



**BOX-BEHNKEN TASARIM TABANLI OPTİMİZASYON
STRATEJİSİ KULLANILARAK “*Lactobacillus*
Senmaizuke” BİYOKATALİZÖRÜ İLE 4-METOKSİ
ASETOFENON'UN ASİMETRİK İNDİRGENMESİ**

Mervenur KAVİ

**Yüksek Lisans Tezi
Gıda Mühendisliği
Anabilim Dalı
Doç. Dr. Engin ŞAHİN
2021
(Her Hakkı Saklıdır)**

T.C.
BAYBURT ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**BOX-BEHNKEN TASARIM TABANLI OPTİMİZASYON STRATEJİSİ KULLANILARAK
“*Lactobacillus Senmaizuke*” BİYOKATALİZÖRÜ İLE 4-METOKSİ ASETOFENON'UN
ASİMETRİK İNDİRGENMESİ**

(Asymmetric Reduction of 4-Methoxy Acetophenone by *Lactobacillus Senmaizuke* Biocatal using
BOX-BEHNKEN Design-Based Optimization Strategy)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mervenur Kavi

Danışman: Doç. Dr. Engin ŞAHİN

Bayburt
Temmuz, 2021

ETİK VE BİLDİRİM SAYFASI

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Yanıt yüzey metodoloji optimizasyon stratejisi kullanılarak *lactobacillus senmaizuke* biyokatalizörü ile 4-metoksi asetofenon’un asimetric indirgenmesi” başlıklı çalışmanın tarafımdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını ve yararlandığım eserleri kaynakçada gösterdiğimi beyan ederim.

07/07/2021

Mervenur KAVI

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam süresince bana her türlü yardımcı olan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Engin ŞAHİN'e teşekkürlerimi sunarım.

Her türlü alt yapısından faydalandığım Bayburt Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarına ve Gıda Mühendisliği Bölümüne çalışmalarım aşamasında vermiş olduğu desteklerinden dolayı Doç. Dr. Enes DERTLİ ve Dr. Öğr. Üyesi Akın ÖZDEMİR hocalarıma teşekkür ederim.

Maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkür ederim.



ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BOX-BEHNKEN TASARIM TABANLI OPTİMİZASYON STRATEJİSİ KULLANILARAK “*Lactobacillus Senmaizuke*” BİYOKATALİZÖRÜ İLE 4- METOKSİ ASETOFENON'UN ASİMETRİK İNDİRGENMESİ

Mervenur KAVI

Temmuz 2021, 48 sayfa

Biyokatalizörler, önemli kimyasalların üretiminde geleneksel kimyasal katalizörlere göre daha seçici, çevre dostu ve daha güvenli oldukları için giderek daha fazla kullanılmaktadır. Enantiyosaf kiral sekonder alkoller, ilaç, biyolojik aktif moleküller ve diğer kimyasalların sentezi için öncüler olarak önemlidir. Kiral sekonder alkollerin fonksiyonel grupları, rasemizasyon olmaksızın kolaylıkla diğer fonksiyonel gruba dönüştürülebilir. Enantiyomerik olarak saf (*R*) ve (*S*)-1-(4-metoksifenil) etanol, loratadin, antihistaminler ve difenhidramin hidroklorür gibi çeşitli ilaç ara maddelerinin üretimi için önemli bir moleküldür. Bu tez kapsamında, bu anahtar molekül, biyokatalizör olarak *Lactobacillus senmaizuke* kullanılarak 4-metoksiasetofenondan sentezlendi. pH, inkübasyon süresi, sıcaklık ve karıştırma hızı gibi reaksiyon koşulları, Box-Behnken deneysel tasarım tabanlı optimizasyon stratejisi kullanılarak optimize edildi. Tam hücreli *Lactobacillus senmaizukei* ile 4-metoksiasetofenonun (*S*)-1-(4-metoksifenil) etanol'e indirgenmesi için öngörülen biyo-redüksiyon koşulları, 29°C sıcaklık, 5,8 pH, karıştırma hızı 155 rpm ve inkübasyon süresi 50 saat olarak Box-Behnken deneysel tasarım ile belirlendi. (*S*)-1-(4-metoksifenil)etanol, *Lactobacillus senmaizuke* kullanılarak bu optimum biyoindirgenme koşullarında >%99 dönüşüm, >%99 enantiyomerik fazlalık ve % 96 verimle üretildi. 4-metoksiasetofenonun biyoindirgenme etkinliği, kültür parametrelerinin ikinci dereceden ve doğrusal etkilerinden önemli ölçüde etkilenmiştir. Bu sonuçlar, katalitik biyo-redüksiyon reaksiyonları için kültür optimizasyon parametrelerinin rolünü ve bu parametreleri optimize etmek için Box-Behnken yönteminin etkinliğini göstermek için çok önemlidir.

Anahtar Kelimeler: Asimetrik indirgenme, biyokatalizör, (*S*)-1-(4-metoksifenil)etanol, Box-Behnken optimizasyon, *Lactobacillus senmaizuke*.

ABSTRACT

MASTER THESIS

ASYMMETRIC REDUCTION of 4-METHOXY ACETOPHENONE by “*Lactobacillus Senmaizuke*” BIOCATALYZER USING BOX-BEHNKEN DESIGN-BASED OPTIMIZATION STRATEGY

Mervenur KAVI

July 2021, 48 Pages

Biocatalysts are increasingly used in the production of important chemicals as they are more selective, environmentally friendly and safer than traditional chemical catalysts. Enantiopure chiral secondary alcohols are important as precursors for the synthesis of drug, biological active molecules and other chemicals. The functional group of chiral secondary alcohols can be easily transformed into other functional group without racemization. Enantiomerically pure (*R*) and (*S*)-1-(4-methoxyphenyl) ethanol is an important molecule for the production of various drug intermediates such as loratadine, antihistamines and diphenhydramine hydrochloride. In this thesis, this key molecule was synthesized from 4-methoxyacetophenone using *Lactobacillus senmaizuke* as a biocatalyst. The reaction conditions, such as pH, incubation period, temperature and agitation speed, were optimized using Box-Behnken experimental design-based optimization strategy. The predicted bioreduction conditions for the reduction of 4-methoxyacetophenone to (*S*)-1-(4-methoxyphenyl) ethanol with whole-cell *Lactobacillus senmaizukei* were found to be temperature of 29°C, pH of 5.8, agitation level of 155 rpm and incubation period of 50 h. (*S*)-1-(4-methoxyphenyl) ethanol was produced using *Lactobacillus senmaizuke* in >99% conversion, >99% enantiomeric excess and 96% yield in this optimum bioreduction conditions. The efficiency of the bioreduction of 4-methoxyacetophenone was importantly affected by the quadratic and linear effects of culture parameters. These results are crucial to demonstrate the role of culture optimization parameters for catalytic bioreduction reactions and the effectiveness of the Box-Behnken method to optimize these parameters.

Keywords: Asymmetric reduction, biocatalyst, (*S*)-1-(4-methoxyphenyl) ethanol, Box-Behnken optimization, *Lactobacillus senmaizuke*.

İÇİNDEKİLER

ETİK VE BİLDİRİM SAYFASI	i
TEŞEKKÜR	ii
ÖZ	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR DİZİNİ	x
BİRİNCİ BÖLÜM	1
Giriş	1
Araştırmanın Konusu ve Problemi	1
Araştırmanın Amacı.....	1
Araştırmanın Önemi ve Gerekçesi.....	2
İKİNCİ BÖLÜM	3
Kuramsal Çerçeve ve Alan Yazın Derleme.....	3
Kuramsal Çerçeve.....	3
Asimetrik sentez.	3
Kiralite.	3
Enantiyomerler ve özellikleri.....	4
Optikçe aktiflik.	5
Rasemik karışım.	5
Asimetrik sentezin önemi.	6
Enantiyomerik saflık.....	8
Enantiyomerik olarak saf bileşiklerin sentez yöntemleri.....	8

<i>Stereoseçimli sentez</i>	9
<i>Rasemat rezolüsyonu</i>	9
<i>Tercihli kristalizasyon</i>	10
<i>Diastereomer kristalizasyon</i>	10
<i>Kromatografik yöntemle ayırıştırma</i>	10
<i>Kinetik rezolüsyon</i>	10
Kiral sekonder alkollerin önemi.	11
Alan Yazın Derlemesi	13
ÜÇÜNCÜ BÖLÜM	24
Materyal ve Yöntem	24
Deney Tasarımı ve İstatiksel Analizler.....	24
DÖRDÜNCÜ BÖLÜM	32
Bulgular	32
Kromatografik Ayırmalar.	32
Kolon kromatografisi.....	32
İnce tabaka kromatografisi.....	32
Spektrumlar.....	32
¹ H-NMR spektrumları.	32
¹³ C-NMR spektrumları.....	32
HPLC spektrumları.....	32
Genel.....	32
Genel asimetrik indirgenme prosedürü.....	33
BEŞİNCİ BÖLÜM	35
Sonuç, Tartışma ve Öneriler	35
Sonuç	35
Tartışma	35
Öneriler	38

KAYNAKÇA	39
Ekler	45
Ek-1. HPLC Spektrumları.....	45
Ek-2. NMR Spektrumları.....	46
Öz Geçmiş	48



TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. <i>Kiral İlaçların Yıllık Satış Miktarı</i>	12
Tablo 2. <i>Phaseolus Aureus L Biyokatalizörü ile Çeşitli Prokiral Ketonların Asimetrik İndirgenmesi</i>	15
Tablo 3. <i>2-Bromo-4-Floro Asetofenon'un Mikroorganizmalar ile Asimetrik İndirgenmesi</i>	16
Tablo 4. <i>Farklı Fungus Türleri ile Asetofenon'un Biyoindirgenmesi</i>	17
Tablo 5. <i>Asetik Asit Bakterileri ile Farklı Ketonların Asimetrik İndirgenmesi Sonucu Enantiyomerik Aşırılık Değerleri</i>	18
Tablo 6. <i>Asetofenon'un Farklı Bitki Kökleri Kullanılarak Biyoindirgenmesi</i>	19
Tablo 7. <i>Box-Behnken Deneysel Tasarım Matrisi ve Toplanan Veriler</i>	25
Tablo 8. <i>Ee ve cr Yanıtları İçin Box-Behnken Deneysel Tasarım Modeli İstatistikleri ve ANOVA Analizleri</i>	28
Tablo 9. <i>Eşitlik (7)'De Önerilen Optimizasyon Modelinin Sonuçları</i>	30

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. <i>Lactobacillus Senmaizuke</i> biyokatalizörü ile 4-metoksi asetofenonun asimetric indirgenmesi.	2
Şekil 2. Kiral karbon atomunun ayna görüntüsü.....	3
Şekil 3. Kiral bir molekülün ayna görüntüsü.	4
Şekil 4. (S)-bütan-2-ol ve (R)-bütan-2-ol molekülü.....	4
Şekil 5. Polarimetrenin genel gösterimi.....	5
Şekil 6. (S) -talidomidin meydana getirdiği fizyolojik farklılıklar.	7
Şekil 7. Talidomid'in (R) ve (S) enantiyomeri.....	7
Şekil 8. Ketamin'in (R) ve (S) enantiyomeri.....	7
Şekil 9. Enantiyomerik olarak saf bileşiklerin elde edildiği yöntemler.	9
Şekil 10. Rasemat rezolüsyonu için kullanılan metotlar.	9
Şekil 11. R ve S Penisilamin	12
Şekil 12. Metil Dopa'nın S enantiyomeri.....	13
Şekil 13. 2-Bromo-1-(4-Nitrofenil) Etanon'un asimetric indirgemesi.	14
Şekil 14. <i>Phaseolus Aureus L</i> biyokatalizörü ile sekonder alkol elde edilmesi.....	15
Şekil 15. 2-Bromo-4-Floro Asetofenon'un Asimetric İndirgenmesi.....	16
Şekil 16. 1-[3,5-Bis (Triflorometil)Fenil] Etanon'un kimyasal ve biyokatalizör ile asimetric indirgenmesi.	19
Şekil 17. Asetofenon'un <i>Alternaria Alternata</i> EBK-4 biyokatalizörü ile asimetric indirgenmesi.	20
Şekil 18. Asetofenon'un RSM tekniđiyle asimetric indirgenmesi.	20
Şekil 19. Asetofenon'un dondurulmuş havuç biyokatalizörü ile asimetric indirgenmesi.	21
Şekil 20. Box-Behnken (BB) deneysel tasarımı kullanılarak 4-metoksi asetofenon'un asimetric indirgenmesi.	24
Şekil 21. Ph, sıcaklık, çalkalama hızı ve inkübasyon süresinin ee ve dönüşüm üzerine etkisi.	30

KISALTMALAR DİZİNİ

ADH : Alkol Dehidrogenaz Enzimi

ee : Enantiyomerik aşırılık

LAB : Laktik Asit Bakterileri

RT : Oda sıcaklığı

μl : Mikrolitre

ml : Mililitre

mmol : Milimol

BB : Box-Behnken optimizasyon

c.r : Dönüşüm oranı



BİRİNCİ BÖLÜM

Giriş

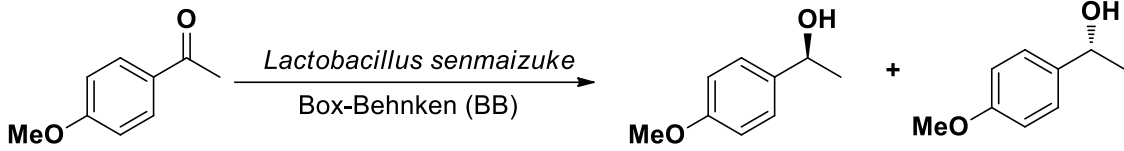
Araştırmanın Konusu ve Problemi

Kimya endüstrisi topluma çok sayıda önemli ürün sağladığından ve dünya çapında en büyük ekonomik sektörlerden biri olduğu için toplumda merkezi bir role sahiptir. Kimya endüstrisi, bu rekabetçi konumu korumak ve pazarlara başarılı bir şekilde girebilmek için yenilik yapmaya zorlanmıştır. Buda, ürün kalitesinden ödün vermeden yenilenebilir kaynaklardan kimyasalların üretimine daha fazla odaklanılmasına, daha yeşil sentetik yolların teşvik edilmesine ve daha az toksik yan ürün ve atık üretilmesine neden olmuştur. Toksik moleküllerin tüketimini ve yan ürün olarak elde edilmesini azaltmak veya ortadan kaldırmak için kimyasal ürün ve işlem tasarımı olarak bilinen “Yeşil Kimya”, yeni nesil metotların ve ürünlerin tasarımını, çevre dostu ve ekonomik olarak daha rekabetçi hale getirmektedir. Bu bağlamda biyoproses ilaç sanayi başta olmak üzere birçok alana sürdürülebilir, çevre dostu yenilikler getirmişlerdir. Bundan dolayı biyokatalizörlere olan ilgi her geçen gün artmaktadır. Biyokatalizörler ılıman reaksiyon şartlarının yansıra, yüksek oranda seçicidirler ve bu nedenle sentetik organik kimyada büyük ilgi görmektedir. Bundan dolayı özellikle ilaç öncü maddeleri olabilecek kiral bileşiklerin sentezini biyokatalizörler ile yapmak oldukça önemli hale gelmiştir. Bunun için asimetrik bileşiklerin sentezinde kullanılacak yeni bir biyokatalizörün ve prosesin ortaya çıkarılması oldukça önemlidir.

Araştırmanın Amacı

Kiral sekonder alkoller çeşitli biyolojik aktif bileşiklerin, doğal ürünlerin ve ilaçların sentezinde kullanılan değerli moleküllerdir. Son yıllarda ilaç sanayi, kimya, kimyasal tarım ve kozmetik gibi alanlarında enantiyomerik olarak saf bileşiklere her geçen gün talep artmaktadır ve bu yüzden bu bileşiklerin üretiminde önemli çıkış moleküller olan kiral sekonder alkollere olan talepte her geçen gün artmaktadır. Piyasada bulunan ilaçların çoğu kiraldır ve bu ilaçların büyük bir kısmının yapısında birden fazla kiral merkeze bulunmaktadır. *R*-denopamin, *L*-klorpromazin, *S*-fluoksetin ve *R*-atomoksetin gibi bir çok ilaç kiral aromatik sekonder alkollerden sentezlenebilmektedirler. 1- (4-metoksifenil) etanol'ün hem *R* hem de *S* enantiyomeri ilaç öncüsü olarak kullanılmaktadır. Enantiopure (*S*)-1-(4-metoksifenil) etanol,

genel alerjik tepkileri tedavi etmek için kullanılan sikloalkil[b]indollerin sentezi için anahtar bir kiral yapı bloğudur. (*R*)-1-(4-metoksifenil) etanol ise anti-enflamatuar aktiviteye sahip propanoik asitlerin hazırlanmasında kullanılabilir. Bu çalışmada, *Lactobacillus senmaizuke* biyokatalizörü ile 4-metoksi asetofenon'un asimetrik biyoreduksiyonu hedeflenmektedir (Şekil 1).



Şekil 1. *Lactobacillus Senmaizuke* biyokatalizörü ile 4-metoksi asetofenonun asimetrik indirgenmesi.

Ayrıca bu çalışmada reaksiyon şartlarının optimizasyonu klasik metotlar yerine Box-Behnken optimizasyon stratejisi kullanılarak yapılacaktır.

Araştırmanın Önemi ve Gerekçesi

Kiralite, birçok ilacın etkinliğinde kilit bir faktördür. Enantiyomerlerin farklı biyolojik etkilerinden dolayı bir enantiyomer pozitif bir etki gösterebilirken, diğer enantiyomer ya etki göstermeyebilir ya da telafisi imkansız sonuçlar doğurabilecek negatif etki gösterebilmektedirler. Yukarıda bahsedildiği gibi 4-metoksi asetofenon'un asimetrik indirgenmesi sonucu elde edilen her iki enantiyomerinin de ilaç öncü maddesi olarak kullanılabilir. Bundan dolayı bu tez kapsamında 4-metoksi asetofenon substrat olarak seçilmiş ve *Lactobacillus senmaizuke* biyokatalizörü ile enantiyosaf olarak (*R*) veya (*S*)-enantiyomerinin sentezi hedeflenmiştir. Bu çalışmanın amacı önemli bir substrat olan 4-metoksi asetofenon'un biyokatalizör kullanılarak asimetrik olarak indirgenmesini gerçekleştirmek ve enantiyomerlerden birisini saf olarak elde etmektir. Ayrıca Box-Behnken optimizasyon stratejisi bu substratın asimetrik indirgenmesinde ilk kez kullanılacaktır.

