

ENANTİYOMERİK OLARAK SAF SEKONDER ALKOLLERİN ÜRETİMİNDE BİTKİ BİYOKATALİZÖRLERİ KULLANIMI

Hilal Çelik KAZICI*, Ülkü MEHMETOĞLU**

* Kimya Müh. Böl., Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Van

** Kimya Müh. Böl., Mühendislik Fakültesi, Ankara Üniversitesi, Ankara

hcelik@eng.ankara.edu.tr, mehmet@eng.ankara.edu.tr

(Geliş/Received: 27.01.2014; Kabul/Accepted: 18.12.2014)

ÖZET

Bu çalışmada asetofenonun biyoindirgenmesiyle, birçok farmakolojik ürünün öncü maddesi olan enantiyomerik saflıkta (S)-1-fenil etanol üretilmiştir. (S)-1-fenil etanol türevleri antialzaymır ilaç etken maddesi olarak da kullanım alanına sahiptir. (S)-1-fenil etanolün üretimi, asetofenonun *alkoldehidrojenaz* (ADH) enzimi biyokatalizli asimetrik indirgenme tepkimesiyle gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın ilk aşamasında, karbonil grubunu indirgeyebilmesi için ADH enzim kaynağı olarak çeşitli meyve ve sebzeler kullanılmıştır. En yüksek aktiviteye sahip olan uygun bitkinin seçimi için, farklı bitkilerin (havuç, patates, üzüm, turp) ADH enzim aktiviteleri tayin edilmiştir. Biyokatalizör olarak, en yüksek ADH aktivitesine sahip havuç seçilmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında, enantiyomerik saflıkta (S)-1-fenil etanol üretimine biyokatalizör boyutu, enzim kaynağı, substrat derişim ve sıcaklık, tepkime süresi, tepkime pH'ı ve hücre derişiminin etkileri araştırılmıştır. Enantiyoseçimli asimetrik biyoindirgenme tepkimesinde biyokatalizör olarak kullanılan taze havuç içindeki ADH enzimi tepkimeyi 2mM substrat derişimi, 200 g/L biyokatalizör derişimi, 1,52 mm biyokatalizör boyutu, 33 °C tepkime sıcaklığı, pH=7 ve 150 rpm karıştırma hızı koşullarında, yüksek enantiyoseçimlilikte ve yüksek dönüşümde katalizlemiştir (>%99 ee ve %92 c).

Anahtar Kelimeler: Biyoindirgenme, asimetrik sentez, (S)-1-fenil etanol, alkoldehidrojenaz, bitki

USE OF THE PLANT AS BIOCATALYSTS FOR PRODUCING ENANTIOMERICALLY PURE SECONDER ALCOHOL

ABSTRACT

In this study, enantiomerically pure (S)-1-Phenylethanol was produced with bioreduction of acetophenone that the precursor of many pharmacological product. Derivatives of (S)-1-Phenylethanol (secondary alcohol) is used as the active ingredient of drug of anti alzheimer. Production of (S)-1-Phenylethanol was conducted with the asymmetric reduction reaction of acetophenone that biocatalyst for there action is enzyme of *alcohol dehydrogenase* (ADH). In this study, a variety of fruits and vegetables were used as source of enzyme (ADH) for reduction of the carbonyl group and ADH enzyme activities were determined of different plants (carrots, potatoes, grapes, radishes) for selection of suitable plant which it has the highest intra cellular enzyme activity. At the end of this election carrot has been considered as a biocatalyst which has highest ADH activity. The effects of size of biyocatalyst, source of enzyme, substrate concentration, temperature, reaction time, pH of there action and the amount of biocatalyst have been investigated on the production of (S)-1-Phenylethanol. It was found that ADH enzyme in fresh carrots catalysed the bioselective asymmetric reduction reactions at high conversion and high enantioselectively (>%99 ee and 92% c), under the conditions of 2mM substrate concentration, 200 g/L biocatalyst concentration, 1,52 mm biyocatalyst size, reaction temperature 33 °C, pH=7 and 150 rpm agitation speed.

Keywords: Bioreduction, asymmetric synthesis, acetophenone, (S)-1-Phenylethanol, alcoholdehydrogenase, plant

1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Ketonların asimetrik indirgenmesi organik moleküllerin sentezinde temel bir prosestir. Prokiral ketonların asimetrik indirgenmesi ile elde edilen kiral alkoller, ilaç sanayi, zirai kimya ve tatlandırıcı sentezinde kullanılmaktadır [1]. Kiral maddeler (R) ve (S) olmak üzere iki enantiyomere sahiptir. Farklı biyolojik etkilerinden dolayı genellikle enantiyomerlerden yalnız bir tanesi istenen aktiviteyi sağlar ve farmakolojik açıdan ilgi görür [2]. Bu nedenle, enantiyomerlerin ayrılması ilaç endüstrisi için büyük önem taşımaktadır [3]. Literatürde mikrobiyal hücrelerle biyokatalitik indirgenme ile ilgili bir çok çalışma bulunmaktadır [4-5]. Son yıllarda, biyokatalizör olarak bitki hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen kimyasal reaksiyonlar büyük ilgi çekmektedir [6]. Biyokatalizör olarak mikrobiyal hücre ve bitki hücresinin kullanıldığı bir çalışmada, bitki hücresi olarak havuç, mikrobiyal hücre olarak ekme mayası kullanılmıştır [7].

Çalışmada, pro-kiral ketonlar (indanon, tetralon vb. keton) asimetrik sentez ile ekme mayası ve havuç biyokatalizörü ile indirgenmiştir ve havuç biyokatalizöründe her substrat için, ekme mayasına göre yüksek dönüşüm ve enantiyomerik aşırılık değerleri sırası ile >%99 ee ve % 95 c, % 85ee ve % 45 c, > % 99 ee ve % 70 c olarak elde edilmiştir.

