ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

RASEMİK NAPROKSEN ESTERDEN ENANTİYOSEÇİMLİ HİDROLİZ İLE S-NAPROKSEN ÜRETİMİNDE REAKSİYON PARAMETRELERİNİN İNCELENMESİ

DENİZ MUTLU

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ANKARA 2006

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

RASEMİK NAPROKSEN ESTERDEN ENANTİYOSEÇİMLİ HİDROLİZ İLE S-NAPROKSEN ÜRETİMİNDE REAKSİYON PARAMETRELERİNİN İNCELENMESİ

Deniz MUTLU
Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Serpil TAKAÇ

Candida rugosa lipazı (CRL) biyokatalizörlüğünde rasemik Naproksen metil esterden iki fazlı sistemde S-Naproksen üretiminde; çözücü türü, tampon/çözücü hacim oranı (T/Ç), pH, sıcaklık, substrat derişimi, enzim derişimi, karıştırma hızı ve katkı maddeleri ilavesinin enantiyoseçimlilik ve aktivite üzerine etkileri incelenmiştir. Çözücü olarak izooktan, hekzan, siklohekzan ve toluen kullanılmış; 120 st sonunda en yüksek enantiyomerik aşırılık (ee_s ve ee_p), enantiyomerik oran (E) ve dönüşüm (x) değerlerine sırasıyla %91.3, %95.2 130.3 ve %48.9 olarak log P değeri en yüksek çözücü olan izooktan varlığında ulaşılmıştır. Aynı çözücülerin CRL'nin hidrolitik aktivitesi üzerine etkileri incelendiği zaman da en yüksek aktivite izooktan varlığında elde edilmiştir. Tampon/çözücü hacim oranının S-Naproksen üretimine etkisi izooktan varlığında T/Ç= 2, 1/2, 1 ve 1/8 değerlerinde incelenmiş ve 120 st sonunda en yüksek ee_s, ee_p, E and x değerleri sırasıyla %97.1 (T/Ç=2), %95.2 (T/Ç=1/2), 133.5 (T/Ç=1) ve %50 (T/Ç=2) olarak bulunmuştur. T/Ç oranının CRL enziminin hidrolitik aktivitesine etkisi ise 2 ve 1/2 değerlerinde incelenmiş ve her çözücü için T/Ç=2'de elde edilen aktivitenin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Sulu tampon fazı pH'ının S-Naproksen üretimine etkisi pH=4, 6, 7.5 ve 9 değerlerinde incelenmiş; pH=4 en yüksek enantiyoseçimliliği veren pH olarak bulunmuştur. pH=4'de 120 st sonunda elde edilen ee_s, ee_p, E ve x sırasıyla %95.9, %94.4, 135.4 ve %50'dir. pH'ın CRL'nin hidrolitik aktivitesi üzerine etkisinde ise en yüksek aktivite pH=7.5'da, en düşük aktivite pH=9'da elde edilmiştir. Sıcaklığın S-Naproksen üretim tepkimesindeki enantiyoseçimliliğe ve CRL aktivitesine etkisi T=30, 37, 45 ve 50ºC'de incelenmiş; 120 st sonunda en yüksek değerler ee_s, ee_p, E ve x için sırasıyla %95.3, % 94.4, 131.2 ve %50 olarak T=45ºC'de gözlenmiştir**.** CRL'nin hidrolitik aktivitesi ise 24 st sonunda 37ºC'de en yüksek, 50ºC'de en düşük bulunmuştur. Hidroliz tepkimesinin girdisi rasemik Naproksen metil ester derişiminin enantiyoseçimliliğe etkisi 5, 7.5, 10 ve 15 g dm^{-3} derişimlerinde incelenmiş ve en yüksek ee_s, ee_p, E ve x sırasıyla %95.74, %92.5, 99.3 ve %50.3 olarak 10 g dm^{-3}'de elde edilmiştir. CRL enzim derişiminin S-Naproksen üretimine etkisi ise 0.01, 0.02, 0,04 ve 0,06 g cm^{-3} değerlerinde incelenerek 120 st sonunda en yüksek değerler ee_s, ee_p, E ve x için sırasıyla %96.3 (0.06 g cm^{-3}), %96.5 (0.01 g cm^{-3}), 157.8 (0.01 g cm^{-3}) ve %54.3 (0.06 g cm^{-3}) olarak bulunmuştur. N=200, 250 ve 300 rpm karıştırma hızlarında gerçekleştirilen tepkimede 120 st sonunda elde edilen en yüksek değerler ee_s, ee_p, E ve x için sırasıyla %93.6 (250 rpm), % 95.3 (250 rpm), 122.3 (200 rpm) ve %51.2 (300 rpm)'dir. NaCl, LiCl, KCl, $ZnCl_2$, $MgCl_2$, Trietilamin ve Triton-X 100 gibi katkı maddelerinin tepkime ortamına katılmasıyla dönüşüm artmasına rağmen enantiyoseçimlilik azalmıştır.

2005,88 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: *Candida rugosa* lipazı, enantiyoseçimli hidroliz, S-Naproksen

ABSTRACT

Master of Science Thesis

INVESTIGATION OF REACTION PARAMETERS FOR THE PRODOCTION OF S-NAPROXEN FROM RASEMIC NAPROXEN ESTER BY ENANTIOSELECTIVE HYDROLYSIS

Deniz MUTLU
Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemical Engineering

Supervisor: Prof.Dr.Serpil TAKAÇ

The effects of organic solvent type, volume ratio of aqueous phase/organic solvent (A/O), aqueous phase pH, temperature, substrate concentration, enzyme concentration, agitation rate, and additives on the enantioselectivity and activity of *Candida rugosa* lipase (CRL) in the production of S-Naproxen by the hydrolysis of racemic Naproxen methyl ester in biphasic system were investigated. Isooctane, hexane, cyclohexane and toluene were used as solvents and the highest enantiomeric excess (ee_s and ee_p), enantiomeric ratio (E), and conversion (x) were obtained in the presence of isooctane as 91.3%, 95.2%, 130.3, and 48.9%, respectively, at the residence time of 120 h. The highest hydrolytic activity was also observed when isooctane was used as organic solvent, which was followed by cyclohexane, hexane, and toluene in sequence. The effect of aqueous phase/organic solvent volume ratio on the hydrolysis of racemic Naproxen methyl ester was investigated for A/O (v/v) = 1/8, 1/2, 1 and 2 values by using isooctane as organic solvent. The highest ee_s, ee_p, E, and x obtained at the residence time of 120 h were 97.1% (A/O=2), 95.2% (A/O=1/2), 133.5 (A/O=1), and 50% (A/O=2), respectively. The variations in hydrolytic activity and stability were investigated for A/O=1/2 and A/O=2. The activity of A/O=2 is greater than A/O=1/2 for all organic solvents. Hydrolysis of racemic Naproxen methyl ester was carried out in the aqueous phase/isooctane biphasic system (A/O=2) for the aqueous phase pH values of 4, 6, 7.5 and 9. pH=4 led to the highest enantioselectivity. The highest ee_s, ee_p, E and x achieved at pH=4 as 95.9%, 94.4%, 135.4 and 50%, respectively, at the residence time of 120 h. On the other hand, the highest and lowest hydrolytic activity of CRL were obtained at pH=7.5 and pH=9, respectively. The effect of temperature on the S-Naproxen production was investigated for T=30, 37, 45 and 50ºC; and the highest ee_s, ee_p, E, and x were obtained at 45^{o}C. The ee_s, ee_p, E and x values achieved at T=45ºC were 95.9%, 94.4%, 135.4 and 50%, respectively, at the residence time of 120 h. However, the highest and lowest activities of CRL were observed at 37 and 50ºC, respectively. The influence of substrate concentration was investigated for 5, 7.5, 10 and 15 g $dm^{-3.}$ The highest ee_s, ee_p, E and x values were achieved for 10 g dm^{-3} substrate concentration. The effect of enzyme concentration was investigated for 0.01, 0.02, 0,04 and 0,06 g cm^{-3} and the highest ee_s, ee_p, E and x values achieved were 96.3% (0.06 g cm^{-3}), 96.5% (0.01 g cm^{-3}), 157.8 (0.01 g cm^{-3}) and 54.3% (0.06 g cm^{-3}), respectively. The effect of agitation rate was investigated for N=200, 250 ve 300 rpm. The highest ee_s, ee_p, E and x values obtained at the 120 h of residence time were 93.6% (250 rpm), 95.3% (250 rpm), 122.3 (200 rpm) and 51.2% (300 rpm), respectively. Using additives such as NaCl, LiCl, KCl, $ZnCl_2$, $MgCl_2$, trietilamine and Triton-X 100 increased the conversion; however, decreased the enantioselectivity.

2005, 88 pages

KEY WORDS: *Candida rugosa* lipase, enantioselective hydrolysis, S-Naproxen

TEŞEKKÜR

Öncelikle çalışmalarımı titizlikle takip eden, motivasyonumu sağlayan, hayata bakış açımı değiştiren, daha sistemli, düzenli ve dikkatli olmamı sağlayan, bilgisinden sonsuz faydalanabildiğim sayın hocam Prof.Dr.Serpil Takaç'a çok teşekkür ederim. Yüksek lisansımı tamamlamadan işe başladığımda, hayata gerçekten iyi bir yerden başladığımı düşünerek kendimi şanslı hissettim. Hayata adaptasyonumu kolaylaştıran, sonuç almanın keyfini tattıran bu yüksek lisans çalışmasına çok şey borçluyum. Deneylerim sırasında bana fikir veren motive eden, azmine hayran kaldığım, hayata dair de birçok şey paylaştığımız canım arkadaşım A.Ezgi Ünlü Büyüktopçu'ya da çok teşekkür ederim. Sahip olduğum en değerli varlığım aileme de her konuda olduğu gibi bu konuda da beni yüreklendirdikleri için teşekkür ederim. Sabrından, fedakarlığından, çalışkanlığından örnek, varlığından güç aldığım, bana en büyük emeği olan canım annem Necmiye Mutlu'ya, bana her zaman destek veren bilgi donanımından yararlandığım kendisiyle gurur duyduğum, hayatıma felsefe katan canım babam M.Erdal Mutlu'ya ve ev arkadaşım çok sevdiğim ağabeyim M.Fırat Mutlu'ya teşekkür ederim.

Deniz MUTLU
Ankara, Ocak 2006

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
SİMGELER DİZİNİ vii
ŞEKİLLER DİZİNİ viii
ÇİZELGELER DİZİNİ xi
1.GİRİŞ 1
2.KAYNAK ÖZETLERİ 3
2.1 Naproksen ve Etki Mekanizması 3
2.2 S-Naproksen Üretim Prosesleri 8
2.3 *Candida rugosa* Lipazı 10
2.4 Enzimatik Tepkimelerde Enantiyoseçimliliği Etkileyen Parametreler 11
2.4.1 Tepkime koşullarının değiştirilmesi 12
2.4.1.1 Çözücü türü ve seçimi 12
2.4.1.2 Sıcaklık, pH, katkı maddeleri, faz oranı ve karıştırma hızı etkisi 18
2.4.2 Biyokatalizörün yapısal olarak değiştirilmesi 20
2.4.3 Substrat modifikasyonu 22
2.5 Rasemik Naproksen Metil Esterin *Candida rugosa* Lipazı Katalizörlüğünde Enantiyoseçimli Hidroliz Tepkimesi 23
3. MATERYAL ve YÖNTEM 31
3.1 Materyal 31
3.2 Yöntem 31
3.2.1 CRL'nin hazırlanması 31
3.2.2 CRL' nin aktivite tayini 31
3.2.3 CRL'nin protein derişimi tayini 32
3.2.4 HPLC analizleri 32
3.2.4.1 Naproksen metil ester analizi 32
3.2.4.2 Naproksen analizi 32
3.3 Tepkimeler 33

3.3.1 Rasemik Naproksen üretimi 33
3.3.2 Rasemik Naproksen metil ester üretimi..... 33
3.3.3 Rasemik Naproksen metil esterin hidroliz tepkimesi ile S-Naproksen üretimi 33
3.4 Verilerin değerlendirilmesi 34
4. ARAŞTIRMA BULGULARI..... 35
4.1 Çözücü Türünün S-Naproksen Üretimine Etkisi..... 35
4.2 Tampon/Organik Çözücü Oranının S-Naproksen Üretimine Etkisi 38
4.3 Organik Çözücü Türünün ve Tampon/Organik Çözücü Oranının CRL Aktivitesine Etkisi 41
4.4 Tampon pH'ının S-Naproksen Üretimine Etkisi 43
4.5 Tampon pH'ının CRL Aktivitesine Etkisi 47
4.6 Sıcaklığın S-Naproksen Üretimine Etkisi 48
4.7 Sıcaklığın CRL Aktivitesine Etkisi 52
4.8 Substrat Derişiminin S-Naproksen Üretimine Etkisi 53
4.9 CRL Derişiminin S-Naproksen Üretimine Etkisi..... 56
4.10 Karıştırma Hızının S-Naproksen Üretimine Etkisi 59
4.11 Katkı Maddelerinin S-Naproksen Üretimine Etkisi..... 62
4.12 Katkı Maddelerinin CRL Aktivitesine Etkisi..... 66
5 TARTIŞMA VE SONUÇ..... 68
5.1 Çözücü Türünün S-Naproksen Üretimine Etkisi..... 68
5.2 Tampon/Organik Çözücü Hacim Oranının S-Naproksen Üretimine Etkisi..... 68
5.3 Organik Çözücü Türünün ve Tampon/Çözücü Hacim Oranının CRL Aktivitesine Etkisi 69
5.4 Tampon pH'ının S-Naproksen Üretimine Etkisi 70
5.5 Tampon pH'ının CRL Aktivitesine Etkisi..... 71
5.6 Sıcaklığın S-Naproksen Üretimine Etkisi 71
5.7 Sıcaklığın CRL Aktivitesine Etkisi..... 72
5.8 Substrat Derişiminin S-Naproksen Üretimine Etkisi 72
5.9 CRL Derişiminin S-Naproksen Üretimine Etkisi 73
5.10 Karıştırma Hızının S-Naproksen Üretimine Etkisi 73

5.11 Katkı Maddelerinin S-Naproksen Üretimine Etkisi 74
5.12 Katkı Maddelerinin CRL Aktivitesine Etkisi 75
KAYNAKLAR 76
EKLER 81
EK1 Deneysek Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal ve Biyokimyasal Maddeler 82
EK2 PNF Kalibrasyon Grafiği 83
EK3 Örnek Aktivite Hesabı 84
EK4 BSA Kalibrasyon Grafiği 85
EK5 Örnek HPLC Kromotogramları 86
ÖZGEÇMİŞ 88

SİMGELER DİZİNİ

COX	Siklooksijenaz
C_R	(R)-enantiyomerinin derişimi
C_S	(S)-enantiyomerinin derişimi
CRL	*Candida rugosa* lipazı
E	Enantiyomerik oran
ee_s	Substrat enantiyomerik aşırılığı
ee_p	Ürün enantiyomerik aşırılığı
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromotografisi
log Pi	i çözücüsünün 1-oktanol ve sudaki dağılma katsayısının logaritması
N	Karıştırma hızı
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drug
PEG	Polietilen glikol
PNF	para-nitro fenol
PNFA	para-nitro fenil asetat
T	Sıcaklık (°C)
k	Tepkime hız sabiti
t	Kalma süresi (st)
A	Aktivite
UV	Ultraviyole
x	Dönüşüm
λ	Dalga boyu (nm)
ε	Molar absorbtivite katsayısı (L/mol cm)

Kısaltmalar

MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
T/Ç	Tampon faz / Organik çözücü faz
TEA	Trietilamin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Naproksenin kimyasal yapısı ve enantiyomerleri 4
Şekil 2.2 NAIDS grubu ilaçların seçimlilik aralıkları..... 6
Şekil 2.3 Araşidonik asitten PGH_2 oluşum mekanizması 7
Şekil 2.4 Araşidonik asitten PGH_2 oluşumundaki reaksiyonlar. 7
Şekil 2.5 COX-1 ve COX-2 enzimlerinin yapısı 8
Şekil 2.6 İki faz sistemlerde organik çözücü– sulu faz gösterimi..... 14
Şekil 2.7 Organik çözücülerdeki suyun ters misellerdeki çözünürlüğü..... 21
Şekil 2.8 Enzim molekülünün ters misel içindeki konumları. 21
Şekil 2.9 Modifiye edilmiş substratla elde edilen ürünün modifiye edilmemiş substratla elde edilen ürüne dönüşümünün şematik gösterimi 22
Şekil 2.10 Rasemik Naproksen metil esterinin enantiyoseçimli enzimatik hidroliz tepkimesi 23
Şekil 4.1 Rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde çözücünün enantiyomerik aşırılık değerine (%ee_s) etkisi. 36
Şekil 4.2 Rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde çözücünün enantiyomerik aşırılık değerine %(ee_p) etkisi. 36
Şekil 4.3 Rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde çözücünün dönüşüm değerine (%x) etkisi..... 37
Şekil 4.4 Rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde çözücünün enantiyomerik orana (E) etkisi. 37
Şekil 4.5 Rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde tampon/çözücü hacim oranının (T/Ç) enantiyomerik aşırılık değerine (%ee_s) etkisi. 39
Şekil 4.6 Rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde tampon/ çözücü hacim oranının (T/Ç) enantiyomerik aşırılık değerine (ee_p) etkisi. 39
Şekil 4.7 Rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde tampon/çözücü hacim oranının (T/Ç) dönüşüm değerine (%x) etkisi. 40
Şekil 4.8 Rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde tampon/çözücü hacim oranının (T/Ç) enantiyomerik oran (E) etkisi. 40

Şekil 4.9 CRL'nin PNFA'ya karşı hidrolitik aktivite ve kararlılığına organik çözücü türünün etkisi..... 42
Şekil 4.10 CRL'nin PNFA'ya karşı hidrolitik aktivite ve kararlılığına organik çözücü türünün etkisi..... 42
Şekil 4.11 Rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde tampon pH'ının enantiyomerik aşırılık değerine (ee_s) etkisi. 45
Şekil 4.12 Rasemik Naproksen metil esterin enatiyoseçimli hidrolizinde tampon pH'ının enantiyomerik aşırılık (ee_p)değerine etkisi. 45
Şekil 4.13 Rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde tampon pH'ının dönüşüm (% x) üzerine etkisi. 46
Şekil 4.14 Rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde tampon pH'ının enantiyomerik oran (E) üzerine etkisi..... 46
Şekil 4.15 CRL'nin PNFA'ya karşı hidrolitik aktivite ve kararlılığına sulu faz pH'ının etkisi..... 48
Şekil 4.16 Rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde sıcaklığın enantiyomerik aşırılık değerine (ee_s) etkisi. 50
Şekil 4.17 Rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde sıcaklığın enantiyomerik aşırılık değerine (ee_p) etkisi..... 50
Şekil 4.18 Rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde sıcaklığın dönüşüm (% x) üzerine etkisi..... 51
Şekil 4.19 Rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde sıcaklığın enantiyomerik oran (E) üzerine etkisi. 51
Şekil 4.20 CRL'nin PNFA'ya karşı hidrolitik aktivite ve kararlılığına sıcaklık etkisi. 52
Şekil 4.21 Rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde substrat derişiminin enantiyomerik aşırılık değerine (ee_s) etkisi..... 54
Şekil 4.22 Rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde substrat derişiminin enantiyomerik aşırılık değerine (ee_p) etkisi. 54
Şekil 4.23 Rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde substrat derişiminin (%x) üzerine etkisi. 55
Şekil 4.24 Rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde substrat derişiminin enantiyomerik oran (E) üzerine etkisi. 55

Şekil 4.25 Rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde CRL derişiminin enantiyomerik aşırılık değerine (ee_s) etkisi 57
Şekil 4.26 Rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde CRL derişiminin enantiyomerik aşırılık değerine (ee_p) etkisi. 57
Şekil 4.27 Rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde CRL derişiminin dönüşüm (%x) üzerine etkisi. 58
Şekil 4.28 Rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde CRL derişiminin enantiyomerik oran (E) üzerine etkisi. 58
Şekil 4.29 Rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde karıştırma hızının enantiyomerik aşırılık değerine (ee_s) etkisi. 60
Şekil 4.30 Rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde karıştırma hızının enantiyomerik aşırılık değerine (ee_p) etkisi. 60
Şekil 4.31 Rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde karıştırma hızının dönüşüm (%x) değerine etkisi. 61
Şekil 4.32 Rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde karıştırma hızının enantiyomerik oran (E) üzerine etkisi. 61
Şekil 4.33 Rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde katkı maddelerinin girdi için enantiyomerik aşırılık (ee_s) değerine etkisi. 64
Şekil 4.34 Rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde katkı maddelerinin ürün için enantiyomerik aşırılık değerine (ee_p) etkisi. 64
Şekil 4.35 Rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde katkı maddelerinin dönüşüm (%x) değerine etkisi. 65
Şekil 4.36 Rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde katkı maddelerinin çözücünün enantiyomerik oran (E) değerine etkisi. 65
Şekil 4.37 CRL'nin PNFA'ya karşı hidrolitik aktivite ve kararlılığına katkı maddesi etkisi (Deney 1) 67
Şekil 4.38 CRL'nin PNFA'ya karşı hidrolitik aktivite ve kararlılığına katkı maddesi etkisi (Deney 2) 67

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Yaygın kullanılan çözücülerin log P değerleri..... 16

Çizelge 2.2 Çözücülerin suyla karışabilirlikleri ve enzim aktivitesi üzerine etkileri. 17

Çizelge 4.1 Katkı maddelerinin CRL aktivitesine etkisi deneyinde madde ortama eklenen madde miktarları..... 67

Çizelge Ek 1 Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal ve Biyokimyasal maddeler..... 78

1.GİRİŞ

S-Naproksen, α-arilpropiyonik asit türevi, stereoidal olmayan iltihap giderici ilaçlar (NSAIDs) grubunda, antipiretik (ateş düşürücü), analjezik (ağrı kesici) ve antiinflamatuar (iltihap giderici) özelliğe sahip, vücuttaki iltahaplanma prosesini kortizonsuz olarak inhibe eden bir ağrı kesici etken maddesidir. S- ve R- olmak üzere iki enantiyomere sahip olan Naproksenin S-enantiyomeri, R-enantiyomerine göre yaklaşık 28 kat daha aktiftir.

S-Naproksen, tepkimede kiral bir etki yokken oluşan rasemik karışımından klasik rezolüsyon, kinetik rezolüzyon ya da asimetrik sentez yöntemleriyle üretilebilir. Klasik rezolüsyon yöntemi endüstride yaygın olarak kullanılmasına rağmen, diğer yöntemler de alternatif olarak geliştirilmektedir. Kinetik rezolüsyonla enantiyomerik saflıkta ilaç üretimi ise, rasemik karışımdan enantiyoseçimli olarak kimyasal veya biyokimyasal katalizör kullanımıyla gerçekleştirilir. Kinetik rezolüsyonda, koşulların ılımlı olması ve enzimin enantiyoseçimliliğinin yüksek olması nedenleriyle biyokimyasal yapıdaki katalizörler tercih edilir.

Endüstriyel olarak kullanılan enzimlerin %80'ini hidrolazlar oluşturmaktadır. Lipaz, serin proteaz ve esteraz en çok kullanılan hidrolitik enzimlerdir. Lipaz enzimi, organik asitlerin, alkollerin, aminlerin, amidlerin ve esterlerin enantiyoseçimli hidroliz, esterleşme ve transesterleşme tepkimelerini katalizler. S-Naproksene olan yüksek enantiyoseçimliliği nedeniyle bilim adamları tarafından en çok kullanılan lipaz enzimi ise *Candida rugosa* lipazıdır (CRL). S-Naproksen, CRL biyokatalizörlüğünde rasemik Naproksen metil esterin hidroliz tepkimesi sonucu oluşmaktadır. Enzimatik hidroliz tepkimelerinin gerçekleştiği sistemler su ile karışabilen organik çözücü, su ile karışmayan organik çözücü veya suyla doygun organik çözücülü sistemlerdir. İki fazlı sistemler; yüksek substrat çözünürlüğü, biyokatalizör ve ürünün kolay uzaklaşabilmesi, substrat ve ürün inhibisyonunun az olması gibi sebeplerle tercih edilirler. İki fazlı sistemde gerçekleşen rasemik Naproksen metil esterin hidroliz tepkimesinde, girdi organik bir çözücüde çözünmekte, tepkime su-organik çözücü arayüzeyinde

gerçekleşmekte ve oluşan ürün Naproksen ise suda çözünmektedir. Su-organik çözücü iki fazlı sistemlerde yüksek verim eldesi için optimize edilmesi gereken başlıca reaksiyon parametreleri çözücü türü, organik faz/sulu faz hacim oranı, sıcaklık, sulu fazın pH değeri, substrat ve enzim derişimleri, karıştırma hızı ve katkı maddesi ilavesidir. Bu parametreler lipaz enantiyoseçimliliğini, aktivite ve kararlılığını etkilemektedir.

İlk olarak A.B.D'de 1976 yılında üretilen ve ülkemizde de yaygın olarak kullanılan Naproksenin Türkiye'de üretiminin gerçekleştirildiğine dair bilgi bulunmamaktadır. S-Naproksenin CRL enzimi katalizörlüğünde iki fazlı sistemde enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi süreli yayın literatüründe de oldukça az yer almaktadır. Literatürdeki çalışmalar daha çok esterleşme tepkimesi ile Naproksen esteri üretimi üzerine yoğunlaşmıştır.

Bu yüksek lisans çalışmasında, rasemik Naproksen metil esterden enzimatik yöntemle iki fazlı kesikli karıştırmalı bir sistemde S-Naproksen üretiminde önemli reaksiyon parametrelerinden çözücü türü, tampon/çözücü hacim oranı, tampon pH'ı, sıcaklık, substrat derişimi, enzim derişimi, karıştırma hızı ve katkı maddesi ilavesinin CRL enantiyoseçimliliği, aktivitesi ve kararlılığı üzerine etkileri incelenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Naproksen ve Etki Mekanizması

$C_{14}H_{14}O_3$ kapalı formülüne sahip olan Naproksen, beyaz kristal bir yapıdadır. Molekül ağırlığı 230.27, pKa = 4.15, pH = 2.2 - 3.7, erime noktası = 154 - 158°C'dır (British Pharmacopoeia 1993). Naproksen; kimyasal olarak α-metil-6metoksi-2-naftalin asetik asit ya da 2-(6-metoksi-2-naftil) propiyonik asit olarak adlandırılan stereoid olmayan iltihap giderici ilaçlar (Nonsteroidal Antiınflamatuar Drugs; NSAIDs) grubunun alt grubu olan profenlerin üyesi bir ilaçtır. NSAIDs, antipiretik (ateş düşürücü), analjezik (ağrı kesici) ve antiinflamatuar özelliğe sahip olup vücuttaki iltihaplanma prosesini kortizonsuz olarak inhibe eder (Kayaalp 1992). Tedavide tablet, fitil, yarı katı jel olarak kullanılırlar (Tezcan ve Tarımcı 1990).

Naproksen aromatik grup, asidik grup, yan zincirler ve bir kiral karbon atomuna sahiptir. Kiral olan α-CH_3'deki karbon atomu Naproksen molekülüne rasemik özellik kazandırmaktadır. Naproksenin -R ve –S olmak üzere iki formu vardır (Şekil 2.1). Birçok NSAIDs'da olduğu gibi ilaç aktivitesi enantiyomerlerden birinde daha fazladır. S-Naproksen R- enantiyomerine göre 28 kat daha aktif olarak etki gösterir ve R-Naproksenin toksik özelliği de vardır. Bu özellikler sebebiyle rasemat halinde bulunmayan profen üyesi tek ilaç Naproksendir (Lee *et al*. 2001).

NSAIDs'ın uluslararası kabul gören tek bir bilimsel sınıflandırılması yoktur. NSAIDs klasik olarak kimyasal yapılarına, siklooksijenaz (COX) seçiciliklerine ya da yarı ömürlerine göre sınıflandırılırlar (www.ttb.org.tr).

A. Kimyasal yapılarına göre

- ✓ Karboksilik Asitler
  - a) Salisilik asit ve esterleri
  - b) Antranilik asit ve türevleri: Flufenamik asit, Mefanamik asit
- ✓ Propiyonik Asitler (Profenler): Iboprofen, Ketoprofen, Flurbiprofen, Suprofen, ***Naproksen,*** Fenoprofen, Tiaprofenik asit

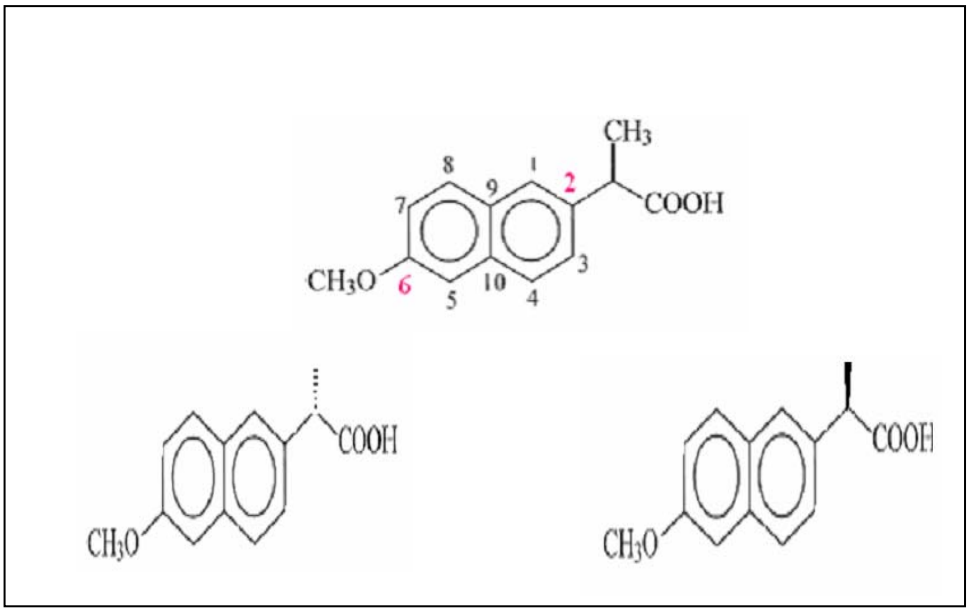
- ✓ Aril ve Heteroarilasetik Asitler
- ✓ Fenamik Asitler: Flufenamik, Mefenamik, Meklofenamik
- ✓ Enolik Asitler
    a) Pirazolonlar: Fenilbutazen, Oksifenbutazon, Azopropazon
    b) Oksikamlar : Pirosikam, Pesoksikam, Sudoksikam
- ✓ Fenilprazolonlar
- ✓ Anilitler

B. Yarı ömürlerine göre

- ✓ Uzun yarı ömürlü ilaçlar (10-12 saat): Azopropazon, Diflunosel, Perbufen, Nabumeton, ***Naproksen***, Oksaprazosin, Fenilbutazon, Piroksikam. Naproksen propiyonik asit türevleri içinde en uzun etki gösteren ilaçtır; günde iki kez kullanılır.
- ✓ Kısa yarı ömürlü ilaçlar (6 saatten az): Diklofenak, Etodolak, Fenoprofen, Flufenamik Asit, Flurbiprofen, İbuprofen, İndometazin, Ketoprafen, Pirprofen, Traprofenik Asit, Tolmetin

C. COX seçiciliklerine göre

- ✓ COX- 1 Spesifik İlaçlar (ajanlar)
- ✓ COX Spesifik olmayan İlaçlar
- ✓ COX-2 Seçici İlaçlar
- ✓ COX-2 Spesifik İlaçlar



Şekil 2.1 Naproksenin kimyasal yapısı ve enantiyomerleri

Naproksenin ağrı ve iltihabı giderme ile ateş düşürme mekanizmaları birbirinden farklıdır. İltihap giderici etkisini araşidonik asitten prostoglandin (PG) oluşumunu katalizleyen COX enzimini inhibe ederek gösterirken, ateş düşürücü etkisine aracılık eden mekanizma belirsizdir. Naproksen, ağrı kesici etkisini hipotalamusta bulunan COX enzimini inhibe edip PGE2 oluşumunu azaltarak gösterir .

Dokularda iltihaplanma veya yaralanma olduğu zaman araşidonik asitten prostoglandin sentezlenir. Sentezde görev yapan enzim siklooksijenaz (COX), diğer adıyla prostoglandin senteazlar serbest yağ asitleridir. Siklooksijenazın COX-1 ve COX-2'den oluşan iki formu vardır. COX-1, kan damarları, mide ve böbreklerde fazla miktarda ve sürekli olarak bulunur. COX-1 enziminin katalizörlüğünde oluşan prostoglandin; mide mukozasını asitlere karşı korur, böbreklerden su atılımında etkin roldedir. COX-2 ise normalde hücrelerde önemli seviyelerde bulunmaz. Metabolizmada sadece yaralanma ya da iltihaplanma sonucu sitokin, mitojen, endotoksin gibi iltihaplanma hücrelerinde üretilirler. COX-2 inhibisyonu, ağrıyı ve iltihabı azaltır; COX-1 inhibisyonu ise ülsere sebep olur.

NSAIDs metabolizmaya alındığında fonksiyonlarından biri COX enzimini inhibe edip ağrı ve iltihabı gidermektir. İlacın COX-1 ve COX-2 enzimlerine olan ilgisi farklılık gösterebilir. Bu durum NSAIDs'ın COX seçiciliğiyle ilgilidir. COX seçiciliği IC_{50} ile tanımlanır. IC_{50}, COX-1 aktivitesini yarıya indirmek için gerekli olan ilaç derişiminin, COX-2 aktivitesini yarıya indirmek için gerekli ilaç derişimine oranıdır .

