

**T.C.  
AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HALKASAL HİDROKSİENON VE ASETOKSİENON  
YAPISINDAKİ KİRAL ÖNCÜLÜ MOLEKÜLLERİN  
DEHİDROGENAZ ENZİMLERİ İLE BİYOKATALİTİK  
DÖNÜŞÜMLERİ**

**Hatice DEMİR**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**KIRŞEHİR  
OCAK 2013**

**T.C.  
AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HALKASAL HİDROKSİENON VE ASETOKSİENON  
YAPISINDAKİ KİRAL ÖNCÜLÜ MOLEKÜLLERİN  
DEHİDROGENAZ ENZİMLERİ İLE BİYOKATALİTİK  
DÖNÜŞÜMLERİ**

**Hatice DEMİR**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN  
Yrd. Doç. Dr. Şaziye Betül SOPACI**

**KIRŞEHİR  
OCAK 2013**

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan .....

Doç. Dr. Sıdıka Polat Çakır

Üye.....

Yrd. Doç. Aslıhan Günel

Üye.....

Yrd. Doç. Dr. Şaziye Betül Sopacı

Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.../.../2013

Doç. Dr. Mahmut Yılmaz  
Enstitü Müdürü

## ÖZ

Biyotransformasyon ya da diğer bir deyişle biyokatalitik dönüşümler günümüzde klasik organik kimya da gerçekleştirilmeleri güç bazı tepkimeleri kolaylıkla ve 'çevre dostu' koşullarda gerçekleştirmeleri nedeniyle oldukça önemsenen bir araştırma alanıdır. Özellikle asimetrik sentez yöntemleri içerisinde ağırlığı ve kullanım alanı gittikçe artmaktadır. Bu yöntemler hem hücrelerin hem de izole enzimlerin kullanılması ile gerçekleştirilebilmektedir. Bu çalışmada iki önemli farnesolik öncül madde sentezlenmiş ve dehidrogenaz enzimleri ile biyodönüşüm çalışmalarına tabi tutulmuştur. Bu yapılardan ilki  $\alpha$ -asetoksi enon yapısındaki 4-metoksi-2-okzasikloheks-3-enil asetat diğeri **2** ise  $\alpha$ -hidroksi keton yapısındaki 6-hidroksi-3-metoksisikloheks-2-enon **3** dur. Bu maddelerin elde edilebilmesi için öncelikle 3-metoksi-sikloheks-2-enon, 1,3 diketon yapısındaki başlangıç maddesinden sentezlenmiştir. Daha sonra kimyasal asetilleme tepkimesi ile madde **2** ve lipaz enzimleri katalizörlüğünde enzimatik deasetilleme tepkimesi ile madde **3** sentezlenmiştir. Sentezlenen maddelerin yapı tayini NMR analizi ile gerçekleştirilmiştir. Bu maddelerin dehidrogenaz enzimleri ile biyokatalitik dönüşümlerinde ise galaktitol dehidrogenaz, şikimat dehidrogenaz ve diaforaz enzimleri kullanılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Biyotransformasyon, lipaz, dehidrogenaz, asetoksienon,  $\alpha$  hidroksienon.

## ABSTRACT

Biotransformation or in another word biocatalytic conversions have gaining attention for their ability to perform such reactions that can hardly afforded by conventional chemical synthesis. Particularly in asymmetrical synthesis area they are becoming one of the mainly used techniques. These techniques can be accomplished with whole cells, their extract or isolated enzymes. In this study two important pharmaceutical precursor were synthesized and subjected to dehydrogenase mediated bioconversion reactions. One of these compound is a  $\alpha$ - acetoxy enone structure 4-methoxy-2-oxocyclohex-3-enyl acetate **2** and the other is a  $\alpha$ -hydroxyl ketone structure 6-hydroxy-3-methoxycyclohex-2-enone. To obtain these compounds firstly 3- methoxy-cyclohex-2-enone was synthesized from 1,3 diketone **3** structure. After that acetylation reaction was performed and compound **2** was obtained and lipases were used to afford the other compound **3** by enzymatic deacetylation. All these compound were identified by NMR analysis. For dehydrogenase mediated biocatalytic conversions galactitol dehydrogenase, scimate dehydrogenase and diaphorase are used.

Key Words: Biotransformation, lipase, dehydrogenase, acetoxycyclohexenone,  $\alpha$  hydroxycyclohexenone.

## TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleŐtirilmesinde, baŐlangıcından sonuna kadar manevi destek ve yol gÖstericiliğini benden esirgemeyen, gerekli bütÖn yardım ve yönlendirmeleri yapan, deneyimlerinden yararlandığım, bilgi ve birikimime katkıda bulunup, amacıma doğru hızla yol almam, çeşitli ihtimalleri görÖp ufkumu açmam için sağladığı imkanı ile değerli katkı ve anlayıŐından dolayı sayın hocam Yrd. Doç. Dr. BetÖl SOPACI' ya teŐekkürlerimi sunarım

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZ .....	İ
ABSTRACT .....	İİ
TEŞEKKÜR .....	İİİ
İÇİNDEKİLER DİZİNİ .....	İV
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	İX
1. GİRİŞ .....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....	6
2.1. KİRALİTE .....	6
KIRAL ÜRÜNLERİN SENTEZLERİ .....	7
2.2. BİYOTRANSFORMASYON .....	8
2.2.1. BİYOTRANSFORMASYONUN ÖZELLİKLERİ .....	8
2.2.1.1. Tepkime seçiciliği .....	8
2.2.1.2. Ilımlı tepkime koşulları .....	9
2.2.1.3. Biyotransformasyon Türleri .....	9
2.3. ENZİMLER VE ENZİMATİK TEPKİME TÜRLERİ .....	11
2.3.1. ENZİMLERİN SINIFLANDIRILMASI .....	12
2.3.1.1. Oksidoredüktazlar .....	13
2.3.1.2. Transferazlar .....	13
2.3.1.3. Hidrolazlar .....	13
2.3.1.4. Liyazlar .....	13
2.3.1.5. İzomerazlar .....	14
2.3.1.6. Ligazlar .....	14
2.4. BİYOTRANSFORMASYON ÇALIŞMALARINDA OKSİDOREDÜKTAZLAR .....	14

2.5. BİYOTRANSFORMASYON ÇALIŞMALARINDA LİPAZLAR VE ESTERAZLAR .....	17
3. MATERYAL VE METOD .....	20
3.1. MATERYALLER.....	20
3.2. METOD .....	21
3.2.1. ENZİMATİK İNDRİGENME TEPKİMLERİNDE KULLANILACAK OLAN SUBSTRATLARIN (4-METOKSI-2-OKSOSİKLOHEKZ-3-ENİLASETAT VE 6-HİDROKSI-3-METOKSİKLOHEKZ-2-ENON) SENTEZİ.....	21
3.2.1.1. 3-Metoksisikloheksan-2-enonun sentezi.....	21
3.2.1.2. 4-Metoksi-2-Oksosikloheks-3-Enil Asetat Sentezi.....	22
3.2.1.3. 4-Metoksi-2-oksosikloheks-3-enil asetat'ın enzimatik hidrolizi. ....	23
3.2.2. GALAKTİTOL DEHİDROGENAZ VE ŞİKİMAT DEHİDROGENAZ ENZİM GENLERİNİ TAŞIYAN REKOMBİNANT E. COLİ HÜCRELERİNİN BÜYÜTÜLMESİ VE ENZİM ÜRETİMİ	23
3.2.3. BRADFORD PROTEİN TAYİN YÖNTEMİ .....	24
3.2.4. 4-METOKSI-2-OKSOSİKLOHEKZ-3-ENİLASETAT'IN DEHİDROGENAZ ENZİMLERİ İLE BİYOKATALİTİK TEPKİMLERİ .....	24
3.2.5. 6-HİDROKSI-3-METOKSİKLOHEKZ-2-ENON'UN DEHİDROGENAZ ENZİMLERİ İLE BİYOKATALİTİK TEPKİMLERİ .....	25
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	26
4.1. 3-METOKSI-SİKLOHEKZ-2-ENON'UN SENTEZİ.....	26
4.2. 4-METOKSI-2-OKZASİKLOHEKZ-3-ENİL ASETAT'IN SENTEZİ .....	27
4.3. 4-METOKSI-2-OKZASİKLOHEKZ-3-ENİL ASETAT'IN LİPAZ VE ESTERAZ ENZİMLERİ KATALİZÖRLÜĞÜNDE ASİMETRİK HİDROLİZİ: 6-HİDROKSI-3-METOKSİKLOHEKZ-2-ENON'UN SENTEZİ.....	29
4.4. GALAKTİTOL DEHİDROGENAZ VE ŞİKİMAT DEHİDROGENAZ ENZİMLERİNİN ÜRETİLMESİ VE ENZİM AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ	



4.5. 4-METOKSI-2-OKZASIKLOHEKZ-3-ENİL ASETAT 2 VE 6-HİDROKSI-3-METOKSIKLOHEX-2-ENON'UN 3 DEHİDROGENAZ ENZİMLERİ İLE BIYOTRANSFORMASYONU .....	33
5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	36
6. KAYNAKÇA .....	39
EKLER.....	43

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1.1.</b> 4-Metoksi-2-okzasikloheks-3-enilasetat'ın yapısı.....	2
<b>Şekil 1.2.</b> 6-Hidroksi-3-Metoksi Sikloheks-2-Enon'un Yapısı .....	2
<b>Şekil 1.3.</b> 4-Metoksi-2-okzasikloheks-3-enil asetat ve 6-hidroksi-3-metoksi sikloheks-2-enon'un indirgenme ürünleri.....	3
<b>Şekil 1.4.</b> Galaktitol dehidrogenaz enziminin katalizlediği tepkimeler <sup>12</sup> .....	4
<b>Şekil 1.5.</b> 3-Dehidroşikimatın şikimat dehidrogenaz katalizörlüğünde gerçekleşen indirgenme tepkimesi.....	5
<b>Şekil 2. 1.</b> Kiral bir karbon bileşiğinin iki farklı enantiomerik yapısı.....	6
<b>Şekil 2.2.</b> Talidomit'in kiral yapısı .....	7
<b>Şekil 2.3.</b> Prelog kuralına göre R <sub>1</sub> ve R <sub>2</sub> süstituentlerinin büyüklüklerine bağlı olarak (R <sub>1</sub> >R <sub>2</sub> ) gerçekleşen ADH katalizörlüğündeki indirgenme tepkimesi.....	15
<b>Şekil 2.4.</b> Rhodococcus ruber ile gerçekleştirilen optikçe aktif alkol üretimi <sup>33</sup> .....	15
<b>Şekil 5.5.</b> Rhodococcus ruber'den izole edilmiş karbonil redüktaz enzimi katalizörlüğünde gerçekleşen biyo-indirgeme tepkimesi <sup>34</sup> .....	16
<b>Şekil 5.6.</b> Protein mühendisliği ürünü enzimler ile sentezlenmiş optikçe aktif önemli kiral yapılar <sup>36, 37, 38, 39</sup> .....	17
<b>Şekil 5.7.</b> Karboksilik esteraz ve lipaz enzimlerinin karboksilik esterler üzerindeki hidrolitik aktivitesi <sup>42</sup> .....	18
<b>Şekil 5.9.</b> Lipaz katalizörlüğünde gerçekleşen kinetik ayrışma tepkimeleri.....	19
<b>Şekil 4.1.</b> 3-Metoksi-Sikloheks-2-Enon'un Sentezi .....	26
<b>Şekil 4.2.</b> 3-Metoksi-sikloheks-2-enon'un proton NMR spektrumu.....	27
<b>Şekil 4.3.</b> $\alpha$ , $\beta$ , Doymamış Ketonların $\alpha'$ Asetoksilleme Ürünlerinin Oluşum Mekanizması .....	28
<b>Şekil 4.4.</b> 4-Metoksi-2-okzasikloheks-3-enil asetat'ın sentezi.....	28
<b>Şekil 4.5.</b> 4-Metoksi-2-okzasikloheks-3-enil asetat'ın <sup>1</sup> NMR spektrumu.....	29
<b>Şekil 4.6.</b> 6-Hidroksi-3-metoksisikloheks-2-enon'un sentezi.....	30
<b>Şekil 4.7.</b> 6-Hidroksi-3-Metoksisikloheks-2-Enon'un NMR Spektrumu.....	31
<b>Şekil 4.8.</b> 4-Metoksi-2-okzasikloheks-3-enil asetat'ın GatDH, ShDH ve diaforaz enzimleri ile vermesi beklenen tepkimeler.....	35

<b>Şekil 4.9.</b> 6-Hidroksi-3-metoksiklohex-2-enon'un 3 GatDH, ShDH ve diaforaz enzimleri ile vermesi beklenen tepkimeler. ....	35
<b>Şekil E1.</b> 4-Metoksi-2-Okzasikloheks-3-Enil Asetat'ın 2 Esteraz Katalizörlüğünde Deasetilleme Tepkimesine Ait GC Kromatogramı ve Ürüne ait (6-Hidroksi-3-Metoksiklohex-2-Enon) Kütle Spektrumu.....	43
<b>Şekil E2.</b> Esteraz tepkimesinde 50 saat sonra oluşan 6-hidroksi-3-metoksiklohex-2-enon'un HPLC analizi.....	44
<b>Şekil E3.</b> Esteraz tepkimesinde 22 saat sonra oluşan 6-hidroksi-3-metoksiklohex-2-enon'un HPLC analizi.....	44
<b>Şekil E4.</b> 4-Metoksi-2-okzasikloheks-3-enil asetat'ın GatDH katalizörlüğünde gerçekleştirilen tepkime ürününe ait NMR spektrumu. ....	45

## SİMGELER VE KISALTMALAR

ADH	Alkol dehidrogenaz
DMSO	Dimetilsülfoksit
FAD	Flavin adenin dinükleotit
GatDH	Galaktitol dehidrogenaz
GC-MS	Gas Chromatography-Mass (Gaz kromatografisi-Kütle analizi)
NAD	Nikotinamit Adenin Dinükleotit
TLC=İTK	İnce tabaka kromatografisi
LB	Luria Broth
IPTG	İsopropil- $\alpha$ -D-tiogalaktopiranozit
ShDH	Sikimat dehidrogenaz
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi)

## 1. GİRİŞ

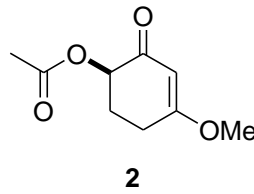
Enzimler ve diğer biyolojik katalizörler asimetric yapıya sahip moleküllerdir. Bu özellikleri doğada seçici ve hedefe özgün biyolojik fonksiyonların gerçekleşmesini sağlamaktadır. Bu nedenle biyolojik olarak aktif moleküllerin sentezinde ki bunlar arasında farmasötik özellikteki moleküller ve zirai mücadelede kullanılan ajanlar büyük yer tutmaktadır, optik saflık (%ee) değeri en önemli ölçüttür <sup>1</sup>. Olası istenmeyen yan etkilerin giderilmesinin yanı sıra, kullanılan biyoaktif molekülün etkinliği de optik saflık derecesine bağlıdır. Bu gün optikçe saf ürünlerin dünya pazarındaki hacmi 100 milyar doları bulmaktadır ve ilaç endüstrisinin yaklaşık % 70'ini kapsamaktadır <sup>2</sup>.