İKİNCİ BÖLÜM

Kuramsal Çerçeve ve Alan Yazın Derleme

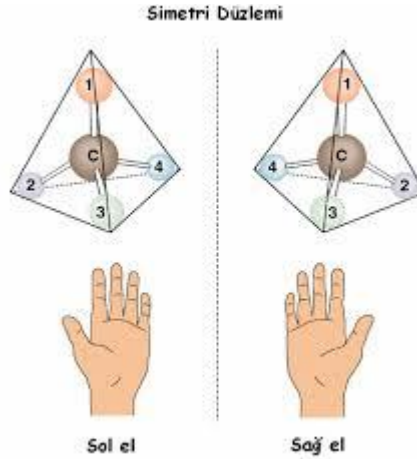
Kuramsal Çerçeve

Asimetrik sentez.

Asimetrik sentez reaksiyonları optik olarak aktif kiral ara maddelerin kolayca elde edilmesini sağlayan reaksiyonlardır (Nakamura, & Kaoru, 2003, s.2670). Doğada bulunan bileşiklerin önemli bir kısmı klinikte kullanılan ilaçların birçoğu tek bir enantiyomer formundadır. Ayrıca, enantiyomerik saf bileşikler gıda, zirai, parfüm gibi alanlarda kullanılmaktadır. Bu süreç, yeni kiral maddelerin, kiral organik katalizörlerin ve biyokatalizörlerin hızlı büyümesine yol açmıştır.

Kiralite.

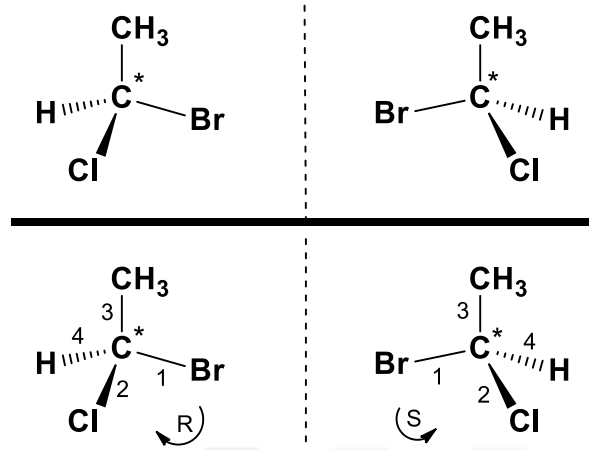
Kiralite, *cheiros* sözcüğünden gelip Yunanca'da el anlamına gelmektedir. Kiral nesne kendi görüntüsü ile aynı bileşiğin ayna görüntüsünün üst üste çakışmayan nesnelere olarak tanımlanmaktadır. Kiral olmayan molekülde ise bu görüntüler üst üste çakışır (Tüzün, 1993). Örneğin dört farklı grubun bağlı olduğu karbon atomunu içeren bileşiklerin ayna görüntüsü ile kendi görüntüsü aynı değildir ve bu bileşikler kiral bileşiklerdir (Şekil 2).



Şekil 2. Kiral karbon atomunun ayna görüntüsü.

Kiralite, doğada canlı sistemlerde çok yaygın olarak bulunmaktadır. Örneğin; aminoasitler, lipitler, proteinler kiral yapıda moleküllere sahiptir ve kiral tarzda etkileşim gösterirler (Nejem, 2004, s.2). Kiralite farklı moleküller üzerinde görülebilir. Örneğin; bir

karbon atomuna dört farklı grup bağlı olduğunda ayna görüntüsü ile kendi görüntüsü aynı değildir (Şekil 3).

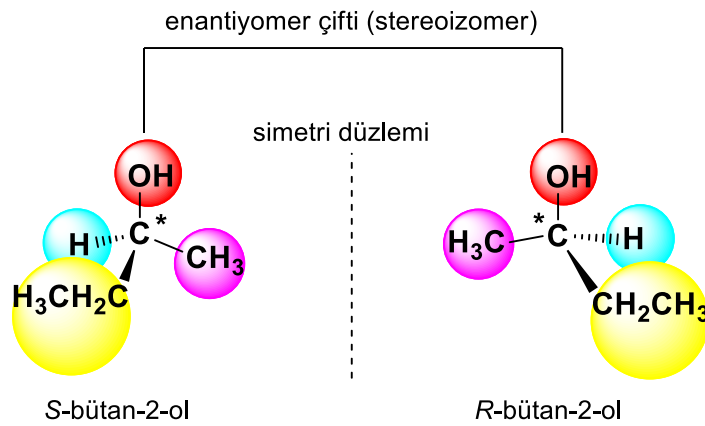


Şekil 3. Kiral bir molekülün ayna görüntüsü.

Bu moleküllerde merkezde bulunan karbon atomu stereomerkez olarak bilinir. Bu merkez optikçe aktiftir. Birbirinin ayna görüntüsü olan bu yapılar enantiyomerlerdir ve biri düzlem polarize ışığı sola doğru çevirirken diğeri sağa doğru çevirir (Bunnett, 1999, s.1341).

Enantiyomerler ve özellikleri.

Bir nesne ile nesnenin ayna görüntüsü birbiri ile çakışmıyorsa bu iki moleküle enantiyomer çift denir. Kiral bir objenin her iki formundan biri *R* olarak diğeri *S* olarak isimlendirilir (Şekil 4). *R rectus* sağa çeviren, *S sinister* sola çeviren anlamına gelmektedir. Enantiyomerlerden birisi polarize ışık düzlemini sağa (+), diğeri sola (-) çevirir.

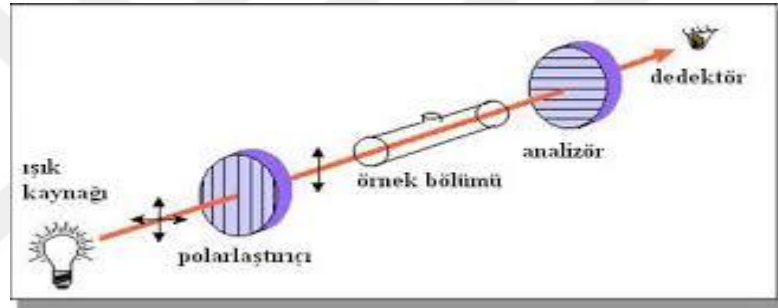


Şekil 4. (*S*)-bütan-2-ol ve (*R*)-bütan-2-ol molekülü.

Enantiyomerlerin çevirme açıları dışında tüm kimyasal ve fiziksel özellikleri aynıdır ve bu enantiyomer çiftleri farklı biyolojik etkilere sahip olabilmektedir. Örneğin; biri biyolojik aktiviteye sahip olurken diğeri toksik etki oluşturabilmektedir (Maier, Franco, & Lindner, 2001).

Optikçe aktiflik.

Optikçe aktif maddeler organik yapıda veya inorganik yapıda olabilirler. Bunlardan polarize ışık düzlemini sağa çevirenlere dekstrojir, sola çevirenlere ise levojir denir. Sağa çevirenlerin önüne (+), sola çevirenlerin önüneyse (-) konur. Polarimetreler polarize ışık düzlemini çevirme açısını ölçmek için kullanılan cihazlardır (Şekil 5) ve ayrıca polarimetreler molekül boyutları ile derişim miktarı tayininde ve birçok gıda maddelerinin kontrol edilmesi amacıyla da kullanılır (Atkins, & Carey, 1997).



Şekil 5. Polarimetrenin genel gösterimi.

Enantiyosaf olan maddeleri rasemik maddelerden ayıran özellik polarize ışık düzlemini sola ya da sağa çevirmeleridir. Bu özellik, maddelerin yapısında bulunan asimetrik atom merkezinden kaynaklanır. Fakat asimetrik molekül sadece karbon atomu değildir. Örneğin; oksijen, azot ve fosfor gibi moleküllerde asimetrik atom merkezine sahiptir. Bir molekülde biri diğerrinin ayna görüntüsü olan fakat üst üste çakıştırılmayan iki enantiyomer bulunuyorsa asimetrik moleküldür. Bir maddenin optikçe aktiflik özelliği sahip olabilmesi için enantiyomerlerinden birisinin miktarının diğerrinden fazla olması gerekmektedir (Atkins, & Carey, 1997).

Rasemik karışım.

Rasemik karışım, birbirinin ayna görüntüsü olan her iki enantiyomeride eşit sayıda barındıran kiral bileşiklere denir. Rasemik karışımlar düzlem polarize ışığı çevirmeyen karışımlardır (Dreamsteam, 2007). Gıda sanayinde optikçe aktiflik şekerlerin tanımlanmasında

ve tayininde kullanılır. D-glukoz polarize ışığı sola çevirirse D-(-)-glukoz, sağa çevirirse D-(+)-glukoz şeklinde gösterilir.

İlaç sanayinde, gıda, biyokimya endüstrisinde optikçe aktif, enantiyosaf bileşikler tercih edilir (Böhringer, Morgenstern, Schneider, & Berndt, 1999). İlaç sanayisinde kiral maddelerin enantiyomer çiftleri farklı etki gösterebilmektedir. Enantiyomer çiftlerinden biri istenen etkiyi gösterirken diğeri istenmeyen etki gösterebilmektedir. İstenmeyen etkiyi gösteren enantiyomer zararlı olabilmektedir, bu yüzden oranı % 0.1 oranına düşürülmek istenir (Böhringer *vd.*, 1999).

Rasemik karışımların erime noktaları saf enantiyomerlerinkinden farklıdır. Kiral olan bileşikler kimyasal olarak sentezlendiklerinde rasemik karışım olarak elde edilirler. *R* ve *S* enantiyomerleri eşit olarak elde edilirler. İlaç sanayisinde bu iki enantiyomerin oranı önemlidir. Bu iki enantiyomer farklı biyolojik aktiviteler gösterebileceğinden, enantiyomerleri birbirinden ayırarak enantiyomerik saf bileşikler elde etmek ilaç endüstrisi için çok önemlidir (Kordikowski, York, & Latham, 1999). Örneğin enantiyomer çiftlerinden hangisinin istenen aktivitede olduğunu ayırt etmek kullanılan ilacın hastada meydana getireceği olumsuz etkiyi engellemede önemlidir. Rasemik karışım halinde piyasaya sürülen ilaçların yan etkileri fark edilince akademik ve endüstriyel anlamda önemli kiral bileşiklerin elde edilmesi için çok sayıda enantiyoseçici metotlar geliştirilmiştir (Sheldon, 1993).

Asimetrik sentezin önemi.

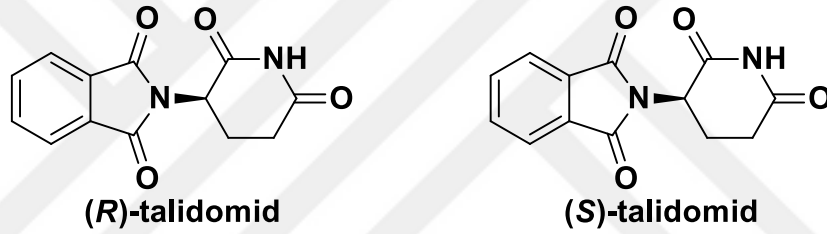
Asimetrik sentez başta ilaç sanayisi olmak üzere ziraat, gıda, eczacılık alanında da önemi artmaktadır. Üretimi yapılmış 5000 kayıtlı ilacın büyük bir kısmı doğal ürünlerden veya kimyasal olarak elde edilmektedir. Üretilen ilaçlar ya rasemik halde ya da enantiyomerik saf madde olabilmektedir. Eczacılık yani ilaç endüstrisinde tek enantiyomer olarak elde edilir (Babaarslan, 2008). İlaç üretiminde ilk dönemlerde dünya genelinde üretilen ilaçlar rasemik olarak üretilip piyasaya sürülmüş ve istenmeyen sonuçlar ortaya çıkmıştır. Bu nedenle günümüzde enantiyosaf olarak elde edilmektedir.

Rasemik halde piyasaya sürülen ilaçların ciddi yan etkiler oluşturduğu bilinmektedir. Rasemik halde üretilen ve istenmeyen sonuçlara neden olarak bilinen ilk ilaç örneği talidomittir. Bu ilaç 1957 yılında hamile bayanlarda mide bulantısını giderici ilaç olarak satılmıştır. 1960 yılı sonrası bu ilacın yan etkileri ortaya çıkmaya başlamıştır. Talidomit kullanan gebelerin bebeklerinin doğum sonrasında fizyolojik farklılıklar gözlenmiştir (Buharaoğlu C. & Buharaoğlu G., 1960) (Şekil 6).



Şekil 6. (S) -talidomidin meydana getirdiği fizyolojik farklılıklar.

Yapılan araştırmalarda *R* enantiyomere sahip talidomid'in gerçekten istenilen etkiyi gösterdiği bulunurken, *S* enantiyomerin bu fizyolojik bozukluklara sebep olduğu belirlenmiştir. Bu tarihi vaka asimetrik sentezin ne kadar önemli olduğu gösteren belge olarak tarihte yerini almıştır (Ananthanarayanan, Tetreault, & Saint-Jean, 1993, s.87) (Şekil 7).



Şekil 7. Talidomid'in (*R*) ve (*S*) enantiyomeri.

Rasemik olarak piyasaya sürülen ve istenmeyen sonuçlar meydana getiren diğer bir örnek Ketamin'dir. Ketamin insan ve hayvan ameliyatlarında anesteziye kullanılan bir maddedir. Rasemat şeklinde uygulandıktan sonra hastalarda zihinsel ve halüsinasyon karışıklıkları gözlenmiştir. Ketamin'in enantiyomerleri araştırıldığında *S*-(+) ketaminin anesteziye olduğu, *R*-(-) ketamin ise istenmeyen yan etkilere sahip olduğu rapor edilmiştir. (Karadeniz, 2006, s.8) (Şekil 8).



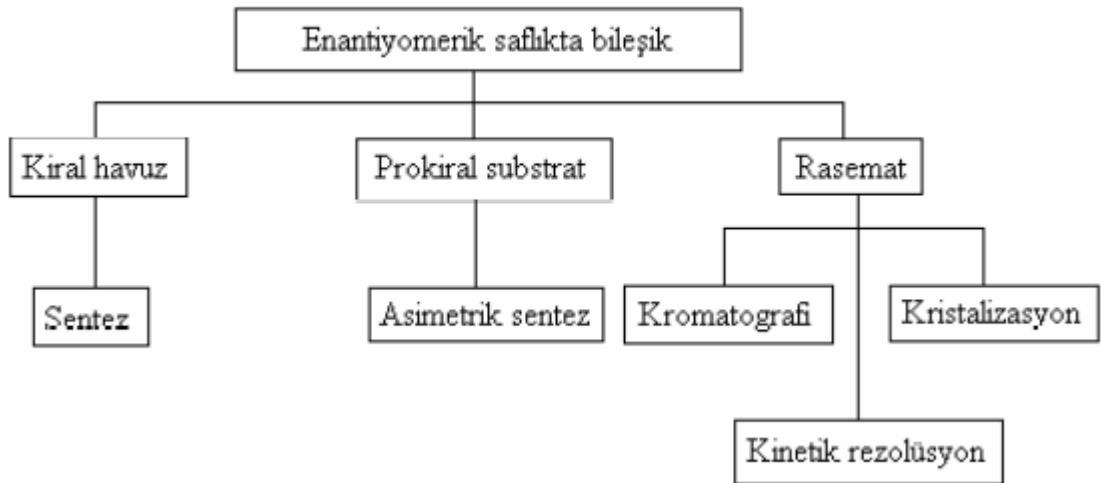
Şekil 8. Ketamin'in (*R*) ve (*S*) enantiyomeri.

Enantiyomerik saflık.

Enantiyomerik saflık; enantiyomer çiftlerin birinin diğerinden fazla miktarda olmasıdır. Genelde % olarak ee ile ifade edilir. % 100 ee değerine sahip bileşikler, enantiyomerik olarak saf kabul edilirler. Özel bir proses ile yapılmadığında laboratuvarında sentezlenen bileşikler genellikle rasem olarak elde edilirler. Doğada serbest veya bir gruba bağlı olarak bulunan bileşikler *S* veya *R* enantiyomerleri halinde bulunurlar. Bu iki enantiyomer çifti farklı biyolojik etkilere sahiptir. Bu sebeple enantiyomerlerden yalnız bir tanesi istenen aktiviteye sahiptir ve farmakolojik açıdan tercih edilir (Williams, Riley, Sigvardson, Fortunak, Nicolas, Unger, Krahn, & Bremmer, 1998).

Enantiyomerik olarak saf bileşiklerin sentez yöntemleri.

Kiral bileşikler canlı sistemlerde bulunan kiral maddeler ile farklı bir şekilde etkileşimleri sonucu farklı biyolojik aktiviteler gösterebilmektedirler. Bundan dolayı enantiyomerik olarak saf bileşiklerin kullanımı tercih edilmektedir. Karmaşık bir yapıya sahip olan kiral moleküller kademeli sentez yöntemleri ile elde edilmektedirler. Bu bileşiklerin üretim prosedürü iki ana başlık altında toplanabilir. Bunlardan birincisi, tepkime sırasında kiral bir etkinin olmadığı şartlarda üretilen rasemik karışımın *R* ve *S* enantiyomerlerinin ayrıldığı rezolüsyon metodları; ikincisi ise reaksiyon ortamında bir bileşiğin kiral etki kaynağı olduğu koşullarda enantiyomer çiftlerinden birinin fazla olduğu asimetric sentezlerdir. Enantiyomerik olarak saf bileşik elde edebilmek için üç farklı yöntem kullanılmaktadır, Bunlar; kiral havuz yöntemi, prokiral substratlar ve rasematlardır (Ghanem, & Aboul-Enein, 1999, s.3332) (Şekil 9).



