

***Lactobacillus curvatus* Suşu ile Asetofenon Türevlerinin Asimetrik İndirgenmesi**

Engin ŞAHİN*

Bayburt Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 69000, Bayburt

Geliş tarihi/Received 29.03.2017

Düzeltilerek geliş tarihi/Received in revised form 01.07.2017

Kabul tarihi/Accepted 20.07.2017

Öz

Sekiz farklı *Lactobacillus curvatus* suşu asetofenon'un 1-fenil etanol'e asimetrik indirgenmesinde biyokatalizör olarak değerlendirildi. Test edilen bu laktik asit bakterisi (LAB) suşları arasında *Lactobacillus curvatus* N5 asetofenon'un enantioseçici indirgenmesinde en etkili biyokatalizör olarak bulundu. Optimize edilen reaksiyon şartları altında asetofenon türevleri % 99 enantiyomerik fazlalığa kadar ilgili kiral sekonder alkollere dönüştürüldü.

Anahtar kelimeler: *Biyokatalizör, Enantioseçici indirgenme, Keton, Kiral alkol, Lactobacillus curvatus*

Asymmetric Reduction of Acetophenone Derivatives by a *Lactobacillus curvatus* strain

Abstract

Eight strains of *Lactobacillus curvatus* were evaluated as biocatalysts in the asymmetric reduction of acetophenone to 1-phenyl ethanol. Among the tested lactic acid bacteria (LAB) strains *Lactobacillus curvatus* N5 was found to be an effective biocatalyst for the enantioselective reduction of acetophenone. Under the optimized reaction conditions, derivatives of acetophenones were converted to the corresponding chiral secondary alcohols in up to 99% enantiomeric excess.

Keywords: *Biocatalyst, enantioselective reduction, ketone, chiral alcohol, Lactobacillus curvatus*

1. Giriş

Kiral alkoller çeşitli biyolojik aktif bileşiklerin ve ilaçların sentezinde değerli ara ürünlerdir. Son yıllarda ilaç, kimya ve kimyasal tarım alanlarında optikçe aktif bileşiklere talep artmıştır ve bu yüzden bu bileşiklerin sentezinde önemli başlangıç maddesi olan kiral

sekonder alkollere olan talep de her geçen gün artmaktadır (Zilbeyaz vd., 2016). Optikçe aktif aromatik alkoller, L-klorpromazin, S-fluoksetin, R-atomoksetin ve R-denopamin gibi bir çok kiral ilacın önemli yapı taşlarıdır (Kataoka vd., 2003). Çoğu ilaç kiraldır ve hatta büyük bir

* Engin ŞAHİN, esahin@bayburt.edu.tr, Tel: (0458) 211 11 53/1654

kısmı birden fazla kiral merkeze sahiptir (Murzin vd., 2005). Kiral alkollerin sentezinde kullanılan yöntemler, prokiral ketonların biyokatalizör veya metal katalizörler ile indirgenmesi ve rasemik alkollerin kinetik rezolusyonu ya da uygun esterlerin hidrolizidir (Wong vd., 1985, Yang vd., 2006). Kimyasal katalizörlerin dezavantajları toksik metal kullanımı, zayıf seçicilik, düşük dönüşüm oranı, sert reaksiyon koşulları, yan ürünlerin fazla olması ve pahalı olmalarıdır (Hage vd., 2001). Enantiyomerik saf aromatik alkollerin üretilmesinin en önemli yollarından biri, aktif hücreler tarafından katalize edilen ilgili prokiral aromatik ketonların asimetrik indirgenmesidir. İzole edilmiş enzimler veya tüm hücreleri içeren biyokatalizörler ılımlı reaksiyon koşulları, stereo seçiciliklerinin yüksek olması ve özellikle çevreci olmalarından dolayı daha çekici hale gelmişlerdir. Asimetrik indirgenmede kullanılan izole enzimler indirgenme fonksiyonunu yerine getirmesi için NADPH gibi pahalı kofaktörlere ihtiyaç duyarlar (Faber, 1997). Ayrıca bu enzimlerin saflaştırılmasının pahalı olması da indirgenmede saf enzim kullanmanın diğer bir dezavantajıdır. Biyokatalizör olarak mikrobiyal tüm hücrenin kullanılması arzu edilen indirgenmenin yapılmasında önemlidir. Çünkü bütün gerekli kofaktörleri ve kendilerinin yeniden oluşumları için gerekli metabolik yolları içerirler (Mandal vd., 2004). Aynı zamanda bütün enzimler ve kofaktörler kendi doğal hücre ortamlarında iyi bir şekilde korunmuş durumdadır. Bu yüzden tüm hücre olarak kullanılan biyokatalizörler enzim saflaştırılması gerektirmediği ve ekstradan kofaktör gerektirmedikleri için biyokatalizör olarak daha avantajlıdır (Faber, 2000). Bu yüzden mikrobiyal tüm hücreler asimetrik indirgenme reaksiyonlarında biyokatalizör olarak tercih edilirler. Bu çalışmada, sekiz *Lactobacillus curvatus* suşunun asetofenon türevlerinin indirgenmesinde biyokatalizör olarak kullanılma potansiyelleri değerlendirilmiştir.

2. Metaryal ve Yöntem

Kullanılan tüm çözücüler, kimyasallar ve kültür ortamı yüksek saflıkta Sigma ve Merck'ten

satın alındı. ^1H ve ^{13}C NMR'lar Bruker 400 MHz NMR ile belirlendi. Enantiyomerik fazlalık (*ee*) kiral detektöre sahip Agilent 1260 HPLC'de OD, OD-H ve AS kiral kolonlar kullanılarak belirlendi. Çevirme açıları Bellingham + Stanley, ADP 220, polarimetre ile belirlendi. Saflaştırma işlemi kolon kromatografisi ile Silikajel 60 (70-230 mesh ASTM) (Merck) kullanılarak yapıldı.

2.1. Kullanılan mikroorganizmalar ve Kültür Koşulları

Bu çalışmada daha önce ekşi hamurdan izole edilmiş *Lactobacillus curvatus* suşları kullanılmıştır (Dertli vd., 2016). Bu amaçla suşlar MRS (%2 glikoz, maya ekstraktı [Difco] 5 g l^{-1} , lab lemco [Oxoid] 8 g l^{-1} , pepton [Oxoid] 10 g l^{-1} , Sodyum asetat. $3\text{H}_2\text{O}$ 5 g l^{-1} , K_2HPO_4 2 g l^{-1} , triamonyum sitrat 2 g l^{-1} , tuz çözeltisi [$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ %11.5 (w/v), $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ %2.8 (w/v)] 5 ml l^{-1} , Tween 80 1 ml l^{-1}) besiyerinde 37°C 'de 2 gün süreyle geliştirilmiş ve takiben yıkama işleminin ardından suşlar dondurularak kurutulmuştur. Liyofilize suşlar oda sıcaklığında saklanarak daha sonraki reaksiyonlarda kullanılmıştır.

