratojenik etkisi nedeniyle meydana gelen Doğum Anomalisi

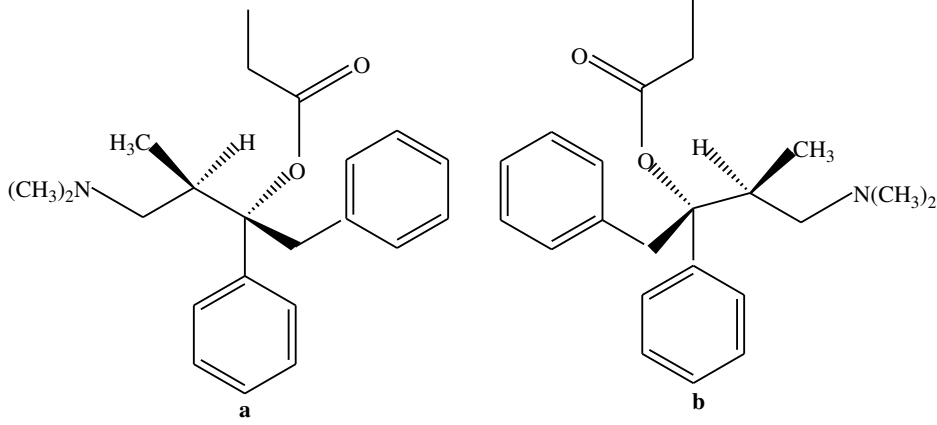
Distomerin istenmeyen yan etkiler gösterdiği diğer bir örnek ise Ketamin'dir. Ketamin anestezik ve analjezik olarak kullanılan bir maddedir. Rasemat şeklinde uygulanmasından dolayı, anestezi sonrası hastalarda zihinsel karışıklıklara neden olur. Ketamin'in enantiyomerleri araştırıldığında (S)-(+)-Ketamin'in anestezik olduğu, istenmeyen yan etkilerin büyük çoğunlukla (R)-(-)-Ketamin ile ilişkili olduğu görülmüştür (Şekil 1.16). Bu örnekler gösteriyor ki distomerler yan etkilerden öncelikli olarak sorumludur ve ilaçlar kesinlikle tek bir enantiyomer şeklinde üretilmelidir.



Şekil 1.16. a: (S)-(+)-Ketamin; b: (R)-(-)-Ketamin

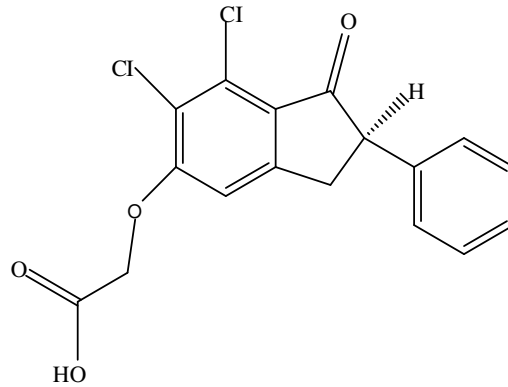
Bazı durumlarda, kiral bir ilacın her iki enantiyomeri de birbirinden farklı iki ilaç olarak tedavilerde kullanılabilir. Yani, her iki enantiyomer bağımsız tedavi edici etkiye sahip olabilir. Birçok doğal ürün ve yine sentetik ilaç bu şekildedir. Buna örnek olarak Propoksifen verilebilir. (2R,3S)-(+)-Dekstropoksifen analjezik bir reaktif

iken, (2*S*,3*R*)-(-)-Levopropoksifen etkili bir öksürük önleyicidir (Şekil 1.17). İlginç olan birbirinin ayna görüntüsü olan bu iki molekül iki farklı ilaç olarak piyasada satılmaktadır.



Şekil 1.17. a: (2*R*,3*S*)-(+)-Dekstropropoksifen; b: (2*S*,3*R*)-(-)-Levopropoksifen

Bazı durumlarda, her iki enantiyomer tedavi için avantaj sağlar. Yani, mevcut kiral ilaçlardan bir kısmının her iki enantiyomerinin de istenen tedavi etkisini sağlamada farklı yollardan katkıda bulunabildiği görülmektedir. Bu olguya en iyi örnek, bir diüretik olan İndakrinon'dur. (*R*) enantiyomeri aktif bir Diüretik'tir (Şekil 1.18.). Diğer birçok diüretikte olduğu gibi (*R*) enantiyomeri Ürik asit oluşumunu engelleyerek istenmeyen yan etkiler gösterir. (*S*) enantiyomeri ise Ürik asit salgısını artırarak (*R*) enantiyomerinin Antagonist'i olarak görev yapar.



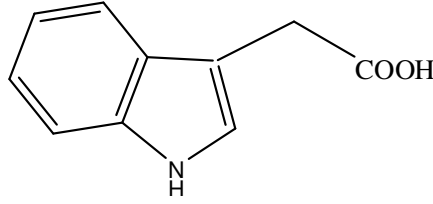
Şekil 1.18. (*R*)-(-)-İndakrinon

Bu gibi durumlarda ilaçların rasemat şeklinde satışı iyi bir fikir olarak görülebilir. Ancak yapılan çalışmalarda, iki enantiyomerinin, 9:1 oranındaki karışımlarının tedavi için uygun olduğu anlaşılmıştır (Sheldon 1993).

1.5. Pestisitler, Herbisitler ve İnsektisitler

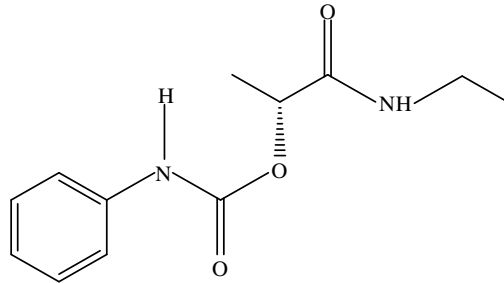
Bitkiler, böcekler ve mantarlar gibi canlı organizmaların üzerinde etkili olan zirai kimyasallar da enantiyoseçicilik sergilerler. Bu olayın moleküler mekanizması ilaçlardaki ile tamamen aynıdır ve hedef organizmadaki enzim ya da reseptör ile biyoaktif maddelerin etkileşimi söz konusudur. İlaçlar ile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

Herbisit, tarımda istenmeyen otların yok edilmesinde kullanılan kimyasalların genel adıdır. α -Ariksipropionik asitler herbisitlerin ticari olarak önemli bir sınıfını oluşturmaktadır. Bunların tümünde, herbisidal etki (*R*) enantiyomerine aittir. Bu bileşikler herbisidal etkilerini bitki büyüme hormonu olan İndol-3-Asetik Asit'i inhibe ederek gösterirler (Şekil 1.19.).



Şekil 1.19. İndol-3-Asetik Asit (IAA)

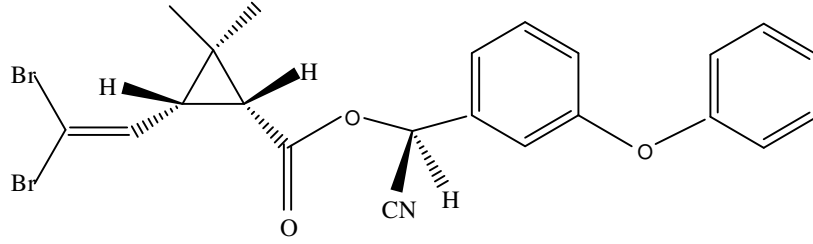
Geçmiş yıllarda Hollanda hükümeti, herbisitlerin rasemat şeklinde kullanımını sınırlamış ve bu nedenle bir herbisit olan Karbetamit, saf (*R*) enantiyomeri şeklinde üretilmiştir (Şekil 1.20.).



Şekil 1.20. (*R*)-(-)-Karbentamit

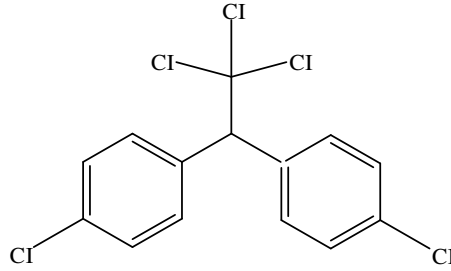
Bitki zararlısı böcekleri öldürmede kullanılan kimyasal maddelere insektisit denilmektedir. Nöroaktif bir insektisit olan Deltametrin üç asimetrik merkeze sahiptir ve

mümkün olan sekiz optik izomerinden sadece biri olan (*R,R,S*) izomeri şeklinde satılmaktadır (Şekil 1.21.).



Şekil 1.21. (*αS*, 2*R*, 3*R*)-Deltametrin

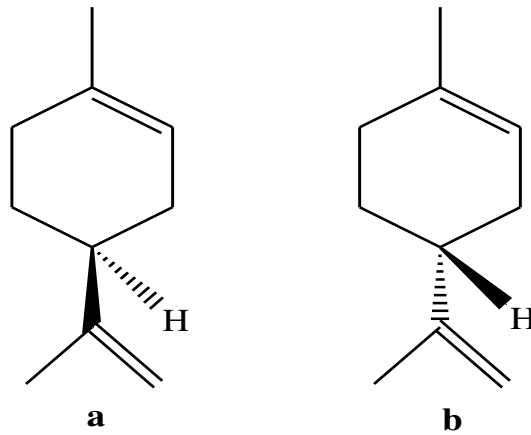
Deltametrin 1950’li yıllardaki DDT (dikoro difenil trikloroetan) kadar aktif olan ancak memeli ve kuşlara zarar vermeyen günümüzdeki en etkili insektisittir (Şekil 1.22.).



Şekil 1.22. DDT

1.6. Enantiyomerlerin Farklı Kokular Vermeleri

Tat ve koku algısı, dil ve burundaki reseptörler ile aroma maddeleri arasındaki özel etkileşimlerle belirlenir. Örneğin, Limonen bileşiğinin her iki enantiyomerinin kendi karakteristik kokuları vardır. (*S*)-(-)-Limonen limon kokusu, diğer enantiyomeri (*R*)-(+)-Limonen ise portakal kokusu olarak algılanmaktadır (Şekil 1.23.).

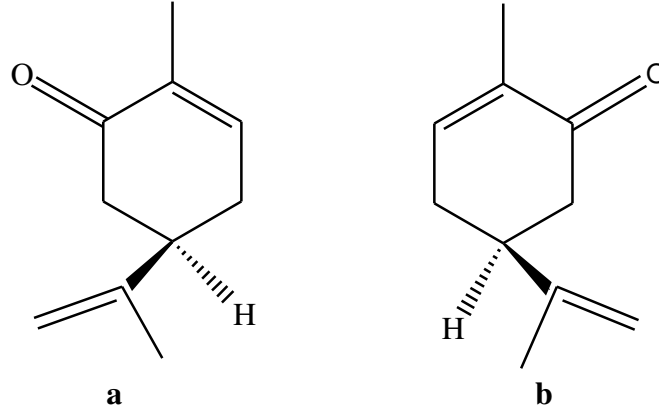


Şekil 1.23. a: (*S*)-(-)-Limonen ; b: (*R*)-(+)-Limonen

1. GİRİŞ

(*S*)-(-)-Limonen ve (*R*)-(+)-Limonen arasındaki bu koku farklılığı onların burundaki alıcı sinir hücrelerine karşı farklı davranmalarından kaynaklanır. Alıcı sinir uçları kiral yapıda olduklarından enantiyomerlerden sadece biri için uygunluk gösterir.

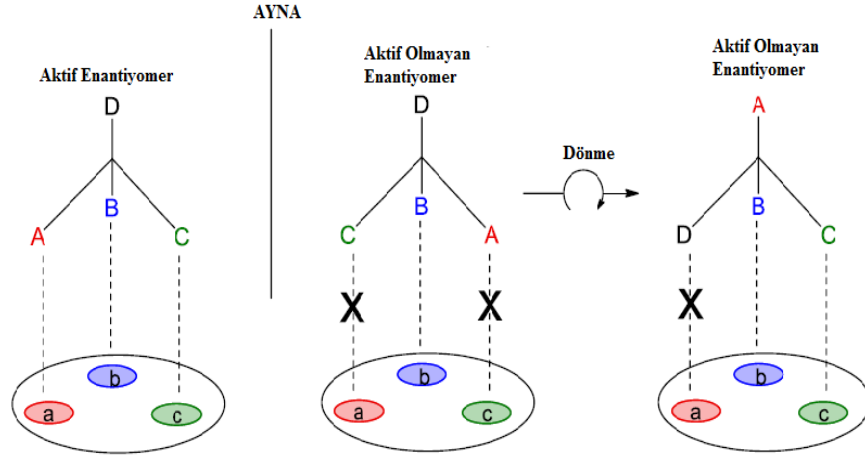
Diğer bir başka örnek ise Karvon bileşiğidir. (*R*)-(-)-Karvon nane kokusu verirken, (*S*)-(+)-Karvon kimyon kokusu verir (Şekil 1.24.). Zencefil ise rasemik Karvon içermektedir.



Şekil 1.24. a: (*R*)-(-)-Karvon; b: (*S*)-(+)-Karvon

1.7. Enantiyomerlerin Farklı Davranışlar Göstermeleri

Enantiyomerlerin biyolojik ortamda farklı davranışlar sergilemesinin nedeni; enantiyomerlerin üç boyutlu yapıda biyolojik sistemlerle farklı etkileşmesinden kaynaklanmaktadır. Bu olay ilk kez 1930'lu yılların başlarında Easson ve Stedmann (1933), tarafından “Üç Noktadan Etkileşim Modeli” ile açıklanmış ve farmakolojik aktivitede, stereokimyasal farklılıkların anlaşılmasına bir temel oluşturmuştur (Şekil 1.25.). Enzim ya da reseptör yüzeyindeki biyolojik olarak aktif bölgeye enantiyomerlerin farklı biyoaffinite gösterdiklerini öne sürmüşlerdir. Biyoaffinitedeki bu farklılığın ortaya çıkmasının başlıca nedeni ise enzim ya da reseptörün eşdeğer olmayan üç noktası ile enantiyomerlerin eşdeğer olmayan üç noktasının farklı şekillerde etkileşmesidir (Easson ve Stedman 1933). Enzimin üç noktası ile aynı anda etkileşen enantiyomer “eutomer” ya da “aktif enantiyomer” olarak isimlendirilmiştir. Enzimin üç noktası ile birebir etkileşmeyen enantiyomer ise “distomer” ya da “aktif olmayan enantiyomer” olarak isimlendirilmiştir.

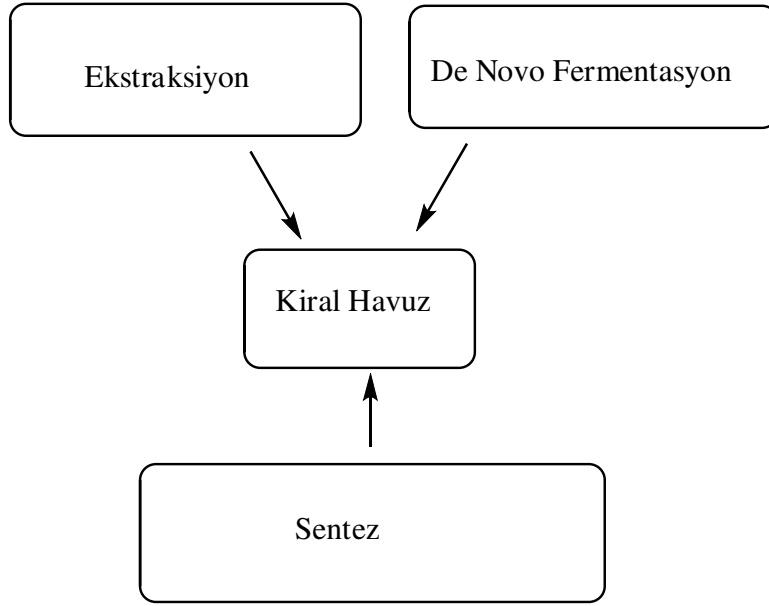


Şekil 1.25. Üç Nokta Etkileşim Modeli

1.8. Kiral Havuz

Doğa, optik olarak saf olmasa da optik olarak aktif materyallerin büyük bir kısmını üretir ve buda asimetrik sentez için başlama noktası olarak kullanılır. Alkoloidler, Terpenler, Şekerler, α -Amino asitler ve α -Hidroksi asitler kiral havuzu oluşturan maddelerdir. Enantiyomerikçe saf bileşikler başlıca üç farklı kaynaktan elde edilir (Sheldon 1993).

- ❖ Birinci kaynak, saf enantiyomer şeklinde doğal olarak var olan karbonhidrat, Terpen ve Alkoloid türevi kiral moleküllerin bitki ve hayvanlardan ekstraksiyon yoluyla elde edilmesidir.
- ❖ İkinci kaynak, ucuz ve bolca bulunan karbonhidrat kaynaklarından De novo fermentasyonu ile mikroorganizmalarca üretilmesidir. De Novo fermentasyon, Laktik asit, Tartarik asit ve L-Amino asit gibi basit yapıları kiral moleküller ile Antibiyotikler, Hormonlar ve Vitaminler gibi daha kompleks moleküllerin önemli üretim kaynağıdır.
- ❖ Üçüncü kaynak, kiral veya prokiral başlangıç maddelerinden kimyasal/biyokimyasal olarak sentezlenmesidir (Şekil 1.26.).



Şekil 1.26. Saf enantiyomerlerin elde edilme yöntemleri

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

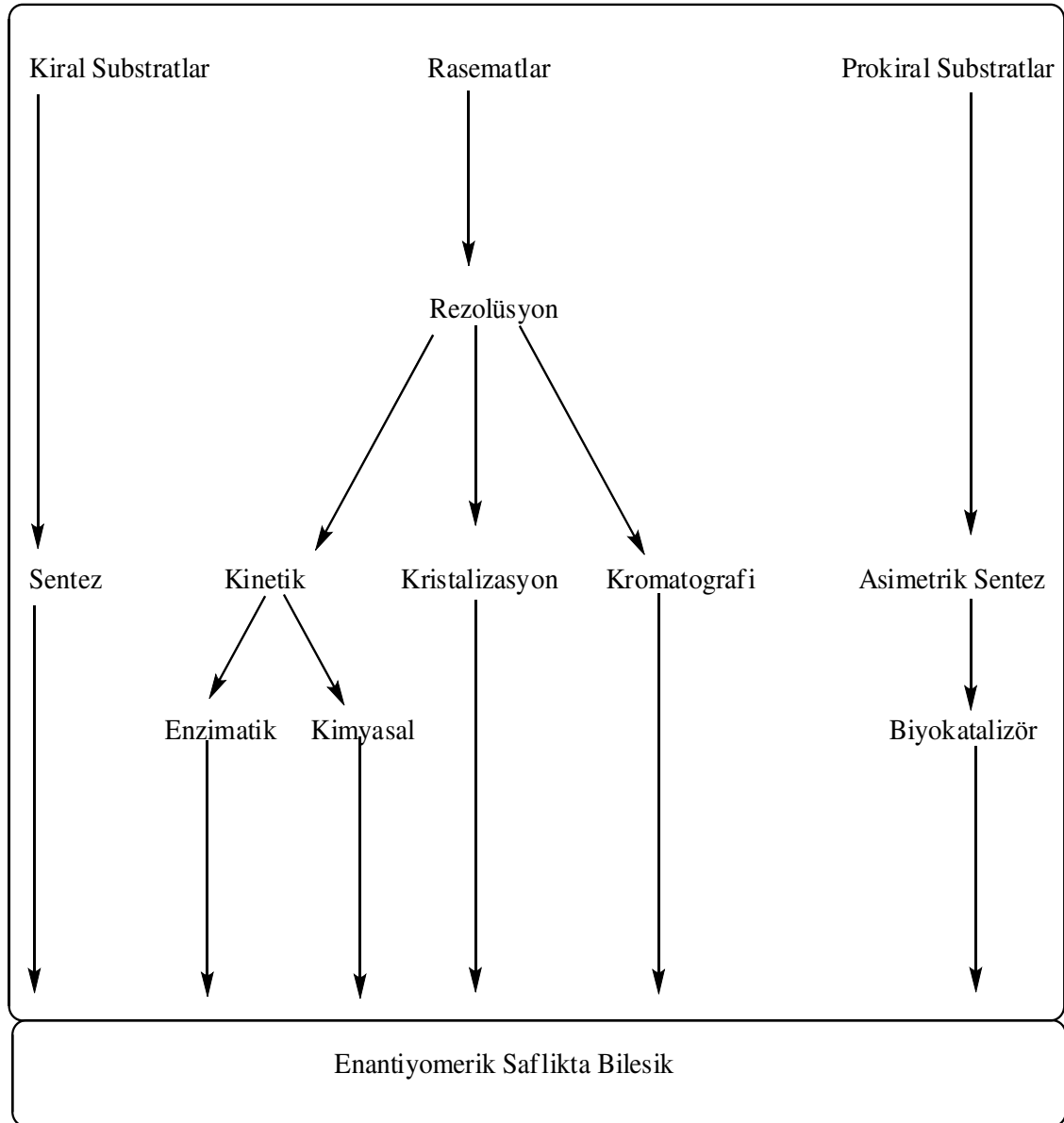
1.9. Optikçe Saf Bileşiklerin Sentezlenme Yöntemleri

Enantiyomerik saflıkta ürün elde etmek için başvurulan yöntemlerden ikisi, rasematların rezolüsyonu ve asimetrik sentezdir (Sheldon 1993, Xin ve ark. 2001, Özcan 2003). Asimetrik sentezdeki önemli gelişmelere rağmen, saf enantiyomerlerin endüstriyel sentezi için başlıca üretim yöntemi rasematların rezolüsyonudur (Ghanem ve Aboul-Enein 2004). Enantiyomerik saflıkta ($ee > \%99$) ya da enantiyomerik açıdan zenginleştirilmiş bileşiklerin sentezinde kullanılan metotlar, genel olarak başlangıç maddesinin türüne bağlı olarak üçe ayrılabilir (Şekil 1.27.). Bu kısımda sadece rasematların rezolüsyon yöntemlerine değinilecektir.

1.9.1. Rasemik Karışımların Rezolüsyonu

Rezolüsyon, bir rasem bileşiğin enantiyomerlerine ayrılma işlemidir. Bunun için kristallendirme başta olmak üzere bir takım fiziksel ve kimyasal yöntem geliştirilmiştir. Rezolüsyonun birçok uygulama alanı vardır. Örnek olarak, ilaç olarak kullanılacak bileşik disimetrik bir molekül ise bunun sadece bir enantiyomeri etkindir, diğer enantiyomerin ilaç etkinliği yoktur veya çok azdır. Böyle bir bileşik kimyasal

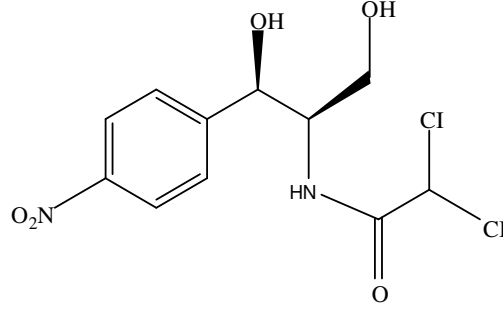
yöntemlerle sentezlendiğinde çoğunlukla rasem şeklinde elde edilir, sonrasında ise rasemik bileşiğin rezolüsyonu yapılarak etkin enantiyomer elde edilir. Enantiyomerlerin rezolüsyonu için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir ve bu yöntemler tercihlili kristalizasyon, diastomerik tuzların kristalizasyonu, kromatografi ve kinetik rezolüsyon yöntemleri olmak üzere dörde ayrılabilir. Tercihli kristalizasyon ve diastomerik tuzların kristalizasyonu klasik rezolüsyon yöntemleri olarak bilinir (Şekil 1.27.). Bu yöntemler arasında, en çok kinetik rezolüsyon tercih edilmektedir (Ghanem ve Aboul-Enein 2004).



Şekil 1.27. Optikçe saf bileşiklerin sentezlenme yöntemleri

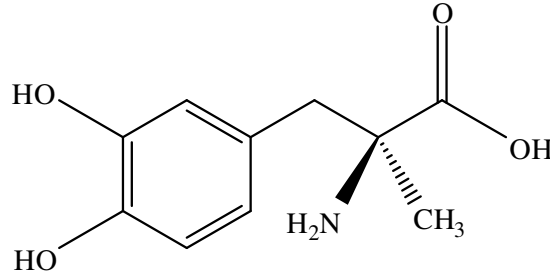
1.9.1.1. Tercihli Kristalizasyon

Tercihli Kristalizasyon; endüstriyel ölçekte yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Örneğin, bakteriyel enfeksiyonların tedavi edilmesi için yararlı bir ilaç olan Kloramfenikol üretimi tercihli kristalizasyon yöntemiyle mümkündür (Şekil 1.28.).



Şekil 1.28. Kloramfenikol

Ayrıca, kalp damar hastalıklarında tedavi edici reaktif olarak kullanılan α -Metil-L-Dopa'da yine tercihli kristalizasyon yöntemiyle elde edilmektedir (Şekil 1.29.).



Şekil 1.29. α -Metil-L-Dopa

Tercihli kristalizasyon yöntemi sadece “Konglomerat” şeklindeki rasematlara uygulanabilir. Konglomerat eşit miktarda iki enantiyomerin kristallerinin mekanik karışımından oluşur. Ancak, tüm rasematların % 20'den daha azı Konglomerat şeklindedir. Geri kalanı gerçek rasemik bileşiklerdir ve tercihli kristalizasyon yöntemiyle ayrılamazlar. Tercihli kristalizasyonun başarısı Konglomerat şeklindeki rasemik karışımın enantiyomerlerden herhangi birinden daha çözünür olmasına bağlıdır.

1.9.1.2. Diastereomerik Tuzların Kristalizasyonu

Bu yöntemin öncülüğünü 1854'te Louis Pasteur yapmıştır. Bu yöntemde rasemat gerçek bir rasemik karışım ise bu durumda Diastereomer kristalizasyon yöntemi kullanılabilir. Su ya da etanol içindeki rasemik karışım çözeltisi saf bir enantiyomer ile reaksiyona girer ve diastereomerik bir tuz karışımı oluşur. Böylece diastereomerik

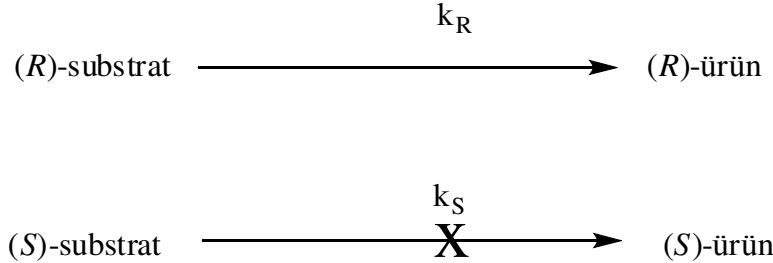
karışım kristalizasyon yoluyla ayrılabilir. Bu yöntemde rasemik karışımın enantiyomerleri önce farklı fiziksel özelliklere sahip diastereomer türevlerine dönüştürülür. Diastereomerleri oluşturan ve oluşan diastereomerleri tekrar enantiyomerlerine dönüştüren tepkimeler basit asit-baz tepkimeleridir. Genellikle optikçe aktif bir baz ile rasemik bir asit tepkimeye girer ve diastereomerik tuzlar oluşur. Bu yöntem kiral amin ve karboksilik asitlerin rezolüsyonunda yaygın olarak kullanılır.

1.9.1.3. Rasemik Bileşiklerin Kinetik Rezolüsyonu

Rezolüsyon, rasemik karışımdan tercih edilen enantiyomerin elde edilmesi işlemidir. Kinetik rezolüsyon, bir kiral reaktif varlığında enantiyomerlerin farklı hızlarda tepkime vermesine dayanır. Bu kiral reaktif, bir biyokatalizör (enzim yada mikroorganizma) veya bir kemokatalizör (kiral asit, kiral baz veya kiral bir metal kompleksi) olabilir ve ortamda katalitik miktarda bulunmalıdır. (Xin ve ark. 2001, Lin ve Tsai 2003, Ghanem ve Aboul-Enein 2004). Kinetik rezolüsyon rasemik karışımdaki enantiyomerlerden birinin diğerinden daha hızlı ürüne dönüşmesi olarak tanımlanabilir. Kinetik rezolüsyon yöntemi ile enantiyomerik saflığı yüksek bileşiklerin elde edilmesinde, çevreye zarar vermemeleri, ılımlı koşullarda tepkimeleri gerçekleştirmeleri, bozunma, izomerizasyon ve rasemizasyon gibi istenmeyen yan tepkimeleri önlemeleri, yüksek tepkime verimi sağlamaları ve seçici olmalarından dolayı enzimler tercih edilmektedir. Bu nedenlerle biyokatalitik olarak farmasötik ürünlerin sentezi ve optik olarak saf ilaçların stereoseçimli sentezi ile elde edilmesi için katalizör olarak enzim kullanımı büyük ölçüde önem kazanmış ve biyolojik katalizörlerin kullanıldığı çalışmalar giderek artmıştır. Ayrıca, enzim biyokatalizörlüğünde kinetik rezolüsyon ile saf enantiyomerlerin eldesinin ekonomik olması, bu yöntemi diğer yöntemlere göre daha tercih edilir hale getirmiştir (Suan ve Sarmidi 2004).

1. GİRİŞ

Rasemik bileşiklerin kinetik rezolüsyonu lipazların katalizlediği dönüşüm tepkimelerinden en yaygın olanıdır ve lipaz enzimi rasemik karışımdaki iki enantiyomer arasında ayırım yapabilir (Şekil 1.30.).

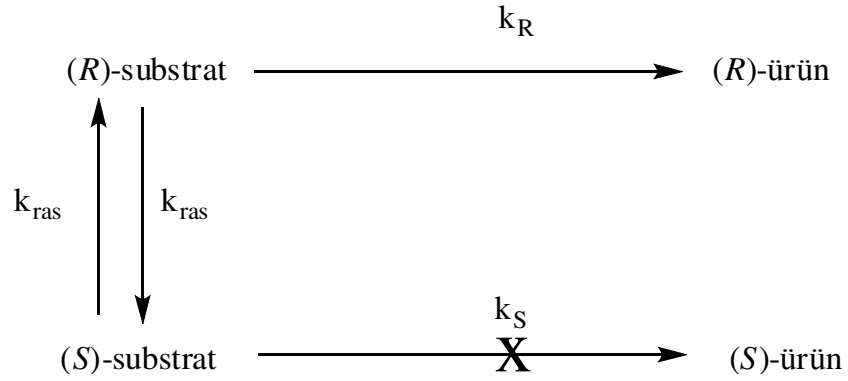


Şekil 1.30. Katalitik kinetik rezolüsyon

Kinetik rezolüsyon ancak $k_R \neq k_S$ olduğu durumda gerçekleşir ve tepkimedeki dönüşüm % 0 ve % 100 arasında bir değere ulaştığında durdurulur. İdeal durumda bir enantiyomer diğerinden daha hızlı tepkimeye girer, örnek verilecek olursa tepkime girdisi (R) tepkimeye giren tek enantiyomerdir ($k_S=0$). Bu durumda enantiyomerlerin birbirine oranı eşit (1:1) olduğu rasemik karışımda % 50 dönüşüme ulaşıldığında karışım içinde % 50 girdi (S) ve % 50 ürün (R) kalır. Bu yöntem tek bir enzim kullanılarak iki enantiyomerin kolay şekilde ayrılmasında avantaj sağlar. Yaygın olarak kullanılan bir rezolüsyon türüdür ve enantiyomerik saflıkta ya da bir enantiyomerce zenginleştirilmiş bileşiklerin elde edilmesinde etkin bir yoldur. Ancak, bu prosesinde iki enantiyomerin ayrılmasında maksimum % 50 verimle enantiyomerik saflıkta bileşik elde edilebilir. Bu kısıtlama ile mezo bileşikler ya da prokiral substratlar kullanılarak, istenmeyen enantiyomerin stereo dönüşümü, rasemizasyonu, istenmeyen enantiyomerin geri döndürülmesi ve dinamik kinetik rezolüsyon gibi farklı yöntemler kullanılabilir (Ghanem ve Aboul-Enein 2004).

Dinamik kinetik rezolüsyonda enzim katalizli kinetik rezolüsyon ile rasemizasyon birlikte gerçekleştirilir. Yaygın olarak kullanılan kinetik rezolüsyon ve dinamik kinetik rezolüsyonda (R)-enantiyomeri (S)-enantiyomerinden daha hızlı (R)-ürününe dönüştürülür ($k_R > k_S$). Dinamik kinetik rezolüsyonun tek farkı (S)-enantiyomeri rezolüsyon prosesi süresince izomerleşir, böylece başlangıç (R) substratının tamamı ürününe (R) dönüşebilir ve $k_{ras} \geq k_R$ olmalıdır. Maksimum verim % 100 verime ulaşılabilir ve rasemizasyon için kimyasal katalizör olarak baz veya asit biyolojik

katalizör olarak rasemazlar kullanılabilir. Şekil 1.31.'de şekilsel gösterimi verilmiştir (Strauss ve ark. 1999, Xin ve ark. 2001, Lin ve Tsai 2003, Ghanem ve ark. 2010).



Şekil 1.31. Dinamik kinetik rezolüsyon

1.9.1.4. Kromatografi

Kolon kromatografisinde kolon dolgu maddesi olarak optikçe aktif katı maddeler (glikoz, sakkaroz, laktoz gibi şekerler) kullanıldığında kolondan rasem bir bileşiğin çözeltisi geçirildiğinde, enantiyomerlerden biri diğerinden daha güçlü tutulur ve rezolüsyon gerçekleşir. Kolon uzunluğu yeterli ise toplanan çözeltide sadece bir enantiyomer bulunur. Kolonda tutulmuş olan diğer enantiyomer ise başka bir çözücü ile alınabilir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Enzimler ve Genel Özellikleri

Enzimler, karbon, oksijen, hidrojen ve azot içeren, canlı hücrede meydana gelen belirli bir kimyasal reaksiyonu katalizleyen ve düzenleyen, reaksiyondan bozulmadan ve değişikliğe uğramadan çıkabilen, protein yapısında biyolojik katalizörlerdir. Organizmada bulunan organik moleküllerin yapımı, yıkımı, kas hareketleri ve solunum gibi fizyolojik olaylar enzimlerin yardımıyla yürütülmektedir (Telefoncu ve ark. 1990, Tutar 2009, Yılmaz 2010).

Geçmiş dönemlerde enzimlerden; ekmek, peynir, şarap vb. maddelerin yapımında ve ayrıca ilaç olarak yararlanılmıştır. Enzimlerin hücre dışında aktivite gösterdiğini ilk kez 1783 yılında Spallanzi, atmaca mide suyunun eti çözebildiği göstererek kanıtlanmıştır. Enzimler için “ katalizatör” sözcüğünü ilk kez 1838 yılında Berzelius, “enzim” sözcüğünü ise 1878 yılında Kühne kullanılmıştır. Enzimler konusundaki araştırmalarda diğer önemli bir adım, 1926 yılında Summer’ın Üreaz enzimini kristalize formda elde etmesiyle atılmıştır. Sonraki yıllarda ise Northop ve arkadaşları bazı proteolitik enzimlerin izolasyon-saflaştırma ve kristalizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. 1940’lı yıllarda çok az sayıda enzim saflaştırılmışken, bu sayı yaklaşık 40 yıl sonra yaklaşık 200 kristallendirilebilen ve 1500 yüksek düzeyde saflaştırılmış enzime ulaşmıştır (Telefoncu ve ark. 1990, Tutar 2009, Yılmaz 2010).

Enzimler, biyolojik sistemlerdeki reaksiyonları canlılığa zarar vermeyecek şekilde ve ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan biyokatalizatörlerdir. Günümüzde, enzimlerden doğal ortamlarının dışındaki pek çok alanda yararlanabilme imkânı bulunmaktadır. Enzimleri inceleyen enzimoloji bilim dalı, başta biyokimya ve moleküler biyoloji olmak üzere bakteriyoloji ve mikrobiyoloji, genetik, patoloji, tıp ve biyoteknoloji gibi bilim dalları ile çeşitli endüstriyel alanlar için büyük önem taşımaktadır (Tutar 2009, Yılmaz 2010).

Enzimler hücre içinde ve hücre dışında aktivitelerini korurlar. Aynı enzim farklı hücre veya doku tiplerinde de katalizör görevi üstlenebilir. Bu durumda, aynı

2. KAYNAK ÖZETLERİ

mikroorganizma tarafından farklı genlerle kodlanan, ancak görevi aynı ya da benzer olan “izoenzimler”den söz edilebilir. Bu farklı enzim formlarının tümü aynı reaksiyonu katalizlerler ve bu nedenle de aynı enzim gibi sınıflandırılırlar. İzoenzimler pH, ısı ve ışık gibi değişik şartlarda bile aynı etkiyi gösterirler. İzoenzimlerin protein yapısı birbirlerinden küçük farklar gösterir, dolayısıyla bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri de farklıdır. Ancak elektroforez ve kromatografik yöntemler ile birbirlerinden ayrılabilirler (Erdem 2008).

Enzimlerde, protein kısmından başka protein olmayan ve kofaktör denilen bir kısım bulunur. Kofaktörler birçok enzimin katalitik aktivite gösterebilmesi için gerekli olan maddelerdir. Kofaktör bir metal iyonu olabildiği gibi, koenzim denilen kompleks yapıda bir organik bileşik de olabilir. Bazen enzimin aktivite göstermesi için ikisi de gereklidir. Enzimler yüksek sıcaklıkta denatüre olurken, kofaktörler yüksek sıcaklığa karşı dayanıklıdır. Katalitik olarak aktif olan enzim-kofaktör kompleksine “holoenzim” adı verilir. Kofaktörsüz proteine ise “apoenzim” denilir. Apoenzim katalitik olarak inaktiftir. Enzim molekülü üzerinde kofaktör ve koenzimlerin yer aldığı ve yapısında ancak özgün substrat moleküllerinin bağlanabildiği, katalizden sorumlu bir bölge vardır. Bu bölgeye enzimin “aktif bölgesi” denir. Aktif merkezde substrat bağlanma merkezi ve bir veya daha fazla katalitik aktivite bölgeleri mevcuttur. Buralar, aminoasit kalıntılarından oluşmuş ve özel geometrisi olan yerlerdir. Bu nedenle, enzimler özgünlüğü oldukça fazla olan biyokatalizörlerdir. Her enzim, gösterdiği aktivite ile değerlendirilir. Enzimler, biyokatalizör olarak kimyasal tepkimelerin dengeye ulaşmasını çabuklaştırırlar. Örneğin; canlı bir sistemde, bir asit ve alkolden ester oluşum tepkimesinde dengeye ulaşma, ortamda enzim yokluğunda son derece yavaş olur. Asit ve alkol molekülleri (substratlar), ester oluşum tepkimesini verebilmek için, öncelikle kararlılığı düşük olan geçiş hali ürünü (enzim-substrat kompleksi) oluştururlar. Ester oluşumu için bu ara ürünün, geçiş haline karşılık gelen bir enerji engelini aşması gerekir. Eğer ara ürün enerji yüksekliğini ya da engelini aşacak yeterli enerjiye sahipse tepkime gerçekleşir. Bu enerji enzimatik tepkimenin “aktivasyon enerjisi” olarak tanımlanır. Aktivasyon enerjisi ne kadar küçükse tepkime o kadar kolay ve hızlı olur. İşte enzimler; kolaylaştırdıkları tepkimenin hızını, onun aktivasyon enerjisini düşürerek artırır. Enzim katalizli bir tepkimenin hızını, enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu, pH, sıcaklık, zaman, ışık ve diğer fiziksel

faktörler, iyonların doğası ve konsantrasyonu, hormonlar ve diğer biyokimyasal faktörler ve reaksiyon ürünleri gibi birçok faktör etkilemektedir (Karaca 2006, Nalbantoğlu 2012).

Enzimler biyokatalizörlerdir ve kimyasal katalizörlere göre birçok üstünlükleri bulunmaktadır. Enzimlerin bu üstünlükleri aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

- ❖ Enzimler, reaksiyonun tipine ve substrata karşı son derece spesifikdir (tepkime spesifikliği). Doğal substratlarla sınırlı değildirler ve organik bileşiklere de uygulanabilirler. Bu nedenle enzimatik reaksiyonlarda yan ürün oluşmaz. Verim %100'dür. Yani, enzim bir tek biyotransformasyon tepkimesi gerçekleştirir.
- ❖ Enzimler, kimyasal katalizörlere göre reaksiyonu 10^8 – 10^{11} kez daha hızlı gerçekleştirirler.
- ❖ Enzimler, fizyolojik pH, sıcaklık ve basınçta çalışabilmeyi sağlarlar. Ayrıca, reaksiyonun aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonun daha düşük enerjili ve daha düşük sıcaklıkta gerçekleştirilmesini sağlarlar.
- ❖ Enzimlerin çok çeşitli doğal kontrol mekanizmaları vardır. Enzimlerin aktivitesi içerisinde bulundukları şartlara göre düzenlenebilir. Ortamdaki kontrol edici küçük moleküllere göre de enzim aktivitesi azalabilir ya da artabilir.
- ❖ Enzimler immobilize edildiklerinde, reaksiyon ortamından geri kazanılarak tekrar kullanılabilme özelliğine sahiptirler.
- ❖ Enzimler, proteolitik enzimlerin, regioselektif, diastereoselektif ve enantioselektif özellik gösterme özelliğine sahiptirler (Tutar 2009, Yılmaz 2010).

2.1.1. Lipaz Enzimleri (Triaçilgliserol Ester Hidrolaz, EC 3.1.1.3)

Lipaz enzimleri, triaçilgliseroller ve yağ asitleri ve gliserole hidroliz etme özelliğine sahip olan enzimler olup bitkilerde, hayvanlarda ve mikroorganizmalarda bulunurlar. Lipazların büyük çoğunluğu suda çözünebilirler ve bu enzimler suda çözünmeyen substratlar üzerinde etkin rol oynarlar. Biyoteknoloji alanındaki çalışmalarda çok amaçlı kullanılabilirlikleri, spesifikliğin olmadığı kimyasal proseslere spesifiklik kazandırılmaları, çok çeşitli substratları kullanabilme yeteneğine sahip olmaları nedeniyle biyoteknoloji ve diğer ilişkili alanlarda yeri ve önemleri gittikçe artmaktadır. Ayrıca, çok yüksek sıcaklık ve pH'da ve organik çözücülere karşı yüksek kararlılık göstermeleri, yan reaksiyonu önlemeleri ve reaksiyon ürünlerinin ayrılmasıyla

2. KAYNAK ÖZETLERİ

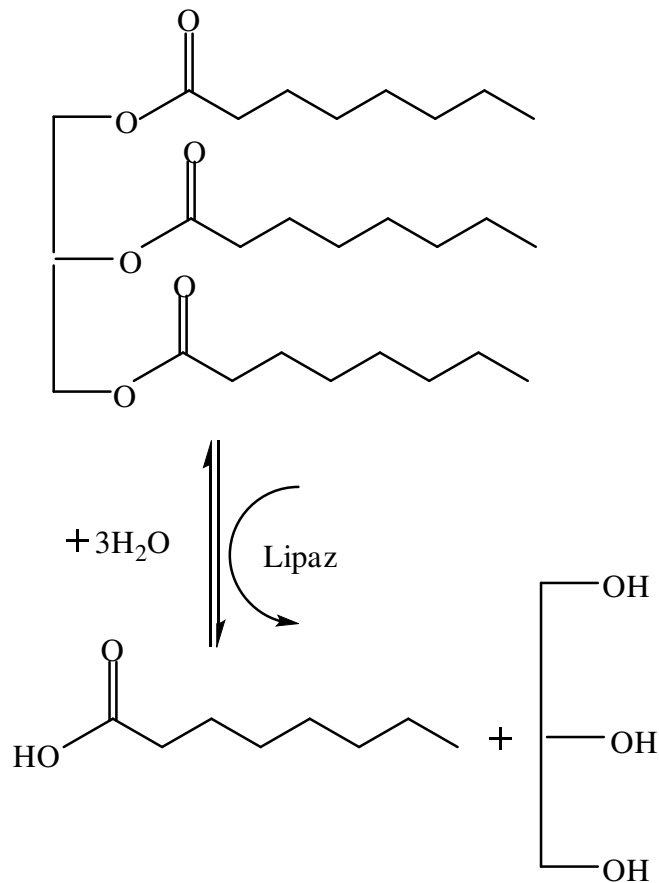
ilgili problemleri kolaylaştırmaları gibi birçok özellikleri nedeniyle her geçen gün bu enzimlere karşı artan bir ilgi ve talep vardır (Aksoy 2003, Hung ve ark. 2003, Zaitsev ve ark. 2003, Akkuş 2006, Karaca 2006).

