



2-METİL-1-FENİLPROPAN-1-ON'UN *Lactobacillus fermentum* BY35 BİYOKATALİZÖR İLE ASİMETRİK BİYOİNDİRGENMESİNDE I-OPTİMAL TASARIMA DAYALI MODEL KULLANILARAK REAKSİYON KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU

Selmani AKSUOĞLU

Yüksek Lisans Tezi

Kimya

Ana Bilim Dalı

Doç. Dr. Engin ŞAHİN

2022

(Her hakkı saklıdır)

T.C.
BAYBURT ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

**2-METİL-1-FENİLPROPAN-1-ON'UN *Lactobacillus fermentum* BY35
BİYOKATALİZÖR İLE ASİMETRİK BİYÖİNDİRGENMESİNDE I-OPTİMAL
TASARIMA DAYALI MODEL KULLANILARAK REAKSİYON KOŞULLARININ
OPTİMİZASYONU**

(Optimization of Reaction Conditions Using I-Optimal Design-Based Model in the
Asymmetric Biorestriction of 2-Methyl-1-Phenylpropan-1-On with *Lactobacillus fermentum*
by35 Biocatalyzer)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Selmani AKSUOĞLU

Danışman: Doç. Dr. Engin ŞAHİN

Bayburt
Haziran, 2022

ETİK VE BİLDİRİM SAYFASI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum “2-metil-1-fenilpropan-1-on’un *Lactobacillus fermentum* BY35 biyokatalizör ile asimetrik biyoindirgenmesinde *I*-optimal tasarıma dayalı model kullanılarak reaksiyon koşullarının optimizasyonu” başlıklı tez çalışmamın tarafımdan bilimsel etik kurallara uyularak yazıldığını ve yararlandığım tüm eserleri kaynakçada gösterdiğimi beyan ederim.

27/06/2022

Selmani AKSUOĞLU

İmza

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmada tez konumu seçen, çalışmama büyük bir özveri ile katkı sunan, bilgi birikimi ve tecrübelerinden yararlandığım, değerli hocam Doç. Dr. Engin ŞAHİN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yardımlarından, ilgilerinden ve manevi desteklerinden dolayı laboratuvar çalışma arkadaşlarıma sonsuz sevgimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımnda vermiş olduğu katkılarından dolayı Prof. Dr. Hüseyin SERENCAM, Doç. Dr. Enes DERTLİ ve Doç. Dr. Akın ÖZDEMİR hocalarıma teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca her türlü desteği esirgemeyen aileme şükranlarımı sunarım.

Selmani AKSUOĞLU

Haziran 2022, BAYBURT

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2-METİL-1-FENİLPROPAN-1-ON'UN *Lactobacillus fermentum* BY35 BİYOKATALİZÖR İLE ASİMETRİK BİYOİNDİRGENMESİNDE *I*-OPTİMAL TASARIMA DAYALI MODEL KULLANILARAK REAKSİYON KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU

Selmani AKSUOĞLU

Haziran 2022, 45 Sayfa

Prokiral ketonların biyolojik olarak indirgenmesi, biyolojik olarak aktif birçok bileşik ve doğal ürün üretmek için potansiyel olarak faydalı öncüler olan kiral ikincil alkollere verimli erişim sağlar. Bu biyolojik indirgeme işlemi, Laktik Asit Bakteri suşları gibi tüm hücreli biyokatalizörler kullanıldığında farklı parametrelerden etkilenebilir. Bu bağlamda, bu tez çalışmasında, 2-metil-1-fenilpropan-1-on'un asimetrik biyo-indirgenmesi için gereken pH, inkübasyon süresi, sıcaklık ve karıştırma hızı gibi kültür parametrelerini optimize etmek için *I*-optimal tasarım tabanlı bir model kullanılacaktır. *Lactobacillus fermentum* BY35, en yüksek dönüşüm oranını (cr) ve enantiyomerik aşırılığı (ee) elde etmek için bir biyokatalizör olarak kullanıldı. Önerilen optimizasyon model kullanılarak, dört kültür parametresinin optimum değerleri: pH 6.5, sıcaklık 25 °C, inkübasyon süresi 38,5 saat, karıştırma hızı 200 rpm dir. Bu şartlar altında ee değeri %98,78 ve cr değeri %98,92 olarak önerildi. Bu optimizasyon şartları altında yapılan deneysel çalışma sonucunda cr ve ee değerleri sırasıyla > %99 ve > %99 olarak bulunmuştur. Bu sebeple, optimizasyon modelinin sonuçları, deneysel sonuçlar ile tutarlıdır. Ayrıca, bu tez çalışmasında, asimetrik indirgeme için önerilen *I*-optimal tasarım tabanlı model kullanarak kültür parametrelerini optimize eden ilk çalışmadır ve asimetrik indirgenme reaksiyonlarında bu metodun kullanılabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *I*-optimal tasarım, optimizasyon, kiral ikincil alkol, tam hücreli biyokatalizör, asimetrik biyo-indirgeme, biyodönüşüm.

ABSTRACT

MASTERS DISSERTATION

OPTIMIZATION OF REACTION CONDITIONS USING I-OPTIMAL DESIGN-BASED MODEL IN THE ASYMMETRIC BIORESTRICTION OF 2-METHYL-1-PHENYPROPAN-1-ON WITH *Lactobacillus fermentum* BY35 BIOCATALYZER

Selmani AKSUOĞLU

June 2022, 45 Pages

Bioreduction of prochiral ketones provides efficient access to chiral secondary alcohols, which are potentially useful precursors for producing many biologically active compounds and natural products. This biological reduction process can be affected by different parameters when whole-cell biocatalysts such as Lactic Acid Bacteria strains are applied. In this regard, this article proposed an *I*-optimal design-based model for the asymmetric bioreduction of 2-methyl-1-phenylpropan-1-one to optimize culture parameters such as temperature, pH, incubation time and shaking rate. *Lactobacillus fermentum* BY35 as a biocatalyst while achieving the highest conversion rate (cr) and enantiomeric excess (ee). Using the proposed optimization model, the optimum settings and cr and ee values of the four culture parameters were found as follows: pH 6.5, temperature 25 °C, incubation time 38.5 hours, stirring speed 200 rpm, ee value 98.78% and cr value 98.92%. After the validation of the process, the values of cr and ee were found to be >99% and >99%, respectively, while using the optimum operating conditions from the optimization model. Therefore, the results of the optimization model are consistent with the results of the validation experiment. It should also be noted that this article is the first study to optimize culture parameters using the proposed *I*-optimal design-based model for an asymmetric reduction.

Keywords: *I*-optimal design, optimization, chiral secondary alcohol, whole-cell biocatalyst, asymmetric bioreduction, biotransformation.

İÇİNDEKİLER

ETİK VE BİLDİRİM SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜR.	ii
ÖZ.....	iii
ABSTRACT.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
TABLolar DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
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
Neden Asimetrik Sentez	3
Stereokimya ve Kiralite.	3
Enantiyomerlerin Özellikleri.	5
Simetri Düzlemi.....	6
Kiral ilaçlar ve biyolojik aktif bileşikler..	7
Optikçe Aktivlik Nedir?.	8
Rasemik Karışım ve Özellikleri.....	8
Asimetrik Sentez Neden Önemlidir.....	9
Asimetrik Saflığın Önemi.....	9
Bileşiklerin enantiyosaf olarak elde edilme metotları.....	10

Stereoseçimli Sentez Yöntemi.....	10
Rasematların Kinetik Rezolüsyonu.....	11
Tercihli Kristalizasyon Yöntemi.....	12
Diastereomer Kristalizasyon Yöntemi.....	12
Kromatografik Yöntemle Ayırıştırma.....	12
Kiral Sekonder Alkollerin Önemi ve Kiral İlaçların Özellikleri.....	12
Feksofenadin.....	15
Alan Yazın Derlemesi.....	16
ÜÇÜNCÜ BÖLÜM.....	27
Materyal ve Yöntem.....	27
DeneySEL Prosedür ve Önerilen <i>I</i> -Optimal Tasarıma Dayalı Model	27
DÖRDÜNCÜ BÖLÜM.....	31
Bulgular.....	31
Spektrumlar.....	31
Genel Asimetrik İndirgenme Prosedürü.....	31
BEŞİNCİ BÖLÜM.....	33
Sonuç, Tartışma ve Öneriler.....	33
Sonuç.....	33
Tartışma.....	33
Öneriler.....	39
KAYNAKÇA.....	40
Ekler.....	43
Ek-1. NMR Spektrumları.....	43
Ek-2. HPLC Spektrumları.....	44
Özgeçmiş.....	45

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. <i>Konfigürasyonel İzomerler</i>	5
Tablo 2. <i>Kiral İlaçların Senelik Satış Değeri</i>	13
Tablo 3. <i>Phaseolus Aureus L Biyokatalizörü ile Farklı Prokiral Ketonların Asimetrik İndirgenmesi</i>	18
Tablo 4. <i>2-Bromo-4-Floro Asetofenon'un Mikroorganizmalar ile Asimetrik Redüksiyonu</i>	20
Tablo 5. <i>Değişik Fungus Çeşitleri ile Asetofenon'un Biyoredüksiyonu</i>	20
Tablo 6. <i>Asetik Asit Bakterileri ile Çeşitli Ketonların Asimetrik Redüksiyonu Sonucu Enantiyomerik Aşırılık Değerleri</i>	21
Tablo 7. <i>Asetofenon'un Çeşitli Bitki Kökleri Kullanılarak Biyoredüksiyonu</i>	22
Tablo 8. <i>Deney İçin Dört Tasarım Faktörünün Seçilen Seviyeleri</i>	28
Tablo 9. <i>Deney İçin Dört Tasarım Faktörü</i>	28
Tablo 10. <i>ANOVA Sonuçları ve ee İstatistikleri</i>	34
Tablo 11. <i>ANOVA Sonuçları ve cr İstatistikleri</i>	35
Tablo 12: <i>ee ve cr Yanıtları İçin Optimizasyon ve Deneysel Sonuçları</i>	36

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. I-optimal tasarım tabanlı model optimizasyon stratejisi kullanılarak <i>L. fermentum</i> BY35 biyokatalizörü ile 1'in asimetrik biyo-indirgenmesi.....	2
Şekil 2. İzomerlerin sınıflandırılması.....	3
Şekil 3. Kiral moleküllerde ayna görüntüsü.....	4
Şekil 4. 2-Bütanol bileşiği.....	5
Şekil 5. Cis trans izomer örnekleri.....	6
Şekil 6. (S)-bütan-2-ol ve (R)-bütan-2-ol molekülü.....	6
Şekil 7. İki kiral C atomlu bileşiklerde (R) ve (S) sistemi	7
Şekil 8. İlaç-reseptör etkileşimi.	8
Şekil 9. Enantiyomerik olarak saf bileşiklerin elde edildiği yöntemler	10
Şekil 10. Rasemat rezolüsyonu için kullanılan metotlar.....	11
Şekil 11. Talidomit bileşiğinin enantiyomerleri	13
Şekil 12. Ketamin'in (R) ve (S) enantiyomeri.....	14
Şekil 13. D-L penisilamin	14
Şekil 14. R-ibuprofen ve S-ibuprofen	14
Şekil 15 Metildopa'nın yarı açık formülü.....	15
Şekil 16. Chloroamphenicol.....	15
Şekil 17. Feksofenedin R ve S enantiyomeri.....	15
Şekil 18. 2-Bromo-1-(4-nitrofenil) etanon'un asimetrik indirgemesi.....	17
Şekil 19. <i>Phaseolus Aureus L</i> biyokatalizörü ile kiral sekonder alkol eldesi.....	18
Şekil 20. 2-Bromo-4-floro asetofenon'un asimetrik redüksiyonu.....	19
Şekil 21. 1-[3,5-Bis (triflorometil)fenil] etanon'un kimyasal ve biyokatalizör ile asimetrik indirgenmesi.....	22
Şekil 22. <i>Alternaria alternata</i> EBK-4 biyokatalizörü ile asetofenon'un asimetrik indirgenmesi.....	23
Şekil 23. Asetofenon'un RSM tekniğiyle asimetrik indirgenmesi	24
Şekil 24. Asetofenon'un dondurulmuş havuç biyokatalizörü ile asimetrik indirgenmesi	24
Şekil 25. (S)-2-metil-1-fenilpropan-1-ol.....	32
Şekil 26. (a) ee yanıtı için tahmin varyans grafiği ; (b) cr yanıtı için tahmin varyans grafiği.....	37
Şekil 27. (a) ee yanıtı için tasarım alanı grafiği (b) cr yanıtı için tasarım alanı grafiği.....	38

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve Kısaltmalar

ee : Enantiyomerik aşırılık

c.r : Dönüşüm oranı

μ l : Mikrolitre

RT : Oda sıcaklığı

Mmol: Milimol

ml : Mililitre

CSO : Başlangıç substrat derişimi

ADH : Alkol Dehidrogenaz Enzimi

LAB : Laktik Asit Bakterileri

TLC : İnce Kağıt Kromotografisi

BİRİNCİ BÖLÜM

Giriş

Araştırmanın Konusu ve Problemi

Kimya endüstrisi insan yaşamına çok sayıda faydalı ürün sentezlemekle yoğun bir şekilde uğraşmaktadır. Ekonomik büyüklük olarak son derece gelişmiş boyutlara ulaşmıştır. Bu sebepten dünyada kimya sektöründe oldukça fazla rekabet vardır. Bu rekabet yenilikleri de zorunlu hale getirmiştir. Burada kaliteden ödün vermeden daha üretken, ekonomik ve çevreci üretim proseslerinin geliştirmesini zorunlu kılmıştır.

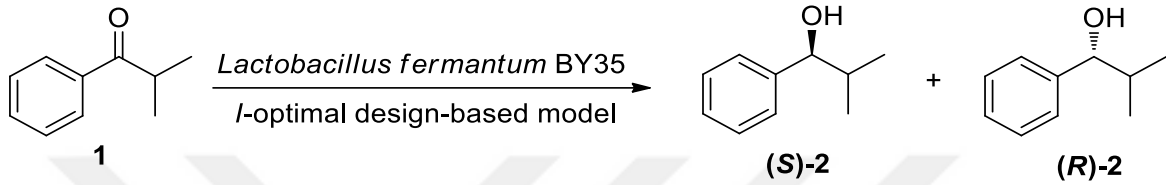
Klasik üretim yöntemleri ya tercih edilmemektedir veya az tercih edilmektedir. Yeşil kimya olarak adlandırılan yeni nesil metot, tasarım, ekonomik tarz, inovasyonla uyumlu meteryal geliştirme çalışmaları gün be gün artmaktadır. Bu açıdan ilaç sanayinde kullanılan bazı ilaç etken maddelerinin üretiminde bu yenilikçi uygulamalar kendine daha çok yer bulmaktadır. Bu noktada biyoproses ilaç kimyası ile sürdürülebilir, çevreci, ekonomik, verimli sonuçlar elde edilmiştir. Bu sebepten biyokatalizörlere olan ilgi sürekli artmaktadır. Biyokatalizörler uygun tepkime koşullarının yansıması, büyük oranda seçicidirler, bu yüzden organik kimyada büyük öneme sahiptirler. Ayrıca ilaç etken maddeleri olabilecek kiral moleküllerin sentezini gerçekleştirmek oldukça önemlidir. Bundan dolayı asimetric moleküllerin üretiminde kullanılabilecek farklı bir biyokatalizörün ve metodun keşfedilmesi ve önerilmesi fazlaca önem arz etmektedir.

Araştırmanın Amacı

Organik kimyada tepkimeler sonucu çoğunlukla yan ürünler de oluşur. Bu yan ürünler istenmeyen bileşiklerdir ve bu bileşiklerin oranını azaltacak çalışmalar her zaman yapılmaya çalışılır. Tıp alanında veya ilaç sanayinde bu istenmeyen ürünlerin bertaraf edilmesi hayati öneme sahiptir. İlaç etken maddesi olarak kullanılan kiral sekonder alkollerin enantiyomerik olarak saf olarak üretilmesi çok önemlidir. Kiral sekonder alkollerin saf olarak sentezlenmesi için yeni yaklaşımlar, prosesler geliştirilmelidir. Bu çalışmalar hem kaliteli ilaç, ürün sentezlenmesine yardımcı olur hem de rekabet ile daha faydalı modellerin gelişimine olanak sunar. Bu moleküller agro kimyada ve kozmetik sanayisinde de kullanılması bu bileşiklerin

hitap ettiği kitleyi kat be kat artırır. Piyasadaki birçok ilacın etken maddesi kiral moleküllerdir. Bu moleküllerin çoğunun yapısında birden çok asimetrik merkez bulunmaktadır. *R*-denopamin, amoxicillin (antibiyotik), *S*-fluoksetin ve erithropoetin (hematopoetik büyüme faktörü) gibi bazı ilaçlar asimetrik aromatik sekonder alkollerden sentezlenebilmektedir. 2-metil-1-fenilpropan-1-on'un indirgenme ürünü olan hem *R* hem de *S* enantiyomerik alkoller, ilaç etken maddeleri olarak kullanılmaktadırlar.