Kiral biyoaktif maddelerin üretimi için yeni yöntemlerin geliştirilmesi akademik bilgi birikimimizin oluşmasına katkı sağlamanın yanında özellikle ülkemiz ilaç sanayinin de değerlendirebileceği yöntemlerin geliştirilmesinde de etkili olacaktır.

Bu önemli kiral yapılardan biriside kiral alkollerdir. Birçok farmasötik öneme sahip bileşiğin yapısında bulunurlar. Bunun dışında  $\alpha$ -hidoksi ketonlar ise kiral bir karbon atomunun bağlı olan  $\alpha$  karbonunda bir fonksiyonel grup bulundurulur. Karbonil grubunun kolaylıkla dioller, halo ya da amino türevleri gibi diğer fonksiyonel yapılara dönüştürülebilmesi nedeniyle bu yapılar önemli biyoaktif yapıtaşları arasında bulunurlar <sup>3</sup>. Alfa hidroksi ketonların indirgenme ürünleri diolleri oluşturur. Dioller de aynı şekilde taşıdıkları kiral enformasyon ve alkol gruplarının fonksiyonelliği düşünüldüğünde  $\alpha$  hidroksi ketonlar kadar önemli yapılardır. Visinal dioller aldehit ve ketonların sentezinde kullanılırlar <sup>4</sup>. 1,2-diketonların sentezinde ve  $\alpha$ -ketoalkollerin oluşumunda kullanıldıkları da bilinmektedir <sup>5</sup>. Yukarıda bahsi geçen kiral yapıların sentezinde biyokatalitik yöntemler etkili bir şekilde kullanılabilir. Bu yöntemler arasında enzimatik yükseltgenme ve indirgenme, deasetilasyon ve kinetik ayrışma tepkimeleri önemli yer tutarlar <sup>6</sup>.

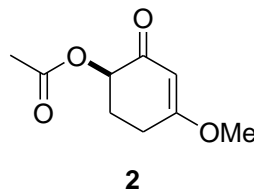
Bu çalışmada biyokatalitik yöntemler kullanılarak halkasal yapıdaki  $\alpha$  asetoksi enon ve  $\alpha$  asetoksienon yapısının biyokatalitik deasetillenmesi sonucu oluşan  $\alpha$  hidroksi keton yapısındaki iki kiral molekülün dehidrogenaz enzimleri ile gerçekleştirecekleri tepkimeler ele alınmıştır.

Bu yapılardan ilki 4-metoksi-2-okzasikloheks-3-enil asetat **2** halkasal poliokso keton yapısında bir maddedir ve bu özellikteki maddeler birçok biyoaktif molekülün önemli yapısal ünitelerindendir <sup>7</sup>. Etkili asimetrik sentez yöntemleri arasında Mn(OAc)<sub>3</sub> kullanılarak gerçekleştirilen metal etkili radikal tepkimeler en yaygın kullanılan yöntemlerden birisidir <sup>8</sup>. Mn(OAc)<sub>3</sub> kullanılarak gerçekleştirilen tepkimeler birçok kemo- ve stereo-seçici sentez yöntemlerinin geliştirilmesinde kullanılmıştır <sup>9</sup>. Mn(OAc)<sub>3</sub> 'ın KMnO<sub>4</sub>/Mn(OAc)<sub>2</sub> den *in-situ* preperasyonlarının kullanımında literatürde mevcuttur <sup>10</sup>.



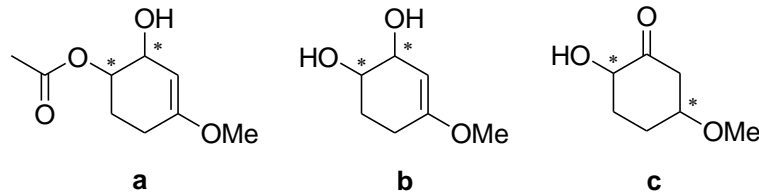
**Şekil 1.1.** 4-Metoksi-2-okzasikloheks-3-enilasetat'ın yapısı.

6-Hidroksi-3-metoksisikloheks-2-enon yapısı ise asetoksi enon yapısındaki molekülün lipaz ya da esteraz enzimleri ile biyokatalitik olarak deasetillenmesi sonucu elde edilebilirler <sup>11</sup>. Lipaz enzimleri enzimatik yöntemler arasında özellikle kinetik ayrışma tepkimeleri ile optikçe saf bileşiklerin elde edilmesinde kullanılırlar <sup>6</sup>. Bu çalışmada da lipaz enzimi katalizörlüğünde kirale yapıda olan başlangıç maddesi **2** enzimin enantiyo-seçici deasetilleme özelliğinden yararlanılarak kinetik ayrışma tepkimesine tabi tutularak optikçe saf ürünün elde edilmesi planlanmıştır. Kinetik ayrışma tepkimelerinin özelliği gereği oluşan ürün en iyi ayrışma düzeyinde % 50 verim ile oluşmakta ve dönüşüme uğramayan başlangıç maddesi de yüksek optik saflıkta elde edilebilmektedir <sup>6</sup>.



**Şekil 1.2.** 6-Hidroksi-3-Metoksi Sikloheks-2-Enon'un Yapısı

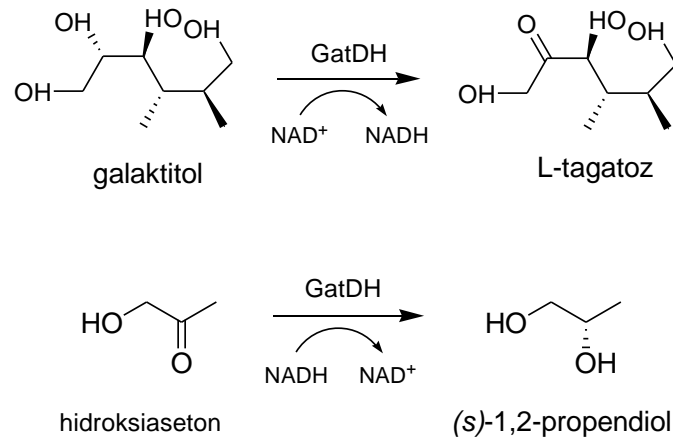
Çalışmamızda sentezlediğimiz başlangıç maddeleri **2** ve **3** halkasal yapısında bir kiral merkez ve bu kiral merkezin hemen yanında –enon yapısında bir fonksiyonel bölge barındırmaları açısından biyoaktif bir molekül öncülü olarak değerli bir yapısal özellik göstermektedir. Bu tür maddelerin indirgenme ürünlerini inceleyecek olursak, hem karbonil grubunun hem de çift bağ bulunduran karbon atomunun enantiyo-seçici indirgenme ürünlerinin de başlangıç maddeleri gibi değerli yapıları oluşturduğu görülmektedir. Karbonil grubu indirgenme ürünü iki kiral merkez ve halka yapısındaki doymamış bir karbon atomu bulunduracaktır.(Şekil 3a,b) Bu yapı optikçe saf olarak elde edildiğinde yapı, taşıdığı kiral enformasyon zenginleştirilmiş fonksiyonel bir biyoaktif molekül öncülü haline gelir. Ayrıca yapı çift bağın indirgenmesi ile de zenginleştirilebilir bir molekülü halindedir. (Şekil 3c)



**Şekil 1.3.** 4-Metoksi-2-okzasiklohekz-3-enil asetat ve 6-hidroksi-3-metoksi siklohekz-2-enon'un indirgenme ürünleri.

Belirtildiği üzere biyoaktif moleküllerin yüksek optik saflıkta elde edilmeleri oldukça önemlidir bir başka deyişle optik saflık derecesi biyoaktif moleküllerin sentezinde öncelikli bir konudur. Enzimler ve reseptörler gibi biyolojik olayların gerçekleşmesine sebep olan önemli yapılar kiral moleküllerdir ve kendilerine özgü kiral bilgiyi taşıdıklarından bu yapılar üzerinde etkili olacak maddeler için de oldukça seçici davranırlar. Bu nedenle biyoaktif moleküllerin sentezinde enzimlerin kullanımı seçicilik açısından önemli avantajlar sağlamaktadır. Ayrıca enzimlerin kendi substratları dışında benzer yapıda molekülleri, bazı durumlarda ise farklı kimyasal dönüşümleri gerçekleştirebilmeleri de biyotransformasyon çalışmalarında kullanılabilirliğini sağlamaktadır.

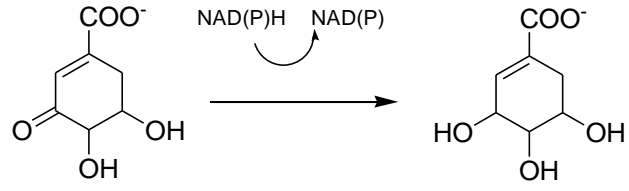
Bizim çalışmamızda indirgenme tepkimeleri için bu dönüşümleri gerçekleştirebilecek dehidrogenaz enzimleri seçilmiştir. Sentezlediğimiz başlangıç maddelerini indirgeyebilecek dehidrogenaz enzimleri seçilirken moleküllerin temel yapısı ve indirgenmesi planlanan fonksiyonel bölge dikkate alınmıştır. Buna göre galaktitol dehidrogenaz (EC 1.1.1.16) ve şikimat dehidrogenaz (EC 1.1.1.24) enzimi halkasal asetoksienon **2** ve hidroksienon **3** yapısındaki maddelerimizin karbonil grubunu indirgeyebileceği düşünülmüştür. Galaktitol dehidrogenaz (galaktitol:NAD<sup>+</sup> 5 oksidoredüktaz; GatDH) ilk olarak galaktitolü kullanan mutant bakteri *Rhodobacter sphaeroides* Si4'den izole edilmiştir<sup>14</sup>. Homotetramerik yapıdaki bu enzim galaktitolü indirgeyerek L-tagataoza dönüşümünü katalizler<sup>15</sup>. Ayrıca bu enzim hidroksiaseton ve hidroksiketon gibi moleküllerin indirgenme tepkimeleri için biyotransformasyon çalışmalarında da kullanılmıştır<sup>16</sup>. (Şekil 4)



**Şekil 1.4.** Galaktitol dehidrogenaz enziminin katalizlediği tepkimeler<sup>12</sup>.

Şikimat dehidrogenaz enzimi şikimat izyolunda 3-dehidroşikimatın şikimata dönüşümünden sorumludur<sup>17</sup>. (Şekil 5)





**Şekil 1.5.** 3-Dehidroşikimatın şikimat dehidrogenaz katalizörlüğünde gerçekleşen indirgenme tepkimesi.

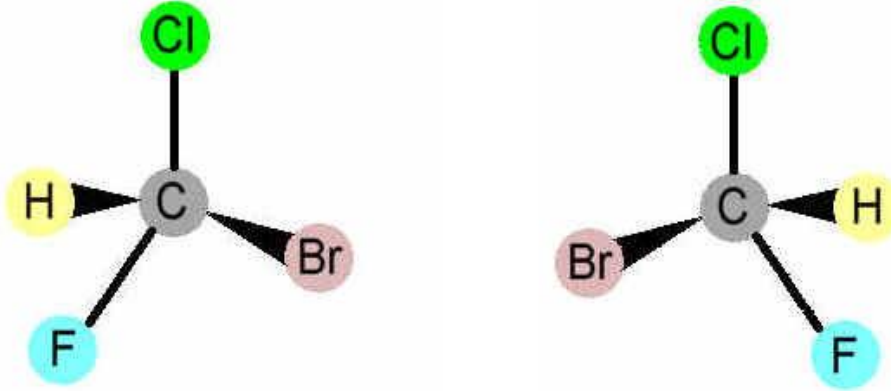
*Corynebacterium glutamicum* endüstride aromatik yapıların biyodönüşümünde sıklıkla kullanılan bir mikroorganizmadır. Bu mikroorganizmadan tespit edilmiş olan şikimat dehidrijenaz Niefind ve ark.<sup>18</sup> tarafından izole edilmiş ve klonlanmıştır.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. KİRALİTE

Bir kiral molekül ayna görüntüsü ile aynı olmayan molekül olarak tanımlanır. Kiral molekül ve onun ayna görüntüsü enantiyomerlerdir ve kiral molekül ile ayna görüntüsü arasındaki ilişki enantiyomerik ilişki olarak ifade edilir. Kiral sözcüğü Yunanca'da el anlamına gelen cheiros sözcüğünden gelmiştir. Ayna görüntüsü ile üst üste çakışan nesnelere ise akiral nesnelere denir<sup>19</sup>.

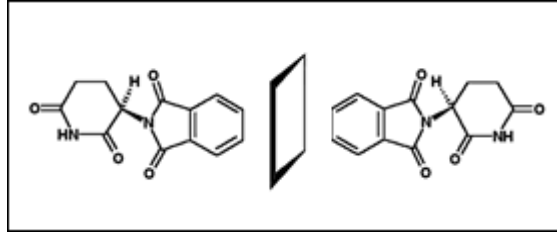
Moleküllerin kirallığı nispeten basit moleküller üzerinde gösterilebilir, Örneğin: bromokloroflorometan molekülündeki karbon atomuna dört farklı grup bağlanmıştır. Bu molekülün ayna görüntüleri birbirleriyle çakışmaz. (Şekil 2.1) Merkezdeki karbon atomu stereomerkez olarak kabul edilir. Birbirinin ayna görüntüsü olan bu yapılardan biri polarize ışığın düzlemini sağa öbürü sola çeviren iki optik izomerdir yani enantiyomerlerdir. Kiral karbon atomlarında gözlenen disimetri molekülün optikçe aktifliğini belirler.



Şekil 2. 1. Kiral bir karbon bileşiğinin iki farklı enantiomerik yapısı.

Kiral yapılar erime noktaları, kaynama noktaları hatta kiral ortamlarda aynı reaktiviteyi göstermeleri gibi fiziksel ve kimyasal açıdan farklılık göstermezler. Ancak akiral bir ortamda bu moleküller birbirlerinden tamamen

farklı özellikler sergilerler <sup>20</sup>. Bu kiral yapılar enzim ya da reseptör molekülleridir. İyi bilinen bir gözlemde bazı maddelerin farklı enantiyomerlerinin farklı koku ve tatta olmalarıdır. (Örnek thalidomide) <sup>21</sup>(Şekil 2.2)



Şekil 2.2. Talidomit'in kiral yapısı

Günümüzde kiral yapılar kimyasal ve farmasötik endüstride en önemli yapı taşları olarak kabul edilmektedir. Örneğin kimyasal katalizör, sıvı kristaller, tat ve koku kazandıran maddeler, tarım ilaçları ve tıbbi ilaçlar gibi çok çeşitli ürün aralığında kiral sentez yöntemleri kullanılmaktadır <sup>22</sup>. Bu nedenle enantiyomerik olarak saf madde sentezi özellikle biyoaktif moleküllerin (ilaçların) ya da ilaç hammadesi olabilecek maddelerin üretimi için oldukça önemlidir. Bugün üretilen ilaçların yarısından fazlası tek bir enantiyomer olarak üretilmektedir. <sup>2</sup> Biyoaktif moleküllerde daha aktif enantiyomere eutomer ve daha az aktif enantiyomere dono diastromer denir. Bazı durumlarda propanolol ( $\beta$ -bloker) da olduğu gibi diastromerlerin hiç aktivitesi yoktur <sup>23</sup>.