Günümüzde enzimlerin kullanıldığı pek çok farklı alanda lipaz enzimlerinin önemi giderek artmaktadır. Lipazların enzim pazarındaki payının büyümesinde, bu enzimlerin enantiyoseçicilik, bölgesel seçiciliği ve geniş substrat aralığı gibi sahip oldukları özellikleri etkili olmuştur. Ayrıca, lipazların diğer enzimlere göre göze çarpan önemli özelliklerinden biri de hem sulu hemde organik fazların ara yüzeyinde reaksiyon vermeleridir ki bu özellikleriyle de esteraz enzimlerinden ayrılmaktadırlar (Akkuş 2006). Lipaz enzimleri, su fazı ile organik faz ara yüzeyinde aktif bölgelerini kapatan kapakçığın açılması ile aktif hale gelirler. Bu nedenle lipaz katalizli tepkimeler, iki fazlı bir sistemde ya da suyla doymuş organik bir çözücünde gerçekleştirilebilir (Bakkal 2006). İki fazlı sistemler; yüksek substrat çözünürlüğü, biyokatalizör ve ürünün kolay uzaklaşabilmesi, substrat ve ürün inhibisyonunun az olması gibi sebepler nedeniyle tercih edilmektedirler. Organik çözücü ve suyun karışmadığı iki fazlı sistemde gerçekleşen hidroliz tepkimelerinde, girdi (substrat) organik bir çözücünde çözünmekte, tepkime, su-organik çözücü ara yüzeyinde gerçekleşmekte ve oluşan ürün suda çözünmektedir (Mutlu 2006).

Ayrıca, ticari olarak kolay bulunabilir olmaları gibi üstünlükleri nedeniyle de diğer enzimlerden ayrılmaktadır. Sahip oldukları bu özellikleri nedeniyle lipaz enzimleri, günümüzde, organik kimyacıların, eczacıların, biyokimya, mikrobiyolog ve biyokimyacıların üzerinde yoğun çalıştıkları enzimler arasında yer almaktadır. Günümüzde endüstriyel biyoteknoloji alanında kullanılan enzimlerin % 25'ini lipaz enzimleri oluşturmaktadır. Rasemik bileşiklerin kinetik rezolüsyonunda en çok kullanılan enzimler, lipaz enzimleridir (Kim ve ark. 2000, Lee ve ark. 2001, Ghanem ve Aboul-Enein 2004).

Lipaz enzimleri hayvan, bitki ve mikroorganizma kökenli olabilirler. Mikroorganizmalardan başlıca bakteri ve mantardan elde edilmektedirler. Günümüzde, lipazlar çoğunlukla organik kimya ve biyoteknolojik uygulamalarda biyokatalizör olarak kullanılır (Jaeger ve Reetz 1998, Gao ve ark. 2000).

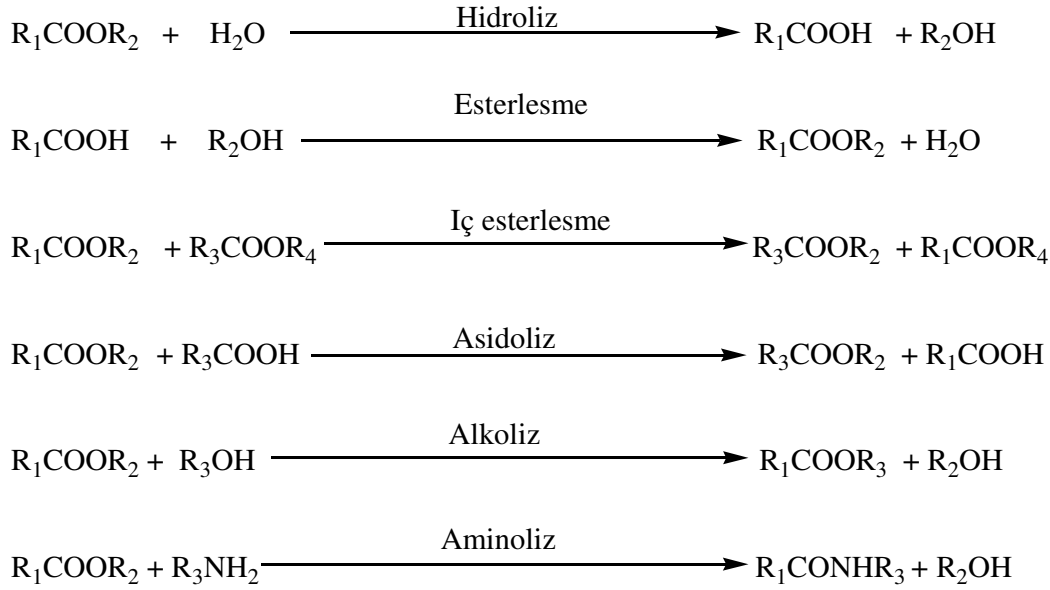
Lipazlar hidroliz, esterifikasyon, interesterifikasyon, asidoliz ve aminoliz gibi çok farklı biyodönüşüm tepkimelerini gerçekleştirebilme yeteneği olan çok amaçlı biyolojik katalizörlerdir. Lipazlar ılımlı tepkime koşulları altında aktivite gösterirler. Organik çözücülerde kullanılabilirler ve spesifik reaksiyonlarda seçicilik gösterirler. Etkin olduğu hidroliz reaksiyonu genel olarak aşağıda Şekil 2.1.'de verildi.



Şekil 2.1. Triaçilgliserol'ün hidrolizi

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Şekil 2.2.'de ise lipaz enzimlerinin katalizlediği tepkimelerin şematik gösterimi verilmiştir (Zaitsev ve ark. 2003, Yılmaz 2010).



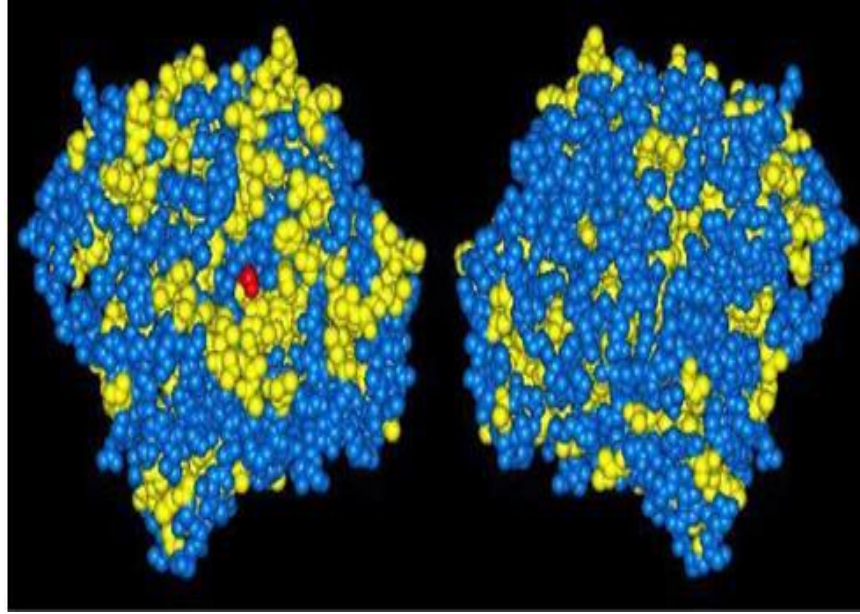
Şekil 2.2. Lipaz enzimlerinin katalizlediği tepkimeler

Lipazlar, biyokatalizörler içerisinde önemli bir yer almakta ve biyoteknolojik uygulamalarda yüksek oranda kullanılmaktadır (Ghosh ve ark. 1996, Benjamin ve Pandey 1998). Lipazlar, hem sulu hem de organik çözücü sistemlerinde aktivite gösterdikleri için endüstride ve tıp alanında önemli bir yere sahiptirler (Gupta ve Gupta 2005). Bu enzimlerin lipit içeren atık suların enzimatik degradasyonu, organik sentez, deterjan formülasyonu, biyosurfektanların sentezi, oleokimyasal endüstri, süt endüstrisi, agrokimyasal endüstri, kâğıt yapımı, besin, kozmetik, kimyasal analiz ve ilaç prosesinde umut verici uygulama alanları bulunmaktadır. Lipaz teknolojisindeki gelişmelerle birlikte yeni bileşiklerin sentezi için de bu enzimlerin kullanımları hızla artmaktadır (Ghosh ve ark. 1996). Mikrobiyal lipazların, biyosensör olarak kullanılmaları ise yeni bir alan olarak ümit vaat etmektedir (Jaeger ve Reetz 1998).

2.1.1.1. Ara Yüzeysel Aktivasyon

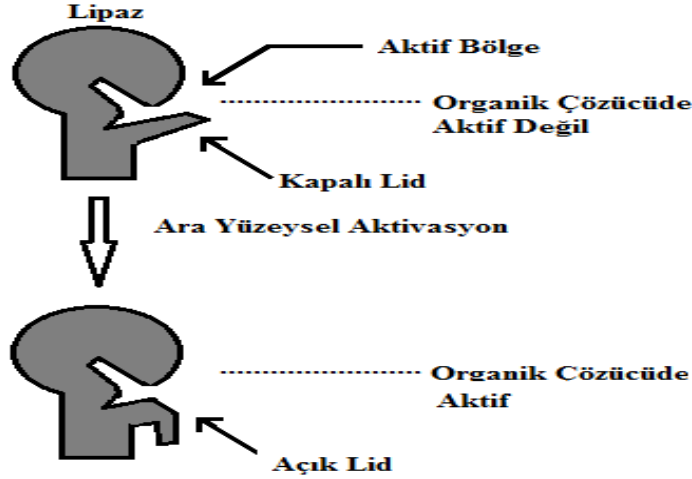
Lipaz enzimlerinin doğal substratları özellikle su içerisinde çözünmez, dolayısıyla da reaksiyon su fazı-organik faz ara yüzeyinde kataliz edilerek gerçekleştirilir (Derewenda ve Sharp 1993). Çoğu lipaz enzimin katalitik etkinlik mekanizması X-ray kristalografi çalışmaları ışığında “ara yüzeysel aktivasyon” olarak adlandırılan bir adımı içermektedir. Lipaz enziminin aktif bölgesi, polipeptit zincirinin

sarmal bölümü ile oluşan bir “kapak” (lid) ile polar çözücülerden izole edildiği için, homojen sulu ortamda bu enzimler kapalı formda (pasif konformasyonda) bulunurlar (Secundo ve ark. 2006). Şekil 2.3.’de CRL enziminin aktif bölgesi kırmızı ile gösterilmiştir.



Şekil 2.3. CRL enzimi

Bu kapağın iç tarafı aktif tarafın hidrofobik bölgesine karşılık gelen non-polar amino asitlerden oluşmaktadır (Şekil 2.4.). Fakat ikinci bir lipidik faz varlığında, lipaz ara yüzeyinde adsorplanır. Kapak, konformasyonel değişikliğe uğrar ve bu durum enzimin hidrofobik kısmını açığa çıkarır ve böylece enzim substratla, non-polar çözücü ile veya bir hidrofobik polimer taşıyıcı ile etkileşebilecek hale gelir (Gonzalez-Navarro ve ark. 2001). Lipaz enzimleri α/β kıvrımlarına sahip monomerik proteinlerdir. Bu yapıda β yaprağı α sarmalları ile çevrelenmiştir (Tyndall ve ark. 2002). Lipaz enzimlerinin katalitik merkezi Serin, Aspartik asit (veya Glutamin) ve Histidin üçlüsünden oluşur. Katalitik serin kalıntısı bir klasik pentapeptittir. Diğer klasik yapısal element amit (-NH) gruplarından oluşmuş oksianyon oyuğudur. Oksianyon oyuğu, ara yüzeysel aktivasyona maruz kalan lipazlarda kapalı konformasyondan açık konformasyona geçerken meydana gelir (Uyanık 2011).



Şekil 2.4. Aktif bölgenin ara yüzeyinde enzimin etkin hale dönüşmesi

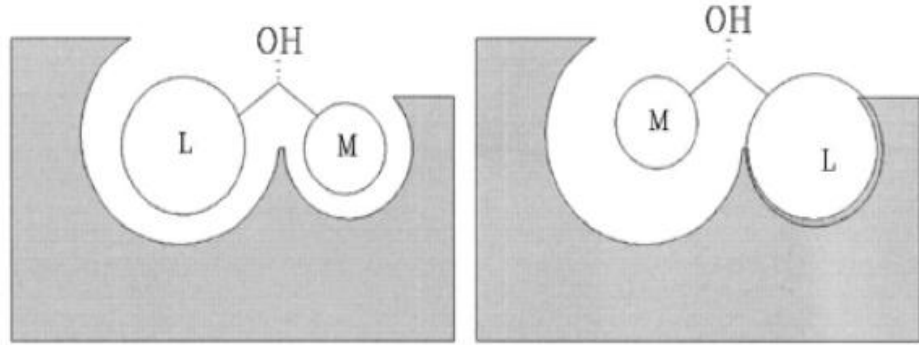
2.1.2. CRL ve Kullanım Alanları

Mikroorganizmalar tarafından üretilen hücre dışı lipazların (EC 3.1.1.3) biyoteknolojik proseslerde birçok farklı kullanım alanları bulunmaktadır (Benjamin ve Pandey 1998). Spor üretmeyen, pseudofilamentous, tek hücreli ve patojenik olmayan maya, *Candida rugosa*'yı sentezlemektedir (Lotti ve ark. 1993).

CRL iç-esterifikasyon, trans-esterifikasyon stereospesifik ve spesifik olmayan hidroliz reaksiyonlarında kullanılır. Şimdiye kadar, CRL niteliğinde olan geniş bir spesifiklik aralığına sahip (substrat, pozisyonel, yağ asidi ve sterotercih) hiçbir lipaz enzimi araştırmacılar tarafından bulunmamıştır. Primer ve sekonder esterler veya gliseritlerde ester bağlarına karşı genel bir ayırım özelliği vardır. Enzimlerin artan fiyatları karşısında bunlar uzun süreli kullanım için, dayanıklılık ve ucuz destek maddelerine immobilize edilerek kullanılmaktadır (Benjamin ve Pandey 1996).

1994 yılında, CRL'nin neden (S)-stereospesifikliği sahip olduğunu açıklamaya yönelik bir çalışma yayınlandı. Bu çalışmada, CRL'nin üç boyutlu yapısı incelendiğinde, lipazın enantiyoseçiciliğinin aktif bölgelerinde bulunan ve büyüklükleri birbirinden farklı 2 cep ile ilişkili olabileceği kanaati oluşmuş ve iyi bir enantiyoseçicilik için asimetrik karbon atomuna bağlı grupların (L ve M) büyüklüklerinin birbirinden farklı olması gerektiğini bildirmişlerdir. Bu şekilde gösterildiği gibi enantiyomerin aktif bölgeye uyumlu bir biçimde bağlanması daha hızlı bir biçimde reaksiyona girmesine neden olmaktadır. Protein yapısındaki enzimlerin

aktif merkezlerinin üç boyutlu yapısı (Şekil 2.5.) enantiyomerlerden yalnızca biri ile uyum içindedir (Ghanem ve Aboul-enein 2005).



Şekil 2.5. Enantiyomerlerin lipazın aktif bölgesine bağlanmaları

2.1.3. Enzim İmmobilizasyonu

2.1.3.1. İmmobilize Enzim Olgusunun Doğuşu

Enzimler sahip oldukları fonksiyonel gruplar ($-NH_2$, $-COOH$) sayesinde suda çözünme özelliğine sahip spesifik biyokatalizörler olarak tanımlanabilir. Endüstriyel uygulamaların büyük çoğunluğu sulu çözeltilerde gerçekleştirilmektedir (Mutlu 2006). Bu endüstriyel uygulamalarda katalizör olarak kullanılan serbest enzimin aktivitesini yitirmeden geri kazanılması olanak dışıdır. Reaksiyonun gerçekleştiği anda, ortamdan serbest enzimin istenilen anda uzaklaştırılamaması nedeniyle reaksiyonun kontrolü oldukça çok güçtür. Enzimatik tepkimenin istenilen zamanda durdurulması için reaksiyon ortamına inhibitör katılabilir, fakat ortama inhibitör eklenmesi serbest enzim tarafından kirletilmiş olan reaksiyon ürünlerine yeni bir kirlilik unsurunun eklenmesi demektir. Bu eklenmiş kirlilik unsurlarından ürün veya ürünlerin arıtılması maliyeti çok yükseltmektedir. Reaksiyon ortamından serbest enzimi aktivitesini yitirmeden uzaklaştırmak olanaksız olduğundan enzimin yeniden kullanılması da söz konusu değildir. Bu ise enzimlerin çok spesifik; ama o ölçüde de pahalı katalizör olmaları nedeniyle maliyeti yükselten önemli bir etmen olarak söylenebilir. Serbest enzimlerin sahip oldukları bu özelliklerinden dolayı sürekli sistemlere de uygulanmaları mümkün değildir. Ayrıca, enzim üretiminde hammadde sorunu ise mikrobiyal kaynaklar sayesinde büyük ölçüde çözülmüş olmakla birlikte enzimlerin mikrobiyal kaynaklardan saflaştırma işlemleri oldukça zahmetli ve masraflı basamaklardan oluşmaktadır (Aksoy 2003, Alptekin 2009, Yılmaz 2010).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Enzimlerle ilgili sıralanan bütün sorunlar pozitif olarak çözümleyebilmek, biyoteknolojide çeşitli amaçlarla kullanılmaya başlanan enzimleri endüstri için daha çekici hale getirmek gerekmektedir. Bilim adamları bu katalizörlerin daha ekonomik ve kullanışlı hale getirilme olanaklarının araştırılmasına yönelmişlerdir. Böylece enzimlerin ısısal mekanik ve kimyasal kararlılıklarını artırmak ve birçok kez kullanabilir kılma düşüncesi, immobilize enzim olgusunun doğmasına sebep olmuştur (Hung ve ark. 2003, Chiou ve Wu 2004, Cao 2005, Guisan 2006).

2.1.3.2. Enzimlerin İmmobilizasyonu

Tarihte bilinen ilk enzim immobilizasyonu Nelson ve Grifin (1916) tarafından adsorpsiyon yöntemiyle gerçekleştirilmiş olup modern anlamda ise ilk olarak; Grubhofer ve Schleith (1953), tarafından bazı immobilize enzim türleri hazırlanarak kinetik parametreleri incelenmiştir. Daha sonraki yıllarda bu alandaki çalışmalar dünyanın her tarafından bilim adamlarının ilgisini çekmiş ve çok sayıda değişik enzim farklı destek maddelerine değişik amaçlarla immobilize edilmiştir (Manecke ve Singer 1960, Yılmaz 2010).

İmmobilizasyonun kelime anlamı, hareketsiz hale getirmek, kımıldatmamak anlamına gelmektedir (Gezer 2009). İmmobilizasyon, enzimlerin suda çözünmeyen bir katı destek maddesine fiziksel veya kimyasal olarak bağlanmasıyla, suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona, enzim molekülünün monomer olarak katılması ve suda çözünmeyen bir matriks veya suda çözünmeyen mikrokapsüllerde tutuklanmasıdır (Klibanov 1989).

Her enzim için bir ideal taşıyıcı olduğunu ve immobilizasyon yöntemi seçiminde ise bilimsel standartların oluştuğunu söylemek şu an mümkün değildir. Destek maddesi ve immobilizasyon yöntemi seçilirken; hem immobilize enzimin karakteristikleri ve kullanılması planlanan alan hem de seçilen yöntem ile destek maddesinin kombinasyonunun sınırlamalarının ve özelliklerinin uyumuna dikkat edilmesi gerekir. Enzim immobilizasyon teknolojisi başta kimya olmak üzere biyokimya ve hücre biyolojisi disiplinleri ile biyokimyasal ve proses mühendisliklerinin ortak bir araştırma alanıdır (Aktaş 2004, Tutar 2009).

2.1.3.3. İmmobilize Enzimlerin Üstünlükleri

İmmobilizasyon işleminin sonunda; immobilize edilen enzimin optimum sıcaklığında artışlar olabilir ve optimum pH'sıda değişebilir. Ayrıca, K_m değerleri immobilizasyondan etkilenebilir. Matriks, enzim için yeni bir ortam oluşturarak enzimin aktivitesini değişik yollarla etkiler. Enzimin aktif bölgesi değişikliğe uğrayabilir veya matriks substratın hareketini engelleyebilir. İmmobilizasyon işlemi ekonomik yönden avantajlar sağlar. Kullanılan immobilizasyon tekniği hangisi olursa olsun immobilize edilen enzimlerin serbest enzimlere göre birçok üstünlükleri vardır. Bu da enzimlerin kesikli veya sürekli işlemlerde kullanımını kolaylaştırmaktadır (Çizelge 2.1.). İmmobilize edilen enzimlerin serbest enzimlere göre üstünlükleri sıralanmıştır (Aksoy 2003, Karaca 2006, Yılmaz 2010).

Çizelge 2.1. İmmobilize enzimler ile serbest enzimlerin karşılaştırılması

Serbest Enzim	İmmobilize Enzim
Reaksiyon sonunda ortamdan uzaklaştırılması güçtür.	Süzme ve santrifüjleme gibi basit yöntemlerle ortamdan kolayca ayrılırlar.
Ürünlerde az da olsa kirlilik yaparlar.	Tamamen ayrıldığından ürünlerle kirlilik meydana gelmesi söz konusu olamaz.
Çevre şartlarından kolayca etkilenirler.	Çevre koşullarına karşı serbest enzimlerden daha dayanıklıdır.
Her örnek bir kere ve kısa süre için kullanılabilir.	Her örnek birçok kez kullanılabilir ve serbest enzime göre daha uzun süre depolanabilir.
Kararsız ve dayanıksızdır.	Daha dayanıklı ve kararlıdır.
çok adımlı reaksiyonlarda kullanılamaları mümkün değildir.	Birbirini izleyen çok basamaklı reaksiyonlarda kullanılmaları uygundur.
Aktivitelerini çabuk kaybeder	Aktivitelerini hemen kaybetmezler
Kendi kendini parçalama özellikleri bulunmaktadır.	Kendi kendini parçalama (otokataliz) özellikleri minimuma indirgenir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

İmmobilize enzimlerin, proses koşullarında aktif olduğu süre, serbest enzime göre daha yüksektir. Böylece işlem süresi kısalmış ve daha fazla saf ürün elde edilir (Telefoncu ve ark. 1990). İmmobilizasyonun bu kadar çok avantajı olmasına rağmen bazı dezavantajları da vardır. Sırasıyla;

- İmmobilizasyon sırasında sıcaklık değişimi, pH değişimi ve serbest radikallerin oluşması gibi faktörler enzimin denatüre olmasına, dolayısı ile aktivitesini kaybetmesine yol açar. Bu nedenle enzim immobilizasyonu sırasında aktif grupların korunması için immobilizasyon işleminin uygun koşullarda (oda sıcaklığı, nötral pH vb.) gerçekleştirilmesi çok önemlidir.
- Çok basamaklı immobilizasyon işlemlerinde enzimin kararlılığı sınırlıdır.
- Bazı enzim taşıyıcılarının maliyeti diğerlerine göre çok yüksektir.

İmmobilizasyon işlemleri sırasında enzimin yapısı konformasyonel değişikliğe uğrayabilir. Farklı sebepler, immobilize enzimin zincir hareketlerini değiştirebilir. Bunlar, immobilizasyonda kullanılan kimyasalların tipi, destek maddesi ile enzimin karşılıklı etkileşmesi, aktifleştirici veya çapraz bağlayıcı kimyasallar ile enzimin etkileşmesi olarak sıralanabilir (Tutar 2009). Aktifleştirilmiş taşıyıcı katı destek maddelerine enzimlerin immobilizasyonunda, düşük immobilizasyon etkinliği ve enzim kararlılığında artış veya azalış meydana gelebilmektedir. Ayrıca, enzim immobilizasyonu enzimin etrafındaki mikro çevreyi etkileyebilir ve enzim davranışları üzerinde aşağıda belirtildiği gibi bazı değişiklikler meydana gelebilir (Alptekin 2009). Bu değişiklikler sırayla;

- ✓ **Bölme Etkisi:** Bölme etkisi çok gözlenen bir durumdur. Poliiyonik destek maddesi kullanıldığında iyonik yapıya sahip substrat, tepkime ortamında homojen olarak dağılmaz yani enzim çevresinde kütle fazındakinden farklı derişimde bulunabilir. Ölçülen derişim değerleri genellikle kütle fazından yapılıdır. Ayrıca, çözünen madde ile polimerik destek maddesi arasında hidrofobik etkileşmeler de meydana gelebilir.
- ✓ **Yapısal Değişiklikler:** İmmobilizasyon işleminde, enzimin yapısının belli bir pozisyonda uzun süre kalması ile enzim ve destek maddesi arasında çok sayıda bağlanma oluşabilir. Enzimin katalitik aktifliği, yapısal değişimlere bağlı

olduğundan K_m ve V_{mak} değerlerinde de farklılıklar; enzim aktifliğinde azalmalar gözlenebilir.

- ✓ **Difüzyon Sınırlaması:** Difüzyonel sınırlama, fiziksel büyüklük ile ilgilidir. Eğer polimer desteğinin gözenek çapı, substrat molekülünden küçük ise substratın destek içine difüzlenmesi ve enzim ile temasa geçmesi engellenir ve bunun sonunda herhangi bir katalitik etki gözlenmez.
- ✓ **İnaktivasyon:** Yüksek pH, ortamda serbest radikallerin ve oksitleyici reaktiflerin varlığı gibi zor tepkime şartlarında gerçekleşen immobilizasyon işlemleri, enzimin bir kısmının veya tamamının aktifliğini yitirmesine sebep olabilir. Böylece immobilize enzimin spesifik aktifliği, serbest enzimin aktifliğinden oldukça düşük olabilir. Enzim herhangi bir konformasyonel değişim olmaksızın aktifliğini yitirebilir.
- ✓ **Sterik Sınırlamalar:** Eğer immobilize enzimin aktif uçları, substrat molekülünün yaklaşmasına elverişli pozisyonda değil ise; sterik problemlerin ortaya çıkma ihtimali çok yüksektir. Örneğin enzimin aktif grupları destek maddesine dönük ise, substratın aktif merkeze yaklaşması engellenir. Enzim polimerik kafeste hapsedildiğinde, substrat moleküllerinin enzime yaklaşıp direk temasa geçmesi matriks tarafından engellenebilir (Karaca 2006).

2.1.4. Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılan Destek Maddeler

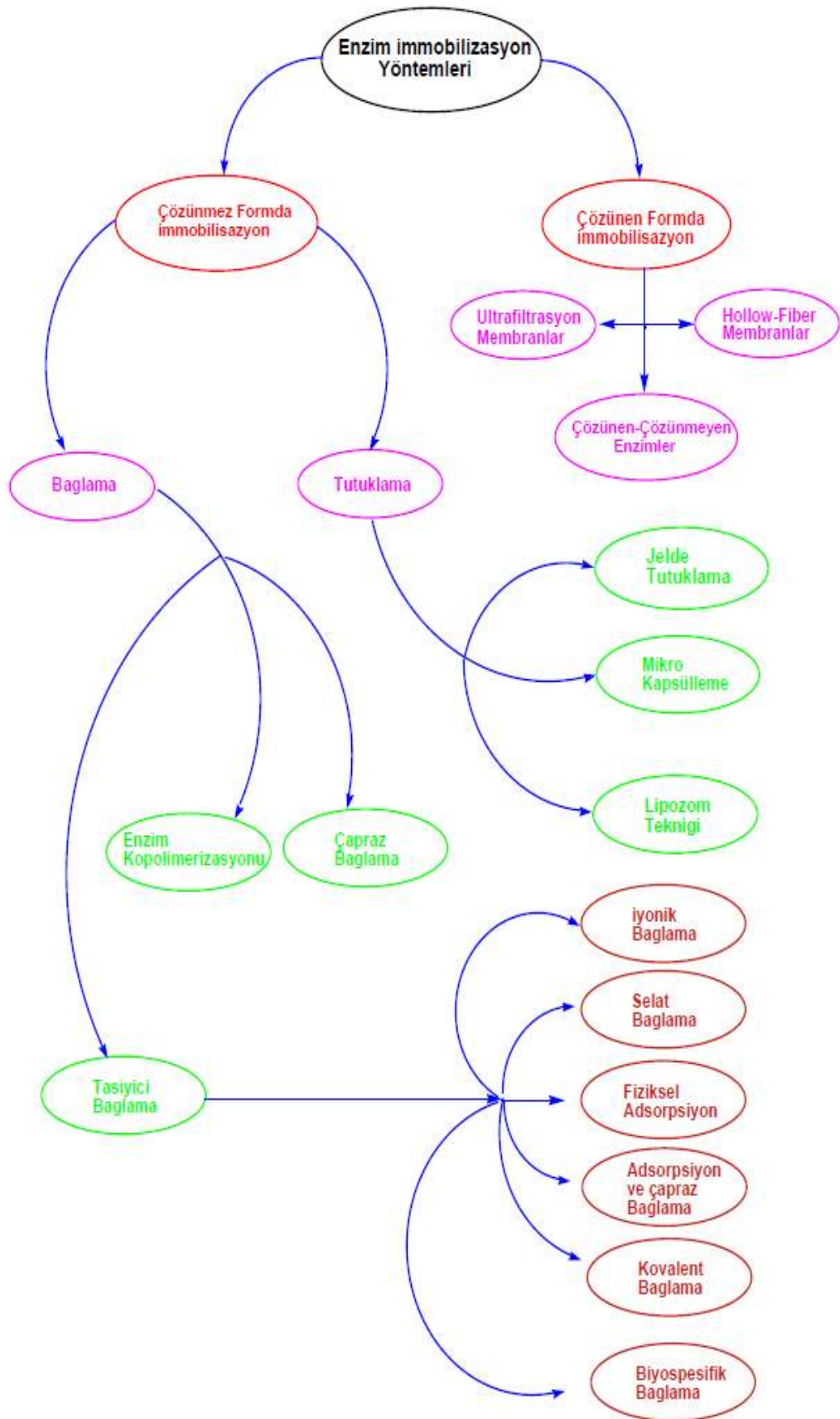
Enzim immobilizasyonunda yaygın olarak kullanılan destek maddeleri, anorganik ve organik yapıda maddelerdir. Organik maddeler, doğal (polisakaritler, proteinler ve karbon) ve sentetik (Polistiren ve diğer polimerler) polimerlerdir. Anorganik maddeler ise doğal mineraller (Bentonit ve silika) ve işlenmiş cam (gözenekli ve gözeneksiz), metaller ve gözenekli metal oksitler gibi maddelerdir (Guisan 2006).

2.1.5. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzimlerin immobilizasyonunda, fiziksel ve kimyasal bağlanma yöntemleri kullanılır (Şekil 2.6.). Kimyasal bağlanma yönteminde, enzim ve destek maddesi arasında, kovalent bağlar meydana gelir. Fiziksel bağlanma yönteminde ise, enzimin desteğe daha zayıf bağlanması veya hapsedilmesi söz konusudur (Karaca 2006).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Enzim immobilize edilirken aktif merkezin bu işlemde kesinlikle etkilenmemesi gerekir. Aktif merkezde farklı fonksiyonlara sahip iki bölge bulunmaktadır. Bunlardan biri katalitik merkez diğeri ise substrata spesifikliğı sağlayan merkezdir. Aktif merkezdeki aminoasitler veya merkezin üç boyutlu yapısı değışirse katalitik aktivite azalır ve substrat spesifikliğı değışir. İmmobilizasyon işlemi ılıman koşullarda gerçekleştirilmelidir. Yüksek sıcaklık, kuvvetli asidik veya bazik ortam, organik çözücüler ve yüksek tuz konsantrasyonu ile muamele denatürasyona dolayısı ile aktivite kaybına neden olur (Sökmen 2005).



Şekil 2.6. Enzim immobilizasyon yöntemleri (Yılmaz 2010)

2.1.5.1. Kovalent Bağlanma Metodu ile Enzim İmmobilizasyonu

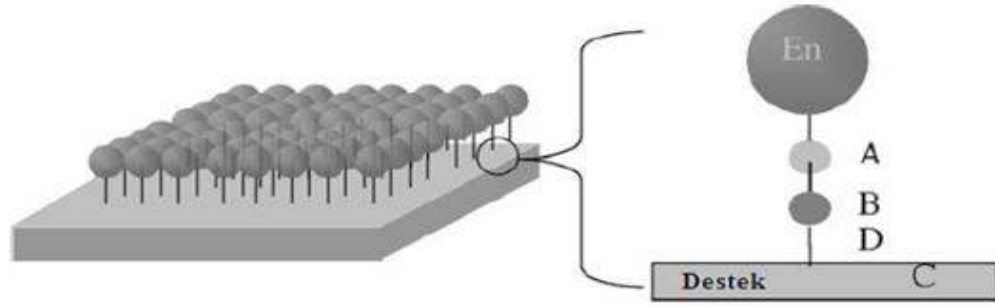
1950’lerden beri geliştirilmekte olan “enzimlerin kovalent immobilizasyonu” günümüzde önemli bir metod haline gelmiştir. Enzim destek maddesine kovalent olarak bağlandıktan sonra enzimin destekten ayrılması mümkün değildir. Bundan dolayı kullanılan matriksten enzimin sızıntısı kovalent bağlanmış immobilize enzimler ile çoğu kez minimuma indirilmiş olur (Zarbosky 1973).

Kovalent immobilizasyonda, enzimlerin reaktif destek maddelerine kovalent bağlanması sulu ortamda gerçekleşmektedir. Enzimin destek maddesine kovalent bağlanmasında dikkat edilecek önemli nokta, bağlanmanın enzimin aktivite gösterdiği bölge üzerinden olmamasına mutlaka dikkat edilmelidir. Yani, kovalent bağlanmada katalitik hareket için enzimin yapısında aktif merkezin dışında kalan bölgeler kullanılmalıdır (Cao ve ark. 2003). Enzimin katalitik görevde yer almayacak kısımları destek maddesine kovalent bağla bağlanmada kullanılmalı ki böylece enzim aktivitesini kaybetmesin. Enzim üzerindeki aktif bölgeyi korumak için birkaç yöntem vardır. Bu yöntemler:

- ✓ Kovalent bağlama süresince yarışmalı inhibitör veya substrat varlığı,
- ✓ Tersinir kovalent bağlanmış enzim-inhibitör kompleksi oluşumu,
- ✓ Kimyasal olarak modifiye edilerek matris ile kovalent bağ yapabilecek yeni gruplar kazandırılmış enzim ve
- ✓ Zimojen ön belirteçidir (Kennedy ve Cabral 1995).

Enzimler taşıyıcı destek maddelerine bağlamadan önce mutlaka aktive edilmelidir (Glazer ve ark. 1962). Enzimin yüzeyinde yer alan aminoasit artığı ile destek yüzeyinde yer alan fonksiyonel grup arasındaki kimyasal bağ Şekil 2.7.’de gösterilmiştir. Enzim ile taşıyıcı destek maddeleri arasındaki bağlanma yüksek olduğundan bazen enzimatik aktivitenin arttığı da görülmektedir (Mattiasson ve Kaul 1991).

Şekil 2.7.’de kovalent bağlanmış bir immobilize enzim, taşıyıcı destek maddelerine, arakol, desteğin fonksiyonel bağ yapacak grubu ve enzimde bulunan aktif amino asit grubu bileşenlerinin bir çok parçadan oluşmuş şekli gösterilmiştir (Cao 2005, Alptekin 2009).



Şekil 2.7. Enzimin taşıyıcı desteğe kovalent immobilizasyonu: (a) aktif amino asit artığı; (b) taşıyıcı desteğin fonksiyonel bağ yapacak grubu; (c) taşıyıcı destek maddesi; (d) organik uzatma kolu

Kovalent bağlanmada, enzim yüzeyinde bulunan amino asitlerin $-NH_2$, $-SH$, ve $-COOH$ gibi fonksiyonel grupları üzerinden bir taşıyıcı katı destek maddesi bağlanır. Etkili bağlantıyı elde etmek için enzim ve katı destek maddesinin işlevselliği immobilizasyondan önce aktive edilmelidir. Taşıyıcı katı destek maddeleri sık sık enzim bağlamak için kullanılmadan önce aktive edilirler. Bağların sayısı veya bağlanma modelinin kontrolü birçok durumda gereklidir (Gemeiner 1992, Alptekin 2009).

Taşıyıcı desteğe kovalent bağlı immobilize enzimin performansını etkileyen faktörler; taşıyıcı katı destek maddesinin fiziksel özelliği (gözenek büyüklüğü, partikül büyüklüğü, gözenekliliği, şekli), taşıyıcı katı destek maddesinin kimyasal tipi (yapının kimyasal kompozisyonu, aktif işlevselliği ve diğer aktif olmayan işlevsellikler), zincirin kimyasal yapısı veya bağlanma özelliği, immobilize olduktan sonra veya immobilize edilirken enzimin konformasyonu, enzim yönlendirmesi, çapraz bağlama reaktifinin uzunluğu ve özelliği, enzimleri bağlamak için kullanılan ortamın özellikleri, taşıyıcı katı destek maddesi ve enzim arasında oluşan bağların sayısı, taşıyıcı katı destek maddelerinin içinde veya üzerindeki enzim dağılımı şeklinde verilebilir (Cao 2005, Alptekin 2009).

Enzimlerin yüzeyinde bulunan fonksiyonel gruplar (iyonik, polar ve hidrofobik gruplar) bağlanmada rol oynarlar. Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcı katı destek maddeleri, 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

2. KAYNAK ÖZETLERİ

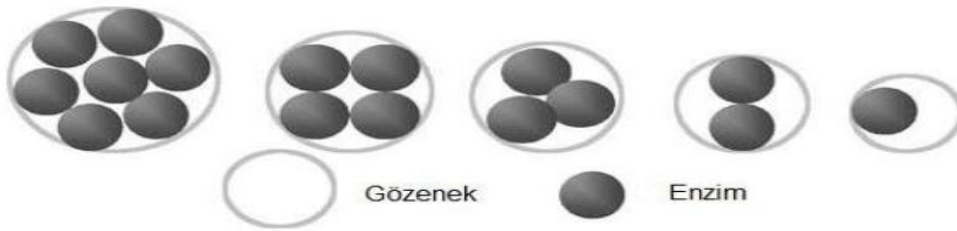
gibi özellikler içermesine dikkat edilmelidir (Telefoncu ve ark. 1990, Kılınç ve ark. 2002, Alptekin 2009). Çünkü seçilen desteğin fiziksel ve kimyasal özellikleri immobilize enzimin performansını (örneğin, aktivitesini, seçiciliğini, kararlılığını) doğrudan etkilemektedir. Taşıyıcı katı destek maddelerinin yüzeyi, iç yüzeyi ve dış yüzeyi (gözeneksiz desteklerde iç yüzey sıfırken oldukça gözenekli desteklerde dış yüzey ihmal edilebilir) kapsamaktadır (Şekil 2.8.). Bir makro-gözenekli destekte partikül çapına bağlı olarak iç yüzey genellikle dış yüzeyin 100–1000 katı kadardır (Cao 2005, Alptekin 2009).



Şekil 2.8. Gözenekli destek maddesinin iç ve dış yüzeyi

Genellikle bağlanan enzim miktarı (mg protein/g destek) ve immobilize enzimin aktivitesi desteğin yüzey alanından çok desteğin gözenek büyüklüğü ile ilişkilidir. Etkili bir immobilizasyon için gözenek büyüklüğü enzimin boyutunun 3–9 katı olması gerektiği bildirilmiştir (Cao 2005, Alptekin 2009).

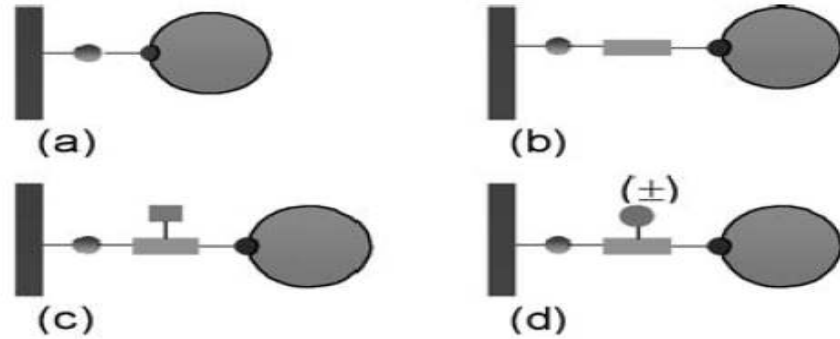
Gözenek büyüklüğü yalnızca yüzey alanı ile ilişkili değil, difüzyon sınırlaması ve immobilize enzimin hareketliliği ile de ilişkilidir. Eğer enzimin büyüklüğü biliniyorsa teorik olarak gerekli olan gözenek büyüklüğü tahmin edilebilir. Şekil 2.9’da gözenek büyüklüğü azaldıkça enzimin yüzeyi kullanma etkinliği azalmaktadır (Alptekin 2009).



Şekil 2.9. Enzim ve gözenek büyüklüğü arasındaki ilişki (Cao 2005)

Taşıyıcı katı destek maddesinin yüzey yapısına bağlı olarak enzimin bir takım özelliklerinde değişimler meydana gelebilir. Bu değişimler; enzimin stabilitesi (kararlılık), enzimin aktivitesi, seçiciliği, enzim konformasyonu, yönlendiği, pH ve sıcaklık profilidir (Alptekin 2009). Kovalent immobilizasyonda seçilen inorganik desteğin yüzeyine fazla miktarda enzimin bağlanabilmesi için desteğin mümkün olan en küçük gözenek büyüklüğüne sahip olması gerektiği bildirilmiştir (Weethall 1976).

İmmobilizasyon, oda sıcaklığı ve nötral pH gibi çok ılıman koşullarda gerçekleştirilmelidir (Alptekin ve ark. 2009). Enzimin desteğe doğrudan immobilizasyonunda enzim hareketi sınırlı iken organik ara kol (Şekil 2.10.) üzerinden immobilizasyonunda enzim daha serbest hareket edebilmektedir. Organik ara kolun immobilize enzim aktivitesi üzerine etkisi karmaşıktır. Bunun nedeni organik ara kol varlığında mikroçevredeki, enzim yönlendiğindeki ve enzimin esnekliğindeki değişimlerdir. Uygun organik ara kolun (uzunluk, hidrofilitiklik, dallanmışlık veya doğrusallık v.b.) kullanımıyla immobilizasyon sonunda immobilize enzim aktivitesi yüksek olabilmektedir (Cao 2005).



Şekil 2.10. Enzimin taşıyıcı destek maddesine doğrudan (a), organik uzatma kolu ile (b), Dallanmış organik uzatma kolu ile (c) ve yüklü uzatma kolu (d) üzerinden immobilizasyonu (Cao 2005)

2.1.5.2. Kovalent Bağlanmanın Avantajlı ve Dezavantajlı Yönleri

Avantajlı yönleri aşağıda maddeler halinde verilmiştir;

- ❖ Taşıyıcı katı destek maddesine, enzimin bağlanması kolaydır ve bağlı olmayan enzim ise yıkama işlemi ile uzaklaştırılabilir.
- ❖ Sürekli sistemlere uygundur.
- ❖ Değişik fiziksel formlarda (tabaka, partikül, fiber vb.) imal edilebilirler.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

- ❖ Kovalent bağlamadaki bağlar çok sıkı olduğu için, immobilizasyonu yapılmış enzimin kullanımı esnasında, ortamda yüksek iyonik karakterli çözücü veya substrat bulunması durumunda dahi enzimlerin destekten sızmaları mümkün değildir.
- ❖ Enzim, taşıyıcı katı destek maddesi yüzeyindeki belirli bölgelere lokalize olduğundan dolayı enzim ile substratın karşılaşma ihtimali yükselir.
- ❖ Enzim ile taşıyıcı katı destek maddesi arasındaki güçlü etkileşimden dolayı enzimin sıcaklık kararlılığında artış gözlenir (Rao ve ark. 1998).

Kovalent bağlanma yönteminin dezavantajlı yönleri ise aşağıda maddeler halinde verilmiştir;

- ❖ Bağlanma aktivite için zorunlu amino asit fonksiyonel grupları üzerinden gerçekleştiği için enzim aktivitesinin düşme ihtimali bulunmaktadır.
- ❖ Enzimin taşıyıcıya bağlanması özel ve masraflı hazırlıkları gerekli kılabilir.
- ❖ Biyokatalizörün toksik reaktiflere ve sert reaksiyon koşullarına maruz kalmasından dolayı ürün veriminde düşüş gözlenir.
- ❖ Taşıyıcı katı destek maddesinin yenilenmesi ve biyokatalizörün taşıyıcıdan geri kazanılmasının imkânsız olması.
- ❖ Kısmi modifikasyondan dolayı enzim moleküllerinin aktif yapıları bozulmaya eğilim gösterir.
- ❖ Enzim molekülleri ile taşıyıcı katı destek maddesi arasındaki kuvvetli etkileşimler, enzimin serbest hareket etmesini engelleyerek enzimin aktivitesinin düşmesine sebebiyet verebilir.
- ❖ Immobilizasyon işlemi için uygun optimum koşulları bulmak zordur (Rao ve ark. 1998).

2.2. Nano, Nanoteknoloji ve Nanopartikül

Nano, Yunanca “cüce” anlamına gelir. Nano ön eki kullanılarak tanımlanan ifadeler, herhangi bir ölçünün milyarda birini ifade eder. Nanometre (nm) ise, metrenin milyarda birini ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) ifade eder. Nano yapılar uzunluk olarak bakıldığında yaklaşık 10–100 atomluk sistemlere (10^{-9} m) karşılık gelir. 1–500 nm büyüklük aralığına Nanoölçek denir. Bir insan saç telinin çapının yaklaşık 10^5 nm olduğu göz

önüne alındığında nano kavramının ne kadar küçük bir ölçek olduğu daha iyi anlaşılmaktadır.