Lactobacillus kefir mikroorganizmasının biyo katalizör olarak kullanıldığı bir çalışmada pro-kiral keton (asetofenon) asimetrik sentez ile indirgenmiştir. *Lactobacilluskefir* biyokatalizörü ile (R)-enantiyomer için yüksek enantiyomerik aşırılık verdiği (> % 99) belirlenmiş fakat kofaktör rejenerasyonu gerektiği için dönüşümlerin yüksek olmadığı vurgulanmıştır. Yüksek dönüşüm ve enantiyomerik aşırılık değerlerine ancak ortama kofaktör ekleyerek ulaşılmıştır [8].

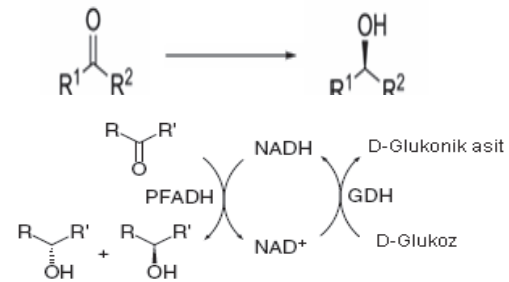
Örneğin, kereviz ve havuç gibi enzim sistemleri kullanılarak orto, meta, para bromo ve methoxy asetofenon türevlerinin enantiyoseçimli olarak indirgenmesi incelenmiştir. Çalışmada taze bitki kökleri elektrikli mikserde 2 dakika parçalanmış ve 20 mL'lik sebze karışımı havuç için pH=6,5 ve kereviz için pH=6,2 olan tepkime ortamına eklenmiştir. Bu karışım ile 20-30 mg substrat 0,5 mL asetonda çözülerek, 48 saat karıştırılmış ve 48 saat sonra kloroform ile ekstrakte edilmiştir. Meta konumu için havuç ile >% 99ee, %100 c ve kereviz ile >% 99ee, %98 c değerleri elde edilmiştir [9].

Substrat olarak asetofenon ve biyokatalizör olarak kurutulmuş yeşil bezelyenin kullanıldığı başka bir çalışmada, 1mM substrat 50 mL su içinde çözülerek, 25 g biyokatalizör ile karıştırılmış ve oda sıcaklığında 24 saat karıştırılmış ve etil asetat ile ekstrakte edilmiştir. Biyoindirgenme reaksiyonu sonucunda %72 verim ve %98 ee ile (S)-1-fenil etanol elde edilmiştir [10].

Literatürde sadece farklı model substratların değişik bitkiler (biyokatalizör) ile indirgenip alkollerine dönüştürmenin mümkün olup olmayacağı araştırılmıştır. Substrat derişimi, biyokatalizör derişimi, tepkime süresi, pH etkisi gibi çalışmalara yer verilmediği görülmektedir.

Bu çalışmada asetofenonun biyoindirgenmesiyle enantiyomerik saflıkta 1-fenil etanol üretilmiştir. Enantiyomerik saflıkta üretilen 1-fenil etanol ve türevleri antiseptik, antibiyotik ve dezenfektan olduğu gibi ilaç ve parfümeride koruyucu olarak kullanılmaktadır. Girdi olarak kullanılacak olan asetofenon ve bir çok türevlerinin biyokatalitik indirgenmesi sonucu elde edilen kiral alkoller, ilaç sanayi için önemli girdilerdir. Örneğin, 2-brom-4-flor fenil alkol anti alzaymer ilaçlarında potansiyel girdi olarak kullanılmaktadır [11].

Biyokatalitik olarak enantiyomerik saflıkta sekonder alkol üretimi için en çok kullanılan yöntemler kinetik rezolüsyon, asimetrik sentez ve derasemizasyondur. Bu çalışmada, prokiral bir bileşikten başlayarak asimetrik sentez yöntemiyle enantiyomerik saflıkta tüm kiral olmayan başlangıç maddelerini enantiyomerik olarak saf ürünlere dönüştürmek mümkündür ve bu tepkimeye enantiyoseçimli tepkime denir. En basit örnek olarak, kiral olmayan bir substrat sadece bir asimetrik merkez taşıyan kiral bir ürünün iki enantiyomerinin eşit olmayan karışımlarına dönüştürülür. Amaç, sentezlenmesi istenen enantiyomerin oranını artırmaktır. Bu da enantiyoseçiciliği maksimuma ulaştırmak anlamına gelir. Bir tepkimenin enantiyoseçimli olabilmesi için kiral bir reaktif, çözücü veya katalizör, tepkime üzerinde etkili olmalıdır [12].



Şekil 1. Ketonların asimetrik sentezi (Asymmetric synthesis of ketones)

Asimetrik sentez, kiral olmayan bir birimin bir substrat molekülle kiral bir moleküle dönüştürülmesi ve bu dönüşümde muhtemel izomerlerin eşit olmayan miktarda oluşumunu sağlayan bir sentez şekli olarak tanımlanabilir (Şekil 1). Enantiyoseçimliliğin derecesi genel olarak enantiyomerik aşırılık (e.e.) ile ifade edilir. Burada enantiyomerlerin oranı yüzde olarak ifade edilir. Enantiyomerik oran yerine bütün durumlarda enantiyomerik aşırılık teriminin kullanılmasının nedeni doğrudan doğruya optikçe

saflığı ifade etmesidir. %100 e.e.'li bir madde enantiyomerik olarak saf bileşiktir. Bir bileşiğin enantiyomerik aşırılık ve dönüşüm yüzdesi aşağıdaki denklemler yardımıyla hesaplanabilir [13].