2.2. Genel Biyoindirgenme Reaksiyon Prosedürü

Steril 100 mL'lik MRS besiyeri içerisine 25 mg kuru *Lactobacillus curvatus* suşu ilave edildi ve 2 saat 28°C 'de 150 rpm karıştırıldı ve daha sonra pH 7.5'e ayarlanarak 2 saat daha aynı şartlarda karışmaya devam edildi. Bunu takiben 1 mmol substrat direkt olarak reaksiyon ortamına ilave edildi ve 48 saat 150 rpm ve 28°C 'de karıştırılmaya devam edildi. İnkübasyon süresinin sonunda reaksiyonun misel kısmı süzülerek ayrıldıktan sonra sıvı kısım NaCl ile doyuruldu ve dietil eter ile ekstrakte edildi. Dietil eter ekstraktı susuz Na_2SO_4 ile kurutuldu ve dietil eter düşük basınçta uzaklaştırıldı. Elde edilen ham ürün silikajel kolon kromatografisinde etil asetat-hekzan (10:90) çözücü karışımı ile saflaştırıldı. Kiral alkollerin yapıları NMR ile ve enantiyomerik fazlalıklar da kiral HPLC ile belirlendi.

2.3. Asimetrik İndirgenme ve Reaksiyon Şartlarının Optimizasyonu

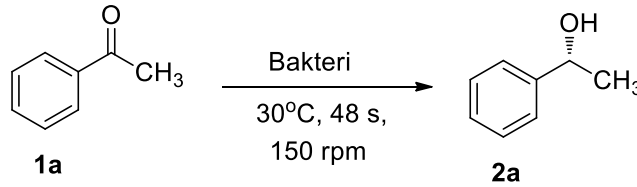
Model substrat asetofenon (**1a**) kullanılarak sekiz *Lactobacillus curvatus* suşunun (Dertli vd., 2016) biyokatalizör olarak kullanıma kapasiteleri test edildi (Tablo 1). Yapılan asimetrik indirgenmede reaksiyon sıcaklığı, pH, inkübasyon süresi ve karıştırma hızı gibi parametreler enantioseçiciliğe etki eden önemli faktörlerdir. Bu amaçla model substrat asetofenon kullanılarak bu parametreler için en uygun reaksiyon şartları belirlendi. Bu optimizasyon şartları Tablo 2’de özetlenmiştir.

Lactobacillus curvatus N5 suşunun optimize reaksiyon şartları altında asetofenon türevleri (**1b-j**)’nin asimetrik indirgenmesinde biyokatalizör etkinliği değerlendirildi (Tablo 3).

3. Bulgular

Asimetrik indirgenme 25 mg kuru bakterinin 100 ml besiyeri ortamına alınması ve 2 saat 30°C, 150 rpm’de karıştırıldıktan sonra üzerine 1 mmol (**1a**) eklenmesi ve aynı şartlar altında 48 saat karıştırılmaya devam edilerek gerçekleştirildi.

Tablo 1. Asetofenon’un asimetrik indirgenmesinde en iyi *Lactobacillus curvatus* bakteri suşunun belirlenmesi



Bakteri ^a	Dönüşüm ^b (%)	%Verim ^c	%ee ^d (R)
<i>Lactobacillus curvatus</i> N1	95	83	50
<i>Lactobacillus curvatus</i> N2	98	81	61
<i>Lactobacillus curvatus</i> N3	95	87	51
<i>Lactobacillus curvatus</i> N4	99	92	54
<i>Lactobacillus curvatus</i> N5	97	90	66
<i>Lactobacillus curvatus</i> N6	95	89	64
<i>Lactobacillus curvatus</i> N7	98	88	55
<i>Lactobacillus curvatus</i> N8	95	87	57

Reaksiyon Şartları: biyokatalizör 25 mg, substrat: 1mmol, sıcaklık: 30°C, süre: 48s, 150 rpm

^a Biyokatalizör suşlarının karşılaştırılması.

^b Dönüşümler HPLC ile belirlendi.

^c Saflaştırılan verim.

^d Kiral OD-H kolon kullanılarak belirlendi.

Tablo 2. *Lactobacillus curvatus* N5 bakteri suşu kullanılarak asimetrik indirgenme şartlarının optimizasyonu.

pH	ee		Sıcaklık °C	Dönüşüm		İnkübasyon süresi		Karıştırma Hızı			
	Dönş. (%) ^b	ee (%) ^{c,d}		Dönş. (%) ^b	ee (%) ^{c,d}	Saat	Dönş. (%) ^b	ee (%) ^{c,d}	rpm	Dönş. (%) ^b	ee (%) ^{c,d}
5.5	97	66 (R)	26	93	59 (R)	24	92	87 (R)	100	86	61 (R)
6	93	71 (R)	28	99	92 (R)	48	99	92 (R)	150	99	92 (R)
6.5	90	73 (R)	30	97	75 (R)	72	99	90 (R)	200	60	44 (R)
7	93	75 (R)	32	93	9 (R)						
7.5	97	75 (R)									

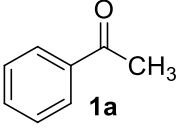
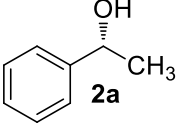
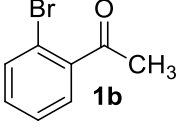
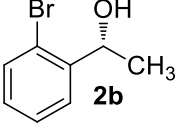
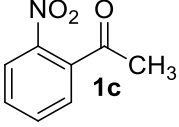
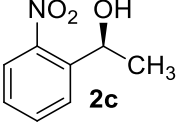
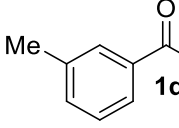
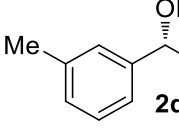
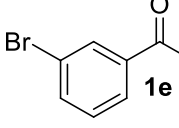
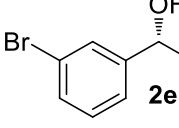
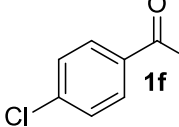
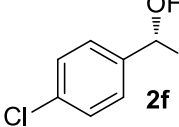
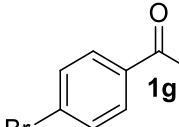
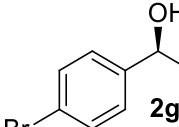
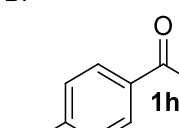
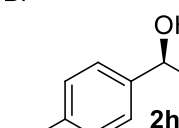
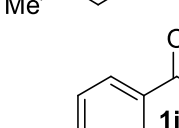
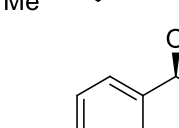
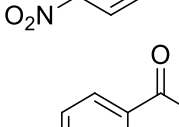
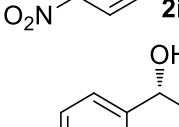
^a Substrat 1mmol.

^b Dönüşümler HPLC ile belirlendi.

^c Enantiyomerik fazlalık kirial kolon OD-H kullanılarak belirlendi.

^d Konfigürasyonlar literatürdeki çevirme açıları ile karşılaştırılarak belirlendi

Tablo 3. *Lactobacillus curvatus* N5 bakteri suşu kullanılarak asetofenon türevlerinin asimetrik indirgenmesi.

Substrat	Ürün	ee (%) ^{c,d}	Dönüşüm (%) ^b	Verim (%) ^e
		92 (<i>R</i>)	>99	87
		80 (<i>R</i>)	69	64
		>99 (<i>S</i>)	98	91
		96 (<i>R</i>)	98	89
		53 (<i>R</i>)	98	88
		64 (<i>R</i>)	91	85
		53 (<i>S</i>)	97	92
		94 (<i>S</i>)	98	90
		>99 (<i>S</i>)	72	67
		92 (<i>R</i>)	38	30

^a İndirgenme koşulları: substrat: 1 mmol, sıcaklık: 28°C, süre: 48s, pH: 7.5, 150 rpm.

^b Dönüşümler HPLC ile belirlendi.