Nanoteknoloji, çeşitli araçların, malzemelerin ve yapıların moleküler düzeyde işlenmesi, oluşturulması ve manipüle edilmesi olarak tanımlanmaktadır. Nanoteknoloji, atomlarla oynayan bir teknolojidir. Atom ve molekülleri tek tek manipüle ederek istenilen yapının oluşturulması ilkesine dayanır. Atomlar ayrı ayrı işleme tabii tutulur. Maddenin atomik veya moleküler boyutta mühendisliğin yapılarak yepyeni özelliklerinin açığa çıkarılması; nanometre ölçeğindeki fiziksel, kimyasal ve biyolojik olayların anlaşılması, kontrolü ve üretimi amacıyla fonksiyonel materyallerin, cihazların ve sistemlerin geliştirilmesi nanoteknolojinin konusudur. Bir malzemenin sahip olduğu özellikler, malzemenin bir ya da daha fazla doğrultudaki büyüklüğü nanometre düzeyinde küçültüldüğünde değişmektedir. Örneğin, normalde kırılğan bir malzeme olan seramik, tanecik büyüklüğü nanometre değerine indirildiğinde kolaylıkla deforme olup şekillendirilebilmektedir. 1 nm büyüklüğündeki altın tanesi kırmızı renk göstermektedir. Bundan başka, nano büyüklükteki tozlarla takviyelendirilen kompozit malzemeler çok daha yüksek performans değerlerine ulaşmaktadır (Özdoğan ve ark. 2006).

Nanopartikül; 1 μm 'den küçük boyuta sahip partiküller nanopartikül olarak isimlendirilmektedir.

Nanopartiküllerin avantajları aşağıdaki gibi özetlenebilir;

- 1. Kararlılık:** Polimerik nanopartiküller (bir maddeyle yüzeyi kaplanmış nanopartiküller) oldukça kararlı yapılardır. Bu özellikleri, üzerlerinde taşıdıkları biyoaktif moleküllerin kararlılıklarını da arttırmaktadır.
- 2. Yüzey alanı:** Nanopartiküller mikropartiküllere göre çok daha büyük yüzey alanına sahiptirler.
- 3. Boyut:** Nanopartiküller boyutlarına göre hücre tarafından fagositoz edilebilirler ya da belli süreler dolaşım sisteminde kalabilirler.
- 4. Modifikasyon:** Nanopartiküller boyutları değiştirilerek ve farklı polimerik kaplamalar kullanılarak kararlılıkları arttırılabilmektedir.
- 5. Taşıma:** Nanopartiküllerin herhangi bir taşıyıcıya ihtiyaç duyulmadan istenilen bölgeye enjeksiyon yoluyla ulaştırılabilirler (Kahraman 2008).

2.2.1. Demir Oksit Bileşiklerinin Yapısı ve Özellikleri

Demir, dünyadaki en yaygın metallere biridir. Demir elementi -2'den +6'ya kadar farklı değeriğe sahip olabilir ancak en yaygın olarak bulunan Fe^{+2} ve Fe^{+3} 'tür. Hava ortamında çoğu Fe (II) bileşikleri daha kararlı olan ve daha yaygın bulunan Fe (III)'lü türlere dönüşür. Demir'in α , β , ve δ olarak bilinen üç allotropik formu mevcuttur. α -Fe oda sıcaklığında en kararlı demir formudur. Curie sıcaklığı olan 770 °C'nin altında Fe Ferromanyetik olur. Demir, oksijenle üç bileşik yapar. Birincisi, FeO (vüstit (wüstit)) siyah bir tozdu ve oda sıcaklığında kararsızdır. İkincisi, Fe_2O_3 'tir, pas olarak da bilinir. Üçüncü bileşik, Fe_3O_4 (magnetit) siyah renktedir ve hem Fe^{+2} hem de Fe^{+3} iyonlarını içerir. Kimyasal formülü bazen $\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ şeklinde de verilebilir (Karaağaç 2011). Doğada bulunan demir oksitler farklı manyetik özelliklere ve kimyasal bileşenlere sahiptirler. Bulk halde Ferrimanyetizma gösteren manyetit (Fe_3O_4), maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ve hematit ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) gibi demir oksitler nanoboyutta süperparamanyetizma gösterirler. Bu üç demir oksit, kimyasal, manyetik ve fiziksel özellikleri nedeniyle teknolojik açıdan oldukça önemlidir. Manyetit ve maghemit en genel ve en çok araştırılan demir oksitlerdir (Karaağaç 2011, Karaağaç ve Koçkar 2012).

2.2.2. Nanopartiküllerin Hazırlanma Yöntemleri

Nanopartiküllerin hazırlanması için kullanılan yöntemler iki ana başlık altında toplanabilir. Bunlar gaz fazı ve sıvı fazı hazırlama yöntemleridir. Kimyasal buhar depozisyonu, metalo-organik kimyasal buhar depozisyonu ve sprey/lazer piroliz gaz-fazı yöntemleri arasında sayılabilir. Sıvı faz hazırlama yöntemlerinden bazıları ise mikroemülsiyon, hidrotermal hazırlama, termal parçalama ve ortak çöktürmedir. Bunlardan termal parçalama yüksek sıcaklık reaksiyonları başlığı altında da incelenebilir (Karaağaç 2011, Karaağaç ve Koçkar 2012).

Pek çok metot ile nanoparçacık hazırlanabilir. Kullanılan bazı yöntemler; ikili çöktürme, mikroemülsiyon, hidrotermal hazırlama ve termal parçalamadır:

- ❖ **Termal Parçalama:** Küçük boyutlarda, monodispers, oda sıcaklığında süperparamanyetik nanoparçacıklar termal parçalama yöntemiyle kolaylıkla hazırlanabilmektedir. Ayrıca bu teknik kullanılarak diğer manyetik

nanoparçacıklar da, CoFe_2O_4 , Cr_2O_3 , MnO , Co_3O_4 ve NiO 'de hazırlanabilmektedir (Bronstein ve ark. 2007, Lu ve ark. 2007).

- ❖ **Mikroemülsiyon:** Mikroemülsiyonla, birbirine karışmayan iki sıvının kararlılığı sağlanır. Yağ fazında nano boyutta su damlaları içeren, su-yağ (s/y) mikroemülsiyonu demir oksit nanoparçacıkları elde etmek için sıkça kullanılan bir metottur. Surfaktan kaplı su birikintisi, parçacıkların oluşumu için uygun ortamı oluşturur ve parçacıkların büyümelerini sınırlandırır. Manyetik nanoparçacıklar, su fazındaki $\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3}$ ve NaOH 'ın çöktürme reaksiyonuyla kolayca elde edilir (Lee ve ark. 2001, Lu ve ark. 2007).
- ❖ **Hidrotermal Hazırlama:** Sistem, hidrotermal şartlar altında farklı reaksiyon sıcaklıklarında Metal Linoleat (katı), sıvı fazda etanol-linoleik asit ve su etanol karışımından oluşur. Bu yöntemle monodispers 9 nm Fe_3O_4 ve 12 nm CoFe_2O_4 nanoparçacıkları elde edilmiştir. Ayrıca monodispers, hidrofilik, tek kristal ferrit mikroküreleri elde edilmiştir. FeCl_3 , etilen glikol, sodyum asetat ve polietilen glikol iyice karıştırılarak basınçlı kaplara konur ve reaksiyon $200\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 8–72 saat arasında gerçekleştirilir. Bu yöntem ile 200–800 nm arasında monodispers nanoparçacıklar elde edilir (Lu ve ark. 2007).
- ❖ **İkili Çöktürme yöntemi:** Fe^{+2} ve Fe^{+3} iyonlarının bulunduğu bir çözeltide inert gaz ortamında ve yeterince kuvvetli karıştırma altında bir baz çözeltisinin ilavesiyle demir oksit nanopartikülleri ilk kez Massart tarafından hazırlandı (Karaağaç 2011, Karaağaç ve Koçkar 2012). İkili çöktürme, demir oksit (Fe_3O_4 , $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) hazırlanmasında kullanılan bir yöntemdir (Martínez-Mera ve ark. 2007, Sun ve ark. 2010).

İkili çöktürme yöntemi, kolay uygulanabilirliği ve yüksek verimliliğinden dolayı (diğer tekniklere göre reaksiyon süresi daha kısadır ve daha çok ürün verir) manyetik nanopartikül hazırlanmasında sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. İkili çöktürme yönteminde belirli oranlarda karıştırılan Fe^{+2} ve Fe^{+3} tuzlarının sulu çözeltileri bazik ortamda (amonyak, amonyum hidroksit ve sodyum hidroksit çözeltisi gibi) güçlü bir karıştırıcı altında çöktürülür. Fe_3O_4 nanoparçacıklarının çökmesi için pH değeri 8 ile 14 arasında olmalıdır (Lu ve ark. 2007). Oksidasyon olmayan ortamda $[\text{Fe}^{+2}]/[\text{Fe}^{+3}]$ oranı 1/2 olarak seçilirken O_2 'li ortamda Fe^{+2} 'nin Fe^{+3} 'e dönüşmesi ile bu oran değişeceğinden 2/3 oranı tercih edilir (Khalafalla ve Reimers 1980). Ortak çöktürme

2. KAYNAK ÖZETLERİ

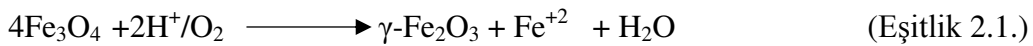
sırasında son ürün elde edilene dek birçok ara basamak gerçekleşebilir. Bu reaksiyonlarda demir oksit oluşabilmesi için baz konsantrasyonu tüm reaksiyonların oluşmasına yetecek kadar olması gerekir. $[\text{OH}^-]$ değeri yeterli olmadığında demir oksit oluşumu sınırlı kalmaktadır (Alibeigi ve Vaezi 2008).

Ortak çöktürmenin ana avantajı, oldukça fazla miktarda ürün elde edilebilmesidir. Fakat parçacık boyutunun kontrolü sınırlıdır. Çünkü bu yöntemde kristallerin oluşumu iki basamak içerir (Lu ve ark. 2007).

- ❖ Birinci basamak, çekirdeklenmedir. Çözelti konsantrasyonu kritik doyuma ulaştığında nanoparçacık çekirdekleri oluşmaya başlar.
- ❖ İkinci basamak olan büyümede ise oluşan çekirdekler büyür ve kristaller oluşur.

Elde edilen nanoparçacıkların monodispers olması bu iki basamağın birbirinden ayrılmasına bağlıdır (Tartaj ve ark. 2003). Bu ise partiküllerin hazırlanmasını etkileyen parametrelerin kontrolü ile sağlanabilir. Bu yöntemde, parçacık boyutunu, manyetik özellikleri ya da yüzey özelliklerini etkileyen faktörler, $\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3}$ konsantrasyon oranı, çözelti pH'ı, demir iyonlarının konsantrasyonu, karıştırma hızı, reaksiyon sıcaklığı ve reaksiyon süresi olarak sıralanabilir (Liu ve ark. 2002, Zhao ve ark. 2008, Valenzuela ve ark. 2009).

Küçük boyutlu partiküller elde edilmesi istendiğinde reaksiyon oda sıcaklığında gerçekleştirilir. Hazırlanma şartları belirlendiğinde, aynı nitelikte nanoparçacıklar tekrar elde edilebilir. 3-20 nm arasında parçacık elde etmek mümkündür. Manyetik nanoparçacıklar için manyetik doyum değerleri bulk değerinden (90 emu/g) düşük olarak 30–50 emu/g arasında değişir. Manyetit (Fe_3O_4) kararlı değildir. Havayla ya da asit ortamında kolayca okside olarak maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) dönüşürler (Eşitlik 2.1.).



Maghemit için oksidasyon büyük bir problem değildir. Bu yüzden, manyetit nanoparçacıkları kasıtlı olarak okside edilerek maghemit nanoparçacıklarına dönüştürülür. Bu dönüşüm, parçacıkların asit ortamında dispersiyonu ve ardından Demir (III) nitrat eklenmesiyle yapılır (Lu ve ark. 2007). Bu şekilde hazırlanan parçacıklar çözeltinin pH değerine bağlı olarak yüzey yüklerine sahiptirler.

Bu yöntemin en büyük avantajı, büyük miktarda parçacık hazırlanabiliyor olmasıdır (Maity ve Agrawal 2007, Kahraman 2008, Kahraman ve ark. 2011). Ortak çöktürmeyle elde edilen nanoparçacıklar polidisperstirler. Bloklama sıcaklığı, parçacık boyutuna bağlıdır. Geniş boyut dağılımı, geniş oranda bloklama sıcaklık dağılımına neden olur. Bu yüzden, parçacıklar pek çok uygulama alanı açısından ideal olmayan manyetik davranışlar sergilerler (Özel ve ark. 2013).

2.2.3. Demir Oksit Nanopartiküllerin Kullanım Alanları

Son yıllarda, nano boyuttan mikron boyutuna kadar hazırlanabilen manyetik nanopartiküller biyomedikal alanındaki uygulamalarda kullanılmaktadır (Curtis ve Wilkinson 2001, Moghimi ve ark. 2001, Panyam ve Labhasetwar 2003, Lu ve ark. 2007, Jun ve ark. 2008, Teja ve Koh 2009). Manyetik nanopartiküllerin uygulanan manyetik alana cevap vererek istenilen şekilde hareket ettirilebilmeleri birçok uygulamada avantaj sağlamaktadır (Kahraman ve ark. 2011).

Nano boyuttaki manyetik partiküllerin kimyasal ve fiziksel özelliklerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Kuantum etkileri ve büyük yüzey alanından dolayı manyetik partiküllerin nano boyutta, manyetik özellikleri değişmekte ve süperparamanyetik karakter kazanmaktadır. Bunun nedeni her bir manyetik partikülün kendi başına bir manyetik birim oluşturmalarıdır (Babes ve ark. 1999, Maity ve Agrawal 2007, Goya ve ark. 2008, Kahraman ve ark. 2011)

Süperparamanyetik nanopartiküller sahip oldukları kimyasal, fiziksel, termal ve mekanik özelliklerinden ve işlemlere getirdikleri kolaylıklar ve kazandırdıkları üstün nitelikler nedeniyle yaşam bilimlerinde ve biyomedikal alanlarda kullanımı araştırılan ve hızla yaygınlaşan manyetik nanopartikülledir (Tartaj ve ark. 2003, Scherer ve Figueiredo 2005).

2.3. Steroid Olmayan Antiinflamatuvar İlaçlar (NSAİİ)

Benzer terapötik ve yan etki gösteren ve çoğu organik asit yapısında olan ilaç grubudur. Aspirin bu grup ilaçların ilk örneğidir. Bu nedenle; Aspirin benzeri ilaçlar veya daha sıklıkla “Steroid Olmayan Antiinflamatuvar İlaçlar” (NSAİİ) olarak tanımlanırlar. Steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar (Non-steroidal antiinflamatuvar ilaçlar), analjezik (ağrı kesici), antipiretik (ateş düşürücü) ve antiinflamatuvar (iltihabi

2. KAYNAK ÖZETLERİ

reaksiyonu önleyici) etkili ilaçlardır. "Nonsteroidal" terimi bu ilaçları benzer etkileri olan steroidlerden ayırmak için kullanılır. NSAİİ'ler narkotik (uyuşturucu, bağımlılık yapıcı) değildirler. Bu grubun en çok bilinen üyeleri aspirin ve ibuprofendir (Büyükuysal 1999, Gündüz 2012).

NSAİ ilaçlar dünyada en fazla reçete edilen ilaç grupları içerisinde yer almaktadır. Türkiye'de 18–65 yaş arasındaki 1889 kişide yapılmış olan bir prevalans (yaygınlık) çalışmasında ağrı kesici kullanma prevalansı yüzde 73.1 olarak bulunmuştur. Bunların onda dokuzunun hekimler tarafından reçete edildiği, onda birinin ise reçetesiz olarak alındığı bildirilmiştir. 2001 yılında, NSAİİ'ler Birleşik Devletlerde yıllık satışıyla 70 milyon reçete ve 30 milyar raf arkası satış dozuna ulaşmıştır (Duran ve ark. 2008). NSAİ ilaçların büyükçe bir kısmının, (S)-(+)-enantiyomer ve (R)-(-)-enantiyomerleri mevcuttur. Yalnızca (S)-(+)-enantiyomer içeren NSAİİ'lerin güvenilirlik profilinin yüksek olduğu çalışmalarla ispatlanmıştır (Carabaza ve ark. 1996).

2.3.1. İbuprofen

İbuprofen, non-steroid antiinflamatuvar bir ilaçtır. Fenilpropionik asit türevleri içinde ilk bulunanıdır. Analjezik, antipiretik ve antiinflamatuvar etkinlik göstermektedir. Trombosit agregasyonunu aspirin ve indometazine göre daha düşük bir derecede inhibe ettiği bulunmuştur. İbuprofen siklooksijenaz enzimini reversibl olarak inhibe ederek araziidonik asitten prostaglandin sentezini engellemektedir. Böylece prostaglandinlerin rol oynadığı inflamatuvar reaksiyonlar kontrol altına alınmış olmaktadır. En sık görülen yan etkisi gastrointestinal sistemde görülmektedir. Bulantı, kusma, ishal, kabızlık, bazen karın ağrısı yapabilir. Seyrek olarak trombositopeni, cilt döküntüsü, baş ağrısı, baş dönmesi, görme bulanıklığı yapabilir. Allerjik döküntüler, kaşıntı ve bronkospazm yapabilir. Böbrek fonksiyonlarını bozabilir. Serum kreatinin düzeyinde geçici artma yapabilir (Kayaalp 2009).

Literatürde, Mandelik asitte olduğu gibi İmmobilize enzimler kullanılarak rasemik İbuprofen'in enantiyomerlerine ayrılmasına yönelik çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Aşağıda özellikle son yıllarda yapılan bu çalışmalar kısaca anlatılmıştır.

Yousefi ve ark. (2014), fiziksel adsorpsiyon yöntemi ile CRL ve *Rhizopus oryzae* lipaz (ROL) enzimini oktil-sepharose immobilize ettiler ve bu immobilize

enzimleri kullanarak rasemik ibuprofen'in stereoselektif hidroliz ve esterleşme çalışmalarını gerçekleştirmişler.

Habibi ve ark. (2013), farklı İbuprofen esterlerinin hidroliz çalışmalarını yapmak için fiziksel adsorpsiyon ve kovalent bağlanma metoduna göre *Rhizomucor miehei* lipaz (RML) enzimini 10 farklı destek maddesine immobilize ettiler. Hazırladıkları immobilize enzimleri hidroliz reaksiyonlarında kullanarak yüksek enantiyomerik saflıkta (S)-(+)-İbuprofen elde ettiler.

Marszałł ve Siódmiak (2012), CRL enzimini Glutaraldehit ve EDC/sulfo-NHS ile aktifleştirilmiş amin uçlu manyetik partiküllere immobilize ederek rasemik İbuprofen'in kinetik rezolüsyon çalışmalarını gerçekleştirdiler.

Goto ve ark. (1996), immobilize lipaz enzimlerini rasemik İbuprofen'in rezolüsyonunda kullandılar. Lipaz enzimi olarak *Mucor javanicus* veya CRL kullandılar.

Chen ve Tsai (2000), CRL enzimini sikloheksan ortamında taşıyıcı destek maddesi olarak Accurel MP1000'e immobilize ederek rasemik İbuprofen'den (S)-(+)-ibuprofen elde etmek için bir enantiyoselektif esterifikasyon prosesi geliştirdiler.

Yu ve ark. (2004), immobilize CRL enzimini rasemik ibuprofen'in kinetik rezolüsyonun çalışmalarında kullanılmışlardır. Çalışma sonunda, İmmobilize lipazların serbest lipazlara göre 2.2 kat daha seçimli olduğu bulmuşlardır.

2.3.2. Naproksen

α -Aripropiyonik asit türevi olan (S)-(+)-6-Metoksi- α -metil-2-naftalinasetik asit, stereoidal olmayan iltihap giderici ilaç (NSAIDs) olup profenler sınıfında bulunmaktadır. Antipiretik (ateş düşürücü), analjezik (ağrı kesici) ve antiinflamatuvar (iltihap giderici) özelliğe sahip, vücuttaki iltihaplanma prosesini kortizonsuz olarak inhibe eden bir ağrı kesici ilaç etken maddesidir. Bu etkilerinden dolayı çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Naproksen'in (S)-enantiyomeri, (R)-enantiyomerine göre yaklaşık 28 kat daha aktiftir. Ayrıca, (R)-enantiyomerin toksik etkileri nedeni ile (S)-enantiyomeri farmasötik endüstride profenler sınıfında enantiyomerik saflıkta kullanılması tercih edilen tek ilaç etken maddesidir (Mutlu 2006, Kayaalp 2009).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Literatürde, İmmobilize enzimler kullanılarak rasemik Naproksen metil esterinin enantiyomerlerine ayrılmasına yönelik çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan bazıları aşağıda kısaca açıklanmıştır.

Uyanık ve ark. (2011), *Candida rugosa* lipazı sol-jel immobilizasyon tekniğine göre kaliks(aza)crowns destek maddelerine immobilize etmişler ve ardından bu immobilize enzimleri rasemik Naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidroliz reaksiyonunda kullanmışlardır. Bu reaksiyon sonucunda immobilize lipazların serbest lipaza göre % 48,4 dönüşüm gösterdiği ve 6 kullanımdan sonra kalan dönüşüm yüzdesinin % 18 olduğunu gözlemlemişlerdir.

Tutar ve ark. (2009), *Candida rugosa* lipazı doğal bir polimer olan *Lycopodium clavatum*’ den elde edilen Sporopollenin’e adsorpsiyon metoduna göre immobilize ederek immobilize lipazın optimum pH’ nın 6.0 ve optimum sıcaklığının ise 40 °C olduğunu bulmuşlardır.

Bakkal (2006), yaptığı çalışmada (S)-(+)-Naproksen’in immobilize CRL biyokatalizörlüğünde rasemik Naproksen metil ester karışımından enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi ile ayrılmasında, immobilizasyon ve tepkime koşullarının enzim aktivitesi ve enantiyoseçiciliği üzerine etkilerini incelenmiştir. CRL’nin immobilizasyon koşulları, enzim miktarı, sulu faz/organik çözücü hacim oranı, sıcaklık, pH, substrat derişimi ve destek türü immobilize olmuş enzimin aktivite ve enantiyoseçiciliğini etkilemiştir. CRL; Amberlite XAD-7, Montmorillonit K10 ve işlem görmüş kile İmmobilize edilmiştir. İmmobilize edilen enzim biyokatalizörlüğünde enantiyoseçimli hidroliz tepkimeleri organik faz (izooktan)- tampon iki fazlı sistemde izoterm koşullarda çalkalamalı hava banyosunda gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyon ve hidroliz tepkimesinin sıcaklık ve pH’ları aynı olduğu zaman immobilize edilen enzim daha iyi katalitik aktivite göstermiştir.

Şahin ve ark. (2009), kaliks[n]aren (n= 4, 6, 8) amin ve karboksilik asit türevlerini *Candida rugosa* lipazına sol-jel tekniğine göre immobilize ederek Naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizinde kullanmışlardır. Çalışmalar sonunda, serbest lipazların immobilize lipazlara göre daha yüksek aktivite ve enantiyoseçicilik gösterdiğini bulmuşlardır.

Yılmaz (2010), yaptığı çalışmada *Candida rugosa* lipazı immobilize etmek için β -Siklodekstrin polimeri, Sporopollenin, Cam boncuklar, Fe_3O_4 nanopartikülleri gibi destek maddelerini hazırlamıştır. Bu destek maddelerini kullanılarak *Candida rugosa* lipaz enzimi kovalent bağlama ve sol-jel İmmobilizasyon tekniğine göre immobilize etmiştir. İmmobilize enzimlerin aktiviteleri, optimum pH ve sıcaklık koşulları, termal ve depolama kararlılığı ile tekrar kullanılabilirliklerini incelemiştir. İmmobilize enzimleri kullanılarak rasemik Naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizi incelemiştir. (S)-(+)-Naproksenin enantiyodönüşümü üzerine pH, sıcaklık ve tekrar kullanılabilirlik gibi parametreler incelemiştir. Sol-jel immobilizasyon metoduna göre immobilize edilen enzimlerin serbest lipazdan daha yüksek enantiyoseçicilik ve dönüşüm gösterdiğini belirlemiştir.

Mutlu (2006), yaptığı çalışmada CRL biyokatalizörlüğünde rasemik Naproksen metil esterden iki fazlı sistemde (S)-(+)-Naproksen üretiminde; çözücü türü, tampon/çözücü hacim oranı (T/Ç), pH, sıcaklık, substrat derişimi, enzim derişimi, karıştırma hızı ve katkı maddeleri ilavesinin enantiyoseçicilik ve aktivite üzerine etkilerini incelenmiştir. Çözücü olarak izooktan, hekzan, siklohekzan ve toluen kullanılmış; 120 st sonunda en yüksek enantiyomerik aşırılık (ee_s ve ee_p), enantiyomerik oran (E) ve dönüşüm (x) değerlerine sırasıyla % 91.3, % 95.2 130.3 ve % 48.9 olarak log P değeri en yüksek çözücü olan izooktan varlığında ulaşılmıştır. Aynı çözücülerin CRL'nin hidrolitik aktivitesi üzerine etkileri incelendiği zaman da en yüksek aktivite izooktan varlığında elde edilmiştir. Tampon/çözücü hacim oranının (S)-(+)-Naproksen üretimine etkisi izooktan varlığında T/Ç= 2, 1/2, 1 ve 1/8 değerlerinde incelenmiş ve 120 st sonunda en yüksek ee_s , ee_p , E and x değerleri sırasıyla % 97.1 (T/Ç=2), % 95.2 (T/Ç=1/2), 133.5 (T/Ç=1) ve % 50 (T/Ç=2) olarak bulunmuştur. T/Ç oranının CRL enziminin hidrolitik aktivitesine etkisi ise 2 ve 1/2 değerlerinde incelenmiş ve her çözücü için T/Ç=2'de elde edilen aktivitenin daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

2.3.3. Mandelik Asit

Mandelik asit, yapısında aromatik bir benzen halkası bulunan α -hidroksi asitler (AHA) arasında en küçük olanıdır. Bir asimetrik karbon atomu içerir. Enantiyomerik formları olan (R)-(-)-Mandelik asit ve (S)-(+)-Mandelik asit ticari olarak temin edilebilmektedir. Bu enantiyomerlerin farmakolojik etkinlikleri birbirinden tamamen

2. KAYNAK ÖZETLERİ

farklıdır. Küçük molekül ağırlığı ve hacimsel büyüklüğünden dolayı cilt yüzeyine nüfuz etme yeteneği yüksek olan kiral bir bileşiktir. Mandelik asit idrar yolları enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır. Yarı sentetik Penisilinlerin sentezinde ve diğer farmakolojik sentezlerde mandelik asit türevleri yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Yarı sentetik penisilinler, antitümör reaktifler, Sefalosporinler, antiyobezite reaktifleri gibi farmakolojik ilaçların üretimi için (R)-(-)-Mandelik asit (MA) oldukça önemlidir. Aynı zamanda, rasemik alkollerin ve aminlerin rezolüsyonunda kiral reaktif olarak kullanılmaktadır (Terreni ve ark. 2001, Karaçoban 2006, Hua ve ark. 2011).

Literatürde, İmmobilize enzimler kullanılarak rasemik mandelik asidin enantiyomerlerine ayrılmasına yönelik çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmaların birinde, Palomo ve ark. (2002), CRL enzimini saflaştırarak, farklı immobilizasyon metodları kullanarak farklı destek maddelerine bu enzimini immobilize ettiler. Çalışmada, hidrofobik destekler üzerine arayüzey adsorbsiyonu, polietilenimin (PEI) kaplı destekler üzerine iyonik adsorbsiyon ve glutaraldehit uçlu destekler üzerine de CRL enzimini kovalent olarak immobilize ettiler. İmmobilize enzimlerin katalitik özelliklerini belirlediler ve immobilize enzimleri kullanarak rasemik metil Mandelat esterinden (S)-(+)-Mandelik asit elde ettiler.

Yılmaz (2010) ise CRL enzimini manyetik sporopollenin'e sol-jel immobilizasyon metoduna göre immobilize ederek immobilize CRL'nin katalitik özelliklerini belirledi. Daha sonra hazırladığı immobilize enzimlerin kullanarak rasemik Naproksen metil esteri, rasemik Mandelik asit metil esteri ve rasemik 2-Fenoksipropionik asit metil esterinin enantiyoselektif hidroliz reaksiyonlarındaki kullanılabilirliğini belirledi. Çalışma sonunda, hazırlanan İmmobilize CRL yüksek enzimatik aktivite gösterdi. Ayrıca, immobilize enzimler kullanılarak enzimatik hidroliz reaksiyonlarında başarılı sonuçlar elde edildi.

Etcı (2011), destek materyali olarak $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@APTES-Spo-HMDI}$ ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@EPPTMS-Spo-NH}_2$ nanopartiküllerine sol-jel metoduna göre *Candida rugosa* lipazı immobilize etti. İmmobilize lipazları, rasemik Naproksen metil esterinin, rasemik 2-Fenoksipropionik asit metil esterinin ve rasemik Mandelik asit metil esterinin kinetik rezolüsyonunda kullanıldı.

Fernandez-Lorente ve ark. (2001), CRL ve *Candida antarctica*-B lipazı değişik destek materyallerine immobilize ederek standart şartlar (pH 7.0 ve 25 °C) altında ve standart olmayan şartlar altında rasemik Mandelik asit esterlerinin enzimatik hidrolizinde kullandılar. Çalışmada standart olmayan şartlarda çalışırken immobilize enzimlerin yüksek enantiyoseçiciliğe sahip olduklarını buldular. Örneğin, PEI kaplı destek materyallerine immobilize edilmiş CRL enziminin pH 5.0’de (S)-(+)-Mandelik aside stereosepesifik olduğunu belirlediler.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Bu çalışma, Batman Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Araştırma laboratuvarları ile Dicle Üniversitesi Ziya Gökalp Eğitim Fakültesi Kimya Eğitimi Anabilim Dalı Organik Kimya Araştırma laboratuvarında yürütüldü. Hazırlanan manyetik nanopartikül ve türevlerinin yapılarının aydınlatılmasında Dicle Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DUBTAM) Araştırma Laboratuvarları kullanıldı. Substrat olarak kullanılan esterlerin yapıları, Dicle Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi NMR laboratuvarındaki 400 MHz ^1H NMR cihazıyla aydınlatıldı. Çalışmada kullanılan alet ve cihazların listesi aşağıda verilmiştir (Çizelge 3.1.).

3. MATERYAL VE METOT

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihazın Adı	Marka
pH metre	Hanna Instrument HI 221 Calibration Check Microprocessor
Ultra Saf Su Cihazı	Sartorius Arium Comfort
Magnetik karıştırıcı	Heidolph MR Hei-Standart Magnetic Stirrer
Erime noktası cihazı	Barnstead IA9100 Electrothermal Digital Melting Point Apparatus
Evaporatör	Heidolph Laborato 4001 Efficient
FT-IR spektrofotometresi	Perkin Elmer Spectrum 100
Soğutmalı inkübatör	Zhicheng ZHWY-200 B incubator shaker
Etüv	Protherm
UV/VIS spektrofotometresi	Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS Spectrometer
HPLC	Agilent Technologies 1260 Infinity Series
Polarimetre	Perkin Elmer 341 model
SEM	Quanta 250 FEG
TGA	Shimadzu DTG-60H Differential Thermal Gravimetric Analyser
Derin dondurucu	Uğur
XRD	Rigaku RINT-2000; CuK α radyasyon
Liyofilizatör	Telstar LyoQuest
Sonikaör	Sonics
NMR	Büker AV 400
Mekanik Karıştırıcı	İKA Labortechnik RW 20
Mikropipetler	Eppendorf
Chiralcel OD, Chiralcel OD-H ve Chiralpak AD-H	Daicel
Lux Cellulose-1	Phenomenex

3.1.2. Kullanılan Kimyasal ve Biyokimyasal Maddeler

Deneyisel çalışmalarda kullanılan tüm reaktifler analitik saflıkta olup Merck, Fluka ve Sigma-Aldrich firmalarından temin edildi. Kullanılan maddelerin ve ticari sağlayıcıların katalog numaraları aşağıda verilmiştir (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasal ve biyokimyasal maddeler

Kimyasal ve Biyokimyasal Maddeler	Firma	Katalog No
CRL	Sigma	L-1754
Demir (III) klorür heksahidrat	Sigma-Aldrich	31232
Demir (II) klorür tetrahidrat	Merck	1.03861.0250
Epiklorohidrin	Fluka	45340
Disodyum hidrojen fosfat	Sigma-Aldrich	S7907
Magnezyum sülfat	Merck	1.06067.1000
Sodyum karbonat	Merck	1.06392.1000
Bakır sülfat pentahidrat	Merck	1.02790.1000
Sodyum hidroksit	Merck	1.06462.1000
İzooktan	Merck	1.15440.2500
Trifloro asetik asit	Merck	S6451162214
Bovin Serum albümin	Sigma-Aldrich	A2153
3-APTES	Sigma-Aldrich	440140
Folin reaktifi	Sigma-Aldrich	F9252
Glutaraldehit	Sigma-Aldrich	G5882
p-Nitrofenil palmitat	Sigma-Aldrich	N2752
Benzen	Sigma-Aldrich	319953
Metanol	Merck	1.06018.2500
Hidroklorik asit	Merck	1.00314.2500
Sülfürik asit	Merck	1.00731.2500
2-Propanol	Merck	1.00995.2500

3. MATERYAL VE METOT

Çizelge 3.2. Çalışmalarda kullanılan kimyasal ve biyokimyasal maddeler “(devamı)”
Kimyasal ve Biyokimyasal Maddeler **Firma** **Katalog No**

(S)-(+)-İbuprofen	Sigma-Aldrich	375160
(S)-(+)-Naproksen	Aldrich	284785
Rasemik Mandelik Asit	Fluka	41605
n-Heksan	Merck	K43222291 207
Etanol	Sigma-Aldrich	32221
Amonyum hidroksit	Sigma-Aldrich	05003
1-Bütanol	Sigma-Aldrich	537993
Aseton	Sigma-Aldrich	48358
Sodyum sitrat	Sigma-Aldrich	W302600
Tris baz	Sigma-Aldrich	93440
Sodyum bikarbonat	Sigma-Aldrich	S6297
Dietil eter	Sigma-Aldrich	E4658
Toluen	Sigma-Aldrich	568821
Asetik asit	Sigma-Aldrich	A6283
Ninhidrin	Sigma-Aldrich	151173
Fenol	Sigma-Aldrich	P5566
Perklorik asit	Sigma-Aldrich	244252
Sodyum tiyosülfat	Sigma-Aldrich	217263
Fenolftalin	Sigma-Aldrich	105945

3.2. Metot

Bu çalışma üç bölümden oluşmaktadır;

Birinci bölümde, manyetik Fe_3O_4 nanopartikülleri hazırlandı. Hazırlanan nanopartiküllere, enzimi immobilize etmek için iki farklı organik uzatma kolu takıldı. Birinci uzatma kolu olarak (3-Aminopropil) trietoksisilan (3-APTES) ve Glutaraldehit (GA) kullanıldı. İkinci uzatma kolu olarak da rasemik Epiklorhidrin (EP) kullanıldı. Hazırlanan, manyetik Fe_3O_4 nanopartikül ve türevlerinin yapılarının aydınlatılması için;

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), X-Işını Difraksiyonu (XRD), Termal Gravimetrik Analiz (TGA) ve FT-IR Spektroskopisi (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi) kullanıldı.

İkinci bölümde, organik uzatma kolları ile aktifleştirilen nanopartiküllere kovalent bağlanma metoduna göre CRL immobilize edildi. Ardından serbest ve immobilize enzimlerin sırasıyla; enzimatik aktiviteleri, optimum pH'ları, optimum sıcaklıkları, termal kararlılıkları ve depolama kararlılıkları belirlendi. Ayrıca, immobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirlikleri de belirlendi.

Üçüncü bölümde, immobilize enzimler ($\text{Fe}_3\text{O}_4@3\text{-APTES=GA-CRL}$ ve $\text{Fe}_3\text{O}_4@EP\text{-CRL}$) kullanılarak rasemik İbuprofen metil esterinin, rasemik Naproksen metil esterinin ve rasemik Bütil Mandelat'ın enantioselektif hidroliz çalışmaları yapıldı. Tarafımızdan sentezlenen ve enzimatik hidroliz çalışmalarında kullanılan esterlerin yapıları, ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları alınarak aydınlatıldı.

Çalışmaların ilk basamağında önce standart Bovin Serum Albümin (BSA) grafiği (Şekil 3.1.) ve standart *p*-Nitrofenol grafiği (Şekil 3.2.) çizildi. Bu çizilen grafiklerden elde edilen doğru denklemleri kullanılarak serbest ve immobilize enzimlerin aktiviteleri belirlendi. Ayrıca çizilen standart BSA grafiği kullanılarak serbest enzimin protein içeriği ve immobilizasyon işlemlerinden sonra süzüntülerde kalan protein miktarı belirlenerek immobilizasyonun başarısı belirlendi (Lowry ve ark. 1951).

Standart Bovin Serum Albümin Grafiğinin Çizilmesi: Standart BSA grafiğinin çizilmesinde kullanılan ve aşağıda A, B ve C harfleri ile isimlendirilen çözeltiler hazırlandı.

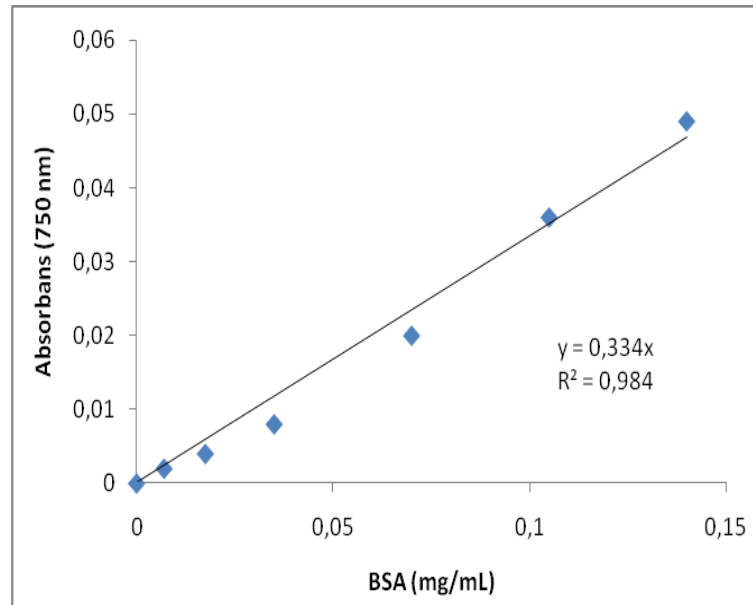
- **Standart protein çözeltisi:** 0.14 mgmL^{-1} derişiminde sığır albümin çözeltisi hazırlandı.
- **Folin-Ciocalteu reaktifi:** 1 mL Folin Ciocalteu reaktifi, 2 mL saf su ile seyreltilerek hazırlandı.
- **Çözelti A:** 0.2 g NaOH ve 1 g Na_2CO_3 saf suda çözüldü ve son hacim 50 mL'ye tamamlandı.

3. MATERYAL VE METOT

- **Çözelti B:** 0.5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, % 1'lik Trisodyum sitrat çözeltisinde çözülerek son hacim aynı çözelti ile 100 mL'ye tamamlandı.
- **Çözelti C:** 1 mL B çözeltisi ve 50 mL A çözeltisi karıştırılarak, C çözeltisi hazırlandı.

Basamak sayısı Standart protein grafiğinin çizimi işlem basamakları:

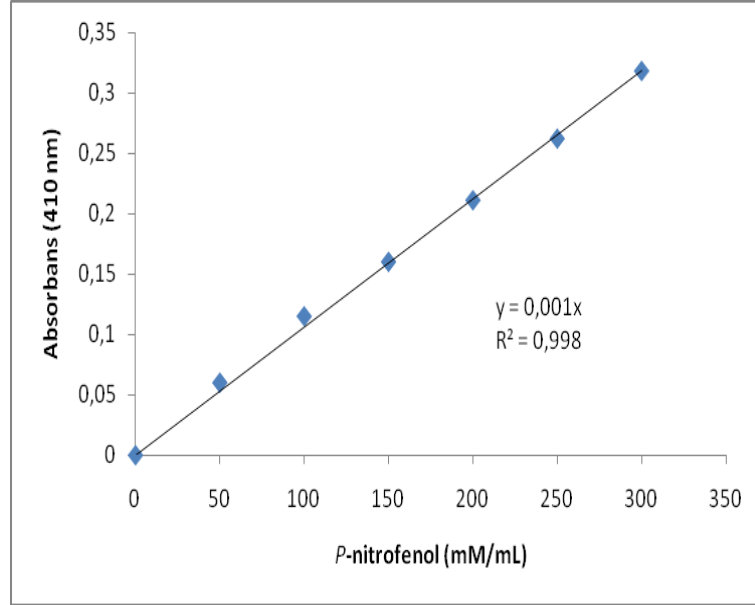
- 1. Bsmk** 8 adet deney tüpüne sırasıyla 0, 50, 100, 125, 250, 500, 750 ve 1000 μL standart protein çözeltisi konuldu. Daha sonra her tüpün hacmi 1 mL'ye tamamlandı.
- 2. Bsmk** Her tüpe C çözeltisinden 5 mL ilave edildi.
- 3. Bsmk** Tüpler, 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- 4. Bsmk** Her tüpe Folin-Ciocalteu çözeltisinden 0.5 mL eklendi.
- 5. Bsmk** Tüpler 30 dakika oda sıcaklığında ve ışıksız ortamda bekletildi.
- 6. Bsmk** Tüplerdeki çözeltilerin absorbansları köre karşı 750 nm'de okundu ve elde edilen bu değerler derişime karşı grafiğe geçirildi (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Standart BSA grafiği

Standart *p*-Nitrofenol Grafiğinin Çizimi: Öncelikle *p*-Nitrofenol'ün 300 mM ve 100 mL stok çözeltisi hazırlandı. Ardından bu çözeltiden, her birinin hacmi 10 mL olacak

şekilde 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM ve 300 mM olmak üzere farklı derişimlerde altı çözelti hazırlandı. Bu çözeltilerin 410 nm’de absorbansları okunarak derişime karşı absorbans grafiğı çizildi (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Standart *p*-Nitrofenol grafiğı

CRL’nin Yapısındaki Protein Miktarı Belirlenmesi: Standart BSA-Absorbans grafiğinden elde edilen denklemden faydalanarak CRL’nin yapısındaki protein miktarı tespit edildi. Bunun için; 3 mgmL^{-1} derişiminde 5 mL hacminde enzim çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden 1000 μL alınıp deney tüpüne kondu. Ardından, bu çözeltiye C çözeltisinden 5 mL ilave edildi. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra tüpe 1:2 oranında seyreltilmiş Folin-Ciocalteu çözeltisinden 0.5 mL eklendi. 30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra tüpün absorbansı köre karşı 750 nm’de okundu.

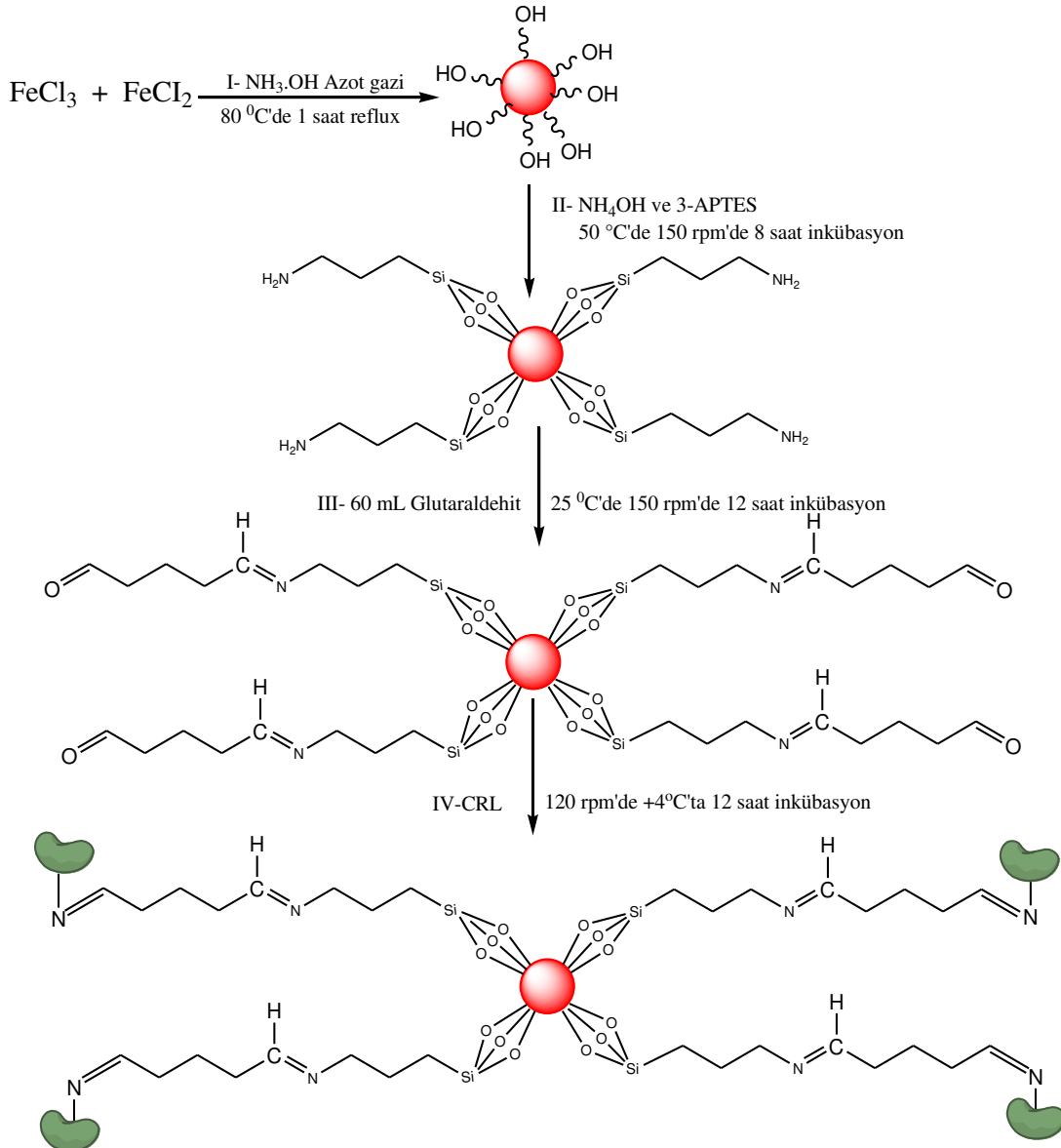
3.2.1. Manyetik Fe_3O_4 Nanopartiküllerin Hazırlanması

Manyetik Fe_3O_4 nanopartikülleri, Fe^{+2} ve Fe^{+3} iyonlarının birlikte çöktürülmesiyle elde edildi (Maity ve ark. 2007). Manyetik nanopartiküllerin hazırlanması sırasında oksidasyonu önlemek için azot gazı atmosferinde çalışıldı. Tuzların molar konsantrasyonları $[\text{Fe}^{2+}] / [\text{Fe}^{3+}]$ 1 / 1.75 olacak şekilde ayarlanarak bazik koşullar altında koyu kahverengi Fe_3O_4 partikülleri elde edildi.