Bu tez çalışmasında, *Lactobacillus fermentum* biyokatalizörü ile 2-metil-1-fenilpropan-1-on'un asimetrik biyoindirgenmesi amaçlanmaktadır (Şekil 1).



Şekil 1. *I*-optimal tasarım tabanlı model optimizasyon stratejisi kullanılarak *L. fermentum* BY35 biyokatalizörü ile 1'in asimetrik biyo-indirgenmesi.

Bu tez çalışmasında reaksiyon şartlarının optimizasyonu klasik metotlar yerine *I*-optimal optimizasyon yöntemi kullanılarak yapılacaktır.

Araştırmanın Önemi ve Gerekçesi

Asimetrik sentez birçok ilacın üretiminde, ilaç endüstrisinde önemli yer tutmaktadır. Endüstriyel araştırma ve geliştirme faaliyetlerinde çok önemli yere sahiptir. İlaç sanayinde enantiyomerik olarak spesifik ilaçların üretimi elzemdir. Etken madde sentezinde geleneksel kimyasal sentez ile biyomolekülleri kullanarak sentez yapma çalışmaları kolektif öneme sahip hale gelmiştir. Kiralite, bazı ilaçların etkinliğinde belirleyici bir faktördür. Enantiyomerlerin farklı kimyasal ve biyolojik etki göstermeleri farklı sonuçlar doğurmaktadır. Aynı bileşiğin bir izomeri çok faydalı ve etkiliyken diğer izomer faydasız veya çok zararlı olabilmektedir.

2-metil-1-fenilpropan-1-on'un asimetrik indirgenmesiyle elde edilen her iki enantiyomer de ilaç etken maddesi olarak kullanılabilir. Bütün bu nedenlerden ötürü bu tez çalışmasında 2-metil-1-fenilpropan-1-on molekülü çıkış bileşiği olarak alınmış ve *Lactobacillus fermentum* biyokatalizörü kullanılarak indirgenme sonucu saf olarak (*R*) veya (*S*)-enantiyomerinin sentezi amaçlanmıştır. Bu çalışmanın amacı *I*-optimal optimizasyon yöntemini kullanarak 2-metil-1-fenilpropan-1-on bileşiğini asimetrik indirgeyerek ilaç sanayinde önemli bir molekül olan 2-metil-1-fenilpropan-1-ol'ün enantiyomerlerden (*S*) izomeri olan bileşiği saf olarak elde etmektir.

İKİNCİ BÖLÜM

Kuramsal Çerçeve ve Alan Yazın Derleme

Kuramsal Çerçeve

Neden asimetrik sentez.

Biyolojik olarak aktif olan kiral bileşiklerin sentezlenmesinde asimetrik sentez reaksiyonları kullanılmaktadır (Nakamura, Yamanaka, Matsuda, & Harada, 2003). İlaç sanayinde kullanılan birçok ilaç ve doğadaki bileşiklerin birçoğu tek bir enantiyomerden oluşmaktadır. Ayrıca sanayi üretimi aşamalarının hemen hemen her bölümünde, ziraat, ilaç, gıda, kozmetik gibi alanlarda kiral bileşikler geniş yer tutmaktadır. Bu sebepler, yeni asimetrik moleküllerin, kiral organik aktivatörlerin ve biyokatalizörlerin gelişimine ve artmasına zemin hazırlamıştır.

Stereokimya ve Kiralite

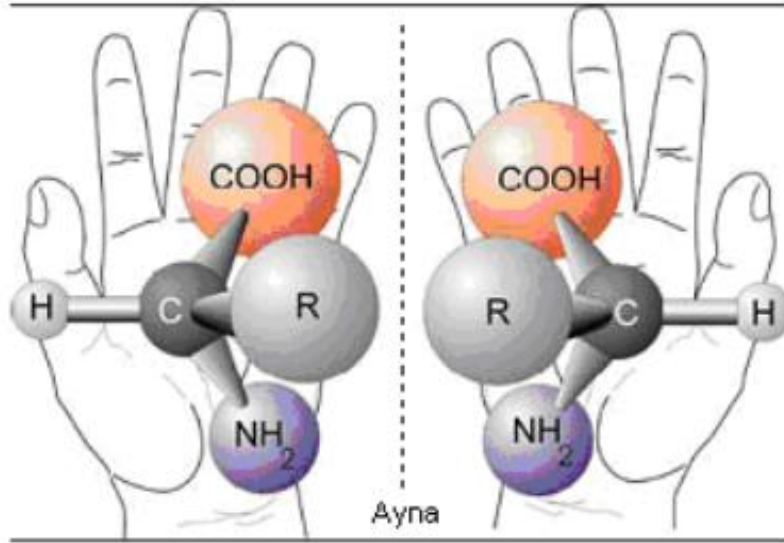
Bileşiklerin yapısal formüllerini üç boyutlu olarak incelenmesini konu alan kimya bölümüne stereokimya denir. Atomların üç boyutlu uzayda bir bileşik içinde birbirine göre olan dizayını araştırır. Moleküllerin üç boyutlu uzaydaki yönelimini izomerizm inceler. Molekül formülü aynı olan iki veya daha fazla sayıdaki bileşiklerin, farklı yapıdaki formlarına izomer denir. Bunlar aynı molekül formülüne sahip fakat atomlarının bağlanma düzeni farklı olan bileşiklerdir ve bu bileşiklere izomer denir. İzomer moleküllerin fiziksel ve kimyasal özellikleri de farklıdır. İzomerler yapı izomeri ve stereoizomeri olmak üzere iki bölüme ayrılır. İzomerlerin bölümleri ve alt bölümleri gösterilmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. İzomerlerin sınıflandırılması.

Stereokimya, organik bileşiklerin üç boyutlu molekül yapılarını ve bu bileşiklerin özelliklerini inceleyen kimya alt disiplinidir. Stereoizomerler bu disiplinin en önemli kısmını oluşturmaktadır. Moleküller üç boyutlu uzayda farklı şekiller alabilmektedir. Yani atomların bağlanma ve yönelmeleri farklı olmaktadır. Kapalı formülleri aynı olup açık formülleri, atomların bağlanma ve yönelmeleri farklı olan bileşiklere izomer denir. İzomerlerin çok farklı türleri bulunmaktadır.

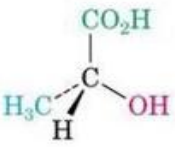
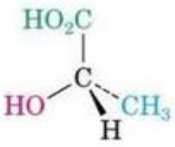
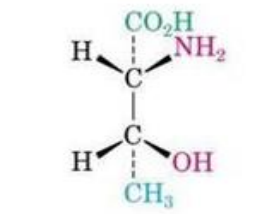
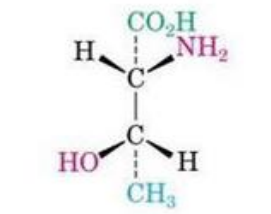
Cheiros kelimesi Yunancada el anlamında kullanılır. Kiralite kavramı da buradan türetilmiştir. Kiral bir objenin görüntüsü ile ayna görüntüsü üst üste çakışmaz. Akiral objelerde ise ayna görüntüleri üst üste çakışacaktır. Aşağıdaki şekilde örnek olarak gösterilen bileşikte, karbon atomuna dört farklı grup takılmıştır ve ayna görüntüsü ile kendi görüntüsü çakışmaz yani farklı bileşiklerdir, aynı yapıda değildirler ve bu bileşikler kirale bileşikler olarak adlandırılırlar (Şekil 3).



Şekil 3. Kiral moleküllerde ayna görüntüsü.

Atomların farklı şekillerde düzenlenmesi konfigürasyon olarak adlandırılır (cis, trans konfigürasyonları, ya da optik stereoizomerlerin D, L-konfigürasyonları). Bu stereokimya üç boyutlu yapı olarak da ifade edilir. Bir karbon atomuna dört ayrı atom ya da atom toplulukları bağlanınca asimetrik bir molekül olur bu moleküle kirale molekül de denir. Bir ya da daha çok asimetrik karbon içeren bir molekül de asimetriktir. Ayna görüntüleri çakışmayan çiftlere ise diastomer denir (Tablo 1).

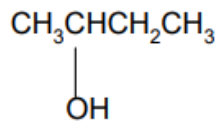
Tablo 1. Konfigürasyonal İzomerler

Enantiyomerler:	 (R)-Lactic acid  (S)-Lactic acid
Diastereomerler:	 2R,3R-2-Amino-3-hydroxybutanoic acid  2R,3S-2-Amino-3-hydroxybutanoic acid

Doğadaki birçok molekül kiral özelliğe sahiptir. Ayrıca canlı sistemlerde çoğunlukla kiral moleküller bulunur. Mesela; birçok aminoasit, aminoasitten sentezlenen proteinler ve yağlar kiral yapıda moleküller içerirler böylece kiraliteyle uyumlu etkileşim gösterirler. Bir enantiyomer düzlem polarize ışığı sola doğru döndürürken, diğer enantiyomer düzlem polarize ışığı sağa doğru döndürür (Bunnett, 1999).

Enantiyomerlerin Özellikleri

Bir bileşik ile o bileşiğin çakışmayan ayna görüntülerine enantiyomer çift denir. Kiral bir bileşiğin (2-Bütanol) her iki formundan biri *S* olarak diğeri *R* olarak adlandırılır (Şekil 4). *S* sinister sola çeviren *R* rectus sağa çeviren, anlamına gelmektedir. Enantiyomer çiftlerden birisi polarize ışık düzlemini sağa (+), diğeri ise sola (-) çevirir (Mislow, 2002).

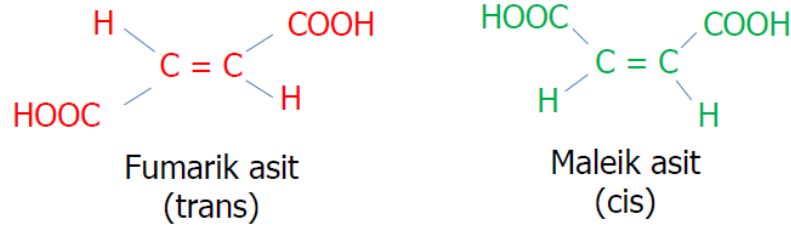


2-Bütanol

Şekil 4. 2-Bütanol bileşiği.

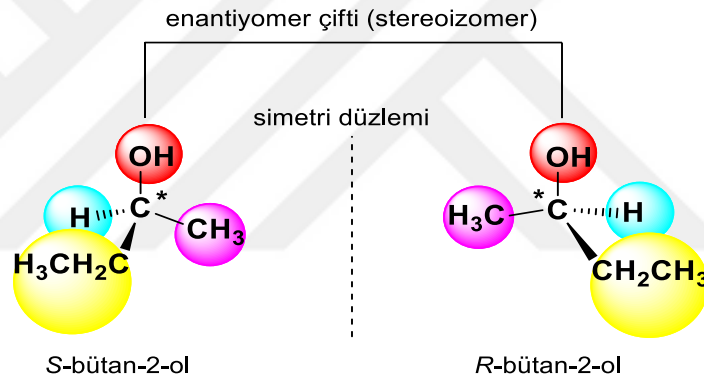
Molekülde stereomerkez bulunmamasına karşın farklı fiziksel ve kimyasal özelliğe sahip izomerlere cis trans izomer denir. Çift bağ karbonlarına farklı grupların bağlı olduğu cis

trans izomer örnekleri gösterilmiştir. Cis izomer daha yüksek polariteye sahipken, Trans izomer daha düşük polariteye ve daha düşük kaynama noktasına sahip olmaktadır (Şekil 5).



Şekil 5. Cis-trans izomer örnekleri.

2-Bütanol bileşiği kiraldir, bu bileşiğin iki adet optik izomeri bulunmaktadır. Bu iki molekül de birbirinin enantiyomerleridir. Bu enantiyomerlerin ayna görüntüleri birbiri üzerinde çakışmaz. Bu enantiyomerler düzlem polarize ışığı farklı açılarla çevirme özelliğine sahiptir. Yani ışığa karşı aktiftir. 2-Bütanol bileşiğinin optik izomerleri aşağıda gösterilmiştir. Bu bileşiklerin ayna görüntülerinin çakışmadığı gösterilmiştir (Şekil 6).



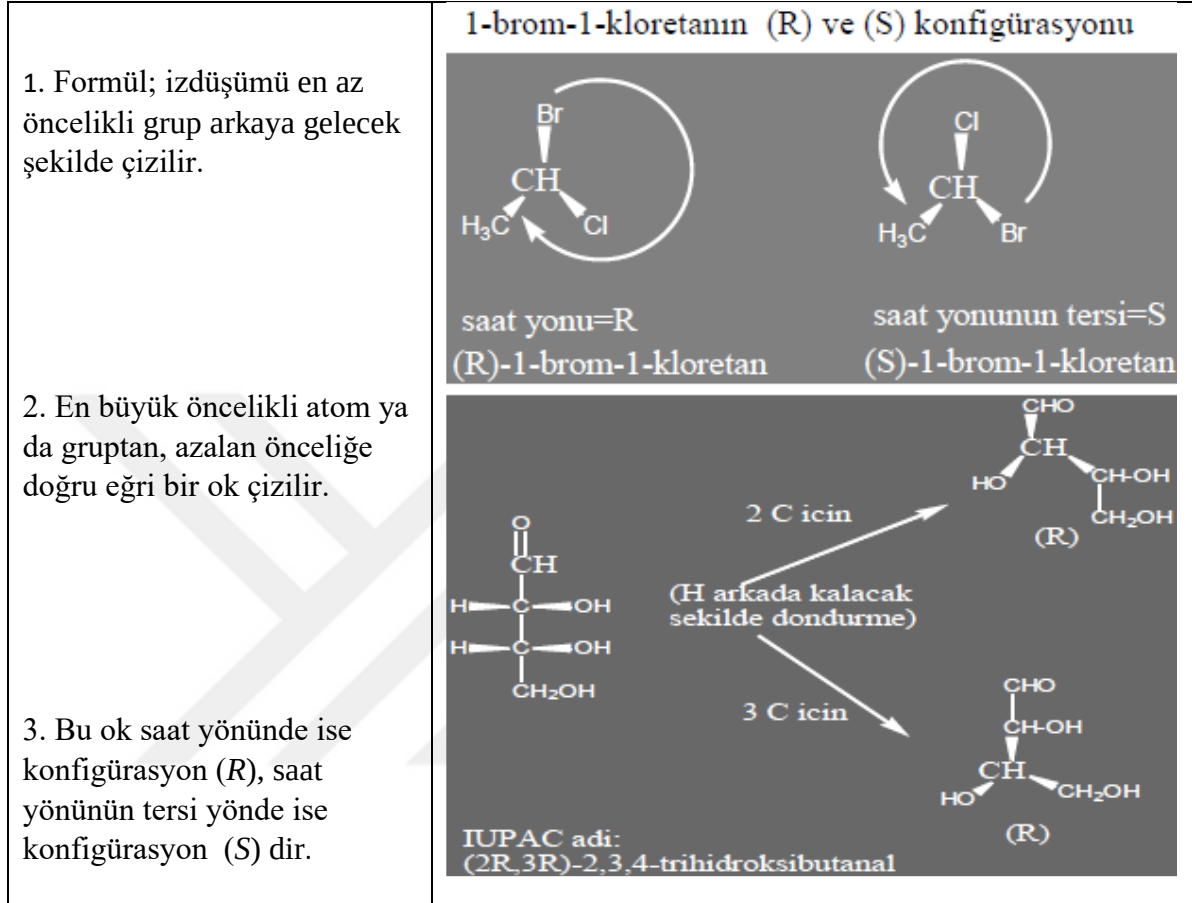
Şekil 6. (S)-bütan-2-ol ve (R)-bütan-2-ol molekülünün yapısı.

Enantiyomer bileşiklerin tüm kimyasal ve fiziksel özellikleri aynıdır fakat polarize ışığı çevirme açıları farklıdır. Bu enantiyomer çiftler farklı biyolojik aktiviteye sahip olabilmektedir. Örneğin; bir izomer biyolojik aktiviteye sahip olurken diğeri tam tersi toksik etkiye neden olabilmektedir (Maier, Franco, & Lindner, 2001).

