

T.C.
BAYBURT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

***WEİSSELLA PARAMESENTEROİDES* BİYOKATALİZÖRÜ İLE PROKİRAL
KETONLARIN ASİMETRİK İNDİRGENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Caner TOZLU

Nisan - 2019

BAYBURT

***WEISSELLA PARAMESENTEROİDES* BİYOKATALİZÖRÜ İLE PROKİRAL
KETONLARIN ASİMETRİK İNDİRGENMESİ**

Caner TOZLU

**Yüksek Lisans Tezi
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
Danışman: Doç.Dr. Engin ŞAHİN**

T.C.
BAYBURT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

WEISSELLA PARAMESENTEROİDES BİYOKATALİZÖRÜ İLE PROKİRAL
KETONLARIN ASİMETRİK İNDİRGENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Caner TOZLU

2019
BAYBURT
Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAY SAYFASI

Weissella Paramesenteroides Biyokatalizörü İle Prokiral Ketonların Asimetrik İndirgenmesi

Doç.Dr. Engin ŞAHİN danışmanlığında, Caner TOZLU tarafından hazırlanan bu tez çalışması 03/04/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof.Dr. Özkan AKSAKAL

İmza : 

Üye : Doç.Dr. Engin ŞAHİN

İmza : 

Üye : Doç.Dr. Enes DERTLİ

İmza : 

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum.

(imza)

Prof.Dr. Metin UÇURUM
Enstitü Müdürü (V.)

Not: Bu tezde kullanılan ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tez içindeki bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu ve bu çalışmada şahsıma ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yaptığımı bildiririm.



Caner TOZLU

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

***WEISSSELLA PARAMESENTEROİDES* BİYOKATALİZÖRÜ İLE PROKİRAL KETONLARIN ASİMETRİK İNDİRGENMESİ**

Caner TOZLU

Bayburt Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman : Doç.Dr. Engin ŞAHİN

Enantiyomerik saf maddeler endüstrideki konumu itibariyle günümüz araştırmacılarının uğraş alanlarından biridir. Enantiyomerik saflıkta elde edilen kiral alkoller endüstride büyük bir yere ve öneme sahiptir. Prokiral ketonların enantiyomerikçe zengin sekonder alkollere indirgenmesi sonucu enantiyomerik saflıkta kiral madde üretimi üzerine çalışmalar önem kazanmıştır.

Bu çalışmada prokiral ketonların biyoindirgenmesiyle endüstride çeşitli alanlarda kullanılan optikçe aktif kiral sekonder alkoller elde edildi. Dört farklı bakteri suşu kullanılarak prokiral ketonların asimetric indirgenmesinde biyokatalizör olarak değerlendirildi. Bu suşlar arasından *Weissella paramesenteroides* N7'nin ketonlara karşılık gelen alkollerin indirgenmesinde en uygun biyokatalizör olduğu belirlenmiştir. Reaksiyon koşulları, indirgeyici madde için, yüksek enantiyoselektiflik ve dönüşüm gösteren bu biyokataliz için sistematik olarak optimize edilmiştir. *Weissella paramesenteroides* N7 ile 1-(4-metoksifenil)propan-1-on (**1r**)'nin asimetric indirgenmesi, (*R*)-1-(4-metoksifenil)propan-1-ol (**2r**) >%99 enantiyomerik aşırılık ve %94 verimle elde edildi. *Weissella paramesenteroides* N7'nin mükemmel verim ve enantiyoseçiciliğe sahip kiral karbonil bileşikler elde etmek için biyokatalizör olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Bu metod hafif ve çevre dostu yöntem ile biyolojik öneme sahip sekonder kiral alkollerin sentezi için umut vaat eden ve alternatif bir yaklaşım gerektirmektedir.

2019, 87 sayfa

Anahtar kelimeler: Kiralite, Asimetric sentez, Biyokatalizör, Kiral alkoller, Enantiyoseçici indirgenme, Keton, *Weissella paramesenteroides*

ABSTRACT

MS Thesis

ASYMMETRIC REDUCTION OF PROCHIRAL KETONES WITH *WEISSELLA* *PARAMESENTEROIDES* BIOCATALYST

Caner TOZLU

Bayburt University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Department of Food Engineering
Supervisor : Assoc.Dr. Engin ŞAHİN

Enantiomeric pure substances are one of the fields of interest of today's researchers in the industry. Chiral alcohols obtained in enantiomeric purity have a great place and importance in industry. As a result of the reduction of prochiral ketones to enantiomerically rich secondary alcohols, studies on the production of chiral substances with enantiomeric purity have gained importance.

In this study, optically active chiral secondary alcohols which are used in various fields in the industry have been obtained by biotransformation of prochiral ketones. Four different lactic acid bacteria strains were used as biocatalyst in asymmetric reduction of prochiral ketones. Among these strains, *Weissella paramesenteroides* N7 was found to be the most suitable biocatalyst for the reduction of alcohols to ketones. The reaction conditions are systematically optimized for this biocatalysis with high enantioselectivity and conversion for the reducing agent. Asymmetric reduction of 1- (4-methoxyphenyl) propan-1-one (**1r**) by *Weissella paramesenteroides* N7, (*R*)-1- (4-methoxyphenyl) propan-1-ol (**2r**) > 99% enantiomeric excess and % 94 yields. *Weissella paramesenteroides* show that N7 can be used as a biocatalyst to obtain chiral carbinol with excellent yield and enantioselectivity. This method requires a promising and alternative approach to the synthesis of biologically important secondary chiral alcohols by a light and environmentally friendly method.

2019, 87 pages

Keywords : Chirality, Asymmetric synthesis, Biocatalyst, Chiral alcohols, Enantioselective reduction, Ketone, *Weissella paramesenteroides*

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum bu çalışma, Bayburt Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde Doç.Dr. Engin ŞAHİN yöneticiliğinde gerçekleştirilmiştir.

Yaptığım çalışmalarımın her aşamasında her konuda desteğini benden esirgemeyen, bilgi ve birikimlerini her zaman benimle paylaşan yaptığım çalışmalarda başarılı olmamı sağlayan sayın hocam Doç.Dr. Engin ŞAHİN'e, çalışmalarım aşamasında vermiş olduğu destek ve yardımlarından dolayı Doç.Dr. Enes DERTLİ'ye laboratuvar çalışmalarına başladığım andan itibaren her konuda destek ve yardımlarını benden esirgemeyen Sayın Hümeysra İSPIRLİ'ye, Sayın Zühal ALKAY'a, Sayın Kübra PURUTOĞLU'na, Sayın Selda ÖKSÜZ'e çok teşekkür ederim.

Hayatımın her anında benim maddi ve manevi olarak buralara kadar gelmeme destek olan, bana her zaman güven duyan, yaptığım her işte arkamda duran çok sevdiğim aileme sonsuz teşekkür ediyorum.

Caner TOZLU

Nisan /2019

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|------|
| ÖZET..... | i |
| ABSTRACT..... | ii |
| TEŞEKKÜR | iii |
| İÇİNDEKİLER | iv |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | vi |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ | viii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 1.1 Kiralite..... | 1 |
| 1.1.1 Enantiyomerler ve Özellikleri..... | 2 |
| 1.1.2 Optikçe Aktiflik..... | 3 |
| 1.1.3 Rasemik Karışım..... | 4 |
| 1.2 Asimetrik Sentezin Önemi | 5 |
| 1.2.1 Asimetrik Sentez | 6 |
| 1.3 Enantiyomerik Olarak Saf Bileşiklerin Sentez Yöntemleri | 6 |
| 1.3.1 Stereoseçimli Sentez..... | 7 |
| 1.3.2 Rasemat Rezolüsyonu..... | 7 |
| 1.3.2.1 Tercihli Kristalizasyon | 8 |
| 1.3.2.2 Diastereomer Kristalizasyon..... | 8 |
| 1.3.2.3 Kromatografi..... | 8 |
| 1.3.2.4 Kinetik Rezolüsyon | 9 |
| 1.4 Kiral Sekonder Alkollerin Önemi..... | 9 |
| 2. KAYNAK ÖZETLERİ | 11 |
| 2.1 Kiral Sekonder Alkollerin Elde Edilme Yöntemleri | 11 |
| 3.MATERYAL ve METOD | 23 |
| 4. ARAŞTIRMA VE BULGULAR..... | 29 |
| 4.1 Kromatografik Ayırmalar | 29 |
| 4.1.1 Kolon Kromatografisi..... | 29 |
| 4.1.2 İnce Tabaka Kromatografisi..... | 29 |
| 4.2 Spektrumlar | 29 |
| 4.2.1 ¹ H-NMR Spektrumları..... | 29 |
| 4.2.2 ¹³ C-NMR Spektrumları..... | 29 |
| 4.2.3 HPLC Spektrumları | 29 |
| 4.3 Deneyler | 29 |

| | |
|--|----|
| 4.3.1 Genel Asimetrik İndirgenme Prosedürü | 29 |
| 5.SONUÇ..... | 37 |
| EKLER..... | 50 |
| EK 1 HPLC SPEKTRUMLARI | 50 |
| EK 2 NMR SPEKTRUMLARI..... | 69 |
| ÖZGEÇMİŞ | |



ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Şekil 1.1 Kiral bir molekül olan Limonen'in ayna görüntüsü | 1 |
| Şekil 1.2 Kiral bir bileşiğin iki farklı enantiyomerik yapısı..... | 2 |
| Şekil 1.3 Karvonun enantiyomeri | 3 |
| Şekil 1.4 2-Bütanol molekülünün enantiyomerleri | 3 |
| Şekil 1.5 1982'den önce kullanılan kiral ilaçların tek enantiyomer veya rasemat şeklinde kullanımı | 4 |
| Şekil 1.6 Talidomid'in yapısı | 5 |
| Şekil 1.7 Kinetik rezolüsyon, asimetric sentez ve derasemizasyon yöntemleri (R,S: Substrat enantiyomerleri, PQ: Ürün enantiyomerleri, A: Prokiral veya mezo başlangıç maddesi..... | 6 |
| Şekil 1.8 Enantiyomerik saflıkta bileşiklerin elde edilme yöntemleri | 7 |
| Şekil 1.9 Steroseçimli sentez | 7 |
| Şekil 1.10 Rasemat rezolüsyonu için metotlar | 8 |
| Şekil 1.11 Bazı farmasötik bileşiklere örnekler | 10 |
| Şekil 2.1 2-bromo-4-floro asetofenonun mikrobiyal biyoindirgenmesi..... | 14 |
| Şekil 2.2 Benzaldehit ve pirüvatın R-PAC'ye biyotransformasyonu | 16 |
| Şekil 2.3 a-haloketonların maya katalizli indirgenmesi..... | 16 |
| Şekil 2.4 o-floroasetofenonun asimetric indirgenmesi..... | 17 |
| Şekil 2.5 Farklı tutklanma matrislerinin dönüşüm ve tutuklama etkinliğine etkisi..... | 20 |
| Şekil 2.6 Weissella paramesenteroides N7 ile aromatik ketonların asimetric indirgenmesi | 22 |
| Şekil 2.7 1-(4-methoxyphenyl) propan-1-one (1r)'nin gram skalada asimetric indirgenmesi..... | 28 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|---|-----------|
| Çizelge 2.1 Enzimlerin sınıflandırılması | 13 |
| Çizelge 2.2 2-bromo-4-floro asetofenonun mikroorganizmalar tarafından indirgenmesi..... | 14 |
| Çizelge 2.3 Farklı funguslarla asetofenonun biyoindirgenmesi ($C_{SO}= 8$ mM, pH= 6, T=28 °C, N=200 rpm) | 15 |
| Çizelge 2.4 Tutuklanmış hücrelerle asetofenonun biyoindirgenmesine sıcaklık, pH ve sürenin etkisi ($C_{SO}= 1$ mM, t= 12 h) | 16 |
| Çizelge 2.4 SK-CO ₂ ortamında biyoindirgenen ketonlar | 17 |
| Çizelge 2.5 Asetofenonun farklı bitki hücreleriyle biyoindirgenmesi ($C_{SO}=10$ mM, t=4 gün, T=30 °C, pH 7) | 18 |
| Çizelge 2.6 Asetofenonun biyoindirgenmesi..... | 19 |
| Çizelge 3.1 Asetofenon'un asimetric indirgenmesinde en iyi <i>N7 Weissella paramesenteroides</i> bakteri suşunun belirlenmesi | 23 |
| Çizelge 3.2 <i>Weissella paramesenteroides</i> N7 bakteri suşu kullanılarak asetofenonun biyoindirgenme parametrelerinin optimizasyonu | 24 |
| Çizelge 3.3 <i>Weissella paramesenteroides</i> N7 bakteri suşu kullanılarak asetofenon türevlerinin asimetric indirgenmesi | 25 |

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

| | |
|-----------------|-----------------------------|
| ee | Enantiyomerik aşırılık |
| m | Meta |
| o | Orto |
| p | Para |
| μ l | Mikrolitre |
| RT | Oda sıcaklığı |
| mmol | Milimol |
| ml | Mililitre |
| C _{so} | Başlangıç substrat derişimi |

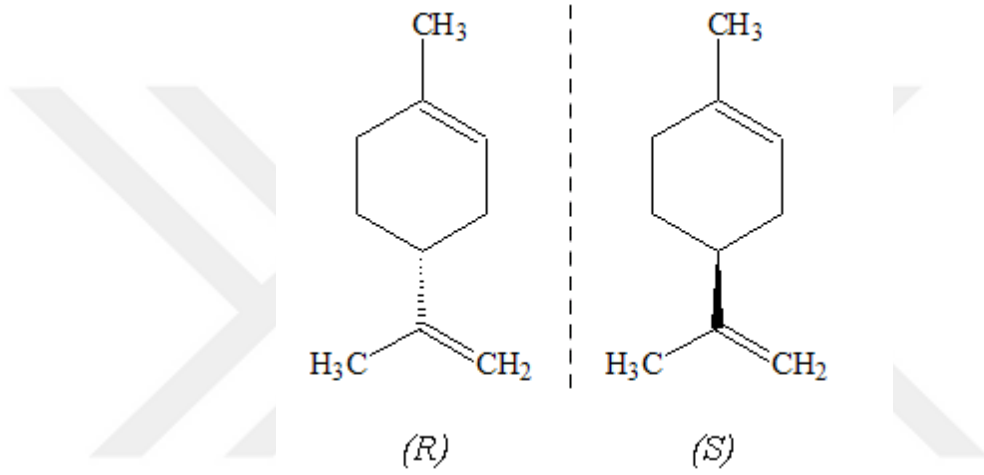
Kısaltmalar

| | |
|-----|---------------------------|
| ADH | Alkol Dehidrogenaz Enzimi |
| LAB | Laktik Asit Bakterileri |
| TLC | İnce Kağıt Kromotografisi |

1. GİRİŞ

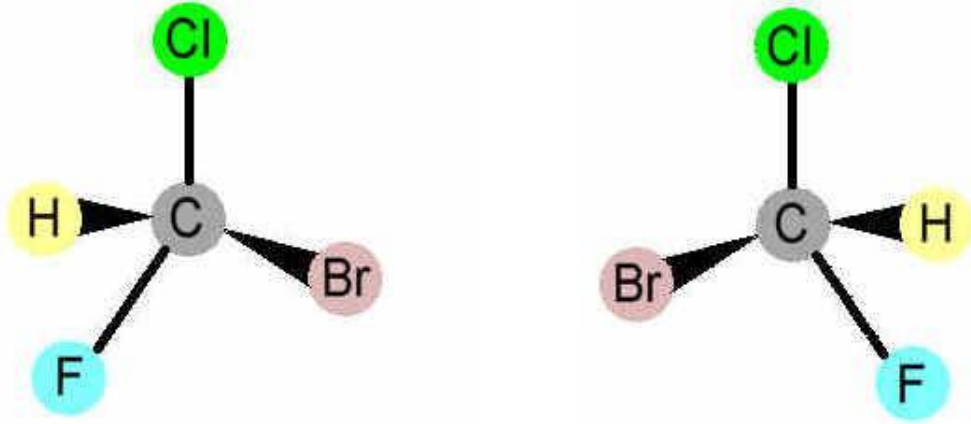
1.1 Kiralite

Kiral kelimesinin Yunanca'da el anlamındaki cheiros sözcüğünden gelmektedir. Ayna görüntüsüyle üst üste çakışık olmayan bir nesneye kiral denir (Tüzün, 1994). Kiral molekül ve onun ayna görüntüsü arasındaki ilişki enantiyomerik ilişki olarak ifade edilir. Ayna görüntüsü ile üst üste çakışan nesnelere ise akiral nesnelere denir (Solomons, 2000).



Şekil 1.1 Kiral bir molekül olan Limonen'in ayna görüntüsü

Moleküllerin kirallığı nispeten basit moleküller üzerinden gösterilebilir. Örneğin; bromokloroflorometan molekülündeki karbon atomuna dört farklı grup bağlanmıştır. Bu molekülün ayna görüntüleri birbiriyle çakışmaz (Şekil 1.2). Merkezdeki karbon atomu stereomerkez olarak kabul edilir. Birbirinin ayna görüntüsü olan bu yapılardan biri polarize ışığın düzleminde sağa doğru, diğeri sola doğru dönmesini sağlayan iki optik izomerdir, yani enantiyomerlerdir. Kiral karbon atomlarından gözlenen disimetri molekülün optikçe aktifliğini belirler (Sheldon, 1993).

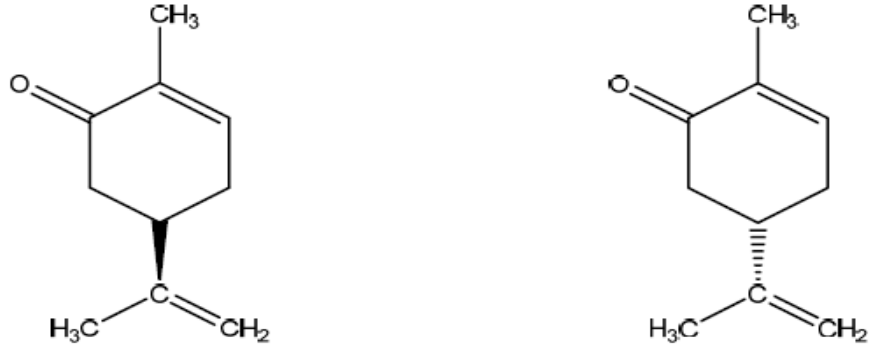


Şekil 1.2 Kiral bir bileşiğin iki farklı enantiyomerik yapısı

Bu kiral yapılar enzim ya da reseptör moleküllerdir. İyi bilinen bir gözlemlerle bazı maddelerin farklı koku ve tat olmalarıdır (DauBmann, 2006).

1.1.1 Enantiyomerler ve Özellikleri

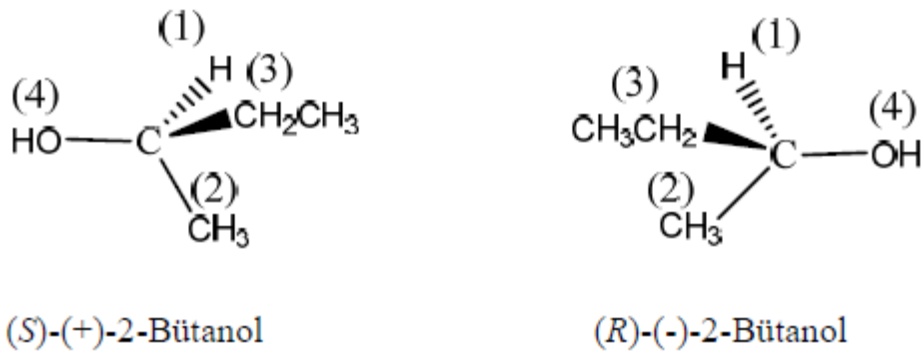
Enantiyomerler, molekül veya bir nesne ile o molekülün ayna görüntüsü olan ve üst üste çakışık olmayan stereoizomerlerdir. Başka bir deyişle kiral bir objenin her iki formu enantiyomerler olarak adlandırılır. Kiral moleküller *R* ve *S* olmak üzere iki enantiyomere sahiptirler. Enantiyomerlerden birisi polarize ışık düzlemini sağa (+), diğeri sola (-) çevirir (Şekil 1.3). Enantiyomerlerin genellikle fiziksel ve kimyasal özellikleri aynıdır. Aynı kaynama noktası, erime noktası, yoğunluk ve çevirme açısı büyüklüğüne sahiptirler. Enantiyomerler, kristalizasyon, ekstraksiyon, distilasyon gibi yöntemlerle ayrılamazlar. Enantiyomerler, düzlem polarize ışığı eşit açıda ancak zıt yöne çevirirler (Tüzün, 1994). Bu durum, enantiyomerlerin biyolojik etkilerinde birbirinden farklı olmasına neden olmaktadır. Enantiyomerlerden biri biyolojik aktiviteye sahip iken diğeri toksik etki gösterebilmekle beraber, diğeri enantiyomerin etkisini de yok etme eğiliminde olabilmekte ve istenmeyen safsızlık olarak nitelendirilmektedir. Bundan dolayı enantiyomerik saflıkta ürün elde edilebilmesi büyük bir önem taşımaktadır. (Çelebi vd, 2006).



Şekil 1.3 Karvonun enantiyomeri

1.1.2 Optikçe Aktiflik

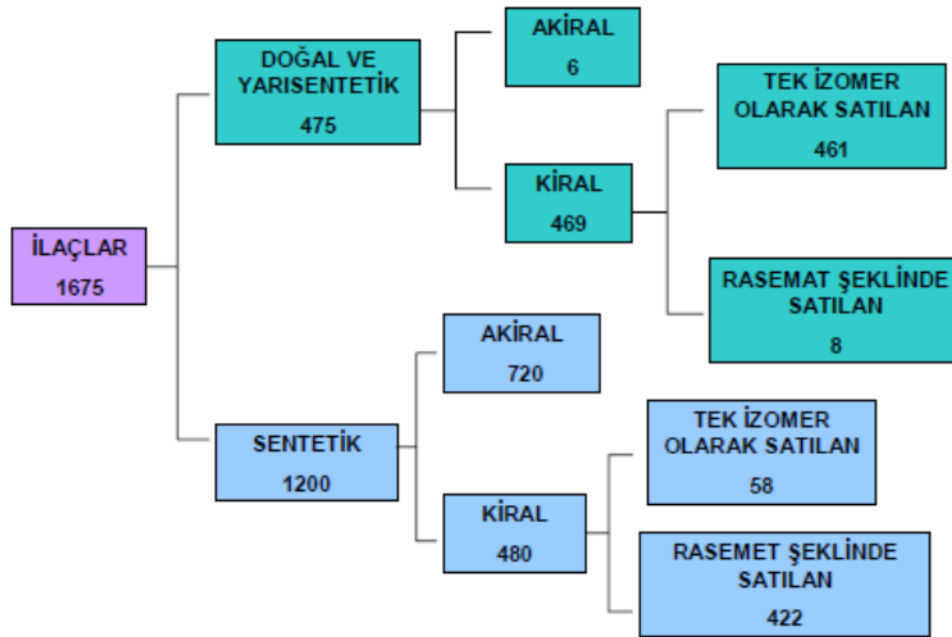
Işık içerisinden geçtiği zaman rezonans düzlemini değiştirebilen maddeler optikçe aktif madde olarak isimlendirilirler. Bu madde organik yapıda veya inorganik yapıda bulunabilirler. Örnek verilecek olursa; kuvars, kalsit, aragonit vb. mineral maddeler ile doğal laktik asit, malik asit vb. çeşitli organik yapıdaki bileşikler bu nitelikleri gösterebilmektedirler ve polarize ışığın rezonans düzlemi üzerinden geçerken belirli bir derecede sağa doğru ya da sola doğru çevirebilirler. Yalnız bu özelliğine bakılacak olursa, bu iki bileşiğin aralarında önemli ölçüde bir fark vardır. Bu özelliklere sahip olan inorganik yapıdaki bileşiklerin yalnız kristal yapılarının özellikleri ile alakalıdır. Örneğin; eritilmiş ya da bir çözücü içerisinde çözüldürülerek maddenin kristal olan yapısı değiştiğinde o maddenin özelliği kaybolur. Oysa optikçe aktiflik özellikleri organik yapıdaki bileşiklerin, molekül yapılarına bağlı olduğundan dolayı kristal yapılarını etkilemez. Optikçe aktif olan organik yapıdaki bir bileşik eritilirse, bir çözücü içerisinde çözülsün ya da buhar haline getirilmiş olsa bile bu özelliği kaybetmezler (Tüzün, 1994).



Şekil 1.4 2-Bütanol molekülünün enantiyomerleri

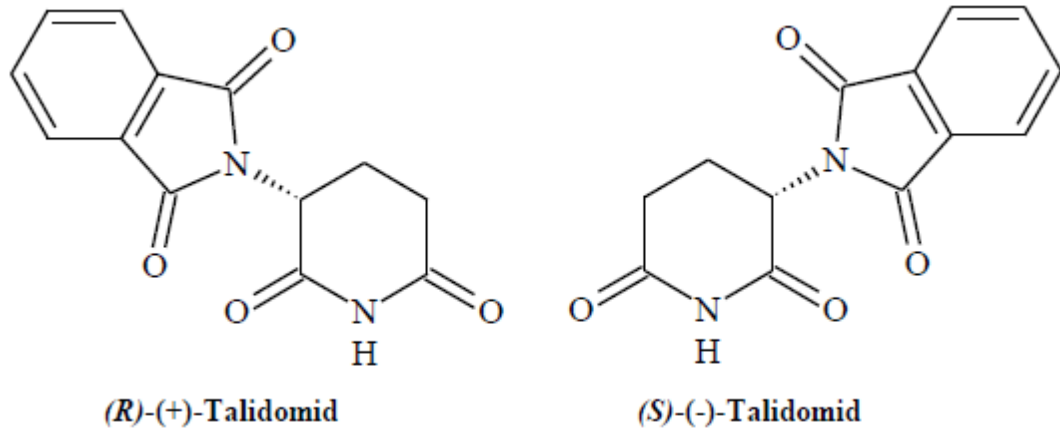
1.1.3 Rasemik Karışım

R ve S enantiomerlerini eşit miktarda içeren karışımlar rasemik karışım ya da rasemat olarak adlandırılır. Rasemik karışımlar optikçe aktiflik göstermezler çünkü polarize ışığı biri sağa çevirirken diğeri sola çevirerek polarize ışık düzlemindeki net değişim sıfır olur (Morrison-Boyd, 1966). Farmakolojik olarak kiral bileşiklerin sentezlenmesi rasemik karışım şeklindedir. Farmasötik sanayide önemli rolü olan kiral maddelerin enantiomerler farklı etkiler gösterebilmektedirler. Biri istenen özelliğe sahipken diğeri enantiomer istenmeyen özellik gösterebilmektedir. İstenmeyen özellik gösteren enantiomer zararlı etki göstereceğinden dolayı %1 seviyelerine kadar düşürülmesi istenir. Farmasötik sanayide, gıda, biyokimya endüstrisi açısından optikçe aktif olan tek enantiyomerli bileşikler tercih edilmektedirler (Tüzün, 1994). Dünya genelinde üretimi yapılmış 5000 kayıtlı ilacın üçte bir kısmı hem doğal ürün hem de bu maddelerin kimyasal modifikasyonu ile elde edilen maddelerden oluşmaktadır. Bu moleküller rasemik veya enantiyomerik saflıkta bulunabilirler. Kiral olmakla beraber doğal moleküllerden elde edilen ilaçların çoğunda rasemik karışım şekline değil tek bir enantiomer olarak üretilirler (Babaarslan, 2008).



Şekil 1.5 1982'den önce kullanılan kiral ilaçların tek enantiyomer veya rasemat şeklinde kullanımı

Geçmiş yıllarda rasemik halde satılan ilaçların ciddi yan etkiler oluşturduğu bilinmektedir. Bu konuya örnek verilebilecek en çarpıcı örnek Thalidomide ilacıdır. Bu ilaç 1957-1960 yılları arasında hamile bayanların mide bulantısı, kusma gibi rahatsızlıklarının çözümü için piyasaya sürülmüştür. 1960 yılı ve sonrasında bu ilacı kullanan bayanların çocuklarında fizyolojik bozukluklar meydana geldiği gözlemlenmiştir. Sonrasın yapılan çalışmalarda görülmüştür ki Thalidomide'in R enantiomerinin bulantı ve kusmayı önleyici etki gösterdiği belirlenirken S enantiomerinin ise fizyolojisi bozuk çocukların meydana gelmesine yol açtığı tespit edilmiştir (Ananthanarayanan vd, 1993). Görüldüğü gibi aktif enantiomeri tespit ederek enantiomerik saflıkta ilaç üretmek ve istenilen aktiviteyi göstermeyen enantiomerin meydana getireceği olumsuzlukları ve yan etkilerin önüne geçmek çok büyük öneme sahiptir (Tüzün. 1994).



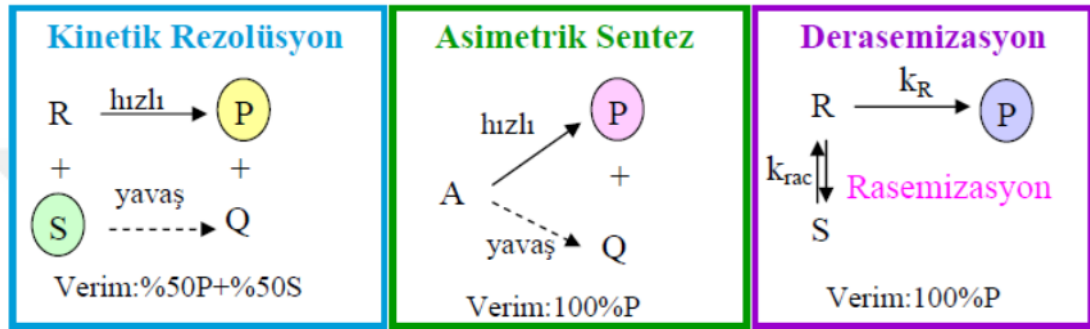
Şekil 1.6 Thalidomid'in yapısı

1.2 Asimetrik Sentezin Önemi

Bitki ve hayvan yaşamında önemli rol oynayan kiralite aynı zamanda tarım, ilaç ve kimya endüstrisinde hayati bir önem sahiptir. Enantiyomerik olarak saf bileşiklerin hazırlanması, enantiyomerlerin farklı aktivite gösterebilme yeteneğinden dolayı bu sektörler açısından oldukça talep gören bir vazife haline gelmiştir (Sanchez vd, Busto vd, Fernandez vd, Malpartida vd ve Gotor vd, 2011). Asimetrik organik senteze ve analitik ayırma teknolojisinde yaşanan gelişmelerin, ilaç endüstrisi ekseninde rasemattaki her enantiyomerin farmodinamik ve farmokinetik özelliklerinin araştırılmasına yeni boyutlar kazandıracığı gayet açıktır. Farklı farmakolojik aktivitelerinin doğal sonucu olarak toksik etkileride farklılaşmaktadır. Kiralitenin ilaca kazandırdığı biyolojik ve farmakolojik özellikler, kiral ilaçların global farmasötik pazarda önemli bir güç haline gelmiştir (Arroniz ve Escolano, 2012).

1.2.1 Asimetrik Sentez

Asimetrik sentez yönteminde başlangıç maddesi bir prokiral yani kiral bir madde olmadığından dolayı enantiyomerik olan bir ürünün elde edilmesinden dolayı teorik verim %100 olabilmektedir ve bu da kinetik rezolüsyona üstünlük sağlayabilmektedir. Tepkimenin ve enzimin tek olması derasemizasyona göre üstünlük sağlamaktadır. Kinetik rezolüsyon, asimetrik sentez ve derasemizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması şekildeki gibi görülmektedir (Şekil 1.7).

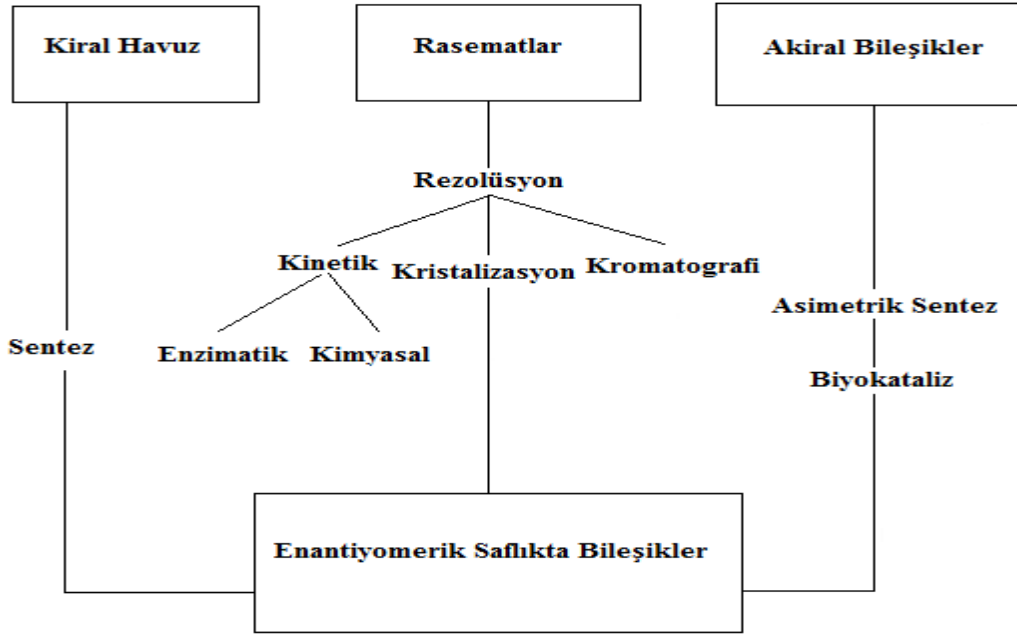


Şekil 1.7 Kinetik rezolüsyon, asimetrik sentez ve derasemizasyon yöntemleri (R,S: Substrat enantiyomerleri, PQ: Ürün enantiyomerleri, A: Prokiral veya mezo başlangıç maddesi)

1.3 Enantiyomerik Olarak Saf Bileşiklerin Sentez Yöntemleri

Ziraat veya eczacılık alanlarında kullanılan kiral yapıdaki moleküller genelde karmaşık yapılarının yanında çok fonksiyonlu yapıları da bulunmaktadır ve çok basamaklı sentez yöntemleriyle üretilebilirler (Ghanem et al, 2004).

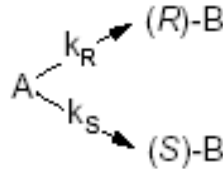
Başlangıç noktasına göre enantiyomerik saf madde elde etmek için üç farklı yöntem vardır. Stereoseçimlilik sentez metodu, kiral havuz bileşikleri olarak isimlendirilen kiral başlangıç substratı ve kimyasal veya akiral bileşiklerle gerçekleştirilebilirler (Ghanem – Aboul Enein, 2004).



Şekil 1.8 Enantiyomerik saflıkta bileşiklerin elde edilme yöntemleri

1.3.1 Stereoseçimli Sentez

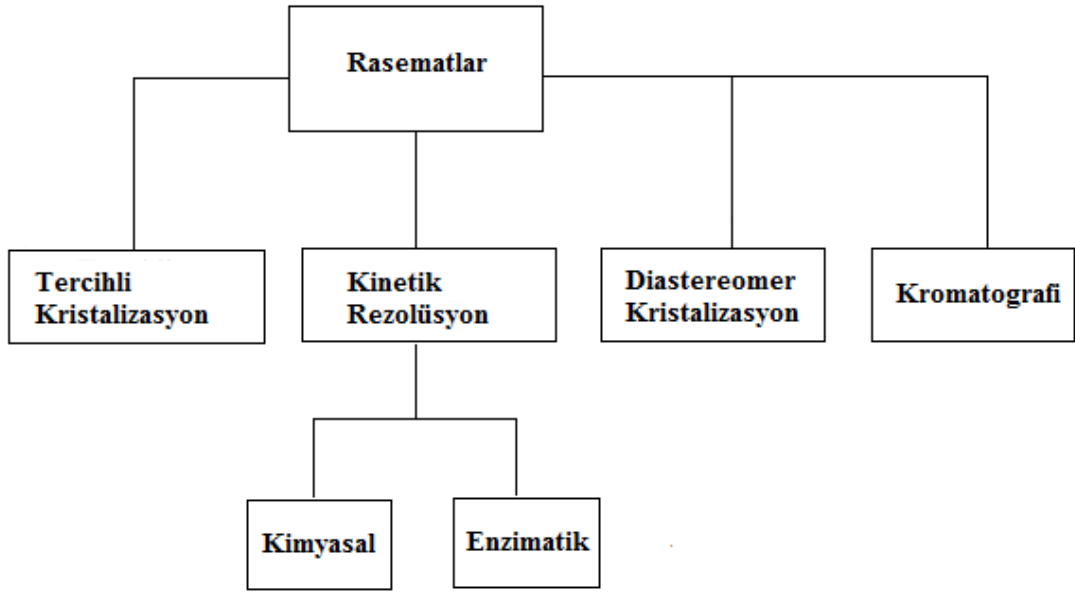
Kiral havuz bileşikleri olarak isimlendirilen başlangıç substratı, kimyasal veya biyolojik olan kiral ayırıcı ve kiral çevreden yararlanılarak akiral olan bileşikleri ile birlikte gerçekleştirilebilir.



Şekil 1.9 Stereoseçimli sentez

1.3.2 Rasemat Rezolüsyonu

Rasemat rezolüsyonu enantiyosaf bileşiğin elde edilmesi için uygulanan bir yöntemdir. Rezolüsyon, bir rasem bileşiğin enantiomerlerine ayrılması işlemidir. Bu yöntem için kristallendirme olmak üzere çeşitli fiziksel ve kimyasal metotlar geliştirilmiştir. Rasematların rezolüsyonu tercihli kristalizasyon, diastereomerik tuzların kristalizasyonu, kinetik rezolüsyon ve kromatografi yöntemi olarak dört basamakta gerçekleştirilirler (Şekil 1.10).



Şekil 1.10 Rasemat rezolüsyonu için metotlar

1.3.2.1 Tercihli Kristalizasyon

Endüstriyel boyutlarda yapılan çalışmalara bakılacak olursa bu yöntem çokça tercih edilip, kloramfenikol ve α -metil-L-dopanın sentezleri örnek olarak verilebilir. Konglomerat miktarları eşit olan enantiyomerlerin kristal yapılarının mekanik olarak karışımından elde edilir. Rasematların tümünün %20'den daha azı konglomerat olduğu için avantaj sağlayacağı söylenememektedir

1.3.2.2 Diastereomer Kristalizasyon

Rasemik haldeki bir bileşik optikçe aktif olan baz enantiyomerinin ve onun tuzu elde edildiğinde oluşan tuzlara diastereomer tuzları adı verilir. Bu tuzlar enantiyomer değil diastereomer tuzlarıdır ve çözünürlükleri ve fiziksel özellikleri birbirinden farklıdır. Ayrılma işlemi uygun bir çözücüde kristallendirme yapılarak gerçekleştirilir ve ayrılmış olan bu tuzlar mineral asitle birlikte etkileşime sokularak asidin anyonu proton alarak serbest hale dönüşebilir. Diastereomer tuzlarını oluşturabilmek için optikçe aktif katı maddeler ve bazlar doğal bileşikler kullanılır ve türleri oldukça fazladır.

1.3.2.3 Kromatografi

Kolon kromatografisi kullanılarak gerçekleştirilen bu yöntemde optikçe aktifliği olan katı haldeki maddeler (sakkaroz, glikoz, laktöz gibi şekerler) kolon dolgusu olarak kullanıldığında, kolon içerisinde rasemik halde bulunan bileşiğin çözeltisi geçirildiği zaman güçlü olan enantiyomer tutulur ve rezolüsyon gerçekleşir. Yapılan işlemde

kolon yeteri kadar uzun ise biriken çözelti içerisinde enantiyomerlerin yalnız bir tanesi yer alır. Kolon içerisinde tutulmuş olan ikinci enantiyomerde farklı bir çözücü yardımıyla ortamdaki alınabilir (Sheldon, 1993).