$C_S > C_R$; Enantiyomerik aşırılık yüzdesi;

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

Dönüşüm yüzdesi;

$$\%c = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100 \quad (2)$$

Çalışmada, karbonil grubunu indirgeyebilmek için ADH enzim kaynağı olarak çeşitli meyve ve sebzeler (havuç, patates, üzüm, turp) kullanılmıştır. Alkoldehidrojenazlar kofaktöre ihtiyaç duyarlar ve kofaktörler oldukça pahalı maddelerdir. Tepkime ilerledikçe ortamdaki kofaktör tükeneneğinden ve kofaktörler pahalı olduklarından, saf enzimler yerine bitkileri, alkoldehidrojenaz kaynağı olarak kullanmak daha ekonomiktir. Bitki hücresinin yapısında bulunan GDH enzimi ve glikoz molekülü kofaktör rejenerasyonunu sağlayabilir.

Üretim kesikli ortamda yapılmıştır ve uygun biyokatalizör olarak seçilen *taze havuç* kullanılarak biyotransformasyon verimi üzerine; biyokatalizör boyutu, başlangıç substrat derişimi, biyotepkime süresi, biyokatalizör derişimi, ortam pH'ı ve sıcaklık etkileri incelenmiştir.

2. DENEYSEL (EXPERIMENTAL)

2.1. Materyal ve Yöntem (Materials and Methods)

Bu çalışmada substrat olarak kullanılan asetofenon ve elde edilen ürün fenil etanolün saf enantiyomerleri olan (R) ve (S)-1fenil etanol Aldrich, hegzan ve 2-propanol Merc'ten temin edilmiştir.

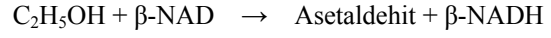
Fenil etanol üretiminde biyokatalizör olarak kullanılan sebze ve meyveler yerel marketlerden temin edilmiştir

2.2. Enzim Aktivitesi Tayini (Determination of Enzyme Activity)

Hücre içi bir enzim olan alkoldehidrojenazın çeşitli bitkilerdeki (*taze havuç*, patates, üzüm, turp) aktivitesini ölçmek için, öncelikle bitkiler belirli boyuta parçalanmış ve 0,1M fosfat tamponu pH 7'ye ayarlanarak eklendikten sonra santrifüj yapılmış ve sıvı kısım kullanılarak aktivite belirlenmiştir. Çalışmada, aktivite değeri ölçmek için, etanolün asetaldehite yükseltgenme tepkimesi (kofaktör varlığında) UV spektrofotometre ile takip edilmiştir.

Kofaktörler (NAD, NADH) 340 nm de absorbans vermektedir. Tepkime esnasında NAD'dan NADH oluşurken absorbans değeri artmaktadır.

ADH



Şekil 2. Etanolün ADH enzimi ile yükseltgenme tepkimesi (Ethanol oxidation reaction with biocatalysts of ADH enzyme)

Enzim aktivitesi internasyonal ünite formülüne göre (IU: $\mu\text{mol/dk}$) olarak verilmiştir [14]. Enzim aktivite değerleri aşağıdaki bağıntı kullanılarak hesaplanmıştır [8].

$$\text{Aktivite(U/L)} = (\Delta\text{Abs/dak}) \cdot (V_T \cdot 1000) / (\epsilon \cdot V_0 \cdot b) \quad (3)$$

2.3. Asetofenonun Asimetrik İndirgenmesi (Asymmetric Reduction of Acetophenone)

Deneyler substrat olarak belirli derişimde asetofenon ve biyokatalizör olarak belirli derişimde taze havuç içeren 0,1M sodyum fosfat tampon (pH=7) ortamında gerçekleştirilmiştir. Asetofenon organik 1 mL MTBE'de (metil tersiyer bütül eter) çözüldükten sonra tepkime ortamına eklenmiştir. Taze havuç belirli bir boyuta getirilerek kullanılmıştır. Tepkimeler 50 mL hacmindeki vida kapaklı kesikli biyoreaktörlerde, sıcaklık ve karıştırma hızı (150 rpm) kontrol edilen orbital çalkalayıcılarda gerçekleştirilmiştir. Dönüşüm ve enantiyomerik aşırılık üzerine, taze havuç biyokatalizörlüğünde başlangıç substrat derişimi, biyotepkime süresi, biyokatalizör derişimi, pH ve sıcaklık etkisi incelenmiştir.

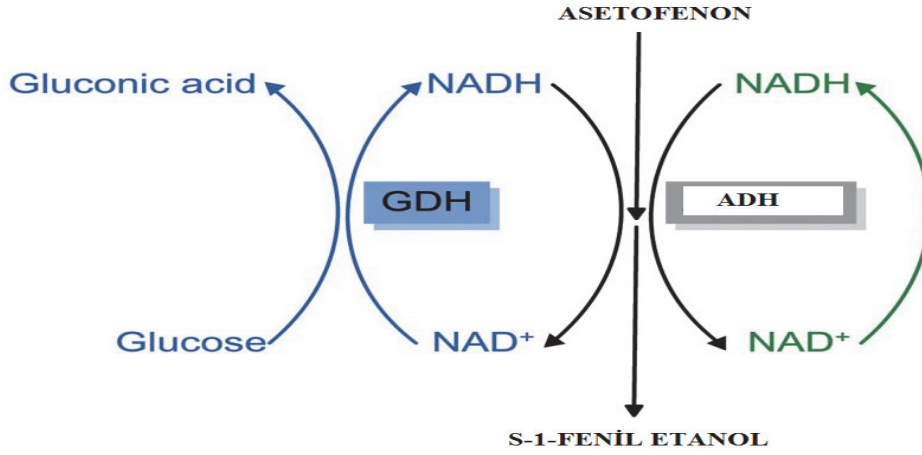
Çalışmada, karbonil grubunu indirgeyebilmek için ADH enzim kaynağı olarak çeşitli meyve ve sebzeler kullanılmıştır (Şekil 3).



