

***Lactobacillus paracasei* biyokatalizörü ile enantiyosaf (S)-1-(4-metoksifenil) etanol üretimi**

Production of enantiopure (S)-1-(4-methoxyphenyl) ethanol by Lactobacillus paracasei biocatalyst

Engin ŞAHİN^{*1,a}

¹ Bayburt Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, 69000, Bayburt

• Geliş tarihi / Received: 03.02.2021

• Düzeltilerek geliş tarihi / Received in revised form: 28.07.2021

• Kabul tarihi / Accepted: 08.08.2021

Öz

Bu çalışmada, 4-metoksiasetofenonun enantiyoseçici indirgenmesinde yedi biyokatalizörün indirgeme kapasitesi tam hücre biyokatalizör olarak araştırılmıştır. *Lactobacillus paracasei* BD28'in en iyi indirgeme kapasitesine sahip olduğu bulunmuştur. pH, inkübasyon süresi, çalkalama hızı ve sıcaklık gibi farklı parametrelerin enantiyomerik aşırılık ve dönüşüm üzerindeki etkileri araştırıldı. Tam hücre biyokatalizörü *Lactobacillus paracasei* BD28 kullanılarak, genel alerjik yanıt için tedavi fonksiyonuna sahip sikloalkil [b] indollerin sentezinde kullanılabilen (S)-1-(4-metoksifenil) etanol, gram ölçeğinde, yüksek verimli ve enantiyomerik olarak saf halde üretilmiştir. Gram ölçekli üretim gerçekleştirildi ve % 95 verimle optik olarak saf formda 9,69 g (S)-1-(4-metoksifenil) etanol üretildi. Bu, kimyasal işlemlere kıyasla (S)-1-(4-metoksifenil) etanol üretimi için ucuz, temiz ve çevre dostu bir işlemdir.

Anahtar kelimeler: Asimetrik indirgenme, Biyokatalizör, Kiral alkol, *Lactobacillus paracasei*, (S)-1-(4-metoksifenil) etanol

Abstract

In this study, the reductive capacity of seven biocatalysts were investigated as whole-cell biocatalyst in the enantioselective reduction of 4-methoxyacetophenone. *Lactobacillus paracasei* BD28 was found to have the best reductive capacity. Effects of different parameters such as pH, incubation time, agitation speed and temperature, on enantiomeric excess and conversion were investigated in a bioconversion. (S)-1-(4-methoxyphenyl) ethanol which, can be employed for the synthesis of cycloalkyl [b] indoles which have the treatment function for general allergic response, was produced in gram-scale, high yield and enantiomerically pure form using whole-cell biocatalyst of *Lactobacillus paracasei* BD28. The gram-scale production was carried out, and 9.69 g of (S)-1-(4-methoxyphenyl) ethanol in optically pure form was produced with 95 % yield. This is a cheap, clean and eco-friendly process for production of (S)-1-(4-methoxyphenyl) ethanol compared to chemical processes.

Keywords: Asymmetric reduction, Biocatalyst, Chiral alcohol, *Lactobacillus paracasei*, (S)-1-(4-methoxyphenyl) ethanol

^{*a} Engin Şahin; esahin@bayburt.edu.tr, Tel: (0505) 691 35 61, orcid.org/0000-0002-3723-1705

1. Giriş

Kiralite, başta ilaç üretimi olmak üzere çok çeşitli endüstrilerde oldukça fazla dikkat çekmektedir. İlaç endüstrisinde kiraliteye artan ilgi ilaç formülasyonlarının üretiminde tekli enantiyomerlerin kullanılmasını talep eden düzenleyici kurumlar tarafından körüklenmektedir, çünkü enantiyomerlerin her biri farklı farmakolojik aktivitelere ve farklı biyolojik etkilere sahiptirler (Drayer, 1986; Murzin vd., 2005). Bundan dolayı son yıllarda tek enantiyomer halinde ilaç satışlarında hızlı ve sürekli bir büyüme olmuştur. Bu bilgiler ışığında, enantiyoseçici üretim metotlarının geliştirilmesi hızlı bir şekilde artmıştır ve yeni metotların geliştirilmesine devam edilmektedir (Ni ve Xu, 2012). Kiral sekonder alkoller ilaçların, zirai kimyasalların ve çoğu fonksiyonel molekülün sentezi için oldukça önemli öncü maddelerdir (Patel, 2002; Gamenara ve de Maria, 2009). Örneğin, kiral 1-(4-metoksifenil) etanol'un her iki enantiyomeride çeşitli ilaçların sentezi için anahtar bir hammadedir. (S)-1-(4-metoksifenil) etanol ((S)-2), difenilhidramin hidroklorür ve loratadin dahil olmak üzere histaminlerin sentezi için önemli bir öncüdür (MacLellan ve Clayden, 2011; Brondani vd., 2012). Ayrıca, (S)-2, genel alerjik tepki için tedavi fonksiyonuna sahip olan sikloalkil [b] indollerin sentezi için kullanılabilir (Hillier vd., 2004, 2005). (R)-1-(4-metoksifenil) etanol ((R)-2), ibuprofen ve naproksen gibi aril propiyonik asit anti-enflamatuar ve analjezik ilaçların sentezi için temel bir öncü olarak kullanılabilir (Llona-Minguez vd., 2015). Bu nedenle, kimyasal veya biyolojik metotlar kullanılarak enantiyosaf olarak (S)-2 ve (R)-2'nin sentezlenmesi oldukça önemli hale gelmiştir. Günümüzde enantiyosaf kiral sekonder alkoller kimyasal ve biyokatalizörler kullanılarak sentezlenebilmektedirler (Honda vd., 2017). Biyokatalizörler kiral bileşiklerin hazırlanması için çok başarılı olan ve yaygın olarak kullanılan bir metottur. Biyokatalizörlerin kimyasal katalizörlere kıyasla birçok avantajı vardır. Kimyasal katalizörler toksik atık ve çok çeşitli yan ürünler üretirken, biyokatalizörler biyolojik olarak parçalanabilir ve hafif reaksiyon koşulları altında kimyasal reaksiyonları gerçekleştirmek için temiz ve çevre dostu bir yol ve substrat için büyük bir seçicilik sağlamaktadırlar (Gotor-Fernández vd., 2006; Contesini vd., 2010). Biyokatalitik reaksiyonlar, birbirlerine göre hem avantajları hem de dezavantajları olan izole edilmiş saf enzimler ve tam hücre biyokatalizörler kullanılarak gerçekleştirilebilir (Kafarski ve Lejczak, 2004). İzole edilmiş saf enzimler, belirli reaksiyonları katalize ederek yan ürün oluşumunu