^c Enantiyomerik fazlalıklar kiral kolon OD-H, OD ve AS kullanılarak belirlendi.

^d Konfigürasyonlar literatürdeki çevirme açıları ile karşılaştırılarak belirlendi

^e Saflaştırılan verimler.

3.1. Elde edilen sekonder alkollerin spectral verileri

3.1.1. (R)-1-feniletanol (2a) (Wei ve Du, 2014)

Renksiz sıvı, verim %87, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 7.38-7.33 (m, 4H), 7.31-7.26 (m, 1H), 4.84 (q, J = 6.45 Hz, 1H), 2.62 (bs, 1H), 1.48 (d, J = 6.5 Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 146.0, 128.4, 127.3, 125.5, 70.2, 25.2; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ = +40.6 (c 1.1, CHCl_3), ee %92; alıkonma zamanları: 9.3dk. (*R* enantiyomer), 11.0 dk. (*S* enantiyomer), Chiralcel OD-H, *n*-hekzan /*i*-PrOH, 95:5, akış hızı 1.0 mL/dk., 210 nm.

3.1.2. (R)-1-(2-bromo fenil) etanol (2b) (Zhang vd., 2011, Li vd., 2014)

Renksiz sıvı, verim % 64, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 7.56-7.54 (m, 1H), 7.50-7.48 (m, 1H), 7.33-7.29 (m, 1H), 7.12-7.08 (m, 1H), 5.39 (q, J = 6.4 Hz, 1H), 2.79 (bs, 1H), 1.44 (d, J = 6.4 Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 144.7, 132.6, 128.7, 127.8, 126.7, 121.6, 69.1, 23.6; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ = +45.7 (c 1.0, CHCl_3), ee %80; alıkonma zamanları: 12.6 dk. (*S* enantiyomer), 13.6 dk. (*R* enantiyomer) Chiralcel OD-H, *n*-hekzan /*i*-PrOH, 98:2, akış hızı 1.0 mL/dk., 220 nm.

3.1.3. (S)-1-(2-nitro fenil) etanol (2c) (Vieira vd., 2010)

Renksiz sıvı, verim % 91, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 7.84 (dd, J = 8.2, 1.1 Hz, 1H), 7.79 (dd, J = 7.9, 1.1 Hz, 1H), 7.63-7.59 (m, 1H), 7.40-7.36 (m, 1H), 5.35 (q, J = 6.4 Hz, 1H), 2.85 (bs, 1H), 1.51 (d, J = 6.4 Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 147.7, 141.0, 133.6, 128.0, 127.5, 124.2, 65.4, 24.2; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ = -29.7 (c 0.4, CHCl_3), ee % >99; alıkonma zamanları: 19.1 dk (*R* enantiyomer), 20.3 dk. (*S* enantiyomer), Chiralcel AS, *n*-hekzan /*i*-PrOH, 97:3, akış hızı 0.8 mL/dk., 220 nm.

3.1.4. (R)-1-(3-metil fenil) etanol (2d) (Ren vd., 2015)

Renksiz sıvı, verim % 89, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 7.25-7.09 (m, 4H), 4.84 (q, J = 6.4

Hz, 1H), 3.38 (s, 3H), 2.20 (bs, OH), 1.46 (d, J = 6.5 Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ =145.8, 138.1, 128.4, 128.2, 126.1, 122.4, 70.4, 25.1, 21.5; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ = +58.8 (c 0.9, CHCl_3), ee % 96; alıkonma zamanları: 10.9 dk. (*R* enantiyomer), 13.5 dk. (*S* enantiyomer), Chiralcel OD-H, *n*-hekzan /*i*-PrOH, 97:3, akış hızı 1.0 mL/dk., 210 nm.

3.1.5. (R)-1-(3-bromo fenil) etanol (2e) (Ren vd., 2015)

Renksiz sıvı, verim % 88, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 7.49 (s, 1H), 7.36-7.38 (m, 1H), 7.25-7.16 (m, 2H), 4.79 (m, 1H), 2.67 (bs, 1H), 1.44 (d, J = 6.4 Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ =148.1, 130.4, 130.1, 128.5, 124.0, 122.5, 69.6, 25.2; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ = +56.6 (c 1.0, CHCl_3), ee % 53; alıkonma zamanları: 15.5 dk. (*S* enantiyomer), 17.4 dk. (*R* enantiyomer) Chiralcel OD-H, *n*-hekzan /*i*-PrOH, 98:2, akış hızı 1.0 mL/dk., 210 nm.

3.1.6. (R)-1-(4-kloro fenil) etanol (2f) (Wei ve Du, 2014, Liu vd., 2015)

Renksiz sıvı, verim %85, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 7.29-7.22 (m, 4H), 4.79 (q, J = 6.5 Hz, 1H), 2.77 (bs, 1H), 1.41 (d, J = 6.5 Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 144.2, 132.9, 128.5, 126.8, 69.6, 25.2; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ = +34.4 (c 1.0, CHCl_3), ee % 64; alıkonma zamanları: 13.7 dk. (*S* enantiyomer), 15.4 dk. (*R* enantiyomer), Chiralcel OD-H, *n*-hekzan/*i*-PrOH, 98:2, akış hızı 1 mL/dk., 220 nm.

3.1.7. (S)-1-(4-bromo fenil) etanol (2g) (Singh ve Chopra, 2016)

Renksiz sıvı, verim % 92, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 7.43-7.40 (m, 2H), 7.18-7.15 (m, 2H), 4.75 (q, J = 6.5 Hz, 1H), 2.93 (bs, 1H), 1.39 (d, J = 6.5 Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 144.7, 131.5, 127.2, 121.0, 69.6, 25.2; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ = -25.1 (c 1.0, CHCl_3), ee % 53; alıkonma zamanları: 9.0 dk. (*R* enantiyomer), 9.9 dk. (*S* enantiyomer), Chiralcel OD-H, *n*-hekzan /*i*-PrOH, 95:5, akış hızı 1 mL/dk., 220 nm.

3.1.8. (S)-1-(4-metil fenil) etanol (2h) (Wakeham vd., 2015)

Renksiz sıvı, verim % 90, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 7.27 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.17 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 4.84 (q, J = 6.5 Hz, 1H), 2.42 (bs, 3H), 2.37 (s, 3H), 1.48 (d, J = 6.5 Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 142.9, 137.0, 129.1, 125.4, 70.1, 25.1, 21.1; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ = -56.9 (c 1.0, CHCl_3), ee % 94; alıkonma zamanları: 14.5 dk. (*S* enantiyomer), 21.5 dk. (*R* enantiyomer), Chiralcel OD, *n*-hekzan /*i*-PrOH, 90:10, akış hızı 0.5 mL/dk., 220 nm.

3.1.9. (S)-1-(4-nitro fenil) etanol (2i) (Vieira vd., 2010)

Renksiz sıvı, verim % 67, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 8.10-8.14 (m, 2H), 7.51-7.48 (m, 2H), 5.00-4.94 (m, 1H), 2.75 (d, J = 3.4 Hz, 1H), 1.47 (d, J = 6.5 Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 153.3, 147.0, 126.1, 123.7, 69.4, 25.4; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ = -25.4 (c 0.5, CHCl_3), ee % >99; alıkonma zamanları: 13.2 dk. (*R* enantiyomer), 15.4 dk. (*S* enantiyomer), Chiralcel AS, *n*-hekzan/*i*-PrOH, 95:5, akış hızı 0.8 mL/dk., 220 nm.