Şekil 3. Asetofenonun bitki hücreleri indirgenmesi (Reduction of acetophenone with biocatalysis of plantcells)

Alkoldehidrojenazlar kofaktöre ihtiyaç duyarlar ve kofaktörler oldukça pahalı maddelerdir. Tepkime ilerlediği sırada ortamdaki kofaktör tükeneneğinden dolayı ve kofaktörler pahalı olduklarından, saf enzimler yerine bitkileri, alkol dehidrojenaz kaynağı olarak kullanmak daha ekonomiktir (Şekil 4).

Bitki hücresinde bulunan GDH enzimi ve glikoz molekülü tarafından kofaktör rejenerasyonu gerçekleşir [15].



Şekil 4. Kofaktör Rejenerasyonu (Cofactor regeneration)

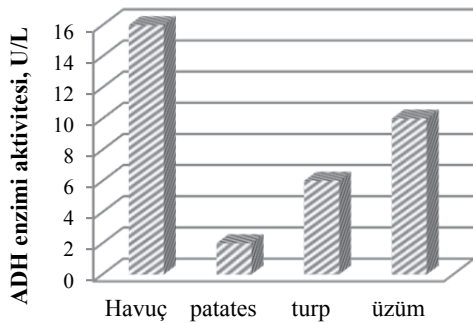
2.4. Analiz (Analysis)

Tepkime ortamından alınan örnekler, eş hacim metil tersiyer bütül eter ile ekstrakte edilmiştir. Organik ve sulu fazlar ayrıldıktan sonra organik faz yüksek basınç sıvı kromatografi ile analiz edilmiştir. Taşıyıcı faz olarak, hegzan/2-propanol (95/05), akış hızı 0,80 mL/dak, 10 µL enjeksiyon hacmi, 30°C’ de Chiralcell OB kolonu (4,6 mm x 50 mm, Daicel Chemical Ind. Ltd. France) 254 nm UV dedektör ile analizlenmiştir.

3. SONUÇ ve TARTIŞMA (RESULTS AND DISCUSSION)

3.1. Enzim Aktivitesi Tayini (Determination of Enzyme Activity)

Aktivite tayinlerinde genellikle kaybolan substrat miktarı veya meydana gelen ürün miktarı tayin edilerek enzimlerin aktiviteleri ölçülür. Enzim aktivite tayininde yöntem seçerken pratik oluşuna ve kısa sürede yapılmasına, ayrıca hassas oluşuna da özen göstermek gerekir.



Biyokatalizör türü

Şekil 5. Farklı biyokatalizörlerin ADH aktivitesi (ADH activity of different biocatalysts)

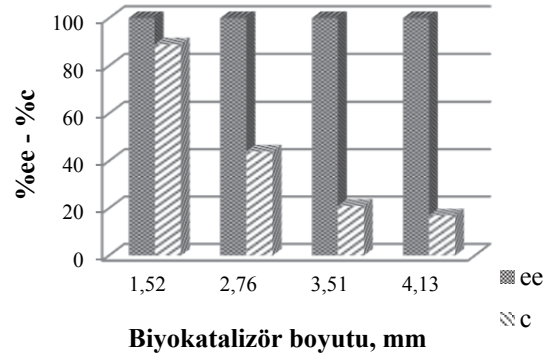
Bu çalışmada tayinde spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. Şekil 2 deki tepkimeye bağlı olarak taze havuç, patates, üzüm ve turp için absorbansın zaman ile değişimi izlenmiştir ve tüm veriler Eşitlik

3’e göre değerlendirilerek ADH aktivite değerleri elde edilmiştir. (Şekil 5).

Farklı biyokatalizörlerin ADH enzimi aktiviteleri hesaplanmış ve en yüksek enzim aktivitesine sahip taze havuç biyokatalizörü ile biyoindirgenme verimi üzerine tepkime parametrelerinin etkileri incelenmiştir.

3.2. Biyokatalizör Boyutu Etkisi (Effect of Biocatalyst Size)

Farklı boyutlara (1,52, 2,76, 3,51 ve 4,13 mm) sahip taze havuç kullanılarak, biyokatalizör boyutu etkisi incelenmiştir. 1,52 mm için %89 ee ve >% 99 ee elde edilmiştir (Şekil 6).

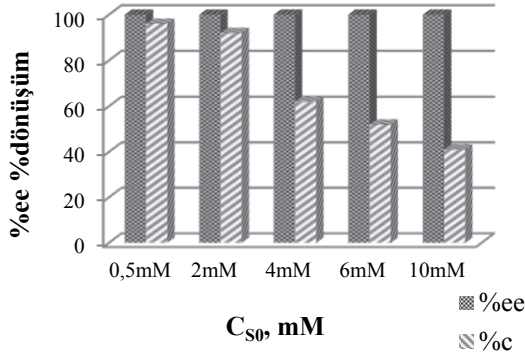


Şekil 6. Biyokatalizör boyutu etkisi (V=51mL, C_{SO}=1,5mM, C_H=200g/L, 0,1M pH=7 fosfat tamponu 50 mL, t= 48 h, 33 °C) (The effect of biocatalyst size (V= 51mL, C_{SO}= 1,5mM, C_H=200g/L, 50 mL 0,1M pH= 7 phosphate buffer, t= 48 h, T=33 °C))

Biyokatalizör boyutunun artması ee değerini etkilememiştir. Ancak, dönüşüm yüzdesi azalmıştır. 1,52 mm boyutunda dönüşüm yüzdesi % 89 iken 4,13 mm için %55’e düşmüştür. Biyokatalizör boyutu arttıkça kütle aktarım kısıtlaması gerçekleşmiş ve substrat enzime yeterince difüzyonlanmamıştır [16].