### 2.1.1. Kiral Ürünlerin Sentezleri

Kiral yapılar organokatalitik moleküllerin yardımıyla ayrıca biyokatalitik yöntemler ile sentezlenebilirler. Bu yöntemler aşağıdaki gibi sıralanabilir.

- Kimyasal metodlarla enantiyosaf maddelerden üretimi
- Asimetrik sentez
- Rasemik karışımların ayrıştırılması yöntemleri ile üretilmektedirler.

Enzimler bu sentez metodlarından asimetrik sentez ve rasemik karışımların ayrıştırılması yöntemlerinde etkinlikle kullanılabilirler<sup>24</sup>. Biyokatalizörlerin kullanıldığı yöntemler biyotransformasyon olarak da bilinirler.

## 2.2. BİYOTRANSFORMASYON

Enzimler veya canlı organizmaların katalizör olarak kullanılmasıyla meydana gelen kimyasal tepkimelerdir. Bu tip reaksiyonlar ilaç, gıda, koku kimya endüstrisi enerji üretimi atık suların temizlenmesi ve geri kazanılması, toksik atıkların degradasyonu gibi alanlarda uygulanmaktadır. Özellikle ilaç endüstrisinde ilaç hammaddelerinin keşfi için öncü bileşiklerin türevlerinin elde edilmesinde kullanılır<sup>6</sup>. Biyotransformasyon prosesleri insanlık tarafından kullanımı antik dönemlere dayanmaktadır. Örneğin şarabın mayalanma ile üretimi Sümerler'den beri bilinen bir yöntemdir.

### 2.2.1. Biyotransformasyonun Özellikleri

#### 2.2.1.1. Tepkime seçiciliği

Biyotransformasyon diğer bir deyişle biyokatalitik sentez kimyasal sentez yöntemleri (homojen ya da heterojen) ile karşılaştırıldığında kendine özgü özellikleri ile göze çarpar. Bu özelliklerin başında seçicilik gelir<sup>25</sup>.

Biyotransformasyon tepkimeleri yan tepkimelerin oluşumunun nadiren gözlemlendiği yöntemlerdir. Bununla beraber enzimatik kataliz ile gerçekleşen bu tepkimeler oldukça seçicidirler. Enzimler;

- Moleküldeki belirli bir bölgenin katalizlenmesini sağlayan kimyasal seçiciliği Enantiyomerler arasında ayırım yapılabilmesini sağlayan stereoseçiciliği, gösterirler.
- Enzim aktif merkezi asimetrik bir yapıdadır ve bu üç boyutlu yapı asimetrik yapı belirli amino asitlerin fonksiyonel gruplarının belirtilen seçicilikleri

göstermeleini sağlayacak şekilde mükemmel bir oryantasyonda organize olmuştur. Bu sayede benzer reaktif gruplar arasındaki fonksiyonel grup seçimini kolaylaştırırlar. Örneğin alifatik ketonların indirgenmesinde kimyasal kataliz ile ancak ardışık karbonil gruplarının birbirinden çok farklı olması durumunda yüksek enantiyometik fazlalık elde edilebilirken enzimatik tepkimeler ile etil propi keton gibi moleküller için bile optikçe saf ürün oluşumu mümkündür<sup>25</sup>. Ayrıca biyokatalitik tepkimelerle istenilen pozisyonda seçimli olarak fonksiyonel grup katılabilir. Fakat kimyasal yöntemlerle bu pek mümkün değildir.

#### 2.2.1.2. İlimli tepkime koşulları

Kimyasal olarak gerçekleştirilen reaksiyonlar birkaç adımda oluşur ve bu esnada çevre için zararlı yan tepkimeler meydana gelir. Enzim ve substratların ara tepkimeleriyle aktivasyon enerjisi oldukça düşürülür. Bu sayede biyotransformasyon 40°C sıcaklıkta, nötrale yakın bir pH ve normal basınç altında gerçekleşebilir. Bu nedenle biyokatalitik tepkimeler genellikle yumuşak tepkime koşullarında gerçekleşen güvenli tepkime ortamlarıdır. Örneğin glukoz ve etanol patlayıcı hidrojen gazı yerine hidrojen kaynağı olarak kullanılabilir<sup>25</sup>.

#### 2.2.1.3. Biyotransformasyon Türleri

Biyotransformasyon reaksiyonları tüm hücre ve izole enzim sistemleri olmak üzere iki yöntem kullanılarak gerçekleştirilebilir. Bitkilerdeki, hayvanlardaki ve mikroorganizmalardaki tepkimeler biyolojik sistemler enzimlerle katalizlenirler. Buna göre mikroorganizmaların ürettiği bileşiklerin metabolizması, in vitro enzimatik reaksiyonlar, bitki ve hayvan hücrelerinde ki yollar ve ilaç metabolizması biyotransformasyon olarak adlandırılabilir<sup>27</sup>.

Biyotransformasyon reaksiyonları büyüyen hücreler, önceden büyütülmüş hücreler, tutuklanmış hücreler ya da saf enzimlerle gerçekleştirilebilirler<sup>27</sup>.

i) *Büyüyen Hücrelerle Biyotransformasyon:* Biyotransformasyon mikrobiyal kültürler, bitki veya hayvan hücrelerinin büyüme ortamlarında gerçekleştirilebilirler. Bu yöntemde hücre kültürüne ve gerçekleşmesi beklenen biyokatalitik tepkime koşullarına uygun büyüme ortamının seçilmesi en önemli aşamadır. Ayrıca hücrelerin üremesi sırasında tepkime ortamına eklenecek substrat için en uygun zamanı belirlenmesi, üreme koşullarının (sıcaklık, incubator rotasyon hızı, oksijen ihtiyacı vb.) optimize edilmesi de hem verim hemde oluşacak ürünün optik saflık derecesini etkileyebilmektedir <sup>28</sup>.

ii) *Önceden Büyütülmüş Hücreler ile Biyotransformasyon:* Mikroorganizma optimum koşullar altında çoğaltıldıktan sonra santrifüj, biyokütle veya filtrasyon gibi yöntemlerle ayrılır. Ayrılan hücreler substrat içeren optimum pH taki destek çözeltisi veya su ile süspansiyon hale getirilir <sup>28</sup>.

iii) *Tutuklanmış Hücreler ile Biyotransformasyon:* Serbest hücreler ile gerçekleştirilen biyotransformasyonla kıyaslandığında tutuklanmış hücreler ile gerçekleştirilen biyotransformasyon daha kararlı işletme olanağına sahiptir. Tutuklanmış hücreler tepkime ortamından kolaylıkla uzaklaştırılıp tekrar kullanılabilirler. Ortamda tutulabiliyorsa biyotransformasyon sürekli olarak gerçekleştirilebilir. Ürün oluşum hızı yüksek, inhibisyon etkisi minimumdur. Böylelikle biyokatalizörün kararlılığı ve maksimum etkinliği korunur. Bu yöntemin ek maliyet getirmesi ve difüzyon kısıtlamaları dezavantajdır <sup>28</sup>.

iv) *Çok fazlı sistemler ile biyotransformasyon:* Sudaki çözünürlüğü düşük substratların yüksek derişimlerinde çalışılır, tepkime dengesi ürün ve substratın fazlar arasındaki dağılımıyla değiştirilebilir, su aktivitesine bağlı olarak tepkime dengesi değişir, substrat ve ürün inhibisyonu azaltılır, biyokatalizör veya ürünü ortamdaki uzaklaştırmak kolaydır, mikroorganizma bulaşma riski düşük, biyokatalizörler daha kararlı, tepkime hızı yüksektir <sup>28</sup>.

v) *Farklı mikroorganizmalarla katalizlenen ardışık biyotransformasyon adımının birleştirilmesi:* İki ardışık basamak gerektiren biyotransformasyon

farklı mikroorganizmalar tarafından katalizlenebilir. Bazı ardışık biyotepkimeler yek bir biyoreaktörde mikroorganizma karışımı kullanımı ile gerçekleştirilebilir<sup>28</sup>.

*vi) İmmobilize hücreler ile biyotransformasyon:* Mikroorganizmalar ürün ve substratın oluşumuna izin veren bir polimer matrikste (poliakrilamid, kappa-karragenan, alginat, selüloz, nişasta vb.) tutuklanır. İmmobilize hücreler istenildiği anda ortamdan uzaklaştırılabilir, yeniden kullanılabilir ve kesiksiz proseslere uygundur<sup>28</sup>.

*vii) Serbest ve İmmobilize Enzimlerle Biyotransformasyon:* İmmobilize hücrelerin biyotransformasyonda kullanılması daha ekonomik olmasına rağmen çok basit yapıları bir hücre bile binlerce enzim içerdiğinden istenmeyen yan reaksiyonların oluşması ve ortamın bu reaksiyonun ürünleri ile kirletilmesi söz konusudur. Yalnız biyotransformasyonu katalizleyen enzimin kullanılması durumunda bu sakınca ortadan kalkar. Enzimler pahalı maddeler olduğundan serbest enzim yerine çeşitli yöntemlerle hazırlanan immobilize formların kullanılması büyük bir ekonomik avantaj sağlar<sup>28</sup>.

### 2.3. ENZİMLER VE ENZİMATİK TEPKİME TÜRLERİ

Enzimlerin katalizör olarak kullanılmalarının çeşitli avantajları vardır<sup>30</sup>. Enzimlerin bu önemli özellikleri ve sağladıkları avantajlar Aşağıdaki gibi sıralanabilir.

İlımlı tepkime koşullarında çalışırlar. Genellikle pH 5-8 ve 20-40 °C de etkilidirler.

- Yan ürün oluşturmazlar. Verim %100'e yakındır. Bozunma, izomerizasyon, rasemizasyon ve yeniden düzenlenme tepkimeleri kimyasal olarak gerçekleşmez.
- Spesifiktirler. Enzimler sadece bir substrata veya aynı fonksiyonel grubu olan substrat serisine karşı etkilidirler.

Enzim molekülü ne kadar büyük olursa olsun substrat bunun sadece aktif merkezine bağlanır ve biyokimyasal tepkime bu aktif merkezde gerçekleşir. Aktif merkez ile substrat arasında indüklenmiş uyum olarak tanımladığımız bir etkileşim vardır. Bu özellik enzimin seçiciliği dahil bir çok katalitik özelliğini etkileyen bir fenomendir.

Enzimler kısmen ya da tek bir protein halinde izole edilebilir, saflaştırılabilirler. Bu açıdan enzimatik kataliz tepkimelerinde bazı dezavantajlar da söz konusudur. Bir enzim doğada sadece belirli bir enantiyomerik formda bulunur, farklı bir enantiyomerik yapıda maddenin sentezi için aynı tepkimeyi katalizleyen yeni bir enzimin araştırılması gerekmektedir. Buna ek olarak her enzim belirli operasyon koşullarında çalışır ve bu koşullar nispeten sınırlıdır. Organik çözücüler içerisinde enzimatik tepkimeleri gerçekleştirmek oldukça güçtür. Doğal koşulları gereği su ortamında çalışırlar. Ayrıca enzimler verimini etkileyecek şekilde ortamda oluşan ürün ya da substratın kendisi tarafından inhibisyona maruz kalabilirler <sup>6</sup>.

### 2.3.1. Enzimlerin Sınıflandırılması

Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim Komisyonu enzimleri, katalizledikleri ya da etki ettikleri genel reaksiyon tipinin sonuna –az eki getirerek 6 sınıfta toplamış, her sınıfı alt sınıflara bunları da daha alt sınıflara ayırmıştır <sup>6</sup>.

- Oksidoredüktazlar
- Transferazlar
- Hidrolazlar
- Liyazlar
- İzomerazlar
- Ligazlar



#### 2.3.1.1. Oksidoredüktazlar

Biyolojik oksido-redüksiyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. NADH, NADPH, FADH<sub>2</sub> ve FMNH<sub>2</sub> koenzimlerini bulundurlar. C-H, C-C ve C=C bağlarının kırılması ya da hidrojen atomu eklenmesi bu enzim grubunun katalizlediği temel tepkime türleridir<sup>6</sup>. Dehidrogenazlar ve oksijenazlar bu enzim grubunda asimetrik sentez tepkimelerinde sıklıkla kullanılırlar. Kiral alkollerin sentezinde dehidrogenaz enzimlerinin, örneğin alkol dehidrogenazlar ve laktat dehidrogenazlar gibi geniş bir kullanım alanı vardır<sup>6</sup>.

#### 2.3.1.2. Transferazlar

Aldehit, keton, açıl, azot, fosfat ve kükürt içeren grupların bir bileşikten diğerine aktarılmasını katalizleyen enzimlerdir. Transaminazlar bu gruba en iyi örnektir. Bunlar aminoasit metabolizmasında önemli rol oynarlar. Bu grubun en iyi bilinen enzimleri, glutamate-okzalaasetat transaminaz (AST) ve glutamate-piruvat transaminaz (ALT) dir<sup>23</sup>.

#### 2.3.1.3. Hidrolazlar

Ester, eter, peptid gibi yapıların hidroliz ürünlerinin oluşmasını sağlayan enzimlerdir<sup>6</sup>. Glikozidazlar, lipazlar, kolinesteraz, fosfatazlar, sulfatazlar, pepsin, tripsin, losin aminopeptidaz, karboksi peptidaz ve üreaz gibi enzimler bu gruba örnektir<sup>23</sup>.

#### 2.3.1.4. Liyazlar

Küçük moleküllerin C=C, C=N ve C=O bağlarına eklenmesini sağlarlar<sup>6</sup>. Örneğin karboksiliyazlardan dekarboksilazlar, piruvat dekarboksilaz, dehidratazlardan fumaraz gibi<sup>23</sup>.

### 2.3.1.5. İzomerazlar

Cis ve trans izomerazlar gibi epimerleşme, rasemleşme ve izomerizasyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir <sup>23</sup>.

### 2.3.1.6. Ligazlar

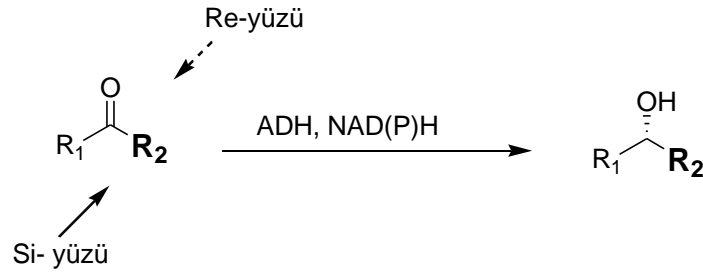
C-O, C-S, C-N ve C-C bağlarının oluşması ya da yıkılmasını katalizlerler<sup>6</sup>. Bağ oluşum tepkimelerinin katalizlenmesinde ATP'nin yıkılmasından oluşan enerjiden faydalanırlar. Örneğin asetati CoA ile birleştirilerek As-CoA'yi oluşturan asetil Co-A sentetaz ve yağ asitlerini CoA ile birleştirilerek yağ asidi açıl-CoA'yi meydana getiren açıl-CoA sentetaz verilebilir <sup>23</sup>.