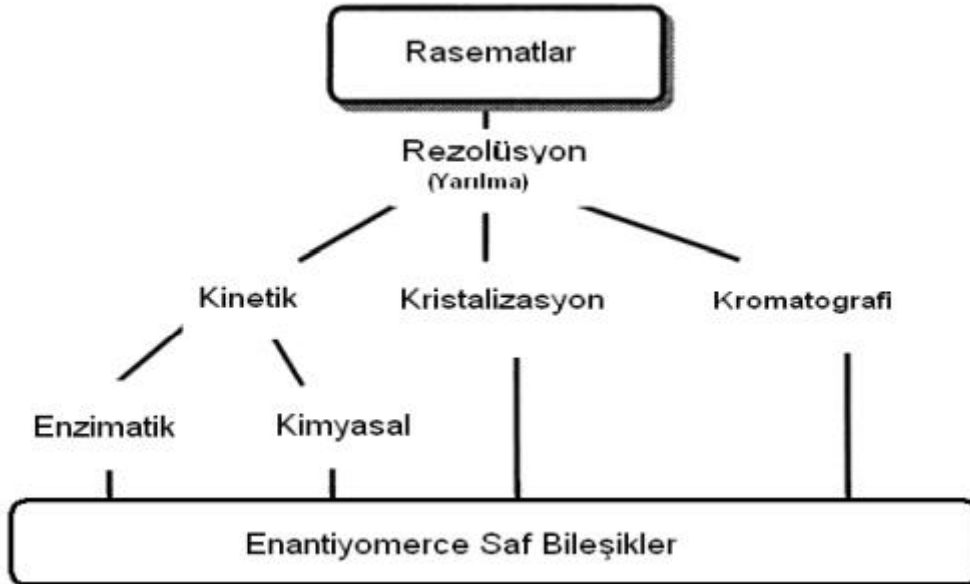
Şekil 9. Enantiyomerik olarak saf bileşiklerin elde edildiği yöntemler.

Stereoseçimli sentez.

Stereoseçimli sentez metodu, kiral havuz adı verilen kiral başlangıç molekül ile kimyasal veya biyolojik kiral ayırıcı ve asimetric çevre kullanılarak akiral bileşiklerle gerçekleştirilebilir.

Rasemat rezolüsyonu.

Rasemik karışımların ayrılması ile enantiyomerik olarak saf bileşiklerin ayrılması için uygulanabilen en eski metottur. Asimetric sentezlerdeki rasematların ayrılması, endüstriyel sentezlerde tek enantiyomerlerin elde edilmesi için önemli bir metot olarak kullanılmaktadır (Wilen, Collet, & Jacques, 1977, s.2730). Fakat bu yöntem veriminin düşük olması nedeni ile çok fazla tercih edilmemektedir. Enantiyomerlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri çevirme açısının işareti dışında aynı olduğundan, bunları birbirinden ayırmak için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (Aklan & Bayraktar, 2007) (Şekil 10).



Şekil 10. Rasemat rezolüsyonu için kullanılan metotlar.

Tercihli kristalizasyon.

Tercihli kristalizasyon metodu katı kristal maddelere uygulanabilen bir yöntemdir. Enantiyomerlerden birinin kristallenmesi, diğerinin kristallenmemesi için ortama farklı katkı maddeleri eklenerek tercihli kristallendirme işlemi yapılmaktadır (Soyer, 2007, s.9).

Diastereomer kristalizasyon.

Ayrırma, rasemik bileşiğin uygun bir optik olarak aktif madde ile reaksiyon yoluyla diastereomerlerine dönüştürülmesiyle gerçekleştirilir. Diastereomerlerin fiziksel özellikleri birbirinden farklı olduğundan, çözünürlük farkından dolayı kolon kromatografisi veya kristalizasyon yoluyla birbirlerinden kolaylıkla ayrılabilirler. Diastereomerler ayrıldıktan sonra, her iki enantiyomer de uygun bir yöntemle optik olarak saf bir biçimde geri kazanılır (Blaschke, 1980, s.15).

Kromatografik yöntemle ayırıştırma.

Enantiyomer çiftlerinin kiral bir bileşikle olan etkileşimleri birbirinden farklı olduğundan dolayı rasemik karışımlar kiral dolgu malzemeleri bulunan kolonlar aracılığıyla ayrımı gerçekleştirilebilir. Enantiyomer çiftlerinin ayrılması için kullanılan kromatografik yöntemler, ince kolon kromatografisi, tabaka kromatografisi ve sıvı kromatografisidir (Blaschke, 1980, s.17).

Kinetik rezolüsyon.

Kinetik çözünürlük, rasemik bir karışımdaki enantiyomer çiftlerinin kiral katalizörler yardımıyla başka bir kiral bileşiğe dönüştürülmesidir, enantiyomer çiftlerinden biri diğerinden daha hızlı dönüştürülür. Kinetik çözünürlük; Kimyasal kinetik çözünürlük, enzimatik kinetik çözünürlük olarak iki şekilde yapılır. Kiral katalizörün ürüne dönüşümü sırasında enantiyomerlerin oluşturduğu geçiş komplekslerinin aktivasyon enerjileri arasında önemli bir enerji farkı olmalıdır. Düşük aktivasyon enerjisi ile geçiş kompleksi oluşturan enantiyomer daha hızlı ürüne dönüşür. Aktivasyon enerjileri arasındaki fark arttıkça düşük enerjili enantiyomerin dönüşüm oranı diğer enantiyomerden daha yüksektir (Strauss, Felfer, & Faber, 1998, s.112). Ayrıca enantiyomerik zenginliğin (ee) fazla olması için dönüşüm %50'de kesilir ve bundan dolayı teorik verim %50'yi geçmez. Reaksiyon takibi için kiral kolonlu HPLC kullanılır. Bu durum yöntemin sınırlılıkları arasındadır.

Kiral sekonder alkollerin önemi.

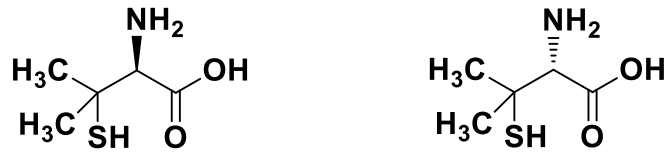
Son yıllarda dünya genelinde ilaç endüstrisinin en fazla ilgi duyduğu araştırma alanlarından biri kiral ilaçların üretimi ve piyasaya sürülmesidir (Stinson, 1998). Enantiyomer çiftlerin kiral ortamlarda gösterdikleri farklı davranışlar anlaşılmeden önce toksik etki gösterecek enantiyomerin önemsiz olduğu kabul edilerek kiral ilaçlar sentez aşamasında rasemik olarak piyasaya sürülmüştür.

İki enantiomer arasındaki biyokimyasal farklılıklar zamanla araştırıldıkça enantiyomer çiftleri üzerinde çalışmalar artmıştır. Günümüzde enantiyomerler çiftlerinin birbirinden farklı etki gösterdiği keşfedilince kiral ilaçlar tek enantiyomer olarak piyasaya sürülmeye başlanmıştır (Süleymanoğlu, 2011, s.57). Bu durum son yıllarda kiral ilaçların ilaç endüstrisindeki satışlarının arttığı görülmektedir (Çağlar, 2009, s.49) (Tablo 1).

Tablo 1. *Kiral İlaçların Yıllık Satış Miktarı*

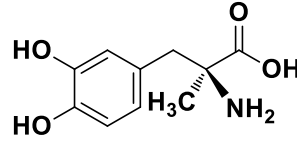
\$ Milyon	Bütün ilaçlar		Kiral ilaçlar		
	1999	2000	1999	2000	2005
Ağrı kesici	\$21,500	\$23,000	\$1,173	\$1,291	\$1,395
Antibiyotik	29,3	31,7	24,918	26,14	29,747
Antiviral	17,7	19,1	6,717	8,82	12,201
Kanser	13,7	15,6	8,891	10,69	13,605
Kalp-damar	42,7	46,6	24,895	27,65	34,627
Merkezi sinir sistemleri	47,7	53,9	8,439	9,094	14,7
Deri hastalıkları	17,9	18,4	16,202	1,272	1,54
Hormon	20	22	14,51	15,384	19,79
Göz hastalıkları	7,1	7,4	1,27	2,265	2,705
Solunum sistemleri	36,5	40,5	5,696	6,615	9,62
Diğer	45,5	49,2	8,751	10,381	14,05
Toplam	\$360,000	\$390,000	\$117,763	\$132,514	\$171,865

Rasemik formdaki kiral ilaçların enantiyomer çiftlerinden biri aktif iken diğeri inaktif olabilir. Örneğin; vücuttaki ağır metal zehirlenmelerinde kullanılan ve bir α -amino asit olan penisilamin'in *R* ve *S* enantiyomerleri farklı etkiye sahiptir. *S*-penisil amin asit ağır metallerin vücuttan uzaklaştırılmasına yardımcı olurken *R*-penisilamin körlüğe neden olur (Özyürek, Kalın, & Özdemir, 2020, s.1149). (Şekil 11).



Şekil 11. *R* ve *S* Penisilamin

Enantiyomerlerden her biri farklı özelliklere sahiptir. Örneğin; iltihap giderici özelliğe sahip olan ibuprofenin yalnızca (*S*) izomeri etkili olurken, (*R*) izomeri inaktif etkiye sahip değildir. (*S*) izomerinden oluşan bir ilaç rasemata göre daha hızlı bir etki gösterir. Yüksek tansiyon hastalarında kullanılan bir ilaç olan metildopa da ise sadece (*S*) izomeri aktif etki gösterir (Karadeniz, 2006, s.58) (Şekil 12).



Şekil 12. Metil Dopa'nın S enantiyomeri.

İstenmeyen toksik enantiyomerin uzaklaştırılması; kullanılan ilaç dozunun yarıya indirilmesi ve toksik etkisi olmayan enantiyomerik açıdan saf ilaçların kullanılması insan sağlığı açısından önemli konulardır. Bu nedenle son yıllarda enantiyosaf ilaçların kullanımı rasemik ilaçlara göre artış göstermiştir (Wanda, & Agnieszka, 2004).

Alan Yazın Derlemesi

Son yıllarda rasemik olmayan enantiyosaf bileşikler kimyasal ve biyolojik olarak elde edilmektedir. Enantiyosaf bileşik eldesinde kiral ajan olarak biyokatalizör ya da kemokatalizör kullanılarak optikçe aktif enantiyosaf ilaçlar üretilmektedir (Ghanem, & Aboul-Enein, 2004, s.3332). Enzimlerin veya mikroorganizmaların katalizör olarak kullanıldığı biyolojik katalizörler içeren tek enantiyomer bileşiklerinin farmasötik endüstrisinde üretilmesinin önemi giderek artmaktadır (Kurbanoglu E., Zilbeyaz, Kurbanoglu N., & Taskin, 2007).

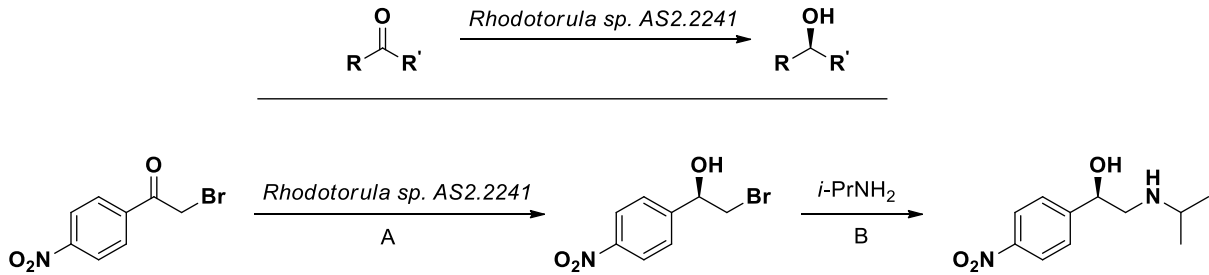
Kimyasal katalizörler biyolojik katalizörler ile karşılaştırıldığında kimyasal katalizör kullanımının bazı dezavantajları vardır. Kimyasal katalizörler; çevre dostu olmayan, seçiciliğe az, tepkime sırasında oluşan yan ürün fazlalığı, ürün dönüşüm oranının düşük olması ve kullanım maliyeti fazladır (Hage, Petra, Field, Schipper, Wijnberg, Kame, & Schoemaker, 2001, s.1031). Biyokatalizörlerin avantajları, yüksek verim elde edilebilmesi, seçicilik, kararlılık ve aktiviteleri duyarlıdır, çözücü olarak su kullanılabilir ve pek çok ortama uyum sağlayabilecek reaksiyon koşullarına sahiptirler. Biyokatalizörler tepkimelerin hızlı gerçekleşmesinde etkilidir. Biyokatalizörler; bitki, hayvan veya farklı mikroorganizmalardan izole edilen enzimler ile elde edilirler. Elde edilen bu enzimler maliyet açısından uygun olmakla birlikte tekrar tekrar elde edilebilmektedir. Aynı zamanda biyokatalizörler çevre dostu oldukları için doğada kolayca ayrışabilmektedirler (Nakamura, Yamanaka, Matsuda, & Harada, 2003). Biyokatalizörler; izomerizasyon, rasemizasyon gibi istenmeyen tepkimelerin oluşmasını engellerler. Aynı zamanda spesifik oldukları için substrata etki edecek enzim belirli bölgeyi katalize eder. Birçok reaksiyonu katalizeyebildikleri için yüksek enantiyoseçici özelliğede sahiptir (Wu, & Liang, 1999, s.339). Enzimin aktif bölgesi asimetric etki göstererek rasemik bileşikte enantiyoseçici davranır.

Böylece tek enantiyomer katalize edilir. Tepkimelerde yüksek verimle enantiyosaf bileşik elde edilmesi biyokatalizörlerin asimetrik sentezdeki önemini göstermektedir.

Substrat veya ürün inhibisyonuna sahip olmaları ve reaksiyonların su içeren çözeltilerde gerçekleştirilmesi dezavantaj olarak bilinmesine rağmen, bu dezavantajların kavram yanılgıları ve önyargılar olduğu ortaya çıkmıştır (Rozzell, 1999, s.2259). Birçok enzim uzun süreli kullanım koşullarında kararlıdır aynı zamanda bilinen her organik reaksiyon tipine uygun enzim-katalizli reaksiyon bulunmaktadır. Doğada bulunan biyokatalizörlerin sahip olduğu özelliklerin hepsi istenilen reaksiyon koşulları ile uygun hale getirilebilir (Johannes, Simurdiak, & Zhao, 2005).

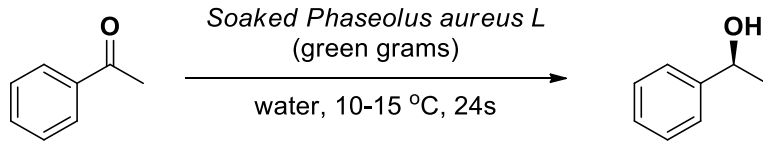
Son yıllarda, mikroorganizmalar, saf enzimler ve bitki ve hayvanlardan elde edilen kültür hücreleri de dahil olmak üzere prokiral ketonların biyokatalizör olarak biyo-indirgenmesi üzerine farklı çalışmalar yapılmıştır.

Yang ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada (2006) *Rhodotorula sp.* AS2.2241 hücreleri kullanılarak prokiral ketonların asimetrik indirgenmesi ile ilgili sekonder alkol elde etmişlerdir. Mikrobiyal indirgeme sistemi, çeşitli aromatik ketonların ve asetilpiridinlerin (>97 ee) indirgenmesinde yüksek aktivite ve enantiyoseçicilik gösterirken, α - ve β -keto esterlerin indirgenmesinde orta ila yüksek enantiyoseçicilik göstermiştir. *Rhodotorula sp.* AS2.2241 hücreleri kullanılarak 2-bromo-1-(4-nitrofenil) etanon'un asimetrik indirgenmesi sonucu elde edilen (R)-(2-bromo-1-(4-nitrofenil)etanol 97% ee oranında sentezlenmiştir (Şekil 13). Biyokatalizör ile elde edilen (R)-(2-bromo-1-(4-nitrofenil)etanol'un yüksek aktivite göstermesi ve yüksek oranda enantiyosaf olarak elde edilmesi ile organik sentez için kullanılabilirliği görülmüştür.



Şekil 13. 2-Bromo-1-(4-Nitrofenil) Etanon'un asimetrik indirgenmesi.

Kumaraswamy ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (2003) *Phaseolus aureus L* biyokatalizör olarak kullanılarak çeşitli prokiral ketonların asimetrik indirgenmesi gerçekleştirilmiştir (Şekil 14).

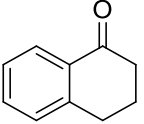
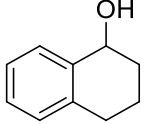
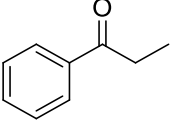
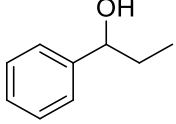
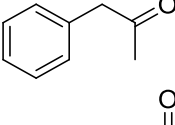
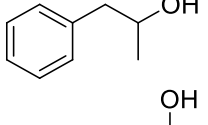
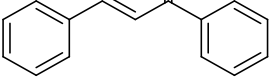
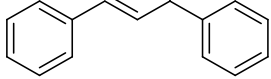


Şekil 14. *Phaseolus Aureus L* biyokatalizörü ile sekonder alkol elde edilmesi.