1.3.2.4 Kinetik Rezolüsyon

Kinetik rezolüsyon yöntemi iyi sonuç vermesinden dolayı kiral girdiyle kimyasal veya biyokimyasal katalizör yardımı ile iki enantiyomerinde tepkimelerinde verdiği hızların birbirinden farklı oluşuna bağlıdır. Kiral girdi, biyokatalizör (enzim veya mikroorganizma) veya metal kompleksler, asit veya bazlar kullanılabilir. En yaygın olanı rasemik bileşiklerin kinetik rezolüsyonu lipazların katalizlediği dönüşüm tepkimeleridir. Rasem karışımdaki İki enantiyomer arasındaki ayrımı yapan lipaz enzimidir ve enantiyomerlerden birinin diğerine göre daha hızlı ürüne dönüşümünü sağlar (Ghanem et al, 2004).

Uygulamalarının yaygın olmasına rağmen kinetik rezolüsyonun endüstriyel boyutta birçok dezavantajıda bulunmaktadır (Faber vd, 1999). Bunlar;

- Teorik verim %50'yi geçememektedir.
- Dönüşüm %50 olduğunda tepkime sona erdirilmelidir.
- Kalan substratın üründen ayrılması zor olabilmektedir. Ayrılma işlemi gerçekleştirilirken klasik yöntemlerin kullanılması yerine, kromatografik yöntemlerin kullanılması gerekmektedir.

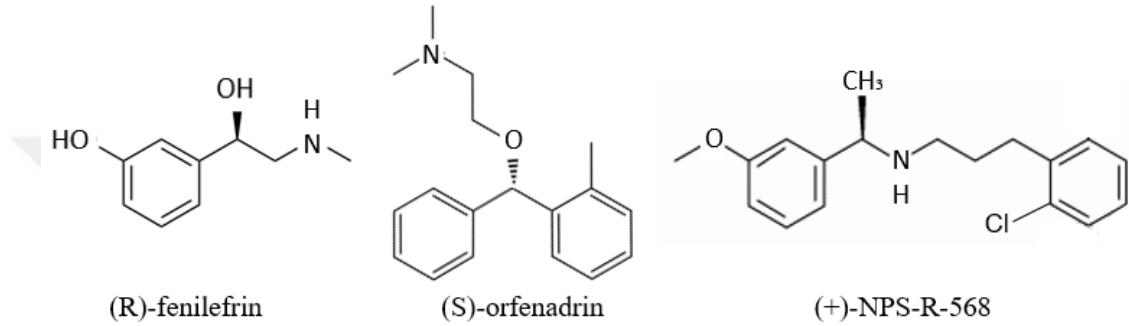
Rasemattan tek bir izomerin elde edilmesi rezolüsyon tekniklerine alternatif olarak oldukça avantajlıdır. Bu yöntem derasemizasyon olarak isimlendirilmektedir. Derasemizasyon prosesinde tepkimeye hızlı giren enantiyomer ürünü oluştururken, tepkimeye yavaş giren enantiyomer ise diğer enantiyomer azaldıkça rasemizasyon ile diğer enantiyomere dönüşmektedir. Böylece ortamdaki iki enantiyomerde ürüne dönüşebilmekte ve teorik dönüşüm %100 olabilmektedir (Tüzün, 1994).

1.4 Kiral Sekonder Alkollerin Önemi

Organik molekül sentezinde ketonların asimetrik indirgenmesi en önemli süreçtir. Enantiyomerik haldeki saf alkoller, asimetrik sentezin temel yapı taşıdır. Prokiral ketonların asimetrik sentez sonucu indirgenmesiyle kiral alkoller oluşmaktadır. Sekonder alkollerin günümüzde ilaç sanayisi başta olmak üzere birçok alanda önemli derecede kullanımı, kiral alkollere olan ilgiyi arttırmıştır (Wanda ve Agnieszka, 2004).

Optikçe aktif kiral maddeler önemli ilaçların ve doğal ürünlerin sentezinde kullanılmaktadır (Cohen ve Silverberg, 2002). Biyolojik açıdan önemli olan bu alkoller birçok molekülün sentezlenmesinde hammadde olarak rol almaktadırlar.

Optikçe aktif kiral alkoller önemli ilaçların (antidepresan, antibakteriyel özelliğe sahip ilaçlar, antidepresan özellikli ilaçlar, antivirütik ilaçlar, potasyum kanal açıcılar ve bazı kalp ilaçları) ve doğal ürünleri sentezleyebilmek için kullanılırlar. Örneğin; sentezlenmiş olan kiral alkoller, *R*-denopamin, *L*-klorpromazin, *R*-atomoksetin ve *S*-fluoksetin gibi bileşiklerde kiral ilaçların ana maddesi olarak kullanılmaktadır (Kataoka vd, 2003). *R*-fenilefrin (Legnani ve Morandi, 2016), *S*-orfenadrin (Wujkowska vd, 2016) ve (+)-NPS-R-568 (Cohen ve Silverberg, 2002; Joy vd, 2006; Nagano, 2006) (Şekil 1.11) gibi bileşiklerde optikçe aktif saf sekonder alkollerden elde edilen farmakolojik açıdan aktif bileşiklerdendir (Şahin, 2017a).



Şekil 1.11 Bazı farmasötik bileşiklere örnekler

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Kiral Sekonder Alkollerin Elde Edilme Yöntemleri

İlaçların optikçe aktif enantioseçici olarak üretilebilmesi için kiral ajan olarak biyokatalizör veya kemokatalizör kullanılabilir (Ghanem ve Aboul-Enein, 2004). Çoğunlukla tek enantiomerli üretim sağladıklarından dolayı enzim veya mikroorganizmaların katalizör olarak kullanılması biyolojik katalizörleri kapsayan çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır.

Kimyasal katalizörlerin bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bunlar; zayıf seçiciliğe sahip olmaları, çevreye zararlı toksik metal kullanımı, sert reaksiyon koşulları, tepkime esnasında oluşan yan ürünlerin fazla olması, düşük dönüşüm oranı ve maliyetlerinin fazla olmasıdır (Hage vd, 2001). Asimetrik indirgenme reaksiyonlarında kullanılan biyokatalizörler, kimyasal katalizörlere göre daha avantajlıdır.

Biyokatalizörlerin kimyasal katalizörlerle karşılaştırıldığında ki avantajları;

- Genellikle daha verimlidirler
- Seçicilik karalılık ve aktivitelerini artıracak şekilde modifiye edilebilirler
- Daha seçicidirler
- İlimli reaksiyon koşullarına sahiptirler
- Çevre dostudurlar

Dezavantajları;

- Substrat veya ürün inhibisyonuna duyarlıdır
- Çözücü genellikle sudur
- Enzimler doğada tek bir enantiomerik formda bulunurlar
- Enzimler alerjik reaksiyonlara neden olabilirler (Faber, 1997).

Biyokatalizörler tepkimelerin gerçekleşmesini oldukça hızlandırır. Mikroorganizma, bitki, hayvan ya da bunlardan izole edilen enzimler gibi biyokatalizörler yeniden üretilebilirler ve yapıları doğal olduğu için kullanım sonrasında doğaya zarar vermeden kolayca ayrışabilirler (Nakamura vd, 2003). Bundan dolayı da çevre dostudurlar. İstenmeyen izomerizasyon ve bozunma gibi yan tepkimeleri önlerler. Bölgesel spesifikliğe sahiptirler (Wu vd, 1999). Enzimatik bir tepkime sonucunda enantiomerik olarak saf bileşiklerin asimetrik sentez yöntemi kullanılarak üretilmesi biyokatalizörler için çok başarılı olan bir uygulamadır. Biyokatalizörlerin tepkimelerde sağladığı avantajlar ise yüksek derecede bölgesel ve stereoseçimliliği, çok yönlü oluşları, ılımlı tepkime koşullarına sahip olduklarıdır (Faber, 2000). Substrat veya ürün inhibisyonuna sahip olduklarından dolayı su içeren çözeltiler içerisinde reaksiyonların gerçekleştirilebilmesi ciddi dezavantaj olarak düşünülüyor olsada yanlış kanı ve önyargı olduğu ortaya çıkmıştır (Faber, 1997; Rozzell, 1999). Biyokatalizörlerin sahip oldukları özelliklerin tümü protein ve metabolik

mühendisliği metotları ile istenilen reaksiyon koşullarını sağlamak için uygun hale getirilebilir (Johannes vd, 2005).

Prokiral ketonların biyoindirgenmesi indirgenmesiyle ilgili yapılan çalışmaları 3 gruba ayırabiliriz. Bunlar;

- Saf enzimler
- Mikroorganizmalar
- Bitki ve hayvanların kültüre edilmiş hücreleridir (Tüzün, 2005).

Biyokatalizörlerin biyotransformasyon reaksiyon türleri ile gerçekleştirdikleri indirgenme tepkimeleri; büyüyen hücreler, tutuklanmış hücreler, önceden büyütülmüş hücreler, çok fazlı sistemler, immobilize hücreler ve serbest ve immobilize enzimlerle olmak üzere altı farklı yöntemle gerçekleştirilebilir (Telefoncu, 1995).

Büyüyen hücreler ile biyotransformasyon: Mikrobiyal kültürler ile bitki veya hayvan hücrelerinin büyüme ortamlarında gerçekleştirilir. Burada gerçekleşmesi beklenen tepkime koşullarına en uygun ortamın seçilmesi çok önemli bir aşamadır. Hücrelerin üremesi gerçekleştiği esnada substratın katılması için en uygun zamanın belirlenmesi ve üreme şartlarının optimize edilmesi verim ve oluşacak olan ürünün optikçe saflık derecesini etkileyebilmektedir (Telefoncu, 1995).

Tutuklanmış hücreler ile biyotransformasyon: Tutuklanmış hücreler kullanılarak gerçekleştirilen biyotransformasyon serbest hücrelerle gerçekleşenle kıyaslandığında daha kararlı işletme olanağına sahip oldukları bilinmektedir. Tutuklanmış olan hücre tepkimesini gerçekleştirdiği ortamdan rahatça uzaklaştırılabilir ve tekrar kullanılabilir. Hücre ortamda tutunabiliyorsa biyotransformasyon sürekli gerçekleşebilir. Burada ürünün oluşum hızı çok yüksek, inhibisyon etkisi ise en azdır. Böylece biyokatalizörün tepkime ortamındaki kararlılığı ve yüksek etkinliği korunmuş olur. Bu yöntemde ek maliyet getirisi ve difüzyon kısıtlamaları dezavantajdır (Telefoncu, 1995).

Önceden büyütülmüş hücreler ile biyotransformasyon: Mikroorganizmayı standart koşullar altında çoğalttıktan sonra santrifüj, filtrasyon ya da biyokütle gibi yöntemlerde biri kullanılarak ayrılırlar. Ayrılmış olan bu hücreler daha sonra substrat içeren optimum pH'daki bir destek çözeltisinde ya da su ile süspansiyon haline getirilerek gerçekleştirilir (Telefoncu, 1995).

Çok fazlı sistemler ile biyotransformasyon: Suda çözünürlüğü düşük olan substratların yüksek derişimlerinde çalışılır. Böylece tepkimesinin dengesi substratın ve ürünün fazlar arasındaki farklı dağılımıyla değiştirilir. Yine tepkime dengesi su aktivitesine bağlı olarak değişim gösterebilir. Substrat ve ürün inhibisyonu düşebilir. Biyokatalizör ya da ürünün ortamdan uzaklaştırılabilmesi oldukça kolaydır. Mikroorganizmanın ortama bulaşma riski çok düşüktür. Biyokatalizörlerin daha kararlı olmalarından dolayı tepkime hızı yüksektir (Telefoncu, 1995).

İmmobilize hücreler ile biyotransformasyon: Mikroorganizmalar biyotransformasyonun gerçekleşebilmesi için izin veren polimer bir matriks (alginat, selüloz, nişasta, poliakrilamid vb.) içerisine tutuklanarak substrat ve ürün oluşumu

sağlanır. İmmobilize hücreleri istenildiği zamanda ortamdaki uzaklaştırabilmek kolaydır ve tekrar tekrar kullanımı mümkündür. Bu yöntem kesiksiz prosesler için uygun bir yöntemdir (Telefoncu, 1995).

Serbest ve immobilize enzimlerle biyotransformasyon: İmmobilize hücrelerin kullanımı daha ekonomik olsa da çok basit yapıları bir hücre binlerce enzimi içerisinde bulundurduğu için istenilmeyen yan reaksiyonlar oluşabilir. Bunun sonucunda da reaksiyon ortamının ürünleri ile kirlenmesi olabilmektedir. Bu durumu ortadan kaldırmak için biyotransformasyonu katalizleyen enzimin kullanılması gereklidir. Enzimlerin pahalı oluşundan dolayı serbest enzim yerine çeşitli yöntemler kullanılarak elde edilen immobilize formlarının kullanılması büyük bir ekonomik avantaj sağlar (Telefoncu, 1995).

Enzim molekülü büyük olsa bile substrat sadece aktif olan bölgeye bağlanır ve dolayısıyla tepkime bu merkezde gerçekleşir. Bu özellik enzimin seçiciliğinde içinde olmak üzere katalitik birçok özelliğini etkileyen bir fenomendir.

Uluslararası Kimya Birliği Enzim Komisyonu enzimleri, katalizledikleri veya etki ettikleri genel reaksiyon tiplerine göre 6 sınıfa ayırmışlardır (Faber, 1996). Bu enzim sınıflandırılması Çizelge 2.1’de görülebilmektedir (Tüzün, 2005).

Çizelge 2.1 Enzimlerin sınıflandırılması

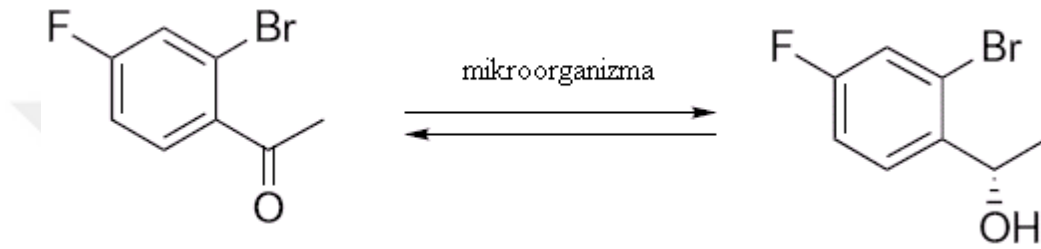
| GRUP | TEPKİME |
|----------------------|--|
| 1. Oksidoredüktazlar | İndirgenme/Yükseltgenme |
| 2. Transferazlar | Grup veya molekül transferi |
| 3. Hidrolazlar | Hidroliz |
| 4. Liyazlar | Substrattan grup uzaklaştırma, çift bağlara katılım |
| 5. İzomerazlar | İzomerleşme |
| 6. Ligazlar | ATP enerjisi kullanılarak moleküllerin birleştirilmesi |

Asimetrik indirgenme reaksiyonlarında kirali alkol elde etmek için biyokatalizör olarak alkol dehidrogenaz (ADH) enziminin kullanılmasıyla prokirali keteonların biyoindirgenmesiyle gerçekleştirilir. Alkol dehidrogenazlar (ADH) oksidoredüktaz sınıfına giren enzim grubudur. İndirgenme yükseltgenme tepkimelerini katalizlerler. Substrat aralığının geniş olmasının (alkoller, dioller, aldehytlar, ketonlar, esterler) yanı sıra enantioseçiciliğinde yüksektir. Alkol dehidrogenazlar (ADH) aktivitelerini kofaktör varlığında gerçekleştirebilirler. Tepkimenin ilerlerken ürün oluşmaya başladığında kofaktör yeni bir şekle dönüşür. Saf alkol dehidrogenazlar kullanıldığında, tepkime devam ettikçe kofaktör biteceğinden dolayı tepkime ortamına kofaktör ilavesi yapılması gerekmektedir. Kofaktörlerin pahalı olmasından dolayı bunların rejenerasyonları gerekmektedir. Bu sayede kofaktör rejenerasyonu yapıldığından dolayı saf enzimlerle çalışmak ekonomik olabilir (Faber, 2000). Ancak enzim yerine biyokatalizör olarak mikroorganizmaların kullanılması maliyeti düşük, kararlı ve yüksek verimli olmalarının yanı sıra daha kolay elde edilmeleri çok daha fazla avantajlıdır. Bundan dolayı organik materyallerin sentezi amacıyla çevreden

mikroorganizmaların izolasyonu üzerine giderek artan bir ilgi bulunmaktadır (Kira vd, 2009).

Literatürlerde saf enzimler ve mikroorganizmaların biyokatalizörlüğünde asimetrik indirgenme reaksiyonları sonucu ketonlardan kiral alkollerin sentezinin gerçekleştirildiği birçok araştırma yapılmıştır.

Patel vd. (2004), çalışmalarında mikroorganizma olarak, *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Sphingomonas* vd. hücreleri ile 2-bromo-4-floro asetofenonun mikrobiyal indirgenmesini incelemiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 2-bromo-4-floro asetofenonun mikrobiyal biyoindirgenmesi

İndirgenme tepkimeleri, kesikli sistemde, 28 °C, 250 rpm'de, 10 mL hacimde (100 mM potasyum fosfat tamponu, pH 7) %20 w/v yaş hücre (0.02 g/mL), 1.5 g/L substrat ve 25 g/L glikoz ilave edilerek, 24 h gerçekleştirmişlerdir.

Bu şartlarda mikroorganizmalarla gerçekleştirilen indirgenme tepkimelerinden sonuç olarak çıkan % dönüşüm ve enantiomerik aşırılık değerleri çizelgede gösterilmiştir (Çizelge 2.1).

Çizelge 1.2 2-bromo-4-floro asetofenonun mikroorganizmalar tarafından indirgenmesi

| Mikroorganizma | % dönüşüm | % ee (S-alkol) |
|--|-----------|----------------|
| <i>Candida sonorensis</i> SC 16117 | 100 | 99 |
| <i>Candida guilliermondii</i> SC 13861 | 100 | 99 |
| <i>Candida boidinii</i> SC 13821 | 100 | 97 |
| <i>Candida utilis</i> SC 13983 | 99 | 99 |
| <i>Candida parapsilosis</i> SC 16346 | 98 | 97 |
| <i>Rhodotorula glutinis</i> SC 16267 | 100 | 99 |
| <i>Hansenula fabianii</i> SC 13894 | 94 | 99 |
| <i>Hansenula polymorpha</i> SC 13824 | 100 | 99 |
| <i>Hansenula saturnus</i> SC 13829 | 100 | 99 |
| <i>Nocardia salmonicolor</i> SC 6310 | 100 | 99 |

| | | |
|---|-----|----|
| Pichia anomala SC 16142 | 100 | 99 |
| Pichia methanolica SC 13860 | 100 | 99 |
| Pichia pinus SC 13864 | 100 | 99 |
| Pichia stiptis SC 13863 | 99 | 99 |
| Pichia capsulata SC 16306 | 100 | 99 |
| Pichia silvicola SC 16159 | 99 | 99 |
| Sphingomonas paucimobilis SC 16113 | 100 | 99 |
| Saccharomyces cerevisiae SC 13902 | 93 | 99 |

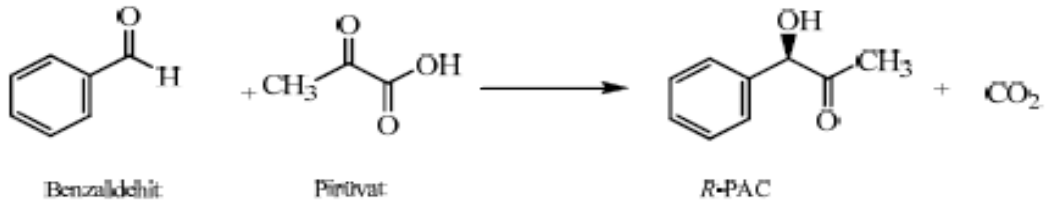
Çizelge 2.2’de görüldüğü gibi *Candida*, *Hansenula* ve *Pichia*’nın türleri yüksek dönüşüm (%99-100) ve *S*-alkol için yüksek enantioseçimlilik ($ee > 99\%$) göstermiştir.

Mandal vd. (2004), optikçe saf kiral maddelerin enantiomerik sentezi tarımda kullanılan kimyasalların üretilebilmesinde ya da yeni ilaçları geliştirebilmek için taleplerin artmasıyla birlikte büyük ilgi gösterdiğini belirtmişlerdir. Biyotransformasyonun, kofaktör ilavesine ihtiyaç duyulmadan tüm mikrobiyal hücre kullanılarak uygun bir yöntemin olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmalarında, farklı funguslarla asetofenon ve türevlerinin enantioseçimli biyoindirgenmesini incelemişlerdir. Yapılan çalışmada enantioseçimlilik (%93.5) dönüşümü (%85) en uygun olan *Trichothecium sp.* ve sonrada *Aspergillus oryzae* NCIM 649 ile enantioseçimlilik (%81.5) ve dönüşüm (%100) olduğu görülmüştür (Çizelge 2.2)

Çizelge 2.3 Farklı funguslarla asetofenonun biyoindirgenmesi ($C_{so} = 8$ mM, pH= 6, T=28 °C, N=200 rpm)

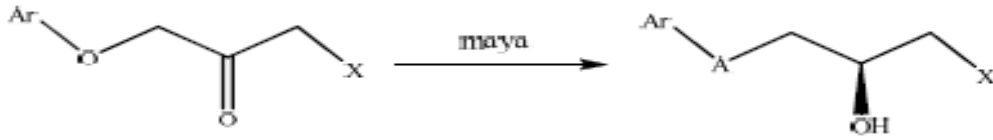
| Fungus | t, h | %ee ve konf.% | % dönüşüm |
|-------------------------------------|-------------|----------------------|------------------|
| Fusarium oxysporum NCIM 1282 | 42 | 72, <i>S</i> | 100 |
| Verticillium AAT-TS-3 | 48 | 41, <i>R</i> | 78 |
| Fusarium sp. NCIM 1075 | 24 | 51, <i>R</i> | 25 |
| Fusarium sp. NCIM 1075 | 48 | 67, <i>R</i> | 100 |
| Aspergillus oryzae NCIM 649 | 48 | 81, <i>R</i> | 100 |
| Trichothecium sp. | 72 | 93, <i>R</i> | 85 |

Mandwal et al. (2004), çoğalan ıslak ve tutuklanmış *Saccharomyces cerevisia* ve *Zygosaccharomyces roixii* hücreleri ile fenilasetil karbonil üretimi üzerinde incelemeler yapmışlar. 1-hidroksi-1-fenil-2-propanon olarak da isimlendirilen L-fenilasetil karbonil (L-PAC) ticari olarak kimyasal sentezin ara ürünüdür. Bunlar maya kültürleriyle benzaldehitin biyotransformasyonu ile endüstriyel boyutta üretilir (Şekil 2.2). Diğer mayalarla karşılaştırma yapıldığında *Saccharomyces* ve *Candida* türlerinin en etkili biyokatalizörler olarak L-PAC üretimini gerçekleştirdikleri belirlenmiştir (Tripathi et al, 1997).



Şekil 2.2 Benzaldehit ve pirüvatın R-PAC'ye biyotransformasyonu

Martinez et al. (2000) tarafından B-bloker halohidrinlerin sentezlenmesinde kullanılan a-haloketonların mayanın katalizliğinde asimetric indirgenmesini araştırmışlar (Şekil 2.3). Verim ve ee üzerine etkili olan çok çeşitli proses parametreleri incelenmiştir. Islak hücrelerle, çoğalan hücreleri yüksek enantiyomerik aşırılık ve verime sahip olarak elde edilmiştir. 1-kloro-3-propan-2-ol'ün *Yarrowia lipolytica* 1240 ıslak hücreleri ile gerçekleştirildiğinde %99 enantiyomerik aşırılık ve %87 verim ile *S*-formu elde edilirken, *Pichiae mexicana* 11105 ıslak hücreleriyle de %95 enantiyomerik aşırılık ve %85 verim ile *R*-formunu elde etmiştir. Asimetric İndirgenme prosesinin başka a-haloketonlara uygulandığı zaman enantiyomerik aşırılığın daha düşük olduğunu gösteren sonuçlar bulmuşlardır.



Şekil 2.3 a-haloketonların maya katalizli indirgenmesi

Kurbanoglu vd. (2010), asetofenon ve türevlerinin asimetric indirgenmesini kalsiyum alginata tutuklanmış *Rhodotorula glutinis* ile çalışmışlardır. Tepkimeyi kesikli sistemde gerçekleştirmişlerdir. Tepkimeyi için 100 mM (tris tamponu), pH 8, %4w/v glikoz (222mM) içeren bir ortam hazırlamışlardır. Asetofenonu, derişimi 1 mM olacak şekilde tepkimenin gerçekleşeceği ortama ilave etmişlerdir. Sıcaklığın, pH'nın ve tepkime süresinin etkisini incelemişlerdir (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.4 Tutuklanmış hücrelerle asetofenonun biyoindirgenmesine sıcaklık, pH ve sürenin etkisi (C_{SO}= 1 mM, t= 12 h)

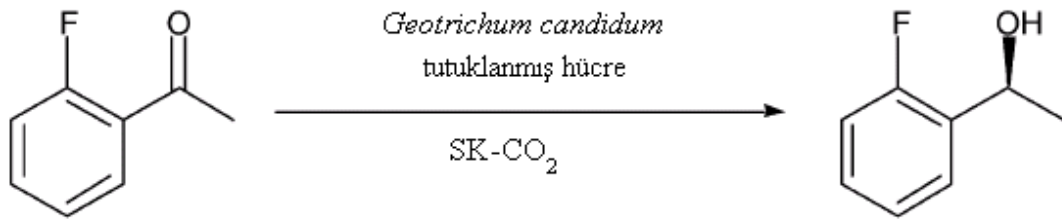
| T, °C | % Dönüşüm | % ee (<i>S</i> -alkol) |
|-------|-----------|-------------------------|
| 25 | 34 | 99 |
| 30 | 40 | 99 |

| | | |
|-------------|------------------|-----------------------|
| 35 | 29 | 99 |
| pH | % Dönüşüm | % ee (S-alkol) |
| 4 | 20 | 90 |
| 5 | 30 | 96 |
| 6 | 36 | >99 |
| 7 | 44 | >99 |
| 8 | 54 | >99 |
| 9 | 50 | 98 |
| t, h | % Dönüşüm | % ee (S-alkol) |
| 18 | 96 | 99 |
| 24 | 100 | 99 |

Çizelge 2.4'te de görüldüğü gibi indirgenme için en iyi sonuçlar 30 °C, pH 8 (tris tamponu), tepkime süresi 24 h olduğu elde edilmiştir.

Tutuklanmış hücrelerin tekrar tekrar kullanılabilirlikleri incelenmiş ve kesikli sistemler için 15 kez tekrar kullanılabilirdiği belirtilmiştir. Bu sonuçla elde edilen Kiral alkollerin tümünün %99 ee S-enantiomer olduğu belirlenmiştir.

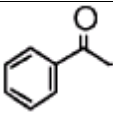
Matsuda vd. (2004), bu çalışmada *Geotrichum candidum* fungusu ile SK-CO₂'nin birçok ketonunun asimetrik indirgenmesini incelemiştir (Şekil 2.4).

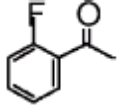
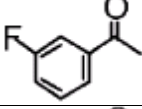
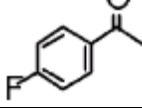
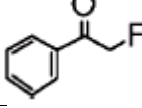
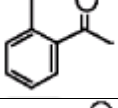
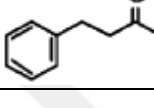


Şekil 2.4 o-floroasetofenonun asimetrik indirgenmesi

Tepkimenin gerçekleştirileceği ortam sulu olduğundan dolayı, ürün sulu fazdan ekstrakte edilmelidir. SK-CO₂ kullanılması ürünün ortamdan rahatça kazanılması için avantaj sağlamaktadır. SK-CO₂ ortamında, 10 MPa (100 bar)'da o-floroasetofenonun (S)-1-o-florofeniletanole indirgenmesini 17 saat boyunca incelemişler. Tepkimenin süresi arttıkça, dönüşümün arttığını ve 12 saat sonunda %81 dönüşüm elde etmişlerdir (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.4 SK-CO₂ ortamında biyoindirgenen ketonlar

| Substrat | % Dönüşüm | % ee | Konf. |
|---|-----------|------|-------|
|  | 51 | 99 | S |

| | | | |
|---|----|----|---|
|  | 81 | 99 | S |
|  | 53 | 99 | S |
|  | 11 | 97 | S |
|  | 96 | 96 | R |
|  | 22 | 99 | S |
|  | 61 | 98 | S |

SK-CO₂ ortamda çalışıldığında, çizelge 2.4'te görüldüğü gibi ketonların birçoğunda yüksek ee değerinin elde edildiği belirlenmiştir. Burada da görüldüğü gibi asetofenonun dönüşümünün %51 olmasına bakılarak diğer yapılan çalışmalara göre düşük bir değere sahiptir.

Chang vd. (2010) çalışmalarında biyokatalizör olarak bitkileri kullanmıştır. İndirgenmelerde model substrat olarak asetofenon kullanılmıştır. İncelenen biyokatalizörler, elma, havuç, salatalık, soğan, patates ve turp'tur (Çizelge 2.5).

Çizelge 2.5 Asetofenonun farklı bitki hücreleriyle biyoindirgenmesi (C₅₀=10 mM, t=4 gün, T=30 °C, pH 7)

| Biyokatalizör | % Dönüşüm | % ee | Konf. |
|---|-----------|------|-------|
| Elma (<i>Malus pumila</i>) | 40.9 | 81.5 | R |
| Havuç (<i>Daucus carota</i>) | 79.2 | 96.4 | S |
| Salatalık (<i>Cucumis sativus</i>) | 55.5 | 75.8 | S |
| Soğan (<i>Allium cepa</i>) | 54.3 | 73.8 | S |
| Patates (<i>Soanum tuberosum</i>) | 51.4 | 92.1 | R |
| Turp (<i>Raphanus sativus</i>) | 82.3 | 72.8 | S |
| Tatlı patates (<i>Ipomoea batatas</i>) | 43.5 | 80.2 | R |

Elma, patates ve tatlı patates kullanıldığında (R)-1-feniletanol, diğer sebzelerle ise (S)-feniletanol elde etmişlerdir. İndirgenme reaksiyonları için ee ve dönüşüm açısından en uygun biyokatalizör havuçtur. Havuç kullanıldığında optimum şartlar, 20 mM substrat derişimi, 50 saat tepkime süresi, 35 °C sıcaklık ve pH 7 olarak belirlenip %95 ee değerine ve %85 dönüşüm değerine ulaşmışlardır. Bu çalışmada

görüldüğü gibi indirgenme tepkimelerinde bitki hücreleri ile mikrobiyal hücrelerle kıyaslandığında tepkime süresinin daha uzun olduğu görülmektedir. Bunun nedeni substratın ya da ürünün bitki hücresine daha zor difüzyonu olduğunu belirtmişlerdir.

Lui vd. (2009), çalışmasında biyokatalizör olarak havuç ve kereviz köklerini kullanarak asetofenon ve türevlerinin enantioseçimli biyoindirgenmesini incelemişlerdir. Havuç ve kerevizleri daha kolay kütle aktarımı gerçekleşmesi amacıyla 5x5x2 mm boyutlarında küçülterek tepkimelerde kullanmışlardır. 27 °C, 30 °C, 33°C ve 36°C gibi farklı sıcaklıkların etkilerini incelemişlerdir. Havuç ve kerevizlerin tepkimeleri sonucunda (S)-1-feniletanol elde etmişlerdir. Tepkimenin gerçekleşmesi için en uygun şartlar olarak 33°C sıcaklık 8mM başlangıç asetofenon derişimini 28 saat tepkime süresi olarak belirlemişlerdir. Tepkimelerden çıkan sonuçlara bakıldığında havuç ile %100 dönüşüm %99 ee, kereviz ile %97 dönüşüm %99 ee elde etmişlerdir.

Andrade vd. (2006), çalışmasında farklı bitki köklerini kullanarak asetofenon ve türevlerinin biyoindirgenmesini incelemişlerdir. Tepkimeyi, asetofenon derişimini 10 mM, bitki hücresini 0.25 g/mL kadar içeren sulu ortamda, karıştırma hızının 160 rpm olarak, sıcaklığında 32 °C olduğu ortamda gerçekleştirmişlerdir. 6 saatte gerçekleşen tepkimenin en iyi sonucunu %91 dönüşüme sahip olan *Arracacia xanthorrhiza* ile elde etmişlerdir. Ancak sürenin artmasıyla enantioseçimliliğin azaldığını saptamışlardır. Diğer bitki hücrelerinin tepkime sonuçlarına bakılınca dönüşümlerin oldukça düşük olduklarını belirlemişlerdir (Çizelge 2.6).

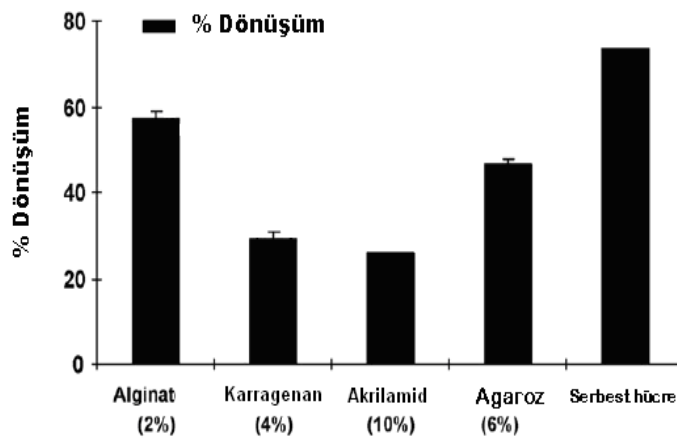
Çizelge 2.6 Asetofenonun biyoindirgenmesi

| Bitki hücresi | t,gün | % dönüşüm | % ee ve Konf. |
|----------------------------|-------|-----------|---------------|
| <i>Allium</i> | 3 | 5 | 98, S |
| <i>schoenoprasum</i> | 6 | 5 | 98, S |
| <i>Arctium lappa</i> | 3 | 8 | 8, S |
| | 6 | 21 | 58, S |
| <i>Arracacia</i> | 3 | 44 | 91, S |
| <i>xanthorrhiza</i> | 6 | 91 | 66, S |
| <i>Beta vulgaris</i> | 3 | 65 | 61, R |
| | 6 | 83 | 87, R |
| <i>Brassica rapa</i> | 4 | 4 | 99, S |
| | 6 | 10 | 99, S |
| <i>Dioscorea alata</i> | 3 | 30 | 94, S |
| | 6 | 47 | 94, S |
| <i>Manihot esculenta</i> | 3 | 13 | 29, R |
| | 6 | 14 | 31, R |
| <i>Solanum</i> | 3 | 3 | 24, R |
| <i>tuberosum</i> | 6 | 5 | 7, S |
| <i>Zingiber officinale</i> | 3 | 8 | >98, S |
| | 6 | 8 | >98, S |

Aydoğan (2012), çalışmasında biyokatalizör olarak *Lactobacillus kefir* mikroorganizmasıyla asetofenon kullanarak asimetrik sentez gerçekleştirmiştir. Tepkimenin sonucuna göre biyokatalizörün (*R*)-enantiomerinin çok yüksek enantioseçimliliğe (>% 99) sahip olduğunu belirlemiştir. Ancak kofaktör rejenerasyonuna ihtiyaç duyulduğu için dönüşümlerin düşük olduğunu belirtmiştir. Yüksek dönüşümün ve enantioseçimliliğin olabilmesi için tepkime ortamına kofaktör ilave edilmesiyle gerçekleştirmiştir.

Kurbanoglu ve arkadaşları (2007), çalışmalarında *Aspergillus niger*'e ait 14 suşu toprak örneklerinde elde etmişlerdir. Elde ettikleri örnekleri asetofenonu 1-feniletanole indirgemelerini incelemişlerdir. Test edilen örneklerden *A.niger* EBK-9 örneğinin indirgenme yapabilmek için en etkili biyokatalizör olduğunu tespit etmiştir. Optimize edilen şartlarda asetofenon türevleri % 99 ee saflık derecesinde optikçe aktif alkollere dönüştürülmüştür. Yapılan çalışmalarda da görüldüğü gibi asimetrik sentezlerin gerçekleştirilmesinde biyokatalizörler çok önemli bir yere sahiptir.

Fatima vd. (2007) 1-asetofenonun biyoindirgenmesiyle (*S*)-1-(1naftil) etanol üretimi için bir maya olan tutuklanmış halde bulunan *Candida viswanathii* MTCC 5158 ile gerçekleştirmişlerdir. Saf enzimlerin maliyetlerinin yüksek oluşundan dolayı ve kofaktöre ihtiyaç duyulduğu için tüm hücre kullanımını tercih etmişlerdir. Serbest hücre biyokatalizörlüğünde ketonların indirgenmesinde hücrelerin tekrar kullanılabilmesi ve geri döngünün çok zor oluşundan dolayı tutuklanmış olan hücrelerle çalışılması avantaj sağlamaktadır. Çalışmalarında serbest hücrelerle olan dönüşümlerini %76 olarak elde etmişler ve tutuklanmış hücreler kullanıldığında dönüşümün daha düşük bir değere sahip olduğunu görmüşlerdir. Ancak tutuklanmış hücreler serbest hücrelere göre daha karardır. Çalışmalarında farklı tutuklama matrisleri; kalsiyum alginat, k-karragenan, poliakrilamid, agaroz'u incelemişlerdir.



Şekil 2.5 Farklı tutuklanma matrislerinin dönüşüm ve tutuklama etkinliğine etkisi

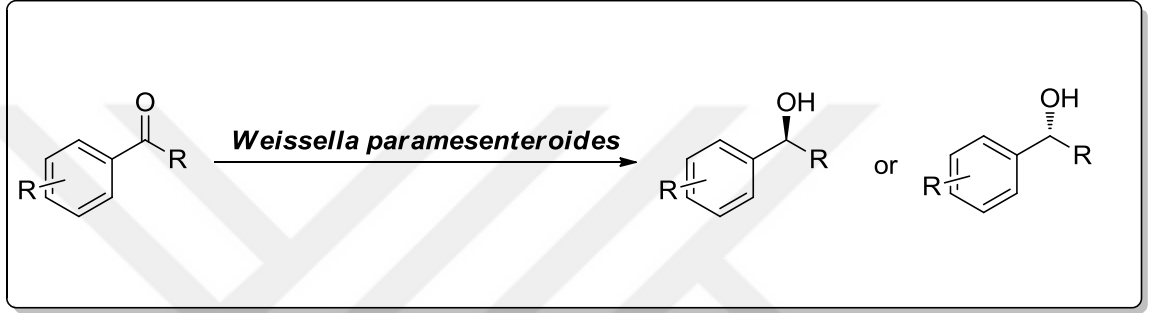
Biyoundirgenme için uygunluğu en iyi olan kalsiyum alginat olduğunu belirtmişlerdir. Optimum koşulları; tepkime süresi 24 h, pH 9 ve sıcaklığında 30°C olarak belirlemişlerdir. Substrat derişimini 0.1-0.5 mg/mL aralığında incelemişlerdir ve en uygun derişimin 0.2mg/mL olduğunu belirtmişlerdir. En uygun çözücünün ise 2-propanol (% 2 v/v) olduğunu belirtmişlerdir. 2-propanol kullanılmaya başladığında sonuç olarak dönüşümün %16 arttığını saptamışlardır. Sonuç olarak tutuklanmış hücrelerin 12 kez kullanılmasıyla aktivitelerini büyük ölçüde koruduklarını belirtmişlerdir.

Temino vd. (2005) ADH enzimi ile kofatörünü polivinil alkol jelinde tutklayıp kesikli sistem kullanılarak asetofenonun (*R*)-1-fenil etanole biyoundirgenmesini incelemişlerdir. Asetofenonun çözünürlüğünün düşük olmasından dolayı, tepkimeyi hekzan çözücülü ortamda gerçekleştirmişlerdir. Ayrıca, tutuklanmış enzimide birçok farklı substratın (1-fenoksiaseton, 1-benzil-4-piperidon, 1-okten-1-on, 2-asetil-5-noboren, 3-kloro-2-norbornanon, 5-hekzene-2-on, siklopropil-metil keton, 5-oksoheksnoik asit, 3,4-metilendioksiasetofenon, alfa-tetralon, 3-oktanon) biyoundirgenmeleri için de incelemişlerdir. Kofaktör rejenerasyonunu çift substrat yöntemi (eş substrat;2-propanol) ile gerçekleştirmişlerdir. Enzim aktivitesinin uzun süre korunabildiğini ve termal karalılığının artırılmasında enzim tutuklamasının avantaj sağladığını belirtmişlerdir. Hekzanın çözücü olarak kullanıldığı bu sistemde, 1gr tutuklanmış enzim, %5 v/v 2-Propanol, 10mM asetofenon, 168 h ve 25°C'de %60 dönüşüm ve %98 enantiyomerik aşırılığa ulaşmışlardır.

