



## The effects of ultrasonication and reaction parameters on the biocatalytic deracemization of racemic propranolol

Rahime Songür, Ülkü Mehmetoğlu\*

Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Ankara University, Ankara, 06100, Turkey

### Highlights:

- Biocatalytic deracemization
- The production of enantiomerically pure propranolol
- Using *Rhizopus oryzae* as enzyme source

### Keywords:

- Biocatalytic deracemization
- propranolol
- $\beta$ -blocker
- enantioselectivity
- *Rhizopus oryzae*

### Article Info:

Received: 20.11.2016

Accepted: 10.08.2017

### DOI:

10.17341/gazimmfd.416366

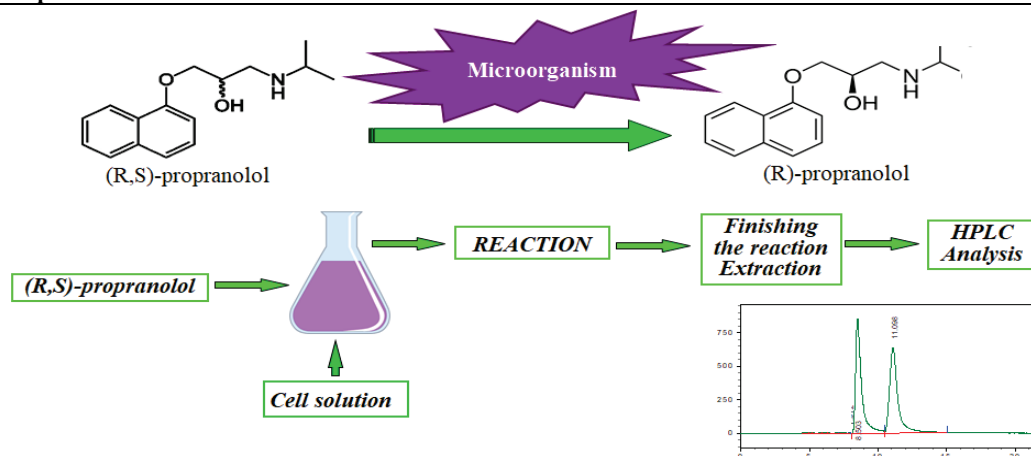
### Acknowledgement:

Ankara University Scientific Research Projects  
(Project no: 14L0443004)

### Correspondence:

Author: Ülkü Mehmetoğlu  
e-mail:  
mehmet@eng.ankara.edu.tr  
phone: +90 312 203 3435

### Graphical/Tabular Abstract



### Purpose:

Pharmaceutically important  $\beta$ -blockers, which are especially used for treatment of cardiovascular disease, are chiral. The enantiomers of  $\beta$ -blocker have different pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. For this reason, it is important that enantiomers of  $\beta$ -blocker should use separately. In this study, the production of enantiomerically pure propranolol, which has commonly use as  $\beta$ -blockers, was aimed.

### Theory and Methods:

The production of enantiomerically pure propranolol via biocatalytic deracemization using *Rhizopus oryzae* CBS 111718 was investigated. The effect of different parameters to the reaction (cell disruption methods, substrate concentration, pH of reaction medium, reaction time, etc.) using *R. oryzae* was investigated to determine optimum conditions. The samples were analyzed with HPLC.

### Results:

The highest enantiomeric excess (ee%) and conversion (C%) values were obtained as ee%=28.4 and C%=60.2 at pH 7 phosphate buffer, 3 mM substrate concentration, 10 min duration of ultrasonication, 6 days reaction time.

### Conclusion:

The production of enantiomerically pure propranolol via biocatalytic deracemization using a microorganism is an environmentally friendly method. R-propranolol was obtained in all experiments.



## Rasemik propranololün biyokatalitik derasemizasyonuna ses ötesi dalga ve tepkime parametrelerinin etkisi

Rahime Songür<sup>ID</sup>, Ülkü Mehmetoğlu\*<sup>ID</sup>

Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Tandoğan, Ankara, 06100, Türkiye

### Ö N E Ç İ K A N L A R

- Biyokatalitik derasemizasyon
- Propranololün enantiyomerik saflıkta üretimi
- Enzim kaynağı olarak *Rhizopus oryzae* kullanımı

#### Makale Bilgileri

Geliş: 20.11.2016

Kabul: 10.08.2017

#### DOI:

10.17341/gazimmfd.416366

#### Anahtar Kelimeler:

Biyokatalitik derasemizasyon, propranolol,  $\beta$ -bloker, enantiyoseçimlilik, *Rhizopus oryzae*

#### ÖZET

Farmasötik açıdan önem taşıyan, özellikle kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan  $\beta$ -blokerlar kiral maddelerdir.  $\beta$ -blokerların enantiyomerleri çoğunlukla farklı farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklere sahiptir. Bu nedenle  $\beta$ -bloker enantiyomerlerinin ayrı ayrı kullanılması önem kazanmıştır. Bu çalışmada; yaygın olarak kullanılan  $\beta$ -blokerlardan biri olan propranololün enantiyomerik saflıkta üretimi amaçlanmaktadır. Bu amaç doğrultusunda, *Rhizopus oryzae* CBS 111718 mikroorganizması kullanılarak biyokatalitik derasemizasyon ile enantiyomerik saflıkta propranolol üretimi incelenmiştir. *R. oryzae* mikroorganizması ile farklı tepkime parametrelerinin (hücre parçalama yöntemi, substrat derişimi, tepkime ortamının pH'ı, süre gibi) tepkimeye etkisi incelenerek en uygun çalışma koşullarının belirlenmesi hedeflenmiştir. Tüm bu denemeler sonucunda en yüksek enantiyomerik aşırılık (%ee) ve dönüşüm (%C) değerleri; pH 7 olan tampon ortamında, 3 mM substrat derişiminde, 10 dakika ses ötesi dalga (SÖD) uygulandığı koşulda, 6 gün sonunda %ee=28,4; %C=60,2 olarak bulunmuştur.

