İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENANTİOSEÇİCİ MENTOL ESTERLEŞMESİNE ENZİM VE ÇÖZÜCÜ ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Şebnem ALPASLAN
(506001116)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 5 Mayıs 2003
Tezin Savunulduğu Tarih : 30 Mayıs 2003

Tez Danışmanı : **Prof.Dr. H. Ayşe AKSOY**
Diğer Jüri Üyeleri **Prof.Dr. A. Tuncer ERCİYES (İ.T.Ü.)**
Yrd.Doç.Dr. Nevin-Gül KARAGÜLER (İ.T.Ü.)

MAYIS 2003

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın ortaya çıkmasında, çok değerli bilgi ve tecrübeleriyle daima bana yol gösteren ve her aşamada desteğini aldığım çok Değerli Hocam, Prof. Dr. H. Ayşe AKSOY'a, gerek laboratuarda gerekse teorik çalışmalarda ilgi ve yardımlarını hiçbirzaman esirgemeyen Değerli Hocam, Doç. Dr. Melek TÜTER'e ve manevi desteği ile yardımlarından ötürü sevgili arkadaşım Kim. Müh. M. Abdullah BULUT'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.
Bir yıl boyunca aynı çalışma ortamını paylaştığım ve her yönden bana destek olan sevgili arkadaşlarım Kim. Müh. Meral ŞEN, Kim. Müh. Mine AYGÜN, Kim. Müh. Şule PEKDÜZGÜN ve Kim. Müh. Yılmaz ERASLAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tüm öğrenim hayatım boyunca manevi desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen aileme, özellikle haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim anne ve babama minnettarlığımı sunarım.

Mayıs 2003 Şebnem ALPASLAN

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR **V**

TABLO LİSTESİ **Vİ**

ŞEKİL LİSTESİ **Vİİ**

ÖZET **Vİİİ**

SUMMARY **X**

1. GİRİŞ **- 1 -**

1.1 Giriş ve Çalışmanın Amacı **- 1 -**

2. TEORİK ÇALIŞMA **- 4 -**

2.1. İzomerizm **- 4 -**

2.2 Enantiomerler, Optikçe Aktiflik ve Kiralite **- 5 -**

2.3. Rasemik Karışım **- 6 -**

2.4. Resolüsyon-Enantiomerlerin Ayrılması **- 7 -**

2.5. Saf Enantiomerlerin Primer (Birincil) Kaynakları **- 7 -**

2.6. Sentez yoluyla saf enantiomer eldesi **- 8 -**

2.6.1. Rasemat Resolüsyonu - 8 -

2.7. Enantiomerik Aşırılık (ee) ve belirlenmesi **- 9 -**

2.7.1. Gaz Kromatografik Metodu - 10 -

2.8. Enzimler **- 11 -**

2.8.1. Enzim Sınıflandırılması ve İsimlendirilmesi için Geçerli Kurallar - 12 -
2.8.2. Enzimlerin Sınıflandırılması ve Numaralandırılması - 13 -
2.8.3. Modern Enzim Teknolojisinin Uygulamaları - 14 -

2.9. Lipazlar **- 15 -**

2.9.1. Lipaz Tarafından Katalizlenen Reaksiyonlar - 16 -
2.9.2. Lipaz Tarafından Katalizlenen Reaksiyonların Mekanizması - 17 -
2.9.3. Lipazların Endüstriyel Uygulamaları - 18 -
2.9.3.1. Süt ve Besin Endüstrisinde Lipazlar - 18 -
2.9.3.2. Deterjan Endüstrisinde Lipazlar - 18 -
2.9.3.3. Kağıt Endüstrisinde Lipazlar - 19 -
2.9.3.4. Oleokimya Endüstrisinde Lipazlar - 19 -
2.9.3.5. Kişisel Bakım Ürünleri Bileşenlerinin Sentezinde Lipazlar - 20 -
2.9.3.6. İlaç ve Zirai Kimyasalların Sentezinde Lipazlar - 20 -
2.9.3.7. Polimer Sentezinde Lipazlar - 21 -

2.9.3.8 Yüzey Aktif Maddelerin Sentezinde Lipazlar - 21 -
2.9.3.9. Organik Sentezlerde Lipazlar - 22 -
2.9.3.10. Rasemik Asit ve Alkollerin Resolüsyonunda Lipazlar - 23 -
2.9.3.11. Ester Sentezinde Lipazlar - 23 -

2.10. Mentolün Enzimatik Esterleşme Reaksiyonu ile İlgili Literatürde Yapılan Araştırmalar - 24 -

3. DENEYSEL ÇALIŞMA - 39 -

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler - 39 -

3.2. Enzimlerin Aktivitelerinin Tayini - 39 -

3.3. Kimyasal Yöntemle Mentol-Yağ Asidi Esterlerinin Hazırlanması - 40 -

3.4. Enzimatik Esterleşme Reaksiyonlarının Gerçekleştirildiği Deney Düzeneği ve Çalışma Şartları - 41 -

3.5. Gaz Kromatografik Analiz Koşulları - 42 -

3.6. Gaz Kromatografisi ile Yapılan Analizlerin Değerlendirilmesi ve Hesaplamalar - 42 -

3.7. Lipaz PS ile Yapılan Çalışmalar - 45 -

3.8. Lipaz AYS ile yapılan çalışmalar: - 46 -

3.8.1. Enzim Miktarının Etkisi - 46 -
3.8.2 Mol Oranının Etkisi - 48 -
3.8.3. Sıcaklık Etkisi - 49 -

3.9. (±)-Mentolün esterleşme reaksiyonu - 50 -

3.9.1. Çözücü Etkisi - 52 -
3.9.2. Kiral Kolon ile Yapılan Çalışmalar - 53 -

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA - 56 -

KAYNAKLAR - 60 -

EKLER - 62 -

ÖZGEÇMİŞ - 80 -

KISALTMALAR

Å	: Ångström (0.1 nm)
HPLC	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
NMR	: Nükleer Magnetik Rezonans
PPL	: *Porcine pancreas* orijinli lipaz
CRL	: *Candida rugosa* VII tipi lipaz
Ras.	: Rasemik
g_e	: Gram enzim
dak	: Dakika
DIPE	: Diizopropil eter

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1. Gaz kromatografik analiz koşulları……..... 42

Tablo 3.2. Çözücü cinsinin (±)-mentol dönüşümü ve başlangıç hızına etkisi..... 52

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1. İzomerlerin alt sınıfları [8].....5

Şekil 2.2 .Enantiomer eldesinde kullanılan metotlar [1].....8

Şekil.2.3. Hidrolazın α-β kıvrımının şematik gösterimi [1].....17

Şekil 3.1. Enzim miktarının mentol dönüşümüne etkisi
[(-)-mentol/oleik asit = 2/1; 35ºC; 0.1 g moleküler elek].....47

Şekil 3.2. Enzim miktarının başlangıç hızına etkisi
[(-)-mentol/oleik asit = 2/1; 35ºC].....48

Şekil 3.3. Mol oranının mentol dönüşümüne etkisi
(1000 U enzim; 35ºC; 0.1g moleküler elek).....48

Şekil 3.4. (-)-mentol/oleik asit mmol oranının başlangıç hızına etkisi
(1000 U enzim; 35ºC; 0.1 g moleküler elek).....49

Şekil 3.5. Sıcaklığın (-)-mentolün esterleşme reaksiyonuna etkisi
[(-)-mentol/oleik asit= 2/4 ;1000U enzim; 0.1g moleküler elek].....50

Şekil 3.6. (-)- ve (±)-mentolün esterleşme reaksiyon süresinin mentol dönüşmesine etkisi (mentol/oleik asit = 2/4 mmol; 1000 U enzim; 35°C; 0.1 g moleküler elek).....51

Şekil 3.7. Çözücü cinsinin (±)-mentol dönüşümüne etkisi
[(-)-mentol/oleik asit= 2/4; 1000U enzim; 0.1g moleküler elek].....53

ÖZET

Mentol optikçe aktif izomerlerden oluşmuş bir sekonder kiral alkoldür. (-)-Mentol ve esterleri endüstriyel açıdan (±)-mentol ve diğer izomerlerden daha çok önem taşımaktadır. (-)-Mentol kendine özgü tadı, nane kokusu ve serinletici etkisi sebebiyle besin,kozmetik, ilaç ve gıda sanayiinde yaygın biçimde kullanılmaktadır. Mentha Piperita (peppermint) ve Mentha Arvensis (Japanese mint) adı verilen bitkilerden ekstraksiyon gibi yollarla elde edilebildiği gibi kimyasal sentez yöntemiyle de elde edilebilmektedir. Bitkilerden elde edilen (-)-mentol ihtiyaca cevap vermediğinden, (-)-mentolün büyük kısmı kimyasal yöntemlerle elde edilmektedir. Ancak kimyasal yolla sentezlenen mentol (±)-mentol olup rasemik karışımın etkin bir biçimde enantiomerlerine ayrılması (resolüsyonu) gerekmektedir. Diğer resolüsyon yöntemlerine kıyasla enzimatik resolüsyonun seçiciliği daha yüksektir.

Bu çalışmanın amacı mentolün yağ asidi ile enantioseçici esterleşme reaksiyonuna enzim ve çözücü etkisinin incelenmesidir.

Tüm reaksiyonlarda yağ asidi olarak oleik asit kullanılmış ve mentol konsantrasyonu 200 mM olarak sabit tutulmuştur. Enzimatik esterleşme reaksiyonu için en uygun enzimi tespit etmek amacıyla *Pseudomonas cepacia* orijinli Lipaz PS"Amano" ve *Candida rugosa* orijinli Lipaz AYS"Amano" olmak üzere iki enzimle çalışılmıştır.

Lipaz PS ile yürütülen reaksiyonların büyük çoğunluğu organik çözücüsüz ortamda, bir miktar su varlığında, (-)-mentol/oleik asit mol oranı 1/3 mol olacak şekilde, 30°C'de, 24 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Enzim miktarı, su miktarı, karıştırma hızı gibi reaksiyon parametreleri değiştirilerek pek çok deney yapılmasına karşın (-)-mentol dönüşmesi en fazla %1.5 olarak bulunmuştur.

Lipaz PS ile başarılı sonuç alınamadığından (-)-mentolün oleik asit ile esterleşme reaksiyonu için Lipaz AYS"Amano" ile bir ön deneme reaksiyonu gerçekleştirilmiştir, (-)-mentol dönüşmesi oldukça yüksek bulunduğundan çalışmalara bu enzim ile devam edilmesine karar verilmiştir.

Lipaz AYS"Amano" ile gerçekleştirilen tüm reaksiyonlarda organik çözücü ortamında çalışılmış ve reaksiyon ortamına enzim eklendikten 1 saat sonra 0.1 g moleküler elek ilave edilmiştir.

Bu çalışmada Lipaz AYS"Amano" tarafından katalizlenen (-)-mentolün oleik asit ile esterleşme reaksiyonu için optimum enzim miktarı, reaksiyon sıcaklığı ve (-)-mentol/oleik asit mol oranı tespit edilmiştir. Çözücü ve enzimin mentolün enantioseçici esterleşmesine etkisini incelemek maksadıyla belirlenen optimum şartlarda ve çeşitli çözücülerde (±)-mentol ve oleik asitin esterleşme reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Kullanılan enzim miktarı endüstriyel uygulamalarda ekonomiyi etkileyen en önemli faktörlerdendir. (-)-Mentolün oleik asit ile esterleşme reaksiyonuna enzim miktarının etkisini görmek için 35°C'de, izooktan ortamında, (-)-mentol/oleik asit mmol oranı 2/1 olacak şekilde, 24 saat boyunca, sırasıyla 500, 1000 ve 1500 U enzim

miktarlarında reaksiyonlar yürütülmüştür. Belirlenen optimum enzim miktarı 1000 U olup bu enzim miktarı için saptanan (-)-mentol dönüşümü %45.0' dır.

(-)-Mentol/oleik asit mol oranının esterleşme reaksiyonuna etkisini belirlemek amacıyla sırasıyla 2/1, 2/2 ve 2/4 (-)-mentol/oleik asit mmol oranlarında, izooktan ortamında, 35°C'de, 1000 U enzim ile ve 24 saat boyunca reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. En yüksek (-)-mentol dönüşmesi 2/4 mmol oranı için tespit edilmiş, bu mol oranı ile çalışılmasına karar verilmiştir.

Optimum sıcaklığı tespit etmek üzere, (-)-mentol/oleik asit mmol oranı 2/4 olacak şekilde, izooktan ortamında, 1000 U enzim katalizörlüğünde sırayla 30, 35, 45 ve 55°C sıcaklıklarda çalışılmıştır. Optimum reaksiyon sıcaklığı olarak 35°C uygun görülmüştür. 35°C'de 24 saat sonunda (-)-mentol dönüşmesi %83.5 olarak tespit edilmiştir.

(-)-Mentol ile yürütülen deneyler için tespit edilen optimum koşullarda (±)-mentol ve oleik asitin Lipaz AYS"Amano" ile 24 saat boyunca esterleşme reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. 24 saat sonunda (±)-mentol ile yürütülen reaksiyon için mentol dönüşmesi %28.9 olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda (-)-mentol dönüşmesi ise %83.5'dir. Lipaz AYS"Amano"'nun (-)-mentole karşı enantioseçici olduğunu söylemek mümkünse de bu sonuca varmak için aynı koşullarda (+)-mentolün oleik asit ile esterleşme reaksiyonunun da gerçekleştirilmesi ve rasemik mentol ile yürütülen reaksiyon ürünlerinin kiral bir kolonla da incelenerek eantiomerik aşırılık ve oranın belirlenmesi gereklidir.

(±)-Mentolün oleik asit ile esterleşme reaksiyonunda enzimin enantioseçiciliğine ve mentol dönüşmesine çözücü etkisini incelemek üzere belirlenen optimum koşullarda (±)-mentolün oleik asit ile esterleşme reaksiyonu farklı çözücü ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Kullanılan çözücüler, izooktan (log P= 4.5), n-heptan (log P=4.0), n-hekzan (log P= 3.5), siklohekzan (log P= 3.2), toluen (log P= 2.5) olup bu çözücülerle gerçekleştirilen reaksiyonların mentol dönüşmeleri sırasıyla %28.9, %5.9, %13.8, %16.9 ve %2.5' dır. Bu sonuçlardan çözücünün log P değeri ile dönüşme arasında direkt bir bağlantı olmadığı görülmektedir. Ayrıca siklohekzan ortamında gerçekleştirilen reaksiyonda elde edilen dönüşmenin n-hekzan ortamında gerçekleştirilen reaksiyonun dönüşmesinden yüksek olması lipazların dallanmış ve halkalı yapıda olan organik çözücüler içinde düz zincir yapısındaki çözücülere kıyasla daha yüksek aktivite gösterdikleri bilgisi ile uyum içindedir. Bu sonuçlara dayanarak en yüksek dönüşmenin izooktan ortamında yürütülen reaksiyona ait olduğu söylenebilir.

Farklı çözücülerde gerçekleştirilen (±)-mentol ve oleik asitin enzimatik esterleşme reaksiyonları için enzimin enantioseçiciliğini kesin olarak tespit etmek amacıyla numuneler kiral bir kolon olan Cydex-β (50 m x 0.22 mm iç çapı x 0.25 μm) ile değişik koşullarda bir çok defa analiz edilmiş, ancak elde edilen kromatogramlarda ester pikleri belirlenememiştir. Kullanılan kolonun mentolün esterleşme reaksiyon ürünlerinin analizi için uygun olmadığına karar verilmiştir.

SUMMARY

Menthol is a secondary chiral alcohol that is composed of optically active isomers. (-)-Menthol and its esters are more important from industrial point of view than (±)-menthol and other isomers of menthol. Becouse of its flavor, refreshing coolness and peppermint odour, it has been widely used in foods, cosmetics and pharmaceutics. It may be either obtained from Mentha arvensis (Japanese Mint) and Mentha piperita (Peppermint) or may be produced on industrial scale by chemical methods. Today, as (-)-menthol obtained from these plants is not able to meet the demand, the majority of (-)-menthol is obtained by chemical methods. If we synthesize menthol by organic synthesis, racemic compounds are obtained. Therefore an efficient seperation method for the racemic compounds is needed.

Enzymatic resolution of menthol is highly selective compared with other resolution methods.

This work was aimed at investigating the effect of enzyme and solvent on the enantioselective esterification of menthol with fatty acid.

The fatty acid used in all experiments was oleic acid and menthol molarity was kept constant at 200 mM. In order to select the suitable enzyme for the enzymatic esterification reaction, two different lipases were used. These were Lipase PS 'Amano'from *Pseudomonas cepacia* and Lipase AYS "Amano" from *Candida rugosa*.

Reactions catalyzed by Lipase PS were carried out in organic solvent-free system at 30 ˚C. A mixture of (-)-menthol/oleic acid (1/3, mole/mole) , water and lipase was incubated at 30˚C for 24 hours with stirring. Although many experiments were carried out by changing the system parameters like amount of water, strirring rate, enzyme content, etc. it was not possible to obtain a higher conversion of (-)-menthol than %1.5 with Lipase PS.

As Lipase PS was not successful for the esterification reaction of (-)-menthol and oleic acid, a control experiment with Lipase AYS "Amano" was carried out for the same reaction. As the (-)-menthol conversion found to be high for the control reaction, it was decided to use Lipase AYS "Amano".

All the reactions catalyzed by Lipase AYS "Amano" carried out in organic solvent and 0.1 g molecular sieves was added to the reaction medium one hour after incubation started.

The optimum conditions for the esterification reaction of (-)-menthol and oleic acid catalyzed by Lipase AYS "Amano" were determined. Optimum enzyme content, optimum mole ratio of (-)-menthol to oleic acid and optimum temperature were determined. In order to see the effect of organic solvent and enzyme on the enantioselective esterification of (±)-menthol and oleic acid, reactions in different solvents were performed under optimum conditions.

The amount of enzyme used is a crucial economical factor for successful industrial applications. To investigate the effect of enzyme amount on the esterification reaction, at 35˚C, in isooctane, with a mole ratio of (-)-menthol/oleic acid 2/1 mmole, reactions performed with enzyme loads of 500, 1000 and 1500 U for 24

hours. The optimum enzyme amount determined was 1000 U. At these conditions, the conversion of (-)-menthol was %45

The optimum mole ratio of (-)-menthol to oleic acid was investigated by reactions carried out at mmole ratios of 2/1, 2/2 and 2/4. The conditions of reactions were set as follows : Reaction temperature, 35 ˚C; the amount of lipase, 1000 U; organic solvent, isooctane. The highest (-)-menthol conversion was found to be %83.5 for the mmole ratio of 2/4.

To determine the optimum temperature, reactions at 30, 35, 45 and 55 ˚C were conducted for 24 hours in isooctane with (-)-menthol/oleic acid mmole ratio of 2/4. The optimum temperature for the reaction was 35˚C with a (-)-menthol conversion of %83.5.

The esterification reaction of (±)-menthol and oleic acid was conducted for 24 hours at optimum conditions determined for the esterification reaction of (-)-menthol in isooctane. After 24 h, the menthol conversion obtained for (±)-menthol was %28.9 while the conversion obtained for (-)-menthol was %83.5 under the same conditions. It is possible to decide that in these conditions, Lipase AYS 'Amano' is enantioselective towards (-)-menthol but to make a conclusion, it is needed to perform the reactions with (+)-menthol under the same conditions.

In the present study, various organic solvents were examined for their effect on conversion and enantioselectivity for lipase catalysed esterification of (±)-menthol and oleic acid. For studying the effect of solvents on conversion as well as enantioselectivity, the esterification reaction of (±)-menthol and oleic acid was performed for 24 h at optimum conditions in various solvents. The (-)-menthol conversions in isooctane (log P= 4.5), n-heptane (log P=4.0), n-hexane (log P= 3.5), cyclohexane (log P= 3.2) and toluene (log P= 2.5) are determined as %28.9, %5.9, %13.8, %16.9 and %2.5. From the above results it can be concluded that the log P value is not the only decisive parameter for the conversion. The (-)-menthol conversion in cyclohexane is higher than n-hexane. This result is parallel with the information given in the literature that lipase shows higher activity in organic solvents having a branched or cyclic group than in the solvents having a straight chain. On the basis of results, isooctane gave the best result with regard to the menthol conversion.

To determine enantioselectivity of the enzyme for (±)-menthol esterification in different solvents, analyses with the chiral column Cydex-β (50 m x 0.22 mm internal diameter x 0.25 μm) were carried out. Although many analyses were conducted by changing the analyse conditions the ester peak areas couldn't be determined. It was decided that this column was not suitable for analyzing the esterification products of menthol.

1. GİRİŞ

1.1 Giriş ve Çalışmanın Amacı

Tüm protein ve genetik materyaller, DNA ve RNA kiral yapıdadır. Canlı organizmalarda gerçekleşen bir çok önemli prosesin arkasında enantioseçicilik durmaktadır. Kiral yapı taşları doğada geniş bir çeşitlilik göstermektedir. Bu yapı taşlarının birçoğunun sadece bir enantiomerik formu baskındır [1].

İki enantiomerin birbirinden oldukça farklı farmakolojik özelliklere sahip olması ilaç üretimi ve geliştirilmesini yakından ilgilendirmektedir. Akiral bir ortamda enantiomerler aynı kimyasal özelliklere sahip olmakla birlikte insan vücudu gibi kiral bir ortamda kimyasal özellikleri ve biyolojik aktiviteleri birbirinden tamamen farklı olan iki ayrı molekül gibi davranmaktadırlar [1].

Kiral moleküller farklı özelliklerini değişik şekillerde gösterebilmektedirler. Limonen maddesinin bir enantiomeri portakal kokusuna sahipken diğer enantiomeri limon kokusuna sahiptir. Yine aspartam isimli maddenin (-)-enantiomeri tatlıyken (+)-enantiomeri acıdır. Kiralitedeki farklılığın insanlar üzerinde çok trajik etkileri de olabilmektedir. Bunun en bilinen örneği 1960'lardaki Thalidomide ilacı faciasıdır. Thalidomide isimli ilacın hammaddesi iki enantiomerden oluşmaktadır. Her iki enantiomerin 1:1 oranındaki karışımı sedatif olarak piyasaya sürülmüştür ve hamile bayanlarda sabahları görülen rahatsızlıkların etkilerini gidermede kullanılmıştır. Ne yazık ki (+)-enantiomer istenilen sedatif etkiyi sağlarken (-)-enantiomer ise ilaç kullanımını müteakiben doğan bebeklerin kol ve bacak oluşumunda anormalliklere neden olmuştur [1].

İki enantiomerin aktivitelerindeki farklılığa daha pek çok örnek verilebilmektedir. Thalidomide vakası gibi örnekler, ilaç endüstrisinin kiral bir ilacı iki ayrı bileşik olarak değerlendirmesini gerektirmektedir. Son yıllara kadar kadar piyasaya sunulan sentetik kiral ilaçların büyük çoğunluğu rasematken son yıllarda üretilen kiral ilaçların önemli kısmını tek enantiomerler oluşturmaktadır. Örneğin 1990 yılında pazara sunulan sentetik ilaçların sadece %3'ü saf enantiomerken 2000 yılında bu sayı %>75'e çıkmıştır. Kiral ilaç satışları günümüzde yıl başına 100 bilyon dolara

çıkmıştır. Bir enantimeri saf ve ayrı olarak elde etme ihtiyacındaki artış yeni analitik ve sentetik enantioseçici metot araştırmalarında da artışa neden olmuştur [1]. Bu değişikliğin nedenleri şöyle özetlenebilir;

- İlacı tek bir izomer olarak geliştirmek ilacın güvenilirliğini ve dayanıklılığını belirgin bir biçimde arttırmaktadır. Kiral bir ilacın sadece tek bir enantiomeri istenilen biyolojik aktiviteye sahipken diğer enantiomerin aktivite göstermediği veya daha az aktif olduğu hatta bazen yan etkilere sebebiyet verdiği sayısız örnek mevcuttur [2].
- 1992 yılından beri Amerika'da U.S.Food and Drugs Administration ve European Committee for Proprietary Medicinal Products ilaç üreticilerine rasemik karışım olarak piyasaya sunulacak tüm ilaçlarda herbir enantiomerin öncelikle araştırılarak karakterize edilmesi zorunluluğunu getirmişlerdir [2].
- Optikçe saf maddelerin sentezinde yeni gelişmeler olmuştur. Kimyasal asimetrik sentez, katalitik kinetik resolüsyon, stereoseçici kristalizasyon veya kiral kromatografi ile rasematların resolüsyonu gibi yöntemlerle eskiye oranla daha saf enantiomer elde etmek mümkündür [2].

Bu metotlar arasında enzim uygulamaları giderek önem kazanmaktadır [2].

Mentol sekonder bir terpen alkoldür. Mentol nane yağının önemli bileşenlerinden biridir. İki ana kaynaktan elde edilmektedir. Bunlar Mentha arvensis (Japanese mint) ve Mentha piperita (peppermint) adı verilen bitkilerdir [3]. Mentol rasemik bir madde olup optikçe aktif enantiomerlerin karışımından oluşmaktadır. (-)-Mentol ağızda ferahlık verici bir tada sahipken (+)-mentol hoşa gitmeyen bir tada sahiptir [4]. (-)-Mentol ve esterleri endüstriyel açıdan (±)-mentolden daha büyük bir önem taşımaktadırlar. (-)-Mentol kendine has tadı yanında mentolün diğer izomerlerinde bulunmayan karakteristik nane kokusuna da sahiptir [5]. (±)-Mentolün serinletici etkisi (-)-mentol kadar yoğun değildir. Bu nedenle (-)-mentol sanayide geniş ölçüde kullanılmaktadır. Serinletici ve ferahlatıcı etkisi nedeniyle diş macunları, sakızlar, şekerler, sigaralar, ilaçlar ve lokal anestezide sıklıkla kullanılmaktadır. Kozmetik ürünlerinin ciltte emilimini arttırdığı için kozmetik alanında da kullanılmaktadır [4].

Bitkisel kaynaklardan ekstraksiyon gibi yollarla elde edilen mentol (-)-mentoldür fakat yeterli miktarda olmayıp ihtiyaca tek başına cevap vermemektedir. Bu nedenle kimyasal yollarla da mentol sentezlenmektedir. Mentol organik sentez yoluyla sentezlendiğinde rasemik karışım olarak elde edilmektedir. Bu nedenle rasemik karışımın enantiomerlerine ayrılması için etkin bir ayırma yöntemi gerekmektedir [6].