3.1.10. (R)-1-(*p*-bifenil) etanol (2j) (Zilbeyaz vd., 2012)

Beyaz katı, EN. 92-94°C, verim % 30, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 7.63-7.60 (m, 4H), 7.49-7.45 (m, 4H), 7.40-7.36 (m, 1H), 4.95 (qd, J = 6.4, 2.9 Hz, 1H), 2.24 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 1.56 (d, J = 6.5 Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 144.9, 140.9, 140.4, 128.8, 127.3, 127.3, 127.1, 125.9, 70.1, 25.2; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ = +45.3 (c 0.55, CH_2Cl_2), ee % 92; alıkonma zamanları: 16.8 dk. (*S* enantiyomer), 18.2 dk. (*R* enantiyomer), Chiralcel OD, *n*-hekzan/*i*-PrOH, 90:10, akış hızı 0.6 mL/dk., 220 nm.

4. Tartışma ve Sonuç

Tablo 1'de görüldüğü gibi suşlar (*R*)-fenil etanol (2a)'yı % 50'den % 66'ya değişen enantiyomerik fazlalıkta ürettiler. Biyo indirgenmenin en iyi sonucu *Lactobacillus curvatus*

N5 suşu kullanıldığında elde edildi. Bu indirgenme reaksiyonunda % 97 gibi yüksek bir dönüşüm ve % 66 gibi ılımlı bir enantiyomerik fazlalık gözlemlendi. Bundan dolayı en iyi biyokatalizör olarak *Lactobacillus curvatus* N5 suşu seçildi ve bundan sonraki reaksiyonlarda bu suş kullanıldı. Başarılı bir şekilde kiral sekonder alkol elde etmek için pH, sıcaklık, inkübasyon süresi ve karıştırma hızı gibi reaksiyon koşullarını optimize etmek çok önemlidir (Pereira, 1998). *Lactobacillus curvatus* N5 suşu kullanılarak pH, sıcaklık, inkübasyon süresi ve karıştırma hızı gibi reaksiyon koşulları optimize edildi (Tablo 2). Optimizasyon için öncelikle pH'nın seçiciliğe etkisi araştırıldı. Reaksiyon 100 ml besiyeri (MRS) içerisinde 25 mg bakteri 2 saat 30°C'de 150 rpm'de karıştırıldı ve daha sonra pH'lar (5.5-7.5) ayarlandı 2 saat daha aynı şartlar altında karıştırıldıktan sonra 1mmol substrat (1a) ortama ilave edildi ve 48 saat aynı şartlarda karıştırılmaya devam edildi. Biyokatalizör ile yapılan indirgenme reaksiyonlarında dönüşüm özellikle seçicilik ortamın pH'sından oldukça etkilenmektedir, çünkü pH değiştiğinde enzimin üç boyutlu yapısı değişmektedir ve bu da seçicilik için çok önemlidir. Tablo 2'de görüldüğü gibi optimum pH 7.5 olarak belirlendi. Bu pH değerinde (2a) % 97 dönüşüm ve % 75 enantiyomerik fazlalık ile elde edildi. Sıcaklığın seçiciliğe etkisini belirlemek için pH değerinin 7.5 olduğu şartlarda 26-32°C gibi farklı sıcaklıklarda reaksiyonlar yapıldı. İndirgenme reaksiyonu için en iyi sıcaklık 28°C olarak belirlendi. Tablo 2'de görüldüğü gibi sıcaklık 30°C'nin üzerine çıktığında enantiyomerik aşırılıkta keskin bir düşüş olmuştur. Bu da sıcaklıktaki artışın enantiyomerik fazlalık için negatif bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bundan dolayı sonraki reaksiyonlar 28°C sıcaklıkta yapıldı. Sıcaklığın 28°C ve pH'nın 7.5 olduğu reaksiyon şartları altında değişik inkübasyon sürelerinde reaksiyonlar gerçekleştirilerek inkübasyon süresinin seçiciliğe etkisi belirlendi. Tablo 2'de görüldüğü gibi inkübasyon süresi 24 saat olduğunda dönüşüm ve enantiyomerik fazlalığın düşük, 72 saat olduğunda ise dönüşümün yüksek enantiyomerik fazlalığın

düşük olduğu görülmektedir. Dönüşüm ve enantiyomerik fazlalığın en yüksek olduğu inkübasyon süresi 48 saat olduğundan dolayı reaksiyon için en iyi inkübasyon süresi olarak bu süre belirlenmiştir. Bir diğer önemli parametre karıştırma hızıdır, çünkü karıştırma hızı enzimin yapısını değiştirmektedir. Optimize şartlar için karıştırma hızlarına bakıldığında karıştırma hızının 150 rpm olduğunda en iyi dönüşüm ve enantiyomerik fazlalık elde edildi. Karıştırma hızı arttığında dönüşüm ve enantiyoseçicilik düşmektedir. Bu düşüş yüksek karıştırma hızının hücrenin yapısını değiştirmesi sonucu biyokatalizörün aktivitesini düşürmesi ile ilişkilendirilebilir. Bu durumlar dikkate alınarak optimum karıştırma hızı olarak 150 rpm belirlendi. Sonuç olarak optimizasyon şartları pH 7.5, sıcaklık 28°C, inkübasyon süresi 48 saat ve karıştırma hızı 150 rpm olarak başarılı bir şekilde belirlendikten sonra optimum şartlar altında asetofenon türevlerinin asimetric indirgenmeleri değerlendirildi. *o*-bromo asetofenon (**1b**)'nin asimetric indirgenmesinde % 80 gibi yüksek bir enantiyomerik fazlalık ve % 96'lık bir dönüşüm gözlenirken, *m*-bromo asetofenon (**1e**) ve *p*-bromo asetofenon (**1g**)'de düşük enantiyomerik fazlalık ve yüksek dönüşüm gözlenmiştir. Bu da brom atomunun sterik ve elektronik etkisinin seçicilik ve dönüşümde önemli olduğunu göstermektedir. *o*-nitro (**1c**) mükemmel bir enantiyomerik fazlalık ve dönüşüm ile (**2c**)'ye indirgenmiştir. Aynı şekilde *p*-nitro (**1i**) mükemmel bir enantiyomerik fazlalık ve yüksek bir dönüşüm ile (**2i**)'ye indirgenmiştir. Klor atomunun *p*-pozisyonunda olduğu asetofenon türevi (**1f**)'de ise ortalama bir enantiyomerik fazlalık ve yüksek bir dönüşüm ile (**2f**)'ye indirgenmiştir. Elektron veren metil grubunun *m*- ve *p*- pozisyonunda olduğu asetofenon türevleri (**1d**) ve (**1h**) yüksek dönüşüm ve enantiyomerik fazlalık ile (**2d**) ve (**2h**)'ye indirgenmiştir. Bir diğer elektron sağlayan grup olan fenil grubunun *p*-pozisyonunda olduğu asetofenon türevi (**1j**) yüksek enantiyomerik fazlalık ve düşük bir dönüşüm ile (**2j**)'ye indirgenmiştir. Oluşan sekonder alkollerin konfigürasyonları benzen

halkasına bağlı grubun pozisyonuna göre değişmektedir.