veya ürün bozulmasını ortadan kaldırır ve ürünün saflaştırması genellikle çok daha kolaydır (Kafarski ve Lejczak, 2004). Ancak, saf enzimler çok pahalıdır ve çok kararsızdır. Buna ek olarak, enzimler tek bir reaksiyonu katalize ederken, çok sayıda endüstriyel ürün, tam hücreler kullanılarak bir dizi biyokimyasal reaksiyondan sonra elde edilir. Genel olarak, enzim saflaştırma, pahalı koenzim ve koenzim rejenerasyonu ilavesini önlemek için biyokatalizör olarak izole enzimler yerine tam mikrobiyal hücreler tercihli olarak kullanılmaktadır (Ishige vd., 2005). Tüm hücre biyokatalizörler çok daha kararlı, verimli, daha kolay ve uygun maliyetli olarak kullanılabilirler. Bu yüzden biyokatalizör olarak tam hücreler tercih edilmektedir (Şahin, 2017). Literatürde, 4-metoksiasetofenon (1)'in biyokatalitik asimetrik indirgenmesine odaklanan, immobilize mikrobiyal hücreler tarafından katalize edilen enantiyomerik olarak saf (S)-2'nin biyokatalitik sentezi hakkında bazı raporlar bulunmaktadır ve bunlar sınırlı sayıda (Lou vd., 2009; Wang vd., 2009; Świzdor vd., 2010). Bitki hücre kültürleri, mikrobiyal hücreler ve ketoreduktazlar gibi çeşitli biyokatalizörler, 1'in (S)-2'ye enantiyoseçici olarak indirgenmesi için uygulanmıştır (Lou vd., 2011; Wei vd., 2016). Bununla birlikte, düşük ürün verimi (%63) ve enantiyomerik aşırılıkta (ee) (%77) (S)-2 elde edilmiştir. Rasemik 2'nin çeşitli biyokatalizörler kullanılarak (S)-2'ye asimetrik olarak yükseltildiği ve yüksek ee'lerin elde edildiği çeşitli çalışmalarda mevcuttur (Wang vd., 2009; Xu vd., 2015; Wei vd., 2016). Bununla birlikte, bu yaklaşım %50 teorik verim ile sınırlıdır (Zong vd., 2019). Bu nedenle, (S)-2 ve (R)-2'yi daha yüksek verim, ee ve daha ekonomik olarak üretmek için kullanılacak bir tam hücre biyokatalizörü geliştirmek oldukça önemlidir. Bu çalışmada daha önce boza içeceğinden elde edilmiş 7 farklı laktik asit bakterisi 4-metoksiasetofenon (1)'in asimetrik indirgenmesinde biyokatalizör olarak kullanılabilir potansiyelleri değerlendirilmiştir. En iyi indirgeme kapasitesine sahip biyokatalizör belirlendikten sonra enantiyoseçiciliğe etki eden karıştırma hızı, pH, sıcaklık ve reaksiyon süresi gibi biyokatalitik indirgenme koşulları sistematik olarak optimize edilerek seçicilik üzerine etkileri kapsamlı bir şekilde incelenmiştir.

2. Materyal ve yöntem

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar ve MRS kültür ortamı Sigma-Aldrich'ten temin edildi. Elde edilen ürünün karakterizasyonu Bruker 400 MHz NMR kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen ürünün enantiyomerik aşırılığı (ee) Agilent 1260

model HPLC'de kiral kolon OD-H kullanılarak belirlenmiştir. Ürünün optik rotasyonu Bellingham+Stanley, ADP 220 model, dijital spektropolarimetre ile ölçülmüştür. Merck 60 silika jel (70-230), kolon kromatografisinde kullanılarak ürünün saflaştırma işlemi yapılmıştır. Reaksiyonların dönüşümleri bir miktar ham ürünün silikajel ihtiva eden küçük bir kolondan süzülmesi sonucunda HPLC analizi yapılarak keton pikinin alkol piki ile karşılaştırılması sonucu belirlenmiştir.

2.1. Çalışmada kullanılan biyokatalizörler ve kültür şartları

Bu çalışmada kullanılan biyokatalizler *Lactobacillus plantarum* BY14, *Lactobacillus fermentum* BY35, *Enterococcus faecium* BY48, *Lactobacillus paracasei* BD28, *Lactobacillus paracasei* BD101, *Lactobacillus paracasei* BD71 ve *Lactobacillus paracasei* BD87 daha önce boza'dan izole edilmiştir. (Dertli vd., 2016). Biyokatalizörler MRS (%2 glikoz, Twen 80 1 ml l⁻¹, maya ekstraktı [Difco] 5 g l⁻¹, lab lemco [Oxoid] 8 g l⁻¹, pepton [Oxoid] 10 g l⁻¹, sodyum asetat.3H₂O 5 g l⁻¹, K₂HPO₄ 2 g l⁻¹, triamonyum sitrat 2 g l⁻¹, tuz çözeltisi [MgSO₄.7H₂O %11.5 (w/v)] ortamında 37°C'de 2 gün geliştirildi ve daha sonra yıkama işlemi yapıldı. Yıkanan biyokatalizörler liyolifizatör ile dondurularak kurutuldu. Kurutulmuş biyokatalizörler kullanılmak üzere oda sıcaklığında muhafaza edilmişlerdir.

2.2. Asimetrik biyoindirgenme için genel reaksiyon yöntemi

250 mL'lik bir erlen içerisine 100 mL MRS besiyeri ve üzerine 20 mg kuru *Lactobacillus paracasei* BD28 ilave edildi. Karışım çalkalayıcı inkübatörde 30°C'de 2 saat 150 rpm'de karıştırıldı. Daha sonra karışımın pH'sı 1M'lık HCl kullanılarak 6.0'a ayarlandı ve aynı şartlar altında 2 saat daha karıştırılmaya devam edildi. Substrat **1** (1 mmol) reaksiyon karışımına ilave edilerek çalkalayıcı inkübatörde 30°C, 150 rpm'de 36 saat daha karıştırıldı. Karıştırma işlemi bittikten sonra karışımın kolay bir şekilde ekstrakte edilebilmesi için santrifüjleme işlemine tabi tutuldu. Santrifüj işlemi sonrasında elde edilen sıvı kısım sodyum klörür ile doyuruldu. Daha sonra doyurulan sulu faz diklor metan ile ekstrakte edildi. Ekstraksiyon sonrasında elde edilen diklor metan fazı susuz magnezyum sülfat ile kurutuldu ve organik çözücü evaporasyon ile uzaklaştırıldı. Ham ürün kolon

kromatografisinde hekzan-etil esat (90:10) çözücü karışımı ile saflaştırıldı. Elde edilen kiral alkol (**S**)-**2**'nin yapısı NMR ile karakterize edildi ve enantiyomerik aşırılık OD-H kiral kolon kullanılarak HPLC ile belirlendi.

2.3. Gram ölçekte sentez yöntemi

5 L'lik bir erlen içerisine 1 L'lik steril taze hazırlanmış MRS besiyeri ilave edilerek üzerine 200 mg kuru *Lactobacillus paracasei* BD28 eklendi ve 2 saat 30°C'de 150 rpm'de çalkalayıcı inkübatörde 2 saat karıştırıldı. Daha sonra pH 6'ya ayarlandı ve aynı şartlar altında 2 saat daha karıştırıldı. Bu karıştırma işleminden sonra, 4-metoksi asetofenon (67 mmol, 10.06 g) reaksiyon karışımına ilave edildi ve reaksiyon bittiğinde karakterizasyon ve saflaştırma işlemi yukarıda belirtildiği gibi gerçekleştirildi.

2.4. Asimetrik biyoindirgenme ve reaksiyon şartlarının optimizasyonu

Daha önce boza'dan izole edilen 7 farklı biyokatalizörün 4-metoksiasetofenon **1**'in 1-(4-metoksifenil) etanol **2**'ye asimetrik indirgenme reaksiyonunda indirgeyici kapasiteleri değerlendirildi (Tablo 1). Biyokatalitik indirgenme, 20 mg kuru biyokatalizörün 100 mL'lik taze MRS ortamında süspanse edilip üzerine 1 mmol substrat **1**'in ilave edilip 100 rpm'de 24 saat oda sıcaklığında karıştırılması ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu değerlendirme reaksiyonlarının sonucunda dönüşüm ve enantiyomerik aşırılık bakımından en iyi biyokatalizör olarak *Lactobacillus paracasei* BD28 belirlendi. Belirlenen bu biyokatalizör kullanılarak seçiciliğe etki eden biyoindirgenme reaksiyon şartları optimize edilmiştir (Tablo 2). Bu optimize şartlar altında biyokatalizörün endüstriyel olarak kullanılabilirliğini test etmek için gram ölçekte substratların asimetrik indirgenmesi gerçekleştirilmiştir.