Ayrıca çalışmada, kofaktör rejenerasyonu için kullanılan 2-propanolün, ADH'nın aktivitesini paylaşabilmesi için, sadece 2-propanol tepkimesini katalizleyici etki gösterebilen ikinci bir enzim (*Thermoanaerobium brockii*-ADH) kullanmışlardır. Bu kullanımın tepkime süresine ve ürün derişimine bir etki etmediğini gözlemlemişlerdir. Bu nedenle, kofaktör rejenerasyonu gerçekleştirildiğinde ADH her iki tepkime içinde ortak olarak kullanılmaktadır. Tutuklanmış olan hücreyi 13 gün boyunca kullanmışlardır.

Çalışmanın amacı:

İndirgenme reaksiyonlarında katalizörlerin yapıları seçicilik konusunda önemli bir rol oynar. Bu katalizörün yapısı indirgenme reaksiyonlarında kullanılan substratın yüzeyleriyle değişik hızlarda etkileşmesinden dolayı enantiomerlerden biri diğerine göre miktar olarak daha fazla olmasına sebep olur. Bu tez çalışması kapsamında asetofenon türevlerinin asimetrik indirgenmesiyle birçok farmakolojik ürünün öncü maddesi olarak kullanılan enantiomerik saflıkta kiral alkollerin üretilmesi hedeflenmiştir.

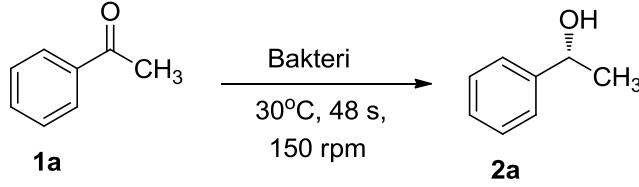


Şekil 2.6 *Weissella paramesenteroides* N7 ile aromatik ketonların asimetrik indirgenmesi

Bu tez kapsamında asimetrik biyoindirgenme kapasitesine sahip olabilecek *Weissella paramesenteroides* N7 bakteri suşları biyokatalizör olarak asimetrik biyoindirgenme reaksiyonlarında test edilecektir. Gerçekleştirilen reaksiyonların sonucunda bu suşlardan en etkin olanı ile asimetrik biyoindirgenme reaksiyonunun optimize şartları belirlenecek ve bu optimize şartlar altında değişik prokiral ketonların asimetrik indirgenmesinin gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir.

3.MATERYAL ve METOD

Model substrat asetofenon (**1a**) kullanılarak dört *Weissella paramesenteroides* N7 suşunun bitokatalizör olarak kullanılma kapasiteleri test edildi (Çizelge 3.1).



Çizelge 3.1 Asetofenon'un asimetrik indirgenmesinde en iyi N7 *Weissella paramesenteroides* bakteri suşunun belirlenmesi

| Bakteri ^a | Dönüşüm ^b (%) | % Verim ^c | % ee ^d |
|--|--------------------------|----------------------|-------------------|
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> N6 | 96 | 88 | 54 |
| <i>Weissella paramesenteroides</i> N7 | 99 | 85 | 64 |
| <i>Weissella cibaria</i> N9 | 98 | 90 | 50 |
| <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> N13 | 98 | 87 | 50 |

Reaksiyon Koşulları: Biyokatalizör 100 µl, substrat (Asetofenon) 1mmol, sıcaklık: RT, zaman: 48h, 150 rpm

^a Biyokatalizör suşlarının karşılaştırılması

^b Dönüşümleri HPLC ile belirlendi

^c Saflaştırılan verim

^d Kiral OD-H, OD ve AS kolonlar kullanılarak belirlendi.

Çizelge 3.1'de gösterildiği gibi kullanılan suşlar (*R*) ve (*S*)-fenil etanol (**2a**)'ü %50'den %64'e değişen enantiomerik üretimi gerçekleştirildi. En iyi asimetrik biyoindirgenme sonucu *Weissella paramesenteroides* N7 suşu kullanılarak elde edildi. Bu biyoindirgenme reaksiyonunda %99 dönüşüm ve %64 gibi bir enantiomerik aşırılık gözlemlendi. Bu sonuçların eldesinde sonra en iyi biyokatalizör *Weissella paramesenteroides* N7 olarak seçildi ve bundan sonra gerçekleştirilecek reaksiyonlarda bu suşun kullanılacağı belirlendi.

Gerçekleştirilen asimetrik indirgenme reaksiyonlarında sıcaklık, pH, inkübe süresi ve karışma hızı gibi parametreleri enantioseçiciliği etkileyen önemli parametrelerdir. Bu nedenle model substrat asetofenonu kullanarak reaksiyon şartları optimize edildi. Belirlenen uygun reaksiyon şartları Çizelge 3.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.2 *Weissella paramesenteroides* N7 bakteri suşu kullanılarak asetofenonun biyoindirgenme parametrelerinin optimizasyonu

| pH | | | Sıcaklık | | | İnkübasyon Süreleri | | | Karıştırma Hızı | | |
|-----|------------------------|--------------------------|----------|------------------------|--------------------------|---------------------|------------------------|--------------------------|-----------------|------------------------|--------------------------|
| pH | Dönüş (%) ^b | ee (S)(%) ^{c,d} | °C | Dönüş (%) ^b | ee (S)(%) ^{c,d} | Saat | Dönüş (%) ^b | ee (S)(%) ^{c,d} | rpm | Dönüş (%) ^b | ee (S)(%) ^{c,d} |
| 5 | 98.5 | 58 | RT | 98.5 | 74 | 24 | 99 | 88 | 100 | 96 | 66 |
| 5.5 | 99 | 64 | 28 | 95 | 30 | 39 | 97 | 64 | 150 | 99 | 88 |
| 6 | 99.5 | 68 | 30 | 96 | 10 | 72 | 92 | 28 | 200 | 99 | 66 |
| 6.5 | 98.5 | 74 | 32 | 96 | 26 | | | | | | |
| 7 | 98 | 64 | | | | | | | | | |
| 7.5 | 99.6 | 50 | | | | | | | | | |

^a Substrat 1mmol.

^b Dönüşümleri HPLC ile belirlendi.

^c Enantiyomerik aşırılıklar kiral kolon OD-H kullanılarak belirlendi.

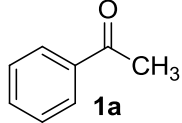
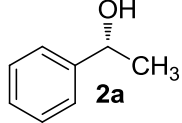
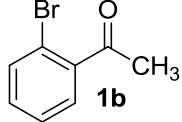
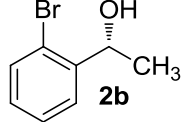
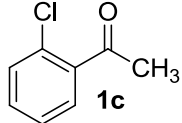
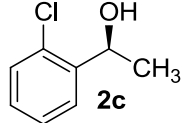
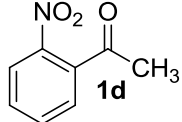
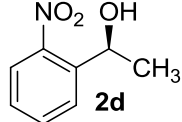
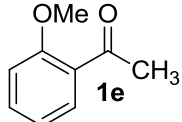
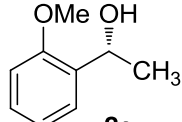
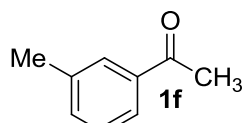
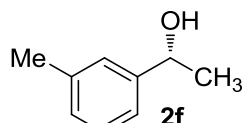
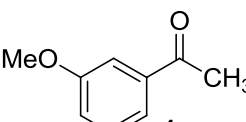
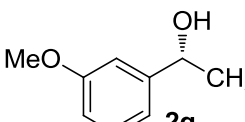
^d Konfigürasyonlar literatürdeki çevirme açıları ile karşılaştırılarak belirlendi

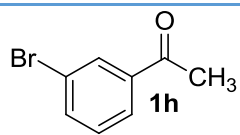
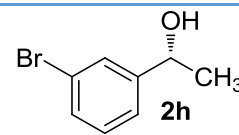
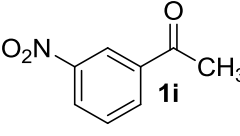
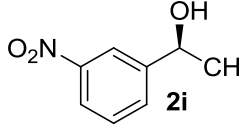
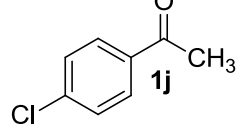
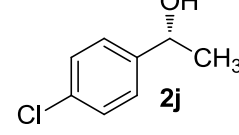
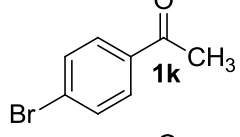
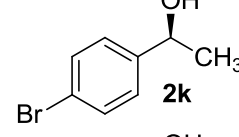
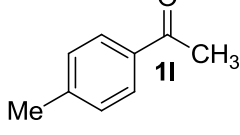
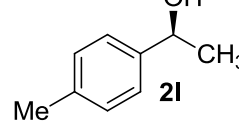
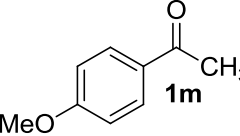
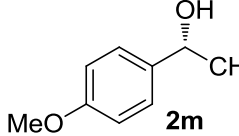
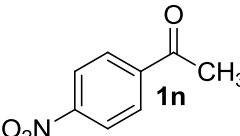
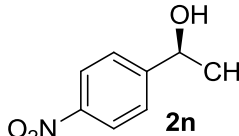
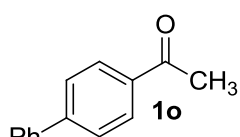
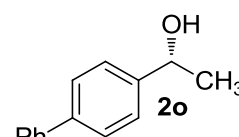
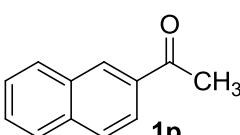
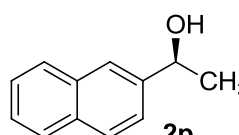
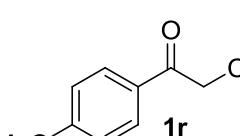
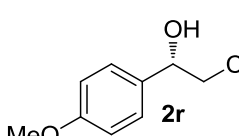
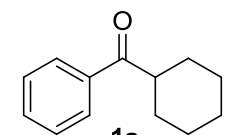
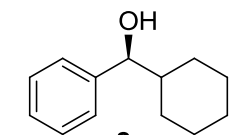
Kiral sekonder alkoller elde edebilmek için pH, sıcaklık, inkübasyon süreleri ve karışma hızı gibi parametreleri reaksiyon şartlarını optimize edebilmek başarılı sonuç alabilmek için çok önemlidir (Pereira, 1998). *Weissella paramesenteroides* N7 bakteri suşu kullanılarak model substrat ile pH, sıcaklık, inkübe süresi ve karışma hızı gibi reaksiyon parametreleri optimize edildi (Çizelge 3.2). Optimize şartları belirlemek için ilk olarak pH'nın enantioseçicilik üzerine etkisi araştırıldı. Bakterileri ilk olarak 10 ml besiyeri (MRS Broth) 100 µl bakteri kullanılarak 1 gün 37°C'de öngeliştirme işlemi gerçekleştirildi. Sonra bakteri 100ml besiyeri 100 µl bakteri olacak şekilde geniş hacimde 1 gün daha 37°C'de geliştirilme yapıldı. Bu işlem tamamlandıktan sonra bakteri karıştırıcıya alınarak 2 saat RT'de 150 rpm'de karıştırıldı. Sonrasında pH'ları (5-7.5) ayarlandı ve yine 2 saat aynı şartlarda karıştırıldı. 2 saatin sonunda ortama 1 mmol substrat (**1a**) eklendi ve 48 saat boyunca aynı şartlar altında karışmaya bırakıldı. pH enzimin üç boyutlu yapısında değişime neden olduğundan seçicilik açısından önemli bir parametredir. Çizelge 3.2'de görüldüğü gibi yapılan denemeler sonucunda optimize pH 6.5 olarak seçildi. Bu pH'da (**2a**) %98.5 dönüşüm ve %74 enantiyomerik aşırılıkla elde edildi. Enantioseçiciliğin üzerine sıcaklığın etkisini belirleyebilmek için pH değerinin 6.5 olduğu şartlara RT, 28°C, 30°C, 32°C'lerde reaksiyonlar yapıldı. İndirgenme reaksiyonunun en iyi gerçekleştiği sıcaklık oda sıcaklığı olarak belirlendi ve bundan sonraki reaksiyonlar oda sıcaklığı olarak gerçekleştirildi. Oda sıcaklığından farklı sıcaklıklar denendiğinde hem dönüşümün hem de enantiyomerik aşırılıkta azalmanın olduğu görülmektedir. pH'nın 6.5 ve sıcaklığın oda sıcaklığı olduğu reaksiyon koşullarında farklı inkübasyon sürelerinde reaksiyonlar gerçekleştirilerek bu parametrenin seçicilik üzerindeki etkisi belirlendi. Çizelge 3.2'de görüldüğü gibi inkübe edilen süre 24 saat olduğu zaman dönüşüm ve enantiyomerik aşırılık en yüksek değere sahiptir. Bundan dolayı inkübasyon süresi 24 saat olarak optimize edilmiştir.

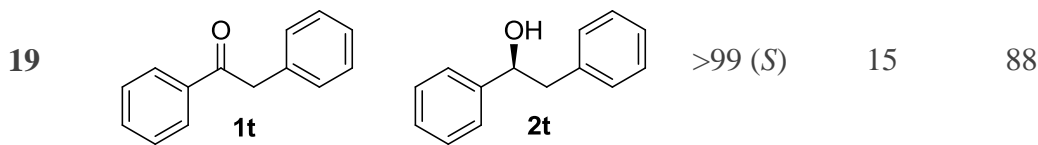
İnkübasyon süresi arttığında dönüşümün ve enantiomerik aşırılığın düştüğü görülmektedir. Bunun muhtemel sebebi enzim aktivitesinin zamanla azalmasıyla ilgilidir. Önemli olan bir diğer parametre ise enzimin aktivitesi ve yapısını değiştirebilen karıştırma hızıdır. Karıştırma hızları karşılaştırıldığında en iyi dönüşüm ve enantiomerik aşırılığın 150 rpm’de elde edildiği görülmektedir. Karıştırma hızı 150 rpm’den farklı olduğunda enantioseçicilikte önemli düşüşler olduğu görülmektedir. Sonuç olarak optimize şartlar pH 6.5, sıcaklık olarak oda sıcaklığı (RT), inkübe süresi 24 saat ve karışma hızı 150 rpm olarak belirlenmiştir.

Optimizasyon işleminden sonra belirlenen şartlarda *Weissella paramesenteroides* N7 bakteri suşunun asetofenon türevlerinin ve değişik prokiral ketonların asimetrik indirgenmesinde biyokatalizör olarak etkinliği ve substratların seçicilik üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Bu indirgenme sonuçları Çizelge 3.3’te gösterilmiştir.

Çizelge 3.3 *Weissella paramesenteroides* N7 bakteri suşu kullanılarak asetofenon türevlerinin asimetrik indirgenmesi

| Deney | Substrat | Ürün | ee (%) ^{a,b} | Dönüşüm (%) ^c | Verim (%) ^d |
|-------|---|---|-----------------------|--------------------------|------------------------|
| 1 |  |  | 88(R) | 99 | 90 |
| 2 |  |  | 90(R) | 62 | 57 |
| 3 |  |  | 94(S) | 65 | 61 |
| 4 |  |  | Rasem | 94 | 88 |
| 5 |  |  | 64(R) | 37 | 35 |
| 6 |  |  | 96(R) | 100 | 94 |
| 7 |  |  | 10(R) | 73 | 69 |

| | | | | | |
|----|---|---|-----------------|-----|----|
| 8 |  |  | 64(<i>R</i>) | 90 | 82 |
| 9 |  |  | 92(<i>S</i>) | 100 | 82 |
| 10 |  |  | 70(<i>R</i>) | 99 | 90 |
| 11 |  |  | 50(<i>S</i>) | 99 | 88 |
| 12 |  |  | 94(<i>S</i>) | 100 | 93 |
| 13 |  |  | 72(<i>R</i>) | 87 | 81 |
| 14 |  |  | 52(<i>R</i>) | 100 | 90 |
| 15 |  |  | 76(<i>R</i>) | 10 | 7 |
| 16 |  |  | 72(<i>S</i>) | 81 | 77 |
| 17 |  |  | >99(<i>R</i>) | 98 | 94 |
| 18 |  |  | 28(<i>S</i>) | 10 | 6 |



Reaksiyon koşulları: Substrat 1mmol, sıcaklık: rT°C, süre: 24 saat, pH: 6.5, karıştırma hızı: 150 rpm

^a Enantiomerik aşırılıklar kiral HPLC OD-H, OD, AS-H kolonlar kullanılarak belirlendi.

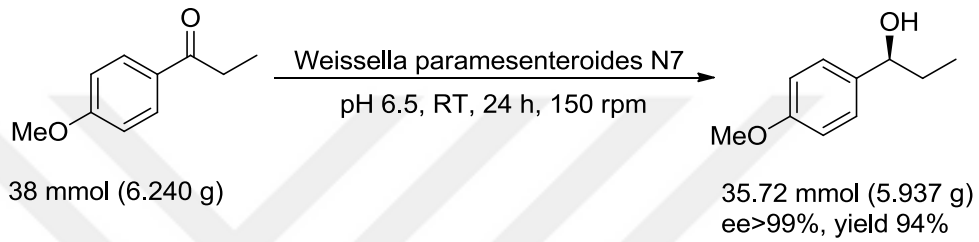
^b Konfigürasyonlar literatürlerdeki çevirme açıları ile karşılaştırılarak belirlendi.

^c Dönüşümler HPLC ile belirlendi.

^d Saflaştırılan verimler.

Reaksiyon şartları optimize edildikten sonra aromatik halkaya bağlı brom, klor, nitro, metoksi, metil ve fenil gibi grupların seçiciliği nasıl etkilediği test edildi. *Weissella paramesenteroides* N7'nin aril-ke-ton substratları üzerindeki katalitik aktivitesi farklı *orto*-, *meta*- ve *para*- ile asetofenon türevleri kullanılarak araştırılmış ve asetofenon ile karşılaştırılmıştır. *orto*-bromo asetofenon **1b**'nin asimetrik indirgenmesiyle %90 gibi yüksek olan enantiyomerik aşırılık ve %62'lik bir dönüşüm elde edilirken, *meta*-bromo asetofenon ve *para*-bromo asetofenonunda daha düşük enantiyomerik aşırılık ve yüksek dönüşüme sahip oldukları gözlemlendi. *orto*-nitroasetofenonun (**1d**) asimetrik indirgenmesinden yüksek bir dönüşüm oranı (%94) elde edilirken, oluşan ürünün rasem olduğu görülmektedir. (Çizelge 3.3). *orto*- metoksiasetofenon (**1e**), %64 enantiyomerik aşırılık ve %37 dönüşüm ile **2e**'ye indirgendi ve çıkan bu sonucun düşük olması metoksi grubunun elektron verici özelliğinin etkili olduğunu göstermektedir (Çizelge 3.3). *Meta*- pozisyonunda elektron çeken (**1f**, **1i**) grupların asimetrik indirgenmesiyle yüksek bir enantiyomerik aşırılık (%96, %92) ve dönüşüm (%100, %100) ile sekonder alkoller elde edildi. Bununla birlikte *meta*-pozisyonundakiler (**1g**, **1h**), *orto*- pozisyonundakilerle kıyasla daha düşük sonuçlar verdiği gözlemlendi. *Weissella paramesenteroides* N7'nin asetofenon türevlerine karşı katalitik aktivitesi üzerindeki fark, karbonil grubunun reaktivitesi üzerindeki elektronik etkisi ile açıklanabilir. Benzer bir durumda literatürde açıklanmıştır (Rodriguez ve ark., 2014). Metil grubundan bir atom ara parçasına sahip olan substrat **1r**, çok yüksek enantiyomerik aşırılık (>%99) ve dönüşüm oranı (%98) ile (*R*)-karbonil **2r**'ye indirgendi (Çizelge 3.3). Substrat **1m** ile kıyaslandığında metil grubundan bir atom ara parçasına sahip **2r**'de hem dönüşüm hem de enantiyomerik aşırılığın arttığı gözlemlendi (Çizelge 3.3). Bu sterik etkinin elektronik etkiye göre reaksiyon dönüşüm oranını ve enantiyomerik aşırılığı etkilemede baskın olduğunu görülmektedir. *Para*-halojenli asetofenon **1j** ve **1k** indirgenmesinde ortalama bir değerde enantiyomerik aşırılık ve kantitatif dönüşüm sağladı (Çizelge 3.3). Bununla beraber, *para*-metoksi asetofenonun (**1m**) asimetrik indirgenmesinde %72 enantiyomerik aşırılık ve %87 dönüşüm gözlemlendi ve *orto*- ve *meta*- pozisyonları ile karşılaştırıldığında daha yüksek bir sonuç elde edildi (Çizelge 3.3). Elektron çeken nitro grubunun *para*- pozisyonundaki substrat **1n**'nin asimetrik indirgenmesinde %100 dönüşüm ve %52 enantiyomerik aşırılık elde edildi, burada

meta- pozisyonunda daha iyi enantiyomerik aşırılık verdiği gözlemlendi (Çizelge 3.3). *Para*-fenilasetofenonunun (**1o**) asimetrik indirgenmesinde %76 enantiyomerik aşırılık ve %10 dönüşüm oranı elde edildi ve dönüşümün düşük oluşu, muhtemelen fenil halkasının sterik etkisinden kaynaklandığını söyleyebiliriz (Çizelge 3.3). Yapılan deneylerin sonuçlarına baktığımızda, yüksek enantiyomerik aşırılık ve dönüşümün elde edildiği substratın **2r** olduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 3.3). *Weissella paramesenteroides* N7'in biyokatalizörlüğünde gerçekleştirilen asimetrik indirgenme reaksiyonlarında enantiyomerik aşırılığın ve dönüşümlerin değişiklik göstermesinin, substratın boyutuna, substratın özelliklerine ve sterik etkinin baskın oluşuna bağlı olduğunu söyleyebiliriz.



Şekil 2.7 1-(4-methoxyphenyl) propan-1-one (**1r**)'nin gram skalada asimetrik indirgenmesi

Optimize edilen reaksiyon şartlarıyla (RT, pH 6.5, 24 saat ve 150 rpm) çeşitli prokiral aromatik ketonların asimetrik indirgenme reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. 1-(4-metoksifenil)propanon (**1r**)'un saf enzim kullanılarak gerçekleştirilen asimetrik indirgenme reaksiyonlarında literatürlere bakıldığında enantiyomerik aşırılığın ve veriminin çok düşük değerlere sahip olduğu görülmektedir. Tüm hücre kullanılarak gerçekleştirdiğimiz 1-(4-metoksifenil) propanon (**1r**)'un asimetrik indirgenmesinin literatürlerde yer alan sonuçların aksine mükemmel bir enantiyomerik aşırılık (>%99), dönüşüm (%98) ve verimde (%94), basit ve etkili bir işlemle gram ölçekte üretimi gerçekleştirildi.

4. ARAŞTIRMA VE BULGULAR

4.1 Kromatografik Ayırmalar

4.1.1 Kolon Kromatografisi

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

4.1.2 İnce Tabaka Kromatografisi

Silikajel 60 (HF 254+366) (Merck)

4.2 Spektrumlar

4.2.1 ¹H-NMR Spektrumları

¹H-NMR 400 MHz Spektrometre (Bruker)

4.2.2 ¹³C-NMR Spektrumları

¹³C-NMR 100 MHz (Bruker)

4.2.3 HPLC Spektrumları

Kiral detektöre sahip Agilent 1260 HPLC

4.3 Deneyleler

4.3.1 Genel Asimetrik İndirgenme Prosedürü

100 mL'lik steril MRS Broth besiyerine 100 µl *Weissella paramesenteroides* N7 bakteri suşu eklendi ve 2 saat oda sıcaklığında 150 rpm karıştırma hızı ile karıştırıldı. 2 saat sonunda pH 6.5'e ayarlanarak tekrar belirlenmiş olan şartlarda 2 saat daha karıştırılmaya bırakıldı. Belirlenen sürenin sonunda 1 mmol substrat ilave edildi ve 24 saat boyunca oda sıcaklığında ve 150 rpm'de karıştırılmaya devam edildi. 24 saatin sonunda sıvı kısım dietil eter kullanılarak ekstrakte işlemi yapıldı. Dietil eter ekstraktı susuz Na₂SO₄ ile kurutuldu. Ekstraktta bulunan dietil eter düşük basınç altında ortamdandan uzaklaştırıldı. Geriye kalan ham ürün kolon kromatografisinde etil asetat-hekzan (10:90) çözücüsü ile saflaştırılma yapıldı. Elde edilen kiral alkollerin yapılarını NMR ile ve enantiyomerik aşırılıklar da kiral detektöre sahip HPLC ile belirlendi.

4.3.1.1 (*R*)-1-feniletanol (2a) (Şahin, 2017b)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ= 7.38-7.33 (m, 4H), 7.31-7.26 (m, 1H), 4.84 (q, J = 6.45 Hz, 1H), 2.62 (bs, OH), 1.48 (d, J = 6.5 Hz, 3H)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ= 146.0, 128.4, 127.3, 125.5, 70.2, 25.2; [α]₂₅^D = +41 (EK-1, Şekil-1)

Enantiyomerik aşırılık: %88

HPLC analizi: Chiralcel OD-H kolon, *n*-hekzan/*i*-PrOH, 95:5 akış hızı 1.0 mL/dak., 210 nm, 9.3 dak. (*R* enantiyomer), 11.1 dak. (*S* enantiyomer), (EK-1, Şekil 1,2).

4.3.1.2 (*R*)-1-(2-bromofenil)ethanol (2b) (Şahin, 2017b)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) 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, OH), 1.44 (d, J = 6.4 Hz, 3H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ= 144.7, 132.6, 128.7, 127.8, 126.7, 121.6, 69.1, 23.6; [α]₂₅^D = +51.4 (c 1.0, CHCl₃) (EK-1, Şekil-2)

Enantiyomerik aşırılık: %90

HPLC analizi: Chiralcel OD-H kolon, *n*-hekzan/*i*-PrOH, 99:1 akış hızı 1.0 mL/dak., 210 nm, 25.9 dak. (*S* enantiyomer), 29.0 dak. (*R* enantiyomer), (EK-1, Şekil 3,4).

4.3.1.3 (*S*)-1-(2-klorofenil)ethanol (2c) (Şahin, 2017b)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ= 7.58-7.56 (m, 1H), 7.32-7.17 (m, 3H), 5.27 (q, J = 6.4 Hz, 1H), 2.25 (bs, OH), 1.47 (d, J = 6.4 Hz, 3H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ= 143.0, 131.6, 129.4, 128.4, 127.2, 126.4, 66.9, 23.5; [α]₂₅^D = -59.1 (c 1.0, CHCl₃) (EK-1, Şekil-3)

Enantiyomerik aşırılık: %94

HPLC analizi: Chiralcel OD-H kolon, *n*-hekzan/*i*-PrOH, 98:2 akış hızı 0.8 mL/dak., 220 nm, 11.5 dak. (*R* enantiyomer), 12.8 dak. (*S* enantiyomer), (EK-1, Şekil 5,6).

4.3.1.4 1-(2-nitrofenil)etanol (2d) (Şahin, 2017b)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) 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, OH), 1.51 (d, J = 6.4 Hz, 3H)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ= 147.7, 141.0, 133.6, 128.0, 127.5, 124.2, 65.4, 24.2 (EK-1, Şekil-4)

Enantiyomerik aşırılık: 0

HPLC analizi: Chiralcel AS-H kolon, n-hekzan/i-PrOH, 95:5 akış hızı 0.8 mL/dak., 220 nm, 21.9 dak. (R enantiyomer), 23.1 dak. (S enantiyomer), (EK-1, Şekil 7,8).

4.3.1.5 (R)-1-(2-methoxyfenil)ethanol (2e) (Şahin, 2017b)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ= 7.36-7.43 (m, 1H), 7.28-7.23 (m, 1H), 6.97 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 6.88 (d, J = 8.20 Hz, 1H), 5.13-5.07 (m, 1H), 3.86 (s, 1H), 2.78 (bs, OH), 1.50 (d, J = 7.1 Hz, 3H);

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ= 156.5, 133.4, 128.3, 126.3, 120.8, 110.4, 66.4, 55.2, 22.9; [α]₂₅^D = +15.9 (c 1.1, CHCl₃) (EK-1, Şekil-5)

Enantiyomerik aşırılık: %64

HPLC analizi: Chiralcel OD-H kolon, n-hekzan/i-PrOH, 98:2 akış hızı 1.0 mL/dak., 220 nm, 17.8 dak. (S enantiyomer), 19.1 dak. (R enantiyomer), (EK-1, Şekil 9,10).

4.3.1.6 (R)-1-(3-metilfenil) ethanol (2f) (Yılmaz et al. 2017)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) 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)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ=145.8, 138.1, 128.4, 128.2, 126.1, 122.4, 70.4, 25.1, 21.5; [α]₂₅^D = +13.2 (c 0.6, CHCl₃) (EK-2, Şekil-6)

Enantiyomerik aşırılık: %70

HPLC analizi: Chiralcel OD-H kolon, n-hekzan/i-PrOH, 97:3 akış hızı 1.0 mL/dak., 210 nm, 11.9 dak. (R enantiyomer), 15.2 dak. (S enantiyomer), (EK-1, Şekil 11,12).

4.3.1.7 (*R*)-1-(3-methoxyfenil)ethanol (2g) (Şahin, 2017)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ= 7.27-7.23 (m, 1H), 6.93-6.91 (m, 2H), 6.81-6.78 (m, 1H), 4.83 (q, J = 6.4 Hz, 1H), 3.79 (s, 3H), 2.41 (bs, OH), 1.46 (d, J = 6.5 Hz, 3H)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ= 159.7, 147.6, 129.5, 117.7, 112.8, 110.9, 70.2, 55.2, 25.1; [α]₂₅^D = +5.9 (c 0.9, CHCl₃) (EK-2, Şekil-7)

Enantiyomerik aşırılık: %10

HPLC analizi: Chiralcel OD-H kolon, n-hekzan/i-PrOH, 95:5 akış hızı 0.8 mL/dak., 210 nm, 17.9 dak. (*S* enantiyomer), 20.7 dak. (*R* enantiyomer), (EK-1, Şekil 13,14).

4.3.1.8 (*R*)-1-(3-bromofenil)ethanol (2h) (Yılmaz et al. 2017)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) 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)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ=148.1, 130.4, 130.1, 128.5, 124.0, 122.5, 69.6, 25.2; [α]₂₅^D = +68.3 (c 1.0, CHCl₃),

Enantiyomerik aşırılık: %64

HPLC analizi: Chiralcel OD-H kolon, n-hekzan/i-PrOH, 98:2 akış hızı 1.0 mL/dak., 210 nm, 14.6 dak. (*S* enantiyomer), 16.3 dak. (*R* enantiyomer), (EK-1, Şekil 15,16).

4.3.1.9 (*S*)-1-(3-nitrofenil)ethanol (2i) (Liang et al. 2013, Lin et al. 2009)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ= 8.21 (m, 1H), 8.09 (m, 1H), 7.68 (m, 1H), 7.49(m, 1H), 4.99 (q, J = 6.5 Hz, 1H), 2.84 (bs, OH), 1.51 (d, J = 6.5 Hz, 3H)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ= 148.3, 147.9, 131.6, 129.4, 122.3, 120.4, 69.3, 29.4; [α]₂₅^D = -34.4 (c 1.0, CHCl₃)

Enantiyomerik aşırılık: %92

HPLC analizi: Chiralcel AS-H kolon, n-hekzan/i-PrOH, 95:5 akış hızı 0.8 mL/dak., 220 nm, 23.7 dak. (*R* enantiyomer), 25.5 dak. (*S* enantiyomer), (EK-1, Şekil 17,18).

4.3.1.10 (*R*)-1-(4-klorfenil)ethanol (**2j**) (Zilbeyaz vd., 2012)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ= 7.29-7.22 (m, 4H), 4.79 (q, J = 6.5 Hz, 1H), 2.77 (bs, OH), 1.41 (d, J = 6.5 Hz, 3H)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ= 144.2, 132.9, 128.5, 126.8, 69.6, 25.2; [α]₂₅^D = +32.7 (c 1.0, CHCl₃)

Enantiyomerik aşırılık: %70

HPLC analizi: Chiralcel OD-H kolon, n-hekzan/i-PrOH, 98:2 akış hızı 1.0 mL/dak., 220 nm, 14.7 dak. (*S* enantiyomer), 16.5 dak. (*R* enantiyomer), (**EK-1, Şekil 19,20**).

4.3.1.11 (*S*)-1-(4-bromfenil)ethanol (**2k**) (Şahin, 2017b)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ= 7.43-7.40 (m, 2H), 7.18-7.15 (m, 2H), 4.75 (q, J = 6.5 Hz, 1H), 2.93 (bs, OH: exchanges with D₂O), 1.39 (d, J = 6.5 Hz, 3H)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ= 144.7, 131.5, 127.2, 121.0, 69.6, 25.2; [α]₂₅^D = -19.5 (c 1.0, CHCl₃)

Enantiyomerik aşırılık: %50

HPLC analizi: Chiralcel OD-H kolon, n-hekzan/i-PrOH, 95:5 akış hızı 1.0 mL/dak., 220 nm, 9.4 dak. (*R* enantiyomer), 10.4 dak. (*S* enantiyomer) (**EK-1, Şekil 21,22**).

4.3.1.12 (*R*)-1-(*p*-tolyl)ethanol (**2l**) (Şahin, 2017b)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) 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, OH: exchanges with D₂O), 2.37 (s, 3H), 1.48 (d, J = 6.5 Hz, 3H)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ= 142.9, 137.0, 129.1, 125.4, 70.1, 25.1, 21.1; [α]₂₅^D = -56.2 (c 1.0, CHCl₃)

Enantiyomerik aşırılık: %94

HPLC analizi: Chiralcel AS-H kolon, n-hekzan/i-PrOH, 95:5 akış hızı 0.8 mL/dak., 220 nm, 8.1 dak. (*S* enantiyomer), 8.9 dak. (*R* enantiyomer), (**EK-1, Şekil 23,24**).

4.3.1.13 (R)-1-(4-metoksifenil)ethanol (2m) (Singh ve Chopra, 2016)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ= 7.30-7.27 (m, 2H), 6.89-6.85 (m, 2H), 4.83 (q, J = 6.4 Hz, 1H), 3.79 (s, 3H), 2.11 (bs, OH), 1.46 (d, J = 6.5 Hz, 3H)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ= 158.9, 138.0, 126.7, 113.8, 69.9, 55.3, 25.0; [α]_{D25} = +44.4 (c 1.0, CHCl₃)

Enantiyomerik aşırılık: %72

HPLC analizi: Chiralcel OD-H kolon, n-hekzan/i-PrOH, 95:5 akış hızı 0.8 mL/dak., 220 nm, 16.1 dak. (*S* enantiyomer), 18.6 dak. (*R* enantiyomer), (**EK-1, Şekil 25,26**).

4.3.1.14 (R)-1-(4-nitrofenil)ethanol (2n) (Şahin, 2017b)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ= 8.10-8.14 (m, 2H), 7.51-7.48 (m, 2H), 5.00-4.94 (m, 1H), 2.75 (bs, OH), 1.47 (d, J = 6.5 Hz, 3H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ= 153.3, 147.0, 126.1, 123.7, 69.4, 25.4; [α]_{D25} = +1.3 (c 0.5, CHCl₃)

Enantiyomerik aşırılık: %52

HPLC analizi: Chiralcel AS-H kolon, n-hekzan/i-PrOH, 80:20 akış hızı 1.0 mL/dak., 220 nm, 10.6 dak. (*R* enantiyomer), 13.6 dak. (*S* enantiyomer), (**EK-1, Şekil 27,28**).

4.3.1.15 (R)-1-(p-biphenyl)ethanol (2o) (Şahin, 2017b)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) 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 (bs, OH: exchanges with D₂O), 1.56 (d, J = 6.5 Hz, 3H)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ= 144.9, 140.9, 140.4, 128.8, 127.3, 127.3, 127.1, 125.9, 70.1, 25.2; [α]_{D25} = +39.6 (c 0.55, CH₂Cl₂)

Enantiyomerik aşırılık: %76

HPLC analizi: Chiralcel OD kolon, n-hekzan/i-PrOH, 90:10 akış hızı 0.6 mL/dak., 220 nm, 16.7 dak. (*S* enantiyomer), 18.0 dak. (*R* enantiyomer), (**EK-1, Şekil 29,30**).

4.3.1.16 (S)-1-(naphthalen-2-yl)ethanol (2p) (Wu et al. 2016)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ= 7.85 (m, 4H), 7.52 (m, 3H), 5.07 (q, J = 6.5 Hz, 1H), 2.21 (bs, OH), 1.60 (d, J = 6.4 Hz, 3H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ=143.2, 133.3, 132.9, 128.3, 128.0, 127.7, 126.2, 125.8, 123.9, 123.8, 70.5, 25.2; [α]₂₅^D = -26.9 (c 0.5, CH₂Cl₂)

Enantiyomerik aşırılık: %72

HPLC analizi: Chiralcel AS-H kolon, n-hekzan/i-PrOH, 97:3 akış hızı 1.0 mL/dak., 220 nm, 19.8 dak. (R enantiyomer), 23.8 dak. (S enantiyomer), (**EK-1, Şekil 31,32**).

4.3.1.17 (R)-1-(4-metoksifenil)propanol (2r) (Zhong vd., 2007)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ= 7.30-7.28 (m, 2H), 6.92-6.90 (m, 2H), 4.56 (t, J = 6.6 Hz, 1H), 3.83 (s, 1H), 1.86-1.65 (m, 2H), 0.92 (t, J = 7.4 Hz, 3H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ=159.0, 136.8, 127.2, 113.8, 75.7, 55.3, 31.8, 10.2; [α]₂₅^D = +40.1 (c 1.2, CHCl₃)

Enantiyomerik aşırılık: >%99

HPLC analizi: Chiralcel OD-H kolon, n-hekzan/i-PrOH, 95:5 akış hızı 1.0 mL/dak., 254 nm, 19.3 dak. (R enantiyomer), 21.3 dak. (S enantiyomer), (**EK-1, Şekil 33,34**).

4.3.1.18 (S)-1-cyclohexyl(phenyl)methanol (2s) (Wang et al. 2017)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ= 7.36-7.28 (m, 5H), 4.39 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 2.01-1.61 (m, 6H), 1.42-0.94 (m, 6H)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ=143.6, 128.2, 127.4, 126.6, 79.4, 45.0, 29.3, 28.8, 26.4, 26.1, 26.0; [α]₂₅^D = +10.3 (c 1.0, CHCl₃)

Enantiyomerik aşırılık: %28

HPLC analizi: Chiralcel OD kolon, n-hekzan/i-PrOH, 95:5 akış hızı 0.5 mL/dak., 254 nm, 17.4 dak. (R enantiyomer), 21.3 dak. (S enantiyomer), (**EK-1, Şekil 35,36**).

4.3.1.19 (S)-1,2 difenilethanol (2t) (Musa et al. 2018, Guo et al. 2015)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ= 7.40-7.23 (m, 10H), 4.93 (dd, J = 8.2, 5.1 Hz, 1H), 3.11-3.10 (m, 2H), 2.07 (bs, 1H, OH)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ=143.8, 138.1, 129.6, 128.5, 128.5, 127.7, 126.7, 125.9, 75.4, 46.1; [α]_D²⁵ = -14.3 (c 1.0, CHCl₃)

Enantiyomerik aşırılık: >%99

HPLC analizi: Chiralcel AS-H kolon, n-hekzan/i-PrOH, 98:2 akış hızı 1.0 mL/dak., 254 nm, 16.0 dak. (*S* enantiyomer), 17.6 dak. (*R* enantiyomer), (**EK-1, Şekil 37,38**).