Simetri Düzlemi

Bileşiğin bir yarısı ile diğeri yarısının ayna görüntüsü olacak biçimde kesen düzlemdir. Asimetrik moleküller: Kiral (Chiral) ve kiral olmayan (achiral) moleküllerdir. “Kiral” bir molekül ayna görüntüsü ile üst üste çakışmayan eşidir. “Kiral olmayan” bir bileşik simetri merkezi yoktur ve simetri düzlemini taşımaz. Mezobileşik ayna görüntüleri üzerinde çakışabilen moleküllerdir.

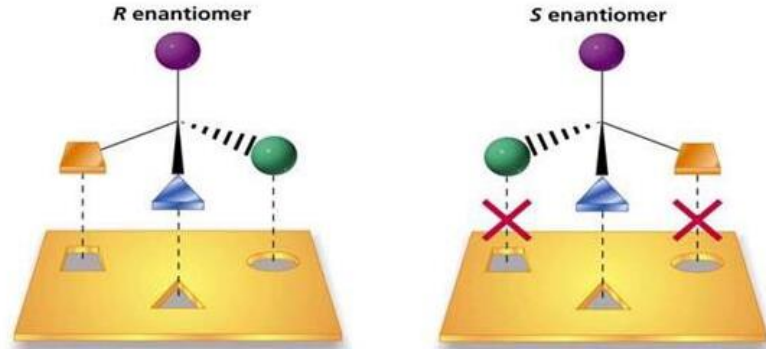
Bu bileşikler kiral merkez içerirler fakat optikçe aktif değildirler. Simetri merkezi ve simetri düzleminin olmayışı “Kirallık” için gereklidir, fakat yeterli değildir. Çakışmazlık (Asimetriklik) Kendi ayna görüntüsü ile üstüste çakışamayan herhangi bir moleküle kiral (çakışmaz) denir (Şekil 7).



Şekil 7. İki kiral C atomlu bileşiklerde (R) ve (S) sistemi.

Kiral ilaçlar ve biyolojik aktif bileşikler.

Optik izomerlerin en büyük özelliği farklı biyolojik aktivite göstermeleridir. Bileşiğin açık formülü aynı olmasına karşın aynı etkiyi göstermemektedir. İlaç reseptör eşleşmesinde anahtar kilit gibi bir modelleme söz konusudur. Örneğin aşağıda gösterildiği gibi (R) enantiomer ile reseptör tam eşleşmektedir yani bu ilaç olumlu etki göstermektedir. Fakat (S) enantiomerde reseptör ile uyum olmadığından istenen etkiyi göstermemektedir (Şekil 8).



Şekil 8. İlaç-reseptör etkileşimi.

Optikçe Aktiflik Nedir?

Organik yapıda veya inorganik yapıdaki maddeler optikçe aktif olabilirler. Bu moleküller polarize ışık düzlemini sola ya da sağa çevirebilirler. Sağa çevirenlere dekstrojir, sola doğru çevirenlere ise levojir denilmektedir. Sağa çevirenlerin isiminin önüne (+), sola çevirenlerin isminin önüne (-) işareti konur. Polarize ışık düzleminin çevrilme açısının değerini ölçmek için kullanılan cihaza polarimetre denir. Polarimetreler molekül büyüklüğünün ve derişiminin tayininde ve birçok gıda ürününün kontrol edilmesinde de kullanılır.

Enantiyomerik olarak saf olan maddeler polarize ışık düzlemini sola ya da sağa çevirirler, rasemik maddeler ise bu özellikte değildirler. Bu çevirme etkisi, molekülün yapısındaki asimetrik karbon atomundan kaynaklanır. Asimetrik molekül yalnız karbon atomu olmayabilir. Örneğin; oksijen, azot ve fosfor atomları içeren bazı bileşikler asimetrik atom merkezi bulundurabilirler.

Bir bileşiğin ayna görüntüleri birbiri üstünde çakışmıyorsa bu ikili bileşiğe enantiyomer denir ve bu bileşikler asimetrik molekül olarak adlandırılır. Bir maddenin optikçe aktif olabilmesi için enantiyomerlerinden birisinin miktarının diğer enantiyomerin miktarından çok olması gerekmektedir.

Rasemik Karışım ve Özellikleri

Biri diğerinin ayna görüntüsü olan her iki enantiyomeri de aynı miktarda bulunduran asimetrik molekül karışımına rasemik karışım denir. Rasemik karışımlar düzlem polarize ışığa etki etmezler. Gıda sanayinde de kullanılan rasematlar kiral şekerlerin tanımlanmasında ve eldesinde kullanılır. D-Früktoz polarize ışığı sola çevirirse D-(-)- Früktoz, sağa çevirirse D-(+)-Früktoz şeklinde gösterilir. Birçok faydalarından dolayı ilaç endüstrisinde besin ve biyokimya endüstrisinde kiral, enantiyosaf moleküller tercih edilmektedir (Böhringer, Morgenstern,

Schneider, & Berndt, 1999). Bazı enantiyomer çiftler ilaçlarda da farklı etki gösterebilmektedir. Enantiyomerlerden biri istenen olumlu etkiyi gösterirken diğer enantiyomer ise istenmeyen yani olumsuz bir etki gösterebilir. Bu etki zararlı bir etki de olabilir. Bu yüzden istenmeyen enantiyomerin oranı %0,1'e düşürülmek istenir. Rasematların fiziksel ve kimyasal özellikleri oldukça farklıdır. Örneğin erime noktaları saf enantiyomerlerinkinden farklıdır.

Asimetrik bir molekül sentezlenirken rasemik karışım olarak sentezlenirler. *R* ve *S* enantiyomerleri aynı miktarda sentezlenir. İlaç endüstrisinde bu iki enantiyomerin miktarı önemlidir. Bu bileşikler farklı biyolojik etkinlik gösterdiklerinden saf enantiyomer eldesi oldukça ehemmiyetlidir (Kordikowski, York, & Latham, 1999). Böylece olumsuz etki gösterecek bu zararlı kiral bileşiğin hastayı etkilemesinin önüne geçilmiş olunacaktır. Bütün bu sebeplerin, yan etkilerin, olumsuzlukların önüne geçmek için akademik ve endüstriyel alanlarda önemli kiral bileşiklerin sentezlenmesi için çok sayıda enantiyoseçici yöntemler geliştirilmiştir (Sheldon, 1993).

Asimetrik Sentez Neden Önemlidir?

Asimetrik molekül üretimi; Birincil olarak ilaç endüstrisi olmak üzere, ziraat alanında, gıda sektöründe, eczacılıkta önemli yere sahiptir. Üretilmiş ve kayıt altına alınmış 5000'i aşkın ilacın çoğunluğu doğal ürünlerden ya da kimyasal yollardan elde edilmektedir. Bu ilaçlar ya rasemik formda ya da enantiyomerik olarak saf madde olabilmektedir. Eczacılıkta yani ilaç endüstrisinde tek enantiyomer olarak elde edilir (Babaarslan, 2008). İlaç üretiminde ilk önceleri rasemik karışımlar elde edilmiştir. Bu İlaçların olumsuz sonuçları olmuştur bu da şikâyetleri beraberinde getirmiştir. Bu durumlar ilaç sanayisiyle uğraşan kişileri saf enantiyomer moleküller üretmeye itmiştir.

Asimetrik Saflığın Önemi

Optik izomerlerin birinin diğerinden daha fazla olmasına Enantiyomerik saflık denir. Enantiyomer çiftlerin birinin diğerinden fazla miktarda olmasıdır. Enantiyomerik saflık şöyle ifade edilir; % olarak ee ile ifade edilir. %100 ee değerindeki bir enantiyomer, enantiyomerik olarak saf kabul edilirler. Laboratuvar ortamında özel bir uygulama yapılmadığı sürece elde edilen moleküller rasemik karışım şeklinde bulunur yani saf halde bulunmazlar. Doğadaki birçok molekül saf halde bulunmaz yani *R* veya *S* enantiyomerlerin karışımı halinde bulunur. Aynı formüne sahip fakat optikçe aktif olan bu moleküller farklı biyolojik aktivitelere sahiptir. Bu sebeple enantiyomerlerden sadece bir tanesi istenilen etkiyi göstermektedir. Bu sebeple

farmakolojik olarak etkin olan enantiyomerin seçilmesi, saf olarak elde edilmesi elzemdir ve çok önemlidir (Williams vd., 1998).

Bileşiklerin enantiyosaf olarak elde edilme metotları.

İlaçlarda gıdalarda bulunan kiral moleküller canlı organizmalarındaki farklı kiral bileşiklerle olumlu veya olumsuz etkileşime girebilmektedirler. Bu sebeple farklı aktiviteler gösterebilmektedirler, bu sebeplerden ötürü bileşiklerin enantromerik olarak saf bir şekilde elde edilmesi çok önemlidir ve tercih edilmektedir. Kiral bileşiklerin sentezlenmesi çok basit tepkimelerle gerçekleşmez, birçoğu karmaşık tepkimelerle oluşturulur. Bunlardan bazıları kademeli sentez tepkimeleridir.

Kiral bileşiklerin üretim yöntemi iki temel başlıkta incelenebilir. Bunlardan ilki reaksiyon ortamında bir molekülün kiral etki oluşturduğu şartları belirleyerek enantriyomer çiftlerden birinin diğerinden daha fazla sentezlendiği yöntemdir ve bu yönetime asimetrik sentez denir, yani bu yöntem ile gereken şartlar ayarlanıp istediğimiz optik izomer saf şekilde veya safa yakın üretilir.

İkinci yöntem ise reaksiyon esnasında kiral bir etkinin bulunmadığı şartlarda üretilen *R* ve *S* izomerlerden oluşan rasemik karışımdan bu enantiyomerlerin ayrıldığı rezolüsyon tepkimeleridir. Enantiyomer olarak saf bileşiklerin üretimi safhalarında 3 farklı metot kullanılmaktadır. Bunlar prokiral substratlar, rasematlar, kiral havuz yöntemidir. Enantiyosaf bileşik elde yöntemleri aşağıdaki gibi gösterilmiştir (Şekil 9).



Şekil 9. Enantiyomerik olarak saf bileşiklerin elde edildiği yöntemler.

Stereoseçimli Sentez Yöntemi

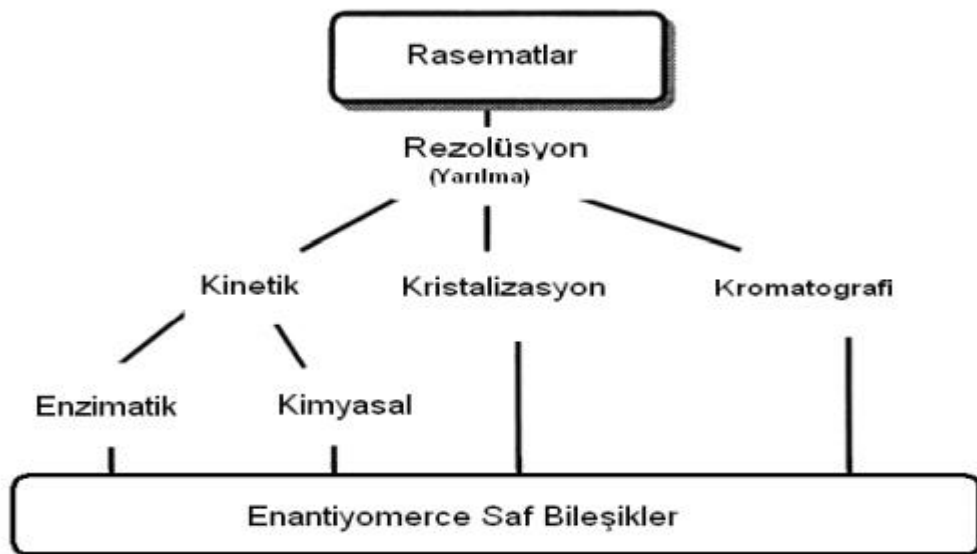
Stereoseçimli sentez yönteminde, asimetrik bir ortam kullanılarak bu ortamdaki akiral bileşikler yardımıyla kiral adı verilen kiral başlangıç moleküllerini kimyasal ve biyolojik kiral ayırıcı maddelerle elde yöntemidir.

Rasematların Kinetik Rezolüsyonu

Kinetik çözünürlük, kiral katalizörler kullanılarak rasemik bir karışımdaki enantiyomer çiftlerinin başka bir kiral bileşiğe dönüşümüdür, bu işlemde enantiyomerlerden biri diğerinden daha kısa sürede dönüşüme uğrar. Kinetik çözünürlük; enzimatik kinetik çözünürlük ve kimyasal kinetik çözünürlük olmak üzere iki şekilde uygulanabilir. Kiral katalizör, madde ürüne dönüşürken enantiyomerlerden türeyen geçiş komplekslerinin ileri aktivasyon enerjileri arası fark oldukça fazla olmalıdır. Daha düşük aktivasyon enerjisili geçiş kompleksi oluşturan izomer daha kısa sürede ürüne dönüşür.

Bu aktivasyon enerji farkı arttıkça düşük enerjili enantiyomerin oluşma yüzdesi diğer enantiyomerden daha fazla olacaktır (Felfer, Kroutil, Strauss, & Faber, 1998). Enantiyomerik zenginliğin (ee) daha fazla olması için dönüşüm %50'de durur ve bu sebepten teorik verim %50'yi geçemez. Reaksiyon hız takip basamağı için kiral kolonlu HPLC tercih edilir. Bu ise bu yöntemin sınırlı seyretmesine neden olur. Rasemik karışımlardan enantiyosaf moleküllerin elde edilmesinde kullanılan en eski metotlardan biri rasemat rezolüsyonudur.

Endüstride kullanılan en önemli rasemat ayırıcı yöntemlerden biri bu yöntemdir, karışımdaki istenen molekül yani asimetrik molekül elde edilir (Wilén, Collet, & Jacques, 1977). Fakat bu metot verim açısından oldukça düşük verimli olduğundan çok fazla kullanılmamaktadır. Enantiyomerlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri çoğunlukla aynı olduğu için ayrılmaları çok zor yapılır. Bu yüzden de daha verimli yani verimi yüksek yöntemler geliştirilmiştir (Şekil 10).



Şekil 10. Rasemat rezolüsyonu için kullanılan metotlar.

Tercihli Kristalizasyon Yöntemi

Bu yöntem tıpkı ayrımsal kristallenmeye benzeyen bir yöntemle yapılır, katı kristal maddelere uygulanabilen yöntemdir, bileşenlerden birisinin kristallenerek katı hale geçmesi diğer bileşenin ise yani diğer enantiyomerin ise kristallenmeyecek şekilde bulunabileceği uygulamalar, maddeler ilave edilmesi suretiyle yapılır.

Diastereomer Kristalizasyon Yöntemi

Ayrırma, rasemik karışımdaki enantiyomer, uygun, aktif bir madde ile reaksiyona sokulur, diastereomerlerine dönüştürülmesiyle yapılır. Diastereomerlerin fiziksel özellikleri farklı olduğundan çözünürlük farkından yararlanılarak kolon kromatografisi ve kristalizasyon tekniği ile birbirlerinden rahatlıkla ayrılırlar. Bu diastereomer bileşikler ayrıldıktan sonra, geriye kalan her iki enantiyomer de optik olarak saf bir biçimde ayrılmış olur. (Blaschke, 1980).

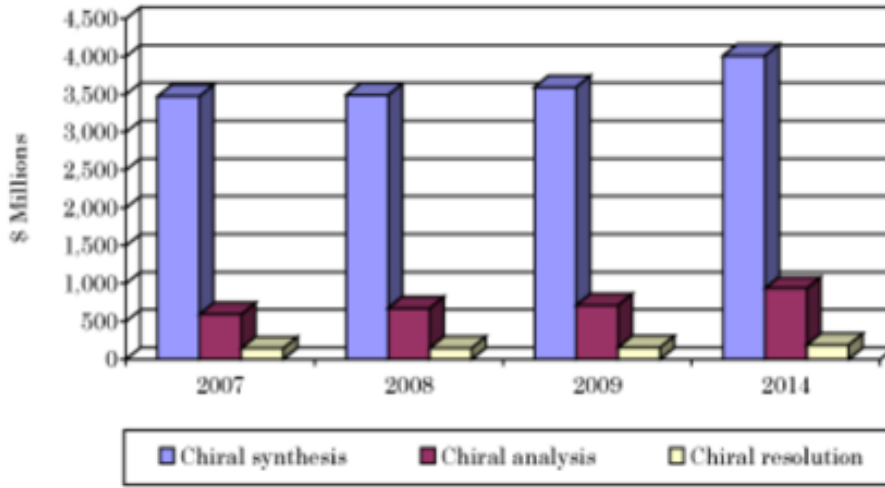
Kromatografik Yöntemle Ayrıştırma

Enantiyomer bileşiklerin farklı kiral bileşiklerde etkileşimi farklıdır. Bu sebeple rasemik karışım, kromatografik yöntemle ayrılabilir. Burada kolon kromatografisi kullanılabilir. Kolondaki dolgu malzemesi kiral dolgu malzemesidir ve rasemik karışımdaki kiral bileşiklerle kolondaki kiral dolgu malzemesi etkileşir bu şekilde ayırım yapılır. Bu yöntemde; ince kolon kromatografisi, sıvı kromatografisi ve tabaka kromatografisi alt yöntemleri kullanılabilir (Blaschke, 1980).