3. Bulgular

En iyi biyokatalizörü belirlemek için asimetrik indirgenme reaksiyonları 20 mg kuru bakterinin 100 ml taze hazırlanmış MRS besiyeri içerisine ilave edildi ve 2 saat oda sıcaklığında, 100 rpm'de çalkalayıcı inkübatörde karıştırıldı. Daha sonra karışımın üzerine 1 mmol **1** eklendi ve aynı şartlar altında 24 saat karıştırıldı ve sonuçlar analiz edilerek en iyi biyokatalizör belirlendi (Tablo 1).

Tablo 1. 4-metoksi asetofenon (1)'in asimetrik biyoindirgenmesinde en iyi biyokatalizörün belirlenmesi

Biyokatalizör	Dönüşüm ^a [%]	Verim ^b [%]	ee ^c [%], (S) ^d
<i>Lactobacillus plantarum</i> BY14	49	47	50
<i>Lactobacillus fermentum</i> BY35	51	48	55
<i>Enterococcus faecium</i> BY48	61	55	51
<i>Lactobacillus paracasei</i> BD28	74	71	75
<i>Lactobacillus paracasei</i> BD101	59	56	68
<i>Lactobacillus paracasei</i> BD71	71	68	59
<i>Lactobacillus paracasei</i> BD87	53	48	18

Reaksiyon şartları: biyokatalizör 20 mg, substrat 1 mmol, RT, 24 s, 100 rpm. ^aDönüşümler kiral HPLC ile belirlendi, ^bizole edilen verim, ^cenantiyomerik aşırılıklar kiral OD-H kolon kullanılarak HPLC ile belirlenmiştir, ^dKonfigürasyonlar ölçülen çevirme açılarının literatürdeki değerleri ile karşılaştırılarak belirlenmiştir.

4-metoksi asetofenon'un 1-(4-metoksifenil) etanol 2'ye biyokatalitik asimetrik indirgenmesinde en iyi indirgenme potansiyeline sahip *Lactobacillus paracasei* BD28 biyokatalizörü belirlendikten sonra bu biyokatalizör kullanılarak reaksiyonun

dönüşümü, ürünün seçicilik ve verimine etki eden reaksiyon koşulları (pH, karıştırma hızı, sıcaklık ve inkübasyon süresi) kapsamlı bir şekilde araştırılarak optimizasyonları yapılmıştır (Tablo 2).

Tablo 2. *Lactobacillus paracasei* BD28 biyokatalizörü kullanılarak asimetrik indirgenme şartlarının optimizasyonu

pH			Sıcaklık			İnkübasyon süresi			Karıştırma Hızı		
Dönş. (%) ^a	ee (%) ^{b,c}		°C	Dönş. (%) ^a	ee (%) ^{b,c}	Saat	Dönş. (%) ^a	ee (%) ^{b,c}	rpm	Dönş. (%) ^a	ee (%) ^{b,c}
4.5	74	75 (S)	RT	88	91 (S)	24	95	96 (S)	100	99	98 (S)
5.5	80	79 (S)	28	94	92 (S)	36	99	98 (S)	150	99	99 (S)
6	88	91 (S)	30	95	96 (S)	48	99	89 (S)	200	65	54 (S)
6.5	81	80 (S)	32	90	78 (S)	60	87	71 (S)	250	61	41 (S)
7	77	71 (S)	34	83	69 (S)	72	79	65 (S)			
7.5	65	63 (S)	36	78	54 (S)						

^aDönüşümler kiral HPLC ile belirlendi, ^benantiyomerik aşırılıklar kiral OD-H kolon kullanılarak HPLC ile belirlenmiştir, ^cKonfigürasyonlar ölçülen çevirme açılarının literatürdeki değerleri ile karşılaştırılarak belirlenmiştir.

Reaksiyon şartları optimize edildikten sonra bu optimize şartlar altında biyokatalizör miktarının dönüşüm, enantiyomerik aşırılık ve verim üzerine etkisi araştırıldı (Tablo 3).

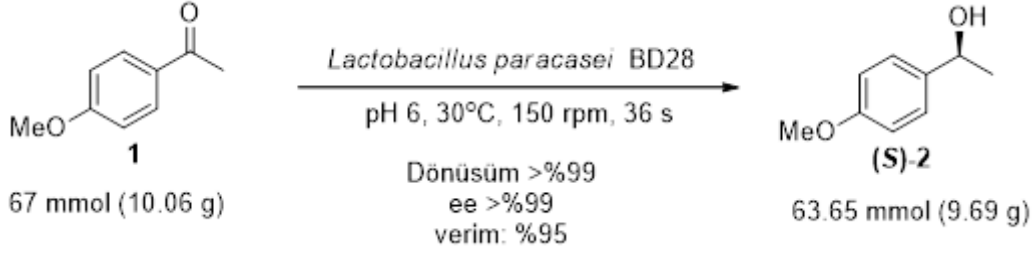
Tablo 3. Biyokatalizör miktarının dönüşüm ve seçiciliğe etkisi

Biyokatalizör miktarı (mg)	Dönüşüm (%)	ee (%)	Verim (%)
10	82	79	77
15	91	82	79
20	>99	>99	95
25	89	79	80
30	82	65	77
35	79	62	71
40	77	58	69
45	68	54	61
50	65	51	58
55	67	47	61

Reaksiyon şartları: pH 6, 30°C, 150 rpm, 36 h

Reaksiyon optimizasyon şartları belirlendikten sonra bu optimizasyon şartları altında biyokatalizörün endüstriyel olarak kullanılabilirliğini göstermek için değişik gram

skalada substrat kullanılarak biyokatalizörün dönüşüm ve enantiyomerik aşırılığında herhangi bir değişiklik olmadan maksimum ne kadar substratı indirgeyebileceği tespit edildi (Şekil 1).