## The effects of ultrasonication and reaction parameters on the biocatalytic deracemization of racemic propranolol

### H I G H L I G H T S

- Biocatalytic deracemization
- The production of enantiomerically pure propranolol
- Using *Rhizopus oryzae* as enzyme source

#### Article Info

Received: 20.11.2016

Accepted: 10.08.2017

#### DOI:

10.17341/gazimmfd.416366

#### Keywords:

Biocatalytic deracemization, propranolol,  $\beta$ -bloker, enantioselectivity, *Rhizopus oryzae*

#### ABSTRACT

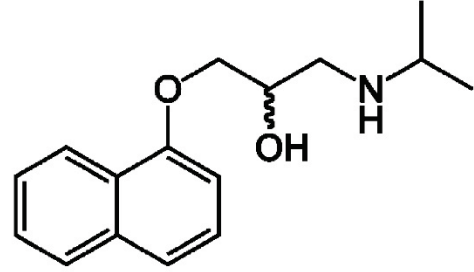
Pharmaceutically important  $\beta$ -blockers, which are especially used for treatment of cardiovascular disease, are chiral. The enantiomers of  $\beta$ -blocker have different pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. For this reason, it is important that enantiomers of  $\beta$ -blocker should use separately. In this study, the production of enantiomerically pure propranolol, which has commonly use as  $\beta$ -blockers, was aimed. In accordance with this purpose, the production of enantiomerically pure propranolol via biocatalytic deracemization using *Rhizopus oryzae* CBS 111718 was investigated. The effect of different parameters to the reaction (cell disruption methods, substrate concentration, pH of reaction medium, reaction time, etc.) using *R. oryzae* was investigated to determine optimum conditions. At the end of all this experiments, the highest enantiomeric excess (ee%) and conversion (C%) values were obtained as ee%=28.4 and C%=60.2 at pH 7 phosphate buffer, 3 mM substrate concentration, 10 min duration of ultrasonication, 6 days reaction time.

## 1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

İlaç endüstrisi için önemli kiral bileşikler kimyasal yöntemlerle sentezlendiğinde genellikle rasemik karışım şeklindedir. Genel olarak kiral bileşiklerin sadece bir enantiyomeri istenen biyolojik aktiviteye sahiptir. Diğer enantiyomer ise bir biyolojik aktivite göstermez ve safsızlık olarak nitelendirilir, yan ve toksik etki gösterebilir ya da diğer enantiyomerin etkisini azaltacak yönde çalışabilir. Bu yüzden tek enantiyomer formunda kiral ürünlerin üretimi önem kazanmaktadır. İlaç tedavisinde tek enantiyomerin kullanılması gerekliliği, otoriteleri ilaçlar üzerindeki düzenlemeleri sıkılaştırmaya yöneltmiştir. Bu durum ilaç teknolojisinde yeni gelişmeler sağlamış olup tek-enantiyomer elde etmek amacıyla pek çok çalışma başlatılmıştır [1]. Böylece son 20 yılda onaylı yeni rasemik ilaçların miktarı önemli ölçüde azalmıştır. 1992-2011 yılları arasında Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) onaylı yeni rasemik ilaçların miktarı %21'den %5'e düşmüştür. Örneğin, 2011 yılında dünya çapında hiç yeni rasemik ilaç onayı yapılmamış, onaylanan ilaçların neredeyse %70'i enantiyomerik saflıktaki bileşiklerden, geri kalanı da akiral bileşiklerden oluşmuştur. Fakat, enantiyomerik saflıktaki ilaçlara olan istek her ne kadar artsa da hala birçok ilaç rasemat olarak satılmaktadır [2].

Toplumda kardiyovasküler hastalıklara çok sık rastlanılır ve bu hastalıkların tedavisinde kullanılan birçok ilaç kiraldir [3].  $\beta$ -blokerlar da kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan çok önemli bir ilaç grubudur [4]. Hipertansiyon, iskemik kalp hastalıkları, kalp ritim bozuklukları [3], kalp yetmezliği, akut koroner sendrom hastalıklarının tedavisinde [5] ve ayrıca migren ağrıları, glokom [6], böbreküstü bezi vasküler tümörü, tiroid bezinin aşırı faaliyetinden doğan durumlar [5] ile sempatik sinir sistemi ile ilgili diğer hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır [4].  $\beta$ -blokerların enantiyomerleri çoğunlukla farklı farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklere sahiptir. Bu nedenle  $\beta$ -bloker enantiyomerleri ayrı ayrı kullanılmalıdır. Çünkü daha az aktif olan enantiyomer (distomer)  $\beta$ -bloker etkisi vermemekte, tüm ilaç seçimliliğini azaltmakta ya da yan etki oluşturabilmektedir. Genellikle, daha aktif olan enantiyomer (eutomer) distomerden 10-500 kat daha aktiftir [1]. Yapılan bir SWORD çalışması ile sotalolün distomerinin miyokardiyal damar tıkanıklığı olan hastaların ölüm oranını artırdığı saptanmıştır. Diğer  $\beta$ -blokerların daha az aktif olan enantiyomerlerinin genel olarak bu kadar ciddi yan etkileri saptanmasa da istenen tedavi edici etkileri olmayan bu enantiyomerlerin yan etki oluşturabilecek gereksiz bir izomerik yüklemeye olduğu düşünülmektedir [4].  $\beta$ -blokerların sadece küçük bir bölümü tek enantiyomer halinde satılmaktadır [1].  $\beta$ -adrenajik bloker aktivitesine sahip bileşiklerden en önemlileri propranolol, atenolol, metoprolol ve alprenololdür [7]. Propranolol (Şekil 1) hipertansiyon, migren ağrısı, prekardiyal rahatsızlığa bağlı göğüs ağrısı, kalp ritim bozuklukları, yüksek tansiyona sebep olan bir böbreküstü bezi vasküler tümörü tedavisi için kliniklerde

kullanılmaktadır [8, 9]. Bir sekonder amino-alkol olan propranolol (1-izopropil amino-3-(1-naftoksi)-2-propanolol) ticari olarak rasemik karışım halinde satılmaktadır. Fakat rasemik halde astım hastalarında bronşların daralması ve hipertansiyon hastalarında diyabete neden olan yan etkilere sahiptir. Bu etkiler R-enantiyomerinden kaynaklanmaktadır [10]. Fakat, R-propranolol de tiroksinin ( $T_4$ ) triiyodotriyonine ( $T_3$ ) dönüşümünü inhibe ederek kandaki  $T_3$  derişiminin azalmasını sağladığından hipertiroid tedavisinde [11] ve ayrıca doğum kontrol haplarında [12] kullanılmaktadır. Bu nedenle enantiyomerik saflıkta R ve S-propranololün elde edilmesi için farklı yöntemler denenmektedir.