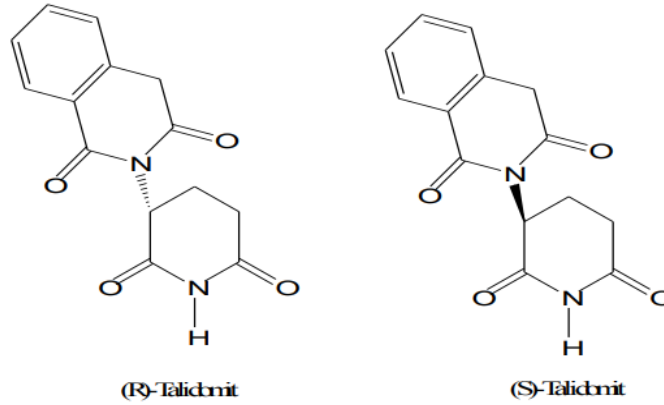
Kiral Sekonder Alkollerin Önemi ve Kiral İlaçların Özellikleri

İlaç endüstrisinin en fazla odaklandığı ve ilgilendiği konuların başında kiral ilaçların üretimi ve piyasaya sürülmesi gelmektedir. Enantiyomerlerin kiral moleküllere karşı gösterdikleri farklı etkiler anlaşılmadan önce, toksik özellikli enantiyomerin önemsenmeyecek kadar düşük etkiye sahip olduğu düşünülerek kiral ilaçlar üretim aşamasında rasemik olarak üretilip piyasaya sürülmüştür. Enantiyomerlerin biyokimyasal farklılık göstermeleri zamanla tespit edilince enantiyomer bileşikler hakkında araştırmalar artmıştır. Günümüzde enantiyomerler birbirinden farklı etkiye sahip olduğu keşfedilince kiral ilaçların, aktif olan enantiyomeri üretilmeye başlanmış ve piyasaya sürülmüştür. Bu durumun ilaç endüstrisindeki kiral ilaçların üretimini ve satışını artırdığı görülmektedir (Tablo 2).

Tablo 2. Kiral İlaçların Senelik Satış Değeri



Rasemik olarak piyasada satılan ilaçların oldukça fazla yan etkiler oluşturduğu bilinmektedir. Bu konuda olumsuz olarak ortaya çıkan ilk örnek talidomittir. 1963 yılına kadar hamilelerde sabah bulantısını gidermede kullanılmıştır. 1963'te, bu ilacı kullanan kadınların çocuklarında sakatlıklar oluşmuştur. Bu sakatlık ve doğum kusurlarının nedeninin bu ilaç olduğu ispat edilmiştir. Talidomidin enantiyomerlerinden biri sabah bulantılarını giderici etki gösterirken, ilahtaki diğer enantiyomerin ise doğum kusurlarına yol açtığı tespit edilmiştir (Şekil 11).



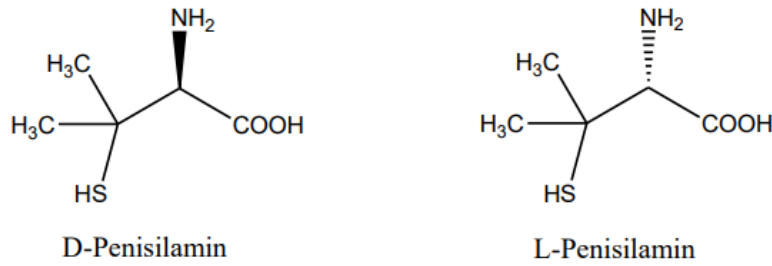
Şekil 11. Talidomit bileşiğinin enantiyomerleri.

Ketamin adlı ilaç rasemik halde üretilerek satışa sunulmuş ve istenmeyen sonuçlar doğurmuştur. Bu madde insan ve hayvan operasyonlarında anestezik olarak kullanılan bir etken maddedir. Rasemik olarak uygulandıktan sonra hastalarda zihinsel olumsuzluklar görülmüştür. Bazı hastalarda halisinasyon gözlenmiştir. Ketamin'in enantiyomerleri incelendiğinde S-(+) ketaminin anestezik etki gösterdiği, R-(-) ketamin'in ise istenmeyen olumsuz etkiler gösterdiği rapor edilmiştir (Şekil 12).



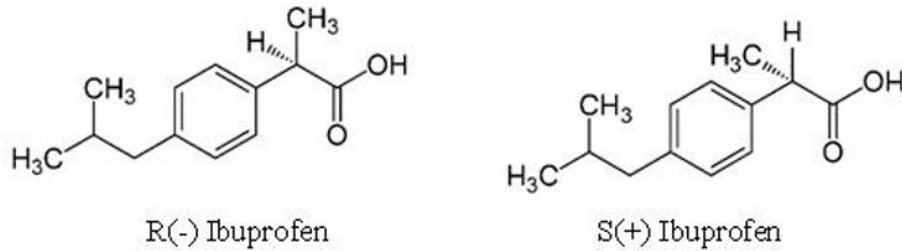
Şekil 12. Ketamin'in (*R*) ve (*S*) enantiyomeri.

Ağır metal zehirlenmesinde sıkça kullanılan ve antipod özellikteki bir α -amino asit yapısında olan penisilaminin D ve L enantiyomerleri aynı etkiyi göstermezler. D-penisilamin zehirlenmeyi giderirken, L-penisilamin ağır metal iyonlarının atılmasında etkin değildir hatta körlüğe yol açmaktadır. (Şekil 13).



Şekil 13. D-L penisilamin.

Bu bileşiklerin merkezindeki karbon atomu stereomerkezdır. Bu karbon atomu optikçe aktiftir. Bu bileşikler birbirinin çakışmayan ayna görüntüleridir ve bu bileşiklere enantiyomerler de denir. Bu enantiyomerler düzlem polarize ışığa karşı aktiftir yani ışığı farklı açılarla çevirirler. İltihap giderici olarak kullanılan ilaçlarda bulunan ibuprofen bileşiğinin (*S*) izomeri etkinlik gösterirken, (*R*) izomerinin iltihap giderici etkisine rastlanmamıştır. Dolayısıyla saf (*S*) izomerinden oluşmuş bir ilaç, rasemik karışıma göre çok daha hızlı etki göstermektedir (Şekil 14).



Şekil 14. *R*-ibuprofen ve *S*-ibuprofen.

Yüksek tansiyon ilaçlarında kullanılan metildopa adlı ilaçta bu etkisiyi sadece (*S*) izomeri gösterirken (*R*) izomeri bu etkiyi göstermemektedir (Şekil 15).

İlaçlar rasemik karışım halinde üretilecek olursa, bu ya etkin maddeyi karşılamak için iki kat fazla ilaç kullanmayı gerektirecek veya ilaçtaki istenmeyen optik izomer sağlık sorunlarına neden olacaktır. Bütün bunlar ise istenmeyen bir durumdur. Hem kaynak israfına neden olacak hem de ilaç tüketimini artıracak etki yapacaktır. Bu nedenle tek bir enantiyomer tercih edilir. Rasemik karışım ise tercih edilmez.

Toksik etki gösteren enantiyomerin ayrılması; kullanılan ilaç miktarının yarı yarıya azaltılması ve stereokimyasal anlamda saf aktif enantiyomerlerin farmakodinamik etkilerinin ve toksikliğinin saptanıp analiz edilmesini sağlanması gibi sebeplerden ötürü rasemik ilaçlar tercih edilmeyip enantiyosaf ilaçların kullanımının tercih edilmesinde artış görülmektedir (Maćzka, & Mironowicz, 2004).

Alan Yazın Derlemesi

Rasemat olmayan enantiyosaf bileşikler farklı yöntemlerle kimyasal ve biyokimyasal olarak sentezlenebilmektedirler. Enantiyosaf molekül eldesinde kiral özellikteki biyokatalizör ya da kemokatalizörler ajan olarak kullanılarak optikçe aktif enantiyosaf ilaçlar sentezlenebilmektedir (Ghanem, & Aboul-Enein, 2004). Farmasötik endüstrisinde saf enantiyomer bileşiklerinin sentezinin önemi giderek artmaktadır. Bu amaçla aynı zamanda biyolojik katalizörler de olan enzimler veya mikroorganizmalar kullanılır (Kurbanoglu, Zilbeyaz, Kurbanoglu, & Taşkın, 2007). Biyolojik katalizörler kimyasal katalizörler ile kıyaslandığında kimyasal katalizör seçiminin ve kullanımının birçok olumsuz yönleri vardır. Kimyasal katalizörler; çevre kirleticisidir, seçiciliği azdır, tepkime verimi düşüktür, fazlaca yan ürün oluşturur, ürün dönüşüm oranı düşüktür ve kullanım maliyeti fazladır (Hage vd., 2001). Biyokatalizörlerin ise avantajları şöyle sıralanabilir; yüksek verimlidirler, seçicidirler, aktivitelere daha çok duyarlıdır, çözücü olarak çoğunlukla su kullanılabilir ve birçok ortamda uygulanabilecek reaksiyon şartlarına sahiptirler (Willick vd., 1997).

Biyokatalizörlerin tepkimeleri çok daha hızlı gerçekleşir. Biyokatalizörler; bitki, hayvan veya farklı yapıdaki mikroorganizmalardan elde edilebilen enzimler ile elde edilirler. İzole edilen bu enzimler ekonomik açısından uygundur aynı zamanda sürekli elde edilebilmektedir. Biyokatalizörler çevre dostudur, doğada kolayca parçalanabilmektedirler (Nakamura vd., 2003).

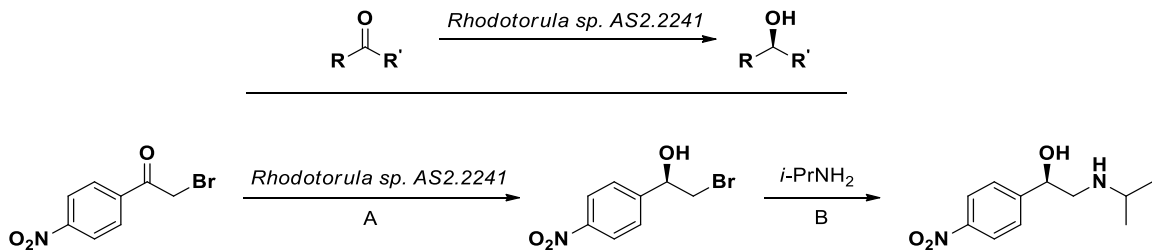
İzomerizasyon, rasemizasyon gibi istenmeyen reaksiyon oluşumunu engellemede biyokatalizörler oldukça başarılıdır. Ayrıca spesifik olduklarından substrattaki belirli bir bölgeye etki edecek enzimi katalize eder. Çoğu tepkimeyi katalizleyebildiklerinden yüksek

enantiyoseçici özelliğe de sahip olabilmektedirler (Wu, & Liang, 1999). Enzimin aktif bölgesi asimetrik etki göstererek rasemik bileşikte enantiyoseçici davranır. Böylece tek enantiyomer katalize edilir. Reaksiyonlarda yüksek verimle enantiyosaf bileşik elde edilmesinde oldukça önemli rol oynadığından, biyokatalizörler asimetrik sentezde oldukça önemli yer tutar.

Biyokatalizörler substrat veya ürün inhibisyonuna neden olmaları ve tepkimelerinin sulu ortamda yapılması dezavantaj olarak görülmesine rağmen bu dezavantajların doğru olmadığı, kavram yanlışları olduğu görülmüştür. Enzimlerin birçoğu uzun zamanlı kullanım şartlarında kararlıdır, ayrıca bilinen her organik tepkime türüne uygun enzim-katalizli tepkime bulunmaktadır. Doğadaki biyokatalizörlerin özellikleri değiştirilebilir ve istenilen reaksiyon koşullarına uyumlu hale getirilebilir (Woodyer, Simurdiak, Van Der Donk, & Zhao, 2005).

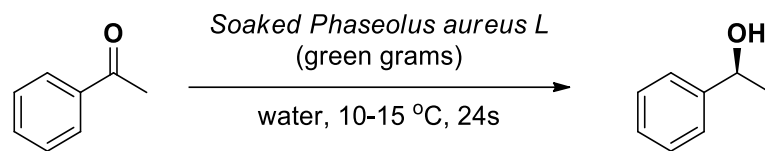
Son yıllarda, prokiral ketonların biyokatalizör olarak biyo-indirgenmesi üzerine farklı araştırmalar yapılmıştır. Bu amaçla mikroorganizmalar, saf enzimler ve bitki ve hayvanlardan elde edilen kültür hücrelerinden yararlanılmıştır.

Yang vd. (2006) Bakteri hücrelerini kullanarak sekonder alkol elde etmeyi amaçlamışlardır. Bu sebeple prokiral ketonları asimetrik olarak indirgemişler ve sekonder alkol sentezlemişlerdir. Bakteri ile indirgeme sistemi α - ve β -keto esterlerin redüksiyonunda orta ile yüksek enantiyoseçicilik göstermiştir fakat bazı aromatik ketonların ve asetilpiridinlerin redüksiyonunda (>%97 ee) yüksek aktiflik ve enantiyoseçicilik göstermişlerdir. *Rhodotorula* sp. AS2.2241 hücreleriyle 2-bromo-1-(4-nitrofenil) etanon'un asimetrik redüksiyonundan (*R*)-(2-bromo-1-4-nitrofenil) etanol %97 ee oranında elde edilmiştir. Biyokatalizör yardımıyla üretilen (*R*)-(2-bromo-1-4-nitrofenil) etanol'ün yüksek aktiviteli bir molekül olması ve yüksek miktarda enantiyosaf olarak elde edilmesi ile bu organik bileşiğin üretilmesi için kullanılabilirliği saptanmıştır (Şekil 18).



Şekil 18. 2-Bromo-1-(4-nitrofenil) etanonun asimetrik indirgemesi.

Kumaraswamy ve Ramesh (2003) *Phaseolus aureus* L biyokatalizörü ile bazı prokiral ketonları asimetrik olarak indirgeyebilmişlerdir (Şekil 19).



Şekil 19. *Phaseolus Aureus L* biyokatalizörü ile kiral sekonder alkol eldesi.

Sekonder kiral alkollerin üretilmesinde biyokatalizli indirgeme tercih edilmiş ve daha çevreci olan *Phaseolus aureus L* biyokatalizörünün enantioseçici olarak biyoindirgeyici olduğunu ispatlamışlardır. *Phaseolus aureus L* kullanılarak yapılan reaksiyonların daha yüksek verimli olduğunu ve kimyasal reaktifler veya mikroorganizmalardan daha az atığa neden olduğu kanıtlanmıştır. Bu tepkime sonucu kiral alkollerin multigram ölçekli üretimi için denemeler yapılmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Tablo 3). *Phaseolus aureus L*'nin prokiral ketonları indirgeyerek sekonder alkol üretilmesinde farmasötik açıdan uygun biyokatalizör olduğu görülmüştür.

Tablo 3. *Phaseolus aureus L* Biyokatalizörü ile Farklı 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 vd. (2004) 2-bromo-4-floro asetofenon'un *Pichia*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Rhodotorula* kullanarak enantiyoseçimli asimetrik indirgeme tepkimesi yapmıştır. Tepkime sonucunda asimetrik indirgenme tepkimesiyle ile 2-bromo-4-floro asetofenon'dan (S)-1-(2-bromo-4-floro fenil) etanol sentezlemiştir (Şekil 20).



Şekil 20. 2-Bromo-4-floro asetofenon'un asimetrik redüksiyonu.

Ekmek mayasından elde edilen *Pichia*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Rhodotorula* bakterileriyle çalışılarak elde edilen sekonder alkollerin dönüşüm ve enantiyomerik aşırılık durumları çalışılmıştır (Tablo 4). İndirgeme reaksiyonları, 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 sa gerçekleştirilerek dönüşüm ve enantiyomerik aşırılık (ee) miktarları bulunmuştur. *Pichia*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Rhodotorula* ait bakteriler yüksek dönüşüm (%99-100) ve ee (S-alkol) ile yüksek oranda enantiyoseçimlilik (ee>%99) saplanmıştır (Tablo 4).