Yapılan literatür araştırmalarında enzimatik resolüsyonun kolon kromatografisi veya kristalizasyon gibi diğer resolüsyon metotlarına göre çok daha seçici olduğu belirtilmiştir [6].

(-)-Mentol kısa zincirli yağ asitleriyle esterleştirilerek keskin tadı hafifletilebilmektedir. Ancak (-)-mentolün uzun zincirli yağ asitleriyle oluşturduğu esterlerin ilginç özellikleri vardır [7]. Bunlar;

i) Ester bağı hidrolizlenince cilt tarafından absorblanma hızı artmakta ve güzel bir koku ortaya çıkmaktadır [7].

ii) Ester sıvı halde olduğundan kolayca çözünmekte ve emulsifiye edilmektedir [7].

iii) Uzun zincirli yağ asitlerinin esterleri kısa zincirli yağ asitlerinin esterlerine kıyasla daha dayanıklıdır [7].

iv) Doymamış uzun zincirli yağ asitleri cilt yağlarının önemli bileşenleri olduklarından, bunların kullanımı, cilt yüzeyini koruma özelliği göstermektedir [7].

Bu çalışmanın amacı (±)-mentolün enantioseçici enzimatik resolüsyonunu gerçekleştirmek ve bu reaksiyonda kullanılan enzimin enantioseçiliğine çözücü etkisini incelemektir. Bu doğrultuda öncelikle çeşitli ticari enzimler kullanılarak (-)-mentolün uzun zincirli bir yağ asidi olan oleik asit ile enzimatik esterleşme reaksiyonu gerçekleştirilmiş, uygun enzim tespit edildikten sonra enzim miktarı, (-)-mentol/yağ asidi mol oranı, sıcaklık gibi faktörlerin (-)-mentolün esterleşme reaksiyonuna etkileri incelenmiştir. Bunun dışında (±)-mentolün oleik asit ile enzimatik esterleşme reaksiyonu gerçekleştirilip bu reaksiyonda mentol dönüşmesine çözücü etkisi incelenmiş ve yine enzimin enantioseçiciliğine çözücü etkisi tespit edilmeye çalışılmıştır.

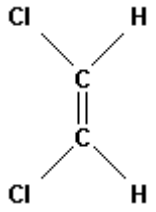
2. TEORİK ÇALIŞMA

2.1. İzomerizm [8]

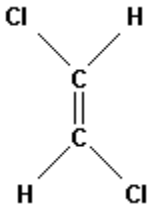
Aynı kaba formüle ancak değişik molekül yapısına sahip olan bileşiklere izomer adı verilmektedir. İzomerler kendi içlerinde yapısal izomerler ve stereo izomerler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Yapısal izomerler atomlarının dizilişi farklı sırada olan izomerlerdir. Bağ yapılarının farklı olduğu belirtilmektedir. Yapısal izomerlere verilebilecek bazı örnekler şunlardır;

Molekül Formülü	Yapısal İzomerler	
		CH_3 |
C_4H_{10}	$CH_3CH_2CH_2\ CH_3$	CH_3CHCH_3
	Bütan	İzobütan

Stereo izomerlerin atomlarının diziliş şekli aynıdır. Stereo izomerlerin farklılığı sadece atomlarının uzaydaki düzenidir. Alkenlerin cis ve trans izomerleri, stereo izomerlere örnek olarak gösterilebilir. 1,2 dikloroeten'in cis ve trans izomerleri buna örnek olarak gösterilebilir;



Cis-1,2-dikloroeten



Trans-1,2-dikloroeten

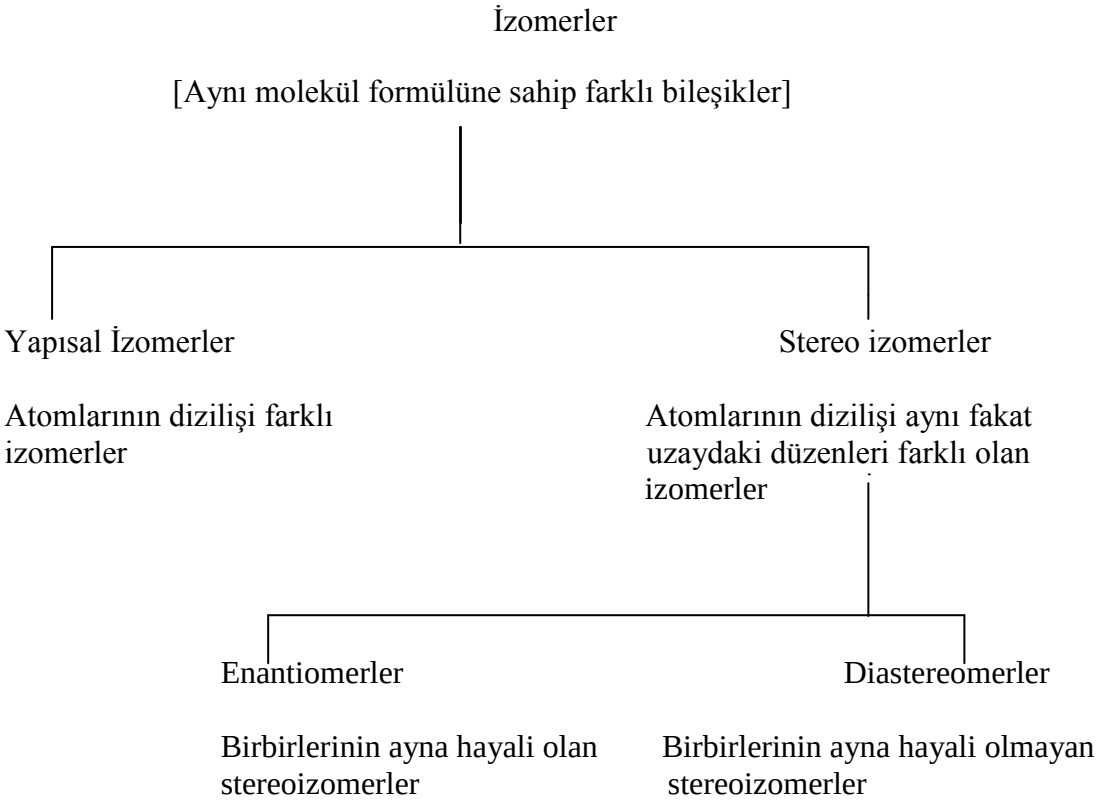
Cis-1,2-Dikloroeten ve trans-1,2-dikloroeten birbirlerinin izomeridirler çünkü iki bileşiğin molekül formülü aynıdır ($C_2H_2Cl_2$) ancak bu iki molekül birbirlerinin aynısı değildirler. Karbon-karbon çift bağının rotasyonundaki güçlük nedeniyle birbirlerine dönüşmeleri kolay değildir. Stereoizomerler yapısal izomer değildirler çünkü her iki bileşikteki atomların birbirine bağlanma sırası aynıdır. Her iki bileşik de bir çifte bağ ile birbirine bağlanmış iki merkezi karbon atomu ve bu merkezi karbon atomlarına bağlı bir hidrojen ve bir klor atomu içermektedirler. Cis-1,2-dikloroetende H

atomları molekülün aynı tarafında, trans-1,2-dikloroetende ise farklı tarafında yer alırlar. Bu nedenle cis-1,2-dikloroeten ve trans-1,2-dikloroeten stereoizomerdirler.

Stereo izomerler, enantiomerler ve diastereomerler olarak iki alt gruba ayrılmaktadırlar. Molekülleri birbirinin ayna hayali olan stereo izomerlere enantiomer, molekülleri birbirinin ayna hayali olmayan stereo izomerlere ise diastereomer adı verilmektedir.

Cis-1,2-dikloroeten ve trans-1,2-dikloroeten molekülleri birbirlerinin ayna hayali değillerdir. Fakat cis ve trans-1,2-dikloroeten stereo izomer oldukları ancak birbirlerinin ayna hayali olmadıkları için diastereomerdirler.

İzomerlerin alt grupları şu şemayla özetlenebilir



Şekil 2.1. İzomerlerin alt sınıfları [8]

2.2 Enantiomerler, Optikçe Aktiflik ve Kiralite

Bilindiği gibi birbirlerinin ayna hayali olan izomerlere enantiomer adı verilmektedir Polarize ışık düzlemini çevirebilen maddelerinse optikçe aktif oldukları söylenmektedir. Şayet bir molekülün gerçek görüntüsü ile ayna hayali üstüste

çakışabiliyorsa polarize ışık düzlemini çevirememektedir ve optikçe inaktif olarak nitelendirilmektedir [8].

Bir cismin gerçek görüntüsünün ayna hayali ile çakışamaması özelliği kiralite olarak adlandırılmaktadır. Eğer bir molekülün gerçek görüntüsü ayna hayali ile çakışamıyorsa kiraldir, çakışabiliyorsa akiraldir [9].

Kiraliteyi açıklamakta kullanılan en bilinen örnek enantiomerik bir çift oluşturan sağ ve sol ellerimizdir. Sol ve sağ elin birbirlerinin ayna hayali oldukları ve üst üste gelemedikleri açıktır [1].

Bir molekülün gerçek görüntüsünün ayna hayali ile çakışamaması ayna hayalinin farklı bir molekül olduğunu göstermektedir. Optikçe aktif olan saf bir bileşik söz konusu olduğunda bu bileşiğin sadece iki izomeri vardır. Bunlara enantiomer adı verilmektedir. Enantiomerlerin iki önemli farklılık dışında fiziksel ve kimyasal özellikleri aynıdır [9]. Bu farklılıklar;

i. Enantiomerler, polarize ışık düzlemini zıt yönlerde ve eşit miktarda çevirmektedirler. Düzlemi sola yani saat yönünün tersine çeviren izomere levo izomer adı verilir ve (-) yada l- işareti ile gösterilir. Düzlemi sağa yani saat yönünde çeviren izomere ise dekstro izomer adı verilir ve (+) veya d- işareti ile gösterilir [9].

ii. Enantiomerler, diğer kiral bileşiklerle farklı hızda reaksiyona girerler. Bu reaksiyon hızları birbirine çok yakın olabilmekle beraber birbirinden çok farklı da olabilmektedir. Öyle ki enantiomerlerden biri hiç reaksiyona girmezken diğeri rahatlıkla reaksiyona girebilir. Bir çok bileşik biyolojik olarak aktifken bu bileşiklerin enantiomerlerinin niçin aktif olmadığını bu durum açıklamaktadır. Enantiomerler akiral bileşiklerle aynı hızda reaksiyona girmektedirler [9].

2.3. Rasemik Karışım

(-) ve (+) enantiomerleri eşit miktarda içeren karışıma rasemik karışım adı verilmektedir. Rasemik karışım optikçe inaktiftir çünkü enantiomerler bir araya geldiklerinde bir izomer molekülü polarize ışık düzlemini sağa çevirirken diğeride aynı oranda sola çevirerek bu etkiyi yok etmektedir. Rasemik karışımları göstermek için (±) işareti kullanılmaktadır [10].

2.4. Resolüsyon-Enantiomerlerin Ayrılması [8]

Enantiomerlerin çözücüler içindeki çözünürlükleri ve kaynama noktaları aynıdır. Bu nedenle organik bileşikleri ayırmada kullanılan kristalizasyon ve distilasyon gibi bilinen yöntemler rasemik karışımlara uygulandığında başarılı sonuçlar elde edilememektedir.

Bir rasemik karışımdaki enantiomerlerin ayrılması işlemine resolüsyon denilmektedir.

Enantiomerleri ayırmada kullanılan en etkili yöntemlerden biri rasemik karışımı başka bir bileşiğin tek bir enantiomeri ile reaksiyona sokarak diastereomerlerden oluşan bir karışıma dönüştürmektir. Diastereomerlerin erime, kaynama noktaları ve çözünürlükleri farklı olduğundan klasik yöntemlerle kolayca ayrılabilmektedirler.

2.5. Saf Enantiomerlerin Primer (Birincil) Kaynakları [1]

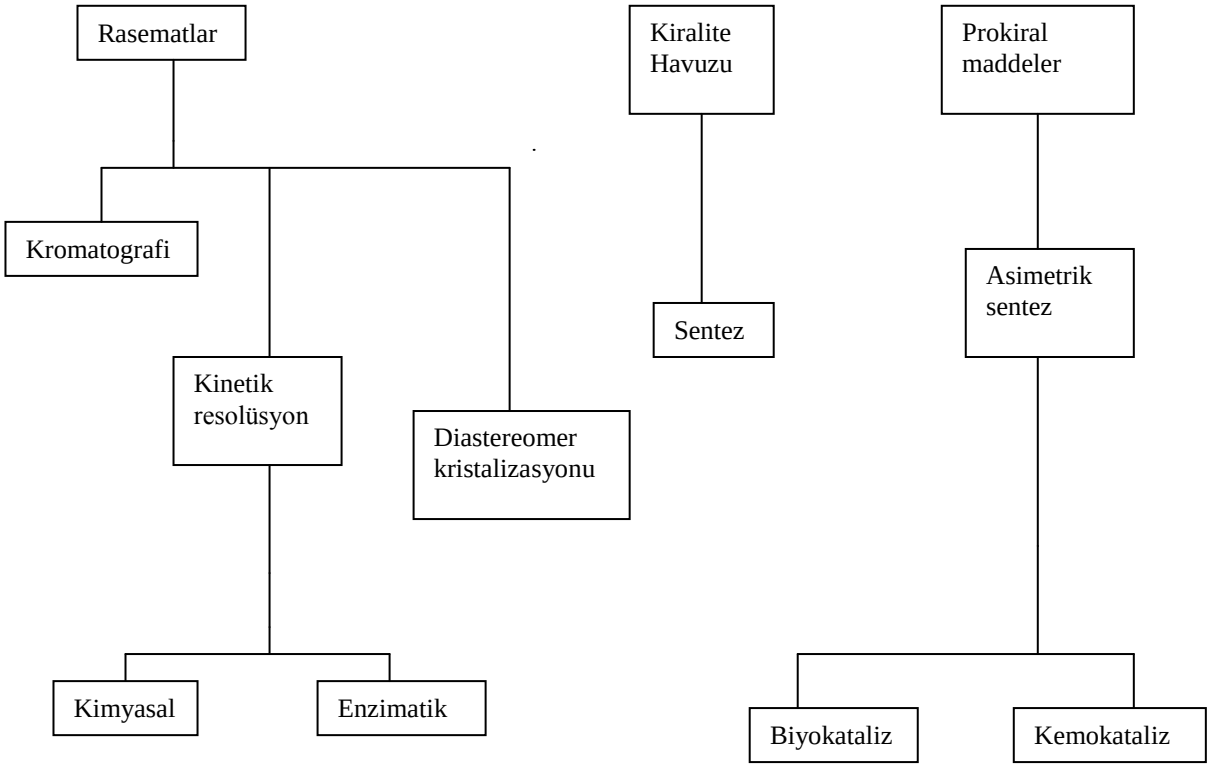
İlaç ve kimyasal madde üretiminde kullanılması zorunlu olan enantiomerler başlıca dört kaynaktan elde edilebilir. Doğada bulunan saf enantiomerler (karbonhidratlar, terpenler, aminoasitler, vb.) ekstraksiyon veya protein hidrolizi ile direkt olarak hayvansal ve bitkisel maddelerden elde edilebilmektedir.

Ucuz ve bol miktarda bulunabilen karbonhidratca zengin olan sukroz ve melasın De Novo fermentasyonu (mikrobiyal sentez) ile elde edilebilmektedir. Bu yöntem, hem tartarik, laktik ve amino asitler hem de antibiyotik, hormon ve vitaminler gibi kompleks maddelerin üretimi için uygulanmaktadır.

Saf enantiomerlerin rasemik bileşiklerden eldesi ise kristalizasyon yada kromatografi ile gerçekleştirilmektedir.

2.6. Sentez yoluyla saf enantiomer eldesi [1]

Enantiomerik bileşiklerin eldesinde kullanılan sentez yolları kullanılan ham maddenin cinsine göre üç guruba ayrılmaktadır. Bu metotlar aşağıda Şekil 2.2'de sunulmaktadır.



Şekil 2.2 .Enantiomer eldesinde kullanılan metotlar [1]

2.6.1. Rasemat Resolüsyonu [1]

Enantioseçici sentezde yeni gelişmeler ve ilerlemeler kaydedilmesine rağmen tek bir enantiomer elde etmede kullanılan temel yöntemlerden en önemlisi rasematların resolüsyonudur. Rasemat resolüsyonu dört guruba ayrılmaktadır.

Sanayide en çok tercih edilen metodlardan biri seçimli kristalizasyon olup özellikle kloramfenikol ve α-metil-L-dopa üretiminde kullanılmaktadır. Sentetik (-)-mentol'ün üretiminde lider olan Haarmann&Reimer firması da mentil benzoatın seçimli kristalizasyonundan yararlanarak (-)-mentol üretimi gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemde saf mentol enantiomerlerinden biri aşı kristali olarak ortama ilave edilerek kristalizasyon verimi arttırılabilmektedir. Bu proses teknik olarak iki enantiomeri eşit miktarda içeren rasematlara uygulanabilmektedir. Ancak ne yazık ki rasematların %20'den daha azı eşit miktarda enantiomerden oluşmaktadır. Bu nedenle seçimli kristalizasyon rasematların büyük bir bölümüne uygulanamamaktadır. Seçimli kristalizasyonun başarısı rasemik karışımın çözünürlüğünün her iki enantiomerden daha fazla olmasına bağlıdır.

Rasemat iki enantiomeri eşit oranda içermiyorsa enantiomerler seçimli kristalizasyon ile ayrılamazlar. Bu durumda Pasteur tarafından 1848 yılında geliştirilen diastereomer kristalizasyonu ile ayırma gerçekleştirilmektedir. Rasemik karışımın su yada metanolde hazırlanan çözeltisi saf bir enantiomer ile reaksiyona sokularak diastereomerlerden oluşan bir karışım elde edilir. Bu karışım kristalizasyon ile ayrılabilmektedir.

Rasematların resolüsyonunda kullanılan üçüncü metod kinetik resolüsyondur. Bu metod iki enantiomerin kiral bir madde ile farklı hızlarda reaksiyona girmesine dayanmaktadır. Bu reaksiyonlar enzim veya mikroorganizma gibi bir biyokatalizör yada kimyasal katalizör varlığında yürütülür. Sekonder alkollerin enzim veya metal katalizör kullanılarak yürütülen kinetik resolüsyonu buna örnektir.

Son olarak rasemat resolüsyonunda kullanılan bir metot da kromatografidir.

2.7. Enantiomerik Aşırılık (ee) ve belirlenmesi [1]

Enantiomerik saflığın tespiti için 1960'ların sonlarında geliştirilmeye başlanan metotlar enantioseçici sentezin gelişimi açısından kritik bir öneme sahip olmuştur.

Sekonder alkollerin enzim katalizörlüğünde kinetik resolüsyonu için öncelikle enantioseçicilik, enantiomerik saflık ve dönüşme derecelerinin kesin ve güvenilir olarak belirlenmesi gereklidir. Bunun için kullanılan metotlar;

1) Polarimetrik metotlar
2) Gaz kromatografisi metotları
3) Sıvı kromatografisi metotları
4) NMR spektroskopisi 'dir.

Kinetik resolüsyon reaksiyonlarına ait ürünlerin enantiomerik saflığını tespit etmede kullanılan en modern ve duyarlı metotlar kiral gaz kromatografisi ve HPLC (yüksek basınçlı sıvı kromatografisi) yöntemleridir.

Bu çalışmada sekonder alkollerin kinetik resolüsyonu için enantiomerik aşırılığın tespitinde gaz kromatografisi metodunun yararlarına değinilecektir.

2.7.1. Gaz Kromatografik Metodu [1]

Sekonder alkollerin enzim katalizörlüğünde yürütülen kinetik resolüsyonu sonucunda ortamda bulunan substrat ve ürünlerin enantiomerik saflığının tespitinde kullanılan en etkili metotlardan biri kiral gaz kromatografi yöntemidir. Bu hassas metot, analizi yapılan örnekte bulunan safsızlıklardan etkilenmediği gibi uygulanması pratik ve hızlıdır. Gaz kromatografi cihazında yüzeyi siklodekstrin gibi kiral bir madde ile kaplanmış bir kolon kullanılır. Bu sabit (durucu) faz kullanımı ile enantiomerik ayrılmanın gerçekleşmesini sağlayan etkin kiral tanınma sağlanır. Hareketli faz olan gaz fazı (He, H_2, N_2 vs.) rasemik karışımın sabit (durucu) fazdan geçerek taşınmasını sağlar. Analiz edilen enantiomerler kiral sabit faz ile hızlı ve tersinir diastereomerik etkileşimlere uğrayarak her biri farklı zamanlarda kolonu terk ederler. Bu metodun sınırlamalarından biri numunenin uçucu, termal açıdan kararlı ve kullanılan sabit (durucu) fazda çözünebilir olması zorunluluğudur. Gaz kromatografisi ile enantiomerik aşırılık tespiti % ±0.05 gibi yüksek oranda kesinliğe sahip olduğundan güvenilir sonuçlar elde edilebilmektedir. Bu yöntemle %99'a kadar yüksek enantiomerik aşırılık (ee) tespit edilebilmektedir.

2.8. Enzimler

Dünya üzerindeki yaşam sürekli bir değişime dayanmaktadır. İnorganik maddeler en karmaşık yapılar olup zaman içinde cansız maddelere dönüşecek olan canlı yaşamı meydana getirmektedir. İnsan, hayvan ve bitkiler de bu büyük döngüde yer almaktadır. Yaşamın temelini oluşturan inert maddelerin yapısı çok basittir. Su, CO_2, N_2 ve enerjisi ile bitkilerin fotosentez yapmasını sağlayan güneş ışığı temel bileşenlerdir [11].

Kimyasal deneyler, canlıların yapı taşı olan amino asitler gibi çok spesifik bileşiklerin yüksek sıcaklık ve basınçta karbon, azot, oksijen ve hidrojen gibi bileşenlerine ayrıldığını göstermiştir. Bu karmaşık yapılar bir kez oluştuktan sonra daha basit koşullarda parçalanabilmektedirler. Ancak varolan global şartlarda bu tür prosesler çok yavaş ilerlemektedir [11].

O zaman yaşam için vazgeçilmez olan bu bileşiklerin sentezine ve yaşamı oluşturan yüksek molekül ağırlıklı karmaşık yapıların ayrışmasına sebep olan nedir?

Uzun süre bu sentez ve parçalanmaların kendiliğinden ya da canlı hücrelerin gelişmiş bir özelliğinden ileri geldiği düşünülmüştür [11].

Enzimatik ayrışma ilk olarak 1783'te İtalyan bir rahip ve fen adamı olan Spallanzani (1729-1799) tarafından gözlemlenmiştir. Küçük gözenekli kapsüllerin içine et koyduktan sonra bunları yiyen şahinlerin mide suları tarafından etin derhal sıvı hale getirildiğini ispatlamıştır [11].

1814'te Kirchoff arpanın nişasta macununu sıvılaştırarak şekere dönüştürebilen bir madde içerdiğini bulmuştur. Reaksiyona arpadaki gluten proteininin neden olduğunu ileri sürmüştür. Şeker moleküllerinden oluşan nişastanın parçalanması ve şekerin CO_2 ve alkole fermantasyonu 19.yy kimyacılarını oldukça meşgul etmiştir [11].

Bu varsayımın somut delili 1897'de E.Buchner'in hücrelerden ekstrakte edilmiş mayaların şekerden alkol üretebildiğini göstermesiyle kanıtlanmıştır [11].

1857'de Pasteur fermentasyon ile canlı maya arasında yakın ilişki olduğunu göstermiştir. Organize ve organize olmamış çözünebilir mayaların hareketlerini mukayese etmiştir. Canlı hücreye bağlanmayan çözünebilir mayalar 1878'de Kühne tarafından "Enzimler" olarak adlandırılmıştır. Bu terim Yunanca'da "ekşi hamur" anlamına gelen enzim kelimesinden gelmektedir [11].

Enzimler biyolojik proseslerin katalizörleridirler. Diğer katalizörlerin yaptığı gibi katalizledikleri reaksiyonun normalde erişebileceğinden daha hızlı bir şekilde dengeye ulaşmasını sağlarlar ancak bir enzim reaksiyonun serbest enerjisinde istenmeyen bir değişim meydana getiremez [12].

Enzimlerin geçmişi binlerce yıl öncesinde eski Yunanistan'a kadar dayanmaktadır. Mikroorganizmalardan elde edilen enzimler peynir yapımı, alkol ve bira üretimi ile pişirmede kullanılmışlardır. Bu tür enzimatik prosesler tarih öncesi zamanlardan beri bilinmekteydi. Günümüzde ise bilimsel araştırmalar yardımıyla enzimler, hayatımızı en mükemmel hale getirmek için kullanılmaktadır [1].

2.8.1. Enzim Sınıflandırılması ve İsimlendirilmesi için Geçerli Kurallar [12]

Enzimlerin sınıflandırılması ve isimlendirilmesi için kabul görmüş olan sistem üç genel kurala dayanmaktadır. Bunlar;

1) Özellikle "az" ile biten enzim isimleri sadece tek bir enzim söz konusu olduğunda kullanılmalıdır, birden fazla enzim içeren sistemler için kullanılmamalıdır.
2) Bir enzim katalizlediği reaksiyona göre isimlendirilir ve sınıflandırılır. Bunun için kimyasal reaksiyonda enzim tarafından meydana getirilen değişiklik referans alınmaktadır. Hareket mekanizması, ara kofaktörleri veya prostetik gruplar isimlendirilmede göz önüne alınmamaktadır. Sonuçta bir enzimin katalizlediği reaksiyon tamamıyla anlaşılmadan o enzim sistematik olarak isimlendirilememektedir.
3) Enzimlerin isimlendirilmesi ve sınıflandırılmasında tanınmayı kolaylaştırmak amacıyla Enzim Komisyonu'nun katalizlenen reaksiyon türüne göre belirlediği kod numaraları kullanılmaktadır. Sistematik isimlendirmede belli bir sınıfa ait tüm enzimlerin deneysel olarak sadece ters yönündeki reaksiyonu da katalizlediği belirlenmiş olsa bile belli bir yöndeki reaksiyonu katalizledikleri kabul edilmektedir.

Sonuç olarak bir enzimin çoğunlukla biri sistematik diğeri önerilen olmak üzere iki ismi vardır. Genellikle daha kısa olduğu için önerilen isimleri kullanılmaktadır. Bir enzim sistematik adı ve Enzim Komisyonu'nun kod numarasıyla tanımlandıktan sonra önerilen adı kullanılabilmektedir.