Şekil 1. Propranolol (Propranolol)

Enantiyomerik saflıkta bileşenlerin elde edilmesinde en ilgi çekici yöntemlerden biri oksidoredüktif stereoinversiyon ile derasemizasyon yöntemidir. Stereoseçimli oksidoredüktazları içeren mikrobiyal oksidoredüktif sistemlerin; farmasötik, tarım kimyasalları ve değerli kimyasallar için önemli olan optikçe aktif alkollerin eldesinde ve ticari olarak ilgi çekici tepkimelerin katalizlenmesinde kullanımı gittikçe artmaktadır. Fakat, optikçe saf alkoller istenen konfigürasyonda üretmek için derasemizasyon tepkimesini etkili bir şekilde katalizleyecek enzimatik sistemi bulmak hala zordur [13]. Bu çalışmada incelenen rasemik propranololün biyotransformasyonu konusunda da literatürde sadece tek bir çalışma bulunmaktadır ve kapsamı oldukça sınırlıdır [14]. Bu çalışmada, farmasötik açıdan önem taşıyan, özellikle kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan  $\beta$ -blokerlardan biri olan propranololün biyokatalitik derasemizasyon yöntemiyle enantiyomerik saflıkta üretimi amaçlanmaktadır. Bu amaç doğrultusunda, *R. oryzae* mikroorganizması kullanılarak gerçekleştirilen derasemizasyon tepkimesi için en uygun tepkime parametrelerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır.

## 2. DENEYSEL METOT (EXPERIMENTAL METHOD)

### 2.1. *Rhizopus oryzae* (CBS 111718) Mikroorganizmasının Üreme Koşulları (Growth Conditions of *Rhizopus oryzae*)

*Rhizopus oryzae* (CBS 111718) küfü ilk olarak bileşimi 20 g/L glikoz, 20 g/L malt özütü, 20 g/L agar ve 1 g/L peptondan oluşan, pH'ı 6,6 olan katı üreme ortamına ekim

yapılarak 30°C'da, 4-7 gün süresince çoğaltılmıştır. Katı üreme ortamında çoğaltılan sporlar steril ortamda, bir miktar steril suya aktarılarak spor çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiden örnek alınıp mikroskopta Thoma lamı kullanılarak spor sayımı yapılmıştır. Böylece başlangıç spor sayısı  $5 \times 10^5$  olacak şekilde sıvı üreme ortamına ekim yapılmıştır. 20 g/L glikoz, 5 g/L maya özütü, 5 g/L sodyum klorür ve 10 g/L triptondan oluşan ve pH'ı 5 olan sıvı üreme ortamında mikroorganizma üretimi 30°C'da, 150 rpm karıştırma hızındaki orbital çalkalayıcıda, 2 günde gerçekleştirilmiştir.

## 2.2. Hücrelere Parçalama Yöntemlerinin Uygulanması (Application of Cell Disruption Methods)

Mikroorganizmalar tepkimeye kullanılmadan önce, parçalayarak kütle aktarım kısıtlamalarını azaltmak ve hücre içi olduğu bilinen ADH ve NADH oksidaz enzimlerinin serbest kalması için hücrelere ses ötesi dalga (SÖD) ve mekanik parçalama yöntemleri uygulanmıştır.

### 2.2.1. Ses ötesi dalga (SÖD) uygulama yöntemi (Application of ultrasonication)

Üreyen hücreler 6000 rpm ve 4°C'da 15 dakika santrifüjlendikten sonra tampon ortamı ile %10-11 (w/v) oranında hücre çözeltisi hazırlanmıştır. 40 W güçteki 20 kHz SÖD, 1s uygulama+1s ara olacak şekilde 5-25 dakika hücrelere uygulanmıştır (Bandelin Sonopuls HD3400 Ultrasonic homogenizer, 400 W; 1,9 cm çaplı prop). SÖD uygulanırken mikroorganizmanın bulunduğu beher, uygulama sırasında artan sıcaklığın enzim aktivitesini düşürmemesi için buz banyosuna oturtulmuştur.

### 2.2.2. Mekanik parçalama uygulama yöntemi (Application of mechanical homogenization)

Üreyen hücreler 6000 rpm ve 4°C'da 20 dakika santrifüjlendikten sonra tampon ortamı ile %10-11 (w/v) oranında çözeltisi hazırlanmıştır. 50 Hz, 850 W güçteki mekanik homojenizer ile 45 s uygulama yapılarak hücreler parçalanmıştır (Micra D-9, 850W, 11000 min<sup>-1</sup>, 50 Hz). Mekanik parçalama uygulanırken de mikroorganizmanın bulunduğu beher, uygulama sırasında artan sıcaklığın enzim aktivitesini düşürmemesi için buz banyosuna oturtulmuştur.

## 2.3. Biotransformasyon Tepkimesinin Gerçekleştirilmesi (The Procedure of Biotransformation Reaction)

Biyokatalitik derasemizasyon tepkimesinde substrat olarak kullanılan rasemik propranolol Sigma'dan temin edilmiştir. Enzim kaynağı olarak kullanılacak olan *R. oryzae*'nin üreyen hücreleri süzülerek ya da 6000 rpm ve 4°C'da 15 dakika santrifüjlendikten sonra istenen derişimi sağlayacak şekilde tartılıp SÖD/mechanik parçalama uygulanarak ya da hiç bir uygulama yapılmadan 10 mL tepkime ortamına koyulmuştur. Tampon olarak fosfat tamponu (pH 6-8) kullanılmıştır. İstenen derişimde rasemik propranolol tepkime kabına eklenerek tepkimeler başlatılmış ve 30°C, 180 rpm'de gerçekleştirilmiştir. Tepkimeler ortamda O<sub>2</sub>

miktarının fazla olması için 250 mL'lik ağzı pamuklu erlenlerde gerçekleştirilmiştir. Tepkime süresi sonunda tepkime ortamı kloroformla 2 kez ekstrakte edilmiş, çözücüsü uzaklaştırılmış ve etanolde çözülerek HPLC analizine hazırlanmıştır. Tüm deneyler iki tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçların aritmetik ortalamaları alınarak kullanılmıştır.

### 2.4. HPLC Analizi (HPLC Analysis)

Tepkime sonunda analizler HPLC'de (Thermo Finnigan Spectra System) Chiralcel OD (4,6 x 250 mm, 10 µm) kolonu kullanılarak yapılmıştır. Çözücü ve örnekler 0,2 µm membran filtrelerden süzülüş, hareketli faz olarak hekzan ve etanol kullanılmış; 0,8 mL/min akış hızı, UV dedektör 280 nm dalga boyu, 20 µL enjeksiyon hacmi koşullarında analizler gerçekleştirilmiştir.