5.SONUÇ

Enantiyomerik olarak saf kiral alkollerin yeri ve önemi günümüzde giderek artış göstermektedir ve birçok bileşiminde sentezinde önemli bir yere sahiptir. Yüksek lisans tezi olarak yapılan bu çalışmada dört farklı *Lactobacillus* bakteri suşunun asimetric indirgenme reaksiyonları ile kiral alkol sentezinde tüm hücrenin biyokatalizör olarak kullanılması değerlendirilmiştir. Bu dört farklı suş arasında *Weissella paramesenteroides* N7 bakteri suşunun en etkili biyokatalizör olduğu yapılan çalışmalar sonucu belirlenmiştir. Optimize edilen reaksiyon şartlarıyla (RT°C, pH 6.5, 24 saat ve 150 rpm) çeşitli prokiral aromatik ketonların asimetric indirgenme reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara bakıldığında (**R**)-**2r**, basit ve etkili bir işlemle mükemmel bir enantiyomerik aşırılık (>%99) ve verim (%94) ile gram ölçekte üretilmiştir. Elde edilen ürünlerin konfigürasyonları benzen halkasındaki grupların yapısı ve pozisyonu *R* ve *S* olarak değişmektedir. Reaksiyonların seçicilik ve dönüşümlerinde benzen halkasındaki gruplar önemli oranda etkilemektedirler. Örneğin; *orto*-bromo (**1b**) asetofenonun asimetric indirgenmesinde enantiyomerik aşırılık %90 ve dönüşümünün %62 olduğu gözlemlenirken *orto*-nitro (**1d**) asetofenonun reaksiyonda rasemik halde ürün oluşturduğu gözlemlenmiştir. Burada benzen halkasına bağlı olan grubun enantiyoseçicilik üzerinde ne kadar etkin olduğu görülmektedir. *Weissella paramesenteroides* N7 biyokatalizörü kullanılarak yapılan asimetric indirgenmelerde bu biyokatalizörün *orto*-süstitüe aromatik ketonlardan ziyade *para*- ve *meta*-süstitüe aromatik ketonların indirgenmesinde daha etkili biyokatalizör olduğu görülmüştür. *orto*-nitro asetofenonda reaksiyonun olmaması bu grup ile reaksiyon merkezi arasındaki sterik itmeden kaynaklanan hidrojen atomunun transferinin gerçekleşmemesidir. *orto*-bromo asetofenonda ise çok yüksek olmasada bir dönüşüm meydana gelmiştir. Çünkü brom atomu nitro atomu kadar büyük değildir. (**1o**) asimetric indirgenmesiyle enantiyomerik aşırılığın %76 dönüşümünün ise çok düşük bir değer %10 olduğu gözlemlenmiştir. Dönüşümün düşük bir değere sahip olması *para*- pozisyonunda bulunan fenilin, benzen halkası üzerinde bulunan diğer grupların gösterdikleri farklı sterik ve elektronik etkileriyle açıklanabilir. Sonuç olarak bakıldığında 1-(4-metoksifenil)propanon (**1r**)'un asimetric indirgenmesiyle elde edilen 1-(4-metoksifenil)propanol (**2r**)'ün >%99'lük yüksek bir enantiyomerik aşırılığa ve %94'lük bir verime sahip olduğu belirlendi ve farmasötik açıdan çok önemli bir yere sahip olabilecek 1-(4-metoksifenil)propanol (**2r**) kiral sekonder alkole başarılı bir şekilde indirgenmiştir. Bu çalışmada kullanılan biyokatalizör benzen halkasındaki süstitüentlerin pozisyonuna göre yüksek enantiyomerik aşırılık göstermiştir. *Weissella paramesenteroides* N7 biyokatalizörünün enantiyoseçiciliği ve dönüşümünün benzen halkasına bağlı bulunan gruplarının pozisyonları ve elektronik etki tarafından kontrol edildiği görülmektedir. Bu kiral katalizör başka prokiral ketonların indirgenmesinde başarılı bir şekilde kullanılacak potansiyele sahip olabilir. *Weissella paramesenteroides* N7 biyokatalizörü prokiral ketonların kiral karbonil bileşiklerinin asimetric indirgenme reaksiyonlarında kullanılan toksik ve çevreye zararlı kimyasal katalizörlerin yerine alternatif bir biyokatalizör olarak kullanılabilceğide gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

- Ananthanarayanan, V.S., Tetreault, S., Saint-Jean, A.(1993). *Interaction of Calcium Channel Antagonists with Calcium: Spectroscopic and Modeling Studies on Diltiazem and Its Ca²⁺ Complex*. **J. Med. Chem.**, 36, 1324–1332.
- Atkins, R.C. ve Carey, F.A. (1997). *The McGraw-Hill companies, Organic Chemistry. Inc*, 184–212, New York.
- Aydoğan, O. (2012). *Ketonların Biyokatalitik İndirgenmesi ile Enantiyomerik Saflıkta Kiral Madde Üretimi*. **Doktora Tezi**, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Babaarslan, Ç. (2008). *Biyokatalitik Olarak Enantiyoseçimli α -Hidroksi Keton Üretim Prosesinin Geliştirilmesi, Doktora Tezi*, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Bhattacharyya, M. S., Singh, A., Banerjee, U. C. (2010). *Immobilization of Intracellular carbonyl reductase from Geotrichum candidum for the stereoselective reduction of 1-naphthyl ketone*. **Bioresour. Technol.**, 101, 1581-1586.
- Blaser, H. U. (1992). *The Chiral Pool as a Source of Enantioselective Catalysts and Auxiliaries*, **Chem. Rev.**, 92 (5), 935-952.
- Borges, K. B., Borges, W. D., Duran-Patron, R., Pupo, M.T., Bonato, P.S., Collado, I.G. (2009). *Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts*. **Tetrahedron: Asymmetry**, 20, 385-397.
- Brunner, H. ve Zettlmeier, W. (1993). *Handbook of Enantioselective Catalysis: With Transition Metal Compounds*, **VHC, New York**.
- Bunnett, J. F. (1999). *Organic Chemistry: A Short Course, 10th edition (Hart, Harold; Craine, Leslie E.; Hart, David J.)*. **Journal of Chemical Education**, 76(10), 1341. <https://doi.org/10.1021/ed076p1341.1>
- Chem.libretexts. (2006). *Chirality in Organic Chemistry*. <https://chem.libretexts.org>, 21.08.2017.

- Cohen, A., Silverberg S. J. (2002). *Calcimimetics: therapeutic potential in hyperparathyroidism*. **Curr Opin Pharmacol**, 2: 734-739.
- Carlsen, PHJ., Katsuki T, Martin VS, Sharpless KB. (1981). *A greatly improved procedure for ruthenium tetroxide catalyzed oxidations of organic compounds*. **J. Org. Chem**, 46: 3936–3938.
- Comasseto, JV., Andrade, LH., Omori, AT., Assis, LF., Porto, ALM. (2004). *Deracernization of aryl ethanols and reduction of acetophenones by whole fungal cells of Aspergillus terreus CCT 4083, A. terreus CCT 3320 and Rhizopus oryzae CCT 4964*. **J Mol Catal B Enzym**, 29:55–61.
- Contente, ML., Serra, I., Polazzola, L., Parravicini, C., Gianazza, E., Eberini, I., Pinto, A., Guidi, B., Molinari, F., Romano, D., (2016). *Enzymatic reduction of acetophenone derivatives with a benzil reductase from Pichia glucozyma (KRED1-Pglu): electronic and steric effects on activity and enantioselectivity*. **Org Biomol Chem** 14: 3404-3408.
- Corey, EJ., Helal, CJ. (1996). *Catalytic enantioselective synthesis of the second generation histamine antagonist cetirizine hydrochloride*. **Tetrahedron Lett** 37: 4837-4840.
- Polarimeter Scheme. <https://www.dreamstime.com>, (18.08.2017)
- Demir, A. S., Emrulloğlu, M. (2007). **Org. Synth.**, 4 ,321-325.
- Demir, A.S., Fındık, H., Köse, E.(2004). **Tetrahedron: Asymm.**, 15, 777-781.
- Demir, A. S., Reis, Ö., İğdir, Ç. (2004). **Tetrahedron: Asymm.**, 60, 3427-3432.40
- 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.
- Enantiomer. (2017, 10 Mart). Wikipedia, The Free Encyclopedia içinde. <http://en.wikipedia.org/wiki/Enantiomer>, 17.08.2017.
- Devalia, JL., De Vos, C., Hanotte, F., Baltes, E. (2001). *A randomized, double-blind, crossover comparison among cetirizine, levocetirizine, and ucb 28557 on*

histamine-induced cutaneous responses in healthy adult volunteers. Allergy, 56: 50-57.

Devaux-Basseguy, R., Bergel, A., Comtat, M. (1997). *Potential applications of NAD (P) dependent oxidoreductases in synthesis: a survey. Enzyme Microb Technol, 20: 248-258.*

Di Nunno, L., Franchini, C., Nacci, A., Scilimati, A., Sinicropi, MS. (1999). *Baker's yeast induced asymmetric reduction of α -ketosulfides: synthesis of optically active 1-(benzothiazol-2-ylsulfanyl)-2-alkanols, 2-alkanols, and thiiranes. Tetrahedron: Asymmetry, 10:1913–1926.*

Dudzik, A., Snoch, W., Borowiecki, P., Opalinska-Piskoraz, J., Witko, M., Heider, J., Szalanie, M. (2015). *Asymmetric reduction of ketones and β -keto esters by (S)-1-phenylethanol dehydrogenase from denitrifying bacterium *Aromatoleum aromaticum*. App Microbiol Biotechnol, 99: 5055-5069.*

Faber, K. (1997). *Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook, 3th Edition Springer-Verlag Berlin, Germany*

Faber, K. ve Strauss, U.T. (1999). *Deracemization of (\pm)-Mandelic Acid Using a LipaseMandelate Racemase Two-Enzyme System. Tetrahedron: Asymmetry, Vol.10, pp. 4079-4081.*

Ghanem, A. ve Aboul-Enein, H.Y. (2004). *Lipase-Mediated Chiral Resolution of Racemates in Organic Solvents. Tetrahedron: Asymmetry, 15; 3331-3351.*

Jacques, J., Collet, A. ve Wilen, S. H. (1981). *Enantiomers, Racemates and Resolutions, Wiley, New York.*

Gao, K., Song, Q. ve Wei, D. (2006). *Coupling of enantioselective biooxidation of DL 1,2 propanediol and bioreduction of pinacolone via regeneration cycle of coenzyme. Appl Microbiol Biotechnol, 71:819–823.*

Guo, J., Chen, J. ve Lu, Z. (2015). *Cobalt-catalyzed asymmetric hydroboration of aryl ketones with pinacolborane. Chemical Communications, 51: 5725 5727.*

- Hage, A., Petra, D. G., Field, J.A., Schipper, D., Wijnberg, J.,B., Kame, P.,C., Schoemaker, H.,E. (2001). *Asymmetric reduction of ketones via whole cell bioconversions and transfer hydrogenation: complementary approaches. Tetrahedron: Asymmetry* 12:1025-1034.
- Houng, J.Y. ve Liau, J.S. (2006). *Mathematical modeling of asymmetric reduction of ethyl 4-chloro acetoacetate by bakers'yeast. Enzyme Microb Technol*, 38:879–886.
- Johannes, T., Simurdiak, M. R. ve Zhao, H. (2005). *Biocatalysis*. Department of Chemical and Biomolecular Engineering, University of Illinois, Urbana, Illinois, U.S.A.
- Joy, M. S., Kshirsagar, A.V., Franceschini, N. (2006). *Calcimimetics and the treatment of primary and secondary hyperparathyroidism. Ann Pharmacother* 38: 1871-1880.
- Jomy, K.(2006). *Joseph, S. L. Bir S. Eur. J. Org. Chem.* 590–594.
- Karadeniz, F., (2006). *Rasemik 1-fenil-1-propanolün Lipaz Katalizli Enantiyoseçimli Esterleşme Tepkimesi. Yüksek Lisans Tezi*, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- 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.
- Kira, I. Suzuki, T. Onishi, N. Watanabe, K., Nakanishi, E. (2009). *Microbial production of (S)-1-phenyl-1, 3-propanediol by stereospecific reduction of 3 hydroxy-1-phenylpropane-1-one. J. Mol. Catal. B: Enzym.* 56, 283-287.
- Kordikowski, A.,York, P. and Latham, D. (1999). *Resolution of Ephedrine Insupercritica CO2: A Novel Technique for Seperation of Chiral Drugs, Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88, 786-791.
- Kurbanoglu, E.B., Taskin, M., Zilbeyaz, K., Kurbanoglu, N.I. (2009a). *Production of (R)-3'-fluorophenylethan-1-ol by Trichothecium roseum isolate in a*

laboratory scale bioreactor. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 84, 1474-1479.

45

Kurbanoglu, E.B., Zilbeyaz, K., Taskin, M., Kurbanoglu, N.I. (2009b). *Total production of (R)-3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl ethanol by asymmetric reduction of 3,5-bis(trifluoromethyl)-acetophenone in the submerged culture of Penicillium expansum isolate.* **Tetrahedron: Asymmetry**, 20, 2759-2763.

Kurbanoglu, E.B., Zilbeyaz, K., Kurbanoglu, N.I. ve Kilic, H. (2007a). *Enantioselective Reduction of Substituted Acetophenones by Aspergillus niger*, **Tetrahedron: Asymmetry**, Cilt 18, 1159-1162.

Kurbanoglu, E.B., Zilbeyaz, K., Kurbanoglu, N.I. ve Kilic, H. (2007b). *Asymmetric Reduction of Acetophenone Analogues by Alternaria alternata Using Ram Horn Peptone*, **Tetrahedron: Asymmetry**, Cilt 18, 2332-2335.

Kurbanoglu, E.B., Zilbeyaz, K., Kurbanoglu, N.I. ve Taskin, M. (2007). *Highly Enantioselective Reduction of Acetophenone by Locally Isolated Alternaria alternata Using Ram Horn Peptone*, **Tetrahedron: Asymmetry**, Cilt18, 1529-1532.

Kurbanoglu, E. B, Zilbeyaz, K., Kurbanoglu, N I. (2011). *Cryptococcus laurentii as a new biocatalyst for the asymmetric reduction of substituted acetophenones.* **Tetrahedron: Asymmetry**, 22; 345-350.

Legnani, L. Morandi B. (2016). *Direct catalytic synthesis of unprotected 2-amino-1 phenylethanol from alkenes by using iron(II) phthalocyanine.* **Angew Chem Int Ed Engl**, 55: 2248-2251.

Liu, W. P. Yuan, M. L., Yang, X. H., Li, K., Xie, J. H., Zhou, Q. L. (2015). *Efficient asymmetric transfer hydrogenation of ketones in ethanol with chiral iridium complexes of spiro PAP ligands as catalysts*, **Chem. Commun**, 51, 6123-6125.

Liang, P., Qin, B., Mu, M., Zhang, X., Jia, X., You, S. (2013). *Prelog and anti Prelog stereoselectivity of two ketoreductases from Candida glabrata.* **Biotechnology letters**, 35: 1469-1473.

- Lin, H., Chen, Y.Z., Xu, X.Y., Xia, S.W., Wang, L.X. (2009). *Preparation of key intermediates of adrenergic receptor agonists: Highly enantioselective production of (R)- α halohydrins with Saccharomyces cerevisiae CGMCC 2.396.* **J. Mol Catal B Enzym**, 57: 1-5.
- Maier, M.N., Franco, P., Lindner, W. (2001). *Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives.* **Journal of Chromatography A**, 906:3-33.
- Mandal, D., Ahmad, A., Khan, M. I. ve Kumar, R., (2004). *Enantioselective Bioreduction of Acetophenone and Its Analogous by the Fungus Trichothecium sp.* **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Vol. 27, pp. 61-63.
- Matsuda, T., Yamanaka, R., Nakamura, K. (2009). *Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction.* **Tetrahedron: Asymmetry**, 20, 513-557.
- Matsuyama, A., Yamamoto, H., Kobayashi, Y. (2002). *Practical application of recombinant whole-cell biocatalysts for the manufacturing of pharmaceutical intermediates such as chiral alcohols.* **Org. Proc. Res. Dev.**, 6, 558-561.
- Meguro K, Aizawa M, Sohoda T, Kawamatsu Y, Nagaoka N. (1985). *New 1, 4 dihydropyridine derivatives with potent and long-lasting hypotensive effect.* **Chem Pharm Bull**, 33: 3787-3797.
- Murzin DY, Maki-Arvela P, Toukoniitty E, Salmi T. (2005). *Asymmetric heterogeneous catalysis: science and engineering.* **Catal Rev.**, 47:175-256.
- Musa, M.M., Bsharat, O., Karume, I., Vieille, C., Takahashi, M., Hamdan, S.M. (2018). *Expanding the substrate specificity of Thermoanaerobacter pseudoethanolicus secondary alcohol dehydrogenase by a dual site mutation.* **European Journal of Organic Chemistry**, 2018: 798-805.
- Nagano, N. (2006). *Pharmacological and clinical properties of calcimimetics: calcium receptor activators that afford an innovative approach to controlling hyperparathyroidism.* **Pharmacol Ther**, 109: 339-365.

- Nakamura, K., Yamanaka, R., Matsuda, T. ve Harada, T. (2003). *Recent Developments in Asymmetric Reduction of Ketones with Biocatalysts* **Tetrahedron: Asymmetry**, Cilt 14, No 18, 2659–2681.
- Nejem, R. M. (2004). *Enantioselective sensors and biosensors for clinical analysis*. **Doctor Thesis**, University of Pretoria, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, Pretoria.
- Ojima, I. (Ed.) (1993). *Catalytic Asymmetric Synthesis*, VHC, New York.
- Patel, R. N., Goswami, A., Chu, L., Donovan, M. J., Nanduri, V., Goldberg, S., Johnston, R., Siva, P. J., Nielsen, B., Fan, J., He, W., Shi, Z., Wang, K. Y., Eiring, R., Cazzulino, D., Singh, A. ve Mueller, R., (2004). *Enantioselective Microbial Reduction of Substituted Acetophenones*, **Tetrahedron: Asymmetry**, Vol. 15, pp.1247-1258.
- Öksüz, S., Şahin, E., Dertli, E. (2018). *Synthesis of Enantiomerically Enriched Drug Precursors by *Lactobacillus paracasei* BD 87E6 as a Biocatalyst*. **Chemistry & biodiversity**, 15: e1800028.
- 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.
- Pereira, RS. (1998). *The use of baker's yeast in the generation of asymmetric centers to produce chiral drugs and other compounds*. **Crit Rev Biotechnol.**, 18:25-64.
- Pérez, H.I., Luna, H., Manjarrez, N., Solís, A. (2001). *Microbiological resolution of chiral arylethyl carbinols by *Nocardia corallina**. **Biotechnology letters**, 23: 1467-1472.
- Perrone, M.G., Santandrea, E., Bleve, L., Vitale, P., Colabufo, N.A., Jockers, R., Milazzo, F.M., Sciarroni, A.F., Scilimati, A. (2008). *Stereospecific synthesis and bio-activity of novel β_3 -adrenoceptor agonists and inverse agonists*. **Bioorg Med Chem**, 16:2473–2488.

- Perrone, M.G., Santandrea, E., Scilimati, A., Syldatk, C., Tortorella, V. (2005). *Screening yeasts for the stereoselective reduction of oxoester clofibrate analogues*. **Tetrahedron: Asymmetry**, 16:1473–1477.
- Pollard, D.J. and Woodley, J.M. (2006). *Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now*. **Trends Biotechnol.**, 25: 66–73.
- Ramacciotti, A., Fiaschi, R. and Napolitano, E. (1996). *Enantioselective synthesis of natural combretastatin*. **Tetrahedron: Asymmetry**, 7: 1101–1104.
- Ren, X. Wei, S. Du, H. (2015). *Facile Development of Chiral Alkenylboranes from Chiral Dienes for Asymmetric Hydrogenation of Silyl Enol Ethers*, **Org. Lett.**, 17, 990-993.
- Rodriguez C, Borzecko W, Satter JH, Kroutil W, Lavandera I, Gotor V. (2014). *Steric vs. electronic effects in the Lactobacillus brevis ADH-catalyzed bioreduction of ketones*. **Org Biomol Chem.**, 12: 673-681.
- Rozzell, J. D. (1999). *Commercial Scale Biocatalysis: Myths and Realities*, **Bioorg. Med. Chem.**, 7 (10), 2253–2261.
- Salvi, N.A. and Chattopadhyay, S. (2016). *Laboratory scale-up synthesis of chiral carbinols using Rhizopus arrhizus*. **Tetrahedron: Asymmetry**, 27: 188, 192.
- Schmidt, F., Stemmler, R.T., Rudolph, J., Bolm, C. (2006). *Catalytic asymmetric approaches towards enantiomerically enriched diarylmethanols and diarylmethylamines*. **Chem Soc Rev.**, 35: 454-470.
- Sheldon, R. A. (1993). *Chirotechnology: Industrial Synthesis of Optically Active Compounds.*, **Marcel Dekker, Inc.**, New York, 1993.
- Siedler, S., Lindner, S.N., Bringer, S., Wendisch, V.F., Bott, M. (2013). *Reductive whole cell biotransformation with Corynebacterium glutamicum: improvement of NADPH generation from glucose by a cyclized pentose phosphate pathway using pfkA and gapA deletion mutants*. **Appl Microbiol Biotechnol.**, 97:143–152.

- Singh, A. Chopra, H. K. (2016). *New benzimidazolium-based chiral ionic liquids: synthesis and application in enantioselective sodium borohydride reductions in water*, **Tetrahedron: Asymmetry**, 27, 448-453.
- Songür, R., (2009). *Rasemik Benzoin Asetattan Mikrobiyal Hidroliz Tepkimesi ile Enantiyomerik Saflıkta Benzoin Üretimi*. **Yüksek Lisans Tezi**, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Straathof, A. J., Panke, S. and Schmid, A. (2002). *The Production of Fine Chemicals by Biotransformations*, **Current opinion in biotechnology**, 13, 548–556.
- Şahin, E. (2017a). *Debaryomyces hansenii as a new biocatalyst in the asymmetric reduction of substituted acetophenones*. **Biocatalysis and Biotransformation**, 35:5, 363-371.
- Şahin, E. (2017b). *Lactobacillus curvatus Suşu ile Asetofenon Türevlerinin Asimetrik İndirgenmesi*. **GÜFBED/GUSTIJ.**, 7(2): 285-308
- Tanyeli, C., Özdemirhan, D., Ezen, B. (2002) **Tetrahedron**, 58, 9983- 988.
- Timpson, L.M., Liliensiek, A.K., Alsafadi, D., Cassidy, J., Sharkey, M.A., Liddell, S., Allers, T., Paradise, F. (2013). *A comparison of two novel alcohol dehydrogenase enzymes (ADH1 and ADH2) from the extreme halophile Haloferax volcanii*. **Appl Microbial Biotechnol.**, 97: 195-203.
- Temino, D.M., Hartmeier, W. and Ansorge-Schumacher, M.B. (2005). *Entrapment of the Alcohol Dehydrogenase from Lactobacillus kefir in Polyvinyl Alcohol for the Synthesis of Chiral Hydrophobic Alcohols in Organic Solvents*. **Enzyme Microbial Technology**, Vol. 36(1), pp.3-9.
- Telefoncu, A. (1995). **Biyoteknoloji Ege Üniversitesi Fen Fakültesi yayınları**, Ege Üniversitesi.
- Tüzün, C. (1994). *Stereokimya*. **Ankara: Palme Yayın Dağıtım**.
- Tüzün, C. (2005). *Biyokimya*. **Ankara: Palme Yayın Dağıtım**.
- Uyar T. İnam R. (Ed.) (2011). *Organic Chemistry: a Short Course*, **Boston: Houghton Mifflin Company**, 149.

- Valadez-Blanco, R., Livingston, A.G. (2009). *Enantioselective whole-cell biotransformation of acetophenone to S-phenylethanol by Rhodotorula glutinis: Part I. Product formation kinetics and feeding strategies in aqueous media.* **Biochem. Eng. J.**, 46, 44-53.
- 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-Fernandez, V., Gotor, V. (2010). *Candida tropicalis CE017: a new Brazilian enzymatic source for the bio-reduction of aromatic prochiral ketones,* **J. Braz. Chem. Soc.**, 21, 1-21.
- Viatcheslav, S., Melvin, D.J., Wildeliz, C., Lorianne, B., Cindybeth, V., Irisbel, G., Margarita, OM. (2009). *Chiral spiroaminoborate ester as a highly enantioselective and efficient catalyst for the borane reduction of furyl, thiophene, chroman and thiochroman containing ketones.* **Tetrahedron: Asymmetry**, 20:2659–2665.
- Vitale P, D'Introno C, Perna, F.M., Perrone, M.G., Scilimati, A. (2013). *Kluyveromyces marxianus CBS 6556 growing cells as a new biocatalyst in the asymmetric reduction of substituted acetophenones.* **Tetrahedron: Asymmetry**, 24:389.394.
- Vitale, P., Perna, F.M., Perrone, M.G., Scilimati, A. (2011). *Screening on the use of Kluyveromyces marxianus CBS 6556 growing cells as enantioselective biocatalysts for ketone reductions.* **Tetrahedron: Asymmetry**, 22:1985, 1993
- Wanda, K.M. ve Agnieszka, M. (2004). *Enantio Selective Reduction of Bromo- and Methoxy Acetophenone Derivatives Using Carrot and Celeriac Enzymatic System,* **Tetrahedron: Asymmetry**, Cilt 15, No 13, 1965–1967.
- Ward, O. P. ve Singh, A. (2000). *Enzymatic Asymmetric Synthesis by Decarboxylases.* **Current Opinion in Biotechnolog**, Vol.11, pp. 520-526.
- Wang P, Liu Y, Zhang Y L, Da CS. (2017). *The inexpensive additive N methylmorpholine effectively decreases the equivalents of nucleophiles in the catalytic highly enantioselective arylation of aryl aldehydes.* **Chirality**, 29: 443-450.

- Wang X, Zhang J, Liu Y, Cui Y. (2014). *Chiral Porous TADDOL-Embedded Organic Polymers for Asymmetric Diethylzinc Addition to Aldehydes*. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, 87: 435-440
- Wei, S. Du, H. (2014). *A Highly Enantioselective Hydrogenation of Silyl Enol Ethers Catalyzed by Chiral Frustrated Lewis Pairs*, **J. Am. Chem. Soc.** 136, 12261-12264.
- Williams, R.C. Riley, C.M. Sigvardson, K.W., Fortunak, J., Ma, P., Nicolas, E.C., Unger, S.E. Krahn, D.F. ve Bremmer, S.L. (1998). *Pharmaceutical Development and Specification of Stereoisomers*, **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, 17, 917-924.
- Wu, J.Y. ve Liang, T.L. (1999). *Enhancement of Enantioselectivity by Altering Alcohol Concentration for Esterification in Supercritical CO₂*, **J. Chem. Eng**, 32, 338-340.
- Wu, W., Liu, S., Duan, M., Tan, X., Chen, C., Xie, Y., Lan, Y., Dong, X-Q., Zhang, X. (2016). *Iridium Catalysts with *f*-Amphox Ligands: Asymmetric Hydrogenation of Simple Ketones*. **Organic letters**, 18: 2938-2941.
- Wujkowska, Z., Jarzyński, S., Pieczonka, A. M., Leśniak, S., Rachwalski, M. (2016). *Highly enantioselective addition of arylzinc reagents to aldehydes promoted by chiral aziridine alcohols*. **Tetrahedron: Asymmetry**, 27: 1238-1244.
- Xie, Y., Xu, J., Lu, W., Lin, G. (2009). *Adzuki bean: a new resource of biocatalyst for asymmetric reduction of aromatic ketones with high stereoselectivity and substrate tolerance*. **Bioresour. Technol.**, 100, 2463-2468.
- Yazıcı, H., Mehmetoğlu, U. (2015). *Use of the plant as biocatalysts for producing enantiomerically pure secondary alcohol*. **Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University**, 30, 49-56.
- Yılmaz, D., Şahin, E., Dertli, E. (2017). *Highly Enantioselective Production of Chiral Secondary Alcohols Using Lactobacillus paracasei BD 101 as a New Whole Cell Biocatalyst and Evaluation of Their Antimicrobial Effects*. **Chemistry & biodiversity**, 14: e1700269.

Zhong, J., Guo, H., Wang, M., Yin, M., Wang, M. (2007). *Asymmetric diethylzinc addition and phenyl transfer to aldehydes using chiral cis-cyclopropane based amino alcohols*. **Tetrahedron: Asymmetry**, 18: 734-741.

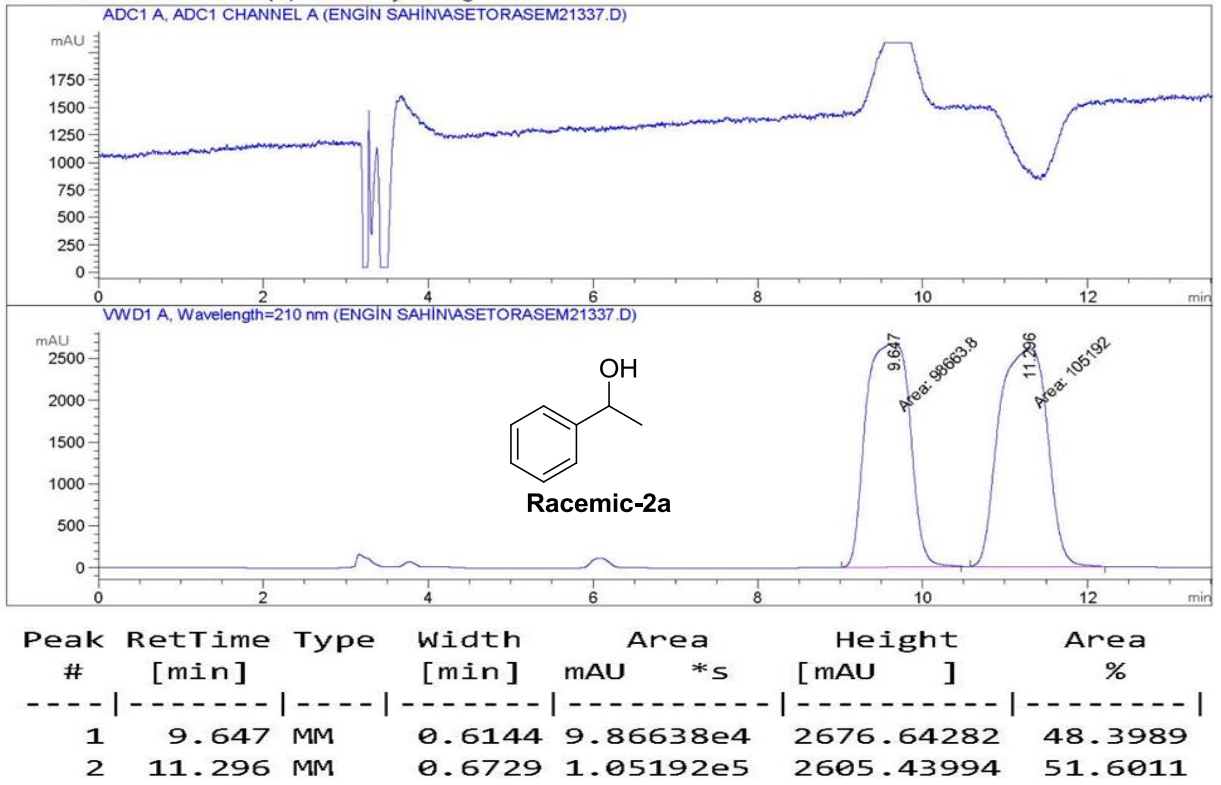
Zhang, Z., Jain, P., Antilla, J. C. (2011). *Asymmetric Reduction of Ketones by Phosphoric Acid Derived Catalysts*, **Angew. Chem., Int. Ed.**, 50, 10961-10964.

Zilbeyaz, K., Taskin, M., Kurbanoglu, E., Kurbanoglu, N., Kilic, H. (2010). *Production of (R)-1-phenylethanols through bioreduction of acetophenones by a new fungus isolate Trichothecium roseum*. **Tetrahedron: Asymmetry**, 22; 543-547.

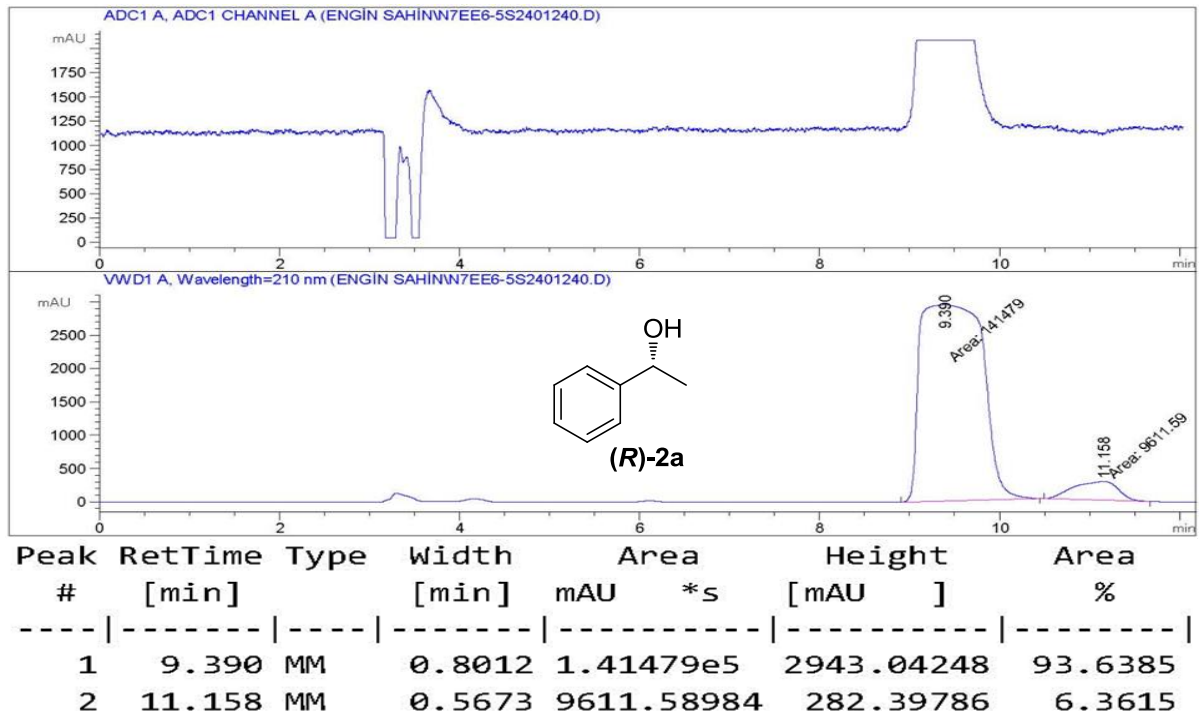
Zilbeyaz, K., Kilic, H., Şişecioğlu, M., Ozdemir, H., Güngör, A. A. (2012). *Preparation of enantiomerically pure p-substituted phenylethyl hydroperoxides by kinetic resolution and their use as enantioselective oxidants in the asymmetric Weitz–Scheffer epoxidation of E-chalcone*, **Tetrahedron: Asymmetry**, 23, 594-601.7981.