Sonuç olarak asetofenon (**1a**) ve türevleri (**1b-j**) biyokatalizör *Lactobacillus curvatus* N5 kullanılarak ilgili kiral alkollere (**2a-j**) % 99'a varan bir enantiyomerik fazlalık ile indirgenmiştir. Kullanılan bu biyokatalizör benzen halkasındaki substituentin bulunduğu konuma göre yüksek enantiyomerik fazlalık göstermiştir. Bu çalışmada kullanılan biyokatalizörün dönüşüm ve seçiciliğinin benzen halkasına bağlı grupların pozisyonu ve elektronik etkisi tarafından kontrol edildiği görülmektedir. Bu da bu biyokatalizörün enantiyosaf kiral sekonder alkollerin sentezinde kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca bu ucuz ve çevreci biyokatalizör *Lactobacillus curvatus* N5 prokiral ketonların asimetric olarak kiral karbinol bileşiklerine indirgenme reaksiyonlarında kullanılan klasik toksik kimyasal katalizörlere alternatif bir biyokatalizör olarak kullanılabileceği gösterilmiştir.

Teşekkür

Bu çalışmada kullanılan suşların sağlanmasındaki katkılarından dolayı Dr. Enes Dertli (Bayburt Üniversitesi)'ye teşekkür ederiz.

5. Kaynaklar

- Yang, V., Xu, J. H., Xie, Y., Xu, Y., Zhao, G., ve Lin, G. Q., 2006. Asymmetric reduction of ketones by employing *Rhodotorula* sp. AS2. 2241 and synthesis of b-blocker (R)-nifenalol. Tetrahedron: Asymmetry, 17, 1769-1774.
- Dertli, E., Mercan, E., Arıcı, M., Yılmaz, M. T., ve 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.
- Faber, K., 1997. Biotransformations in Organic Chemistry, Springer Press, Berlin, Germany, 405p.

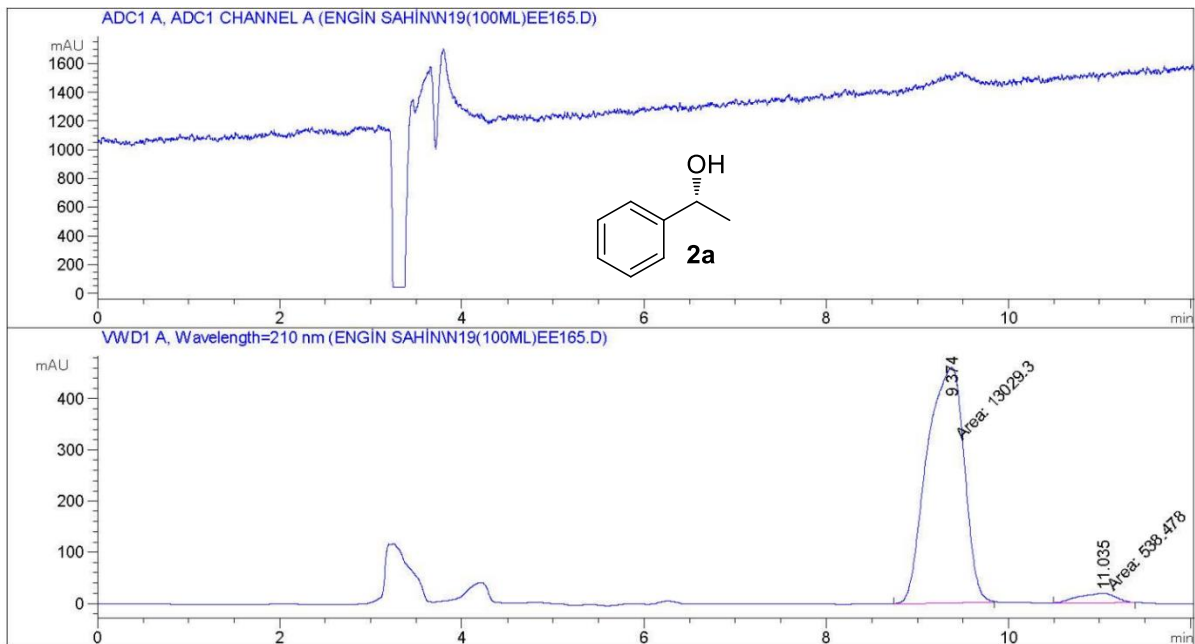
- Faber, K., 2000. Biocatalytic Application. In biotransformations in Organic Chemistry, Springer Press, Berlin, Germany, 437p.
- Hage, A., Petra, D.G.I., Field, J.A., Schipper, D., Wijnberg, J.B.P.A., Kamer, P.C.J., Reek, J.N.H., Van Leeuwen, P.W.N.M., Waver, R. ve Schoemaker, H.E, 2001. Asymmetric reduction of ketones via whole cell bioconversions and transfer hydrogenation: complementary approaches, Tetrahedron: Asymmetry, 12,7, 1025-1034.
- Kataoka, M., Kita, K., Wada, M., Yasohara, Y., Hasegawa, J. ve Shimuzu, S., 2003. Novel bioreduction system for the production of chiral alcohols, Appl. Microbial. Biotechnol., 62,5-6, 437-445.
- Li, Y., Yu, S., Wu, X., Xiao, J., Shen, W., Dong, Z. ve Gao, J., 2014. Iron Catalyzed Asymmetric Hydrogenation of Ketones, J. Am. Chem. Soc., 136,10, 4031-4039.
- Liu, W. P., Yuan, M. L., Yang, X. H., Li, K., Xie, J. H. ve Zhou, Q. L., 2015. Efficient asymmetric transfer hydrogenation of ketones in ethanol with chiral iridium complexes of spiroPAP ligands as catalysts, Chem. Commun., 51,28, 6123-6125.
- Mandal, D., Ahmad, A., Khan, M. I. ve Kumar, R., 2004. Enantioselective bioreduction of acetophenone and its analogous by the fungus *Trichothecium* sp., J. Mol. Catal. B: Enzym., 27,2-3, 61-63.
- Murzin, D. Y., Mäki-Arvela, P., Toukoniitty, E. ve Salmi, T., 2005. Asymmetric heterogeneous catalysis: Science and engineering, Catal Rev., 47,2, 175-256.
- Pereira, R. D. S., 1998. The use of baker's yeast in the generation of asymmetric centers to produce chiral drugs and other compounds, Crit. Rev. Biotechnol., 18,1, 25-64.
- Ren, X., Li, G., Wei, S. ve Du, H., 2015. Facile Development of Chiral Alkenylboranes from Chiral Dienes for Asymmetric Hydrogenation of Silyl Enol Ethers, Org. Lett., 17,4, 990-993.
- Singh, A. ve Chopra, H. K., 2016. New benzimidazolium-based chiral ionic liquids: synthesis and application in enantioselective sodium borohydride reductions in water, Tetrahedron: Asymmetry, 27,11, 448-453.
- Vieira, G. A. B., Araujo, D. M. F., Lemos, T. L. G., Mattos, M. C., Oliveira, M. C. F., Melo, V.M. M., Gonzalu, G., Gotor-Fernández, V. ve Gotor, V., 2010. *Candida tropicalis* CE017: A new Brazilian Enzymatic Source for the Bioreduction of Aromatic Prochiral Ketones, J. Braz. Chem. Soc., 21,8, 1509-1516.
- Wakeham, R. J., Morris, J. A. ve Williams, J. M. J., 2015. Alternative Hydrogen Source for Asymmetric Transfer Hydrogenation in the Reduction of Ketones, ChemCatChem., 7, 4039-4041.
- Wei, S. ve Du, H., 2014. A Highly Enantioselective Hydrogenation of Silyl Enol Ethers Catalyzed by Chiral Frustrated Lewis Pairs, J. Am. Chem. Soc., 136,35, 12261-12264.
- Wong, C. , Drueckhammer, D. G. ve Sweers, H. M., 1985. Enzymatic vs. fermentative synthesis: thermostable glucose dehydrogenase catalyzed regeneration of NAD(P)H for use in enzymatic synthesis, J. Am. Chem. Soc., 107,13, 4028-4031.
- Zhang, Z., Jain, P. ve Antilla, J. C., 2011. Asymmetric Reduction of Ketones by Phosphoric Acid Derived Catalysts, Angew. Chem. Int. Ed., 50,46, 10961-10964.