Analiz sonuçlarına göre %ee ve %C hesabı yapılmıştır. %ee propranololün enantiyomerik aşırılığını ifade etmekte ve Eş. 1'den hesaplanmakta, %C ise (S)-propranololün dönüşümünü ifade etmekte ve Eş. 2'den hesaplanmaktadır.

$$\%ee = \frac{C_R - C_S}{C_R + C_S} \times 100 \quad (1)$$

Burada; C<sub>R</sub> ve C<sub>S</sub> sırasıyla (R)-propranolol ve (S)-propranololün derişimini ifade etmektedir.

$$\%C = \frac{C_{So} - C_S}{C_{So}} \times 100 \quad (2)$$

Burada; C<sub>So</sub> ve C<sub>S</sub> sırasıyla (S)-propranololün başlangıç derişimini ve tepkime sonrasında ortamda kalan (S)-propranololün derişimini ifade etmektedir.

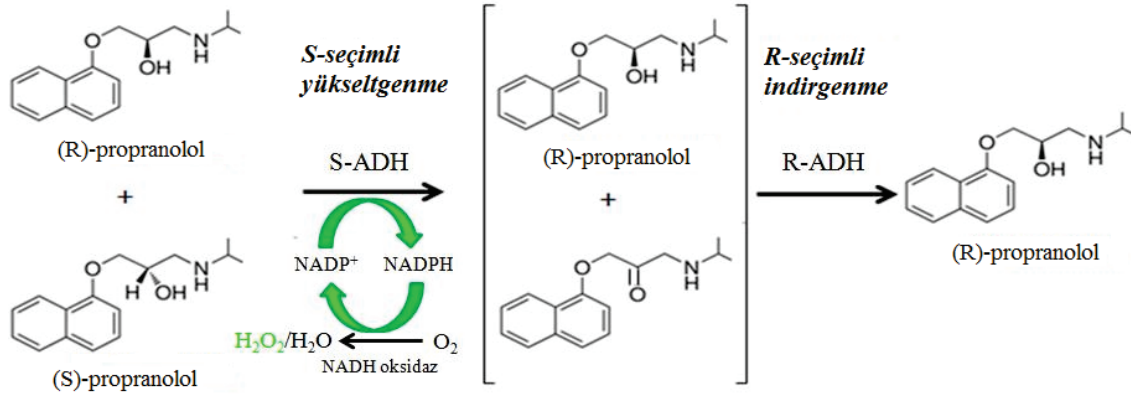
## 3. SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR (RESULTS AND DISCUSSIONS)

Bu çalışma kapsamında, rasemik propranololün biyokatalitik derasemizasyonu ile enantiyomerik saflıkta propranolol üretimi amaçlanmaktadır. Biyokatalitik derasemizasyon ile enantiyomerik saflıkta sekonder alkol üretimi konusundaki çalışmalar [15] referans alınarak propranolol için, Şekil 2'deki derasemizasyon mekanizması önerilmiştir. Bu mekanizmayı gerçekleştirmek için enzim kaynağı olarak *Rhizopus oryzae* CBS 111718 mikroorganizması tüm hücre olarak kullanılmakta ve sonuçta R-propranolol elde edilmektedir. Burada *R. oryzae* mikroorganizmasının içinde bulunan ADH ve NADH oksidaz enzimleri ile ardışık yükseltgenme-indirgenme tepkimelerinin gerçekleştiği düşünülmektedir. ADH kofaktör gerektiren bir enzimdir ve kofaktörler pahalıdır [16]. Bu çalışmada *R. oryzae* tüm hücre olarak kullanıldığından ortamda bulunan ve rejenere olan kofaktörler tepkimeye kullanılmakta ve kofaktör eklenmesine gerek kalmamaktadır. Bu da, saf enzime göre prosesin ekonomikliğini sağlaması açısından tüm hücre kullanımının büyük bir avantajıdır. Son zamanlarda endüstriyel olarak uygulanan yükseltgenme-indirgenme biyotransformasyonlarında proseslerin %75'inde tüm hücre

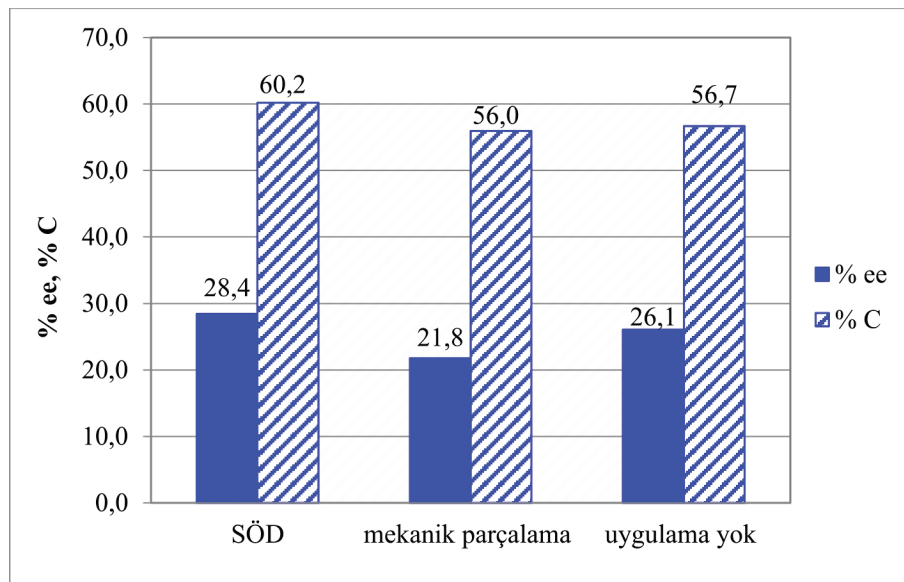
kullanılması [17], gerçekleştirilen bu çalışmanın önemini ortaya koymaktadır. Çalışmada *R. oryzae* mikroorganizması ile tepkimenin yüksek %ee ve dönüşümle gerçekleşmesi için çeşitli tepkime parametrelerinin etkisi (hücre parçalama yöntemi, tepkime ortamının pH'ı, substrat derişimi, tepkime süresi gibi) araştırılmıştır. Üreme ortamında üretildikten sonra topaklanarak üreyen mikroorganizmanın tepkimede kütle aktarım kısıtlamalarına sebep olmaması için hücreler SÖD ve mekanik parçalamayla parçalanmış, bununla birlikte hiçbir uygulama yapılmayan hücrelerle de biyotransformasyon tepkimeleri gerçekleştirilmiştir. Fosfat tamponunda gerçekleştirilen bu tepkimelerin sonuçları Şekil 3'te verilmiştir. Buna göre; *R. oryzae* mikroorganizmasının propranololü seçimli olarak dönüştürdüğü gözlenmiştir. Tampon ortamında gerçekleştirilen tepkimelerde, tüm uygulama yöntemleri ile yakın sonuçlar elde edilmiştir. Fakat, en yüksek %ee değeri (%28,4) ve %C değeri (%60,2) SÖD uygulaması ile elde edildiğinden sonraki deneylerde hücrelere SÖD uygulaması yapılmasına karar verilmiştir.