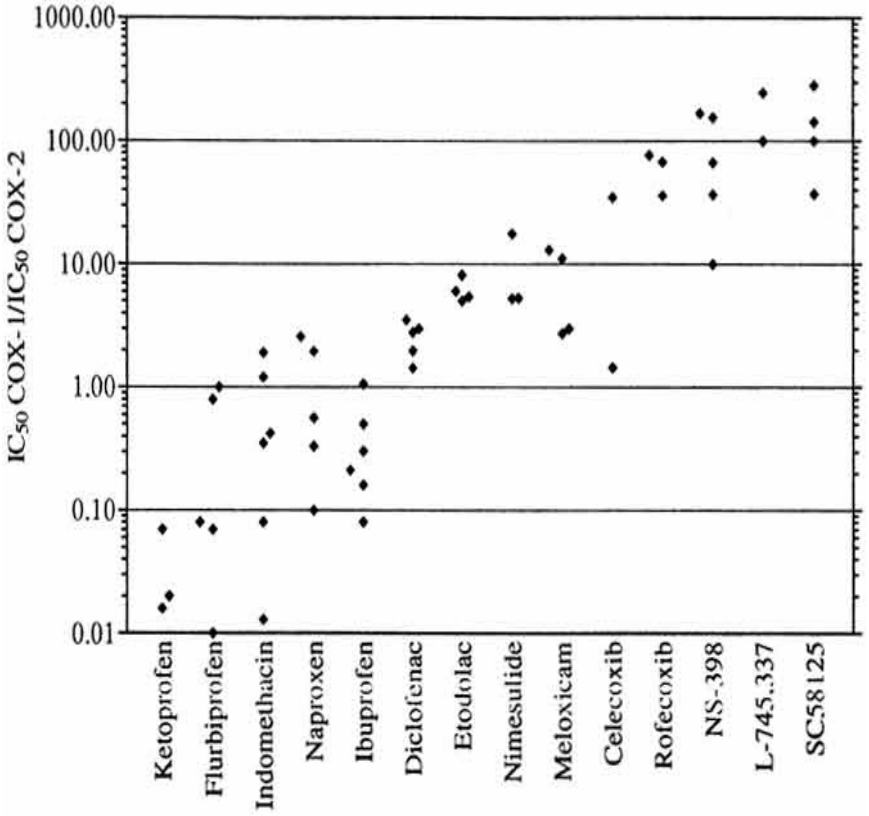
$$IC_{50} = \left[\frac{IC_{50}COX-1}{IC_{50}COX-2} \right] \qquad (2.1)$$

IC_{50} >1 ise ilaç COX-2 seçici, IC_{50} < 1 ise ilaç COX-1 seçicidir. NSAIDs, COX seçiciliklerine göre sınıflandırıldıkları zaman inhibe ettikleri enzime göre isimlendirilirler):

COX-1 Spesifik İlaçlar: COX-2 inhibisyonu yapmadan COX-1'i inhibe ederler. Örneğin düşük doz aspirin, kanı sulandırma özelliğine sahiptir.
COX Spesifik Olmayan İlaçlar: Her iki enzimi de inhibe ederler.

COX-2 Seçici İlaçlar: COX-2 inhibisyonu yaparken artan dozlarda belirgin COX-1 inhibisyonuna sebep olurlar.
COX-2 Spesifik İlaçlar: COX-1 inhibisyonuna neden olmazlar.

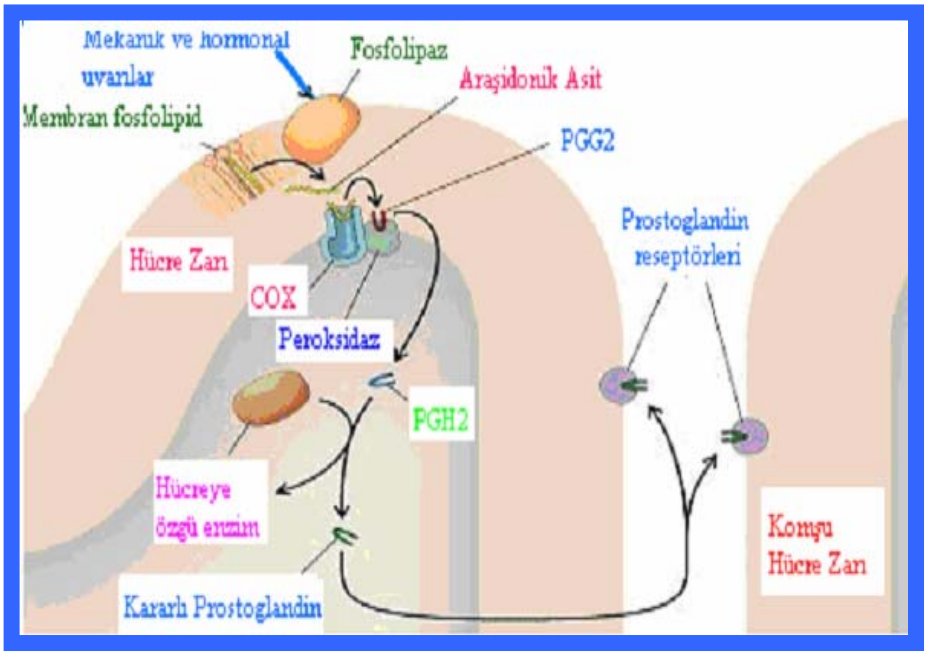
Naproksen, prostoglandin sentezini katalizleyen COX-1 ve COX-2 enzimlerini birlikte inhibe eder, yani COX spesifik olmayan ilaç grubundandır. Bu özellikleriyle fazla miktarda gastrik asit üretimine sebep olur (örn: ülser ve gastrointestinal kanama). Şekil 2.2'de NAIDS grubu ilaçların seçicilik aralıkları gösterilmiştir. Ketoprofen, Flurbiprofen, İndometasin, COX-1 spesifik ilaçlar; Naproksen, Ibuprofen, Diklofenak COX spesifik olmayan ilaçlar; Etodolak, Nimesuside, Meloksikam, Celecoxib, Rofecoxib COX-2 seçici ilaçlar; NS-398 ve diğer ilaçlar ise COX-2 spesifik ilaçlardır.



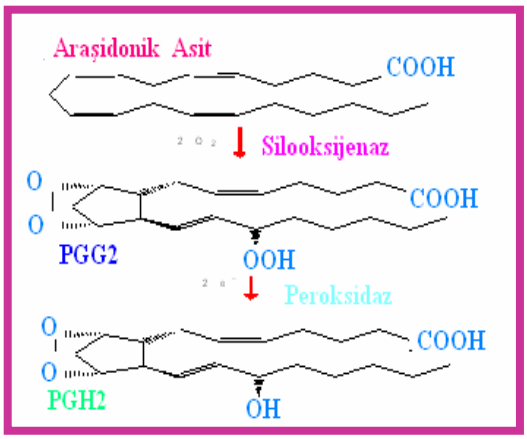
Şekil 2.2 NAIDS grubu ilaçların seçimlilik aralıkları http://www.ttb.org.tr

Şekil 2.3'de prostoglandin oluşum mekanizması gösterilmiştir. Bu mekanizmaya göre, mekanik ve hormonal faktörlerin etkisiyle fosfolipaz A_2 hücre zarındaki fosfolipitle birleşerek, araşidonik asit hücre zarından ayrılır. Araşidonik asit, hücre zarında bulunan

doymuş bir yağ asididir. Araşidonik asit, COX ve peroksidaz enzimlerinden oluşan komplekse bağlanır. COX enzimiyle etkileşimden sonra PGG_2 oluşur. Oluşan PGG_2 peroksidaz ile etkileşerek biyoaktif bir yağ olan PGH_2 sentezlenir. PGH_2 hücreye özgü enzimlerle, hızlı bir şekilde kararlı prostoglandine dönüşür. Kararlı prostoglandin hücreden difüzyon ile ayrılır. Araşidonik asitten PGH_2 oluşumunda gerçekleşen reaksiyonlar Şekil 2.4'te gösterilmiştir.

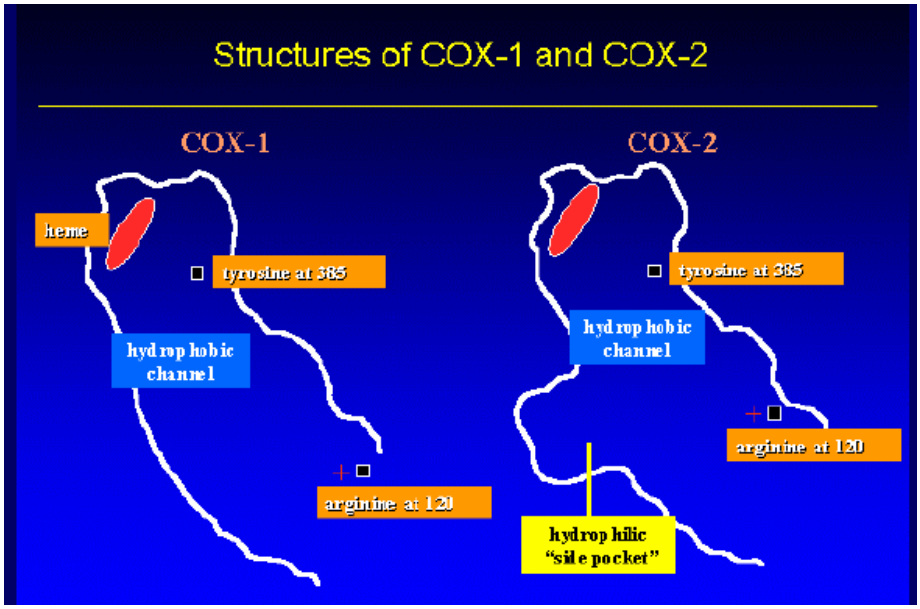


Şekil 2.3 Araşidonik asitten PGH_2 oluşum mekanizması http://www.ttb.org.tr



Şekil 2.4 Araşidonik asitten PGH_2 oluşumundaki reaksiyonlar)

COX-1 ve COX-2 enzimleri, yapısal olarak benzerlik göstermelerine rağmen farklı fonksiyonları vardır (Şekil 2.5). İki enzimin amino asit dizilişleri çok benzerdir. COX kanalı, uzun, dar ve hidrofobiktir. Yapısal olarak iki enzim arasındaki en büyük fark, substratın giriş kanalında ve aktif konumlarındaki amino asit dizilişlerindedir.



Şekil 2.5 COX-1 ve COX-2 enzimlerinin yapısı

2.2 S-Naproksen Üretim Prosesleri

İzomerler, yapısal ve stereoizomerler olmak üzere ikiye ayrılır. Stereoizomerler de enantiyomerler ve diastereomerler olarak sınıflandırılırlar. Enantiyomerlerin eşit miktardaki karışımları ise rasemik karışım (rasemat) olarak adlandırılır ve kimyasal sentez yoluyla elde edilirler. Rasematlar, kiral bir bileşik ya da kiral bir katalizör olmadığı durumlarda oluşan kiral ürünlerdir. Ticari olarak üretilen sentetik, biyoaktif, kiral moleküllerin %85'i rasematlardır (Ahuja 1997). Rasemik karışımlardan enantiyomerlerin ayrılması işlemine rezolüsyon (ayrışma) denir. Rezolüsyonun amacı, enantiyomerlerden birini saf ya da zenginleştirilmiş olarak elde etmektir.

Enantiyomerik saflıkta bileşik elde etmek için uygulanan rezolüsyon yöntemi, rasematların rezolüsyonu ve asimetrik sentez olmak üzere iki ana başlık altında incelebilir (Özcan 2003):

1. Rasematların Rezolüsyonu

1.1. Kristalizasyon temelli rezolüsyon

1.1.1. Doğrudan rezolüsyon

1.1.2. Klasik rezolüsyon

1.2. Kinetik rezolüsyon

1.2.1. Kimyasal biyokatalizör kullanılarak

1.2.2. Biyokimyasal katalizör kullanılarak

2. Asimetrik Sentez

2.1. Doğal kiral bileşikler kullanılarak

2.2. Kiral katalizörler kullanılarak

2.2.1. Kimyasal katalizörler

2.2.2. Biyokimyasal katalizörler

S-Naproksen, tepkimede kiral bir etki yokken oluşan rasemik karışımdan klasik rezolüsyon, kinetik rezolüzyon ya da asimetrik sentez yöntemleriyle üretilebilir. S-Naproksen üretimi, ilk kez 1970 yılında Harrison *et al.* (Syntex) tarafından klasik rezolüsyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Endüstride halen yaygın olarak kullanılan yöntem klasik rezolüsyon olmasına rağmen, diğer yöntemler de alternatif olarak geliştirilmektedir. Klasik rezolüsyonun temeli, rasemik Naproksenle bir rezolüsyon aracı arasında diastereomerik yapılar oluşturarak enantiyomerlerin ayrılmaları sağlanmaktadır. Kinetik rezolüsyonla enantiyomerik saflıkta ilaç üretimi ise, rasemik karışımdan enantiyoseçimli olarak kimyasal veya biyokimyasal katalizör kullanımıyla gerçekleştirilir. Bu prosesin temelini enantiyomerlerin reaksiyon hızlarının farkı oluşturmaktadır; katalizör ya biyokatalizör kiral yapıda olduğu için enantiyomerden birinin diğerine göre daha fazla ve hızlı oluşumu sağlanır. Kinetik rezolüsyonda, koşulların ılımlı olması ve enzimin enantiyoseçimliliğinin yüksek olması nedenleriyle biyokimyasal yapıdaki katalizörler tercih edilir. Asimetrik sentezin kinetik rezolüsyondan farkı, girdi ya da substratın rasemik formda olmasıdır (Özcan 2003).

Biyokatalizör varlığında rezolüsyon tepkimelerinde substrat spesifikliği, katalizörü tanıma özelliği ve kofaktöre ihtiyaç duymamasından dolayı en çok kullanılan enzim lipazdır. Yüksek aktivitesi ve enantiyoseçimliliği sebebiyle en çok kulllanılan lipaz türü ise *Candida rugosa* lipazıdır (CRL).

2.3 *Candida rugosa* Lipazı (CRL)

Enzimler oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlar olmak üzere altı sınıfa ayrılırlar. Endüstriyel enzimlerin %80'ini hidrolazlar oluşturmaktadır. Hidrolazlar C-O,C-N, C-C, P-O bağlarının kırılmasını sağlarlar (Krishna 2002). En yaygın kullanılan hidrolazlar; lipaz, serin proteaz ve esterazdır. Endüstriyel biyoteknolojik uygulamalarda kullanılan enzimlerin ise yaklaşık %25'i lipazlardır. Lipazlar (triaçilgliserol hidrolazlar; EC 3.1.1.3), triaçil gliserolün alkole (gliserol) ve serbest yağ asitlerine hidroliz tepkimesinin katalizörleridir (Brady *et al.* 2004). Bu enzimler gıda ve tatlandırıcı yapımında, farmasötik ürünlerin üretiminde, deterjan endüstrisinde, kozmetik ve parfümeri sektöründe kullanılırlar. Organik asitlerin, alkollerin, aminlerin, amidlerin ve esterlerin enantiyoseçimli hidroliz, esterleşme ve transesterleşme tepkimelerini katalizlerler (Benjamin 1998). S-Naproksen üretimi amaçlı çalışmalarda kiral yapıyı algılama, geniş substrat spesifikliği, kofaktöre ihtiyaç duymaması, ısıl kararlılığı ve ucuz olması sebebiyle en çok kullanılan enzim CRL'dir. Sadece *Candida rugosa* mayasından elde edilen lipaz, rasematın -S formuna karşı yüksek enantiyoseçimlilik gösterir (Cui *et al.* 1997). CRL'nin aktif konumunu Ser-His-Glu oluşan katalitik üçlü oluşturmaktadır. Aktif bölgeyi kısmen kaplayan bir kapağa sahiptir. Kapağın aktif bölgeye bakan yüzeyi hidrofobik, diğer yüzeyi ise hidrofiliktir (Tejo *et al*. 2004). Kapak açık ve kapalı olmak üzere iki farklı konformasyonda bulunabilir. Kapak kapalıyken 90° hareket ettiğinde açık forma gelir. Kapağın görevi enzimin aktif konumuna substrat girişini sağlamaktır (Secundo *et al.* 2003). Kapalı konumda enzim inaktif ve enantiyoseçimliliği düşük, açık konumda ise aktif ve enantiyoseçimliliği yüksektir Enzimler organik çözücülerde çözünmezler, girdinin organik fazda çözündüğü durumda su-organik çözücü iki faz sistemi kullanmak gereklidir. Bu durumda tepkime su-organik çözücü iki faz arayüzeyinde gerçekleşir. CRL, prolin aminoasitinin hidrofobik yüzeyiyle su-yağ arayüzeyine bağlanır (James *et*

al. 2003). Enzim aktivitesinin arayüzeyde artması arayüzey aktivasyonu olarak bilinir. Diğer birçok lipaz türünde gözlenmeyen arayüzey aktivasyonu *Candida rugosa* lipazında gözlenmektedir. CRL enzimi suda çözündüğü zaman kapağı kapalı ve hidrofilik kısmı çözücüye doğru dönüktür. Lipazın su-organik çözücü arayüzeyine adsorbsiyonundan sonra kapak açılır ve enzimin hidrofobik kısmı ara yüzeyde ortaya çıkar.

2.4 Enzimatik Tepkimelerde Enantiyoseçimliliği Etkileyen Parametreler

Biyokatalizör varlığında gerçekleşen tepkimeler, farmasotiklerin, kiral moleküllerin, gıda maddelerinin ve biyokimyasalların üretiminde yaygın olarak kullanılırlar. Enzimlerin bir alt grubu olan hidrolaz enzimleri katalizörlüğünde, esterlerin tersinir olarak suyla parçalanarak alkol ve aside dönüşümü enzimatik bir hidroliz tepkimesidir. Bu tepkimeler rasemik bir karışımdan kiral bir katalizör varlığında, enantiyoseçimli olarak rasemik olmayan kiral moleküller elde etmek amacıyla da gerçekleştirilir. Enzimatik hidroliz tepkimelerinde yüksek verim ve enantiyoseçimlilikte ürün eldesi amaçlanmaktadır. Hidroliz tepkimeleri kimyasal katalizör varlığında da gerçekleşebilmelerine rağmen biyokimyasal katalizli tepkimelerin birçok üstünlükleri vardır (Garcia *et al*. 1995):

1. Enzimatik tepkimeler ılımlı koşullarda gerçekleşebilirler, yüksek sıcaklık ve basınç gerektirmezler.
2. Yan ürün oluşumu oldukça az gözlenir.
3. Reaksiyonlar stereospesifiktir ve rasemik karışımlar substrat olarak kullanılabilir.
4. Enzimler tekrar kullanılabilirler, tutuklanmış enzimlerin kullanımları ise serbest enzime göre daha kolaydır.

Enzimatik hidroliz tepkimelerinin dezavantajı ise farklı aminoasit dizinlerinden oluşan büyük bir peptiti sentezleyebilmek için birçok enzim gerekebilmesi, reaksiyonda kullanılmak istenen enzimin bazen saf olarak değil de enzim karışımı olarak bulunabilmesidir. İstenilen enzimi saf olarak elde etmek zor olabilir ve enzimlerin

pahalı olmaları da dezavantajları arasındadır. Enzimlerin substratla etkileşip tepkime verebilmeleri için arayüzeye ihtiyaçları vardır. Girdi ve enzimin aynı fazda çözünmedikleri sistemlerde girdinin çözünebilmesi için bazen organik çözücüler gerekli olmaktadır. Girdi ve enzimin aynı fazda çözündüğü sistemlere ise yağ ile kaplanmış enzimli sistemlere verilebilir (Wu *et al.* 2002).

Organik çözücülü sistemlerde gerçekleşen enzim katalizli tepkimelerin aktivite ve enantiyoseçimlilikleri üç farklı yolla değiştirilebilir (Faber 2000):

1. Tepkime koşullarının değiştirilmesi
2. Biyokatalizörün yapısal olarak değiştirilmesi
3. Substrat modifikasyonu

2.4.1 Tepkime koşullarının değiştirilmesi

2.4.1.1 Çözücü türü ve seçimi

Enzimler aktivitelerini sulu çözeltilerde uygun sıcaklık ve basınçta gösterirler. Enzimlerin aktivitelerini sulu ortamlarda gerçekleştirmeleri lipofilik bir girdi kullanıldığı zaman enzim-substrat etkileşimi açısından dezavantaj yaratabilir. Bu durumda tepkimenin organik faza taşınması gerekebilir. Organik çözücülerde gerçekleşen enzimatik tepkimelerin, sulu çözeltide gerçekleşen tepkimelere bazı üstünlükleri vardır. Birçok lipofilik bileşiğin sulu fazda çözünmemesi, suda oluşabilecek yan tepkimelerin organik ortamlarda gözlenmemesi, girdinin (veya ürünün) organik çözücüde çözünüp ortamdan kolay ayrılabilmelerinin sağlanması, apolar çözücüler kullanıldığı zaman enzimin bağlı suyunun zarar görmemesi, enzimlerin organik ortamlarda çözünmemeleri nedeniyle ortamdan kolay ayrılabilmeleri, enzimlerin sulu ortama göre organik ortamda daha kararlı olmaları ve mikrobiyal kirliliğin aza indirgenmesi sebepleriyle enzimatik tepkimeler organik çözücü varlığında gerçekleştirilirler. Ancak, çözücü enzim aktivitesini azaltma eğilimi gösterebilir ve polar özellikte ise enzimler denature olabilirler. Organik çözücülerin enzimler üzerine etkisinin üç şekilde olabileceği bildirilmiştir (Selek and Chaudhur 1999):

1. Çözücüler proteinin tersiyer yapısını bozup ayrışmasına sebep olabilirler (denaturasyon). Aktif konumun bozulması katalitik aktiviteyi azaltır. Ancak, bu durum tersinir olabilir.
2. Çözücüler enzimin konformasyonunu bozarak tersinir bir şekilde kararlılığının azalmasına sebep olabilir.
3. Çözücü molekülleri enzimin aktif konumuna bağlandıkları zaman inhibisyon etkisi yaratabilirler ve enzimin deaktive olmasına sebep olabilirler.

Biyolojik sistemlerde su, fiziksel olarak iki kategoride incelenir. Bunlar, enzimin etrafında bulunan ve %98'den büyük olan *yığın su* ile enzim yüzeyine sıkıca bağlanmış olan *bağlı su*dur. Enzim yapısının bozulması ve aktivitesinin kaybolmasına sebep, organik çözücüyle enzimin yüzey tabakasında bulunan bağlı suyun yer değiştirmesidir. Bu yer değiştirme sırasında enzimin ikincil ve üçüncül yapıları da değişerek katalitikçe aktif konformasyonu değişir ve sonuç olarak enzim denature olur. Enzim aktivitesi organik çözücüdeki su miktarıyla değil, enzime bağlanan su miktarıyla ilişkilidir (Zaks and Russell 1988).

Enzimatik tepkimelerin gerçekleştiği organik ortamlar ise üç ana başlık altında incelenebilir (Ogino and Ishikawa 2000):

1. Su ile karışabilen organik çözücü sistemi
2. Su ile karışmayan organik çözücü sistemi
3. Suyla doygun organik çözücü sistemi

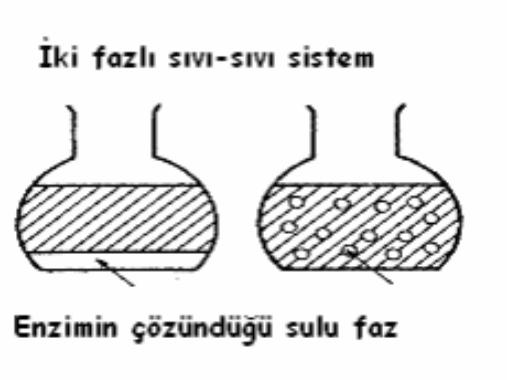
Suyla karışan organik çözücü sistemleri:

Tek fazlı sistemlerdir; enzim, girdi ve ürün aynı fazda çözünürler. Su-organik çözücü arayüzeyinde girdi ve ürün için kütle aktarım kısıtlamaları yoktur. Suyla karışan birçok organik çözücü, toplam hacim %10'una kadar kullanılır, bazı durumlarda bu oran %50-70'e kadar çıkabilir. Yüksek organik çözücü derişimlerinde enzim aktivitesinde azalma gözlenir. Dimetilsulfoksit, dimetilformamid, tetrahidrofuran, dioksan, aseton, metanol ve tersiyer butanol suyla karışabilen organik çözücülerdir (Ogino and Ishikawa 2000).

Suyla karışan organik çözücü sistemlerindeki reaksiyonlara amino ester, karboksilik asit, üre ve gliserofosfat sentezleri örnek olarak verilebilir.

Su ile karışmayan organik çözücü sistemleri:

Bu sistemler, enzimin çözündüğü sulu faz ve lipofilik substratın çözündüğü apolar organik faz olmak üzere iki makroskobik faz içerir. Bu gruptaki çözücülere örnek olarak hidrokarbonlar, eter, kloroform verilebilir. Sulu faz ve organik faz ayrı tabakalar halinde olabilir veya sulu faz damlacıklar halinde organik fazın içinde emülsiyon oluşturabilir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 İki faz sistemlerde organik çözücü-sulu faz gösterimi

İki fazlı sistemlerde reaksiyon bölgesi sulu faz ya da su-organik faz arayüzeyi olabilir. Genel olarak reaksiyon bölgesi sulu faz olan iki fazlı sistemlerdeki enzim inaktivasyonu suyla karışan tek fazlı sistemlere göre daha azdır; çünkü enzimin organik çözücüyle doğrudan teması engellenmiştir. Reaksiyon bölgesi su-organik çözücü arayüzeyi olan iki fazlı sistemlerde ise enzim denatürasyonu gerçekleşebilir. Karıştırma, kütle aktarım katsayısının artırırken enzimin mekanik kuvvetler sonucu aktivitesini kaybetmesine sebep olabilir. Su-organik çözücü iki fazlı sistemler, steroidler, yağlar ve alkenler gibi lipofilik substratların dönüşümünde etkili ortamlardır. Bu tür sistemlerde yüksek verim eldesi için optimize edilmesi gereken parametreler şunlardır:

- Çözücü seçimi
- Organik çözücü /sulu faz hacim oranı (faz oranı)
- Sıcaklık
- Sulu ortam pH değeri

- Katkı maddeleri
- Karıştırma hızı

İki fazlı sıvı-sıvı sistemler kolay hazırlanabilirler ve reaksiyon ürünleri kolayca ayrılabilir. Bunun yanısıra, arayüzey alanı küçük olabileceğinden arayüzeydeki kütle aktarım hızı düşük olabilir. Kütle aktarım hızını artırabilmek için karıştırmanın etkili yapılması gerekir. Bu sistemlerin dezavantajları çözücü maliyeti, çözücünün yaratabileceği inhibisyon ve biyokatalizörün denatürasyonudur. Bunlara rağmen yüksek substrat çözünürlüğü, biyokatalizör ve ürünün kolay uzaklaşabilmesi, substrat ve ürün inhibisyonunun az olması ve reaksiyon hızlarının yüksek olması sebebiyle tercih edilirler.

Suyla doygun organik çözücü sistemleri:

Bu tür sistemlerde, katı enzim tek fazlı bir organik çözücü içerisinde çözünmeden bulunmaktadır. Bu tür çözücüler doygundur; %2'den daha az su içeriğine sahiptir. Bu sistemler sıvı-katı iki fazlı sistemler olarak da adlandırılabilirler. Organik çözücü ve organik çözücüyle temas eden denaturasyona uğramış protein tabakasıyla korunan katı, hidratlanmış enzim etrafında bir kafes oluşmuştur. Yüksek sıcaklıklarda kullanımı uygundur (Khmelnitsky *et al*. 1988). Organik çözücülerdeki katı enzim süspansiyonlarında gerçekleşen enzim katalizli proseslere; peptitlerin sentezi, terpenlerin dönüşümü, fenol, kolesterol, lignin oksidasyonları ve transesterleşme tepkimeleri örnek olarak verilebilir.

Çözücüler; yoğunluk, vizkozite, dielektrik sabiti, donma noktası, karışabilirlik, toksiklik, yanıcılık gibi farklı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahiptirler (Butler 1979). Enzimatik sistemlerde sadece bu özelliklerden yararlanılarak çözücü seçimi yapmak yetersizdir. Enzimler için aktivite ve kararlılık önemli parametrelerdir; kullanılan çözücülerin enzim yapısını bozucu özellikte olmamaları gerekir. Çözücülerin sınıflandırılmalarında kullanılan parametreler çözücülerin polar özellikleriyle ilişkilendirilmişlerdir. Çözücü polarlığını belirleyen parametreler ise; dielektrik sabiti (ε), Hildebrand parametresi (δ), dipol moment (μ), ve log P'dir. Hidrofobluk derecesini simgeleyen log P dışındaki parametreler çözücülerin polarlıklarını tanımlamak için

yeterli değildirler. Enzimatik tepkimelerde çözücü seçimi, çözücülerin log P değerlerinden yararlanılarak yapılır. *i* çözücüsünün hidrofobluğu log Pi değeriyle ölçülür. Burada Pi dağılma katsayısıdır, çözücünün oktanoldeki derişiminin sudaki derişimine oranıdır.

$$P_i = \frac{C_i(ok\tan ol)}{C_i(su)} \tag{2.2}$$

Yaygın olarak kullanılan çözücülerin log P değerleri Çizelge 2.1'de verilmiştir. Çözücü hidrofobluğu ile enzim aktivitesi arasında bir ilişki olmasına rağmen, çözücü hidrofobluğunun enzimin kararlılığıyla ilişkisi yoktur. Genelde enzim aktivitesi, çözücünün hidrofobluğu arttıkça artar. Çözücülerin suyla karışabilirlikleri ve enzim aktivitesi üzerine etkileri ise Çizelge 2.2'de yer almaktadır. Genel olarak düşük polariteye sahip çözücüler enzimin kararlılığını daha az etkilerler (Duhalt 1992).

Çizelge 2.1 Yaygın kullanılan çözücülerin log P değerleri (Faber 2000)

Çözücü	*log P*	*Çözücü*	*log P*
Dimetilsülfoksit	-1.3	Dipropileter	1.9
Dioksan	-1.1	Kloroform	2.0
N,N dimetilformamid	-1.0	Benzen	2.0
Metanol	-0.76	Fenilasetat	2.2
Asetonitril	-0.33	Toluen	2.5
Etanol	-0.24	Octanol	2.9
Aseton	-0.23	Dibütileter	2.9
Tetrahidrofuran	0.49	Pentan	3.0
Etilasetat	0.68	Karbontetraklorit	3.0
Pyridin	0.71	Siklohekzan	3.2
Bütanol	0.8	Hekzan	3.5

Çizelge 2.2 Çözücülerin suyla karışabilirlikleri ve enzim aktivitesi üzerine etkileri (Faber 2000)

log P	*20 C° suda çözünürlük (%)*	*Enzim üzerine etkisi*
<2	>%0.4 (polar)	Enzimin bağlı suyunu alarak biyokatalizörü inaktive veya denature ederler, biyokatalitik sistemler için uygun değildir
2 -4	% 0.04-0.4	Enzimin bağlı suyuna zayıf olarak zarar verirler. Enzim aktiviteleri farklılık gösterir.
>4	Karışmaz (apolar)	Enzimin bağlı suyuna zarar vermezler, biyokatalitik sistemler için uygundurlar.

İki fazlı sistemlerde gerçekleşen enzimatik tepkime koşullarının optimize edilmesinde çözücü seçimi çok önemlidir. İyi bir çözücü tepkimenin amacına göre aşağıdaki özelliklere sahip olmalıdır:

1. Tepkime ortamına inert olmalı
2. Yüksek seçimlilikte olmalı
3. Ürünün geri kazanımını kolaylaştırabilmeli
4. Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca ayrılabilmeli
5. Enzimin aktivitesini ve kararlılığını azaltmamalı
6. Kimyasal ve ısıl olarak kararlı olmalı
7. Zararlı ve tehlikeli olmamalı
8. Ucuz olmalı, çok miktarda bulunabilmeli

Çözücü seçiminin aktivite ve kararlılık üzerine etkisi bu bölümde verilmiştir. Ancak çözücülerin tepkime enantiyoseçimliliğine etkisi kesin olarak bilinmemektedir.Bu konuyla ilgili yapılan literatür çalışmaları Bölüm 2.5’ de yer almaktadır.

2.4.1.2 Sıcaklık, pH, katkı maddeleri, faz oranı ve karıştırma hızı etkisi

İki fazlı sistemlerde çözücü seçiminin yanısıra enzimin aktivite ve enantiyoseçimliliğini etkileyen optimize edilmesi gereken diğer önemli parametreler; sulu faz/organik faz hacim oranı, sulu ortam pH değeri, sıcaklık, katkı maddesi ve karıştırma hızıdır.

Enzim herhangi bir pH değerinde pozitif ve negatif gruplara sahiptir. Enzimin reaksiyon ortamında iyonlaşması ortamın pH'ına bağlıdır. İyonlaşan enzimin konformasyonu değişir; bu durumda aktivitesi ve seçimliliği de değişmiş olur. Enzimler, genellikle pH=5-8 aralığında aktivite gösterirler. Her enzimin aktivitesinin artıp maksimum olduğu ve sonra azaldığı bir pH aralığı vardır.

Sıcaklık enzimatik tepkime hızını etkileyen diğer bir parametredir. Pek çok tepkime için geçerli olan Arhennius modeli sıcaklık ve tepkime hız sabiti k arasındaki ilişkiyi açıklamaktadır. Sıcaklık, tepkime hızı k ve tersir tepkimelerde denge sabiti K'yı etkilemektedir. Tepkimenin tersinmez olduğu durumlarda sıcaklık artıkça K da artmaktadır. Tepkime tersinir ise sıcaklık arttıkça K'nın değişimi tepkimenin entalpi değişimine bağlı olarak değişmektedir. Tepkime endoterm ise K artmakta, ekzoterm ise K azalmaktadır. Enzimatik hidroliz tepkimelerinde sıcaklık başlıca iki nedenle kontrol edilir:

1. Sıcaklık düşük olduğu zaman reaksiyon hızı düşük olur; ayrıca substratın ortamdaki çözünürlüğü de düşüktür.
2. Sıcaklık çok yüksek olduğu zaman enzim denatüre olur, katalitik aktivitesini kaybeder.

Enzimatik tepkimelerde rasemik karışımlar girdi olarak kullanıldığı zaman sıcaklık, tepkimenin aktivitesini ve enantiyoseçimliliğini de etkiler. Birçok protein için denatürasyon 45-50˚C arasında başlar ve 55˚C'yi bulur (Bailey 1986). Enzimatik rezolüsyon tepkimeleri genelde 20-60ºC arasında gerçekleşir. Deaktivasyon fiziksel olarak şu şekilde gerçekleşir: Sıcaklık arttığında enzim molekülünün enerjisi artar ve hareket etme eğilimi de artmış olur. Enzim molekülü kazandığı enerji ile globular protein yapısını bir arada tutan zayıf bağları koparır ve deaktivasyon başlar.

Girdinin organik fazda, enzimin sulu fazda çözündüğü tepkimenin sıvı-sıvı arayüzeyinde gerçekleştiği iki fazlı sistemlerde arayüzeye adsorblanan enzim, organik faza geçmez. Birçok durumda tepkime hızı organik fazdaki girdi derişiminin azalmasıyla ölçülür. Kütle aktarım kısıtlaması yeterli miktarda enzim ve girdinin arayüzeye aktarılmasını engeller. Kütle aktarım kısıtlaması ise yeterli karıştırmayla, arayüzey alanı artırılarılarak veya sulu fazdaki enzim derişimi artırılarak sağlanabilir. Ayrıca iki fazlı tepkimelerde sulu faz ve organik faz hacim oranlarının da iyi optimize edilmesi gerekmektedir. Ortamda enzimi çözebilecek hacimde sulu faz, girdiyi çözebilecek ve enzimin protein yapısına zarar vermeyecek kadar hacimde organik faz gerekmektedir. Bölüm 2.5' de bu parametreyle ilgili literatür çalışmaları verilmiştir.