Zilbeyaz, K., Kilic, H., Sisecioğlu, M., Özdemir, H. ve Güngör, A. A., 2012. Preparation of enantiomerically pure *p*-substituted phenylethyl hydroperoxides by kinetic resolution and their use as enantioselective oxidants in the asymmetric Weitz–Scheffer epoxidation

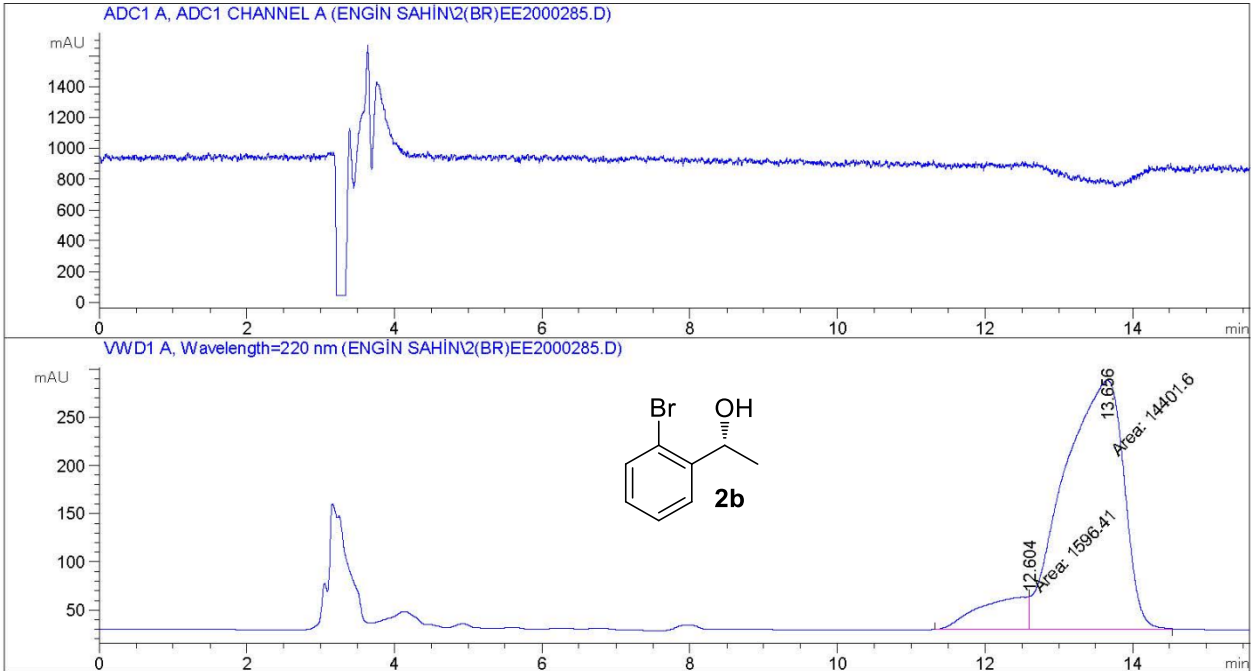
of *E*-chalcone, Tetrahedron: Asymmetry, 23,8, 594-601.

Zilbeyaz, K., Kurbanoglu, E. B., ve Kilic., H., 2016. Preparation of Enantiomerically Pure (S)- (-) - 1-(1'-naphthyl)-ethanol by the fungus *Alternaria alternata*, Chirality, 28, 669-673.

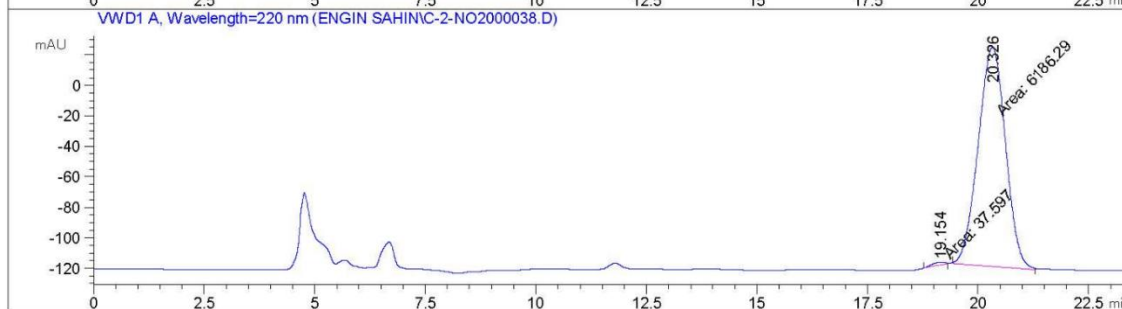
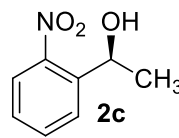
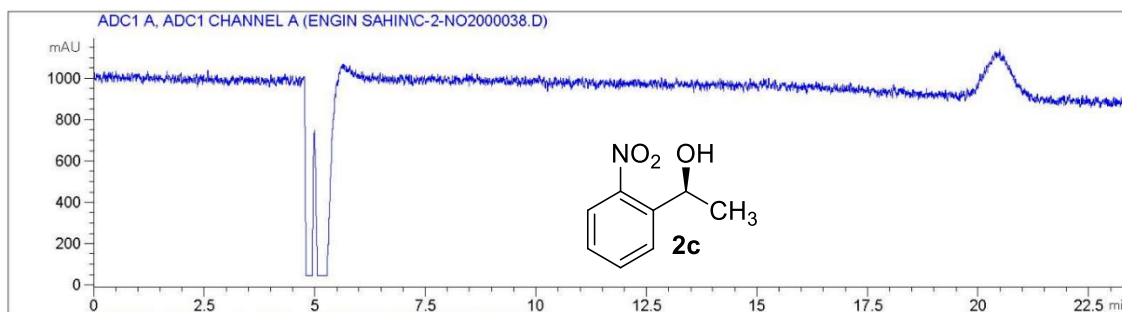
Ek ¹H, ¹³C NMR ve HPLC spektrumları