## 2.4. BİYOTRANSFORMASYON ÇALIŞMALARINDA OKSİDOREDÜKTAZLAR

Tüm hücre sistemlerinde kullanılan birçok yükseltgenme ve indirgenme tepkimelerinin asıl katalizörleridir. EC. listelerine göre sınıflandırıldığında kofaktör olarak NAD, FAD, PQQ 176 farklı dehidrogenaz tanımlanır. En çok bilinen ve en iyi çalışan dehidrogenaz at karaciğer alkol dehidrogenazdır (HLAHD). Asetaldehitten bisiklik ketonlara kadar geniş bir substrat aralığına sahiptir ve NADH bağımlıdır. Yükseltgenme tepkimeleri dehidrogeazların indirgeme tepkimelerine göre daha dar bir kullanım alanına sahiptir. Çoğunlukla kiral alkolle kinetik ayrışma – enantiyomerlerden birinin seçimli olarak oksitlenmesi ve ortamın diğer enantiyomer bakımından zengin hale gelmesi- ve de dinamik kinetik ayrışma tepkimlerinde kullanılır <sup>30</sup>.

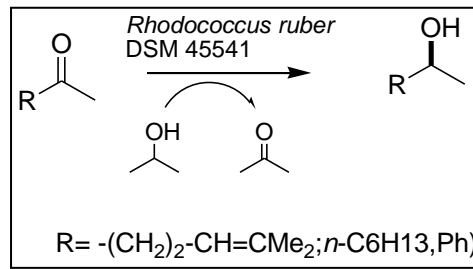
Dehidrogenaz enzimlerinin biyotransformasyon çalışmalarında en geniş kullanım alanı indirgeme tepkimeleridir. Bu enzimler EC.1.1.1 grubu altında toplanan dehidrogenazlar ve redüktazlardır <sup>31</sup>. Bu tepkimeler ile kiral alkollerin, hidroksi asitlerin ve aminoasitlerin üretilmesi mümkündür <sup>31</sup>. Alkol dehidrogenaz

(ADH) enzimini ve onun katalizlediği tepkimeleri örnek alırsak, 2 elektron indirgenen nikotinamid alıcı bir moleküle bir keton ya da keto-amid aktarılır. Bu akseptör reaksiyon çoğunlukla oldukça seçici gerçekleşen bir reaksiyondur. Hidratasyonu karbonil grubunun re- ya da si- yüzüne aktararak (*R*)- ya da (*S*)- alkol ürününü verir. (Şekil 5.3) Bu kurala uygunluk (Prelog kuralı) bir çok ADH tepkimesi için geçerlidir<sup>32</sup>.



**Şekil 2.3.** Prelog kuralına göre  $R_1$  ve  $R_2$  sübstüentlerinin büyüklüklerine bağlı olarak ( $R_1 > R_2$ ) gerçekleşen ADH katalizörlüğündeki indirgenme tepkimesi.

Literatürde dehidrogenaz katalizörlüğünde gerçekleşen karbonil grubu indirgeme dönüşümlerinin önemli bir kısmı tüm-hücre dönüşümleri ile gerçekleştirilen biyotransformasyonlardır. Bunlar genellikle bakteri türleri (Ör. *Rhodococcus spp.*) (Şekil 5.4) ve maya (*Saccharomyces*) hücreleri ile gerçekleşen dönüşüm türleridir.



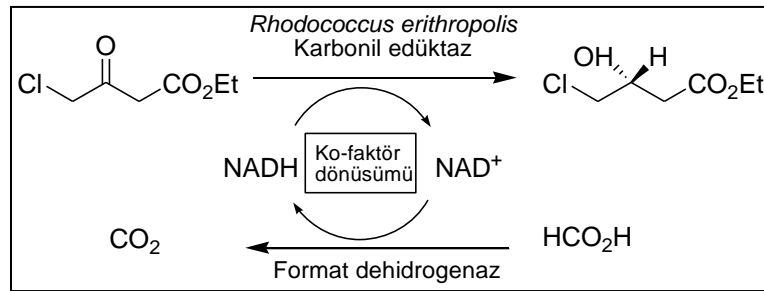
**Şekil 2.4.** *Rhodococcus ruber* ile gerçekleştirilen optikçe aktif alkol üretimi<sup>33</sup>.

Tüm hücre otomatik olarak metabolik yol izleyebildiğinden dolayı kofaktör rejenerasyonu için kofaktör döngüsüne ihtiyaç duymaz. Ancak tüm hücre dönüşümlerinin bazı dezavantajları vardır<sup>33</sup>.

- Mikrobiyal dönüşümlerin verimliliği genellikle düşük olur. Çünkü doğal olmayan substratlar çoğunlukla yaşayan organizmaya toksik etki yaparlar ve düşük konsantrasyonlarda tolere edilebilirler (hacim başına ~%0.1-0.3).
- Eğer ürün hücre içinde depolanıyor ve ortama salgılanamıyorsa verim düşük olur ve ürün geri kazanımı zordur <sup>26</sup>.
- Ayrıca rasemik substrat kullanıldığı zaman hücre içine ve hücre dışına kiral taşıma tepkimenin spesifikliğini etkiler.

Mikroorganizmaların farklı türleri farklı özelliklere sahiptir. Bu yüzden literatürle sonuçları karşılaştırabilmemiz için tam olarak aynı kültürü kullanmamız gerekir.

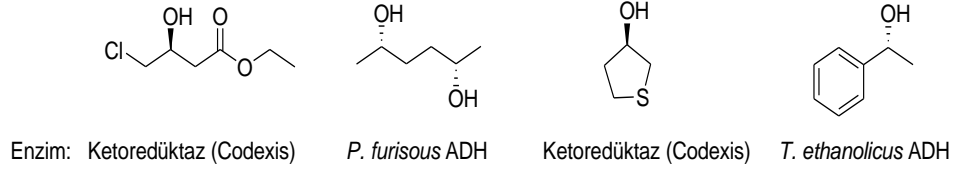
Tüm hücre dönüşümlerine ek olarak gittikçe artan sayıda dehidrogenaz enzimi izole edilmiş ve biyotransformasyon çalışmalarında değerlendirilmiştir <sup>32</sup>. Burada etkili bir ko-faktör dönüşüm sisteminin kullanılması önemlidir. İzole enzimler kofaktör döngüsü gerektirir. (Şekil 5.5) Bunun yerine enzim içeren tüm hücre kullanılabilir.



Şekil 5.5. *Rhodococcus ruber*'den izole edilmiş karbonil redüktaz enzimi katalizörlüğünde gerçekleşen biyo-indirgeme tepkimesi <sup>34</sup>.

Enzimatik kataliz tepkimeleri günümüzde rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesine dayalı olarak yeni bir çok yöntemin kullanılmasına olanak sağlayacak şekilde gelişmiştir. Yeni katalizörlerin değişik kaynaklarda taranması ve protein

mühendisliği ile yeni enzimlerin ve tepkime türlerinin geliştirilmesi mümkün olmuştur. Bu yöntemler ile geliştirilen dehidrogenaz ve redüktaz enzimleri ile Şekil 5.6'da örnekleri verilen önemli biyodönüşüm ürünleri sentezlenmiş ve patentlendirilmiştir<sup>35</sup>.



**Şekil 5.6.** Protein mühendisliği ürünü enzimler ile sentezlenmiş optikçe aktif önemli kiral yapılar<sup>36, 37, 38, 39</sup>.

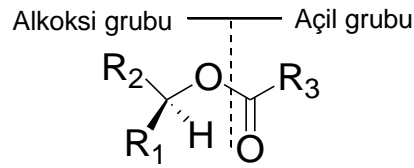
## 2.5. BİYOTRANSFORMASYON ÇALIŞMALARINDA LİPAZLAR VE ESTERAZLAR

Lipazlar ve esterazlar EC. 3.1.1 grubunda bulunan hidrolitik enzimlerdir. Esterazlar ester, amid ve glikozid bağlarını koparan enzimlerdir. Bu enzimlerin doğal fonksiyonları triaçilgliserollerin hidrolizi ve esterleşme tepkimeleridir<sup>29</sup>.

Lipaz ve esterazlar hayvansal, bitkisel, doğal veya genetik olarak iyileştirilmiş mikroorganizmalardan elde edilebilir. Bu enzimler tarafından katalizlenmiş reaksiyonlar kimyasal reaksiyonlara oranla daha çevre dostu olarak tanımlanırlar. Düşük aktivasyon enerjileri sebebiyle katalizledikleri reaksiyonlar daha düşük sıcaklık ve nötral pH gerektirir. Enerji gereksinimleri düşük ürün ve substrata karşı aktiviteleri çok yüksektir. Bu aktivite özellikle de substrat yağ-su ara yüzeyinde en yüksek seviyeye çıkmaktadır. Bu kavram ara yüzey aktivasyonu olarak tanımlanır<sup>40</sup>.

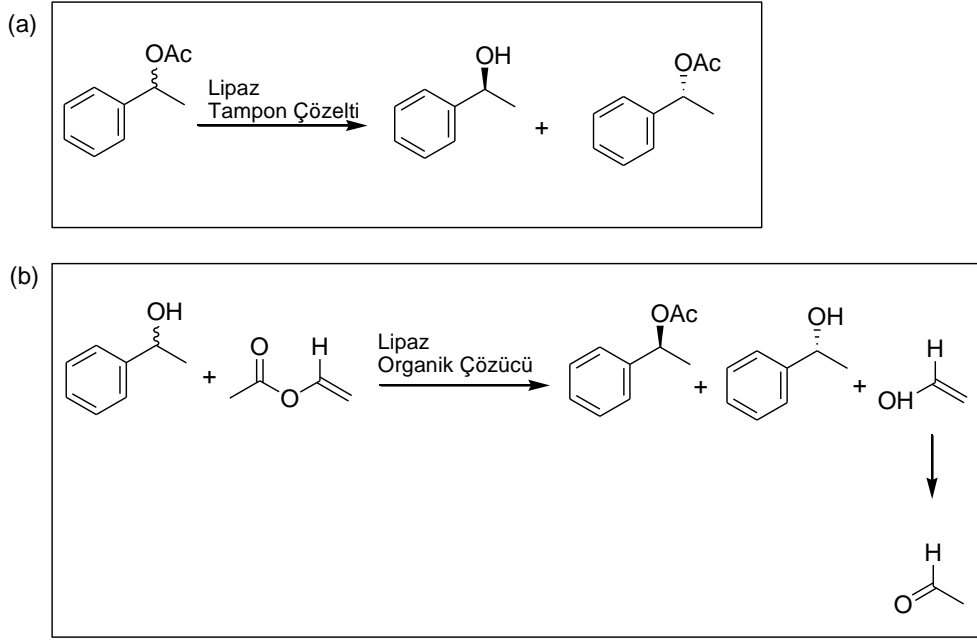
Sentetik organik kimyada lipaz ve esteraz enzimleri hidroliz, esterleşme ve transesterleşme tepkimeleri için kullanılırlar<sup>41</sup>. Bunların arasında en yaygın biçimde karboksilik esterlerinin hidroliz tepkimelerinde kullandıklarını görürüz. Bu enzimler karboksil lipazlar ve esterazlar olarak bilinir (Şekil 5.7)<sup>42</sup>. Karboksilik esteraz ve

lipazlar her ikisinde aynı tepkime türünü katalizlese de, hidrolize ettikleri esterlerin yapıları farklıdır. Lipazlar daha çok dallanmamış basit yapılı alkonolik asitleri hidroliz ederler. Çünkü doğal substratları yağlardır. Bununla beraber esterazlar lipazlar kadar spesifik değildir ve büyük açıl gruplarını substrat olarak kullanırlar<sup>42</sup>. Bunun dışında esteraz ve lipaz enzimleri arasındaki önemli fark iki enzimin kinetik davranışlarıdır. Az çözünür esterler kullanıldığında substrat miktarı arttığında esteraz tepkimelerinde enzim aktivitesi artmakta iken lipazlarda substrat konsantrasyonu belirli bir kritik değere gelmeden aktivite artmaz<sup>32</sup>.



**Şekil 5.7.** Karboksilik esteraz ve lipaz enzimlerinin karboksilik esterler üzerindeki hidrolitik aktivitesi<sup>42</sup>.

Kinetik ayrışma tepkimeleri esteraz ve lipazların kiral hammadde sentezinde en sık tercih edildiği proseslerden biridir. Örneğin sekonder alkoller ve optikçe aktif karboksilik esterler rasemik karışımlar olarak kullanıldığında asetilleme ve hidroliz tepkimeleri sonucu enzimlerin yüksek seçiciliğinde kinetik ayrışma tepkimeleri olarak gerçekleşir (Şekil 5.8)<sup>32</sup>. Burada rasemik alkollerin asetillenmesi ve esterlerin kinetik ayrışması ile optikçe saf alkoller elde edilir. Bununla birlikte ayrışma tepkimesi sonucu oluşan optikçe saf kiral asetoksi grupları da oluşur.



**Şekil 5.9.** Lipaz katalizörlüğünde gerçekleşen kinetik ayrışma tepkimeleri (a) Ester hidrolizi ile kinetik ayrışma tepkimesi (b) Açılma (esterleşme) tepkimesi ile kinetik ayrışma tepkimesi <sup>32</sup>.

Kinetik ayrışma tepkimelerinde kullanılan domuz karaciğer esteraz enzimi (PLE, pig liver esterase) bilindiği kadarıyla bu tür tepkimeler için en güçlü ve en çok kullanılan enzimdir <sup>32</sup>. Bu enzim çok yüksek seçicilikte gerçekleştirdiği tepkimeler ile oldukça geniş bir substrat aralığına sahiptir.

Lipaz ve esterazların endüstride ilaç ve kimya endüstrisinde uygulama alanlarından kısaca bahsedecek olursak, yine öncelikli olarak kinetik ayrışma tepkimelerini örnek verebiliriz. Önemli bir örnek BASF (Almanya) firması tarafından geliştirilen (*R,S*)-1- fenil aminin lipaz katalizörlüğünde gerçekleştirdiği enantiyoseçici açılma tepkimesidir. Bu tepkimenin sonucunda oluşan (*R*)-amid ürünü, (*S*)-aminden kolaylıkla ayrılarak optikçe saf olarak elde edilmiştir <sup>32</sup>. Bunun dışında DSM firması hipertansiyon tedavisinde kullanılan Captopril ilacının etkin maddesinin üretimi için lipaz katalizörlüğünde gerçekleştirdiği kinetik ayrışma tepkimesi ile geliştirdiği yöntemi kullanmaktadır <sup>32</sup>.