Bu yöntem ile çevre dostu ve çevre açısından zararsız olarak sekonder alkoller elde edilmiştir. *Phaseolus aureus L* enantioseçici olarak biyoindirgeyici biyokatalizör olarak kullanılabileceğini bulmuşlardır. *Phaseolus aureus L* kullanılarak oluşturulan reaksiyonun daha verimli olduğu ve geleneksel kimyasal reaktifler veya mikroorganizmalardan daha az atık ürettiğini saptamışlardır. Bu reaksiyon sonucu optik olarak aktif alkollerin multigram ölçekli üretimi için test edilmiş ve başarılı sonuç elde edilmiştir (Kazıcı, & Mehmetoğlu, 2015, s.54) (Tablo 2). *Phaseolus aureus L*'nin Farmasötik açıdan önemli prokiral ketonların hazırlanması için uygun biyokatalizör olduğu belirtilmiştir.

Tablo 2. *Phaseolus Aureus L* Biyokatalizörü ile Çeşitli Prokiral Ketonların Asimetrik İndirgenmesi

Substrat	Ürün	% ee	Zaman (saat)	% verim
		84 (S)	24	52
		90 (S)	24	50
		87 (S)	24	45
		95 (S)	24	51
		72 (S)	24	23
		90 (S)	24	28

		98 (S)	46	55
		80 (S)	24	50
		98 (S)	24	48
		85 (S)	24	28

Patel ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (2004) 2-bromo-4-floro asetofenon'un mikroorganizma kullanılması ile enantiyoseçimli asimetric indirgenmesi gerçekleştirilmiştir. Mikrobiyal asimetric indirgenme ile 2-bromo-4-floro asetofenon'dan (S)-1-(2-bromo-4-floro fenil) etanol elde etmişlerdir (Şekil 15).



Şekil 15. 2-Bromo-4-Floro Asetofenon'un Asimetric İndirgenmesi

Fırın ürünlerinde kullanılan mayadan elde edilen *Pichia*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Rhodotorula* mikroorganizma kullanılarak ve bu hücreler ayrı ayrı çalışılarak elde edilen sekonder alkollerin dönüşüm ve enantiyomerik aşırılık değerleri incelenmiştir (Tablo 3). İndirgeme tepkimeleri, 28 °C, 250 rpm'de, 10 mL hacimde (100 mM potasyum fosfat tamponu, pH:7), %20 w/v yaş hücre (0,02g /ml), 1,5 g/L substrat ve 25 g/L glikoz (138) mM ilave edilerek, 24 saatte gerçekleştirilerek dönüşüm ve enantiyomerik aşırılık (ee) oranları elde edilmiştir.

Tablo 3. 2-Bromo-4-Floro Asetofenon'un Mikroorganizmalar ile Asimetric İndirgenmesi

Mikroorganizma	% dönüşüm	% ee (S-alkol)
<i>C. sonorensis</i> SC 16117	100	99
<i>C. guilliermondi</i> SC 13861	100	99
<i>C. boidinii</i> SC 13821	100	97
<i>C. utilis</i> SC 13983	99	99
<i>C. parapsilosis</i> SC 16346	98	97
<i>R. glutinis</i> SC 16267	100	99
<i>H. fabianii</i> SC 13894	94	99

<i>H. polymorpha</i> SC 13824	100	99
<i>H. saturnus</i> SC 13829	100	99
<i>N. salmonicolor</i> SC 6310	100	99
<i>P. anomala</i> SC 16142	100	99
<i>P. methanolica</i> SC 13860	100	99
<i>P. pinus</i> SC 13864	100	99
<i>P. stiptis</i> SC 13863	99	99
<i>P. capsulata</i> SC 16306	100	99
<i>P. silvicola</i> SC 16159	99	99
<i>S. paucimobilis</i> SC 16113	100	99
<i>S. cerevisiae</i> SC 13902	93	99

Tablo 3'te görüldüğü gibi *Pichia*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Rhodotorula* ait türler yüksek dönüşüm (%99-100) ve ee (*S*-alkol) ile yüksek enantiyoseçimlilik (ee>%99) göstermiştir.

Mandal ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (2004) asetofenon türevlerinin enantiyoseçimli biyoindirgenmesini farklı funguslarla gerçekleştirmişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre *Trichothecium sp.*'nin enantiyoseçimlilik (%93,5) ve dönüşüm (%85) olarak en iyi fungus olarak belirlenmiştir. *Trichothecium sp.*'den sonra en iyi sonuç veren fungus *Aspergillus oryzae* NCIM 649 ile enantiyoseçimlilik (%81.5) ve dönüşüm (%100) olarak belirlenmiştir (Tablo 4).

Tablo 4. Farklı Fungus Türleri ile Asetofenon'un Biyoindirgenmesi

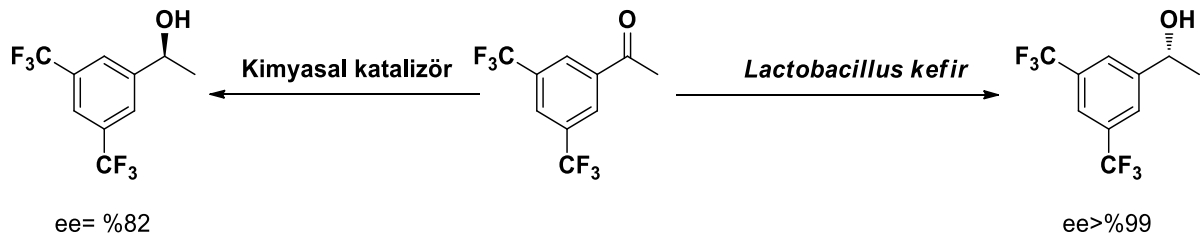
Fungus	saat	%ee ve konf.	% dönüşüm
<i>Fusarium oxysporum</i> NCIM 1282	42	72(S)	100
<i>Verticillium</i> AAT-TS-3	48	41 (R)	78
<i>Fusarium sp.</i> NCIM 1075	24	51 (R)	25
<i>Fusarium sp.</i> NCIM 1075	48	67 (R)	100
<i>Aspergillus oryzae</i> NCIM 649	48	81 (R)	100
<i>Trichothecium sp.</i>	72	93 (R)	85

Adlercreutz yaptığı çalışmada (1991) altı adet asetik asit bakteri suşu kullanarak ketonların stereoseçici indirgenmesini katalize etme yetenekleri açısından değerlendirmiştir. *Gluconobacter oxydans* DSM 50049 ve *Acetobacter aceti* DSM 2002 ketonların stereoseçici indirgenmesini katalize etme yeteneklerinin en iyi olduğunu belirlemişlerdir. Bu suşların her ikisini de kullanarak 12 adet ketonun tümünü \geq %94 enantiyomerik aşırılık derecesinde (*S*-alkollere indirgenmiştir. *Acetobacter aceti* DSM 2002 bakterisinin yüksek seviyede enzimatik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Tablo 5).

Tablo 5. Asetik Asit Bakterileri ile Farklı Ketonların Asimetrik İndirgenmesi Sonucu Enantiyomerik Aşırılık Değerleri

Ürün	<i>G. oxydans</i> DSM 50049	<i>A. aceti</i> DSM2002	<i>G. oxydans</i> DSM 2003	<i>A. aceti</i> DSM 2004	<i>A. pasteurianus</i> DSM2324	<i>A. peroxydans</i> DSM 2347
(<i>S</i>)-2-pentanol	94	94	41	6	72	91
(<i>S</i>)-2-hexanol	95	96	13	54	45	85
(<i>S</i>)-2-octanol	94	91	45	63	69	56
(<i>S</i>)-3-methyl-2-butanol	99	11	74	18	98	64
(<i>S</i>)-3,3-dimethyl-2-butanol	97	49	86	24	39	29
(<i>S</i>)-1-cyclohexyletanol	95	94	76	34	81	66
(<i>S</i>)-4-phenyl-2-butanol	81	94	82	52	90	50
(<i>S</i>)-1-phenyletanol	99	92	75	86	94	66
(<i>S</i>)-1-phenyl-1-propanol	97	96	48	39	90	93
(<i>S</i>)-3-heptanol	88	96	61	74	81	72
(<i>S</i>)-3-nonanol	93	94	24	23	89	78
(<i>S</i>)-4,4-dimethyl-2-pentanol	89	97	-	65	85	87

Gelo-Pujic ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (2006) tanımlanan çeşitli mikroorganizmalar arasında, *Lactobacillus kefir* ve *Aspergillus niger* mikroorganizmalarını kullanarak 1-[3,5-bis(triflorometil)fenil] etanonun enantiyoseçici indirgenmesi için iki farklı yol denenmiştir. İlk olarak asimetrik hidrojen transferi yoluyla ketonların asimetrik indirgenmesi, sonra mikrobiyal asimetrik indirgenme yöntemini incelemiş ve bu iki yöntem karşılaştırılmıştır. 1-[3,5-bis(triflorometil)fenil] etanon hem (*R*)-alkol'e hem de (*S*)-alkol'e indirgenmiştir. Her iki enantiyomerde yüksek verim ve enantiyomerik aşırılık (ee) değerleriyle elde edilerek alternatif bir yöntem olarak belirlenmiştir (Şekil 16).



Şekil 16. 1-[3,5-Bis (Triflorometil)Fenil] Etanon'un kimyasal ve biyokatalizör ile asimetrik indirgenmesi.

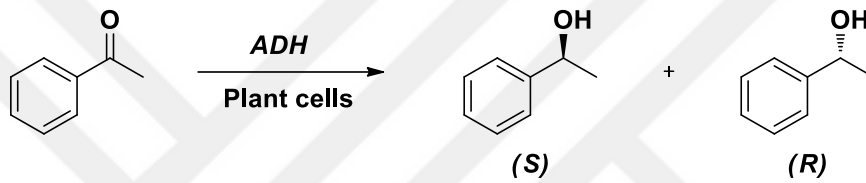
Andrade ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (2006) bitki kökleri biyokatalizör olarak kullanılması sonucu asetofenon türevleri biyoindirgenmiştir. Kiral (*R*) ve (*S*) alkoller enantiyomerik aşırılık % 98'e varan oranlarla elde edilmiştir. Tepkime koşulları; bitki hücrelerini 0.25 g/mL kadar içeren sulu ortamda, asetofenon derişimini 10 mM, sıcaklığında 32 °C karıştırma hızınının 160 rpm olarak gerçekleştirmişlerdir.

Tablo 6. Asetofenon'un Farklı Bitki Kökleri Kullanılarak Biyoindirgenmesi

Bitki hücresi	Reaksiyon süresi (gün)	% dönüşüm	% ee ve Konf.
<i>Allium schoenoprassum</i>	3	5	>98, <i>S</i>
<i>Arctium lappa</i>	3	8	8, <i>S</i>
	6	21	58, <i>S</i>
<i>Arracacia xanthorrhiza</i>	3	44	91, <i>S</i>
	6	91	66, <i>S</i>
<i>Beta vulgaris</i>	3	65	61, <i>R</i>
	6	83	87, <i>R</i>
<i>Colocasia esculenta</i>	3	24	50, <i>S</i>
<i>Coriandrum sativum</i>	3	56	90, <i>S</i>
<i>Raphanus sativus</i>	6	4	79, <i>R</i>
	4	4	99, <i>S</i>
<i>Brassica rapa</i>	6	10	99, <i>S</i>
	3	30	94, <i>S</i>
<i>Dioscorea alata</i>	6	47	94, <i>S</i>
	3	13	29, <i>R</i>
	6	14	31, <i>R</i>
<i>Solanum tuberosum</i>	3	3	24, <i>R</i>
	6	5	7, <i>S</i>
<i>Zingiber officinale</i>	3	8	>98, <i>S</i>
	6	8	>98, <i>S</i>

olarak belirlenmiştir. RSM yöntemini başarılı bir şekilde asetofenonun asimetric indirgenmesinde kullanmışlardır.

Kazıcı ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (2016) Dondurularak kurutulmuş havucu tam hücre biyokatalizörü olarak kullanarak bir grup aldehitin veya ketonun asimetric indirgenmesini incelemişlerdir (Şekil 19). Tam hücreler, asimetric sentez için dehidrogenaz kaynakları olduğunu belirtmişlerdir. Tam bitki hücresi ile prokiral ketonları indirgeyerek kiral alkollerin üretimi için biyoteknolojik süreçleri incelemiş ve yüksek bir ee elde etmek için çalışma koşullarını araştırmışlardır. Response Surface Methodology (RSM) yöntemi, bitki (dondurularak kurutulmuş havuç) biyokatalizörleri ile yapılan biyoindirgenme reaksiyonlarında kullanmışlardır.



Şekil 19. Asetofenon'un dondurulmuş havuç biyokatalizörü ile asimetric indirgenmesi.

Dondurularak kurutulmuş havuçların prokiral aromatik ketonların asimetric indirgeme reaksiyonu için uygun biyokatalizör olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Optimum çalışma koşullarını belirlemek için RSM yöntemi uygulanarak substrat konsantrasyonu, reaksiyon süresi, sıcaklık ve pH gibi çeşitli faktörlerin reaksiyon üzerindeki etkileri araştırılmıştır. En iyi reaksiyon koşulları reaksiyon süresi 48 saat, substrat konsantrasyonu 1 mmol, reaksiyon sıcaklığı 33 °C ve pH 7 olarak belirlemişlerdir. En iyi sonuç olarak ee ve dönüşüm oranları sırasıyla > % 99 ve % 58 olarak elde etmişlerdir.

Soyer ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (2010) RSM yöntemini kullanarak 1-fenil 1-propanol'ün enantiyoseçici olarak üretimi hakkında çalışma yapmışlardır. RSM uygulanmadan önce enzim kaynağı *Candida antartica* olarak belirlenmiştir. Yüksek oranda enantiyomerik aşırılık eldesi için *Candida antartica* enziminin optimum reaksiyon koşulları belirlenerek % 83'lük enantiyomerik aşırılık oranından % 91 oranına yükselmiştir.

Goretti ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (2012) *Cryptococcus gastricus*'un tüm hücreleri kullanılarak (4S)-(+)-karvonun dihidrokarvona asimetric indirgenmiştir. *Cryptococcus gastricus*'un tüm hücreleri RSM yöntemi ile optimize edilmiştir. *Cryptococcus gastricus*'un tüm hücreleri tarafından (4S)-(+)-karvonun biyoindirgenmesi (>% 95) yüksek

oranda gerçekleşmiştir. Biyoindirgenmeyi maksimize etmek ve yan reaksiyonların azaltmak için optimum deneysel koşullar incelenerek en iyi koşullar belirlenmiştir.

Bin Halmi ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (2016) RSM tekniği ile *Serratia sp* suşunun reaksiyon koşullarını optimize ederek altı değerlikli molibdenin biyoindirgemisini gerçekleştirmişlerdir.

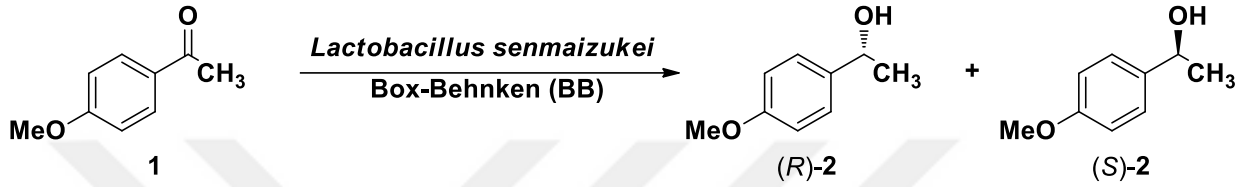
Kiral 1-(4-metoksifenil) etanol, farmasötik ara ürünlerin sentezi için anahtar bir hammaddedir. Ayrıca, (*S*)-1-(4-metoksifenil) etanol, difenilhidramin hidroklorür ve loratadin dahil olmak üzere antihistaminiklerin sentezi için önemli bir öncü iken (*R*)-1-(4-metoksifenil) etanol, ibuprofen gibi aril propiyonik asit anti-enflamatuar ve analjezik ilaçların sentezi için önemli bir öncüdür (MacLellan, & Clayden, 2011, s.3396; Brondani, Guilmoto, Dudek, Fraaije, & Andrade, 2012, s.65; Llona-Minguez, Ghassemian, & Helleday, 2015, s.10433). Bu nedenle, kimyasal veya biyolojik yaklaşımlar yoluyla enantiyosaf 1- (4-metoksifenil) etanol'nin sentezlenmesi oldukça önemlidir. Kimyasal katalizörler ile asimetric sentez yöntemleri, ciddi çevre kirliliğine, ürünlerin saflaştırılmasında zorluklarında dolayı bazı sınırlılıklar vardır. Enzimatik yöntemler, hafif reaksiyon koşulları ve yüksek enantiyoseçicilik nedeniyle daha fazla tercih edilen yöntemlerdendir. Bitki hücre kültürleri, mikrobiyal hücreler ve ketoreduktazlar (Lou, Wang, Smith, & Zong, 2009, s.1378; Wei, Liang, Cheng, Zong, & Lou, 2009, s.9) gibi çeşitli biyokatalizörler, 4-metoksiasetofenonun (*S*)-1-(4-metoksifenil) etanol'e stereoselektif olarak indirgenmesi için uygulanmıştır. 4-metoksiasetofenonun biyokatalitik asimetric indirgenmesine odaklanan, mikrobiyal hücreler tarafından katalize edilen enantiyomerik olarak saf (*S*)-1-(4-metoksifenil) etanol'ün biyokatalitik sentezi hakkında bazı raporlar bulunmaktadır (Zong, Wang, & Lou, 2009,379; Lou, Wang, Li, & Zong, 2009, s.195). Bu çalışmalarda ortalama bir seçicilik ile ilgili alkoller elde edilmiştir. Hatzakis ve arkadaşları rasemik 1-(4-metoksifenil) etanol'ü biyokatalizör varlığında kinetik rezülüsyonu sonucu (*R*)-1-(4-metoksifenil) etanol'ü %88 enantiyomerik aşırılık ve %18 gibi düşük bir verim ile elde etmişlerdir (Hatzakis, & Smonou, 2005). Bitki hücre kültürleri (Kumaraswamy, & Ramesh, 2003; Maczka, & Mironowicz, 2004) mikrobiyal hücreler (Salvi, Patil, Udupa, & Banerji, 1995; Homann, Vail, Previte, Tamarez, Morgan, Dodds, & Zaks, 2004; Utsukihara, Misumi, Kato, Kuroiwa, & Horiuchi, 2006; Yang, Xu, Xie, Xu, Zhao, & Lin, 2006) ve ketoreduktazlar (Wendlausen, P.J.S. Moran, Joekes, Rodrigues, & Mol, 1998) biyokatalizörler olarak kullanılarak 4'-metoksiasetofenonun (*S*)-1-(4-metoksifenil) etanol'e biyokatalitik asimetric indirgenmesi üzerine çeşitli raporlar bulunmaktadır ancak elde edilen maksimum substrat