2.8.2. Enzimlerin Sınıflandırılması ve Numaralandırılması [12]

Enzim Komisyonu'nun 1961'de yayınlanan ilk raporuna göre enzimler katalizledikleri reaksiyonun türüne göre 6 sınıfa ayrılmaktadırlar. Enzim Komisyonu tarafından bu sınıflara kod numaraları tahsis edilmiştir. Bu kod numaraları birbirinden nokta ile ayrılmış 4 numaradan oluşmaktadırlar ve her bir numara şunu göstermektedir;

1) İlk numara enzimin bu 6 sınıftan hangisine ait olduğunu
2) İkinci numara alt sınıfı
3) Üçüncü numara alt-alt sınıfı
4) Dördüncü numara ise enzimin alt-alt sınıfının seri numarasını göstermektedir.

Belirtilen alt sınıflar şu şekildedir;

1) Oksidoredüktazlar: Bu sınıf redoks reaksiyonlarını katalizleyen tüm enzimleri kapsamaktadır. Önerilen isim dehidrojenaz yada redüktazdır. İndirgeme (redüksiyon) reaksiyonunun alıcısı (akseptörü) O_2 olduğunda oksidaz ismi kullanılabilmektedir. Sistematik isim vericiye (donör) göre belirtilmektedir.
2) Transferazlar: Transferazlar metil, açil, glisol veya fosfat gibi spesifik bir grubun bir maddeden diğerine transferini katalizlemektedir. Normalde kullanılan isim genellikle akseptör grup transferaz veya donör grup transferazdır. Donöre göre belirlenen isim akseptör grup transferazdır.
3) Hidrolazlar: Hidrolazlar C-O, C-N, C-C ve diğer bazı bağların hidrolitik parçalanmasını katalizlerler. Önerilen isim çoğunlukla subsrat adına "-az" ekinin takılmasıyla oluşmaktadır. Sistematik isim ise her zaman hidrolaz kelimesini içermektedir.
4) Liyazlar: Liyazlar, C-C, C-O, C-N ve diğer bağların eliminasyonla parçalanmasını katalizlemektedirler. Önerilen isim genellikle dekarboksilaz, aldolaz, dehidrataz olabilir. Sistematik isim subsrat grubuna "-liyaz" eki gelmesiyle oluşmaktadır.
5) İzomerazlar: İzomerazlar bir molekül içinde geometrik ve yapısal düzenlemeleri katalizlemektedirler. Farklı izomerleşme türlerine göre

rasemaz, epimeraz, izomeraz, tautomeraz, mutaz veya sikloizomeraz isimleri kullanılmaktadır.

6) Ligazlar: Ligazlar ATP'deki pirofosfat bağının veya nükleosid trifosfat bağının hidrolizlenmesi ile eşleşen iki molekülün birleşmesini katalizlemektedirler. 1983'e kadar önerilen isim çoğunlukla sentetaz kelimesini içermiştir. Günümüzde ise sentetaz isminin sebep olduğu karışıklığı önlemek amacıyla X-Y tipi ligaz ismi kullanılmaktadır.

2.8.3. Modern Enzim Teknolojisinin Uygulamaları [11]

Besinlerin ve besin öğelerinin muhafazası, ham maddelerin daha etkin kullanımı ve besin kalitesinin yükseltilmesi modern enzim teknolojisinin temel hedefleri olmaya devam etmektedir. Enzimler ayrıca proses masraflarını azaltmak için besin endüstrisinde proses optimizasyonunda da kullanılmaktadırlar. Günümüzdeki diğer kullanım hedefleri, insan ve hayvan gıdalarında yeni ham maddelerin kullanımı ve belli gıda ham maddelerinden besleyici özelliği olmayan maddelerin uzaklaştırılmasıdır.

Klasik kimyasal prosesler yerlerini biyoteknolojik metotlara bırakmaya başlamışlardır. İmmobilize enzim ve immobilize mikroorganizmaların kullanıldığı yeni yöntemler modern biyoteknolojinin sadece bir yönünü oluşturmaktadır. Biyoteknoloji, aminoasitlerin, antibiyotiklerin sentezi gibi bir çok proses içermektedir.

Yeni biyoteknolojik proseslere verilebilecek örneklerden bazıları şunlardır;

- Kiral bileşiklerin üretimi ve özel polimerlerin sentezi için susuz ortamda enzim kullanımı
- Amino asit, peptid ve antibiyotik sentezinde enzim kullanımı
- Gıda atıklarının geri dönüşümü ve atık su işlemlerinde enzim kullanımı
- Mikrobiyolojik ve enzimatik metotların birlikte uygulanması ile aspartam gibi tatlandırıcıların üretimi
- Belli enzimlerin kullanımı ile nişastadan siklodekstrin üretimi
- Deterjanların aktif komponentleri olarak selülaz ve lipazların kullanımı

- Mikroorganizmalar yardımıyla pahalı ve nadir bulunan memeli enzimlerinin üretimi
- Özel, belli bir proseste katalizör olarak kullanılmak amacıyla enzim üretimi: Bu prosedürler özel fonksiyonlara sahip protein dizaynı yapan protein mühendisliğinin bir parçasıdır.
- Gelecek yıllarda gen teknolojisi yardımıyla geniş ölçekli enzim üretimi yapılması beklenmektedir.

2.9. Lipazlar

Lipazlar, (triaçilgliserol açil hidrolazlar, EC 3.1.1.3) serin hidrolazlar ailesine mensup olup hayvan, bitki ve mikroorganizmalarda bulunmaktadırlar. Lipazlar, gliserol ve uzun zincirli yağ asidi esterlerinin hidroliz ve sentezini katalizleyen enzimlerdir. Lipazlar doğada geniş ölçüde bulunmalarına karşın ticari yönden sadece mikrobiyal lipazlar önem taşımaktadırlar. Lipazların yağ hidrolizi, yağların modifikasyonu, gıda üretiminde lezzet arttırma, rasemik karışımların resolüsyonu, kimyasal analizler ve organik sentezler gibi çok çeşitli uygulamaları bulunmaktadır [1].

Esterazların aksine lipazlar sadece yağ-su ara yüzeyinde absorblandıklarında aktivite gösterirler. Lipazlar serin hidrolazlardır. Çözünebilir subsratlar içeren sulu çözeltilerde çok düşük aktivite gösterirler. Esterazlar ise aksine bu ortamda normal Michaelis-Menten kinetiği göstermektedirler. Lipaz ve lipidlerin ara yüzeyde nasıl etkileştikleri hala tamamen bilinmemekte olup araştırılmaya devam edilmektedir [13].

Lipazlar çok fazla çeşitlilik göstermelerinden ötürü önemli bir araştırma konusu teşkil etmektedirler. Lipazlar üzerine yapılan araştırmalar, özellikle lipazların yapısal karakterizasyonu, kinetiği, hareket mekanizmalarına açıklık getirmek ve lipaz genlerinin klonlanması gibi konularda yoğunlaşmaktadır. Tüm çabalara rağmen ticari kullanım için verimli lipaz biyoreaktör sistemlerinin geliştirilmesinde çok az yol kat edilmiştir [13].

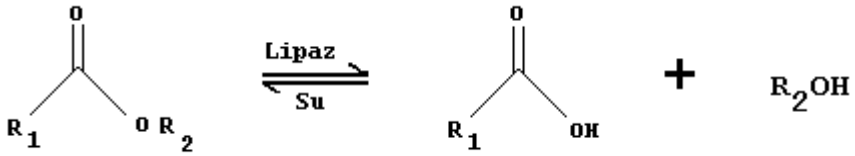
Ticari değeri olan lipazlar çoğunlukla mikroorganizmalardan elde edilenlerdir. Lipazların bir çoğu organik çözücü ortamında esterleşme, transesterleşme, peptid ve

diğer kimyasalların sentezi ve glikol ile mentol açilasyonu gibi çeşitli reaksiyonları katalizlemektedirler [1].

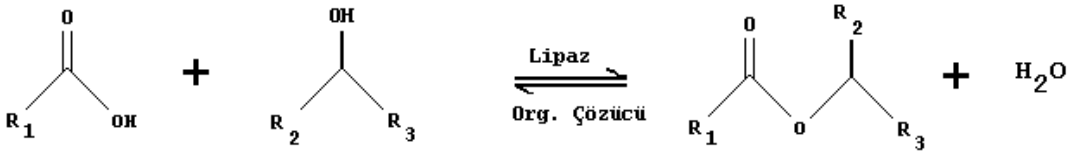
Gelecekte lipazların ticari yönden proteaz ve karbohidrazlar kadar önem kazanacağı tahmin edilmektedir.

2.9.1. Lipaz Tarafından Katalizlenen Reaksiyonlar [1]

1. Hidroliz (sulu ortam)

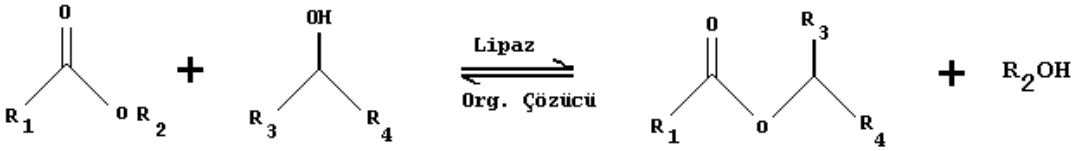


2. Esterleşme (organik ortam)

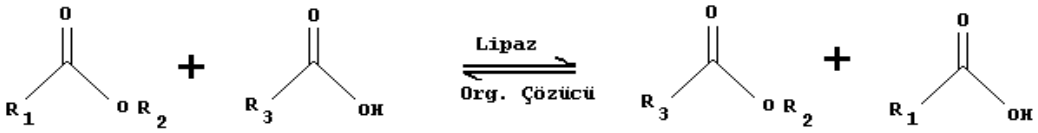


3. Transesterleşme

a) Alkoliz



b) Asidoliz



4. İnteresterleşme



2.9.2. Lipaz Tarafından Katalizlenen Reaksiyonların Mekanizması [1]

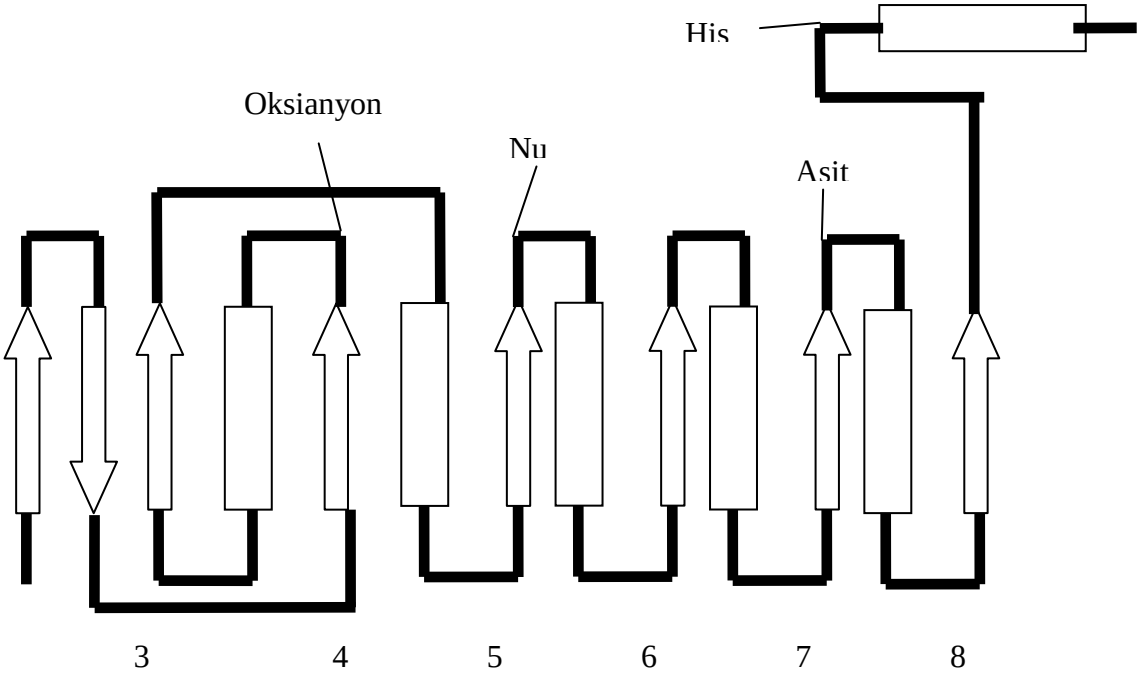
Lipazlar birincil zincirlerinde çok farklı sayıda amino asit taşıyabilirler. Örneğin *Candida rugosa* lipazı 500'den fazla amino asit içermekteyken *Candida antarctica-B* lipazı 200'den az amino asit ihtiva etmektedir. Lipazlar pozisyonel seçiciliklerine göre genellikle üç sınıfa ayrılmaktadırlar;

a. sn-1,3-spesifik

b. sn-1(3) spesifik

c. spesifik olmayan

Tüm lipazların ortak özelliği, aktif bölgelerinin katalitik üçlü olarak bilinen serin, aspartat veya glutamat ve histidin amino asitlerinden oluşmasıdır. Tüm lipazların üç boyutlu yapısı ortak bir motif olan hidrolazın α-β kıvrımını içermektedir. Bu motifte lipaz hemen hemen paralel olan ve her iki tarafında α-helislerle kuşatılmış durumda bulunan 8 adet β-yapraklar içermektedir.



Şekil.2.3. Hidrolazın α-β kıvrımının şematik gösterimi [1]

Katalitik üçlü (Ser, Asp ve His) ve oksianyon-stabilizasyon kalıntılarının lipazın aktif merkezini oluşturdukları düşünülmektedir. Aktif merkezi bloke eden bir kapak lipazın ara yüzle aktivasyonundan sorumludur, bu aktivasyon özelliği lipazı serin proteaz veya esteraz gibi diğer hidrolazlardan ayırmaktadır. Lipazın subsrata bağlanmadan önce ve sonraki X-ışını yapısına dayanarak araştırmacılar lipazın

biyokimyasal transformasyon reaksiyonlarına girmeden önce aktive edildiğini düşünmektedirler.

2.9.3. Lipazların Endüstriyel Uygulamaları

2.9.3.1. Süt ve Besin Endüstrisinde Lipazlar

Katı ve sıvı yağlar besinlerin önemli bileşenleridir. Bir trigliseridin fiziksel özellikleri ve besin değeri yağ asidinin gliserol iskeletindeki pozisyonu, yağ asidinin zincir uzunluğu ve doymamışlık oranı gibi faktörlerle yakından ilgilidir. Lipazlar gliseridde bulunan yağ asidinin yerini değiştirerek ve yağ asitlerinden bir veya daha fazlasını yenileriyle değiştirerek bize sıvı yağların özelliklerini değiştirme imkanı tanımaktadırlar. Bu şekilde nispeten ucuz ve tercih edilmeyen bir lipid daha değerli bir yağa dönüştürülebilmektedir [13].

Değerli bir yağ olan kakao yağı palmitik ve stearik asitler içermektedir ve yaklaşık 37°C olan bir erime noktasına sahiptir. Çikolata gibi ürünlerde kakao yağının ağızda erimesiyle ferahlatıcı bir his duyulmaktadır. Lipaz katalizörlüğünde yürütülen interesterleşme reaksiyonları ile pek talep görmeyen yağları kakao yağı eşdeğeri bir yağa dönüştürmek mümkündür. Bu prosesin bir versiyonu, immobilize *Rhizomucor miehei* orijinli lipaz ile palm yağı içinde palmitik asitin stearik asitle transesterleşme reaksiyonu gerçekleştirilmesidir [13].

Lipazlar süt endüstrisinde de geniş ölçüde kullanılmaktadırlar. Günümüzdeki uygulamaları peynirlerin lezzetini arttırmak, peynirin olgunlaşmasını hızlandırmak, peynir tadındaki besinlerin üretimi ve krema ile tereyağının lipolizidir [14].

Son zamanlarda mikrobiyal lipaz preparatlarının büyük kısmı peynir imalat sanayii için geliştirilmektedir. Bunlara *Mucor miehei* (Piccantase, Gist-Brocades; Palatase M., Novo Nordisk), *Aspergillus niger* ve A. Oryzae (Palatase A., Novo Nordisk; Lipase AP, Amano; Flavour AGE; Chr. Hansen) ve daha bir çok örnek gösterilebilir. Bu mikrobiyal lipazlar sadece lezzet arttırmada değil bazı özel peynir çeşitlerinin olgunlaşmasını hızlandırmada da kullanılmaktadırlar [14].

2.9.3.2. Deterjan Endüstrisinde Lipazlar [14]

Bulaşık tozlarında kullanılan enzimlerin satışı hala endüstriyel enzimler için en büyük pazar payına sahiptir.

Yağları hidrolizleme yeteneğinden dolayı lipazlar deterjan ve kuru temizleme sanayiinde katkı maddesi olarak önemli oranda kullanılmaktadırlar.

Deterjanlarda kullanılan lipazlar şu özelliklere sahip olacak şekilde seçilmektedir.

- Düşük substrat seçiciliğine sahip, çeşitli bileşiklerin yağlarını hidrolizleme yeteneğine sahip
- Sert yıkama koşullarına dayanıklı (pH 10-11; 30-60°C)
- Pek çok deterjan formülasyonunun önemli bileşenleri olan yüzey aktif madde ve enzimlere dayanıklı

İstenilen özelliklere sahip lipazlar protein mühendisliğince sürekli bir takip sonucu elde edilmektedirler.

2.9.3.3. Kağıt Endüstrisinde Lipazlar [13]

Kağıt üretiminde odunun hidrofobik bileşenleri ve zift çeşitli problemlere neden olmaktadırlar. Lipazlar, kağıt üretiminde kullanılmak üzere üretilen kağıt hamurundaki zifti uzaklaştırmak için kullanılırlar. Japonya'da bulunan Nippon Kağıt Sanayii, odun trigliseridlerinin %90'nını hidrolizleyen *Candida rugosa* lipazını kullanan bir zift kontrol yöntemi geliştirmiştir.

2.9.3.4. Oleokimya Endüstrisinde Lipazlar

Lipazların oleokimya sanayiindeki uygulama alanı çok geniştir. Katı ve sıvı yağlar tüm dünyada yılda yaklaşık 60 milyon ton kadar üretilmektedirler ve bunun büyük kısmı (2 milyon tondan fazlası) hidroliz, gliseroliz ve alkoliz gibi yüksek enerji tüketen proseslerde kullanılmaktadır [14].

Lipazların oleokimyasal proseslerde kullanımı ile enerjiden tasarruf edilmekte ve alkoliz, asidoliz, hidroliz ve gliseroliz sırasında ortaya çıkan termal düşüş minimize edilmektedir. Lipazlar yapıları gereği triaçilgliserolün ester bağlarının hidrolitik yarılması için dizayn edilmişlerdir ancak düşük su miktarına sahip ortamda bunun tersinir reaksiyonu olan ester sentezini de katalizlemektedirler. Hidroliz ve esterleşme, interesterleşme olarak bir proseste aynı anda meydana gelebilmektedir. Substratlara bağlı olarak lipazlar asidoliz, alkoliz ve transesterleşme reaksiyonlarını katalizlemektedirler [13].

Lipazların oleokimya sektöründeki geleceğinin umut vaad ettiği sonucuna varılabilir ve biyoteknolojik metotların ileriki yıllarda önem kazanacağına işaret eden önemli göstergeler mevcuttur. Bu görüş bir Amerikan oleokimya sanayi danışmanı olan N.OV.Sonntag tarafından yayınlamış bir makalede yer alan şu cümlelerle desteklenmektedir [14]

"Enzimatik hidroliz pahalı cihaz sermayesi ve büyük miktarlarda termal enerji sarfiyatı gerektirmediğinden yağ parçalanmasında en çok umut veren yöntemdir."

2.9.3.5. Kişisel Bakım Ürünleri Bileşenlerinin Sentezinde Lipazlar [14]

Dökme ürünlerin üretimi için lipaz katalizörlüğünde gerçekleşen esterleşme reaksiyonları, maliyeti yüksek olmasına rağmen piyasada iyi bir yer edinmiştir. Uluslar arası Unichem firması cilt, bronzlaşma kremleri ve banyo yağları gibi kişisel bakım ürünlerinde kullanım maksadıyla izopropil miristat, izopropil palmitat ve 2-etil hekzil palmitat üretimine başlamıştır. İmmobilize edilmiş *Mucor miehei* orijinli lipaz, çözücüsüz ortamda gerçekleşen esterleşme reaksiyonunda biyokatalizör olarak kullanılmış ve reaksiyonda açığa çıkan su vakum distilasyonu ile uzaklaştırılmıştır. Firmanın belirttiğine göre alışılagelmiş bir katalizör olan asit yerine enzim kullanılması ürün kalitesini arttırmıştır. Unichem firmasının İspanya'daki fabrikasında tonlarca şarj başarıyla üretilmektedir.

2.9.3.6. İlaç ve Zirai Kimyasalların Sentezinde Lipazlar [14]

Son 10 yıldır özellikle ilaç endüstrisinde rasemik karışımlar yerine optikçe saf ürünlerin üretiminde belirgin bir artışa şahit olunmaktadır. Yine de sentetik ilaç ve zirai kimyasallar arasında bir veya daha çok kiral merkeze sahip olanlar çoğunluğu oluşturmaktadır. Bunun sebebi arzu edilen biyolojik aktivitenin genellikle belirgin bir enantiomerde bulunmasıdır. Tek bir izomerin rasemik karışıma tercih edilir olması tartışılmazdır ancak, tek izomerlerin üretiminde bazı teknik ve/veya ekonomik problemler mevcuttur.

Örneğin fenoksi propionat herbisitlerin sentezinde başlangıç maddesi olan 2-halopropionik aistler Chemie Linz Şirketi (Avusturya) tarafından Massachusetts Teknoloji Enstitüsü'nün lisansı ile 100 kg ölçeğinde üretilmektedir. Proses, susuz hekzan *içinde Porcine pancreatic* lipazı katalizörlüğünde (S)-izomerlerinin

butanolle seçici esterleşmesine dayanmaktadır. Teorik olarak %75 dönüşme için %>99 enantiomerik aşırılık tespit edilmiş ve resolüsyon saatlerce sürmüştür.

Lipazlar tüm dünyada birçok ilaç firması tarafından kilogram ölçeğinde optikçe saf aktif ara ürünler üretmekte kullanılmaktadır. Ek olarak İngiltere'de bulunan Enzymatix gibi nispeten küçük biyoteknoloji şirketleri biyodönüşümlerde uzmanlaşmışlardır. Bu şirketler lipaz ortamında resolüsyonla hazırlanan ara ürünlere geniş bir çeşitlilik sunmaktadırlar.

2.9.3.7. Polimer Sentezinde Lipazlar [14]

Optikçe aktif polimerler çeşitli amaçlarla kullanılmaktadırlar. Absorban, asimetrik madde ve sıvı kristaller üretimi kullanım alanlarından bazılarıdır. Bu tür polimerler genellikle kimyasal yöntemlerle hazırlanmaktadırlar ancak son zamanlarda lipaz katalizörlüğünde yürütülen reaksiyonlardan polimer biliminde de faydalanıldığı kaydedilmiştir. Rasemik diester ve diolün politransesterleşmesinde lipaz varlığında mükemmel stereoseçicilik görülmekte ancak sadece oligomerik ürünlerin oluştuğu bildirilmektedir. Kiral polimer üretimi için alternatif bir yöntem, lipazları da kapsayan belli sayıda enzim varlığında polimerleştirilebilen prokiral monomerlerin tek bir enantiomerik formda kullanımını kapsamaktadır.

Yüksek molekül ağırlıklı polimerler eski yöntemlerle daha kolay hazırlanmaktadırlar ancak uygun monomerler alkollerin lipaz katalizörlüğünde gerçekleşen transesterifikasyon reaksiyonu yada rasemik alkollerin resolüsyonu ile hazırlanabilmektedirler.

2.9.3.8 Yüzey Aktif Maddelerin Sentezinde Lipazlar [14]

Lipaz teknolojisinin ticarileşmeyi beklediği başka bir alan da yüzey aktif madde sentezidir. Günümüzde sanayi ve ev kullanımı için geliştirilen deterjanların kullanımını sınırlayan unsur bunların çevre açısından güvenli olup olmadıkları sorusudur. Benzer biçimde gıda endüstrisinde suni gıda katkı maddelerinin alerjik yan etkilerini minimuma indirmek veya ortadan kaldırmak üzere katı yönetmelikler uyarlanmaktadır. Kısacası tüketicilerde eskiye oranla bilinçlilik artmış ve "yeşil" yada "doğal" ürünlere karşı bir eğilim oluşmaya başlamıştır.

Poligliserol ve karbonhidrat yağ asidi esterleri endüstriyel deterjanlarda ve gıda formülasyonlarında emulsifiye edici (emulsifier) olarak geniş ölçüde

kullanılmaktadır (düşük kalorili mayonezler, soslar, dondurmalar, vb.) . Günümüzde kimyasal imalat yöntemlerinde yüksek miktarda enerji tüketimi ve istenmeyen yan ürün oluşumu gibi sorunlarla karşılaşılmaktadır. Ek olarak, karbonhidrat substratlarında birbirine yakın reaktiviteye sahip çifte hidroksil grup varlığında çok çeşitli yapılar elde edilebilmektedir. Örneğin farklı üreticilerden temin edilen sorbitan monoesterler laboratuarda tekrar incelendiğinde tipik bir preparatın sayısı 65'e varan bağımsız bileşiklerden oluştuğu görülmüştür. Bunların bir çoğu gaz kromatografisi ve kütle spektroskopisi ile incelenmiş ve sorbitan, izosorbid ve bunların mono, di ve tri esterlerinin çeşitli izomerleri oldukları saptanmıştır.

Lipazlar lizofosfolipidlerin üretiminde fosfolipazların yerine de kullanılabilmektedirler. Mevcut üretim metodu biraz karmaşıktır. %30 (w/w) oranında fosfolipid ve yüksek konsantrasyonlu $CaCl_2$ emulsiyonunda fosfolipaz katalizörlüğünde hidroliz reaksiyonu gerçekleştirilmektedir. Sonuç olarak enzim tekrar kullanılamamaktadır ve ısı ya da proteaz ile inaktive edilmesi gerekmektedir. Buna alternatif olarak *Mucor miehei* orijinli lipaz fosfolipidlein primer ve sekonder alkollerin transesterleşmesinde kullanılmaktadır. Bu metot ürünün geri kazanımını mümkün kılmaktadır. Kofaktör gerektirmediği gibi reaksiyon dolgu kolonlu biyoreaktörde devamlı olarak yürütülebilmektedir.