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. MATERYALLER

Çalışmada kullanılan ticari enzimler Porcine Liver Esterase (EC 3.1.1.1), Diaphorase (EC 1.8.1.4), *Mucor pavanicus* Amanolipase M (E.C 3.1.1.3) Sigma-Aldrich'den temin edildi. Galaktikoldehidrogenaz (GatDH) enzim genini taşıyan plazmitini içeren *Escherichia coli* BL21 (Invitrogen) Almanya Saarbruecken Üniversitesi Dr. Gert Kohring'in laboratuvarından Şikimat/Kuimat dehidrogenaz (E.C. 1.1.1.24, E.C. 1.1.1.25) enzim genlerini (CglQDH CglAroE ve CglSDH-L) taşıyan plazmitleri ise Köln Üniversitesi'nden Dr. Niefind Karsten ve Dr. Jennifer Raaf'ın katkıları ile sağlandı. Enzimatik tepkimelerde kullanılan ko-faktör NADH Fluka, AppliChem, protein tayini için Bradford reaktantı ve Bovine Serum Albumini AppliChem, tepkimelerde kullanılan tampon çözeltilerinin hazırlanması için gereken kimyasallar (Tris bazı, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tuzları) Sigma-Aldrich, başlangıç maddesinin sentezinde kullanılmış olan reaktantlar ve çözücüler (Mn(OAc)<sub>3</sub>.2H<sub>2</sub>O, KMnO<sub>4</sub>, Benzen, CH<sub>3</sub>COOH, MeOH Merck' den temin edildi. Ürünlerin saflaştırılması ve analizi için gereken çözücüler Merck'ten temin edildi. HPLC analizlerinde Agilent 1100 Seisi HPLC cihazı kullanılmış. NMR spektrumları BRUKER DPX 400 MHz NMR cihazı ile kaydedilmiş ve tetrametil silan internal standart olarak kullanılmıştır. NMR için numuneler dötorokloroform (CDCl<sub>3</sub>) içerisinde çözülerek analiz edilmiştir.

Rekombinant *E. coli* hücrelerinden hedef enzimin (GatDH) üretilmesi için Sigma marka LB (Luria Broth) , ampisilin ve Fluka marka IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) kullanıldı. Ham özüt eldesi Soniprep Ultrasonik Sonikatör ve Millipore Spin Coloumn Konsantratör ile gerçekleştirildi.



## 3.2. METOD

### 3.2.1. Enzimatik İndirgenme Tepkimelerinde Kullanılacak Olan Substratların (4-metoksi-2-oksosiklohekz-3-enilasetat ve 6-hidroksi-3-metoksisiklohex-2-enon) Sentezi

Galaktitol dehidrogenaz, diaforaz ve şikimat dehidrogenaz ile katalizörlüğünde gerçekleştirilecek indirgenme tepkimeleri için iki substrat madde sentezlenmiştir. Bunlardan birisi asetoksienon yapısında (4-metoksi-2-oksosiklohex-3-enilasetat) diğeri ise bu maddenin lipaz enzimi ile deasetilasyonu ile elde edilen (6-hidroksi-3-metoksisiklohex-2-enon) alfa-hidroksiketon yapısındadır. İlk olarak cyclohexane-1,3-dione' dan metilasyon yöntemi ile 3-methoxycyclohex-2-enone **1** sentezi yapılmıştır. Daha sonra bu maddenin mangan-III asetat ile asetillenmesi sağlanmıştır. Oluşan 4-methoxy-2-oxocyclohex-3-enylacetate **2** lipaz ve esteraz enzimleri ile 6-hidroksi-3-metoksisiklohekz-2-enona **3** dönüşümleri gerçekleştirilmiştir. Bu maddede başlangıç maddesi olarak kullanılıp galaktitol dehidrogenaz, diaforaz ve şikimat dehidrogenaz ile enzimatik indirgenme tepkimelerinde kullanılmıştır.

#### 3.2.1.1. 3-Metoksisiklohekzan-2-enonun sentezi

4.500 gr 1,3-siklohekzandion 100 ml'lik balona alınıp 1-1.5 ml CH<sub>3</sub>COOH eklenerek çözünmesi için ısıtıcı manto içerisinde de bir süre karıştırılmıştır<sup>43</sup>. Daha sonra bu ortama 50 ml metanol eklenerek geri soğutma işlemi başlatılmıştır. Ürünün oluşumu TLC kontrolü ile (hexan:etilasetat 1:1) takip edilmiştir. Tepkimenin yaklaşık 12 saat süre sonunda tamamlanmasının ardından 1:1 hacim oranında etilasetat ile 2 kez ekstrakte edilmiştir. Doymuş NaHCO<sub>3</sub> çözeltisi ile pH 7-8` e ayarlanmıştır. Ürün kolon kromatografisi ile saflaştırılması için silika dolgulu kolon kullanılmıştır. Kolon (2:1) hexan:etilasetat de şartlanıp, ürün (1:1) hexan:etilasetat oranında fraksiyonlanarak toplanmıştır. Ürünün yapı tayini <sup>1</sup>H- NMR analizi ile yapılmıştır.

### 3.2.1.2. 4-Metoksi-2-Oksosikloheks-3-Enil Asetat Sentezi

Bu maddenin sentezi Demir ve ark. (2004) <sup>13</sup> de açıklanan metoda bağlı kalarak bazı modifikasyonlar ile gerçekleştirilmiştir. Başlangıç maddesi olarak bir önceki basamakta sentezlenen 3-metoksisikloheksan-2-enon kullanılmıştır. Organik çözücü olarak benzen kullanılmıştır. Reaksiyon ortamında suyun bulunmaması gerektiğinden benzen kurutulmuştur. Benzenin ısıtıldığı balona Na parçaları kesilip konulmuştur. Isıtıcı manto ile benzen ısıtılıp kaynatılmıştır. Buharlaştan benzen kondensör yardımıyla tekrar yoğunlaşıp ikinci balonda toplanmıştır. Bu işlem bir kaç defa tekrarlanmıştır. Bu işlem argon gazı altında yapılmıştır.

Potasyum permanganat ( $\text{KMnO}_4$ ) 10ml asetik asit ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) içerisinde çözünüp 90 mL benzen eklendikten sonra ısıtıcı karıştırıcıda geri soğutma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem başlatıldıktan bir süre sonra mangan(III)asetatın oluşumu nedeniyle mor renk dönüşümünün gerçekleşmesinin ardından karışım süzülerek kalıntı  $\text{KMnO}_4$  ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Karışım tekrar geri soğutma işlemine alındıktan sonra yavaş yavaş enon eklenmeye başlanmıştır. Toplam 1260 mg 1:4 enon: $\text{KMnO}_4$  mol oranında enon eklenmiştir. Çözünmeyen  $\text{KMnO}_4$ 'un ortamdaki filtrasyon yardımı ile ayrılması işlemi güçleştirdiğinden  $\text{KMnO}_4$  yerine  $\text{Mn}(\text{OAc})_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  de denenmiştir. Ancak  $\text{Mn}(\text{OAc})_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  içerisindeki sudan kısmen kurtulmak için 12-24 saat etüvde bekletilmiştir. Asetilleme reaksiyonu sırasında oluşan suyun ortamdaki uzaklaşması için Dean-Stark kapan kullanılmıştır. 250 ml'lik balona 3 g mangan (III) asetat ( $\text{Mn}(\text{OAc})_3$ ) 10ml asetik asitte ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) çözünüp ve 90 ml benzen eklenip reaksiyon başlatılmıştır. Reflux başladıktan 45 dakika sonra 1000 mg enone eklenip 2-3 gün geri soğutma altında tepkime sürdürülmüştür. TLC kontrolleri 1:1 (hexan:etilasetat) ile yapılmıştır. Ekstraksiyon için benzen uçurulup eter ile elüe edilip etilasetat ile ekstrakte edilmiştir. Doymuş sulu  $\text{NaHCO}_3$  çözeltisi ile nötrale edilmiştir. Ayırım için kolon 0.9 EtOAc-1.1 hekzanda şartlanıp toplanmıştır. Ürün analizi  $^1\text{H-NMR}$  ile yapılmıştır.

### 3.2.1.3. 4-Metoksi-2-oksosikloheks-3-enil asetat'ın enzimatik hidrolizi.

Başlangıç maddesi 4-metoksi-2-oksosikloheks-3-enilasetat (20µl), 200µl DMSO`da çözüldükten sonra enzim (Sığır karaciğer esterazı (porcine liver esterase) 30 mg, Amano Lipaz 40 mg) içeren 10 ml 50mM fosfat tamponunda (pH 7) eklenmiştir. Tepkime 30°C` ta 100 rpm rotasyon hızında de rasemik ürün eldesi için 50 saat, optikçe zenginleştirilmiş ürün oluşumu için 22 saat inkübe edilmiştir . Ürün oluşumu kontrolü 1:1 EtOAc:hexan hareketli fazda TLC ile takip edilmiştir. Ürün analizi H<sup>1</sup>- NMR ile enantiyomerik fazlalık (ee) değerinin tespiti için HPLC ile analiz edilmiştir (Chiralpak AD, 90:10 Hekzan:İzopropanol, 0,8 ml/dk.)

### 3.2.2. Galaktitol Dehidrogenaz ve Şikimat Dehidrogenaz Enzim Genlerini Taşıyan Rekombinant *E. coli* Hücrelerinin Büyütülmesi ve Enzim Üretimi

Galaktitol dehidrogenaz enziminin üretimi için, *E. coli* BL21 (Invitrogen) hücreleri kullanılmıştır. Rekombinant hücreler (*E. coli* BL21 ve DH5a steril LB (Luria Broth) 100 mg/ml ampisilin içeren agar da üretildikten sonra 10 mL LB sıvı besi ortamına alınmıştır. 50 mL lik falkon tüplerde büyütüldükten sonra 100 µg/mL konsantrasyonda antibiyotik (Ampisilin) eklenmiştir. Bir gece büyütülen hücreler (150 rpm 37 °C) daha sonra 250 mL lik hacime aynı besi ortamına aktarılmış ve 600 nm de (absorbansı) OD=0,6-0,7 değerine ulaşıncaya kadar yaklaşık 3-4 saat üretilmiştir. Bu sürenin sonunda kültür ortamına son konsantrasyon 1 mM olacak şekilde IPTG (isopropil-β-D-tiogalaktopiranozit) eklenmiş ve enzim üretiminin başlaması sağlanmıştır. IPTG 0.2µm filtreden (Millipore) geçirilerek işlem öncesinde steril edilmiştir, 5-8 saat üretim gerçekleştirildikten sonra hücreler santrfüj işlemi (5000 rpm 4°C 10 min) ile çöktürülmüştür. Süpernatantın ayırılmasının ardından ve hücreler ekstraksiyon için 10 mM NaCl, 10 mM imidazol, 10 mL 2 mg lizozim enzimi içermekte olan (50 mM, pH:7,5) fosfat tamponuna alınmıştır. Sonikasyon işlemi ile (2 dk, 2sn aralıklarla) ham özüt hazırlanmıştır. Daha sonra santrfüjleme işlemi ile ham özüt elde edilmiştir. (20 000 rpm, 10 dakika 4°C). Uzun süreli saklama için 1-2 gün liyofilize edilmiştir ya da %20 gliserol -20 °C içerisinde saklanmıştır.

Liyofilize halde bulunan enzimin kullanıldığı deneylerde toz halindeki enzim pH 6,5, 50mM fosfat tamponuna alınmış, hücre duvarının parçalanmasına yardımcı lizozim enzimi eklenip 5 dk buz banyosunda inkübe edilmiştir. Toplam 2 dk, 2sn aralıklar ile sonikatör yardımı ile hücreler parçalanmış ve daha sonra bu karışım 9000 rpm`de 10 dk santrifüj edilerek çözelti fazında bulunan ham özüt ayrılmıştır. Ham özüt direk olarak enzimatik tepkimelerde kullanılmış ya da uzun süreli saklanması durumunda ise -20°C de %50 gliserol ortamına alınmıştır.

### 3.2.3. Bradford Protein Tayin Yöntemi

*Standart Hazırlama:* Protein tayini Bradford yöntemine göre tayin edilmiştir <sup>44</sup>. 1mg albumin 1000µl suda çözülmüştür. 500 µl`si alınıp 500 µl su ile 0.5mg/ml`ye seyreltilmiştir. 0,5`lik çözeltilerden 500 µl alınıp 500 µl su ile 0.25 mg/ml`ye seyreltilmiştir. Aynı işlemle 0,125`lik bir çözelti de elde edilmiştir. Bir tane de kör numune yani içerisinde protein bulunmayan hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltilerin her birinden 50µl alınıp 1.5 ml Bradford reaktantı bulunan spektrofotometre küvetlerine eklenmiştir.

Protein değeri ölçülecek olan numuneler ise 1:100 oranında seyreltilip 1,5 ml Bradford reaktantına eklenerek 595 nm de optik abzorbanları ölçülmüş ve protein değerleri saptanmıştır.

### 3.2.4. 4-Methoksi-2-Oksosikloheks-3-Enilasetat`ın Dehidrogenaz Enzimleri ile Biyokatalitik Tepkimeleri

Bölüm 3.2.6 da tarif edilen şekilde hazırlanan rekombinant enzimler (GatDH ve ShDH) 50mM fosfat tamponuna alınmıştır. GatDH ile gerçekleştirilen tepkimelerde tepkime ortamına 1 mM MgCL<sub>2</sub> eklenmiştir. Bu karışıma 10 mg 300 µL DMSO içerisinde 6 mg NADH eklenmiştir. 35°C`ta rotasyon hızında 2 gün bırakılmıştır. Diaforaz enzimi ile gerçekleştirilen tepkimeler 4 mg liyofilize enzim ile gerçekleştirilmiştir (Sigma, 6-8 U/mg). Tepkimeler enzim içermeyen ve substrat içermeyen tepkime karışımlarından oluşan deneyler ile kontrol grubu

kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 24 saat sonra reaksiyonlara başlangıçta eklenen miktar kadar daha enzim eklenmiştir.

Ürün oluşumları TLC ile takip edilmiştir (1:1 EtOAc:hexan). Tepkime ortamı etil asetat ile 2 kez, konsantre NaCl çözeltisi eklenere bir kez ekstrakte edilmiş ve magnezyum sülfat (MgSO<sub>4</sub>) ile kurutularak silika kolonda (hexan:etilasetat 1:1 ) ayrılmıştır.