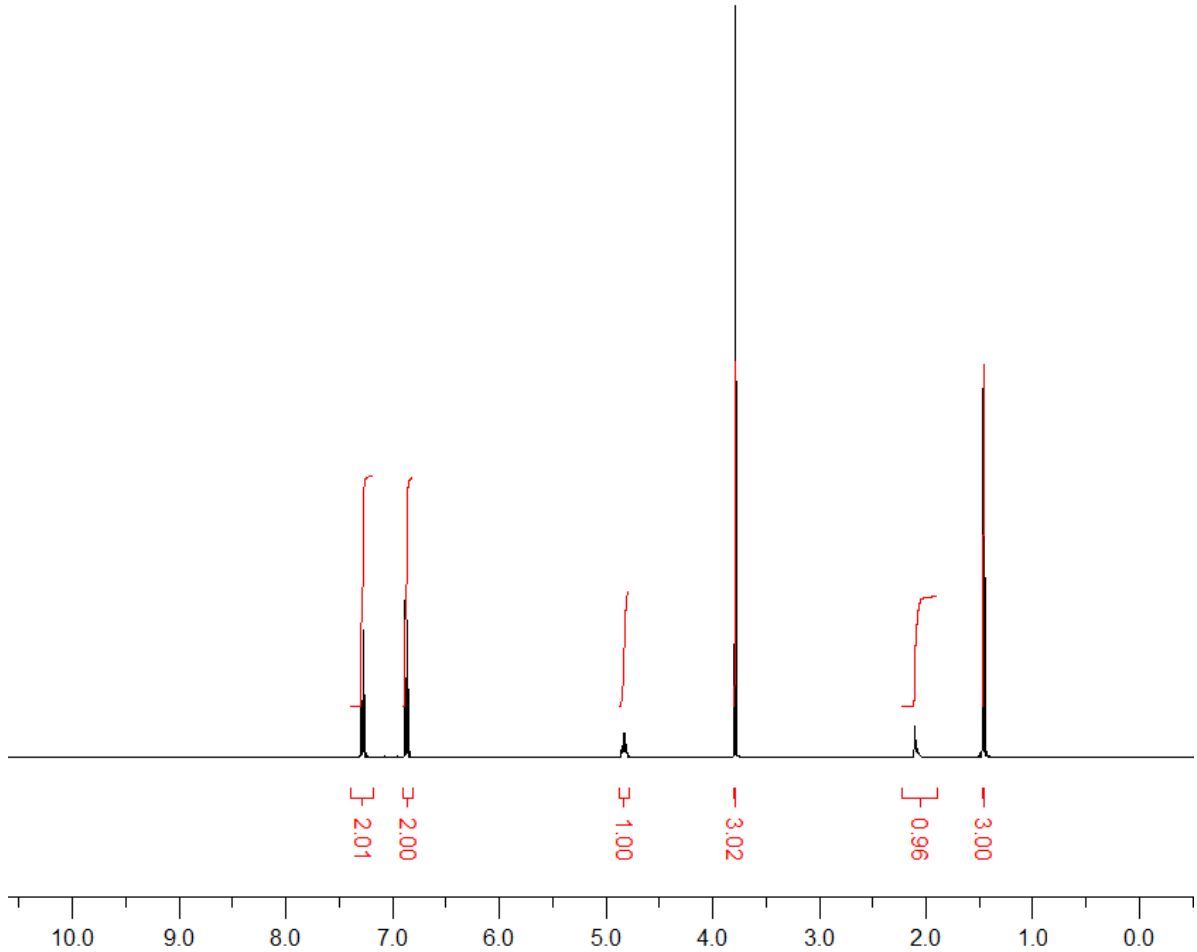
Şekil 1. (S)-1-(4-metoksifenil)ethanol'ün gram ölçekte sentezi

3.1. Kiral sekonder alkol (S-2)'nin spektral verileri

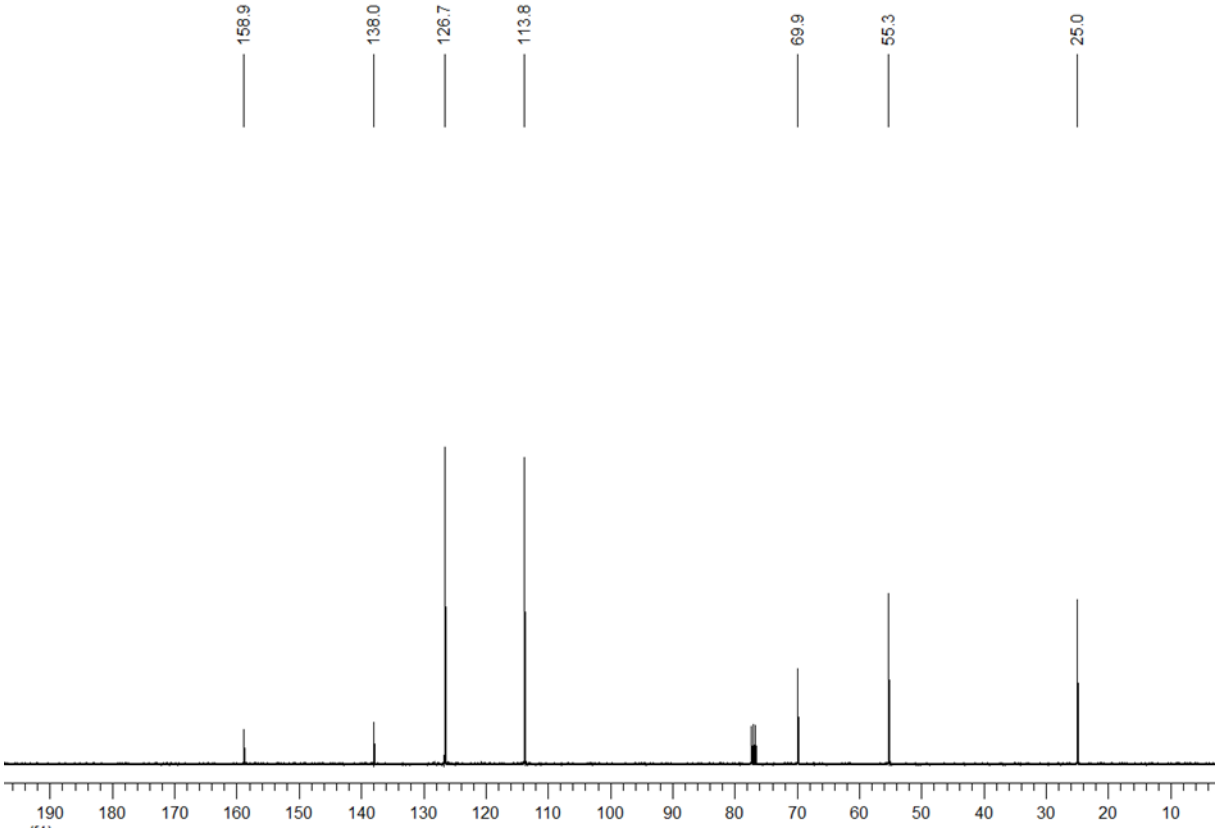
3.1.1. (S)-1-(4-methoxyphenyl)ethanol ((S)-2) (Şahin, 2017)

Renksiz sıvı, verim %95; $^1\text{H-NMR}$ (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) (Şekil 2); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 158.9, 138.0, 126.7, 113.8,