dönüşümü hayal kırıklığı yaratacak kadar düşüktür (\leq % 62.3). Bildirilen biyokatalizörlerin çoğunda %77'den düşük enantiyomerik aşırılık elde edilmiştir. Fakat *Fusarium caucasicum* 18791 (ürün ee:>% 99, verim: % 17) ve *Aspergillus niveus* 12276 (ürün ee:>% 99, verim: % 15) biyokatalizörü ile yüksek enantiyomerik aşırılık elde edilmesine rağmen çok düşük verimler elde edilmiştir. Diğer taraftan literatürde rasemik 1-(4-metoksifenil) etanol'ün biyokatalizörler ile asimetric oksidasyonu sonucu yüksek enantiyomerik aşırılıklar elde edilmiştir fakat bu reaksiyonlarda teorik olarak verim %50'yi geçmemektedir (Xiao, Zong, & Lou, 2009, s.5562; Wang, Chen, Xu, Lou, Wu, Zong, & Wang, 2013, s.298) ve grubu tarafından immobilize lipaz enzimi varlığında rasemik 1-(4-metoksifenil) etanol'ün oksidasyonu sonucu (S)-1-(4-metoksifenil)etanol %99 enantiyomerik aşırılıkta elde edilmiştir (Wang, Zhu, Gong, Weng, Xia & Liu, 2020, s.10759). Fakat kinetik rezülüsyonda teorik dönüşüm maksimum %50'dir. Diğer taraftan Xu ve grubu tarafından rasemik 1-(4-metoksifenil) etanol'ün immobilize *Acetobacter* biyokatalizörü varlığında oksidasyonu sonucu %99 enantiyomerik aşırılıkta (S)-1-(4-metoksifenil) etanol elde edilmiştir (Xu, Cheng, Lou, W. & Zong, 2015, s.6363). Bu çalışmada da teorik verim %50'den fazla olmamaktadır. Bundan dolayı (R) veya (S)-1-(4-metoksifenil) etanol'ü enantiyosaf olarak yüksek verim ve dönüşümde elde etmek oldukça önemlidir. Bu reaksiyon kimyasal katalizörler kullanılarak yapılabilir, fakat kimyasal katalizörlerde elde edilen seçicilikler genelde düşük ve toksik ligandlar kullanılmaktadır. Biyokatalizörler, önemli kimyasalların üretiminde geleneksel kimyasal katalizörlere göre daha verimli ve çevresel olarak daha güvenli alternatifler olarak giderek daha fazla kullanılmaktadır. Biyokatalizörler kiral ve bölge seçiciliği nedeniyle, geleneksel organik katalizörler kullanarak yapılması zor olan önemli kimyasallar üretmek için kullanılırlar. Enzimler hücrelerin içinde oluşmalarına rağmen, bir test tüpünde işlev görmeye devam edebilirler ve çok özel kimyasal dönüşümler gerçekleştirme yetenekleri, onları endüstriyel işlemlerde giderek daha faydalı hale getirir. Biyokatalize prosesler, kademeli olarak endüstrinin birçok alanında kimyasal proseslerin yerini almıştır. Endüstriyel biyokatalizör üretiminin başlamasından bu yana, biyokatalizör teknolojisi ve ürünleri giderek artan bir önem kazanmıştır. Günlük yaşamın taleplerini karşılayacak endüstriyel malzeme üretiminde biyokatalizörler önemli bir rol oynamıştır. Biyokatalizörlerin bu öneminden dolayı, 4-metoksiastofenon'u asimetric olarak indirgeyebilecek biyokatalizörlerin geliştirilmesi de önemlidir.

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

Materyal ve Yöntem

Bu çalışmada *Lactobacillus senmaizukei* 4-metoksi asetofenon (1)'in 1-(4-metoksifenil) etanol (2)'ye asimetric indirgenmesinde biyokatalizör olarak kullanılmıştır. Asimetric indirgenme reaksiyonunda optimum şartlar Box-Behnken (BB) deneysel tasarımı kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 20).



Şekil 20. Box-Behnken (BB) deneysel tasarımı kullanılarak 4-metoksi asetofenon'un asimetric indirgenmesi.

Deney Tasarımı ve İstatistiksel Analizler

Yanıt yüzey metodolojisi (RSM), tasarım parametrelerini optimize etmek için etkili bir araçtır (Myers, Montgomery, Anderson-Cook, & Response, 2016; Özdemir, & Cho, 2016, s.2860). Bu çalışmada, 4-metoksiasetofenonun 1-(4-metoksifenil) etanole asimetric indirgenmesinde *Lactobacillus senmaizukei* biyokatalizörü kullanıldı ve indirgenme şartlarını optimize etmek için Box-Behnken optimizasyon metodu uygulanmıştır. Bu özel amaç için, Box-Behnken (BB) deneysel tasarımı, biyoindirgenme reaksiyonlarının etkinliğini etkileyebilecek dört bağımsız değişkenin etkisini analiz etmek için seçilmiştir; (1) pH (4.5-6.5, x1), (2) sıcaklık (25-35°C, x2), (3) inkübasyon süresi (24-72 saat, x3) ve (4) çalkalama hızı (100-200 rpm, x4). Seçilen bu değerlerin iki bağımlı değişken (1) enantiyomerik fazlalık (ee %) ve (2) dönüşüm oranı (cr %) üzerinde etkileri incelenmiştir. Tablo 7 BB deneysel tasarım matrisini ve toplanan verileri göstermektedir. Tablo 7'de deneysel önyargıyı önlemek için deneysel çalışmalar rastgele seçilmiştir.

Tablo 7. Box-Behnken Deneysel Tasarım Matrisi ve Toplanan Veriler

Bağımsız değişkenler		pH	Sıcaklık (°C)	İnkubasyon süresi (s)	Çalkalama hızı (rpm)	Yanıtlar ve değerleri	
Notasyonlar		x_1	x_2	x_3	x_4	Enantiyomerik fazlalık (%)	Dönüşüm oranı (%)
Kodlanmış		Gerçek Değerler					
Tasarım faktörlerinin seviyeleri	-1	4.5	25	24	100		
	0	5.5	30	48	150		
	1	6.5	35	72	200		
<i>SDS</i>	<i>RDS</i>	Bağımlı değişkenler				Enantiyomerik fazlalık (%)	Dönüşüm oranı (%)
9	1	4.5	30	48	100	68	80
19	2	6.5	30	24	150	92	84
27	3	5.5	30	48	150	97	99
22	4	5.5	25	48	200	92	85
23	5	5.5	35	48	100	52	84
7	6	5.5	30	72	100	63	82
21	7	5.5	25	48	100	90	83
6	8	5.5	30	24	200	52	88
18	9	4.5	30	72	150	90	95
8	10	5.5	30	72	200	77	88
16	11	5.5	35	72	150	50	78
20	12	6.5	30	72	150	97	98
11	13	6.5	30	48	100	88	94
25	14	5.5	30	48	150	97	99
17	15	4.5	30	24	150	90	88
5	16	5.5	30	24	100	58	95
3	17	6.5	25	48	150	69	99
2	18	4.5	35	48	150	57	98
10	19	4.5	30	48	200	78	84
12	20	6.5	30	48	200	90	97
4	21	6.5	35	48	150	30	88
13	22	5.5	25	24	150	80	85
15	23	5.5	35	24	150	45	80
1	24	4.5	25	48	150	52	94
26	25	5.5	30	48	150	97	99
14	26	5.5	25	72	150	74	89
24	27	5.5	35	48	200	48	81

Not: *SDS*=standart deney sırası; *RDS*=ratgele deney sırası

Polinom modeli, tahmini yanıtlar aşağıdaki gibi uygulanmıştır:

$$\hat{y}_1 = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^4 \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i<j=2}^4 \sum_{i=1}^4 \beta_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

$$\hat{y}_2 = \varphi_0 + \sum_{i=1}^4 \varphi_i x_i + \sum_{i=1}^4 \varphi_{ii} x_i^2 + \sum_{i<j=2}^4 \sum_{i=1}^4 \varphi_{ij} x_i x_j \quad (2)$$

Burada \hat{y}_1 ve \hat{y}_2 tahmini ee ve cr için yanıt fonksiyonlarıdır. β_0 , β_i , β_{ii} ve β_{ij} ee tahmini yanıt fonksiyonunun katsayılarıdır. Benzer şekilde φ_0 , φ_i , φ_{ii} ve φ_{ij} cr tahmini yanıt fonksiyonunun katsayılarıdır. Bu çalışmada, örneklerin yanıt değerlerini (ee ve cr) ölçmek için analizler üç tekerrürlü iki kez tekrarlanmıştır. Ayrıca bu değerler tablo 7'de verilmiştir.

Yanıt değerleri (ee ve cr) % 0 ile % 100 arasında değişmektedir. Bu nedenle, Tablo 7'deki yanıtları (ee ve cr) tahmin etmek için logaritma dönüşümü gereklidir. Logaritma dönüşüm tekniği, modelleme aşamasına geçmeden önce yanıt değerlerine uygulanmıştır. Ayrıca, bu dönüştürme tekniği kullanışlıdır çünkü her yanıt tablo 7'de sonlu bir aralıktadır. Logaritma dönüştürme tekniğinin matematiksel ifadesi aşağıdaki gibi gösterilir:

$$\text{logit } p(x) = \ln \left[\frac{p(x)}{1+p(x)} \right] \quad (3)$$

Burada $p(x)$ yanıt fonksiyonu, y , ve $p(x) = \frac{1}{1 + e^{-\left(\alpha + \sum_{i=1}^n \beta_i x_i\right)}}$. Bundan dolayı Denklem

(3) şu şekilde yazılabilir:

$$\text{logit } (y) = \ln \left(\frac{y - \text{lower limit}}{\text{upper limit} - y} \right) \quad (4)$$

Burada y değeri alt sınır ile üst sınır arasındadır. Yanıt değerlerini (ee ve cr) maksimize eden tasarım değişkenlerinin optimum koşulları, literatürde bilinen bir yöntem ile çok yanıtlı bir optimizasyon ile elde edildi (Özdemir, 2020, s.1550). Bu amaçla, istenen yanıtları (ee ve cr) maksimize ederken tasarım değişkenlerinin optimum koşullarını elde etmek için arzu edilebilirlik fonksiyonları ($d_i(y_i)$) kullanılmıştır. Aşağıdaki arzu edilebilirlik fonksiyonu, ee ve cr yanıtlarını maksimize etmek için ifade edilir:

$$d_i(\hat{y}_i) = \begin{cases} 0, & \hat{y}_i < L_i \\ \left(\frac{\hat{y}_i - L_i}{T_i - L_i} \right)^r, & L_i \leq \hat{y}_i \leq T_i \\ 1, & \hat{y}_i > T_i \end{cases} \quad (5)$$

Burada doğrusal durumlarda $r=1$ 'dir. Ayrıca, L_i ve T_i sırasıyla i . Düşük ve hedef değerlerdir. 0 ile 1 arasında değişen tek bir arzu edilebilirlik indeksi (D), her bir arzu edilebilirlik fonksiyonu göz önünde bulundurulurken birden çok yanıtı optimize etmek için kullanılmıştır. Tek arzu edilebilirlik fonksiyonu, aşağıdaki gibi arzu edilebilirlik fonksiyonlarının ağırlıklı geometrik ortalaması (Denklem (5)) ile hesaplanır:

$$D = \left(\prod_{i=1}^2 d_i(\hat{y}_i)^{p_i} \right)^{1/\sum_{i=1}^2 p_i} \quad (6)$$

Burada p_i arzu edilebilirlik fonksiyonunun ağırlığıdır ve $\sum_{i=1}^2 p_i = 1$ 'dir. Bu çalışmada, istenen yanıtları (ee ve cr) aynı anda maksimize etmek için bağımsız değişkenlerin düzeylerini elde etmek için amaçlanmıştır. Bu nedenle, önerilen optimizasyon modeli şu şekilde ifade edilir (denklem 7):

$$\begin{aligned} \text{maximize } D &= \left(\prod_{i=1}^2 d_i(\hat{y}_i)^{p_i} \right)^{1/\sum_{i=1}^2 p_i} \\ \text{subject to } &LB_i \leq x_i \leq UB_i \end{aligned} \quad (7)$$

Burada LB_i ve UB_i , sırasıyla i 'inci bağımsız değişkenin i . alt ve üst sınırlarıdır. Tablo 8, ee ve cr yanıtları için BB deneysel tasarım modeli istatistiklerini ve varyans analizini (ANOVA) göstermektedir.

Tablo 8. *Ee ve cr Yanıtları İçin Box-Behnken Deneysel Tasarım Modeli İstatistikleri ve ANOVA Analizleri*

Kaynak (ee/cr)	Std. Sapma	R^2	R^2_{adj}	R^2_{pre}	Press ^b	
Doğrusal	1.27/1.21	0.1794/0.0639	0.0302/-0.1063	0.47423/-0.2891	49.27/44.21	
Doğrusal ve Etkileşim	1.46/1.31	0.2134/0.1969	-0.2783/-0.305	-0.9204/-0.8378	83.22/63.03	
Kuadratik	1.01/0.7724	0.7157/0.5478	0.3839/0.5478	-0.6377/-0.2023	70.97/41.24	
Kübik (İleri) ^a	0.8753/0.5525	0.6817/0.8843	0.5403/0.7686	0.2839/0.3118	31.03/23.60	
Kaynak (ee/cr)	Katsayı tahmini	Karelerin toplamı	Serbestlik derecesi	Karelerin ortalaması	F değeri	p değeri
Model (İntersept)	3.48/4.60	29.54/30.33	8/13	3.69/2.33	4.82/7.64	0.0027/0.004
x_1 -pH	0.2738/0.0697	0.8993/0.0388	1/1	0.8993/0.0388	1.17/0.1272	0.2929/0.270
x_2 -Sıcaklık	-0.7265/-0.2373	6.33/0.6758	1/1	6.33/0.6758	8.27/2.21	0.0101/0.1606
x_3 - İnkubasyon süresi	0.186/-0.1491	0.4151/0.1778	1/1	0.4151/0.1778	0.5417/0.5825	0.4712/0.4590
x_4 -Çalkalama hızı	0.1029/0.0384	0.1271/0.0177	1/1	0.1271/0.0177	0.1659/0.0581	0.6886/0.8133
x_1x_2	-/-0.9357	-/3.50	-/1	-/3.50	-/11.48	-/0.0049
x_1x_3	-/0.3204	-/0.4106	-/1	-/0.4106	-/1.35	-/0.2670
x_1x_4	-/0.1132	-/0.0512	-/1	-/0.0512	-/0.1678	-/0.6887
x_1^2	-0.7106/-0.4380	2.69/1.02	1/1	2.69/1.02	3.51/3.35	0.0771/0.901
x_2^2	-1.92/-1.29	19.6/8.94	1/1	19.6/8.94	25.58/29.29	<0.0001/0.0001
x_3^2	-0.9792/-1.39	5.11/10.24	1/1	5.11/10.24	6.67/33.55	0.0187/<0.0001
x_4^2	-1.19/-1.54	7.57/12.71	1/1	7.57/12.71	9.88/41.63	0.0056/<0.0001
$x_1^2x_3$	-/0.9455	-/2.38	-/1	-/2.38	-/7.81	-/0.0152
$x_1x_4^2$	-/0.7261	-/1.41	-/1	-/1.41	-/4.61	-/0.0513
Artıklack of f		13.79/3.79	18/13	0.7662/0.3052		
Uyum eksikliği		13.79/3.79	16/11	0.862/0.3607		Önemli değil
Saf hata		0.00/0.00	2/2	0.00/0.00		
Kor toplamı		43.33/34.30	26/26			
Std. Sapma	0.8753/0.5525					
Ortalama	1.34/2.52					
C.V. %	65.14/21.89					
Yeterli Hassasiyet	7.7914/7.8342					

^a Diğer terimler ileri seçim yöntemi kullanılarak seçilen kübik modelden çıkarıldı