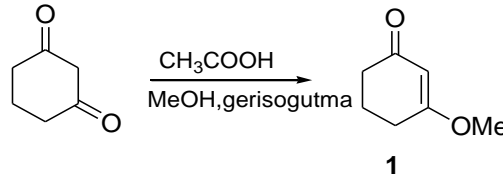
### 3.2.5. 6-Hidroksi-3-Metoksiklohex-2-Enon'un Dehidrogenaz Enzimleri ile Biyokatalitik Tepkimeleri

6-Hidroksi-3-Metoksiklohex-2-Enon 10 mg 300 µL DMSO içerisinde çözüldükten sonra içerisinde 6 mg NADH, dönüşüm için kullanılan enzim (GatDH (~28 U) ve ShDH (100 mg total protein) ) bulunan 50mM pH 6-8 fosfat tamponuna alınmıştır. 35°C'ta rotasyon hızında 2 gün bırakılmıştır. Diaforaz enzimi ile gerçekleştirilen tepkimeler 4 mg liyofilize enzim ile gerçekleştirilmiştir (Sigma, 6-8 U/mg). Tepkimeler asetoksi enon dönüşümlerinde olduğu gibi enzim içermeyen ve substrat içermeyen kontrol deneyleri ile beraber yürütülmüştür. Ürün oluşumları TLC ile takip edilmiştir (EtOAc:hexan 1:1). Tepkime ortamı etil asetat ile 2 kez, konsantre NaCl çözeltisi eklenere bir kez ekstrakte edilmiş ve magnezyum sülfat ile kurutularak silika kolonda (1:1 Etil asetat:Hekzan) temizlenmiştir. Oluşan ürün analizi <sup>1</sup>H- NMR ile yapılmıştır.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

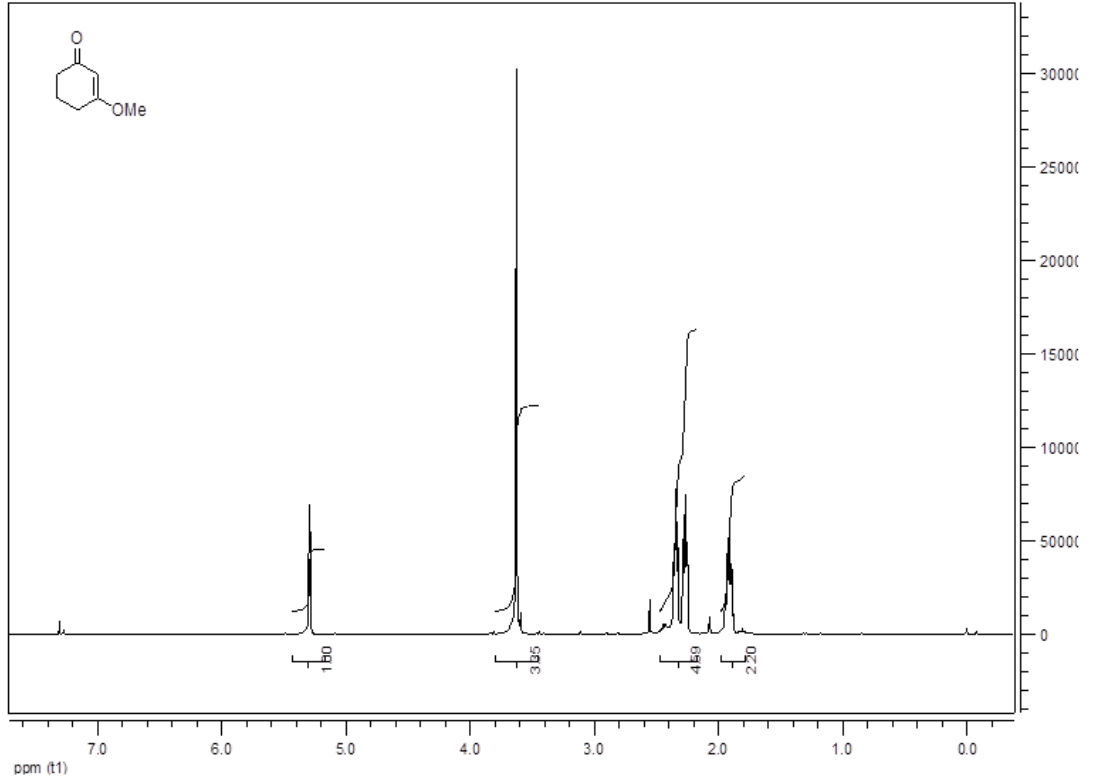
### 4.1. 3-METOKSİ-SİKLOHEKZ-2-ENON'UN SENTEZİ

Enzimatik indirgenme tepkimelerinde kullanılmak üzere bir halkasal asetoksi enon yapısı (4-metoksi-2-oksosiklohex-3-enilasetat **2**) sentezlenmesi amaçlanmıştır. Bu maddenin elde edilmesi için ilk basamak sikloheksan-1,3-dion'dan 3-metoksi-sikloheks-2-enon'un sentezidir. (Şekil 4.1)



Şekil 4.1. 3-Metoksi-Sikloheks-2-Enon'un Sentezi

Başlangıç maddesi **1** in sentezi sikloheksan-1,3-dion'dan başlanarak gerçekleştirilmiştir. 3-metoksisikloheks-2-enon'un **1** sentezi asidik ortamda gerçekleştirilmiştir. Sentez 1:50 oranında asetik asit ve metanol karışımı içerisinde gerçekleşen reaksiyon ürünün oluşumu TLC ile takip edilmiş ve ürünün RF değeri 0,802 (EtOAc:Hekzan 2:1) olarak tespit edilmiştir ve ilk 6 saat içerisinde ürün oluşumu gözlenmeye başlamıştır. Tepkime başlangıç maddesinin tamamı 16 saat sonra tükenmiştir. Oluşan ürünün saflaştırılmasının ardından NMR ile yapı tayini gerçekleştirilmiştir.(Şekil 4.2) Yapılan proton MNR analizine göre moleküldeki metoksi grubu 3.63 ppm, olefinik proton 5.29 ppm de gelmiş diğer -CH<sub>2</sub> pikleri sırasıyla 2.36-2.33, 2.29-2.25, 2.29-2.25 de gelmiştir. (<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 5.29 (s, 2H), 3.63 (s, 3H), 2.36-2.33 (m, 2H), 2.29-2.25 (m, 2H), 1.95-1.88 (m, 2H)).Buna dayanarak sonuçlar bize elde edilen maddenin beklenen enonon yapısındaki ürün **1** olduğunu göstermiştir.

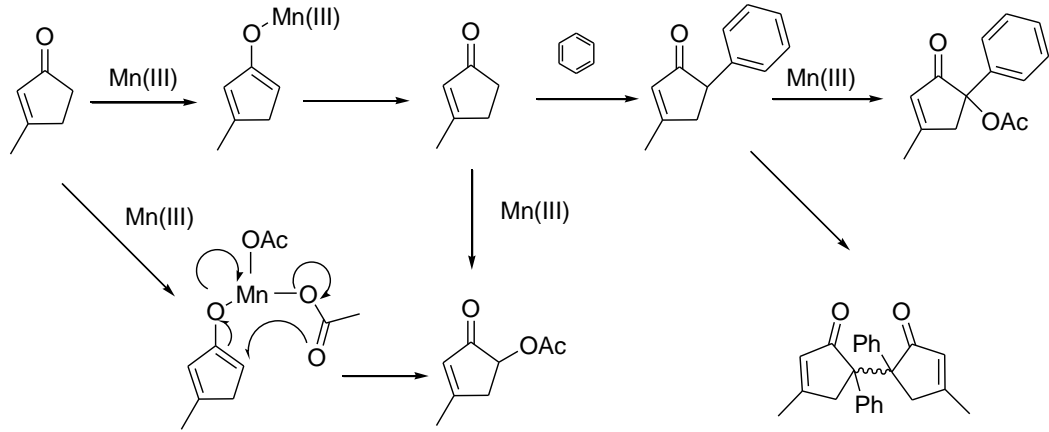


Şekil 4.2. 3-Metoksi-sikloheks-2-enon'un proton NMR spektrumu

#### 4.2. 4-METOKSİ-2-OKZASİKLOHEKZ-3-ENİL ASETAT'IN SENTEZİ

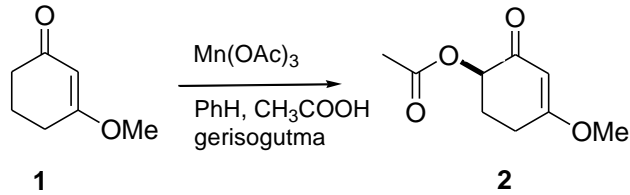
4-metoksi-2-okzasikloheks-3-enil asetat **2** iki farklı enzimatik reaksiyon (enzimatik indirgenme ve deasetilasyon tepkimeleri) için başlangıç maddesi olarak sentezlenmiştir.

$\alpha$ ,  $\beta$  (doymamış ketonların  $\alpha'$  asetoksilleme ürünleri önemli kiral ligantlardır<sup>44</sup>. Bu ürünlerin elde edilmelerine yönelik bir çok yöntem kullanılmıştır<sup>13</sup>. Bizim burada kullandığımız yöntem Watt ve ark. tarafından asetoksilleme tepkimelerinde yüksek verimde ürün elde edilmesinde kullanılmış ve bir çok araştırmacı tarafından geliştirilmiştir<sup>13</sup>. Benzenin gerisoğutma ile gerçekleştirilen bu tepkime geniş bir substrat aralığında denenmiştir<sup>11,12,13</sup>. Bu metodun diğer yöntemlere göre avantajı arillenmiş yan ürünün oluşmamasıdır. Tepkime mekanizması radikalik olarak ilerler<sup>13</sup>. (Şekil 4.3).



**Şekil 4.3.**  $\alpha, \beta$ , Doymamış Ketonların  $\alpha'$  Asetoksilleme Ürünlerinin Oluşum Mekanizması

Ürün **1** e asetik asit:benzen ortamında 3 ekvalent mangan asetat eklenmesi ile 3 enil pozisyonundan asetillenmesi sağlanmıştır (Şekil 4.4). 48-54 saat süren geri soğutma altında %40-60 dönüşüm oranı ile oksidasyon ürünü elde edilmiştir. Bu yöntemle ürün oluşumu enantioseçici olarak gerçekleşmemektedir <sup>13</sup>.

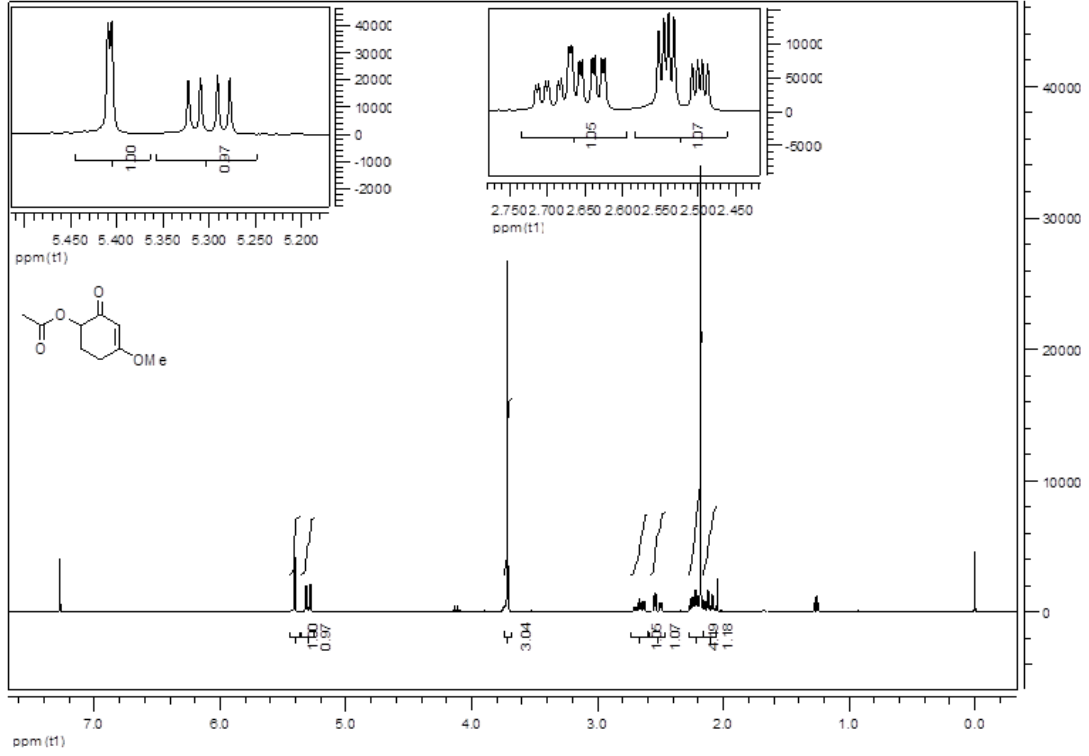


**Şekil 4.4.** 4-Metoksi-2-okzasiklohekz-3-enil asetat'ın sentezi

Ürün oluşumu ilk 20 saat sonunda TLC ile gözlenmiş (Rf: 0,320; 2:1 EtOAc:Hekzan) ve reaksiyon ortamına mangan asetat ilavesi yapılmıştır. Burada mangan asetatın iyice kurutulmuş olması tepkimenin verimini etkileyen önemli bir faktördür. Tepkime 54 saat sonunda değişim gözlenmemesi üzerine durdurulmuştur. Ürünün izolasyonu ve saflaştırılmasının ardından NMR ile analiz edilmiştir (Şekil 4.5). Ürün oluşumu çok kolay bir şekilde proton NMR spektrumunda asetil grubuna ait metil pikinin 2.18 ppm değerinde gelmesiyle ve bunun yanında alfa protonu da yaklaşık 5.30 ppm de dd olarak gözlenmesi



sonucu belirlenebilmiştir. ( $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  5.41 (d,  $J=1.5$  Hz, 1H), 5.30 (dd,  $J=5.3$  ve 12.6 Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 2.67 (dddd,  $J=1.6, 5.2, 12.0$  ve 17.4Hz, 1H), 2.52 (ddd,  $J=2.9, 5.3$  ve 17.8 Hz, 1H), 2.27-2.20 (m, 1H), 3.71 (s, 3H), 2.15-2.06 (m, 1H)).

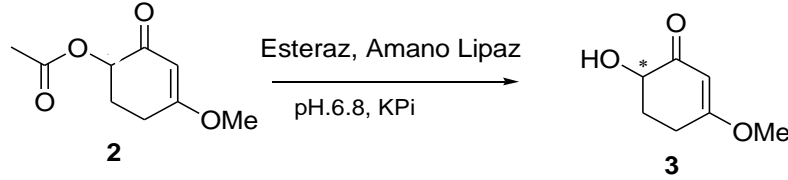


Şekil 4.5. 4-Metoksi-2-okzasikloheks-3-enil asetat'ın  $^1\text{H}$ NMR spektrumu

#### 4.3. 4-METOKSİ-2-OKZASİKLOHEKZ-3-ENİL ASETAT'IN LİPAZ VE ESTERAZ ENZİMLERİ KATALİZÖRLÜĞÜNDE ASİMETRİK HİDROLİZİ: 6-HİDROKSİ-3-METOKSİSİKLOHEKZ-2-ENON'UN SENTEZİ

Asetoksi enon yapısının deasetillenmesi ile oluşacak alfa hidroksi enon yapısı Domuz karaciğer estera (EC. 3.1.1.1) Porcine Liver Esteraz (PLE) ve Amanolipaz (EC. 3.1.1.3) enzimleri seçilmiştir çünkü bu enzimler daha önceki bölümlerde belirtildiği gibi hücre içerisinde de asetil grup transferlerini (örneğin amino asit sentezinde) gerçekleştirirler ve bu tepkimeler enantioselektif bir şekilde yürüyen tepkimelerdir <sup>6</sup>. Bu özelliklerinden dolayı biyotransformasyon

çalışmalarında asetil grubu transferlerinde özellikle deasetillasyon tepkimelerinde kullanılmaktadırlar <sup>34</sup>. Bu yolla farmasötik öneme sahip bazı değerli alkollerin enantiyospesifik olarak sentezi gerçekleştirilmektedir <sup>11,12,13</sup>.