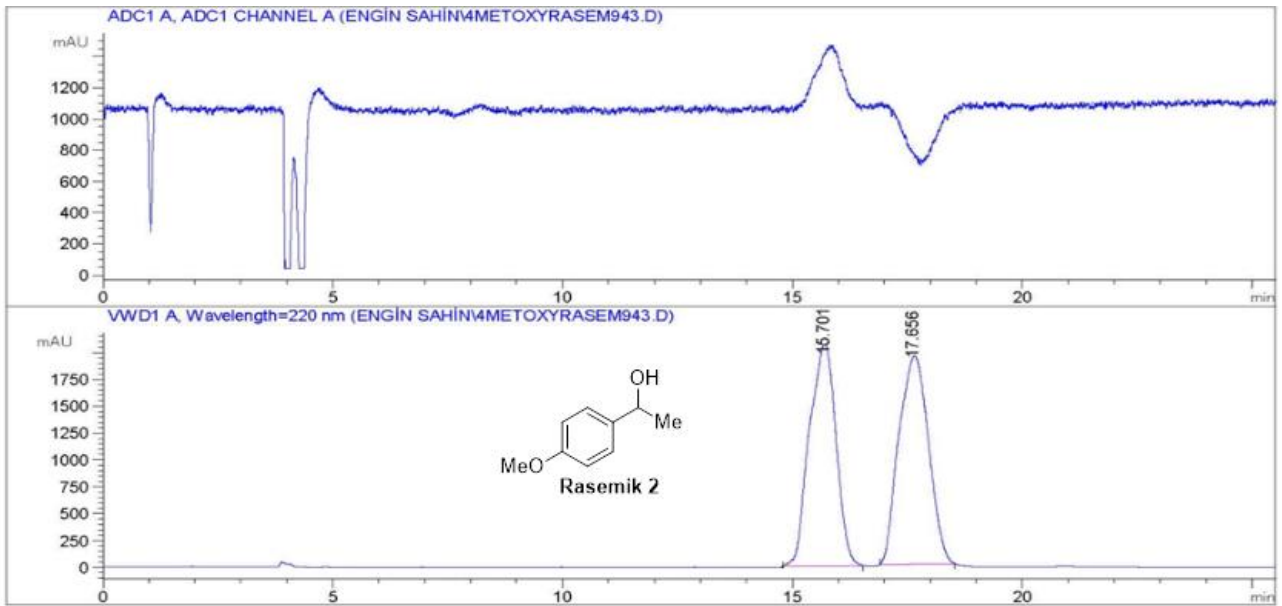
69.9, 55.3, 25.0 (Şekil 3); $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ = -61.6 (c 1.0, CHCl_3), >99% ee; Lit. $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ = +3.7 (c 1.0, CHCl_3) R enantiyomer ve %6 ee için ölçülen değer (Şahin, 2017); HPLC koşulları: kirial OD-H kolon, 220 nm, akış kızı: 0.8 mL/dk, *i*-PrOH/*n*-hekzan 5:95, t_{R} (S enantiyomer) 17.7 dk. (Şekil 4 (rasemik alkol 2'nin HPLC kromatogramı); Şekil 5). Substrat 1'in HPLC analiz şartları (S)-2 ile aynıdır ve ketonun alıkonma zamanı 11.2 dk. (Şekil 6).