Enzimin kararlılığını artırmak ya da tepkime termodinamiğini istenilen yöne kaydırmak amacıyla, tepkime ortamına eklenen katkı maddeleri, aktivatörler veya artırıcı olarak adlandırılırlar. Enzim kararlılığını artırmak için üç farklı yöntem uygulanabilir (Faber 2000).

1. Çözünen enzim kimyasal olarak modifiye edilebilir.
2. Enzim çözünmeyen katı bir matrise tutuklanabilir.
3. Reaksiyon ortamına kararlılığı artırıcı bileşikler eklenebilir.

Enzimin konformasyonunun kararlı hale getirilmesi iki farklı şekilde gerçekleştirilebilmektedir (Sukan *et al*. 1995).

a) Spesifik, kovalent olmayan etkileşimlerle

- substratlar, ürünler, inhibitörler, kofaktörler, allosterik etkilerle ve düşük molekül ağırlıklı ligantlarla
- metal iyonlarıyla ve diğer iyon türleriyle (düşük derişimde)
-protein ve polimerlerle

b) Spesifik olmayan ya da çözücü özelliklerinin değişmesi yoluyla

- iyon türleriyle (yüksek derişimde)
- organik çözücülerle
- polimerlerle

Karbonhidratlar, gliserol, polietilen glikol gibi polialkoller enzimde hidrojen bağlarının kırılma eğilimini azaltarak kararlı yapılarını koruyabilmelerini sağlarlar (Bailey 1986). Trietilamin, piridin gibi organik bazlar substratla veya ürünle etkileşerek denge dönüşümünü istenilen yöne kaydırabilirler (Faber 2000). Bunların yanısıra Zn, Mn, Fe, Mo, Cu gibi enzimle etkileşen iyonlara metalloenzimler denir; bunlardan bazıları kofaktördür ve enzimle etkileştiklerinde kararlılığını artırılar. Ca kararlılığı artıran en önemli katkı maddesidir. Tepkime ortamına katkı maddesi olarak eklenen tuzlar (LiCl, NaCl, KCl gibi) düşük derişimli (<0.1M) ve yüksek derişimli (>0.1M) olmak üzere ikiye ayrılmaktadırlar. Yüksek derişimde kullanılan katkı maddelerine amonyum sulfat, sulfo-poli karboksilik asit ve boratlar örnek olarak verilebilir.

2.4.2 Biyokatalizörün yapısal olarak değiştirilmesi

Enzimin organik çözücüde çözünüp kararlılığını kaybetmemesi için çeşitli kimyasal ve fiziksel yöntemler uygulanmaktadır. Bunlar:

1. Enzimlerin amfipatik bileşiklerle kimyasal modifikasyonu
2. Enzimlerin lipidlerle ya da yüzey aktif maddelerle fiziksel modifikasyonu
3. Enzimlerin ters misellerle etkileşimi

Enzimler, amfipatik bileşiklerle kimyasal olarak modifiye edildiklerinde organik çözücülerde çözünür hale gelirler. Polietilenglikol (PEG) ile modifiye edilmiş enzimler, transestrifikasyon, ester ve amid sentezi gibi birçok proseste pratik bir öneme sahiptir. Genelde enzimin serbest aminoasit grupları kimyasal olarak modifiye edildiğinde katalitik aktivitelerini kaybederler. Ancak PEG modifiyeli enzimler organik çözücü varlığında aktivitelerini kaybetmezler; çünkü PEG zinciri, enzim etrafında sulu bir kabuk oluşturur, bu kabuk enzimi denaturasyona sebep olan organik çözücüden korur (Khmelnitsky *et al.* 1988).

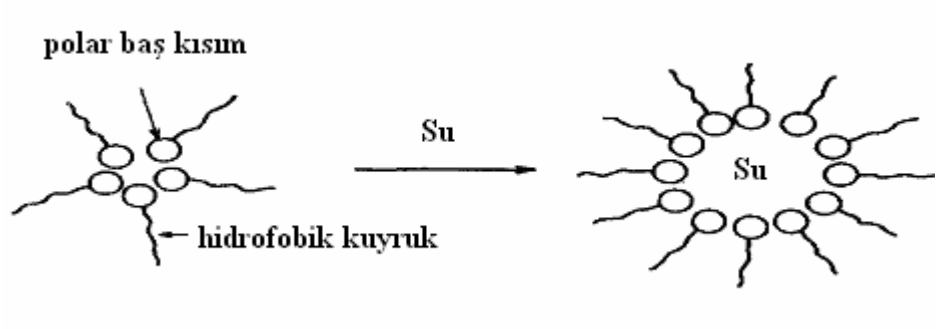
Enzimler fiziksel modifikasyonla liyofilize edilirlerken yağlarla ya da yüzey aktif maddelerle kaplanabilirler. Liyofilize edilen enzim organik çözücülerde çözünebilir ve yüksek aktivite gösterir. Genel olarak lipid veya yüzey aktif maddelerle kaplanmış

enzimin aktivitesi, amfipatik bileşiklerle kimyasal olarak modifiye edilmiş enzimlerden daha yüksektir.

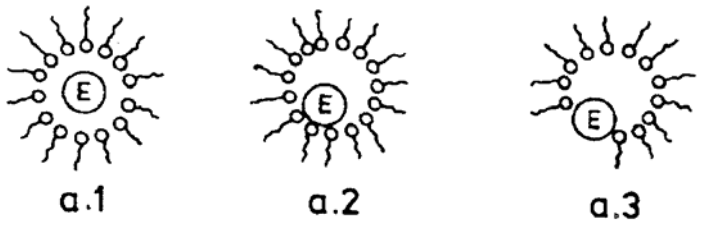
Yüzey aktif maddeler apolar çözücülerde çözündüğü zaman, aniden ters miseller oluşur. Ters misellerin polar baş kısımları ve dış kısımlarında da hidrofobik kuyrukları vardır. En önemli özellikleri çok fazla miktarda suyu iç kısımlarında çözebilmeleridir. Yüzey aktif maddeler mikro damlacıklar oluşturarak organik çözücüden ayrılırlar. Enzim sulu fazda çözünürken, yüzey aktif maddeler organik fazda çözünür (Şekil 2.7). Enzim su-organik arayüzeyinde ters misellerin içine girer ve organik faza taşınmış olur. Yüzey aktif maddeler iyonik ya da noniyonik olabilirler. Örneğin Triton X-100 noniyonik bir yüzey aktif maddedir. Hidratlanmış ters misellerin en önemli özelliği enzimi iç kısmındaki boşlukta çözebilmeleridir. Bu sistemin özelliği enzim molekülünün boşluk içerisinde esnek olması ve istediği bölgede durabilmesidir (Şekil 2.8):

- Enzim molekülü su moleküllerinin bulunduğu boşlukta (a.1),
- Enzim yüzey aktif maddenin iç yüzeyinde polar baş kısımla birleşik olarak (a.2),
- Enzim misel zarının hidrofobik bölgesinde (a.3)

bulunabilir (Khmelnitsky *et al*.1988).



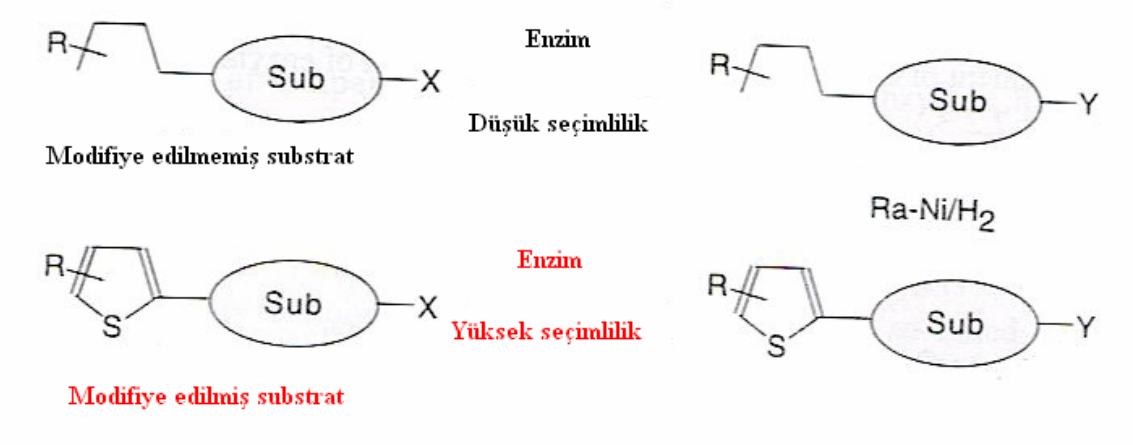
Şekil 2.7 Organik çözücülerdeki suyun ters misellerdeki çözünürlüğü



Şekil 2.8 Enzim molekülünün ters misel içindeki konumları

2.4.3 Subtrat modifikasyonu

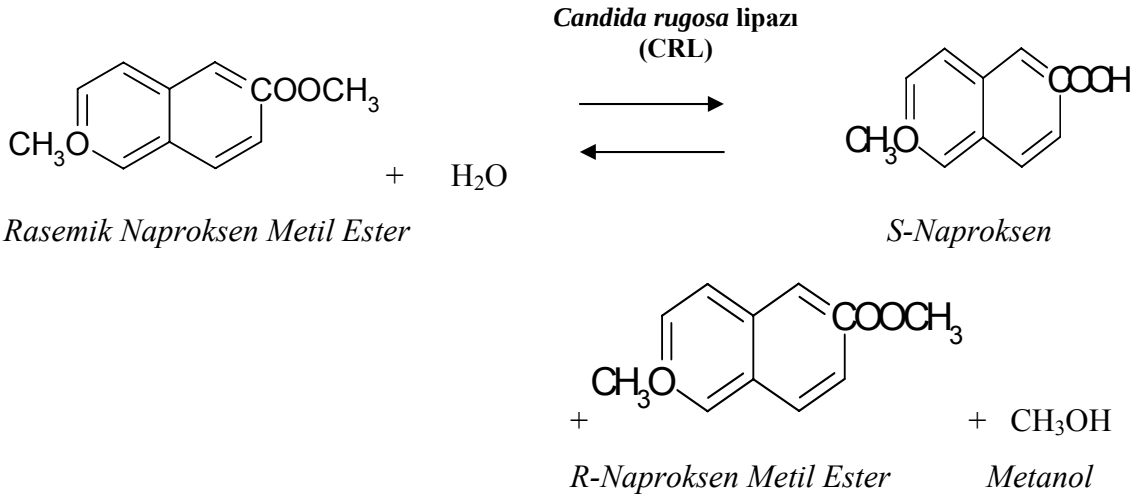
Optikçe saf ve yüksek enantiyoseçimlilikte ürün elde etmenin bir başka yolu da substratın kimyasal yapısını değiştirmektir (substrat mühendisliği). Bütün enzimatik dönüşüm tepkimelerinde uygulanabilen bir yöntemdir. Substrat farklı büyüklüklerde ve polaritelerde gruplarla etkileştirilerek enzimin seçimliliği artırılmaya çalışılır (Şekil 2.9). Modifiye edilmemiş substrat kullanıldığında enzim seçimliliği düşükken, modifiye substrat kullanıldığında enzimin seçiciliği artmıştır. Modifiye edilmiş substratla elde edilen ürünü modifiye edilmemiş substratla elde edilen ürüne dönüştürmek gerekir. Enzim-substrat etkileşiminde enzimin sterik şeklinin önemi elektrostatik etkilerden daha önemlidir. Örneğin Stampfer *et al*. (2003) -yaptıkları çalışmada substratta bulunan C=C yapısını, C=OH'a dönüşümü sağlanarak tepkimenin enantiyoseçimliliği artırılmaya çalışmışlardır. Enantiyomerik oranı 16.8 olan rac-2-pentanol, rac-pent-3-en-ol'a modifiye edildiğinde E>100 gözlenirken, E =13.3 olan rac-3-oktanol rac-4-oktan-3-ol e modifiye edildiğinde E =50 olarak gözlenmiştir (Faber 2000).



Şekil 2.9 Modifiye edilmiş susbstratla elde edilen ürünün modifiye edilmemiş substratla elde edilen ürüne dönüşümünün şematik gösterimi (Faber 2000)

2.5 Rasemik Naproksen Metil Esterin *Candida rugosa* Lipazı Katalizörlüğünde Enantiyoseçimli Hidroliz Tepkimesi

Rasemik Naproksen metil esterinin enantiyoseçimli enzimatik hidroliz tepkimesi Şekil 2.10'da gösterilmiştir. Tepkime ileri yönde hidroliz, geri yönde ise esterleşme tepkimesi olan bir denge tepkimesidir. S-Naproksen üretimi çalışmalarında en çok kullanılan enzim *Candida rugosa* lipazıdır (Tsuzuki and Szuki1991).



Şekli 2.10 Rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli enzimatik hidroliz tepkimesi

S-Naproksenin hidroliz tepkimesi ile üretimi sulu sistemde, su-organik çözücü iki fazlı sistemde ya da suyla doygun organik çözücülerde gerçekleştirilebilir. Sulu sistemlerin bazı dezavantajları vardır. Örneğin, Naproksen metil esterinin sudaki çözünürlüğünün az olması düşük reaksiyon hızına sebep olur. Ayrıca hidroliz tepkimesinde ürün olarak oluşan S-Naproksenin ortamdan ayırılması zordur. Bir başka çözücü ortamı olarak kullanılan suyla doygun organik çözücü sisteminde ise enzimin aktif ve enantiyoseçimli kalması sağlanır. Bu tür sistemlerde substratın çözünürlüğü yüksektir ve enzim kolayca geri kazanılabilir. Ancak bu sistemin de üç dezavantajı vardır: 1) Su kapasitesi düşük olan apolar çözücüler kullanıldığı zaman reaksiyon hızı ve verimlilik düşük olur. 2) Naproksen metil ester hidrolizinin diğer ürünü olan metanolün organik çözücüdeki çözünürlüğü düşüktür. Bundan dolayı lipaz aktivitesi inhibisyona uğrayabilir. 3) Hidroliz tepkimesi sonucu oluşan ürün Naproksenin apolar organik çözücülerdeki

çözünürlüğü oldukça düşüktür. Çöken Naproksen, çözücüyle karışmayan lipaz parçacıklarıyla karışır ve ürünün geri kazanımını zorlaştırır.

Naproksen metil esterin hidrolizinde kullanılan CRL enzimi suda çözünürken, hidroliz tepkimesinin girdisi olan Naproksen metil esterin çözünebilmesi için organik çözücü gerekmektedir. Bu durumda S-Naproksen üretimini su-organik çözücü iki fazlı sistemde gerçekleştirmek uygun olmaktadır. Bu tür sistemin dezavantajı da iki fazlı sistemlerde kütle aktarım kısıtlamalarının varlığı sebebiyle etkin bir karıştırma yapılması gerekmesidir. CRL'nin emülsiyon olarak dağıldığı sistemlerde reaktörde tam karıştırmayı sağlamak zor olabilir (Xin *et al.* 1999).

Naproksen ve esterlerinin lipaz katalizörlüğünde enantiyoseçimli rezolüsyonu için önemli sayıda çalışma yapılmasına rağmen, Naproksen metil esterin CRL ile hidroliz tepkimesinde organik çözücü etkisi çok fazla incelenmemiştir. Bu konudaki çalışmalar daha çok Naproksenin esterleşme tepkimeleri ile rezolüsyonunda yer almaktadır. Buna karşın, Naproksen üretimi için su-organik çözücü iki fazlı sistemlerde çözücü etkisinin incelendiği çalışmalarda izooktan en fazla kullanılan çözücüdür (Chang *et al*., 1998; Chang *et al*., 1999; Xu *et al*., 2001). Xin *et al*., (1999), rasemik Naproksen metil esterin sürekli bir reaktörde tutuklanmış CRL ile hidroliz tepkimesini incelemişlerdir. Çalışmada log P değerleri -0.23 (aseton), 2.5 (toluen), 3.2 (siklohekzan), 3.5 (hekzan) ve 4.5 (izooktan) olan organik çözücüler kullanılmıştır. S-Naproksen üretiminde en yüksek dönüşüm ve enantiyomerik aşırılık değerlerine $\%ee_p$=93.4 ve E=53 ile izooktan kullanıldığında ulaşılırken, en düşük $\%ee_p$ ve E değerleri siklohekzanda sırasıyla 88.5 ve 25 olarak elde edilmiştir. CRL'nin kullanıldığı farklı substratların hidroliz tepkimelerinde organik çözücü etkisi ise en fazla Cipiciani ve arkadaşlarının çalışmalarında yer almaktadır.

Cipiciani *et al*. (1998) rasemik metil 2-(2,4-diklorofenoksi) propiyonatı girdi olarak kullanarak, ham ve muamele edilmiş CRL ile su-organik çözücü iki fazlı sistemde hidroliz tepkimesi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada log P değerleri -0.33 (asetonitril), -0.23 (aseton), 0.85 (dietileter), 2 (benzen), 2.5 (toluen), 2.9 (dibütileter), 3.2 (siklohekzan), 3.5 (hekzan) ve 4 (heptan) olan organik çözücüler kullanılmıştır.

Tepkimede farklı sulu tampon faz/organik çözücü (T/Ç; h/h) oranlarında çalışılarak; ham CRL (C-CRL), 2-propanol muameleli CRL (PT-CRL) ve amonyum sülfatla çöktürülmüş CRL (ASP-CRL) varlığındaki hidroliz tepkimelerindeki enantiyoseçimlilikler incelenmiştir. İlk incelemede benzen/su oranı (h/h) arttıkça tepkime hızı artmaktadır; %20 değerinden sonra ise tepkime hızındaki artış daha fazla olmaktadır. Ayrıca benzen/su oranında (h/h) az miktarda artış, enantiyomerik oran (E) değerini birden artırmakta; %5 değerinden sonra ise E değişmemektedir. İkinci incelemede aseton/su oranı (h/h) arttıkça tepkime hızı artmaktadır; %10 değerinden sonra tepkime hızındaki artış benzen/su değerine göre daha fazla olmaktadır. Aseton/su oranının (h/h) tepkime hızına etkisi incelendiğinde ise, hacmin küçük değerlerinde tepkime hızı düşmekte ve sabit kalmaktadır. Yazarlara göre su-organik çözücü iki fazlı sistemde organik çözücü hacmi arttığı zaman hidroliz hızı düşmektedir. PT-CRL kullanıldığında benzen/su iki fazlı sisteminde en yüksek ürün için enantiyomerik aşırılık %ee_p=83, enantiyomerik oran E=70 değeridir. Saf su ve benzen/su sistemindeki reaksiyon hızı ve enantiyoseçimlilik arasındaki fark enzimdeki konformasyonel değişiklikle açıklanmaktadır. Cipiciani *et al*. (1999), bir diğer çalışmalarında rasemik metil 2-ariloksipropiyonatı girdi, propanol muameleli CRL'yi ise su-organik iki faz sistemin enzimi olarak kullanarak tepkimedeki enantiyoseçimliliğini incelemişlerdir. Sistemin organik çözücüleri olarak aseton, dietileter, benzen ve siklohekzan kullanılmıştır. Su-organik çözücü reaksiyon ortamı, tepkimenin enantiyoseçimliliği etkilemektedir. Tepkimenin enantiyomerik aşırılık değeri, ortamda su-organik çözücü kullanıldığında sadece su kullanıldığı duruma göre daha fazladır. En iyi enantiyomerik aşırılık değerleri su-benzen ortamında gözlenmiştir. Hidroliz tepkimesi 10/1 su/organik çözücü hacim oranında gerçekleştirilmiş; organik çözücü oranı %10'dan fazla olduğunda hidroliz hızı azalırken, E değerinin değişmediği gözlenmiştir**.** Tepkime girdisinin Naproksen metil ester olmadığı bir başka çalışmada ise Rakels *et al.* (1994) rasemik glisidil bütarat ve rasemik metil 2-klorpropiyonatın porsin pankreatik lipaz (PPL) ve *Candida cylindracea* lipazı (CCL) ile hidroliz tepkimesinde çözücü etkisini incelemişlerdir. Tepkime ortamında heptan, diklormetan, pentanon gibi suyla doygun organik çözücüler kullanılmıştır. CCL katalizörlüğünde rasemik 2-klorpropiyonatın %x ve E değerleri sırasıyla heptanda 8.7 ve 2 olarak gözlenirken, diklormetanda %x= 24 ve E =15, pentanonda ise %x =95 ve E =1.5 değerleri elde edilmiştir. Aynı makalede farklı

çözücü, substrat ve lipaz kullanıldığında %x ve E değerleri de incelenmiştir. Çözücü olarak diklormetan, girdi olarak da rasemik glisidil bütaratın kullanıldığı PPL katalizli hidroliz tepkimesinde %x=75, E=6 gözlenmiştir. Ayrıca $\%ee_s$ değerlerinin %x değerleriyle değişimi incelenmiş; dönüşüm oranı arttıkça substratın enantiyomerik aşırılık değeri S-enantiyomerinin harcanmasıyla önce artıp, R-enantiyomerinin de harcanmaya başlanmasıyla azalma gösterdiği gözlenmiştir. Aynı tepkimede ürünlerin enantiyomerik aşırılık değerleri dönüşüm arttıkça azalmıştır. Xin *et al*., (2000) çalışmalarında organik çözücülerin CRL aktivitesi üzerine etkisini de incelemişlerdir. Rasemik Naproksen metil esterin sürekli bir reaktörde tutuklandığı CRL ile hidroliz tepkimesinde log P değerleri -0.23 (aseton), 2.5 (toluen), 3.2 (siklohekzan), 3.5 (hekzan) ve 4.5 (izooktan) olan organik çözücüler kullanılmıştır. Bu çözücülerden en yüksek log P değerine sahip olan izooktanda CRL bağıl aktivitesi %100 gözlenirken sırayla hekzanda %77.6, siklohekzanda %75, toluen de de %8.6 gözlenmiştir.

Su-organik çözücü iki fazlı sistemlerde enzimin iyonlaşma derecesi sulu faza bağlıdır. Literatürde iki fazlı hidroliz tepkimesinde enantiyoseçimliliğin CRL çözeltisinin pH değeri ile artırılmaya çalışıldığı ve Naproksen metil esterin girdi olarak kullanıldığı çalışmalar oldukça azdır. Lee *et al*. (2001), yaptıkları çalışmada tepkime girdisi olan Naproksen metil esteri ve biyokatalizör olarak kullanılan CRL'yi MES tamponunda çözerek tek fazlı sistem oluşturmuşlardır. CRL, ham ve asetonla muamele edilmiş olarak kullanılmış; pH değerleri 3 ile 8 arasında değiştirilmiştir. Saf CRL kullanıldığında en yüksek dönüşüm pH=6'da %x=38.3, en yüksek enantiyoseçimlilik değerleri de pH =3 ve 8'de % ee_p>90 olarak gözlenmiştir. Asetonla muamele edilmiş CRL kullanıldığında ise en yüksek %x=48 ve $\%ee_p$=98 olarak gözlenmiştir. Dönüşüm ve enantiyoseçimlilik değerleri pH ile önemli ölçüde değişmemiştir. Liu *et al*. (1999), S-ketoprofen esteri girdi olarak kullanılmış ve sulu ortam pH'ının 2.2 ile 10 arasındaki değerlerinin CRL enantiyoseçimliliği üzerine etkisini incelemişlerdir. En yüksek enantiyomerik oran pH=2.2'de gözlenmiştir. Düşük pH değerlerinde CRL konformasyonunun, S- substratının bağlanabilmesi için daha uygun olduğu düşünülmektedir**.** Cipiciani *et al*. (2001), (+-)-4-asetoksi-[2,2] parasiklopandan oluşan rasemik karışımın kinetik rezolüsyonunda propan-2-ol muameleli CRL'yi kullanarak pH değişiminin enantiyoseçimlilik üzerine etkisini incelemişlerdir. Tepkime ortamında

pH=5.2-8.2 aralığında su ve pH=6.2-11 aralığında su/n-hekzan kullanılmıştır. Suda pH=5.2-7.7 aralığında enantiyomerik oran azalmış, pH=8.2'de artmıştır. En yüksek % ee_p=87, E=10 olarak pH=8.2'de gözlenmiştir. Su/n-hekzan kullanıldığında ise enantiyomerik oran en yüksek pH=6.2'de E=100 ve %ee=96 iken, pH=7.2-11 arasında E değeri 15 ile 4 arasında ve %ee_p ise 25 ve 49 arasında değişmektedir. Bu sonuçlara göre yazarlar; enzimindeki konformasyonel yapının polipeptit kapağınının açılmasıyla değiştiği sonucunu çıkarmışlardır. Long *et al*. (2005), 1-heptil-ibuprofen ester ve 2-etoksietil-ibuprofen ester olmak üzere iki farklı girdi kullanarak hidroliz tepkimelerinde pH'ın enantiyoseçimlilik üzerine etkisini incelemişlerdir. Tepkime bir membran reaktörde gerçekleştirilmiş ve CRL polimerik membrana tutuklamıştır. Ortamda organik faz olarak izooktan, sulu faz olarak ise fosfat tamponu bulunmaktadır. Çalışılan pH=6, 7 ve 8 değerleri arasında en yüksek enzim enantiyoseçimliliği pH=8'de gözlenmiştir. Buna göre, ibuprofenin alkali pH'larda çözünürlüğünün yüksek olması ve pH değişimi ile enzim konformasyonunun değişmesi nedeniyle enantiyoseçimliliğin arttığı sonucuna varmışlardır.

Tepkimenin arayüzeyde gerçekleştiği iki fazlı sistemlerde girdinin ve enzim moleküllerinin arayüzeye aktarılması etkin bir karıştırma ile mümkün olmaktadır. Naproksen metil esterin girdi, CRL'nin ise katalizör kullanıldığı iki fazlı hidroliz tepkimelerinde karıştırma hızının enantiyoseçimlilik üzerine etkisi literatürde yer almamaktadır. (Ancak Chae and Yoo1997), çalışmalarında, su-organik çözücü iki fazlı sistemlerde enzimatik bir reaksiyon olan trisinaz katalizli fenolün hidroksilasyon tepkimesinin matematiksel analizini yapmışlardır. Tepkime sıvı-sıvı arayüzeyinde gerçekleşmektedir. Enzim sulu fazda (fosfat tamponu), girdi olan fenol ise organik fazda (kloroform) çözünmektedir. İki fazlı sistemde fenolün trisinaz katalizli hidroksilasyon tepkimesinde 150, 210 ve 300 dev/dk karıştırma hızlarında zamanla % dönüşüm değerleri incelenmiş ve karıştırma hızının en büyük olduğu 300 dev/dk'da en yüksek dönüşüm gözlenmiştir**.** Brady *et al*., (2003) çalışmalarında karıştırma varken ve yokken biyokatalizör olarak tutuklanmış CRL'nin aktivitesini ölçmüşlerdir. Tutuklanmış CRL, amonyum asetat tamponunda bulunmaktadır. CRL aktivitesi 600 rpm değerinde ve karışma yokken incelenmiştir. Karıştırma hızının enzim aktivitesini önemsenmeyecek miktarda az etkilediği gözlenmiştir.

Literatürde Naproksen metil esterin CRL enzimi katalörlüğündeki hidroliz tepkimesinde sıcaklığın etkisi de oldukça az sayıda incelenmiştir. Lee *et al*. (2001) çalışmalarında tepkime girdisi olan Naproksen metil ester ve biyokatalizör olarak kullanılan CRL'yi, MES tamponunda çözerek tek fazlı sistem oluşturmuşlardır. CRL, ham ve asetonla muamele edilmiş olarak kullanılmış ve sıcaklığın %x ve $\%ee_p$ değerlerine etkileri incelenmiştir. Naproksen metil esterin CRL ile enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi T=20, 25, 30, 37 ve 45°C'lerde gerçekleştirilmiştir. CRL ham olarak kullanıldığında hidroliz tepkimesinde en yüksek dönüşüm T=37°C'de %38.3 iken, en yüksek ee_p değeri yaklaşık %90 olarak gözlenmiştir. Tepkimede asetonla muamele edilmiş CRL kullanıldığında en yüksek dönüşüm T=37°C'de %48, en yüksek enantiyoseçimlilik ise T=20°C'de $\%ee_p$=98 olarak gözlenmiştir. Sakai *et al*. (1998) çalışmalarında düşük sıcaklıklarda lipaz katalizli transesterifikasyon tepkimelerinin enantiyoseçimliliğini artırmayı amaçlamışlardır. Girdi olarak solketal ve bazı kiral alkoller kullanılmıştır. Katalizör olarak ise *Pseudomonas fluorescens*'den elde edilen lipaz AK ve *Pseudomonas cepacia'*dan elde edilen lipaz PS kullanılmıştır. Solketalin lipaz katalizli kinetik rezolüsyonunda 30 ve -60˚C arasında enantiyoseçimlik değerleri incelenmiş ve en yüksek değer T=-40˚C'de E=55, en düşük değer ise T=30˚C'de E=9 olarak bulunmuştur. -40˚C'nin altında E değerinde azalma gözlenmiştir. Cipiciani *et al*. (2001), çalışmaların bir bölümünde (+-)-4-asetoksi-[2,2] parasiklopandan oluşan rasemik karışımın kinetik rezolüsyonunda propan-2-ol muameleli CRL'yi kullanarak sıcaklık değişiminin enantiyoseçimlilik üzerine etkisini incelemişlerdir. Sıcaklık 22-60ºC arasında değiştirilmiş ve E değerleri T= 22ºC ve 30ºC için 2 değerindeyken, T= 40, 50 ve 60 ºC için sırasıyla 28, 27 ve 26 olarak bulunmuştur.

Rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidroliz tepkimesinde katkı maddelerinin enantiyoseçimlilik ve enzim aktivitesi üzerine etkisi literatürde yer almamaktadır. Ancak, (Okomato and Ueji 2000) çalışmalarında *Candida rugosa* lipazı (CRL) katalizörlüğünde rasemik bütil 2-(4 sübstite fenoksi) propiyonatların hidroliz tepkimesinin su ve metal iyonları içeren çözücüler varlığında enantiyoseçimliliği incelemişlerdir. Hidroliz tepkimesi, suda, ayrıca LiCl içeren ve $MgCl_2$ içeren izopropil eterin sulu çözeltilerinde, 37^oC, 170-200 vuruş/dk karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir. Butil 2-(4-substitute fenoksi) propiyanatın enantiyoseçimli lipaz

katalizli organik çözücülerde gerçekleşen hidroliz tepkimesi A, B, C olmak üzere üç koşulda gerçekleştirilmiştir: A=izopropil eter+su, B=izopropil eter+ LiCl sulu çözeltisi, C=izopropil eter+$MgCl_2$ sulu çözeltisi. Tepkime sonunda katkı ilavesi yapılan B ve C koşullarında E değerlerinin A koşulundan daha yüksek değere sahip olduğu gözlenmiştir. Brady *et al*. (2003) yaptıkları bir incelemede farklı metal iyonları varlığında tutuklanmış CRL'nin aktivitesini ölçmüşlerdir. PEG ve asetat tamponu karışımında çözünen CRL enziminin zamanla aktivitesi Cu^{+2}, Na^{+}, Al^{+3}, Mg^{+2}, Ca^{+2}, Co^{+2}, B^{+3} iyonlarının farklı derişimlerinde incelenmiştir. Ortamda ayrı ayrı Cu^{+2} ve Ca^{+2} derişimleri arttıkça CRL aktivitesinde artma gözlenirken, Al^{+3}, Na^{+}, Mg^{+2} ve Co^{+2} iyon derişimleri arttıkça aktivitede azalma gözlenmiştir. B^{+3} iyonları ise ortamda arttıkça enzim aktivitesi önce artıp sonra azalmaktadır.

Enzim enantiyoseçimliliğini ve dönüşümünü etkileyen bir diğer parametre ise substrat derişimidir. Literatürde Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidroliz tepkimesinde substrat olan rasemik Naproksen metil ester derişiminin etkisini Xin *et al*. (1999) sürekli bir sistemde incelenmiştir. İzooktan varlığında, enzimin fosfat tamponunda çözündüğü iki fazlı sistemde 5-20 mg/mL aralığındaki substrat derişimlerinde % dönüşüm değerlerindeki değişim incelenmiştir. Naproksen metil ester derişimi arttıkça dönüşüm değeri azalmaktadır. En yüksek dönüşüm substrat derişiminin 5 mg/mL değerinde iken %20 olarak, en düşük dönüşüm ise substrat derişiminin 20 mg/mL değerinde gözlenmiştir. Dönüşüm değerindeki bu azalmanın hidroliz tepkimesi sonucu oluşan S-Naproksen ya da metanolün CRL enzimini inhibe etmesinin sonucu olduğu düşünülmektedir. Metanol ve Naproksenin bağımsız olarak enzim üzerine etkisi incelenmiş ve enzimi inhibe eden ürün belirlenmeye çalışılmıştır. Ortama eklenen metanol miktarı arttıkça dönüşümde azalma gözlenmiştir. Bu durum metanol inbisyonunun varlığıyla açıklanmıştır.

Tepkimenin sıvı-sıvı ara yüzeyde gerçekleştiği, enzimin sulu fazda çözündüğü sistemlerde tepkime hızı Michaelis-Menten kinetiği gereğince enzim derişimiyle doğru orantılıdır. Literatürde, rasemik Naproksen metil esterin hidroliz tepkimesinde enzim derişiminin tepkime enantiyoseçimliliğine ve aktivitesine etkisi incelenmemiştir. Ancak,

Straathof (2003) çalışmasında iki fazlı sistemde belirli bir substrat derişiminde enzim derişimi arttıkça tepkime hızının arttığını belirlemiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Optikçe saf S-Naproksen ve *Candida rugosa* lipazın (Tip VII, Lot:033K0612) ticari üreticileri Sigma firmasıdır. HPLC analizlerinde kromatografik saflıkta, reaksiyonlarda ise reaktif saflıkta çözücüler kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan kimyasal ve biyokimyasal maddeler Ek 1'de verilmiştir. Tepkime girdisi olan rasemik Naproksen metil ester ise rasemik Naproksenden laboratuvarda üretilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 CRL'nin hazırlanması

Ham CRL, 0.01 M pH=7.5 sodyum fosfat tamponunda C_{CRL}=0.02 ya da 0.04 mg ml^{-1} derişiminde olacak şekilde çözülmüş; 10000 rpm ve +4°C'de 30 dk santrifüjlenmiştir (Hettich Rotina 35R). Üstte kalan sıvı, CRL kaynağı olarak hidroliz tepkimelerinde ve aktivitenin zamanla değişiminin izlenmesinde kullanılmıştır.