2.9.3.9. Organik Sentezlerde Lipazlar [13]

Organik kimyasal sentezlerde lipaz kullanımı giderek önem kazanmaktadır. Lipazlar çeşitli kemo-, regio- ve stereoseçici transformasyonları katalizlemekte kullanılmaktadırlar. Organik kimyada katalizör olarak kullanılan lipazların büyük kısmı mikrobiyal kaynaklıdır. Bu enzimler hidrofilik-lipofilik ara yüzeyinde etkilidirler ve reaksiyon karışımlarında bulunan organik çözücüleri tolare etmektedirler.

Enzimler su-yağ ara yüzeyinde su ile karışmayan trigliseridlerin hidrolizini katalizlemektedirler. Belirtilen şartlarda, reaksiyon karışımındaki suyun miktarı lipaz tarafından katalizlenen reaksiyonun yönünü belirlemektedir. Ortamda çok az ya da hiç su bulunmadığında sadece esterleşme ve transesterleşme tercih edilmektedir. Aşırı miktarda su bulunduğunda ise hidroliz reaksiyonu tercih edilmektedir.

2.9.3.10. Rasemik Asit ve Alkollerin Resolüsyonunda Lipazlar [13]

Lipazların stereoseçiciliğ farklı rasemik organik karışımların ayrılmasında kullanılmaktadır. Rasemik alkoller ayrıca lipaz katalizörlüğünde gerçekleşen transesterleşme reaksiyonu ile saf enantiomerlerine ayrılabilmektedirler.

Arroyo ve Sinisterra (1995) susuz ortamda *Candida antarctica* orijinli Lipaz-B katalizörlüğünde, izobutilmetilketon gibi akiral bir çözücü içinde gerçekleşen esterleşme reaksiyonunun ketoprofenin R-izomerine karşı stereoseçicilik gösterdiğini belirtmişlerdir.

Bir çalışmada da *Candida rugosa* orijinli saf bir lipaz susuz ve hafif sulandırılmış hidrofobik çözücüler içinde ham hali ile mukayese edilmiştir. Kuru n-heptanda saf lipaz ham haline göre aktivitesi daha düşük olmakla birlikte rasemik 2-(4-klorofenoksi) propanoik asitin n-butanolle esterleşme reaksiyonunda ortama çok az miktarda su ilavesiyle saf enzimin aktivitesi belirgin bir biçimde artmış, ham enzimin aktivitesinde ise artış görülmemiştir.

Yine 2-fenoksi-1-propanol *Pseudomonas sp.* lipazı katalizörlüğünde enantioseçici transesterleşme reaksiyonu ile enantiomerlerine ayrılmıştır. Weber ve arkadaşları çözücüsüz ortamda *Candida antarctica* ve *R.miehei* lipazları katalizörlüğünde yağ asitlerinin uzun zincirli tiollerle esterleşme reaksiyonunu gerçekleştirdiklerini belirlemişlerdir. Ayrıca yağ asidi metil esterlerinin alkan tiollerle çözücüsüz ortamda transtioesterleşme reaksiyonu gerçekleştirdiğini belirtmişlerdir.

2.9.3.11. Ester Sentezinde Lipazlar [13]

Lipazların ester sentezinde katalizör olarak kullanımı oldukça başarılı sonuçlar vermektedir. Kısa zincirli yağ asitlerinden üretilen esterler gıda endüstrisinde lezzet arttırıcı olarak, uzun zincirli yağ asitlerinin metil ve etil esterleri ise dizel yakıt alternatifi olarak kullanılmaktadır.

From ve arkadaşları (1997) *Candida antarctica* lipazı ile hekzan içinde laktik asit ve alkollerin esterleşme reaksiyonunu araştırmışlardır. Lie ve arkadaşları da asetilenik yağ asitlerinin farklı zincir uzunluklarına sahip 5 pozisyonel izomerinin n-butanol ile esterleşme reaksiyonunu 8 farklı lipaz katalizörlüğünde incelemişlerdir(1998). Krishnakant ve Madamwar ise silika ve mikroemulsiyon bazlı organojeller üzerinde immobilize edilen lipazları ester sentezinde kullandıklarını bildirmişlerdir (2001).

2.10. Mentolün Enzimatik Esterleşme Reaksiyonu ile İlgili Literatürde Yapılan Araştırmalar

Wang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, farklı kaynaklardan elde edilen lipazların rasemik mentolün organik çözücü içinde esterleşme reaksiyonuna etkileri incelenmiş ve en uygun lipaz saptanmıştır. Bunun dışında bu çalışmada esterleşme reaksiyonunu etkileyen faktörler olarak lipaz immobilizasyonunda kullanılan farklı taşıyıcılar, farklı yağ asitleri, ortam pH'sı, maksimum aktivite için kritik nem içeriği ve enzim karalılığı da incelenmiştir [4]. Test edilen on lipaz arasından rasemik mentolün organik çözücü içindeki resolüsyonunu en iyi katalizleyenin *Candida rugosa* orijinli lipaz olduğu saptanmıştır. Ayrıca bu lipaz farklı taşıyıcılar üzerinde immobilize edilmiş ve reaksiyon farklı açil vericilerle de yürütülmütür. En saf ürün ve en yüksek verim siklohekzan içinde, açil verici olarak valerik asit kullanılarak ve DEAE-Sephadex A-25 üzerinde immobilize edilmiş *Candida rugosa* orijinli lipaz katalizörlüğünde elde edilmiştir. DEAE-Sephadex A-25 üzerinde immobilize edilmiş lipazın, esterleşme reaksiyonunda 34 günlük sürekli kullanımı sonucu başlangıç aktivitesinin %85 ve daha fazlasını koruduğu saptanmıştır.

Bu çalışmada mentolün dönüşme miktarı (C);

C = [ester miktarı (mmol)/başlangıçtaki mentol miktarı (mmol)].100 (2.1)

Olarak tanımlanıp, pik alanından hesaplanmaktadır.
Enantiomerik aşırılık (ee_p) ise gaz kromatografi analizlerinden şu denkleme göre hesaplanmaktadır:

$$ee_p = \frac{[d]-[l]}{[d]+[l]} \tag{2.2}$$

[d]: d-mentil ester stereo izomeri
[l]: l-mentil stereo izomeri

Enantiomerik oran (E) ise ürünün dönüşme miktarı ve enantiomerik aşırılıktan (ee_p) şu formüle göre hesaplanmaktadır:

$$E=\frac{\ln[1-C.(1+ee_p)]}{\ln[1-C.(1-ee_p)]} \tag{2.3}$$

Yukarıda özet olarak verilen çalışmada; Wang ve arkadaşları öncelikle en uygun lipazı saptamak amacıyla 30°C de, organik çözücü olarak siklohekzan kullandıkları bir deney serisi gerçekleştirmişlerdir. Bu deneylerde mentol:valerik asit (0.2 M:0.125 M) karışımına enzim miktarı sabit tutulmak suretiyle enzim ilave edilmiş, deneyler on adet farklı enzim ile tekrarlanmıştır. Değerlendirme, dönüşme miktarı (C), enantiomerik aşırılık (ee_p) ve enantiomerik oran (E) kullanılarak yapılmıştır. En yüksek verim ve enantioseçicilik *Candida rugosa* orijinli lipaz ile elde edilmiştir. Test edilen lipazlar içinde sadece *Candida rugosa* lipazı ile enantiomerik oran, E= 92.3 olarak saptanmıştır ki bu da E=∞ olduğu durum kadar etkilidir. Reaksiyon hızı ve optikçe saflık açısından sadece *Candida rugosa* lipazı kabul edilebilir sonuçlar verdiğinden mentolün stereo seçici esterleşmesi için bu lipaz seçilmiştir.

Başka bir deney serisinde ise yağ asidinin *Candida rugosa* lipazının aktivitesine etkisini incelemişlerdir. Siklohekzanın organik çözücü olarak kullanıldığı bu deney serisi de 30°C de, sabit enzim miktarında ve mentol:organik asit (0.2 M:0.125 M) şartlarında gerçekleştirilmiştir. Organik asit olarak asetik asit, propiyonik asit, butirik asit, valerik asit, kaproik asit, kaprik asit, laurik asit, palmitik ve oleik asit kullanılmıştır. Asetik, propiyonik, valerik ve kaproik asitlerinin optikçe mükemmel saflıkta mentil esteri elde etmek için uygun olduğu görülmüştür. Fakat bu organik asitlerden bazıları için esterleşme veriminin çok düşük olduğunu saptamışlardır. Yaptıkları deneylerde en yüksek dönüşümün palmitik ve oleik asitte elde edildiği ancak bu asitler için optik resolüsyonun düşük olduğunu saptamışlardır. Palmitik ve oleik asit için % dönüşme sırasıyla, 50.5 ve 55.7 iken E değerleri 1.5 ve 1.3'tür. Sonuç olarak enantiomerik aşırılığı yüksek olan tüm asitler arasında sadece valerik asitin en büyük E değerini verdiğini görmüşlerdir (E=66.4). Bu nedenle farklı zincir uzunluklarındaki yağ asitleri içinden bu çalışma için valerik asiti seçmişlerdir.

Bu çalışmada bir dizi deney ile immobilize lipaz katalizörlüğünde mentil esteri oluşumuna taşıyıcı etkisi de incelenmiştir. Bu amaçla 30°C'de, enzim miktarı sabit tutularak, *Candida rugosa* lipazı 11 farklı taşıyıcı üzerinde immobilize edilmiştir. Enantiomerik aşırılık (ee_p) açısından kıyaslandığında farklı taşıyıcılar arasında hemen hemen fark görülmemiş ancak, en yüksek enantiomerik oran E= 87.7 olarak DEAE-Sephadex A-25 üzerinde immobilize edilen *Candida rugosa* lipazı kullanımında saptanmış ve daha sonraki deneylerde bu taşıyıcı kullanılmıştır.

Lipaz üretiminde lipaz çözeltisi hazırlamakta kullanılan tamponun pH değerinin mentol dönüşmesini etkileyen bir faktör olduğu görülmüştür [4]. Kilbanov bunu pH hafızası olarak adlandırmaktadır [4]. Wang ve arkadaşları pH ve mentol dönüşümü arasındaki ilişkiyi incelemek için bir dizi deney yapmışlardır. Bu deneyler pH 3-10, 0.2 M rasemik mentol ve 0.125 M valerik asit ile 30°C'de, 48 saat süresince, çözücü olarak siklohekzan ve farklı taşıyıcılar üzerinde pH 3-10'da immobilize edilmiş lipazlar kullanılmak suretiyle gerçekleştirilmiştir. Farklı taşıyıcılar için optimum pH aralığı da değişmektedir. Örneğin Sephadex G-25 üzerinde immobilize olan lipazın optimum aktivitesini, 3 ve 7 arasında bir pH aralığında gösterdiğini bulmuşlardır.

Mentol dönüşümünü etkileyen diğer önemli bir faktör de taşıyıcıların su tutma oranlarındaki farklılıktır [4]. Araştırmacılar aynı çalışma koşullarında yaptıkları deneyler sonucunda az miktardaki suyun mentol dönüşümünü arttırdığını tespit etmişlerdir. Sephadex G-25 üzerinde immobilize edilmiş lipaz ve DEAE –Sephadex A-25 üzerinde immobilize edilmiş lipazların optimum su içeriğini %10-20 ve %15-20 olarak belirlemişlerdir.

İmmobilize enzim pek çok defa çok az aktivite kaybı ile geri kazanılmıştır. Aynı reaksiyon şartlarında DEAE-Sephadex A-25 üzerinde immobilize edilen lipazın operasyonel karalılığı da incelenmiştir. Bulgulara göre immobilize lipazın kesikli tipteki operasyonunda (1 çevrim/gün) 34 günlük sürekli kullanımı sonucu başlangıç aktivitesinin %85 ve fazlasını koruduğunu saptanmıştır. Bu durum enzimin yüksek kararlılıkta olduğunu göstermektedir. Operasyonel karalılığının yüksek olması bu enzimin optikçe saf mentol üretiminde kullanımının uygun olduğunu göstermiştir [4].

Athawale ve arkadaşları ise çalışmalarında (-)-mentolün optikçe aktif olan metakrilat esterini sentezlemek üzere, rasemik mentolün *Pseudomonas cepacia* orijinli "PS" lipazı katalizörlüğünde enantioseçici transesterifikasyon reaksiyonunu incelemişlerdir [5]. Katalizör miktarı, yağ asidi türü, çözücü ve sıcaklık gibi çeşitli reaksiyon parametrelerinin dönüşme ve enantioseçiciliğe etkileri araştırılmıştır.

Lipazlar farklı substratlara karşı çok seçici olduklarından öncelikle (-)-mentolün mentil metakrilata transesterifikasyon reaksiyonu ile dönüşümünü katalizleyecek en uygun lipazın bulunması gerekiyordu. Bu amaçla bu çalışmada; 30°C de, açilleme ajanı olarak oksim metakrilat, çözücü olarak diizopropileter (DIPE) kullanmak

suretiyle 3 farklı lipaz, Lipaz PS, Lipaz PPL ve Lipaz CRL'nin katalitik aktivitelerini test etmişlerdir. Sırasıyla Lipaz PS için %98.7, Lipaz PPL için %92.1 ve Lipaz CRL için %89.9 dönüşme oranları tespit edilmiştir. Bu nedenle söz konusu reaksiyon için Lipaz-PS katalizör olarak seçilmiştir.

Lipaz katalizörlüğünde yürüyen reaksiyonlar lipaz miktarı, açil vericinin cinsi, reaksiyonda kullanılan çözücüler ve reaksiyon sıcaklığı gibi parametrelere çok duyarlı olduğundan araştırmacılar çalışmalarının ikinci adımında bu parametreleri incelemişlerdir.

Enzim miktarının reaksiyona etkisi incelendiğinde, enzim miktarını 100 U'den 1000 U'e çıkarmışlar ve (-)-mentolün (-)-mentil metakrilat esterine dönüşümünün %58.4'ten %98.1'e çıktığını saptamışlardır. 400 U'den sonra ise dönüşmedeki artışın yavaşladığını görmüşlerdir. Bu verilerden reaksiyonu verimli kılmak için gereken optimum enzim miktarına karar vermeleri mümkün olmuştur.

Organik çözücülerin yapısı ve polaritesinin enzimatik dönüşümlere etki ettiği bilinmektedir [5]. Bu nedenle araştırmacılar çalışmalarında (-)-mentolün (-)-mentil metakrilata dönüşmesine organik çözücülerin etkisini de incelemişlerdir. Organik çözücülerin polaritesi log P değeri ile ölçülür [5]. Log P, çözücünün 1-oktanol ve su arasında dağılma katsayısının logaritmasıdır [5]. Log P değeri 2'den küçük olan organik çözücülerin genellikle biyokatalizörler için iyi olmadıkları söylenmektedir [5]. Bu çalışmada 30°C de, 1000 U Lipaz-PS katalizörlüğünde, 24 saat yürütülen reaksiyonlarda, (-)-mentol-oksim metakrilat mol oranları 1/1 ve 2/1 olarak alınarak çeşitli organik çözücüler kullanılmıştır. Bu çözücüler DIPE, n-hekzan, eter, siklohekzan, toluen ve kloroformdur. Reaksiyon, çalışılan çözücüler içinde en hızlı olarak DIPE'de gerçekleşmiştir. Çözücülerin dönüşüm ve enantioseçiciliğe etkisini incelemek üzere farklı çözücüler içinde Lipaz-PS katalizörlüğünde, rasemik mentolün stereoseçici resolüsyonu ile kiral mentil metakrilat sentezlenmiştir. Buna göre kloroform ile (log P= 2.0) %8.2'lik dönüşme elde edilmiştir. Dietileter ve DIPE'nin log P değerleri düşük olmasına rağmen (log P=0.85 ve log P=2.0) dönüşmeyi yaklaşık %48 ve enantiomerik aşırılığı (% ee) ise %98 gibi yüksek değerler olarak saptamışlardır. Hekzanda dietileter ve DIPE ile benzer sonuçlar vermiştir. Siklohekzan ve toluen için düşük dönüşme fakat iyi enantiomerik aşırılık (ee%) değerleri elde etmişlerdir. Bunlara dayanarak V.Athawale ve arkadaşları

dönüşme ve enantioseçicilik için sadece log P değerinin başlı başına sonuca etki eden bir parametre olmadığına kanaat getirmişlerdir.

Athawale ve arkadaşları açil vericilerin reaksiyon üzerine etkisini incelemek üzere 3 farklı açil verici ile çalışmışlardır. Bunlar vizmetilmetakrilat, vinilmetakrilat ve oksimmetakrilat olup reaksiyonlar 30°C de, çözücü olarak DIPE kullanılarak ve 1000 U Lipaz PS katalizörlüğünde gerçekleştirilmiştir. Verilere göre reaksiyon en hızlı oksimmetakrilat, en yavaş ise metil metakrilat kullanıldığında gerçekleşmiştir. Bunun için birkaç sebep öne sürmüşlerdir. Metanol, vinil ve oksim gruplarına kıyasla geç terkeden grup olduğundan metil metakrilat kullanılan reaksiyonun dönüşme hızının en düşük olduğunu ayrıca açil verici olarak vinil esterlerinin kullanılması durumunda transesterifikasyon esnasında yan ürün olarak asetaldehit oluştuğunu, bunun ise enzim aktivitesine zaralı etkide bulunduğunu belirtmişlerdir. Aksine oksim esterlerindeyse, oksimin zayıf bir nükleofil oluşu nedeniyle tersinir reaksiyonda rol oynamadığını, bunun da dönüşme hızını arttırdığını belirtmişlerdir.

Reaksiyona sıcaklık etkisini incelemek üzere araştırmacılar (-)-mentolün oksim metakrilat ile transesterifikasyon reaksiyonunu, 25, 30, 35 °C'de 24 saat boyunca izlemişler ve (-)-mentolün (-)-mentil metakrilata dönüşümü için hız sabitlerini (k) tespit etmişlerdir. Sonuçlar reaksiyonun 1. dereceden olduğunu göstermiştir. Buna göre 25°C'den 30°C'ye çıkıldığında reaksiyon hızında 2.5 kat artış saptanmıştır. Ancak 35°C'ye çıkıldığında reaksiyon hızında %50'lik bir düşüş olmuştur. Bu 35°C'de lipazın deaktive olmasına bağlanmıştır. Araştırmacılar rasemik mentolün oksim metakrilata transesterifikasyon reaksiyonu için sıcaklığın dönüşme ve enantioseçicilik üzerine etkisini de incelemişlerdir. Rasemik mentolün (-)-mentil metakrilata dönüşmesinde sıcaklığın 20°C'den 30°C'ye yükseltilmesiyle dönüşmenin %67.7'den % 96.3'e yükseldiği tespit edilmiştir. Ancak sıcaklık 30°C'nin üstüne çıkartıldığında ise dönüşmede ani bir düşüş gözlemlenmiştir. Bunun sebebi de yüksek sıcaklıkta lipazın deaktive olmasına dayandırılmıştır. Bu nedenle iyi bir dönüşme ve enantioseçicilik için 30°C'nin en uygun reaksiyon sıcaklığı olduğuna karar verilmiştir.

Bu çalışmalarının sonucunda Athawale ve arkadaşları kiral mentil metakrilat sentezinde optimum reaksiyon koşulları olarak 1000 U Lipaz PS, 30°C reaksiyon sıcaklığı, çözücü olarak DIPE ve açilleme ajanı olarak oksim metakrilat kullanımını

belirlemişlerdir [5].

Shimada ve arkadaşları organik çözücüsüz ortamda, enzim katalizörlüğünde, (-)-mentolün uzun zincirli yağ asitleriyle esterleşme reaksiyonunu incelemişlerdir [7].

Kimyasal proses ile ester sentezi, organik çözücülü ortamda alkol ve yağ asidinin reaksiyona sokulması ile gerçekleşmektedir [7]. Kimyasal yöntemle mukayese edildiğinde biyokimyasal yöntemin birçok üstünlükleri vardır. Bunlar; i) Lipaz katalizörlüğünde sadece gerekli miktarda alkol ve yağ asidi karıştırılmak suretiyle reaksiyon yürütülür. ii) Düşük reaksiyon sıcaklığı substratların bozunmasını azaltır iii) Substrat seçiciliğinden dolayı lipaz sadece istenilen reaksiyonu katalizler iv) Şayet istenilen ester gıda sanayiinde kullanılacaksa organik çözücüsüz enzimatik proses tercih edilir çünkü gıda endüstrisinde kullanılabilen organik çözücüler sınırlıdır [7].

Shimada ve arkadaşları öncelikle (-)-mentil esterinin sentezi için uygun lipazı bulmak üzere bir deney serisi gerçekleştirmişlerdir. Mol oranı 3/1 olacak şekilde toplam 4 g oleik asit/(-)-mentol, 1g su ve 1000 U lipazdan oluşan karışım, 30ºC'de 24 saat boyunca 500 rpm hızında karıştırılmak suretiyle çeşitli lipazlarla reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. (-)-Mentolün yüzde dönüşmesi, *Candida rugosa* lipazı ile %74.6, *Pseudomonas cepacia* lipazı ile %23.5 ve *P.aeruginosa* lipazı ile %0.5 olarak bulunmuştur. Etkinliğinden dolayı *Candida* lipazı reaksiyon için seçilmiştir.

(-)-Mentolün oleik asit ile esterleşme reaksiyonuna su miktarının etkisini incelemek üzere (-)-mentol, oleik asit ile %5'den %70'e kadar su içeren ortamlarda esterleştirilmiştir. Yüksek miktarda su genellikle esterleşme miktarını düşürmektedir çünkü reaksiyon dengesini hidroliz yönüne kaydırmaktadır [7]. Yine de bu reaksiyon karışımındaki su miktarının esterleşme hızını ve dengesini belirgin oranda etkilemediği saptanmıştır. En yüksek esterleşme oranının, su içeriği %20-30 aralığında iken gerçekleştiği tespit edilmiştir.

Oleik asit miktarının (-)-mentolün esterleşme reaksiyonu üzerine etkisini incelemek üzere 30ºC'de, %30 su ve 200 U *Candida* lipazı içeren karışım ile (-)-mentol farklı miktarlarda oleik asit ile esterleştirilmiştir. Oleik asit miktarı, oleik asit ve (-)-mentolün birbirlerine olan mol oranları cinsinden ifade edilmiştir. Buna göre 6 ve 24 saat süresince, oleik asit/(-)-mentol mol oranı 0.5, 1, 2, 3 ve 5 olacak şekilde

gerçekleştirilen deneylerde mol oranı 3'e kadar esterleşmede artış görülmüş, 3 değerinden sonra 24 saatlik reaksiyon için esterleşme artışı durmuştur.

Sıcaklığın etkisini incelemek üzere oleik asit/(-)-mentol mol oranı, 3/1 olacak şekilde, %30 su ve 200 U *Candida* lipazı karıştırılmak suretiyle 20ºC'den 50ºC'ye kadar değişen sıcaklıklarda, 24 saat boyunca gerçekleştirilen reaksiyonlar sonuncunda (-)-mentolün esterleşme yüzdesi 30ºC için %75 bulunmuştur.

Enzim miktarının reaksiyona etkisini incelemek için oleik asit/(-)-mentol mol oranı 3/1 olacak şekilde, farklı miktarlarda *Candida* lipazı katalizörlüğünde reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. 6 saat sonunda esterleşmenin lipaz miktarına bağlı olduğu, 24 saat sonra ise artan miktarda lipaz ile esterleşmenin arttığı ve 400 U üzerine çıkıldığında esterleşme artışının durduğu gözlemlenmiştir.

Yapılan deneyler sonucunda optimum reaksiyon koşulları; oleik asit/(-)-mentol mol oranı 3/1, su miktarı %30, *Candida* lipazı miktarı 700 U, reaksiyon sıcaklığı 30ºC olarak saptanmıştır [7].

Shimada ve arkadaşları sentezlenen ürünün yapısını da incelemişlerdir. Bu amaçla (-)-mentolü ellerindeki yağ asitleri içinde en saf olan linoleik asit ile (-)-mentol/linoleik asit mmol oranı 12/36 olacak şekilde, 24 saat boyunca daha önce tespit ettikleri optimum reaksiyon koşullarında reaksiyona sokmuşlar ve esterleşme yüzdesini %89.3 olarak tespit etmişlerdir.

Esterleşme sonucu oluşan ürün bazik ortamda n-hekzan ile ekstrakte edilmiş ve silikajel kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Ürün içindeki yağ asidi gaz kromatografisi ile analiz edilmiştir. Sonuç olarak üründeki (-)-mentol ve metil linoleat oranı 50.5/49.5 (mol/mol) oranında tespit edilmiştir. Bu da sentezlenen ürünün eşit miktarda (-)-mentol ve linoleik asit içerdiğini göstermektedir [7].

Shimada ve arkadaşları rasemik mentolün optik resolüsyonunu incelemek maksadıyla 30ºC'de, sürekli karıştırmak suretiyle, mol oranı 3/1 olan toplam 4 g oleik asit/(-)-mentol karışımı, 1 g su ve 3500 U *Candida rugosa* lipazından oluşan karışımı 35 saat boyunca reaksiyona sokmuşlardır. Reaksiyon çözücüsüz ortamda gerçekleşmesine rağmen *Candida* lipazının (-)-mentol üzerine kuvvetli, (+)-mentole ise zayıf etki ettiği görülmüştür. 32 saat sonunda mentolün (+) ve (-) izomerlerinin esterleşme yüzdeleri sırasıyla, %5.2 ve %87.0 olarak bulunmuştur. Reaksiyon yüksek oranda enantioseçicilik göstermiştir, 32 saat sonunda (-)-mentil oleatın enantiomerik

oranı (E) 31 ve enantiomerik aşırılığı (% ee) %88 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuç rasemik mentolün *Candida rugosa* lipazı katalizörlüğünde optik resolüsyonunda organik çözücü kullanımının şart olmadığını göstermiştir.

Shimada ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalar sonucunda vardıkları sonuçlar özetle şöyledir:

Lipaz sıvı substratlar üzerine kuvvetli, katı substratlar üzerine zayıf tesir etmektedir. (-)-Mentol reaksiyon sıcaklığında katıdır ancak (-)-mentolün uzun zincirli yağ asidi ile karışımı sıvı fazda olduğundan lipaz esterleşmeyi etkin bir biçimde katalizlemektedir, bu da etkin bir esterleşme için substratlar sıvı fazda olduğu takdirde organik çözücü gerekmediğini göstermektedir.