Mekanik parçalama ile uygulama yapılmayan duruma göre daha düşük sonuçlar elde edilmesinin, mekanik parçalama sırasında enzim yapısının zarar görmüş olabileceğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

*R. oryzae* mikroorganizmasındaki enzimlerin rasemik propranololün biyokatalitik derasemizasyonunu katalizlediğinden emin olduktan sonra en uygun tepkime parametrelerinin belirlenmesi için substrat derişimi, tepkime süresi, tepkime ortamının pH'ı, SÖD uygulama süresi, MgCl<sub>2</sub> ilavesi, gibi farklı parametrelerin tepkimeye etkileri incelenmiştir. Yapılan bu deneylerde elde edilen sonuçlardan sırasıyla bahsedilecektir. Substrat derişimi tepkime için çok önemli bir parametre olduğundan başlangıç substrat derişiminin tepkimeye etkisi incelenmiş (1, 3, 5, 10 mM) ve elde edilen sonuçlar Şekil 4'te verilmiştir. Buna göre, tepkimede substrat derişimi 1 mM ve 3 mM olduğunda birbirine çok yakın değerler elde edilmiş, derişim 3 mM'dan fazla olduğunda ise %ee değerinin azaldığı gözlenmiştir.



Şekil 2. Ardışık yükseltgenme-indirgenme tepkimeleri ile rasemik propranololün biyokatalitik derasemizasyonu (Biocatalytic deracemization of racemic propranolol via tandem oxidation and reduction reactions)

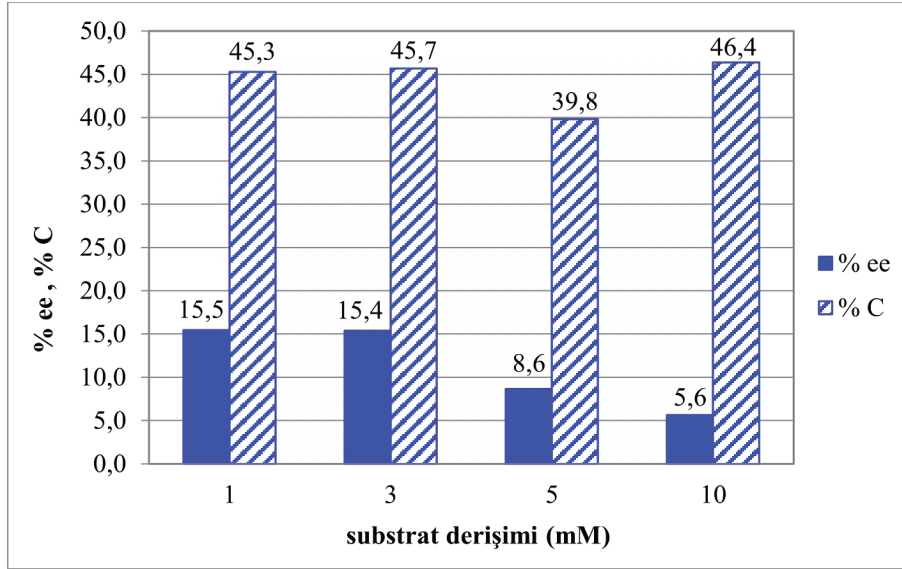


Şekil 3. Hücre parçalama yönteminin etkisi (C<sub>0</sub>=3 mM, V=10 mL, *R. oryzae*=100 g/L, SÖD= %10 w/v hücre derişimindeki tampon ortamında 10 min (pulse:1s +1s), Mekanik parçalama= %10 w/v hücre derişimindeki tampon ortamında 45s uygulama, pH 7, Süre= 6 gün) (The effect of cell disruption methods)

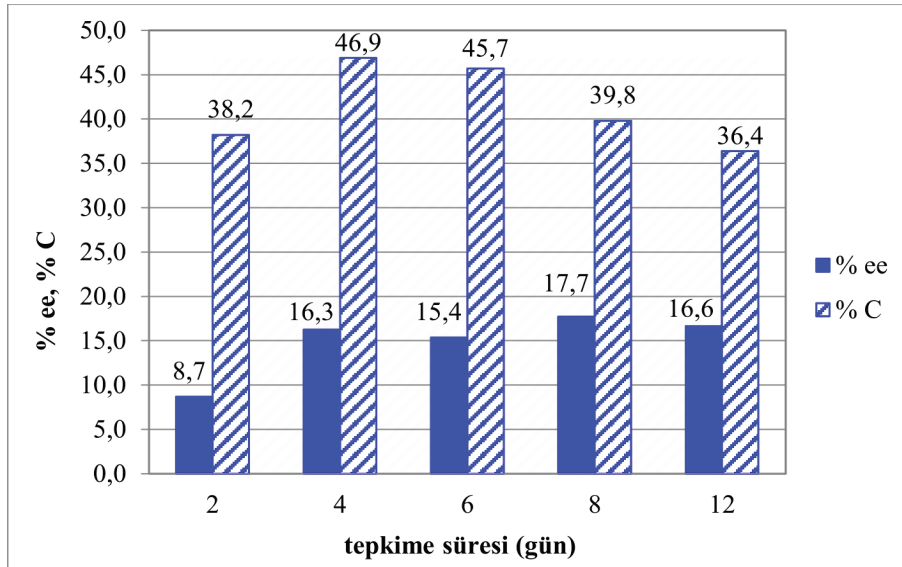
Endüstriyel açıdan düşünüldüğünde birim zamanda birim hacimde üretilen madde miktarının fazla olması istenmektedir. Bu nedenle tepkime sırasında mümkün olan en yüksek substrat derişiminde çalışılması oluşacak ürün miktarını artırmayı sağlayacaktır. Bu durum düşünülerek Şekil 4'e göre; incelenen tepkime sistemi için en uygun substrat derişimi 3 mM olarak belirlenmiştir.