3.2.2 CRL'nin aktivite tayini

CRL'nin hidrolitik aktivitesi (A_{CRL}), enzim hidroliz tepkimelerinde kullanılmadan önce; ayrıca organik çözücü ve sulu fazdan oluşan iki fazlı sistemde enzimin kararlılığının belirlenmesi amacıyla tepkimesiz ortamda sulu fazdan her 24 saatte bir alınan örneklerle belirlenmiştir. Lipaz aktivitesi, *p*-nitrofenil asetatın (PNFA) hidroliz tepkimesi sonucu açığa sonucu açığa çıkan *p*-nitrofenolün (PNF) üretim hızı ölçülerek λ=404 nm'de spektrofotometrik (Shimadzu 1601A) olarak tayin edilmiştir (Michimasa *et al*. 2001). Bir ünite enzim (U), 1 dakikada 1μmol PNF üretimi için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Analizlerde, öncelikle 2 ml 0.1 M pH=7.5 sodyum fosfat tamponu, 10 μl 0.01 M pH=7.5 sodyum fosfat tamponu ve 10 μl 0.05 M PNFA'nın asetonitrildeki çözeltisi kullanılarak kör çözeltisi hazırlanmıştır. Aktivite tayini yapılacak CRL çözeltisinin sulu fazından alınan 10μl örnek, 2 ml 0.1M pH=7.5 fosfat

tamponu ve 10µl PNFA çözeltisi ile karıştırılarak absorbans değeri ölçülmüştür. Absorbansın 120 s boyunca değişimi kaydedilip, aktivite 2 ve 18. s ler arasındaki absorbans farkı ile hesaplanmıştır. Aktivite tayininde kullanılan PNF'nin absorptivite katsayısının bulunması için hazırlanan kalibrasyon grafiği Ek 2'de yer almaktadır Spektrofotometrede yapılan analizler sonucunda elde edilen $\Delta A/\Delta t$ değerini kullanarak yapılan bir aktivite örnek hesabı Ek 3'te verilmiştir.

3.2.3 CRL'nin protein derişimi tayini

Protein derişimi (C_P), λ=750 nm'de Lowry yöntemi ile spektrofotometrik (Shimadzu 1601A) olarak ölçülmüştür. Çalışmada kullanılan kalibrasyon grafiği Ek 4'de verilmiştir.

3.2.4 HPLC analizleri

3.2.4.1 Naproksen metil ester analizi

S- ve R- Naproksen metil ester enantiyomerlerinin analizi HPLC'de (Waters Alliance) 25°C'de Chiralcel OD-H kolonda, λ=254 nm'de UV dedektör kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizde taşıyıcı faz olarak 1 ml/dk akış hızında n-hekzan (%98):2-propanol (%2) kullanılmıştır (Cernia *et al*. 2002). Örnek bir kromatogram Ek 5'te gösterilmiştir.

3.2.4.2 Naproksen analizi

S- ve R- Naproksen enantiyomerlerinin analizi HPLC (Waters Alliance) 25°C'de Chirex R-NGLY&DNB kolonda, λ=254 nm'de UV dedektör kullanılark gerçekleştirilmiştir. Analizde taşıyıcı faz olarak 0.7 ml/dk akış hızında 100 mM amonyum asetat içeren metanol kullanılmıştır (Lee *et al.* 2001). Örnek bir kromatogram Ek 5'te gösterilmiştir.

3.3 Tepkimeler

3.3.1 Rasemik Naproksen üretimi

Hidroliz tepkimesinde girdi olarak kullanılan rasemik Naproksen metil ester ticari olarak sağlanamadığı için, optikçe saf S-Naproksenin rasemizasyonu ile laboratuvarda üretilen rasemik Naproksenden elde edilmiştir (Wu and Liu 2000). Rasemizasyon tepkimesi, 12 ml etilen glikolde çözünen 2 g S-Naproksenin, 1.28 g NaOH varlığında T=175^{o}C sıcaklıkta t=6 saat boyunca izoterm bir sistemde, geri soğutucu altında karıştırılması ile gerçekleştirilmiştir. Tepkime, su ve buz banyoları kullanılarak durdurulmuştur. Tepkime karışımı pH=4 olana kadar 2M HCl ile asitlendirilmiş ve pH=4.3 civarına kadar saf su ile yıkanmıştır. Oluşan katı ürün oda şartlarında kurumaya bırakılmış ve beyaz toz halinde rasemik karışım elde edilmiştir.

3.3.2 Rasemik Naproksen metil ester üretimi

0.5 g rasemik Naproksen, 40 ml metanolde çözünüp, 4 ml H_2SO_4 katalizörlüğünde geri soğutucu altında 1 saat esterleşme tepkimesi gerçekleştirilmiştir. Metanol uzaklaştırıldıktan sonra %20 lik NaOH ile pH=9'a ayarlanmıştır (Cabusas 1998). Oluşan çökelek 1 M $NaHCO_3$ çözeltisi ve distile suyla yıkanmış ve karışım kurutulmuştur (Lee *et al*. 2001). Oluşan Naproksen metil ester tozu, hidroliz tepkimesinin girdisi olarak kullanılmıştır.

3.3.3 Rasemik naproksen metil esterin hidroliz tepkimesi ile S-Naproksen üretimi

Hidroliz tepkimesi, sulu tampon fazı ve organik çözücü fazı olmak üzere iki fazlı bir sistemde gerçekleştirilmiştir. Rasemik Naproksen metil ester organik fazda çözünürken, enzim sulu tampon fazında çözünmüştür. Hidroliz tepkimeleri orbital çalkalamalı hava banyosunda (Buhler), sabit sıcaklık ve karıştırma hızlarında gerçekleştirilmiştir. Hidroliz tepkimelerinde kullanılan organik çözücüler ve miktarları, enzim ve substrat derişimleri, karıştırma hızı, sıcaklık ve tampon pH'ı parametre olarak incelenmiştir.

3.4 Verilerin değerlendirilmesi

Rasemik Naproksen metil esterin hidrolizi sonucu lde edilen katı ve/veya sıvı fazdaki ürünün HPLC analizleri ile her bir enantiyomer için derişimler belirlendikten sonra enantiyomerik aşırılıklar (girdi için: ee_s ve ürün için: ee_p), enantiyomerik oran (E) ve dönüşüm oranı değerleri (x) Eşt. 3.1-3.3 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$ee = \frac{C_S - C_R}{C_S + C_R} \tag{3.1}$$

$$E = \frac{\ln[1 - x(1 + ee_P)]}{\ln[1 - x(1 - ee_P)]} = \frac{\ln[(1 - x)(1 - ee_S)]}{\ln[(1 - x)(1 + ee_S)} \tag{3.2}$$

$$x = \frac{ee_s}{ee_S + ee_P} \tag{3.3}$$

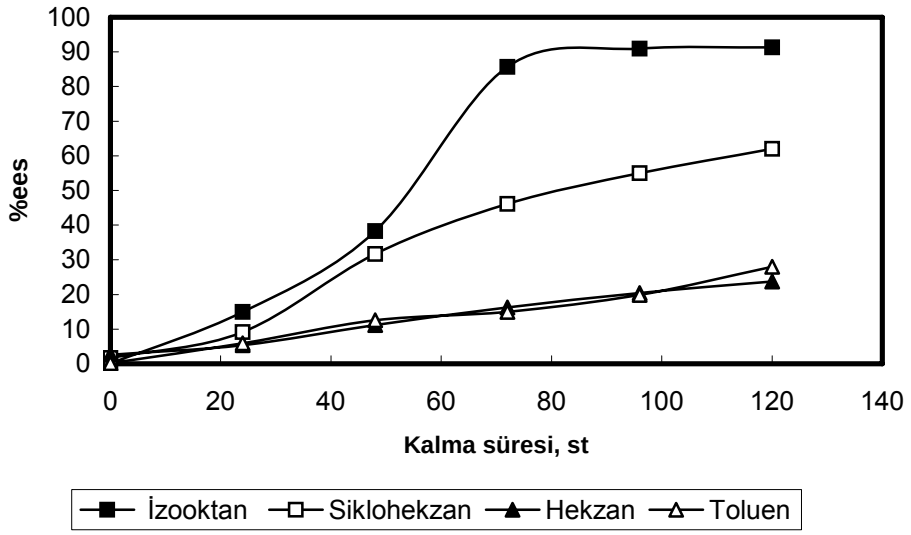
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Çözücü Türünün S-Naproksen Üretimine Etkisi

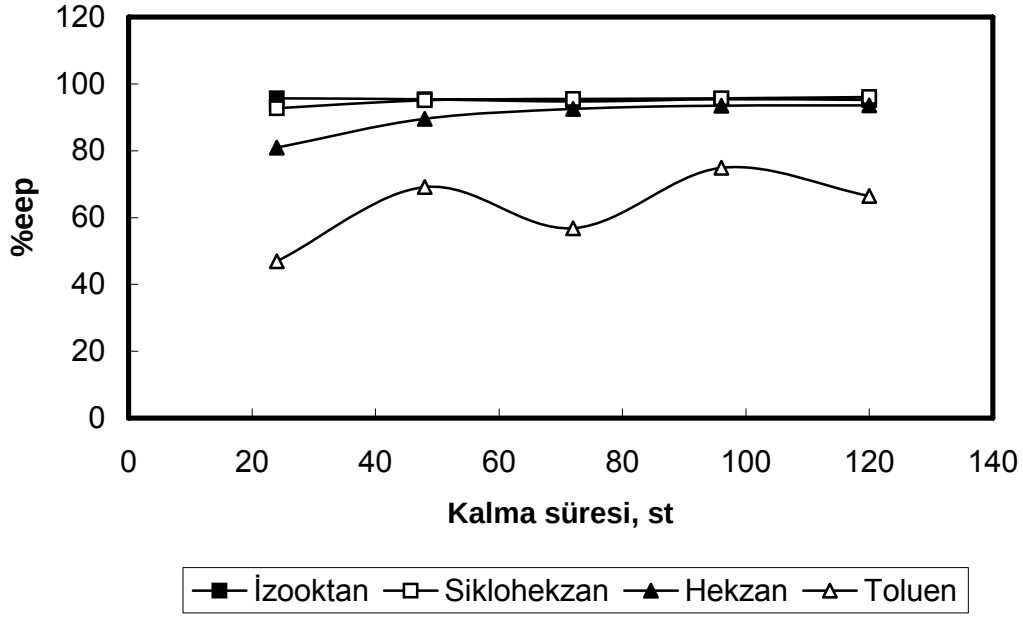
Çözücü türünün rasemik Naproksen metil esterin hidroliz tepkimesindeki enantiyoseçimliliğe etkisi, farklı log P değerlerine sahip çözücüler kullanılarak incelenmiştir. Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesinin girdisi 0.034 M Naproksen metil ester, biyokatalizörü ise 0.01 M pH=7.5 fosfat tamponunda çözünmüş 0.04 mg ml^{-1} derişimindeki C*andida rugosa* lipazıdır. Sıcaklık T=37°C, karıştırma hızı N=200 rpm, tampon/çözücü hacim oranı T/Ç=1/2 koşullarında, izooktan (log P=4.7), hekzan (log P=3.5), siklohekzan (log P=3.2) ve toluen (log P=2.5) kullanılarak iki fazlı sistemde hidroliz tepkimeleri gerçekleştirilmiştir. 120 saat boyunca her 24 saatte bir, ürün Naproksenin çözündüğü sulu fazdan ve girdi Naproksen metil esterin çözündüğü organik fazdan örnekler alınmıştır.

Çözücü türünün, kalma süresi ile girdi ve ürünün enantiyomerik aşırılık (%ee_s ve %ee_p), dönüşüm (%x) ve enantiyomerik oran (E) değerlerine etkisi Şekil 4.1-4.4'te verilmiştir. Şekil 4.1'de görüldüğü gibi hidroliz ortamında tüm çözücülerde %ee_s değeri kalma süresi ile artmaktadır. %ee_s, izooktan > siklohekzan > hekzan ≈ toluen sırasıyla azalmaktadır. log P değeri en yüksek olan izooktan varlığında %ee_s değeri de en yüksek bulunmuştur. Şekil 4.2'de çözücü türüne bağlı olarak kalma süresi ile %ee_p'nin, izooktan > siklohekzan > hekzan > toluen sırasıyla azaldığı görülmektedir. Şekil 4.3'te ise kalma süresi ile %x değerlerinin önce arttığı ve 72. saatten sonra değişmediği görülmektedir. %x, izooktan > siklohekzan > toluen > hekzan sırasıyla azalmaktadır. En iyi %x değerini sağlayan çözücü izooktan, en düşük değeri veren çözücü ise hekzandır. Şekil 4.4'de görüldüğü gibi E değerleri izooktan, siklohekzan ve hekzan çözücülerinde kalma süresi ile artarken, toluende değişmemiştir. E; izooktan > siklohekzan > hekzan > toluen sırasıyla azalmaktadır.

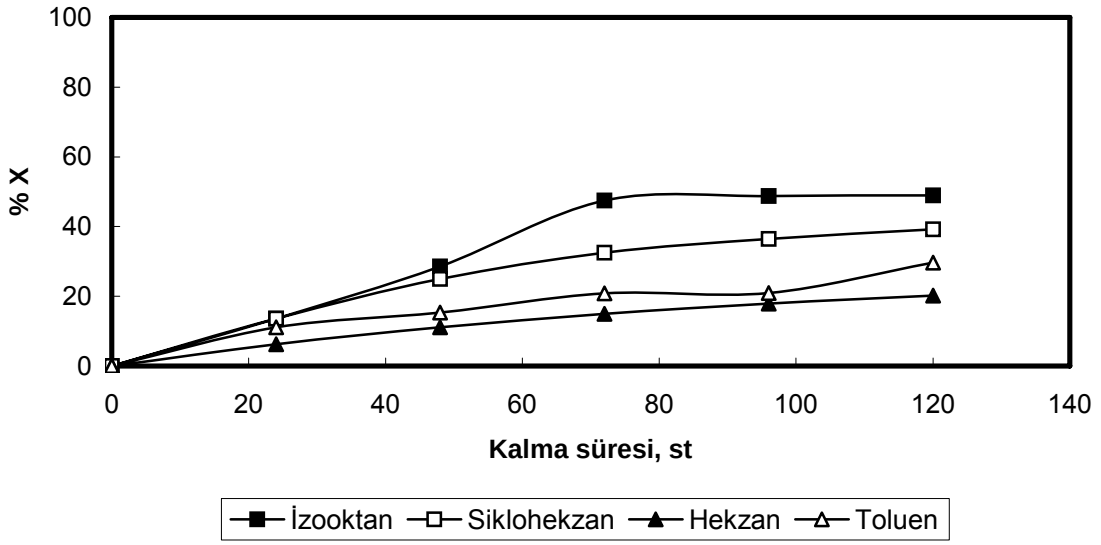
En yüksek değerler 120.saatin sonunda ee_s, ee_p, E ve x için sırasıyla %91.3, %95.2 130.3, %48.9 olmak üzere izooktan varlığında elde edilmiştir.



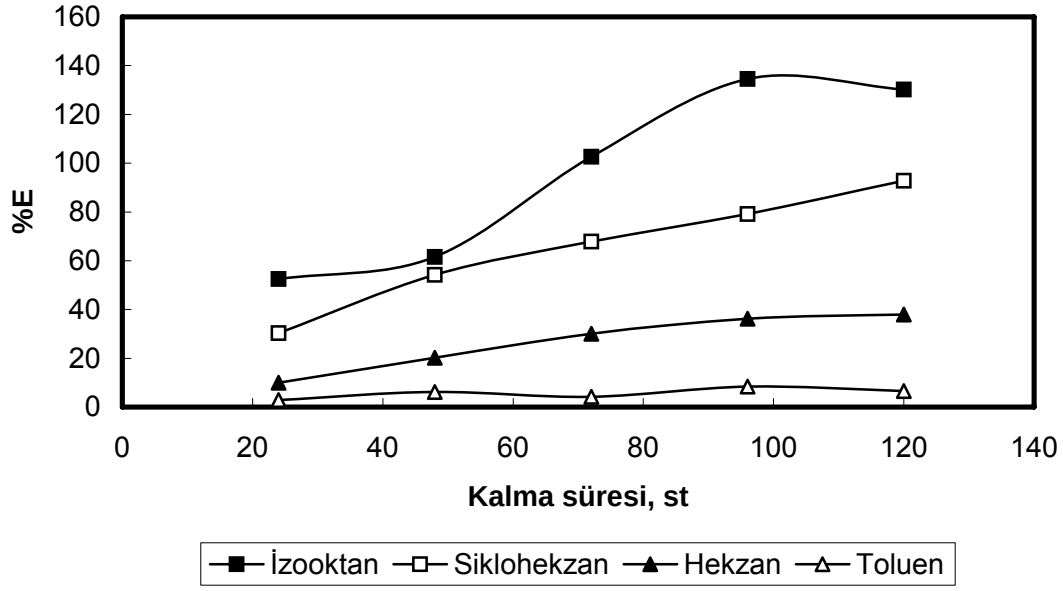
Şekil 4.1 Rasemik Naproksen metil esterin hidrolizinde çözücü türünün substrat için enantiyomerik aşırılık değerine (%ee_s) etkisi
T/Ç(h/h)=1/2, T=37ºC, N=200 rpm, pH=7.5, Cso=0.034 M,
C_{CRL}=0.04 g ml^{-1} A_{CRL}=2.088 U, C_{Po}=0.987 mg protein ml^{-1}



Şekil 4.2 Rasemik Naproksen metil esterin hidrolizinde çözücü türünün ürün için enantiyomerik aşırılık değerine %(ee_p) etkisi
T/Ç(h/h)= 1/2, T=37ºC, N=200 rpm, pH=7.5, Cso=0.034 M, C_{CRLo}=0.04 g ml^{-1} A_{CRL} =2.088 U, C_{Po}=0.987 mg protein ml^{-1}



Şekil 4.3 Rasemik Naproksen metil esterin hidrolizinde çözücü türünün dönüşüm değerine (%x) etkisi
T/Ç(h/h)= 1/2, T=37ºC, N=200 rpm, pH=7.5,Cso=0.034 M, C_{CRL}=0.04 g ml $^{-1}$ A_{CRL}=2.088 U, C_{Po}=0.987 mg protein ml $^{-1}$



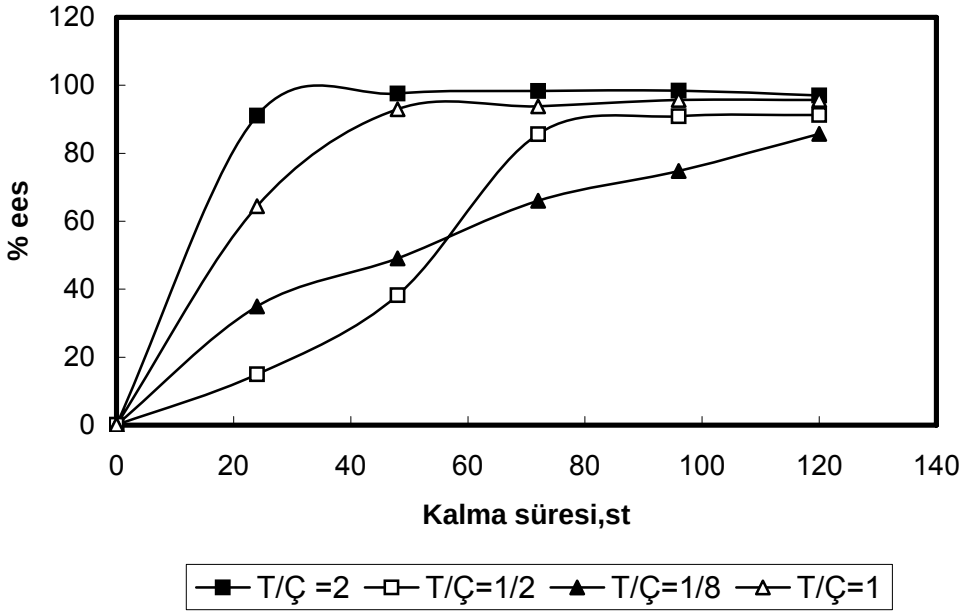
Şekil 4.4 Rasemik Naproksen metil esterin hidrolizinde çözücü türünün enantiyomerik oran değerine (E) etkisi
T/Ç(h/h)=1/2, T=37ºC, N=200 rpm, pH=7.5, Cso=0.034 M, C_{CRL}=0.04 g ml $^{-1}$ A_{CRL}=2.088 U, C_{Po}=0.987 mg protein ml $^{-1}$

4.2 Tampon / Organik Çözücü (T/Ç) Hacim Oranının S-Naproksen Üretimine Etkisi

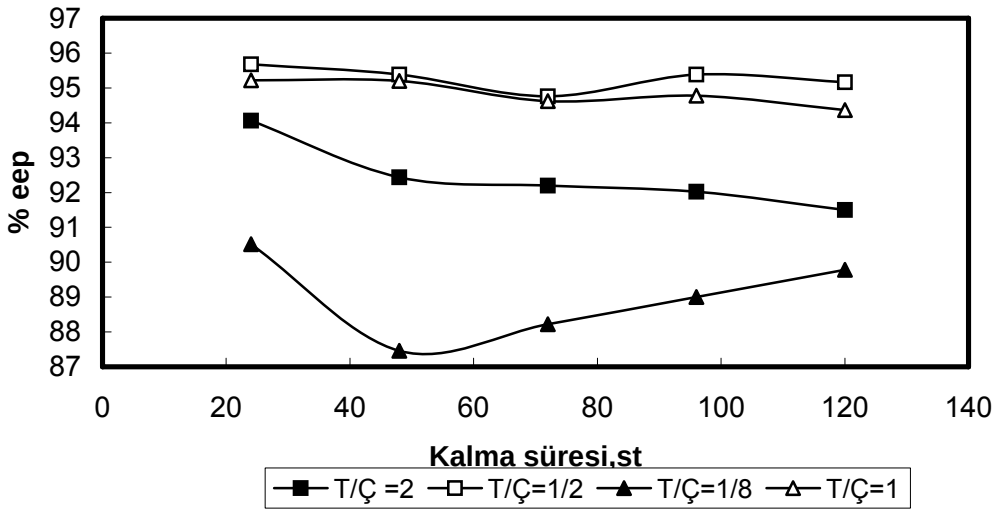
Hidroliz tepkimesi, rasemik Naproksen metil esterin çözündüğü organik ve CRL enziminin çözündüğü sulu fazdan oluşan iki fazlı bir sistemde gerçekleşmektedir. Naproksen metil esterin hidroliz tepkimesinde, sulu tampon fazı (0.01 M, pH=7.5 fosfat tamponu)/çözücü hacim oranının T/Ç (h/h)= 2, 1, 1/2 ve 1/8 olduğu koşullarda, enantiyoseçimlilik ve dönüşümün kalma süresi ile değişimi incelenmiştir. Hidroliz tepkimesi, rasemik Naproksen metil ester derişimi 0.034 M, enzim derişimi 0.04 mg ml, $^{-1}$ sıcaklık T=37°C ve karıştırma hızı N=200 rpm koşullarında gerçekleştirilmiştir. 120 saat boyunca her 24 saatte bir tampon ve organik fazlardan ayrı ayrı örnekler alınmıştır.

Şekil 4.5'te T/Ç= 2, 1/2, 1/8 ve 1 değerlerinde $\%ee_s$ değerinin kalma süresi ile önce arttığı sonra sabit kaldığı görülmektedir. $\%ee_s$, T/Ç= 2 > 1 > 1/2 > 1/8 sırasıyla azalmaktadır. 120 saat süresince en kısa sürede platoya ulaşılan T/Ç değeri 2 iken, en uzun sürede ulaşılan T/Ç değeri 1/8'dir. Şekil 4.6'da $\%ee_p$ değerlerinin -her T/Ç oranında- kalma süresi ile fazla değişmediği görülmektedir. $\%ee_p$'nin değişimi T/Ç = 1/2 = 1 > 2 > 1/8 şeklinde gözlenmiştir. En yüksek $\%ee_p$ değerleri T/Ç=1 ve 1/2'de gözlenirken, en düşük değer T/Ç=1/8'de gözlenmiştir. Rasemik Naproksen metil esterin hidrolizinde dönüşüm (%x) ise kalma süresi ile önce artmış, sonra sabit kalmıştır (Şekil 4.7). %x; T/Ç= 2 > 1 > 1/2 > 1/8 sırasıyla azalmaktadır. Şekil 4.8'de E değerinin kalma süresi ile değişimi verilmiştir. T/Ç= 2, 1/2, 1/8 ve 1 değerlerinin her birinde E değerleri farklı değişimler göstermiştir. T/Ç=1 iken 48. saate kadar E değerinde önce hızlı bir artış gözlenmiş, sonra yaklaşık sabit kalmıştır; en iyi E bu değerde gözlenmiştir. T/Ç=1/2 iken 24 ile 48. saatler arasında E değeri değişmemiş, 48 ile 96. saatler arasında bir artış gözlenmiş ve sonra bu değer sabit kalmıştır. E değerinin değişimi T/Ç=1 >2 >1/2 > 1/8 şeklindedir.

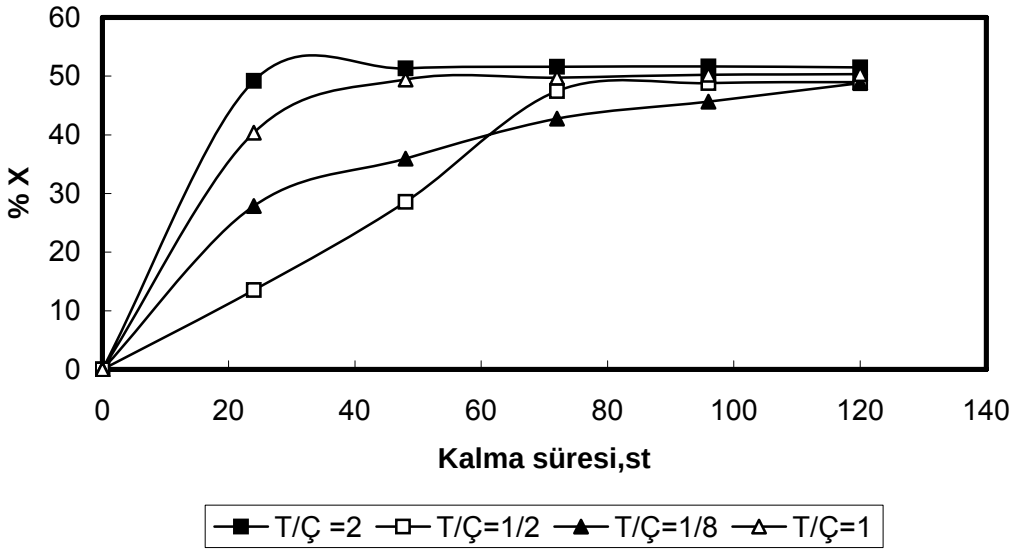
En yüksek ee_s, ee_p, E and x değerleri 120. saat sonunda %97.1 (T/Ç=2), %95.2 (T/Ç=1/2), 133.5 (T/Ç=1) ve %50 (T/Ç=2) olarak elde edilmiştir.



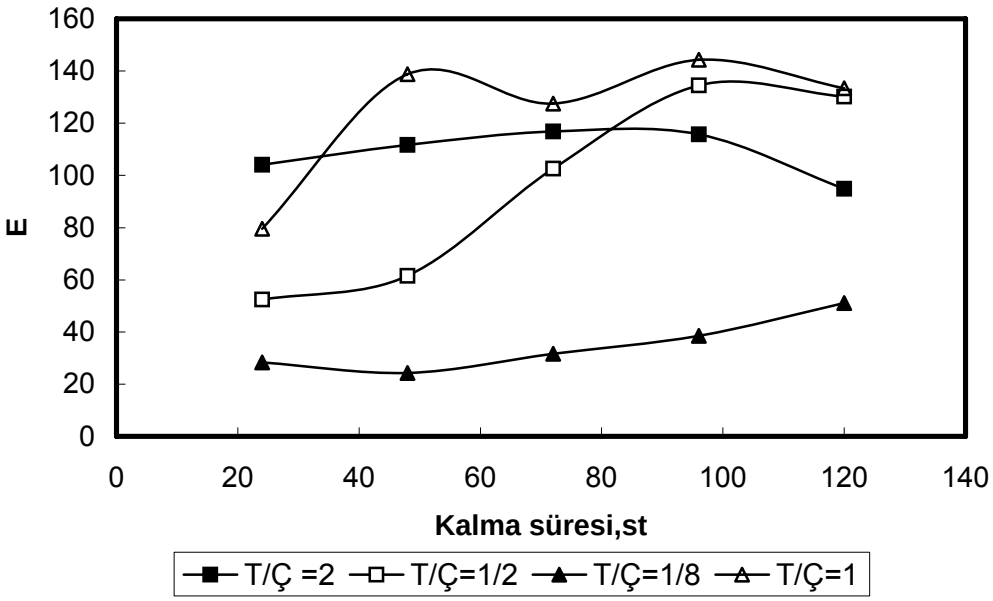
Şekil 4.5 Rasemik Naproksen metil esterin hidrolizinde tampon/çözücü hacim oranının (T/Ç) substrat için enantiyomerik aşırılık değerine ($\%ee_s$) etkisi
T=37ºC, N=200 rpm, pH=7.5, çözücü=izooktan, Cso=0.034 M, C_{CRL}=0.04 g ml^{-1}, A_{CRL}=2.088 U, C_P=0.987 mg protein ml^{-1}



Şekil 4.6 Rasemik Naproksen metil esterin hidrolizinde tampon/çözücü hacim oranının (T/Ç) ürün için enantiyomerik aşırılık değerine ($\%ee_p$) etkisi
T=37ºC, N=200 rpm, pH=7.5, çözücü=izooktan, Cso=0.034 M, C_{CRL}=0.04 g ml^{-1} A_{CRL} =2.088 U, C_{Po}=0.987 mg protein ml^{-1}



Şekil 4.7. Rasemik Naproksen metil esterin hidrolizinde tampon/çözücü hacim oranının (T/Ç) dönüşüm (%x) değerine etkisi
T=37ºC, N=200 rpm, pH=7.5, çözücü=izooktan, Cso=0.034 M, C_{CRL}=0.04 g ml, $^{-1}$ A_{CRL} =2.088 U, C_{Po}=0.987 mg protein ml $^{-1}$

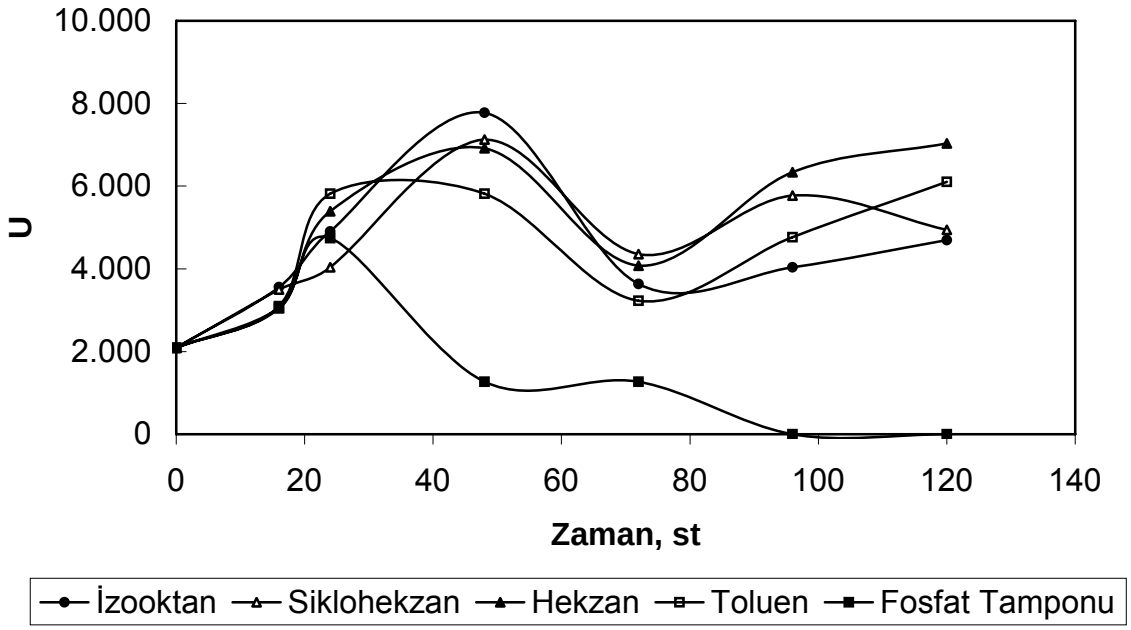


Şekil 4.8. Rasemik Naproksen metil esterin hidrolizinde tampon/çözücü hacim oranının (T/Ç) enantiyomerik oran (E) değerine etkisi
T=37ºC, N=200 rpm, pH=7.5, çözücü=izooktan, Cso=0.034 M, C_{CRL}=0.04 g ml $^{-1}$ A_{CRL} =2.088 U, C_{Po}=0.987 mg protein ml $^{-1}$

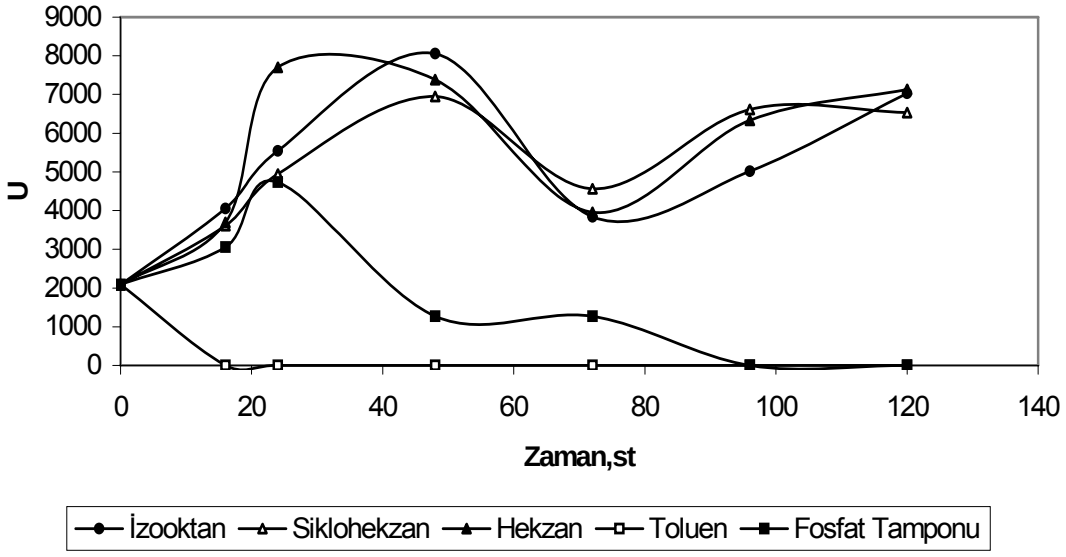
4.3 Organik Çözücü Türünün ve Tampon/Çözücü Oranının CRL Aktivitesine Etkisi

Organik çözücü ve sulu tampon fazından oluşan iki fazlı sistemde CRL'nin kararlılığını belirlemek amacıyla enzimin PNFA'ya karşı hidrolitik aktivitesinin zamanla değişimi incelenmiştir. Farklı log P değerlerindeki çözücüler ile, N=200 rpm ve T=37˚C koşullarında sulu tampon fazından (0.01 M pH=7.5 fosfat tamponu) 120 saat boyunca 24 saatte bir örnekler alınmış ve bu örneklerin hidrolitik aktiviteleri Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi belirlenmiştir. Kullanılan çözücüler; izooktan (log P=4.7), hekzan (log P=3.5), siklohekzan (log P=3.2) ve toluendir (log P=2.5). CRL enziminin PNFA'ya karşı aktivitesinin zamanla değişimi bu çözücülerin varlığında, sulu faz/organik faz hacim oranı T/Ç=1/2 ve 2 değerlerinde ayrı ayrı incelenmiştir. Sonuçlar çözücüsüz ortamla karşılaştırmalı olarak sırasıyla Şekil 4.9 ve 4.10'da yer almaktadır.