Nanopartiküllerin Hazırlanması: 3.1736 g (0.016 mol) $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ve 7.5684 g (0.028 mol) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 320 mL deiyonize suda çözüldü. Çözelti geri soğutucu altında

3. MATERYAL VE METOT

yağ banyosunda 80 °C’de azot gazı atmosferi altında 1 saat karıştırıldı. Daha sonra reaksiyon balonuna, 40 mL amonyum hidroksit hızlı bir şekilde ilave edildi (pH yaklaşık 11 oldu) ve karışım yine aynı şartlar altında 1 saat karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığına kadar soğutuldu ve Neodyum Demir Bor (Nd-Fe-B) mıknatıs kullanılarak nanopartiküller sulu fazdan uzaklaştırıldı. Elde edilen partiküller deiyonize su ile birkaç defa yıkandı. Süzütünün pH’ı 7 olana kadar işleme devam edildi. Partiküller, liyofilizatör (Freeze Dryer)’de bir gece kurutuldu. Kurutulan partiküller havanda iyice dövüldü ve daha sonraki işlemlerde kullanılmak üzere +4 °C’de saklandı (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Manyetik Fe₃O₄ partiküllerin hazırlanması (I), Fe₃O₄@3-APTES’in hazırlanması (II), Fe₃O₄@3-APTES=GA’nın hazırlanması (III), Fe₃O₄@3-APTES=GA-CRL’nin hazırlanması (IV)

3.2.2. Fe₃O₄@APTES=GA'nın Hazırlanması ve CRL'nin İmmobilizasyonu

Manyetik Fe₃O₄ nanopartiküllerine, CRL'yi immobilize etmek için öncelikle partikül yüzeyleri 3-APTES ile kaplandı ve daha sonra oluşan yapı GA ile aktifleştirildi (Özcan ve ark. 2009, Özmen ve ark. 2010).

3.2.2.1. Fe₃O₄@3-APTES'in Hazırlanması

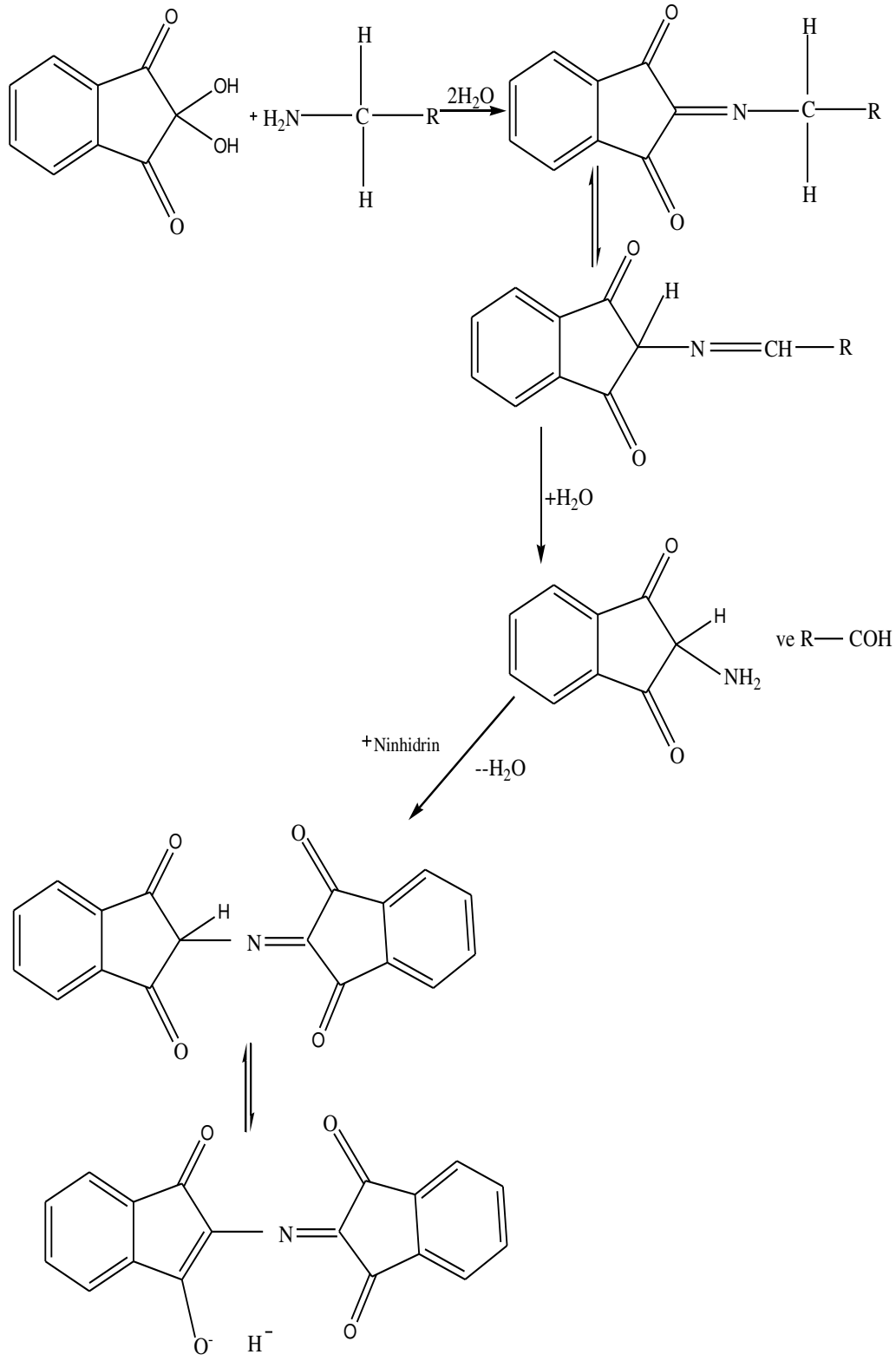
4.2252 g partikül 150 mL etanole su (1:1) çözeltisine ilave edildi ve yaklaşık 1 saat süreyle sonikatörde karıştırıldı. Ardından, karışıma 16.1600 g 3-APTES ilave edildi ve daha sonra karışım 40 °C'de azot gazı atmosferinde 2 saat mekanik karıştırıcı ile karıştırıldı. Reaksiyon sonunda karışım oda sıcaklığına kadar soğutuldu. Süzgeç kağıdı üzerinden süzüldü ve sırasıyla etanol ve deiyonize su ile nötr pH' a kadar yıkandı. Bu işlemten sonra manyetik partiküller liyofilizatör (Freeze Dryer)'de kurutuldu ve daha sonraki işlemlerde kullanılmak üzere +4 °C'de saklandı (Şekil 3.3.). Oluşan yapı Fe₃O₄@3-APTES şeklinde sembolize edildi.

Manyetik Fe₃O₄ nanopartiküller silanlandıktan sonra destek yüzeyinde bulunan amino gruplarının miktarı belirlendi (Hermanson ve ark. 1992). Fe₃O₄@3-APTES yapısındaki serbest amino gruplarının miktarının belirlenmesi için öncelikle 3-APTES'in derişime bağlı absorbands grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanarak yapıda bulunan serbest amino gruplarının miktarı belirlendi.

Standart 3-APTES Grafiğinin Çizim İşlemleri: 3-APTES'in 0.01 M ve 100 mL'lik stok bir çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiden herbiri 2 mL hacminde olmak üzere değişik derişimlerinde (6×10^{-4} M, 9×10^{-4} M, 12×10^{-4} M, 15×10^{-4} M, 18×10^{-4} M ve 21×10^{-4} M) altı çözelti hazırlandı. Ayrıca, % 2 (w/v)'lik Ninhidrin çözeltisi hazırlandı.

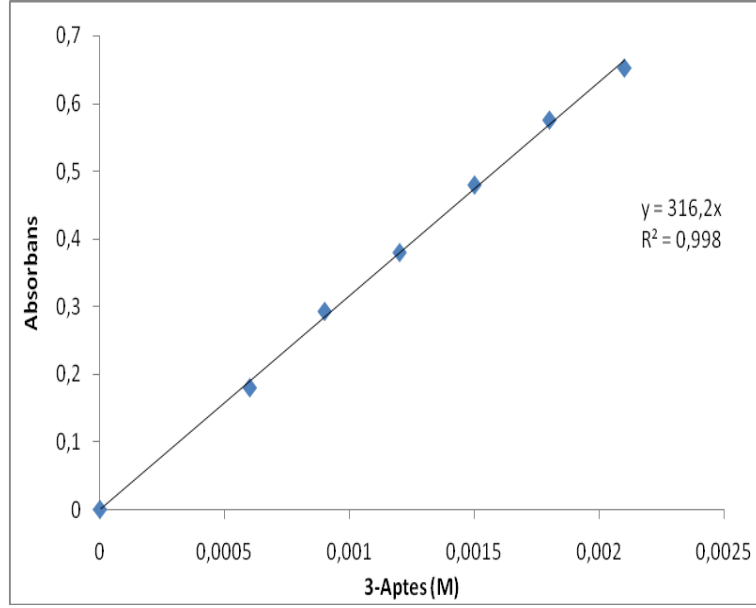
Yukarıda hazırlanan bu çözeltilerin her birinden 100 µL alınıp tüplere aktarıldı ve hemen ardından tüplere 200 µL ninhidrin çözeltisi ilave edildi. Kör tüpe de, 100 µL su ve 200 µL Ninhidrin çözeltisi ilave edildi (Şekil 3.4.). Tüplerdeki çözelti bir su banyosunda (suyun kaynama sıcaklığında) 15 dakika bekletilip ardından bir buz banyosunda soğumaya bırakıldı. Bu basamakta her bir tüpe 50:50 oranında hazırlanan etanol: su çözeltisinden 5 mL eklenerek karıştırıldı ve çözeltilerin absorbandsı 570 nm de okundu. Bu verilerden faydalanarak standart bir grafik çizildi (Şekil 3.5.).

3. MATERYAL VE METOT



Mor renkli Kompleks

Şekil 3.4. Ninhidrinin ile $\text{R}-\text{NH}_2$ grubu arasındaki reaksiyon



Şekil 3.5. Standart 3-Aptes grafiği

Hazırlanan $\text{Fe}_3\text{O}_4@3\text{-APTES}$ 'in yapısındaki serbest amino gruplarının varlığının kanıtlanması ve miktarının belirlenmesi için 100 μL suya 20 mg partikül eklendi ve hemen ardından tüplere 200 μL Ninhidrin çözeltisi ilave edildi. Kör içinde tüpe, 100 μL su ve 200 μL Ninhidrin çözeltisi ilave edildi. Bu esnada mor renkli kompleks oluştu (Bu durum serbest amino gruplarının varlığının ve 3-APTES'in yapıya kovalent bağlandığının göstergesidir.). Tüplerdeki çözeltiler bir su banyosunda (suyun kaynama sıcaklığında) 15 dakika bekletilip ardından soğuk suya alınarak soğumaya bırakıldı. Son olarak çözeltilere 50:50 oranında hazırlanan etanol: su çözeltisinden 5 mL eklenerek karıştırıldı ve çözeltilerin absorbansı 570 nm' de okundu. Okunan absorbans değerleri standart grafikten elde edilen denklemde yerine konularak serbest amino gruplarının miktarı belirlendi.

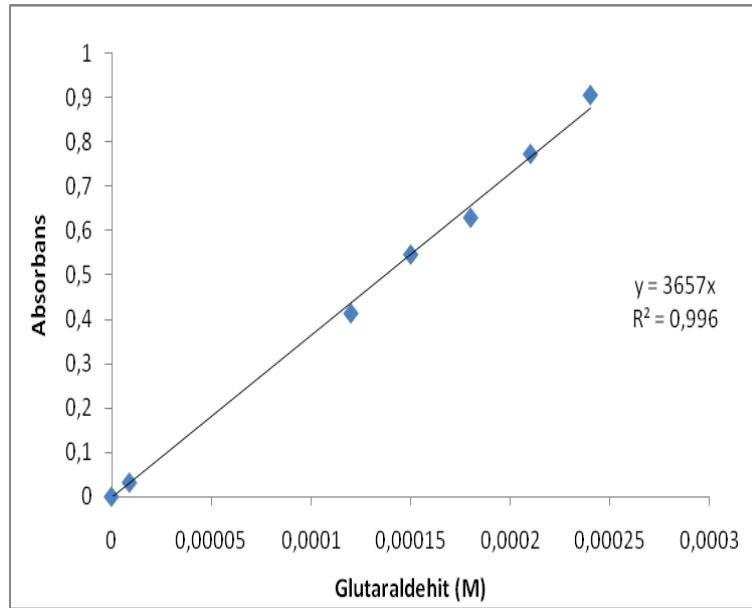
3.2.2.2. $\text{Fe}_3\text{O}_4@3\text{-APTES=GA}$ 'nın Hazırlanması

1.5300 g $\text{Fe}_3\text{O}_4@3\text{-APTES}$, 60 mL ve % 12.5'lik GA çözeltisine ilave edildi. Ardından karışım, 25 $^{\circ}\text{C}$ 'de 150 rpm'de 12 saat inkübasyona tabi tutuldu. Süre sonunda partiküller süzgeç kâğıdı üzerinden süzüldü ve yıkama çözeltisinde glutaraldehit kalmayıncaya kadar yıkandı.

Yıkama işleminin başarılı bir şekilde yapıp yapılmadığını anlamak için yıkama suyunda GA'nın spektrofotometrik olarak belirlenebildiği bir yöntem kullanıldı. Bu yöntemde öncelikle standart bir grafik çizildi. Bunun için; GA'nın 10×10^{-4} M ve 100

3. MATERYAL VE METOT

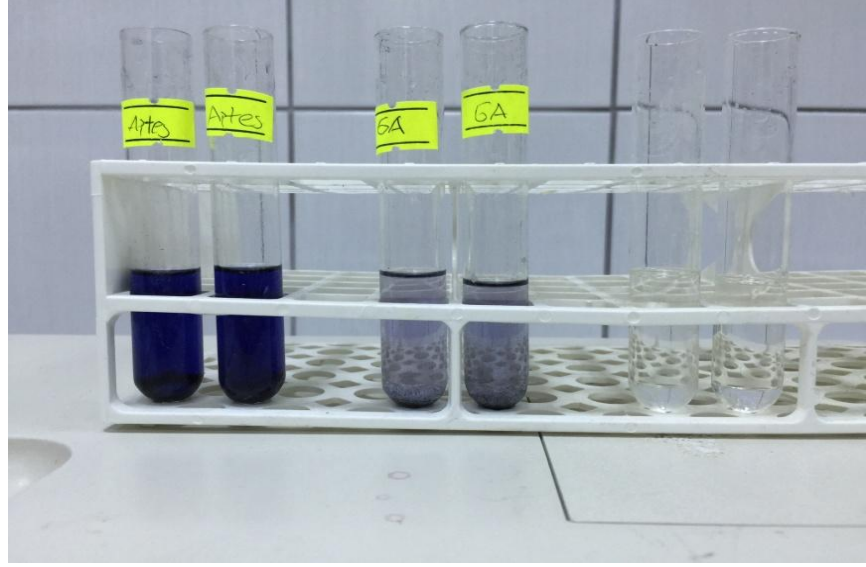
mL'lık stok bir çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltiden herbiri 2 mL'lık hacime sahip değişik derişimlerde ($9,0 \times 10^{-6}$ M, 12×10^{-5} M, 15×10^{-5} M, 18×10^{-5} M, 21×10^{-5} M ve 24×10^{-5} M) olmak üzere altı çözelti hazırlandı. Bu çözeltilerden 500 μ L'lık nümuneler alınıp deney tüplerine konuldu. Tüplere 2.5 mL Fenol ayırıcı (40 μ L % 5 (w/v)'lik Fenol çözeltisi ve 10 mL % 70 (w/w)'lik HClO_4 çözeltisi) eklenerek oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi ve daha sonra 479 nm'de köre karşı absorbansları okundu. Elde edilen absorbans değerlerinden standart bir grafik çizildi (Şekil 3.6.).



Şekil 3.6. Standart GA grafiği

Yıkama süzütüsünden alınan 500 μ L'lık örnekler aynı işlemlerden geçirilerek 479 nm'de U.V.de nümunenin absorbansının olup olmadığı kontrol edildi. GA'nın tamamen uzaklaştırıldığından emin olunduktan sonra, destek 50 °C'de kurumaya bırakıldı (Boratynski ve Zal 1990). Daha sonraki işlemlerde kullanılmak üzere +4 °C'de saklandı.

$\text{Fe}_3\text{O}_4@3\text{-APTES}$ 'in GA muamelesinden sonra GA ile reaksiyon vermeyen destekte bulunan serbest $-\text{NH}_2$ gruplarının miktarı belirlendi (Hermanson ve ark. 1992). Bu yöntem ile GA bağlanmayan $\text{Fe}_3\text{O}_4@3\text{-APTES}$ yapısındaki serbest amino grubu taşıyan uçların miktarı belirlendi. Bunun için, Bölüm 3.2.2.1.'de yapılan işlemler tekrarlandı (Şekil 3.7.).



Şekil 3.7. Soldan sağa doğru $\text{Fe}_3\text{O}_4@3\text{-APTES}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@3\text{-APTES=GA}$ ve körün Ninhidrinin ile etkileşmesi sonucu oluşan mor renkli kompleks

3.2.2.3. $\text{Fe}_3\text{O}_4@3\text{-APTES=GA}$ 'ya CRL'nin İmmobilizasyonu

CRL, manyetik nanopartiküllere GA üzerinden kovalent bağlanma metoduna göre immobilize edildi (Sahoo ve ark. 2011). 1.5 g $\text{Fe}_3\text{O}_4@3\text{-APTES=GA}$, derişimi 10 mg mL^{-1} olan 45 mL enzim çözeltisine (50 mM pH 7.0 fosfat tamponu kullanıldı) ilave edildi. Karışım, 120 rpm dönme hızı ile $+4^\circ\text{C}$ 'de 12 saat karıştırıldı. Süre sonunda immobilize enzimler yıkandı. Yıkama suları immobilizasyon başarısını belirlemek için ayrıldı (Lowry ve ark. 1951). İmmobilize enzim oda sıcaklığında kurutuldu ve buzdolabında $+4^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edildi (Şekil 3.3.).

İmmobilizasyon İşleminin Sonunda Bağlı İmmobilizasyon Başarısının Belirlenmesi: İmmobilizasyon işlemi sonunda süzüntüdeki protein miktarı tayini yapıldı. Ayrıca, bağlı immobilizasyon başarısı belirlendi. Protein tayini yapıldıktan sonra immobilizasyonun başlangıcında ortama eklenen CRL'nin miktarından süzüntüde bulunan enzim miktarı çıkartılarak 1.5 g desteğe bağlanan enzim miktarı hesaplandı.

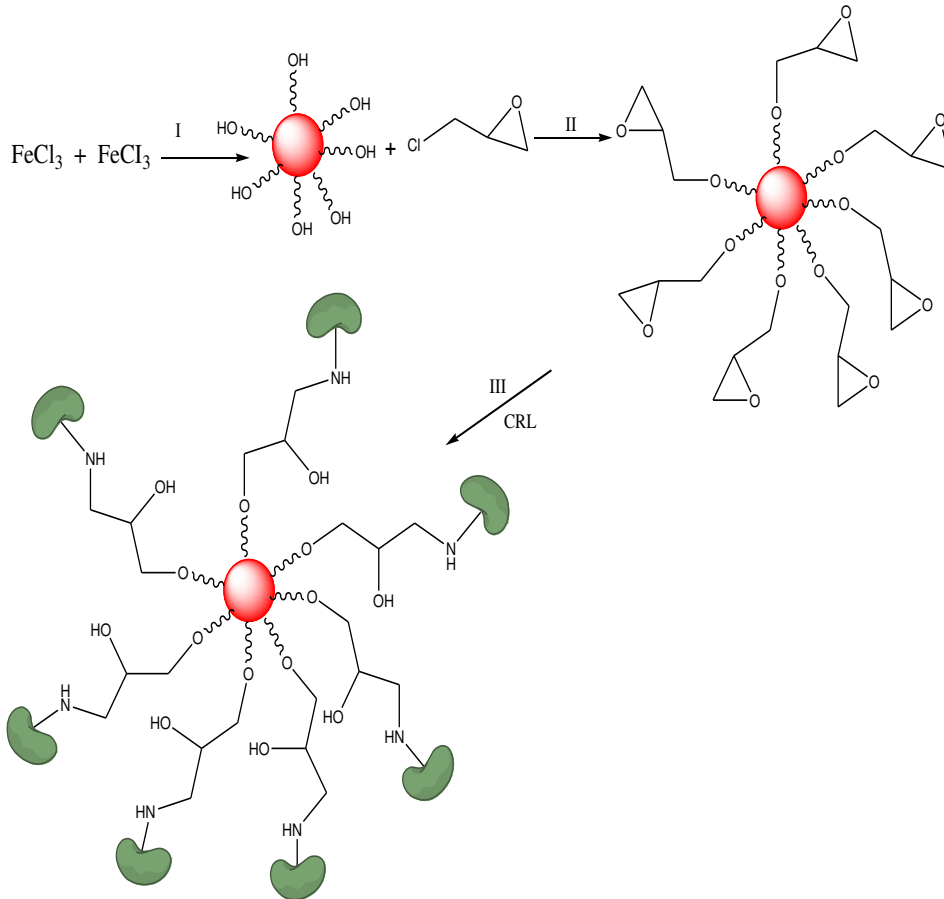
Bu değerden faydalanarak gram destek başına bağlanan mg enzim miktarı hesaplandı. Bunun için; deney tüpüne süzüntüden 1 mL alındı. Ardından, C çözeltisinden tüpe 5 mL ilave edildi. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten hemen sonra tüpe 1:2 oranında seyreltilen Folin-Ciocalteu çözeltisinden 0.5 mL eklendi. 30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra tüp içeriğinin absorbansı köre karşı 750 nm 'de okundu.

3.2.3. Fe₃O₄@EP'nin Hazırlanması ve CRL'nin İmmobilizasyonu

Manyetik Fe₃O₄ nanopartiküllerine, CRL'nin immobilizasyonu için öncelikle partikül yüzeyleri EP ile aktifleştirildi. Ardından, aktifleştirilen bu partiküllere kovalent bağlanma metoduna göre CRL immobilize edildi (Sahoo ve ark. 2011). Literatürdeki benzer çalışmalarla kıyaslanarak yapıya giren oksiran gruplarının varlığı kanıtlandı ve miktarı belirlendi (Sundberg ve Porath 1974, Axen ve ark. 1975).

3.2.3.1. Fe₃O₄@EP'nin Hazırlanması

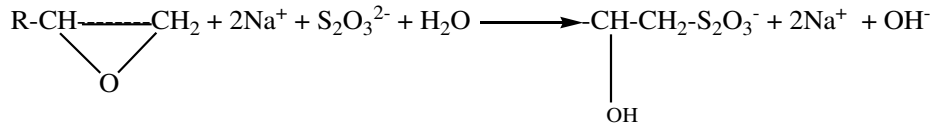
3.0 g manyetik Fe₃O₄, 1 M 60 mL'lik NaOH çözeltisine ilave edildi. Bu karışıma oda sıcaklığında 6 mL EP yavaşça ilave edildi. Ardından, karışım 60 °C'de 165 rpm'de 2 saat inkübe edildi. Süre sonunda, partiküller süzülerek yıkandı. Oluşan destek maddesinin yapısı Fe₃O₄@EP olarak sembolize edildi (Şekil 3.8.)



Şekil 3.8. Manyetik Fe₃O₄ partiküllerinin hazırlanması (I), Fe₃O₄@EP'nin hazırlanması (II), Fe₃O₄@EP-CRL'nin hazırlanması (III)

Hazırlanan Fe₃O₄@EP’de Bulunan Oksiran Gruplarının Varlığının ve Miktarının

Belirlenmesi: Bunun için 0.5 g Fe₃O₄@EP, 2.6 mL ve 1.3 M’lık Sodyum tiyosülfat (Na₂S₂O₃) çözeltisine ilave edildi. Bu karışıma indikatör olarak bir damla Fenolftalein eklendi. Karışım dönüm noktasına kadar 0.1 M HCl çözeltisi ile titre edildi (Şekil 3.9.). Stokiyometrik olarak harcanan HCl çözeltisinin hacminden oksiran grubunun miktarı g destek başına hesaplandı.



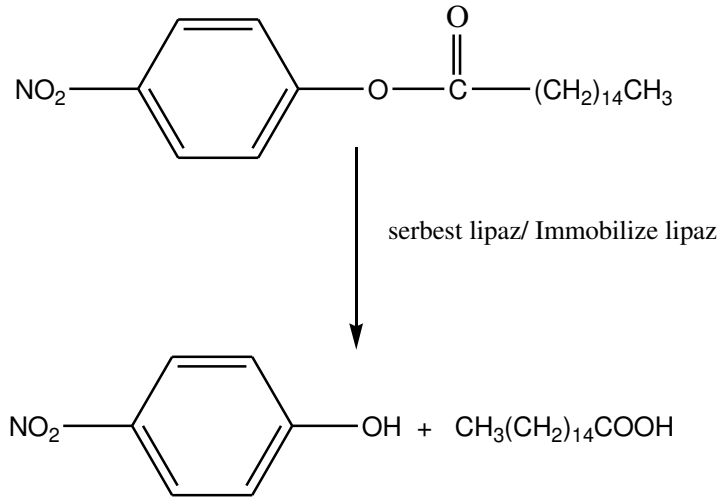
Şekil 3.9. Fe₃O₄@EP’nin Sodyum tiyosülfat ile reaksiyonu

3.2.3.2. CRL’nin Fe₃O₄@EP’ye Kovalent İmmobilizasyonu

1.5 g Fe₃O₄@EP, derişimi 10 mgmL⁻¹ olan 45 mL enzim çözeltisine (50 mM pH 7.0 fosfat tamponu kullanıldı) ilave edildi ve karışım 120 rpm dönme hızı ile +4 °C’de 12 saat karıştırıldı. Süresi sonunda, partiküller süzöldü ve pH 7.0 fosfat tamponu ile yıkanarak desteğe bağlanmayan serbest enzimlerinin uzaklaştırılması sağlandı. İmmobilize enzim oda sıcaklığında kurutuldu ve kullanılıncaya kadar buzdolabında +4 °C’de muhafaza edildi (Şekil 3.8.). Yıkama suları immobilizasyon başarısının belirlenmesi için ayrıldı (Lowry ve ark. 1951).

3.2.4. Serbest ve İmmobilize Lipazların Aktiviteleri

Serbest CRL için deney tüpüne fosfat tamponunda (50 mM, pH 7.0) hazırlanan lipaz çözeltisinin (1 mg/mL) 1.0 mL’si ilave edildi. İmmobilize lipazlar için deney tüplerine öncelikle 1.0 mL fosfat tamponu (50 mM, pH 7.0) eklendi ve ardından her tüpe 20 mg immobilize lipaz ilave edildi. Daha sonra, etanol içinde hazırlanan *p*-nitrofenilpalmitat (*p*-NFP) çözeltisinden 1.0 mL (14.4 mM), serbest enzim ve immobilize enzimlerin olduğu deney tüplerine ilave edildi. Tüpler 30 dakika karıştırıldı. Reaksiyon süresi sonunda tüplere 2.0 mL 0.5 N Na₂CO₃ çözeltisi ilave edildi (Şekil 3.10.). Deney tüplerindeki karışımlar, içinde 2 cm yüksekliğinde cam pamuk bulunan 10 mL’lik enjektör kullanılarak süzöldü. Süzöntülerde açığa çıkan *p*-nitrofenolün absorbansı 410 nm’de ölçöldü. Çalışmalar 25 °C’de yapıldı (Hung ve ark. 2003, Chiou ve Wu 2004).



Şekil 3.10. CRL tarafından katalizlenmiş *p*-nitrofenilpalmitat'ın hidrolizi

3.2.5. Serbest ve İmmobilize Lipazların Optimum pH'ları

Protein yapısına sahip enzimlerin üç boyutlu yapısına etki eden tüm faktörler, enzimlerin kararlılıkları üzerinde etkilidir. Ortamın pH'sı enzimin üç boyutlu yapısı üzerinde etki eden faktörlerden biridir. Enzim çoğu aşırı asidik ya da bazik koşullarda tersinmez denatürasyona uğrar.

Serbest ve immobilize lipazların ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@EP-CRL}$ ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@3-APTES=GA-CRL}$) aktiviteleri farklı pH'larda (pH 5.0 Trisodyum sitrat dihidrat; pH 6, 7 ve 8 fosfat tamponu; pH 8.5 Tris baz) ve 50 mM derişimde hazırlanan tampon çözeltiler kullanılarak belirlendi. Bunun için Kesim 3.2.4.'de verilen işlem basamakları dikkate alınarak her seferinde farklı bir pH'daki tampon çözelti kullanarak aktivite tayinleri yapıldı.

3.2.6. Serbest ve İmmobilize Lipazların Optimum Sıcaklıkları

Serbest ve immobilize lipazların ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@EP-CRL}$ ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@3-APTES=GA-CRL}$) aktivitelerine, sıcaklığın etkisini incelemek amacı serbest ve immobilize lipazların farklı sıcaklıklarda (25, 30, 35, 40, 50 ve 60 °C) ve 50 mM fosfat tamponundaki (serbest enzim için pH 7.0'de, immobilize enzimler için pH 8.0'de çözelti hazırlandı) hidrolitik aktiviteleri ölçülerek optimum sıcaklık değerleri belirlendi. Bunun için Kesim 3.2.4.'de verilen işlem basamakları dikkate alınarak her seferinde farklı bir sıcaklık değerinde aktivite tayinleri yapıldı.

3.2.7. Serbest ve İmmobilize Lipazların Termal Kararlılıkları

Enzimler protein yapısındadırlar ve sıcaklık artışlarına karşı hassastırlar. Bu nedenle, enzimatik reaksiyonlar için yüksek sıcaklıklar tercih edilmez. Ancak enzimlerin termal kararlılığı artırılabilirse endüstriyel açıdan kullanım potansiyeline sahip biyokatalizörler hazırlanmış olur.

Serbest enzim ve immobilize lipazların ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@EP-CRL}$ ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@3-APTES=GA-CRL}$) termal kararlılığı incelemek amacı ile serbest ve immobilize lipazların çözeltileri 60 °C’de farklı zaman aralıklarında (20, 40, 60, 80, 100 ve 120 dakika) tutularak termal kararlılıkları belirlendi. Serbest ve immobilize enzimlerin termal kararlılıklarının belirlenmesi işlemlerinde serbest enzim için pH 7.0’de, immobilize enzimler için pH 8.0’de 50 mM fosfat tamponu kullanıldı.

3.2.8. Serbest ve İmmobilize Lipazların Depolama Kararlılıkları

Depolama kararlılığı uzun süre saklama durumunda aktivite kaybının bir ölçüsüdür. Çalışmada, hazırlanan immobilize lipazların daha sonraki zaman dilimlerinde aktivitelerinin belirlenmesi için her birinden 20 mg tartılıp deney tüplerine konuldu ve tüplerin ağzları parafilm ile kapatılarak +4 °C’de buzdolabında muhafaza edildiler. 30 gün boyunca periyodik aralıklarla aktivitelerindeki değişimler belirlendi. Aktivitelerinin belirlenmesi işlemlerinde pH 8.0’de hazırlanan 50 mM derişimde fosfat tamponu kullanıldı. Aynı şekilde, serbest enzimin daha sonraki zaman dilimlerinde aktivitesinin belirlenmesi için fosfat tamponu (50 mM, pH 7.0) kullanılarak 1 mg/mL derişime sahip çözeltisi hazırlandı. +4.0’de buzdolabında muhafaza edildi. 30 gün boyunca belirli aralıklarla aktivitesindeki değişim belirlendi.

3.2.9. İmmobilize Lipazların Tekrar Kullanılabilirlikleri

İmmobilize enzimlerin, endüstriyel kullanımları açısından tekrar kullanılabilirlik son derece önemli bir parametredir. Aktivite tayinlerinin belirlenmesinde Kesim 3.2.4.’de verilen işlem sırası takip edildi. Bu bölümde, 50 mM derişimde hazırlanan pH 8.0 fosfat tamponu kullanıldı. Ayrıca, 25 mg immobilize enzim kullanıldı. Çalışmalar 25 °C’de yapıldı. Her işlemten sonra immobilize enzimler, kullanılan tampon çözeltinin 5 mL’si ile yıkandı. Bu işlemler 20 kez tekrarlandı.

3.3. İmmobilize Lipazların Hidroliz Çalışmaları

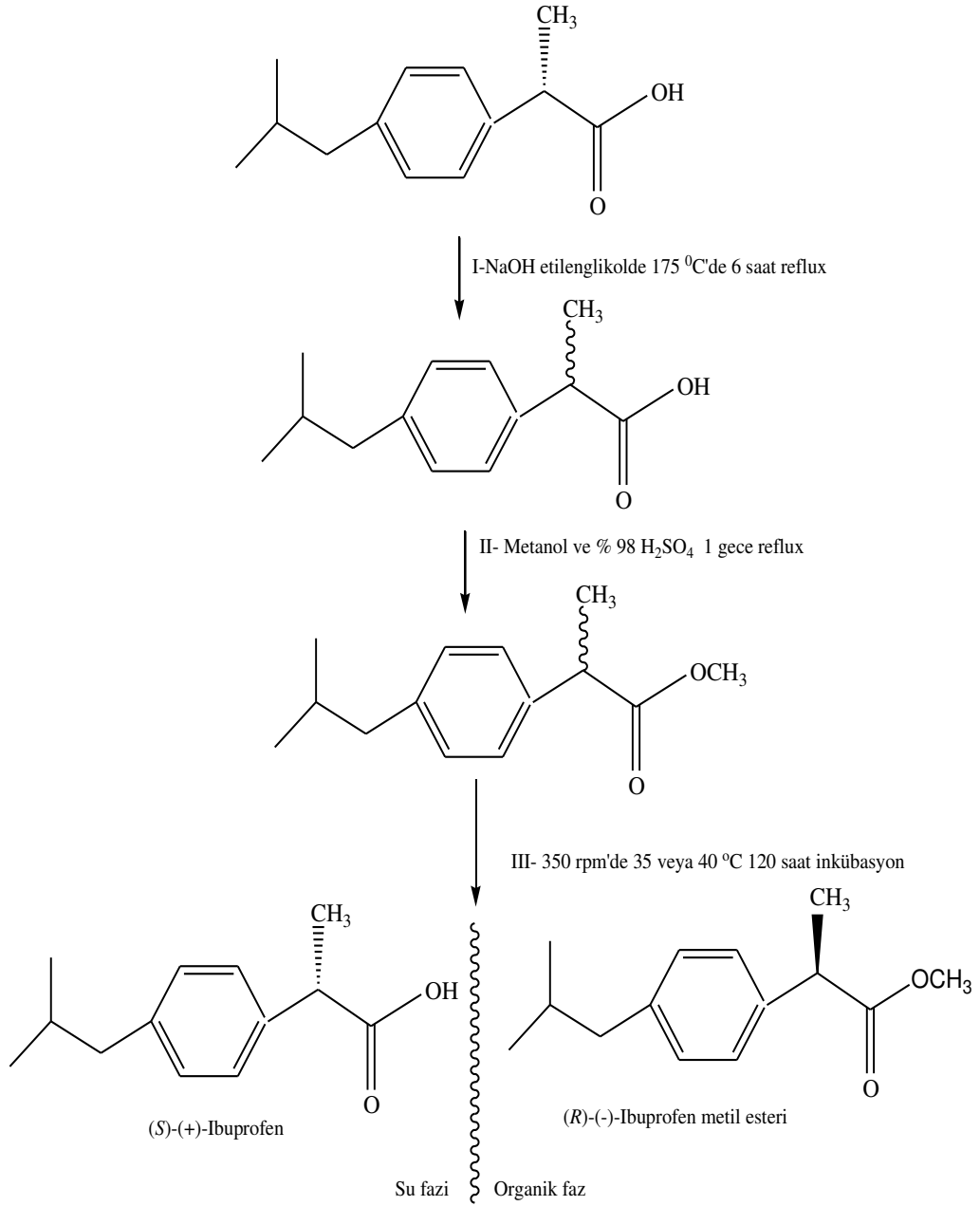
Hidroliz çalışmalarına başlamadan önce substrat olarak kullanılan esterler sentezlendi. Bu esterler; rasemik İbuprofen metil esteri, rasemik Naproksen metil esteri ve rasemik bütıl Mandelat'tır. Ester sentezine geçmeden önce, rasemik İbuprofen ve rasemik Naproksen ticari olarak temin edilemediğinden bu iki bileşiğin piyasada satılan (*S*)-enantiyomerleri satın alınarak bu bileşikler rasemleştirildi. İmmobilize lipazlar ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@EP-CRL}$ ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@3-APTES=GA-CRL}$) kullanılarak sentezlenen rasemik İbuprofen metil esterinin, rasemik Naproksen metil esterinin ve rasemik Bütıl Mandelat'ın enantiyoselektif hidroliz çalışmaları gerçekleştirildi.

3.3.1. Rasemik İbuprofen Ester'inin Hidroliz Çalışmaları

3.3.1.1. Rasemik İbuprofen Ester'inin Sentezlenmesi

Rasemik İbuprofen'in Hazırlanması: 1.7888 g (8.68 mmol) (*S*)-(+)-İbuprofen 12 mL etilen glikolde çözündü. Bu çözeltiye, 1.2800 g (32 mmol) NaOH eklendi ve çözelti geri soğutucu altında 175 °C'de 6 saat reflux edildi. Bu süre sonunda, balonundaki çözelti, su-buz karışımına döküldü. Bu çözeltinin pH'ı, 1M HCl çözeltisi damla damla ilave edilerek 4'e düşürüldü. Böylece rasemik ibuprofen çöktürüldü (Şekil 3.11.). Çöktürülen ibuprofen süzülerek ortamdan ayrıldı. Süzgeç kâğıdında bulunan madde, saf su ile yıkandı ve laboratuvar sıcaklığında kurumaya bırakıldı (Wu ve Liu 2000).

(*S*)-(+)-İbuprofen'in rasemleştiğini anlamak için, bileşiğin polarimetrede çevirme açısı ölçüldü. Ayrıca; rasemleşmenin olduğunu anlamak için bileşik, Lux Cellulose-1 kiral HPLC kolon kullanılarak analiz edildi ve rasemleşmenin başarılı bir şekilde gerçekleştiği eşit yüzdedeki pik alanlarının gözlenmesiyle ispatlandı.



Şekil 3.11. (S)-(+)-Ibuprofen'in rasemleştirilmesi (I), rasemik Ibuprofen metil esterinin sentezlenmesi(II), rasemik Ibuprofen metil esterinin enantiyoselektif hidrolizi (III)

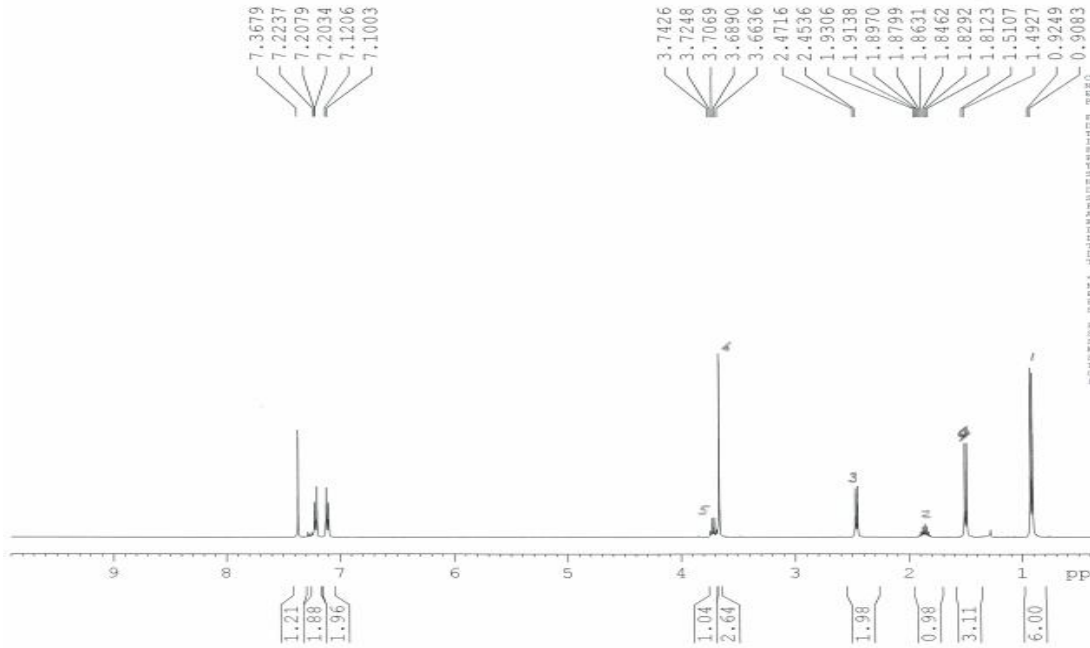
Rasemik Ibuprofen Metil Ester'inin Sentezlenmesi: 2.0628 g (10 mmol) rasemik ibuprofen 50 mL benzende çözündü. Bu çözeltiye yaklaşık % 99.8 saflıkta 2.1 mL metanol (50 mmol, 1.602 g, Ma: 32.04 gmol⁻¹, d: 0.791 gmL⁻¹) ilave edildi ve ardından çözeltiye birkaç damla % 98'lik H₂SO₄ damlatıldı. Karışım bir gece reflux edildi. Daha sonra çözücü uçuruldu. Geriye kalan madde % 10'luk NaHCO₃ çözeltisi ile nötralize edildi. Oluşan ester (Şekil 3.11.) 50 mL kloroform (2 x 25 mL) ile ekstrakte edildi ve

3. MATERYAL VE METOT

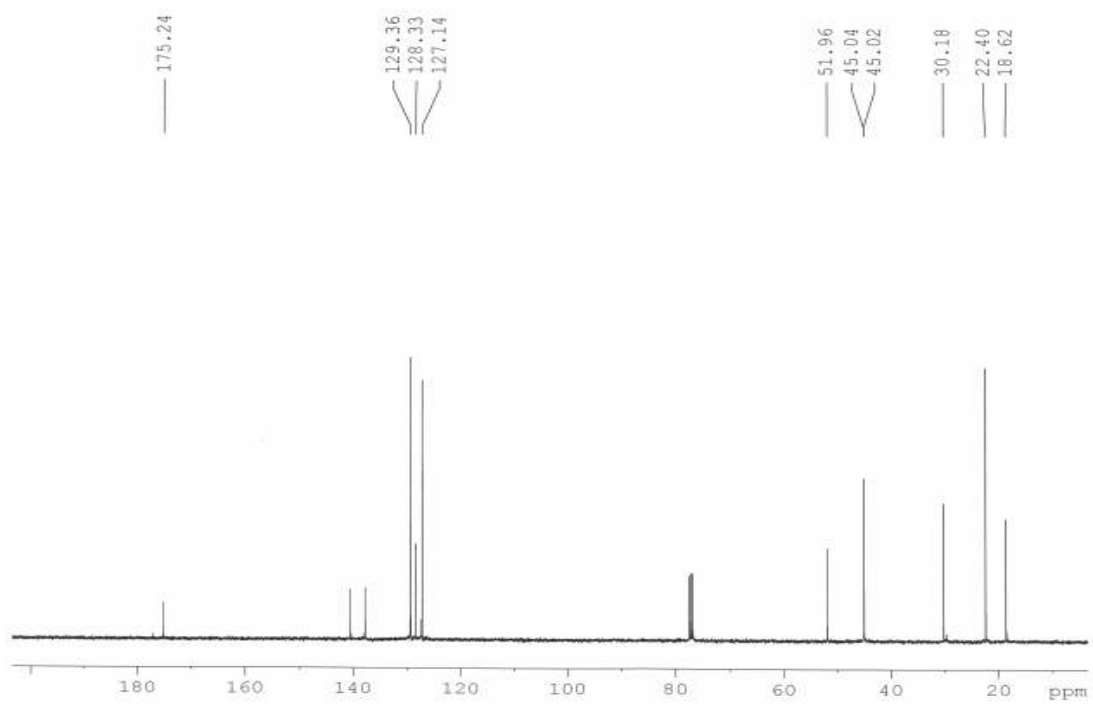
ardından susuz Na₂SO₄ üzerinden kurutuldu. Çözücü uçurularak, % 77 verim ile soluk sarı yağimsı rasemik Ibuprofenin metil esteride edildi (Ghanem ve ark. 2010).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0.91 (d, 6H, CH(CH₃)₂), 1.45 (d, 3H, CHCH₃), 1.85 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 2.5 (d, 2H, CH₂CH(CH₃)₂), 3.68 (s, 3H, OCH₃), 3.7 (q, 1H, CHCH₃), 7.1–7.3 (dd, 4H, aromatik), (Şekil 3.12.).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 18.62, 22.40, 30.18, 45.02, 51.96, 127.14, 128.33, 129.36, 139.04, 140.9, 175.24, (Şekil 3.13.).