Şekil 2. (S)-2'nin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu

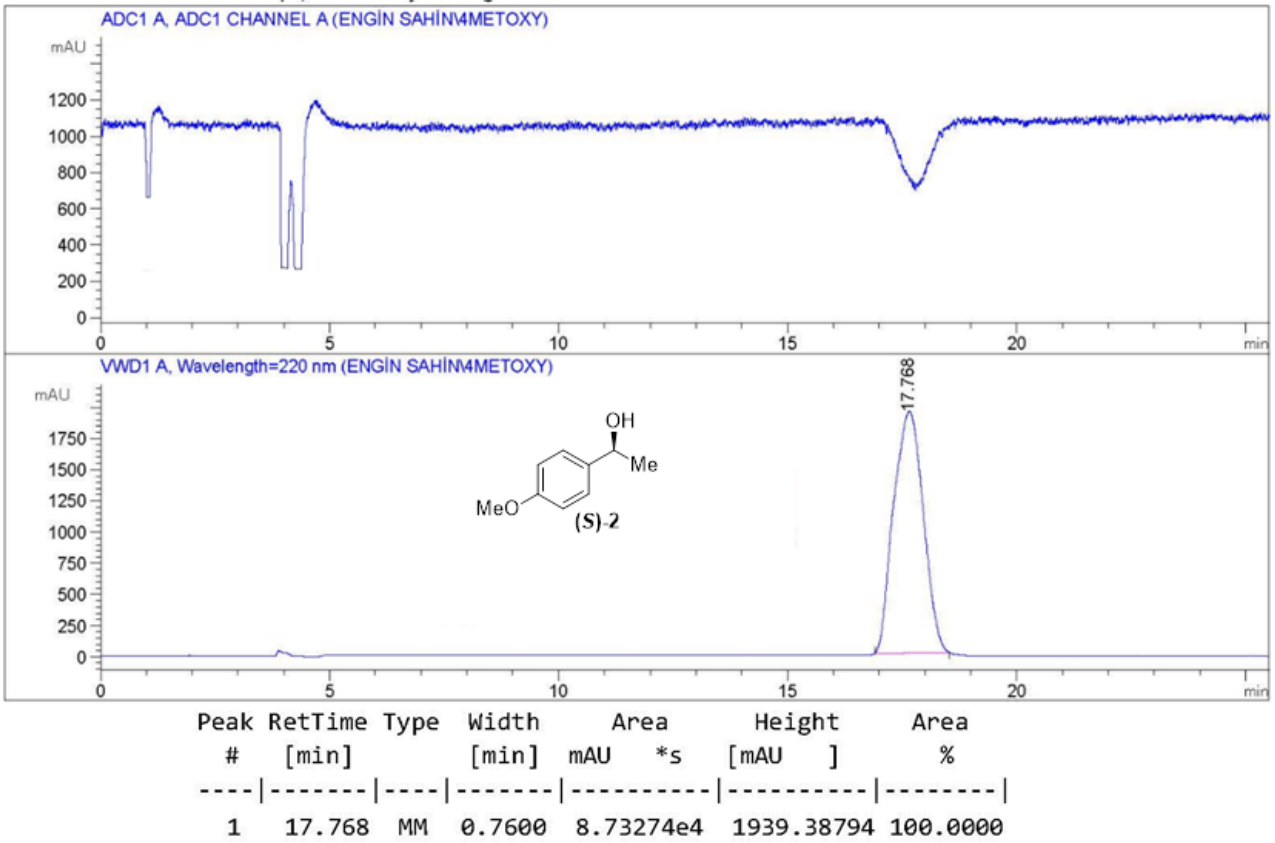


Şekil 3. (S)-2'nin ¹³C-NMR spektrumu

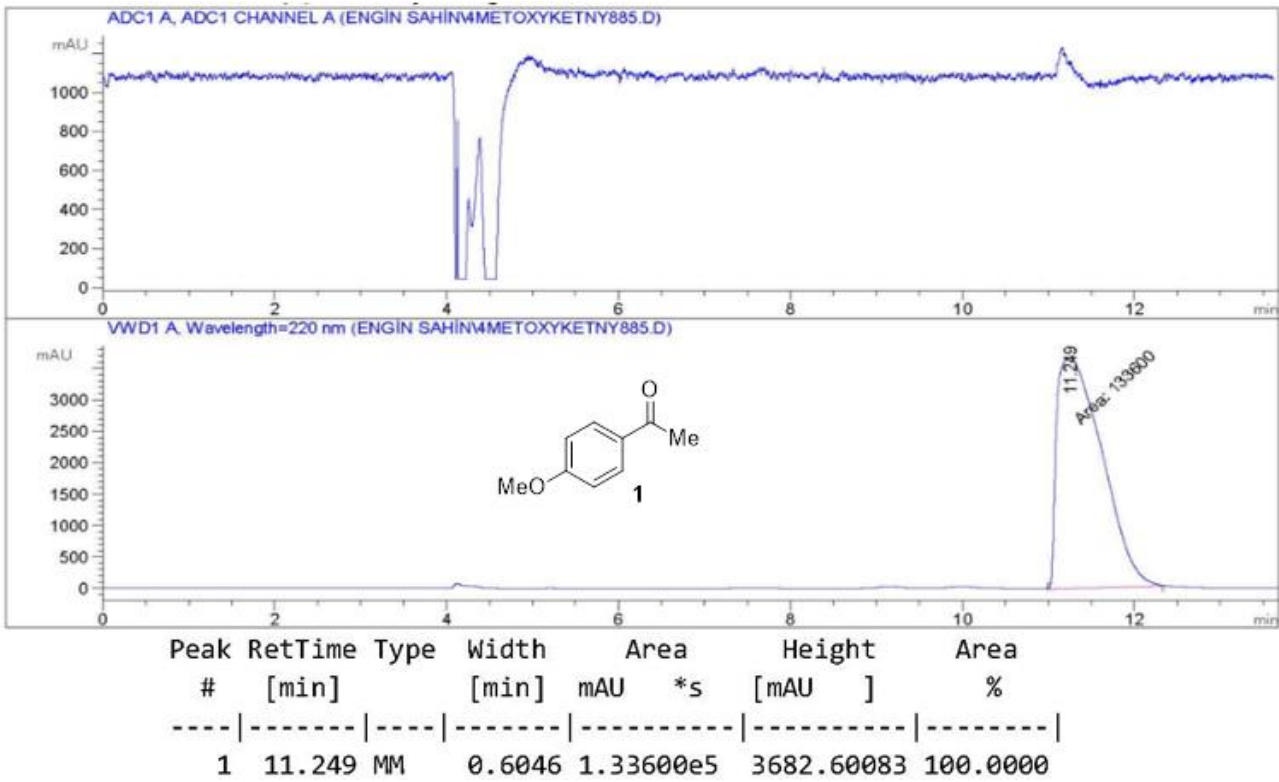


Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	15.701	MM	0.6596	8.07666e4	2040.82080	48.0774
2	17.656	MM	0.7500	8.72264e4	1938.29895	51.9226

Şekil 4. Rasemik alkol 2'nin HPLC kromatogramı



Şekil 5. (S)-2'nin HPLC kromatogramı



Şekil 6. Substrat 1'in HPLC kromatogramı

4. Tartışma ve Sonuç

Çeşitli biyokatalizörlerin taranması sonucu arzulanan ee'yi ve dönüşümü elde etmek organik kimya için önemli bir yoldur (Matsuda vd., 2009). Bununla birlikte literatür iyi bir biyokatalizörün sahip olması gereken özellikleri tanımlamıştır (Matsuda vd., 2009). İyi bir biyokatalizöre fermentasyonun optimizasyonu kullanılarak ulaşılabilir. Biyokatalizörlere olan ilginin artmasından dolayı, bilinen mevcut biyokatalizörler hala sınırlıdır ve bu nedenle yeni ve geliştirilmiş aktivitelere sahip yeni biyokatalizörlerin keşfedilmesi hayati önem taşımaktadır. Tablo 1'den açıkça görülmektedir ki kullanılan 7 farklı biyokatalizör %49'dan % 74'e kadar değişen bir dönüşüm oranı ve % 18'den %75'e kadar değişen enantiyomerik aşırılıklarda (S)-2'yi üretmişlerdir (Tablo 1). Çeşitli biyoindirgenme reaksiyonlarından elde edilen enantiyomerik aşırılık ve dönüşüm değerleri, taranan 7 biyokatalizörden *Lactobacillus paracasei* BD28'nin en iyi ee'yi ve dönüşümü verdiğini ortaya koymaktadır. Bundan dolayı dönüşüm (%74) ve enantiyomerik aşırılık bakımında (%75) en iyi değere sahip olan *Lactobacillus paracasei* BD28 en iyi biyokatalizör olarak seçildi ve bundan sonraki reaksiyonlara bu biyokatalizör kullanılarak devam edildi. Reaksiyon koşulları, kiral bir alkolün başarılı bir şekilde üretilmesi için gereklidir ve pH, sıcaklık, inkübasyon süresi ve çalkalama hızı gibi parametrelerin optimizasyonu yüksek dönüşüm ve enantiyomerik aşırılığa ulaşmak için önemlidir (Tablo 2) (Pereira, 1998). İlk parametre olarak pH'nın dönüşüm ve seçiciliğe etkisinin araştırılması yapılmıştır. pH'nın, tam hücrelerin kullanıldığı biyokatalitik reaksiyonların seyrinde anahtar bir rol oynadığı bilinmektedir ve aşağıda belirtildiği şekilde etkiler yapabilir. a) pH, reaksiyona dahil olan enzimlerin aktivitesini ve enantiyoseçiciliğini etkiler. b) Koenzim rejenerasyonunu etkiler ve bu da substratların biyoindirgenmesini etkiler. c) Reaksiyona dahil olan substratların, ürünlerin ve enzimlerin iyonik durumunu değiştirir. d) Enzimin aktif bölgesinin substrat ile bağlanmasını etkiler (Guo vd., 2010; Luo vd., 2011; Cui vd., 2018). pH'nın etkisinin araştırılması için, 20 mg kuru biyokatalizör, 1 mmol substrat, 100 rpm, oda sıcaklığında (RT) ve 24 saat reaksiyon koşulları altında değişik pH'larda (4.5-7.5) reaksiyonlar gerçekleştirilerek pH'nı seçiciliğe etkisi araştırıldı (Tablo 2). Açık bir şekilde tablo 2'de görüldüğü gibi pH hem seçicilik hem de dönüşüm üzerine etkili olduğu görülmektedir. pH değerinin 6'nın üzerine çıktığı durumlarda hem dönüşüm hem de seçicilik

düşmektedir. Bu durum yukarıda da belirtildiği gibi enzimin üç boyutlu yapısının değişmesi sonucu enzim aktif merkezinin substrat ile yeterince etkileşememesi sonucu seçicilik ve dönüşümün düşmesi ile açıklanabilir. pH 6 olduğu durumda en iyi dönüşüm (%88) ve en iyi seçicilik (%91) değerlerine ulaşıldığı için optimum pH 6 olarak belirlenmiştir. Sıcaklık, çoğu enzimin aktivitesi, seçiciliği, kararlılığı ve bir reaksiyonun dinamik denge durumu üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Bu nedenle, biyoindirgenme reaksiyonları farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilerek ikinci parametre olarak sıcaklığın dönüşüm ve enantiyomerik aşırılık üzerine etkisi araştırıldı (Tablo 2). pH 6 olarak optimize edildikten sonra bu pH değerinde, 100 rpm ve 24 saat reaksiyon süresi şartları altında sıcaklığın substratın dönüşümü, ürünün ee'si ve verimi üzerine etkisini belirlemek için farklı sıcaklıklarda (RT-36°C) reaksiyonlar yapılmıştır. Sıcaklığın 30°C'nin üzerine çıktığında hem dönüşüm hem de seçicilik değerleri düşmektedir. Bu değerlerdeki düşüş yüksek sıcaklıklarda biyokatalizörün aktivitesinin azalması ile açıklanabilir. Dönüşüm ve enantiyomerik aşırılık bakımından en iyi değerle 30°C'de elde edildiği için 30°C optimum sıcaklık olarak belirlenmiş ve bundan sonraki reaksiyonlar bu sıcaklıkta yapılmıştır. pH değerinin 6 ve sıcaklığın 30°C olduğu ve karıştırma hızının 100 rpm olduğu koşullar altında üçüncü parametre olan inkübasyon süresinin seçicilik ve dönüşüm üzerine etkisini incelemek için farklı inkübasyon sürelerinde (24-72 saat) reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir (Tablo 2). Tablo 2'den de görüldüğü gibi reaksiyon süresinin 36 saatten fazla olduğunda hem seçiciliğin hem de dönüşümün düştüğü görülmektedir. Bu değerlerdeki düşme süre arttıkça enzimin aktif bölgesinin şeklinin değişebileceği hem de enzim aktivitesinin azalması ile açıklanabilir. Inkübasyon süresi için en iyi dönüşüm (%99) ve en iyi enantiyomerik aşırılık (%98) 36 saatte elde edilmiştir ve bundan dolayı optimum inkübasyon süresi olarak 36 saat belirlenmiştir. Genel olarak, çalkalama hızı, biyoindirgenme sürecinde substratların ve ürünlerin partikül transfer oranını etkileyebilir ve daha sonra dönüşüm ve verimi etkiler. Bu nedenle, çalkalama hızının biyoindirgenme üzerindeki etkilerini araştırmak oldukça önemlidir. Bundan dolayı, karıştırma hızı enzimin yapısını değiştirdiği için son parametre olarak optimizasyonu yapılmıştır. pH'nın 6, sıcaklığın 30°C ve inkübasyon süresinin 36 saat olduğu reaksiyon şartları altında farklı karıştırma hızları altında (100-250 rpm) reaksiyonlar yapılarak dönüşüm ve enantiyomerik aşırılık üzerine etkisi değerlendirilmiştir (Tablo 2). Karıştırma hızının