Lipaz katalizörlüğünde esterleşme reaksiyonunun oldukça fazla miktardaki suyun varlığından etkilenmediğini, lipazın alkol ve yağ asidine karşı seçici olup esterleşme ürününü tanımadığı için denge reaksiyonunun esterleşme yönüne kaydığı tespit edilmiştir [7].

Wen-Hsin Wu ve arkadaşları rasemik mentolün n-hekzan içinde , açilleme ajanı olarak asit anhidritler kullanımı ile ve *Candida cylindracea* orijinli Lipaz AY-30 katalizörlüğünde stereoseçici esterleşme reaksiyonunu incelemişlerdir [15]. Reaksiyonun enzim kullanmadan da gerçekleşip gerçekleşmeyeceğini kontrol etmek amacı ile aynı reaksiyon 30ºC'de, 48 saat boyunca ve n-hekzan içinde yürütülmüş ve mentolün mentil esterine molar dönüşmesinin %23-30 gibi yüksek değerler ile gerçekleştiği saptanmıştır. Mentol esterleşmesinde ester ürününün molar dönüşme yüzdesi, enantiomerik oran (E) ve enantiomerik aşırılık (% ee) kapiler gaz kromatografisi yöntemi ve bir kiral kolon ile tespit edilmiştir.

Wu ve arkadaşları öncelikle esterleşme reaksiyonuna enzim etkisini incelemek üzere 30ºC'de, mentol/asit anhidrit mol oranı 1/1 olacak şekilde, sırasıyla asetik anhidrit, propionik anhidrit ve butirik anhidrit kullanmak suretiyle, Lipaz AY-30, Lipaz PS katalizörlüğünde ve enzimsiz 48 saat sürdürülen reaksiyonlar gerçekleştirmişlerdir. Bu deneylere göre enzimsiz reaksiyonda %23-30 değerinde olan dönüşüm, asetik anhidrit veya propionik anhidrit kullanıldığında, Lipaz PS katalizörlüğünde, az bir miktar artmıştır. Lipaz PS'ye kıyasla Lipaz AY-30'un aynı koşullarda mentil propionat ve mentil butirat dönüşmelerini daha belirgin bir biçimde arttırdığı da

saptanmıştır. Bu nedenle çalışmanın ileri aşamalarında Lipaz AY-30 ile çalışmaya karar verilmiştir.

Diğer yandan enzimsiz yapılan çalışmada iki enantiomer hemen hemen eşit miktarda elde edilirken Lipaz AY-30 katalizörlüğünde yapılan çalışmada (-)-mentil propionat daha fazla elde edilmiştir [15].

Mentol ve açil vericinin mol oranlarının reaksiyona etkisini incelemek üzere mentol/açil verici mol oranı 1/0.5, 1/1 ve 1/2 olacak şekilde, Lipaz AY-30 katalizörlüğünde deneyler de yapılmıştır. Buna göre eşit mol oranında alınan reaktanlarla yapılan çalışmanın optik seçicilik ve yüzde dönüşme bakımından daha iyi sonuç verdiğine kanaat getirilmiştir.

Literatürde daha önce yapılmış bir çalışma bulgularına göre Lipaz AY-30 katalizörlüğünde, çözücü olarak toluen ve reaktan olarak asit anhidrit kullanıldığında gerçekleşen enzimatik açilleme reaksiyonuna, çözünmüş halde bulunan organik ya da süspansiyon halindeki inorganik bir bazın ilavesi ile bu reaksiyonun enantioseçiciliğini E=20'den E=200'e kadar arttırmanın mümkün olduğu kaydedilmiştir [15]. Bunun sebebi ise asitin uzaklaştırılmasına bağlanmıştır [15]. Wu ve arkadaşları reaksiyona zayıf bir baz olan $NaHCO_3$ ilave etmişler ve bu bulguların aksine baz ilavesinin enantioseçiciliği etkilemediğini sadece enantiomerlerin oluşumunu ayrı ayrı arttırdığını saptamışlardır. Bu çelişkinin enzimatik reaksiyonlarda farklı reaktanlar kullanılmasından kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir [15].

Wu ve arkadaşları organik çözücülerin Lipaz AY-30 katalizörlüğünde mentilbutirat sentezinde, yüzde molar dönüşüm ve stereoseçiliğe etkilerini incelemişlerdir. Bu amaçla mentil/butirik anhidrit mol oranı 1/1, reaksiyon süresi 48 saat olacak şekilde ve çözücü olarak n-hekzan, n-heptan, izooktan, siklohekzan, benzen, toluen, metilen klorür ve kloroform kullanarak 30ºC'de bir dizi reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Çözücü olarak izooktan, n-hekzan, siklohekzan, benzen ve toluen kullanıldığında mentil butirat oluşumunda molar dönüşme stereoseçicilik açısından artmıştır. Metilen klorür ve kloroformun bu lipazı inhibe ettikleri saptanmıştır. Mentilbutiratın enantioseçici sentezi için en uygun organik çözücü olarak n-hekzan tespit edilmiştir.

Wu ve arkadaşları başka bir çalışmalarında da rasemik mentolün, organik çözücü içinde, lipaz katalizörlüğünde, vinil propioanatla stereoseçici transesterifikasyon reaksiyonunu incelemişlerdir [16].

Çalışmalarında immobilize Lipaz PS-30 ve moleküler elek kullanımının (±)-mentil propionat dönüşümünü %16'dan %35'e çıkardığını tespit etmişlerdir.

30ºC'de, (±)mentol/vinil propionat mol oranı 1/1 olacak şekilde, n-hekzan içinde ve immobilize Lipaz PS katalizörlüğünde 48 saat boyunca yürüttükleri reaksiyonda (-)-mentolün yaklaşık %50 oranında estere dönüştüğünü tespit etmişlerdir.

Mentol/vinil propionat mol oranının etkisini incelemek üzere aynı şartlarda 1/1, 1/2 ve 1/3 mol oranlarında da çalışmışlardır. Bu üç orandaki yüzde dönüşme ve stereoseçicilik miktarları birbirine yakın olarak saptanmıştır. Yine de rasemik mentolün resolüsyonu açısından 1/1 oranı daha memnun edici bulunmuştur [16].

Sıcaklığın reaksiyona etkisini görmek maksadıyla 20, 30, 40, 50 ve 60ºC'de ve daha önce belirtilen koşullarda yaptıkları deneyler sonucunda sıcaklık arttırıldıkça (-)-mentil propionata dönüşmenin %50'den %86'ya çıktığını saptamışlardır. 30-40ºC ve 50-60ºC arasındaki artış fazla belirgin olmamakla beraber dönüşmedeki en yüksek artma 40-50ºC arasında görülmüştür. Öte yandan sıcaklık yükseldikçe streoseçiciliğin azaldığını tespit etmişlerdir. Bu nedenle 60ºC'nin üstüne çıkmamaya karar vermişlerdir.

Enzim miktarı da endüstriyel uygulamada ekonomiyi etkileyen önemli bir faktördür [16]. Bu nedenle enzim miktarının etkisi de incelenmiştir. Enzim miktarı 100 U'den 700 U'e çıkartıldığında (-)-mentil propionat dönüşmesi %20'den %67'ye çıkmıştır. Ancak 300 U'den sonra yüzde dönüşmede ki artış daha az olmuştur. Şayet enzim fiyatı yüksekse 300 U'den daha fazla miktarın kullanılmasının gerekli olmadığına karar kılınmıştır.

Kullanılan organik çözücünün yapısı ve polaritesinin biyokatalizörün aktivitesini etkilediği görüşü yaygındır. Organik çözücülerin polaritesi log P değeri ile ölçülmektedir. Log P değeri 2.0'den küçük olan organik çözücüler genellikle biyokatalizörün aktivitesini düşürür[16]. Wu ve arkadaşları çalışmalarında bazı organik çözücülerin rasemik mentol ve vinil propionatın lipaz katalizörlüğünde stereoseçici resolüsyonuna etkisini incelemişlerdir. Çözücü olarak sırasıyla izooktan (log P= 4.5), n-heptan (log P=4.0), n-hekzan (log P= 3.5), siklohekzan (log P= 3.2),

toluen (log P= 2.5), benzen (log P= 2.0) ve kloroform (log P= 2.0) kullandıkları deneyleri 30ºC'de, 48 saat boyunca ve (±)-mentol/vinil propionat mol oranı 1/1 olacak şekilde gerçekleştirmişlerdir. Kloroform ortamında (±)-mentil propionat oluşumu sadece %2.2 oranında gerçekleşmiştir. İzo-oktan, n-heptan ve n-hekzan içinde (-)-mentolün, (-)-mentil propionata dönüşmesi yaklaşık %55, E ve %ee değerleri ise 200 ve %99 gibi yüksek değerler olarak tespit edilmiştir. Siklohekzan, toluen ve benzen ise düşük dönüşme, ancak daha iyi E ve %ee değerlerine ulaşılmasını sağlamıştır.

Kamiya ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada mentolün organik çözücü içinde ve yüzey aktif madde ile kaplanmış lipaz katalizörlüğünde enzimatik resolüsyonuna, lipaz türünün, reaksiyon sıcaklığının, çözücünün ve yağ asidinin alkil zincirinin uzunluğunun etkisini incelemişlerdir [6].

Lipazın orijininin etkisini görmek amacıyla 35ºC'de 6 farklı lipaz kullanarak (-)-mentol ve laurik asidin izooktan içinde 48 saat yürütülen esterleşme reaksiyonunu gerçekleştirmişlerdir. *Candida cylindracea* (Lipaz AY), *Rhizopus sp*. (Lipaz F), *Pseudomonas cepacia* (Lipaz PS), *Mucor javanicus* (Lipaz M), *Aspergillus niger* (Lipaz A) ve *Porcine pancreas* orijinli lipazları kullanmış, enzimin orijininin aktivitesini güçlü bir biçimde belirlediğini tespit etmişlerdir. Bu enzimlerin her biri gerek yüzey aktif madde (glutamik asit dioleil ester ribitol amid) ile kaplanarak gerekse toz halinde kullanılmıştır. Denemeleri sonucunda sadece *Candida cylindracea* orijinli lipazın (-)-mentil laurat sentezini etkin biçimde katalizlediğini, üstelik yüzey aktif madde ile kaplandığında çok daha yüksek aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. *Pseudomonas sp*. orijinli lipazla ise Okahata ve arkadaşlarının belirttiği kadar yüksek bir dönüşme elde edememişlerdir [6]. Bu nedenle çalışmalarında Lipaz AY kullanılmasına karar verilmiştir.

35ºC'de 30 saat boyunca izooktan içinde hem toz hem de yüzey aktif madde ile kaplanmış Lipaz AY kullanarak mentil laurat oluşumunu izlemişlerdir. Yüzey aktif madde ile kaplı enzimle yürütülen reaksiyonun dönüşme hızının toz enzimle yürütülen reaksiyona kıyasla çok daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte yüzey aktif madde ile kaplanmış enzimle yürütülen reaksiyonda (-)-mentil laurat oluşumunun (+)-mentil laurat oluşumundan daha fazla olduğunu gözlemlemişlerdir. 24 saat sonunda oluşan (-)-ester ürünü %90'ın üzerinde iken (+)-ester ürünü sadece %9 olarak tespit edilmiştir. Bu bulgulara göre yüzey aktif madde ile kaplanmış

lipazın rasemik mentolün resolüsyonu için iyi bir biyokatalizör olduğuna karar verilmiştir.

Yüzey aktif madde ile kaplanmış Lipaz AY katalizörlüğünde yürütülen reaksiyonda sıcaklığın (-)-mentol ve (+)-mentol esterleşmesinde başlangıç hızına etkisini görmek amacıyla 10ºC'den 60ºC'ye kadar değişen sıcaklıklarda deneyler yapılmıştır. Deneylerin sonucunda reaksiyon sıcaklığının enzimatik aktiviteyi büyük ölçüde etkilediği ve optimum sıcaklık aralığının oldukça dar olduğu belirlenmiştir. Buna göre optimum reaksiyon sıcaklığı 35ºC civarında saptanmış, reaksiyonun 35ºC'de yürütülmesine karar verilmiştir.

Organik çözücülerin enantioseçiciliğe etkisini görmek amacıyla log P ile ifade edilen hidrofoblukları birbirinden farklı olan 19 adet çözücü temin edilmiştir. Hidrofilik çözücüler olan 1,4-dioksan (log P= -1.1), metanol (log P= -0.78), asetonitril (log P= -0.33) ve etanol (log P= -0.24) ile yapılan denemelerde, yüzey aktif madde ile kaplanmış Lipaz AY mentolün esterleşme reaksiyonunu katalizlememiştir. Öte yandan tetrahidrofuran (log P=0.49), dietileter (log P=0.85) ve kloroform (log P=2.0) ortamlarında enzim çözündüğü ve berrak çözeltiler elde edildiği halde enzim katalitik aktivite gösterememiştir. Bu da hidrofilik çözücülerde lipaz-yüzey aktif madde kompleksinin çözünebilirliğinin enzim aktivitesini etkilemediğini göstermektedir.

Bu çalışmada aromatik çözücülerle yürütülen reaksiyonların ilk hızları ve enantioseçicilikleri de saptanmıştır. Yüzey aktif madde ile kaplanmış lipaz, benzen ve toluende oldukça yüksek ilk hızlar vermiştir. Bu lipaz toluende (-)-mentol ile benzen ortamında elde edilene göre iki kat fazla aktivite göstermiştir. (-)-Mentolün benzen ortamındaki daha düşük esterleşme hızı enantioseçicilikte de bir azalmayla sonuçlanmıştır. Aromatik çözücüler içinden sadece toluenin bu reaksiyon için uygun olduğuna karar verilmiştir. Ayrıca o-, m- ve p-ksilen içinde yürütülen reaksiyonlarda yüzey aktif madde ile kaplanmış lipazın reaksiyonu hiç katalizlemediği de saptanmıştır. Bu durum çözücünün inhibisyon etkisi yapmasıyla açıklanmıştır. Sonuç olarak çözücü yapısındaki küçük bir değişimin çok farklı sonuçlara neden olduğu saptanmıştır.

Alifatik çözücülerin, (-) ve (+)-mentolün laurik asitle yüzey aktif madde ile kaplanmış lipaz katalizörlüğünde yürütülen esterleşme reaksiyonuna etkisini

inceledikleri çalışmada çözücü yapısının enzimatik reaksiyonun aktivitesine çok duyarlı olduğunu görmüşlerdir. Siklohekzan ve izooktan dışındaki çözücülerde, çözücülerin hidrofobluğu arttıkça ilk hızın da arttığını saptamışlardır. Siklohekzan ve izooktanla elde edilen sonuçlarda ilk hızların yüksek olmasını organik çözücülerdeki yapısal farklılıklara bağlamışlardır. Yüzey aktif madde ile kaplanmış lipazın düz zincirli çözücülere oranla siklohekzan ve izooktanda daha yüksek aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir.

Hekzan ve heptan içinde gerçekleştirilen reaksiyonların enantioseçiciliği yüksek olmakla birlikte pentan içinde gerçekleştirilen reaksiyonun enantioseçiciliğinin düşük olmasının sebebini (-)-izomerin reaksiyon hızının düşük olması olarak göstermişlerdir. Oktan ve dodekan'da ise (+)-izomerin ester oluşum hızının artmasına bağlı olarak enantioseçicilikte düşme eğilimi gözlemişlerdir. (+)-izomerin esterleşmesinde ilk hız yüksek olduğundan siklohekzanda da yüksek katalitik aktivite gözlenmiştir ancak enantioseçiciliğin düşük olduğu görülmüştür. Reaksiyon hızı ve enantioseçicilik bakımından en iyi sonuçlar izooktan ortamında elde edilmiş ve reaksiyon için organik çözücü olarak izooktan kullanılmasına karar verilmiştir.

Karbon zincirlerinin uzunlukları 4 ve 18 arasında değişen yağ asitleri kullanılarak da yağ asidinin reaksiyona etkisi incelenmiştir. Uzun alkil zincirine sahip yağ asitleri kısa zincirlilere kıyasla daha yüksek reaksiyon hızı göstermişlerdir.

Kamiya ve arkadaşları başka bir çalışmalarında mentol ve laurik asidin kuru izooktan içinde yüzey aktif madde ile kaplanmış lipaz katalizörlüğünde enantioseçici esterleşme reaksiyonunu kinetik açıdan incelemişlerdir [17]. Bu reaksiyonun maksimum reaksiyon hızını (V_{maks}), Michaelis sabitlerini ($K_{m,yağasidi}$, $K_{m,mentol}$) ve inhibisyon sabitini (K_i) tesbit etmişlerdir. *Candida rugosa* orijinli lipazın substrat seçiciliğini araştırmak üzere (-)-mentol ve farklı zincir uzunluklarındaki yağ asitleri (C_{14}-C_{16}) ile çalışmışlardır.

(+)-Mentol veya (-)-mentolün yağ asitleriyle 35ºC'de gerçekleştirdikleri reaksiyonun kinetik parametrelerini tespit etmek amacıyla toplam 10 mL izooktan içinde, herbir substrat için standart konsantrasyonları 5, 10, 20 ve 50 mM olarak seçilmiştir. Enzim konsantrasyonu ise 0.4 g/L olacak şekilde sabit tutulmuştur.

(-)-Mentol ve laurik asidin kullanıldığı bir dizi deneyde, bu iki substratın konsantrasyonları 5, 10, 20, 50 mM olacak şekilde toplam 16 adet başlangıç hızı

tespit edilmiştir. Mentolün yüksek konsantrasyonları ve laurik asidin düşük konsantrasyonlarında inhibisyon gözlenmiştir. Sabit (-)-mentol konsantrasyonunda başlangıç hızlarının laurik asit konsantrasyonlarına karşı grafiği çizildiğinde yüzey aktif madde ile kaplanmış lipaz, yüksek mentol konsantrasyonunda mentol ile reaksiyona girerek kör noktaya dek lipaz-mentol kompleksi oluşturmaktadır.

Hesaplamalarda kullanılan eşitlikler şunlardır [17];

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{maks}}\{\frac{K_{m(MTL)}}{[MTL]} + 1\} + \frac{K_{M[LA]}}{V_{maks}}\{1 + \frac{[MTL]}{K_i}\}\frac{1}{[LA]} \quad (2.4)$$

V_{maks}=Maksimum başlangıç hızı

[MTL]=(-)-Mentolün başlangıç konsantrasyonu

[LA]= Laurik asidin başlangıç konsantrasyonu

$K_{m(MTL)}$ ve $K_{m[LA]}$ =(-)-Mentol ve laurik asit için Michaelis sabitleri

K_i= İnhibisyon sabiti

Mentol konsantrasyonu 5, 10, 20 ve 50 mM için 1/v ve 1/[LA] grafikleri çizilerek herbir mentol konsantrasyonu için 4 adet kesim noktası ve 4 adet eğim elde edilmiştir. Grafikteki eğim ve kesim noktası şu şekilde gösterilmektedir;

$$\text{Kesim noktası} = \frac{1}{V_{maks}} + \frac{K_{m[MTL]}}{V_{maks}} . \frac{1}{[MTL]} \quad (2.5)$$

$$\text{Eğim} = \frac{K_{m[LA]}}{V_{maks}} + \frac{K_{m[LA]}}{V_{maks} . K_i}[MTL] \quad (2.6)$$

Elde edilen kesim noktaları 1/[MTL]'ye karşı grafiğe geçirilecek olursa elde edilen doğru eğimi $K_{m(MTL)}/ V_{maks}$, kesim noktası ise $1/ V_{maks}$'a eşit olur. Eğimlerde mentol konsantrasyonları olan [MTL]'ye karşı grafiklenecek olursa buradaki doğru eğimi de $K_{m[YA]}/ (V_{maks} * K_i)$, kesim noktası ise $K_{m[YA]}/ V_{maks}$' eşit olur [17].

$K_{m[YA]}$= Yağ asidinin Michaelis sabiti

(+)-Mentol ve laurik asit için esterleşme kinetiği de aynı biçimde incelenebilir.

Bu çalışma sonucunda (-)-mentol ve laurik asit ile yürütülen çalışmanın maksimum başlangıç hızınının (V_{maks}), (+)-mentol ve laurik asit ile gerçekleştirilen çalışmanın

başlangıç hızının yaklaşık 100 misli olduğunu tespit etmişlerdir. Öte yandan iki çalışmanın K_m ve K_i değerleri birbirine yakın bulunmuştur.

Kamiya ve arkadaşları önceki çalışmalarında yağ asitlerinin alkil zincirlerinin uzunluğunun *Candida rugosa* orijinli ve yüzey aktif madde ile kaplanmış lipazın aktivitesini etkilediğini göstermişlerdir. Laurik (C_{12}), miristik (C_{14}) ve palmitik (C_{16}) asitlerin başlangıç hızlarının yüksek olduğunu tespit etmişlerdi. Buna dayanarak bu çalışmalarında yağ asitlerinin reaksiyon mekanizmasına olan etkisini kinetik açıdan irdelemek maksadıyla bu üç yağ asidini seçmişlerdir. (-)-Mentol ve yağ asitlerinin esterleşme reaksiyonu sonunda buldukları sonuçlara göre farklı yağ asitleri için hesaplanan K_m değerleri alkil zincirlerinin uzunlukları ile orantılı değildir. Öte yandan üç yağ asidi için de maksimum başlangıç hızlarının neredeyse aynı olduğunu belirlemişlerdir. Lipazın substrat seçiciliği herbir yağ asidinin K_m değerlerinin farklı bulunmasına neden olmuştur. Sonuçlar göstermektedir ki yağ asidinin bağlanma prosesi (-)-mentol esterleşmesinde tüm reaksiyon hızını belirlemektedir.

Babalı ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada izooktan ortamında (-)-mentolün yağ asitleri ile esterleşme reaksiyonunu *Candida rugosa* orijinli toz enzim Lipaz AY"Amano"30 katalizörlüğünde başarılı bir biçimde gerçekleştirmişlerdir. (-)-Mentol konsantrasyonu 200 mM olarak sabit tutulmak suretiyle esterleşme reaksiyonuna sıcaklık, enzim miktarı, (-)-mentol/yağ asidi mol oranı ve yağ asidi cinsi etkilerini incelemişlerdir. Esterleşme reaksiyonu için optimum şartlar olarak belirlenen 35°C'de, (-)-mentol/laurik asit mol oranı 1/1 olacak şekilde, 1.5 g enzim/g(-)-mentol miktarında enzim katalizörlüğünde ve 0.1 g moleküler elek varlığında 48 saat sonunda (-)-mentol dönüşmesi %93 olarak saptanmıştır. (-)-Mentol/yağ asidi mol oranı 2/1 olacak şekilde 24 saat boyunca, çeşitli yağ asitleriyle gerçekleştirilen deneyler sonucunda elde edilen en düşük yağ asidi dönüşümü miristik asit ile olup %78'dir, en yüksek yağ asidi dönüşmesi ise margarik asit ile olup %98 olarak saptanmıştır. (-)-Mentol ve laurik ile gerçekleştirilen esterleşme reaksiyonuna (-)-mentol/laurik mol oranının etkisini incelemek maksadıyla sırasıyla 2/1, 1/1 ve 1/2 mol oranlarında 48 saat sonunda elde edilen molar laurik asit dönüşmeleri sırasıyla %98, %93 ve %49 olarak belirlenmiştir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMA

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Gerçekleştirilen deneylerde iki farklı ticari lipaz kullanılmıştır. Bunlar, *Pseudomonas cepacia* orijinli Lipaz PS (1308 U/g_{enzim}) ve *Candida rugosa* orijinli Lipaz AYS (9660 U/ g_{enzim}) olup Amano Pharmaceutical Co. Ltd.'den temin edilmiştir. Yağ asitleri olarak Hopkin&Williams Ltd. ürünü %90'lık laurik asit (12:0) ve Alemdar Kimya San ve Tic.A.Ş. ürünü olan %88'lik oleik asit (18:1) kullanılmıştır. (-)-Mentol ve (±)-mentol Haarmann&Reimer GmbH orijinli olup Eczacıbaşı İlaç Sanayi ve Tic. A.Ş. tarafından hediye edilmiştir. Çözücü olarak kullanılan izo-oktan %99.5 saflıktadır ve Carlo Erba Reagenti markalıdır. Diğer tüm çözücüler ise Merck markalı ve analitik saflıktadır. Bunların dışında deneylerde Türk Henkel Kimyevi Maddeler Sanayi ve Tic. A.Ş.'den temin edilen 4 Å'lük moleküler elek kullanılmıştır.