Literatürde rasemik propranololün biyotransformasyonunun gerçekleştirildiği tek çalışmada [14]; *Rhizopus arrhizus* (NCIM 997) ve *Geotrichum candidum* (NCIM 980) mikroorganizmaları kullanılmıştır. Gerçekleştirilen tepkimelerde süre etkisi incelenmiş (2, 4, 6, 8 gün) ve en uygun tepkime süresi 6 gün olarak belirlenmiştir. *Rhizopus oryzae*'ye yakın bir tür olan *Rhizopus arrhizus*

mikroorganizması ile gerçekleştirilen tepkimelerde zamanla %ee değerinin değişimi incelendiğinde; 2. günde elde edilen %ee değerlerinin 4. güne kadar hızlı bir yükseliş gösterdiği, 6. güne kadar daha az bir hızla artmaya devam ettiği, 6. günden sonra 8. güne kadar tepkime sürdürüldüğünde ise düşmeye başladığı gözlenmektedir. Bu bilgiden faydalanarak, bu çalışmada önceki tepkimeler 6 gün sürdürülmüştür. Fakat *Rhizopus oryzae* mikroorganizması ile gerçekleştirilen tepkimelerde, zamanla enantiyomerik aşırılığın ve dönüşümün nasıl değiştiğini anlayabilmek için tepkime süresinin etkisi (2, 4, 6, 8, 12 gün) incelenmiştir. Aynı koşullarda başlatılan tepkimeler farklı sürelerde sonlandırılarak elde edilen sonuçlar Şekil 5'te verilmiştir. Buna göre; 2 günün bu tepkime için yeterli bir süre olmadığı görülmektedir. 2. günden 4. güne kadar %ee değeri artmıştır.



Şekil 4. Substrat derişiminin etkisi (*R. oryzae*=100 g/L, V=10 mL, SÖD= %10 w/v hücre derişimindeki tampon ortamında 5 min (pulse:1s +1s), pH=6, Süre= 6 gün) (The effect of substrate concentration)



Şekil 5. Tepkime süresinin etkisi ( $C_0=3$  mM, V=10 mL, *R. oryzae*=100 g/L, SÖD= %10 w/v hücre derişimindeki tampon ortamında 5 min (pulse:1s +1s), pH=6) (The effect of reaction time)

4. günden sonra ise %ee değerinde çok fazla bir değişiklik olmamakla beraber hafif bir artış olduğu gözlenmiştir. Buna göre, bu tepkime sistemi için 6 gün tepkime süresinde çalışılmasına karar verilmiştir. Enzimlerin aktivite gösterebilmeleri için pH önemli bir parametredir. Fosfat tamponunda gerçekleştirilen tepkimelerde pH etkisini görebilmek amacıyla tepkimeler pH 6, 7, 8 olmak üzere üç farklı pH değerinde gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 6'da verilmiştir. En yüksek %ee ve %C değerleri sırasıyla %25,6 ve %53 olarak pH 7'de elde edilmiştir. Literatürde rasemik propranololün biyotransformasyonunun gerçekleştirildiği tek çalışmada [14]; bir de pH etkisi (pH 6,8; 7,0; 7,4) incelenmiş ve *Rhizopus arrhizus* mikroorganizması kullanıldığı durumda en yüksek %ee değerleri pH 7'de elde edilmiştir. Bu nedenle *Rhizopus oryzae* mikroorganizması ile yapılan bu çalışmada, bulunan en uygun pH değerinin literatürle uyumlu olduğu düşünülmektedir.

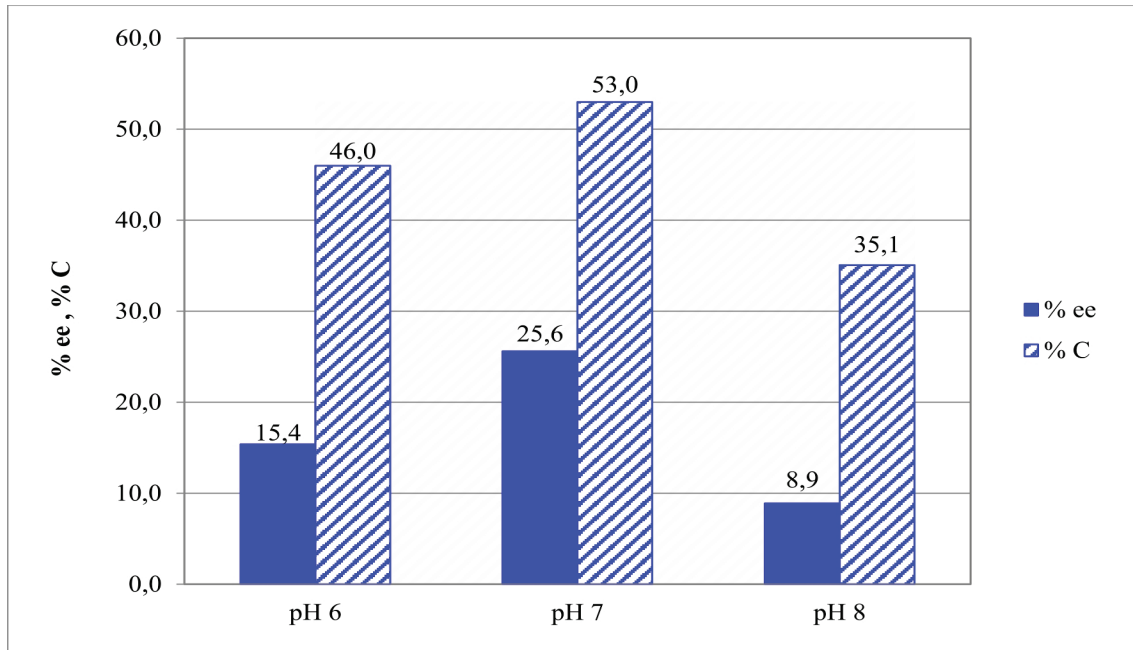
Topaklanarak üreyen hücreyi parçalayarak kütle aktarım kısıtlamalarının azaltılması ve hücre içindeki enzimlerin dışarı çıkabilmesi için hücre parçalama yöntemi olarak SÖD uygulanmasına karar verilmiştir. Fakat, bu uygulama sırasında hücreye enerji uygulandığından bu sırada enzimin protein yapısının zarar görmemesi için SÖD uygulama süresinin önemli olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, hücreye SÖD uygulama süresinin etkisi incelenmiştir. 40 W güçteki 20 kHz SÖD, 1s uygulama+1s ara olacak şekilde 5, 10, 15 ve 25 dakika hücrelere uygulanmıştır. SÖD uygulanırken mikroorganizmanın bulunduğu beher, uygulama sırasında artan sıcaklığın enzim aktivitesini düşürmemesi için buz banyosuna oturtulmuştur. Elde edilen sonuçlar Şekil 7'de görülmektedir. Buna göre; en yüksek %ee ve %C değerleri, hücreye 10 dakika SÖD