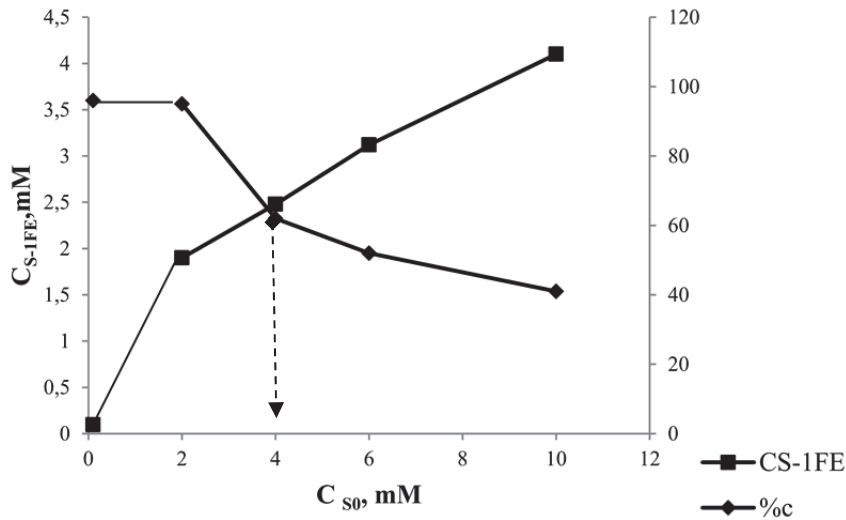
3.3. Başlangıç Substrat Derişimi Etkisi (Effect of Initial Substrate Concentration)

Biyotransformasyon verimi üzerine, taze havuç biyokatalizörlüğünde başlangıç substrat derişimi etkisi 0,1-10 mM derişim aralığında çalışılmıştır (Şekil 7).



Şekil 7. Taze havuç hücreleri ile asimetric olarak biyoreduktasyona substrat derişimi etkisi ($V= 51$ mL, $C_h= 200$ g/L, $0,1M$ pH=7 fosfat tamponu 50 mL, $t= 48$ h, $T= 33$ °C) (Effect of substrate concentration ($V= 51$ mL, $C_h= 200$ g/L, $0,1M$ pH=7 phosphate buffer 50 mL, $t= 48$ h, $T= 33$ °C))

Başlangıç substrat derişiminin enantiyomerik aşırılık üzerine etkisi olmadığı, dönüşüm değerinin ise etkilendiği gözlenmiştir. $0,1mM$ başlangıç substrat derişimindeki % 96 dönüşüm, $10mM$ substrat derişiminde % 41'e düşmüştür. Enantiyomerik aşırılık değeri > % 99 olarak sabit kalmıştır.



Şekil 8. Substrat derişiminin dönüşüm ve ürün derişimi üzerine etkisi ($V=51$ mL, $C_h=200$ g/L, $0,1M$ pH= 7 fosfat tamponu 50 mL, $t=48$ h, $T=33$ °C) (Effect of substrate concentration on the conversion and concentration of product ($V=51$ mL, $C_h=200$ g/L, $0,1M$ pH=7 phosphate buffer 50 mL, $t=48$ h, $T=33$ °C))

Bu durumda % c ve ee açısından en uygun substrat derişimi değerinin $2mM$ olduğu belirlenmiştir.

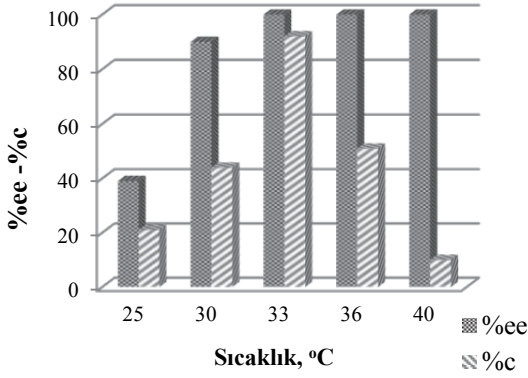
(S)-1-feniletanol derişiminin substrat derişimi ile değişimi incelendiğinde substrat derişimi arttıkça % dönüşüm azalırken (S)-1-feniletanol derişimi artmaktadır (Şekil 8). $2mM$ substrat derişiminde % 92 dönüşüm ile $1,9mM$ (S)-1-feniletanol elde edilirken $10mM$ substrat derişiminde % 41 dönüşüm ile ürün derişimi $4mM$ değerine ulaşmaktadır.

Hem dönüşüm hem de ürün derişimi açısından en uygun substrat derişiminin $4mM$ olduğu görülmektedir. $4mM$ substrat derişiminde % 60 dönüşüm ile $2,48mM$ (S)-1-feniletanol elde edilirken, $2mM$ substrat derişiminde % 92 dönüşüm ile $1,9mM$ (S)-1-feniletanol elde edilmiştir. Uygun substrat derişiminin $4mM$ olduğu düşünüldüğü durumda, dönüşmeden kalan substrat miktarının fazla olduğu görülmektedir (% 60) ve bu miktar sadece geri döngülü bir sistemde çalışılarak artırılabilir.

Geri döngülü bir sisteme ihtiyaç duyulmadan substratın neredeyse tamamı (%92) dönüşebildiği için kesikli sistemde $2mM$ da çalışmanın uygun olacağı düşünülmüştür.