EKLER

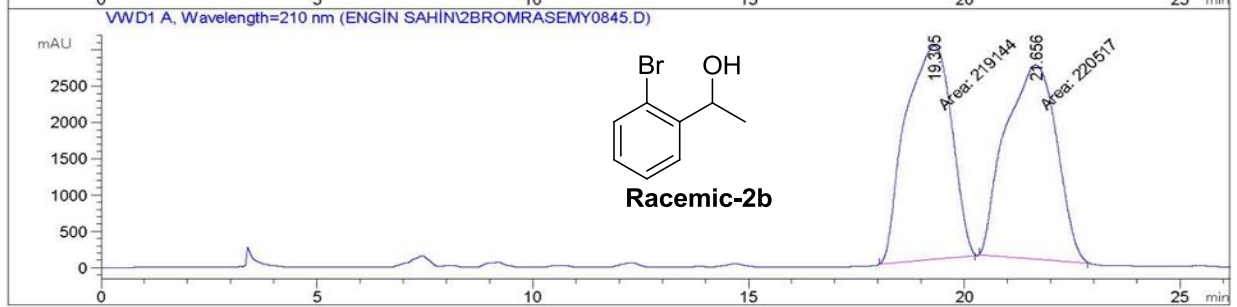
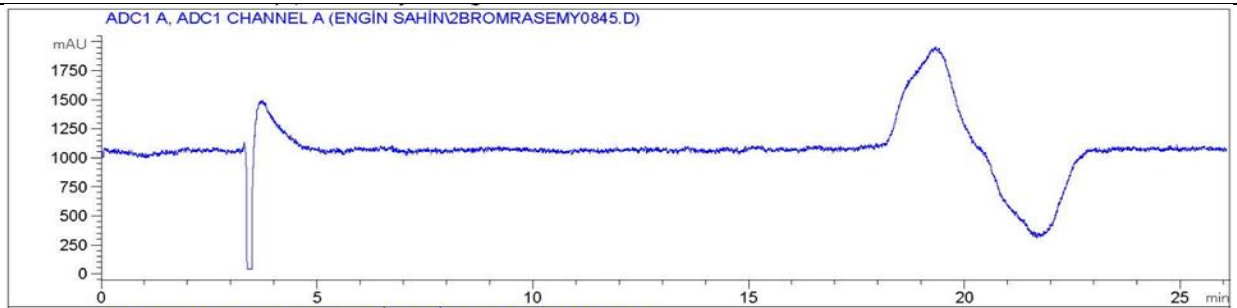
EK 1 HPLC SPEKTRUMLARI



Şekil 1 (R)-1-phenylethanol Rasemik (2a) HPLC spektrumu

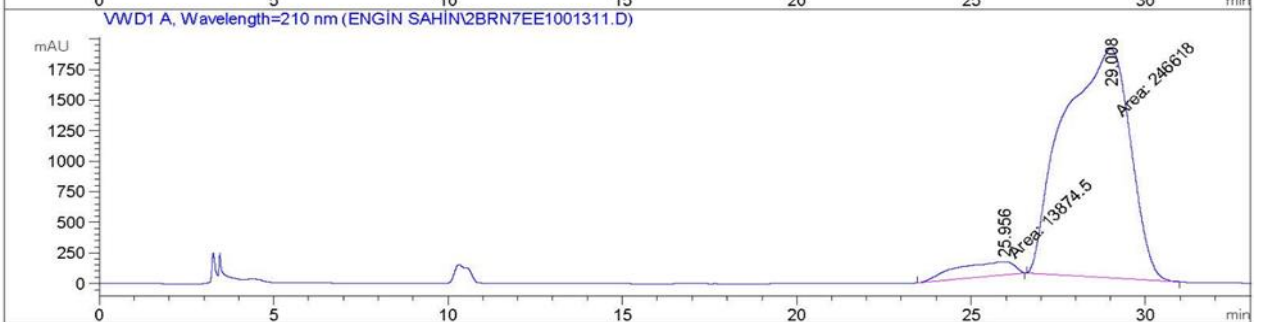
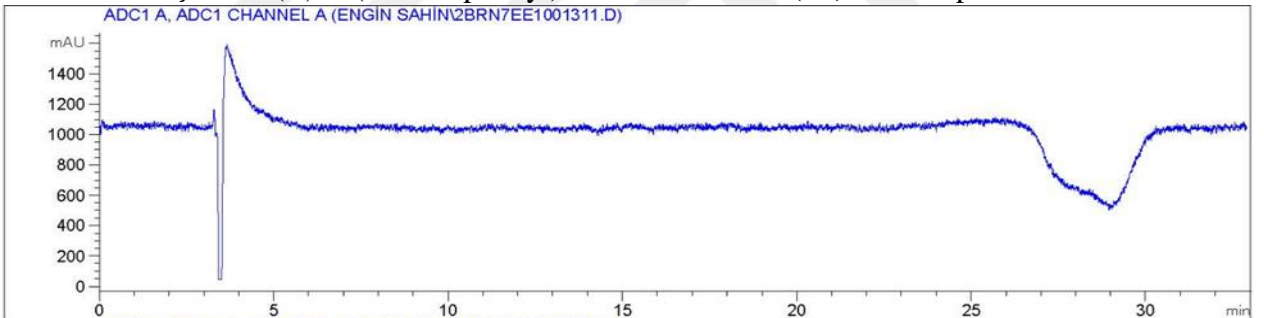


Şekil 2 (R)-1-phenylethanol (2a) HPLC spektrumu



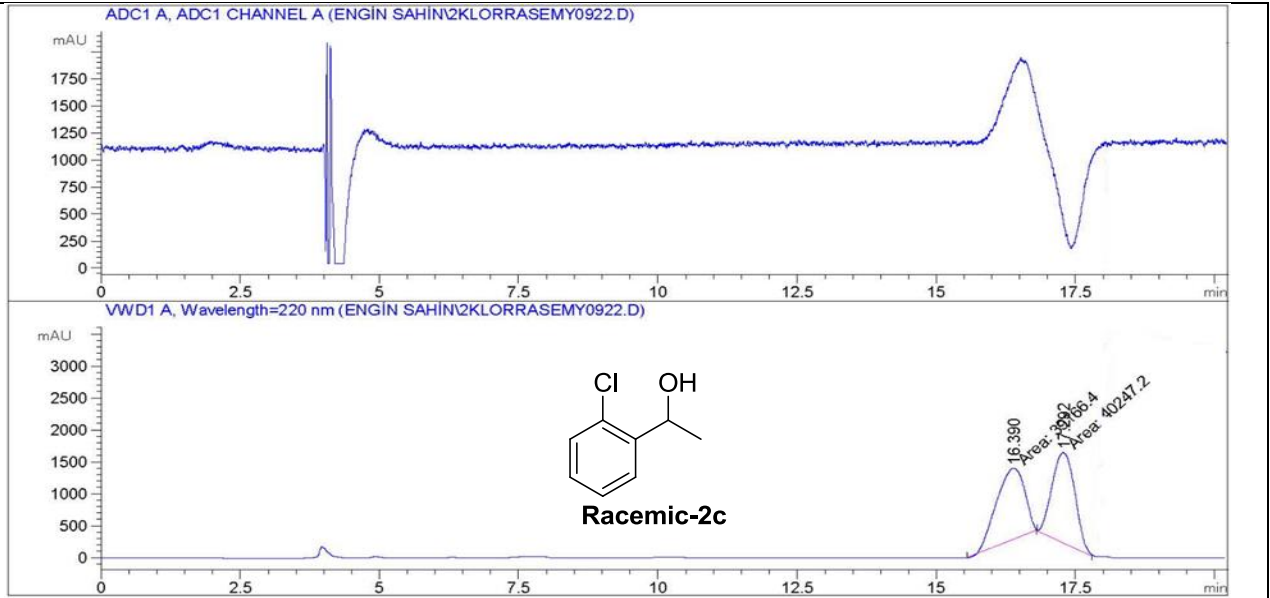
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area mAU *s | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|-------------|--------------|---------|
| 1 | 19.305 | MM | 1.2407 | 2.19144e5 | 2943.73608 | 49.8438 |
| 2 | 21.656 | MM | 1.3732 | 2.20517e5 | 2676.37256 | 50.1562 |

Şekil 3 (R)-1-(2bromophenyl)ethanol **Rasemik (2b)** HPCL spektrumu



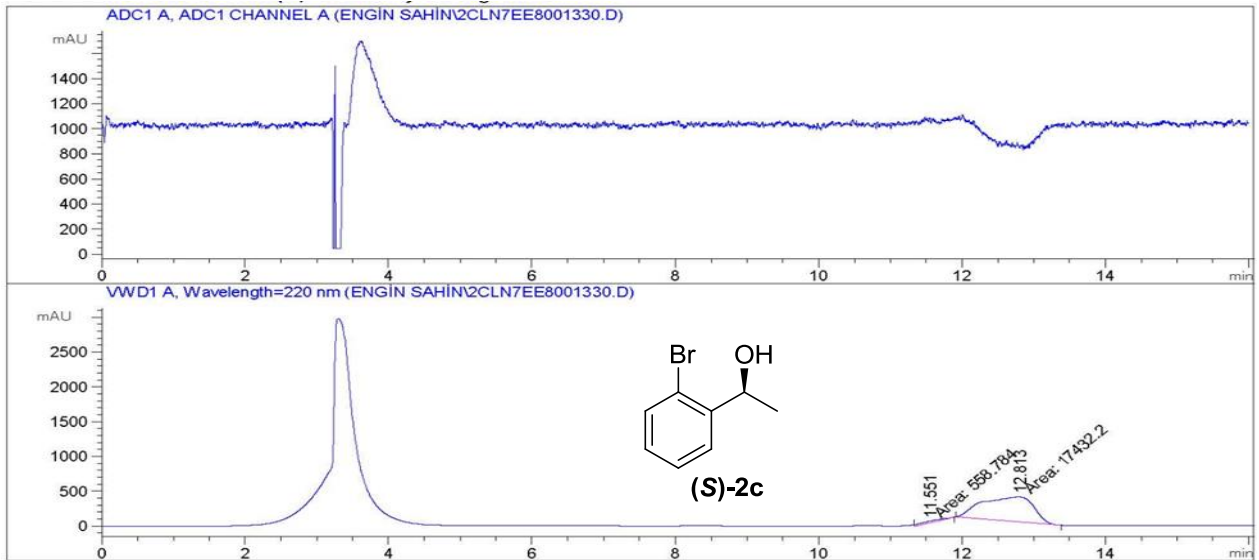
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area mAU *s | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|-------------|--------------|---------|
| 1 | 25.956 | MM | 2.1087 | 1.38745e4 | 109.65865 | 5.3262 |
| 2 | 29.008 | MM | 2.1986 | 2.46618e5 | 1869.53015 | 94.6738 |

Şekil 4 (R)-1-(2bromophenyl)ethanol **(2b)** HPCL spektrumu



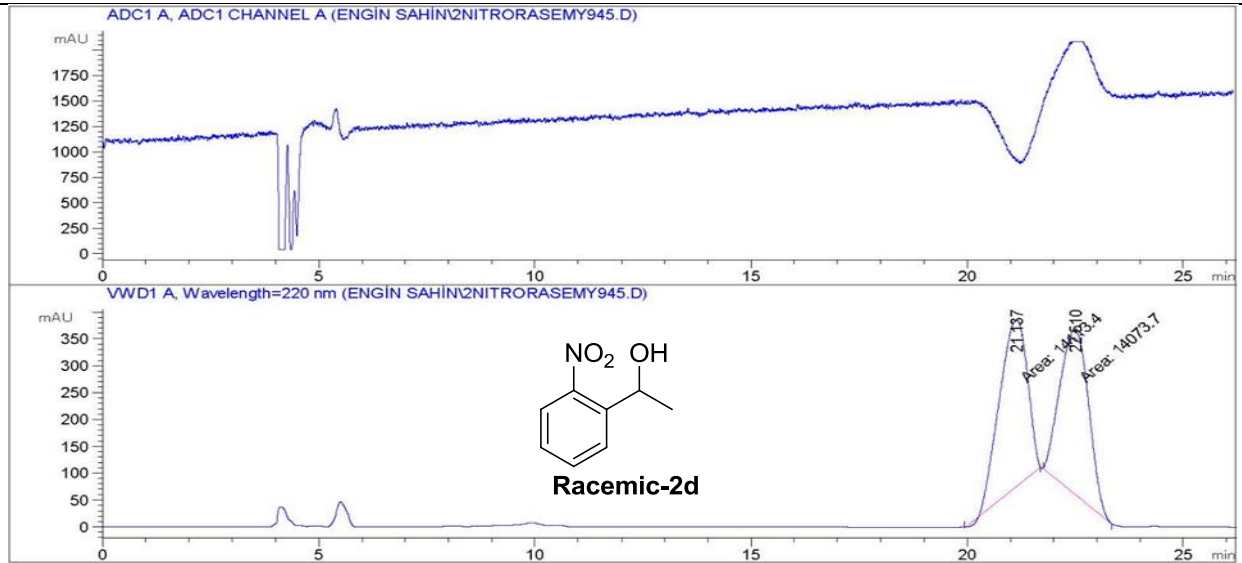
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area mAU *s | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|-------------|--------------|---------|
| 1 | 16.390 | MM | 0.5892 | 3.91664e4 | 1107.89429 | 49.3195 |
| 2 | 17.292 | MM | 0.4750 | 4.02472e4 | 1412.07715 | 50.6805 |

Şekil 5 (S)-1-(2-chlorophenyl)ethanol Rasemik (2c) HPLC spektrumu



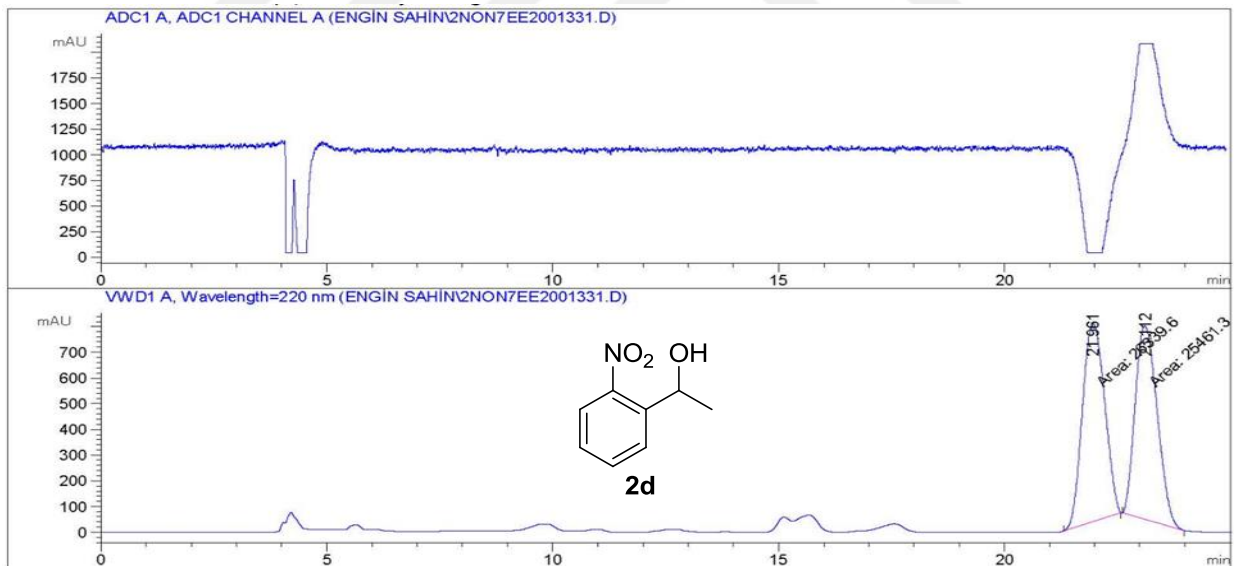
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area mAU *s | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|-------------|--------------|---------|
| 1 | 11.551 | MM | 0.3786 | 558.78418 | 24.59863 | 3.1059 |
| 2 | 12.813 | MM | 0.8067 | 1.74322e4 | 360.15723 | 96.8941 |

Şekil 6 (S)-1-(2-chlorophenyl)ethanol (2c) HPLC spektrumu



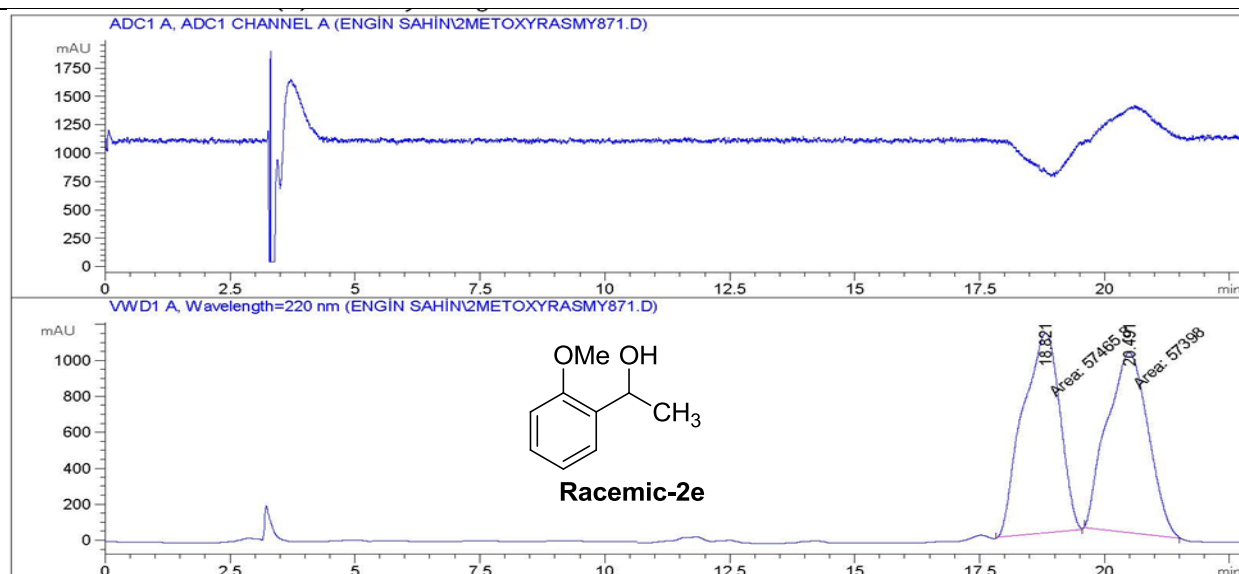
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area mAU *s | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|-------------|--------------|---------|
| 1 | 21.137 | MM | 0.7572 | 1.41134e4 | 310.65750 | 50.0704 |
| 2 | 22.510 | MM | 0.7665 | 1.40737e4 | 306.00131 | 49.9296 |

Şekil 7 1-(2-Nitrophenyl)ethanol Rasemik (2d) HPLC spektrumu



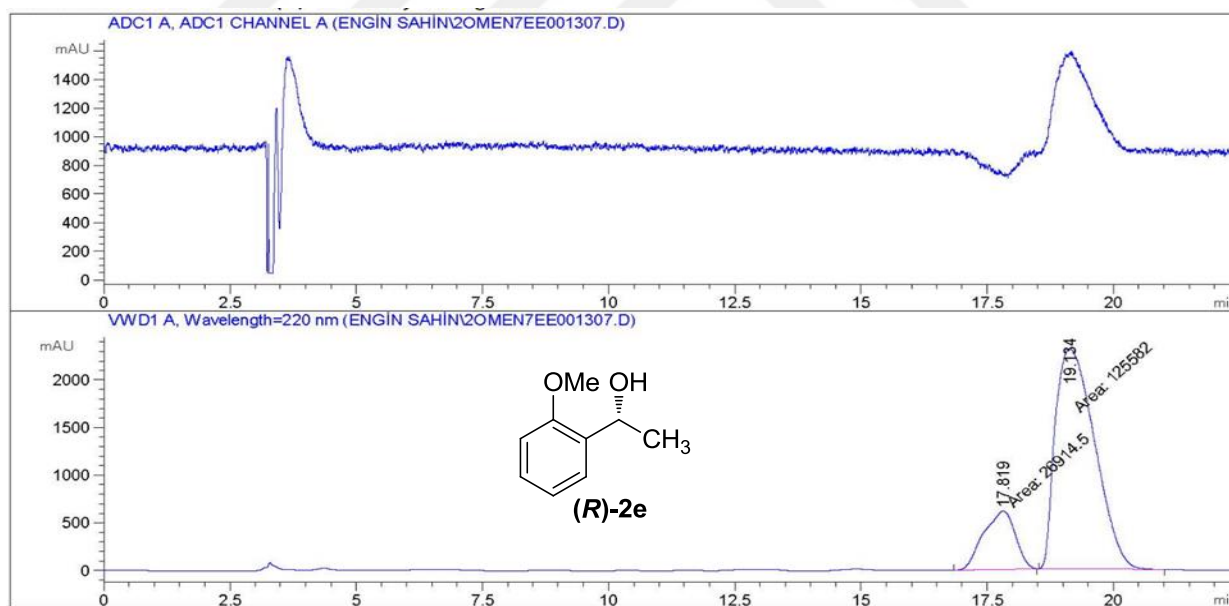
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area mAU *s | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|-------------|--------------|---------|
| 1 | 21.961 | MM | 0.5693 | 2.63396e4 | 771.08093 | 50.8478 |
| 2 | 23.112 | MM | 0.5641 | 2.54613e4 | 752.25665 | 49.1522 |

Şekil 8 1-(2-Nitrophenyl)ethanol (2d) HPLC spektrumu



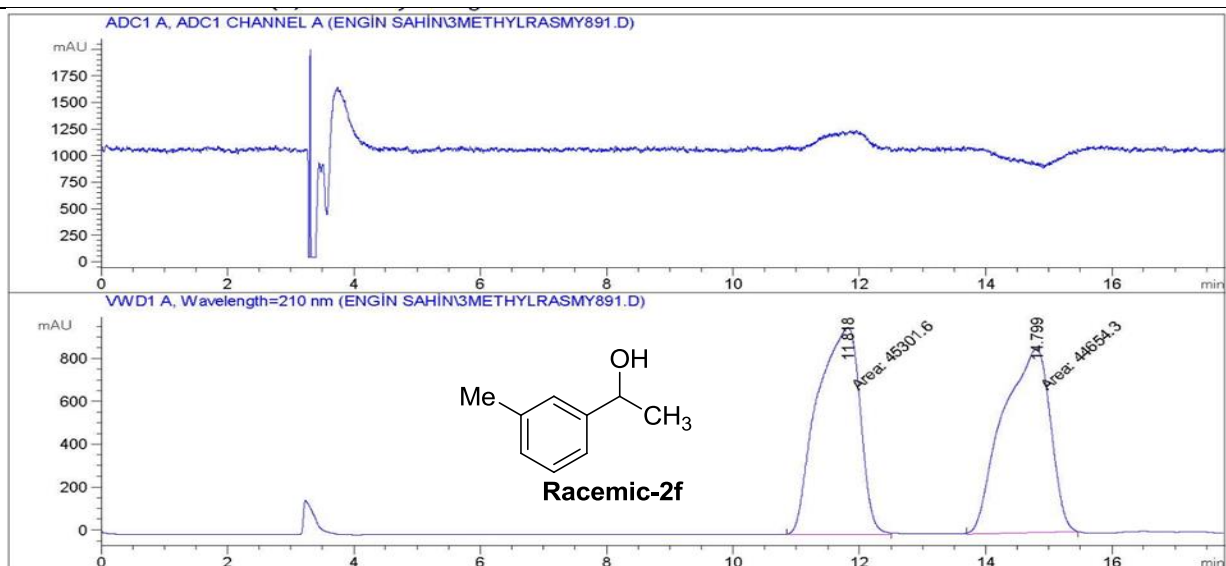
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area mAU *s | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|-------------|--------------|---------|
| 1 | 18.821 | MM | 0.8605 | 5.74658e4 | 1112.98120 | 50.0295 |
| 2 | 20.491 | MM | 0.9530 | 5.73980e4 | 1003.75995 | 49.9705 |

Şekil 9 (R)-1-(2-methoxyphenyl)ethanol **Rasemik (2e)** HPLC spektrumu



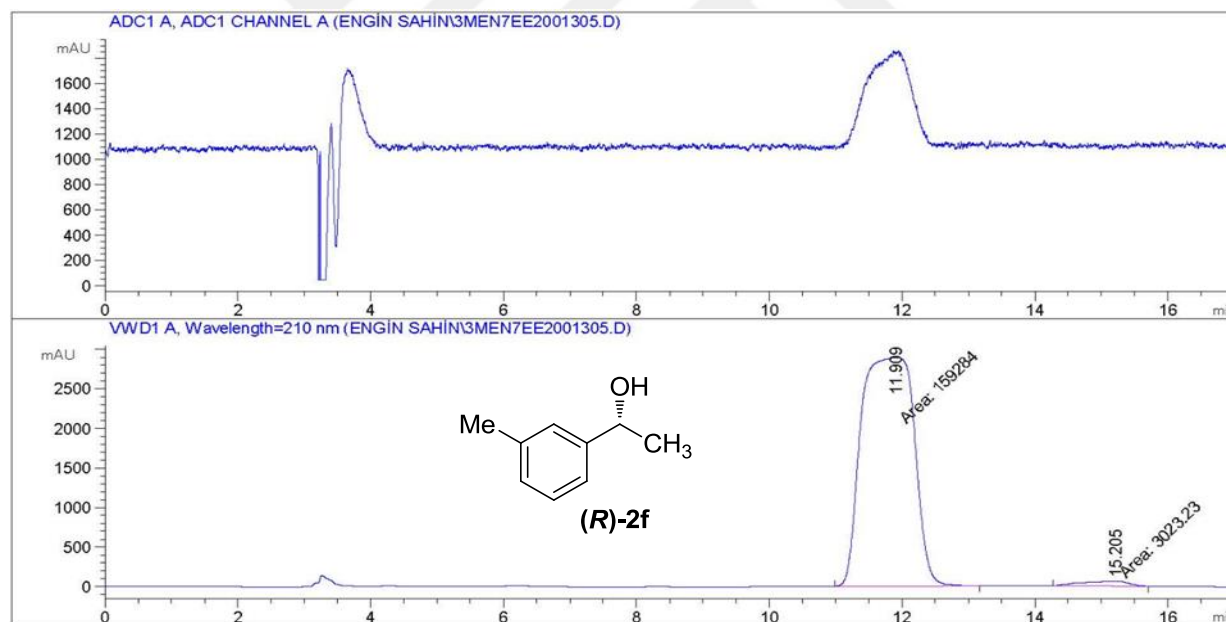
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area mAU *s | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|-------------|--------------|---------|
| 1 | 17.819 | MM | 0.7322 | 2.69145e4 | 612.66901 | 17.6492 |
| 2 | 19.134 | MM | 0.9049 | 1.25582e5 | 2312.89185 | 82.3508 |

Şekil 10 (R)-1-(2-methoxyphenyl)ethanol **(2e)** HPLC spektrumu



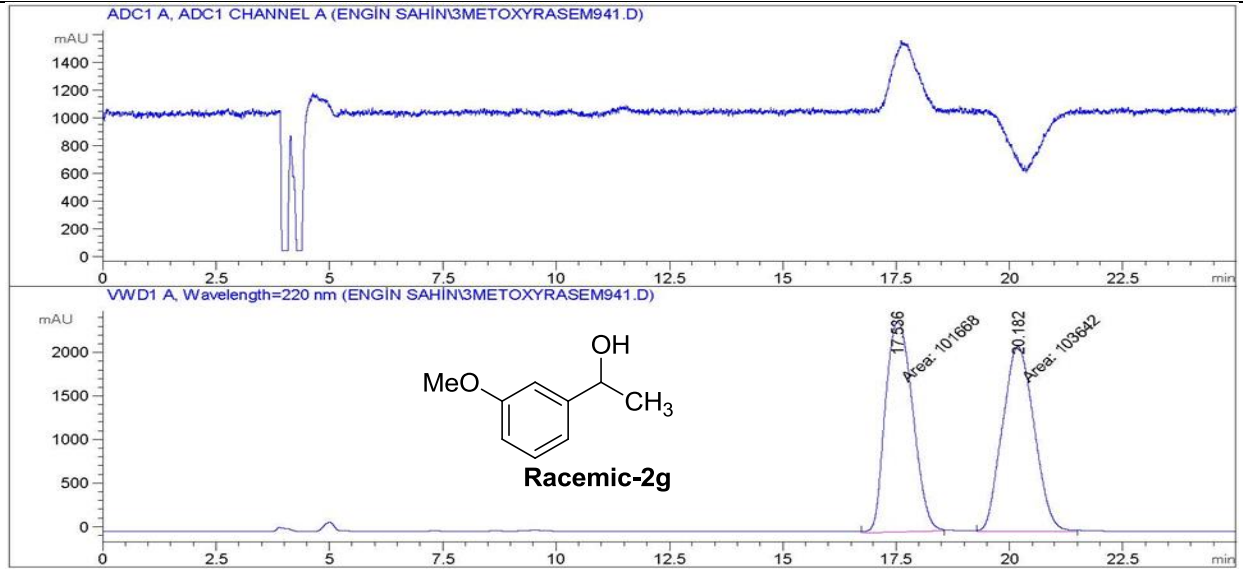
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area mAU *s | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|-------------|--------------|---------|
| 1 | 11.818 | MM | 0.7814 | 4.53016e4 | 966.20062 | 50.3598 |
| 2 | 14.799 | MM | 0.8661 | 4.46543e4 | 859.32965 | 49.6402 |

Şekil 11 (R)-1-(3-methylphenyl)ethanol **Rasemik (2f)** HPLC spektrumu

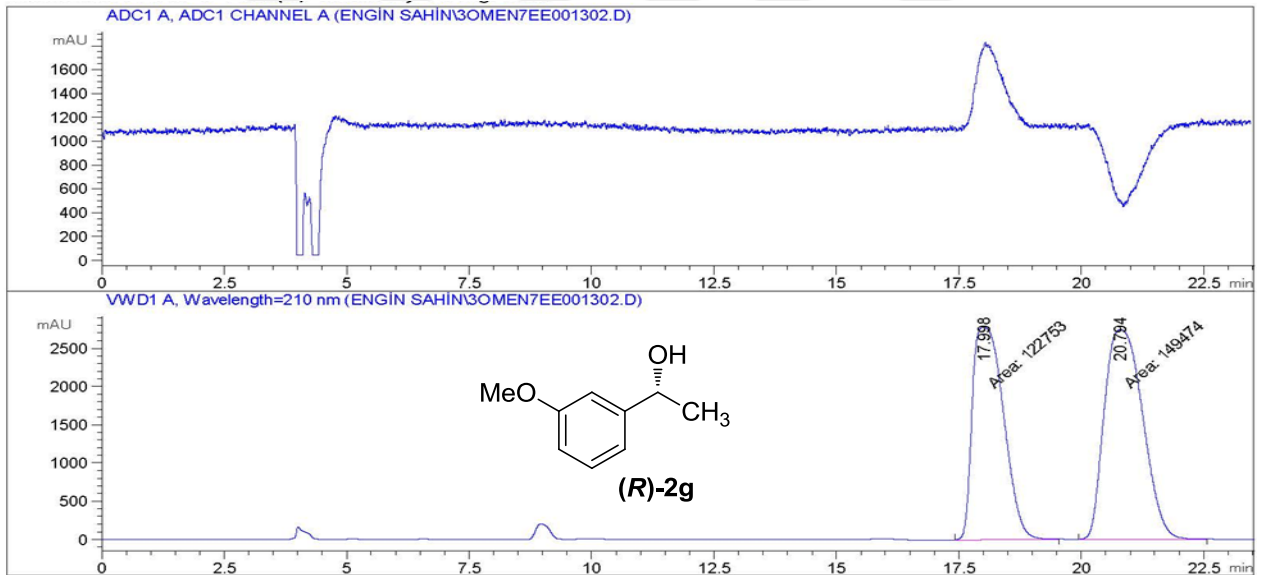


| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area mAU *s | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|-------------|--------------|---------|
| 1 | 11.909 | MM | 0.9188 | 1.59284e5 | 2889.37939 | 98.1373 |
| 2 | 15.205 | MM | 0.8105 | 3023.23267 | 62.16608 | 1.8627 |

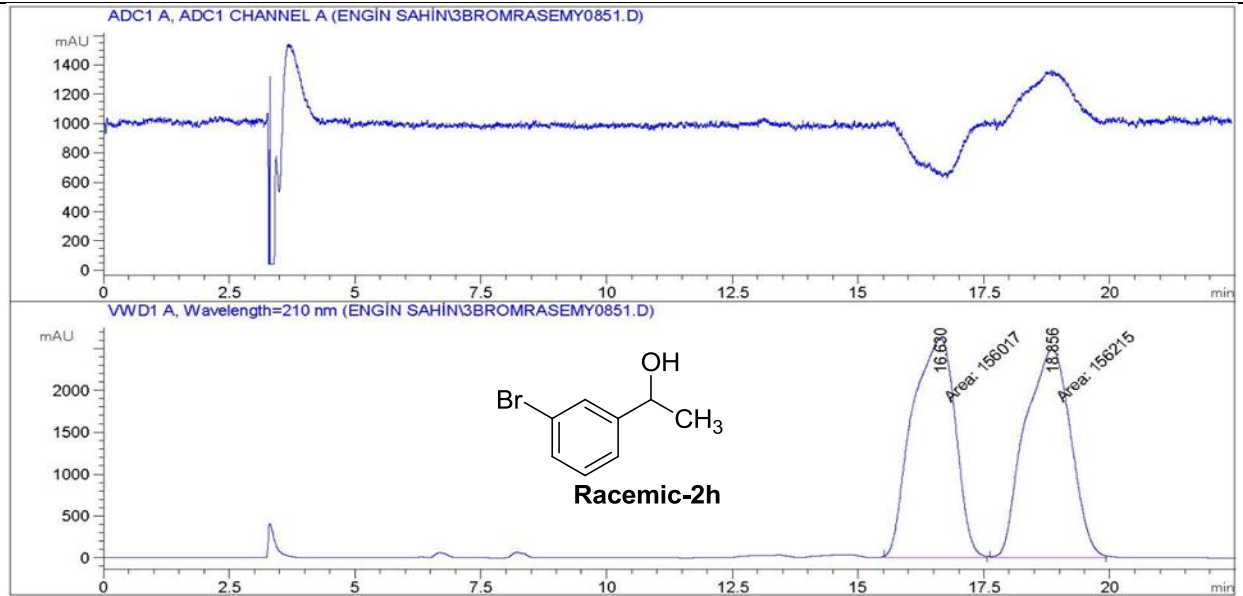
Şekil 12 (R)-1-(3-methylphenyl)ethanol **(2f)** HPLC spektrumu



Şekil 13 (R)-1-(3-methoxyphenyl)ethanol **Rasemik (2g)** HPLC spektrumu

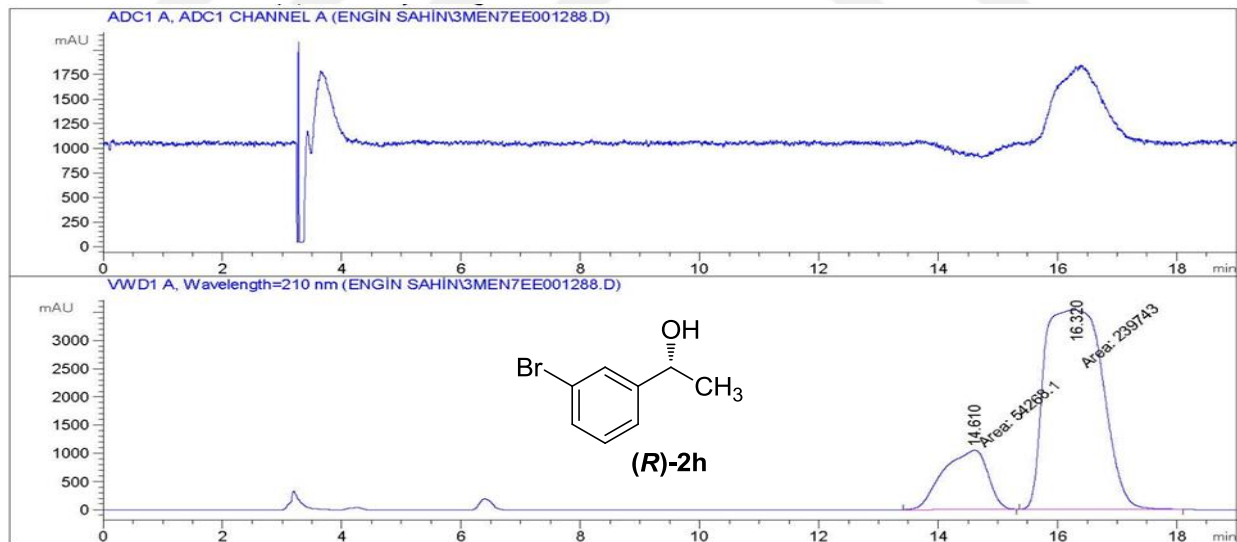


Şekil 14 (R)-1-(3-methoxyphenyl)ethanol **(2g)** HPLC spektrumu



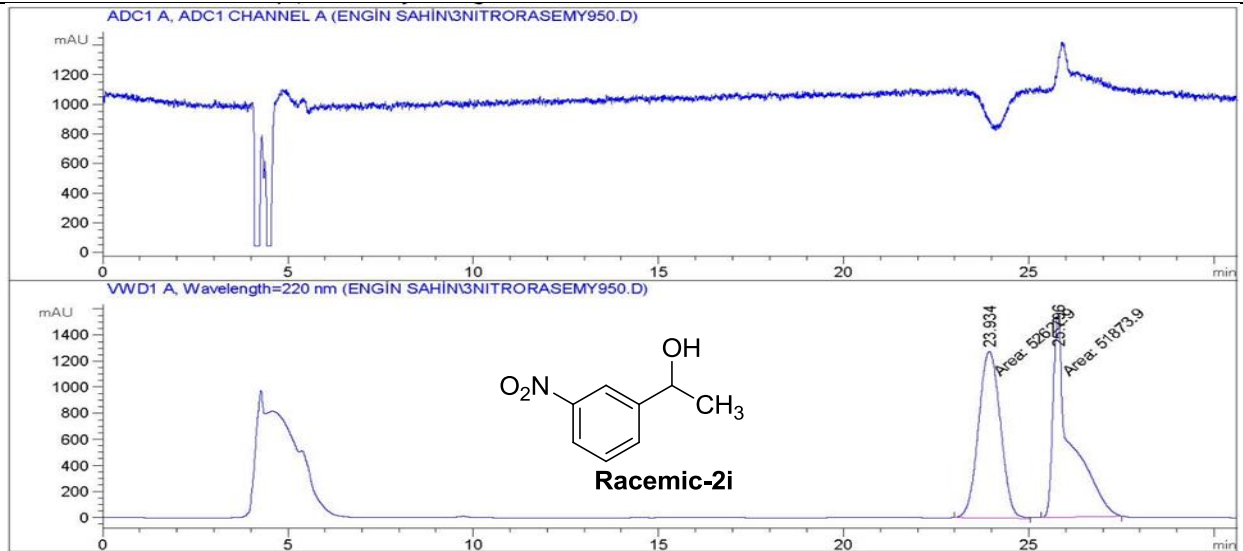
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area mAU *s | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|-------------|--------------|---------|
| 1 | 16.630 | MM | 0.9956 | 1.56017e5 | 2611.88623 | 49.9683 |
| 2 | 18.856 | MM | 1.0493 | 1.56215e5 | 2481.24561 | 50.0317 |

Şekil 15 (R)-1-(3-bromophenyl)ethanol Rasemik (2h) HPLC spektrumu



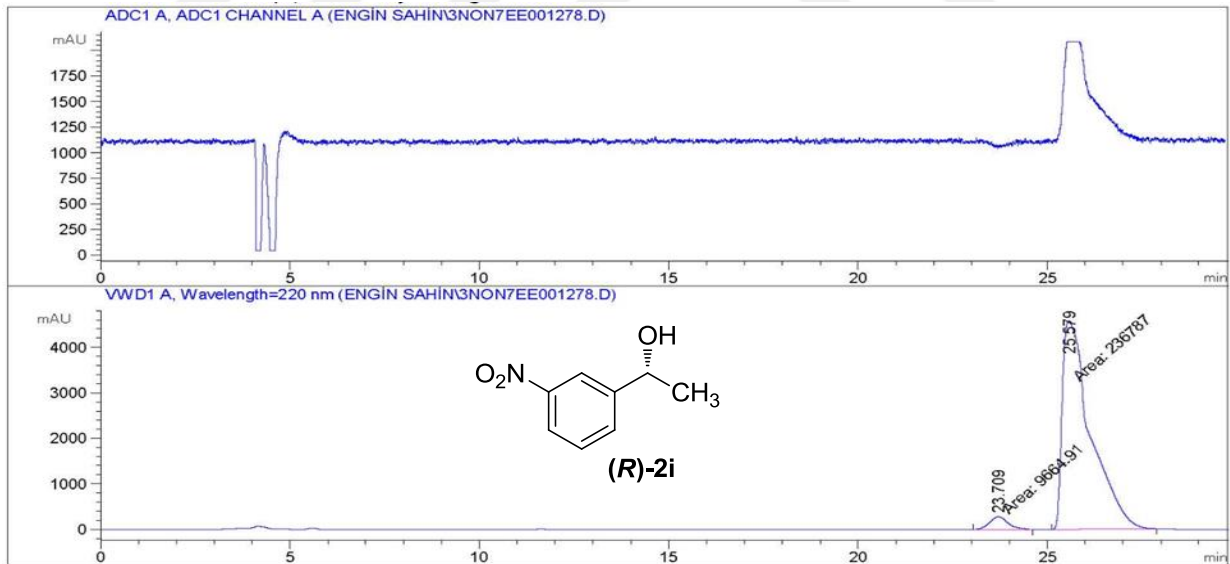
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area mAU *s | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|-------------|--------------|---------|
| 1 | 14.610 | MM | 0.8612 | 5.42681e4 | 1050.29333 | 18.4578 |
| 2 | 16.320 | MM | 1.1319 | 2.39743e5 | 3530.10229 | 81.5422 |

Şekil 16 (R)-1-(3-bromophenyl)ethanol (2h) HPLC spektrumu



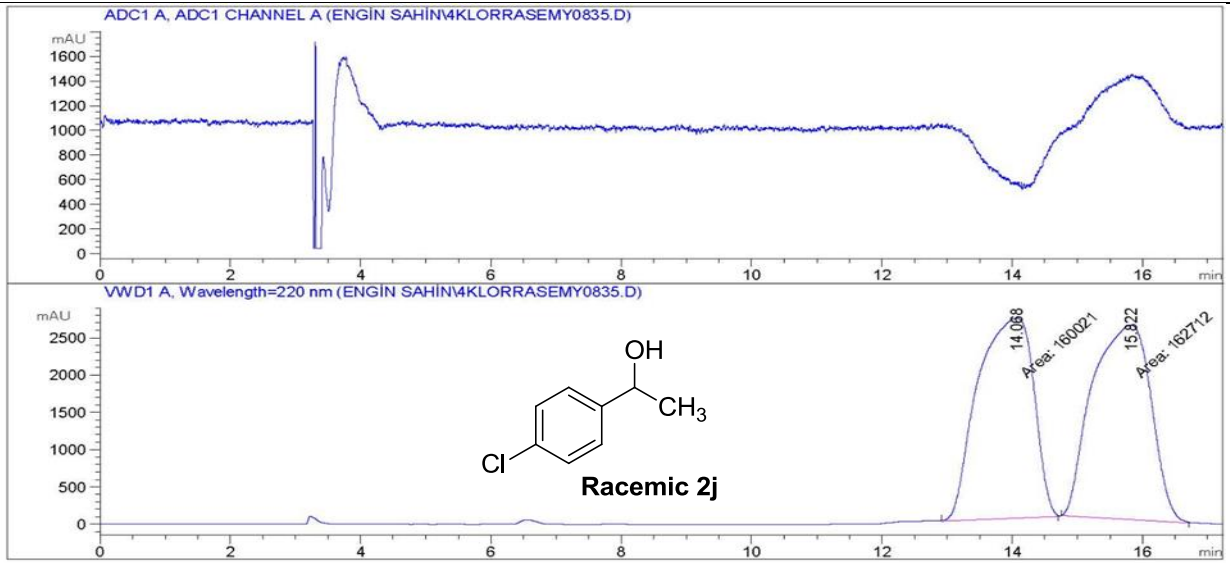
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area mAU *s | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|-------------|--------------|---------|
| 1 | 23.934 | MM | 0.6860 | 5.26229e4 | 1278.45349 | 50.3584 |
| 2 | 25.796 | MM | 0.5551 | 5.18739e4 | 1557.55090 | 49.6416 |