uyulduğunda sırasıyla %25,6 ve %53 olarak elde edilmiştir. SÖD, hücreye 5 dakika uygulandığında hücreyi parçalamak için sürenin yeterli olmadığı, 10 dakikadan fazla uygulandığında ise uygulanan enerjinin enzim yapısına olumsuz etkisi olduğu düşünülmektedir. Kofaktörler enzimin katalitik aktivitesini artırmak ve tepkime süresini kısaltmak için kullanılırlar. Bazı enzimlerin aktivitesi üzerine olumlu etkiler yapan +2 değerlikli iyonlardan biri olan Mg'un etkisini görebilmek için tepkime ortamına farklı derişimlerde MgCl<sub>2</sub> eklenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 8'de verilmiştir. Fakat burada beklenenin aksine tepkime ortamındaki MgCl<sub>2</sub> derişimi arttıkça enantiyomerik aşırılık değeri düşmüştür. Hiç eklenmediği durumda %ee ve %C değerinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

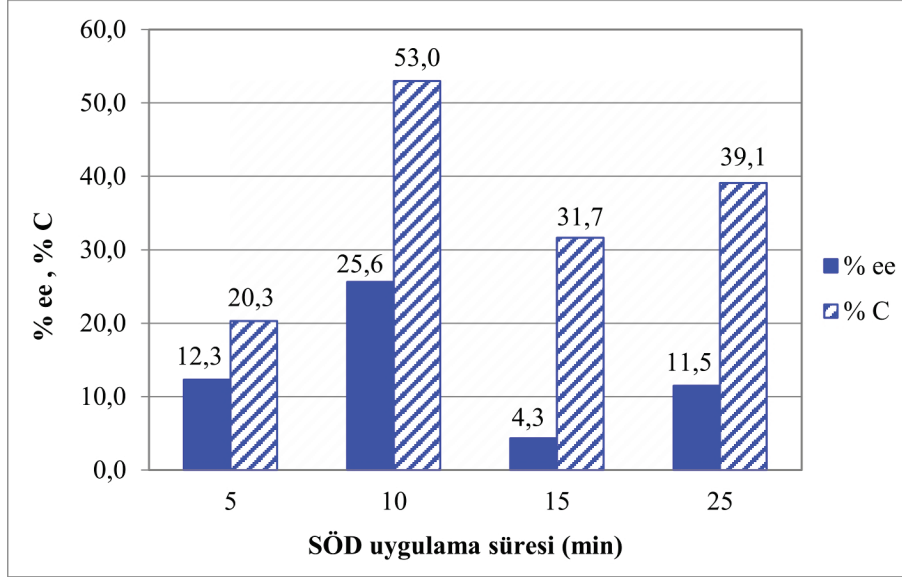
Bu çalışmada rasemik propranololün *R. oryzae* katalizörlüğünde biyokatalitik derasemizasyonu sonucu R-propranolol elde edilmektedir. Buna göre *R. oryzae*'nın rasemik propranololün içinde yer alan S-propranololü dönüştürdüğü (ardışık yükseltgenme-indirgenme tepkimeleri ile) (Şekil 2) ve R-propranololün dönüşmeden kaldığı düşünülmektedir. Bu nedenle, elde edilen %ee değerlerinin tümü R konfigürasyonuna aittir.

#### 4. SİMGELER (SYMBOLS)

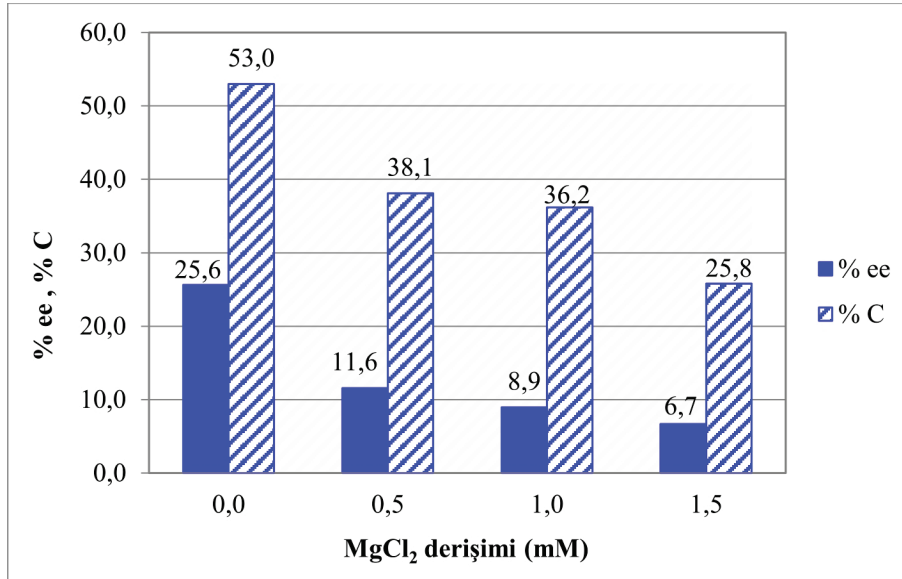
$C_R$	: (R)-propranololün derişimi
$C_S$	: (S)-propranololün derişimi
$C_0$	: Rasemik propranololün başlangıç derişimi
$C_{S_0}$	: (S)-propranololün başlangıç derişimi
SÖD	: Ses ötesi dalga
V	: Tepkime hacmi
%C	: Dönüşüm
%ee	: Enantiyomerik aşırılık



Şekil 6. Tepkimedeki fosfat tamponunun pH'ının etkisi ( $C_0=3$  mM,  $V=10$  mL,  $R. oryzae=100$  g/L, SÖD= %10 w/v hücre derişimindeki tampon ortamında 10 min (pulse:1s +1s), Süre= 6 gün) (The effect of phosphate buffer pH in the reaction medium)



Şekil 7. SÖD uygulama süresinin etkisi ( $C_0=3$  mM,  $V=10$  mL,  $R. oryzae=100$  g/L, SÖD= %10 w/v hücre derişimindeki tampon ortamında (pulse: 1s +1s), pH=7, Süre= 6 gün) (The effect of US application duration)