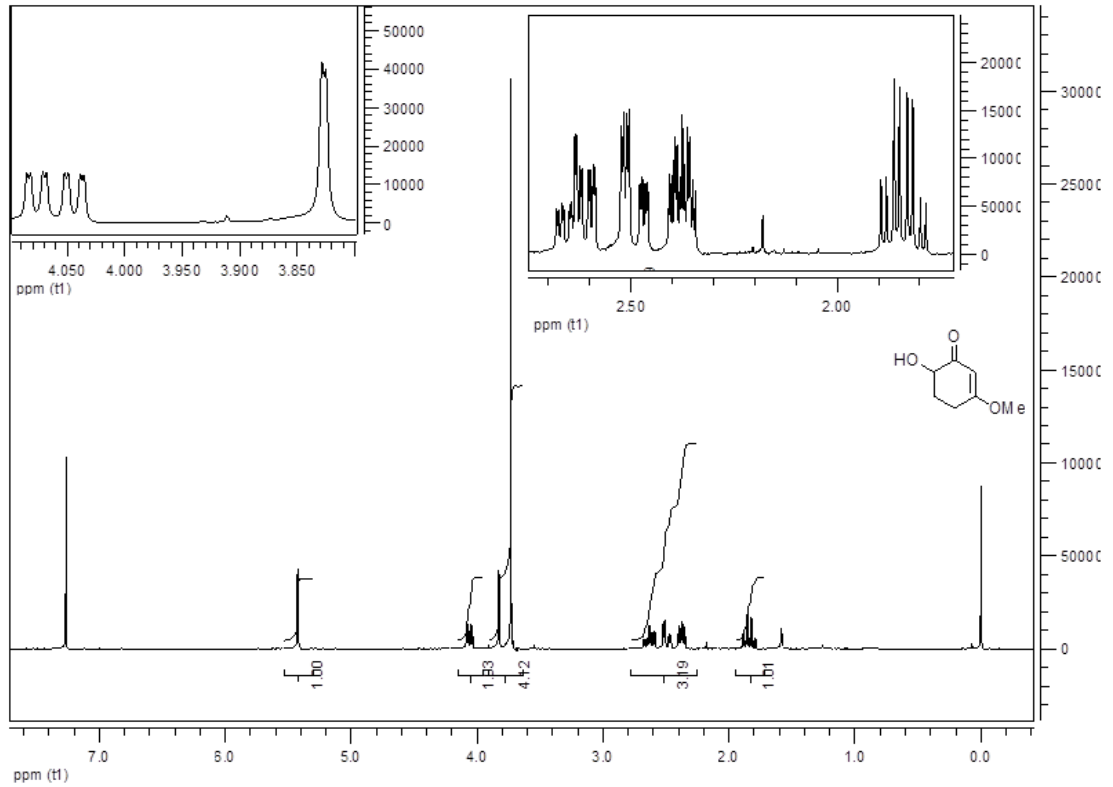
**Şekil 4.6.** 6-Hidroksi-3-metoksisikloheks-2-enon'un sentezi.

Bizim çalışmamızda asetoksi enon yapısındaki başlangıç maddesinin **2** asetil grubunun kopartılması ile  $\alpha$ -hidroksi enon yapısının elde edilmesi amaçlanmıştır.

Enzimatik tepkimelerde kullanılan başlangıç maddesinin miktarının sınırlı tutulması gerekliliği <sup>6</sup> oluşan ürün miktarının da az olmasına ve NMR analizlerinin netliğinin azalmasına sebep olmaktadır. Özellikle enantiyospesifik ürün oluşumunun en fazla % 50 olduğu kinetik ayrışma tepkimelerinde GC-MS ile de yapı tayini gerçekleştirilebilmektedir. Bu yöntem saflaştırma aşamasında madde kaybını da engellediği için düşük miktarlardaki maddeler de avantajlı bir analiz yöntemidir. Bizim sentezlediğimiz ürünün GC-MS analizi gerçekleştirilmiştir. (Ek 1) **3** nolu ürünün molekül ağırlığı 142.1 dir ve bu kütle analizinde görülmektedir buna ilaveten bir proton kopması sonucu oluşan molekülün de kütlesi ( $m/z=141.1$ ) izlenebilmektedir. Alkol içeren bileşiklerin kütle analizlerinde moleküler iyon ( $M^+$ ) piki eşliğinde  $M-1$  pikinin gözlemlenmesi ve su çıkışına ait ( $M-18$ ) piklerin bulunması oldukça belirgindir. Bileşik **3** ün  $M-18$  piki 124.1 de gözlemlenmiştir.

Esteraz tepkimesi ile gerçekleştirilen deasetilleme sonucu oluşması beklenen alfa hidroksiketon **3** numaralı madde de proton NMR'ı ile de analiz edilmiştir (Şekil 4.7). Bu maddenin asetil grubunun metil grubu spektrumda gözlenmemektedir ve alfa protonu beklenildiği gibi daha düşük ppm (4.06 ppm) değerinde pik vermiştir.

Pikin üçe yarılmaması gerekirken madde kiral olduğu için ikiye yarılmıştır. Bunların dışında hidroksi grubunun protonu 3.83 ppm de doublet olarak görülmesi de maddenin istenen ürün olan hidroksi enon yapısındaki **3** nolu madde olduğunu ıspatlamaktadır.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  5.42 (d,  $J=1.6$  Hz, 1H), 4.06 (ddd,  $J=1.2, 5.5$  ve  $13.1$  Hz, 1H), 3.83 (d,  $J=1.2$  Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 2.63 (dddd,  $J=1.7, 5.0, 12.6$  ve  $17.7$  Hz, 1H), 2.49 (ddd,  $J=2.2, 5.2$  ve  $17.9$  Hz, 1H), 2.37 (dtd,  $J=2.3, 5.2$  ve  $12.7$  Hz, 1H), 1.84 (dq,  $J=5.3$  ve  $12.7$  Hz, 1H).



**Şekil 4.7.** 6-Hidroksi-3-Metoksisikloheks-2-Enon'un NMR Spektrumu

Belirtildiği üzere enzimatik deasetilleme tepkimeleri enantiyospesifik ve enantiyoseçici olarak gerçekleşmektedir. Başlangıç maddesi asetoksi enon yapısı kiral bir yapıdır ve bu yapı enzim tarafından seçici olarak reaksiyona gireceklerdir ki bu enantiyomerlerin enzimatik tepkimede farklı hızlarla deasetilleneceği anlamına gelir. Bu tür tepkimelerin kinetik ayrışma tepkimeleri olarak adlandırıldığını giriş bölümünde belirtmiştik. Kinetik ayrışma tepkimelerinin özelliği gereği en yüksek enantiyo seçiciliğin gerçekleştiği zaman aralığını tespit etmek önemlidir. Başlangıç

maddesinin tümünün harcanmasının mümkün olacağı kadar uzun bir süre beklenmesi halinde oluşan ürün rasemik karışım olarak elde edilecektir. Bizim çalışmamızda literatür değerlerine göre tepkimenin 22-24 saatlik süreçlerde %98 ee değeri ile tam kinetik ayrışma gerçekleştiği bilimektedir <sup>11</sup>. Bu nedenle başlangıç aşamasında rasemik karışım oluşturmak için tepkimeler 48-50 saatlik sürelerin sonucunda durdurulmuş ve ürünün HPLC analizinde esteraz enzimi için rasemik karışım olduğu gözlenmiştir (EK 1) Belirtilen 22 saatlik süreçte ise % 80 lik bir enantiyomerik fazlalık tespit edilmiştir. (Ek 2) Amano lipaz enzimi ise literatür değerlerinde bir ayrışma göstermediği için daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere esteraz enzimi seçilmiştir.

Bizim çalışmamızda bu basamaktan sonra planlanan tepkime enzimatik indirgenme tepkimeleridir. Bu tepkimeler de başlangıç maddesinin kiral özellikte maddeler olması sebebi ile farklı enantiyomerler ile farklı hızlarda tepkime vermesi muhtemeldir. Hatta kinetik ayrışma tepkimelerinde bazı durumlarda enantiyomerlerden birisi enzim ile tepkimeye girmeyebilir bu enantiyomer üzerinden dönüşüm gerçekleşmeyebilir. Bu nedenle indirgenme reaksiyonlarında kullanılacak olan başlangıç maddesi  $\alpha$ -asetoksi enon ve  $\alpha$ -hidroksi enol (**2** ve **3**) için dehidrogenaz enzimlerinin herhangi bir enantiyomer üzerindeki olası tercihini göz önüne alarak ilk aşamada tepkimelerin rasemik karışımlar ile yürütülmesi düşünülmüştür. Bu aşamadan sonra dehidrogenaz enzimlerinin tepkimeyi tercih ettiği enantiyomer üzerinden yürüterek optikçe saf ürünün yüksek verimle sentezlenmesi için optimize edilmesine geçilmesi planlanmıştır. Bu nedenle lipaz ve esteraz katalizörlüğünde gerçekleştirilen enzimatik deasetilleme tepkimelerinin optimize edilmesine ek olarak bu tepkime  $K_2CO_3$  ve metanol ile rasemik olarak da sentezlenmiştir.

#### 4.4. GALAKTİTOL DEHİDROGENAZ VE ŞİKİMAT DEHİDROGENAZ ENZİMLERİNİN ÜRETİLMESİ VE ENZİM AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Enzimatik indirgenme tepkimeleri için öncelikle bu tepkimeleri katalizleyen ticari olmayan galaktitol dehidrogenaz ve şikimat dehidrogenaz enzimlerinin üretilmesi gerekmiştir.

Enzim üretim aşamasında enzimi taşıyan genin en iyi düzeyde ifade edildiği (expression) zaman aralığının bilinmesi ve enzimin bu süreç içerisinde izole edilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada galaktitol dehidrogenaz ve şikimat dehidrogenaz enzimlerini kodlayan D GatDH pET a ve CglSDH-L genlerini taşıyan *E. coli* suşları BL21 ve DH5 $\alpha$  enzim üretiminde kullanılmıştır. IPTG ile indüklenme işleminden sonra fermentasyon 5-8 saat sonra durdurulmuş hücreler santrifüjleme ile ayrılmıştır. Ham özüt eldesinden sonra enzim katalizli tepkimeler bu ham özüt ile gerçekleştirilmiştir. Ham özütteki enzim aktivitesi GatDH 1,2-hekzandion'un indirgenmesi üzerinden ölçülmüş ve ham özütteki spesifik aktivite 0,8-1 U/mg olarak hesaplanmıştır. Şikimat dehidrogenaz enzimi için enzimin doğal substratının bulunmaması nedeniyle aktivitesi hesaplanamamıştır. Ancak deneyler 100 mg total protein içeren ham özüt karışımı ile gerçekleştirilmiştir.

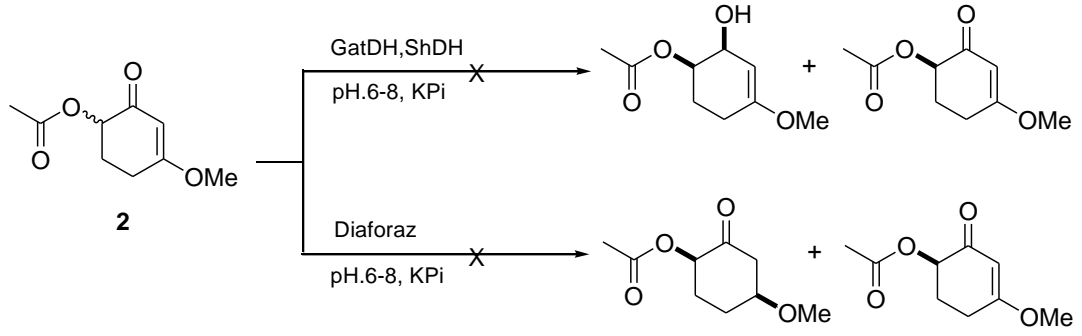
#### 4.5. 4-METOKSİ-2-OKZASİKLOHEKZ-3-ENİL ASETAT 2 VE 6-HİDROKSİ-3-METOKSİKLOHEX-2-ENON'UN 3 DEHİDROGENAZ ENZİMLERİ İLE BİYOTRANSFORMASYONU

Galaktitol dehidrogenaz, şikimat dehidrogenaz ve diaforaz enzimleri, asetoksi enon ve halkasal alfa hidroksi enon yapısında olan 4-metoksi-2-okzasiklohekz-3-enil asetat **2** ve 6-hidroksi-3-metoksiklohex-2-enon'un **3** biyokatalitik dönüşümlerinde kullanılmak üzere seçilen enzimleridir.

Biyodönüşüm tepkimeleri her enzim için ko-enzimin (NADH) yükseltgendiği indirgeme tepkimesine göre optimum tepkime koşullarında gerçekleştirilmiştir. Tepkimenin indirgeme yönünde gerçekleşmesi dehidrogenaz enzimleri için çoğunlukla ya da oksidasyon tepkimelerine göre her koşulda nispeten asidik pH

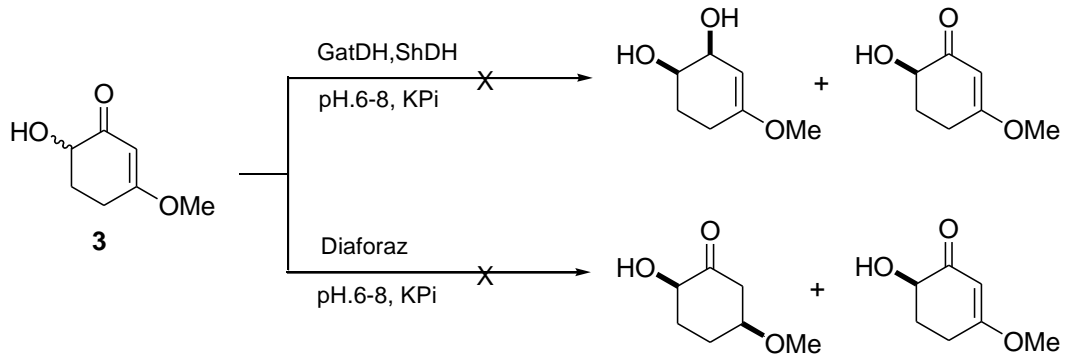
derecelerinde gerçekleşmektedir. Bu nedenle enzimatik indirgenme tepkimeleri için pH 6-8 aralığında kalan farklı pH derecelerinde test edilmiştir. Tepkimeler tamamen tampon ortamında yani su ortamında gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda indirgeme tepkimeleri için sentezlediğimiz substratlar suda çözünürlüklerinin zayıf olması nedeniyle tepkime ortamı içerisine DMSO (%1) eklenmiştir. GatDH ve diaforaz için enzim aktivitesi tespit edilebilmiş ve tepkime ortamına 20 U enzim eklenmiştir. Şikimat dehidrogenaz için aktivite belirlenmediğinden 100 mg toplam protein konsantrasyonundaki ham özüt ile tepkime gerçekleştirilmiştir.