150 rpm'den fazla olduğu durumlarda seçicilik ve dönüşüm oranı azalmaktadır. Bu azalma karıştırma hızı yüksek olduğunda biyokatalizörün yapısının değişmesi sonucu aktivitesinin düşmesi ile açıklanabilir. Reaksiyonun tamamen dönüştüğü ve ürünün enantiyomerik aşırılığının %99'dan büyük olduğu çalkalama hızı 150 rpm'dir. Bundan dolayı optimum çalkalama hızı 150 rpm olarak belirlenmiştir. Sistematik olarak yapılan reaksiyon optimizasyon işlemi sonucunda en iyi biyoindirgenme reaksiyon koşulları (sıcaklık 30°C, 150 rpm, pH 6, inkübasyon süresi 36 saat) belirlenmiştir. Tam hücre biyokatalizörlerinde, biyokatalizör miktarı yalnızca reaksiyon hızını, dönüşümü, seçiciliği doğrudan etkilemekle kalmaz, aynı zamanda kütle transferi sınırlamasını da başlatabilir. Bu nedenle, uygun miktarda biyokatalizör kullanarak biyokatalitik reaksiyonların gerçekleştirilmesi son derece önemlidir (Pu vd., 2011). Bu amaçla, 10 ila 55 mg arasında değişen miktarlarda biyokatalizörler kullanılarak optimize edilmiş koşullar altında çeşitli deneyler gerçekleştirildi (Tablo 3). Biyokatalizör miktarı 20 mg'a kadar kullanıldığında dönüşüm ve ee'nin arttığı, ancak miktar 20 mg'dan fazla olduğunda hem dönüşüm hem de ee'nin azaldığı görülmüştür. Örneğin biyokatalizör miktarı 25 mg ve 30 mg olarak kullanıldığında ee'nin sırasıyla % 79 ve % 65'e düştüğü görülmüştür. Bu durum, daha önce literatürde belirtildiği gibi, reaksiyon ortamındaki biyokatalizörün artması ile NADPH miktarının değişmesi sonucu biyokatalizörün seçiciliğinin değişmesi ile açıklanabilir (Zhimin vd., 2018). Bundan dolayı bu biyokatalitik asimetric indirgenme için uygun biyokatalizör miktarı 20 mg olarak belirlenmiştir.

Çalışmanın son amacı, enantiyosaf kiral alkolün yeşil yöntemle gram ölçeğinde sentezlenmesi endüstriyel uygulamalar için son derece önemli olduğundan, belirlenen optimum biyoindirgenme koşullarını kullanarak (S)-2'nin gram ölçeğinde sentezini gerçekleştirmektir. Substrat konsantrasyonunun, ürünün ee'si ve substrat'ın dönüşümü üzerinde bir etkisi olduğu bilinmektedir. Literatürde, daha yüksek substrat konsantrasyonunun, hücre toksisitesine ve ürün/substrat inhibisyonuna neden olarak biyotransformasyonu azaltabileceği rapor edilmiştir (Xie vd., 2009; Singh vd., 2012). Bu nedenle, maksimum ee ve dönüşüm elde etmek için optimum substrat konsantrasyonunu belirlemek çok önemlidir. Substrat konsantrasyonu, reaksiyonun dönüşümünü ve seçiciliğini etkilemiştir çünkü hücreler, substrata karşı farklı afiniteye sahip farklı türde redüktazlar içerir.

Ayrıca, büyük miktarlarda substrat kullanılması hücre toksisitesine ve substrat ürün inhibisyonuna neden olabilir (Roy vd., 2003). Bu nedenle, optimum substrat konsantrasyonunun belirlenmesi çok önemlidir. Optimize edilmiş koşullar altında substrat konsantrasyonunun 10-80 mmol aralığında değiştirilmesiyle bir dizi deney gerçekleştirildi. Ürünün en iyi ee'si (>% 99) ve tam dönüşüm (>%99), 67 mmol (10.06 g)/1L substrat 1 konsantrasyonu ile elde edildi (Şekil 1). Optimize edilmiş koşullar altında substrat 1 (67 mmol), >% 99 ee ve % 95 verimle (S)-2 (63.65 mmol, 9.69 g)'ye dönüştürüldü. Dönüşüm ve ee, 67 mmol'den daha yüksek konsantrasyonda keton kullanılması ile azaldı. Dönüşüm ve ee'deki bu azalma substratın toksisitesinin bir sonucu olarak enzimin aktivitesindeki azalma ile açıklanabilir.

Sonuç olarak, *Lactobacillus paracasei* BD28'in mükemmel dönüşüm ve enantioseçicilik ile 1'in asimetric biyoindirgenmesi için çok önemli bir biyokatalizör olduğu gösterilmiştir. Difenilhidramin hidroklorür ve loratadin dahil olmak üzere antihistaminlerin sentezi için önemli bir öncü olarak kullanılabilen (S)-2, *Lactobacillus paracasei* BD28 kullanılarak gram ölçeğinde, mükemmel verimde ve enantiyomerik olarak saf formda sentezlendi. Bu çalışma, daha yüksek substrat toleransı (10.06 g /1L) ve verim (% 95) gibi avantajlar sağlamıştır. Bu sonuçlar, mevcut yöntemin gram ölçeğinde (S)-2'nin yeşil sentezi için önemli bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Bu biyokatalitik indirgenme, çevre dostu reaksiyon koşulları nedeniyle optik olarak saf (S)-2'nin sentezi için büyük önem taşımaktadır. *Lactobacillus paracasei* BD28 kullanılarak 1'in katalitik asimetric indirgenmesi, kimyasal işlemlere kıyasla ucuz, çevreye zarar vermeyen ve kolayca ölçeklendirilebilen bir metottur. Böylece, ilaç öncüsü olarak kullanılacak enantiyo saf (S)-2'nin elde edilmesi için yeni bir biyokatalizör literatüre kazandırılmıştır.