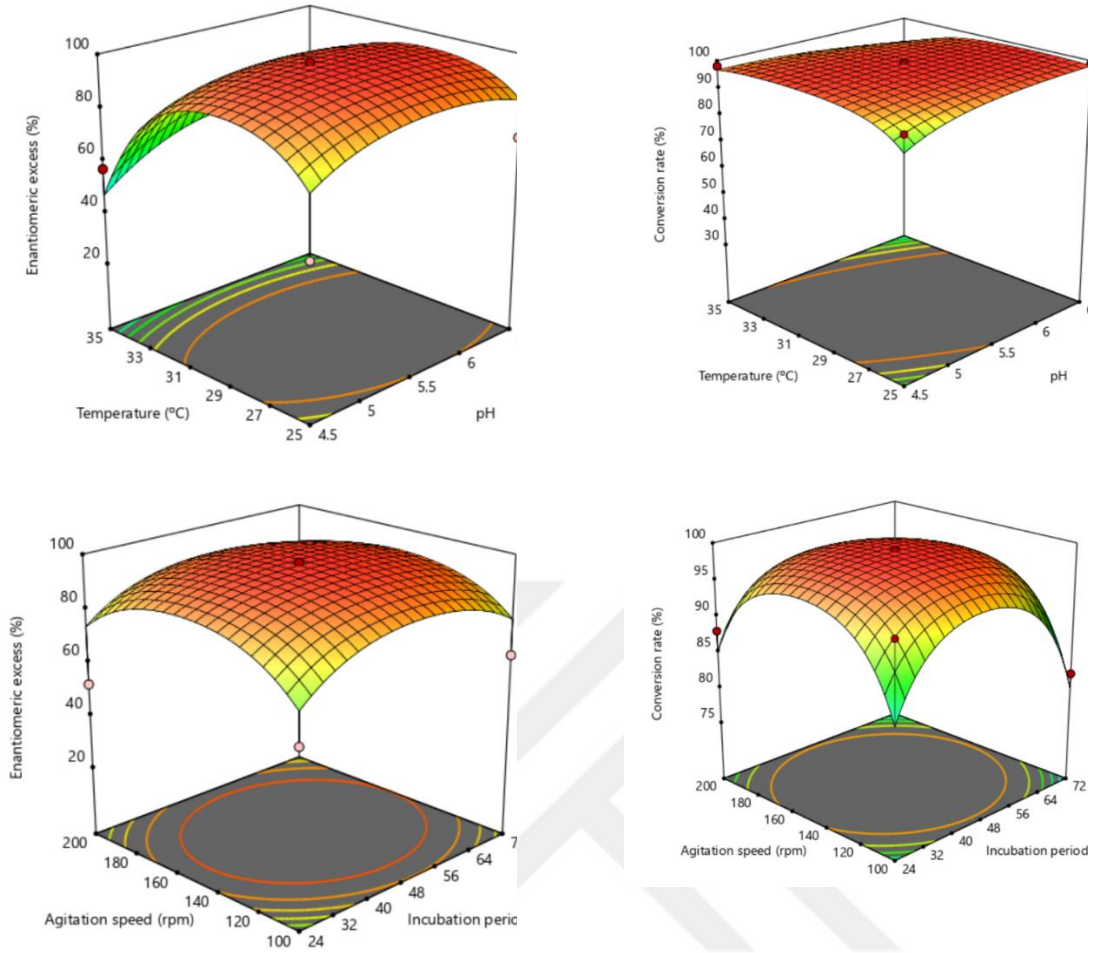
^b 1.000 kaldırılmış durum(lar): Pres istatistikleri belirtilmemiş

Ayarlanmış belirleme katsayısını (R_{adj}^2) ve mutlak tahmin edilen belirleme katsayısını (R_{pre}^2) maksimize eden modele odaklandık. Tablo 3. 1. 2'de, tasarım değişkenlerinin yanıtlar üzerindeki etkisini analiz etmek için en iyi tahmin yeteneği kübik model ile bulunabilir, çünkü model maksimum R_{adj}^2 ve R_{pre}^2 sahiptir ve diğer modellerle karşılaştırılmıştır. Ayrıca cr yanıtı için maksimum belirleme katsayısı (R^2) elde edilmiştir. R^2 ayrıca ee yanıtı için yeterince iyidir. Aksine, tam kübik model yeterince ifade edilmedi; bu nedenle, önemli model terimleri eklemek için ileri seçim regresyonu (FSR) kullanıldı. FSR yöntemi, $p < 0.1$ seviyelerinde model terimleri eklemek için uygulandı. Gerçek değerler açısından ee ve cr yanıtlarının indirgenmiş kübik modelleri aşağıdaki gibi gösterildi:

$$\begin{aligned}
 & \text{Logit } \hat{y}_1 \text{ (ee, \%)} \\
 & = \text{Ln} \left[\frac{(\text{ee}(\%) + 0.00)}{(100.00 - \text{ee}(\%))} \right] \\
 & = -99.49 + 8.09 * x_1 + 4.46 * x_2 + 0.17 * x_3 + 0.15 * x_4 \\
 & \quad - 0.71 * x_1^2 - 0.08 * x_2^2 - 0.002 * x_3^2 - 0.0005 * x_4^2
 \end{aligned} \tag{8}$$

$$\begin{aligned}
 & \text{Logit } \hat{y}_2 \text{ (cr, \%)} \\
 & = \text{Ln} \left[\frac{(\text{cr}(\%) + 0.00)}{(100.00 - \text{cr}(\%))} \right] \\
 & = -192.11 + 36.86 * x_1 + 4.09 * x_2 + 1.34 * x_3 + 0.65 * x_4 \\
 & \quad - 0.19 * x_1 * x_2 - 0.42 * x_1 * x_3 - 0.08 * x_1 * x_4 - 2.33 * x_1^2 - 0.05 * x_2^2 \\
 & \quad - 0.002 * x_3^2 - 0.002 * x_4^2 + 0.04 * x_1^2 * x_3 + 0.0003 * x_1 * x_4^2
 \end{aligned} \tag{9}$$

Ee ve cr yanıtlarını modellemek ve optimize etmek için eşitlikler (8) ve (9) kullanıldı. Bağımsız değişkenlerin etkisini göstermek için Şekil 3.1.1'deki üç boyutlu grafikler ve kontur grafikleri kullanılarak görselleştirilmiştir.



Şekil 21. Ph, sıcaklık, çalkalama hızı ve inkübasyon süresinin ee ve dönüşüm üzerine etkisi.

Bağımsız değişkenlerin seviyelerinin yaklaşık olarak deneysel tasarım uzayının ortasında yer aldığı ee tepki değeri maksimize edilmiştir. Benzer şekilde, maksimum cr yanıt değeri, bağımsız değişkenlerin yaklaşık orta seviyelerinin seçildiği yerde elde edilmiştir. Bağımsız değişkenler, denklem 7 eşitliğindeki önerilen optimizasyon modeli kullanılarak optimize edilmiştir. Önerilen optimizasyon modelinin amacı, yanıt değerlerini (ee ve cr) aynı anda maksimize etmektir. Tablo 9’da önerilen optimizasyon modelinin sonuçlarını göstermektedir.

Tablo 9. Eşitlik (7) ’De Önerilen Optimizasyon Modelinin Sonuçları

Amaç	Bağımsız değişkenler				Yanıtlar		Arzu edilebilirlik değeri (D)
	pH	Sıcaklık °C	Inkübasyon süresi (h)	Çalkalama hızı (rpm)	ee (%)	cr (%)	
Maksimum	5.80	29	50	155	97.3	99.0	1.000

Design-Expert Yazılımı (Stat-Ease Inc., Sürüm 12.0.3.0 64-bit Minneapolis, MN 55413 ABD) deneysel verileri analiz etmek, modellemek ve optimize etmek ve üç boyutlu grafiklerin grafiğini çizmek için kullanılmıştır.



DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

Bulgular

Kromatografik Ayırmalar.

Kolon kromatografisi.

Silikajel 60 (70-230 Mesh) ASTM (Merck)

İnce tabaka kromatografisi.

Silikajel 60 (HF 254+366) (Merck)

Spektrumlar.

¹H-NMR spektrumları.

¹H-NMR 400 MHz Spektrometre (Bruker)

¹³C-NMR spektrumları.

¹³C-NMR 100 MHz (Bruker)

HPLC spektrumları.

Kiral detektöre sahip Agilent 1260 HPLC sistem.

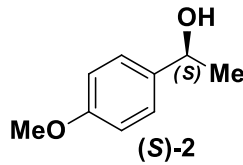
Genel

Bu çalışmada kullanılan substratlar, bakteri suşunun büyüme ortamı olan MRS ve çözücüler Fluka ve Sigma-Aldrich'ten satın alındı. Elde edilen alkol 2'nin saflaştırılması, kolon kromatografisi ile gerçekleştirildi ve ürün, etil asetat/heksan (10:90) çözücü karışımı kullanılarak saflaştırıldı. Reaksiyonun ilerleyişi mobil faz olarak heksan: etil asetat (10:90) çözücü karışımı kullanılarak TLC ile belirlendi. Rasemik alkol 2, substratın oda sıcaklığında metanol içinde sodyum borohidür ile indirgenmesiyle hazırlandı. Ürünün optik rotasyon çevirme açıları için Bellingham + Stanley (ADP220, 589 nm) spektropolarimetresi kullanıldı. Dönüşüm oranı, ham ürünün kiral alkol ile aynı şartlar altında HPLC analizinden sonra keton pikinin alkol pikiyle karşılaştırılmasıyla hesaplandı.

Genel asimetrik indirgenme prosedürü.

5 ml steril MRS broth besiyeri ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 11.5% (w/v), K_2HPO_4 2 g/L, pepton [Oxoid] 10 g/L, yeast extract 2% glucose, [Difco] 5 g/L, $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 5 g/L, salt solution [$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 11.5% (w/v), triamonium citrate 2 g/L], Tween 80 1 mL/L) içerisine gliserol stoktan 50 μl *Lactobacillus senmaizuke* bakterisi ilave edilerek 2 gün 37°C’de ön geliştirme işlemine tabi tutuldu. Ön geliştirme işleminden sonra, 100 mL’lik steril MRS broth besiyerine 1 mL *Lactobacillus senmaizuke* bakteri suşu eklenerek 37°C’de 1 gün daha geniş hacimde geliştirme işlemi gerçekleştirildi. Gelişimi tamamlanan *Lactobacillus senmaizuke* bakteri suşu 2 saat, 29°C ve 155 rpm karıştırma hızı ile karıştırıldı. 2 saat sonunda pH 5.8’e ayarlanarak 2 saat daha aynı şartlarda karıştırıldı. Belirlenen sürenin sonunda 1 mmol substrat reaksiyon ortamına eklenerek aynı şartlar altında 50 saat karıştırıldı. Reaksiyon bittikten sonra karışım santrifüjlenerek sıvı kısım ayrıldı. Sıvı kısım diklorometan ile ekstrakte edildi. Organik faz susuz Na_2SO_4 ile kurutuldu ve çözücünün rotari evaporatörde düşük basınç altında uzaklaştırılması ile ham ürün elde edildi. Ham ürünün HPLC’de alkol ile aynı şartlarda analiz edilerek keton piki ile alkol piklerinin karşılaştırılması sonucu dönüşümler belirlendi. Geriye kalan ham ürün kolon kromatografisinde üzerinden etil asetat-hekzan (10:90) çözücü karışımı ile saflaştırılma yapıldı. Elde edilen kiral alkol NMR ile karakterize edildi ve enantiyomerik aşırılıkl kiral detektöre sahip HPLC ile belirlendi.

(S)-1-(4-metoksifenil)etanol (S)-2 (Şahin, 2017).



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 7.30-7.27 (m, 2H), 6.89-6.85 (m, 2H), 4.83 (q, J = 6.4 Hz, 1H), 3.79 (s, 3H), 2.11 (bs, OH), 1.46 (d, J = 6.5 Hz, 3H) (EK-2, Şekil-1).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 158.9, 138.0, 126.7, 113.8, 69.9, 55.3, 25.0; (EK-2, Şekil-1).

Çevirme açısı: $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -61.6$ (c 1.0, CHCl_3)

Enantiyomerik aşırılık: >%99

Verim: %96

Rasemik 2 için HPLC şartlar: Chiralcel OD-H kolon, n-hekzan/i-PrOH, 95:5 akış hızı 0.8 mL/dak., 220 nm. Alıkonma zamanları: 15.7 dak. (*R* enantiyomer), 17.7 dak. (*S* enantiyomer) (EK-1, Şekil-1)

(S)-2 için HPLC şartları: Chiralcel OD-H kolon, n-hekzan/i-PrOH, 95:5 akış hızı 0.8 mL/dak., 220 nm. Alıkonma zamanları: 17.7 dak. (*S* enantiyomer) (EK-1, Şekil-2).

Keton 1 için HPLC şartları: Chiralcel OD-H kolon, n-hekzan/i-PrOH, 95:5 akış hızı 0.8 mL/dak., 220 nm. Alıkonma zamanı: 11.2 dak. (EK-1, Şekil-3).



BEŞİNCİ BÖLÜM

Sonuç, Tartışma ve Öneriler

Sonuç

Bu çalışma, *Lactobacillus senmaizukei* biyokatalizörü tarafından 4-metoksiasetofenon'un 1-(4-metoksifenil) etanole asimetric indirgenmesini göstermektedir. Box-Behnken deneysel tasarıma dayalı optimizasyon yöntemi, ee ve dönüşüm değerleri üzerine etki eden pH, sıcaklık, inkübasyon süresi ve karıştırma hızını gibi reaksiyon şartlarının optimizasyonu için uygulandı. Bulgular sadece her tasarım faktörünün önemini göstermekle kalmadı, aynı zamanda tasarım faktörlerinin ee ve cr yanıtlarının değerleri üzerindeki etkileşimini ve ikinci dereceden etkilerini ortaya koymaktadır. *Lactobacillus senmaizukei* için önerilen optimizasyon modeli kullanılarak optimum çalışma koşulları pH 5,80, 29°C sıcaklık, 50 saat inkübasyon süresi ve 155 rpm çalkalama hızı olarak elde edildi. Ayrıca, bu tahmin edilen şartlarda altında ee'nin % 97.3 ve dönüşümün %99 olabileceği tahmin edildi. Model tarafından belirlenen şartlar altında yapılan deney sonucunda (S)-1-(4-metoksifenil) etanol % 99 ee ve %99 dönüşüm oranı ile elde edilmiştir. Bu bulgular, bu biyokatalizörleri ile asimetric indirgenme reaksiyonu için önerilen optimizasyon modelinin önemini göstermektedir. Ayrıca, (S)-1-(4-metoksifenil) etanol enantiyo saf olarak elde edilmiştir ve bu bileşik genel alerjik tepkileri tedavi etmek için kullanılan sikloalkil[b]indollerin sentezi için anahtar bir kiral yapı bloğudur. Böylece önemli bir ilaın başlangıç maddesi olan (S)-1-(4-metoksifenil) etanol'un sentezi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Literatürde 4-metoksiasetofenon'un bir matematiksel optimizasyon metodu kullanılarak biyokatalitik asimetric indirgenmesi bilinmemektedir. Dolayısıyla bu çalışma bu boşluğu doldurmaktadır.

Tartışma

Enzimler tarafından katalize edilen biyotransformasyon sistemleri, yeşil kimya endüstrisinde önemli ara ürünlerin üretimi için yararlı bir araç haline gelmiştir. Bir enzimatik reaksiyonun bir sonucu olarak asimetric sentez yoluyla enantiyomerik olarak saf bileşiklerin üretimi, biyokatalizörler için başarılı bir uygulamadır. Ketonların asimetric indirgenmesi, organik moleküllerin sentezinde önemli bir süreçtir. Prokiral moleküllerin asimetric indirgenmesiyle elde edilen kiral alkoller, ilaç endüstrisi, tarım kimyası ve tatlandırıcıların sentezinde kullanılmaktadır. Günümüzde araştırmacılar, istenen konfigürasyonda ve enantiyomerik saflıkta ürünler elde etmek için birçok farklı enzimle çalışıyorlar.

Mikroorganizmaların bir enzim kaynağı olarak kullanılması, dışarıdan pahalı kofaktörlerin eklenmesini gerektirmediğinden avantajlıdır. Biyokatalizörlerin tüm hücre uygulamaları temel olarak biyokatalizörlerin pH, sıcaklık, inkübasyon süresi ve çalkalama hızı gibi kültürel koşullarına bağlıdır ve en yüksek verimi ve enantiyomerik fazlalığı elde etmek için bu parametrelerin optimize edilmesi gerekir (Hage, Petra, Field, Schipper, Wijnberg, Kamer, & Schoemaker, 2001, s.1029; Wu, & Liang, 1999, s.339). Bu parametreler enzimin seçiciliği için çok önemlidir. En iyi mikrobiyal suşun seçilmesinin, biyo-redüksiyon ve güvenlik açısından da çok önemli bir adım olduğu ve Laktik Asit Bakterilerinin (LAB), GRAS durumları nedeniyle tüm hücre uygulamaları için önemli mikrobiyal gruplardan biri olduğu da unutulmamalıdır (Wu & Liang, 1999, s.339). Bu nedenle, bu çalışmada, *Lactobacillus senmaizukei* bir LAB suşu olarak, 4-metoksiasetofenonun biyo redüksiyonu için bir tam hücre biyokatalizörü olarak kullanılmıştır. En yüksek enantiyomerik fazlalık ve dönüşüm oranı değerlerini elde etmek için optimizasyon parametrelerini belirlemek için Box-Behnken tasarım tabanlı optimizasyon stratejisi kullanılmıştır. Deneysel tasarımın diğer yöntemlere göre avantajı, tüm parametrelerin aynı anda değiştirilebilmesidir. Klasik optimizasyon çalışmalarında her parametre bağımsız olarak incelenebilir. Bu, çok sayıda deney gerektirdiğinden çok fazla tercih edilen bir yöntem değildir. Tablo 7, tasarım faktörleri için BB deneysel tasarım matrisini ve her deneysel durumda bulunan ee ve cr oranı değerlerini göstermektedir. BB deney tasarımında bağımsız değişkenler olarak bu deney koşulları pH 4.5-6.5, sıcaklık 25-35 °C, inkübasyon süresi 24-72 saat ve karıştırma hızı 100-200 rpm dir. Ayrıca ee ve cr değerleri farklı deneysel çalışmalarda elde edilmiştir. Örneğin, Tablo 7'deki ilk randomizasyon çalışmasında, 4-metoksiasetofenonun 1-(4-metoksifenil) etanol'e indirgenmesi için pH 4.5, 30°C sıcaklık, 48 saat inkübasyon süresi ve 100 rpm çalkalama hızı şartları altında elde edilen deneysel değerler %68 ee ve %80 dönüşüm oranıdır. İkinci randomizasyon çalışmasında deneysel koşullar pH 6.5, 30°C sıcaklık, 24 saat inkübasyon süresi ve 150 rpm çalkalama hızında bu yanıt değerleri %92 ee ve %84 dönüşüm oranına çıkarılmıştır. 7'de, dönüşüm yanıt değerlerinin genellikle farklı deneysel çalışmalarda ee yanıt değerlerinden daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Tablo 8, Box-Behnken deneysel tasarım istatistiklerini ve çok düşük olasılıklı (0.0027 ve 0.0004) *F*-test değerlerini göstermektedir. Dolayısıyla bu düşük olasılıklar, modellerin deneysel sonuçları tahmin edebildiğini ve bağımsız değişkenlerin anlamlı kombinasyonlara sahip olduğunu göstermektedir. İndirgenmiş kübik model, doğrusal, doğrusal ve etkileşim ve ikinci dereceden modellere kıyasla maksimum R_{adj}^2 ve R_{pre}^2 ve en düşük standart sapmalara sahiptir. Ayrıca, indirgenmiş kübik model, cr yanıtı için maksimum R^2 'ye sahiptir. Uyum eksikliği değerleri