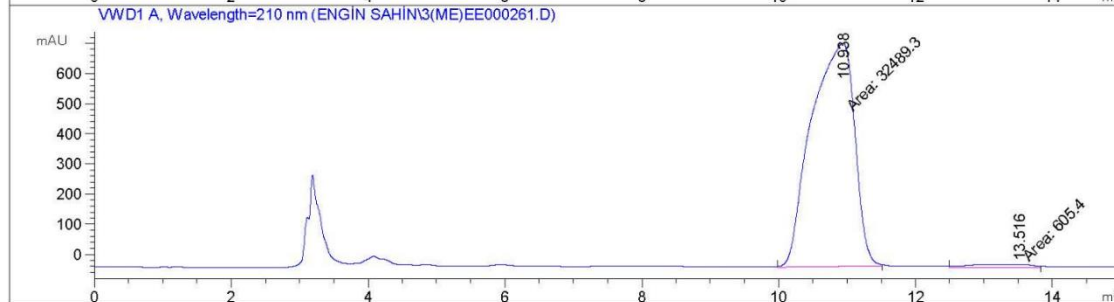
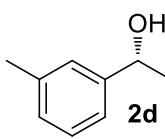
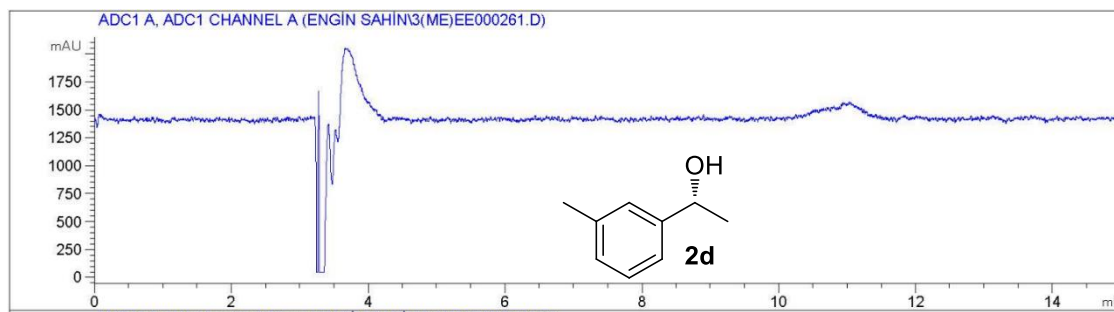
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	9.374	MM	0.4723	1.30293e4	459.75446	96.0312
2	11.035	MM	0.4876	538.47803	18.40613	3.9688



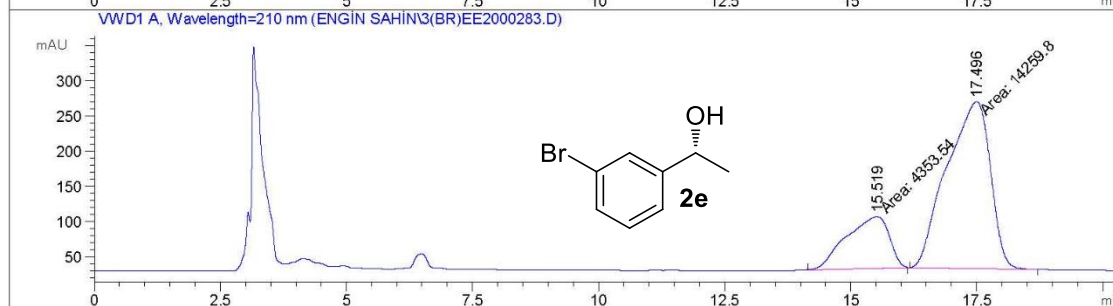
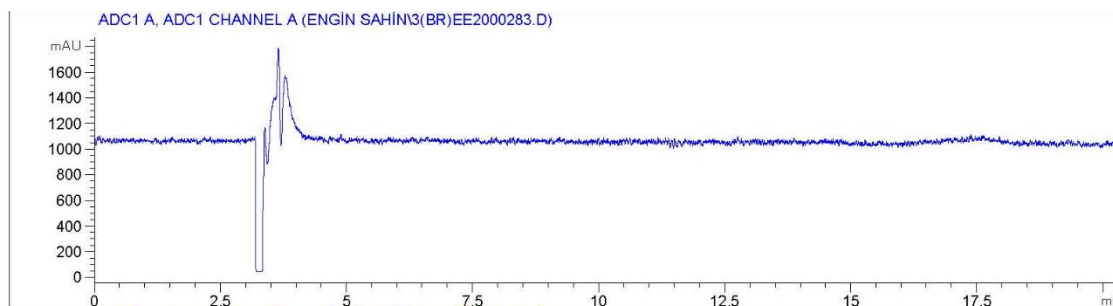
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	12.604	MF	0.7802	1596.40735	34.10357	9.9788
2	13.636	FM	0.9298	1.44016e4	258.13986	90.0212



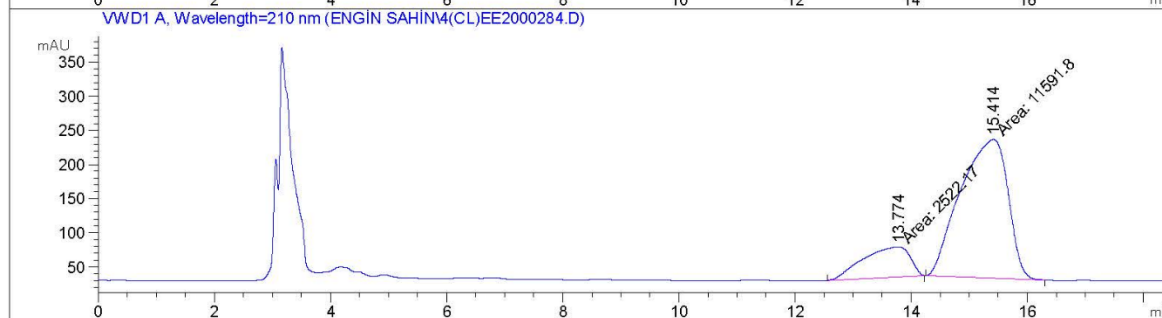
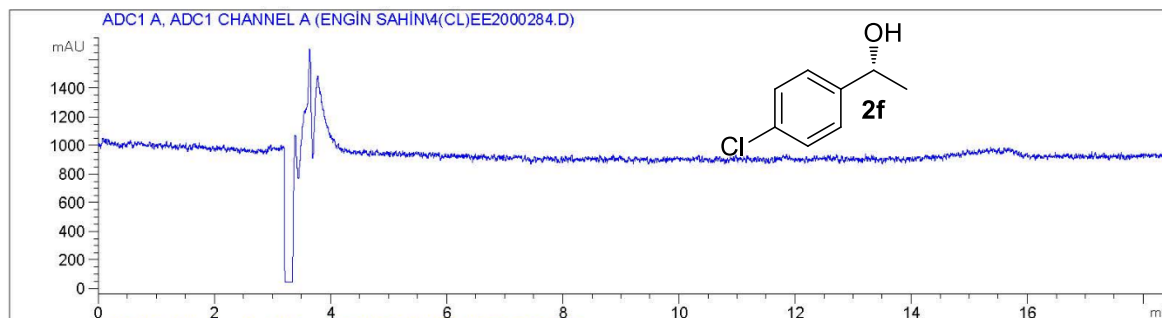
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	19.154	MM	0.3945	37.59699	1.58831	0.6041
2	20.326	MM	0.7170	6186.28760	143.80521	99.3959