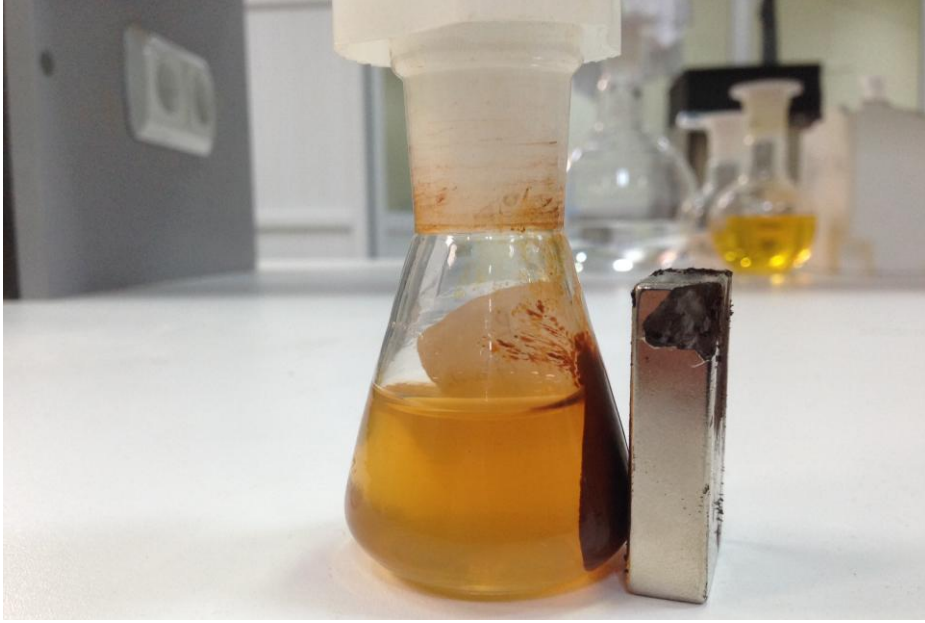
Şekil 3.12. Rasemik Ibuprofen metil esterinin ¹H-NMR spektrumu



Şekil 3.13. Rasemik Ibuprofen metil esterinin ^{13}C -NMR spektrumu

3.3.1.2. İmmobilize Lipazlar ile Rasemik Ibuprofen Metil Ester'inin Hidrolizi

Genel Prosedür: 25 mL'lik kapaklı bir erlene 2.5 mL (50 mM ve pH=8.0) fosfat tamponu eklendi. Bu çözeltiye immobilize enzimden 600 mg tartılıp ilave edildi. Daha sonra erlene izooktan içinde çözünmüş ve derişimi 10 mgmL^{-1} olan rasemik Ibuprofen metil esteri çözeltisinden 5 mL ilave edildi ve karışım 350 rpm'de 120 saat 35 veya 40 $^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyona tabi tutuldu. Bu süre sonunda, Nd-Fe-B ticari mıknatıs kullanılarak partiküller uzaklaştırıldı (Şekil 3.14.) ve karışım, içinde cam pamuk bulunan bir enjektör yardımıyla süzöldü. Hidroliz reaksiyonu sonucunda, su fazında bileşiğin asit kısmı ((*S*)-(+)-ibuprofen daha fazla); organik fazda bileşiğin hidroliz olmamış ester kısmı ((*R*)-(-)-ibuprofen metil esteri daha fazla) bulunmaktadır (Habibi ve ark. 2013, Yousefi ve ark. 2014).



Şekil 3.14. İnkübasyonun hemen ardından immobilize enzimlerin ortamdan uzaklaştırılması

HPLC Analizleri: Hidroliz reaksiyonu sonucunda, substratın enantiyomerik fazlalığı (% ee_s), ürünün enantiyomerik fazlalığı (% ee_p), enantiyoseçimlilik (E) ve dönüşüm oranı (c veya x) gibi değerler hesaplandı. HPLC ile analizlerinin yapılması için öncelikle numunelerin hazırlanması gerekmektedir. Ürünün enantiyomerik fazlalığını (% ee_p) bulmak için aşağıdaki işlemler yapıldı;

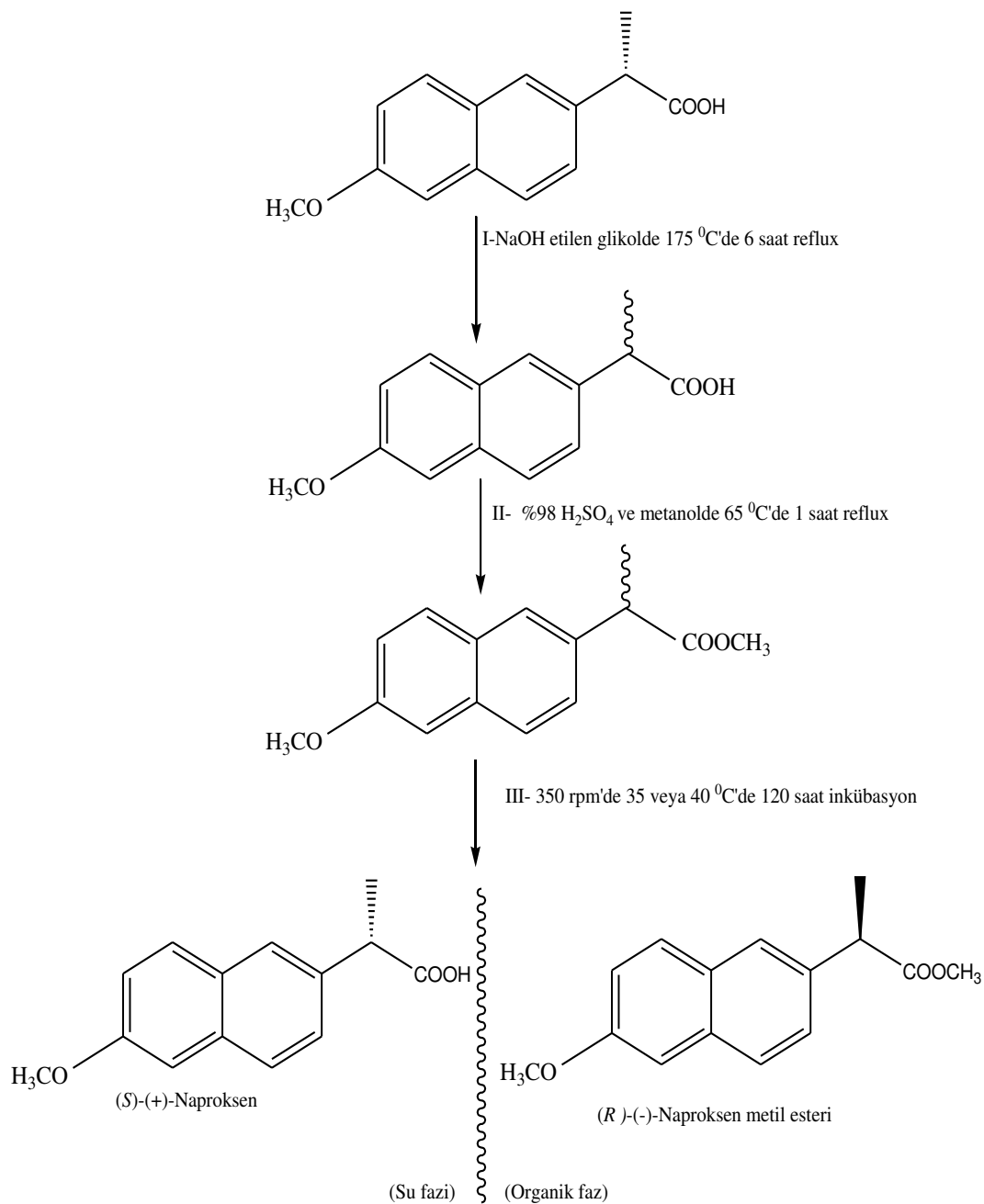
pKa' s 4.91 olan İbuprofen, su fazında (tampon çözeltide) tuz halinde bulunması nedeniyle çözeltinin üzerine 1 M HCl çözeltisi ilave edilerek bileşiğin tuz formundan asit formuna dönüşmesi sağlandı. Daha sonra bu çözelti, dietileter ile ekstrakte (2x3 mL) edilerek bir balona alındı. Su banyosunda eter uzaklaştırıldı ve geri kalan kısım 0.5 mL mobil fazda çözündü (Yılmaz ve ark. 2010). Substratın enantiyomerik fazlalığını (% ee_s) bulmak için, organik faz uçuruldu. Geri kalan kısım 0.5 mL mobil fazda çözöldü. Bu işlemler sonunda, hem su fazından (ürün) hem de organik fazdan gelen numuneler elekten geçirilip viallere konuldu ve daha sonra her bir numunenin enantiyomerik fazlalığı Lux Cellulose-1 kiral kolon kullanılarak HPLC'de belirlendi. Mobil faz olarak, n-heksan/2-propanol/asetik asit (99.6/0.4/0.15, v/v/v) çözeltisi kullanıldı. Çalışmalar, 1 mL/dk akış hızında ve 25 °C'de gerçekleştirildi. UV dedektörde $\lambda = 254 \text{ nm}$ 'de okundu (Marszałł ve Siodmiak 2012, Siodmiak ve ark. 2013).

3.3.2. Rasemik Naproksen Ester'inin Hidroliz Çalışmaları

3.3.2.1. Rasemik Naproksen Ester'inin Sentezlenmesi

Rasemik Naproksen'in Hazırlanması: 5.0 g (21.7 mmol) (*S*)-(+)-Naproksen 30 mL etilen glikolde çözündü. Bu çözeltiye, 3.2 g (80 mmol) NaOH eklendi ve geri soğutucu altında 175°C'de 6 saat reflux edildi. Süre sonunda balondaki çözelti, su-buz karışımına döküldü. Bu çözeltinin pH'ı, 1M HCl çözeltisi, damla damla ilave edilerek 4'e kadar düşürüldü. Böylece rasemik Naproksen çöktürüldü (Şekil 3.15.). Çöktürülen Naproksen süzülerek ortamdaki ayrıldı ve saf su ile yıkandı (Wu ve Liu 2000).

(*S*)-(+)-Naproksen'in rasemleştiğini anlamak için, bileşiğin polarimetrede çevirme açısı ölçüldü. Ayrıca; rasemleşmenin olduğunu anlamak için bileşik, Chiralcel OD kolon kullanılarak analiz edildi ve rasemleşmenin başarılı bir şekilde gerçekleştiği eşit yüzdedeki pik alanlarının gözlenmesiyle ispatlandı (Sakiki ve ark. 2001).



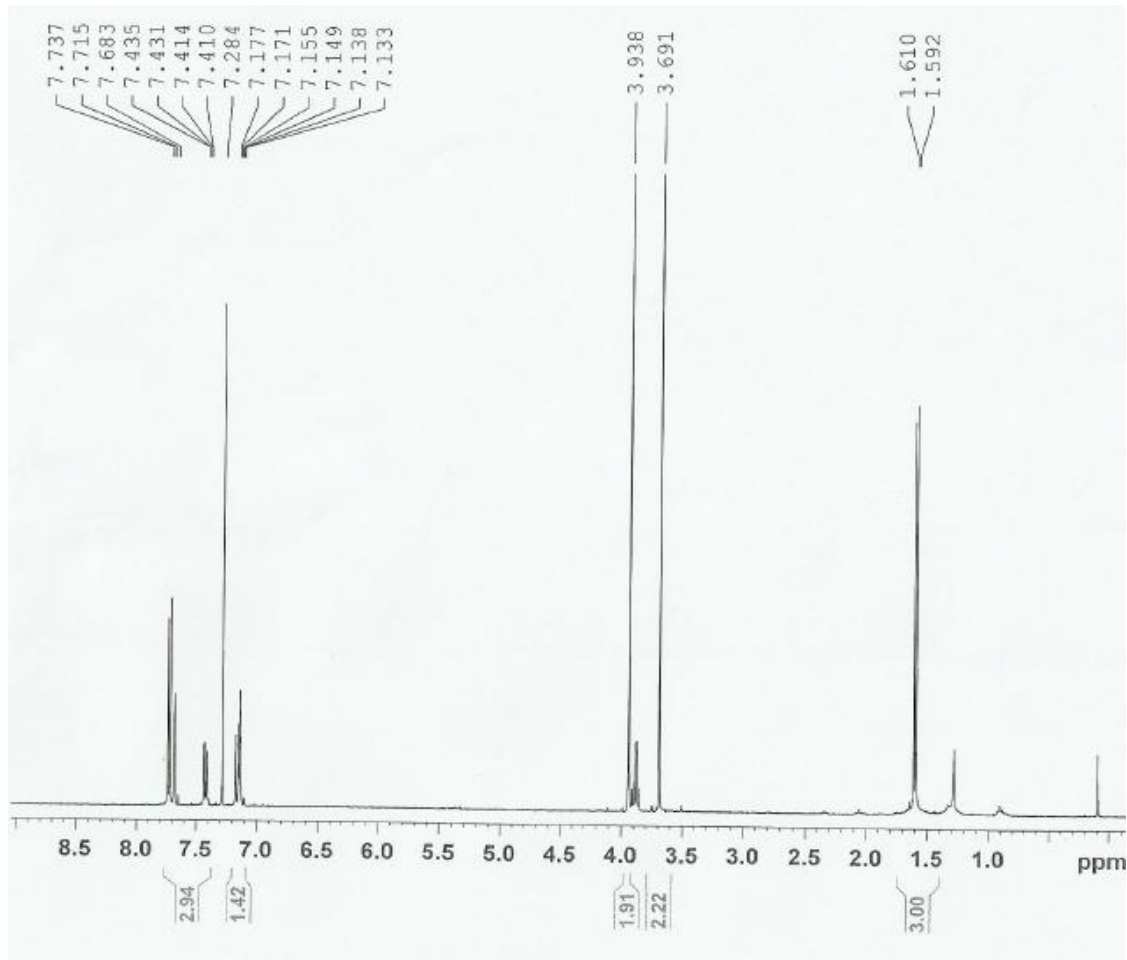
Şekil 3.15. (S)-(+)-Naproksen'in rasemleştirilmesi (I), rasemik Naproksen metil esterinin sentezlenmesi (II) ve rasemik Naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizi (III)

Rasemik Naproksen Metil Ester'inin Sentezlenmesi: 1.0 g (4.34 mmol) rasemik Naproksen, 80 mL metanolde çözüldü ve bu çözeltiye denge basınçlı bir damlatma hunisi yardımıyla 8 mL % 98'lik H₂SO₄ damla damla ilave edildi. Çözelti 65 °C'de bir geri soğutucu altında 1 saat süre ile reflux edildi. Hemen ardından, reaksiyon balonundaki çözelti, su-buz karışımına döküldü. Metanol'ün fazlası rotary evaporatör yardımıyla uçurulduktan sonra rasemik Naproksen metil ester, buz banyosu içinde, üzerine yavaş yavaş % 20'lik NaOH çözeltisi eklenerek çözeltinin pH'ı 9-10'a

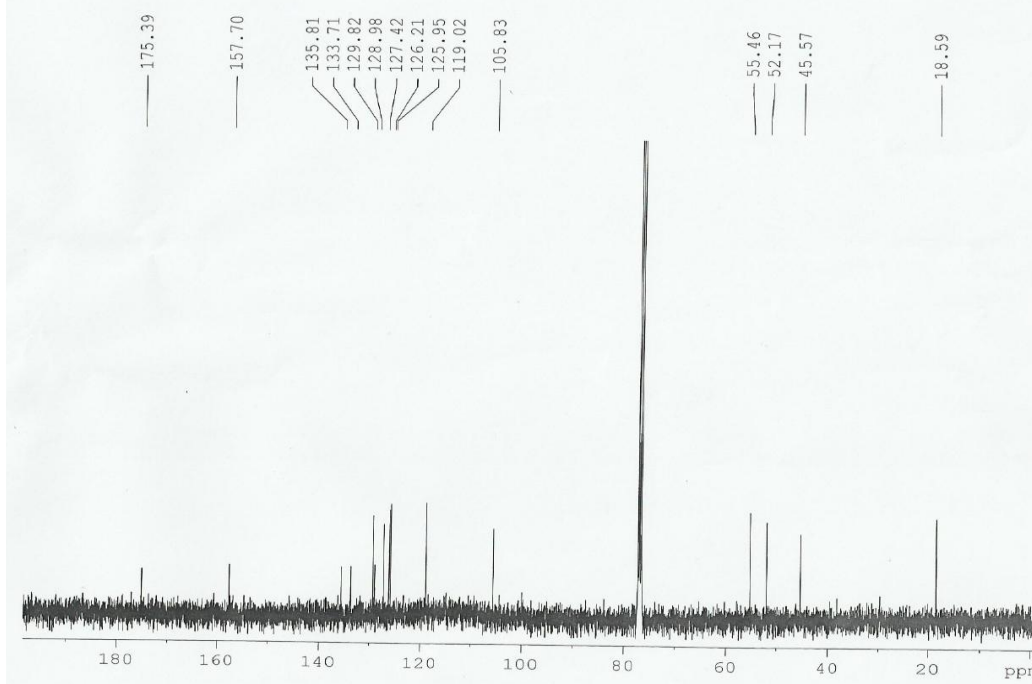
getirilerek çöktürüldü. Tepkime sonunda reaksiyona girmeyen rasemik Naproksen ile rasemik Naproksen metil esteri 1 M NaHCO₃ çözeltisi ve saf su ile birkaç kez yıkanarak ayrıldı. Elde edilen rasemik Naproksen metil esteri süzgeç kâğıdı üzerinde kurutuldu (Şekil 3.15.). Daha sonra, izooktan içinde yeniden kristallendirildi (Lee ve ark. 2001, Takaç ve Bakkal 2007). Verim % 82, erime noktası 90–92 °C ‘dir.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.6 (d, CHCH₃, J=7.2 Hz), 3.63 (s, COOCH₃), 3.86 (m, CH), 3.92 (s, OCH₃), 7.15 (2H, m), 7.4 (1H, m), 7.71 (3H, m), (Şekil 3.16.).

¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ18.59, 52.17, 45.57, 55.16, 105.83, 119.02, 125.95, 126.21, 127.42, 128.98, 129.82, 133.81, 135.81, 157.70, 175.39), (Şekil 3.17.).



Şekil 3.16. Rasemik Naproksen Metil Ester'inin ¹H-NMR spektrumu



Şekil 3.17. Rasemik Naproksen Metil Ester'inin ^{13}C -NMR spektrumu

3.3.2.2. İmmobilize Lipazlar ile Rasemik Naproksen Ester'inin Hidrolizi

Genel Prosedür: 25 mL'lik kapaklı bir erlene 2.5 mL (50 mM ve pH=8.0) fosfat tamponu eklendi. Bu çözeltiye immobilize enzimden 600 mg tartılıp ilave edildi. Daha sonra erlene izooktan içinde çözünmüş ve derişimi 10 mgmL^{-1} olan rasemik Naproksen metil esteri çözeltisinden 5 mL ilave edildi ve karışım 350 rpm'de 120 saat 35 veya 40 $^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyona tabi tutuldu. Bu süre sonunda, Nd-Fe-B ticari mıknatıs kullanılarak partiküller uzaklaştırıldı ve karışım, içinde cam pamuk bulunan bir enjektör yardımıyla süzöldü. Hidroliz reaksiyonu sonucunda, su fazında bileşiğin asit kısmı ((S)-(+)-Naproksen daha fazla); organik fazda bileşiğin hidroliz olmamış ester kısmı ((R)-(-)-Naproksen metil esteri daha fazla) bulunmaktadır (Takaç ve Bakkal 2007, Yılmaz 2010).

HPLC Analizleri: Hidroliz reaksiyonu sonucunda, % ee_s, % ee_p, E ve c (x) gibi değerler hesaplandı. HPLC ile analizlerinin yapılması için öncelikle numunelerin hazırlanması gerekmektedir. % ee_p'yi bulmak için aşağıdaki işlemler yapıldı;

pKa' sı 4.15 olan Naproksen, su fazında (tampon çözeltide) tuz halinde bulunması nedeniyle çözeltinin üzerine 1 M HCl çözeltisi ilave edilerek bileşiğin tuz formundan asit formuna dönüşmesi sağlandı. Daha sonra bu çözelti, dietileter ile ekstrakte (2x3 mL) edilerek bir balona alındı. Su banyosunda eter uzaklaştırıldı ve geri

kalan kısım 0.5 mL mobil fazda (heksan/2-propanol (1:1)) çözündü (Yılmaz ve ark. 2010). Bu işlemler sonucunda çözelti elekten geçirilip viale konuldu ve daha sonra numunenin enantiyomerik fazlalığı Chiralcel OD kiral kolon kullanılarak HPLC’de belirlendi. Mobil faz olarak, n-heksan/etanol/TFA (95.0/5.0/0.15) kullanıldı. Çalışmalar, 1 mL/dk akış hızında ve 25 °C kolon sıcaklığında gerçekleştirildi. UV dedektörde $\lambda = 254$ nm’de okundu. Kolondan önce, (R)-(-)-Naproxen, ardından (S)-(+)-Naproksen ayrıldı (Battistel ve ark. 1991, Sakaki ve ark. 2001).

% ee_s’yi bulmak için, organik faz uçuruldu. Geri kalan kısım 0.5 mL mobil fazda (n-heksan/2-propanol) çözöldü. Bu işlemler sonucunda çözelti elekten geçirilip viale konuldu ve daha sonra numunenin enantiyomerik fazlalığı Chiralcel OD-H kiral kolon kullanılarak HPLC’de belirlendi. Mobil faz olarak, hekzan/2-propanol (98/2) kullanıldı. Çalışmalar, 1 mL/dk akış hızında ve 25 °C kolon sıcaklığında gerçekleştirildi. UV dedektörde $\lambda = 254$ nm’de okundu. Kolondan önce, (R)-(-)-Naproxen, ardından (S)-(+)-Naproksen ayrıldı (Cernia ve ark. 2002, Takaç ve Bakkal 2007, Yılmaz 2010).

3.3.3. Rasemik Bütil Mandelat Ester’inin Hidroliz Çalışmaları

Bu bölümde, rasemik Bütil Mandelat esterinin enantiyoselektif hidroliz çalışmaları gerçekleştirildi. Rasemik bütil Mandelat esterinin sentezinde, öncelikle piyasada ticari olarak satılan rasemik Mandelik asit temin edildi. Daha sonra esterleşme tepkimesi ile rasemik bütil Mandelat esteri sentezlendi.

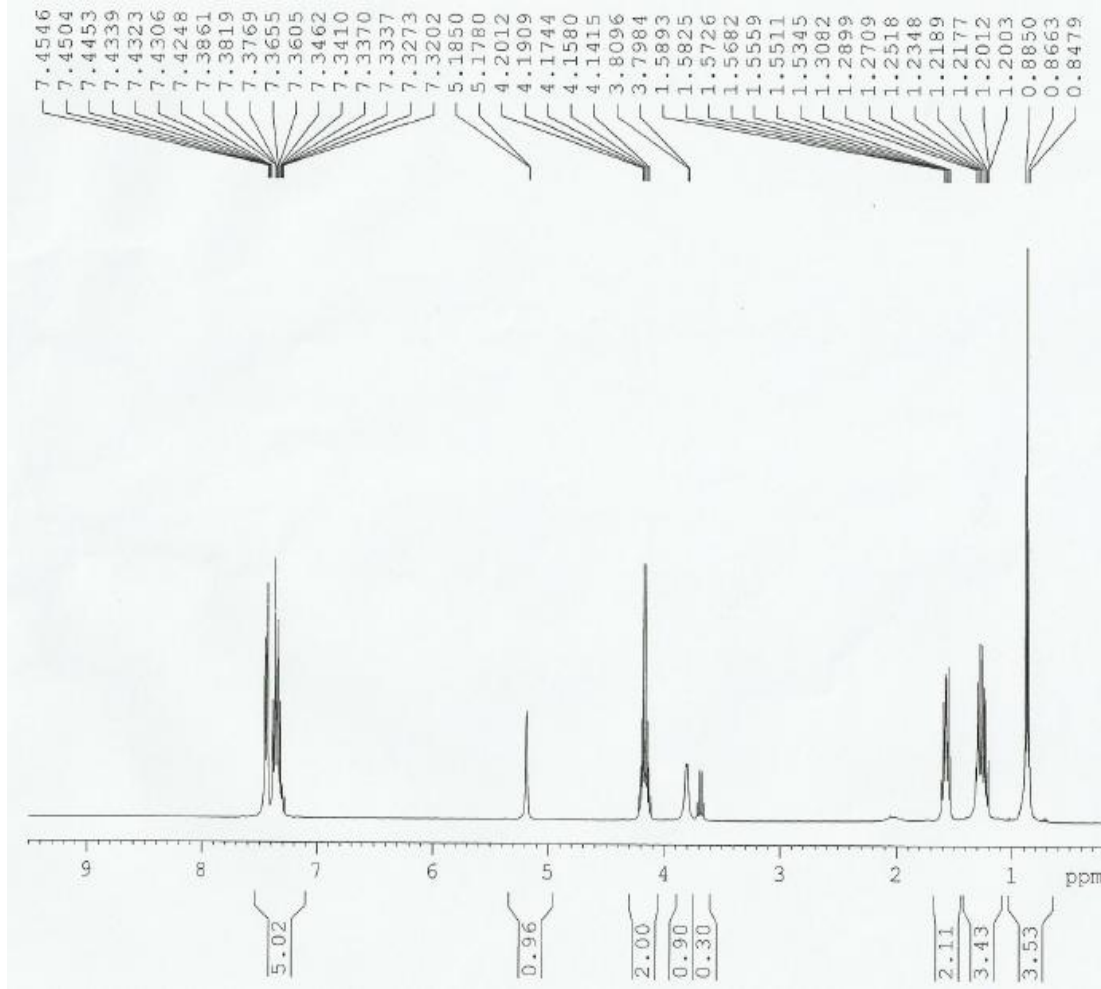
3.3.3.1. Rasemik Bütil Mandelat Ester’inin Sentezi

1.414 g (10 mmol) rasemik Mandelik asit 20 mL n-Bütanol’de çözöndü. Çözeltiye 0.100 g katalizör Fe₂(SO₄)₃.xH₂O ilave edildi ve geri soğutucu altında 3.5 saat reflux edildi. Alkolün fazlası evapore edildi. Çözeltiye 20 mL dietil eter eklendi. Katalizör süzgeç kâğıdı üzerinden uzaklaştırıldı. Ardında çözelti, % 5 NaHCO₃ çözeltisi (2x10 mL) ile ekstrakte edildi. Su fazı atılıp organik fazda bulunan bileşiği elde etmek için eter uçuruldu ve bileşik petrol eterinde kristallendirildi (Zhang ve Gong 1999). Sentezlenen esterinin erime noktası 33–34 °C’dir. Reaksiyon % 80 verim ile gerçekleştirildi (Şekil 3.18.).

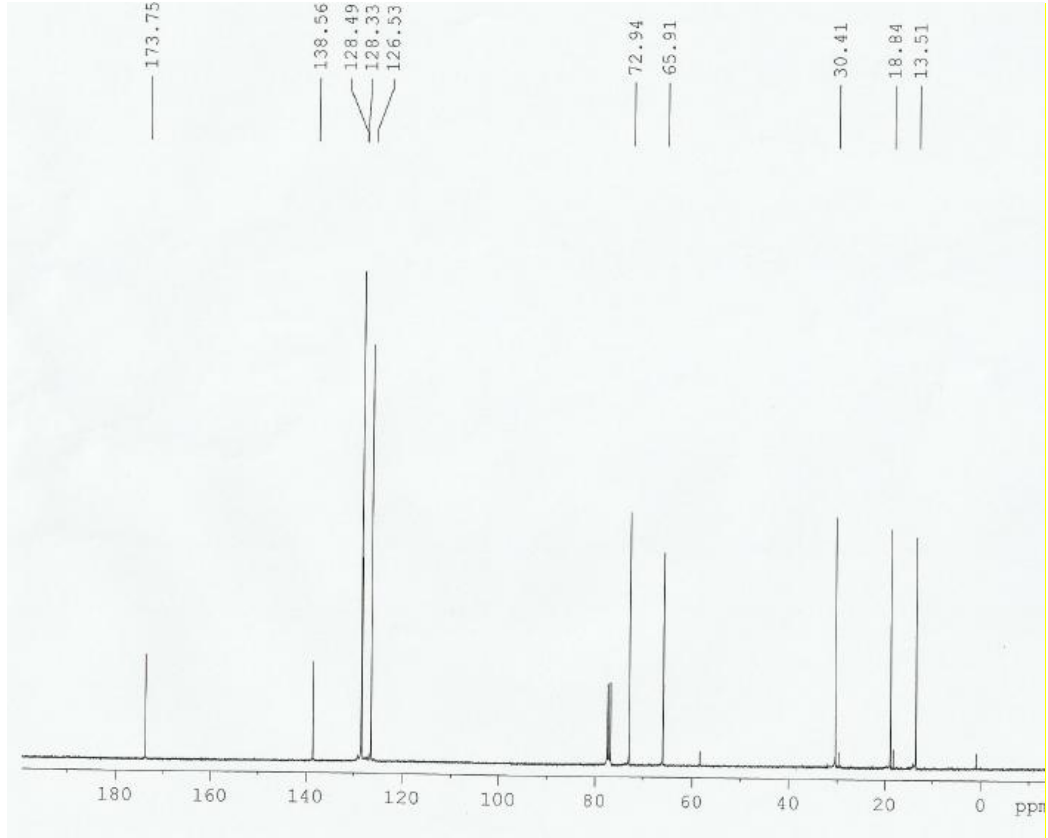
3. MATERYAL VE METOT

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 0.86 (t, *J* = 7.48, 3H), 1.26 (m, 2H), 1.56 (m, 2H), 3.8 (d, *J* = 4.48, 1H, OH), 4.19 (m, 2H), 5.18 (d, *J* = 2.8, 1H), 7.45–7.32 (m, 5H), (Şekil 3.19.).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 13.51, 18.84, 30.41, 65.91, 72.94, 126.53, 128.33, 128.49, 138.56, 173.75, (Şekil 3.20.).



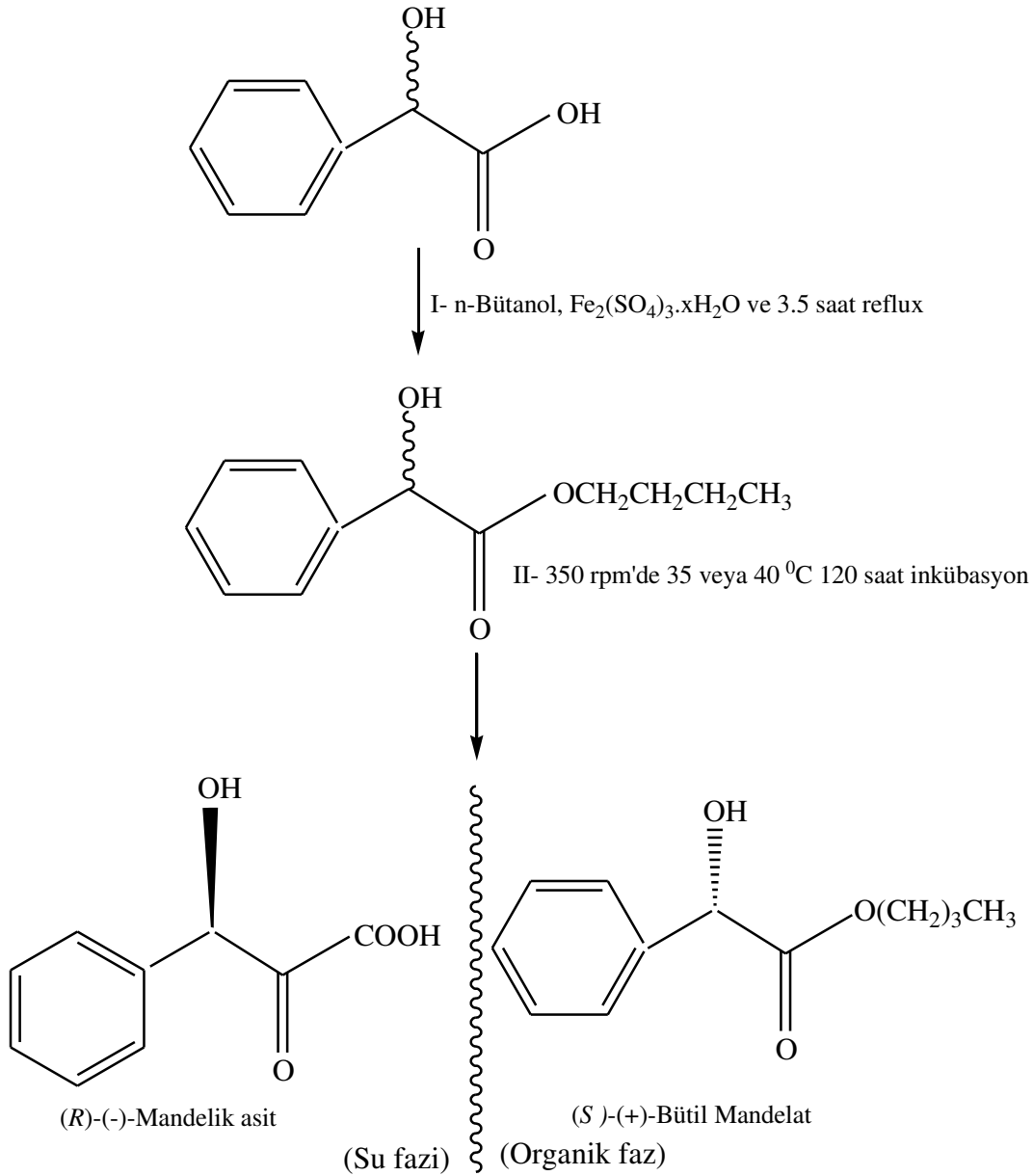
Şekil 3.19. Rasemik Bütıl Mandelat'ın ¹H-NMR spektrumu



Şekil 3.20. Rasemik Bütül Mandelat 'ın ^{13}C -NMR spektrumu

3.3.3.2. İmmobilize Lipazlar ile Rasemik Bütül Mandelat'ın Hidrolizi

Genel Prosedür: 25 mL'lik kapaklı bir erlene 2.5 mL (50 mM ve pH=8.0) fosfat tamponu eklendi. Bu çözeltiye immobilize enzimden 600 mg tartılıp ilave edildi. Daha sonra erlene izooktan içinde çözünmüş ve derişimi 10 mgmL^{-1} olan rasemik Ibuprofen metil esteri çözeltisinden 5 mL ilave edildi ve karışım 350 rpm'de 120 saat 35 veya 40 $^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyona tabi tutuldu. Bu süre sonunda, Nd-Fe-B ticari mıknatıs kullanılarak partiküller uzaklaştırıldı ve karışım, içinde cam pamuk bulunan bir enjektör yardımıyla süzöldü. Hidroliz reaksiyonu sonucunda, su fazında bileşiğin asit kısmı ((*R*)-(-)-Mandelik asit daha fazla); organik fazda bileşiğin hidroliz olmamış ester kısmı ((*S*)-(+)-Bütül Mandelat daha fazla) bulunmaktadır.



Şekil 3.18. Rasemik Bütil Mandelat'ın sentezi (I) ve enantiyoseçimli hidrolizi (II)

HPLC Analizleri: Hidroliz reaksiyonu sonucunda % ee_p hesaplandı. % ee_s uygun kiral kolon temin edilemediğinden dolayı belirlenmedi. HPLC ile analizlerinin yapılması için öncelikle numunenin hazırlanması gerekmektedir. % ee_p 'yi bulmak için aşağıdaki işlemler yapıldı;

pKa' sı 3,41 olan Mandelik asit, tampon çözeltide tuz halinde bulunması nedeniyle çözeltinin üzerine 1 M HCl çözeltisi ilave edilerek bileşiğin tuz formundan asit formuna dönüşmesi sağlandı. Daha sonra bu çözelti, dietileter ile ekstrakte (2x3 mL) edilerek bir balona alındı. Su banyosunda eter uzaklaştırıldı ve geri kalan kısım 0.5

mL mobil fazda (heksan/2-propanol (1/1)) çözündü (Yılmaz ve ark. 2010). Bu işlemler sonucunda çözelti elekten geçirilip vial konuldu ve daha sonra numunenin enantiyomerik fazlalığı Chiralcel OD kiral kolon kullanılarak HPLC’de belirlendi. Mobil faz olarak, n-heksan/2-propanol/ TFA (85/15/0.3) kullanıldı. Çalışmalar, 1 mL/dk akış hızında ve 25 °C kolon sıcaklığında gerçekleştirildi. UV dedektörde $\lambda = 254$ nm’de okundu. Auto sampler kullanılarak cihaza 3 μ L numune verildi (Mao ve ark. 2012).

3.4. Dönüşüm ve Enantiyoseçimliliğin Hesaplanması

HPLC’de elde edilen sonuçlara göre yapılan hesaplamalar, literatürdeki (Chen ve ark. 1982) formüller kullanılarak yapıldı. % ee_s (Eşitlik 3.1.), % ee_p (Eşitlik 3.1.), E (Eşitlik 3.1.) ve c (x) (Eşitlik 3.1.) gibi değerler aşağıda verilen formüller kullanılarak belirlendi.

$$\%ee_s = \frac{C_R - C_S}{C_R + C_S} \quad \text{Eşitlik 3.1.}$$

$$\%ee_p = \frac{C_S - C_R}{C_S + C_R} \quad \text{Eşitlik 3.2.}$$

$$\%c(x) = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \quad \text{Eşitlik 3.3.}$$

$$E = \frac{\ln[(1-c).(1-ee_s)]}{\ln[(1-c).(1+ee_s)]} \quad \text{veya} \quad E = \frac{\ln[(1-c).(1+ee_p)]}{\ln[(1-c).(1-ee_p)]} \quad \text{Eşitlik 3.4.}$$

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

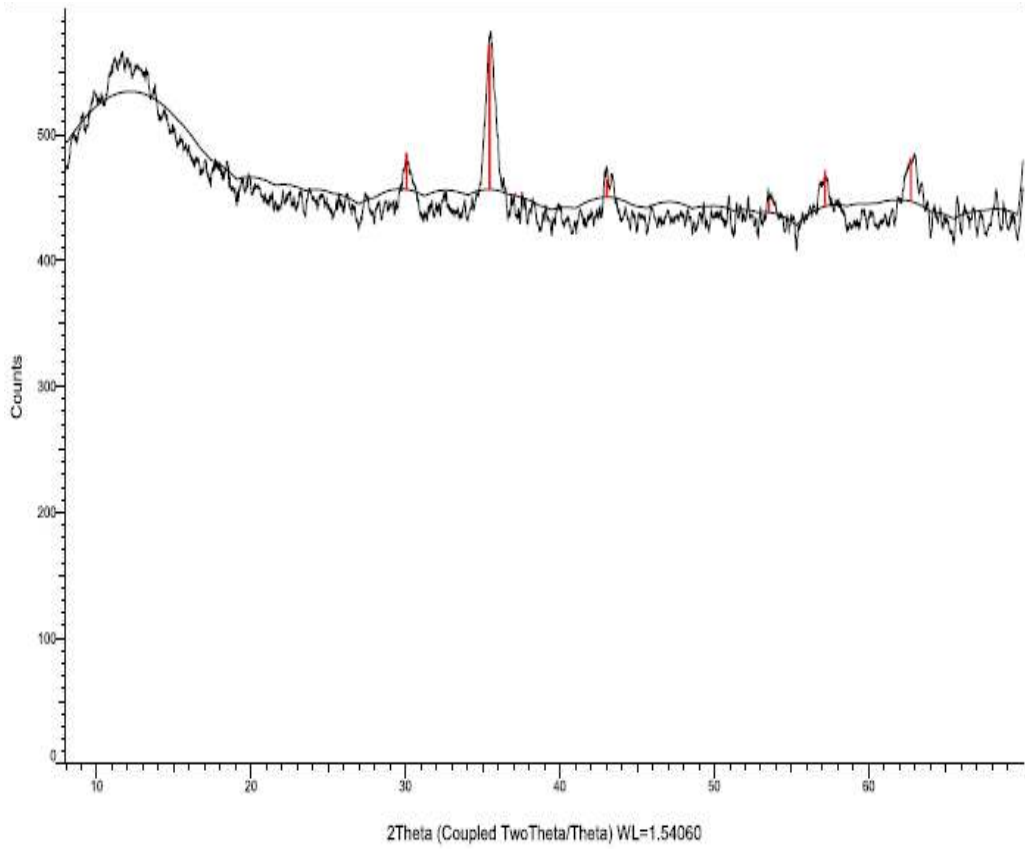
4.1. Manyetik Fe₃O₄ Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

CRL immobilizasyonunda taşıyıcı destek maddesi olarak kullanılan manyetik Fe₃O₄ nanopartikülleri Fe²⁺ ve Fe³⁺ iyonlarının birlikte kimyasal çöktürülmesiyle hazırlandı. Fe²⁺ / Fe³⁺’ün molar konsantrasyon oranı Fe²⁺’nin oksidasyona eğilimli olması nedeniyle, 1/1.75 olarak seçildi (Maity ve ark. 2007).

Hazırlanan partiküllerin X-ray analiz sonuçları (Şekil-4.1.) incelendiğinde 6 farklı yerde pik görülmektedir. Magnetit (Fe₃O₄) için beklenen X-ışınları desenleri sırasıyla 2θ= 30.064, 35.452, 43.038, 53.547, 57.168 ve 62.728 ((220), (311), (400), (422), (511) ve (440) tekabül eden) ana pikler olarak gözlendi (Şekil 4.2.). Magnetit’in atmosferdeki oksijenle oksidasyona uğrayarak maghemit’e (γ-Fe₂O₃) dönüşme ihtimali olduğu bilinmektedir. Magnetit ve maghemit’in X-ışınları desenleri birbirine çok yakındır γ-Fe₂O₃ oluşumunu önlemek için azot gazı atmosferinde çalışıldı (Santra ve ark. 2001, Gupta ve Gupta 2005).