Tablo 4. 2-Bromo-4-Floro Asetofenon'un Mikroorganizmalar ile Asimetrik Rediksiyonu

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

Mandal, Ahmad, Khan ve Kumar (2004) yaptıkları çalışmada farklı funguslar kullanarak asetofenon türevlerini enantiyoseçimli olarak biyoredüksiyonunu gerçekleştirmişlerdir. Elde edilen verilere göre *Trichothecium* sp.'nin enantiyoseçimlilik (%93,5) ve dönüşüm (%85) olarak en iyi fungus olduğu görülmüştür.

Trichothecium sp.'den sonra en yüksek verimli sonuç veren fungus *Aspergillus oryzae* NCIM 649 ile enantiyoseçimlilik (%81,5) ve dönüşüm (%100) olarak belirlenmiştir (Tablo 5).

Tablo 5. Değişik Fungus Çeşitleri ile Asetofenon'un Biyoredüksiyonu

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</i> sp. NCIM 1075	24	51 (R)	25
<i>Fusarium</i> sp. NCIM 1075	48	67 (R)	100
<i>Aspergillus oryzae</i> NCIM 649	48	81 (R)	100
<i>Trichothecium</i> sp.	72	93 (R)	85

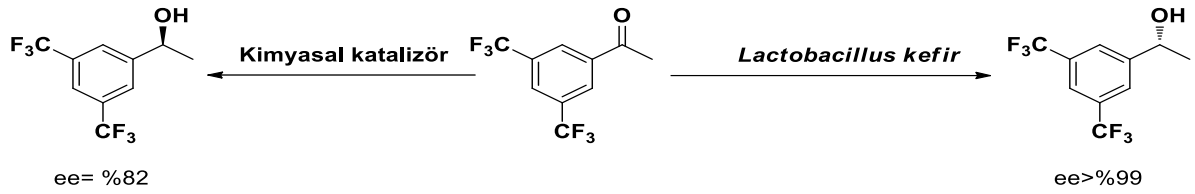
Adlercreutz (1991) yaptığı çalışmada ketonların stereoseçici indirgenmesini katalize etmek amacıyla altı adet asetik asit bakteri suşu kullanmış ve bu suşların yeterlilik derecelerini yeteneklerini analiz etmiştir. *Gluconobacter oxydans* DSM 50049 ve *Acetobacter aceti* DSM 2002 ketonların enantiyoseçici redüksiyonunu katalize etmede en başarılı olduğunu belirlemiştir. 12 tane ketonun hepsini ≥ 94 enantiyomerik aşırılık derecesinde (S)-alkollere indirgenmiştir. Reaksiyonda *Gluconobacter oxydans* DSM 50049 ve *Acetobacter aceti* DSM 2002 suşlarını kullanmıştır. *Acetobacter aceti* DSM 2002 bakterisinin yüksek oranda enzimatik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Tablo 6).

Tablo 6. Asetik Asit Bakterileri ile Çeşitli Ketonların Asimetrik Redüksiyonu Sonucu Enantiyomerik Aşırılık Değerleri

Ürün	<i>G.oxydans</i> DSM 50049	<i>A. aceti</i> DSM 2002	<i>G.oxydas</i> DSM 2003	<i>A. aceti</i> DSM 2004	<i>A.pasteurianus</i> DSM 2324	<i>A.peroxydans</i> DSM 2347
(S)-2-pentanol	94	94	41	6	72	91
(S)-2-hexanol	95	96	13	54	45	85
(S)-2-octanol	94	91	45	63	69	56
(S)-3-methyl-2-butanol	99	11	74	18	98	64
(S)-3,3-dimethyl-2-butanol	97	49	86	24	39	29
(S)-1-cyclohexyletanol	95	94	76	34	81	66
(S)-4-phenyl-2-butanol	81	94	82	52	90	50
(S)-1-phenyletanol	99	92	75	86	94	66
(S)-1-phenyl-1-propanol	97	96	48	39	90	93
(S)-3-heptanol	88	96	61	74	81	72
(S)-3-nonanol	93	94	24	23	89	78
(S)-4,4-dimethyl-2-pentanol	89	97	-	65	85	87

Gelo-Pujic, Le Guyader ve Schlama (2006) yaptıkları çalışmada enantiyoseçici redüksiyon için iki farklı yöntem uygulamıştır. *Lactobacillus kefir* ve *Aspergillus niger* mikroorganizmalarını kullanarak 1-[3,5-bis(triflorometil)fenil] etanonu indirgemıştır. Bu yöntemlerden birincisi hidrojen ile asimetrik indirgeme diğeri ise bakteriyofaj indirgemesidir. Bu iki yöntemi incelenmiş ve bu yöntemler kıyaslanmıştır. 1-[3,5-bis(triflorometil)fenil] etanon hem (S)-alkol'e hem de (R)-alkol'e indirgenmiştir. Her iki enantiyomerde yüksek verim ve

enantiyomerik aşırılık (ee) değerlerine ulaşılmış ve bulunan bu yöntemler alternatif indirgeme yöntemi olarak belirlenmiştir (Şekil 21).



Şekil 21. 1-[3,5-Bis (triflorometil)fenil] etanon'un kimyasal ve biyokatalizör ile asimetrik indirgenmesi.

Andrade, Utsunomiya, Omori, Porto ve Comasseto (2006) yaptıkları çalışmada biyokatalizör eldesinde bitki köklerini kullanmışlar, bu biyokatalizörler ile asetofenon türevleri biyoindirgenmiştir. Asimetrik (*R*) ve (*S*) alkoller enantiyomerik aşırılık %98'e yakın oranlarla ortaya konulmuştur. Tepkime şartları; bitki hücrelerini 0.25 g/mL içeren sulu ortamda, asetofenon derişimini 10 mM, sıcaklığını 32 °C, karıştırma hızını 160 rpm olarak gerçekleştirmişlerdir.

Tablo 7. Asetofenon'un Çeşitli Bitki Kökleri Kullanılarak Biyoredüksiyonu

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

	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>

Tablo 7’de gösterildiği gibi reaksiyon süresiyle enantiyomerik aşırılık arasında ters orantı olduğu görülmüştür.

Arracacia xanthorrhiza bitki kök hücresinden elde edilen bakteri ile en iyi sonuca ulaşılmıştır. Bu reaksiyonların etkili ve çevreci olduğunun kabul edildiğini belirtmişlerdir.

Kurbanoğlu vd. (2007) yaptıkları çalışmada bazı asetofenon türevlerinin asimetric indirgenme reaksiyonlarını gerçekleştirmede farklı bitkilerden izole edilmiştir.

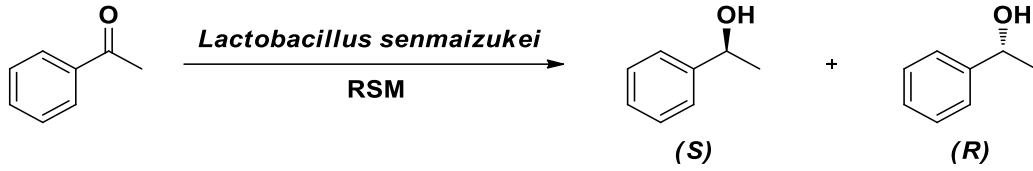
Alternaria alternata EBK-4 mantarı biyokatalizör olarak kullanılarak reaksiyon koşullarını optimize ederek pH 6.5, sıcaklık 28 °C, 26 saat ve 150 rpm de tepkimeyi gerçekleştirmişlerdir (Şekil 22).



Şekil 22. *Alternaria Alternata* EBK-4 biyokatalizörü ile asetofenon’un asimetric indirgenmesi.

Alternaria alternata EBK-4 mantarı biyokatalizörü ile asetofenon’un 1-feniletanole yüksek enantiyomerik aşırılıkla redüksiyonu gerçekleştirilmiştir. *Alternaria alternata* EBK-4 biyokatalizörü ile optimize koşullarda ilgili optikçe aktif alkollere >%99 enantiyomerik aşırılık (ee) ile dönüştürülmüştür.

Çolak, Şahin, Dertli, Yılmaz ve Taylan (2019) yaptığı çalışmada *Response Surface Methodology* (RSM) yöntemini kullanarak asetofenon’un indirgenmesini gerçekleştirmişlerdir. Bu yöntemde laktik asit bakterisi olan *Lactobacillus senmaizukei*’nin tüm hücresi kullanılmıştır. Kültür parametrelerini sıcaklık, pH, inkübasyon süresi açısından optimize edilmiştir (Şekil 26). Optimize şartlarını oluşturmalarının nedeni yüksek enantiyomerik aşırılık (ee) ve dönüşüm oranını elde etmektir.



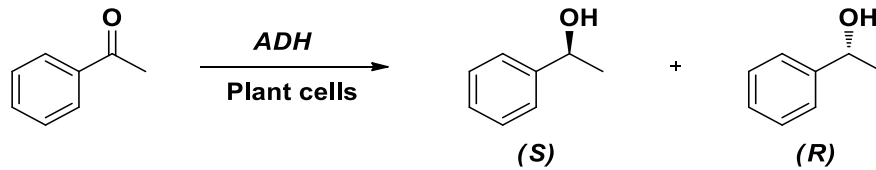
Şekil 23. Asetofenon'un RSM tekniğiyle asimetrik indirgenmesi.

Tam hücre *Lactobacillus senmaizukei* ile biyoindirgenme için belirlenen optimum koşullar pH 5.25, sıcaklık 25°C, inkübasyon süresi 72 saat ve karıştırma seviyesi 100 rpm olarak belirlenmiştir. RSM yöntemini kullanarak başarılı bir şekilde asetofenonun asimetrik redüksiyonunu gerçekleştirmişlerdir (Şekil 23).

Kazıcı, Bayraktar ve Mehmetoğlu (2016) yaptıkları çalışmada bir grup aldehitin ve ketonun asimetrik indirgenmesini incelemişlerdir. Çalışmalarında dondurularak kurutulmuş havucu tam hücre biyokatalizörü olarak kullanılmıştır (Şekil 24).

Tam hücrelerin, asimetrik 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 şartlarını araştırmışlardır.

Response Surface Methodology (RSM) yöntemini, dondurularak kurutulmuş havuçtan izole edilen biyokatalizörleri kullanarak biyoindirgenme reaksiyonlarını başarılı bir şekilde gerçekleştirmişlerdir.



Şekil 24. Asetofenon'un dondurulmuş havuç biyokatalizörü ile asimetrik indirgenmesi.

Prokiral aromatik ketonların asimetrik indirgeme reaksiyonu için dondurularak kurutulmuş havuçların uygun biyokatalizör olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Optimum çalışma şartlarını belirlemek için RSM yöntemi kullanılarak substrat derişimi, tepkime süresi, sıcaklık ve pH gibi farklı faktörlerin reaksiyonlar üzerindeki etkileri incelenmiştir. En yüksek verimli reaksiyon şartları; reaksiyon süresi 48 saat, substrat derişimi 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, Bayraktar ve Mehmetoğlu (2010) yaptıkları çalışmada enzim kaynağı *Candida antartica* adlı bakteriyi kullanarak RSM yöntemi yardımıyla 1-fenil 1-propanol'ün

enantioseçici olarak üretimi hakkında çalışma yapmışlardır. RSM uygulanmadan önce belirlenmiştir. Yüksek oranda enantiyomerik aşırılık eldesi için *Candida antartica* enziminin optimum tepkime koşulları sağlanarak %83'lük enantiyomerik aşırılık oranı %91 oranına yükselmiştir.

Goretti vd. (2012) yaptıkları çalışmada *Cryptococcus gastricus*'un tüm hücreleri yardımıyla (4S)-(+)-karvon dihidrokarvona asimetrik indirgenmiştir. *Cryptococcus gastricus*'un tüm hücreleri RSM tekniği yardımıyla optimize edilmiştir. *Cryptococcus gastricus*'un tüm hücreleri tarafından (4S)-(+)-karvonun biyoindirgenmesi (>% 95) yüksek oranda eldesi sağlanmıştır. Optimum deneysel koşullar incelenerek en uygun koşullar belirlenmiş ve biyoindirgenme yüksek verimle gerçekleştirilmiştir.

Bin Halmi vd. (2016) yaptıkları çalışmada RSM tekniği yardımıyla *Serratia sp* suşunun tepkime şartlarını optimize ederek artı altı yükseltgenme basamağına sahip molibdenin biyoindirgemisini yüksek verimle gerçekleştirmişlerdir.

Kiral 1-(4-metoksifenil) etanol, farmasötik ara madde üretiminde çok önemli bir hammaddedir. Ayrıca antihistaminiklerin sentezi için (S)-1-(4-metoksifenil) etanol, difenilhidramin hidroklorür ve loratadin önemli aktif bir maddeyken (R)-1-(4-metoksifenil) etanol, ibuprofen gibi aril propanoikasit anti-enflamatuar ve analjezik etki gösteren bazı ilaçların üretiminde oldukça önemli yer tutar (MacLellan, & Clayden, 2011; Brondani, Guilmo, Dudek, Fraaije & Andrade, 2012; Llona-Minguez, Ghassemian & Helleday, 2015).

Kimyasal veya biyolojik yöntemlerle enantiyosaf 1-(4-metoksifenil) etanol'ün sentezlenmesi oldukça önem kazanmıştır. Kimyasal katalizörler kullanılarak asimetrik sentez çalışmalarının bazı olumsuzlukları vardır. Bu olumsuzluklar; çevre kirliliğine neden olma, ürünlerin saflaştırılmasında zorluklar, verim düşüklüğü sıralanabilir. Enzimatik yöntemlerin, kolay reaksiyon şartları ve yüksek enantioseçici olduklarından fazlaca tercih edilen yöntemlerdendir. Bitki hücre kültürleri, mikrobiyal hücreler ve ketoreduktazlar (Lou, Wang, Smith & Zong, 2009; Wei, Liang, Cheng, Zong & Lou, 2009) gibi çeşitli biyokatalizörler, 4-metoksiasetofenonun (S)-1-(4-metoksifenil) etanol'e stereoselektif olarak redüksiyonunda kullanılmıştır.

4-metoksiasetofenonun biyokatalitik asimetrik indirgenmesiyle ilgili, mikrobiyal hücreler tarafından katalize edilen enantiyomerik olarak saf (S)-1-(4-metoksifenil) etanol'ün biyokatalitik senteziyle ilgili bazı çalışmalar bulunmaktadır (Lou vd., 2009). Bu çalışmalar sonucu ortalama bir seçicilik ile ilgili alkoller elde edilmiştir.

Rasemik 1-(4-metoksifenil) etanol'ü biyokatalizör eşliğinde kinetik rezölüsyonundan (R)-1-(4-metoksifenil) etanol'ü %88 enantiyomerik aşırılık ve %18 oranında oldukça düşük bir verim ile elde etmişlerdir (Hatzakis, & Smonou, 2005).

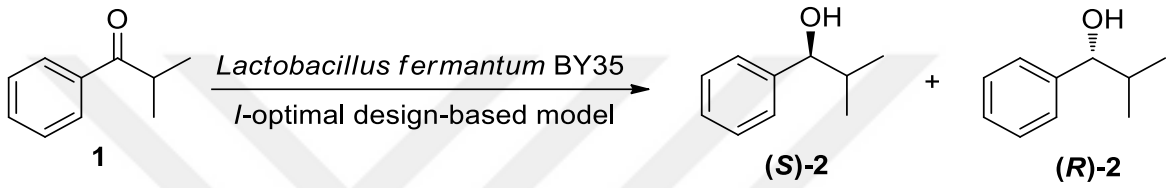
Endüstriyel biyokatalizör üretiminin başlamasıyla birlikte, biyokatalizör teknolojisi ve ürünleri, sürekli artan bir önem kazanmıştır. Gündelik yaşamın taleplerine cevap verecek endüstriyel malzeme üretiminde biyokatalizörler oldukça önemli bir yer kazanmıştır. Biyokatalizörlerin bu öneminden dolayı 4-metoksiastofenon'u asimetrik olarak indirgeyebilecek farklı biyokatalizörlerin geliştirilmesi de oldukça önemlidir.



ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

Materyal ve Yöntem

Bu tez çalışmasında *Lactobacillus fermentum* BY35, 2-metil-1-fenilpropan-1-on bileşiğinin, 2-metil-1-fenilpropan-1-ol bileşiğine asimetrik olarak indirgenmesinde biyokatalizör olarak kullanılmıştır. *I*-optimal tabanlı deneysel tasarımı kullanılarak, asimetrik indirgenme reaksiyonunun optimum şartları belirlenmiştir.



Şekil 1. *I*-optimal tasarım tabanlı model optimizasyon stratejisi kullanılarak *L. fermentum* BY35 biyokatalizörü ile 1'in asimetrik biyo-indirgenmesi.