Enzim sadece fosfat tamponunda çözündüğü zaman gözlenen aktivite değeri, aynı tamponda çözünmüş olan enzimin organik çözücüyle iki fazlı sistem oluşturduğu durumda (T/Ç=2 ve 1/2) ölçülen aktivite değerine göre daha düşüktür. Enzim aktivitesi, çözücünün log P değeri ile doğru orantılı olarak değişmektedir. Her iki T/Ç oranında da CRL aktivitesinin değişiminin izooktan > hekzan > siklohekzan > toluen> fosfat tamponu şeklinde olduğu belirlenmiştir. Ancak, CRL enziminin PNFA'ya karşı hidrolitik aktivitesinde her çözücü için T/Ç=2'de elde edilen değerlerin T/Ç=1/2 değerlerine göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.9 CRL'nin PNFA'ya karşı hidrolitik aktivite ve kararlılığına organik çözücü türünün etkisi
T/Ç(h/h)=1/2, T=37°C, N=200 rpm, C_{CRL}=0.02 g ml^{-1}, C_P=0,897 mg protein ml^{-1}



Şekil 4.10 CRL'nin PNFA'ya karşı hidrolitik aktivite ve kararlılığına organik çözücü türünün etkisi
T/Ç(h/h)=2, T=37°C, N=200 rpm, C_{CRL}=0.02 g $ml,^{-1}$ C_P=0,897 mg protein ml^{-1}

4.4 Tampon pH'ının S-Naproksen Üretimine Etkisi

Ortam pH'ı enzim konformasyonunu önemli derecede etkileyen bir parametredir. pH= 4, 6 (iki ayrı tampon ile), 7.5 ve 9 tamponları kullanılarak pH'ın rasemik Naproksen metil esterin hidroliz tepkimesinde enantiyoseçimliliğe etkisi incelenmiştir. Hidroliz tepkimesinde ortam pH'ı sulu fazda ayarlanmıştır. 0.034 M ester derişiminde, enzim derişimi 0.02 g ml^{-1} tampon olmak üzere, sıcaklık T=37°C, karıştırma hızı N=200 rpm, çözücü olarak izooktan kullanılarak tampon/çözücü hacim oranı T/Ç=2 değerinde hidroliz tepkimeleri gerçekleştirilmiştir. 120 saat boyunca her 24 saatte bir ürün Naproksenin çözündüğü sulu fazdan ve girdi Naproksen metil esterin çözündüğü organik fazdan örnekler alınmış ve kalma süresi ile $\%ee_s$, $\%ee_p$, %x ve E değerlerinin değişimi incelenmiştir.

Sulu ortam pH'ının enantiyomerik aşırılıklar ($\%ee_s$ ve $\%ee_p$), dönüşüm (%x) ve enantiyomerik oran (E) değerlerine etkisi Şekil 4.11-4.14'de verilmiştir. Şekil 4.11'de farklı pH değerlerinde tamponlar kullanıldığı zaman kalma süresiyle $\%ee_s$'deki değişimler yer almaktadır. pH=9 hariç diğer tüm değerlerde $\%ee_s$ kalma süresiyle önce artmakta, 96. saatten sonra ise değişmemektedir. Asidik pH değerlerinde $\%ee_s$ değerleri, bazik pH değerlerine göre daha yüksek gözlenmiştir. $\%ee_s$, pH= 4 > 6 (fosfat tamponu) > 6 (MES tamponu) > 7.5 > 9 sırasıyla değişmektedir. Şekil 4.12'de ise kalma süresiyle $\%ee_p$ değerlerinin değişimi verilmiştir. Bazik pH değerlerinde enzimin enantiyoseçimliliği daha yüksek gözlenmiştir. $\%ee_p$, pH= 9 > 4 > 7.5 > 6 (MES tamponu) > 6 (fosfat tamponu) sırasıyla değişmektedir. Asidik pH değerlerinde %x değerleri -$\%ee_s$'nin kalma süresiyle değişimindeki gibi- bazik pH değerlerine göre daha yüksektir (Şekil 4.13). %x; pH= 4 > 6 (fosfat tamponu) > 6 (MES tamponu) > 7.5 > 9 sırasıyla değişmektedir. E değerlerinin kalma süresiyle değişimi ise Şekil 4.14'de yer almaktadır. E; pH= 4 > 7.5 > 6 (fosfat tamponu) > 9 > 6 (MES tamponu) sırasıyla azalmaktadır. pH=4 değeri, en yüksek enantiyomerik oran değerini veren pH olarak bulunmuştur.

En yüksek değerler 120 saat sonunda pH=4 için ee_s, ee_p, E ve x için sırasıyla %95.9, %94.4, 135.4 ve %50 olarak belirlenmiştir.

Farklı pH değerleri için kullanılan tamponlar aşağıda verilmiştir:

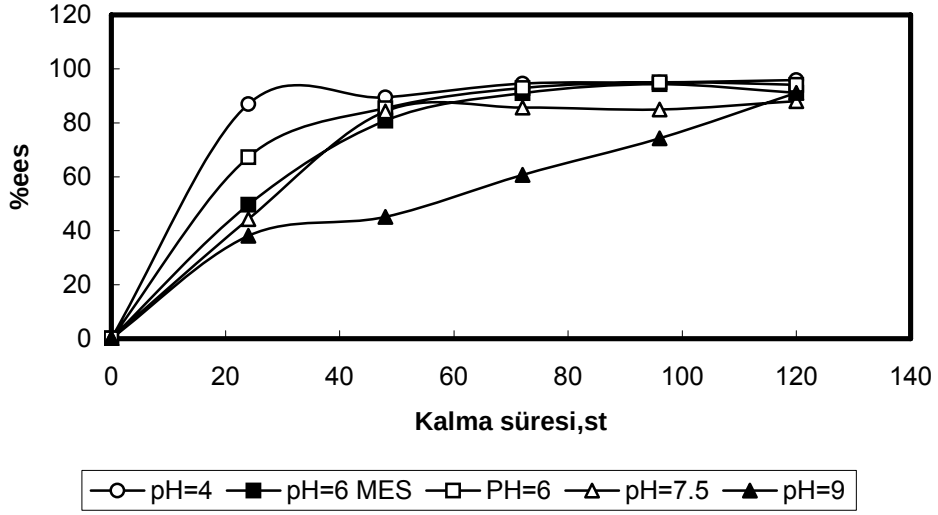
pH = 4 Tamponu: 847ml Asetik asit + 153ml Sodyum Asetat

pH = 6 Fosfat Tamponu: 6.15ml 0.2M Na_2HPO_4 + 43.85ml 0.2M NaH_2PO_4

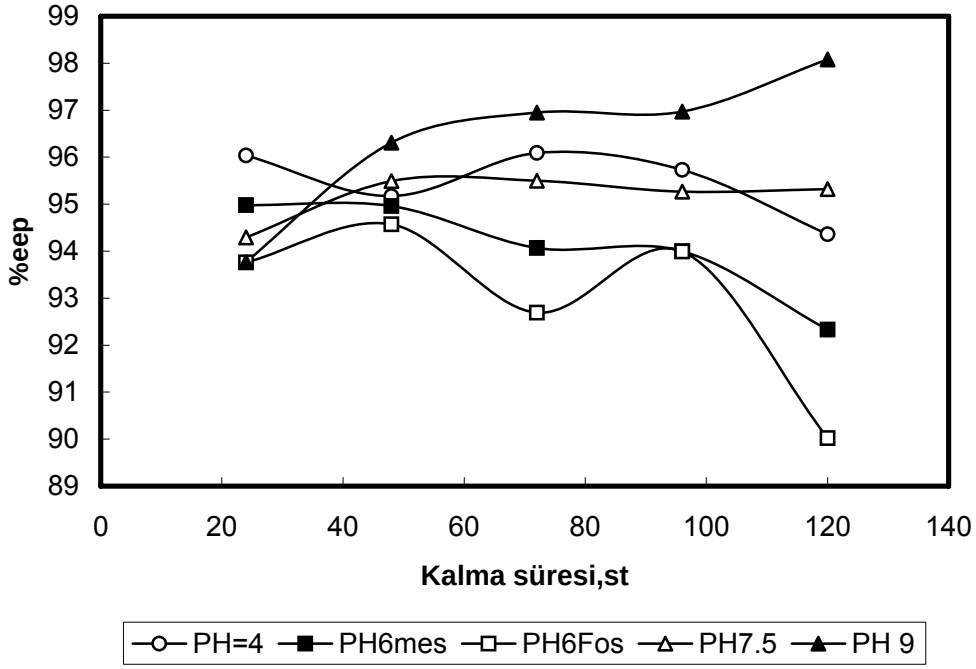
pH = 6 MES Tamponu: 976 g MES 900ml suda çözünerek 1N NaOH ile ayarlanır.

pH =7.5 Fosfat Tamponu : 42ml 0.2M Na_2HPO_4+ 8ml 0.2M NaH_2PO_4)

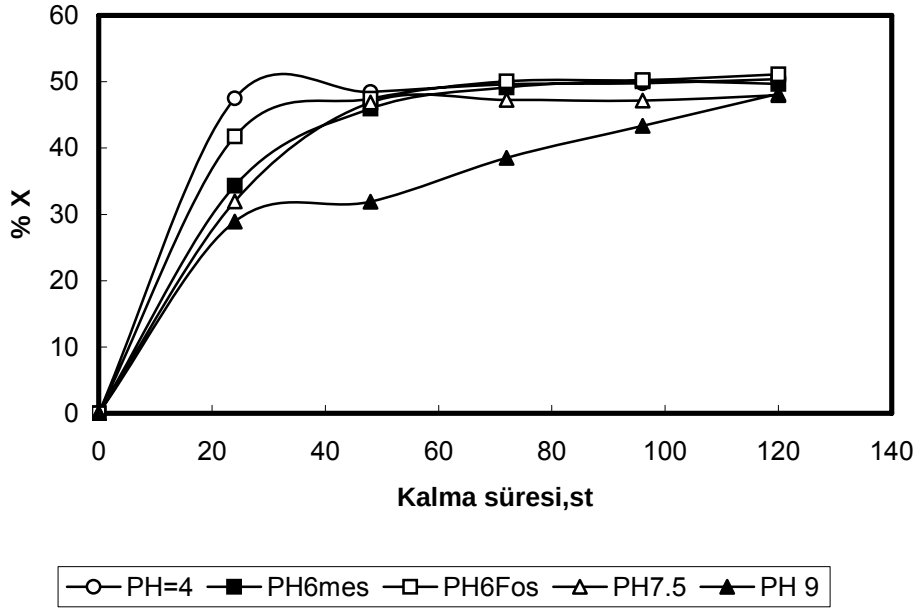
pH = 9 Tris Tamponu : 0.1M 100ml Tris + 0.1M 11.4 ml HCl



Şekil 4.11 Rasemik Naproksen metil esterin hidrolizinde tampon pH'ının substrat için enantiyomerik aşırılık değerine (%ee_s) etkisi
T/Ç(h/h)=1/2, T= 37ºC, N=200 rpm, C_{CRL}=0.02 g ml^{-1}, Cso=0.034M, Cp (mg protein ml^{-1}): 0.868 (pH=4), 0.649 (pH=6 MES tamponu), 0.819 (pH=6 fosfat tamponu), 0.964 (pH=7.5), 0.867 (pH=9), A_{CRL}(U); 2.316 (pH = 4), 2.166 (pH=6 MES tamponu), 2.028 (pH=6 fosfat tamponu), 2.088 (pH=7.5), 1.224(pH=9).

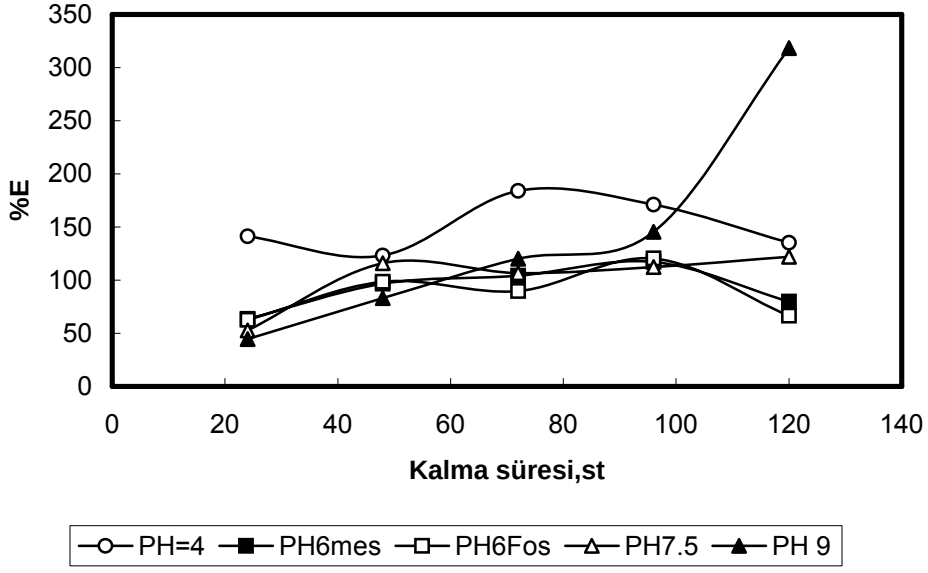


Şekil 4.12 Rasemik Naproksen metil esterin hidrolizinde tampon pH'ının ürün için enantiyomerik aşırılık (%ee_p) değerine etkisi
T/Ç(h/h)=1/2, T= 37ºC, N=200 rpm C_{CRL}=0.02g ml^{-1}, Cso=0.034 M, Cpo (mg protein $ml^{-1)}$,: 0.868 (pH=4), 0.649 (pH=6 MES tamponu), 0.819 (pH=6 fosfat tamponu), 0.964 (pH=7.5), 0.867 (pH=9), A_{CRL}(U); 2.316 (pH = 4), 2.166 (pH=6 MES tamponu), 2.028 (pH=6 fosfat tamponu), 2.088 (pH=7.5), 1.224 (pH=9)



Şekil 4.13 Rasemik Naproksen metil esterin hidrolizinde tampon pH'ının dönüşüm (%x) üzerine etkisi

T/Ç(h/h)=1/2, T=37ºC, N=200 rpm, C_{CRL}=0.02 g ml^{-1}, Cso=0.034 M, Cp (mg protein ml^{-1}): 0.868 (pH=4), 0.649 (pH=6 MES tamponu), 0.819 (pH=6 fosfat tamponu), 0.964 (pH=7.5), 0.867 (pH=9), A_{CRL}(U); 2.316 (pH = 4), 2.166 (pH=6 MES tamponu), 2.028 (pH=6 fosfat tamponu), 2.088 (pH=7.5), 1.224 (pH=9)



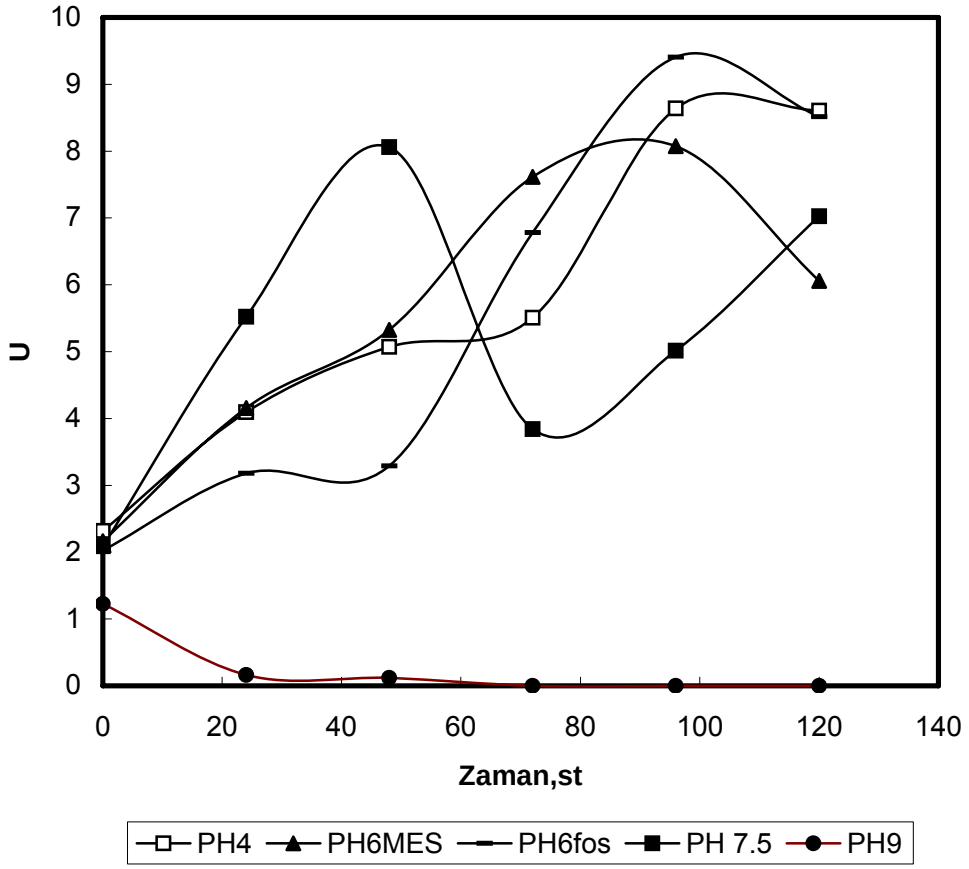
Şekil 4.14 Rasemik Naproksen metil esterin hidrolizinde tampon pH ının enantiyomerik oran (E) üzerine etkisi

T/Ç(h/h)=1/2, T=37ºC, N=200 rpm, C_{CRL}=0.02 g ml^{-1}, Cso=0.034 M, Cpo (g protein ml^{-1},): 0.868 (pH=4), 0.649 (pH=6 MES tamponu), 0.819 (pH=6 fosfat tamponu), 0.964 (pH=7.5), 0.867 (pH=9), A_{CRL}(U); 2.316 (pH = 4), 2.166 (pH=6 MES tamponu), 2.028 (pH=6 fosfat tamponu), 2.088 (pH=7.5), 1.224(pH=9)

4.5 Tampon pH'ının CRL Aktivitesine Etkisi

İzooktan ve ortam pH'ını belirleyen sulu fazdan oluşan sistemde CRL'nin kararlılığını belirlemek amacıyla enzimin PNFA'ya karşı hidrolitik aktivitesinin zamanla değişimi incelenmiştir. Farklı pH'larda hazırlanan tampon çözeltilerin (pH= 4, 6 (iki ayrı tampon), 7.5 ve 9) yer aldığı, T/Ç=2 olan iki fazlı ortamdan N=200 rpm ve T=37^{o}C koşullarında 120 saat boyunca 24 saatte bir örnekler alınmış ve bu örneklerin hidrolitik aktiviteleri Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.15'de yer almaktadır.

Tüm pH'larda zamanla aktivite değerleri farklılık ve kararsızlık göstermiştir. pH=4'de aktivite 48. saate kadar önce artmış, 48 ile 72. saat arasında azalmış, 72. ile 120 saat arasında ise tekrar artmıştır. pH=6 MES tamponu kullanıldığında aktivite 96.saate kadar artmış, sonra azalmıştır. MES tamponu kullanıldığında gözlenen değişim pH=6 fosfat tamponunda da gözlenmiştir. pH=7.5 fosfat tamponu kullanıldığında ise aktivite değeri 48.saate kadar artmış, 48 ile 72. saatler arasında azalmış, 72 ile 120. saatler arasında tekrar artmıştır. pH=9 değerinde ise 48 saat sonra CRL aktivitesi gözlenmemiştir. Aktivite değerleri 24 saatin sonunda pH= 7.5 > 6 (MES tamponu) = 4 > 6 (fosfat tamponu) > 9 sırasıyla azalmaktadır. pH=9 tamponu dışında tüm pH değerlerinde enzim aktivitesi başlangıç aktivitesine göre zamanla artmıştır. pH=6 MES tamponunun aktivite değerleri, pH=6 fosfat tamponunun aktivite değerlerinden daha yüksek olarak gözlenmiştir.



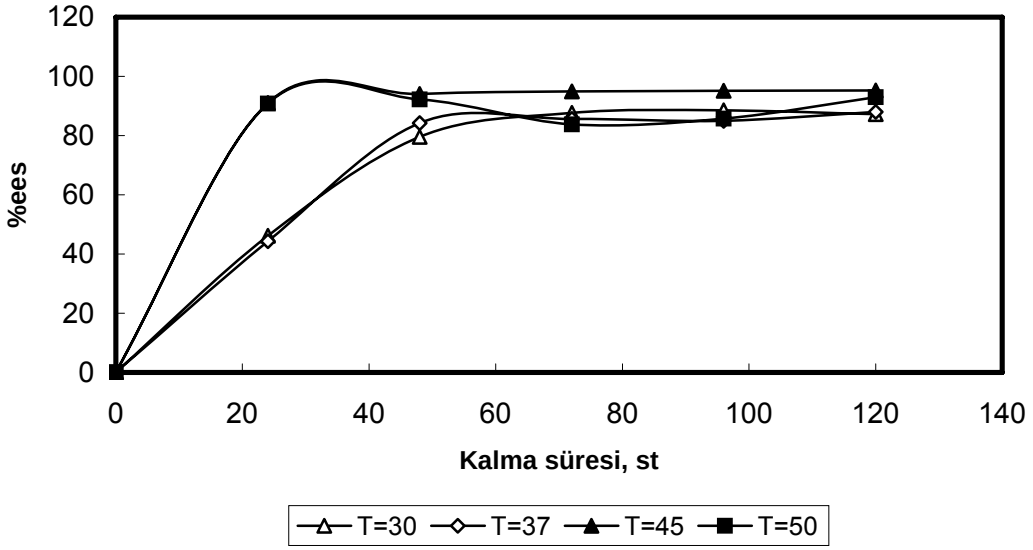
Şekil 4.15 CRL'nin PNFA'ya karşı hidrolitik aktivite ve kararlılığına sulu faz pH ının etkisi
T/Ç(h/h)=1/2, T=37°C, N=200 rpm, C_{CRL}=0.02 g ml^{-1}, C_P=0,897 mg protein ml^{-1}

4.6 Sıcaklığın S-Naproksen Üretimine Etkisi

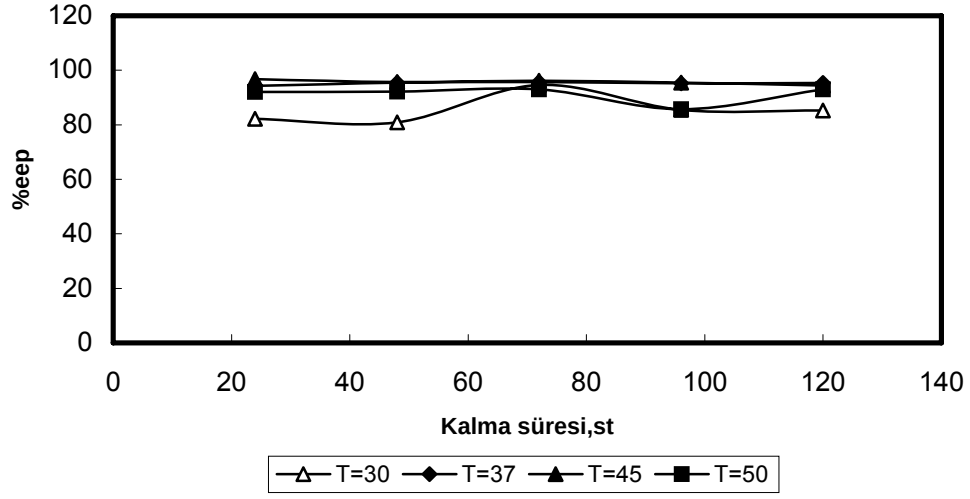
Sıcaklığın, rasemik Naproksen metil esterin hidroliz tepkimesindeki enantiyoseçimliliğe etkisi, karıştırma hızı N=200 rpm, T/Ç=2 koşullarında çözücü olarak izooktan kullanılarak iki fazlı sistemde incelenmiştir. Hidroliz tepkimesinde 0.034 M Naproksen metil ester, 0.01 M pH=7.5 fosfat tamponunda çözünen CRL enzimi ile T=30ºC, 37ºC, 45ºC ve 50ºC sıcaklıklarda etkileştirilmiştir. 120 saat boyunca her 24 saatte bir ürün Naproksenin çözündüğü sulu fazdan ve girdi Naproksen metil esterin çözündüğü organik fazdan örnekler alınmıştır. Sıcaklığın girdi ve ürünün enantiyomerik aşırılıkları (%ee_s ve %ee_p), dönüşüm (%x) ve enantiyomerik oran (E) değerlerine etkisi Şekil 4.16-4.19'da verilmiştir.

Şekil 4.16'da görüldüğü gibi hidroliz ortamında farklı sıcaklıklarda %ee_s değeri kalma süresi ile önce artmakta, 48.saatten sonra ise değişmemektedir. %ee_s; T=45ºC > 50ºC > 37ºC >30ºC sırasıyla azalmaktadır. Farklı sıcaklıklardaki %ee_p değerleri ise kalma süresiyle değişmemektedir. %ee_p; T=45ºC ≈ 37ºC > 50ºC >30ºC sırasıyla azalmaktadır (Şekil 4.17). Kalma süresiyle %x değerleri artmakta, 48.saatten sonra ise değişmemektedir. %x; T=45ºC ≈ 50ºC > 37ºC >30ºC sırasıyla azalmaktadır (Şekil 4.18). Şekil 4.19'da E değerlerinin kalma süresiyle değişimi verilmiştir. T=30ºC'de enantiyomerik oran 72.saate kadar artmakta, 72 ile 96 saatler arasında azalmakta, sonra sabit kalmaktadır. T=37ºC'de ise E değeri 48.saate kadar artmakta, sonra değişmemektedir. T=45ºC'de E değeri 48.saate kadar azalmakta, 48 ile 72.saat arasında artmakta, sonra azalmaktadır. T=50ºC'de E değeri 72.saatin sonuna kadar değişmemekte, 72 ile 96 saatler arasında azalmakta, sonra artmaktadır. E; T=45ºC> 37ºC> 50ºC> 30ºC sırasıyla azalmaktadır.

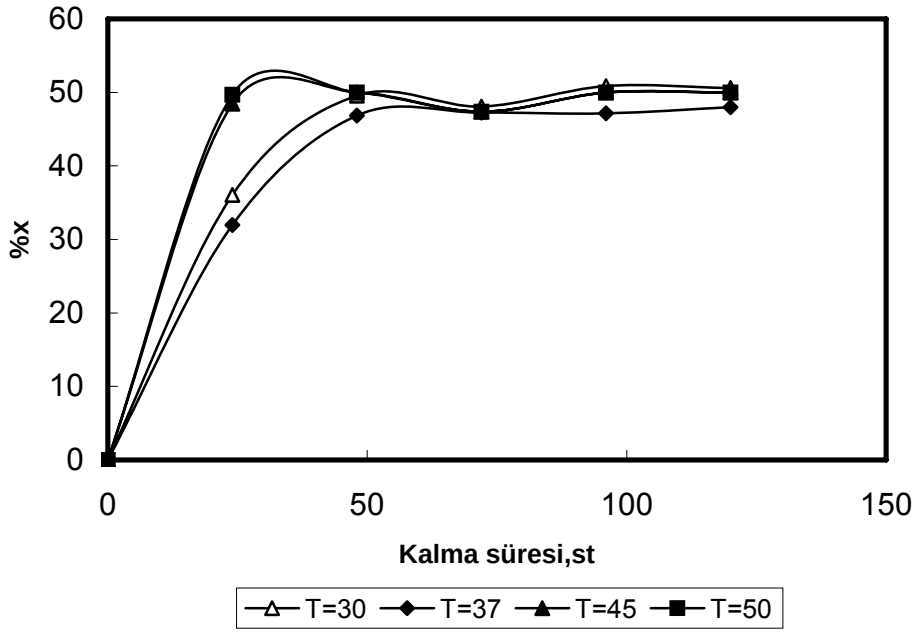
En yüksek değerler 120.saatin sonunda ee_s, ee_p, E ve x için sırasıyla %95.28, % 94.39, 131.22 ve %50 olarak T=45 ºC'de elde edilmiştir.



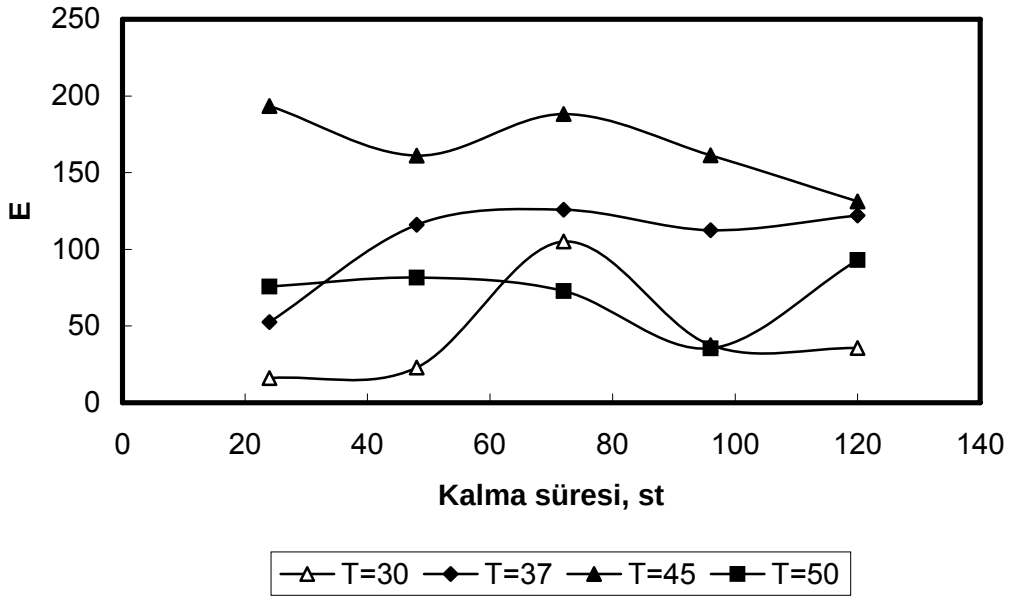
Şekil 4.16 Rasemik Naproksen metil esterin hidrolizinde sıcaklığın substrat için enantiyomerik aşırılık değerine (%ee_s) etkisi
T/Ç(h/h)=2, pH=7.5, çözücü=izooktan, Cso=0.034 M, C_{CRL}=0.04 g ml^{-1} A_{CRL}=0.2380 U, C_{Po}=0.8257 g protein ml^{-1}



Şekil 4.17 Rasemik Naproksen metil esterin hidrolizinde sıcaklığın ürün için enantiyomerik aşırılık değerine (%ee_p) etkisi
T/Ç(h/h)=2, pH=7.5, çözücü=izooktan, Cso=0.034 M, C_{CRL}=0.04 g ml^{-1} A_{CRL}=0.2380 U, C_{Po}=0.8257 g protein ml^{-1}



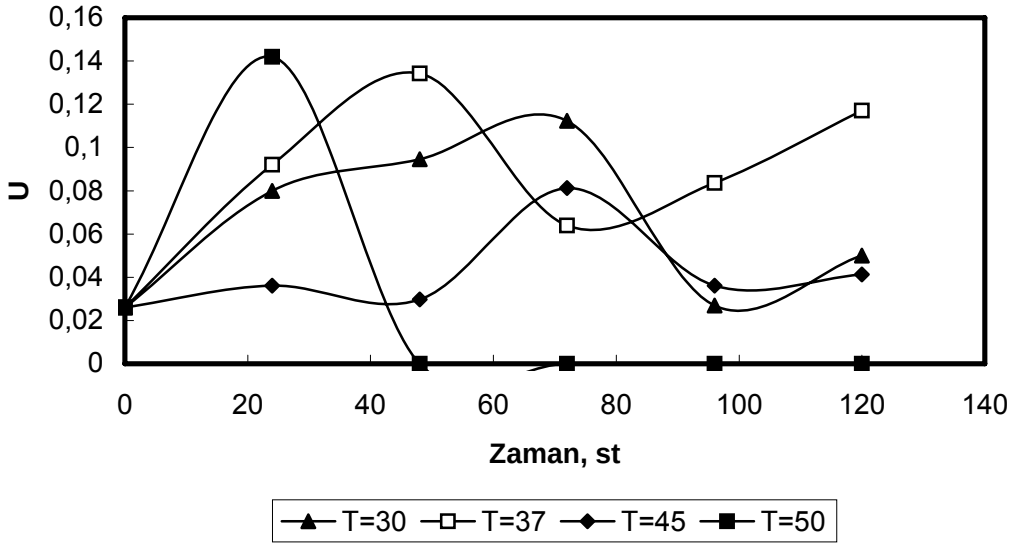
Şekil 4.18 Rasemik Naproksen metil esterin hidrolizinde sıcaklığın dönüşüm (%x) değerine etkisi
T/Ç(h/h)=2, pH=7.5, çözücü=izooktan, Cso=0.034 M, C_{CRL}=0.04 g ml^{-1} A_{CRL}=0.2380 U, C_{Po}=0.8257 g protein ml^{-1}



Şekil 4.19 Rasemik Naproksen metil esterin hidrolizinde sıcaklığın enantiyomerik oran (E) üzerine etkisi
T/Ç(h/h)=2, pH=7.5, çözücü=izooktan, Cso=0.034 M, C_{CRL}=0.04 g $ml,^{-1}$ A_{CRL}=0.2380 U, C_{Po}=0.8257 g protein ml^{-1}