Bu çalışmada, hazırlanan manyetik Fe₃O₄ nanopartiküllerin X-ray spektrumu incelendiğinde, piklerin tamamının hazırlanan Magnetit’e ait olduğu görüldü. Özellikle, 35.452’deki karakteristik pik (311) Magnetit’in spinal yapısının oluştuğunu göstermektedir. Yapıda goetit (α-FeOOH) ve hematit (α-Fe₂O₃)’in bulunmadığı Şekil 4.2.’deki 2θ değerleri incelenerek anlaşıldı. Eğer yapıda bu iki madde birlikte bulunsaydı 21.22° ve 33.15°’ye karşılık gelen 110 ve 104 piklerinin X-ray spektrumunda görülmesi beklenirdi. Hazırlanan manyetik nanopartiküllerin kübik spinal yapıda olduğu belirlendi. Ayrıca, partiküllerin ortalama kristal boyutu, Scherrer denkleminde hesaplandı ve kristal boyutunun yaklaşık 13,72 nm olduğu belirlendi. Bulgular literatürle uyum içindedir (Wan ve Li 1998, Cao ve ark. 2009, Kefu ve ark. 2009, Guo ve ark. 2010).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA



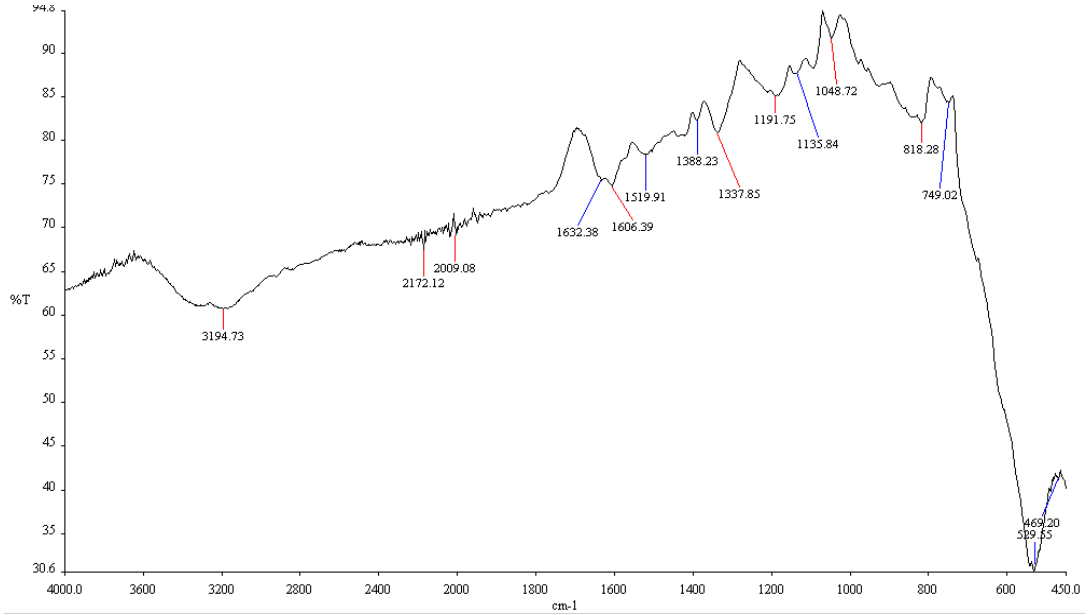
Şekil 4.1. Manyetik Fe₃O₄ nanopartiküllerin X-ray diffractometer spektrumu

2θ	I	h	k	l
30.064	25	2	2	0
35.452	100	3	1	1
37.121	2	2	2	2
43.038	12	4	0	0
53.547	8	4	2	2
57.168	25	5	1	1
62.728	30	4	4	0
70.785	2	6	2	0
73.997	2	5	3	3
86.907	2	6	4	2
89.934	8	7	3	1
94.381	2	8	0	0
105.145	4	7	5	1

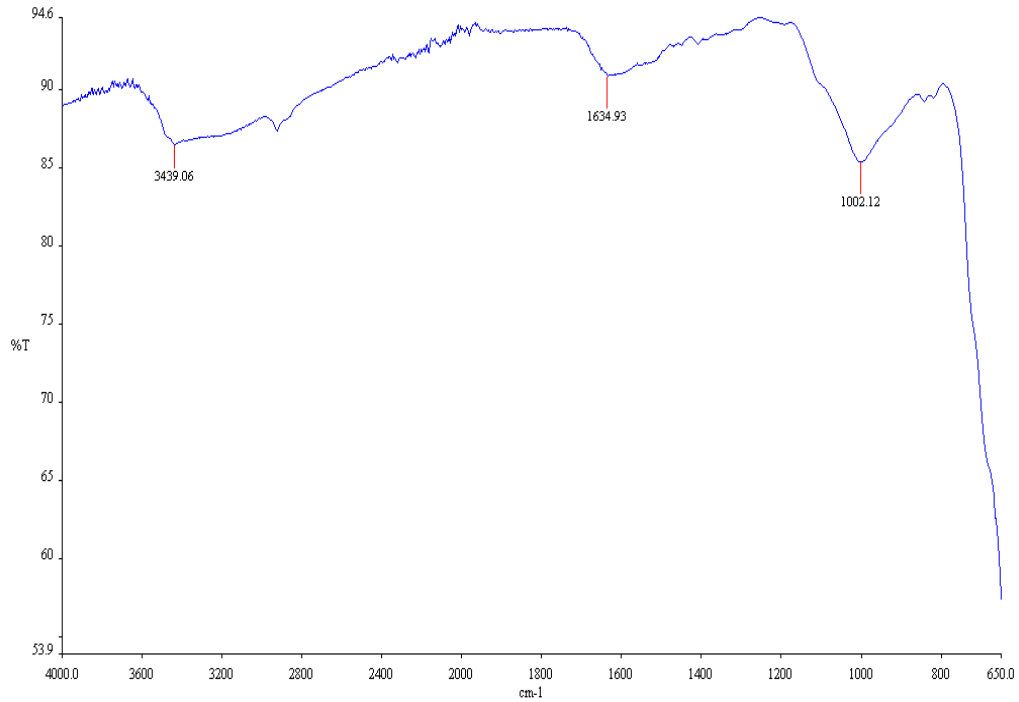
Şekil 4.2. X-ray spektrumunda piklerin görüldüğü bölgelere ait 2θ değerleri

Modifiye nanopartiküller FT-IR ile karakterize edildi. Fe₃O₄'in FT-IR spektrumu incelendiğinde manyetik nanopartiküllerin varlığı 529 cm⁻¹'de bulunan Fe-O bağına ait güçlü absorpsiyon bandı ile görülebilmektedir. Yaklaşık 3500–3194 cm⁻¹ aralığındaki geniş band O-H gerilme titreşimine aittir (Şekil 4.3.). Manyetik nanopartiküllerin yüzeyinin 3-APTES ile modifiye edildiği yani yapıya 3-APTES'in bağlandığı FT-IR spekturumunda 3439 cm⁻¹'deki amin bandları (N-H gerilme), 2911

cm^{-1} 'de C-H gerilme titreşimine ait bantlar ve 1003 cm^{-1} 'de oldukça yayvan silika bandının (Si-O), gözlenmesiyle (Şekil 4.4.) ortaya konuldu (Ma ve ark. 2003, Cao ve ark. 2009, Yılmaz ve ark. 2010, Ghaemi ve ark. 2015). $\text{Fe}_3\text{O}_4@3\text{-APTES}$ 'e GA'nın bağlandığı, 1643 cm^{-1} 'de C=N gerilme titreşimlerinin gözlenmesiyle ispatlandı (Can ve ark. 2009, Özmen ve ark. 2010). (Şekil 4.5.). $\text{Fe}_3\text{O}_4@3\text{-APTES}=\text{GA}$ 'ya CRL'nin immobilize olduğu FT-IR spektrumundaki band değişimlerinden gözlemlendi (Şekil 4.6.).

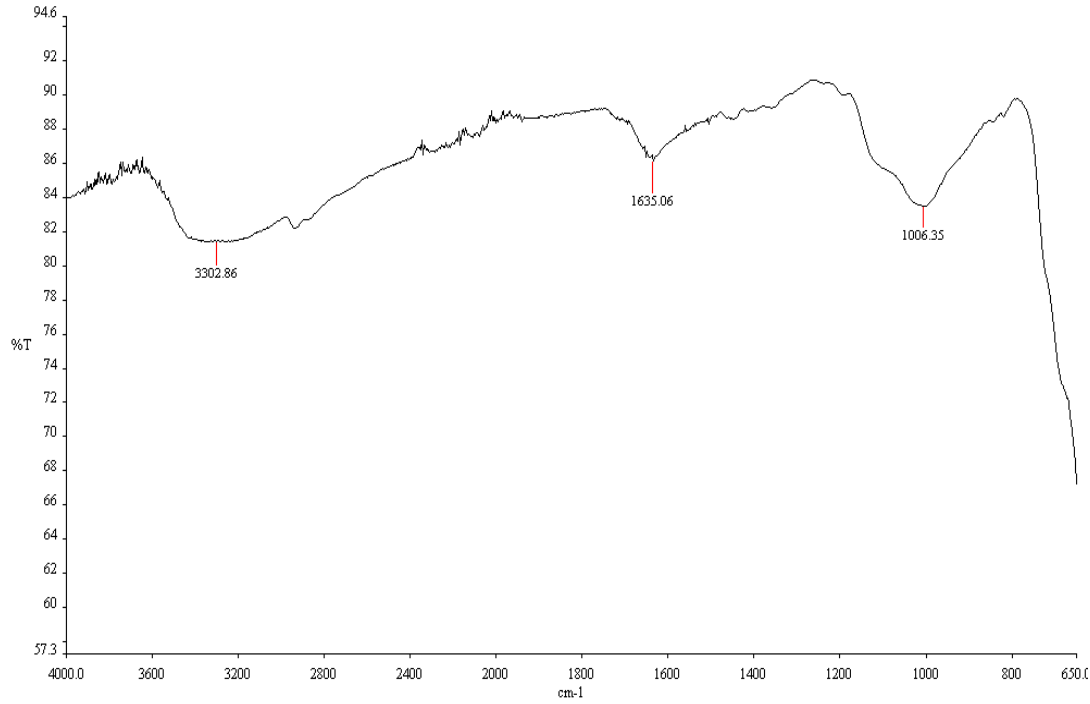


Şekil 4.3. Manyetik Fe_3O_4 nanopartiküllerine ait FT-IR spektrumu

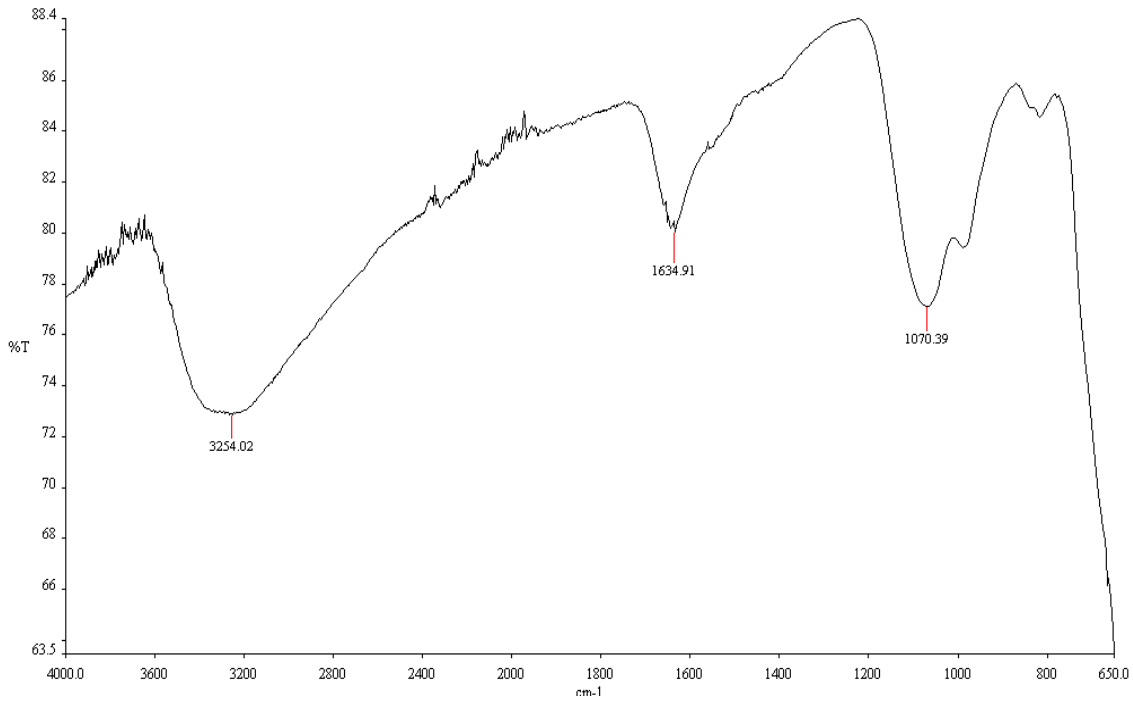


Şekil 4.4. Manyetik $\text{Fe}_3\text{O}_4@3\text{-APTES}$ 'e ait FT-IR spektrumu

4. BULGULAR VE TARTIŞMA



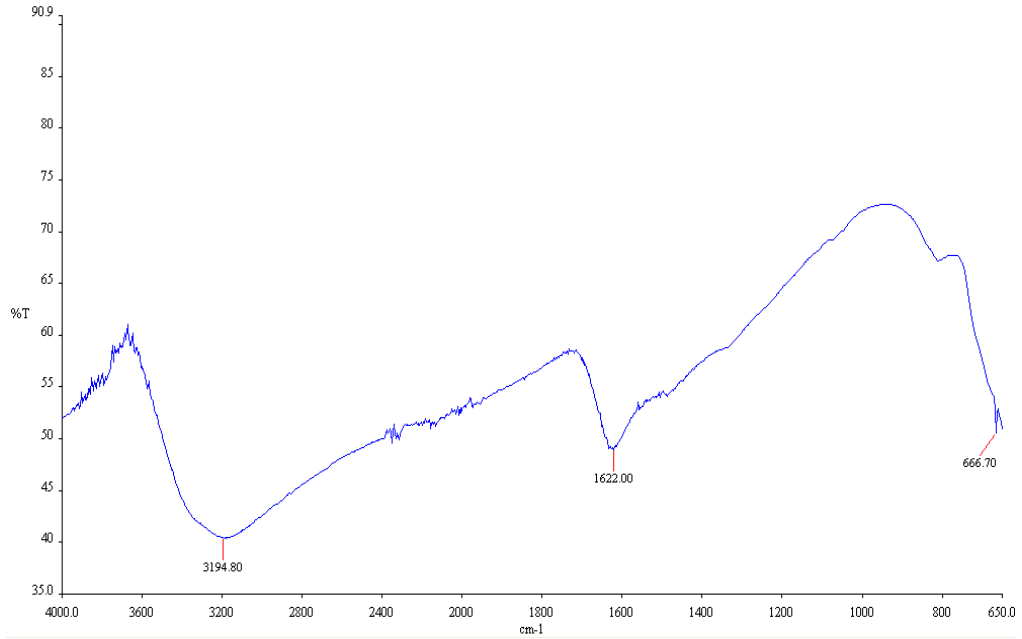
Şekil 4.5. Manyetik Fe₃O₄@3-APTES=GA'ya ait FT-IR spektrumu



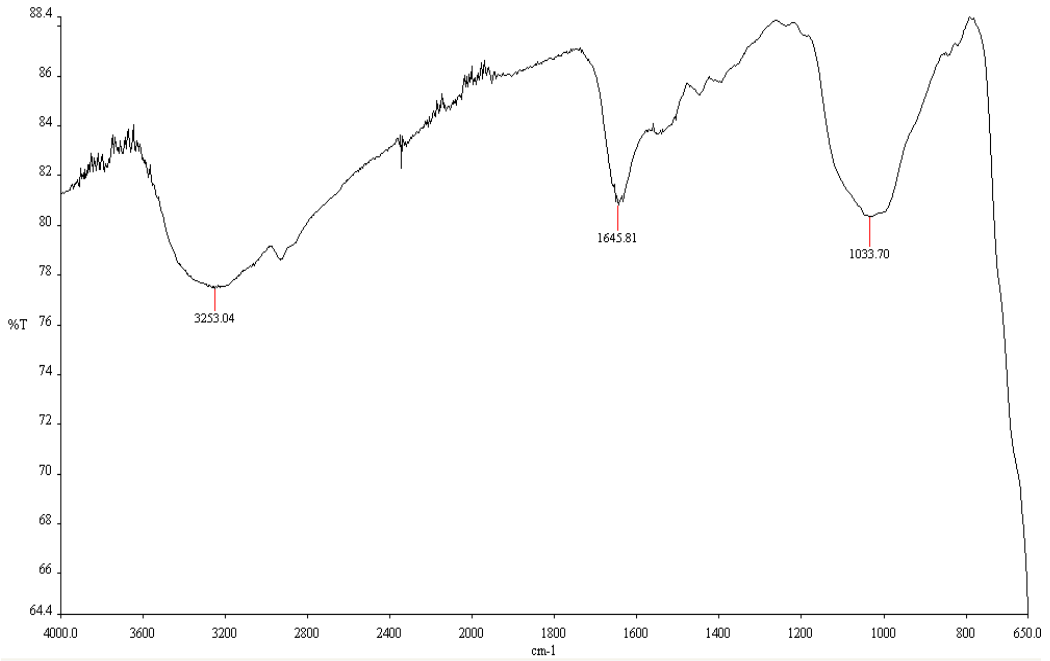
Şekil 4.6. Manyetik Fe₃O₄@3-APTES=GA-CRL'ye ait FT-IR spektrumu

Manyetik nanopartiküllerin yüzeyinin EP ile modifiye edildiği FT-IR spektrumunda oksiran halkasına ait 3194 cm⁻¹ de (C-H) gerilme titreşimlerine ait piklerin varlığı ve 1033.70 cm⁻¹'deki (C-O-C) gerilme titreşimlerine ait geniş bandın

gözlenmesiyle ispatlandı (Etcı 2011). Spektrumdaki değişimlerden yapıya önce EP (Şekil 4.7.) ve daha sonra CRL enziminin bağlandığı görülmektedir (Şekil 4.8.).



Şekil 4.7. Fe₃O₄@EP'ye ait FT-IR spektrumu

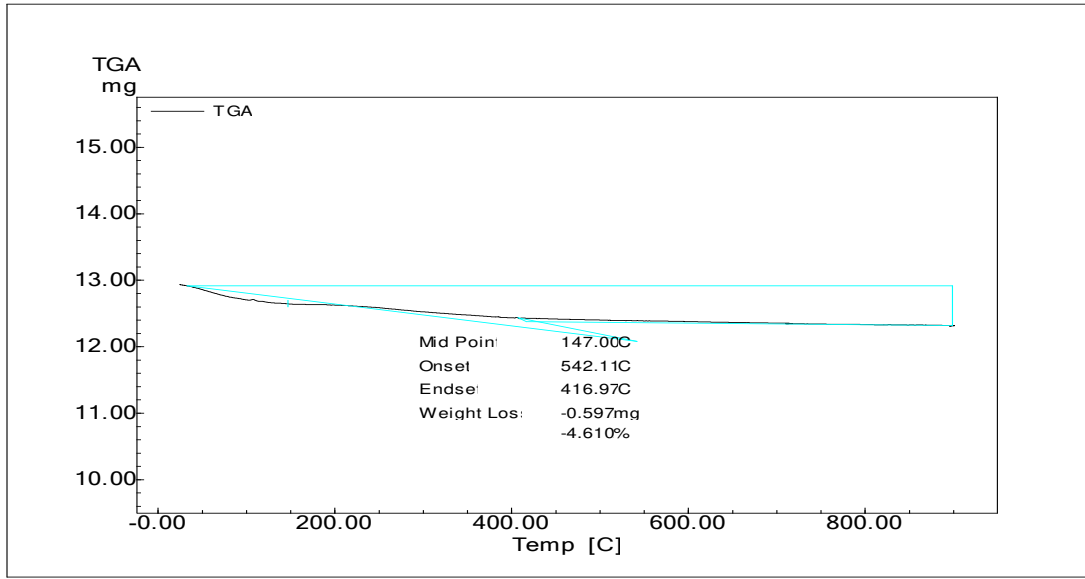


Şekil 4.8. Fe₃O₄@EP-CRL'nin FT-IR spektrumu

Modifiye nanopartiküllerin yüzeyinde bulunan organik içerikleri değerlendirmek amacıyla hazırlanan partiküllerin Termal Gravimetrik Analiz'ları yapıldı. Manyetik nanopartiküllerin yüzeyinde, kaplanmanın meydana geldiği TGA ölçümlerinden anlaşılabilir. Fe₃O₄ ve modifiye partiküllerin termal kararlılığı TGA ile değerlendirildi.

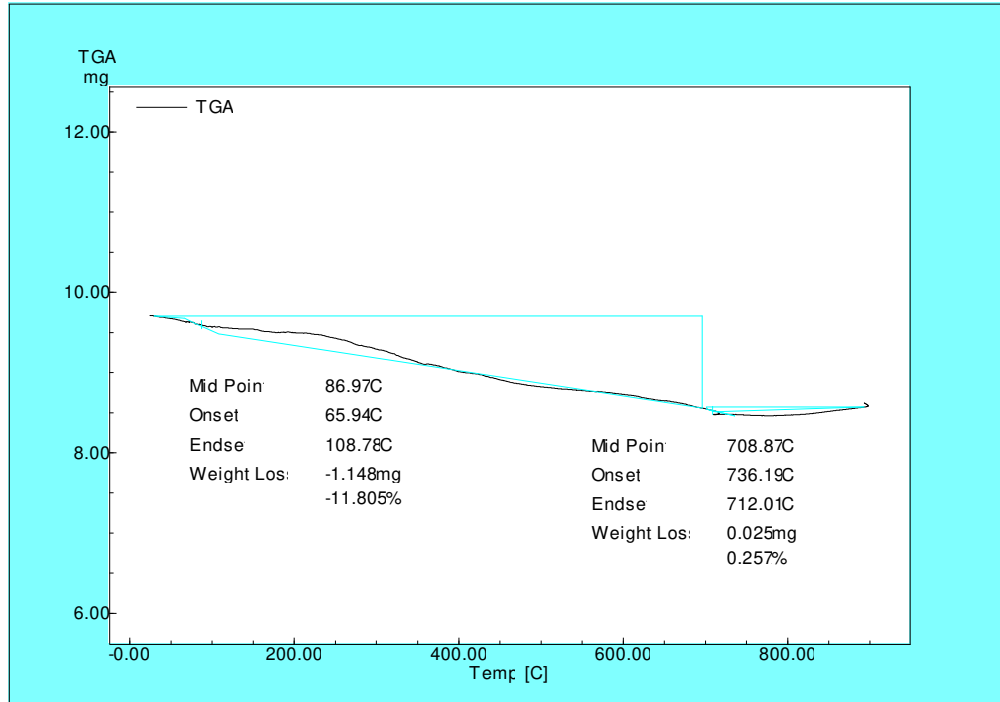
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Şekil 4.9.'da nanopartiküllere ait termogram incelendiğinde sıcaklık artışı ile birlikte başlangıçta hızlı bir kütle kaybının gerçekleştiği görülmektedir. Sonuç olarak, orta noktası 147 °C'de olmak üzere partikül, kütlesinin 0.597 mg'ını yani toplam kütlesinin % 4.610'unu kaybetmiştir. Bu sonuç literatür ile uyumludur. Kaybedilen kütlenin çoğunlukla fiziksel olarak partikül yüzeyinde absorbanmış sudan kaynaklandığı düşünülmektedir (Can ve ark. 2009, Kurtan ve Baykal 2014, Sundar ve ark. 2014).



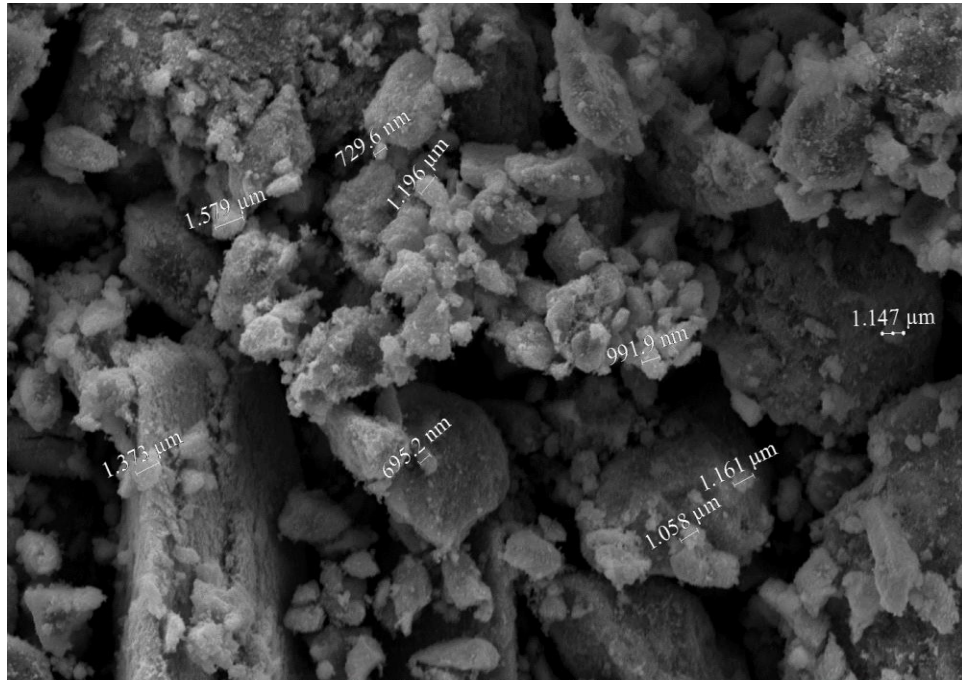
Şekil 4.9. Manyetik Fe₃O₄ nanopartiküllerinin termogramı

Şekil 4.10.'deki termogram incelendiğinde, sıcaklık artışı ile birlikte başlangıçta hızlı bir kütle kaybının gerçekleştiği görülmektedir. Daha sonra ise kütlede küçük bir artış söz konusudur. Sonuç olarak, orta noktası yaklaşık 87 °C'de olmak üzere partikül, kütlesinin 1.148 mg'ını yani toplam kütlesinin % 11.805'ini kaybetmiştir. Bu kütle kaybı yapıda bulunan 3-APTES + GA'nın termal dekompoze olmasına bağlanmıştır. İki kademede ise, orta noktası yaklaşık 709 °C'de olmak üzere partikül kütlesi 0.025 mg yani kütlede % 0.257'lik bir artış söz konusudur. Bu kütle artışı, magnetit'in maghemite dönüşümü ile ilgili olabileceği ileri sürülmüştür (Cao ve ark. 2009).



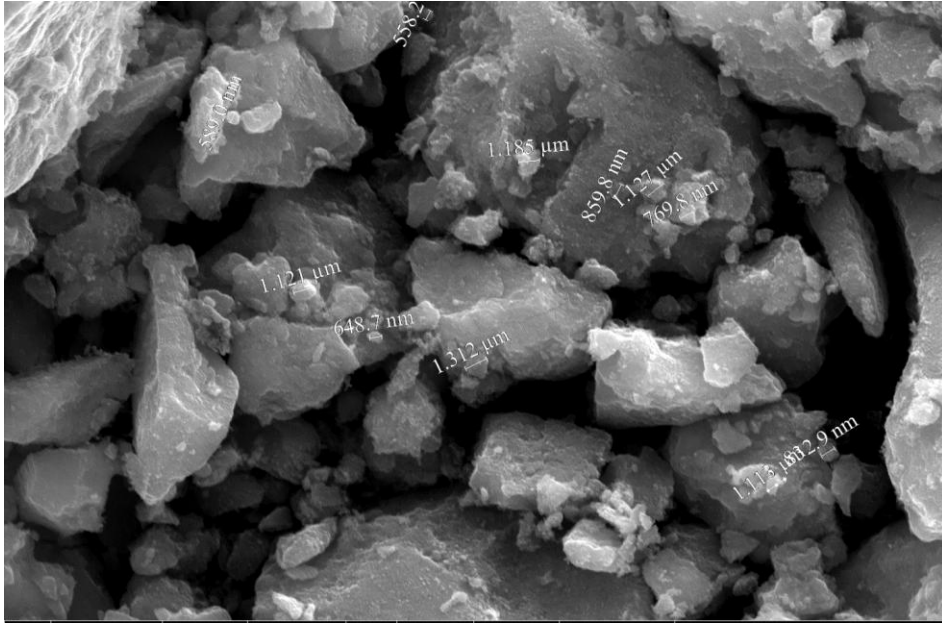
Şekil 4.10. Manyetik $\text{Fe}_3\text{O}_4@3\text{-APTES=GA}$ 'nın termogramı

Manyetik Fe_3O_4 (Şekil 4.11.), $\text{Fe}_3\text{O}_4@3\text{-APTES}$ (Şekil 4.12.), $\text{Fe}_3\text{O}_4@3\text{-APTES=GA}$ (Şekil 4.13.) ve $\text{Fe}_3\text{O}_4@EP$ 'nin (Şekil 4.14.) yüzey yapısını incelemek amacıyla SEM fotoğrafları alındı. Aşağıda verilen şekillerden görüldüğü gibi hazırlanan yapıların morfolojik farklılıkları açıkça görülmektedir.

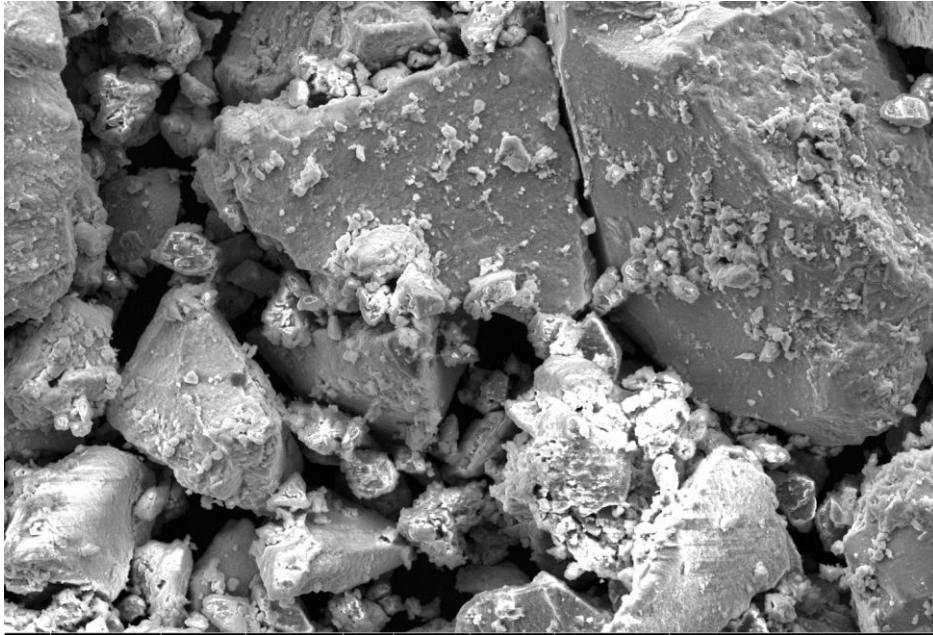


Şekil 4.11. Manyetik Fe_3O_4 nanopartiküllerin SEM fotoğrafları (mag:8 000x)

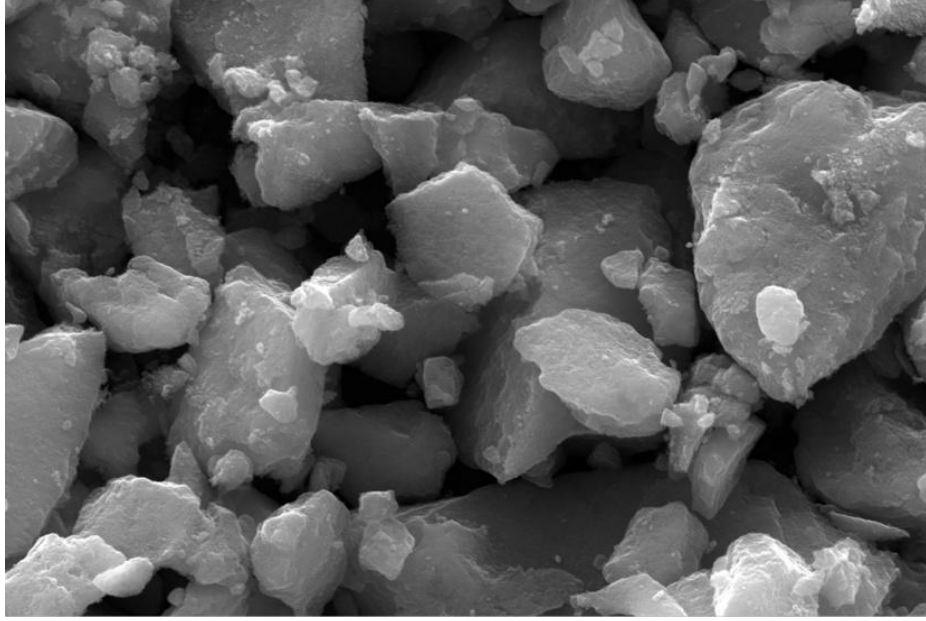
4. BULGULAR VE TARTIŞMA



Şekil 4.12. Fe₃O₄@3-APTES'in SEM fotoğrafı (mag:8 000x)



Şekil 4.13. Fe₃O₄@3-APTES=GA'nın SEM fotoğrafı (mag:2 000x)



Şekil 4.14. Fe₃O₄@EP'nin SEM fotoğrafı (mag:8 000x)

4.2. Modifiye Nanopartiküllere CRL'nin Kovalent İmmobilizasyonu

Bu çalışmada; CRL, manyetik nanopartiküllere iki farklı organik uzatma kolu üzerinden (3-APTES + GA ve EP) kovalent bağlanma metoduna göre immobilize edildi. Çalışmada birinci organik uzatma kolunu oluşturmak için kullanılan GA, taşıyıcı destek maddelerinin aktifleştirilmesinde sıklıkla kullanılan bir bileşiktir. GA, immobilize enzimler için en iyi, aktive edici reaktif olarak bilinir (Alonso ve ark. 2005, Betancor ve ark. 2006, Alptekin ve ark. 2009, Yılmaz ve ark. 2010). Çalışmada nanopartiküller öncelikle 3-APTES ile aktifleştirilmiş ve partikül yüzeylerinde primer amin grupları oluşturuldu. Primer amin grubu taşıyan partiküllerin GA ile reaksiyona sokulması sonrasında immobilizasyon işlemleri gerçekleştirildi. Enzimler partiküllere yapıda bulunan aldehit grubu üzerinden bağlanmaktadır. Bu yüzden, yapıda ne kadar çok aldehit grubu varsa, immobilize olan enzim miktarı da o kadar fazla olur.

Bu çalışmada, manyetik nanopartiküllerin 3-APTES ile aktifleştirilmesi sonucunda partikül yüzeyinde bulunan $-NH_2$ grubu miktarı belirlendi. Yapılan hesaplamalar sonucunda 1.0 g partikül yüzeyinde bulunan $-NH_2$ grubunun miktarı 420 $\mu\text{mol/g}$ olarak hesaplandı. Fe₃O₄@3-APTES'in GA ile reaksiyonu sonrasında yapıda primer amin gruplarının büyük çoğunluğunun GA ile reaksiyon verdiği belirlendi. Yaklaşık % 88'inin GA ile modifiye olduğu bulundu. Bu sonuçlar yapıya önce 3-APTES'in ve daha sonra GA'nın girdiğini göstermektedir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışmada ikinci organik uzatma kolunu oluşturmak için kullanılan EP literatürde çapraz bağlayıcı reaktif olarak kullanıldığı bilinmekte ve özellikle de Siklodekstrin'in modifiye edilmesinde son 50 yıldan beri kullanılmaktadır. Yapısında, bir epoksit grubu (oksiran) ve bir kloroalkil grubu olmak üzere iki fonksiyonel grup bulundurur (Crini ve Morcellet 2002, Santos ve ark. 2008). Epoksit grubu taşıyan destek maddelerine enzimlerin çok kolay immobilize olduğu bilinmektedir. Epoksit grubu taşıyan destek materyalleri, ılımlı deney koşulları (pH 7.0) altında farklı protein grupları ile (amino, tiyol, fenolik) çok kararlı kovalent bağ oluşturabilmeleri nedeniyle enzim teknolojisi uygulamalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Arıca 2000).

Bu çalışmada, manyetik Fe₃O₄ nanopartiküllerin EP ile reaksiyonu sonucunda partikül yüzeyinde bulunan oksiran gruplarının miktarı belirlendi. 1 g partikül yüzeyinde bulunan oksiran gruplarının miktarı 460 µmol/g olarak hesaplandı. Bu sonuçlar manyetik nanopartiküllerin EP ile reaksiyon verdiğini göstermektedir.

CRL'nin modifiye manyetik nanopartiküllere kovalent olarak immobilizasyon işleminde, lipaz aktivitelerinin pH'ya bağlılığı ile ilgili çalışmalara bakıldığında lipazların genel olarak pH 7.0 civarında aktivite gösterdikleri görülmektedir (Şahin ve ark. 2009, Sun ve ark. 2010, Jiang ve ark. 2014).

Bu çalışmada, immobilizasyon işleminde kullanılan tamponun derişiminin belirlenmesine yönelik herhangi bir çalışma yapılmadı. Fakat genel olarak lipaz enzimleri ile ilgili çalışmalarda kullanılan tamponun derişimi 50 mM'dır (Kuo ve ark. 2012). Bu derişimin üzerinde/altında yapılan işlemlerde enzim aktivitesinde bir düşüş tespit edilmiştir. CRL'nin tampon derişiminden etkilendiğı belirlenmiştir. Bu durum reaksiyon ortamının iyonik şiddetinin ve lipazın stabilizasyonunu sağlamada önemli bir rol aldığını göstermektedir (Yıldırım ve ark. 2014). İmmobilizasyon sırasında ortamın pH'ının immobilize olan enzim miktarına etkisinin incelendiğı bir çalışmada, CRL'nin izoelektrik noktasında (pH_I=4.0) serbest enzimin % 95'inin immobilize olduğu belirlenmiştir. CRL'nin izoelektrik noktasının altında (pH=3.0), serbest enzimin ancak % 20'sinin maddeye bağlandığı, izoelektrik noktanın üstündeki bir pH'da (pH=9.0) serbest enzimin % 80'ine yakın kısmının bağlandığı tespit edilmiştir. En yüksek miktarda bağlanmanın izoelektrik noktada gerçekleşmesinin sebebi; CRL'nin izoelektrik noktada en küçük molekül boyutuna ulaşmasıdır. Yüksek miktarda enzimin

bağlandığı pH=4’de enzimin spesifik aktivitesinin oldukça düşük olduğu anlaşılmıştır. pH=4.0’de CRL’nin en küçük molekül boyutunda olması nedeniyle, desteğin gözeneklerinin içine girdiği düşünülmüştür. Bu durumda enzimin büyük bir kısmının gözenek içinde girdiği için gözenek içi kütle aktarım kısıtlamaları nedeni ile substratın enzime ulaşmasının engellenmiş olabileceği öne sürülmüştür (Takaç ve Bakkal 2007).

Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcı destek maddelerinin, enzimi bağlayabilecekleri bir yüzey alanları vardır. Immobilizasyonda maddenin yüzey alanı dolduğunda immobilizasyon işlemi bitmiş demektir. Bu çalışmada, CRL’nin manyetik nanopartiküllere GA ve EP organik ara kolları üzerinden kovalent bağlanma metodu ile immobilizasyonunda kullanılan 450 mg enzimin % 100’e yakın kısmı partiküllere bağlandı.

CRL’nin modifiye nanopartiküllere immobilizasyonunda, ortamın sıcaklığı ham enzimin yüzeye bağlanma miktarını etkilemektedir. Sıcaklığın etkisinin incelendiği bir çalışmada, en yüksek miktarda ham enzimin bağlandığı sıcaklık 40 °C olarak belirlenmiştir. Sıcaklığın 40 °C’nin üzerine çıkması nedeniyle, immobilize enzimin substrata karşı aktivitesinde azalma görülmüştür. Düşük sıcaklıkta, immobilize enzimin substrata karşı aktivitesinin daha iyi olduğu belirtilmiştir (Takaç ve Bakkal 2007, Yılmaz ve ark. 2010). Battistel ve ark. (1991), 1.0 g Amberlite XAD-7’ye immobilize etmek için 200 mg ham CRL kullanmışlar ve immobilizasyon işlemlerini oda sıcaklığında gerçekleştirmişlerdir. Oda sıcaklığında immobilize olan enzimin 5, 20, 35 ve 50 °C sıcaklıklarda Tribütirin’e karşı % kalan aktivitesinin, sıcaklık arttıkça azaldığını belirlemişlerdir. Bu çalışmada enzim, modifiye partiküllere +4 °C’de immobilize edildi. Sıcaklığın etkisinin incelendiği bu kısımda 4 °C yerine; enzim 25 °C’de immobilize edildiğinde immobilizasyon yüzdesinin sıcaklık arttıkça düştüğü tespit edildi. Ayrıca, lipaz enzimleri ile yapılan bir çalışmada immobilizasyon süresinin uzaması enzimin aktivitesinde ve immobilize olan protein miktarının azalmasına neden olduğu belirlenmiştir (Yıldırım ve Tükel 2013).

İmmobilizasyon sırasında karıştırma hızı ve sürenin etkisinin incelendiği bir çalışmada, karıştırma hızının immobilizasyon başarısına katkısının olmadığı belirlenmiştir. CRL’nin Montmorillonit K10’a immobilizasyon işleminde, optimal immobilizasyon süresini belirlemek için yapılan çalışmalarda, araştırmacılar ilk 6 saat

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

içinde immobilizasyon işleminin tamamladığını tespit etmişlerdir (Takaç ve Bakkal 2007). Bu çalışmada immobilizasyon sırasında inkübatür 150 rpm ve 12 saat süreyle çalıştırıldı. İmmobilizasyon işlemlerinden sonra süzüntülerde kalan protein miktarı belirlenerek immobilizasyonun başarısı belirlendi (Lowry ve ark. 1951).

Çalışmada, serbest ve immobilize enzimlerin enzimatik aktiviteleri belirlendi. Enzim aktivitesinin belirlenmesi için CRL'nin yapısındaki protein miktarı tespit edildi (Lowry ve ark. 1951). Serbest enzimin yapısındaki protein miktarı % 11.66 olarak belirlendi. Bu sonuç literatür ile uyumludur (Takaç ve Bakkal 2007).

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@APTES=GA-CRL}$ 'nin hazırlanmasında kullanılan enzimin yaklaşık % 99.89'unun immobilize olduğu belirlendi. İmmobilize enzimdeki protein miktarı 52.42 mg olarak belirlendi.

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@EP-CRL}$ 'nin hazırlanmasında kullanılan enzimin yaklaşık % 99.82'sinin immobilize olduğu belirlendi. İmmobilize enzimdeki protein miktarı 52.38 mg olarak belirlendi.

Enzimlerin aktivite tayinlerinde genel olarak ya kaybolan substrat miktarı ya da meydana gelen ürün miktarı ölçülür. Bir dakikada ve optimum koşullarda bir mikromol substratı ürüne çeviren enzim miktarı bir “ünite” olarak kabul edilmektedir. Enzim üniteleri U veya UI şeklinde gösterilir (Yılmaz 2010).

Bu çalışmada serbest ve immobilize lipazların enzimatik aktiviteleri belirlendi. Çizelge 4.1.'de serbest ve immobilize lipazların ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@EP-CRL}$ ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@APTES=GA-CRL}$) aktiviteleri sırasıyla, 60.58, 1405 ve 2107.5 U/g destek maddesi olarak hesaplandı. Aktivite hesaplamalarında serbest lipazın aktivitesi mL'de (1.0 mg/mL) alındı.

Çizelge 4.1. Optimum reaksiyon şartlarında serbest ve immobilize lipazların aktivitesi

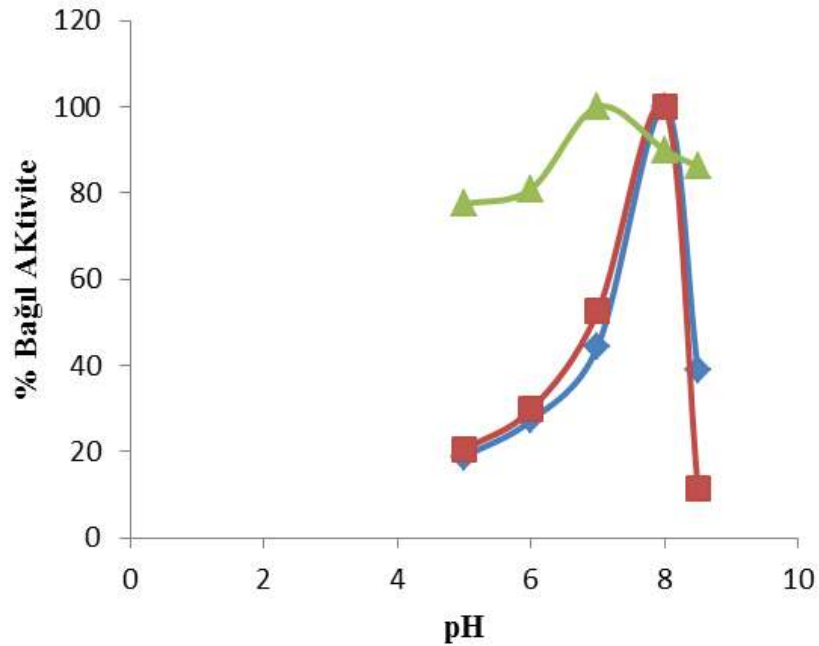
	İmmobilize enzimin yüzdesi (%)	İmmobilize protein miktarı (mg)	Lipaz Aktivitesi (U/g destek maddesi)
Serbest Lipaz	-	-	60.58 ^a
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@EP-CRL}$	99.82	52.38	1405
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@APTES=GA-CRL}$	99.896	52.42	2107.5

^aSerbest lipazın aktivitesi mL'de (1.0 mg/mL) alındı.