Ayrıca bu çalışmada reaksiyon koşullarının optimizasyonu klasik metotlar yerine *I*-optimal tasarım tabanlı optimizasyon stratejisi kullanılarak yapılacaktır.

Deneysel Prosedür ve Önerilen *I*-Optimal Tasarıma Dayalı Model

Bu çalışmada, *I*-optimal tasarımın tahmin odaklı olması ve deney için tasarım noktalarının sayısının azaltılabilmesi nedeniyle, diğer tasarımlar yerine *I*-optimal bir tasarım seçilmiştir. Merkezi bileşik tasarım ve Box-Behnken tasarımı gibi geleneksel yüzey tasarımlarının, deney için *I*-optimal tasarımından daha fazla tasarım noktası gerektirmektedir. Ayrıca D-optimal tasarımı tahmin amaçları için iyi çalışmayabilir.

I-optimallik kriteri, *I*-optimal tasarım noktalarını oluşturmak için kullanılır. Bu kriter için tahmin performansı, bir ortalama alma işlemi aracılığıyla üretilir. *I*-optimal tasarım şu şekilde gösterilir (1).

$$\min_{\delta} \frac{\int_R v(\mathbf{x}) d\mathbf{x}}{\int_R d\mathbf{x}} \quad (1)$$

Burada $\mathbf{X}$, model matristir, $v(\mathbf{x}) = N \int_R \mathbf{x}^{(m)'} (\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1} \mathbf{x}^{(m)} d\mathbf{x}$, and $\int_R d\mathbf{x} = C$.

Denklem (1)'de belirtilen I -optimal tasarım, bir değişim algoritması kullanılarak elde edilebilir. Algoritma, deney için I -optimal tasarım noktaları üretmede etkilidir.

$$\begin{aligned}
& \min_{\delta} \frac{N \int \mathbf{x}^{(m)'} (\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1} \mathbf{x}^{(m)} d\mathbf{x}}{C} \\
& \Rightarrow \min_{\delta} \frac{N}{C} \int_R \text{tr} \left[\mathbf{x}^{(m)'} (\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1} \mathbf{x}^{(m)} \right] d\mathbf{x} \\
& \Rightarrow \min_{\delta} \frac{N}{C} \int_R \text{tr} \left[\mathbf{x}^{(m)'} \mathbf{x}^{(m)} (\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1} \right] d\mathbf{x} \quad (2) \\
& \Rightarrow \min_{\delta} \text{tr} \left\{ (\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1} \left[\frac{1}{C} \int_R \mathbf{x}^{(m)'} \mathbf{x}^{(m)} d\mathbf{x} \right] \right\} \\
& \Rightarrow \min_{\delta} \text{tr} \left\{ [M(\delta)]^{-1} [\mathbf{D}_R] \right\}
\end{aligned}$$

Burada $I(\delta)$ I -optimalite kriteri olarak tanımlanır ve $I(\delta) = \text{tr} \left\{ [M(\delta)]^{-1} [\mathbf{D}_R] \right\}$. Ayrıca, $\mathbf{D}_R$ çapraz bir matrisi temsil eder ve $[M(\delta)]^{-1} = N(\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1}$ (2)

Tablo 8'da “-1” alt düzeyi, “+1” ise yüksek düzeyi ifade etmektedir

Tablo 8. Deney için dört tasarım faktörünün seçilen seviyeleri

Tasarım Faktörleri	x_1 (pH)	x_2 (Sıcaklık, °C)	x_3 (İnkübasyon Süresi, h)	x_4 (Karıştırma Hızı, rpm)
Kodlanmış seviyeler	Gerçek değerler			
-1 (Düşük seviye)	4.5	25	24	100
+1 (Yüksek seviye)	6.5	35	72	200

Tablo 9. Deney için dört tasarım faktörü

No	Tasarım faktörleri ve gerçek değerleri				Yanıt değişkenleri ve verileri	
	x_1 (pH)	x_2 (°C)	x_3 (saat)	x_4 (dev/dak)	ee (%)	cr (%)
1	5.00	25	24,0	137	80	82
2	5.70	25	53.0	153	85	88
3	4.50	25	72,0	100	77	71
4	5.00	35	72,0	105	68	59
5	5.00	29	41.0	100	88	81
6	6.50	25	24,0	100	85	79
7	5.00	35	72,0	200	79	73
8	6.50	28	72,0	105	81	77
9	4.50	31	53.0	154	75	71
10	5.70	25	53.0	153	87	82

11	5.00	35	36.5	200	91	88
12	5.70	31	24,0	153	93	88
13	6.50	35	72,0	179	90	89
14	4.50	25	24,0	200	81	83
15	6.50	27	72,0	194	95	94
16	5.00	28	72,0	200	84	81
17	5.70	31	24,0	153	77	68
18	4.50	35	24,0	100	70	68
19	4.50	31	53.0	154	75	71
20	6.50	35	38.0	105	90	84
21	5.25	29	42.0	195	89	86
22	5.25	29	41.0	100	71	77
23	6.50	28	36.0	200	99	99
24	5.70	31	24,0	153	85	78
25	6.10	31	54.0	145	85	83

Not: No=Çalıştırma Numarası

Deneyler için *I*-optimal tasarım noktaları Tablo 9'da gösterilmiştir. Tablo 9'da ee (%) ve cr (%) yanıt değişkenleri için asimetrik biyo-indirgeme deneyine on beş gerekli, beş tekrarlı ve beş uyumsuzluk tasarım noktası dahil edilmiştir. Tablo 9'da ki tasarım noktalarını oluşturmak için değişim algoritması kullanıldı. Ayrıca, deney için *I*-optimal tasarımı oluşturmak için çalışma süresi 4311,29 s dir. Gözlenen yanlılığı ortadan kaldırmak için *I*-optimal tasarım noktalarının rastgele oluşturulduğuna dikkat edilmelidir. ee'nin tahmini yanıtı (%) aşağıdaki gibi gösterilir (3).

$$\hat{\mu}_{ee}(\mathbf{x}) = \hat{\alpha}_0 + \mathbf{x}'\mathbf{a} + \mathbf{x}'\mathbf{A}\mathbf{x} \text{ where } \mathbf{x} = \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \\ x_3 \\ x_4 \end{bmatrix}, \mathbf{a} = \begin{bmatrix} \hat{\alpha}_1 \\ \hat{\alpha}_2 \\ \hat{\alpha}_3 \\ \hat{\alpha}_4 \end{bmatrix}, \text{ and } \mathbf{A} = \begin{pmatrix} \hat{\alpha}_{11} & \hat{\alpha}_{12}/2 & \hat{\alpha}_{13}/2 & \hat{\alpha}_{14}/2 \\ & \dots & \dots & \dots \\ \hat{\alpha}_{41}/2 & \hat{\alpha}_{42}/2 & \hat{\alpha}_{43}/2 & \hat{\alpha}_{44} \end{pmatrix} \quad (3)$$

Burada $\hat{\alpha}_i$ *i*. Regresyon katsayısını gösterir. Ayrıca, $\mathbf{a}$ ve $\mathbf{A}$, sırasıyla ee için tahmini regresyon katsayılarının vektörü ve tahmini regresyon katsayılarının matrisidir. Aynı doğrultuda, cr (%) 'nin tahmini cevabı aşağıdaki gibi verilir:

$$\hat{\mu}_{cr}(\mathbf{x}) = \hat{\beta}_0 + \mathbf{x}'\mathbf{b} + \mathbf{x}'\mathbf{B}\mathbf{x} \text{ where } \mathbf{x} = \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \\ x_3 \\ x_4 \\ x_n \end{bmatrix}, \mathbf{b} = \begin{bmatrix} \hat{\beta}_1 \\ \hat{\beta}_2 \\ \hat{\beta}_3 \\ \hat{\beta}_4 \end{bmatrix}, \text{ and } \mathbf{B} = \begin{pmatrix} \hat{\beta}_{11} & \hat{\beta}_{12}/2 & \hat{\beta}_{13}/2 & \hat{\beta}_{1n}/2 \\ & \dots & \dots & \dots \\ \hat{\beta}_{41}/2 & \hat{\beta}_{42}/2 & \hat{\beta}_{43}/2 & \hat{\beta}_{44} \end{pmatrix} \quad (4)$$

Burada $\hat{\beta}_i$ regresyon katsayısını temsil eder. Ek olarak, $\mathbf{b}$ ve $\mathbf{B}$, sırasıyla cr için tahmini regresyon katsayılarının vektörünü ve tahmin edilen regresyon katsayılarının matrisini gösterir.

(4) Tablo 9'da ee ve cr yanıt değerleri %0 ile %100 arasında toplanmıştır. Bu nedenle, ee ve cr yanıt değişkenlerini tahmin etmek için logit dönüşüm tekniği uygulanabilir. Teknik aşağıdaki gibi verilmiştir (5 ve 6).

$$y'_{ee,i} = \ln \left(\frac{y_{ee,i} - LL}{UL - y_{ee,i}} \right) \quad (i=1, 2, \dots, 25) \quad (5)$$

$$y'_{cr,i} = \ln \left(\frac{y_{cr,i} - LL}{UL - y_{cr,i}} \right) \quad (i=1, 2, \dots, 25) \quad (6)$$

Burada ve $LL \leq (y_{ee}), (y_{cr}) \leq UL$ LL ve UL sırasıyla alt ve üst limitleri ifade eder.

Önerilen *I*-optimal tasarım tabanlı modelin amacı, dört tasarım faktörünün sınır gereksinimlerine tabiyken ee ve cr yanıt değişkenleri için genel arzu edilebilirliği maksimize etmektir. Genel arzu edirlilik fonksiyonu, ee ve cr arzu edirlilik fonksiyonlarının geometrik ortalaması olarak bulunur. Önerilen *I*-optimal tasarım tabanlı model şu şekilde ifade edilir (7).

$$\begin{aligned} & \text{maximize} \left(d_{ee} \left(\text{Logit}(\hat{\alpha}_0 + \mathbf{x}'\mathbf{a} + \mathbf{x}'\mathbf{A}\mathbf{x}) \right) * d_{cr} \left(\text{Logit}(\hat{\beta}_0 + \mathbf{x}'\mathbf{b} + \mathbf{x}'\mathbf{B}\mathbf{x}) \right) \right)^{1/2} \\ & \text{subject to } -1 \leq x_1, x_2, x_3, x_4 \leq +1 \\ & \text{where} \\ & d_{ee} \left(\text{Logit}(\hat{\alpha}_0 + \mathbf{x}'\mathbf{a} + \mathbf{x}'\mathbf{A}\mathbf{x}) \right) = \begin{cases} 0, & \text{Logit}(\hat{\alpha}_0 + \mathbf{x}'\mathbf{a} + \mathbf{x}'\mathbf{A}\mathbf{x}) < L_{ee} \\ \left(\frac{\text{Logit}(\hat{\alpha}_0 + \mathbf{x}'\mathbf{a} + \mathbf{x}'\mathbf{A}\mathbf{x}) - L_{ee}}{T_{ee} - L_{ee}} \right), & L_{ee} \leq \text{Logit}(\hat{\alpha}_0 + \mathbf{x}'\mathbf{a} + \mathbf{x}'\mathbf{A}\mathbf{x}) \leq T_{ee} \\ 1, & \text{Logit}(\hat{\alpha}_0 + \mathbf{x}'\mathbf{a} + \mathbf{x}'\mathbf{A}\mathbf{x}) > T_{ee} \end{cases} \\ & d_{cr} \left(\text{Logit}(\hat{\beta}_0 + \mathbf{x}'\mathbf{b} + \mathbf{x}'\mathbf{B}\mathbf{x}) \right) = \begin{cases} 0, & \text{Logit}(\hat{\beta}_0 + \mathbf{x}'\mathbf{b} + \mathbf{x}'\mathbf{B}\mathbf{x}) < L_{cr} \\ \left(\frac{\text{Logit}(\hat{\beta}_0 + \mathbf{x}'\mathbf{b} + \mathbf{x}'\mathbf{B}\mathbf{x}) - L_{cr}}{T_{cr} - L_{cr}} \right), & L_{cr} \leq \text{Logit}(\hat{\beta}_0 + \mathbf{x}'\mathbf{b} + \mathbf{x}'\mathbf{B}\mathbf{x}) \leq T_{cr} \\ 1, & \text{Logit}(\hat{\beta}_0 + \mathbf{x}'\mathbf{b} + \mathbf{x}'\mathbf{B}\mathbf{x}) > T_{cr} \end{cases} \end{aligned} \quad (7)$$

$d_{ee} \text{Logit}(\hat{\alpha}_0 + \mathbf{x}'\mathbf{a} + \mathbf{x}'\mathbf{A}\mathbf{x})$ ve $d_{cr}(\text{Logit}(\hat{\beta}_0 + \mathbf{x}'\mathbf{b} + \mathbf{x}'\mathbf{B}\mathbf{x}))$ sırasıyla ee ve cr istenilen olumlu fonksiyonlarını ifade eder. Ayrıca, L_{ee} ve L_{cr} yanıtlar için daha düşük değerleri ifade etmektedir. T_{ee} ve T_{cr} ayrıca yanıtlar için hedef değerleri temsil eder. Tasarım ile veri analizi aşamalarını analiz etmek ve grafikleri çizmek için JMP'nin (Sürüm 13 64-bit Cary, NC 27,513 ABD) uygulandı. Ayrıca MATLAB optimizasyon araç kutusu kullanıldı (Sürüm R2014a 64-bit Natick, Massachusetts 01.760 ABD). Denklem 7'deki dört tasarım faktörünün optimum ayarlarını elde etmek için kullanıldı.

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

Bulgular

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.

Kromatografik Ayırmalar

Kolon Kromatografisi

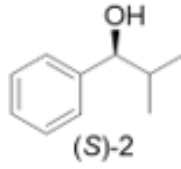
Silikajel 60 (70-230 Mesh) ASTM (Merck)

İnce Tabaka Kromatografisi

Silikajel 60 (HF 254+366) (Merck)

Genel Asimetrik İndirgenme Prosedürü

Kuru *L. fermentum* BY35 (20 mg) biyokatalizörü, 250 mL Erlenmeyer içinde taze hazırlanmış 100 mL MRS süspansiyonuna ilave edildi. Karışım 200 rpm'de 25°C'de iki saat süreyle, orbital çalkalayıcıda karıştırıldı. Karışım 2 s karıştırıldıktan sonra reaksiyon ortamının pH'sı 1 M HCl ile 6.50'ye ayarlandı ve 2 saat daha karıştırıldı. Reaksiyon ortamına 1 mmol substrat **1** eklendi ve 25°C'de 38,5 saat süreyle 200 rpm'de karıştırıldı. Reaksiyon bittikten sonra santrifüj ile katı kısım ayrıldı ve süspansiyon süzüldü. Süzüntü, CH₂Cl₂ (3x100 mL) kullanılarak ekstrakte edildi. Ekstrakt Na₂SO₄ üzerinde kurutuldu ve daha sonra, çözücü buharlaştırıldı. Ham (S)-2 kolon kromatografisinde heksan: etil asetat (85:15) çözücü karışımı kullanılarak saflaştırıldı. Substratın dönüşümü, az miktarda ham ürünün silika jel bir kolondan filtre edilmesinden sonra HPLC ile belirlendi.



Şekil 25. (S)-2-metil-1-fenilpropan-1-ol

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.36-7.25 (m, 5H), 4.36 (dd, J 6,8, 3,1 Hz, 1H), 2.00–1.90 (m, 1H), 1.87 (d, J 3,1 Hz, 1H), 1.62 (bs, 1H, (OH)), 1.00 (d, J 6.8 Hz, 3H), 0.80 (d, J 6.8 Hz, 3H).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ =143.6, 128.2, 127.4, 126.5, 80.0, 35.3, 19.0,18.2.

Çevirme açısı: $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ =-41.6 (c 1.0, CHCl_3)

Enantiyomerik aşırılık:>%99

Verim: %93

(S)-2 için HPLC şartlar: Chiralcel OD-H kolon, n-hekzan/i-PrOH, 95:5 akış hızı 1 mL/dak, 220 nm. Alıkonma zamanları: 10.9 dak. (S enantiyomer), 13.8 dak. (R enantiyomer).

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

BEŞİNCİ BÖLÜM

Sonuç, Tartışma ve Öneriler

Sonuç

Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre biyokatalitik asimetrik indirgeme reaksiyonunda ilk kez kullanılan *I*-optimal tasarım tabanlı modelin farklı asimetrik indirgeme reaksiyonlarında kullanılabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmada, deneyi dört kültür parametresi ile yürütürken ee ve cr yanıt değerlerini maksimize etmek için *I*-optimal tasarım tabanlı model kullanılmıştır: (1) pH, (2) sıcaklık (°C), (3) inkübasyon süresi (h) ve (4) karıştırma hızı (rpm). Deneysel tasarım uzayı üzerinde tahmin amacına odaklanırken tasarım noktalarını oluşturmak için *I*-optimalite kriteri kullanıldı. Ayrıca, indirgenmiş kübik modeller, model parametreleri için R^2 ve p değerlerine dayalı olarak en iyi sonuçları göstermiştir.