3.2. Enzimlerin Aktivitelerinin Tayini [19]

Deneylerde kullanılan enzimlerin aktiviteleri zeytinyağı yöntemi ile tayin edilmiştir [19]. Öncelikle aktivitesi tayin edilecek enzim yaklaşık 10 mg/mL olacak şekilde distile suda çözülerek enzim çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra, enzim aktivitesinin tayini için bir erlene, sırasıyla 1 mL zeytinyağı, 0,5 mL 0.1 M $CaCl_2$, 2 mL pH=7 fosfat tamponu ve 5 mL distile su konulmuş, aynı reaktifler kullanılarak biri zeytinyağı, diğeri enzim çözeltisi içermeyecek şekilde iki adet şahit deneme karışımları hazırlanmıştır. Bu amaçla zeytinyağı içermeyen erlene, karışımın aynı hacimde olması amacıyla 0,5 mL 0.1 M $CaCl_2$, 2 mL pH=7 fosfat tamponu ve 6 mL distile su konulmuştur. Enzim çözeltisi içermeyecek erlene ise1 mL zeytinyağı , 0,5 mL 0.1 M $CaCl_2$, 2 mL pH=7 fosfat tamponu ve 6 mL distile su konulmuştur. Ardından üç erlen 37ºC'de sabit hızda çalışan bir çalkalayıcı içine yerleştirilerek tüm karışımlar 10 dakika karıştırılmıştır. 10 dakika sonunda enzim çözeltisi içermeyecek erlen dışındaki her iki erlene 1'er mL enzim çözeltisi ilave edilmiş ve karıştırma işlemine 20 dakika daha devam edilmiştir. Daha sonra üç karşıma da 20 mL etanol-

aseton karışımı (1:1, hacmen) ilave edilerek enzimatik reaksiyonlar durdurulmuştur. Hidroliz reaksiyonu sonucunda zeytinyağından açığa çıkan yağ asitlerinin miktarını tespit etmek için her iki karışım da timolftalein indikatörlüğünde NaOH çözeltisi ile titre edilmiştir. Bir birim lipaz aktivitesi (U) 37ºC'de 1 dakikada 1 μmol serbest yağ asidini açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmakta olup spesifik aktivite aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır:

$$\text{Spesifik aktivite} = \frac{(V_1 - V_2 - V_3).1000.N}{20.C} \qquad (3.1)$$

Bu eşitlikte;

V_1= Numune için sarfedilen NaOH hacmi (mL)

V_2= Zeytinyağı içermeyen şahit için sarfedilen NaOH hacmi (mL)

V_3= Enzim çözeltisi içermeyen şahit için sarfedilen NaOH hacmi (mL)

N= NaOH çözeltisinin normalitesi

C= 1 mL enzim çözeltisinde bulunan enzim miktarı (g) dır

3.3. Kimyasal Yöntemle Mentol-Yağ Asidi Esterlerinin Hazırlanması

İleride gerçekleştirilecek olan enzimatik mentol-yağ asidi esterleşme reaksiyonlarında ürün olarak ortaya çıkacak mentol-yağ asidi esterlerinin gaz kromatografisi ile yapılacak analizlerinde, esterlerin kromatogramdaki piklerinin yerini (her bir bileşiğin kolonda alıkonma zamanlarını) tespit etmek amacıyla, mentol esterleşme reaksiyonu önce kimyasal yöntemle yürütülmüş ve elde edilen ester ürün gaz kromatografisi ile analiz edilmiştir. Kimyasal yöntem ile mentol-yağ asidi esteri hazırlamak amacıyla, toplam kütle 10 g olacak şekilde, 1/1 mmol oranında (-)-mentol/yağ asidi alınıp 250 mL'lik bir balon konulmuş ve karışım yaklaşık 40 mL ksilen ilave edildikten sonra geri soğutucu altında 8 saat kaynatılarak esterleşme reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonunda ksilen döner buharlaştırıcıda uzaklaştırılarak esterleşme ürünü kazanılmıştır. Daha sonra bu esterleşme ürünleri, bölüm 3.5'de belirtilen gaz kromatografik analiz koşullarında, kapiler gaz kromatografisi ile incelenmiş, kolonda alıkonma süreleri belirlenmiştir.

3.4. Enzimatik Esterleşme Reaksiyonlarının Gerçekleştirildiği Deney Düzeneği ve Çalışma Şartları

Reaksiyonlar, ısıtıcılı manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiş bir su banyosu içine oturtulan 25 mL'lik şilifli kapağı olan cam balonun içinde gerçekleştirilmiştir. Tüm reaksiyonlarda mentol konsantrasyonu 200 mM olarak sabit tutulmuştur. Literatürden edinilen bilgilerin değerlendirilmesi sonucu, mentolün yağ asitleriyle esterleşme reaksiyonunda gerek dönüşme gerekse enantioseçicilik açısından yağ asidi olarak oleik asit ve çözücü olarak da izooktan ile iyi sonuç alındığı görüldüğünden, yağ asidi olarak tüm çalışmalarda oleik asit, çözücü etkisinin incelendiği ve çözücüsüz ortamda yürütülen deneyler haricinde ise izooktan ile çalışılmıştır. *Candida rugosa* orijinli Lipaz AYS ile yapılan deneylerin tümünde belli mol oranlarındaki mentol ve oleik asit sırasıyla balona konulup üzerine 10 mL çözücü ilave edilmiş ve karışım yaklaşık 10 dakika istenilen sıcaklığa erişene kadar ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda 500 dev/dak hızla karıştırılmıştır. İstenilen sıcaklığa ulaşıldıktan sonra ortama enzim ilave edilmiş ve 1 dakika sonra ilk numune alınmıştır. Bu numune 0.saat numunesi olarak adlandırılmıştır. 1. saat numunesi alındıktan hemen sonra karışıma, esterleşme sırasında açığa çıkacak olan suyu uzaklaştırmak amacı ile, daha önceden etüvde 24 saat 120ºC'de nemi giderilip aktive edilen 4 Å'lük moleküler elek ilave edilmiştir.

Pseudomonas cepacia orijinli Lipaz PS ile yürütülen esterleşme deneylerinde ise ağırlıklı olarak çözücüsüz ortamda çalışılmış ve moleküler elek kullanılmamıştır. Bu çalışmalarda, yine belli mol oranlarında tartılan mentol ve oleik asit balona konulmuş ve ortama belli miktarda su ilave edildikten sonra karışım yukarıda anlatılan şekilde istenilen deney sıcaklığına getirilmiştir. Ardından istenilen sıcaklığa gelmiş karışıma enzim ilave edilmiş ve yine 1 dakika sonra 0.saat numunesi alınmıştır. Lipaz PS ile yapılan çalışmalarda manyetik karıştırıcı hızı 700 dev/dak ve 500 dev/dak olarak değiştirilmiştir. Belirli zaman aralılarıyla alınan tüm numuneler, derhal 90ºC deki su banyosunda daldırılıp 15 dakika bu sıcaklıkta ısıtılıp enzimin inaktive olması sağlanmıştır. 15 dakika sonra numuneler, 3 dakika 10000 devir/dak (=21000xg) hızla santrifüjlenerek iki fazın ayrılması sağlanmıştır. Üst fazda bulunan ester ürünleri altta kalan enzim fazından ayrılmış ve susuz Na_2SO_4 ile kurutulduktan sonra gaz kromatografisi ile analiz edilmiştir.

3.5. Gaz Kromatografik Analiz Koşulları

Tablo 3.1'de gaz kromatografik analiz koşulları görülmektedir.

Tablo 3.1. Gaz Kromatografik Analiz koşulları

Dedektör Tipi sıcaklığı(ºC)	FID 280
Enjektör Tipi sıcaklığı(ºC)	Dağıtmalı 250
Gaz Hızları (ml/dak) Taşıyıcı gaz (N_2) Hidrojen Hava Dağıtma oranı	 4,3 35 400 24:1
Fırın sıcaklığı	170ºC (5 dak), 170-275ºC (10ºC/dak) 275ºC(10 dak)
Kolon tipi	Kapiler kolon Ultra 1*

* 25m x 0.32 mm x 0.52 μm film kalınlığında %100 polisiklosan

Bu şartlarda öncelikle farklı derişimlerde hazırlanan (-)-mentol-izooktan ve yağ asidi-izooktan çözeltilerinin kapiler gaz kromatografik analizleri yapılarak bu maddelerin kolonda alıkonma süreleri ile her bileşik için dedektör cevap faktörü belirlenmiştir.

3.6. Gaz Kromatografisi ile Yapılan Analizlerin Değerlendirilmesi ve Hesaplamalar [20]

Hesaplamalarda ve kromatogramların değerlendirilmesinde mentolün esterleşme reaksiyonu ile ilgili daha önce yapılmış bir yapılmış çalışma referans alınmıştır [20]. Bu çalışmada yer alan bilgilerin ışığında mentol-yağ asidinin izooktan içinde ve ksilenli ortamda gerçekleştirilen esterleşme reaksiyonuna ait ürünlerin analizinde, yağ asidi, mentol ve mentol esterlerine ait dedektör cevap faktörleri 1 olarak kabul edilmiştir. Dolayısıyla her bir bileşik için pik alanlarından hesaplanan alan yüzdeleri ürün bileşimi (%ağırlık) olarak kabul edilmiştir. Ancak enzimatik reaksiyon sonucu ele geçen ürünlerin analizinde elde edilen kromatogramlardaki mentol, yağ asidi ve esterlerin pik alanlarından yola çıkılarak ağırlık yüzdeleri hesaplandığında düşük yağ asidi dönüşümlerinde ester oluşmasına rağmen mentol miktarındaki azalmanın

dedektör tarafından algılanamadığı saptanmıştır. Buradan yola çıkılarak bu ağırlık yüzdeleri ile hesaplanan dönüşümlerin gerçek değerleri yansıtmadığına karar verilmiştir. Sonuç olarak hesaplamalarda kromatogramlarda sadece yağ asidi ve esterlerin pik alanlarından birbirlerine göre relatif ağırlık yüzdeleri hesaplanmış, estere ait relatif ağırlık yüzdesi yardımıyla oluşan ester miktarı (mmol), dönüşüm ve gerçek bileşimler hesaplanmıştır [20].

Hesaplamalarda kullanılan formüller aşağıda verilmiştir;

	Mentol	+	Oleik Asit	↔	Mentil Oleat	+	Su
T=0			Y mmol		0		0
T=t			(Y –x) mmol		x mmol		

$$\%\text{Ester} = \frac{x.M_E.100}{x.M_E + (Y - x).M_{YA}} \tag{3.2}$$

$$\%\text{Dönüşüm} = \frac{x}{Y}.100 \tag{3.3}$$

Formüllerde;

%Ester = Estere ait relatif ağırlık yüzdesi

x = Dönüşen mol sayısı (mmol)

Y= İnkübasyondan önce reaksiyon ortamındaki yağ asidi mol sayısı (mmol)

M_E = Oluşan esterin mol ağırlığı (g/mmol)

M_{YA}= Yağ asidi mol ağırlığı (g/mmol)

T= Zaman

Gerçek ürün bileşimi;

	Mentol	+	Oleik Asit	↔	Mentil Oleat	+	Su
T=0	M_T		Y_T		0		0
T=t	(M_T-x.M_M)		(Y_T –x.M_{YA})		x.M_E		x.M_S

$$\%M=\frac{M_T - x.M_M}{TA - x.M_S}.100 \quad (3.4)$$

$$\%YA=\frac{Y_T - x.M_{YA}}{TA - x.M_S}.100 \quad (3.5)$$

$$\%E=\frac{x.M_E}{TA - x.M_S}.100 \quad (3.6)$$

formüller yardımıyla hesaplanmıştır. Formüllerde,

%M= İncelenen numunedeki mentol miktarı (%Ağırlık)

%YA= İncelenen numunedeki yağ asidi miktarı (%Ağırlık)

%E= İncelenen numunedeki ester miktarı (%Ağırlık)

M_M= Mentol mol ağırlığı (g/mmol)

M_T= Esterleşme reaksiyonu için alınan mentol miktarı (g)

Y_T= Esterleşme reaksiyonu için alınan yağ asidi miktarı (g)

TA= M_T+ Y_T= Esterleşme reaksiyonu için alınan mentol ve yağ asidi toplam ağırlığı (g)

M_S= Suyun mol ağırlığı (g/mmol) olarak verilmiştir.

Kromatogramlardaki pik alanlarının yüzdeleri kullanılarak yapılan çalışmalarda yağ asidi dönüşümünün %10'dan büyük olduğu durumlarda, mentol pik alanı dikkate alınarak hesaplama yapıldığı takdirde mentoldeki azalmanın da dedektör tarafından algılandığı belirlenmiş ve bu aşamadan itibaren her iki yöntemle elde edilen sonuçların birbirlerine çok yakın oldukları görülmüştür [20].

Bu verilere dayanarak çalışmanın ileri aşamalarında tüm hesaplamalarda sadece yağ asidi ve esterler dikkate alınarak belirlenen relatif ağırlık yüzdeleri üzerinden yapılmasına karar verilmiştir.

3.7. Lipaz PS ile Yapılan Çalışmalar

Literatürdeki bilgilerin değerlendirilmesi sonucunda *Pseudomonas cepacia* orijinli Lipaz PS'nin bazı esterleşme reaksiyonlarını başarılı bir biçimde katalizlediği görülmüştür. Bu nedenle mentolün yağ asidiyle esterleşme reaksiyonu için öncelikle bu enzimle çalışılmasına karar verilmiştir.

Shimada ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Lipaz PS kullanılmış ve esterleşme reaksiyonu 30ºC' de, çözücüsüz ortamda yürütülmüştür. 3/1 (mol/mol) oranında (-)-mentol ve oleik asit kullanılan reaksiyonda, toplam ağırlık 4 g olacak şekilde mentol ve oleik asit ile hazırlanan karışıma ayrıca 1 g su ilave edilmiştir. 1000 U enzim kullanılarak yürütülen reaksiyonda karıştırma hızı 500 rpm ve reaksiyon süresi 24 saat olarak alınmıştır. Bu reaksiyon sonucunda %23.5 oranında dönüşme elde edilmiştir [7]. Bu bilgiye dayanarak, öncelikle Lipaz PS ile aynı şartlarda bir çalışma yapılmasına, % 23.5 civarında bir dönüşme elde ettikten sonra da bu dönüşme oranını arttırmaya yönelik deneyler gerçekleştirilmesine karar verilmiştir.

Yukarda açıklandığı gibi, Lipaz PS kullanılan çalışmalarda, reaksiyonlar ilk olarak 30ºC'de ve çözücüsüz ortamda, yukarda açıklanan koşullarda yürütülmüştür. 700 dev/dak karıştırma hızında ve 400 U enzim katalizörlüğünde 24 saat sürdürülen bir reaksiyon sonunda mentol dönüşmesinin ancak %1.5 olduğu saptanmıştır. Bunu takiben yaklaşık sekiz deney daha yapılarak her birinde karıştırma hızı, enzim miktarı, ortama çözücü ilavesi, aynı miktardaki enzimin 1 g suda çözüldükten sonra ortama ilavesi ve ortamdaki su miktarı değiştirilerek dönüşmenin arttırılmasına çalışılmış ancak %1.5 üzerinde dönüşme sağlanamamıştır. Yapılan deneylerin şartları ve değiştirilen parametreler sonucu elde edilen dönüşme miktarları Ek A'da bir tablo halinde sunulmaktadır.

Deneyler esnasında sürdürülmekte olan literatür araştırmalarında, Zuegg ve arkadaşlarının primer ve sekonder kiral alkollerin ester hidrolizinde lipazların seçiciliği üzerine yaptıkları bir çalışmaya rastlanmıştır [21]. Bu çalışmaya göre, *Pseudomonas cepacia* orijinli lipazlar *Candida rugosa* orijinli lipazlara göre daha

küçük bir aktif merkeze sahiptirler. Bu durum sekonder alkollerin esterlerinin oluşmasında büyük kısıtlamaya yol açmaktadır. Bağlanma bölgesinin küçük oluşu esterlerin asit kısmının enzim seçiciliğini de kötü etkilemektedir. Bu nedenle sekonder alkollerin enzimatik esterleşme reaksiyonu için *Candida rugosa* orijinli lipazların *Pseudomonas cepacia* orijinli lipazlara göre daha uygun oldukları belirtilmiştir.

Gerek yapılan deneylerden sonuç alınamaması, gerekse edinilen bu bilgi doğrultusunda çalışmanın ilerleyen safhalarında deneylerin *Candida rugosa* orijinli Lipaz AYS ile yürütülmesine karar verilmiştir.

3.8. Lipaz AYS ile yapılan çalışmalar:

Lipaz AYS 'nin esterleşme reaksiyonuna etkisini görmek amacıyla bir ön deneme reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu esterleşme reaksiyonu 10 mL izooktan kullanılarak, mentol molaritesi 200mM olacak şekilde, 2/1 (-)-mentol/oleik asit mol oranında, 35ºC'de ve 500 dev/dak karıştırma hızı altında, daha önce Bölüm 3.4'de açıklandığı şekilde yürütülmüştür. Reaksiyon süresi 24 saat olarak seçilmiştir. 19728 U enzim kullanılan bu çalışmada, 2.saatin sonunda mentol ve yağ asidi dönüşmesinin sırasıyla %50.7 ve %98.1 olduğu tespit edilmiştir. Alınan sonuçlar doğrultusunda çalışmanın Lipaz AYS ile sürdürülmesi kesinlik kazanmıştır.

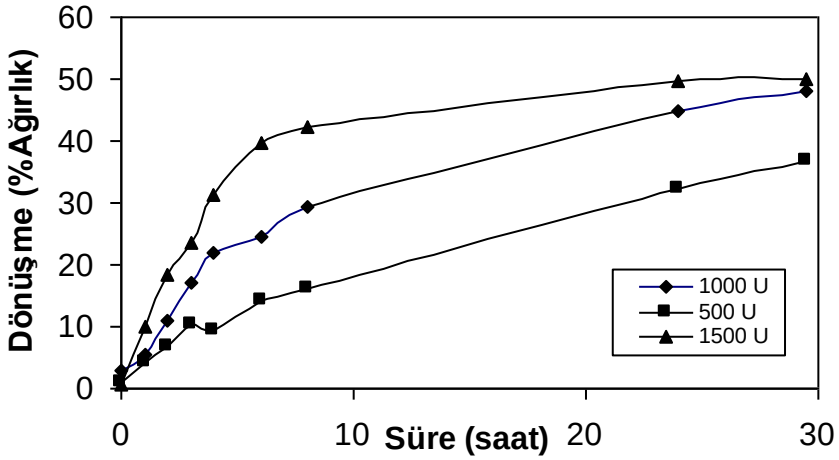
3.8.1. Enzim Miktarının Etkisi

Enzim miktarının (-)-mentol/oleik asit esterleşmesine etkisini incelemek üzere gerçekleştirilen çalışmalarda, enzim miktarı, (-)-mentol/yağ asidi mmol oranı 2/1 olacak şekilde sabit tutularak ve ortamda bulunan (-)-mentol miktarına bağlı olarak belirlenmiştir. Enzim miktarının (-)-mentol miktarına bağlı olarak belirlenmesinin nedeni, mikroemülsiyon sisteminde gerçekleştirilen mentol-yağ asidi esterleşme reaksiyonlarında yağ asidi konsantrasyonundaki artışın, belli bir değerden sonra başlangıç hızını düşürmesidir [20].

Reaksiyonlar 35ºC'de 24 saat sürdürülmüştür. Deneylerde kullanılan enzim miktarları 19728, 1500, 1000 ve 500 U olarak seçilmiştir. Bu miktarlardaki enzimlerle 24 saat sonunda elde edilen yağ asidi dönüşümleri sırasıyla %50.9, %49.6 %45.0 ve %32.3 olarak saptanmıştır.

Bu reaksiyonlarda elde edilen ester ürünlerinin gaz kromatografik analiz sonuçlarından hesaplanan yağ asidi ve esterin birbirlerine göre relatif ağırlık yüzdeleri, numunelerin gerçek bileşimleri, yağ asidi ve mentol dönüşümleri (% ağırlık) ve her bir reaksiyona ait başlangıç hızlarının değerleri sırasıyla Ek B, Ek C, Ek D, Ek E ve Ek P'da verilmiştir.

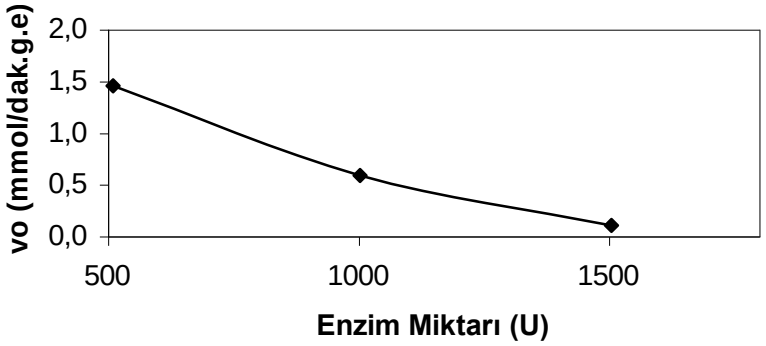
Şekil 3.1 'de enzim miktarının mentol dönüşümüne etkisi görülmektedir.



Şekil 3.1. Enzim miktarının mentol dönüşümüne etkisi
[(-)-mentol/oleik asit = 2/1; 35ºC; 0.1 g moleküler elek]

Şekil 3.1' de görüldüğü üzere enzim miktarı arttıkça mentol dönüşümü de yükselmiştir. Enzim miktarı ilk denemede, reaksiyonun Lipaz AYS tarafından katalizlenip katalizlenmeyeceğini görmek amacıyla 19728 U olarak alınmıştı. Pratikte bu kadar yüksek miktardaki enzimle çalışmak uygun ve ekonomik değildir. Bu çalışma dışında en yüksek dönüşüm 1500 U enzim ile elde edilmiştir. Ancak bu dönüşüm değeri ile 1000 U enzim ile yapılan çalışmada yaklaşık 24 saat sonunda ulaşılan dönüşme arasında çok belirgin bir fark yoktur. Bu nedenle ekonomi açısından 1000 U miktarında enzim ile çalışılması uygun görülmüş ve çalışmanın ilerleyen aşamalarında bu miktardaki enzim kullanılmıştır.

Şekil 3.2 'de de enzim miktarı ile başlangıç hızları arasındaki ilişki gösterilmektedir.



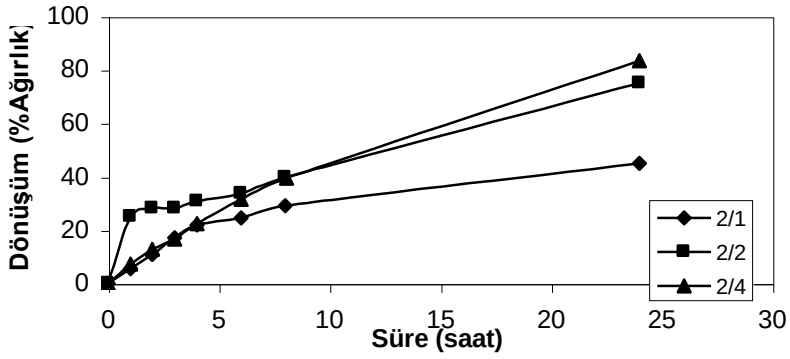
Şekil 3.2. Enzim miktarının başlangıç hızına etkisi
[(-)-mentol/oleik asit = 2/1; 35ºC]

Enzim miktarı azaldıkça başlangıç hızının arttığı görülmektedir.

3.8.2 Mol Oranının Etkisi

Mol oranının mentolün enzimatik esterleşme reaksiyonuna etkisini incelemek amacıyla yürütülen deneyler yukarda belirlenen koşullarda, (-)-mentol molaritesi 200 mM olarak sabit tutulup, 2/1, 2/2 ve 2/4 (-)-mentol/oleik asit mmol oranlarında gerçekleştirilmiştir. Ek C, Ek F, Ek G ve Ek R'de deneylere ait numunelerin gaz kromatografik analiz sonuçlarından hesaplanan yağ asidi ve ester relatif ağırlık yüzdeleri, numunelerin gerçek bileşimleri, yağ asidi ve mentol dönüşümleri ve her bir reaksiyona ait başlangıç hızlarının değerleri sunulmuştur.

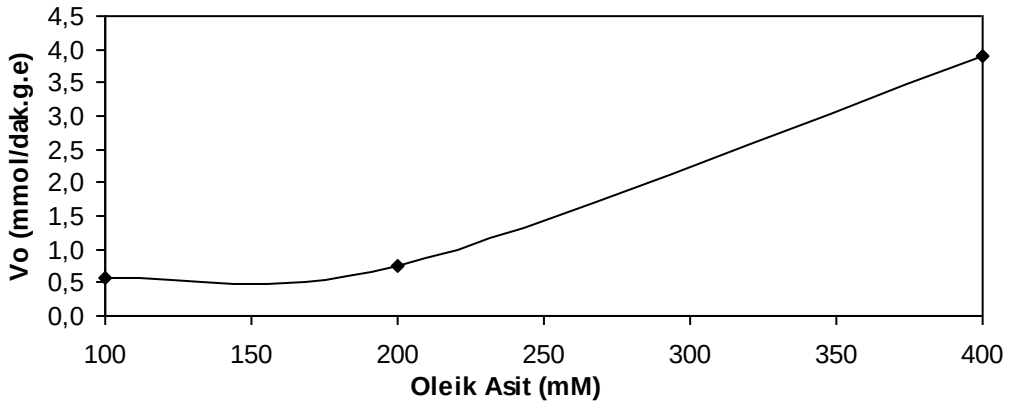
Mol oranına bağlı olarak mentol dönüşmesi Şekil 3.3' de gösterilmektedir.



Şekil 3.3. Mol oranının mentol dönüşümüne etkisi
(1000 U enzim; 35ºC; 0.1g moleküler elek)

2/1, 2/2 ve 2/4 mmol oranlarında gerçekleştirilen reaksiyonlarda 24.saat sonunda mentol dönüşümleri sırasıyla %45.0, %75.1 ve %83.5 olarak saptanmıştır. Mentol dönüşümünün en yüksek değerde olması sebebiyle çalışmanın ileri safhalarında 2/4 mmol oranında çalışılmasına karar verilmiştir. Bu bulgular sonucunda mentolün yüksek konsantrasyonlarında inhibisyon etkisi gözlenmektedir ki bu da Kamiya ve arkadaşlarının çalışmaları ile uyum içindedir [17].

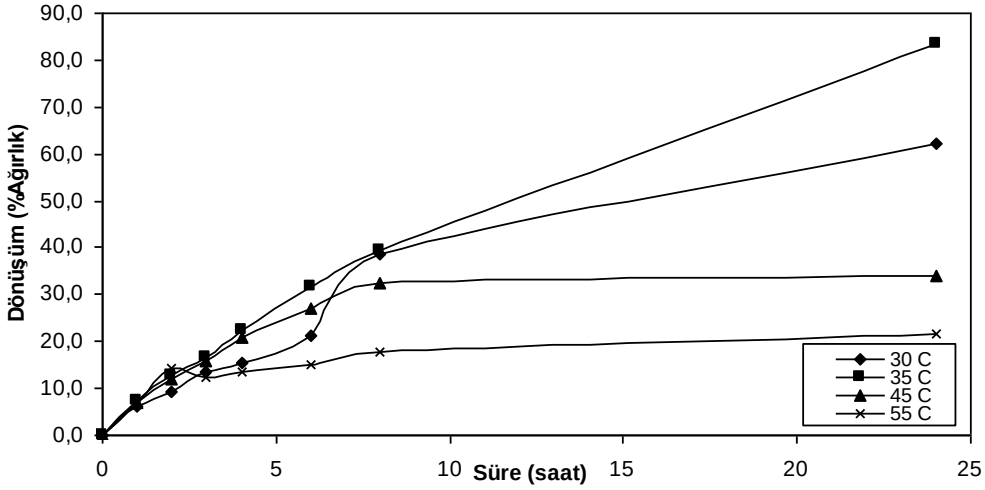
Şekil 3.4' de ise mmol oranının başlangıç hızına etkisi görülmektedir. En yüksek başlangıç hızı (-)-mentol/oleik asit mmol oranı 2/4 iken elde edilmiştir.