4.3. Serbest ve İmmobilize Lipazların Yüksek Aktivite Gösterdiği Şartlar

4.3.1. Serbest ve İmmobilize Lipazların Aktivitelerine pH'ın Etkisi

Enzimler elektrolit karakterli oldukları için enzim aktifliği, pH ile değişim gösterebilir. pH sulu çözeltide enzimatik aktiviteyi değiştiren en önemli faktörlerden biridir. pH değişikliği ile enzim yapısındaki amino asit zincirinin iyonik özelliği değişir ve denatüre olan enzimin katalitik aktifliği kaybolur. Şekil 4.15.'de görüldüğü gibi lipazların aktifliği asidik ve bazik bölgelere kaydıkcı azalmıştır. Enzimlerin üç boyutlu yapısı immobilizasyon sürecinden etkilenmeyebilir. Bu nedenle immobilize enzimin optimum parametreleri serbest enzimin parametreleri ile aynı gözlenebilir. İmmobilizasyon yönteminde enzim ile destek materyali arasında bir etkileşim söz konusu değildir. Bu nedenle pH'ın az değişmesi beklenen bir durumdur. Aktiviteye pH'ın etkisi, farklı pH'larda (pH:5 Trisodyum sitrat; pH: 6, 7 ve 8 fosfat tamponu; pH:8.5: Tris baz) ve 50 mM derişimde tampon çözeltiler kullanılarak belirlendi. Sonuçlar % bağıl aktivite olarak pH'a karşı grafiğe geçirildi.



Şekil 4.15. Serbest lipaz (▲), Fe₃O₄@3-APTES=GA-CRL (◆) ve Fe₃O₄@EP-CRL (■)

Şekil 4.15.'de görüldüğü gibi serbest lipazın optimum pH'ı 7.0 iken, immobilize lipazların optimum pH'ları 8.0'dır. Serbest lipazın pH profili immobilize enzimden daha geniş aralıktadır. Bu durum immobilizasyonun, enzim aktivitesini daha dar pH aralığına hapsettiği anlamına gelmektedir. Bununla birlikte, immobilize enzimlerin

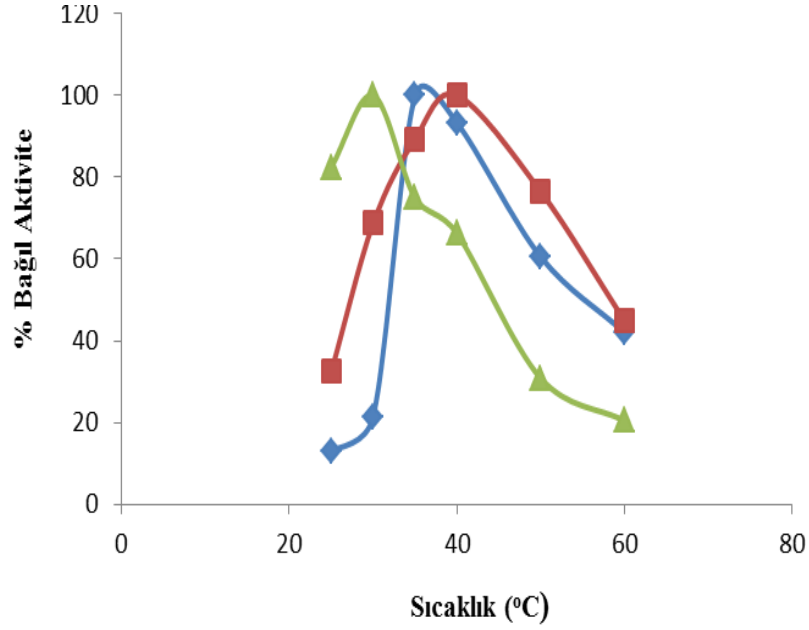
optimum pH değerleri bir miktar alkali bölge civarına kaydığı gözlemlendi. Bu kaydırma destek maddesinin yapısına bağlı olabilir. Santos ve ark. (2008), aktive edilmiş GA ile polivinil alkolde immobilize lipazın optimum pH'ının 8.8 olarak bulmuşlardır. CRL'nin GA ile kitosan küreciklerine immobilize edildiği bir başka çalışmada optimum pH 9.0 ile pH 5-8.0 aralığında dayanıklı olduğunu bulmuşlardır (Hung ve ark. 2003).

4.3.2. Serbest ve İmmobilize Lipazların Aktivitelerine Sıcaklığın Etkisi

Reaksiyonlarda sıcaklığın artması ile moleküller arası çarpışma artmakta ve buna bağlı olarak da genellikle tepkimenin hızı artmaktadır. Enzimler protein yapısında oldukları için optimum sıcaklığın üzerinde denatürasyona uğrarlar. Sıcaklığın artması ile serbest enzimin aktifliği azalır (Tümtürk ve ark. 2006). İmmobilize enzimler serbest enzimlere göre daha yüksek sıcaklıklarda katalitik aktive göstermektedirler. Yüksek sıcaklıklarda serbest lipaz kolaylıkla denatürasyona uğrar fakat immobilize lipaz muhtemelen rijit konformasyona dayanarak korunur ve bundan dolayı katalitik aktivitesini devam ettirir (Ye ve ark. 2005).

Buna ilaveten, immobilize lipazların sıcaklık profilleri serbest enzime göre daha geniş aralıktadır. Bu durum, immobilizasyonun daha geniş bir sıcaklık aralığının üzerinde enzim aktivitesini koruduğu anlamına gelmektedir (Arıca ve Bayramoğlu 2004, Phadtare ve ark. 2004). Bu durum ya destek maddesi ve enzim arasındaki hidrojen bağ oluşumu ve elektrostatik etkileşimin sonucu olarak enzim hareketinde konformasyonel sınırlamanın oluşmasından ya da yüksek sıcaklıklarda substratın difüzyonunda düşük bir sınırlamadan kaynaklanır. Böylece immobilize enzimler daha yüksek sıcaklıklarda katalitik aktivite gösterirler (Ye ve ark. 2005). Literatürde optimum sıcaklıktaki benzer değişimler gözlenmiştir (Ye ve ark. 2007).

Aktiviteye sıcaklığın etkisinin incelenmesinde, serbest lipaz için pH 7.0'de 50 mM'lık fosfat tamponu ve immobilize lipazlar için pH 8.0'de 50 mM'lık fosfat tamponu kullanıldı. Farklı sıcaklıklarda, sırasıyla 25, 30, 35, 40, 50 ve 60 °C'de çalışılarak aktiviteye sıcaklığın etkisi belirlendi. Aktivitenin sıcaklığa bağlı olarak değişimi % bağıl aktivite olarak Şekil 4.16.'de gösterildi.



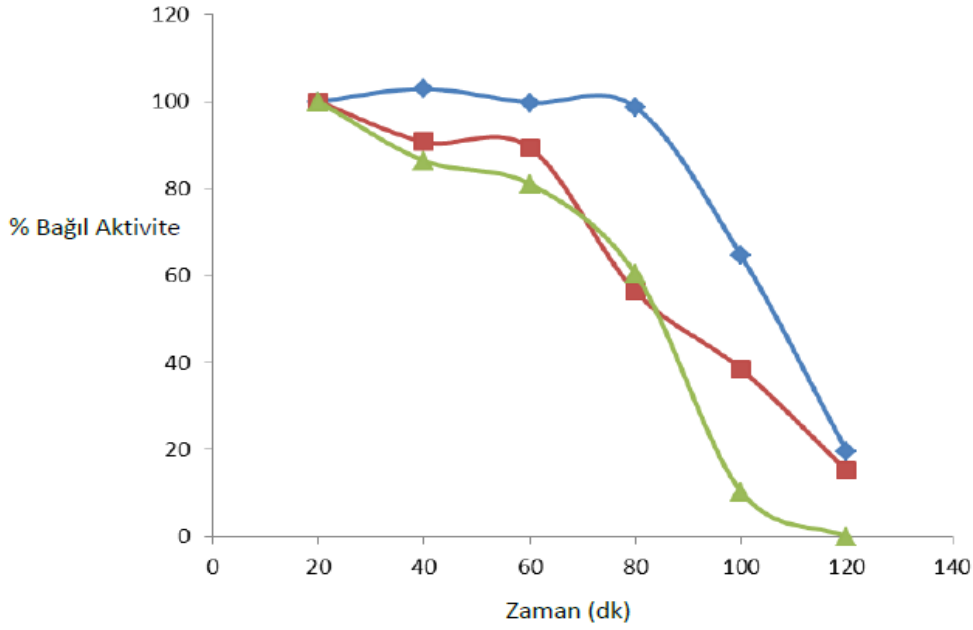
Şekil 4.16. Serbest lipaz (▲), Fe₃O₄@3-APTES-GA-CRL(■) ve Fe₃O₄@EP-CRL (◆)

Grafikten görüldüğü gibi serbest enzimin optimum sıcaklığının 30 °C, sırasıyla immobilize lipazlardan Fe₃O₄@EP-CRL'nin optimum sıcaklığının 35 °C ve Fe₃O₄@3-APTES=GA-CRL'nin optimum sıcaklığının ise 40 °C olduğu belirlendi. Immobilize lipazların, serbest lipaza göre, optimum sıcaklık değerlerini daha yükseğe taşıdıkları belirlendi.

4.3.3. Serbest ve İmmobilize Lipazların Termal Kararlılıkları

Serbest ve immobilize lipazlar 60 °C'de ve 20, 40, 60, 80, 100 ve 120 dakika gibi farklı zaman aralıklarında inkübe edildi ve her sürenin sonunda kalan aktiviteleri belirlendi. Şekil 4.17.'de görüldüğü gibi elde edilen aktiviteler kullanılarak zamana karşı % bağlı aktivite olarak grafiği çizildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA



Şekil 4.17. Serbest lipaz (▲), Fe₃O₄@3-APTES=GA-CRL (◆) ve Fe₃O₄@EP-CRL (■)

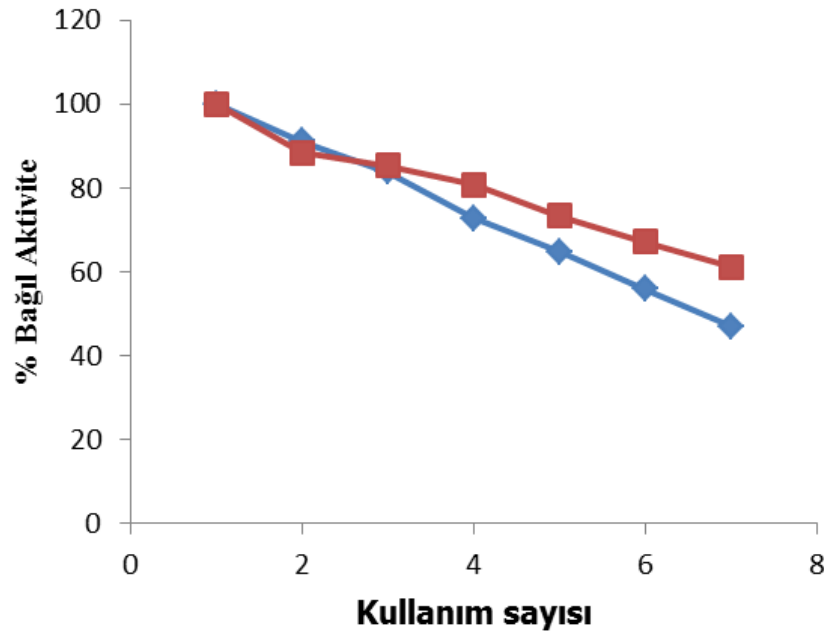
Şekil 4.17.'de serbest ve immobilize lipaz'ın termal kararlılığı görülmektedir. Serbest ve immobilize lipaz 60 °C'de 2 saat süreyle inkübe edildi ve enzim aktivitesi çeşitli zaman aralıklarında ölçüldü. Şekil 4.17. incelendiğinde sürenin sonuna doğru hem serbest hem de immobilize CRL'nin aktivitesinin tükenmeye başladığı görüldü. Bu sonuçlar göstermiştir ki immobilize lipazların termal stabilitesi serbest lipazdan çok daha iyidir, çünkü enzim ve destek maddesi arasındaki etkileşim yüksek sıcaklıklarda enzimin konformasyonel geçişini önleyebilmektedir. Lipaz enzimi, destek materyaline çoklu noktadan tutunabildiğinden termal stabilitesi korunabilmiştir.

Enzimlerin kullanım proseslerinde sık sık enzimin termal bozunması problemiyle karşılaşılır. Immobilize lipazların sıcaklığa karşı direnç göstermeleri pratik uygulamaları için önemli bir potansiyel avantajdır. Eğer enzimlerin ısı kararlılıkları immobilizasyon ile artıyorsa, bu enzimlerin potansiyel uygulama alanları genişletilebilir (Öztürk ve ark. 2007). Lipazın termal kararlılığı açıkça yapısı ile ilgilidir (Zhu ve ark. 2001). Bu çalışmada, yüksek sıcaklıklarda enzimin konformasyonel geçişini önleyebilen enzim ve destek maddesi arasındaki etkileşimden dolayı immobilize lipazın termal kararlılığı serbest enzimden daha yüksek çıkmıştır. Sonuç olarak, termal kararlılık enzimler için istenilen bir özelliktir (Janssen ve ark. 1994).

4.3.4. İmmobilize Lipazların Tekrar Kullanılabilirlikleri

Serbest enzime göre immobilize enzimler birçok kez ve uzun süre kullanılabilir. İmmobilize enzimlerin bu özelliği endüstriyel uygulamalarda çok önemlidir. Çünkü üretim maliyeti sürekli kullanıma bağlı olarak düşer. İmmobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği, ekonomik açıdan önemlidir. İmmobilize enzimlerin sürekli kullanımları sonucunda enzimatik aktifliklerinde bir azalma gözlenmiştir. İmmobilize lipazların tekrar kullanım sayısını ölçmek amacıyla aktiflikleri tayin edildi. Sonuçlar, hidrolitik aktivite yönünden İmmobilize enzimin tekrar kullanım kararlılığının daha yüksek olduğunu göstermektedir.

Tekrar kullanılabilirliği araştırmak için immobilize enzimler her kullanımdan sonra fosfat tamponu ile (50 mM, pH 8.0) yıkandı ve diğer hidroliz işlemlerinde kullanıldılar. 7. kullanım sonunda immobilize enzimlerin hala önemli oranda aktivitelerini korudukları gözlemlendi (Şekil 4.18.). İmmobilize enzimlerin aktivitesi tekrar kullanım sayısındaki artış ile azalmaktadır. Bu sonuçlar, kullanımdaki destek maddesinden proteinin sızıntısı ve proteinin denatürasyonu ile enzimin aktivitesinin kaybolması ile açıklanabilir.

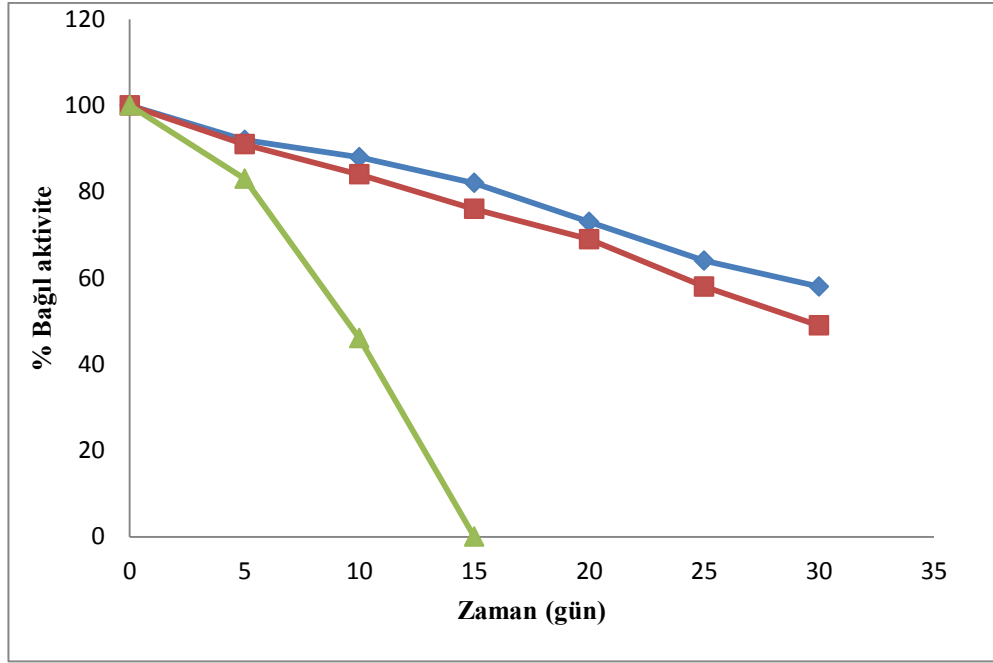


Şekil 4.18. Fe₃O₄@3-APTES=GA-CRL (◆) ve Fe₃O₄@EP-CRL (■)

4.3.5. İmmobilize Lipazların Depolama Kararlılıkları

İmmobilize enzimlerin, serbest enzimlere göre depolama kararlılıklarının daha yüksek olduğu ve daha uzun raf ömrüne sahip oldukları bilinmektedir. Enzimler düşük sıcaklıklarda tutulduğu zaman aktivitelerini daha çok korurlar (Yılmaz ve ark. 2010). Aktivitelerindeki bu düşüş immobilize lipazlar için daha yavaş olmaktadır ve genellikle aynı zaman sonunda başlangıç aktivitelerini önemli oranda korumaktadırlar. Geride kalan kararlılık, destek maddesi için enzimin çoklu bağlanması ile ilgilidir (Abrol ve ark. 2007). İmmobilize enzimlerin +4 °C’de izooktan içinde saklandığı bir çalışmada 48 saat sonunda aktivitelerinde bir değişim gözlenmemiş ve 96 saat sonunda ise % 2 civarında aktivite kaybının gerçekleştiği anlaşılmıştır. Buna karşın, immobilize enzimler +4 °C’de tampon faz içinde saklandığında 48 saat sonunda % 15 aktivite kaybı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, immobilize enzimlerin aktivitelerini uzun zaman korumaları için +4 °C’de izooktan içinde saklamanın daha iyi olduğu sonucuna varmışlardır. Depolama kararlılığı ile ilgili yapılan çalışmada CRL, Amberlite XAD-7’ye immobilize edilmiş ve daha sonra 5, 20, 35 ve 50 °C’de bekletilerek aktivite kayıplarını incelemişler. 200 saat sonunda 5 °C’de aktivite kaybı gözlenmezken, 50 °C’de saklanan immobilize enzimlerde 10 saat sonrasında aktivitenin tamamen kaybolduğunu belirlemişlerdir (Battistel ve ark. 1991, Bakkal 2006, Takaç ve Bakkal 2007).

İmmobilize lipazların aktifliğine, depolanma süresinin etkisini incelemek amacı ile immobilize lipazlar hazırlandıktan sonra, ilk gün aktiviteleri belirlenip +4 °C’de buzdolabında muhafaza edildiler. İmmobilize lipazların, kalan aktivitelerinin belirlenmesi için 5., 10., 15., 20., 25. ve 30. gün numunelerin aktivite tayinleri yapıldı. Sonuçlar immobilize lipazların, 30. gün sonunda aktivitelerinin hala yüksek olduğunu göstermiştir (Şekil 4.19.). Bu elde edilen sonuçlara göre GA ile aktifleştirilmiş immobilize enzimlerin daha uzun raf ömrüne sahip oldukları belirlendi. Ayrıca, serbest enzimin zamana bağlı aktivitesi ölçüldü. Serbest enzimin yaklaşık 15. gün sonunda aktivitesini tamamen kaybettiği belirlendi. Sonuç olarak, immobilizasyon işlemi ile enzim aktifliğinin iyileştirilebilir olduğu söylenebilir.



Şekil 4.19. Fe₃O₄@3-APTES=GA-CRL (◆), Fe₃O₄@EP-CRL (■) ve serbest lipaz (▲)

4.4. (S)-(+)-Ibuprofen, (S)-(+)-Naproksen ve (R)-(-)-Mandelik Asit Üretimi

İmmobilize lipazlar (Fe₃O₄@EP-CRL ve Fe₃O₄@3-APTES=GA-CRL) kullanılarak hazırlanan substratların çalkalamalı inkübatörde enzimatik hidroliz reaksiyonları; sabit sıcaklık ve karıştırma hızlarında kapaklı erlenlerde gerçekleştirildi.

Hidroliz reaksiyonlarında, tampon faz olarak fosfat tamponu ve organik faz olarak izooktan kullanıldı. Tampon fazın organik faza oranı (2.5 mL fosfat tamponu ve 5 mL izooktan) 1/2 oldu. Bu tür çalışmalarda bu oran çok önemlidir. Tampon faz miktarının yüksek olması durumunda immobilize enzimlerin aktivitelerinin azaldığı belirlenmiştir. Neden olarak ta immobilize enzimin büyük ölçüde tampon faz içinde kalması nedeniyle organik fazda bulunan substrat ile reaksiyon verme şansının azalmış olabileceği ileri sürülmüştür. Aynı immobilize enzim miktarına karşı kullanılan tampon faz miktarının (hacimce) azalması ile tepkime hızının arttığı tespit edilmiştir. Bunun nedeni olarak, immobilize enzimin substratla temas yüzeyinin artması şeklinde açıklanmıştır. Hidroliz tepkimelerinde zaman ilerledikçe ortamda alkolün miktarı artmaktadır. Bu çalışmada; (S)-(+)-Ibuprofen ve (S)-(+)-Naproksen üretiminde ortamda Metanol miktarı, (R)-(-)-Mandelik asit üretiminde ise ortamda n-Bütanol miktarı artmaktadır. Eğer ortamda yeterli miktarda tampon faz bulunmazsa, artan alkol

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

miktarının immobilize enzim üzerinde inhibisyon etkisi yaratabileceği vurgulanmıştır (Bakkal 2006, Takaç ve Bakkal 2007).

Rasemik esterlerin hidrolizinde iki farklı sıcaklıkta çalışıldı (Çizelge 4.2.). Sıcaklığın enzimatik hidroliz reaksiyonları üzerinde etkili olduğu ve en uygun sıcaklıkta tepkime hızının ve enantiyoseçiciliğin yüksek olduğu açıklanmıştır (Battistel ve ark. 1991, Lin ve Tsai 2003). Substrat derişimi olarak bu çalışmada 10.0 mgmL^{-1} derişiminde çözelti kullanıldı. Substrat derişiminin etkisinin incelendiği bir çalışmada, $5\text{--}20.0 \text{ mgmL}^{-1}$ derişiminde iki çözelti kullanılmış ve substrat derişiminin artmasının % dönüşümü azalttığı belirlenmiştir. Ancak substrat derişiminin artması ile daha düşük dönüşümlerde de enantiyomerik saflığı yüksek ürün elde edilmiştir. Araştırmacılar, substrat derişiminin 10.0 mgmL^{-1} 'ye yükseldikçe ürün miktarının arttığını ve daha yüksek derişimlerde ise ürün miktarının azaldığını saptamışlardır. Ayrıca, ürünlerin ortamdaki uzaklaştırılmasının dönüşümü olumlu yönde etkilediği belirlenmiş ve bu sonucun ürün (alkol) ve/veya substrat inhibisyonundan kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (Moreno ve Sinisterra 1995, Xin ve ark. 2000, Lin ve Tsai 2003, Takaç ve Bakkal 2007).

Hazırlanan immobilize enzimlerin *p*-NPP'ye karşı optimum pH'larının 8 olarak belirlenmesi nedeniyle hidroliz çalışmalarında pH 8.0 fosfat tamponu kullanıldı. Yine immobilize enzimlerin *p*-NPP'ye karşı optimum sıcaklıklarına göre hidroliz çalışmalarında ortam sıcaklığı $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@EP-CRL}$ için 35°C ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@3-APTES=GA-CRL}$ için 40°C oldu (çalışıldı). Hidroliz çalışmalarında, ortam sıcaklığının dönüşüm ve enantiyoseçicilik üzerine etkisi bulunmaktadır. Hidroliz için optimum sıcaklık belirlendiğinde tepkimedeki dönüşüm ve enantiyoseçicilik yüksek olmaktadır. Bunun nedeni olarak, optimum sıcaklıkta enzimin aktif bölgesine, substratın rahatlıkla ulaşabileceği bir üç boyutlu düzenlenmede olması ve immobilizasyon sırasında bu yapının korunması ile ilgili olabileceği ileri sürülmüştür (Xin ve ark. 2000, Lin ve Tsai 2003, Bakkal 2006, Takaç ve Bakkal 2007).

Hidroliz reaksiyonlarında kullanılan immobilize enzim miktarının iyi belirlenmesi gerekmektedir. Çalışmada kullanılan enzim miktarının substrata göre fazla olması halinde, enzim her iki enantiyomeri de substrat olarak kullanabilmektedir. Kullanılan immobilize lipaz miktarının artırılması, rasemik esterlerin hidrolizini

hızlandırmaktadır. İmmobilize lipaz miktarının hidroliz tepkimesine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, kullanılan immobilize lipaz miktarının artırılmasının enantiyoseçimli hidroliz tepkimesini hızlandırdığı belirlenmiştir (Lin ve Tsai 2003, Takaç ve Bakkal 2007). Bu çalışmada kullanılan immobilize lipaz miktarları kritik değerlerin altında tutulmaya çalışıldı. İlk etapta farklı miktarlar (200, 400 ve 600 mg) kullanılarak en uygun miktarlar belirlenmeye çalışıldı. 600 mg immobilize lipaz kullanıldığında iyi sonuçlar elde edildi.

Çalışmada hidroliz reaksiyonlarının olması için substratların inkübatörde karıştırılma hızları çok önemlidir. Hidroliz reaksiyonlarının başarılı bir şekilde olması için substratlar 150, 250, 300 ve 350 rpm’de karıştırıldı. Substratlar 350 rpm’de karıştırıldığında daha iyi sonuçlar elde edildi. Ondan sonra substratlar 350 rpm’de karıştırıldı. Süre olarak hidroliz reaksiyonlarının gerçekleşmesi için 120 saat beklenildi (Çizelge 4.2.). İmmobilize CRL enzimi kullanılarak yapılan hidroliz reaksiyonlarında yüksek dönüşüm ve enantiyoseçicilik elde etmek için substratların 120 saat ve üstü zaman dilimlerinde inkübasyona tabi tutulduğu belirlenmiştir (Bakkal 2006, Takaç ve Bakkal 2007). İnkübasyon süresinin sonucunda organik faz ve tampon fazından alınan örnekler HPLC’de okumaya hazırlandı. Farklı kiral kolonlar kullanılarak substrat ve ürünlerin enantiyomerik fazlalıkları belirlenerek her reaksiyon için dönüşüm ve enantiyoseçicilik belirlendi.

Çizelge 4.2. Substratların hidroliz çalışmalarında kullanılan optimum şartlar

	Fe₃O₄@EP-CRL	Fe₃O₄@3-APTES=GA-CRL
Sıcaklık (°C)	35	40
pH	8	8
Karıştırma hızı (rpm)	350	350
İmmobilize lipaz (mg)	600	600
Tampon/izooktan (mL)	2.5/5	2.5/5
Substrat derişimi (mgmL⁻¹)	10	10
Zaman (saat)	120	120

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

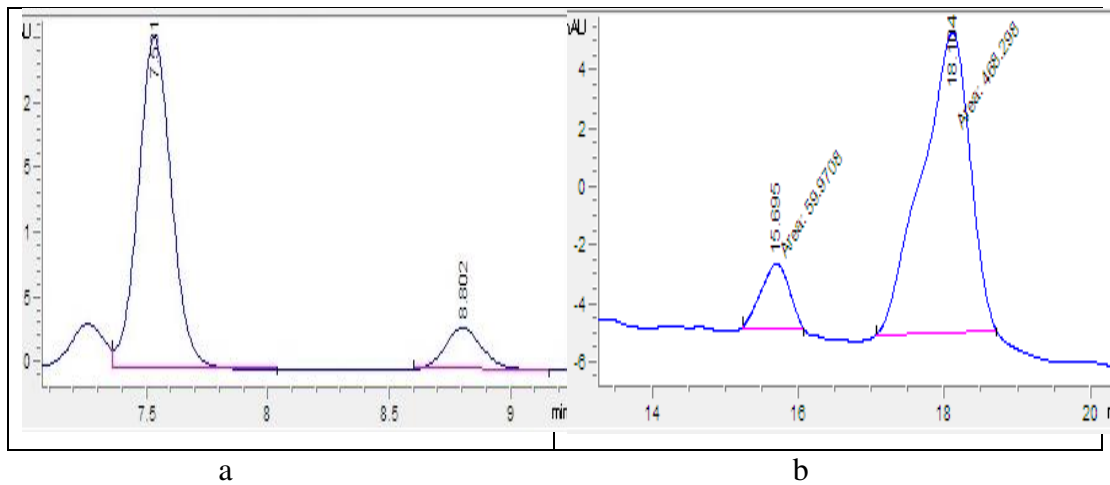
4.4.1. Enantiyomerik Safılıkta (S)-(+)-Ibuprofen Üretimi

Hazırlanan immobilize lipazlar kullanılarak rasemik İbuprofen metil esterinin enzimatik hidroliz tepkimesi sonucunda enantiyomerik safılıkta (S)-(+)-İbuprofen elde edildi. İmmobilize lipazlar ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@EP-CRL}$ ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@3-APTES=GA-CRL}$) kullanılarak yapılan hidroliz tepkimesi sonucunda ürün ve substratın enantiyomerik fazlalılığı belirlenerek tepkimede meydana gelen dönüşüm ve tepkimenin enantiyoseçicilik değerleri hesaplandı (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.3. Rasemik İbuprofen metil esterinin hidroliz çalışmaları ile ilgili sonuçlar

	$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@EP-CRL}$	$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@3-APTES=GA-CRL}$
% ee _s	75.19	35.88
% ee _p	77.30	78.83
% c(x)	49	31
E	17	12

Hidroliz reaksiyonu sonucunda % ee_s belirlenirken analiz süresi 15 dakika olarak belirlendi. Kolondan ilk olarak (R)-(-)-İbuprofen metil esteri (7.53 dakika) ve ardından (S)-(+)-İbuprofen metil esteri (8.80 dakika.) ayrıldı. % ee_p belirlenirken analiz süresi 25 dakika olarak belirlendi. Ürün kısmında da önce (R)-(-)-İbuprofen (15.69. dakika) ve ardından (S)-(+)-İbuprofen (18.10 dakika) kolondan ayrıldı. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@EP-CRL}$ kullanılarak yapılan hidroliz tepkimesi sonucunda ürün ve substrata ait kromatogramlar aşağıda birlikte verilmiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. Substrata (a) ve ürüne (b) ait kromatogramlar

Enantiyomerik saflıkta (*S*)-(+)-Ibuprofen'in elde edilmesine yönelik yapılan çalışmalardaki sonuçlar ile bu çalışmada elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında başarılı sonuçlar elde edildiği rahatlıkla söylenebilir (Goto ve ark. 1996, Yu ve ark. 2004, Marszałł ve Siodmiak 2012, Habibi ve ark. 2013, Siódmiak ve ark. 2013, Yousefi ve ark. 2014).

4.4.2. Enantiyomerik Saflıkta (*S*)-(+)-Naproksen Üretimi

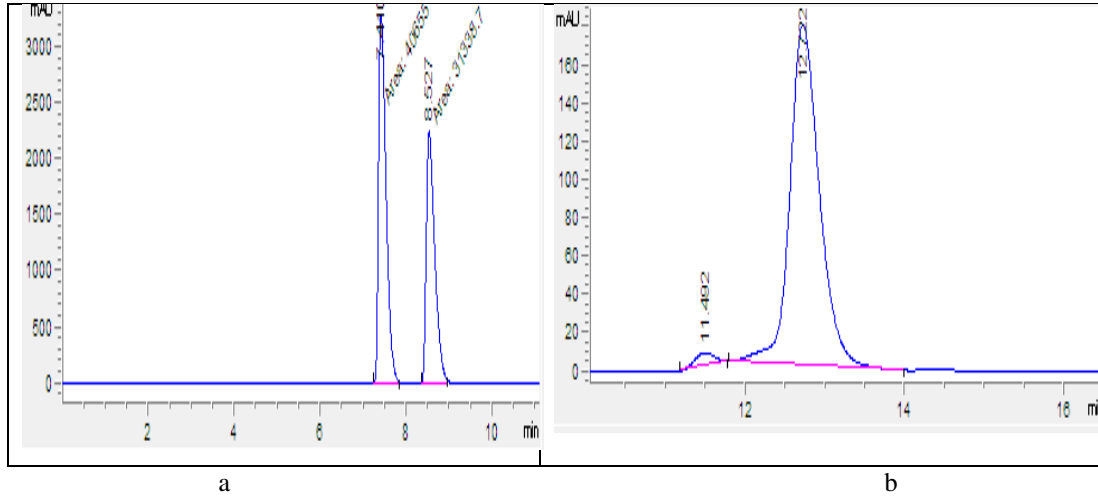
Hazırlanan immobilize lipazlar kullanılarak rasemik Naproksen metil esterinin enzimatik hidroliz tepkimesi sonucunda enantiyomerik saflıkta (*S*)-(+)-Naproksen elde edildi. İmmobilize lipazlar ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@EP-CRL}$ ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@3-APTES=GA-CRL}$) kullanılarak yapılan hidroliz tepkimesi sonucunda ürün ve substratın enantiyomerik fazlalılığı belirlenerek tepkimede meydana gelen dönüşüm ve tepkimenin enantiyoseçicilik değerleri hesaplandı (Çizelge 4.4.).

Çizelge 4.4. Rasemik Naproksen metil esterinin hidroliz çalışmaları ile ilgili sonuçlar
 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@EP-CRL}$ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@3-APTES=GA-CRL}$

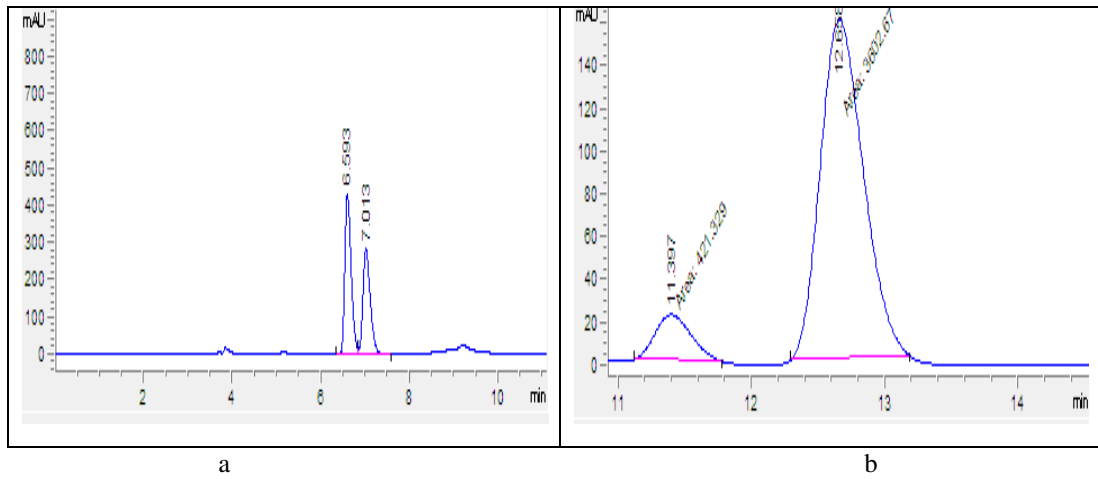
% ee _s	12.94	12.88
% ee _p	94.93	79.06
% c(x)	12	14
E	44	10

Hidroliz reaksiyonu % ee_s)belirlenirken analiz süresi 12 dakika olarak belirlendi. Kolondan ilk olarak (*R*)-(-)-Naproksen metil esteri (7.41 dakika) ve ardından (*S*)-(+)-Naproksen metil esteri (8.53 dakika.) ayrıldı. % ee_p belirlenirken analiz süresi 16 dakika olarak belirlendi. Ürün kısmında da önce (*R*)-(-)-Naproksen (11.49. dakika) ve ardından (*S*)-(+)-Naproksen (12.72 dakika) kolondan ayrıldı. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@EP-CRL}$ kullanılarak yapılan hidroliz tepkimesi sonucunda ürün ve substrata ait kromatogramlar aşağıda birlikte verilmiştir (Şekil 4.21). Ayrıca; $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@3-APTES=GA-CRL}$ kullanılarak yapılan hidroliz tepkimesi sonucunda ürün ve substrata ait kromatogramlar aşağıda birlikte verilmiştir (Şekil 4.22).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA



Şekil 4.21. Substrata (a) ve ürüne (b) ait kromatogramlar



Şekil 4.22. Substrata (a) ve ürüne (b) ait kromatogramlar

4.4.3. Enantiyomerik Safılıkta (*R*)-(-)-Mandelik Asit Üretimi

Hazırlanan immobilize lipazlar kullanılarak rasemik Bütıl Mandelat'ın enzimatik hidroliz tepkimesi sonucunda (*R*)-(-)-Mandelik asit elde edildi. İmmobilize lipazlar ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@EP-CRL}$ ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@3-APTES=GA-CRL}$) kullanılarak yapılan hidroliz tepkimesi sonucunda % ee_p hesaplandı (Çizelge 4.5.). Çizelge 4.5.'de Bütıl Mandelat'ın hidrolizi sonucunda elde edilen kromatogramlardan yola çıkılarak % ee_p belirlendi.

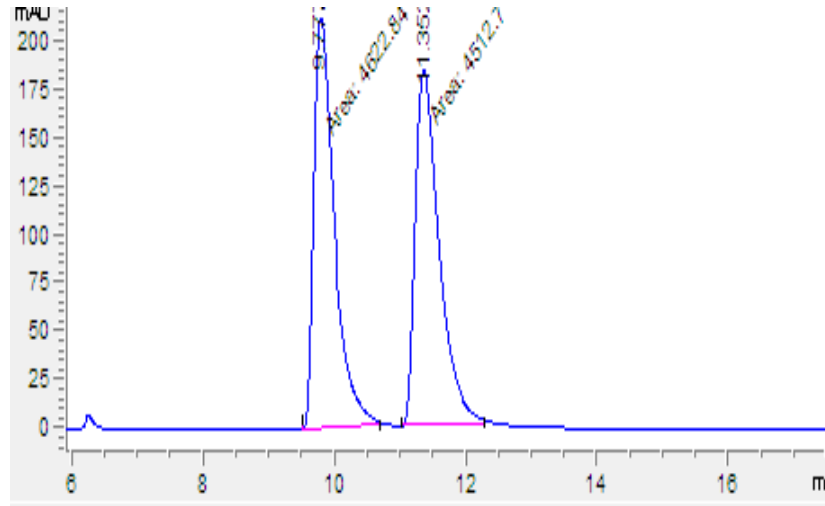
Çizelge 4.5. Rasemik Bütıl Mandelat'ın hidroliz çalışmaları ile ilgili sonuçlar

	$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@EP-CRL}$	$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@3-APTES=GA-CRL}$
% ee _p	68.15	40.63

Bu bölümde mevcut kiral kolonlar (Chiralcel OD, Chiralcel OD-H, Chiralpak AD-H ve Lux Cellulose-1) kullanılarak Bütil Mandelat için %ee_s belirlenemediğinden dolayı tepkimede meydana gelen dönüşüm ve tepkimenin enantiyoseçicilik değeri hesaplanamadı.

Hidroliz reaksiyonu sonucunda % ee_p belirlenirken analiz süresi 16 dakika olarak belirlendi. Bu bölümde ürün kısmında kolondan öncelikle hangi enantiyomerin geldiği belirlendi. Bilindiği gibi rasemik Naproksen metil esterinin ve rasemik İbuprofen metil esterinin enzimatik hidrolizi sonucunda bu bileşiklerin enantiyomerik saflıkta daima (*S*)-enantiyomerleri elde edildi. Çünkü CRL enzimi stereoseçiciliğe sahiptir. Bu bileşiklerle yapılan enzimatik hidroliz tepkimelerinde CRL enzimi daima (*S*)-enantiyomere saldırılmaktadır (Yu ve ark. 2004, Bakkal 2006, Takaç ve Bakkal 2007, Yılmaz 2010, Habibi ve ark. 2013).

Oysaki bu çalışmada substrat olarak rasemik Bütil Mandelat kullanıldığında CRL enzimi beklenenin aksine rasemik esterinin (*S*)-enantiyomeri yerine (*R*)-enantiyomerine saldırı. Dolayısıyla hidroliz reaksiyonu sonucunda (*R*)-(-)-Mandelik asit elde edildi. Bunu ispatlamak için öncelikle kullanılan Chiralcel OD kolona rasemik Mandelik asit verildi. Elde edilen kromatogram incelendiğinde 9.77 ve 11.35 dakikalarında eşit alanlara sahip iki pik elde edildi (Şekil 4. 23.)

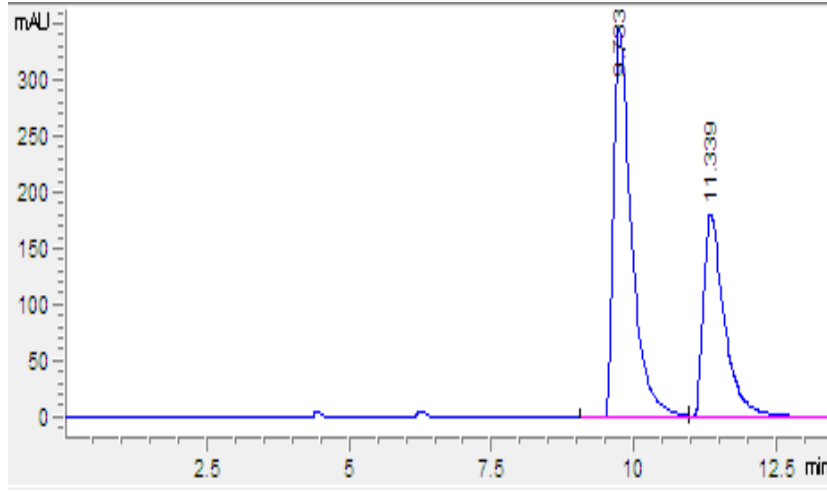


Şekil 4.23. Rasemik Mandelik Asit'e kromatogram

Bu aşamada kromatogramdaki piklerden hangisinin (*R*)-enantiyomer, hangisinin (*S*)-enantiyomer olduğunu anlamak gerekmektedir. Bunu anlamak için sırasıyla önce rasemik Mandelik asite Mandelik asidin (*S*)-enantiyomeri ve daha sonra rasemik

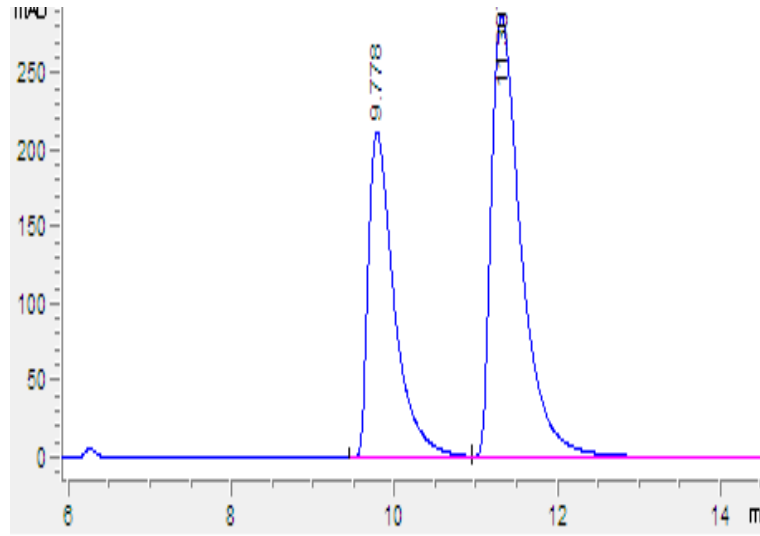
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Mandelik asite Mandelik asidin (*R*)-enantiyomeri eklenerek kromatogramlardaki piklerin alanlarındaki değişimler incelendi.



Şekil 4.24. Rasemik Mandelik asit + (*S*)-(+)-Mandelik asit çözeltisine ait kromatogram

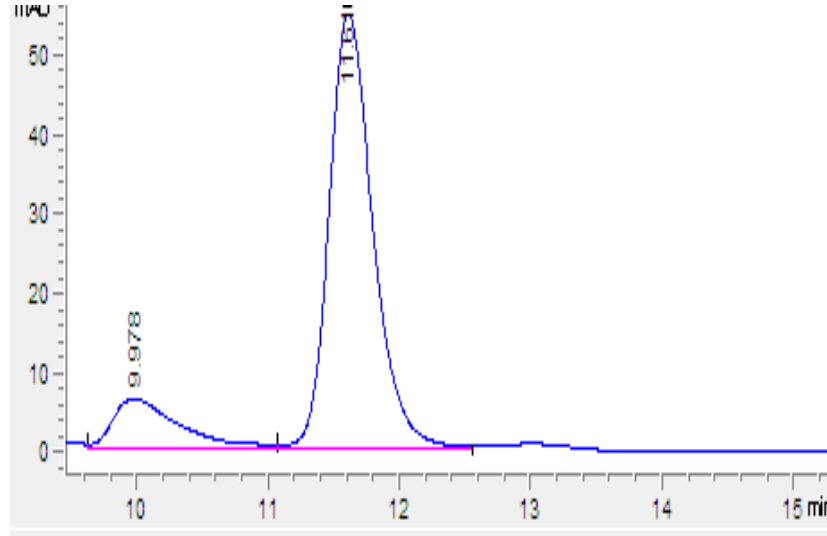
Elde edilen kromatogram incelendiğinde 9.73 ve 11.33. dakikalarında çıkan biri büyük diğeri daha küçük alana sahip iki pik elde edildi. Çözeltiye (*S*)-(+)-Mandelik asit eklendiği için daha büyük alana sahip pikin Mandelik asidin (*S*)-enantiyomerine ait olduğunu söyleyebiliriz. Başka bir deyimle kromatogramdaki ilk pik Mandelik asidin (*S*)-enantiyomerine aittir (Şekil 4.24.).