Dört tasarım faktörünün optimum ayarları, *L. fermentum* BY35 biyokatalizörü için *I*-optimal tasarım tabanlı önerilen model kullanılarak pH 6.5, sıcaklık 25,0 °C, inkübasyon süresi 38,5 saat ve karıştırma hızı 200.30 rpm olarak elde edildi. Doğrulama deneyinden elde edilen ee ve cr yanıt değerleri sırasıyla %99 ve %99 idi. Bulgular, deneysel tasarım alanı üzerindeki tahmin varyansını ele alırken, 2-metil-1-fenilpropan-1-on'un *L. fermentum* BY35 biyokatalizörü ile asimetrik biyo-indirgenmesi için önerilen modele dayalı *I*-optimal tasarımın önemini ortaya koydu. *I*-optimal tasarım tabanlı matematiksel modelleme tekniği, gelecekteki araştırma çalışmaları ile uğraşırken asimetrik biyo-indirgeme için geleneksel tekniklerden bazı avantajlar ve uygulanabilirlik sunabilir.

Tartışma

Asimetrik sentez reaksiyonları, endüstride ve çeşitli alanlarda kiral ara ürünler elde etmek için çok önemlidir. İkincil kiral alkoller, prokiral ketonların asimetrik indirgenmesiyle elde edilebilir. Kiral sekonder alkollerin birçok alanda, özellikle ilaç endüstrisinde öne çıkan kullanımları olduğundan, son yıllarda kiral alkollere olan ilgi ve talepler artmıştır. Biyo-indirgeme süreçleri için en önemli metodolojilerden biri, tam hücreli biyokatalizörlerin kullanılmasıdır. Sıcaklık (°C), pH, inkübasyon süresi (h) ve karıştırma seviyesi (rpm) gibi kültürel koşullar, biyokatalizörün tüm hücre uygulamaları için gereklidir ve bu parametreler

maksimum verimi elde etmek için optimize edilmiştir ve ee (%) değerleri, parametreleri, hem enzim aktivitesinin üretimi için kritik olan nihai bakteri seviyeleri hem de biyo-indirgeme süreçleri için daha önemli olan seçicilik üzerinde bir etkiye sahip olabilir.

Biyo-indirgeme ve güvenlik açısından, uygun mikrobiyal suşu seçmek de çok önemlidir. LAB, GRAS durumlarından dolayı tüm hücre uygulamaları için çok önemli bir mikrobiyal gruptur. Bu çalışmada, bir LAB suşu olarak *L. fermentum* BY35, ilk kez 2-metil 1-fenilpropan-1-on'un biyolojik olarak indirgenmesi için tam hücreli bir biyokatalizör olarak kullanılmıştır.

Ardından, optimum biyo-indirgeme koşullarını elde etmek için dört kültür parametresini optimize etmek için *I*-optimal tasarım tabanlı model geliştirildi. Gerçek değerler açısından, ee ve cr yanıtları için logit dönüşüm tekniği kullanılarak indirgenmiş kübik modeller aşağıdaki gibi elde edilmiştir: (8) (9).

$$\text{Logit}(\hat{\mu}_{cr}(\mathbf{x})) = \text{Logit}(\hat{\beta}_0 + \mathbf{x}'\mathbf{b} + \mathbf{x}'\mathbf{B}\mathbf{x}) = -18.79 - 4.53*x_1 - 0.04*x_2 + 0.07*x_3 + 0.70*x_4 + 0.01*x_1*x_4 + 0.30*x_1^2 - 0.0008*x_3^2 - 0.005*x_4^2 + 0.00001*x_4^3 \quad (8)$$

$$\text{Logit}(\hat{\mu}_{ee}(\mathbf{x})) = \text{Logit}(\hat{\alpha}_0 + \mathbf{x}'\mathbf{a} + \mathbf{x}'\mathbf{A}\mathbf{x}) = 39.56 - 6.53*x_1 - 1.10*x_2 + 0.03*x_3 - 0.31*x_4 + 0.20*x_1*x_2 + 0.05*x_1*x_4 + 0.007*x_2*x_4 - 0.0004*x_3^2 + 0.0001*x_4^2 - 0.001*x_1*x_2*x_4 \quad (9)$$

Tablo 10. ANOVA Sonuçları ve ee İstatistikleri

İstatistiklerin özeti					
R^2	0.8555	R_{adj}^2	0.7523		
Yeterli hassasiyet	12.9955	R_{pre}^2	0.6442		
Performans göstergeleri					
RMSE	0.300				
MAE	0.211				
MAPE	14%				
Kaynak	KT	ÖD	OK	F-değeri	p-değeri
Model	13.35	10	1.34	8.29	0.0003 önemli
x_1 -pH	6.30	1	6.30	39.12	< 0.0001 önemli
x_2 -Sıcaklık	0.1820	1	0.1820	1.13	0.3058 önemli değil
x_3 -İnkübasyon Süresi	1.19	1	1.19	7.36	0.0168 önemli
x_4 -Karıştırma Hızı	4.09	1	4.09	25.38	0.0002 önemli
$x_1 x_2$	0.0039	1	0.0039	0.0244	0.8780 önemli değil
$x_1 x_4$	1.22	1	1.22	7.55	0.0157 önemli
$x_2 x_4$	0.0182	1	0.0182	0.1128	0.7419 önemli değil

x_3^2	0.2510	1	0.2510	1.56	0.2324 önemli değil
x_4^2	0.9648	1	0.9648	5.99	0.0282 önemli
$x_1 x_2 x_4$	0.5106	1	0.5106	3.17	0.0967 önemli değil
Artık	2.26	14	0.1611		
Uygunsuzluk	0.6719	9	0.0747	0.2358	0.9707 önemli değil
Saf Hata	1.58	5	0.3166		
Kor Toplam	15.61	24			

Not: KT= Kareler Toplamı, ÖD= Özgünlük derecesi, OK= Ortalama Kare

Tablo 10, bu tez çalışmasında test edilen dört kültür parametresinin uygulanmasıyla elde edilen model parametreleri ve ee (%) ve cr (%) değerlerini göstermektedir. ee yanıtının ANOVA sonuçları Tablo 10'da gösterilmektedir. Azaltılmış kübik modelin maksimum belirleme katsayısına (R^2) ve p değeri 0.0003'e göre seçildiğine dikkat çekicidir.

Tüm model terimleri anlamlı olmadığı için tam kübik model kullanılmamıştır. Böylece, model indirgeme yöntemi, yanıt değişkenleri için çalışılan modeli geliştirmek için uygulanabilir. Tablo 10'da R^2 'nin değeri 0.8555'tir ve ee yanıtı için anlamlı model terimlerini kolayca tahmin edebiliriz. Ayrıca mutlak tahmin edilen determinasyon katsayısı (R^2 pre) değeri 0.6442 olarak bulunmuştur. Düzeltilmiş belirleme katsayısı (R^2 adj) değerinin değeri 0.7523'tür. R^2 adj ve R^2 pre arasındaki fark 0,2'den azdı; bu nedenle, R^2 pre, R^2 ile uyumludur.

Tablo 11. ANOVA Sonuçları ve cr İstatistikleri

İstatistiklerin özeti						
R^2	0.9178	R_{adj}^2	0.8685			
Yeterli hassasiyet	20.9548	R_{pre}^2	0.7955			
Performans göstergeleri						
RMSE	0.232					
MAE	0.163					
MAPE	12%					
Kaynak	KT	ÖD	OK	F-değeri	p-değeri	
Model	14.49	9	1.67	18.61	<0.0001	önemli
x_1 -pH	5.78	1	5.78	64.61	< 0.0001	önemli
x_2 - Sıcaklık	0.5475	1	0.5475	6.12	0.0258	önemli
x_3 - İnkübasyon Süresi	0.9467	1	0.9467	10.58	0.0054	önemli
x_4 - Karıştırma Hızı	0.1742	1	0.1742	1.95	0.1832	önemli değil
$x_1 x_4$	2.99	1	2.99	33.46	<0.0001	önemli
x_1^2	0.3542	1	0.3542	3.96	0.0652	önemli değil

x_3^2	1.24	1	1.24	13.80	0.0021	önemli
x_4^2	0.7402	1	0.7402	8.27	0.0115	önemli
x_4^3	0.5824	1	0.5824	6.51	0.0222	önemli
Artık	1.34	15	0.0895			
Uygunsuzluk	0.4251	10	0.0425	0.2317	0.9764	önemli değil
Saf Hata	0.9174	5	0.1835			
Kor Toplam	16.34	24				

Not: KT= Kareler Toplamı, ÖD= Özgünlük derecesi, OK= Ortalama Kare

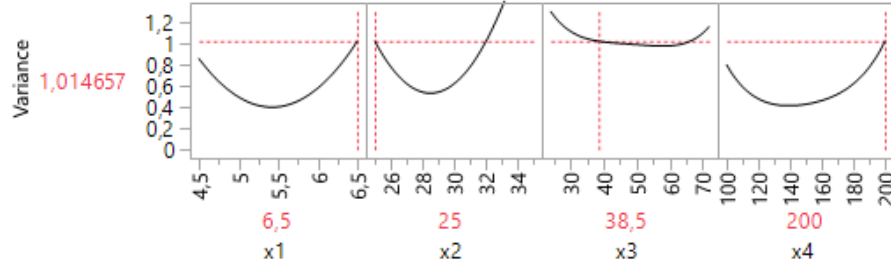
Tablo 12. *ee ve cr Yanıtları İçin Optimizasyon ve Deneysel Sonuçları*

Çözüm yöntemi	pH	Sıcaklık (°C)	İnkübasyon Süresi (h)	Karıştırma Hızı (rpm)	ee %	cr %
Önerilen I-optimal tasarım tabanlı model	6.5	25.0	38.5	200.0	98.78	98.92
Deneysel çalıştırma	6.5	25.0	38.5	200.0	99.00	99.00

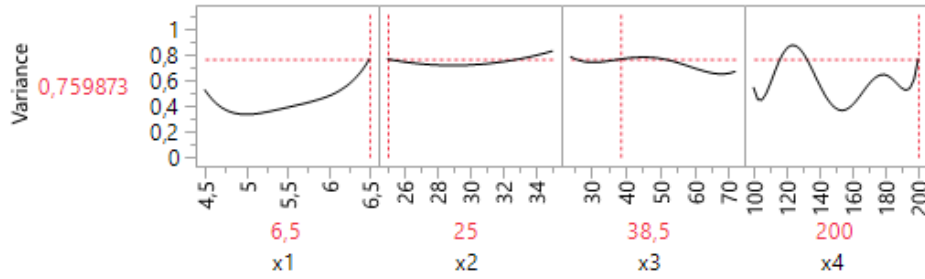
Bu çalışmada model indirgeme veya yanıt dönüşümü düşünülebilir. Yeterli kesinlik değeri, yeterli bir sinyali gösteren 12.955 idi. Daha da ötesi, performans göstergeleri hesaplandı. Ortalama karekök hata (RMSE), ortalama mutlak hata (MAE) ve ortalama mutlak yüzde hata (MAPE) sırasıyla %0.300, 0.211 ve %14 olarak bulundu. Bu değerler, modelin verileri doğru tahmin ettiğini gösterir. Ayrıca F değeri 8.29'du ve modele uyumludur. Tablo 10'da x_1 (pH), x_3 (inkübasyon süresi), x_4 (karıştırma hızı), $x_1.x_4$ (pH* karıştırma hızı) ve $x_2.x_4$ (karıştırma hızı* karıştırma hızı) anlamlı model terimleri olarak bulunmuştur çünkü p değerleri 0.05'ten küçüktü. Model terimlerinin ee yanıt değeri üzerinde etkisi oldu. Ayrıca, model için önemli olmayan bir uyum eksikliği görüldü ve uyum eksikliği, indirgenmiş kübik model için önemli değildi yani ihmal düzeyindeydi. cr yanıtının ANOVA sonuçları Tablo 11'de sunulmuştur.

İndirgenmiş kübik model R^2 'ye ve p değeri <0.0001'e göre seçilmiştir. Tüm model terimleri önemli değildi; bu nedenle, model terimlerini tahmin etmek için tam kübik model seçilmemiştir. Tablo 11'de R^2 değeri 0.9178 olarak bulunmuş ve cr yanıtı için anlamlı model terimlerinin tahmin edilmesine uygundur. Ayrıca R^2 adj 0,8685 olarak hesaplanmış ve R^2 pre 0,7955 olarak elde edilmiştir. R^2 adj ve R^2 pre arasındaki fark 0,2'den az olduğu için R^2 adj, R^2 pre ile uyumludur. Bu nedenle modelde ve tahmin verilerinde herhangi bir problem yoktur. cr yanıtı için, yeterli kesinlik değeri 20.9548 olduğu için yeterli bir sinyal gözlemlendi. Ayrıca RMSE, MAE ve MAPE sırasıyla %0.232, 0.163 ve %12 olarak bulundu. Performans göstergelerinin değerleri, modelin verileri doğru tahmin ettiğini gösterir. Model anlamlı olarak tanımlandı

çünkü F değeri 18,61 olarak hesaplandı, burada p değeri < 0.0001 . Tablo 11'de x_1 (pH), x_2 (sıcaklık), x_3 (inkübasyon süresi), $x_1 x_4$ (pH*karıştırma hızı), $x_2 x_3$ (inkübasyon süresi*inkübasyon süresi), $x_2 x_4$ (karıştırma hızı* karıştırma hızı) ve $x_3 x_4$ (karıştırma hızı*karıştırma hızı*karıştırma hızı) anlamlı model terimleri olarak belirlendi çünkü p değerleri 0,05'ten küçüktü. Anlamlı model terimleri cr yanıt değerini etkilemiştir. Daha sonra, indirgenmiş kübik model için uyum eksikliği önemli değildi ve model için önemli olmayan yani ihmal edilebilir bir uyum eksikliğidir.



(a) ee yanıtı için tahmin varyans grafiği.

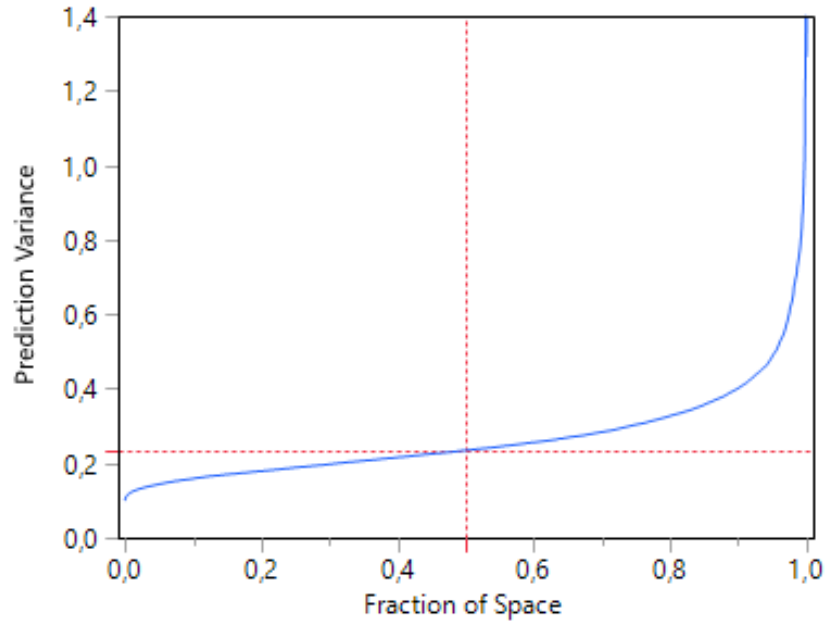


(b) cr yanıtı için tahmin varyans grafiği.