4.7 Sıcaklığın CRL Aktivitesine Etkisi

İzooktan ve sulu tampon fazından oluşan iki fazlı sistemde sıcaklığın CRL'nin kararlılığı ve aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla enzimin PNFA'ya karşı hidrolitik aktivitesinin zamanla değişimi incelenmiştir. 0.01 M pH=7.5 fosfat tamponunda çözünen CRL'nin T=30ºC, 37ºC, 45ºC ve 50ºC olmak üzere dört farklı sıcaklıkta aktivitesi ölçülmüştür. T/Ç=2 ve N=200 rpm koşullarında 120 saat boyunca 24 saatte bir örnekler alınmış ve bu örneklerin hidrolitik aktiviteleri Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.20'de verilmiştir. Tüm sıcaklık değerlerinde zamanla aktivite değerleri farklılık ve kararsızlık göstermiştir. T=30ºC ve 45ºC değerlerinde aktivite 72.saate kadar artmakta, sonra azalmaktadır. 30ºC CRL'nin aktivitesi 45ºC'den daha fazla gözlenmektedir. T= 50ºC'de aktivite 24.saate kadar artmakta, 48.saat sonunda hızlı bir şekilde azalıp sıfıra düşmektedir. En yüksek aktivite değeri 37ºC'de gözlenmiştir. Bu sıcaklıkta enzim aktivitesi 48.saate kadar artmakta, 72.saatte azalmakta, sonra tekrar artmaktadır. Aktivite değerlerinin sıcaklıkla değişimi 24 saatin sonunda 37ºC >30ºC> 45ºC >50ºC olarak gözlenmiştir



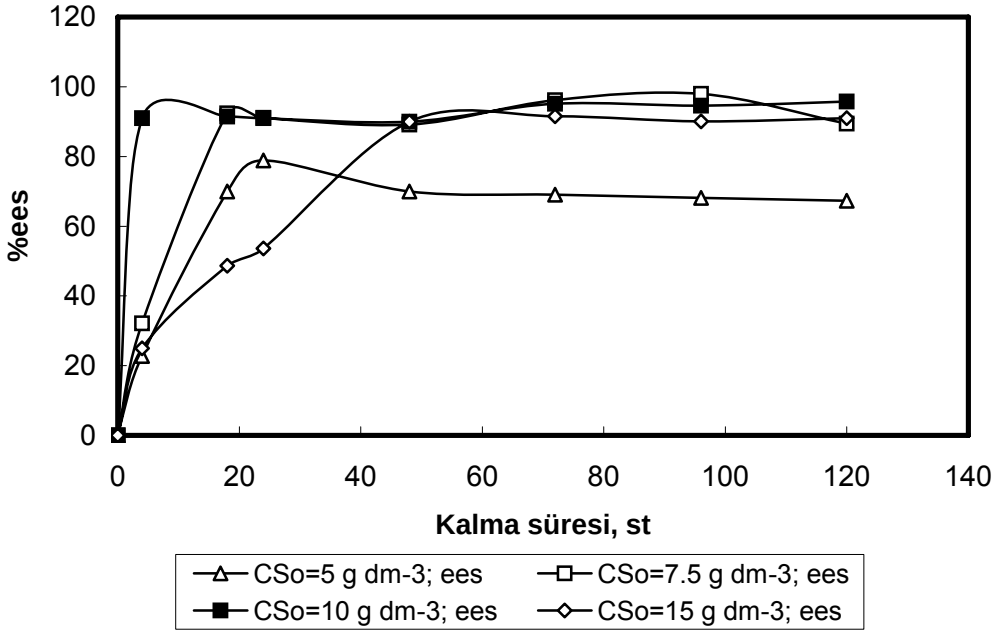
Şekil 4.20 CRL'nin PNFA'ya karşı hidrolitik aktivite ve kararlılığına sıcaklık etkisi
T/Ç(h/h)=1/2, T=37ºC, pH=7.5, N=200 rpm, C_{CRL}=0.02 g ml, $^{-1}C_P$=0,897 mg protein ml $^{-1}$

4.8 Substrat Derişiminin S-Naproksen Üretimine Etkisi

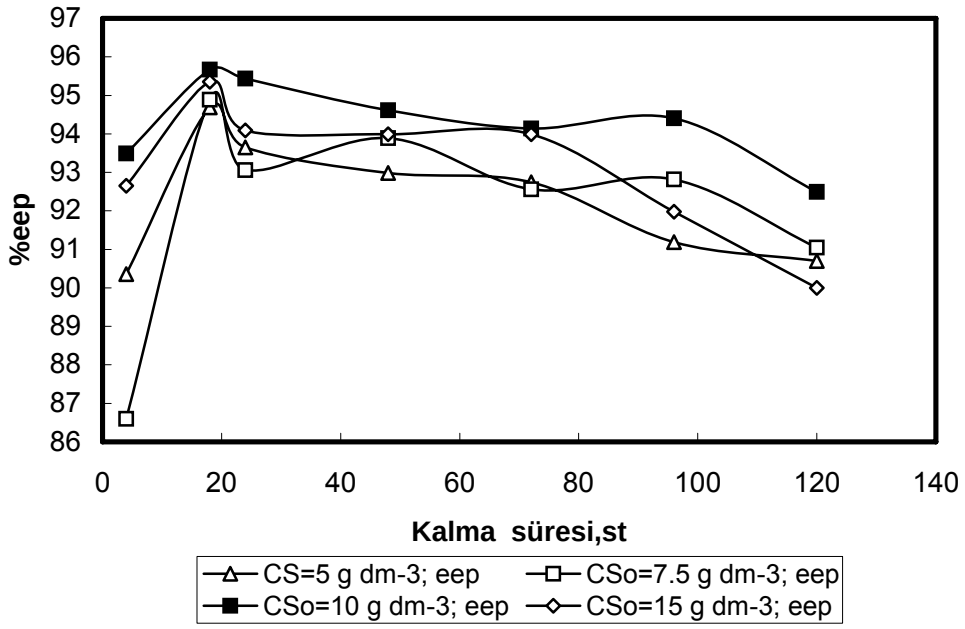
CRL katalizli, iki fazlı enantiyoseçimli hidroliz tepkimesinin girdisi olan rasemik Naproksen metil esterin başlangıç derişiminin $\%ee_s$, $\%ee_p$, %x ve E üzerine etkisi, N=200 rpm, T=37^oC, T/Ç=2, pH=7.5 koşullarında, C_{So}=5, 7.5, 10 ve 15 gdm^{-3} değerlerinde incelenmiş ve sonuçlar Şekli 4.21-4.24'de verilmiştir.

Bütün derişimlerde kalma süresiyle $\%ee_s$ önce artmakta, sonra sabit kalmaktadır (Şekil 4.21). $\%ee_s$'deki değişim şu şekildedir: Cso(10gdm^{-3}) = Cso(7.5 gdm^{-3}) > Cso(15 gdm^{-3}) > Cso(5 gdm^{-3}) Cso=10 gdm^{-3} derişiminde Cso =7.5 gdm^{-3} derişime göre daha çabuk platoya gelindiği gözlenmektedir. Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesinde $\%ee_p$'lerin kalma süresiyle değişimleri incelendiğinde ise şu sonuçlar elde edilmiştir. Naproksen metil esterin tüm derişimlerinde 24 ve 48. saatler arasında $\%ee_p$ değerlerinde bir artış gözlenmiş, daha sonra yaklaşık sabit kalmıştır (Şekil 4.22). $\%ee_p$'deki değişim şu şekilde azalmaktadır: Cso(10 gdm^{-3}) > Cso(15 gdm^{-3})> Cso(7.5 gdm^{-3})> Cso(5 gdm^{-3}). Şekil 4.23'de farklı derişimlerdeki Naproksen metil esterin %x'e etkisi verilmiştir.%x deki değişim ise şu şekildedir: Cso(10 gdm^{-3}) = Cso(7.5 gdm^{-3}) > Cso (15gdm^{-3}) > Cso(5gdm^{-3}). Derişimin enantiyomerik oran üzerine etkisi incelendiğinde ise kalma süresiyle E değerinin her derişimde farklılık gösterdiği belirlenmiştir. En yüksek E değeri Cso=10 gdm^{-3}de gözlenmiştir. E değerlerindeki kalma süresiyle değişimi ise şu şekildedir: Cso= (10 gdm^{-3}) > Cso= (7.5 gdm^{-3}) > Cso= (5 gdm^{-3}) > Cso= (15 gdm^{-3}) (Şekil 4.24).

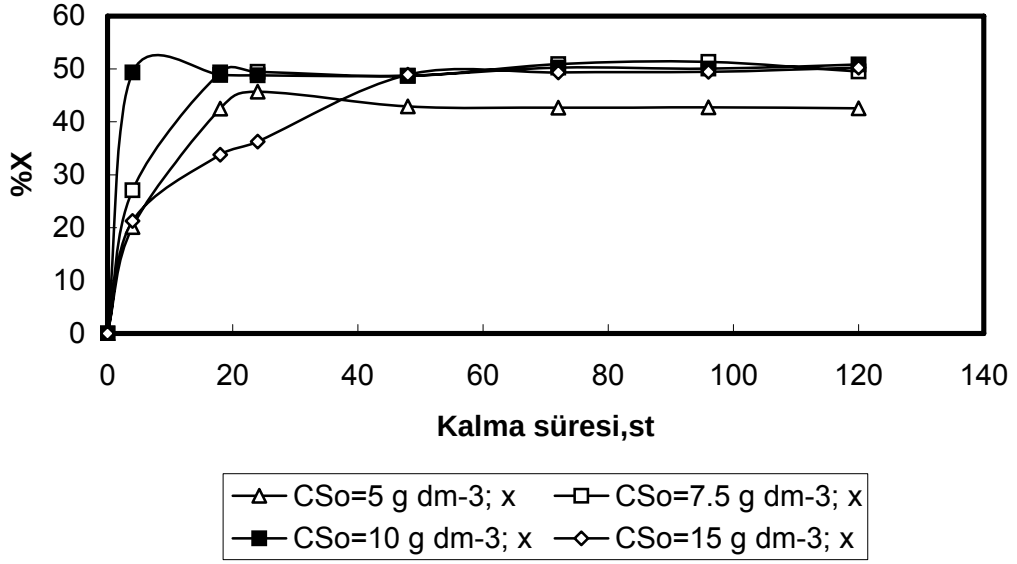
En yüksek değerler 120.saatin sonunda ee_s, ee_p, E ve x için sırasıyla %95.74, % 92.49, 99.27 ve %50.86 olarak Cso=10 gdm^{-3} de elde edilmiştir.



Şekil 4.21 Rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde substrat derişiminin ees üzerine etkisi
T/Ç(h/h)=2, N=200 rpm, T=37ºC, pH=7.5, N=200 rpm, pH=7.5 fosfat tamponu, $_{ACRL}$=0.2571 U, Cpo= 0.27 mg protein g enzim^{-1}

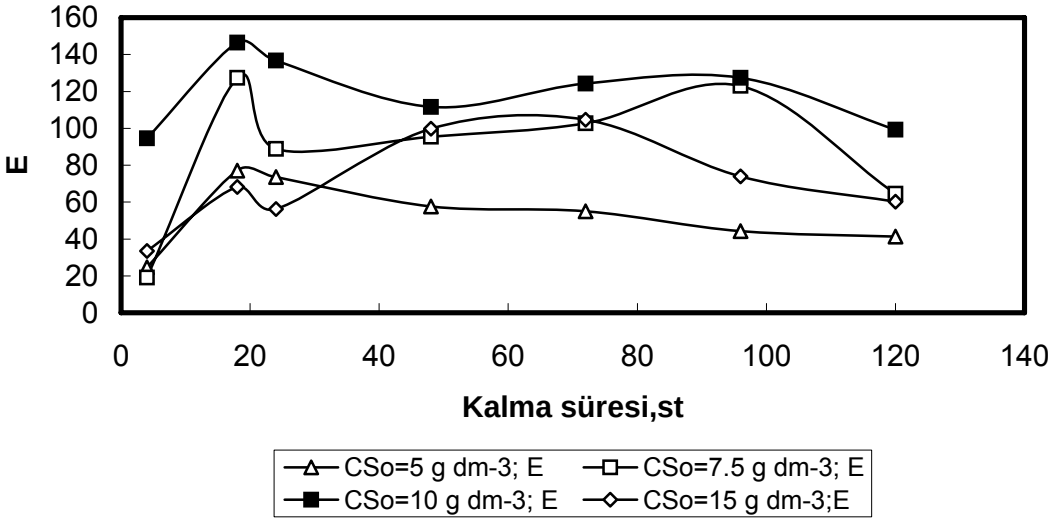


Şekil 4.22 Rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde substrat derişiminin eep üzerine etkisi
T/Ç(h/h)=2, N=200 rpm, T=37ºC, pH=7.5, N=200 rpm, pH=7.5 fosfat tamponu, $_{ACRL}$=0.2571 U, Cpo= 0.27 mg protein g enzim^{-1}



Şekil 4.23 Rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde substrat derişiminin %x üzerine etkisi

T/Ç(h/h)=2, N=200 rpm, T=37ºC, pH=7.5(fosfat tamponu), N=200 rpm, pH=7.5 fosfat tamponu, $_{ACRL}$=0.2571 U, Cpo= 0.27 mg protein g enzim^{-1}



Şekil4.24 Rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde substrat derişiminin E üzerine etkisi

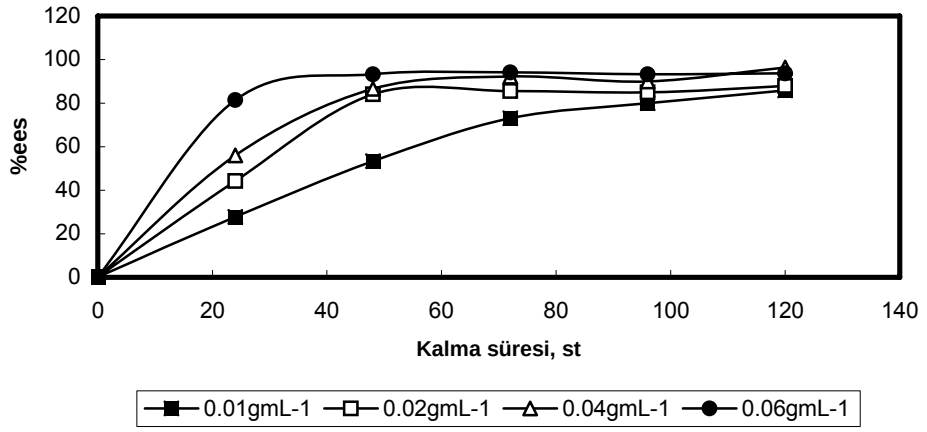
T/Ç(h/h)=2, N=200 rpm, T=37ºC, pH=7.5(fosfat tamponu), $_{ACRL}$=0.2571 U, Cpo= 0.27 mg protein g enzim^{-1}

4.9 CRL Derişiminin S-Naproksen Üretimine Etkisi

Enzim derişiminin, rasemik Naproksen metil esterin hidroliz tepkimesindeki enantiyoseçimliliğe etkisi; sıcaklık T=37°C, karıştırma hızı N=200 rpm, T/Ç=2 koşullarında izooktan çözücü olarak kullanılarak iki fazlı sistemde incelenmiştir. Hidroliz tepkimesinin girdisi 0.034 M Naproksen metil ester, biyokatalizörü ise 0.01 M pH=7.5 fosfat tamponunda çözünerek dört farklı derişimde hazırlanmış olan (C_{Eo}= 0.01, 0.02, 0,04 ve 0,06 g ml^{-1}) C*andida rugosa* lipazıdır. 120 saat boyunca her 24 saatte bir, ürün Naproksenin çözündüğü sulu fazdan ve girdi Naproksen metil esterin çözündüğü organik fazdan örnekler alınmıştır. Enzim derişiminin girdi ve ürünün enantiyomerik aşırılıkları (%ee_s ve %ee_p), dönüşüm (%x) ve enantiyomerik oran (E) değerlerine etkisi Şekil 4.25-4.28'de verilmiştir.

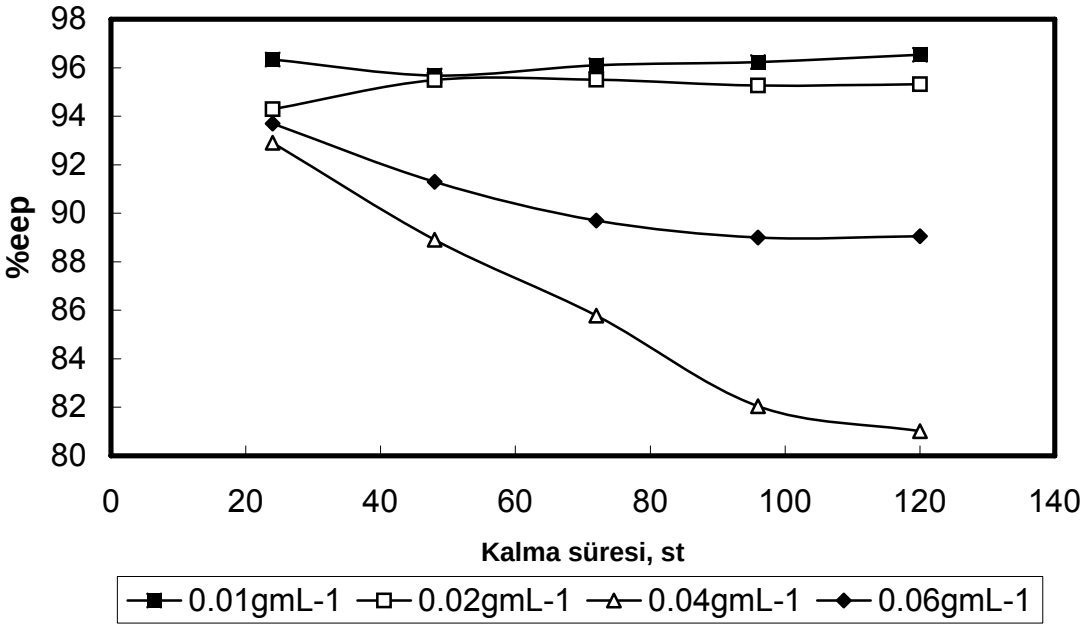
Şekil 4.25'de görüldüğü gibi hidroliz ortamında 0.06, 0.04, 0.02, 0.01 g ml^{-1} enzim derişimleri kullanıldığı zaman %ee_s değeri kalma süresiyle artmakta, 120. saatten sonra ise değişmemektedir. %ee_s; C_{Eo} = 0.06 g ml^{-1} > 0.04 g ml^{-1} > 0.02 g ml^{-1} > 0.01 g ml^{-1} sırasıyla azalmaktadır. Şekil 4.26'da enzim derişimine bağlı olarak %ee_p değerlerinin de kalma süresi ile farklılık gösterdiği görülmektedir. 0.01 ve 0.02 g ml^{-1} enzim derişimlerinde kalma süresiyle %ee_p sabit kalmış, 0.04 ve 0.06 g ml^{-1} değerlerinde ise kalma süresiyle azalmıştır %ee_p; C_{Eo} = 0.01 g ml^{-1} > 0.02 g ml^{-1}> 0.06 g ml^{-1}> 0.04 g ml^{-1}sırasıyla azalmaktadır. Şekil 4.27'de %x değerlerinin kalma süresi ile arttığı ve 120. saatten sonra değişmediği görülmektedir. %x; C_{Eo} = 0.06 g ml^{-1} > 0.04 g ml^{-1} > 0.02 g ml^{-1} > 0.01 g ml^{-1} sırasıyla azalmaktadır. En yüksek dönüşüm 0.06g ml^{-1} enzim derişiminde, en düşük dönüşüm ise 0.01 g ml^{-1} değerinde gözlenmiştir. Rasemik Naproksen metil esterin hidroliz tepkimesinde dönüşüm değerlerinde platoya en kısa sürede 0.06 g ml^{-1} değeriyle ulaşılırken, 0.01 g ml^{-1} değeriyle en uzun sürede ulaşılmıştır. 0.06 ve 0.04 g ml^{-1} enzim derişimlerinde E değeri kalma süresi ile değişmemiş, 0.02 g ml^{-1} değerinde 24 ve 48. saat arasında önce artmış, sonra değişmemiş, 0.01 g ml^{-1} değerinde ise kalma süresiyle artmıştır (Şekil 4.28).

En yüksek değerler 120.saatin sonunda ee_s, ee_p, E ve x için sırasıyla %96.3 (C_{Eo}=0.06 g ml^{-1}), %96.54 (C_{Eo}=0.01 g ml^{-1}), 157.79 (C_{Eo}=0.01 g ml^{-1}) ve %54.3 (C_{Eo}=0.06 g ml^{-1}) olarak belirlenmiştir.



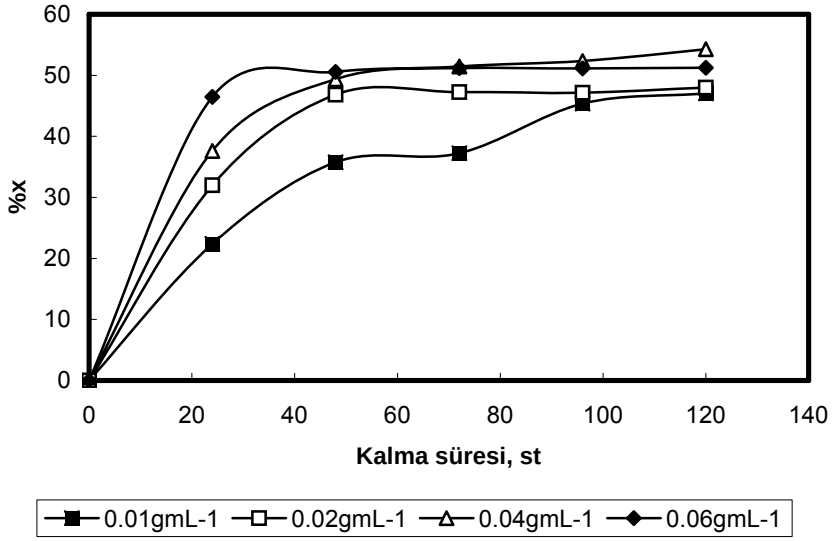
Şekil 4.25 Rasemik Naproksen metil esterin hidrolizinde CRL derişiminin substrat için enantiyomerik aşırılık değerine (%ee_s) etkisi

T/Ç(v/v)=2,T=37ºC, N=200rpm, pH=7.5 (0.01 M fosfat tamponu), çözücü =izooktan, Cso=0.034M, A_{CRL}=0.2571 U, [(C_{CRL}=0.01 g enzim ml^{-1}), 0.54 (mg protein *g $enzim^{-1)}$], [(C_{CRL}=0.02 g enzim ml^{-1}), 0.27 (mg protein *g $enzim^{-1)}$], [(C_{CRL}=0.04 genzim ml^{-1}), 0.135(mg protein *g $enzim^{-1}$)], [(C_{CRL}=0.06 g enzim ml^{-1}), 0.0675(mg protein *g $enzim^{-1}$)]



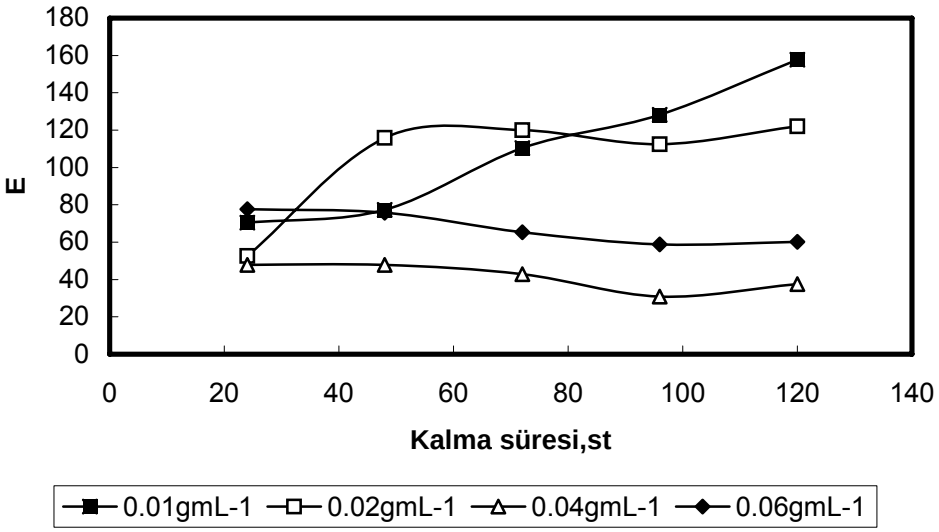
Şekil 4.26 Rasemik Naproksen metil esterin hidrolizinde CRL derişiminin ürün için enantiyomerik aşırılık değerine (%ee_p) etkisi

T/Ç(v/v)=2,T=37ºC, N=200rpm, pH=7.5 (0.01 M fosfat tamponu), çözücü =izooktan, Cso=0.034M, A_{CRL}=0.2571 U, [(C_{CRL}=0.01 g enzim ml^{-1}), 0.54 (mg protein *g $enzim^{-1)}$], [(C_{CRL}=0.02 g enzim ml^{-1}), 0.27 (mg protein *g $enzim^{-1)}$], [(C_{CRL}=0.04 genzim ml^{-1}), 0.135(mg protein *g $enzim^{-1}$)], [(C_{CRL}=0.06 g enzim ml^{-1}), 0.0675(mg protein *g $enzim^{-1}$)]



Şekil 4.27 Rasemik Naproksen metil esterin hidrolizinde CRL derişiminin dönüşüm (%x) üzerine etkisi

T/Ç(v/v)=2,T=37ºC, N=200rpm, pH=7.5 (0.01 M fosfat tamponu), çözücü =izooktan, Cso=0.034M, A_{CRL}=0.2571 U, [(C_{CRL}=0.01 g enzim ml^{-1}), 0.54 (mg protein *g $enzim^{-1)}$], [(C_{CRL}=0.02 g enzim ml^{-1}), 0.27 (mg protein *g $enzim^{-1)}$], [(C_{CRL}=0.04 genzim ml^{-1}), 0.135(mg protein *g $enzim^{-1}$)], [(C_{CRL}=0.06 g enzim ml^{-1}), 0.0675(mg protein *g $enzim^{-1}$)]



Şekil 4.28 Rasemik Naproksen metil esterin hidrolizinde CRL derişiminin enantiyomerik oran (E) üzerine etkisi

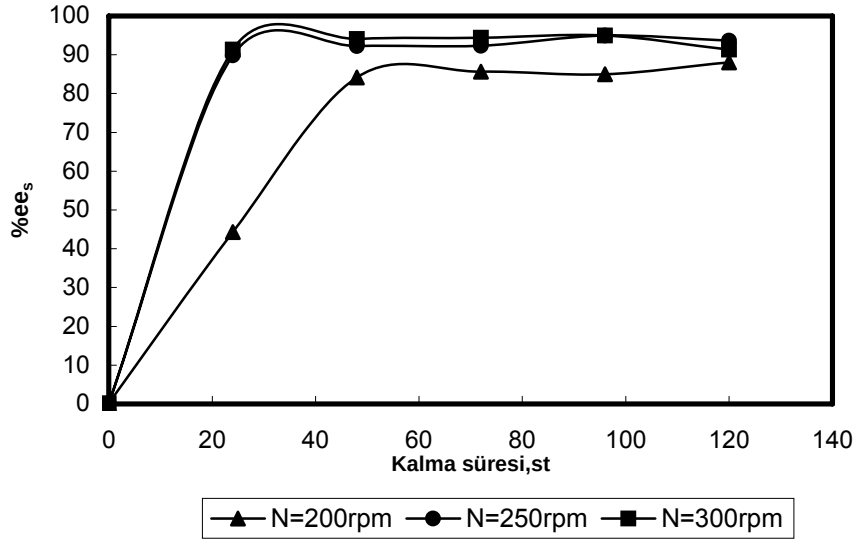
T/Ç(v/v)=2,T=37ºC, N=200rpm, pH=7.5 (0.01 M fosfat tamponu), çözücü =izooktan, Cso=0.034M, A_{CRL}=0.2571 U, [(C_{CRL}=0.01 g enzim ml^{-1}), 0.54 (mg protein *g $enzim^{-1)}$], [(C_{CRL}=0.02 g enzim ml^{-1}), 0.27 (mg protein *g $enzim^{-1)}$], [(C_{CRL}=0.04 genzim ml^{-1}), 0.135(mg protein *g $enzim^{-1}$)], [(C_{CRL}=0.06 g enzim ml^{-1}), 0.0675(mg protein *g $enzim^{-1}$)]

4.10 Karıştırma Hızının S-Naproksen Üretimine Etkisi

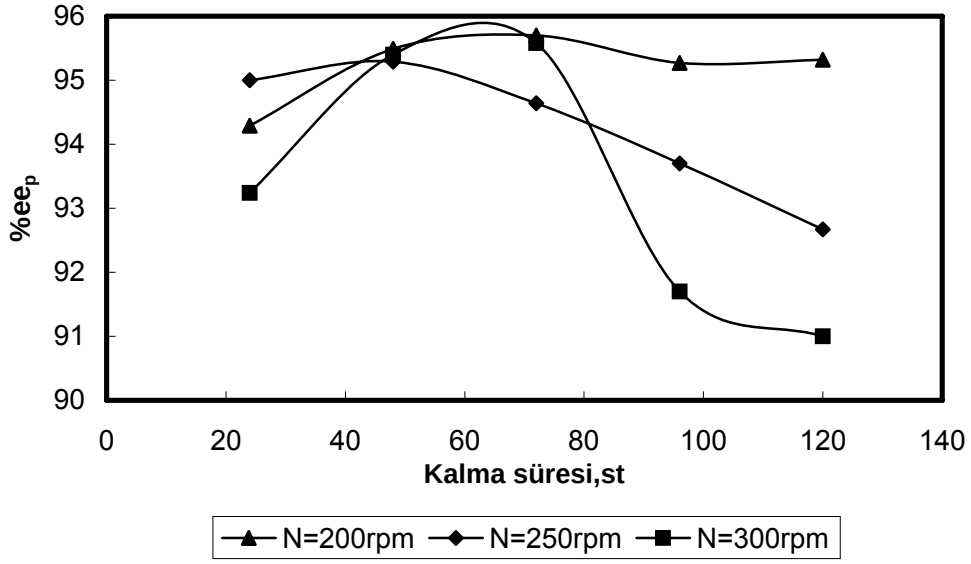
Rasemik Naproksen metil esterin hidroliz tepkimesinde girdi organik çözücüde çözünürken, tepkimenin biyokatalizörü olan CRL ve ürün Naproksen sulu tampon fazda çözünmektedir.Tepkime, su-organik çözücü arayüzeyinde gerçekleştiği için karıştırma hızı önemli bir parametredir. İzooktanda çözünmüş 0.034 M Naproksen metil ester, 0.01 M pH=7.5 fosfat tamponunda çözünmüş 0.04 mg ml^{-1} CRL, T=37°C sıcaklık, T/Ç=2 koşullarında; N=200, 250 ve 300 rpm olmak üzere üç ayrı karıştırma hızında hidroliz tepkimesi gerçekleştirilmiştir. 120 saat boyunca her 24 saatte bir ürün Naproksenin çözündüğü sulu fazdan ve girdi Naproksen metil esterin çözündüğü organik fazdan örnekler alınmıştır. Karıştırma hızının kalma süresi ile girdi ve ürünün enantiyomerik aşırılıkları ($\%ee_s$ ve $\%ee_p$), dönüşüm (%x) ve enantiyomerik oran (E) değerlerine etkisi Şekil 4.29-4.32'de verilmiştir.

Şekil 4.29'de görüldüğü gibi hidroliz ortamında farklı karıştırma hızları kullanıldığında $\%ee_s$ değeri kalma süresi ile artmakta, 48.saatten sonra değişmemekte ve $\%ee_s$ N=300 > 250 > 200 sırasıyla azalmaktadır. Şekil 4.30'da farklı karıştırma hızlarında $\%ee_p$ değerlerinin kalma süresiyle değişimleri görülmektedir. N=200 rpm'de $\%ee_p$ değeri 48. saate kadar artmış, sonra değişmemiştir. N=250 rpm değerinde 48.saatten sonra azalma gözlenmiştir. N=300 rpm değerinde ise $\%ee_p$ değeri 72. saate kadar artmış, daha sonra azalmıştır. Şekil 4.32'de görüldüğü gibi E değerleri N=300 >250>200 rpm sırasıyla azalmaktadır.

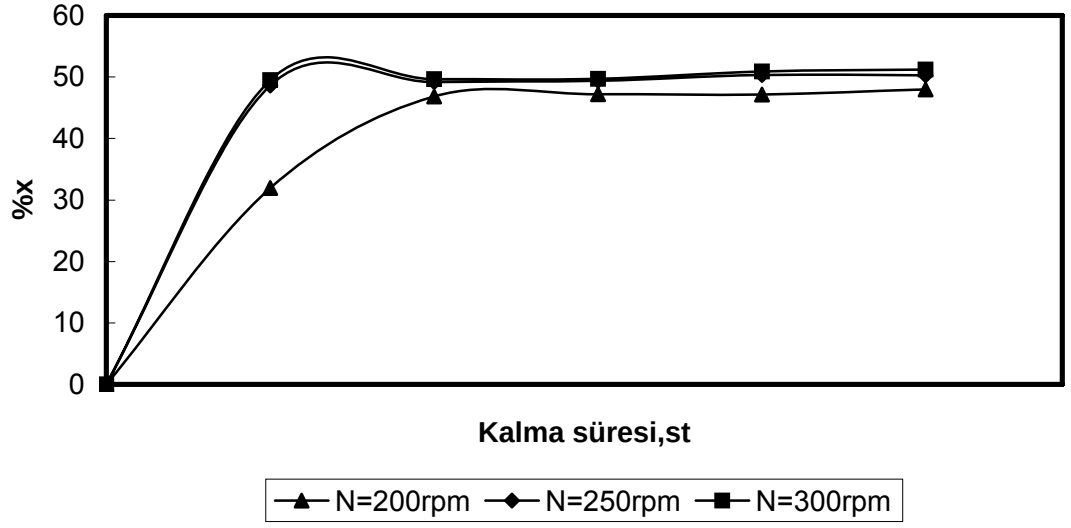
En yüksek değerler 120.saatin sonunda ee_s, ee_p, E ve x için sırasıyla %93.62 (N=250rpm), % 95.32 (N=250rpm), 122.34 (N=200rpm) ve %51.18 (N=300rpm) olarak gözlenmiştir.