3.4. Sıcaklık Etkisi (Effect of Temperature)

Her enzimin aktif olduğu bir optimum sıcaklık aralığı vardır. Ancak yüksek sıcaklık, enzimin aktivitesini kaybetmesine sebep olduğu için, bu çalışmada $25-40$ °C aralığında çalışılmıştır (Şekil 9).

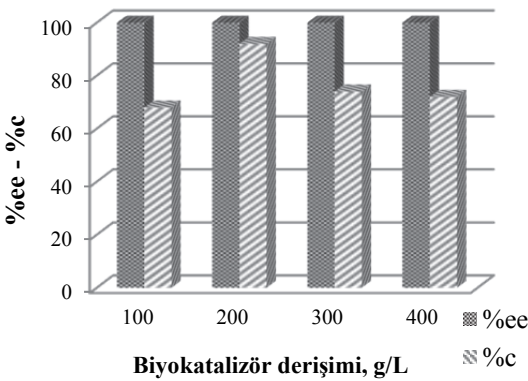


Şekil 9. Taze havuç hücreleri ile asimetric olarak biyoindirgeme üzerine sıcaklık etkisi ($V=51\text{mL}$, $C_{SO}=2\text{mM}$, $C_h=200\text{g/L}$, $0,1\text{M}$ pH=7 fosfat tamponu 50 mL , $t=48\text{ h}$) (Effect of temperature ($V=51\text{mL}$, $C_{SO}=2\text{mM}$, $C_h=200\text{g/L}$, $0,1\text{M}$ pH=7 phosphate buffer 50 mL , $t=48\text{h}$))

Enantiyomerik aşırılık değeri tüm sıcaklıklarda $> \% 99$ iken $33\text{ }^\circ\text{C}$ 'de diğer sıcaklıklara göre daha yüksek dönüşüm elde edilmiştir. Enzimler diğer katalizörlerden farklı olarak protein yapılarından dolayı aktiviteleri sıcaklığa bağlıdır. Belli bir sıcaklıktan sonra enzim denatüre olmaya başlar ve bu nedenle dönüşümün azalması, oksidoredüktaz olan ADH enziminin yüksek sıcaklıkta aktifliğini yitirmesi ile açıklanmıştır. Enzim reaksiyon hızının maksimumuna eriştiği sıcaklık olan optimum sıcaklık değerine $33\text{ }^\circ\text{C}$ 'de ulaşılmıştır.

3.5. Biyokatalizör derişimi etkisi (Effect of the Concentration of Biocatalyst)

Biyokatalizör derişiminin artması ile tepkimenin nasıl etkilendiği incelenmiştir (Şekil 10). Tepkime ortamına; $100\text{-}400\text{ g/L}$ derişim aralığında taze havuç eklenmiştir.



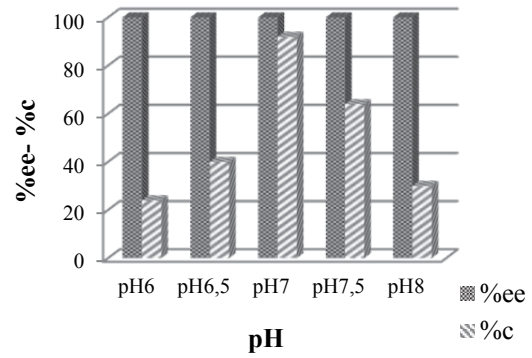
Şekil 10. Taze havuç hücreleri ile asimetric olarak biyoindirgemeye hücre derişimi etkisi ($V=51\text{mL}$, $C_{SO}=2\text{mM}$, $0,1\text{M}$ pH=7 fosfat tamponu 50 mL , $t=48\text{h}$, $T=33\text{ }^\circ\text{C}$) (Effect of the concentration of biocatalyst ($V=51\text{mL}$, $C_{SO}=2\text{mM}$, $0,1\text{M}$ pH=7 phosphate buffer 50 mL , $t=48\text{ h}$, $T=33\text{ }^\circ\text{C}$))

Biyokatalizör derişiminin artması sonucu ile enantiyomerik aşırılık değeri etkilenmemiştir fakat dönüşümün yüksek hücre derişimi değerlerinde azaldığı gözlenmiştir.

Yüksek biyokatalizör derişimlerinde ortamın yoğun olması nedeniyle oluşan kütle aktarımı kısıtlamaları nedeniyle substratın enzime difüzyonunu güçleştirmiştir. 200 g/L hücre derişimi değerinde yüksek enantiyoseçimliliğe $> \%99$ ve dönüşüme ($\% 92\text{ c}$) ulaşılmıştır.

3.6. pH Etkisi (Effect of pH)

Taze havuç ile biyoindirgeme deneylerinde pH etkisi incelenirken, ortamın pH'sı $6\text{-}8$ 'e ayarlanmıştır (Şekil 11).



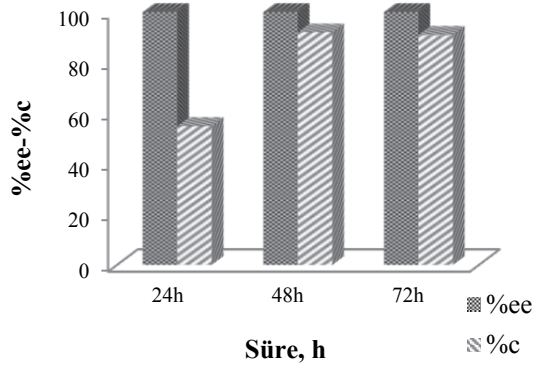
Şekil 11. Taze havuç hücreleri ile asimetric olarak biyoindirgemeye pH etkisi ($V=51\text{mL}$, $C_{SO}=2\text{mM}$, $C_h=200\text{g/L}$, $0,1\text{M}$ fosfat tamponu 50 mL , $t=48\text{ h}$, $T=33\text{ }^\circ\text{C}$) (Effect of pH ($V=51\text{ mL}$, $C_{SO}=2\text{mM}$, $C_h=200\text{g/L}$, $0,1\text{M}$ phosphate buffer 50 mL , $t=48\text{h}$, $T=33\text{ }^\circ\text{C}$))