önemli olmamalıdır. Bu çalışmada uyumsuzluk değerlerinin anlamlı olmadığı görülmüştür. Bu nedenle, model deneysel sonuçları tahmin etme konusunda iyi bir yeteneğe sahipti. İndirgenmiş kübik model, deneysel tasarım değişkenlerinin belirtilen aralıktaki yanıtlar üzerindeki etkisini analiz etmek için yeterlidir (Strauss *vd.*, 1998, s.108). Enantiyomerik aşırılık ve dönüşüm modelleri için belirleme katsayıları sırasıyla 0.6817 ve 0.8843 dir. Bu değerler, deneysel ve tahmin edilen sonuçlar arasında bir korelasyon olduğunu göstermektedir. Yeterli değerinin 4'ten büyük olması istenmektedir. Tablo 8'de yeterli kesinlik değerleri ee ve cr yanıtları için sırasıyla 7.7914 ve 7.8342'dir. Bu değerler 4'ten büyüktür, bu nedenle, azaltılmış kübik modeller deneysel tasarım alanında gezinmek için kullanılabilir. Ayrıca Tablo 8'de ee ve cr yanıtları için katsayı ve varyans (% CV) sırasıyla 65.14 ve 21.89'dur. Bu C.V. değerler deneysel tasarımın güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini göstermektedir (Strauss *vd.*, 1998, s.115). Tablo 8'de ee ve cr yanıtları üzerindeki doğrusal, etkileşim ve ikinci dereceden etki terimleri arasındaki ilişkiler ANOVA sonuçları kullanılarak sunulmuştur. P değerleri 0,05'ten küçük olduğunda, tasarım değişkenlerinin etki terimleri yanıt değerlerini (ee ve cr) önemli ölçüde değiştirmektedir. Box-Behnken deneysel tasarım modellerinin F değerleri ee ve cr yanıtları için sırasıyla 4,82 ve 7,64'tür. Bu nedenle, bu değerler modellerin önemini ortaya koydu. Enantiyomerik aşırılık yanıtı için, kesişme noktası, doğrusal terim [sıcaklık (x_2)] ve ikinci dereceden terimler [sıcaklık (x_2^2), inkübasyon süresi (x_3^2) ve çalkalama hızı (x_4^2)], düşük p değerleri nedeniyle önemli etkilerdir. Aynı çizgiler boyunca, kesişme, etkileşim terimi [ph * sıcaklık ($x_1 * x_2$)], ikinci dereceden terimler [sıcaklık (x_2^2), inkübasyon süresi (x_3^2) ve çalkalama hızı (x_4^2)] ve kübik terimler [(pH) 2 * inkübasyon süresi ($x_1^2 * x_3$)], cr tepki değerleri üzerinde önemli etkilere sahiptir. Yanıt değerlerinin (ee ve cr) maksimizasyonu için en çok istenen çözüm 1.000'dir. Optimum çalışma koşulları sırasıyla % 97.3 ve % 99.0 maksimum ee ve cr değerlerini bulmak için pH 5.80, 29 C sıcaklık, 50 saat inkübasyon süresi ve 155 rpm çalkalama hızı olarak bulundu. Bu optimum çalışma koşulları altında, tahmin edilen kültür faktörleri test edildi ve ee ve cr değerlerinin sırasıyla >% 99 ve >% 99 olduğu gözlemlendi. Bu nedenle, önerilen optimizasyon modelinin sonuçları karşılaştırılabilir ve deneysel verilerin yanıt değerleri ile uyumlu olduğunu göstermektedir. Ayrıca önerilen optimizasyon modeli değerleri, her bir faktörün biyoindirgenme reaksiyonundaki rolünü göstermede başarılı olmuştur. Sonuçlar, önerilen optimizasyon modelinin, tam hücre uygulamaları ile biyoindirgenme reaksiyonları için maksimum ee ve cr değerlerini elde etmek için önemli olduğunu göstermektedir. Şekil 21. pH, sıcaklık, inkübasyon süresi ve çalkalama hızı gibi bağımsız değişkenlerin seçicilik ve dönüşüm

üzerine etkisini gösteren üç boyutlu grafikleri ve yansıtılan kontur çizimlerini temsil etmektedir. İnkübasyon süresi ve karıştırma hızının hem dönüşüm hemde seçiciliğe etkisi açık bir şekilde görülmektedir. Karıştırma hızı 155 rpm'e kadar hem dönüşüm hem de ee değerinde artışa sebep olmuştur. 155 rpm'den sonra ise hem dönüşüm hem de ee'nin düştüğü görülmektedir. Bu da muhtemelen reaksiyon süresi arttıkça ve karıştırma hızı arttıkça enzimin üç boyutlu yapısının bozulması sonucu enzimin hem aktivitesinin düştüğü hem de seçiciliğinin düşmesi ile açıklanabilir. Şekil 3.1.1'den de görüleceği üzere pH'nın seçicilik ve dönüşüm üzerine etkisinin az olduğu görülmektedir. Sıcaklığı dönüşüm üzerine etkisinin fazla olmadığı ve bunun aksine sıcaklığın seçicilik üzerine etkisinin oldukça fazla olduğu görülmektedir. Sıcaklık artması ile seçiciliğin önemli ölçüde azaldığı görülmektedir. Bu da yüksek sıcaklıklarda enzimlerin inhibe olmaları ile açıklanabilir.

Öneriler

Optimizasyon şartları BB ile belirlenerek kullanılan *Lactobacillus senmaizukei* biyokatalizörü ile kiral sekonder alkol (S)-1-(4-metoksifenil) ethanol optikçe saf olarak elde edilmiştir. 4-metoksiasetofenonun biyoindirgenme etkinliği, kültür parametrelerinin ikinci dereceden ve doğrusal etkilerinden önemli ölçüde etkilenmiştir. Bu sonuçlar, katalitik biyoreduksiyon reaksiyonları için kültür optimizasyon parametrelerinin rolünü ve bu parametreleri optimize etmek için Box-Behnken yönteminin etkinliğinin çok önemli olduğunu göstermektedir. *Lactobacillus senmaizukei* biyokatalizörünün prokiral keton 4-metoksiasetofenon'un asimetric indirgenmesinde başarılı olduğu gösterilmiştir. *Lactobacillus senmaizukei* biyokatalizörü kullanılarak farklı prokiral ketonların asimetric indirgenmesi gerçekleştirilebilir. Ayrıca bir biokatalitik asimetric indirgenme reaksiyonunda kullanılan BB optimizasyon stratejisinde farklı biyokatalizörler ve substratlar için kullanılabileceği gösterilmiştir. Laboratuvar ölçekte yapılan bu çalışmada elde edilen sonuçlar kullanılarak endüstriyel ölçekte üretimler yapılabilir ve ayrıca bu sonuçlar enantiyomerik saflıkta kiral madde üretimine ışık tutacaktır. Ayrıca bu tez çalışması ile *Lactobacillus senmaizukei* biyokatalizörünün prokiral substratların kiral karbinol bileşiklere asimetric indirgenme reaksiyonlarında toksik ve çevreye zararlı olabilecek kimyasal katalizörler yerine çevre dostu, bir biyokatalizör olarak kullanılabileceği gösterilmiştir.

KAYNAKÇA

- Adlercreutz, P. (1991). Asymmetric reduction of ketones with enzymes from acetic acid bacteria. *Biotechnology letters*, 13(4), 229-234. <https://doi.org/10.1007/BF01041475>
- Aklan, A. P. Y., & Bayraktar, E. T. D. (2007). *Enantiyomerik saflukta 1-fenil-1-propanolün lipaz katalizörlüğünde esterleşme tepkimesi ile biyoreaktörde kinetik rezolüsyonu* (Yüksek Lisans Tezi). Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi'nden edinilmiştir. (Tez No. 213766)
- Ananthanarayanan, V. S., Tetreault, S., & Saint-Jean, A. (1993). Interaction of calcium channel antagonists with calcium: spectroscopic and modeling studies on diltiazem and its Ca²⁺ complex. *Journal of medicinal chemistry*, 36(10), 1324-1332. <https://doi.org/10.1021/jm00062a004>
- Andrade, L. H., Utsunomiya, R. S., Omori, A. T., Porto, A. L., & Comasseto, J. V. (2006). Edible catalysts for clean chemical reactions: Bioreduction of aromatic ketones and biooxidation of secondary alcohols using plants. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 38(2), 84-90.
- Atkins, R. C., & Carey, F. A. (1997). *Organic chemistry: a brief course*. McGraw-Hill Book Company Limited.
- Babaarslan, Ç. (2008). *Biyokatalitik olarak enantiyoseçimli α -hidroksi keton üretim prosesinin geliştirilmesi* (Doktora Tezi). Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi'nden edinilmiştir. (Tez No. 233032)
- Bin Halmi, M. I. E., Abdullah, S. R. S., Wasoh, H., Johari, W. L. W., bin Mohd Ali, M. S., Shahrudin, N. A., & Shukor, M. Y. (2016). Optimization and maximization of hexavalent molybdenum reduction to Mo-blue by *Serratia* sp. strain MIE2 using response surface methodology. *Rendiconti Lincei*, 27(4), 697-709. <https://doi.org/10.1007/s12210-016-0552-4>
- Blaschke, G. (1980). Chromatographic resolution of racemates. New analytical methods (17). *Angewandte Chemie International Edition in English*, 19(1), 13-24. <https://doi.org/10.1002/anie.198000131>
- Böhringer, M., Morgenstern, K., Schneider, W. D., & Berndt, R. (1999). Separation of a racemic mixture of two-dimensional molecular clusters by scanning tunneling microscopy. *Angewandte Chemie International Edition*, 38(6), 821-823. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19990315\)38:6%3C821::AID-ANIE821%3E3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19990315)38:6%3C821::AID-ANIE821%3E3.0.CO;2-A)
- Bräutigam, S., Dennewald, D., Schürmann, M., Lutje-Spelberg, J., Pitner, W. R., & Weuster-Botz, D. (2009). Whole-cell biocatalysis: Evaluation of new hydrophobic ionic liquids for efficient asymmetric reduction of prochiral ketones. *Enzyme and Microbial Technology*, 45(4), 310-316.
- Brondani, P.B., Guilmoto, N. M.A.F., Dudek, H.M., Fraaije, & Andrade, M.W. (2012). Chemoenzymatic approaches to obtain chiral-centered selenium compounds. *Tetrahedron*, 68(51), 10431-10436.
- Buharalıoğlu, C. K., & Buharalıoğlu, G. Y. (1960). Talidomit faciasının farmakovijilans etkinliklerinin gelişimi üzerine etkisi. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 12(1), 136-142. <https://doi.org/10.26559/mersinsbd.474682>

- Bunnett, J. F. (1999). Organic chemistry: a short course. *Journal of Chemical Education*, 76(10), 1341. <https://doi.org/10.1021/ed076p1341.1>
- Çağlar, K. (2009). *Bazı indol türevlerinin kemoenzimatik sentezleri* (Yüksek Lisans Tezi). Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi'nden edinilmiştir. (Tez No. 244088)
- Çolak, N. S., Şahin, E., Dertli, E., Yilmaz, M. T., & Taylan, O. (2019). Response surface methodology as optimization strategy for asymmetric bioreduction of acetophenone using whole cell of *Lactobacillus senmaizukei*. *Preparative biochemistry & biotechnology*, 49(9), 884-890. <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1633668>
- Dreamstime. (2017, August 8). *Polarimeter scheme*. <https://www.dreamstime.com>, (18.08.2017).
- Gelo-Pujic, M., Le Guyader, F., & Schlama, T. (2006). Microbial and homogenous asymmetric catalysis in the reduction of 1-[3, 5-bis (trifluoromethyl) phenyl] ethanone. *Tetrahedron: Asymmetry*, 17(13), 2000-2005.
- Ghanem, A. ve Aboul-Enein, H.Y. (2004). Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents. *Tetrahedron: Asymmetry*, 15(21), 3331-3351.
- Goretti, M., Branda, E., Turchetti, B., Cramarossa, M. R., Onofri, A., Forti, L., & Buzzini, P. (2012). Response surface methodology as optimization strategy for asymmetric bioreduction of (4S)-(+)-carvone by *Cryptococcus gastricus*. *Bioresource technology*, 121, 290-297.
- Goswami, A., Mirfakhrae, K. D., Totleben, M. J., Swaminathan, S., & Patel, R. N. (2001). Microbial reduction of α -chloroketone to α -chlorohydrin. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 26(5), 259-262. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000080>
- Hage, A., Petra, D. G., Field, J. A., Schipper, D., Wijnberg, J. B., Kamer, P. C., & Schoemaker, H. E. (2001). Asymmetric reduction of ketones via whole cell bioconversions and transfer hydrogenation: complementary approaches. *Tetrahedron: Asymmetry*, 12(7), 1025-1034.
- Hatzakis, N. S., & Smonou, I. (2005). Asymmetric transesterification of secondary alcohols catalyzed by feruloyl esterase from *Humicola insolens*. *Bioorganic chemistry*, 33(4), 325-337.
- Homann, M. J., Vail, R. B., Previte, E., Tamarez, M., Morgan, B., Dodds, D. R., & Zaks, A. (2004). Rapid identification of enantioselective ketone reductions using targeted microbial libraries. *Tetrahedron*, 60(3), 789-797.
- Hussain, W., Pollard, D. J., & Lye, G. J. (2007). The bioreduction of a β -tetralone to its corresponding alcohol by the yeast *Trichosporon capitatum* MY1890 and bacterium *Rhodococcus erythropolis* MA7213 in a range of ionic liquids. *Biocatalysis and Biotransformation*, 25(6), 443-452. <https://doi.org/10.1080/10242420701568534>
- Johannes, T., Simurdiak, M. R. ve Zhao, H. (2005). *Biocatalysis department of chemical and biomolecular engineering*. University of Illinois, Urbana.
- Karadeniz, F., (2006). *Rasemik 1-fenil-1-propanolün lipaz katalizli enantiyo seçimli esterleşme tepkimesi* (Yüksek Lisans Tezi). Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi'nden edinilmiştir. (Tez No. 233775)

- Kazıcı, H. C., Bayraktar, E., & Mehmetoglu, Ü. (2016). Optimization of the asymmetric synthesis of chiral aromatic alcohol using freeze-dried carrots as whole-cell biocatalysts. *Green Processing and Synthesis*, 5(2), 131-137. <https://doi.org/10.1515/gps-2015-0118>
- Kazıcı, H. Ç., & Mehmetoğlu, Ü. (2015). Enantiyomerik Olarak Saf Sekonder Alkollerin Üretiminde Bitki Biyokatalizörlerin Kullanımı. *Gazi Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 30(1), 50-56. <https://doi.org/10.17341/gummfd.39953>
- Kordikowski, A., York, P. and Latham, D. (1999). Resolution of ephedrine insupercritica co2: a novel technique for seperation of chiral drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88, 786-791. <https://doi.org/10.1021/js980459f>
- Kumaraswamy, G., & Ramesh, S. (2003). Soaked Phaseolus aureus L: an efficient biocatalyst for asymmetric reduction of prochiral aromatic ketones. *Green chemistry*, 5(3), 306-308.
- Kurbanoglu, E. B., Zilbeyaz, K., Kurbanoglu, N. I., & Taskin, M. (2007). Highly enantioselective reduction of acetophenone by locally isolated Alternaria alternata using ram horn peptone. *Tetrahedron: Asymmetry*, 18(13), 1529-1532.
- Llona-Minguez, S., Ghassemian, A., Helleday, T. (2015). Lysophosphatidic acid receptor (LPA) modulators: the current pharmacological toolbox. *Progress in Lipid Research*. 58, 51–75.
- Lou, W., Wang, W., Smith, T.J. & Zong, M. H. (2009). Biocatalytic anti-Prelog stereoselective reduction of 4'-methoxyacetophenone to (R)-1-(4-methoxyphenyl)ethanol with immobilized Trigonopsis variabilis AS2.1611 cells using an ionic liquid-containing medium, *Green Chemistry*, 11(9) 1377–1384.
- Lou, W. Y., Wang, W., Li, R. F., & Zong, M. H. (2009). Efficient enantioselective reduction of 4'-methoxyacetophenone with immobilized Rhodotorula sp. AS2. 2241 cells in a hydrophilic ionic liquid-containing co-solvent system. *Journal of biotechnology*, 143(3), 190-197.
- MacLellan, P., & Clayden J. (2011). Enantioselective synthesis of tertiary thiols by intramolecular arylation of lithiated thiocarbamates, *Chemical Communications*, 47(12), 3395–3397.
- Maczka, W. K., & Mironowicz, A. (2004). Enantioselective reduction of bromo-and methoxy-acetophenone derivatives using carrot and celeriac enzymatic system. *Tetrahedron: Asymmetry*, 15(13), 1965-1967.
- Maier, M.N., Franco, P., Lindner, W. (2001). Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives. *Journal of Chromatography*, 906(1-2), 3-33.
- Mandal, D., Ahmad, A., Khanb, M. I. ve Kumar, R., (2004). Enantioselective bioreduction of acetophenone and its analogues by the fungus trichothecium sp. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 27(2-3), 61-63.
- Myers, R.H., Montgomery, D.C., & Anderson-Cook, C.M. (2009). *Moisture, oil and beta-carotene contents of vacuum- response surface methodology: process and product optimization fried apricot slices using various conditions of frying using designed experiments*. Wiley: Hoboken.