Şekil 17 (S)-1-(3-nitrophenyl)ethanol **Rasemik (2i)** HPLC spektrumu



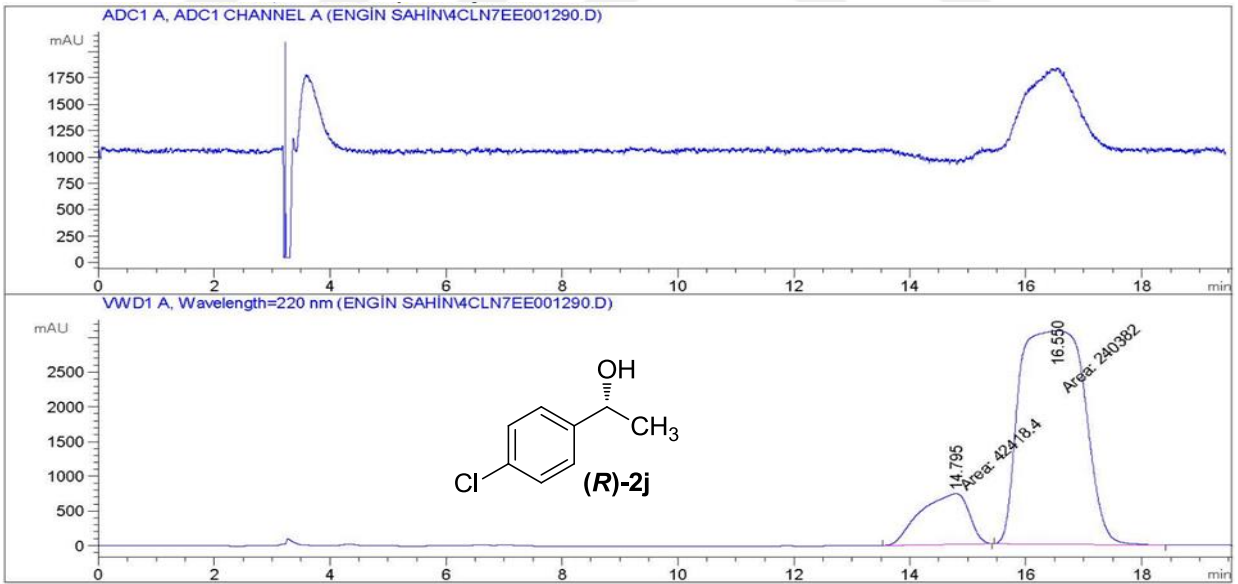
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area mAU *s | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|-------------|--------------|---------|
| 1 | 23.709 | MM | 0.5746 | 9664.90723 | 280.33591 | 3.9216 |
| 2 | 25.579 | MM | 0.8630 | 2.36787e5 | 4573.05029 | 96.0784 |

Şekil 18 (S)-1-(3-nitrophenyl)ethanol **(2i)** HPLC spektrumu



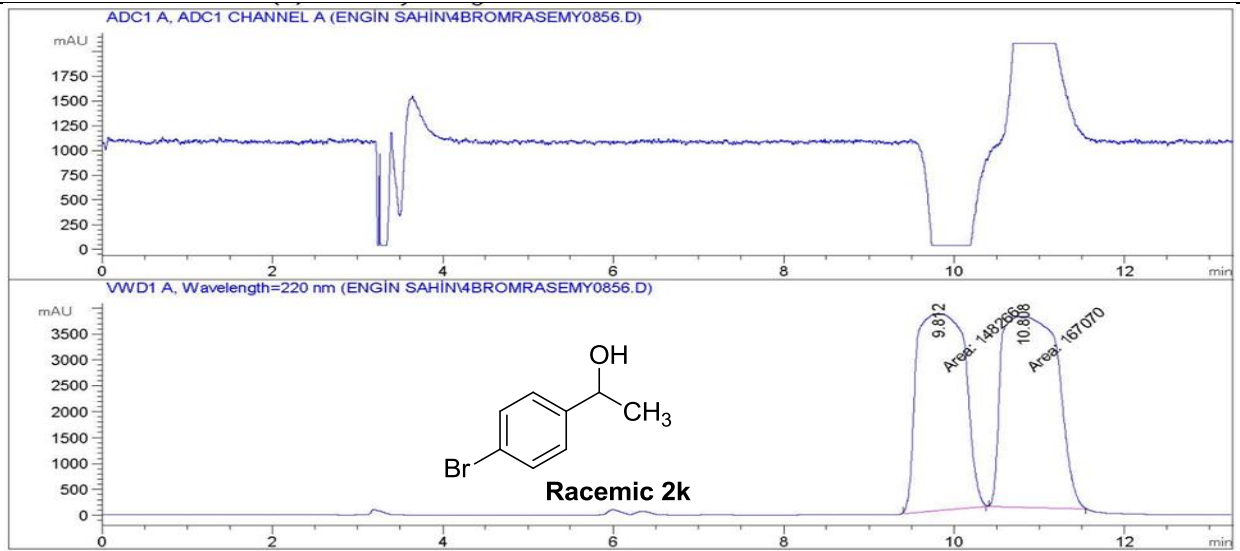
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area mAU *s | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|-------------|--------------|---------|
| 1 | 14.068 | MM | 0.9945 | 1.60021e5 | 2681.89258 | 49.5831 |
| 2 | 15.822 | MM | 1.0396 | 1.62712e5 | 2608.47241 | 50.4169 |

Şekil 19 (R)-1-(4-chlorophenyl)ethanol **Rasemik (2j)** HPLC spektrumu



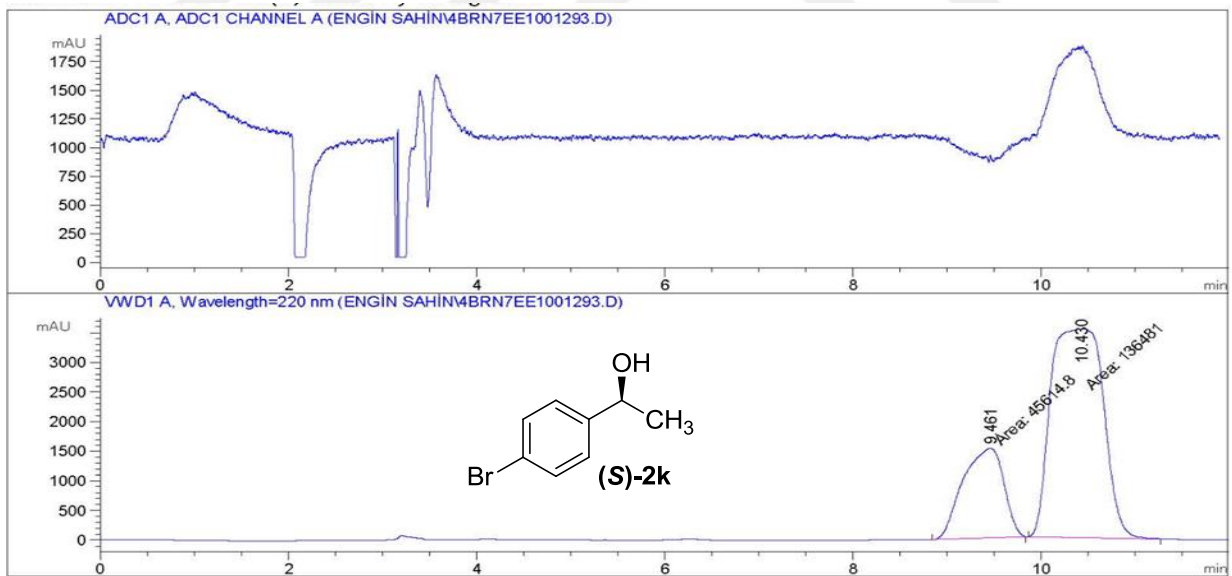
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area mAU *s | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|-------------|--------------|---------|
| 1 | 14.795 | MM | 0.9638 | 4.24184e4 | 733.54047 | 14.9994 |
| 2 | 16.590 | MM | 1.3017 | 2.40382e5 | 3077.68970 | 85.0006 |

Şekil 20 (R)-1-(4-chlorophenyl)ethanol **(2j)** HPLC spektrumu



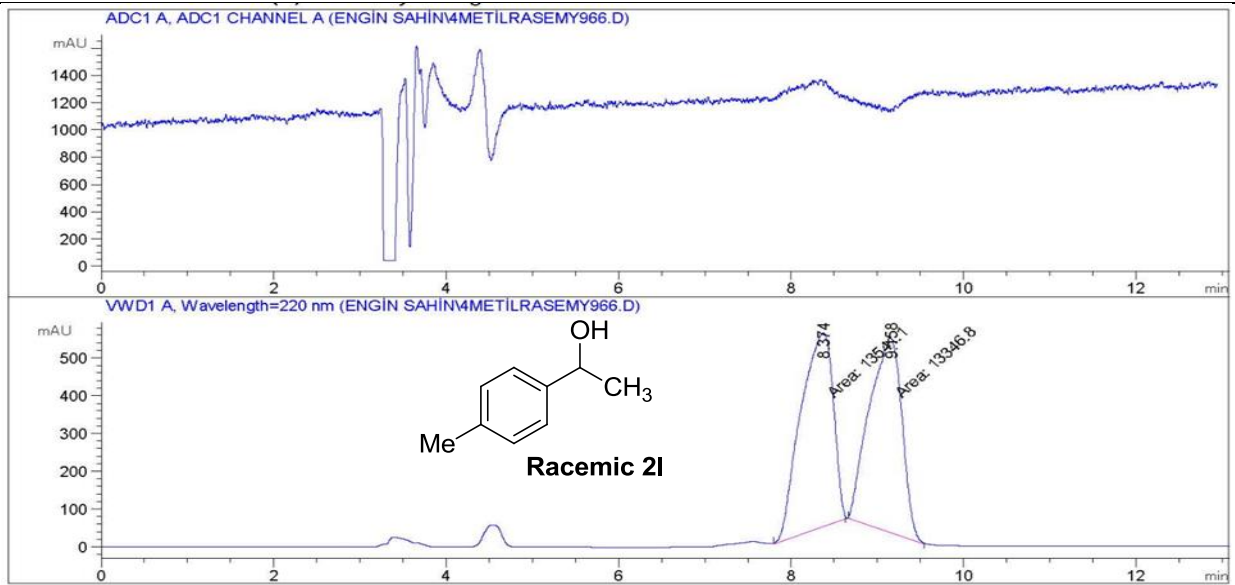
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area mAU *s | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|-------------|--------------|---------|
| 1 | 9.812 | MM | 0.6494 | 1.48266e5 | 3805.28760 | 47.0184 |
| 2 | 10.808 | MM | 0.7560 | 1.67070e5 | 3683.30078 | 52.9816 |

Şekil 21 (S)-1-(4-bromophenyl)ethanol **Rasemik (2k)** HPLC spektrumu



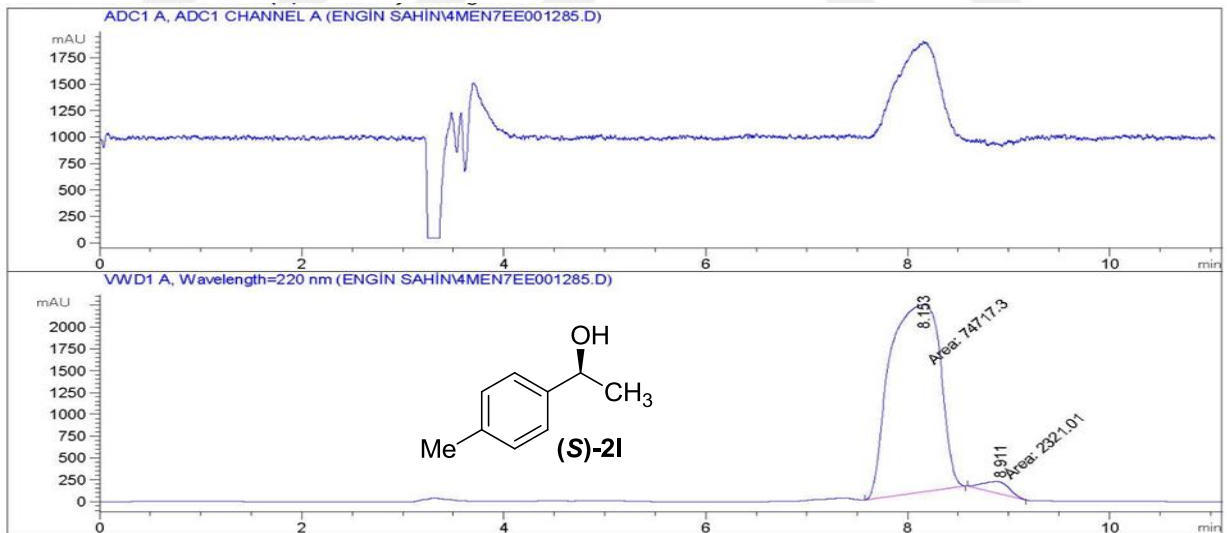
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area mAU *s | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|-------------|--------------|---------|
| 1 | 9.461 | MM | 0.5021 | 4.56148e4 | 1514.26819 | 25.0498 |
| 2 | 10.430 | MM | 0.6462 | 1.36481e5 | 3520.15869 | 74.9502 |

Şekil 22 (S)-1-(4-bromophenyl)ethanol (**2k**) HPLC spektrumu



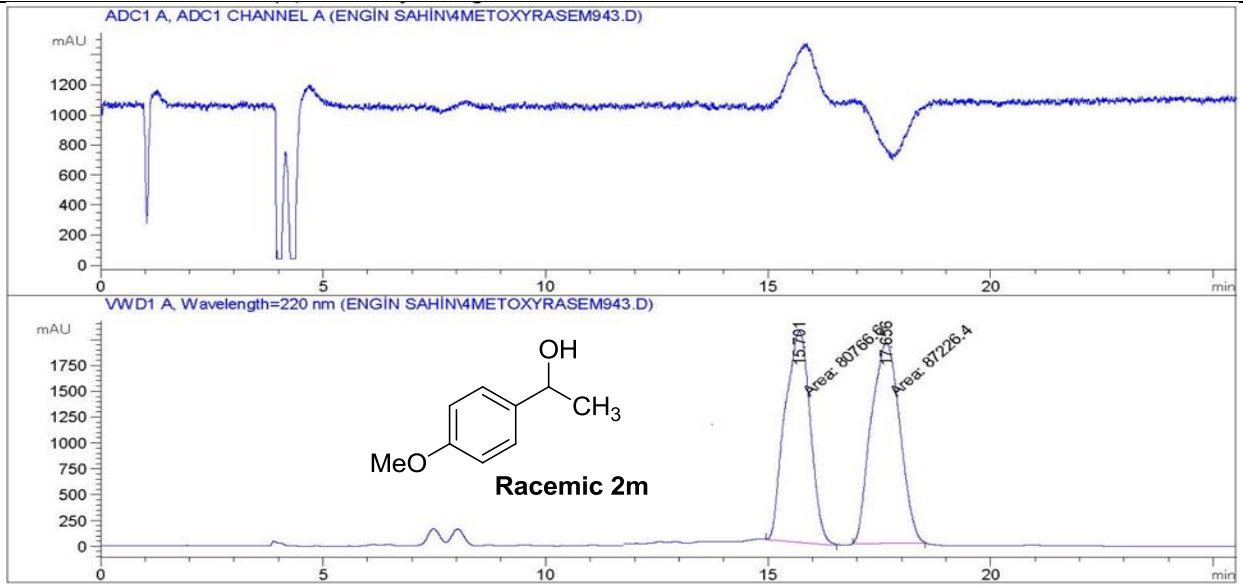
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area mAU *s | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|-------------|--------------|---------|
| 1 | 8.374 | MM | 0.4401 | 1.35411e4 | 512.75995 | 50.3614 |
| 2 | 9.158 | MM | 0.4395 | 1.33468e4 | 506.13147 | 49.6386 |

Şekil 23 (S)-1-(p-tolyl)ethanol Rasemik (2I) HPLC spektrumu



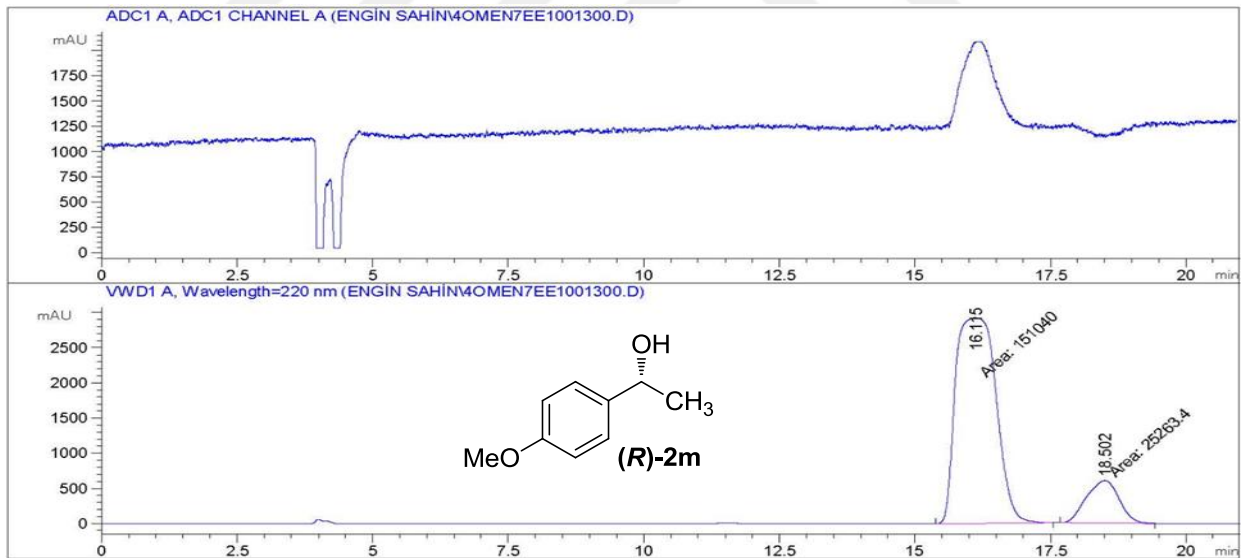
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area mAU *s | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|-------------|--------------|---------|
| 1 | 8.153 | MM | 0.5807 | 7.47173e4 | 2144.64380 | 96.9872 |
| 2 | 8.911 | MM | 0.2890 | 2321.00635 | 133.84102 | 3.0128 |

Şekil 24 (S)-1-(p-tolyl)ethanol (2I) HPLC spektrumu



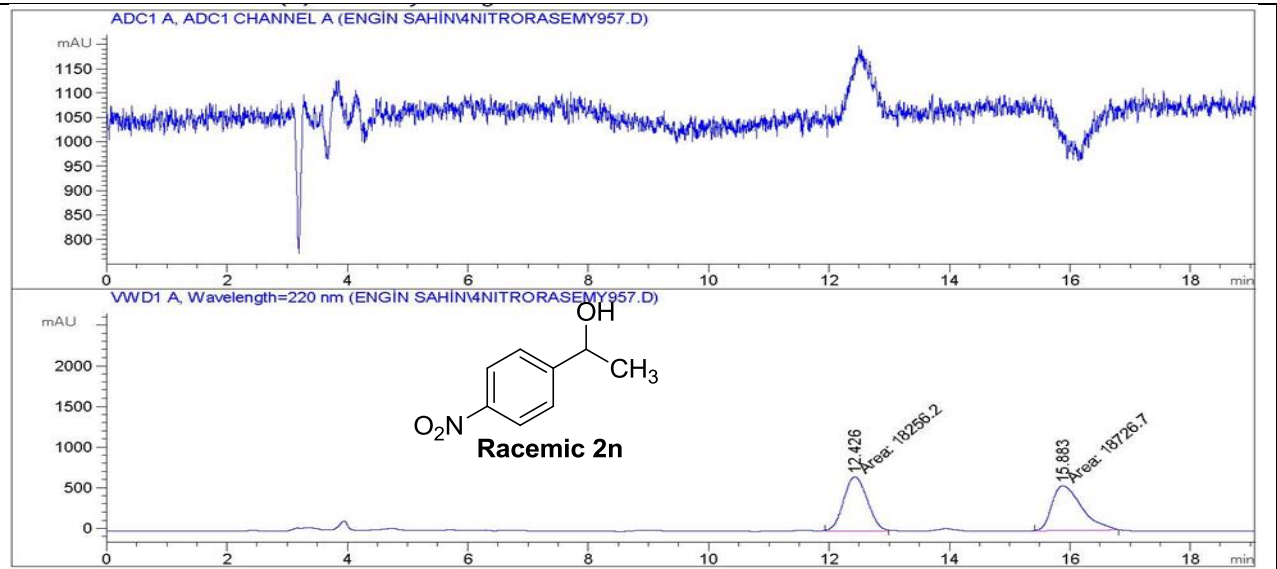
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area mAU *s | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|-------------|--------------|---------|
| 1 | 15.701 | MM | 0.6596 | 8.07666e4 | 2040.82080 | 48.0774 |
| 2 | 17.656 | MM | 0.7500 | 8.72264e4 | 1938.29895 | 51.9226 |

Şekil 25 (R)-1-(4-methoxyphenyl)ethanol **Rasemik (2m)** HPLC spektrumu



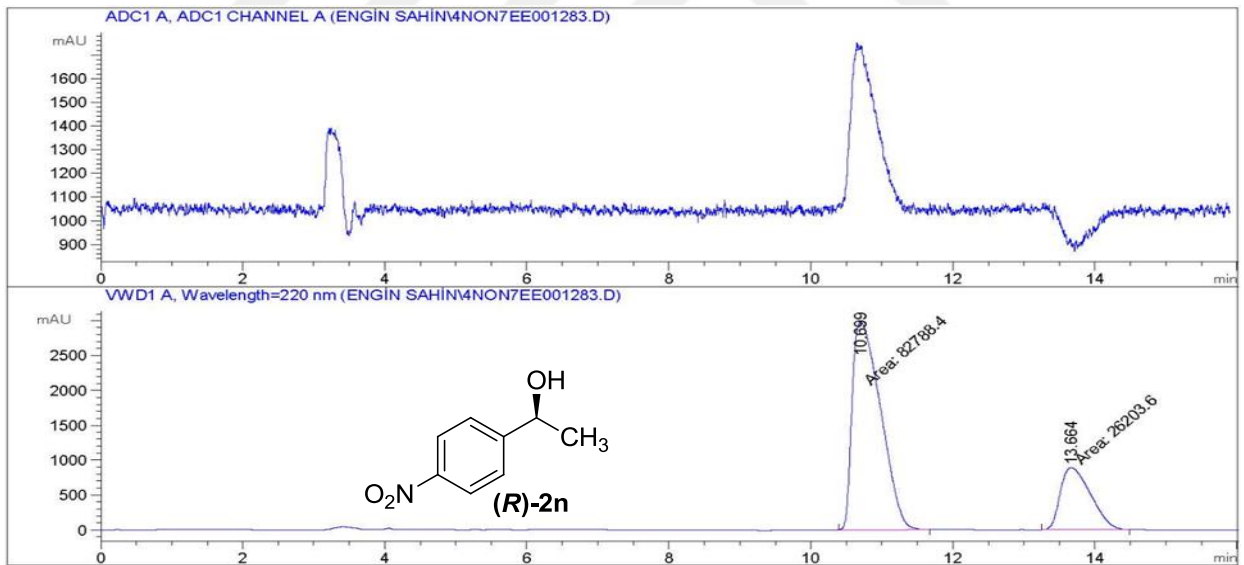
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area mAU *s | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|-------------|--------------|---------|
| 1 | 16.115 | MM | 0.8613 | 1.51040e5 | 2922.60596 | 85.6705 |
| 2 | 18.502 | MM | 0.6952 | 2.52634e4 | 605.69348 | 14.3295 |

Şekil 26 (R)-1-(4-methoxyphenyl)ethanol **(2m)** HPLC spektrumu



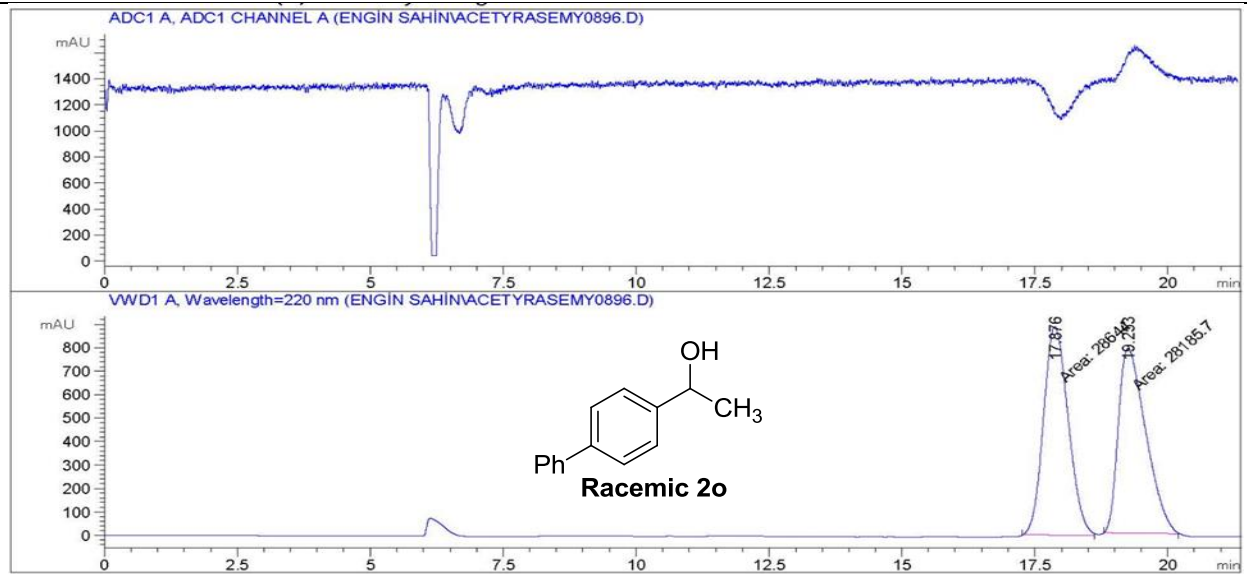
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area mAU *s | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|-------------|--------------|---------|
| 1 | 12.426 | MM | 0.4560 | 1.82562e4 | 667.33081 | 49.3640 |
| 2 | 15.883 | MM | 0.5700 | 1.87267e4 | 547.59491 | 50.6360 |

Şekil 27 (R)-1-(4-nitrophenyl)ethanol **Rasemik (2n)** HPLC spektrumu



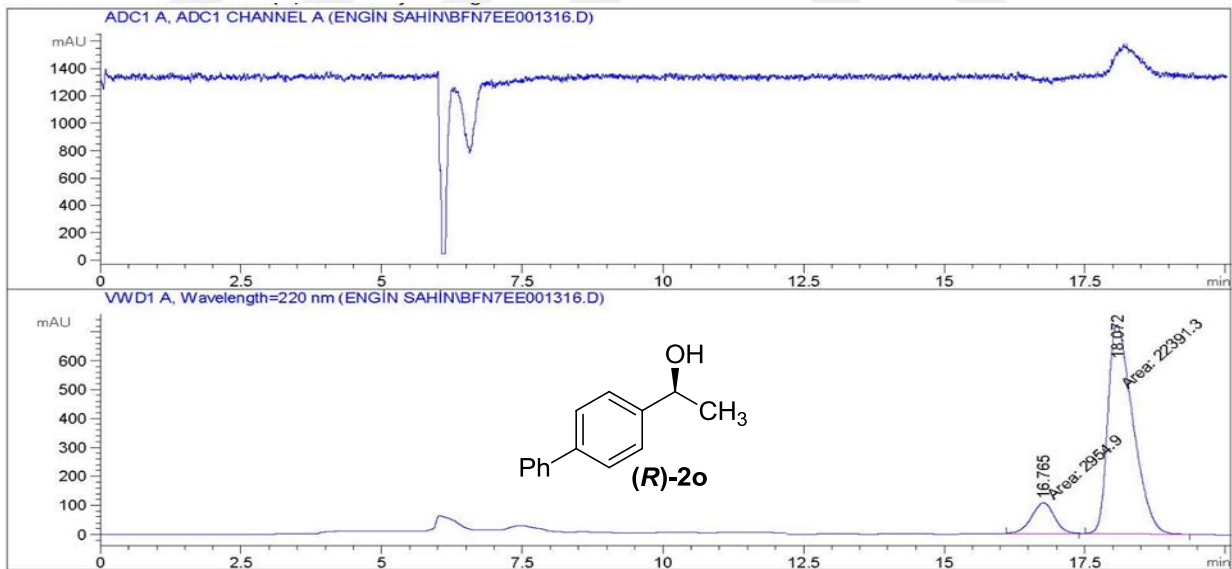
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area mAU *s | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|-------------|--------------|---------|
| 1 | 10.699 | MM | 0.4627 | 8.27884e4 | 2981.85083 | 75.9582 |
| 2 | 13.664 | MM | 0.4911 | 2.62036e4 | 889.24725 | 24.0418 |

Şekil 28 (R)-1-(4-nitrophenyl)ethanol **(2n)** HPLC spektrumu



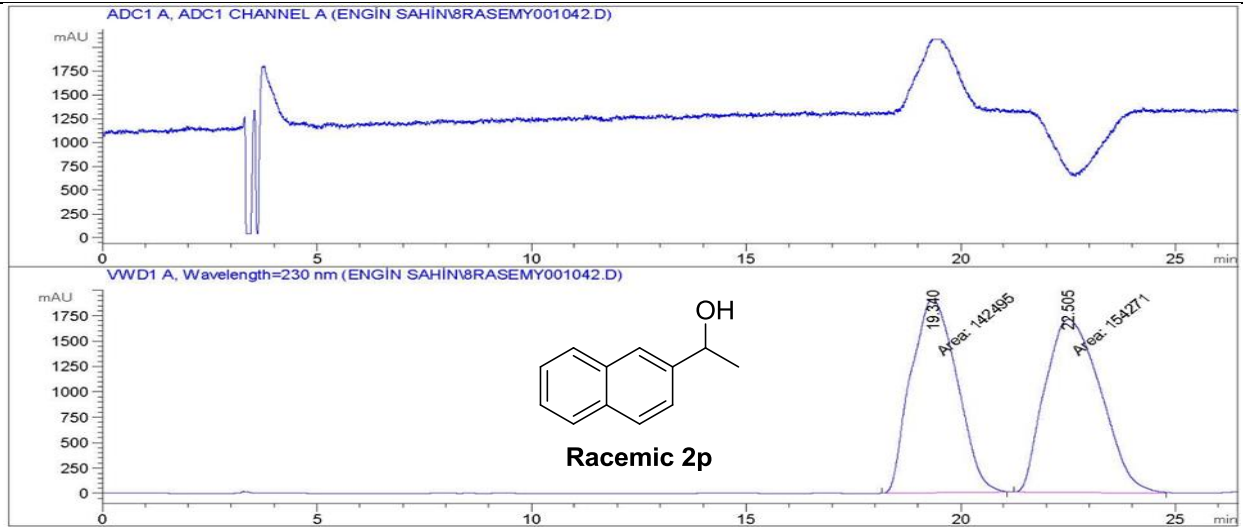
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area mAU *s | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|-------------|--------------|---------|
| 1 | 17.876 | MM | 0.5376 | 2.86440e4 | 888.08118 | 50.4032 |
| 2 | 19.253 | MM | 0.5956 | 2.81857e4 | 788.65613 | 49.5968 |

Şekil 29 (R)-1-(p-biphenyl)ethanol **Rasemik (2o)** HPLC spektrumu



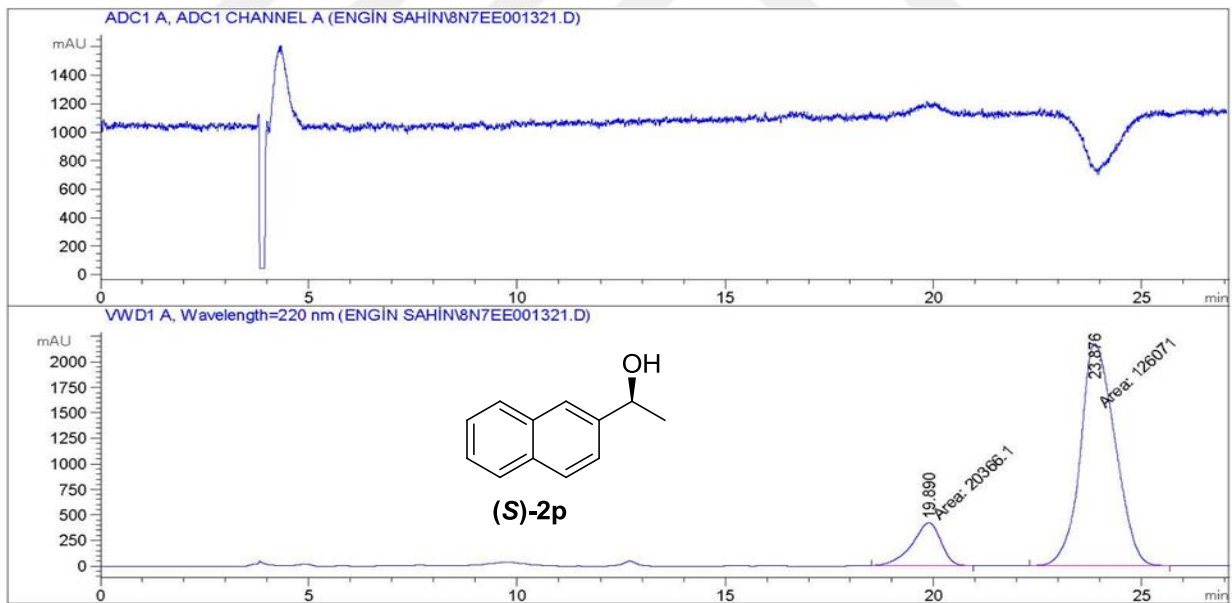
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area mAU *s | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|-------------|--------------|---------|
| 1 | 16.765 | MM | 0.4665 | 2954.89600 | 105.56085 | 11.6581 |
| 2 | 18.072 | MM | 0.5172 | 2.23913e4 | 721.53076 | 88.3419 |

Şekil 30 (R)-1-(p-biphenyl)ethanol **(2o)** HPLC spektrumu



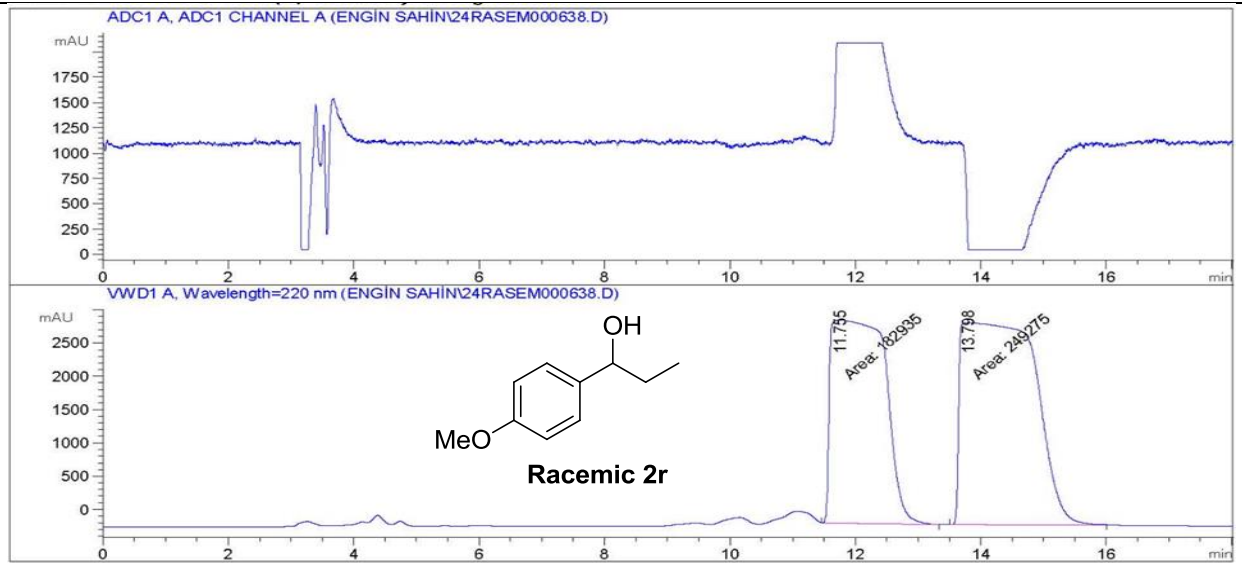
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area mAU *s | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|-------------|--------------|---------|
| 1 | 19.340 | MM | 1.2462 | 1.42495e5 | 1905.75500 | 48.0158 |
| 2 | 22.505 | MM | 1.5079 | 1.54271e5 | 1705.11462 | 51.9842 |

Şekil 31 (S)-1-(naphthalen-2-yl)ethanol Rasemik (2p) HPLC spektrumu



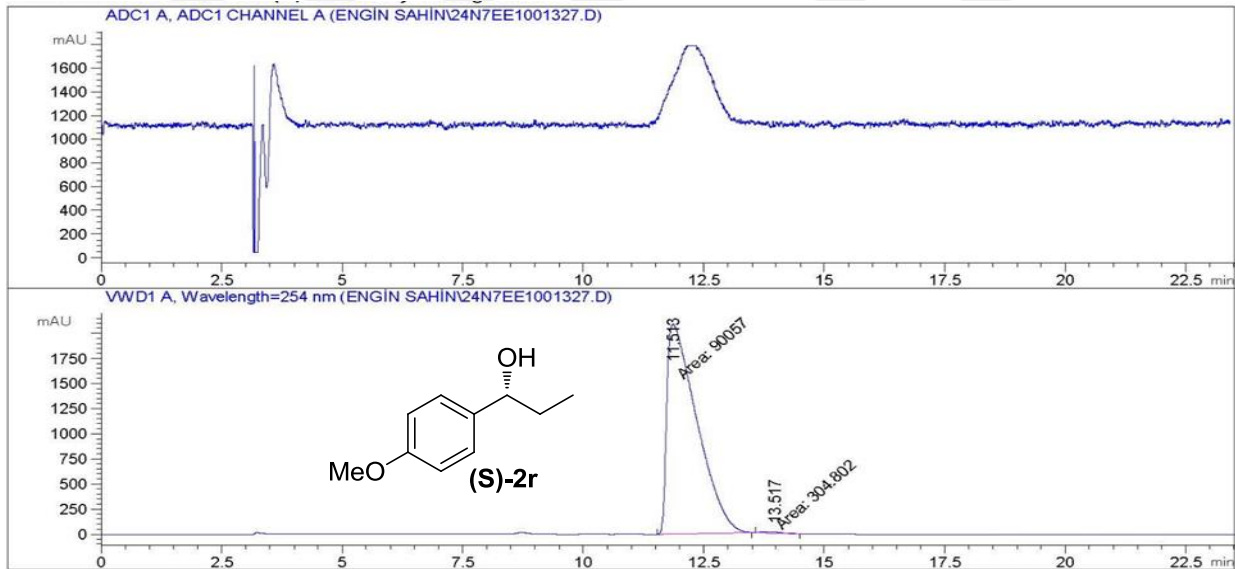
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area mAU *s | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|-------------|--------------|---------|
| 1 | 19.890 | MM | 0.8079 | 2.03661e4 | 420.14700 | 13.9078 |
| 2 | 23.876 | MM | 0.9657 | 1.26071e5 | 2175.70020 | 86.0922 |

Şekil 32 (S)-1-(naphthalen-2-yl)ethanol (2p) HPLC spektrumu



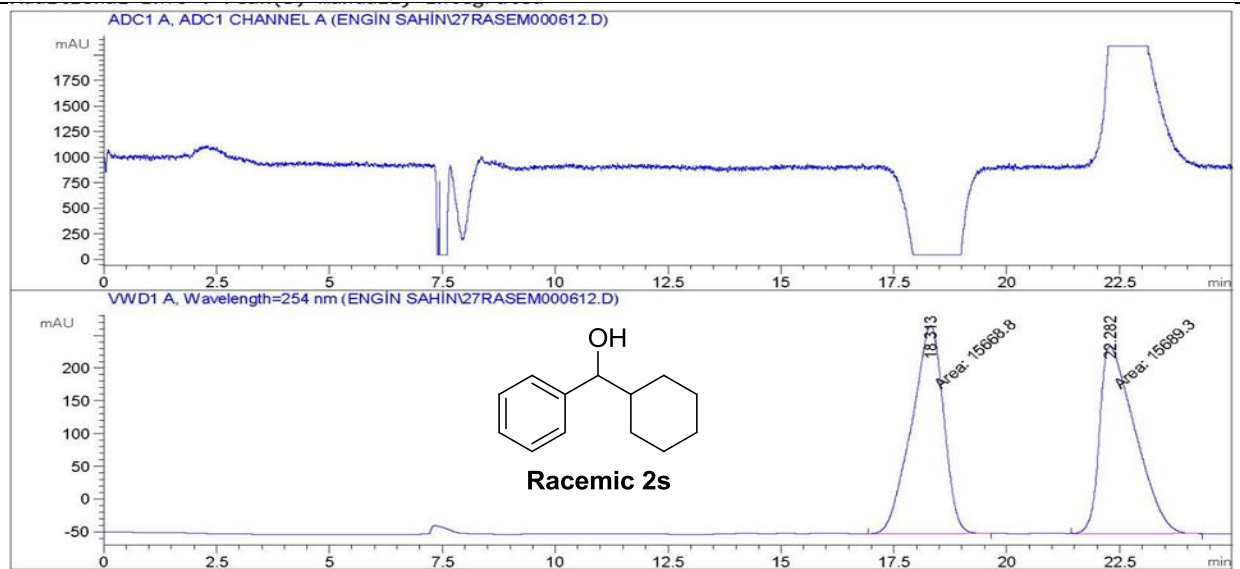
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area mAU *s | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|-------------|--------------|---------|
| 1 | 11.755 | MM | 0.9992 | 1.82935e5 | 3051.42236 | 42.3255 |
| 2 | 13.798 | MM | 1.3688 | 2.49275e5 | 3035.28418 | 57.6745 |