Her enzimin en iyi çalıştığı bir pH aralığı vardır. Enzim aktivitesinin pH ile ilgili olmasının nedeni, enzimlerin proteinlerden oluşmasındandır. Kuvvetli asitler ve bazlar enzimleri koagüle ederler [17]. Bu nedenle genellikle nötr ortamlarda çalışırlar. Taze havuç için en uygun pH değerinin 7 olduğu görülmüştür. Enantiyomerik aşırılık $< \% 99$ 'dur ve pH'dan etkilenmemektedir. Dönüşüm ise $\%92\text{ c}$ olarak elde edilmiştir.

3.7. Süre Etkisi (Effect of Reaction Course)

Biyoindirgenme üzerine tepkime süresinin etkisi $24\text{-}72$ saat için incelenmiştir (Şekil 12).

Dönüşüm değeri reaksiyon süresinden etkilenirken enantiyomerik aşırılık etkilenmemiştir. 48 h sonunda dönüşüm $\% 92$ değerine ulaşmıştır. En uygun çalışma süresinin 48 h olduğuna karar verilmiştir ($\% >99\text{ ee}$ ve $\% 92\text{ c}$). 48 h 'ten sonra reaksiyon hızı zamanla daha yavaş bir şekilde değişmeye başlamıştır.



Şekil 12. Taze havuç hücreleri ile asimetric olarak biyoindirgemeye süre etkisi ($V=51\text{mL}$, $C_{SO}=2\text{mM}$, $C_h=200\text{g/L}$, $\text{pH}=7$, $0,1\text{M}$ fosfat tamponu 50 mL , $T=33^\circ\text{C}$) (Effect of reaction course ($V=51\text{mL}$, $C_{SO}=2\text{mM}$, $C_h=200\text{g/L}$, $\text{pH}=7$, $0,1\text{M}$ phosphate buffer 50 mL , $T=33^\circ\text{C}$))

Yatışkın durumun, belirli bir büyüklüğün bulunduğu sistemde zamanla değerinin aynı kalması olarak tanımlanabildiği düşünülürse [17], bu çalışmada gerçekleşen enzimatik reaksiyon için yatışkın duruma gelme süresinin 48 h olduğu anlaşılmaktadır.

4. SONUÇLAR (CONCLUSIONS)

Hücre içi bir enzim olan alkoldehidrojenazın çeşitli bitkilerdeki (taze havuç, patates, üzüm, turp) aktivitesi sırası ile 16, 2, 10 ve 6 U/L olarak ölçülerek biyoindirgenme tepkimesi için uygun bitki seçimi yapılmıştır.

Asetofenonun enantiyoseçimli biyoindirgenmesi ile (S)-1-fenil etanolün üretimi, ADH kaynağı olarak 16 U/L enzim aktivitesine sahip taze havuç biyokatalizörlüğünde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma kapsamında enantiyomerik saflıkta (S)-1-fenil etanol üretimine enzim kaynağı, biyokatalizör çapı, substrat derişimi, sıcaklık, tepkime süresi, tepkime pH ve biyokatalizör derişiminin etkisi araştırılmıştır. Enantiyoseçimli asimetric biyo- indirgenme tepkimesinde biyokatalizör olarak kullanılan taze havuç içindeki ADH enzimi, tepkimeyi yüksek dönüşüm ve enantiyoseçimlilikte katalizlemiştir.

Biyotransformasyon verimi üzerine yapılan çalışmalarda; asetofenonun yüksek substrat derişimi değerlerinde inhibisyona sebep olduğu belirlenmiştir. 2mM substrat derişiminde taze havuç biyokatalizörü ile gerçekleştirilen biyoindirgenme deneylerinde $\%<99\text{ee}$ ve $\%92\text{ c}$ değerleri elde edilmiştir.

Biyokatalizör olarak taze havucun kullanıldığı çalışmalarda biyokatalizör derişimi olarak, hem tepkimenin maliyeti hem de tepkimeyi yüksek enantiyoseçimlilikte katalizlemesi bakımından 200 g/L enzim miktarının daha uygun olduğu düşünülmektedir.

Tepkime sıcaklığı enzimatik tepkimeler üzerinde büyük etkiye sahiptir. Yapılan deneylerde sıcaklığın enantiyomerik aşırılık değerini etkilemediği, dönüşümü ise etkilediği gözlenmiştir. En uygun sıcaklığın $<\%99\text{ ee}$ ve $\%92\text{ c}$ değerleri ile 33°C olduğu görülmüştür.

Her enzimin en iyi çalıştığı bir pH aralığı vardır. Aşırı asidik ve bazik ortamlardan etkilenirler. Genellikle nötr ortamlarda çalışırlar. Taze havuç için en uygun pH değerinin 7 olduğu görülmüştür.

Tepkime süresinin enantiyomerik aşırılık değerini etkilemediği görülmüştür. Sürenin artması ile birlikte dönüşüm değerlerinde belirgin bir artış gözlenmiştir. 48h sonunda $>\%99\text{ ee}$ ve $\%92\text{ c}$ olarak bulunmuştur.

Yadav ve ark., [10] tarafından biyokatalizör olarak havuç hücreleri kullanılarak tetrahidropiranollerin enantiyoseçimli indirgenmesinin gerçekleştirildiği çalışmada $\%83\text{-}94\text{ ee}$ aralığında (S)-alkoller elde etmişlerdir.