Şekil 3.4. (-)-mentol/oleik asit mmol oranının başlangıç hızına etkisi
(1000 U enzim; 35ºC; 0.1 g moleküler elek)

3.8.3. Sıcaklık Etkisi

Mentolün esterleşme reaksiyonuna sıcaklık etkisini incelemek amacıyla (-)-mentol/oleik asit 2/4 mmol oranında olacak şekilde 30, 35, 45 ve 55ºC sıcaklıklarda 24 saat boyunca reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyonlar sonucu hesaplanan mentol dönüşüm değerleri zamana bağlı olarak Şekil 3.5' te sunulmuştur. Bu sıcaklıklarda gerçekleştirilen deneylere ait numunelerin gaz kromatografik analiz kromatogramlarından hesaplanan yağ asidi ve ester relatif ağırlık yüzdeleri, yağ asidi ve mentol dönüşümleri ile numunelerin gerçek bileşimleri Ek G, Ek H, Ek I ve Ek J'da sunulmuştur.

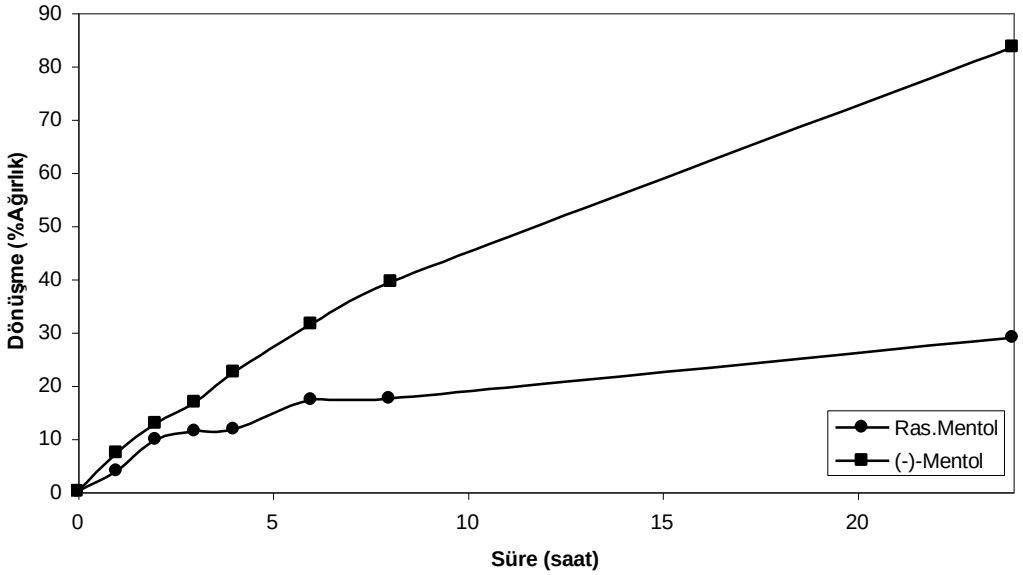


Şekil 3.5. Sıcaklığın (-)-mentolün esterleşme reaksiyonuna etkisi
[(-)-mentol/oleik asit= 2/4 ;1000U enzim; 0.1g moleküler elek]

Şekil 3.5' de görüldüğü gibi en yüksek dönüşüm 35ºC'de gerçekleştirilen reaksiyonda elde edilmiştir. Bu sonuç lipazın yüksek sıcaklıkta deaktive olmasına dayandırılmıştır. Bu nedenle çalışmanın ilerleyen aşamalarında çalışma sıcaklığı olarak 35ºC seçilmiştir.

3.9. (±)-Mentolün esterleşme reaksiyonu

Enzimin (±)-mentolün oleik asit ile esterleşme reaksiyonuna etkisini incelemek amacıyla (±)-mentol/oleik asit mmol oranı 2/4 olacak şekilde, 35°C'de, (-)-mentol/oleik asit reaksiyonuyla paralel şartlarda bir reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Zamana bağlı olarak ölçülen (±)-mentol dönüşüm değerleri ile aynı şartlarda gerçekleştirilmiş (-)-mentol/oleik asit reaksiyonuna ait (-)-mentol dönüşüm değerleri Şekil 3.6'da zamana karşı karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir. Bu reaksiyonlara ait numunelerin gaz kromatografik analizlerinden hesaplanan yağ asidi ve ester relatif ağırlık yüzdeleri, yağ asidi dönüşümleri ve numunelerin gerçek bileşimleri sırasıyla Ek G ve Ek K'de sunulmuştur.



Şekil 3.6. (-)- ve (±)-mentolün esterleşme reaksiyon süresinin mentol dönüşmesine etkisi (mentol/oleik asit = 2/4; 1000 U enzim; 35°C; 0.1 g moleküler elek)

Başlangıç anından itibaren yaklaşık 4 saat boyunca mentol dönüşmesinin her iki reaksiyon için birbirine yakın değerlerde olduğu ancak daha sonra gitgide birbirlerinden uzaklaştıkları görülmektedir. 24 saat sonunda (-)-mentol dönüşmesi %83.5 iken (±)-mentol dönüşümü %28.9 olarak tespit edilmiştir.

Kullanılan (±)-mentolün, üretici firma tarafından bildirilmiş olan spesifik çevirme değerlerinden yola çıkılarak hesaplanan bileşimi ağırlık yüzdesi olarak %52 (-)-mentol ve %48 (+)-mentol'dür.

(±)-Mentol içindeki (+)-mentol dönüşümünün çok düşük olduğu kabul edilirse, (±)-mentol için yürütülen reaksiyonda ortamda 1g (-)-mentol için yaklaşık 0,6 g enzim bulunmaktadır. Oysa (-)-mentol ile yürütülen reaksiyonda ortamda 1 g mentol için yaklaşık 0,3 g enzim mevcuttur. (±)-Mentol ile yürüten deneyde ortamda (-)-mentol için yaklaşık iki kat fazla enzim bulunması (±)-mentol içindeki (-)-mentolün dönüşüm hızını arttırmış bu nedenle ilk dört saat için tespit edilen dönüşüm değerleri birbirine yakın çıkmıştır. Ancak kullanılan enzimin (-)-mentole karşı enantioseçici özelliğe sahip olduğu ve zamanla ortamdaki (-)-mentol miktarı azaldıkça dönüşüm hızının düştüğü tahmin edilmektedir [6]. Enzim (+)-mentolü daha az katalizlediği için dönüşme miktarı ortamdaki (-)-mentol miktarına bağlı olarak azalmıştır. Fakat

yinede bu konuda kesin karar verebilmek için (+)-mentolün oleik asit ile aynı şartlarda esterleşme reaksiyonunun gerçekleştirilmesi ve rasemik mentol ile gerçekleştirilen esterleşme reaksiyonuna ait ürünlerin enantiomerik aşırılık ve oranlarının tespit edilmesi gerekmektedir.

3.9.1. Çözücü Etkisi

Literatürden edinilen bilgiye göre organik çözücülerin yapısı ve polaritesi enzimatik dönüşümlere etki etmektedir [5]. Organik çözücülerin polaritesinin ölçüsü olan log P değerinin dönüşüm ve enantioseçicilik üzerinde etkili olduğu da verilen bilgiler arasındadır [16]. Çözücü cinsinin gerek mentolün esterleşme reaksiyonunda mentol dönüşmesine gerekse enantioseçiliğe etkisini incelemek amacıyla bu çalışmanın (±)-mentol ile yapılmasına karar verilmiştir.

Çalışılacak çözücüler log P değerleri göz önünde bulundurularak seçilmiştir. Literatürde verilen bilgilere göre log P değeri 2.0'den küçük olan çözücüler genellikle biyokatalizörün aktivitesini düşürmektedirler [5,16]. Bu doğrultuda çözücü olarak sırasıyla izooktan (log P= 4.5), n-heptan (log P=4.0), n-hekzan (log P= 3.5), siklohekzan (log P= 3.2), toluen (log P= 2.5) kullanılan deneyler 35ºC'de, 24 saat boyunca, 1000 U miktarında enzim ile ve (±)-mentol/oleik asit mmol oranı 2/4 olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. 1.saat sonunda ortama 0.1 g moleküler elek ilave edilmiş ve deneyler Bölüm 3.4'de anlatıldığı şekilde yürütülmüştür.

Tablo 3.2' de çözücülerin log P değerlerine karşılık 24.saat sonunda tespit edilen (±)-mentol dönüşmesi ve başlangıç hızları görülmektedir.

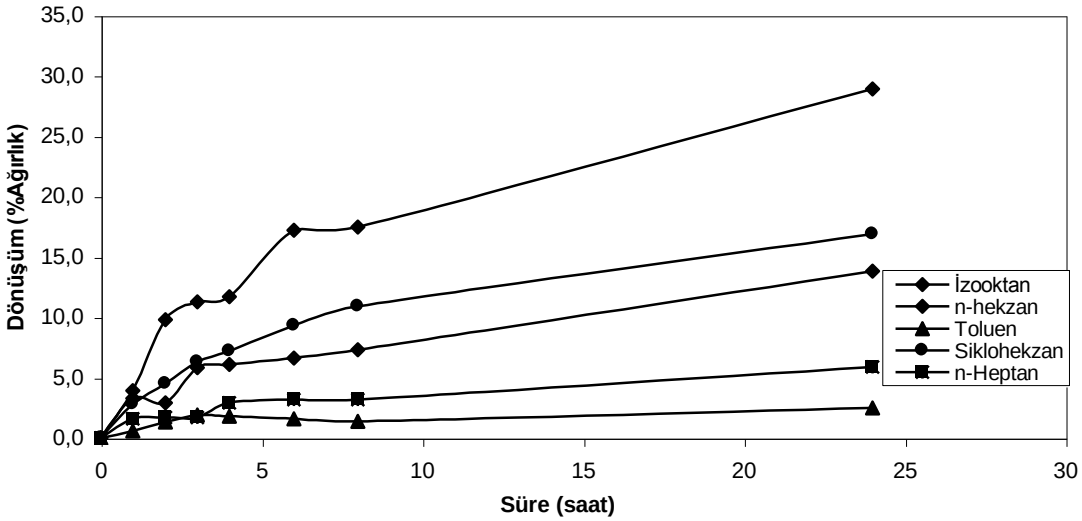
Tablo 3.2. Çözücü cinsinin (±)-mentol dönüşümü ve başlangıç hızına etkisi

Çözücü	log P	%Dönüşme	v_0 (mmol/dak.g_e)
İzooktan	4,5	28,9	5,6
n-Heptan	4,0	5,9	1,2
n-Hekzan	3,5	13,7	2,6
Siklohekzan	3,2	16,9	3,3
Toluen	2,5	2,5	0.5

Tablo 3.2' de görüldüğü üzere dönüşme açısından log P değeri düştükçe dönüşmenin de azaldığı sonucuna varılamamaktadır. Bu da log P değerinin dönüşme için başlı başına etkili bir parametre olmadığı görüşü ile bağdaşmaktadır [5]. Siklohekzan ile yapılan çalışma sonucu saptanan dönüşme ve başlangıç hız değerlerinin n-hekzana

oranla yüksek olması ise Kamiya ve arkadaşlarının enzimlerin dallanmış ve halkalı organik çözücü ortamında düz zincirli çözücü ortamına kıyasla daha yüksek aktivite gösterdiği görüşü ile uyum içindedir [6].

Şekil 3.7' de çözücü cinsinin (±)-mentol dönüşümüne etkisi sunulmaktadır.



Şekil 3.7. Çözücü cinsinin (±)-mentol dönüşümüne etkisi
[(-)-mentol/oleik asit= 2/4; 1000U enzim; 0.1g moleküler elek]

Şekil 3.7' de ve Tablo 3.2' de görüldüğü üzere en yüksek dönüşme ve başlangıç hızları izooktan ile yapılan çalışmada elde edilmiştir. Bu reaksiyonlara ait numunelerin gaz kromatografik analizlerinden hesaplanan yağ asidi ve ester relatif ağırlık yüzdeleri, yağ asidi dönüşümleri ve numunelerin gerçek bileşimleri sırasıyla Ek K, Ek L, Ek M, Ek N ve Ek O'da sunulmuştur.

3.9.2. Kiral Kolon ile Yapılan Çalışmalar

Bölüm 3.6' da belirtildiği üzere çözücünün enantioseçicilik üzerine etkisini araştırmak amacıyla (±)-mentolün oleik asit ile esterleşme reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve gaz kromatografi yöntemi ile bu reaksiyonun ürünleri öncelikle kapiler kolon kullanılarak analiz edilmiştir. Yağ asidi ve mentol dönüşümleri ile numunenin gerçek bileşiminin hesaplanmasında kromatogramlardan elde edilen yağ asidi ve ester pik alanları kullanılmıştır (Bölüm 3.6). Bu veriler Ek K, Ek L, Ek M, Ek N ve Ek O' da sunulmuştur.

Enantiomerik aşırılık ve enantiomerik oranı tespit edebilmek için numunelerin ortamdaki (-)-mentol, (+)-mentol ile bunların ester ürün miktarlarının bilinmesi

gerekmektedir. Kapiler kolonla yapılan kromatografik analizde, (+)- ve (-)-mentol ve esterlerinin kolonda alıkonma zamanları aynı olduğu için, bu bileşiklere ait pikleri ayırmak mümkün değildir. Enantiomerlerin kromatografik analizlerinin kiral kolon ile yapılması zorunludur. Bu çalışmada, SGE marka bir kolon Cydex-β (50 m x 0.22 mm iç çapı x 0.25 μm) kullanılarak kolonun bu analiz için çalışma koşulları ve piklerin yerleri tespit edilmeye çalışılmıştır.

Literatürde kiral kolon ile yapılmış çalışmaların şartları incelendikten sonra öncelikli olarak (-)-mentol'ün alıkonma süresinin bulunmasına çalışılmıştır. Bu amaçla taşıyıcı gaz hızı, sıcaklık programı, split oranı gibi parametreler değiştirilerek (-)-mentolün hekzandaki çözeltisi ile analizler yapılmıştır. Pek çok denemeden sonra en uygun şartların taşıyıcı gaz olan N_2 hızının 0.94 ml/dak, enjektör ve dedektör sıcaklıklarının 200 ve 240ºC, split hızının 59.4 ml/dak ve split oranının 61.2/1 olduğu saptanmıştır. Fırın sıcaklık programı ise şu şekilde seçilmiştir. Sıcaklık 5 dakika boyunca 100ºC'de tutulduktan sonra 2ºC/dak ısıtma hızı ile 130ºC'ye yükseltilmiş ve bu sıcaklıkta 20 dakika tutulmuştur. Bu şartlarda (-)-mentolün kolonda alıkonma süresi 25.25 dakika olarak saptanmıştır.

(-)-Mentolün kolonda alıkonma süresi belirlendikten sonra (±)-mentolün hekzandaki çözeltisi de aynı şartlarda analiz edilerek (+)-mentolün alıkonma süresi saptanmıştır. Bu çalışma sonucunda (-)-mentolün ve (+)-mentolün alıkonma süreleri sırasıyla 25.84 ve 26.03 dakika olarak tespit edilmiştir. Ancak (-)-ve (+)-mentollerin resolüsyonun iyi olmadığı görülmüştür. Resolüsyonu arttırmak için sırası ile taşıyıcı gazın akış hızı ve yukarıda açıklanan sıcaklık programının başlangıç sıcaklığı değiştirilerek denemeler yapılmıştır. Fakat daha düşük taşıyıcı hızı ve başlangıç sıcaklıklarında uygulanan bu analizlerde de (-)-ve (+)-mentol için iyi bir ayırma sağlanamamıştır.

(-)-Mentol ve (+)-mentolün alıkonma süreleri belirlendikten sonra bu bileşiklerin esterlerinin alıkonma sürelerini bulmak hedeflenmiştir. Bu amaçla, ağırlıkça %16.8 oleik asit, %9.1 (-)-mentol ve %74.1 ester içeren numune, gaz hızı ve diğer koşullar aynı kalmak suretiyle farklı sıcaklık programları kullanılarak analiz edilmiştir. Aşağıda verilen sıcaklık programı için (-)-mentol ve oleik asitin kolonda alıkonma süreleri sırasıyla 28.09 ve 62.13 dakika olarak saptanmıştır. Bu sıcaklık programında sıcaklık 5 dakika süresince 100ºC'de tutulduktan sonra önce 2ºC/dak ısıtma hızı ile

130ºC'ye yükseltilmiş, bu sıcaklıkta 10 dakika tutulup 5ºC/dak ısıtma hızıyla 200ºC'ye yükseltilmiş ve bu sıcaklıkta 100 dakika bekletilmiştir.

Kromatogramlarda (-)-mentil oleata ait olan pik tespit edilememiştir. (±)-Mentolün farklı çözücüler içinde oleik asit ile esterleşme reaksiyonuna ait numuneler de analiz edilmiş ancak bu numuneler içinde esterlerin ağırlıkça yüzdeleri maksimum %16.9 olduğu halde yine kromatogramlarda ester pikleri görülememiştir. Kullanılan kolonun bu reaksiyon ürünlerinin analizi için uygun olmadığında karar kılınmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

1) *Pseudomonas cepacia* orijinli enzim Lipaz PS"Amano" katalizörlüğünde, 400 U enzim, çözücüsüz ortamda moleküler eleğin kullanılmadığı ve ortama 1 g. su ilave edilerek (-)-mentol/oleik asit mol oranı 1/3 olacak şekilde ve 30°C'de, (-)-mentolün oleik asit ile enzimatik esterleşme reaksiyonu gerçekleştirilmiş ancak 24 saat sonunda elde edilen (-)-mentol dönüşmesi %1,5 olarak saptanmıştır. Literatürde Shimada ve arkadaşlarının bir çalışmasında aynı şartlarda ancak 1000 U enzim kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyon sonucunda %23,5 civarında bir (-)-mentol dönüşmesi elde ettikleri göz önünde bulundurularak enzim miktarı, karıştırma hızı, ortama çözücü ilavesi, ortamdaki su miktarı gibi parametreler değiştirilerek yaklaşık 5 deney daha yapılmıştır ancak daha yüksek bir (-)-mentol dönüşmesi elde edilememiştir. Bu sonuç Shimada ve arkadaşlarının buldukları dönüşme miktarı ile çelişmektedir.

2) (-)-Mentolün oleik asit ile enzimatik esterleşme reaksiyonunun, *Candida rugosa* orijinli Lipaz AYS"Amano" katalizörlüğünde yürütülen bir ön denemesinde 19728 U Lipaz AYS"Amano" katalizörlüğünde, 35°C'de, mentol molaritesi 200 mM olacak şekilde, 2/1 mmol oranında (-)-mentol/oleik asit, izooktan ortamında enzimatik esterleşme reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Açığa çıkan suyu ortamdan uzaklaştırmak amacıyla reaksiyonun 1.saati sonunda karışıma 0,1 g. 4 Å'lük moleküler elek ilave edilmiş ve hemen alınan örneğin analizi ile yağ asidi dönüşümünün %98.1 , (-)-mentol dönüşümünün ise %50.7 olduğu tespit edilmiştir.

3) 2/1 mmol oranında (-)-mentol/oleik asit ile, 35°C'de gerçekleştirilen reaksiyona enzim miktarının etkisini belirlemek amacıyla sırasıyla, 500 U, 1000 U ve 1500 U miktarında enzimlerle çalışılmıştır. Öndeneme reaksiyonu ile aynı koşullarda çalışıldığında 24 saat sonunda elde edilen (-)-mentol dönüşümleri sırasıyla %32.3, %45 ve %49.6 olarak tespit edilmiştir. Enzim

maliyetinin yüksek olduğu da göz önünde bulundurularak en uygun enzim miktarı 1000 U olarak belirlenmiştir.

4) Aynı koşullarda (-)-mentol molaritesi 200 mM olacak şekilde, bu defa en uygun (-)-mentol/oleik asit mol oranını belirlemek amacıyla sırasıyla 2/1, 2/2 ve 2/4 mmol oranlarında deneyler gerçekleştirilmiştir. 24 saat sonunda elde edilen (-)-mentol dönüşmeleri sırasıyla %45.0, %75.1 ve %83.5 olarak tespit edilmiş, en uygun mol oranı 2/4 mmol olarak belirlenmiştir.

5) Reaksiyona sıcaklığın etkisini görmek için (-)-mentol/oleik asit mmol oranı 2/4 olacak şekilde, aynı şartlarda sırasıyla 30°C, 35°C, 45°C ve 55°C sıcaklıklarında çalışılmıştır. En yüksek dönüşümün 35°C'de gerçekleştiği görülmüş ve uygun reaksiyon sıcaklığı olarak 35°C belirlenmiştir.

6) (-)-Mentolün *Candida rugosa* orijinli Lipaz AYS"Amano" katalizörlüğünde gerçekleştirilen oleik asit ile enzimatik esterleşme reaksiyonunun optimum koşulları 1000 U enzim miktarı, (-)-mentol/oleik asit mol oranı 2/4 mmol ve 35°C reaksiyon sıcaklığı olarak belirlenmiştir.

7) Enzimin (±)-mentolün oleik asit ile esterleşme reaksiyonuna etkisini incelemek amacıyla 2/4 mmol oranında (±)-mentol/oleik asit ile, optimum koşullarda, (-)-mentol/oleik asit reaksiyonuyla paralel şartlarda bir reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Zamana bağlı olarak ölçülen (±)-mentol dönüşüm değerleri ile aynı şartlarda gerçekleştirilmiş (-)-mentol/oleik asit reaksiyonuna ait (-)-mentol dönüşüm değerleri incelendiğinde başlangıç anından itibaren yaklaşık 4 saat boyunca mentol dönüşmesinin her iki reaksiyon için de birbirlerine yakın değerler olduğu ancak daha sonra gitgide birbirlerinden uzaklaştıkları görülmektedir. 24 saat sonunda (-)-mentol dönüşmesi %83.5 iken (±)-mentol dönüşümü %28.9 olarak tespit edilmiştir. Üretici firma tarafından bildirilmiş olan spesifik çevirme değerlerinden yola çıkılarak hesaplanmış (-)- ve (+)- mentol bileşimlerinden yola çıkıldığında (±)-mentol ile yürüten deneyde (-)-mentol ile yürütülen deneye kıyasla ortamda (-)-mentol için yaklaşık iki kat fazla enzim bulunduğu tespit edilmiştir. Bu durum, (±)-mentol içindeki (-)-mentol hızını arttırmış bu nedenle ilk dört saat için tespit edilen dönüşüm değerleri birbirine yakın çıkmıştır. Ancak kullanılan enzimin (-)-mentole karşı enantioseçici özelliğe sahip olduğu ve

zamanla ortamdaki (-)-mentol miktarı azaldıkça dönüşüm hızının düştüğü tahmin edilmektedir. Enzim (+)-mentolü daha az katalizlediği için dönüşme miktarı ortamdaki (-)-mentol miktarına bağlı olarak azalmıştır. Ancak yinede kesin bir sonuca varmak için aynı koşullarda (+)-mentolün oleik asit ile esterleşme reaksiyonunun gerçekleştirilmesinde ve rasemik mentol ile gerçekleştirilen reaksiyon ürünlerinin kiral kolonla da incelenerek enantiomerik aşırılık ve enantiomerik oranın belirlenmesinde fayda vardır.

8) Farklı çözücülerin gerek (-)-mentol dönüşümüne gerekse enzimin enantioseçiciliğine etkisini görmek amacı ile ayrıca Lipaz AYS"Amano" katalizörlüğünde gerçekleştirilen enzimatik esterleşme reaksiyonunun optimum koşullarda, çeşitli çözücülerle reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. İzooktan (log P= 4.5), n-heptan (log P=4.0), n-hekzan (log P= 3.5), siklohekzan (log P= 3.2), toluen (log P= 2.5) ile gerçekleştirilen deneylere ait 24 saat sonundaki mentol dönüşüm değerleri sırasıyla %28.9, %5.9, %13.8, %16.9 ve %2.5 olarak tespit edilmiştir. Başlangıç hız değerleri ise sırasıyla 5.6, 1.2, 2.6, 3.3 ve 0.5 mmol/dak.g_e olarak bulunmuştur. Elde edilen bu sonuçlar değerlendirildiğinde literatürde açıklandığı gibi, çözücünün log P değerinin dönüşme ile doğrudan bir ilişkide olmadığı görülmektedir. Siklohekzan ile elde edilen dönüşmenin n-hekzandan yüksek çıkması dallanmış ve halkalı yapıdaki organik çözücülerin düz zincirli çözücülere kıyasla daha yüksek aktivite gösterdiğini ispatlamaktadır. En yüksek mentol dönüşmesi izooktan ile elde edilmiştir

9) (±)-Mentol ve oleik asitin farklı çözücülerde gerçekleştirilen esterleşme reaksiyonuna ait numunelerin kiral SGE marka, Cydex-β (50 m x 0.22 mm iç çapı x 0.25 μm) kolonu kullanılarak yürütülen gaz kromatografik analizlerinde, analiz koşulları değiştirilerek bir çok analiz yapılmasına rağmen elde edilen kromatogramlarda mentil esterlerine ait pikler görülememiş ve bu bileşiklerin alıkonma süreleri saptanamamıştır. Kullanılan kolonun bu reaksiyon ürünlerinin kolonda analizi için uygun olmadığında karar kılınmıştır.

10) Yapılan bu çalışma sonucunda *Candida rugosa* orijinli toz formdaki Lipaz AYS'nin çözücü ortamında (-)-mentolün oleik asit ile esterleşme reaksiyonunu başarılı biçimde katalizlediği görülmüştür. Enzim yüzey aktif

madde ile kaplanmamış olmasına rağmen optimum koşullarda 24 saat sonunda elde edilen mentol dönüşmesi %83.5 gibi yüksek bir değer olarak tespit edilmiştir. Rasemil mentolün enantioseçici esterleşmesi içinbu enzim uygun görülmektedir.

11) Kiral kolonun çalışma şartları üzerinde araştırmalara devam edilebilir ya da farklı bir kullanımı ile analizler gerçekleştirlebilir. Böylece mentolün oleik asit ile yaptığı enantiseçici enzimatik esterleşme reaksiyonunda çözücünün enzimin enantioseçiciliğine etkisini saptamak mümkün olur.

12) Toz Lipaz AYS"Amano" immobilize edilerek, (-)-mentolün esterleşme reaksiyonuna etkileri gerek reaksiyon koşulları gerekse enantioseçicilik bakımından araştırılabilir.,

13) Lipaz PS'nin mentolün transesterleşme reaksiyonuna etkileri incelenebilir.

KAYNAKLAR

[1] **Ghanem, A.,** 2002. The utility of modified cyclodextrin, sol-gel procedure and gas chromatography in lipase mediated enantioselective catalysis: kinetic resolution of secondary alcohols, *Doktora Tezi*, der Fakültät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften.