Şekil 8. MgCl<sub>2</sub> derişiminin etkisi ( $C_0=3$  mM,  $V=10$  mL,  $R. oryzae=100$  g/L, SÖD= %10 w/v hücre derişimindeki tampon ortamında 10 min (pulse: 1s +1s), pH=7, Süre= 6 gün) (The effect of MgCl<sub>2</sub> concentration)

## 5. SONUÇLAR (CONCLUSIONS)

Farmasötik açıdan önem taşıyan  $\beta$ -blokerlerden biri olan propranololün enantiyomerik saflıkta üretimi kapsamında rasemik propranololün biyokatalitik derasemizasyonu ile ilgili olarak çalışmalar yapılmıştır. Propranololün enantiyomerik saflıkta elde edilmesi için çevre dostu bu yöntemle ilgili literatürde sadece tek bir çalışma [14] bulunmakla beraber, kapsamı oldukça kısıtlıdır. Bahsi geçen çalışmada farklı iki mikroorganizma kullanılmış ve sadece süre ile pH etkisi incelenmiştir. Bu incelemeler sonucunda S-propranolol elde edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, tepkimenin gerçekleşme mekanizmasına dair hiçbir bilgi bulunmamaktadır. *Rhizopus oryzae* CBS 111718

mikroorganizması ile gerçekleştirilen bu çalışmada ise tüm tepkimelerde R-propranolol elde edilmiştir. Tepkimenin yüksek %ee ve %C ile gerçekleşmesi için çeşitli tepkime parametrelerinin etkisi (hücre parçalama yöntemi, tepkime ortamının pH'ı, SÖD uygulama süresi, substrat derişimi, tepkime süresi gibi) araştırılmıştır. Tüm bu denemeler sonucunda en yüksek enantiyomerik aşırılık ve dönüşüm değerleri; pH 7 olan tampon ortamında, 3 mM substrat derişiminde, 10 dakika ses ötesi dalga (SÖD) uygulandığı koşulda, 6 gün sonunda %ee=28,4; %C=60,2 olarak bulunmuştur. Bir ilaç etken maddesi olan propranololün ilaç olarak kullanılabilmesi için %ee değerinin artırılması gerekmektedir. Bu konuda çalışmalar sürmektedir. Ayrıca ilaç olarak kullanılabilmesi için tepkime ortamından



saflaştırma işlemleriyle ayrılması gerekmektedir. Propranololün enantiyomerik saflıkta üretimi ile ilgili çalışmalar, işletme parametrelerinin enantiyomerik saflıkta üretim verimine etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi için deneysel tasarım yöntemi uygulanarak devam etmektedir.

#### TEŞEKKÜR (ACKNOWLEDGEMENT)

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri 14L0443004 nolu proje ile desteklenmektedir.

#### KAYNAKLAR (REFERENCES)

1. Agustian J., Kamaruddin A.H., Bhatia S., Single enantiomeric  $\beta$ -blockers-The existing Technologies, *Process Biochem.*, 45, 1587-1604, 2010.
2. Lund I.T., Bockmann P.L., Jacobsen E.E., Highly enantioselective CALB-catalyzed kinetic resolution of building blocks for  $\beta$ -blocker atenolol, *Tetrahedron*, 72, 7288-7292, 2016.
3. Mehvar R., Brocks D.R., Stereospecific Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: Cardiovascular Drugs (Chapter 7), *Chirality in Drug Design and Development*, Editors: Reddy I.K. and Mehvar R., Marcel Dekker, New York, 281-350, 2004.
4. Zelaszczyk D., Kononowicz K.K., Biocatalytic approaches to optically active  $\beta$ -blockers, *Curr. Med. Chem.*, 14, 53-65, 2007.
5. Kennedy H.L., Current utilization trends for  $\beta$ -blockers in cardiovascular disease, *The American Journal of Medicine*, 110 (5A), 2S-6S, 2001.
6. Agrawal Y.K., Patel R.N., Chiral chromatographic separation of  $\beta$ -blockers, *Journal of Chromatography B*, 820, 23-31, 2005.
7. Kamal A., Khanna G.B.R., Krishnaji T., Tekumalla V., Ramu R., New chemoenzymatic pathway for  $\beta$ -adrenergic blocking agents, *Tetrahedron: Asymmetry*, 16, 1485-1494, 2005.
8. Santoro M.I.R.M., Cho H.S., Kedor-Hackmann E.R.M., Enantiometric separation and quantitative determination of propranolol in tablets by chiral high-performance liquid chromatography, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 27 (7), 693-697, 2001.
9. Kamal A., Sandbhor M., Shaik A.A., Chemoenzymatic synthesis of (S) and (R)-propranolol and sotalol employing one-pot lipase resolution protocol, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14, 4581-4583, 2004.
10. Escorcía A.M., Molina D., Daza M.C., Doerr M., Acetylation of (R,S)-propranolol catalyzed by *Candida antarctica* lipase B: An experimental and computational study, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 98, 21-29, 2013.
11. Stoschitzky K., Lindner W., Zernig G., Racemic  $\beta$ -blockers- fixed combinations of different drugs, *Journal of Clinical and Basic Cardiology*, 1 (1), 15-19, 1998.
12. Kong X.D., Yu H.L., Yang S., Zhou J., Zeng B.B., Xu J.H., Chemoenzymatic synthesis of (R)- and (S)-propranolol using an engineered epoxide hydrolase with a high turnover number, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 122, 275-281, 2015.
13. Li B., Nie Y., Mu X.Q., Xu Y., De novo construction of multi-enzyme system for one-pot deracemization of (R,S)-1-phenyl-1,2-ethanediol by stereoinversion of (S)-enantiomer to the corresponding counterpart, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 129, 21-28, 2016.
14. Damle S.V., Patil P.N., Salunkhe M.M., Biotransformations with *Rhizopus arrhizus* and *Geotrichum candidum* for the preparation of (S)-Atenolol and (S)-Propranolol, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 8, 2067-2070, 2000.
15. Li Y.L., Xu J.H., Xu Y., Deracemization of aryl secondary alcohols via enantioselective oxidation and stereoselective reduction with tandem whole-cell biocatalysts, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 64, 48-52, 2010.
16. Kazıcı H.Ç., Mehmetoğlu Ü., Use of the plant as biocatalysts for producing enantiomerically pure secondary alcohol, *Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University*, 30 (1), 49-56, 2015.
17. Solano D.S., Hoyos P., Hernaiz M.J., Alcantara A.R., Sanchez-Montero J.M., Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs, *Bioresour. Technol.*, 115, 196-207, 2012.