Şekil 4.25. Rasemik Mandelik asit + (*R*)-(-)-Mandelik asit çözeltisine ait kromatogram

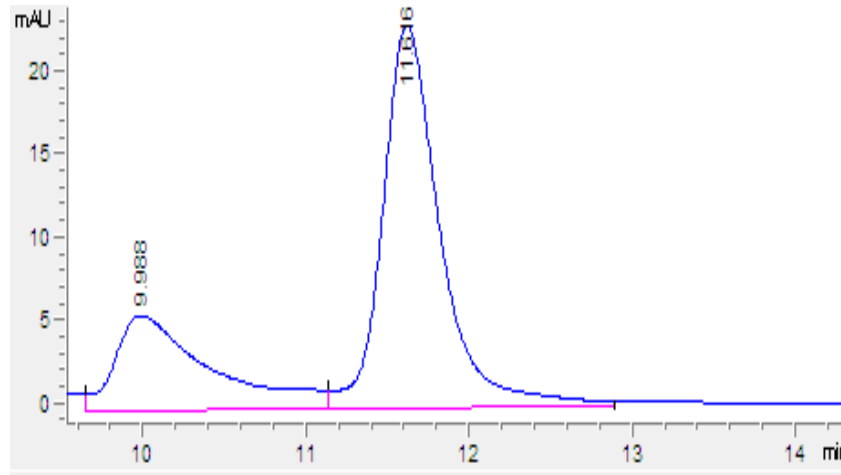
Elde edilen kromatogram incelendiğinde 9.78 ve 11.31. dakikalarında çıkan biri büyük diğeri daha küçük alana sahip iki pik elde edildi. Çözeltiye (*R*)-(-)-Mandelik asit eklendiği için daha büyük alana sahip pikin Mandelik asidin (*R*)-enantiyomerine ait

olduğunu söyleyebiliriz. Başka bir deyimle kromatogramdaki son pik Mandelik asidin (*R*)-enantiyomerine aittir (Şekil 4.25.). Böylece kolondan ilk olarak (*S*)-(+)-Mandelik asit (9.77 dakika) ve ardından (*R*)-(-)-Mandelik asitin (11.35 dakika.) ayrıldığı belirlenmiş oldu. Fe₃O₄@EP-CRL kullanılarak yapılan hidroliz tepkimesi sonucunda ürüne ait kromatogram aşağıda verilmiştir (Şekil 4.26.)



Şekil 4.26. Fe₃O₄@EP-CRL kullanılarak yapılan hidroliz tepkimesine ait kromatogram

Fe₃O₄@3-APTES=GA-CRL kullanılarak yapılan hidroliz tepkimesi sonucunda ürüne ait kromatogram aşağıda verilmiştir (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. Fe₃O₄@3-APTES=GA-CRL kullanılarak yapılan hidroliz tepkimesine ait kromatogram

İmmobilize lipazlar kullanılarak rasemik Mandelik asit esterlerinin enantiyomerlerine ayrılmasına yönelik son yıllarda yayınlanmış birkaç çalışmaya rastlanıldı. Bu çalışmalarda rasemik esterın hidroliz reaksiyonu sonucunda (*S*)-(+)-Mandelik asit elde edildiği ileri sürülmüştür (Fernandez-Lorente ve ark. 2001, Palomo

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

ve ark. 2002). Hâlbuki bizim yaptığımız ayrıntılı çalışmalar sonucunda (*R*)-(-)-Mandelik asit elde edildi. Bulduğumuz sonuçlar literatürde bu konuda çok az çalışma olduğu için farklı çalışmalarla karşılaştırılamadı.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Bu çalışmada, GA ve rasemik EP gibi iki farklı organik uzatma koluna sahip manyetik Fe₃O₄ nanopartiküllerine CRL enzimi kovalent bağlanma yöntemine göre başarılı bir şekilde immobilize edildi. Çalışma sonucunda, immobilize lipazların serbest lipazlara göre üstünlükleri ortaya konuldu. Ayrıca, hazırlanan immobilize lipazların (Fe₃O₄@EP-CRL ve Fe₃O₄@3-APTES=GA-CRL) enantiyomerik saflıkta (S)-(+)-İbuprofen, (S)-(+)-Naproksen ve (R)-(-)-Mandelik asit üretiminde rahatlıkla kullanılabileceği kanıtlandı. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

1. CRL enziminin aktifleştirilmiş nanopartiküllere immobilizasyonu için en uygun sıcaklığın +4 °C olduğu belirlendi.
2. Immobilizasyon işlemlerinde kullanılan enzimin % 100'e yakını aktifleştirilmiş manyetik nanopartiküllere immobilize edildi.
3. Immobilize edilen CRL'nin protein içeriği % 11.66 olarak belirlendi.
4. Hazırlanan manyetik nanopartiküllerin kübik spinal yapıda olduğu belirlendi. Ayrıca, partiküllerin ortalama kristal boyutunun yaklaşık 13,72 nm olduğu belirlendi.
5. Rasemik İbuprofen metil esterinin enzimatik hidrolizinde 600 mg immobilize lipaz (Fe₃O₄@EP-CRL) kullanıldığında sırasıyla; % ee_s, % ee_p, % c ve E değeri 75.19, 77.30, 49 ve 17 olarak hesaplandı.
6. Rasemik İbuprofen metil esterinin enzimatik hidrolizinde 600 mg immobilize lipaz (Fe₃O₄@3-APTES=GA-CRL) kullanıldığında sırasıyla; % ee_s, % ee_p, % c ve E değeri 35.88, 78.83, 31 ve 12 olarak hesaplandı.
7. Rasemik Naproksen metil esterinin enzimatik hidrolizinde 600 mg immobilize lipaz (Fe₃O₄@EP-CRL) kullanıldığında sırasıyla; % ee_s, % ee_p, % c ve E değeri 12.94, 94.93, 12 ve 44 olarak hesaplandı.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

8. Rasemik Naproksen metil esterinin enzimatik hidrolizinde 600 mg immobilize lipaz ($\text{Fe}_3\text{O}_4@3\text{-APTES=GA-CRL}$) kullanıldığında sırasıyla; % ee_s, % ee_p, % c ve E değeri 12.88, 79.06, 14 ve 10 olarak hesaplandı.
9. Rasemik Bütıl Mandelat'ın enzimatik hidrolizinde 600 mg immobilize lipaz ($\text{Fe}_3\text{O}_4@EP\text{-CRL}$) kullanıldığında % ee_p: 68.15 olarak hesaplandı.
10. Rasemik Bütıl Mandelat'ın enzimatik hidrolizinde 600 mg immobilize lipaz ($\text{Fe}_3\text{O}_4@3\text{-APTES=GA-CRL}$) kullanıldığında % ee_p: 40.63 olarak hesaplandı.
11. Serbest ve immobilize lipazların ($\text{Fe}_3\text{O}_4@EP\text{-CRL}$ ve $\text{Fe}_3\text{O}_4@3\text{-APTES=GA-CRL}$) maksimum aktivite gösterdikleri pH'lar sırasıyla 7.0, 8.0 ve 8.0 olarak belirlendi.
12. Serbest ve immobilize lipazların ($\text{Fe}_3\text{O}_4@EP\text{-CRL}$ ve $\text{Fe}_3\text{O}_4@3\text{-APTES=GA-CRL}$) optimum sıcaklıkları sırasıyla 30, 35 ve 40°C olarak belirlendi.
13. Hidrolitik aktivite yönünden tekrar kullanım kararlılığı en yüksek olan Immobilize enzim $\text{Fe}_3\text{O}_4@EP\text{-CRL}$ 'dir. Immobilize enzimlerin, 7. kullanım sonunda hala önemli oranda aktivitelerini korudukları belirlendi. 7. Kullanım sonunda $\text{Fe}_3\text{O}_4@EP\text{-CRL}$ hidrolitik aktivitesinin % 61'ini $\text{Fe}_3\text{O}_4@3\text{-APTES=GA-CRL}$ ise hidrolitik aktivitesinin % 47'sini koruduğu belirlendi.
14. Yapılan çalışmada immobilize lipazların ($\text{Fe}_3\text{O}_4@EP\text{-CRL}$ ve $\text{Fe}_3\text{O}_4@3\text{-APTES=GA-CRL}$) termal stabilitesinin serbest lipazlardan daha iyi oldu ve $\text{Fe}_3\text{O}_4@3\text{-APTES=GA-CRL}$ 'li yapının termal stabilitesinin daha yüksek olduğu belirlendi.
15. Immobilize lipazların ($\text{Fe}_3\text{O}_4@EP\text{-CRL}$ ve $\text{Fe}_3\text{O}_4@3\text{-APTES=GA-CRL}$), 30. gün sonunda aktivitelerinin hala yüksek olduğunu belirlendi. Ayrıca, GA ile aktifleştirilmiş immobilize lipazın daha uzun raf ömrüne sahip olduğu belirlendi. Serbest lipazın ise yaklaşık 15. gün sonunda aktivitesini tamamen kaybettiği belirlendi.

16. Manyetik Fe_3O_4 nanopartiküllerin 3-APTES ile aktifleştirilmesi sonucunda 1g partikül yüzeyinde bulunan $-\text{NH}_2$ gruplarının miktarı 420 $\mu\text{mol/g}$ olarak hesaplandı. $\text{Fe}_3\text{O}_4@3\text{-APTES}$ 'in GA ile reaksiyonu sonrasında ise yapıda bulunan primer amin gruplarının yaklaşık % 88'inin GA ile modifiye olduğu belirlendi.
17. Manyetik Fe_3O_4 nanopartiküllerin EP ile reaksiyonu sonucunda 1 g partikül yüzeyindeki epoksit gruplarının miktarı 460 $\mu\text{mol/g}$ olarak hesaplandı.
18. Serbest ve immobilize lipazların ($\text{Fe}_3\text{O}_4@EP\text{-CRL}$ ve $\text{Fe}_3\text{O}_4@APTES=GA\text{-CRL}$) aktiviteleri sırasıyla, 60.58, 1405 ve 2107.5 U/g destek maddesi olarak hesaplandı. Aktivite hesaplamalarında serbest lipazın aktivitesi mL'de (1 mg/mL) alındı.

5.2. Öneriler

- Enzimatik hidroliz reaksiyonlarında yüksek enantiyoseçicilik ve dönüşüm elde etmek için hidroliz koşullarının iyi belirlenmesi gerekir. Karıştırma hızı, tampon/organik faz oranı, substrat derişimi, ortamın pH'ı, tepkime sıcaklığı ile kullanılan immobilize enzim miktarının belirlenmesinde ayrıntılı çalışmalar yapılmalıdır.
- Enzimlerin taşıyıcıyı katı destek maddelerine immobilizasyonunda birçok metot kullanılmaktadır. Bu çalışma kapsamında enzim immobilizasyon metotlarında biri olan kovalent bağlanma metodu kullanılarak, CRL enzimi manyetik Fe_3O_4 nanopartiküllere immobilize edildi. CRL enzimi kovalent bağlanma metodu dışındaki diğer immobilizasyon (Sol-jel metodu vb.) metotları kullanılarak manyetik Fe_3O_4 nanopartiküllerine immobilize edilip aynı veya farklı substratların enzimatik hidroliz işlemlerinde kullanılabilir.
- Hazırlanan immobilize lipazlar ($\text{Fe}_3\text{O}_4@3\text{-APTES=GA-CRL}$ ve $\text{Fe}_3\text{O}_4@EP\text{-CRL}$) gıda, kâğıt, deri, ilaç endüstrisinde ve yeni bileşiklerin sentezinde kullanılabilir.
- Organik uzatma kollarında enzimlerle kolaylıkla reaksiyon verebilen aldehit grubu ve epoksit halkasına sahip manyetik Fe_3O_4 nanopartiküllerine, endüstriyel önemi olan lipaz enzimleri (*Candida antarctica*, *Rhizomucor miehei* vb.) ve

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

diğer önemli enzimler (Katalaz, Pektinaz, Proteaz ve Amilaz vb.) immobilize edilebilirler. İmmobilize edilen bu enzimlerin farklı endüstriyel alanlarda uygulamaları yapılabilir.

6. KAYNAKLAR

- Abrol, K., Qazi, G.N., Ghos, A.K. 2007. Characterization of an anion-exchange porous polypropylene hollow fiber membrane for immobilization of ABL lipase. *Journal of Biotechnology*, 128(4): 838–848.
- Akkuş, P. 2006. Lipaz kullanılarak şeker esteri sentezi. Yüksek Lisans Tezi, Gebze İleri Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı, Gebze.76.
- Aksoy, C. 2003. Lipaz ve Üreaz enzimlerinin çeşitli taşıyıcılara immobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, İstanbul.59.
- Aktaş, D. 2004. Sığır Karbonik anhidraz enziminin alginat üzerine immobilizasyon koşullarının incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Aydın.
- Alibeigi, S., Vaezi, M. R. 2008. Phase transformation of iron oxide nanoparticles by varying the molar ratio of $\text{Fe}^{2+}:\text{Fe}^{3+}$. *Chemical Engineering & Technology*, 31(11): 1591–1596.
- Alonso, N., Lopez-Gallego, F., Betancor, L., Hidalgo, A., Mateo, C., Guisan, J.M., Lafuente, R.F. 2005. Immobilization and stabilization of glutaryl acylase on aminated sephabeads supports by the glutaraldehyde crosslinking. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 35(1–3): 57–61.
- Alptekin, Ö. 2009. Katalazın eupergit, florisil ve cam desteklere kovalent olarak immobilizasyonu ve karakterizasyonu. Doktora tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Adana. 219.
- Alptekin, Ö., Tükel S.S., Yıldırım, D., Alagöz, D. 2009. Characterization and properties of Catalase immobilized onto controlled pore glass and its application in batch and plug-flow type reactors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 58(1–4): 124–131.

- Arıca, M.Y. 2000. Epoxy-derived pHEMA membrane for use bioactive macromolecules Immobilization: covalently bound Urease in a continuous. *Journal of Applied Polymer Science*, 77(9): 2000–2008.
- Arıca, M.Y., Bayramoğlu, G. 2004. Reversible immobilization of Tyrosinase onto polyethyleneimine-grafted and Cu(II) chelated poly (HEMA-co-GMA) reactive membranes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 27(4–6): 255–265.
- Atkins, R.C., Carey, F.A. 1999. Organic Chemistry. The McGraw-Hill companies, 184–212, New York.
- Axen, R., Drevin, H., Carlsson, J., 1975. Preparation of modified Agarose gels containing thiol groups. *Acta Chemica Scandinavica B*, 29: 471–474.
- Babes, L., Denizot, B., Tanguy, G., Le, Jeune JJ., Jallet, P.1999. Synthesis of iron oxide nanoparticles used as MRI contrast agents: A parametric study. *Journal of Colloid and Interface Science*, 212(2): 474–482.
- Bakkal, M. 2006. Tutuklanmış *Candida rugosa* lipazı ile rasemik Naproksen metil esterden (S)-Naproksen üretiminde proses parametrelerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim dalı, Ankara.124.
- Battistel, E., Bianchi, D., Cesti, P., Pina, C. 1991. Enzymatic resolution of (S)-(+)-Naproxen in a continuous reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 38(6): 659–664.
- Benjamin, S., Pandey, A. 1998. *Candida rugosa* lipases: Molecular biology and versatility in biotechnology. *Yeast*, 14 (12): 1069–1087.
- Betancor, L., Lopez-Gallego, F., Hidalgo, A., Alonso-Morales, N., Dellamora-Ortiz, G., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R. 2006. Preparation of a very stable immobilized biocatalyst of *Glucose oxidase* from *Aspergillus niger*, *Journal of Biotechnology*, 121 (2): 284–289.
- Boratynski, J., Zal, T., 1990. Colorimetric micromethods for glutaraldehyde determination by means phenol and sulfuric acid or phenol and perchloric acid. *Biochemistry*, 184(2): 259–262.

- Bronstein, L.M., Huang, X., Retrum, J., Schmucker, A., Pink, M., Stein, B. D., Dragnea, B. 2007. Influence of iron oleate complex structure on iron oxide nanoparticle formation. *Chemistry. Materials*, 19(15): 3624–3632.
- Burke, D., Henderson, D.J. 2002. Chirality: a blueprint for the future. *British Journal of Anaesthesia*, 88(44): 563–576.
- Büyükuysal, L. 1999. Nonstreoid antienflamatuar ilaçların etki mekanizmaları. *Türkiye Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Dergisi*, 2(2).
- Can, K., Özmen, M., Ersoz, M. 2009. Immobilization of Albumin on aminosilane modified superparamagnetic magnetite nanoparticles and its characterization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 71(1): 154–159.
- Cao, H., He, J., Deng, L., Gao, X. 2009. Fabrication of cyclodextrin-functionalized superparamagnetic Fe₃O₄/amino-silane core-shell nanoparticles via layer-by-layer method. *Applied Surface Science*, 255: 7974–7980.
- Cao, L. 2005. Carrier-bound immobilized enzymes: principles, application and design, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Cao, L.Q., Van Langen, L., Sheldon, R.A. 2003. Immobilised enzymes carrier-bound or carrier free?. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(4): 387–394.
- Carabaza A., Cabré F., Rotlan E., Gomez M., Gutierrez M., Garcia M. L., Mauleon D., 1996. Stereoselective inhibition of inducible Cyclooxygenase by chiral nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Journal of Clinical. Pharmacology*, 36(6): 505–512.
- Cernia, E., Deflini. M., Cocco, E. D., Pallocci, C., Soro, S. 2002. Investigation of lipase-catalysed hydrolysis of Naproxen methyl ester: use NMR spectroscopy methods to study substrate-enzyme interaction. *Bioorganic Chemistry*, 30(4): 276–284.
- Chen, C.S., Fujimoto, Y., Girdaukas, G., Sih, C.J. 1982. Quantitative analysis of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. *Journal of the American Chemical Society*, 104(25): 7294–7299.
- Chen, J.C., Tsai S.W. 2000. Enantioselective synthesis of (S)-ibuprofen ester prodrug in cyclohexane by *Candida rugosa* lipase immobilized on Accurel MP100. *Biotechnology Progress*, 16(6): 986-992.

- Chiou, S.H., Wu, W.T. 2004. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups, *Biomaterials*, 25(2): 197-204.
- Crini, G., Morcellet, M. 2002. Synthesis and applications of adsorbents containing cyclodextrins. *Journal of Separation Science*, 25(13): 789–813.
- Curtis, A., Wilkinson, C. 2001. Nanotechniques and approaches in biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 19 (3): 97–101.
- Derewenda, Z.S., Sharp, A.M. 1993. News from the interface: The molecular structures of triacylglyceride lipases. *Trends in Biochemical Sciences*, 18 (1): 20–25.
- Duran, J.D.G. Arias, J.L., Gallardo, V., Delgado, A.V. 2008. Magnetic colloids as drug vehicles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(8): 2948–2983.
- Easson, L.H., Stedman, E. 1933. Studies on the relationship between chemical constitution and physiological action: Molecular dissymmetry and physiological activity. *Biochemical Journal*, 27(4): 1257-1266.
- Erdem, B. 2008. *Candida rugosa*'dan lipaz üretiminde biyoproses parametrelerinin enzim aktivite ve seçiciliğine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara.110.
- Erdoğan, Ö. 2014. Protein temelli yeni bir HPLC kolon dolgu maddesinin hazırlanması ve bazı rasemik bileşiklerin bu kolon üzerinden enantiyomerik rezolüsyonu. Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Diyarbakır.73.
- Etçi, K. 2011. Sol-Jel tekniğine göre manyetik nanopartiküllere lipaz immobilizasyonu ve bazı enantiyoseçimli tepkimelerde kullanılması, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Konya.95.
- Faber, K. 2000. Biotransformations in Organic Chemistry, 4th Edition, Springer-Verlag, Berlin.
- Gao, X.G., Cao, S.G., Zhang, K.C. 2000. Production, properties and application to nonaqueous enzymatic catalysis of lipase from a newly isolated *Pseudomonas* strain. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(1–2): 74-82.

- Gemeiner, P. 1992. Materials for enzyme engineering. In: Gemeiner P (Ed) Enzyme Engineering. Ellis Horwood, 13–119, New York.
- Gezer, E. 2009. Lipaz enziminin immobilizasyonu ve aromatik esterlerin sentezinde kullanımı, Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Hatay.56.
- Ghaemi, N., Madaeni, S., Daraei, P., Rajabi, H., Zinadini, S., Alizadeh, A., Heydari, R., Beygzadeh, M., Ghousivand, S. 2015. Polyethersulfone membrane enhanced with iron oxide nanoparticles for copper removal from water: Application of new functionalized Fe₃O₄ nanoparticles. *Chemical Engineering Journal*, 263(1): 101–112.
- Ghanem, A., Aboul-Enein M.N., El-Azzouny, A., El-Behairy, M.F. 2010. Lipase-mediated enantioselective kinetic resolution of racemic Acidic drugs in non-standard organic solvents: Direct chiral liquid chromatography monitoring and accurate determination of the enantiomeric excesses. *Journal of Chromatography A*, 1217(7): 1063–1074.
- Ghanem, A., Aboul-Enein, H.Y. 2004. Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents. *Tetrahedron: Asymmetry*, 15(21): 3331–3351.
- Ghanem, A., Aboul-Enein, H.Y. 2005. Application of lipases in kinetic resolution of racemates. *Chirality*, 17(1): 1–15.
- Ghosh, P.K., Saxena, R.K., Gupta, R., Yadav, R.P., Davidson, S. 1996. Microbial lipases: Production and applications. *Science Progress*, 79(Pt2): 119–157.
- Glazer, A.N., Bar-Eli, A., Katchaski, E. 1962. Preparation and characterization of polystyrosyl Trypsin, *Journal of Biological Chemistry*, 237: 1832–1838.
- Gonzalez-Navarro, H., Bano, M.C., Abad, C. 2001. The closed/open model for lipase activation. Addressing intermediate active forms of fungal enzymes by trapping of conformers in water-restricted environments. *Biochemistry*, 40 (10): 3174–3183.
- Goto, M., Noda, S., Kamiya, N., Nakashio, F. 1996. Enzymatic resolution of racemic ibuprofen by surfactant coated lipase in organic media. *Biotechnology Letters*, 18(7): 839-844.

- Goya, G.F., Lima, E., Jr., Arelaro, A.D., Torres, T., Rechenberg, H.R., Rossi, L., Marquina, C., Ibarra, M.R. 2008. Magnetic hyperthermia with FeO nanoparticles: The influence of particle size on energy absorption. *IEEE Transactions On Magnetics*, 44(11): 4444–4447.
- Guisan, J.M. 2006. Immobilization of Enzymes and Cells. *Methods in Biotechnology*, 2. Edition, Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Guo, L., Liu, G., Hong, R.Y., Li, H.Z. 2010. Preparation and characterization of Chitosan poly(acrylic acid) magnetic microspheres. *Marine Drugs*, (8): 2212–2222.
- Gupta, A.K., Gupta, M. 2005. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26 (18): 3995–4021.
- Gündüz, Z. 2012. Bazı yaygın kullanılan steroid olmayan antienflamatuar ilaçların antibakteriyel aktivitelerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Çanakkale.95.
- Habibi, Z., Mohammadi, M., Yousefi, M. 2013. Enzymatic hydrolysis of racemic Ibuprofen esters using *Rhizomucor miehei* lipase immobilized on different supports. *Process Biochemistry*, 48(4): 669–676.
- Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Smith, P.K. 1992. Immobilized affinity ligand techniques. San Diego: Academic Press, pages:454
- Hua, Q., Dabin, L., Chunxu, L. 2011. Ultrasonically-promoted synthesis of mandelic acid by phase transfer catalysis in an ionic liquid. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(5): 1035–1037.
- Hung, T.C., Giridhar, R., Chiou, S.H., Wu, W.T. 2003. Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 26(1-2): 69-78.
- Jaeger, K.E., Reetz, M.T. 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in biotechnology*, 16(9): 396–403.

- Janssen, P.H., Monk, C.R., Morgan, H.W. 1994. A thermophilic, lipolytic *Bacillus* sp., and continuous assay of its p-nitrophenyl-palmitate esterase activity. *FEMS Microbiology Letters*, 120(1–2): 195–200.
- Jiang, Y., Liu, X., Chen, Y., Zhou, L., He, Y., Ma, L., Gao, J. 2014. Pickering emulsion stabilized by lipase-containing periodic mesoporous organosilica particles: A robust biocatalyst system for biodiesel production, *Bioresource Technology*, 153: 278–283.
- Jun, Y., Seo, J., Cheon, J. 2008. Nanoscaling laws of magnetic nanoparticles and their applicabilities in biomedical sciences. *Accounts of Chemical Research*, 41(2): 179–189.
- Kahraman, A.S. 2008. Non-manyetik ve manyetik lateks partiküllerin sentezi, karakterizasyonu ve doku mühendisliği uygulamaları. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Ankara.97.
- Kahraman, A.S., Gümüşderelioğlu, M., Tuncel, A. 2011. Cellular interactions of monodisperse poly(GDMA) latex particles-containing DMAEM brushes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 384(1–3): 90–97.
- Karaağaç, Ö. 2011. Optimum doyum manyetizasyonlu süperparamanyetik nanoparçacıkların sentezi, karakterizasyonu ve enzim immobilizasyon uygulaması. Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fizik Anabilim Dalı, Balıkesir.139.
- Karaağaç, Ö., Kockar, H. 2012. Effect of synthesis parameters on the properties of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Journal of Superconductivity and Novel Magnetism*, 25(8):2 777–2781.
- Karaca, N. 2006. Poli(N,N-dimetilakrilamit-ko-akrilamit) ve Poli(N-izopropilakrilamit-ko-akrilamit)/k-karragenan polimerleri kullanılarak lipaz enziminin immobilizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Ankara.73.
- Karaçoban, Z. 2006. Asit katkılı polianilin katalizörleri ile DL-mandelik asitin esterleşme reaksiyonları. Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Sakarya.45.

- Karaküçük, A. 2006. Kimyasal ve biyoteknolojik yöntemlerle kiral yapıların sentezleri. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Konya.231.
- Kayaalp S.O. 2009. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. Pelikan Tıp Teknik Yayıncılık. Ankara. 1536.
- Kefu, Y., Zhen, P., Xiaolin, F. 2009. Preparation of nanoparticles with an environment-friendly approach. *Journal of Environmental Sciences*, (21): 727–730.
- Kennedy, J.F., Cabral, J.M.S. 1995. Immobilization of biocatalysts by metal-link/chelation processes. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 23(2): 231-252.
- Khalafalla, S.E., Reimers, G.W. 1980. Preparation of dilution-stable aqueous magnetic fluids. *IEEE Transactions on Magnetics*, 16(2): 178–183.
- Kılınç, A., Önal, S., Telefoncu, A. 2002. Chemical attachment of *Porcine pancreatic* lipase to crosslinked poly (vinyl alcohol) by means of adipoyldichloride. *Process Biochemistry*, 38(5): 641–647.
- Kim, M. G., Lee, E. G., Chung, B. G. 2000. Improved enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase towards Ketoprofen ethyl ester by a simple two-step treatment. *Process Biochemistry*, 35(9): 977–982.
- Klibanov, A.M. 1989. Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. *Trends in Biochemical Sciences*, 14(4): 141–144.
- Kordikowski, A., York, P., Latham, D. 1999. Resolution of Ephedrine in supercritical CO₂: a novel technique for seperation of chiral drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88(8): 786–791.
- Kuo, C.H., Liu, Y. C., Chang, C.M.J., Chen, J.H., Chang, C., Shieha, C.J. 2012. Optimum conditions for lipase immobilization on chitosan-coated Fe₃O₄ nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, (87): 2538–2545.
- Kurtan, U., Baykal, A. 2014. Fabrication and characterization of Fe₃O₄@APTES@PAMAM-Ag highly active and recyclable magnetic nanocatalyst: Catalytic reduction of 4-nitrophenol. *Materials Research Bulletin*, (60): 79–87.

- Lee, E.G., Won, H. S., Chung, B. H. 2001. Enantioselective hydrolysis of racemic Naproxen methyl ester by two-step acetone-treated *Candida rugosa* lipase. *Biochemistry*, 37(3): 293–298.
- Lin, H.Y., Tsai, S.W. 2003. Dynamic kinetic resolution of (R, S)-Naproxen 2,2,2-trifluoroethyl ester via lipase-catalyzed hydrolysis in micro-aqueous isooctane. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, (24–25): 111–120.
- Liu, Z.L., Liu, Y.J., Yao, K.L., Ding, Z.H., Tao, J., Wang, X. 2002. Synthesis and magnetic properties of Fe₃O₄ nanoparticles. *Journal of Materials Synthesis and Processing*, 10(2): 83–87.
- Lotti, M., Grandori, R., Fusetti, F., Longhi, S., Brocca, Tramontane., Alberghina, L. 1993. Cloning and analysis of *Candida cylindracea* lipase sequences. *Gene*, 124(1): 45–55.
- Lowry, O.H., Rosenbraugh, N., Farr, L., Randall, R. 1951. Protein measurement with theophilin-phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1): 265–275.
- Lu, A., Salabas, E.L. Schüth, F. 2007. Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization and application. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(8): 1222–1244.
- Ma, M., Zhang, Y., Yu, W., Shen, H.Y., Zhang, H.G., Gu, N. 2003. Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by amino silane. *Colloids Surfaces A*, 212 (2–3): 219–226.
- Maier, M.N., Franco, P., Lindner, W. 2001. Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives. *Journal of Chromatography A*, 906 (1-2): 3-33.
- Maity, D., Agrawal, D. C. 2007. Synthesis of iron oxide nanoparticles under oxidizing environment and their stabilization in aqueous and non-aqueous media. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 308(1): 46–55.
- Manecke, G., Singer, G. 1960. Chemical transformation of polystyrene. *Makromolecular Chemistry*, (37): 119–122.

- Mao, S., Zhang, Y., Rohani, S., Ray, A.K. 2012. Chromatographic resolution and isotherm determination of (R,S)-Mandelic acid on Chiralcel-OD column. *Journal of Seperation Science*, 35(17): 2273–2281.
- Marszałł, M.P., Siodmiak, T. 2012. Immobilization of *Candida rugosa* lipase onto magnetic beads for kinetic resolution of (R,S)-İbuprofen. *Catalysis Communications*, (24): 80–84.
- Martínez-Mera, I., Espinosa-Pesqueira, M.E, Pérez-Hernández, R., Arenas- Alatorre, J. 2007. Synthesis of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles without surfactants at room temperature. *Materials Letters*, 61(23-24): 4447-4451.
- Mattiasson, B., Kaul, R. 1991. Determination of coupling yields and handling of labile proteins in immobilization technology. In: Protein immobilization. Fundamentals and Applications (Taylor, R. F., ed.), Marcel Dekker, New York, NY, 161–179.
- Moghim, S.M., Hunter, A.C., Murray, J.C. 2001. Long-circulating and targets pecific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacological Reviews*, 53(2): 283–318.
- Moreno, J.M., Sinisterra, J.V. 1995. A system analysis of the variables that control a highly stereoselectivite resolution of racemic non-steroidal antiinflammatory drugs using immobilized lipase from *Candida cylindrace*. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, (98): 171–184.
- Mutlu, D. 2006. Rasemik Naproksen esterden enantiyoseçimli hidroliz ile S-naproksen üretiminde reaksiyon parametrelerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara.88.
- Nalbantoğlu, S. 2012. Azol türevi moleküllerin Proteaz enzimleri üzerindeki inhibisyon etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Kocaeli.67.
- Nejem, R.M. 2006. Enantioselective sensors and biosensors for clinical analysis. Doctor Thesis, University of Pretoria, Faculty of Natural and Agricultural Sciences. Pretoria.
- Ong, A.L., Kamaruddin, A.H., Bhatia, S., Long, W.S., Lim, S.T., Kumari, R. 2006. Performance of free *Candida antarctica* lipase B in the enantioselective esterification of (R)-Ketoprofen. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(4): 924-929.

- Özcan, A. 2003. Enantiyomerik saflıkta kiral bileşikler için üretim prosesleri. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Semineri, Ankara.
- Özcan, F., Ersoz, M., Yilmaz, M. 2009. Preparation and application of calix [4] arene-grafted magnetite nanoparticles for removal of dichromate anions. *Materials Science and Engineering: C*, 29(8): 2378–2383.
- Özdoğan, E., Demir, A., Seventekin, N. 2006. Nanoteknoloji ve Tekstil Uygulamaları. *Tekstil ve Konfeksiyon*, 16(3): 159–163.
- Özel, F., Koçkar, H., Beyaz, S., Karaağaç, Ö., Tanrıseven, T. 2013. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: effect of iron oleate precursors obtained with a simple way. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 24(8): 3073–3080.
- Özmen, M., Can, K., Arslan, G., Tor, A., Çengeloğlu, Y., Ersöz M. 2010. Adsorption of Cu(II) from aqueous solution by using modified Fe₃O₄ magnetic nanoparticles. *Desalination*, 254(1–3): 162–169.
- Öztürk, N., Akgol, S., Arısoy, M., Denizli, A. 2007. Reversible adsorption of lipase on novel hydrophobic nanospheres. *Separation and Purification Technology*, 58(1): 83–90.
- Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Mateo, C., Fuentes, M., Fernandez-Lafuente R., Guisan, J.M. 2002. Modulation of The enantioselectivity of *Candida antartica B* lipase via conformational engineering: Kinetic resolutions of (±)-α-Hydroxy-phenylacetic acid derivatives. *Tetrahedron Asymmetry*, 13(12): 1337–1345.
- Panyam, J., Labhasetwar, V. 2003. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(3): 329–347.
- Phadtare, S., Britto, D.V., Pundle, A., Prabhune, A., Sastry, M. 2004. Invertase-lipid biocomposite films: preparation, characterization, and enzymatic activity. *Biotechnology. Progress*, 20(1): 156–161.
- Rao, M. B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3): 597–635.

- Sahoo, B., Sahu, S.K., Pramanik, P. 2011. A novel method for the immobilization of Urease on phosphonate grafted iron oxide nanoparticle. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 69(3–4): 95–102.
- Sakaki, K., Giormo, L., Drioli, E. 2001. Lipase-catalyzed optical resolution of racemic Naproxen in biphasic enzyme membrane reactors. *Journal of Membrane Science*, (184): 27–38.
- Santos, J.C., Mijone, P.D., Nunes, G.F.M., Perez, V.P., de Castro, H.F. 2008. Covalent attachment of *Candida rugosa* lipase on chemically modified hybrid matrix of polysiloxane–polyvinyl alcohol with different activating compounds. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 61(2): 229–236.
- Santos, J.C., Paula, A.V., Nunes, G.F.M., H.F., de Castro. 2008. *Pseudomonas fluorescens* lipase immobilization on polysiloxane–polyvinyl alcohol composite chemically modified with epichlorohydrin. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, (52–53): 49–57.
- Santra, S., Tapeç, R., Theodoropoulou, N., Dobson, J., Hebard, A., Tan, W.H. 2001. Synthesis and characterization of silica-coated iron oxide nanoparticles in microemulsion: the effect of nonionic surfactants. *Langmuir*, 17(10): 2900–2906.
- Scherer, C., Figueiredo Neto, A. M. 2005. Ferrofluids: Properties and Applications. *Brazilian Journal of Physics*, 35(3): 718–727.
- Secundo, F., Carrea, G., Tarabiono, C., Gatti-Lafranconi, P., Brocca, S., Lotti, M., Jaeger, M. Puls, K.-E., Eggert, T. 2006. The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 39(1-4): 166–170.
- Sheldon, R.A. 1993. Chirotechnology: Industrial synthesis of optically active compounds. Marcel Dekker, New York.
- Siódmiak, T., Ziegler-Borowska, M., Marszał, M.P. 2013. Lipase-immobilized magnetic chitosan nanoparticles for kinetic resolution of (*R,S*)-Ibuprofen. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, (94): 7–14.
- Solomons, G., Fryhle, C. 2000. Organic Chemistry. John Wiley & Sons, Inc, 184–210, New York.

- Solomons, T.W. 1997. Fundamentals of Organic Chemistry.178–223. Toronto.
- Sökmen, B.B. 2005. Kayısı (*Armeniaca vulgaris* Lam.) tohumlarından lipazın saflaştırılması ve çeşitli taşıyıcılara immobilize edilmesi. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya, İstanbul.165.
- Strauss, U.T., Felfer, U., Faber, K. 1999. Biocatalytic transformation of racemates in to chiral bulding blocks in % 100 chemical yield and, % 100 enantiomeric excess. *Tetrahedron: Asymmetry*, 10(1): 107–117.
- Suan, C., Sarmidi, M.R. 2004. Immobilized lipase-catalysed resolution of (R,S)-1-phenyl ethanol in recirculated packed bed reactor. *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, 28(2-3): 111-119.
- Sun, J., Jiang, Y., Zhou, L., Gao, J. 2010. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by adsorption in organic medium. *New Biotechnology*, 27(1): 53–58.
- Sundar, S., Mariappan, R., Piraman, S. 2014. Synthesis and characterization of amine modified magnetite nanoparticles as carriers of curcumin-anticancer drug. *Powder Technology*, (266): 321–328.
- Sundberg, L., Porath, J., 1974. Preparation of adsorbents for biospecific affinity chromatography: I. Attachment of group-containing ligands to insoluble polymers by means of bifunctional oxiranes. *Journal of Chromatography A*, 90(1): 87-98.
- Şahin, Ö., Erdemir, S., Uyanık, A., Yılmaz, M. 2009. Enantioselective hydrolysis of (R/S)-Naproxen methyl ester with sol–gel encapsulated lipase in presence of calix[n]arene derivatives, *Applied Catalysis A: General*, 369(1-2): 36-41.
- Takaç, S., Bakkal, M. 2007. Impressive effect of immobilization conditions on the catalytic activity and enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase toward (S)-Naproxen production. *Process Biochemistry*, 42(6): 1021–1027.
- Tartaj, P., Morales, M. P., Veintemillas-Verdaguer, S., Gonzales-Carreno, T., Serna, C. J. 2003. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 36(13): 182–197.

- Teja, A.S., Koh, P-Y. 2009. Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, 55 (1-2): 22-45.
- Telefoncu, A., Dinçkaya, E., Vorlop, K.D. 1990. Preparation and characterization of pancreatic lipase immobilized in Eudragit-matrix. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 26(3): 311–317.
- Terreni, M., Pagani, G., Ubiali, D., Ferndandez-Lafuente, R., Mateo, C., Guisan, J.M. 2001. Modulation of *Penicillin acylase* properties via immobilization techniques: one-pot chemoenzymatic synthesis of cephamandole from cephalosporin C. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 11(18): 2429–2432.
- Tutar, H. 2009. *Candida rugosa* lipaz enziminin Sporopollenin üzerine adsorbsiyonu ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Konya.74.
- Tümerdem, R. 2004. Yeni kiral Schiff bazlarının sentezi ve bunların karbonil bileşiklerinin asimetrik indirgenmesinde kullanılması. Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Diyarbakır.90.
- Tümtürk, H., Karaca, N., Demirel, G., Sahin, F. 2006. Preparation and application of poly (N,N-dimethylacrylamide-co-acrylamide) and poly (nisopropylacrylamide- co-acrylamide)/ κ -Carrageenan hydrogels for immobilization of lipase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 40(3): 281–285.
- Tüzün, C. 1996. Organik Kimya, 7. Baskı, Palme Yayın Dağıtım, Ankara.
- Tyndall, J.D.A., Sinchaikul, S., Fothergill-Gilmore, L.A., Taylor, P., Walkinshaw, M.D. 2002. Crystal structure of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1, *Journal of Molecular Biology*, 323(5): 859–869.
- Uyanık, A. 2011. Enzim mimik çalışmalarında ve lipaz immobilizasyonunda kullanılabilecek Kaliksaren bileşiklerin sentezi ve enantiyoseçimli tepkimelerde kullanılması. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim dalı, Konya.182.
- Valenzuela, R., Cecilia Fuentes, M., Para, C., Baeza, J., Duran, N., Sharma, S.K., Knobel, M., Freer, J. 2009. Influence of stirring velocity on the synthesis of magnetite

- nanoparticles (Fe_3O_4) by the co-precipitation method. *Journal of Alloys and Compounds*, 488(1): 227–231.
- Wan, M., Li, J. 1998. Synthesis and electrical–magnetic properties of polyaniline composites. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 36(15): 2799–2805.
- Weethall, H.H. 1976. Covalent coupling methods for inorganic support materials. *Methods of Enzymology*, 44:134–148.
- Williams, R.C., Riley, C.M., Sigvardson, K.W., Fortunak, J., Ma, P., Nicolas, E.C., Unger, S.E., Krahn, D.F., Bremmer, S.L. 1998. Pharmaceutical development and specification of stereoisomers. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 17(6-7): 917-924.
- Wu, J.Y., Liu, S.W. 2000. Influence of alcohol concentration on lipase-catalyzed enantioselective esterification of racemic Naproxen in isooctane: under controlled water activity, *Enzyme and Microbial Technology*, 26(2-4): 124–130.
- Xin, J. Y., Li, S. B., Xu, Y., Chui, J., Xia C. 2001. Dynamic enzymatic resolution of Naproxen methyl ester in a membran bioreactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 76(6): 579–585.
- Xin, J.Y., Li, S.B., Xu, Y., Wang, L.L. 2000. Enzymatic resolution of (S) (+)-Naproxen in a trapped aqueous–organic solvent biphasic continuous reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 68(1): 78–83.
- Ye P., Xu Z., Che A., Wu J., Seta P. 2005. Chitosan-tethered poly(acrylonitrile-co-maleic acid) hollow fiber membrane for lipase immobilization. *Biomaterials*, 26(32): 6394–6403.
- Ye, P., Jianga, J., Xu, Z.K. 2007. Adsorption and activity of lipase from *Candida rugosa* on the chitosan-modified poly(acrylonitrile-co-maleic acid)membrane surface. *Colloid Surf. B Biointerfaces*, 60(1): 62–67.
- Yıldırım, D., Tükel, S.S. 2013. Immobilized *Pseudomonas* sp. lipase: A powerful biocatalyst for asymmetric acylation of ($\pm$)-2-amino–1-phenylethanols with vinyl acetate. *Process Biochemistry*, (48): 819–830.

- Yıldırım, D., Tükel, S.S., Alptekin, Ö., Alagöz, D. 2014. Optimization of immobilization conditions of *Mucor miehei* lipase onto florisol via polysuccinimide spacer arm using response surface methodology and application of immobilized lipase in asymmetric acylation of 2-amino-1-phenylethanols. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, (100): 91–103.
- Yılmaz, E. 2010. Farklı teknikler kullanarak değişik destek materyallerine lipaz immobilizasyonu ve bir anti-inflammatör olan (S)-Naproksen'in oluşumunda kullanılması. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Konya. 275.
- Yılmaz, E., Sezgin, M., Yılmaz, M. 2010. Enantioselective hydrolysis of racemic Naproxen methyl ester with sol–gel encapsulated lipase in the presence of sporopollenin. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62(2): 162–168.
- Yılmaz, H., Topal, G., Çakmak, R., Hoşgören, H. 2010. Resolution of (±)-β-Methylphenylethylamine by a novel chiral stationary phase for Pirkle-type column chromatography. *Chirality*, 22(2): 252–257.
- Yousefi, M., Mohammadi, M., Habibi, Z. 2014. Enantioselective resolution of racemic ibuprofen esters using different lipases immobilized on octyl sepharose. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, (104): 87–94.
- Yu, H., Wu, J., Ching, C. B. 2004. Enhanced activity and enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase immobilized on macroporous adsorptive resins for ibuprofen resolution. *Biotechnology Letters*, 26(8): 629–633.
- Zaitsev, S.Y., Gorokhova, I.V., Kashtigo, T.V., Zintchenko, A., Dautzenberg, H. 2003. General approach for lipases immobilization in polyelectrolyte complexes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemistry Engineering Aspects*, 221(1-3): 209-220.
- Zarbosky, O. 1973. Immobilised enzymes. *CRC Press (Chemical Rubber Co.)*, 184 (4132):56, Cleveland, Ohio.
- Zhang, G.S., Gong, H. 1999. $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ in synthesis : A new and convenient catalyst for the esterification of Mandelic acid with alcohols. *Synthetic Communications: An International Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry*, 29(9): 1547–1551.

Zhao, Y., Qiu, Z., Huang, J. 2008. Preparation and analysis of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles used as targeted-drug carriers. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 16(3): 451–455.

Zhu, K., Jutila, A., Tuominen, E.K.J., Patkar, S.A., Svendsen, A., Kinnunen, P.K.J. 2001. Impact of the Tryptophan residues of *Humicola lanuginosa* lipase on its thermal stability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1547(2): 329–33.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı: Reşit ÇAKMAK

Doğum Yeri: Diyarbakır

Doğum Tarihi: 20.02.1979

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise: Diyarbakır Birlik Lisesi /1996–1999

Lisans: Dicle Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi /1999–2001 ve

Dicle Üniversitesi Ziya Gökalp Eğitim Fakültesi / 2001–2005

Yüksek Lisans: Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü /2006–2008

Doktora: Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü: 28.09.2009–27.02.2015

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: Batman Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü/2009-

Cep No: 506 993 03 21

e-Mail:resit.cakmak@batman.edu.tr