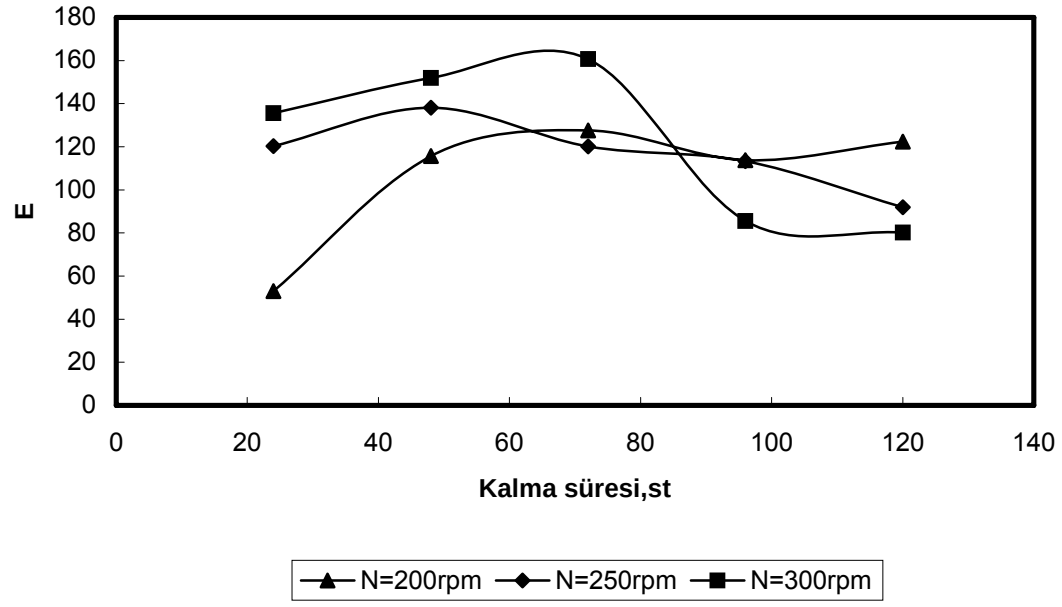
Şekil 4.29 Rasemik Naproksen metil esterin hidrolizinde karıştırma hızının substrat için enantiyomerik aşırılık değerine (%ee_s) etkisi
T/Ç(h/h)=2, T=37ºC, pH=7.5, çözücü=izooktan, Cso=0.034 M, C_{CRL}=0.04 mg ml^{-1}, A_{CRL}=0.2736U, C_{Po}=0.8815 mg protein ml^{-1}



Şekil 4.30 Rasemik Naproksen metil esterin hidrolizinde karıştırma hızının ürün için enantiyomerik aşırılık değerine (%ee_p) etkisi
T/Ç(h/h)=2, T=37ºC, pH=7.5, çözücü=izooktan, Cso=0.034 M, C_{CRL}=0.04 mg ml^{-1}, A_{CRL}=0.2736U, C_{Po}=0.8815 mg protein ml^{-1}



Şekil 4.31 Rasemik Naproksen metil esterin hidrolizinde karıştırma hızının dönüşüm (%x) değerine etkisi
T/Ç(h/h)=2, T=37ºC, pH=7.5, çözücü=izooktan, Cso=0.034 M, C_{CRL}=0.04 mg ml^{-1}, A_{CRL}=0.2736U, C_{Po}=0.8815 mg protein ml^{-1}



Şekil 4.32 Rasemik Naproksen metil esterin hidrolizinde karıştırma hızının enantiyomerik oran (E) üzerine etkisi
T/Ç(h/h)=2, T=37ºC, pH=7.5, çözücü=izooktan, Cso=0.034 M, C_{CRL}=0.04 mg ml^{-1}, A_{CRL}=0.2736U, C_{Po}=0.8815 mg protein ml^{-1}

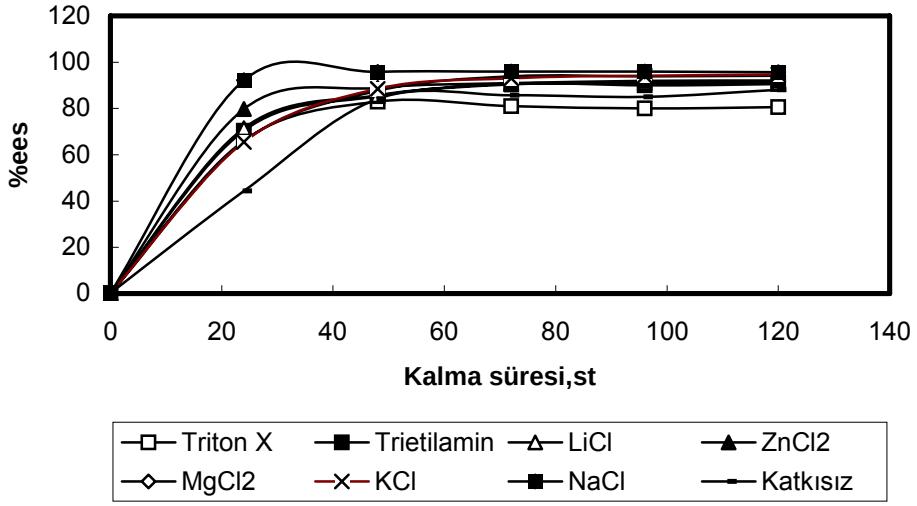
4.11 Katkı Maddelerinin S-Naproksen Üretimine Etkisi

Rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi bir denge tepkimesidir. Bu çalışmada, farklı katkı maddeleri kullanılarak CRL'nin kapağının açılması ve dengenin S-Naproksen yönüne kaydırılması amaçlanmıştır. Enantiyoseçimli hidroliz tepkimesinin girdisi izooktanda çözünmüş 0.034 M Naproksen metil ester, biyokatalizörü ise 0.01 M pH=7.5 fosfat tamponunda çözünmüş 0.04 mg/ml derişimindeki CRL'dir. Sıcaklık T=37°C, karıştırma hızı N=200 rpm, T/Ç==2 koşullarında; $6x10^{-5}$ mmol/ml sulu faz derişiminde tuzlar (NaCl, LiCl, KCl, $MgCl_2$, $ZnCl_2$), 1 µL/ml sulu faz derişiminde yüzey aktif madde (Triton-X 100) ve 1.17 µL/ml sulu faz derişiminde organik baz (trietilamin; TEA) katkı maddeleri olarak kullanılarak iki fazlı sistemde hidroliz tepkimesi gerçekleştirilmiştir. 120 saat boyunca her 24 saatte bir, ürün Naproksenin çözündüğü sulu fazdan ve girdi Naproksen metil esterin çözündüğü organik fazdan örnekler alınmıştır. Katkı maddelerinin kalma süresi ile girdi ve ürünün enantiyomerik aşırılıkları ($\%ee_s$ ve $\%ee_p$), dönüşüm (%x) ve enantiyomerik oran (E) değerlerine etkisi Şekil 4.33-4.36'de katkı maddesiz ortamla karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

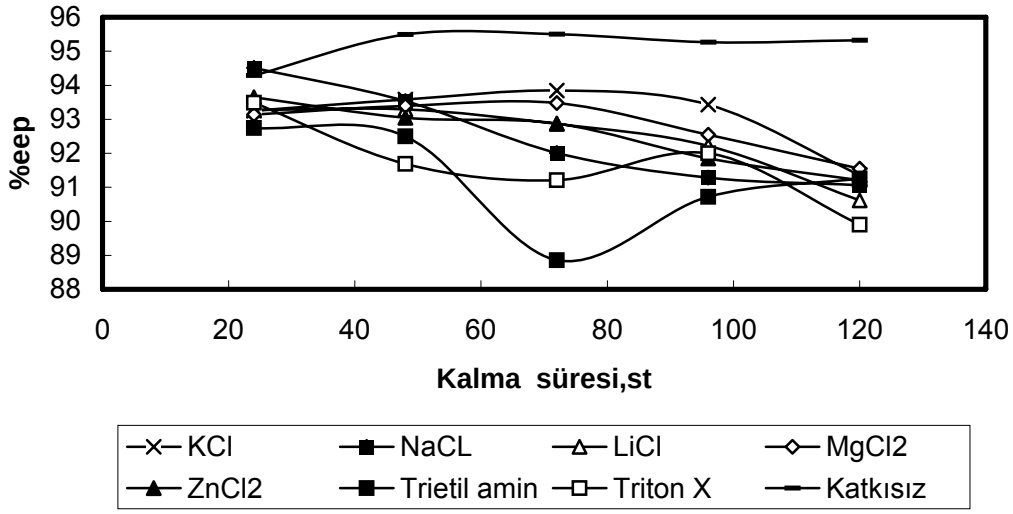
Şekil 4.33'de görüldüğü gibi hidroliz ortamında NaCl, LiCl, KCl, $MgCl_2$, $ZnCl_2$, Triton-X, TEA kullanıldığında $\%ee_s$ değeri kalma süresi ile önce artmakta, 48.saatten sonra ise değişmemektedir. $\%ee_s$; NaCl>$MgCl_2$ > $ZnCl_2$ > TEA = KCl = LiCl > Katkısız > Triton-X sırasıyla azalmaktadır. Naproksen metil esterin hidroliz tepkimesinde kullanılan katkı maddelerinin tümü (TritonX-100 hariç) girdi için enantiyoseçimlilik değerini artırmışlardır. Şekil 4.34'da kalma süresi ile $\%ee_p$ değişimi verilmiştir. Katkı maddesi olarak KCl, NaCl ve $ZnCl_2$ kullanıldığı zaman $\%ee_p$ değeri 72. saate kadar sabit kalmış, sonra azalmıştır. $MgCl_2$ kullanıldığında ise $\%ee_p$ değeri kalma süresi ile azalmıştır. Triton-X ve TEA katkı maddesi olarak kullanıldığı zaman $\%ee_p$ değerlerinin kalma süresi ile farklılık gösterdiği gözlenmiştir. $\%ee_p$; Katkısız> KCl > NaCl > LiCl > $ZnCl_2$ > $MgCl_2$ > Triton-X > TEA sırasıyla azalmaktadır. Naproksen metil esterin hidroliz tepkimesinde kullanılan katkı maddelerinin tümü, ürün için enantiyoseçimlilik değerini azaltmışlardır. Şekil 4.35'de görüldüğü gibi hidroliz ortamına NaCl, LiCl, KCl, $MgCl_2$, $ZnCl_2$, Triton-X, TEA eklendiğinde %x değeri kalma süresi ile artmakta,

48.saatten sonra ise değişmemektedir. %x; $MgCl_2$ > $ZnCl_2$ > TEA = KCl = LiCl > Katkısız > Triton-X sırasıyla azalmaktadır. Hidroliz tepkimesinde kullanılan katkı maddelerinin tümü (TritonX-100 hariç) dönüşümü artırmıştır. Şekil 4.36'de ise E değerinin kalma süresi ile değişimi verilmiştir. Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidroliz tepkimesinde ortama katkı maddesi ilavesinin enantiyomerik oran E değerini azalttığı gözlenmiştir.

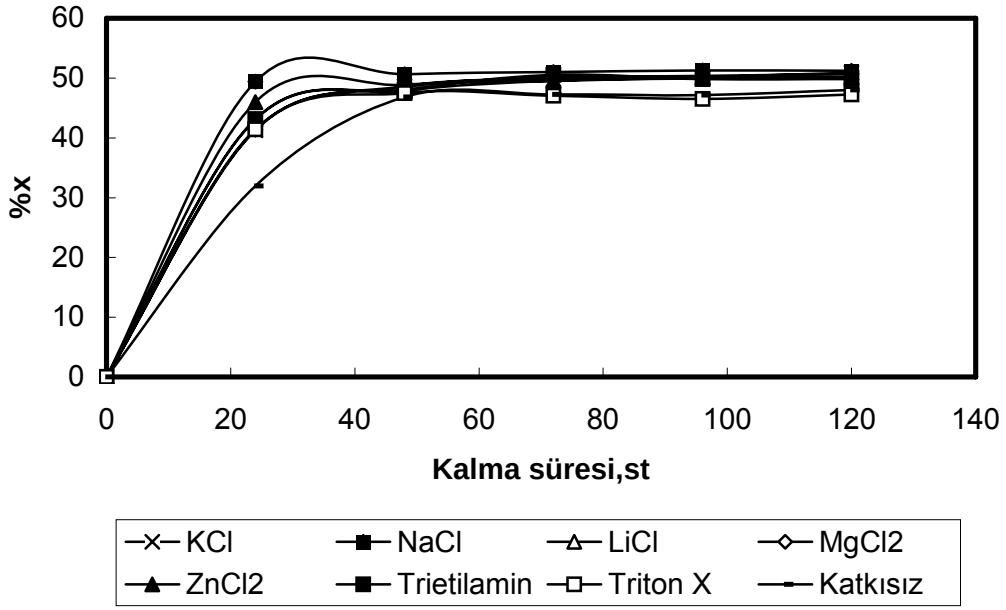
En yüksek ee_s, ee_p, E and x değerleri 120. saat sonunda sırasıyla 95.6% (NaCl), 95.32% (Katkısız), 122 (Katkısız), ve 51.22% (Katkısız) olarak elde edilmiştir.



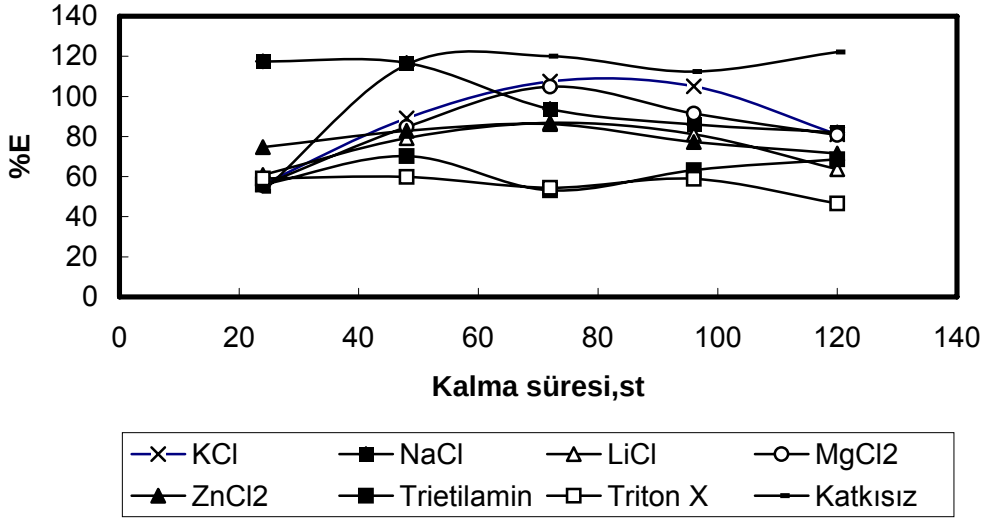
Şekil 4.33 Rasemik Naproksen metil esterin hidrolizinde katkı maddelerinin girdi için enantiyomerik aşırılık değerine (ee_s) etkisi
T=37ºC, N=200 rpm, pH=7.5, T/Ç=2, çözücü=izooktan, Cso=0.034M, C_{CRL}=0.04mg ml $^{-1}$, A_{CRL}=2.088U, C_{Po}=0.987 mg protein ml $^{-1}$



Şekil 4.34 Rasemik Naproksen metil esterin hidrolizinde katkı maddelerinin ürün için enantiyomerik aşırılık değerine (ee_p) etkisi
T=37ºC, N=200 rpm, pH=7.5, T/Ç=2, çözücü=izooktan,Cso=0.034M, C_{CRL}=0.04mg ml,$^{-1}$ A_{CRL}=2.088U, C_{Po}=0.987 mg protein ml $^{-1}$



Şekil 4.35 Rasemik Naproksen metil esterin hidrolizinde katkı maddelerinin dönüşüm değerine (%x) etkisi
T=37ºC, N=200 rpm, pH=7.5, T/Ç=2, çözücü=izooktan,Cso=0.034M, C_{CRL}=0.04mg ml,$^{-1}$ A_{CRL}=2.088U, C_{Po}=0.987 mg protein ml^{-1}



Şekil 4.36 Rasemik Naproksen metil esterin hidrolizinde katkı maddelerinin çözücünün enantiyomerik oran (E) üzerine etkisi
T=37ºC, N=200 rpm, pH=7.5, T/Ç=2, çözücü=izooktan,Cso=0.03 4M, C_{CRL}=0.04mg ml, $^{-1}$ A_{CRL}=2.088U, C_{Po}=0.987 mg protein ml^{-1}

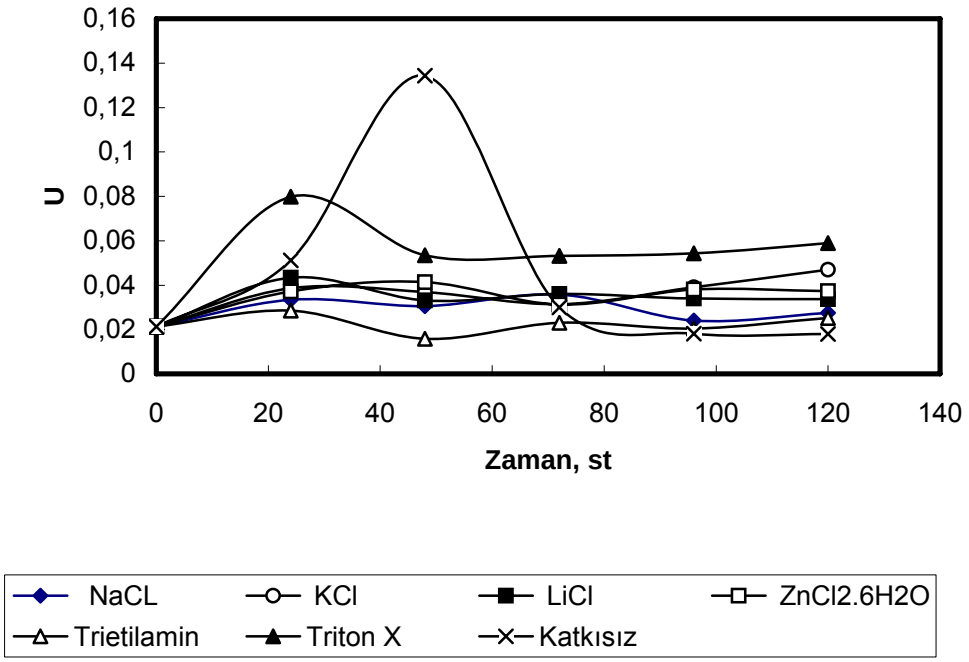
4.12 Katkı Maddelerinin CRL Aktivitesine Etkisi

Katkı maddesi ilave edilmiş sulu tampon fazı ve organik çözücü olarak izooktandan oluşan iki fazlı sistemde CRL'nin kararlılığını belirlemek amacıyla CRL'nin PNFA'ya karşı hidrolitik aktivitesinin zamanla değişimi incelenmiştir. Farklı katkı maddeleri ile (NaCl, LiCl, KCl, $MgCl_2$, $ZnCl_2$, TritonX-100, TEA), T/Ç=2, N=200 rpm ve T=25^oC koşullarında tampon fazdan 120 saat boyunca 24 saatte bir örnek alınmış ve bu örneklerin hidrolitik aktiviteleri Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi belirlenmiştir. Deneylerde katkı maddeleri farklı miktarlarda kullanılarak derişim etkisi de incelenmiştir (Çizelge 4.1). Sonuçlar katkı maddesi ilavesiz ortamla karşılaştırmalı olarak sırasıyla Şekil 4.37 ve 4.38'de verilmiştir.

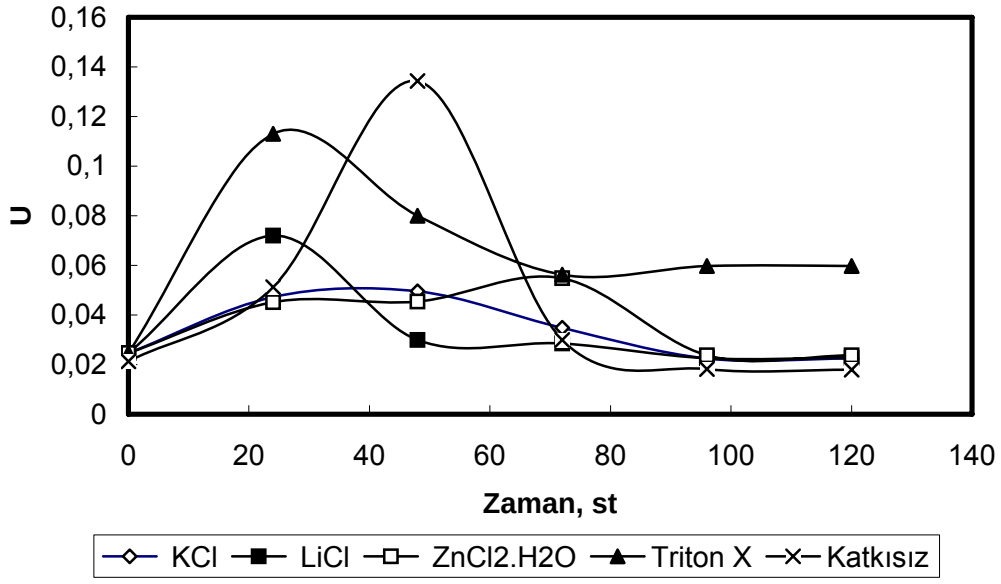
CRL enziminin PNFA'ya karşı hidrolitik aktivitesinin belirlenmesinde her katkı maddesinin düşük derişiminde ilavesinde elde edilen aktivite değerleri, yüksek derişimde katkı maddesi ilavesinde elde edilen değerlere göre daha yüksek gözlenmiştir. Her iki derişimde kullanılan katkı maddeleri için de enzim aktivitesi katkısız ortama göre daha düşük gözlenirken, enzim kararlılığınının katkı maddeleriyle arttığı gözlenmiştir. Aktivite değerleri düşük derişimdeki katkı maddeleri için Katkısız > Triton –X > KCl > $ZnCl_2$ > LiCl; yüksek derişimdeki derişimindeki katkı maddeleri için Katkısız > Triton –X > KCl ≅ $ZnCl_2$ > NaCl > TEA olarak elde edilmiştir.

Çizelge 4.1 Katkı maddelerinin CRL aktivitesine etkisi deneylerinde ortama eklenen madde miktarları

Katkı maddesi	Deney 1	Deney 2
KCl	$12x10^{-5}$ mmol/ml sulu faz	$6x10^{-5}$ mmol/ml sulu faz
LiCl	$12x10^{-5}$ mmol/ml sulu faz	6x10 mmol/ml
NaCl	$12x10^{-5}$ mmol/ml sulu faz	-
$MgCl_2$	$12x10^{-5}$ mmol/ml sulu faz	6x10
$ZnCl_2$	$12x10^{-5}$ mmol/ml sulu faz	6x10
Triton-X 100	0.5 µL/ml sulu faz	1 µL/ml
Trietilamin	1.17 µL/ml	-



Şekil 4.37 CRL'nin PNFA'ya karşı hidrolitik aktivite ve kararlılığına katkı maddesi etkisi (Deney 1)
T/Ç(v/v)=2, T=37°C, N=200 rpm, pH=7.5 (fosfat tamponu) C_{CRL}=0.02mg ml $^{-1}$ C_{Po}=0,897 mg protein ml $^{-1}$



Şekil 4.38 CRL'nin PNFA'ya karşı hidrolitik aktivite ve kararlılığına katkı maddesi etkisi (Deney 2)
T/Ç(v/v)=2, T=37°C, N=200 rpm, pH=7.5 (fosfat tamponu) C_{CRL}=0.02mg ml $^{-1}$ C_{Po}=0,897 mg protein ml $^{-1}$

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1 Çözücü Türünün S-Naproksen Üretimine Etkisi

Organik çözücü-tampon çözelti iki fazlı sistemde gerçekleşen rasemik Naproksen metil esterin CRL katalizli hidroliz tepkimesinde enzimin enantiyoseçimliliği üzerine çözücü türünün etkisi, izoooktan (log P=4.7), hekzan (log P=3.5), siklohekzan (log P=3.2) ve toluen (log P=2.5) kullanılarak incelenmiştir. Sonuçlara göre S-Naproksen üretimi tepkimesinde farklı log P değerlerine sahip çözücülerin CRL enantiyoseçimliliği üzerine farklı etkileri vardır. En yüksek log P değerine sahip olan izooktanda en yüksek dönüşüm ve seçimlilik gözlenirken, hekzana göre log P değeri daha düşük olan siklohekzanda daha yüksek enantiyoseçimlilik gözlenmiştir. Halkalı yapıda olan siklohekzan, düz zincir yapıda olan hekzana göre daha yüksek enantiyoseçimlilik sağlamıştır. Benzer sonuçlar (Shang and Hsu 2003)'un çalışmasında S-Naproksenden esterleşme tepkimesiyle hidroalkil oluşumunda da gözlenmiştir. Lipaz enziminin halkalı yapılı çözücülerde düz zincirli çözücülere göre daha fazla aktivite göstermesi ise Nakamura *et al*. (1995) tarafından açıklanmıştır. Halkalı yapıdaki çözücüler düz zincirlilere göre daha az yer kaplamaları sebebiyle enzim molekülleriyle daha kolay birleşebilmektedirler. Organik çözücüler, CRL'nin aktif konumunu kaplayan polipeptit yapıdaki kapağı açarak substratın aktif bölgeye girişini kolaylaştırırlar (Torres and Otero, 1996; Brocca *et al*., 2003). Bu çalışmada organik çözücülerin log P değerlerinin CRL enantiyoseçimliliğini açıklayabilmek için tek başlarına yeterli olmadığı görülmüştür. Buna ek olarak çözücü, enzim molekülünün konformasyonel yapısını değiştirmiş olabilir.

5.2 Tampon/Çözücü (T/Ç) Hacim Oranının S-Naproksen Üretimine Etkisi

Rasemik Naproksen metil esterin iki fazlı sistemde hidroliz tepkimesinde, tampon/çözücü hacim oranının 1, 1/2, 1/8 ve 2 değerlerinde, çözücü olarak izooktan kullanıldığı zaman enantiyomerik aşırılık, dönüşüm ve enantiyomerik oran değerlerinin kalma süresiyle değişimi incelenmiştir. En düşük $\%ee_s$, $\%ee_p$, %x ve E değerleri, tampon/çözücü hacim oranı 1/8 olduğunda gözlenmiştir. Sonuçlara göre iki fazlı

sistemde organik çözücü hacminin yüksek olması CRL enantiyoseçimliliğini azaltmaktadır. Organik çözücü kesrinin düşük olduğu durumda, yani T/Ç=1 ya da 2 değerinde, daha iyi dönüşüm ve enantiyomerik oran değerlerine ulaşılmıştır. Capiciani *et al*. (1998), (±) da metil 2-(2,4diklorofenoksi) propiyanatın hidroliz tepkimesinde yüksek organik çözücü kesrinin enantiyomerik oran değerini azalttığını gözlemişlerdir. Tampon ve çözücüden oluşan iki fazlı sistemde tepkime arayüzeyde gerçekleşmektedir. Arayüzeyde çözücü molekülleri sulu faz içerisinde damlacıklar halinde emülsiyon oluşturmuşlardır. 1/8 tampon/çözücü hacim oranı hariç diğer tüm T/Ç değerlerinde kalma süresiyle $\%ee_s$ değeri artmakta sonra sabit kalmaktadır. Çözücü hacmi artıp sulu faz oranı azaldığı zaman arayüzeydeki çözücü molekülleri biraraya gelerek yüzey alanlarını küçültürler. Enzimle temas eden çözücü yüzey alanının azalması $\%ee_s$ değerini azaltır. T/Ç hacim oranı -1/8 değeri hariç- kalma süresiyle $\%ee_p$ değerini fazla değiştirmemiştir. Tampon hacminin artması ise $\%ee_p$ değerini azaltmıştır. Arayüzeyde oluşan yan ürün olan metanolün sudaki çözünürlüğü yüksektir. Oluşan metanol, tampon hacmi yüksek olduğu zaman CRL'nin aktif konumlarına zarar verebilir.Tampon hacmi arttıkça $\%ee_p$'deki azalmanın bu sebeple olduğu düşünülmektedir.

5.3 Organik Çözücü Türünün ve Tampon/Çözücü Hacim Oranının CRL Aktivitesine Etkisi

Tampon/çözücü hacim oranının CRL aktivitesi ve kararlılığı üzerine etkisi, çözücü olarak izooktanın kullanıldığı ve CRL'nin tampon fazda çözündüğü iki fazlı sistemde incelenmiştir. CRL enzimin 120 saat süresince 200 rpm ve 37^oC, T/Ç=1/2 ve T/Ç=2 değerlerinde aktivite ve kararlılıklarındaki değişim Şekil 4.9 ve 4.10'da verilmiştir. Sulu faz hacmindeki artış enzim aktivitesini artırmakta; ancak enzim kararlılığını etkilememektedir. T/Ç=2 ve T/Ç=1/2 değerleri için enzim aktiviteleri izooktan > siklohekzan > hekzan > toluen sırasıyla azalmaktadır. Ortamda sadece fosfat tamponu olduğu zaman enzim aktivitesi iki fazlı sisteme göre daha düşüktür ve 96 saat sonunda aktivite sıfır olmuştur. Su-organik arayüzeyinin bulanmaması enzimin inaktif olmasına sebep olmaktadır (Faber 2000). Enzimin hidrolitik aktiviteleri çözücülerin log P değerleriyle uyuşmaktadır. Yüksek log P değerindeki çözücü enzimin bağlı suyuna en az zarar verdiği için enzim aktivitesi yüksek olmaktadır (Zaks and Russell 1988).

Sonuçlara göre iki fazlı sistemde organik çözücünün varlığı CRL aktivitesini artırırken, yüksek derişimde enzimi inhibe ya da denature ederek aktivitesini azaltmaktadır.

5.4 pH değerinin S-Naproksen Üretimine Etkisi

Rasemik Naproksen metil esterin hidroliz tepkimesinde tampon pH'ının 4, 6, 7.5 ve 9 değerlerinde çözücü olarak izooktan kullanıldığı zaman $\%ee_s$, $\%ee_p$, %x ve E değerlerinin kalma süresiyle değişimi incelenmiştir. Sonuçlara göre $\%ee_s$ ve %x değerleri asidik değerlerde, bazik değerlere göre daha yüksektir. Enantiyomerik oran E için de en iyi değer pH=4 olarak gözlenmiştir. Rasemik Naproksen metil esterin hidroliz tepkimesinde enantiyoseçimlilik ve aktivitedeki değişim üç farklı şekilde açıklanabilir: *i)* Enzimin iyonlaşması ortam pH'ıyla değişir. İyonlaşan enzimin aktivitesi ve enantiyoseçimliliği de değişir. pH değişimiyle CRL'nin konformasyonal yapısı değişir, böylece S-Naproksen metil ester CRL'nin aktif merkezine R- enantiyomerine göre daha kolay girebilir. *ii)* Farklı pH'larda tampon çözeltiler ile enzim etrafında elektrostatik etkileşimler yaratılarak enzimin aktif merkezini kaplayan kapak açılır. Enzim molekülünün çözücüyle etkileşimi kullanılan tampon çözeltinin türüne bağlıdır. *iii)* CRL enzimini çözmek için kullanılan farklı tampon çözeltiler; safsızlıkların uzaklaşmasına, CRL enziminin polipeptit kapağının açılmasına veya CRL'nin izoformlarının birbirine dönüşmesine neden olabilir. Sonuç olarak enzimin aktivitesi ve enantiyoseçimliliği değişebilir. Önemli olan başka bir nokta ise en yüksek dönüşümün ve enantiyoseçimliliğin gözlendiği pH=4 noktasının CRL'nin izoelektrik noktasına oldukça yakın bir değer olmasıdır (Benjamin and Pandey,1998). Enzimler izoelektrik noktalarında hidrofobik karakterde, yüksüzdürler ve arayüzeye adsorbalanırlar. Enzim molekülüyle çözücü arasındaki hidrofobik etkileşimler, enzim moleküllerinin birbirleriyle olan etkileşimlerinden daha kuvvetli olmaktadır. pH=4 noktası enzimin diğer pH değerlerinden daha yüksek tepkime hızının gözlendiği noktadır. pH=6 fosfat tamponuyla yapılan hidroliz tepkimesinde elde edilen $\%ee_s$,%x ve E değerleri pH=6 MES tamponunda elde edilenlerle kıyaslandığında pH=6 fosfat tamponunda biraz daha büyük olduğu belirlenmiştir. Enzimin MES tamponunda fosfat tamponuna kıyasla yeteri kadar iyonlaşamadığı düşünülmektedir.

5.5 Tampon pH'ının CRL Aktivitesine Etkisi

CRL enziminin PNPA'ya karşı aktivitesi T/Ç=2, T=37°C ve N=200 rpm koşullarında pH=4, 6, 7.5 ve 9 değerlerinde 120 saat boyunca incelenmiştir. Sonuçlara göre pH=6 MES tamponu kullanıldığı zaman gözlenen aktivite değerleri pH=6 fosfat tamponu kullanıldığı değere göre daha düşüktür. Aynı pH değerinde hazırlanan iki farklı tamponun CRL aktivitesini farklı şekilde etkilemesi, fosfat tamponunda bulunan iyonların CRL'nin aktivitesini artırdığını göstermektedirler. İyonlar amino asitlerin yan zincirlerinde değişime sebep olmaktadırlar; bu da protein molekülleri arasındaki etkileşimleri engellemektedir (Palmer 1991). Bu yüksek lisans çalışmasında da iyonların protein molekülleri arasındaki etkileşimi engellediği gözlenmiştir.