[2] **Garcia, R., Renedo, A., Martinez, M., Aracil, J.,** 2001. Enzymatic synthesis of n-octyl (+)-2-methyl butanoate ester from racemic (±)-2-methylbutanoic acid by immobilized lipase: optimization by statistical analysis, *Enzyme Microb. Technol.*, 30, 110-115.

[3] **Ullmanns Enzyklopadie der technischen Chemie**, 1981, Bd. 20, p. 220-221, Verlag Chemie, Weinheim.

[4] **Wang, D.L., Nag, A., Lee, G.C., Shaw, J.F.,** 2002. Factors affecting the resolution of dl-menthol by immobilized lipase-catalyzed esterification in organic solvent, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 262-265.

[5] **Athawale, V., Manjrekar, N., Athawale, M.,** 2001. Enzymatic synthesis of chiral menthyl methacrylate monomer by Pseudomonas cepacia lipase catalysed resolution of (±)-menthol, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 16, 169-173.

[6] **Kamiya, N., Goto, M., Nakashio, F.,** 1995. Surfactant coated lipase suitable for the enzymatic resolution of menthol as a biocatalyst in organic media, *Biotechnol. Prog.*, 11, 270-275.

[7] **Shimada, Y., Hirota, Y., Baba, T., Kato, S., Sugihara, A., Moriyama, S., Tominaga, Y., Terai, T.,** 1999. Enzymatic synthesis of l-menthyl esters in organic solvent-free system, *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 1139-1142.

[8] **Solomons, T.W.G.,** 1992. Organic Chemistry, 5th Ed., pp. 164-166, John Wiley&Sons, Inc., New York.

[9] **Smith, B.M., March, J.**, 2001. March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 5th Ed., pp. 125-127, John Wiley&Sons, Inc., New York.

[10] **Morrison, T.R., Boyd, N.R.,** 1966. Organic Chemistry, 2nd Ed., pp. 83-84, Allyn and Bacon, Inc., Boston.

[11] **Uhlig, H.,** 1998. Industrial Enzymes and Their Applications, pp.1-11, John Wiley&Sons, Inc., New York.

[12] **Gerhartz, W**., 1990. Enzymes in Industry: Production and Applications, pp. 1-12, VCH, Verlag, Weinheim

[13] **Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C.,** 2001. Production, purification, characterization, and application of lipases, *Biotechnol. Adv.*, 19, 627-662.

[14] **Woolley, P., Petersen, S.B.,** 1994. Lipases: Their Structure, Biochemistry, and Application, pp. 271-287, Cambridge University Press, Cambridge, England

[15] **Wu W.H., Akoh C.C., Phillips, R.S.,** 1996. Lipase-catalyzed stereoselective esterification of dl-menthol in organic solvents using acid anhydrides as acylating agents, *Enzyme Microb. Technol.*, 18, 536-539.

[16] **Wu W.H., Akoh C.C., Phillips, R.S.,** 1997. Stereoselective acylation of DL-menthol in organic solvents by an immobilized lipase from Pseudomonas cepacia with vinyl propionate, *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 435-439.

[17] **Kamiya, N., Goto, M.,** 1997. How is enzymatic selectivity of menthol esterification catalyzed surfactant-coated lipase determined in organic media?, *Biotechnol. Prog.*, 13, 488-492.

[18] **Babalı, B., Aksoy, H.A., Üstün, G., Tüter, M.,** 2001. Enzymatic esterification of (-)-menthol with fatty acids in solvent by a commercial lipase from *Candida rugosa*, *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 53-56.

[19] **Aksoy, H.A., Tüter, M., Üstün, G., Riva, S., Secundo, F., İpekler, S**., 2003. Partial purification of Nigella sativa L. Seed lipase and its application in hydrolytic reactions. Enrichment of γ-linolenic acid from borage oil., *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 237-241.

[20] **Babalı, B.,** 1999. Mentolün esterleşme reaksiyonuna lipazların etkisi, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul

[21**] Zuegg, J., Hönig, H., Schrag, J.D., Cygler, M.,** 1997. Selectivity of Lipases: Conformational analysis of suggested intermediates in ester hydrolysis of chiral primary and secondary alcohols, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 3, 83-98.

EKLER

Ek A:

(-)-Mentol/Asit mol oranı : 1/3 (mol/mol)
Kullanılan Enzim : Lipaz PS
Reaksiyon Sıcaklığı : 30°C

Çözücü Durumu	Lipaz	Enzim Miktarı (g.E/g.ment)	Enzim Miktarı(U)	Sıcaklık (Derece)	Karıştırma Hızı	Y.Asidi Dönüşümü (% Ağırlık)	Mentol Dönüşümü (% Ağırlık)	Su Miktarı
Çözücüsüz	PS	0.05	400,0	30	700 rpm	0.503	1.487	% 20
Çözücüsüz	PS	0.052	434,3	30	500 rpm	0.421	1.244	% 5.6
Çözücü (izooktan)	PS	0.052	425,1	30	500 rpm	0.182	0.544	% 5.4
Çözücüsüz	PS	0.4	3283,0	30	700 rpm	0.337	1.008	% 20
Çözücüsüz	PS	0.43	3501,5	30	500 rpm	0.416	1.237	% 20
Çözücü (izooktan)	PS	0.109	890,8	30	500 rpm	0.267	0.799	% 5.1

Ek B:

(-)-Mentol/Asit mol oranı : 2/1 (mmol/mmol)
Lipaz AYS miktarı : 2.05 g Enzim/ g Mentol
: 19728 Unit
Reaksiyon Sıcaklığı : 35°C
Moleküler Elek Miktarı : 0.1 g
Kullanılan Çözücü : İzooktan

Süre (saat)	GC(*), Göreceli bileşim(%)		Dönüşüm (%Ağırlık)	
	Yağ Asidi	Ester	Yağ Asidi	Mentol
0	82,2	17,8	12,7	6,6
1	1,3	98,7	98,1	50,7
2	0,9	99,1	98,6	50,9
3	-	-	-	-
4	1,3	98,7	98,1	50,7
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	-	-	-	-
8	-	-	-	-
24	0,9	99,1	98,6	50,9

* Yağ Asidi – Ester pik alanlarına göre hesaplanmış relatif ağırlık yüzdeleri

Süre (saat)	Gerçek Ürün Bileşimi (% Ağırlık)		
	(-)- Mentol	Yağ Asidi	Ester
0	48,5	42,3	9,2
1	26,3	1,0	72,7
2	26,1	0,7	73,2
3	-	-	-
4	26,3	0,9	72,8
5	-	-	-
6	-	-	-
7	-	-	-
8	-	-	-
24	26,1	0,7	73,2

Ek C:

(-)-Mentol/Asit mol oranı : 2/1 (mmol/mmol)
Lipaz AYS miktarı : 0.328 g Enzim/ g Mentol
: 1004 Unit
Reaksiyon Sıcaklığı : 35°C
Moleküler Elek Miktarı : 0.1 g
Kullanılan Çözücü : İzooktan

Süre (saat)	GC(*), Göreceli bileşim(%)		Dönüşüm (%Ağırlık)	
	Yağ Asidi	Ester	Yağ Asidi	Mentol
0	91,4	8,6	5,9	2,9
1	84,6	15,4	10,9	5,5
2	70,7	29,3	21,7	10,9
3	56,4	43,6	34,1	17,1
4	46,2	53,8	43,8	21,9
5	-	-	-	-
6	41,1	58,9	49,1	24,6
7	-	-	-	-
8	32,5	67,5	58,2	29,2
24	7,1	92,9	89,7	45,0

* Yağ Asidi – Ester pik alanlarına göre hesaplanmış relatif ağırlık yüzdeleri

Süre (saat)	Gerçek Ürün Bileşimi (% Ağırlık)		
	(-)- Mentol	Yağ Asidi	Ester
0	50,9	44,8	4,3
1	49,7	42,5	7,8
2	47,1	37,5	15,4
3	43,9	31,6	24,5
4	41,5	27,1	31,4
5	-	-	-
6	40,2	24,5	35,3
7	-	-	-
8	37,8	20,2	42,0
24	29,7	5,00	65,3

Ek D:

(-)-Mentol/Asit mol oranı : 2/1 (mmol/mmol)
Lipaz AYS miktarı : 0.169 g Enzim/ g Mentol
: 512 Unit
Reaksiyon Sıcaklığı : 35°C
Moleküler Elek Miktarı : 0.1 g
Kullanılan Çözücü : İzooktan

Süre (saat)	GC(*), Göreceli bileşim(%)		Dönüşüm (%Ağırlık)	
	Yağ Asidi	Ester	Yağ Asidi	Mentol
0	89,5	10,5	7,3	3,8
1	88,3	11,7	8,2	4,3
2	82,0	18,0	12,8	6,7
3	73,1	26,9	19,8	10,4
4	75,7	24,3	17,7	9,3
5	-	-	-	-
6	64,5	35,5	26,9	14,2
7	-	-	-	-
8	60,4	39,6	30,6	16,1
24	29,5	70,5	61,5	32,3

* Yağ Asidi – Ester pik alanlarına göre hesaplanmış relatif ağırlık yüzdeleri

Süre (saat)	Gerçek Ürün Bileşimi (% Ağırlık)		
	(-)- Mentol	Yağ Asidi	Ester
0	49,4	45,3	5,3
1	49,2	44,8	5,9
2	48,0	42,6	9,3
3	46,2	39,3	14,5
4	46,8	40,3	12,9
5	-	-	-
6	44,4	35,9	19,7
7	-	-	-
8	43,5	34,2	22,4
24	35,4	19,1	45,5

Ek E:

(-)-Mentol/Asit mol oranı : 2/1 (mmol/mmol)
Lipaz AYS miktarı : 0.495 g Enzim/ g Mentol
: 1507 Unit
Reaksiyon Sıcaklığı : 35°C
Moleküler Elek Miktarı : 0.1 g
Kullanılan Çözücü : İzooktan

Süre (saat)	GC(*), Göreceli bileşim(%)		Dönüşüm (%Ağırlık)	
	Yağ Asidi	Ester	Yağ Asidi	Mentol
0	97,7	2,3	1,5	0,8
1	73,3	26,7	19,7	10,1
2	54,5	45,5	35,9	18,4
3	44,6	55,4	45,5	23,4
4	30,0	70,0	61,1	31,4
5	-	-	-	-
6	16,5	83,5	77,3	39,7
7	-	-	-	-
8	12,7	87,3	82,2	42,3
24	2,4	97,6	96,4	49,6

* Yağ Asidi – Ester pik alanlarına göre hesaplanmış relatif ağırlık yüzdeleri

Süre (saat)	Gerçek Ürün Bileşimi (% Ağırlık)		
	(-)- Mentol	Yağ Asidi	Ester
0	51,4	47,5	1,1
1	46,8	39,0	14,2
2	42,7	31,2	26,0
3	40,2	26,6	33,1
4	36,2	19,1	44,6
5	-	-	-
6	32,0	11,3	56,7
7	-	-	-
8	30,7	8,8	60,5
24	26,9	1,8	71,3

Ek F:

(-)-Mentol/Asit mol oranı : 2/2 (mmol/mmol)

Lipaz AYS miktarı : 0.344 g Enzim/ g Mentol

: 1050 Unit

Reaksiyon Sıcaklığı : 35°C

Moleküler Elek Miktarı : 0.1 g

Kullanılan Çözücü : İzooktan

Süre (saat)	GC(*), Göreceli bileşim(%)		Dönüşüm (%Ağırlık)	
	Yağ Asidi	Ester	Yağ Asidi	Mentol
0	71,8	28,2	20,8	20,9
1	66,8	33,2	25,0	25,1
2	63,4	36,6	27,9	28,1
3	63,4	36,6	27,9	28,1
4	60,3	39,7	30,7	30,8
5	-	-	-	-
6	57,1	42,9	33,5	33,6
7	-	-	-	-
8	50,7	49,3	39,5	39,6
24	17,2	82,8	74,8	75,1

* Yağ Asidi – Ester pik alanlarına göre hesaplanmış relatif ağırlık yüzdeleri

Süre (saat)	Gerçek Ürün Bileşimi (% Ağırlık)		
	(-)- Mentol	Yağ Asidi	Ester
0	28,3	51,5	20,2
1	26,8	48,9	24,3
2	25,8	47,0	27,2
3	25,8	47,0	27,2
4	24,8	45,3	29,9
5	-	-	-
6	23,9	43,5	32,6
7	-	-	-
8	21,8	39,7	38,5
24	9,1	16,8	74,1

Ek G:

(-)-Mentol/Asit mol oranı : 2/4 (mmol/mmol)
Lipaz AYS miktarı : 0.346 g Enzim/ g Mentol
: 1048 Unit
Reaksiyon Sıcaklığı : 35°C
Moleküler Elek Miktarı : 0.1 g
Kullanılan Çözücü : İzooktan

Süre (saat)	GC(*), Göreceli bileşim(%)		Dönüşüm (%Ağırlık)	
	Yağ Asidi	Ester	Yağ Asidi	Mentol
0	96,9	3,1	2,0	4,1
1	94,7	5,3	3,6	7,2
2	90,7	9,3	6,4	12,8
3	88,0	12,0	8,4	16,7
4	84,2	15,8	11,2	22,4
5	-	-	-	-
6	78,2	21,8	15,8	31,5
7	-	-	-	-
8	73,1	26,9	19,8	39,4
24	48,2	51,8	41,9	83,5

* Yağ Asidi – Ester pik alanlarına göre hesaplanmış relatif ağırlık yüzdeleri

Süre (saat)	Gerçek Ürün Bileşimi (% Ağırlık)		
	(-)- Mentol	Yağ Asidi	Ester
0	20,8	76,8	2,4
1	20,2	75,6	4,2
2	19,0	73,5	7,5
3	18,2	72,0	9,8
4	16,9	69,9	13,1
5	-	-	-
6	15,0	66,5	18,5
7	-	-	-
8	13,3	63,5	23,2
24	3,7	46,5	49,8

Ek H:

(-)-Mentol/Asit mol oranı : 2/4 (mmol/mmol)
Lipaz AYS miktarı : 0.340 g Enzim/ g Mentol
: 1041 Unit
Reaksiyon Sıcaklığı : 45°C
Moleküler Elek Miktarı : 0.1 g
Kullanılan Çözücü : İzooktan

Süre (saat)	GC(*), Göreceli bileşim(%)		Dönüşüm (%Ağırlık)	
	Yağ Asidi	Ester	Yağ Asidi	Mentol
0	99,2	0,8	0,5	1,0
1	94,8	5,2	3,5	7,1
2	91,4	8,6	5,9	11,9
3	88,6	11,4	7,9	15,8
4	85,3	14,7	10,3	20,7
5	-	-	-	-
6	81,1	18,9	13,5	27,0
7	-	-	-	-
8	77,6	22,4	16,3	32,5
24	76,8	23,2	16,8	33,9

* Yağ Asidi – Ester pik alanlarına göre hesaplanmış relatif ağırlık yüzdeleri

Süre (saat)	Gerçek Ürün Bileşimi (% Ağırlık)		
	(-)- Mentol	Yağ Asidi	Ester
0	21,5	77,9	0,6
1	20,2	75,7	4,1
2	19,2	73,8	7,0
3	18,3	72,4	9,3
4	17,3	70,6	12,1
5	-	-	-
6	15,9	68,2	15,9
7	-	-	-
8	14,8	66,1	19,1
24	14,4	65,7	19,9

Ek I:

(-)-Mentol/Asit mol oranı : 2/4 (mmol/mmol)

Lipaz AYS miktarı : 0.331 g Enzim/ g Mentol

: 1001 Unit

Reaksiyon Sıcaklığı : 55°C

Moleküler Elek Miktarı : 0.1 g

Kullanılan Çözücü : İzooktan

Süre (saat)	GC(*), Göreceli bileşim(%)		Dönüşüm (%Ağırlık)	
	Yağ Asidi	Ester	Yağ Asidi	Mentol
0	98,5	1,5	0,9	2,1
1	94,9	5,1	3,5	7,1
2	90,1	9,9	6,9	14,2
3	91,2	8,8	6,1	12,5
4	90,6	9,4	6,5	13,4
5	-	-	-	-
6	89,5	10,5	7,3	15,1
7	-	-	-	-
8	87,5	12,5	8,7	17,9
24	85,2	14,8	10,4	21,5

* Yağ Asidi – Ester pik alanlarına göre hesaplanmış relatif ağırlık yüzdeleri

Süre (saat)	Gerçek Ürün Bileşimi (% Ağırlık)		
	(-)- Mentol	Yağ Asidi	Ester
0	20,7	78,1	1,2
1	19,7	76,3	4,0
2	18,2	73,7	8,1
3	18,6	74,3	7,1
4	18,4	73,9	7,7
5	-	-	-
6	18,1	73,3	8,6
7	-	-	-
8	17,4	72,3	10,3
24	16,7	71,0	12,3

Ek J:

(-)-Mentol/Asit mol oranı : 2/4 (mmol/mmol)
Lipaz AYS miktarı : 0.337 g Enzim/ g Mentol
: 1025 Unit
Reaksiyon Sıcaklığı : 30°C
Moleküler Elek Miktarı : 0.1 g
Kullanılan Çözücü : İzooktan

Süre (saat)	GC(*), Göreceli bileşim(%)		Dönüşüm (%Ağırlık)	
	Yağ Asidi	Ester	Yağ Asidi	Mentol
0	98,1	1,9	1,3	2,6
1	95,6	4,4	3,0	6,1
2	93,3	6,7	4,6	9,4
3	90,3	9,7	6,7	13,6
4	88,9	11,1	7,7	15,5
5	-	-	-	-
6	85,1	14,9	10,5	21,1
7	-	-	-	-
8	74,0	26,0	19,1	38,5
24	60,1	39,9	30,8	62,0

* Yağ Asidi – Ester pik alanlarına göre hesaplanmış relatif ağırlık yüzdeleri

Süre (saat)	Gerçek Ürün Bileşimi (% Ağırlık)		
	(-)- Mentol	Yağ Asidi	Ester
0	20,9	77,5	1,6
1	20,3	76,2	3,5
2	19,6	74,9	5,5
3	18,7	73,4	7,9
4	18,3	72,7	9,0
5	-	-	-
6	17,1	70,6	12,3
7	-	-	-
8	13,4	64,1	22,5
24	8,3	55,1	36,6

Ek K:

(±)-Mentol/Asit mol oranı : 2/4 (mmol/mmol)
Lipaz AYS miktarı : 0.330 g Enzim/ g Mentol
: 1001Unit
Reaksiyon Sıcaklığı : 35°C
Moleküler Elek Miktarı : 0.1 g
Kullanılan Çözücü : İzooktan

Süre (saat)	GC(*), Göreceli bileşim(%)		Dönüşüm (%Ağırlık)	
	Yağ Asidi	Ester	Yağ Asidi	Mentol
0	98,1	1,9	1,3	2,6
1	97,1	2,9	1,9	3,9
2	92,9	7,1	4,9	9,8
3	91,9	8,1	5,6	11,3
4	91,5	8,5	5,8	11,7
5	-	-	-	-
6	87,7	12,3	8,6	17,2
7	-	-	-	-
8	87,5	12,5	8,7	17,5
24	80,0	20,0	14,4	28,9

* Yağ Asidi – Ester pik alanlarına göre hesaplanmış relatif ağırlık yüzdeleri

Süre (saat)	Gerçek Ürün Bileşimi (% Ağırlık)		
	(-)- Mentol	Yağ Asidi	Ester
0	21,1	77,4	1,5
1	20,8	76,9	2,3
2	19,6	74,7	5,7
3	19,2	74,0	6,8
4	19,2	74,0	6,8
5	-	-	-
6	17,9	72,0	10,1
7	-	-	-
8	17,9	71,9	10,2
24	15,5	67,6	16,9

Ek L:

(±)-Mentol /Asit mol oranı : 2/4 (mmol/mmol)
Lipaz AYS miktarı : 0.334 g Enzim/ g Mentol
: 1012 Unit
Reaksiyon Sıcaklığı : 35°C
Moleküler Elek Miktarı : 0.1 g
Kullanılan Çözücü : n-Hekzan

Süre (saat)	GC(*), Göreceli bileşim(%)		Dönüşüm (%Ağırlık)	
	Yağ Asidi	Ester	Yağ Asidi	Mentol
0	99,3	0,7	0,5	0,9
1	97,6	2,4	1,6	3,3
2	97,8	2,2	1,5	2,9
3	95,7	4,3	2,9	5,8
4	95,5	4,5	3,1	6,1
5	-	-	-	-
6	95,2	4,8	3,3	6,6
7	-	-	-	-
8	94,6	5,4	3,6	7,3
24	90,1	9,9	6,9	13,8

* Yağ Asidi – Ester pik alanlarına göre hesaplanmış relatif ağırlık yüzdeleri

Süre (saat)	Gerçek Ürün Bileşimi (% Ağırlık)		
	(-)- Mentol	Yağ Asidi	Ester
0	21,5	77,9	0,6
1	21,0	77,1	1,9
2	21,1	77,2	1,7
3	20,4	76,2	3,4
4	20,4	76,1	3,5
5	-	-	-
6	20,3	75,8	3,9
7	-	-	-
8	20,1	75,6	4,3
24	18,7	73,2	8,1

Ek M:

(±)-Mentol /Asit mol oranı : 2/4 (mmol/mmol)

Lipaz AYS miktarı : 0.328 g Enzim/ g Mentol

: 997 Unit

Reaksiyon Sıcaklığı : 35°C

Moleküler Elek Miktarı : 0.1 g

Kullanılan Çözücü : Toluen

Süre (saat)	GC(*), Göreceli bileşim(%)		Dönüşüm (%Ağırlık)	
	Yağ Asidi	Ester	Yağ Asidi	Mentol
0	99,2	0,8	0,5	1,1
1	99,5	0,5	0,3	0,6
2	99,1	0,9	0,6	1,3
3	98,5	1,5	0,9	1,9
4	98,6	1,4	0,9	1,8
5	-	-	-	-
6	98,8	1,2	0,8	1,6
7	-	-	-	-
8	98,9	1,1	0,7	1,4
24	98,2	1,8	1,2	2,5

* Yağ Asidi – Ester pik alanlarına göre hesaplanmış relatif ağırlık yüzdeleri

Süre (saat)	Gerçek Ürün Bileşimi (% Ağırlık)		
	(-)- Mentol	Yağ Asidi	Ester
0	21,4	77,9	0,7
1	21,5	78,1	0,4
2	21,4	77,8	0,8
3	21,3	77,6	1,1
4	21,3	77,6	1,1
5	-	-	-
6	21,3	77,7	1,0
7	-	-	-
8	21,4	77,8	0,8
24	21,1	77,4	1,5

Ek N:

(±)-Mentol /Asit mol oranı : 2/4 (mmol/mmol)

Lipaz AYS miktarı : 0.330 g Enzim/ g Mentol

: 999 Unit

Reaksiyon Sıcaklığı : 35°C

Moleküler Elek Miktarı : 0.1 g

Kullanılan Çözücü : Siklohekzan

Süre (saat)	GC(*), Göreceli bileşim(%)		Dönüşüm (%Ağırlık)	
	Yağ Asidi	Ester	Yağ Asidi	Mentol
0	99,3	0,7	0,5	0,9
1	98,0	2,0	1,4	2,8
2	96,7	3,3	2,2	4,5
3	95,5	4,5	3,1	6,3
4	94,8	5,2	3,6	7,2
5	-	-	-	-
6	93,3	6,7	4,6	9,3
7	-	-	-	-
8	92,2	7,8	5,4	10,9
24	88,1	11,9	8,3	16,9

* Yağ Asidi – Ester pik alanlarına göre hesaplanmış relatif ağırlık yüzdeleri

Süre (saat)	Gerçek Ürün Bileşimi (% Ağırlık)		
	(-)- Mentol	Yağ Asidi	Ester
0	21,2	78,2	0,6
1	20,8	77,5	1,7
2	20,5	76,9	2,6
3	20,1	76,3	3,6
4	19,9	75,9	4,2
5	-	-	-
6	19,5	75,2	5,3
7	-	-	-
8	19,1	74,5	6,4
24	17,9	72,3	9,8

Ek O:

(±)-Mentol /Asit mol oranı : 2/4 (mmol/mmol)
Lipaz AYS miktarı : 0.332 g Enzim/ g Mentol
: 1002 Unit
Reaksiyon Sıcaklığı : 35˚C
Moleküler Elek Miktarı : 0.1 g
Kullanılan Çözücü : n-Heptan

Süre (saat)	GC(*), Göreceli bileşim(%)		Dönüşüm (%Ağırlık)	
	Yağ Asidi	Ester	Yağ Asidi	Mentol
0	99,5	0,5	0,3	0,6
1	98,8	1,2	0,8	1,6
2	98,7	1,3	0,9	1,7
3	98,7	1,3	0,9	1,7
4	97,8	2,2	1,5	3,0
5	-	-	-	-
6	97,7	2,3	1,6	3,2
7	-	-	-	-
8	97,6	2,4	1,6	3,2
24	95,7	4,3	2,9	5,9

* Yağ Asidi – Ester pik alanlarına göre hesaplanmış relatif ağırlık yüzdeleri

Süre (saat)	Gerçek Ürün Bileşimi (% Ağırlık)		
	(-)- Mentol	Yağ Asidi	Ester
0	21,4	78,2	0,4
1	21,2	77,9	0,9
2	21,1	77,8	1,1
3	21,1	77,8	1,1
4	20,9	77,4	1,7
5	-	-	-
6	20,8	77,3	1,9
7	-	-	-
8	20,8	77,3	1,9
24	20,3	76,3	3,4

Ek P:

(-)-Mentol/Asit mol oranı : 2/1 (mmol/mmol)
Reaksiyon Sıcaklığı : 35°C
Moleküler Elek Miktarı : 0.1 g
Kullanılan Çözücü : İzooktan

Enzim Miktarı (U)	v_0 (mmol/dak.g_{enzim})
500	1,45
1000	0,58
1500	0,10

Ek R:

Lipaz AYS miktarı : 1000 U
Reaksiyon Sıcaklığı : 35°C
Moleküler Elek Miktarı : 0.1 g
Kullanılan Çözücü : İzooktan

Oleik Asit Konsantrasyonu (mM)	v_0 (mmol/dak.g_{enzim})
100	0,58
200	0,75
400	3,90

ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında İstanbul'da doğdu. 1994 yılında Nişantaşı Anadolu Lisesi'nden mezun oldu. 2000 yılında Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü'nden mezun oldu ve aynı sene İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitiüsü Kimya Mühendisliği Bölümün'de Yüksek Lisans programına başladı.