Teşekkür

Biyokatalizörleri temininden dolayı Dr. Enes Dertli'ye (Yıldız Teknik Üniversitesi) ve HPLC analizlerinden dolayı Bayburt Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarına teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Brondani, P.B., Guilamoto, N.M., Dudek, H.M., Fraaije, M.W. and Andrade, L.H. (2012). Chemoenzymatic approaches to obtain chiral-centered selenium compounds. *Tetrahedron*, 68, 10431-10436.
<https://doi.org/10.1016/j.tet.2012.09.087>

- Contesini, F.J., Lopes, D.B., Macedo, G.A., da Graça Nascimento, M. and de Oliveira Carvalho, P. (2010). *Aspergillus* sp. lipase: potential biocatalyst for industrial use. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 67, 163-171. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.07.021>
- Cui, Y.H., Wei, P., Peng, F., Zong, M.H. and Lou, W. Y. (2018). Efficient biocatalytic stereoselective reduction of methyl acetoacetate catalyzed by whole cells of engineered *E. coli*. *RSC Advances*, 8, 9970-9978. <https://doi.org/10.1039/C8RA00883C>.
- Dertli, E., Mercan, E., Arıcı, M., Yılmaz, M.T. and Sağdıç, O. (2016). Characterisation of lactic acid bacteria from Turkish sourdough and determination of their exopolysaccharide (EPS) production characteristics. *LWT-Food Science and Technology*, 71, 116-124. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.030>.
- Drayer, D.E. (1986). Pharmacodynamic and pharmacokinetic differences between drug enantiomers in humans: an overview. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 40, 125-133. <https://doi.org/10.1038/clpt.1986.150>
- Gamenara, D. and de María, P.D. (2009). *Candida* spp. redox machineries: An ample biocatalytic platform for practical applications and academic insights. *Biotechnology Advances*, 27, 278-285. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.005>
- Gotor-Fernández, V., Brieva, R. and Gotor, V. (2006). Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 40, 111-120. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.02.010>
- Guo, J.L., Mu, X.Q. and Xu, Y. (2010). Integration of newly isolated biocatalyst and resin-based in situ product removal technique for the asymmetric synthesis of (*R*)-methyl mandelate. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33, 797-804. <https://doi.org/10.1007/s00449-009-0401-2>
- Hillier, M.C., Desrosiers, J.N., Marcoux, J.F. and Grabowski, E.J. (2004). Stereoselective carbon-carbon bond formation via the Mitsunobu displacement of chiral secondary benzylic alcohols. *Organic Letters*, 6, 573-576. <https://doi.org/10.1021/ol036380l>
- Hillier, M. C., Marcoux, J. F., Zhao, D., Grabowski, E. J., McKeown, A. E. and Tillyer, R. D. (2005). Stereoselective formation of carbon-carbon bonds via S_N2-displacement: synthesis of substituted cycloalkyl [b] indoles. *The Journal of Organic Chemistry*, 70, 8385-8394. <https://doi.org/10.1021/jo051146p>
- Honda, K., Inoue, M., Ono, T., Okano, K., Dekishima, Y. and Kawabata, H. (2017). Improvement of operational stability of *Ogataea minuta* carbonyl reductase for chiral alcohol production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 123, 673-678. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.01.016>
- Ishige, T., Honda, K. and Shimizu, S. (2005). Whole organism biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 9, 174-180. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.02.001>
- Kafarski, P. and Lejczak, B. (2004). Application of bacteria and fungi as biocatalysts for the preparation of optically active hydroxyphosphonates. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 29, 99-104. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2003.12.013>
- Llona-Minguez, S., Ghassemian, A. and Helleday, T. (2015). Lysophosphatidic acid receptor (LPAR) modulators: the current pharmacological toolbox. *Progress in Lipid Research*, 58, 51-75. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.01.004>
- Lou, W.Y., Wang, W., Li, R.F. and 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, 190-197. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.07.004>
- Luo, F., Lu, D. and Gong, Y. (2011). Enantioselective bioreduction of 2-fluoro-2-alken-1-ols mediated by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 70, 101-107. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.02.011>
- MacLellan, P. and Clayden, J. (2011). Enantioselective synthesis of tertiary thiols by intramolecular arylation of lithiated thiocarbamates. *Chemical Communications*, 47, 3395-3397. <https://doi.org/10.1039/C0CC04912C>
- Matsuda, T., Yamanaka, R., and Nakamura, K. (2009). Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction. *Tetrahedron: Asymmetry*, 20, 513-557. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2008.12.035>
- Murzin, D.Y., Mäki-Arvela, P., Toukoniitty, E. and Salmi, T. (2005). Asymmetric heterogeneous catalysis: science and engineering. *Catalysis Reviews*, 47, 175-256. <https://doi.org/10.1081/CR-200057461>
- Ni, Y. and Xu, J.H. (2012). Biocatalytic ketone reduction: a green and efficient access to enantiopure alcohols. *Biotechnology Advances*, 30, 1279-1288. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.10.007>

- Patel, R.N. (2002). Microbial/enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 804-826. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00186-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00186-2)
- Pereira, R.D.S. (1998). The use of baker's yeast in the generation of asymmetric centers to produce chiral drugs and other compounds. *Critical reviews in biotechnology*, 18, 25-64. <https://doi.org/10.1080/0738-859891224211>
- Pu, W., Huizhen, S., Liming, S., Junyao, H. and Yaping, L.Ü. (2011). Asymmetric bioreduction of 3, 5-bis (trifluoromethyl) acetophenone to its corresponding alcohol by *Candida tropicalis*. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 19, 1028-1032. [https://doi.org/10.1016/S1004-9541\(11\)60087-6](https://doi.org/10.1016/S1004-9541(11)60087-6)
- Roy, A., Bhattacharyya, M.S., Kumar, L.R., Chawla, H.P.S. and Banerjee, U.C. (2003). Microbial reduction of 1-acetonaphthone: a highly efficient process for multigram synthesis of S (-)-1-(1'-naphthyl) ethanol. *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 576-580. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00178-9](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00178-9)
- Singh, A., Chisti, Y. and Banerjee, U.C. (2012). Stereoselective biocatalytic hydride transfer to substituted acetophenones by the yeast *Metschnikowia koreensis*. *Process Biochemistry*, 47, 2398-2404. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.09.022>
- Świzdor, A., Janeczko, T. and Dmochowska-Gładysz, J. (2010). *Didymosphaeria igniaria*: a new microorganism useful for the enantioselective reduction of aryl-aliphatic ketones. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37, 1121-1130. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0759-9>
- Şahin, E. (2017). *Debaryomyces hansenii* as a new biocatalyst in the asymmetric reduction of substituted acetophenones. *Biocatalysis and Biotransformation*, 35, 363-371. <https://doi.org/10.1080/10242422.2017.1348500>
- Wang, B., Zhu, B., Gong, J., Weng, J., Xia, F. and Liu, W. (2020). Resolution of racemic 1-(4-methoxyphenyl) ethanol using immobilized lipase with high substrate tolerance. *Biochemical Engineering Journal*, 158, 107559. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107559>
- Wang, W., Zong, M.H. and 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, 70-76. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.05.010>
- Wei, P., Liang, J., Cheng, J., Zong, M. H. and Lou, W.Y. (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, 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0407-1>
- Xie, Y., Xu, J.H., Lu, W.Y. and Lin, G.Q. (2009). Adzuki bean: a new resource of biocatalyst for asymmetric reduction of aromatic ketones with high stereoselectivity and substrate tolerance. *Bioresource Technology*, 100, 2463-2468. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.11.054>
- Xu, P., Cheng, J., Lou, W.Y. and 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, 6357-6364. <https://doi.org/10.1039/C4RA12905A>
- Zhimin, O., Ma, L., Niu, Y. and Cui, J. (2018). Preparation of (R)-(-)-mandelic acid by two-step biotransformation of ethyl benzoylformate. *Biocatalysis and Biotransformation*, 36, 409-416. <https://doi.org/10.1080/10242422.2017.1420063>
- Zong, C., Zhang, X., Yang, F., Zhou, Y., Chen, N., Yang, Z. and Tang, Y. (2019). Biotransformation of a crizotinib intermediate using a mutant alcohol dehydrogenase of *Lactobacillus kefir* coupled with glucose dehydrogenase. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 49, 578-583. <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1591987>