5.6 Sıcaklığın S-Naproksen Üretimine Etkisi

Çözücü olarak izoooktanın kullanıldığı rasemik Naproksen metil esterin hidroliz tepkimesinde kalma süreleriyle enantiyomerik aşırılık, dönüşümün ve enantiyomerik oranın değişimi T=30, 37, 45 ve 50°C sıcaklıklarda incelenmiştir. En yüksek $\%ee_s$, $\%ee_p$, %x ve E değerleri T=45°C'de gözlenmiş; en düşük değerler ise T=30°C'de elde edilmiştir. Benzer sonuçlar literatürde Cipiciani *et al*. (2001)'ın yaptıkları çalışmada da gözlenmiştir. Yazarlar, (+-)-4-asetoksi-[2,2] parasiklopandan oluşan rasemik karışımın kinetik rezolüsyonunda propan-2-ol muameleli CRL kullanarak sıcaklığın enantiyoseçimlilik üzerine etkisini incelemişler ve en düşük E değerini T= 30ºC değerinde 2, en yüksek E değerlerini ise T= 40, 50 ve 60 ºC için sırasıyla 28, 27 ve 26 olarak bulmuşlardır. Yüksek sıcaklıkta enzim enantiyoseçimliliğin ve dönüşüm değerlerinin yüksek gözlenme nedenleri başlıca şöyledir: *i)* Tepkime hız sabiti k ve kütle aktarım katsayısı k_La sıcaklıkla artmaktadır; 45ºC'de tepkime hızı yüksek ve kütle aktarım kısıtlaması az olmaktadır *ii)* Girdilerin ve ürünlerin yüksek sıcaklıkta çözünürlükleri artmaktadır *iii)*Yüksek sıcaklıkta sıvıların vizkozitesi azalmakta; böylelikle enzim ve substrat arasındaki etkileşim artmaktadır *iv)* Kontaminasyon sorunları azalmaktadır *v)* Sıcaklık, pH değerini de etkileyen bir parametredir. İyonlaşan enzimin konformasyonel yapısı da değişmektedir. Kapaklı yapıya sahip olan CRL enzimi T=45ºC'de daha çok iyonlaşabilmiş, kapaktaki proteinler izooktanla etkileşerek kapak açılmış ve substrat molekülleri CRL'nin katalitik bölgesine (Ser, Glu, His)

ulaşabilmiştir. İki fazlı sistemde tepkime arayüzeyine aktarılan substrat enzimle tepkimeye girmektedir. Sıcaklıkla artan tepkime hızı sonucunda $\%ee_s$, $\%ee_p$ ve %x değerleri artmıştır. T=50ºC sıcaklığında bu değerlerdeki azalmanın ise enzimin protein yapısındaki bozulmalardan kaynaklandığı düşünülmektedir**.**

5.7 Sıcaklığın CRL Aktivitesine Etkisi

CRL enziminin PNPA'ya karşı aktivitesi T/Ç=2 oranında T=30, 37, 45 ve 50°C sıcaklıklarda N=200 rpm karıştırma hızında, 120 saat boyunca incelenmiş ve çalışılan iki fazlı sistemde tüm sıcaklık değerlerinde CRL'nin kararsız olduğu gözlenmiştir. 37°C'de CRL'nin aktif konumlarının diğer sıcaklıklardaki kadar bozulmadığı düşünülmektedir. En yüksek aktivite 37°C değerinde gözlenirken, en yüksek enzim enantiyoseçimliliği ise 45°C'de gözlenmiştir. Aktivite ve hidroliz tepkimesi koşullarının aynı olmadığı için en yüksek aktivite ve enantiyoseçimliğin gözlendiği sıcaklıkları da farklıdır. Enzimin 45°C'de yeteri kadar iyonlaşamadığı, CRL kapağının yeteri kadar açılamadığı ve enzimin aktivitesini gösteremediği düşünülmektedir. 50°C'de 24 saatin sonunda CRL aktivitesinin birden arttığı sonra aniden sıfır olduğu gözlenmektedir. Bu sıcaklıkta CRL'nin aktif konumları zarar görmüş ve enzim aktivitesini kaybetmiştir.

5.8 Substrat Derişiminin S-Naproksen Üretimine Etkisi

CRL katalizli enantiyoseçimli hidroliz tepkimesinin girdisi olan rasemik Naproksen metil esterin 5, 7.5, 10 ve 15 gdm^{-3} derişimlerinde enantioseçimlilik ve dönüşüm incelenmiştir. En yüksek $\%ee_s$, $\%ee_p$, %x ve E değerleri 10 gdm^{-3}değerinde gözlenirken, en düşük değerler 5 gdm^{-3} değerinde elde edilmiştir. Substrat derişimi tepkime hızını etkileyen önemli bir parametredir. Substrat derişimi arttıkça dönüşüm değerlerinin artması da beklenen bir sonuçtur. Ancak bu çalışmada rasemik Naproksen metil esterin yüksek derişiminde (15 gdm^{-3}) ortamda fazla miktarda oluşan metanolün inhibisyon yarattığı düşünülmektedir. İnhibisyon sonucu zarar gören aktif konumlardan dolayı $\%ee_s$, $\%ee_p$, %x ve E değerlerinin düşük olduğu düşünülmektedir. Düşük derişimde substrat kullanıldığında ise inhibisyon az olmasına rağmen $\%ee_s$, $\%ee_p$, %x ve E değerlerinin düşük olması da beklenen bir sonuçtur. Literatürde rasemik Naproksen

metil esterin enantiyoseçimli hidroliz tepkimesinde substrat derişiminin etkisini Xin *et al*. (1999) sürekli bir sistemde incelenmiş ve metanol inhibisyonunun varlığı bu çalışmada da ortaya çıkmıştır. Aynı çalışmada substrat derişimi arttıkça % dönüşümde azalma gözlenmiştir. Dönüşüm değerindeki bu azalmanın hidroliz tepkimesi sonucu oluşan S-Naproksen ya da metanolün CRL enzimini inhibe etmesinin sonucu olduğu düşünülmektedir**.**

5.9 CRL Derişiminin S-Naproksen Üretimine Etkisi

Enzim derişiminin, rasemik Naproksen metil esterin hidroliz tepkimesindeki enantiyoseçimliliğe etkisi dört farklı derişimde hazırlanmış olan (C_{Eo}= 0.01, 0.02, 0,04 ve 0,06 g ml^{-1}) CRL kullanılarak incelenmiştir. $\%ee_s$ en yüksek 0.06 g ml^{-1} derişiminde, en düşük ise 0.01 g ml^{-1} değerinde gözlenmiştir. Michaelis-Menten eşitliğine göre tepkime hızı enzim derişimi ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Enzim derişimi arttıkça aktif konum sayısı artmakta ve S-Naproksen metil esterin büyük bir kısmı ürüne dönüşmektedir. Enzim derişimi azaldıkça da enzimin aktif konum sayısı azalmakta tepkimeye giren S-Naproksen metil ester ve R-Naproksen metil ester derişimi azaldığı için $\%ee_s$ değerinin de azaldığı düşünülmektedir. $\%ee_p$ değerleri ise CRL'nin düşük derişim değerlerinde (0.01, 0.02 g ml^{-1}) yüksek, yüksek derişim değerlerinde (0.04 ve 0.06 g ml^{-1}) ise düşük olarak gözlenmiştir. Yüksek derişimde CRL kullanıldığıda enzim önce S-Naproksen metil esteri sonra R Naproksen metil esteri de dönüştürmüştür. İki enantiyomer de ürüne dönüşünce $\%ee_p$ değerinde azalma olmaktadır.

5.10 Karıştırma Hızının S-Naproksen Üretimine Etkisi

Karıştırma hızının, rasemik Naproksen metil esterin hidroliz tepkimesindeki enantiyoseçimliliğe etkisi N=200, 250 ve 300 rpm olmak üzere üç farklı karıştırma hızında incelenmiştir. Girdilerin organik fazda, ürünlerin sulu fazda çözündüğü iki fazlı sistemde arayüzeyde gerçekleşen hidroliz tepkimesi kütle aktarım kısıtlamalı olabilir. Karıştırma hızının artmasına bağlı olarak kütle aktarım kısıtlamalarının azalmasıyla dönüşüm ve enantiyoseçimlilik artmıştır. En yüksek değerler N=300 rpm'de, en düşük

değerler ise N=200 rpm'de gözlenmiştir. Etkili karıştırma gerçekleştiğinde oluşan ürünlerin sulu faza daha kolay geçtiği ve serbest CRL'nin aktif konumlarının arttığı düşünülmektedir.

5.11 Katkı Maddelerinin S-Naproksen Üretimine Etkisi

Katkı maddelerinin rasemik Naproksen metil esterin CRL katalizörlüğündeki hidroliz tepkimesinde enantiyomerik aşırılıklara, dönüşüme ve enantiyomerik orana etkisi çeşitli tuzlar (NaCl, LiCl, KCl, $MgCl_2$ ve $ZnCl_2$), bir yüzey aktif madde (TritonX-100) ve bir organik baz (TEA) kullanılarak incelenmiştir. Hidroliz ortamına tuz ilavesi enzimin organik ortama adaptasyonunu artıran önemli bir enzim modifikasyon yöntemidir (Yu *et al*. 2005). Alkali ve toprak alkali metallerin tuzlarının iki ayrı etkisi vardır**:** *i)* İyonlar, CRL kapağında bulunan aminoasitlerle elektrostatik olarak etkileşip kapağın açılmasını sağlayarak substratının aktif bölgeye taşınımını kolaylaştırırlar *ii)* CRL'nin konformasyonel ve ısıl kararlılıklarını artırırlar.

En yüksek $\%ee_s$ değeri NaCl kullanıldığı zaman elde edilmiştir. Katkı maddelerinin yapılarıyla sağladıkları $\%ee_s$ arasında bir bağlantı bulunamamıştır. CRL enziminin yapısında bulunan hidrofobik ve apolar gruplar sebebiyle tampondaki çözünürlükleri düşük olmaktadır. Enzim molekülünün agregasyona uğraması sonucu enzim ile substrat arasındaki etkileşimin azalabileceği düşünülmektedir. Bu mekanizma çok açık olmamakla birlikte; Na^+ iyonunun kimyasal olarak daha aktif olduğu, substratla CRL arasındaki etkileşimi artırabileceği + ve – yüklere sahip iyonların CRL kapağının dış yüzeyinde bulunan yüklü amino asitlerle elektrostatik etkileşimler yaparak kapağı farklı şekillerde açabileceği düşünülmektedir. Katkı maddesi ilavesi $\%ee_s$ değerini katkı maddesi ilavesiz duruma göre artırırken, $\%ee_p$ değerini azaltmıştır. En düşük $\%ee_s$, $\%ee_p$, % x ve E değerleri Triton X-100 kullanıldığı zaman gözlenmiştir. İyonik olmayan bir yüzey aktif madde olan Triton X-100 enzim moleküllerinin arayüzeyde birleşmesini önleyici özelliğe sahiptir. Triton X-100'ün arayüzey alanını artırarak $\%ee_s$ değerini artırması beklenirken, CRL'nin yapısını bozarak tepkimeyi inhibe ettiği düşünülmektedir. Ortama organik bir baz olan TEA eklendiği zaman $\%ee_s$ ve %x değerlerinin arttığı gözlenmiştir. Ürün olarak oluşan ve asit yapıda olan Naproksenin,

TEA ile etkileşerek tepkime dengesini sağa kaydırdığı düşünülmektedir. Bu çalışmada katkı maddeleri ilavesiyle E değeri değişmezken Okomato *et al.* (2000) CRL katalizörlüğünde rasemik bütil 2-(4 sübstite fenoksi) propiyonatların hidroliz tepkimesinin su ve metal iyonları içeren çözücüler varlığında enantiyoseçimliliğini inceledikleri çalışmalarında katkı maddelerinin E değerini artırdığını gözlemişlerdir. Bu çalışmada elde edilen sonuçların Okomato *et al*. (2000) ile benzer olmama sebebinin farklı girdi kullanılmasının olduğu düşünülmektedir.

5.12 Katkı Maddelerinin CRL Aktivitesine Etkisi

Enzim kararlılığı, enzimin zamanla aktivitesini koruma kapasitesi olarak tanımlanmaktadır. Birçok biyoproseste enzim kararlılığı kısıtlayıcı parametre olmaktadır. Reaksiyon ortamının sıcaklık, pH değerleri ya da ortama eklenen katkı maddeleri enzim kararlılığını etkileyen faktörlerdir.

CRL'nin PNFA'ya karşı hidrolitik aktivite ve kararlılığına katkı maddesi olarak tuzların etkisi yüksek ve düşük derişimlerde incelenmiş ve düşük derişimlerde enzim aktivitesinin daha yüksek olduğu gözlenirken, yüksek derişimde enzim kararlılığı daha fazla gözlenmiştir. Tuzların ortamda enzim moleküllerinin dağılmasını sağlayıp, kütle aktarımını da kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Bununla birlikte ortamda bulunan tuz miktarı arttığı zaman CRL aktivitesi azalmıştır; çünkü fazla tuzun lipaz yüzeyini kapladığı ve substratla (PNFA) temasını önlediği düşünülmektedir. Ayrıca katkı maddelerinin CRL aktivitesini artırmazken, kararlılığını artırdığı belirlenmiştir. En düşük enantiyoseçimliliği veren Triton-X, en yüksek aktiviteyi sağlayan katkı maddesi olmuştur. Noniyonik yapıda olan Triton-X'in enzim yüzeyini kaplamadığı ve substratla enzim temasının engellenmediği düşünülmektedir. Sonuç olarak tüm katkı maddeleri enzimin konformasyonel yapısını korumuşlar ve kararlılığını artırmışlardır.

KAYNAKLAR

Ahuja, S. 1997. Chiral Seperations: Application and Technology, American Chemical Society , Washington.

Benjamin, S., Pandey, A. 1998. *Candida rugosa* lipase molecular biology and versatiliyt in biotechnology, 14;1069-1087.

Brady, D., Steenkamp, L and Skein, E. 2004. Optimization of the enantioselective biocatalytic hydrolysis of naproxen ethyl ester using ChiroCLEC-CR biocataytic hydrolsis. Enz.Microb.Technol, 34; 283-291.

Brocca, S., Secundo,F., Ossola,M., Alberghina, L., Carrea, G. and Lotti, M. 2003. Sequence of the lid affects activity and specificity of *Candida rugosa* lipase isoenzymes.Protein Sci, 12, 2312-2319.

Butler, L. 1979. Enzymes in non – aqueous Solvents. Enzyme Microbial Technol, 1; 253-259.

Cabusas, M. E. Y. 1998. Chiral seperations on HPLC derivatized polysaccharide CSPs: temperature, mobile phase and chiral ecognition mechnanism studies. 64-65, Blacksburg, Virginia.

Cernia, E., Deflini, M., Cocco, E. D., Palocci, C and Soro, S. 2002. Investigation of lipase catalysed hydrolysis of naproxen metil ester: use of NMR spectroscpoy methods to study substrate–enzyme interaction. Bioorganic Chemistry, 30; 276-284.

Chae, H.J., Yoo, Y.J. 1997. Mathematical analysis of an enzymatic reaction in an aqueous /organic two-phase system: Tryrosinase –catalysed hydroxylation of phenol. J.Chem.Technol.Biotechnol, 70; 163-170.

Chang, C.S., Tsai, S.W. and Lin, C.N. 1998. Enzymatic resolution of (RS)-2arylpropionic acid thioesters by *Candida rugosa* lipase-catalysed thioesterification or hydrolysis in organic solvents. Tetrahedron Asymmetry, 9; 2799-2807.

Chang, C-S., Tsai,S-W. and Kuo, J. 1999. Lipase-catalyzed dynamic resolution of naproxen 2,2,2-trifluoroethyl thioester by hydrolysis in isooctane. Biotechnol.Bioeng, 64; 120-126.

Cipiciani, A., Cittadini, M. and Fringuelli, F. 1998. Improving the enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase in the kinetic resolution of racemic methyl 2-(2,4-dichlorophenoxy) propionate. Tetrahedron Asymmetry, 54; 7883-7890.

Cipiciani, A., Bellezza, F., Fringuelli, F. and Stillitano, M. 1999. Enantioselectivity of alcohol-treated *Candida rugosa* lipase in the kinetic resolution of racemic methyl 2-aryloxypropionates in water and aqueous organic media. Tetrahedron Asymmetry, 10; 4599-4605.

Cipiciani, A., Bellezza, F., Fringuelli, F. and Silvestrini, M.G.2001. Influence of pH and temparature on the enantioselectivity of propan-2-ol-treated *Candida rugosa* lıpase ın the kınetıc resolution of (-+)-4-acetoxy-(2,2)-paracyclophane.Tetrahedron Asymmetry, 12; 2277-2281.

Cui, Y., Wei, D and Yu, J. 1997. Lipase catalysed esterification in organic solvent to resolve rasemic naproxen. Biotechnol. Letters, 19(9); 865-868.

DeRuiter, J. 2000. Non-Steroidal Antiinflamatory Drugs (NSAIDS), Principles of Drug Action, 2; 1-19.

Duhalt, R.V., Fedorak, P.M., Westlake, W.S. 1992. Role of enzyme hydrophobicity in biocatalysis in organic solvents. Enzyme Microbial Technol, 14; 837-841

Faber, K 2000. Biotransformations in Organic Chemistry. Springer, 29-45.

Garcia, M.E., Gonzalez, M.J., 1995. Enzyme catalysisi in organic solvents: a Promising field for optical biosensing. Talanta, 42; 1763-1773.

Goto, M., Ogawa, H., Isobe, T., Kawasaki, M and Kometani, T. 2003. 2-Propanol treatment of *Candida rugosa* lipase and its hydrolytic activity. J. Mol. Catal. B: Enzymatic, 24-25; 67-73.

James, J., Lakshmit, B.S and Raviprasad, V., 2003. Insıghts from molecular dynamics into pH-dependent enantioselective hydrolysis of ibu profen esters by *Candida rugosa* lipase. Protein Enginering, 16; 1017-1024.

Kayaalp, S.O. 1992. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 6.Baskı, Vol: 2 2071-2072.

Khmelnitsky, Y., Levashov, A and Martinek, K. 1988. Engineering biocatalytic systems in organic media with low water content. Enzyme Microbial Technol, 10; 710-721.

Krishna, S. H. 2002. Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media. Biotechnology Advances, 20; 239-267.

Laane, C., Boeren, S., Vos, K and Veeger, C. 1987. Rules for Optimization of Biocatalysis in Organic Solvents, Biotechnology and Bioengineering, 81-87.

Lee, E. G., Won, H.S and Chung, B. H. 2001. Enantioselective hydrolysis of racemic naproxen methyl ester by two-step acetone –treated Candida rugosa lipase. Process Biochemistry, 37; 293-298.

Liu,Y-Y., Xu, J-H., Xu, Q-G. and Hu,Y. 1999. Significant enhancement of lipase enantioselectivity toward (S)-Ketoprofen ester at pH=2. Biotechnology Lett. 21; 143-146.

Long, W.S., Kow, C.P., Kamaruddin, H. and Bhatia, S. 2005. Comparison of kinetic resolution between two racemic ibuprofen esters in an enzyme membrane reactor. Proc. Biochem, 40; 2417-2425.

Lowry, O.H., Rosenbourg, N.T., Farr, A.,L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol.Chem, 93; 265-275.

Nakamura, K., Kinoshita, M and Ohno, A, 1995. Structure of solvent affects enantioselectivity of lipase-catalysed transesterification. Tetrahedron Asymmetry, 51; 8799-8808.

Ogino, H., Ishikawa, H., 2000. Enzymes which a stable in the presence of organic solvents. Journal of Bioscience and Bioengineering, 91; 109-116.

Okomato, T., Ueji, S. 2000. A new metod for ımproving the enantioselectivity of lipase-catalysed hydrolysis in organic solvent containing a small amount of water in the presence of metal ıons. Biotechnology Letters, 22;1169-1171.

Özcan. A. 2003. Enantiyomerik saflıkta kiral bileşikler için üretim prosesleri. Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Y.Lisans Semineri, Ankara

Palmer, T. 1991. Understanding Enzymes. 3rd ed., Ellis Horwood, London.

Rakels, J.L.L., Straathof, A.J.J.and Heijnes J.J. 1994. Improvement of enantioselective enzymatic ester hydrolysis in organic solvents.Tetrahedron Asymmetry, 5; 93-100

Sakai,T., Kishimoto,T., Tanaka,Y., Ema,T and Utaka, M. 1998. Low-temperature methods for enhancement of enantioselectivity in the lipase-catalysed kinetic resolutions of solketal and some chiral alcohols. Tetrahedron Letters.39; 7881-7884.

Secundo, F., Carrea, G., Tarabiono, C and Brocca, S. 2003. Activity and enantioselectivity of wildtype and lid mutated *Candida rugo*sa lipase ısoform 1 in organic solvents. Biotechnology and Bioengineering, 86;237-240.

Selek, G.A., Chaudhuri, J.B. 1999. Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles. 25; 471-482.

Shang, C-S. and Hsu, C-S. 2003. Lipase-catalyzed enantioselective esterification of (S)-naproxen hydroxyalkyl ester in organic media. Biotechnol. Lett, 25; 413-416.

Straathof, A.J.J. 2003. Enzymatic catalysis via liquid –liquid interfaces. Biotechnology and Bioengineering, 83; 371-375.

Sukan Ş.S., Sukan F.V., Lilly M.D., Duarte J.C., Federici F., Tramper J and Freeman A., 1995. Downstream Processes in Bıotechnology; 324.

Tejo, B. A., Salleh, A.B and Pleiss, J.2004. Structure and dynamics of *Candida rugosa* lipase: The role of organic solvent. J. Mol. Model, 10;358-366.

Tezcan, N., Tarımcı, N.1990. Studies on the commercial naproxen tablets in turkish drug market. Journal Faculty Pharmacy, 20; 1-2

Torres, C. and Otero, C. 1996. Influence of the organic solvents on the activity in water and the conformation of *Candida rugosa* lipase: Description of a lipase-activating pre-treatment. Enzyme and Microbial Technol, 19; 594-600.

Tsuzuki, W., Suziki, T. 1991. Reactive properties of the organic solvent-soluble lipase. Biochimica et Biophysica Acta, 1083; 201-206

Wu, J-Y. and S-W, Liu. 2000. Influence of alcohol concentration on lipase-catalyzed enantioselective esterification of racemic naproxen in isooctane: under controlled water activity. Enzyme and Microbial Technol, 26; 124-130.

Xin, J.Y., Chen, X.H., Wang, L.L and Xu Y. 1999. Improvement of the enantioselectivity of lipase–catalysed naproxen–ester hydrolysis in organic solvent. Enzyme Microbial Technol, 26; 137-141.

Xin, J.Y., Li S.,Wang, L.L. 1999. Enzymatic resolution of (S)-(+)- Naproxen in a trapped aqueous –organic solvent biphase continuous reactor. Biotechnology and Bioengineering, 68; 2000.

Xu,Y., Chen,J., Xin, J., Li,S., Xia,C. and Cui,J. 2001. Efficient microbial elimination of methanol inhibition for Naproxen resolution by a lipase. Biotechnol. Lett. 23, 1975-1979.

Yu, H.W., Chen, H.Yang Y.Y and Ching C.B. 2005. Effects of salts on activity, stability and enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase in isooctane. Journal of Molecular Catalysıs, 35;28-32.

Zaks, A., Russell, A.J. 1988. Enzymes in organic solvents : Properties and Applications, 8; 259-270.

Wu, J.C., Song.B.D., Xing, A.H., Hayashi, Y and Wang S.C.2002. Esterification reactions catalysed by surfactant-coated *Candida Rugosa* lipase in organic solvents. Process Biochemistry, 37; 1229-1233.

http://www.hospprac t.com Erişim Tarihi:10/10/2005

http://www.ttb.org.tr Erişim Tarihi:10/10/2005

EKLER

EK1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal ve Biyokimyasal Maddeler

EK2 PNF Kalibrasyon Grafiği

EK3 Örnek Aktivite Hesabı

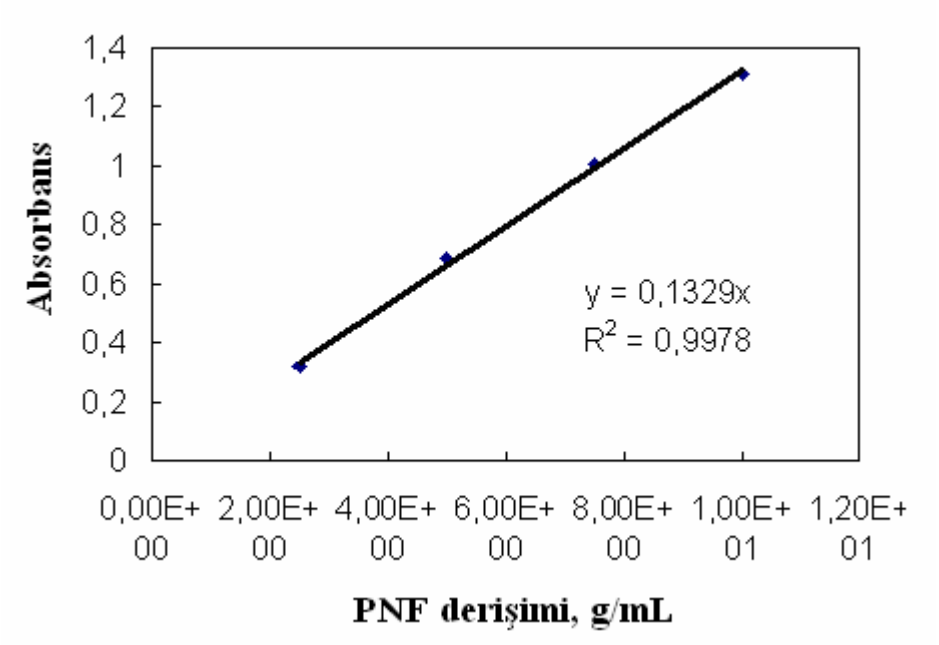
EK4 BSA Kalibrasyon Grafiği

EK5 Örnek HPLC Kromotogramları

EK 1. DENEYSEL ÇALIŞMALARDA KULLANILAN KİMYASAL VE BİYOKİMYASAL MADDELER

Kimyasal/Biyokimyasal	*Firma*	*Katalog No*
Amonyum asetat	Merck	1,01115,1000
Asetik asit	Merck	1,00056,2500
Asetonitril (LC)	Merck	1,00030,2500
BSA	Sigma	Lot 129H1423
CRL	Sigma	Lot 052K1692
Etanol	Merck	1,11727,2500
Folin fenol reaktifi	Sigma	F-9252
n-Hekzan (LC)	Merck	1,04391,2500
Hidroklorik asit	Merck	1,00314,2500
İzooktan (LC)	Merck	1,04717,1000
Lityum klorür	Merck	MR105679
Magnezyum klorür	Fluka	04717,1000
MES	Sigma	M3671-50G
Metanol (LC)	Merck	1,06007,2500
P-Nitrofenol	Merck	1,06798,0100
P-Nitrofenil asetat	Sigma	N8130-5G
2-Propanol (LC)	Merck	1,01040,2500
S-Naproksen	Aldrich	28,478-5
Sodyum bikarbonat	Sigma	S-5761
Sodyum hidroksit	Merck	1,06462,1000
Siklohekzan	Merck	1,02832,2500
Sodyum klorür	Scharlau	SO0227
Sodyum bikarbonat	Merck	MR 106329
Sodyum potasyum tartarat	Merck	8085
Sülfürik asit	Merck	1,00713,2500
Trietilamin	Merck	8,08352,2500
Tris-HCl	Sigma	T-3253
Triton X-100	Sigma	SIT8787
Trisma-Base	Merck	T-6066

EK 2. PNF KALİBRASYON GRAFİĞİ



EK 3. ÖRNEK AKTİVİTE HESABI

Bir ünite enzim (U), 1 dakikada 1µmol PNF üretimi için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

Aktivite (U) değeri $U=9,12*\Delta C/\Delta t$ eşitliğinden hesaplanmaktadır.

Lambert Beer Kanunu:

$A= \varepsilon bC$

$\varepsilon=13290$ L/mol cm (EK 2)

b= 1 cm

Aktivite tayininde kullanılan toplam enzim hacmi: 2.02 ml

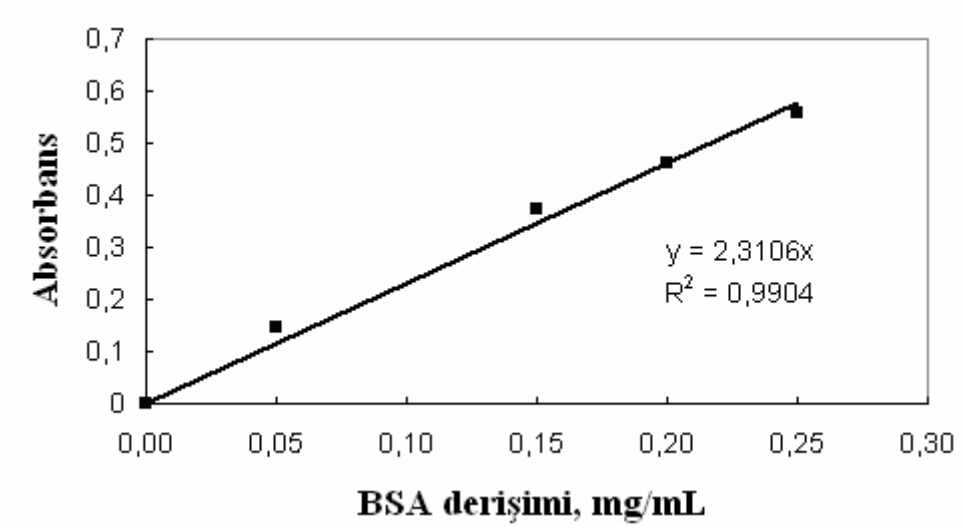
$\Delta A/\Delta t=13290L/(mol\ cm)*1cm*(1mol/10^6\mu mol)*(10^3mL/1L)(2.02mL)\ \Delta C/\Delta t$

$\Delta A/\Delta t=6.579\Delta C/(\mu mol*\Delta t)$

$U=0.1519\Delta A/\Delta t$ (s)

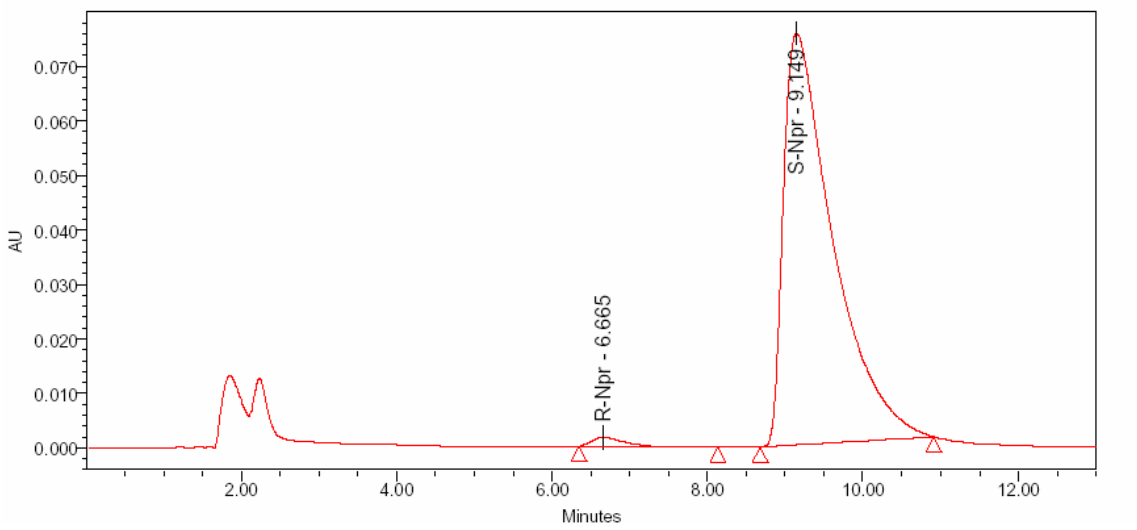
$U=9,12\ \Delta A/\Delta t$ (dak) elde edilir.

EK 4. BSA KALİBRASYON GRAFİĞİ



EK 5. ÖRNEK HPLC KROMOTOGRAMLARI

A) Sulu tampon fazda rasemik Naproksenin HPLC Analizi



	Name	RT	Area	% Area	Height (µV)
1	R-Npr	6.665	47459	1.40	1624
2	S-Npr	9.149	3332828	98.60	75553

Analiz Koşulları:

HPLC Sistemi : Water Alliance 2690/5 HPLC

Kolon : Chirex R-NGLY&DNB

Taşıyıcı Faz : 100 mM Amomyum asetat içeren metanol

UV Dedektör Dalga Boyu : 254 nm

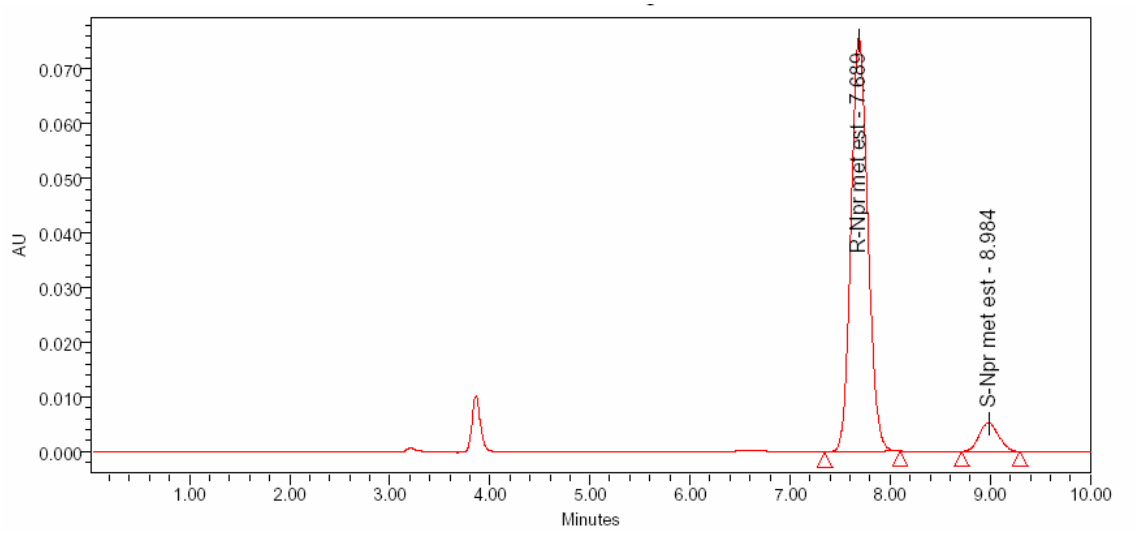
Enjeksiyon ve Kolon Sıcaklığı : 25°C

Enjeksiyon Hacmi : 25µL

Analiz Süresi : 12dk

EK 5. (devam)

B) Organik fazda rasemik Naproksen Metil Esterin HPLC Analizi



	Name	RT	Area	Height	% Area
1	R-Npr met est	7.689	885464	75628	92.67
2	S-Npr met est	8.984	70076	5197	7.33

Analiz Koşulları:

HPLC Sistemi : Water Alliance 2690/5 HPLC

Kolon : Chiralcel OD-H

Taşıyıcı Faz : Hekzan :2-Propanol (% h/h 98:2)

UV Dedektör Dalga Boyu : 254 nm

Enjeksiyon ve Kolon Sıcaklığı: 25°C

Enjeksiyon Hacmi : 25µL

Analiz Süresi :10 dk

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :Deniz Mutlu

Doğum Yeri :Bochum/Almanya

Doğum Tarihi :09/12/1979

Medeni Hali :Bekar

Yabancı Dili :İngilizce

Eğitim Durumu

Lise :Melikgazi Lisesi

Lisans :Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü 2002

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü 2006

Çalıştığı Kurum ve Yıl: Novagenix Bio Analitik İlaç ARGE Merkezi 2005-devam ediyorum

Yayınları

Takaç,S, Ünlü,A.E., Bakkal,M., Mutlu,D., **7-10/9/2004.** Lipaz Biyokatalizörlüğünde Enantiyoseçimli Hidroliz İle S-Naproksen Üretim Tepkimesinin Kinetiği, **6.Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi Bildiri Özetleri Kitabı**, RM11.

Takaç,S., Mutlu, D., 21-24/8/2005. Effect of organic solvent type on the enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase in the hydrolysis of racemic Naproxen methyl ester in biphasic reaction system, 12th European Congress on Biotechnology, Copenhagen, **Journal of Biotechnology** 118: S132-S132 Suppl. 1 AUG 2005 *(SCI)*