Şekil 33 (R)-1-(4-methoxyphenyl)propan-1-ol **Rasemik (2r)** HPLC spektrumu



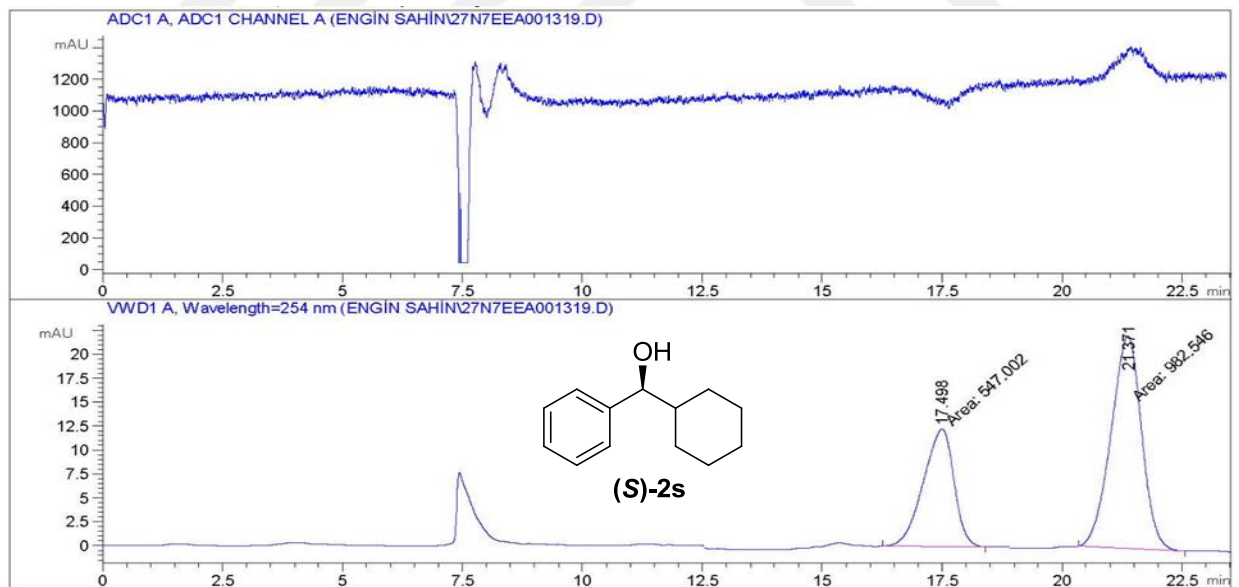
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area mAU *s | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|-------------|--------------|---------|
| 1 | 11.513 | MM | 0.7176 | 9.00570e4 | 2091.62988 | 99.6627 |
| 2 | 13.517 | MM | 0.4744 | 304.80234 | 10.70823 | 0.3373 |

Şekil 34 (R)-1-(4-methoxyphenyl)propan-1-ol **(2r)** HPLC spektrumu



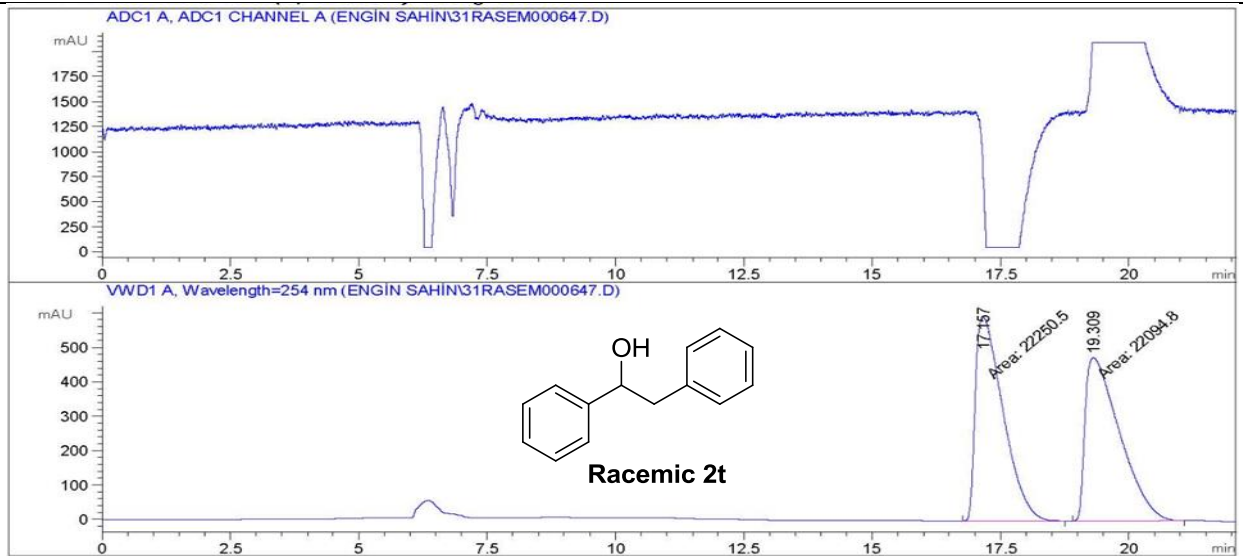
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area mAU *s | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|-------------|--------------|---------|
| 1 | 18.313 | MM | 0.8210 | 1.56688e4 | 318.09320 | 49.9672 |
| 2 | 22.282 | MM | 0.9120 | 1.56893e4 | 286.70963 | 50.0328 |

Şekil 35 (S)-cyclohexy(phenyl)methanol **Rasemik (2s)** HPLC spektrumu



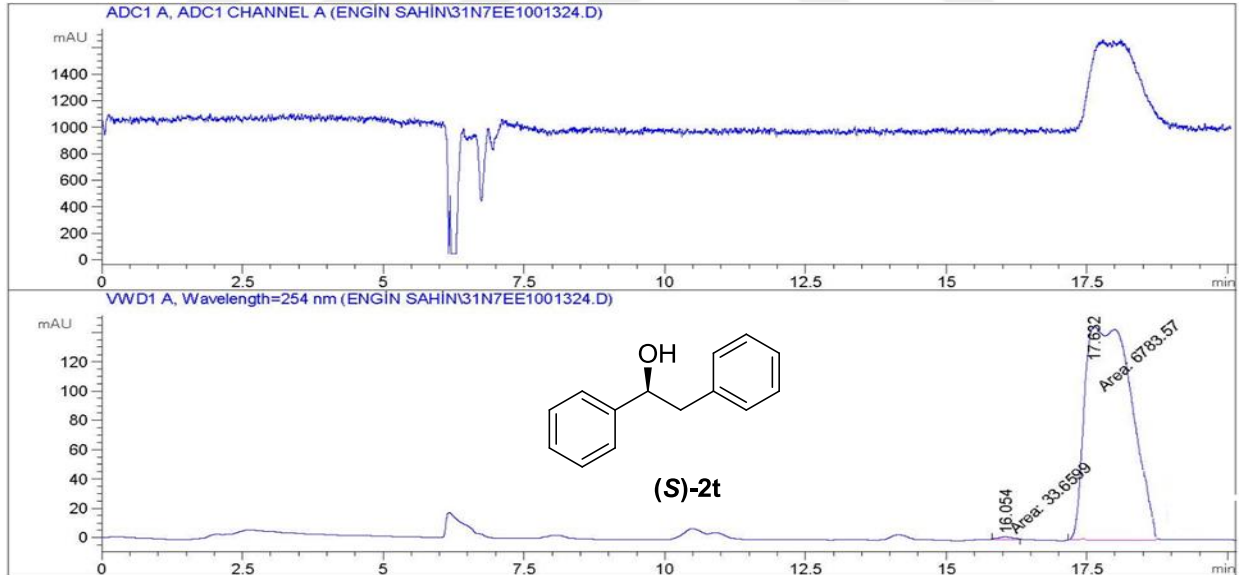
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area mAU *s | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|-------------|--------------|---------|
| 1 | 17.498 | MM | 0.7413 | 547.00226 | 12.29744 | 35.7623 |
| 2 | 21.371 | MM | 0.7369 | 982.54565 | 22.22193 | 64.2377 |

Şekil 36 (S)-cyclohexy(phenyl)methanol **(2s)** HPLC spektrumu



| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area mAU *s | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|-------------|--------------|---------|
| 1 | 17.157 | MM | 0.6246 | 2.22505e4 | 593.69867 | 50.1756 |
| 2 | 19.309 | MM | 0.7760 | 2.20948e4 | 474.53317 | 49.8244 |

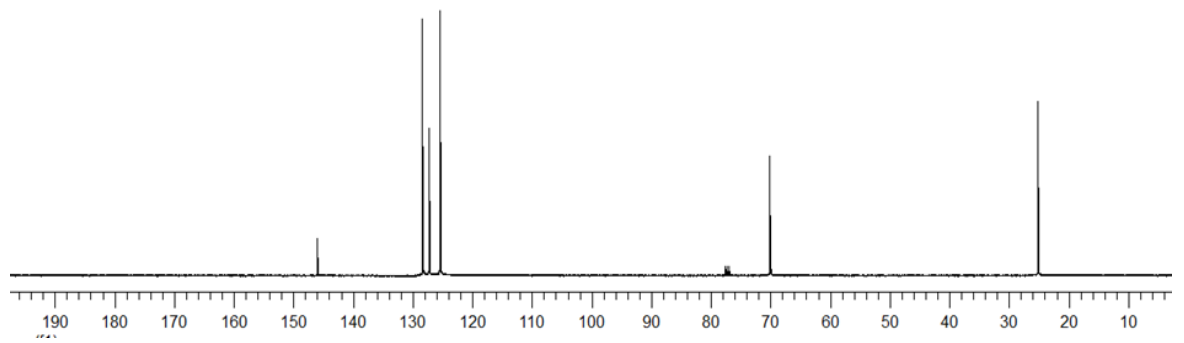
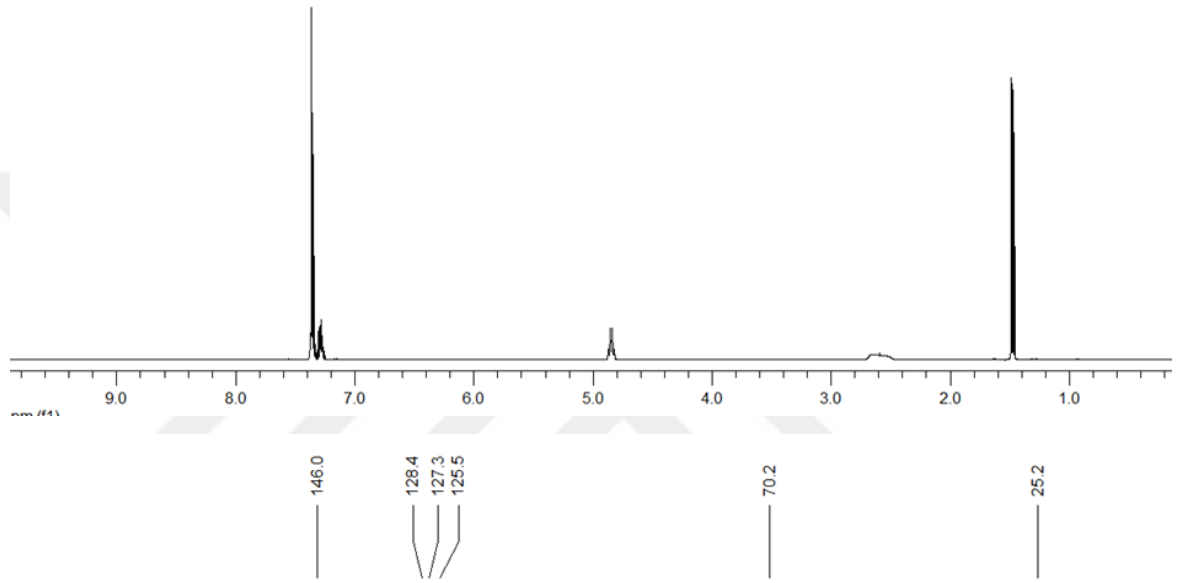
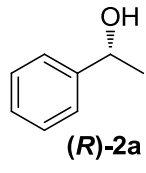
Şekil 37 (S)-1,2-diphenylethanol Rasemik (2t) HPLC spektrumu



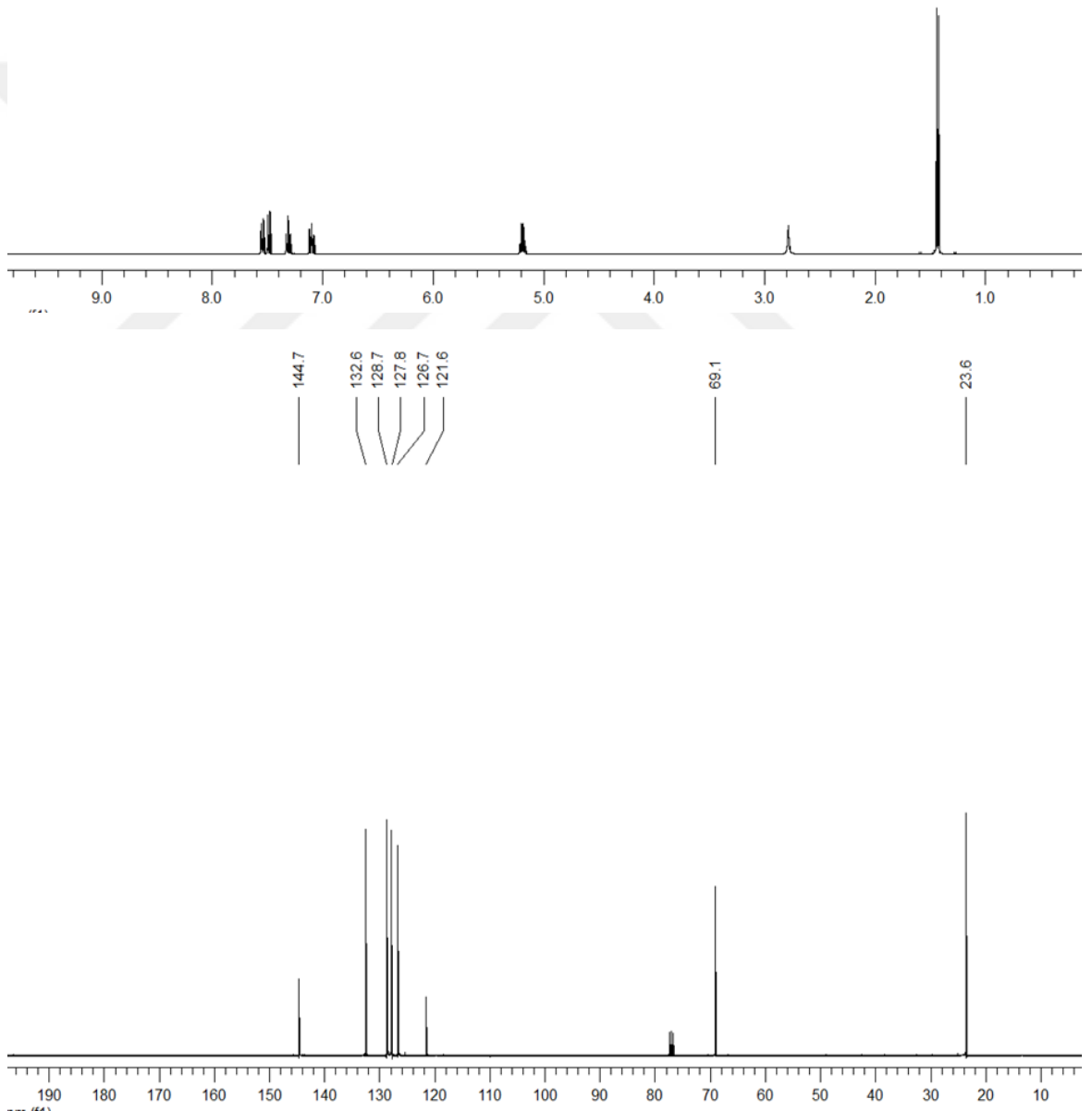
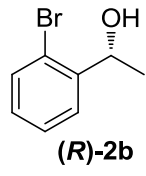
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area mAU *s | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|-------------|--------------|---------|
| 1 | 16.054 | MM | 0.3498 | 33.65986 | 1.60384 | 0.4937 |
| 2 | 17.632 | MM | 0.8432 | 6783.56787 | 134.08264 | 99.5063 |

Şekil 38 (S)-1,2-diphenylethanol (2t) HPLC spektrumu

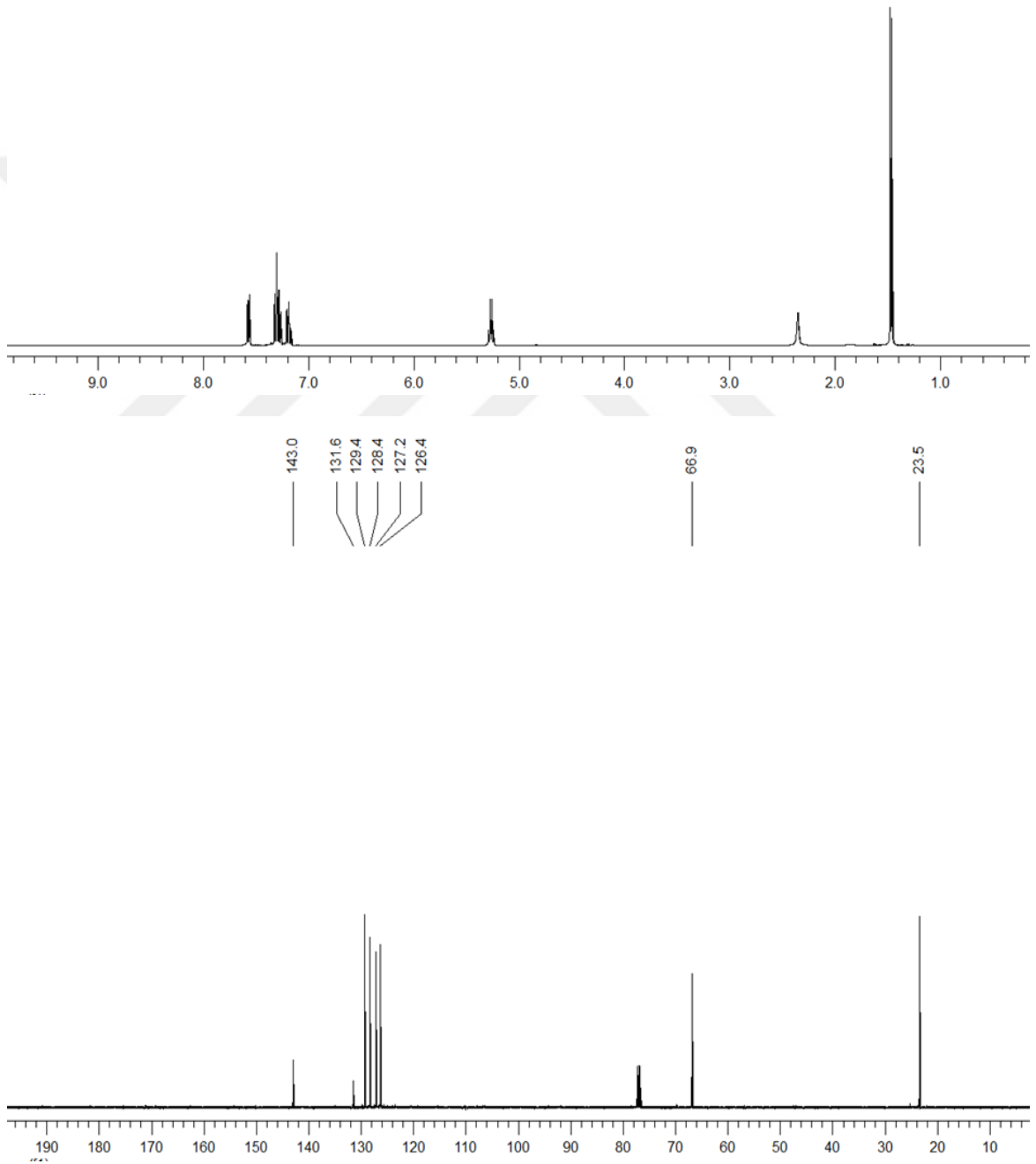
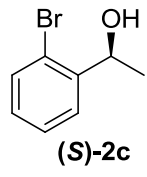
EK 2 NMR SPEKTRUMLARI



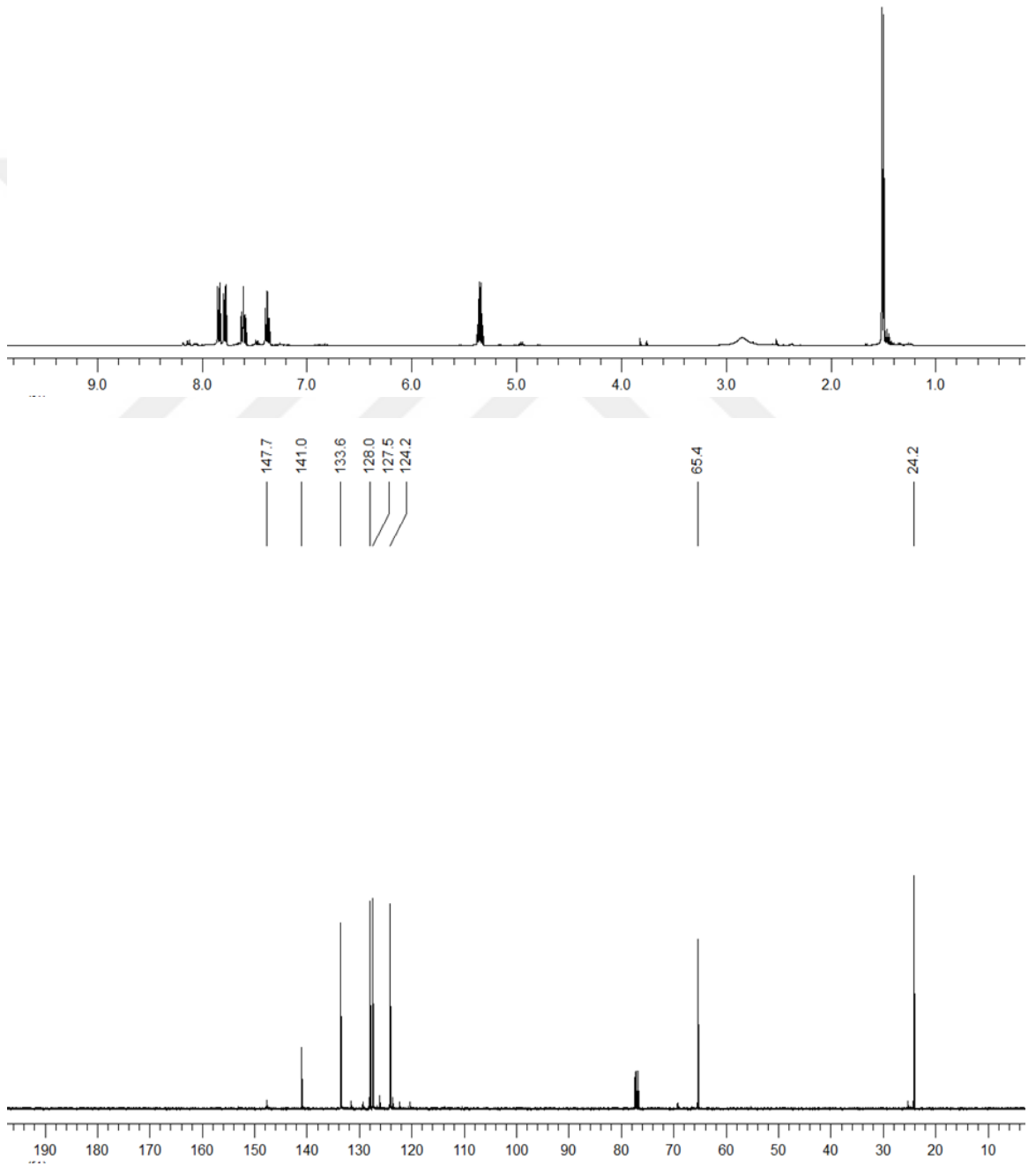
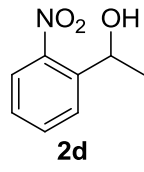
Şekil 1 (R)-1-phenylethanol (2a)'nın ¹H ve ¹³C-NMR spektrumları



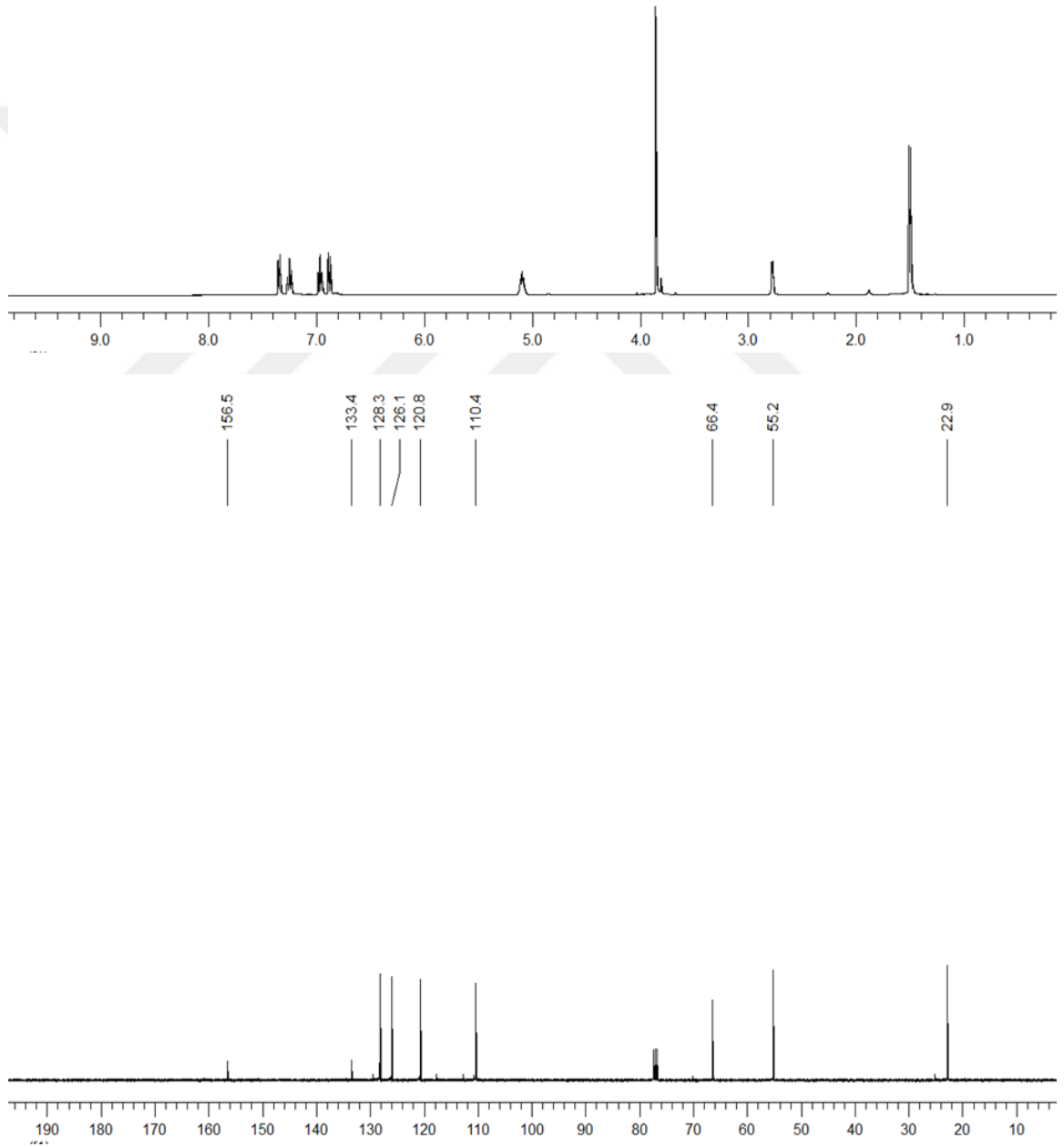
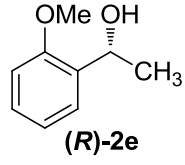
Şekil 2 (R)-1-(2-bromophenyl)ethanol (2b)'nin ^1H ve ^{13}C -NMR spektrumları



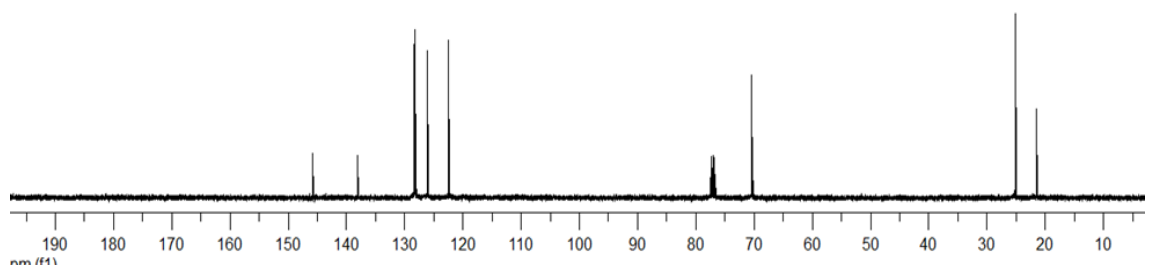
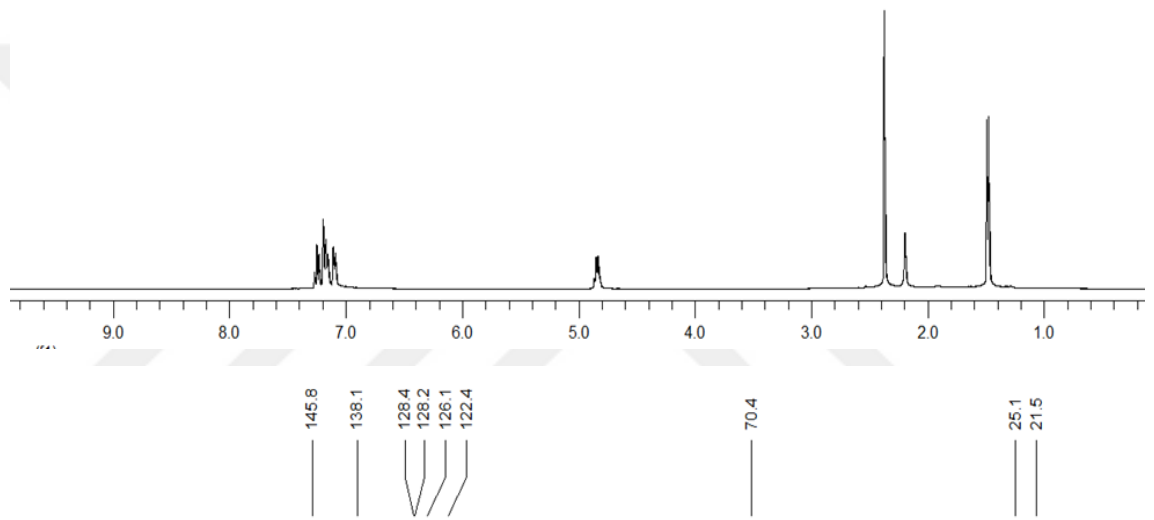
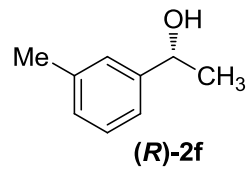
Şekil 3 (S)-1-(2-chlorophenyl)ethanol (2c)'nin ^1H ve ^{13}C -NMR spektrumları



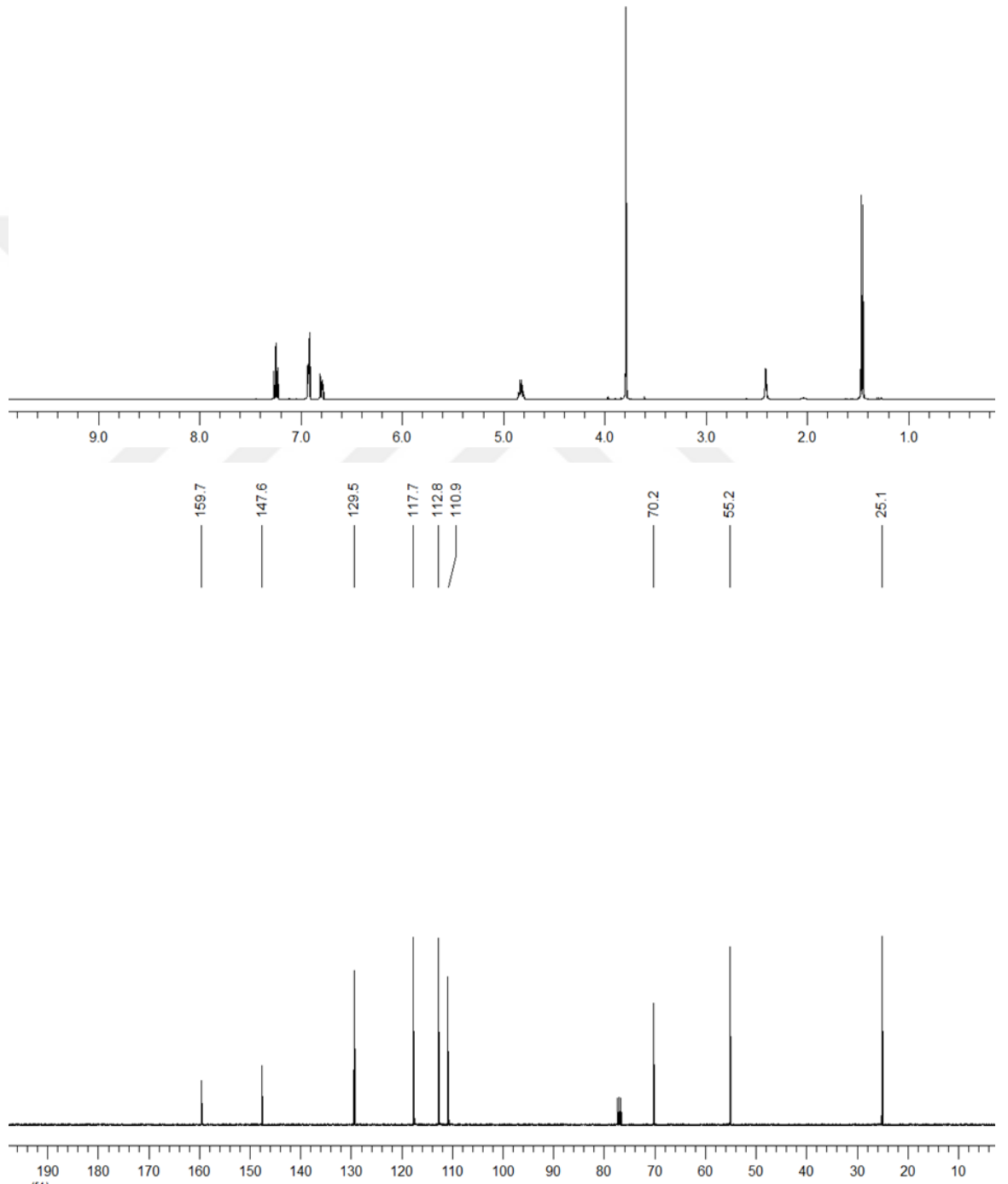
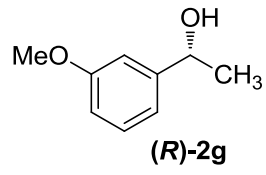
Şekil 4 1-(2-nitrophenyl)ethanol (**2d**)'nin ^1H ve ^{13}C -NMR spektrumları



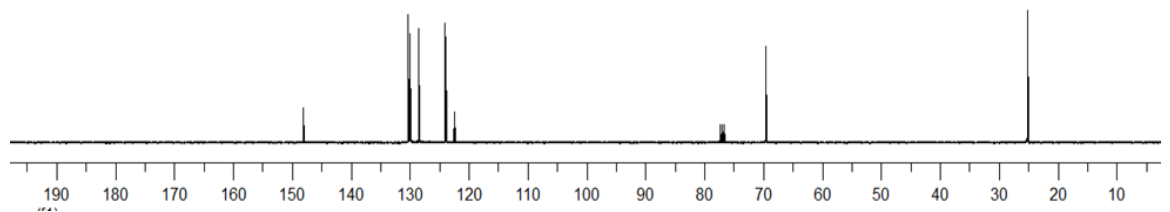
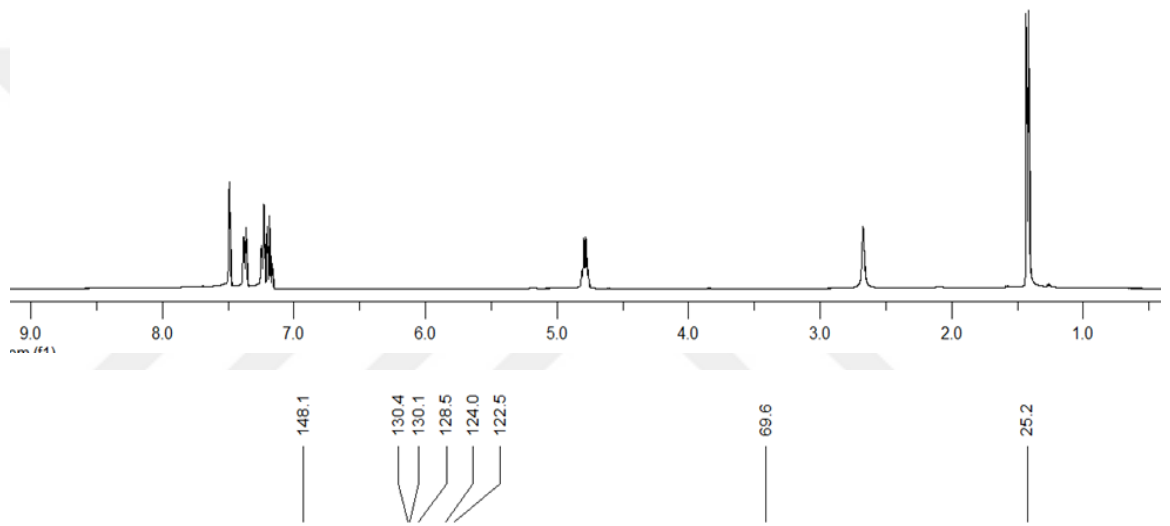
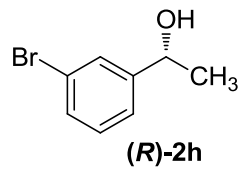
Şekil 5 (R)-1-(2-methoxyphenyl)ethanol (**2e**)'nin ¹H ve ¹³C-NMR spektrumları