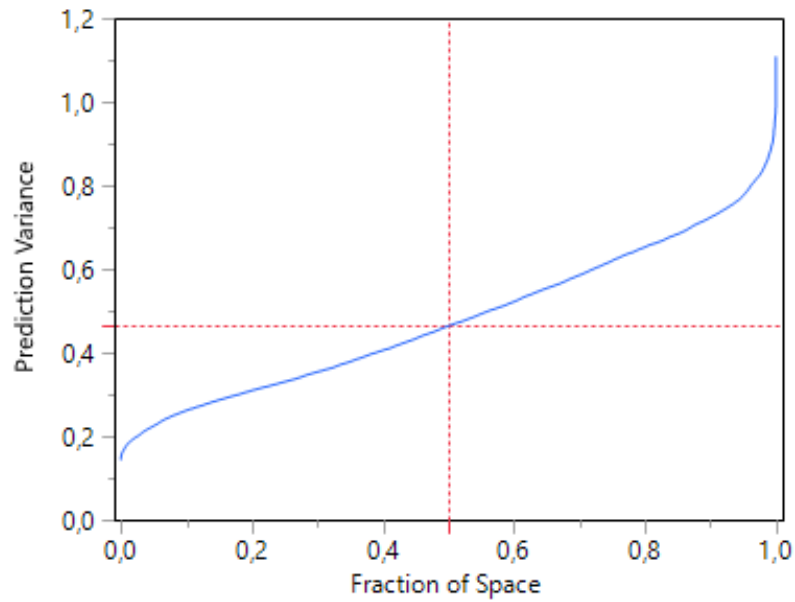
Şekil 26. (a) ee yanıtı için tahmin varyans grafiği ; (b) cr yanıtı için tahmin varyans grafiği.

Tahmin varyans grafikleri, ee ve cr yanıtları için Şekil 25'de gösterilmektedir. Göreceli öngörücü varyans, ee yanıtı için 1.014657 ve cr yanıtı için göreceli öngörücü varyans 0.759873 dir. Şekil 25'de ki her grafik, diğer tasarım faktörlerinin optimal değerlerinde her bir tasarım faktörünün bir fonksiyonu olarak tahminin varyansını göstermektedir.

Şekil 25, yanıtlar için tasarım alanı grafiğinin her bir bölümünü göstermektedir. ee yanıtı için minimum göreceli tahmin varyansının 0,2'den az, maksimumun ise 1,4 olduğunu göstermektedir. Ek olarak, kırmızı noktalı artı işareti, göreceli tahmin varyansının, deneysel tasarım alanının yaklaşık %50'si üzerinde 0,22'den az olduğunu gösterir. ee yanıtı için maksimum nispi tahmin varyansının 1.2'den az, minimumun 0.2'den az olduğunu göstermektedir. Ek olarak, kırmızı noktalı artı işaretleri, göreceli tahmin varyansının, deneysel tasarım uzayının yaklaşık %50'si üzerinde 0,47'den az olduğunu gösterir.



(a) ee yanıtı için tasarım alanı grafiği



(b) cr yanıtı için tasarım alanı grafiği

Şekil 27. **(a)** ee yanıtı için tasarım alanı grafiği **(b)** cr yanıtı için tasarım alanı grafiği.

I-optimal tasarım tabanlı önerilen modelin sonuçları, biyo-indirgeme reaksiyonları için dört kültür faktörünün optimal koşullarının verim ve dönüşümü en üst düzeye çıkarırken verimli bir şekilde muhafaza edildiğini göstermiştir. Şekil 26 a ve Şekil 26 b'deki grafikler, her bir cevap için tahmin varyansının nasıl değiştirilebileceğini gösterdi. Bu sayılar ayrıca, deneysel tasarım alanı üzerinde tahmin gücüne değinirken biyo-indirgeme tepkileri için *I*-optimal tasarımın önemini de göstermiştir.

Öneriler

Optimizasyon şartları *I*-optimal ile belirlenerek kullanılan *Lactobacillus fermentum* biyokatalizörü ile kiral sekonder alkol (S)- 2-metil-1-fenilpropan-1-ol'ün optikçe saf olarak elde edilmiştir. 2-metil-1-fenilpropan-1-on'un 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 *I*-optimal yönteminin etkinliğinin çok önemli olduğunu göstermektedir. *Lactobacillus fermentum* biyokatalizörünün prokiral 2-metil-1-fenilpropan-1-on'un asimetrik indirgenmesinde başarılı olduğu gösterilmiştir.

Lactobacillus fermentum biyokatalizörü kullanılarak farklı prokiral ketonların asimetrik indirgenmesi gerçekleştirilebilir. Ayrıca bir biokatalitik asimetrik indirgenme reaksiyonunda kullanılan *I*-optimal optimizasyon stratejisinin farklı biyokatalizörler ve substratlar için kullanılabileceği gösterilmiştir. Laboratuvar ölçeğinde 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 fermentum* biyokatalizörünün prokiral substratların kiral karbonil bileşiklere asimetrik indirgenme reaksiyonlarında toksik ve çevreye zararlı olabilecek kimyasal katalizörler yerine çevre dostu, bir biyokatalizör olarak kullanılabileceği gösterilmiştir.

KAYNAKÇA

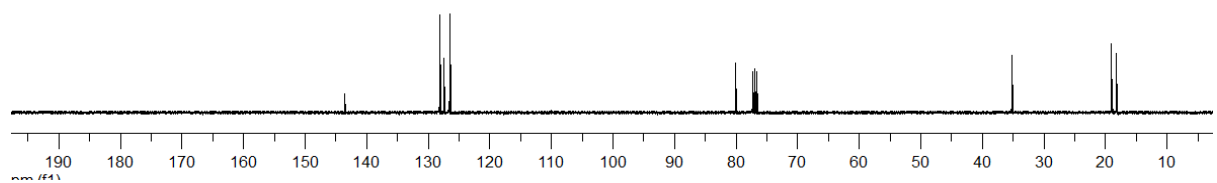
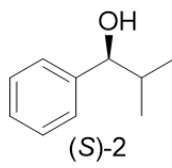
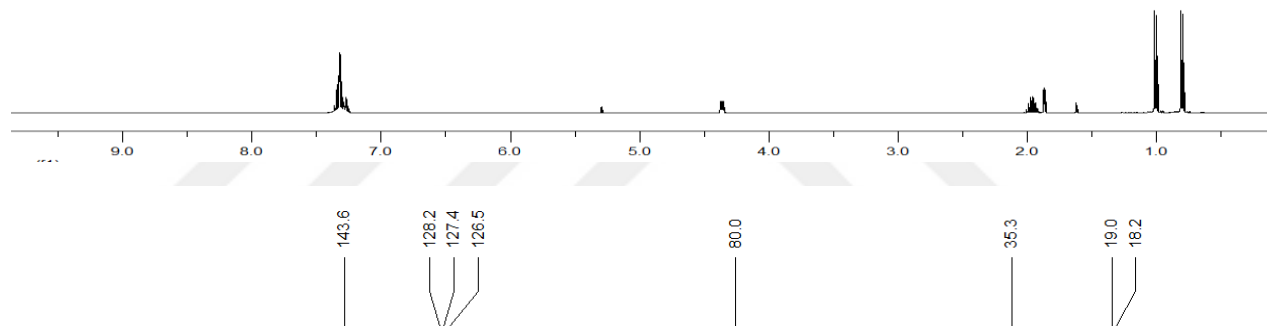
- Andrade, L. H., Utsunomiya, R. S., Omori, A. T., Porto, A. L., & Comasseto, J. V. (2006). For clean airplane- edibles: Plants bio-reducing aromatic ketones and drinking alcohols. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 38 (2), 84-90.
- Adlercreutz, P. (1991). Asymmetric reduction of ketones by enzymes from acetic acid bacteria. *Biotechnology letters*, 13 (4), 229-234.
- Babaarslan, Ç. (2008). Biyokatalitik olarak enantiyoseçimli α -hidroksi keton üretim prosesinin geliştirilmesi. *Ankara Üniversitesi, Doktora tezi, Ankara*.
- Bin Halmi, M. I. E., Abdullah, S. R. S., Wasoh, H., Johari, W. L. W., bin Mohd Ali, M. S., Shaharuddin, N. A., & Shukor, M. Y., (2016). Serratia sp. Force MIE2 using the response surface methodology. *Rendiconti Lincei*, 27 (4), 697-709.
- Blaschke, G. (1980). Chromatographic resolution of racemates. New analytical methods (17). *Angewandte Chemie International Edition in English*, 19 (1), 13-24.
- Böhringer, M., Morgenstern, K., Schneider, W. D., & Berndt, R. (1999). Trennung eines racemischen Gemisches zwei-dimensionaler molekularer Cluster myth de Rastertunnelmicroscope. *Angewandte Chemie*, 111 (6), 832-834.
- Brondani, P. B., Guilmoto, N. M., Dudek, H. M., Fraaije, M. W., & Andrade, L. H. (2012). Chemoenzymatic approaches to obtain chiral-centered selenium compounds. *Tetrahedron*, 68(51), 10431-10436.
- Bunnett, J. F. (1999). Organic chemistry: a short course. *Journal of Chemical Education*, 76(10), 1341.
- Clayden, J. & MacLellan, P. (2011). Asymmetric synthesis of tertiary thiols and thioethers. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 7 (1), 582-595.
- 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.
- Felfer, U., Kroutil, W., Strauss, U. T., & Faber, K. (1998, November). Biocatalytic Strategies for Preparation of Chiral Building Blocks from Racemates at 100% Chemical and Optical Yield. *At the 2nd International Conference on Electronic Synthetic Organic Chemistry*.
- 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., & 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 an optimization strategy for asymmetric bioreduction of (4S)-(+)-carvone by *Cryptococcus gastrikus*. *Biological resource technology*, 121, 290-297.
- 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.
- Kazıcı, H. C., Bayraktar, E., & Mehmetoğlu, Ü. (2016). Optimization of asymmetric synthesis of chiral aromatic alcohol using freeze-dried carrots as whole-cell biocatalysts. *Green Processing and Synthesis*, 5 (2), 131-137.
- Kumaraswamy, G. & Ramesh, S. (2003). Wet *Phaseolus aureus* L: an effective biocatalyst for asymmetric reduction of prochiral aromatic ketones. *Green chemistry*, 5 (3), 306-308.
- Kurbanoğlu, E. B., Zilbeyaz, K., Kurbanoğlu, N. I., & Taşkın, M. (2007). Highly enantioselective reduction of acetophenone by locally isolated *Alternaria alternata* using ram horn peptone. *Tetrahedron Asymmetry*, 18 (13), 1529-1532.
- Kordikowski, A., York, P., & Latham, D. (1999). Resolution of ephedrine in supercritical CO₂: A novel technique for the separation of chiral drugs. *Journal of pharmaceutical sciences*, 88(8), 786-791.
- Li, H., Huang, X., Chen, L., Wu, Z., & Liang, Y. (1999). A high capacity nano Si composite anode material for lithium rechargeable batteries. *Electrochemical and solid-state letters*, 2(11), 547.
- Llona-Minguez, S., Ghassemian, A., & Helleday, T. (2015). Lysophosphatidic acid receptor (LPAR) modulators: The current pharmacological toolbox. *Progress in lipid research*, 58, 51-75.
- Lou, W. Y., 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.
- Mączka, 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.
- Mandal, D., Ahmad, A., Khan, M. I., & Kumar, R. (2004). Enantioselective bioreduction of acetophenone and the fungus *Trichothecium* sp. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 27 (2-3), 61-63.

- Maier, N. M., Franco, P., & Lindner, W. (2001). Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives. *Journal of Chromatography A*, 906(1-2), 3-33.
- Mislow, K. M. (2002). *Introduction to stereochemistry*. Courier Corporation.
- Nakamura, K., Yamanaka, R., Matsuda, T., & Harada, T. (2003). Recent advances in asymmetric reduction of ketones by biocatalysts. *Tetrahedron: Asymmetry*, 14 (18), 2659-2681.
- 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.
- Sheldon, R. A. (1993). *Chirotechnology: industrial synthesis of optically active compounds*. CRC press.
- 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.
- 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.
- Willick, J. A., Courteau, S., Faber, S. M., Burstein, D., Dekel, A., & Strauss, M. A. (1997). Homogeneous velocity-distance data for peculiar velocity analysis. iii. the mark iii catalog of galaxy peculiar velocities. *The Astrophysical Journal Supplement Series*, 109(2), 333.
- Wilen, S. H., Collet, A. & Jacques, J. (1977). Strategies at 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.
- Woodyer, R., Simurdiak, M., Van Der Donk, W. A., & Zhao, H. (2005). Heterologous expression, purification, and characterization of a highly active xylose reductase from *Neurospora crassa*. *Applied and environmental microbiology*, 71(3), 1642-1647.

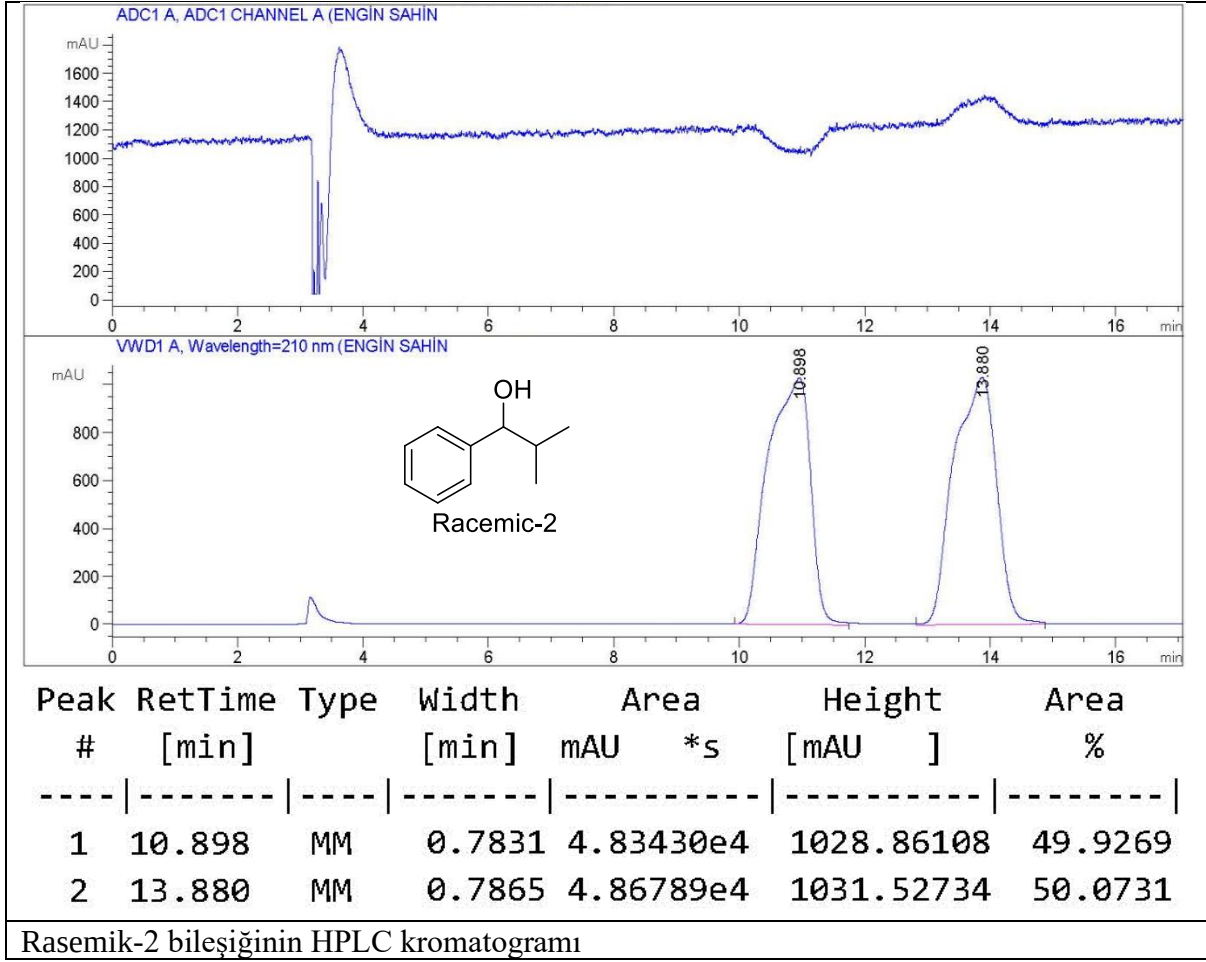
EKLER

EK 1. NMR Spektrumu Sonuçları



Bileşik (S)-2'nin ^1H ve ^{13}C -NMR spektrumu

EK 2. HPLC Spektrum Sonuçları



ÖZGEÇMİŞ

..... tarihinde doğdu. İlk, orta ve lise eğitimlerini Bayburt'ta tamamladıktan sonra yılında Kimya Bölümü'nde Lisans eğitimine başladı. yılında lisans derecesini aldı. Mezuniyet sonrasında yılında ili ilçesinde öğretmenlik görevine başladı. yılında askeri görevini yedek subay olarak tamamladı. yılında evlendi. Üç çocuk babasıdır. yılında İline öğretmen olarak tayin edildi. yılından beri kimya öğretmeni olarak görev yapmaktadır. yılında yüksek lisans eğitimine başladı.