- Myers, R. H., Montgomery, D. C., & Anderson-Cook, C. M. (2016). *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*. Wiley: Hoboken.
- Nakamura, K., Yamanaka, R., Matsuda, T., & Harada, T. (2003). Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts. *Tetrahedron: Asymmetry*, *14*(18), 2659-2681.
- Nejem, R. M. (2004). *Enantioselective sensors and biosensors for clinical analysis*. (Doctor Thesis, University of Pretoria). Retrieved from [Enantioselective sensors and biosensors for clinical analysis \(up.ac.za\)](http://up.ac.za)
- Özdemir, A. (2020). D-optimal experimental design for production models in nonstandard experiments. *Quality and Reliability Engineering International*, *36*(5), 1537-1552.
- Özdemir, A., & Cho, B. R. (2016). A nonlinear integer programming approach to solving the robust parameter design optimization problem. *Quality and Reliability Engineering International*, *32*(8), 2859-2870.
- Özyürek, İ. N., Kalın, R., & Özdemir, H. (2020). D-Penisilamin, D-Penisilamin disülfid ve N-Asetil-D-penisilamin'in Laktoperoksidaz Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkileri. *Journal of the Institute of Science and Technology*, *10*(2), 1146-1153.
- Patel, R. N., Goswami, A., Chu, L., Donovan, M. J., Nanduri, V., Goldberg, S., & Mueller, R. (2004). Enantioselective microbial reduction of substituted acetophenones. *Tetrahedron: Asymmetry*, *15*(8), 1247-1258.
- Rozzell, J. D. (1999). Commercial scale biocatalysis: myths and realities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *7*(10), 2253-2261.
- Salvi, N. A., Patil, P. N., Udupa, S. R., & Banerji, A. (1995). Biotransformations with *Rhizopus arrhizus*: Preparation of the enantiomers of 1-phenylethanol and 1-(*o*-, *m*- and *p*-methoxyphenyl) ethanols. *Tetrahedron: Asymmetry*, *6*(9), 2287-2290.
- Sheldon, R. A. (1993). *Chirotechnology*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Soyer, A., (2007). *Lipaz enzimi biyokatalizörlüğünde kinetik rezolüsyon ile enantiyomerik saflıkta 1-fenil-1-propanolün üretimi* (Yüksek Lisans Tezi). Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi'nden edinilmiştir. (Tez No. 196506)
- Soyer, A., Bayraktar, E., & Mehmetoglu, Ü. (2010). Optimization of lipase-catalyzed enantioselective production of 1-phenyl 1-propanol using response surface methodology. *Preparative biochemistry & biotechnology*, *40*(4), 389-404.
- Stinson, S. (1998). Counting on chirality. *Chemistry Engineer News*, *76*(38), 83-104. <https://doi.org/10.1038/s41570-017-0016>
- Strauss, U., Felfer, U., & Faber, K. (1998). Biocatalytic transformation of racemates into chiral building blocks in 100% chemical yield and 100% enantiomeric excess. *Tetrahedron: Asymmetry*, *10*(1), 107-117.
- Süleymanoğlu Ersez, M. (2011). *Biyoteknolojik yöntemlerle kiral 4-okso-tetrahidroindol türevlerinin sentezleri* (Yüksek Lisans Tezi). Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi'nden edinilmiştir. (Tez No. 296919)

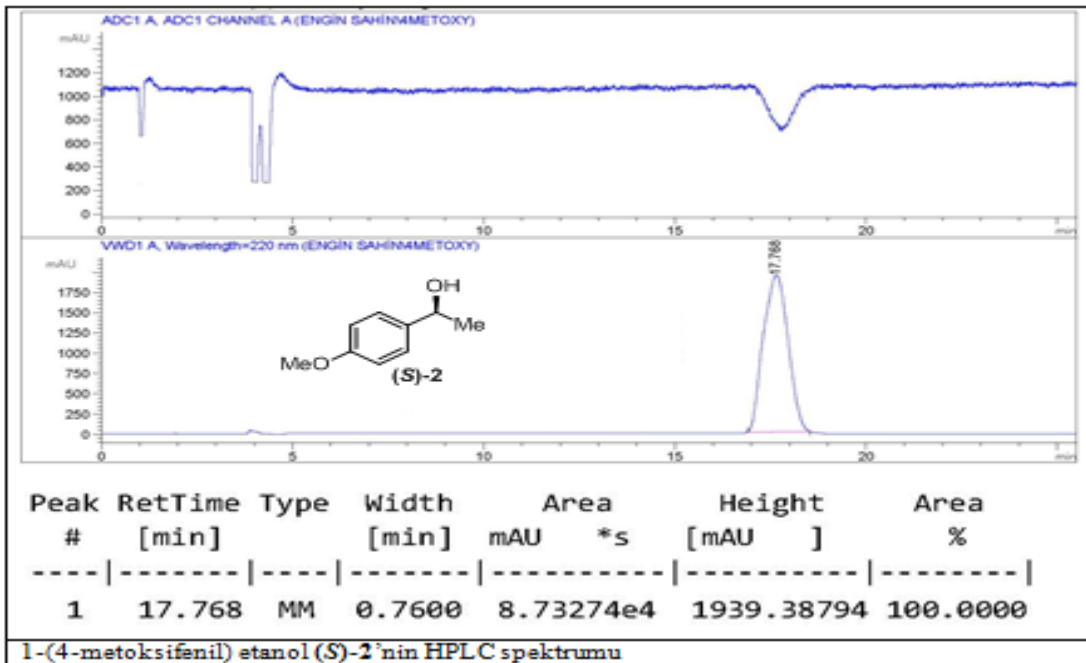
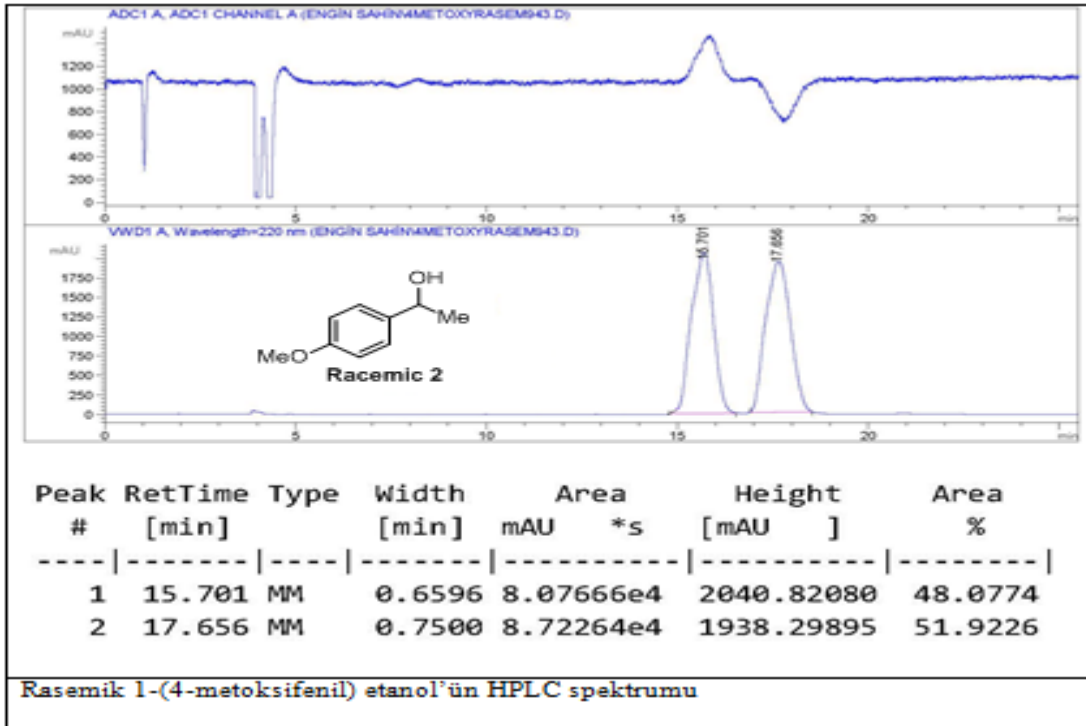
- Şahin, E. *Debaryomyces hansenii* as a new biocatalyst in the asymmetric reduction of substituted acetophenones. *Biocatal Biotransformation*, 2017, 35, 363-371.
- Tüzün, C. (1994). *Stereokimya*. Ankara: Palme Yayıncılık
- Utsukihara, T., Misumi, O., Kato, N., Kuroiwa, T., & Horiuchi, C. A. (2006). Reduction of various ketones by red algae. *Tetrahedron: Asymmetry*, 17(8), 1179-1185.
- Wanda, K.M., & Agnieszka, M. (2004). Enantio selective reduction of bromo- and methoxy acetophenone derivatives using carrot and celeriac enzymatic system. *Tetrahedron: Asymmetry*, 15(13), 1965–1967.
- Wang, B., Zhu, B., Gong, J., Weng, J., Xia, F., & Liu, W. (2020). Resolution of racemic 1-(4-methoxyphenyl) ethanol using immobilized lipase with high substrate tolerance. *Biochemical Engineering Journal*, 158, 107559.
- Wang, W., Zong, M. H., & Lou, W. Y. (2009). Use of an ionic liquid to improve asymmetric reduction of 4'-methoxyacetophenone catalyzed by immobilized *Rhodotorula* sp. AS2. 2241 cells. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 56(1), 70-76.
- Wang, X. T., Chen, X. H., Xu, Y., Lou, W. Y., Wu, H., & Zong, M. H. (2013). Biocatalytic anti-Prelog stereoselective reduction of ethyl acetoacetate catalyzed by whole cells of *Acetobacter* sp. CCTCC M209061. *Journal of biotechnology*, 163(3), 292-300.
- Wei, P., Liang, J., Cheng, J., Zong, M., & Lou, W. (2016). Markedly improving asymmetric oxidation of 1-(4-methoxyphenyl) ethanol with *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 cells by adding deep eutectic solvent in a two-phase system, *Microbial cell factories*. 15(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0407-1>
- Wendhausen Jr, R., Moran, P. J., Joekes, I., & Rodrigues, J. A. R. (1998). Continuous process for large-scale preparation of chiral alcohols with baker's yeast immobilized on chrysotile fibers. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 5(1-4), 69-73.
- Wilen, S. H., Collet, A., & Jacques, J. (1977). Strategies in optical resolutions. *Tetrahedron*, 33(21), 2725-2736.
- Williams, R. C., Riley, C. M., Sigvardson, K. W., Fortunak, J., Ma, P., Nicolas, E. C., & Bremner, S. L. (1998). Pharmaceutical development and specification of stereoisomers. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 17(6-7), 917-924.
- Wu, J. Y., & Liang, M. T. (1999). Enhancement of enantioselectivity by altering alcohol concentration for esterification in supercritical CO₂. *Journal of chemical engineering of Japan*, 32(3), 338-340. <https://doi.org/10.1252/jcej.32.338>
- Xiao, Z. J., Zong, M. H., & Lou, W. Y. (2009). Highly enantioselective reduction of 4-(trimethylsilyl)-3-butyn-2-one to enantiopure (R)-4-(trimethylsilyl)-3-butyn-2-ol using a novel strain *Acetobacter* sp. CCTCC M209061. *Bioresource technology*, 100(23), 5560-5565.
- Xu, P., Cheng, J., Lou, W. Y., & Zong, M. H. (2015). Using deep eutectic solvents to improve the resolution of racemic 1-(4-methoxyphenyl) ethanol through *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 cell-mediated asymmetric oxidation. *RSC advances*, 5(9), 6357-6364.
- Yang, W., Xu, J. H., Xie, Y., Xu, Y., Zhao, G., & Lin, G. Q. (2006). Asymmetric reduction of ketones by employing *Rhodotorula* sp. AS2. 2241 and synthesis of the β -blocker (R)-nifenalol. *Tetrahedron: Asymmetry*, 17(12), 1769-1774.

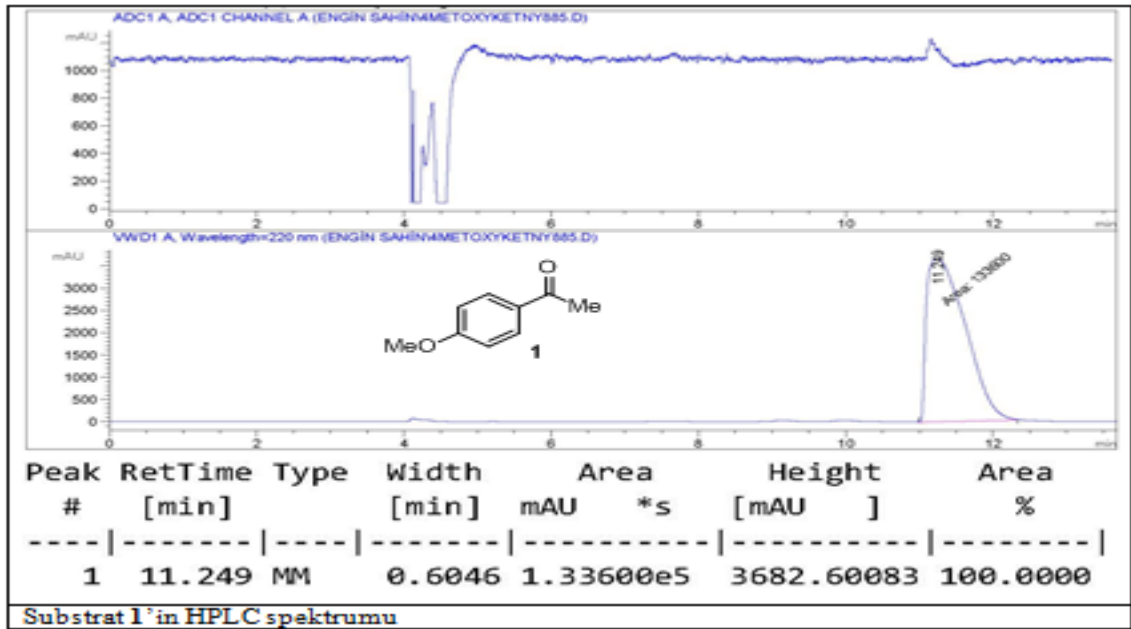
Zong, M.H., Wang, W., & Lou, W.Y. (2008). Efficient asymmetric reduction of 4'-methoxyacetophenone catalyzed by immobilized *Trigonopsis variabilis* cells using ionic liquid-containing systems. *Journal of Biotechnol.* (136), S379. <http://dx.doi.org/10.1016%2Fj.jbiotec.2008.07.873>



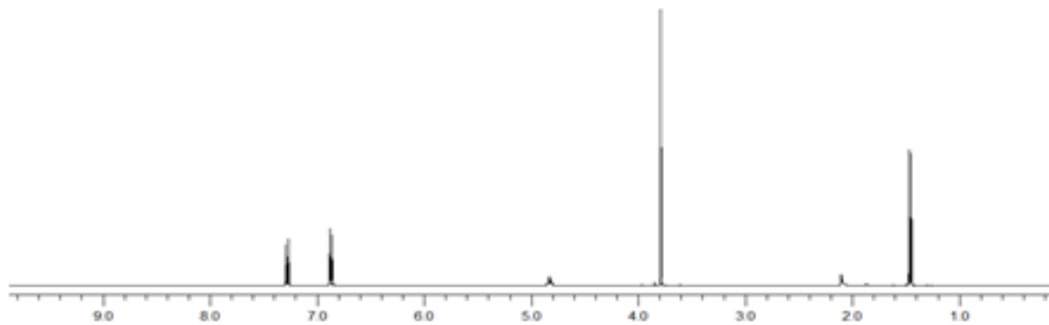
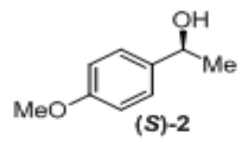
Ekler

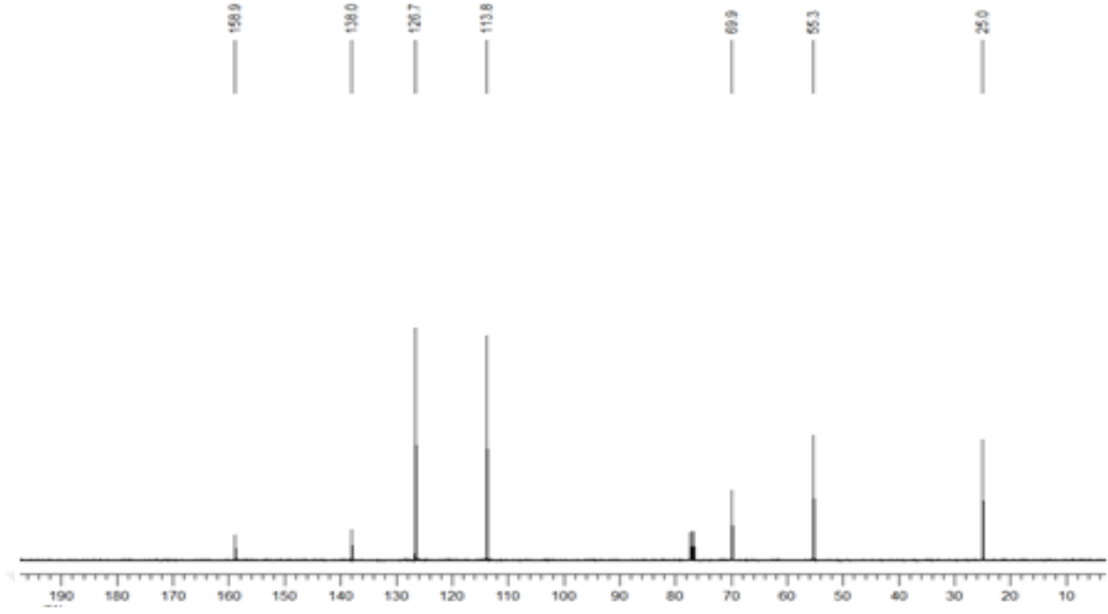
Ek-1. HPLC Spektrumları





Ek-2. NMR Spektrumları





1-(4-metoksifenil) etanol (*S*)-2'nin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

Öz Geçmiş

..... Lise öğrenim hayatına kadar Bayburt'ta eğitim gördü. Ardından 2015 yılında Atatürk Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden mezun oldu. Ek olarak 2015 yılında Atatürk Üniversitesi Açık öğretim Fakültesi İş Sağlığı ve Güvenliği Bölümü'nden mezun oldu. 2018 yılında Atatürk Üniversitesi-Bayburt Üniversitesi (Ortak Program) Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı'nda öğrenim görmeye başladı. 2017 yılında satış yöneticisi olarak başladığı mesleğine hala devam etmektedir.