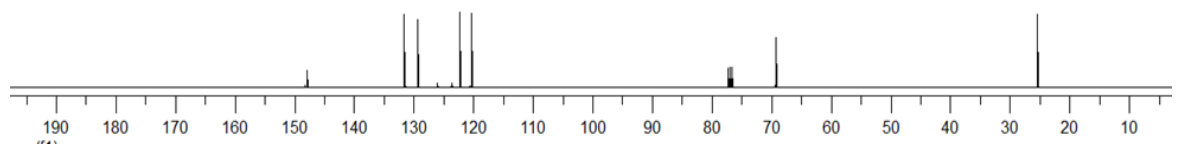
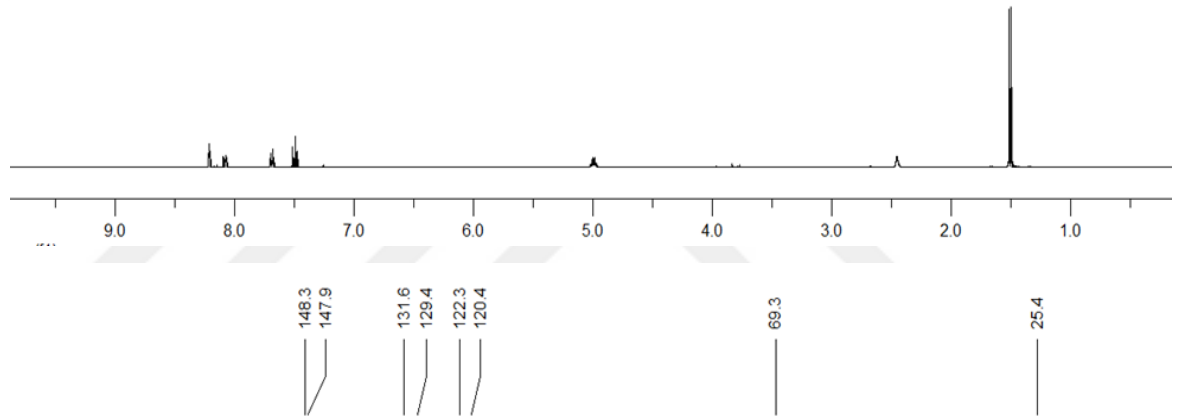
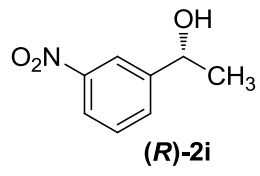
Şekil 6 (R)-1-(3-methylphenyl)ethanol (**2f**)'nin ^1H ve ^{13}C -NMR spektrumu



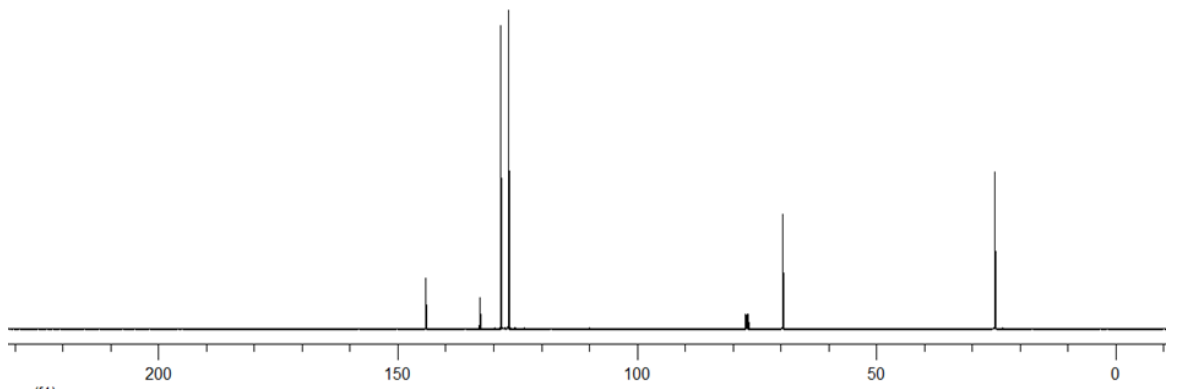
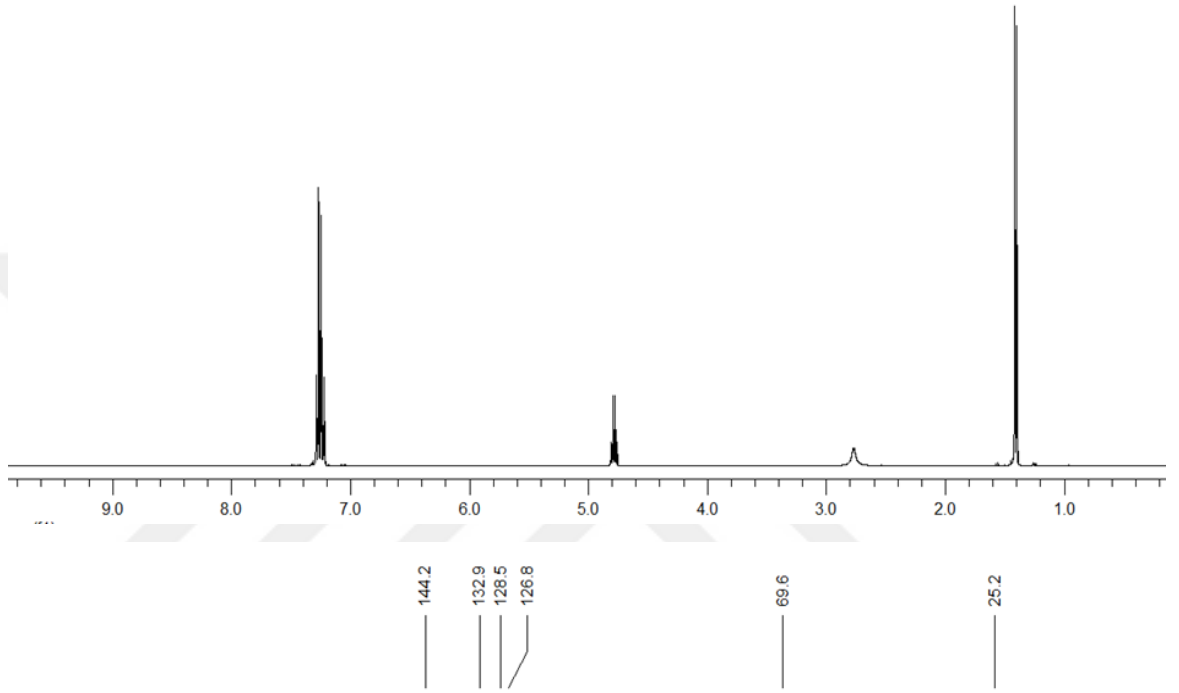
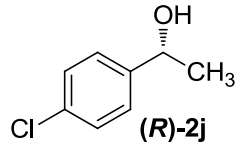
Şekil 7 (R)-1-(3-methoxyphenyl)ethanol (2g)'nin ^1H ve ^{13}C -NMR spektrumu



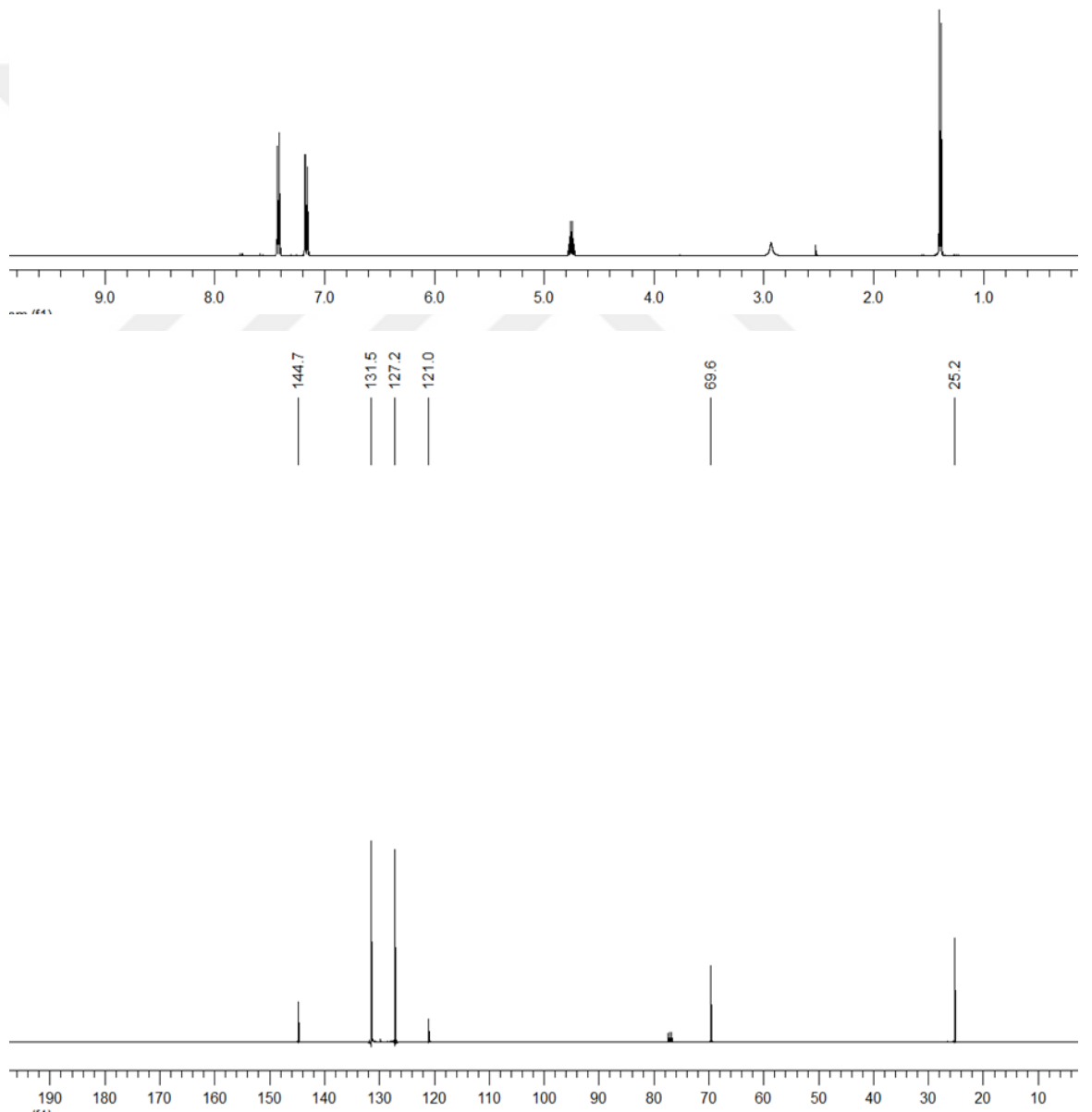
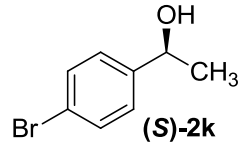
Şekil 8 (R)-1-(3-bromophenyl)ethanol (**2h**)'nin ^1H ve ^{13}C -NMR spektrumu



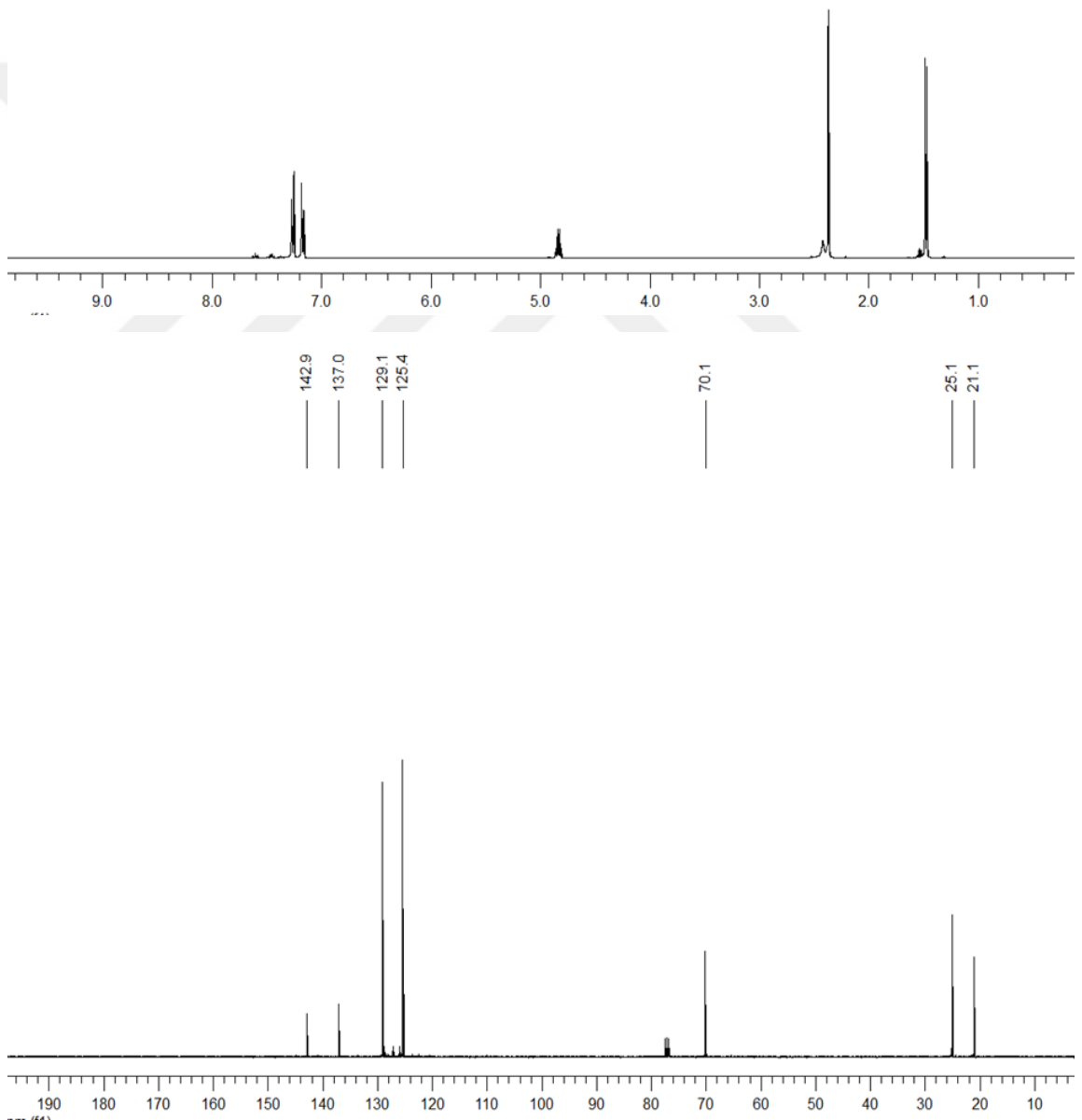
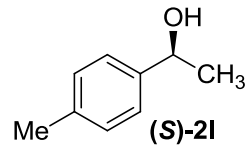
Şekil 9 (S)-1-(3-nitrophenyl)ethanol (**2i**)'nin ^1H ve ^{13}C -NMR spektrumu



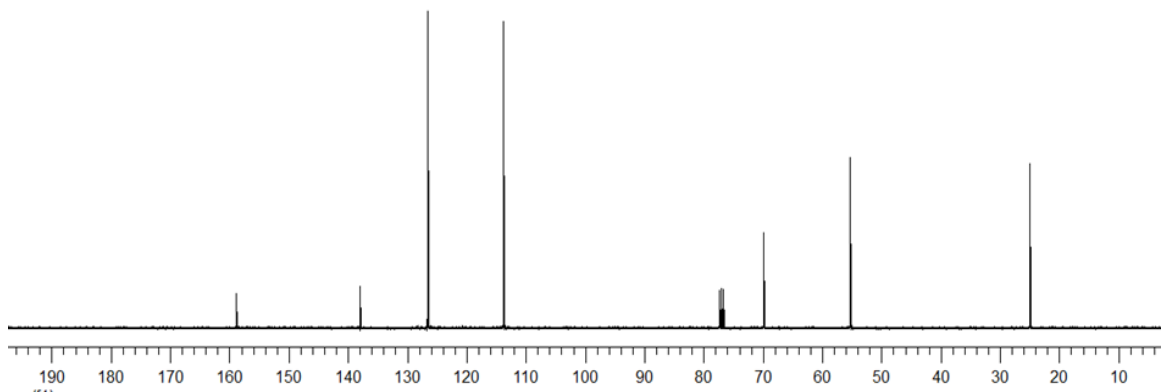
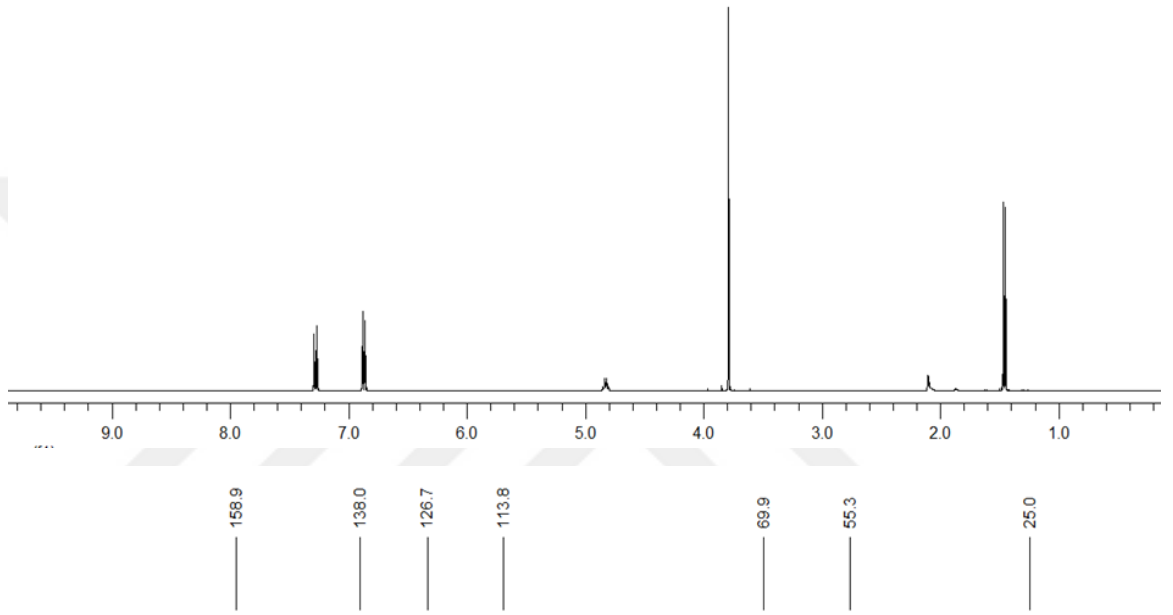
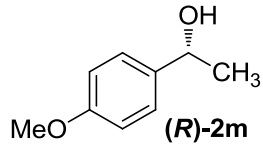
Şekil 10 (R)-1-(4-chlorophenyl)ethanol (2j)'nin ^1H ve ^{13}C -NMR spektrumu



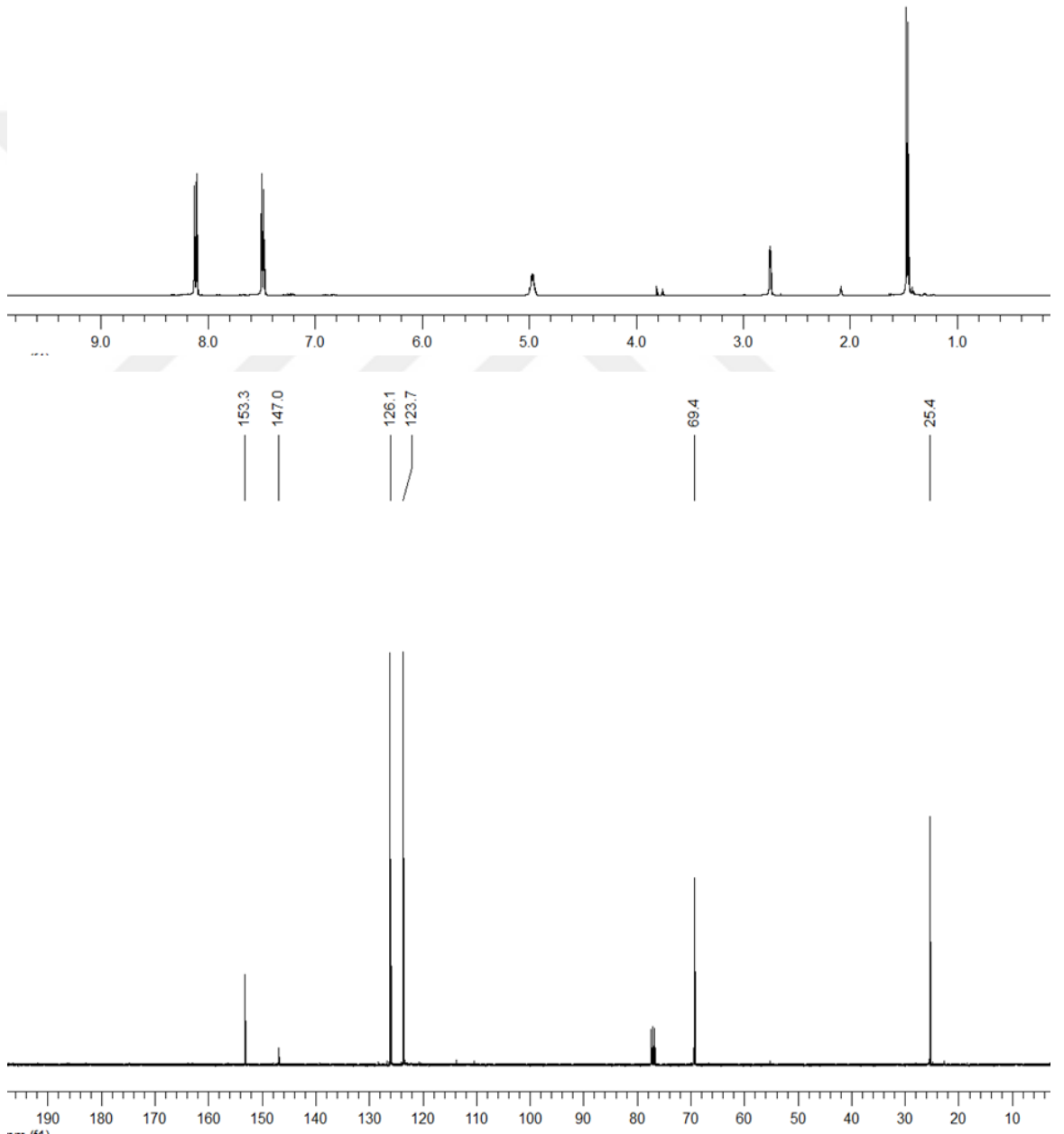
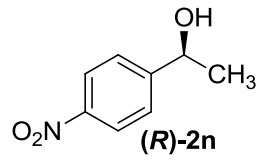
Şekil 11 (S)-1-(4-bromophenyl)ethanol (2k)'nin ¹H ve ¹³C-NMR spektrumu



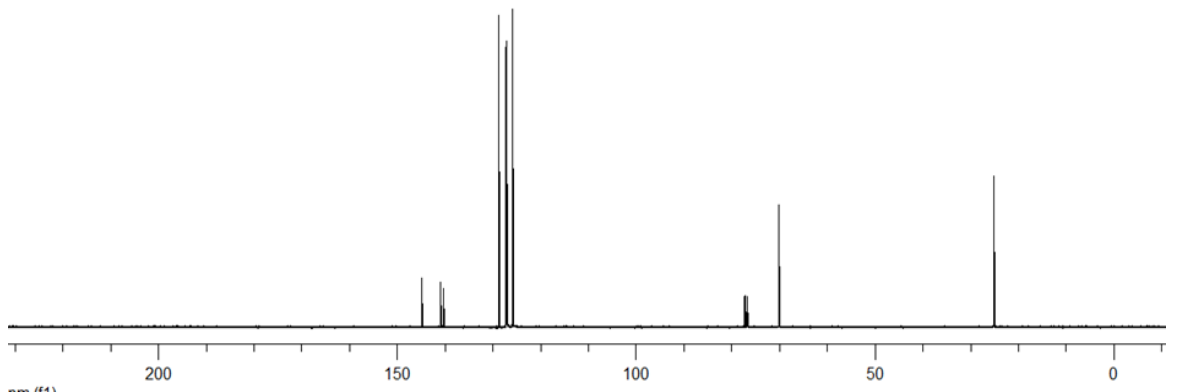
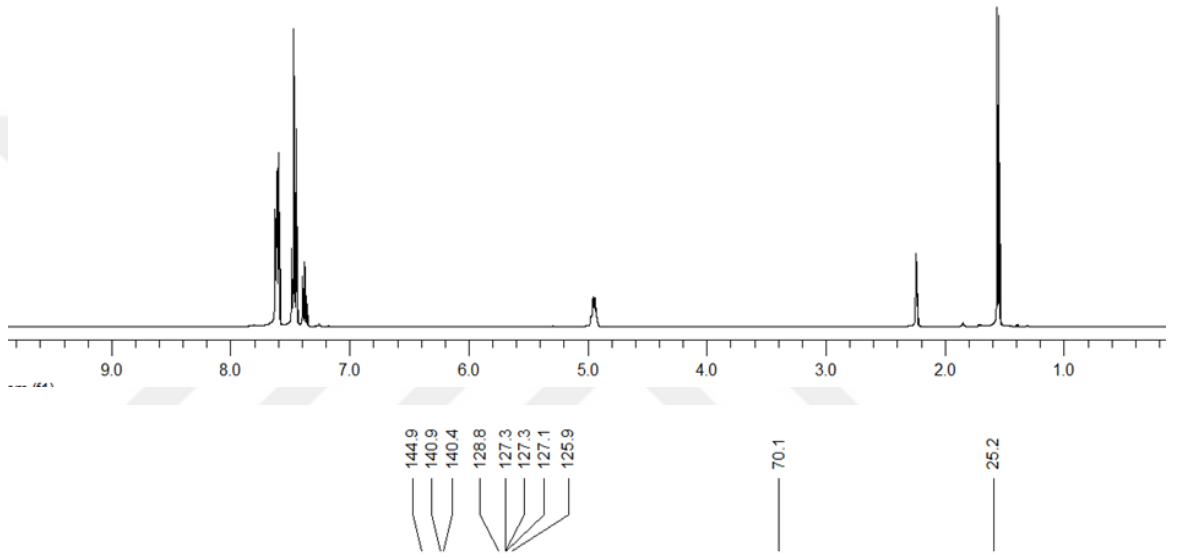
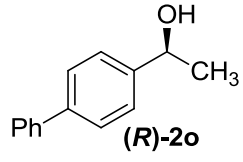
Şekil 12 (S)-1-(p-tolyl)ethanol (**2I**)'nin ¹H ve ¹³C-NMR spektrumu



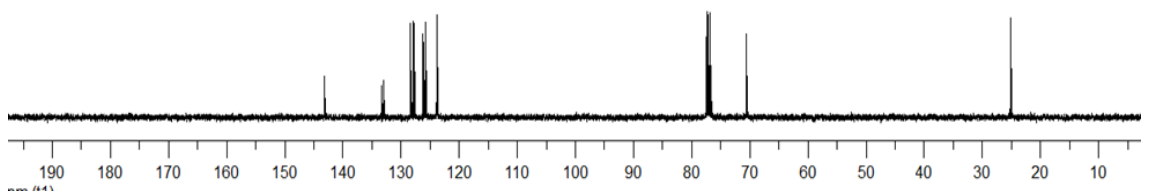
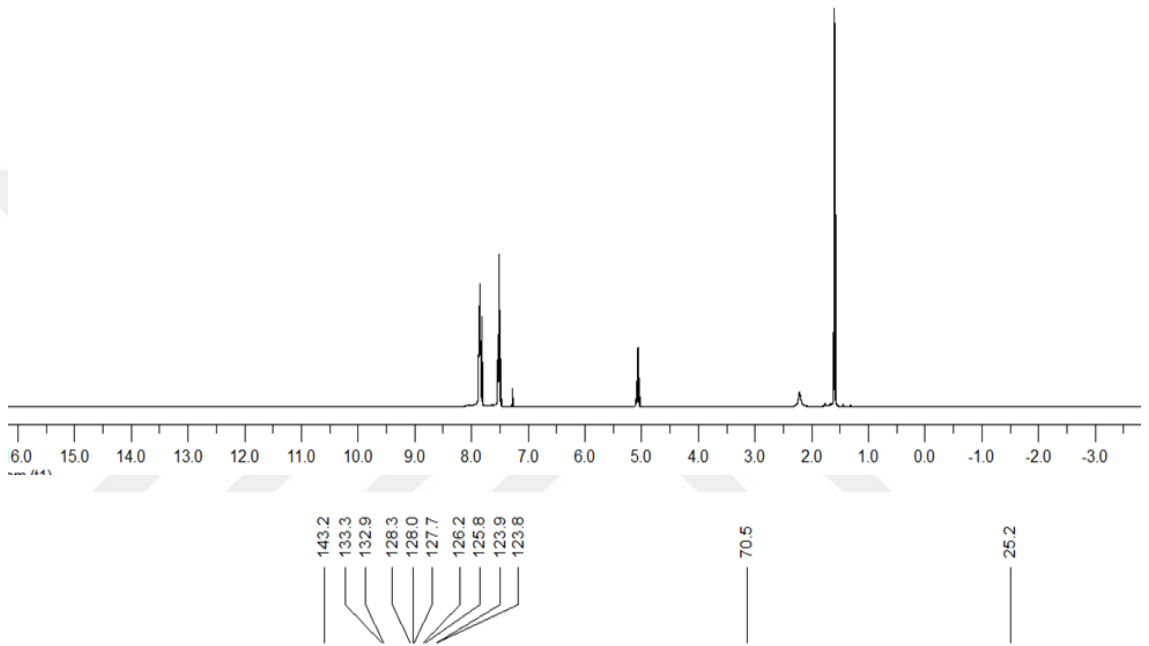
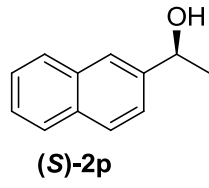
Şekil 13 (R)-1-(4-methoxyphenyl)ethanol (2m)'nin ^1H ve ^{13}C -NMR spektrumu



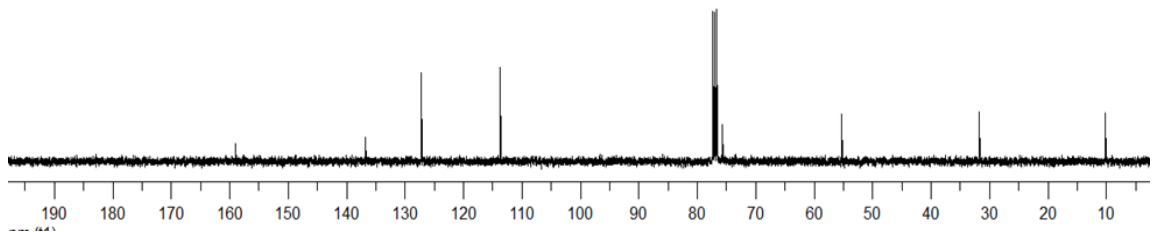
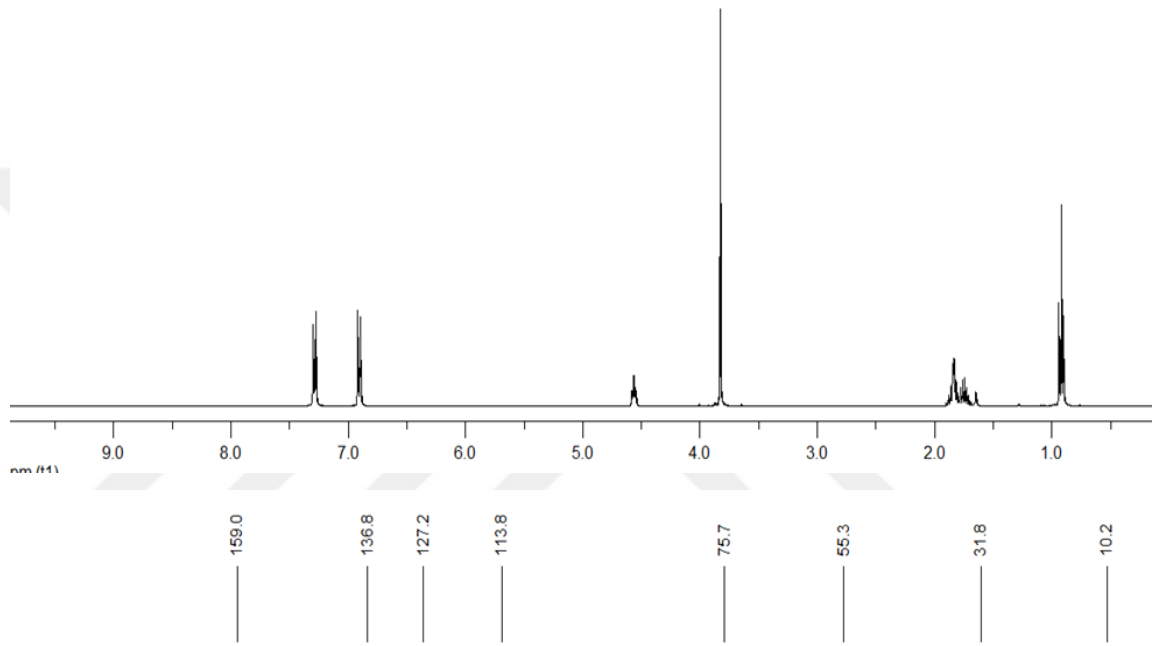
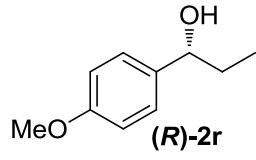
Şekil 14 (R)-1-(4-nitrophenyl)ethanol (2n)'nin ^1H ve ^{13}C -NMR spektrumu



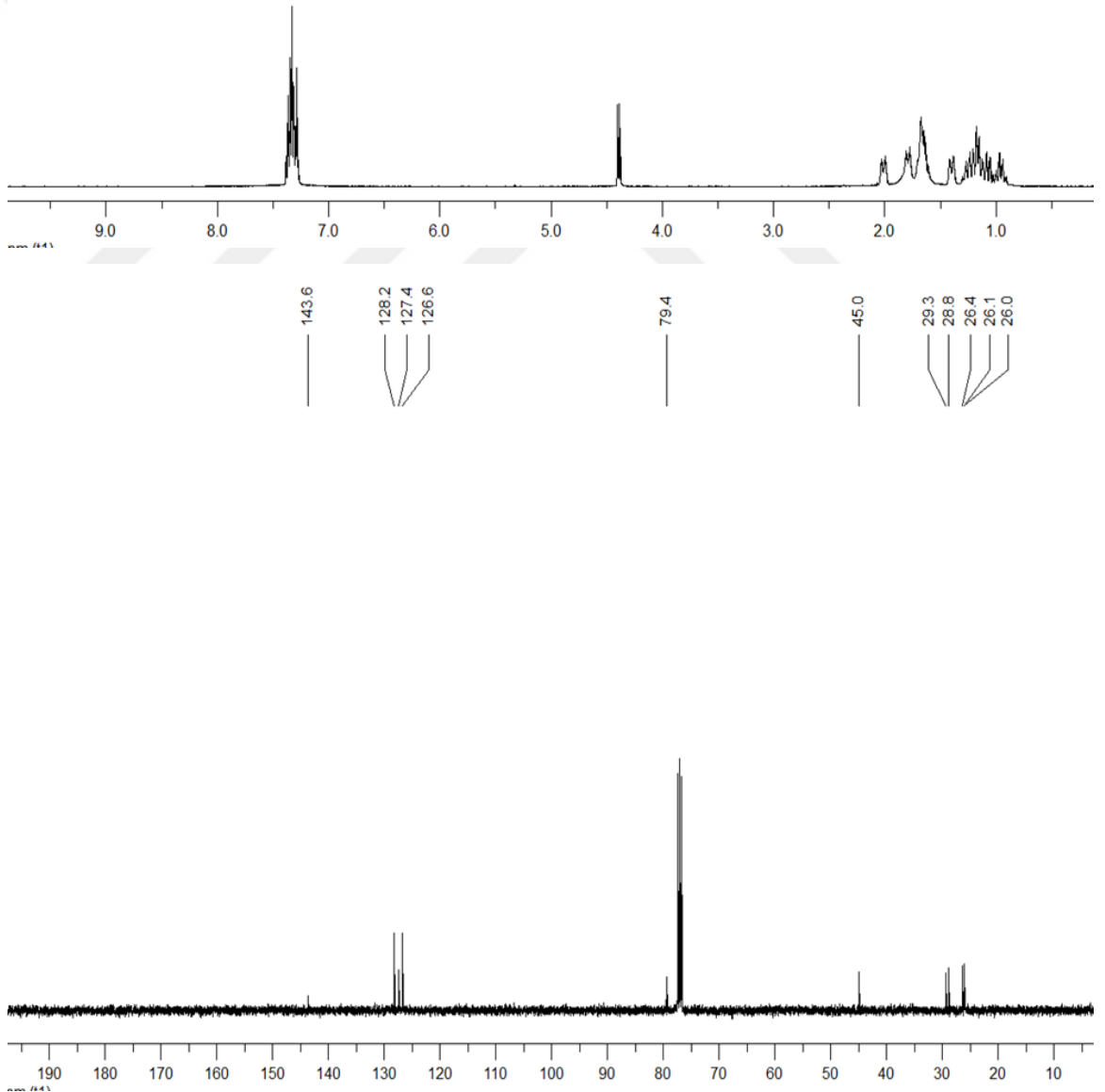
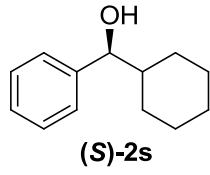
Şekil 15 (R)-1-(p-biphenyl)ethanol (2o)'nun ^1H ve ^{13}C -NMR spektrumu



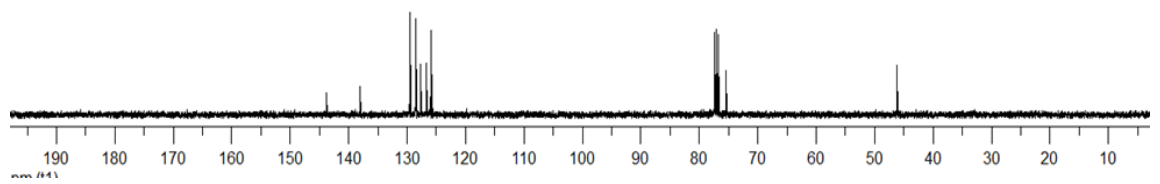
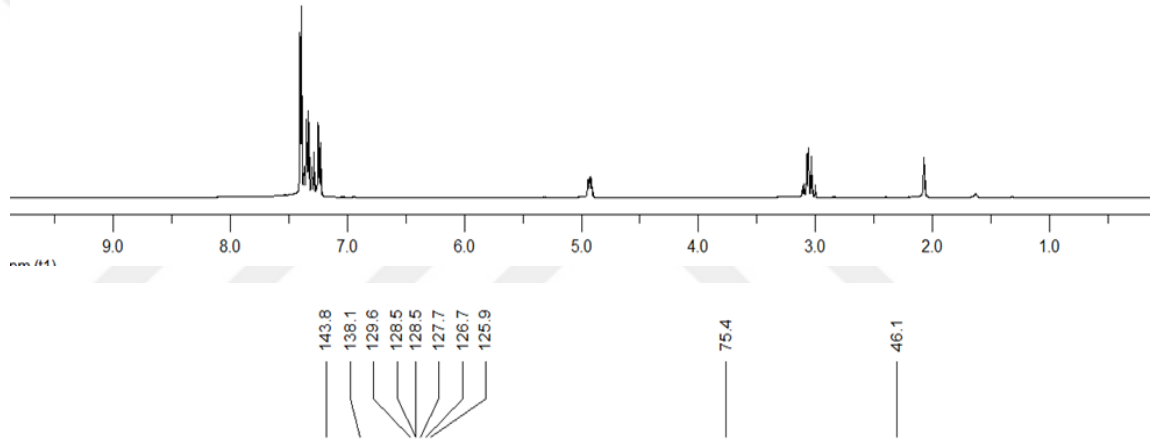
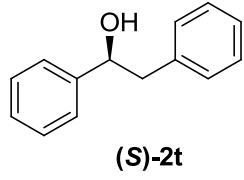
Şekil 16 (S)-1-(naphthalen-2-yl)ethanol (2p)'nin ^1H ve ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 17 (R)-1-(4-methoxyphenyl)propan-1-ol (2r)'nin ^1H ve ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 18 (S)-cyclohexyl(phenyl)methanol (2s)'nin ¹H ve ¹³C-NMR spektrumu



Şekil 19 (S)-1,2-diphenylethanol (2t)'nin ^1H ve ^{13}C -NMR spektrumu

ÖZGEÇMİŞ

Caner TOZLU



10 Haziran 1989 yılında Giresun'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Cumhuriyet İlköğretim okulunda tamamladıktan sonra lise eğitimini Giresun Lisesinde tamamladı. 2008 yılında Adıyaman Üniversitesi Gıda Teknolojisi bölümünde önlisans eğitimine başlayıp 2011 yılında mezun oldu. 2012 yılında Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği bölümünde lisans eğitimine başlayıp 2015 yılında mezun olduktan sonra 2016 yılında Bayburt Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.