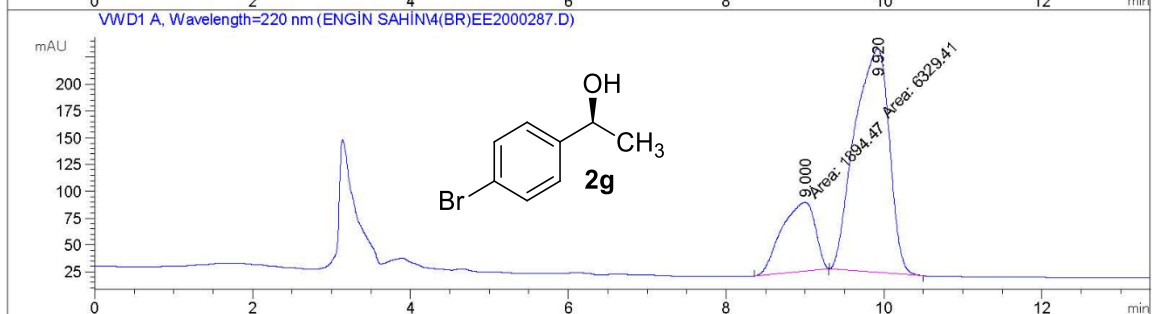
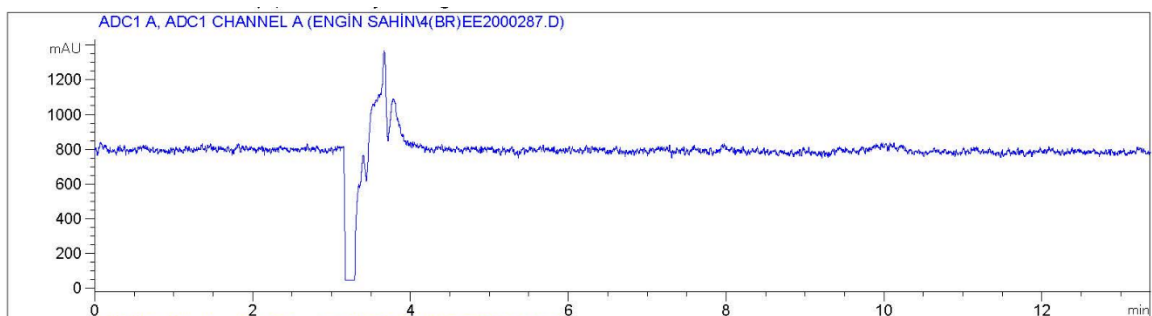
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	10.938	MM	0.7314	3.24893e4	740.29999	98.1707
2	13.516	MM	1.0474	605.40009	9.63305	1.8293



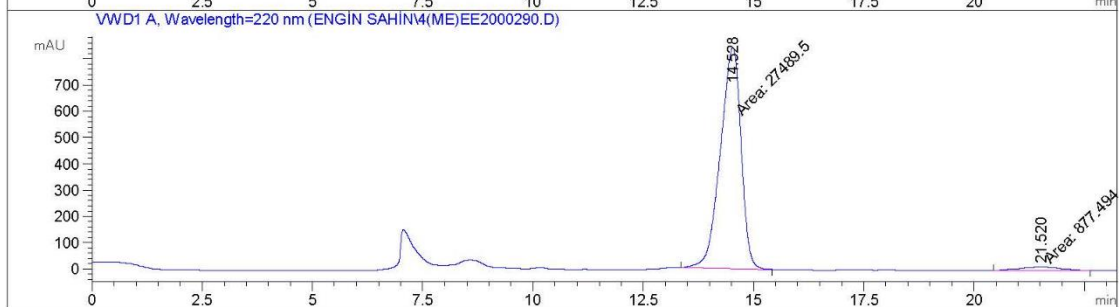
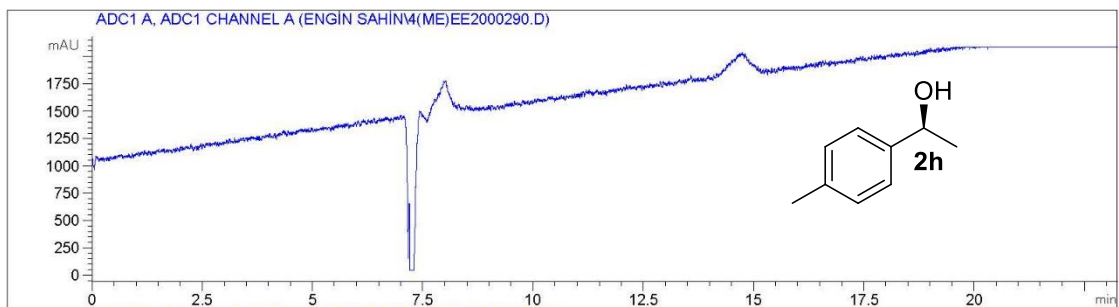
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	15.519	MM	0.9882	4353.53564	73.42900	23.3893
2	17.496	MM	1.0007	1.42598e4	237.50142	76.6107



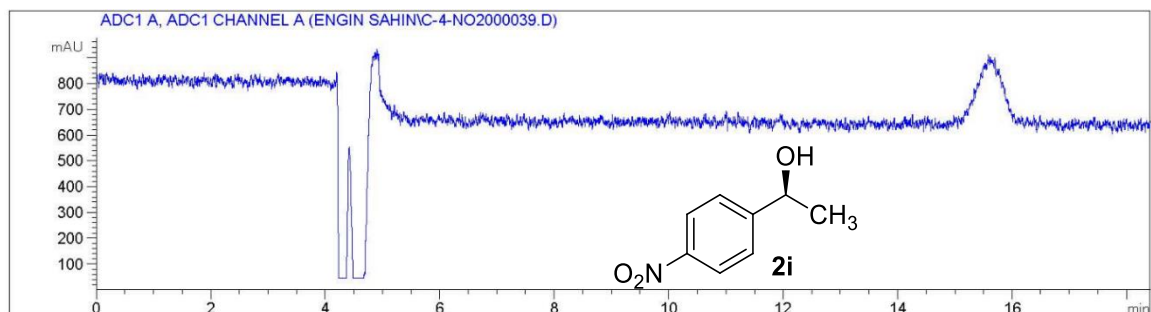
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	13.774	MM	0.9470	2522.17065	44.38805	17.8700
2	15.414	MM	0.9486	1.15918e4	203.65471	82.1300



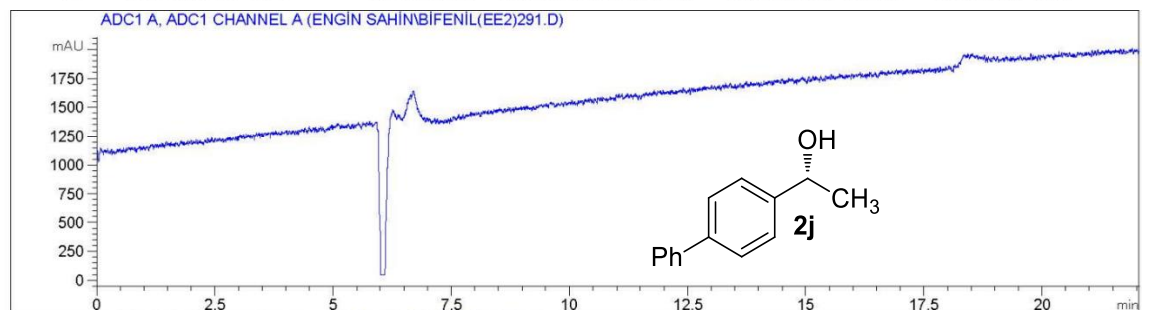
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	9.000	MM	0.4913	1894.47168	64.26962	23.0362
2	9.920	MM	0.5058	6329.41211	208.54593	76.9638



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	14.528	MM	0.5438	2.74895e4	842.44312	96.9066
2	21.520	MM	1.0633	877.49359	13.75456	3.0934



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Height [mAU]	Area %
1	13.308	MM	0.3099	7.38268	3.97033e-1	0.1292
2	15.492	MM	0.5527	5705.88086	172.07132	99.8708



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Height [mAU]	Area %
1	16.885	MF	0.5561	254.26286	7.62007	3.8479
2	18.255	FM	0.5508	6353.52881	192.24095	96.1521