Bu çalışmada (S)-alkoller $>\%99\text{ ee}$ ile elde edilmiştir. Yapılan bu çalışma, asetofenonun biyokatalizör olarak bitki hücresi kullanılarak enantiyoseçimli indirgenmesi ile pek çok farmakolojik ürünün çıkış maddesi olan (S)-1-fenil-etanolün üretimi açısından önemini göstermiştir.

SEMBOLLER (SYMBOLS)

C_S, C_R, C_o :	Enantiyomer ve başlangıç substrat derişimleri
C:	Final substrat derişimi
ee, c:	Enantiyomerik aşırılık ve dönüşüm
ADH:	Alkoldehidrojenaz
$\Delta\text{Abs}/\text{dak}$:	Absorbanstaki net artış
V_T :	Toplam hacim, mL
V_o :	Örnek hacmi, mL
b:	Küvet ışık yolu uzunluğu (1 cm)
ϵ :	340 nm 'de $\beta\text{-NADH}$ için absorpsiyon sabiti ($\epsilon=6,22\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [18]

TEŞEKKÜR (ACKNOWLEDGEMENTS)

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu (12B4343010) tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR (REFERENCES)

- Wanda, K.M. ve Agnieszka, M., "Enantio selective reduction of bromo- andmethoxy acetophenone derivatives using carrot and celeriac enzymatic system", **Tetra hedron :Asymmetry**, Cilt 15, No 13, 1965–1967, 2004.
- Williams, R.C., Riley, C.M., Sigvardson, K.W., Fortunak, J., Nicolas, E.C., Unger, S.E., Krahn, D.F. ve Bremmer, S.L., "Pharma ceutical development and spesification of stereoisomers",

- Pharmaceutical and Bio medical Analysis**, Cilt 17, No 6-7, 917-924, 1998.
3. Kordikowski, A., York, P. ve Latham, D., "Resolution of ephedrinein supercritical CO₂: a novel technique for separation of chiral drugs", **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Cilt 88, No 8, 786-791, 1999.
 4. Kurbanoglu, E. B., Zilbeyaz, K., Ozdal, M. ve Taşkin, M., "Asymmetric reduction of substituted acetophenones using once immobilized *Rhodotorula glutinis* cells", **Bioresource Technology**, Cilt 101, No 11, 3825-3829, 2010.
 5. Leandro, H. A., Roberto, S.U., Alvaro, T.O., Andre, L.M.P. ve Joao, V.C., "Edible catalysts for clean chemical: Bioreduction of aromatic ketones and biooxidation of secondary alcohols using plants", **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Cilt 38, No 2, 84-90, 2005.
 6. Giri, A., Dhinga, V., Giri, C.C., Singh, A., Ward, O.P. ve Narasu, M.L., "Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects", **Biotechnology Adv.**, Cilt 19, No 3, 175, 2001.
 7. Rao, B.A., Rao, V.K., Rahaman, H.U.R., Prasad, A.R., Krishna, A.D., Sabitha, G., Reddy, G.S.K.K. ve Yadav, J.S., "Daucus carota and baker's yeast mediated bio-reduction of prochiral ketones", **Tetrahedron: Asymmetry**, Cilt 18, No 6, 717-723, 2007.
 8. Aydoğan, Ö., **Ketonların Biyokatalitik İndirgenmesi İle Enantiyomerik Safılıkta Kiral Madde Üretimi**, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2012.
 9. Wanda, K. M. ve Agnieszka, M., "Enantioselective reduction of bromo and methoxy acetophenone derivative using carrot and celeriac enzymatic system", **Tetrahedron Asymmetry**, Cilt 15, No 13, 1965-1967, 2004.
 10. Yadav, J.S., Basi, V.S.R., Cihittamuru, S. ve Adari, B.R., "Enantioselective reduction of prochiral ketones employing sprouted *Pisum sativa* as biocatalyst", **Division of Organic Chemistry**, Cilt 11, 1881-1885, 2009.
 11. Ramesh, N.P., "Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by bio catalysis", **C. Chem. Rew.**, Cilt 252, No 5-7, 659-701, 2008.
 12. Demirtaş, H., **Aminoasit ve Aminlerin Enantiyomerik Tanınması İçin Kiral Reseptörlerin Sentezi ve Uygulamaları**, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2009.
 13. Ghanem, A. ve Aboul-Enein, H.Y., "Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents", **Tetrahedron: Asymmetry**, Cilt 15, No 21, 3331-3351, 2004.
 14. Durak, Z., E. ve Gürü, M., "Alkalen fosfataz (Alp) enziminin özütlenmesi, inhibisyonu ve kinetik modellenmesi", **Journal of The Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University**, Cilt 28, No 1, 209-215, 2013.
 15. Yu, W., Lixiang, L., Cuiqing, M., Chao, G., Fei, T. ve Ping, X., "Engineering of cofactor regeneration enhances (2S,3S)-2,3-butanediol production from diacetyl", **Scientific Reports**, Cilt 3, No 2643, 2013.
 16. Valivety, R.H., Halling, P.J., Peilow, A.D. ve Macrae, A.R., "Lipases from different sources vary widely in dependence of catalytic activity on water activity", **Biochim. Biophys. Acta**, No 1122, 143-146, 1992.
 17. Shuler, M.L. and Kargı, F., 1992, **Bioprocess Engineering**, Prentice-Hall, Inc., USA.
 18. Hummel, W., Abokitse, K., Drauz, K., Rollmann, C. ve Gröger, H., "Towards a Large-Scale Asymmetric Reduction Process with Isolated Enzymes: Expression of an (S)-Alcohol Dehydrogenase in *E. coli* and Studies on the Synthetic Potential of this Biocatalyst", **Adv. Synth. Catal.**, Cilt 345, No 1-2, 153-159, 2003.