İlk olarak asetoksienon yapısındaki substrat **2** indirgenme dönüşümlerinde kullanılmıştır. (Şekil 4.8). Yukarıda belirtilen her üç enzim de substrat **2**'nin indirgenmesi için kullanılmıştır. Tepkimelerin ilk 30 dakikadan itibaren belirli aralıklarla yapılan TLC kontrollerinde deneylerin sürdürüldüğü zaman boyunca tüm enzimatik dönüşümlerde daha polar olan bir ürünün oluştuğu gözlemlenmiştir. Ancak bu ürünün izole edilmesi ve ardından gerçekleştirilen NMR (Ek 3) analizleri sonucunda TLC de tespit edilen ürünün asetil grubunun hidrolizi sonucu oluşan  $\alpha$ - hidroksi keton yapısı olduğu tayin edilmiştir. Bu hidroliz ürününün suda belirtilen koşullarda (pH:7-9, 25-30 °C) sulu ortamda enzimatik bir dönüşüm sonucu oluşmadığı düşünülmüştür. Ancak her enzim için farklı oranda ve hızda gerçekleşmiş olan bu hidroliz ürünlerinin enantiyomerik fazlalıklarının saptanması için HPLC ile analiz edilmiştir. Sonuçlar ürünlerin GatDH ve ShDH ile yapılan deneylerde % 15-22 aralığında ee değeri verdiğini göstermiştir. Deneyler sadece tampon ortamında ve sadece NADH bulunan tampon ortamlarında kontrol gurubu ile de yürütülmüştür. Bu kontrol deneylerinde de bahsi geçen deasetilleme ürünü oluşmakla beraber sulu ortamda yok denecek kadar az NADH olan ortamda ise enzimatik tepkimelere göre çok daha yavaş ve düşük verimde gerçekleştiği gözlenmiştir.



**Şekil 4.8.** 4-Metoksi-2-okzasiklohekz-3-enil asetat'ın GatDH, ShDH ve diaforaz enzimleri ile vermesi beklenen tepkimeler.

Biyoindirgeme tepkimelerinde kullanılmak üzere sentezlenen diğer bir başlangıç maddesi 6-hidroksi-3-metoksiklohex-2-enon **3** bir önceki biyoindirgeme deneylerinde kullanılan enzimlerin tümü ile tepkimeye tabi tutulmuştur. Biyodönüşüm koşulları yine nispeten alkali ortamda ve 25-30 °C arlığında sulu ortamda yapılmıştır. Ancak gerçekleştirilen deneylerde hiç bir koşulda herhangi bir ürün oluşumu gözlenmemiştir.



**Şekil 4.9.** 6-Hidroksi-3-metoksiklohex-2-enon'un **3** GatDH, ShDH ve diaforaz enzimleri ile vermesi beklenen tepkimeler.

Biyoindirgeme deneylerimiz için karbonil grubunun yanı sıra bileşiğin yapısında yer alan çift bağı da indirgenme ürünlerinin değerli kiral bileşikler üretebilecek olması nedeniyle diaforaz enzimi de kullanılmıştır. Ancak her iki substrat için de diaforaz ya da diğer enzimlerle yapılan denemelerde NMR ve GC-MS analizlerinde böyle bir ürüne rastlanamamıştır.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma kiral yapıda halkasal asetoksi enon ve alfa hidroksi enon yapısındaki 3-metoksi-2-okzasikloheks-3-enil asetat **2** 4-metoksi-2-okzasikloheks-3-enil asetat **3**'ün dehidrogenaz enzimleri ile farmasötik öneme sahip ürünlerin oluşumu için biyokatalitik dönüşüm tepkimelerine tabi tutulması ve bu amaçla yönelik olarak bahsi geçen substratların kemoenzimatik sentezini kapsamaktadır.

Başlangıç maddelerinin kemoenzimatik sentezinde ilk basamak halkasal diketon dan başlanarak 3-metoksi-sikloheks-2-enon'un **1** sentezidir. Bunu takiben alfa asetilleme reaksiyonu ile 4-metoksi-2-okzasikloheks-3-enil asetat **2** sentezlenerek planlanan enzimatik sentez aşamasına geçilmiştir. Belirtilen tepkimelerin ürünlerinin oluşumu proton NMR analizi kullanılarak yapı tayini gerçekleştirilerek doğrulanmıştır. Sentezlenen ürün **2** dehidrogenaz tepkimeleri biyokatalitik indirgeme için kullanılmasının yanısıra lipaz ve esteraz enzimleri ile asetillenerek dehidrogenaz dönüşümleri için ikinci bir substrat elde edilmiştir. Bu substratın oluşumu da hem proton NMR'ı hemde GC-MS ile analizleri ile doğrulanmış ve kiral bir yapı olan bu maddenin HPLC yöntemi kullanılarak enantiyomerik fazlalığı hesaplanmıştır. GatDH, ShDH ve diaforaz enzimleri ile gerçekleştirilmesi planlanmış olan enzimatik tepkimelerin kiral bir yapıda olan başlangıç maddelerinin ilk denemelerde rasemik karışım olarak kullanılması ve başarılı sonuçların elde edilmesi ile de optikçe saf olan substratların sentezine geçilmesi gerekli bulunmuştur. Bu nedenle ilk olarak tepkime tüm ürün tamamlanana kadar beklenmiş daha sonraki denemeler için ise literatür bilgilerine dayanarak kinetik ayrışmanın en yüksek düzeyde olduğu belirtilen 20-24 saat aralıklarındaki örnekler analiz edilmiştir. Buna göre ürün **3** ün 22 saat içerisinde kinetik ayrışmasını tamamladığı ve 50 saat sonra elde edilen ürünün rasemik karışım olarak oluştuğu tespit edilmiştir.

Başlangıç maddeleri **2** ve **3**'ün sentezlerinin ardından GatDH, ShDH enzimleri biyokatalitik indirgenme tepkimelerinde kullanılmak üzere enzimleri kodlayan genlerin bulunduğu plazmitleri taşıyan rekombinant *E. coli* hücreleri



kullanılarak üretilmiş ve ham özüt olarak elde edildikten sonra biyotransformasyon tepkimeleri için hazırlanmıştır.

Asetoksi enon yapısındaki substrat **3** 'ün sulu ortamda DMSO'nun yardımcı çözücü olarak kullanıldığı tepkime koşullarında biyokatalitik indirgenme tepkimeleri beklenen indirgenme ürünlerini oluşturmamıştır. TLC de gözlemlenen ürünün NMR analizleri karbonil grubunun indirgenme ürünü oluşmadığı ve asetil grubunun koptuğunu göstermiştir. Bunun sebebinin asetil grubunun enzimatik bir tepkimenin sonucu olarak değil ancak sulu ortamda kendiliğinden gerçekleşen bir deasetillenme sonucu oluştuğu düşünülebilir. Bunun dışında kullanılan biyokatalizör saf enzim olarak değil ham özüt olarak eklenmiştir ki bu da düşük oranda da olsa bir çok farklı enzimin tepkime ortamında bulunduğu ve deasetillenme tepkimesinden belirli oranda sorumlu olabileceği ihtimalini ortaya koyar. Deasetilleme sonucu oluştuğu bulunan maddenin HPLC analizi de (ee: %16) her iki koşulun da deasetillemeden sorumlu olabileceğini göstermektedir. Beklenen ürünün oluşmaması ise substratın deasetillenmesi sonucu değil ancak enzimin bu maddeyi belirlenen koşullarda ürüne dönüştürmediği ile ilişkilendirilmelidir. Çünkü deasetillenme sonucu oluşan alfa hidroksi keton da herhangi bir indirgenme ürününe dönüşmemiştir ayrıca deasetillenme tepkimesi 16 saat sürebilen bir zaman aralığında yavaşça gerçekleşmiştir ki indirgenme tepkimesi için bu süre içinde deasetillenme ile yarışabilir durumda olmalıdır.

Asetoksi enon yapısındaki substrat **2** aynı zamanda diaforaz ile de çift bağ yapısında olası bir indirgenme tepkimesi için tepkimeye alınmıştır ve yukarıda belirlenen sonuçların dışında bir sonuç üretilememiştir. Bunun dışında alfa hidroksi keton olan substrat 3 ile de indirgenme tepkimeleri gerçekleştirilmiş ancak belirlenen koşullarda ve süre içerisinde hiç bir ürün oluşumu gözlenmemiştir.

Dehidrogenaz tepkimeleri biyotransformasyon çalışmalarında tepkimenin yönüne göre tercih edilen asidik ya da bazik pH koşullarında tampon çözelti ortamında gerçekleştirilir. Bu nedenle bizim çalışmamızda da bu tür bir biyotransformasyon yöntemi kullanılmıştır. Tepkimeler enzimlerin optimum aktivite

gösterdikleri sıcaklıklarda gerçekleşmiş ve farklı pH değerlerinde elde edilen sonuçlar farklılık göstermeyerek beklenen indirgenme ürünü elde edilememiştir. Bu koşullar altında kullandığımız dehidrogenaz enzimlerinin sentezlediğimiz maddeleri biyodönüşüm için substrat olarak tercih etmedikleri sonucuna varılabilir. Belirtilen ürünlerin daha farklı bir enzimler ile denenmesi gerekmektedir.

## 6. KAYNAKÇA

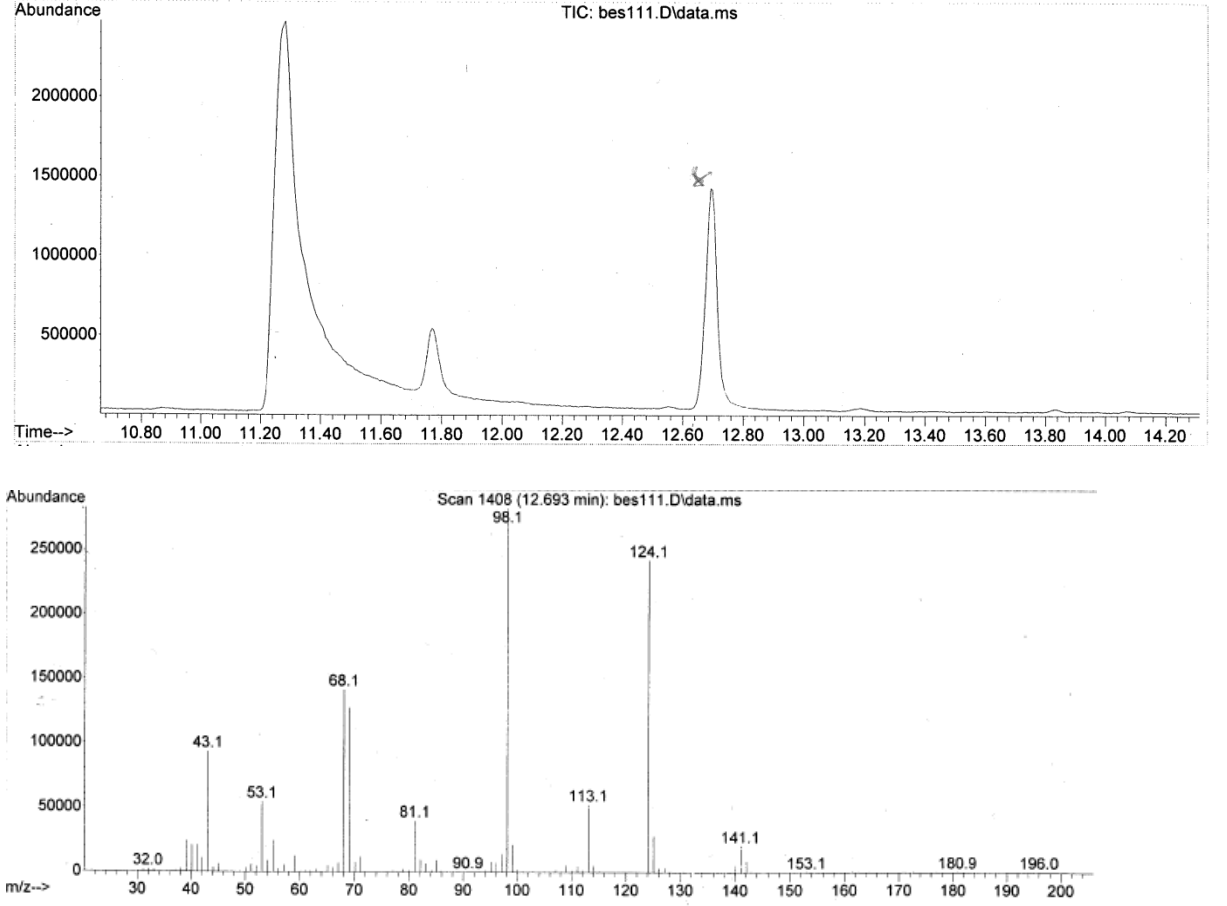
1. Csuk, R.; Glanzer, B. I. *Chem. Rev.* **1990**, 91, 49-97.
2. Kataoka, M.; Kita, K.; Wada, M.; Yasohara, Y.; Hasagawa, J. Shimizu.S. *App. Microb. Biotech.* **2003**, 62, 437-445.
3. Adam, W.; Lazarus, M.; Saha Moller, C. R.; Schreier P. *Acc. Chem. Res.* **1999**, 32, 837-842.
4. Riano, S.; Fernandez, D.; Fadini, L. *Catal. Commun.* **2008**, 9,1282-1285.
5. Jomy K.; Joseph, S. L. Bir S. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 590–594.
6. Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry* Springer, New York, 1996.
7. Noyori, R.; Suzuki, M. *Angewandte* **2006**, 96, 854-882.
8. Demir, A. S.; Emrulloğlu, M. *Curr. Org. Synth.* **2007**, 4 ,321-325.
9. Heiba, E. I.; Dessau, R M. *J. Org.Chem.* **1974**, 39, 3456-3457.
10. E. I. Heiba, R. M. Dessau, Rodewald, P. G. *J. Am. Chem. Soc.*, **1974**, 96, 7977–7981.
11. Demir, A.S.; Findık, H.; Köse, E. *Tetrahedron: Asymm.* **2004**, 15, 777-781.
12. Tanyeli, C.; Özdemirhan D.; Ezen, B. *Tetrahedron* **2002**, 58, 9983-9988.
13. Demir, A. S. Reis, Ö.; İğdir, Ç. *Tetrahedron*, **2004**, 60, 3427-3432.

14. Schneider, K.H; Jäkel, G.; Hoffmann, R, Giffhorn, F. *Microbiol.* **1995**,141, 1865-1873.
15. Huwig, A.; Emmel, S.; Jäkel, G.; Giffhorn, F. *Carbohydr. Res.* **1998**, 305, 337-339.
16. Demir A.S.; Talpur, F.N.; Sopaci B.S.; Kohring, G. W.; Celik, A., *J. Biotechnol.* **2011**, 152, 176-83.
17. Herrmann, K. M.; Weaver, L. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* **1999**, 50, 473–503.
18. Niefind, K.; Chatterjee, S.; Schomburg, D. *Acta Crystall. Section F, Structural biology and Crystallization Communications* **2006**, 62, 635-637.
19. Solomons, G.; Fryhle, T. W. *Organic Chemistry 7<sup>th</sup> Edition*, John Wiley and Sons, New York, 2000.
20. Sheldon, R. A. *Chirotechnology: Industrial Synthesis of Optically Active Compounds.*, Marcel Dekker, New York, 1993.
21. Talidomid
22. Daußmann,T.; Hennemann, H. G.; Rosen T. C. *Chem. Ing. Tech.* **2006**, 78, 249-255.
23. Straathof, A.J.J.; Adlercreutz, P. *The Biology, Ecology, Exploitation and Biocatalysis, second edition*, Harwood Acadmic Publistars 2<sup>nd</sup> edition, Amsterdam, 2000.

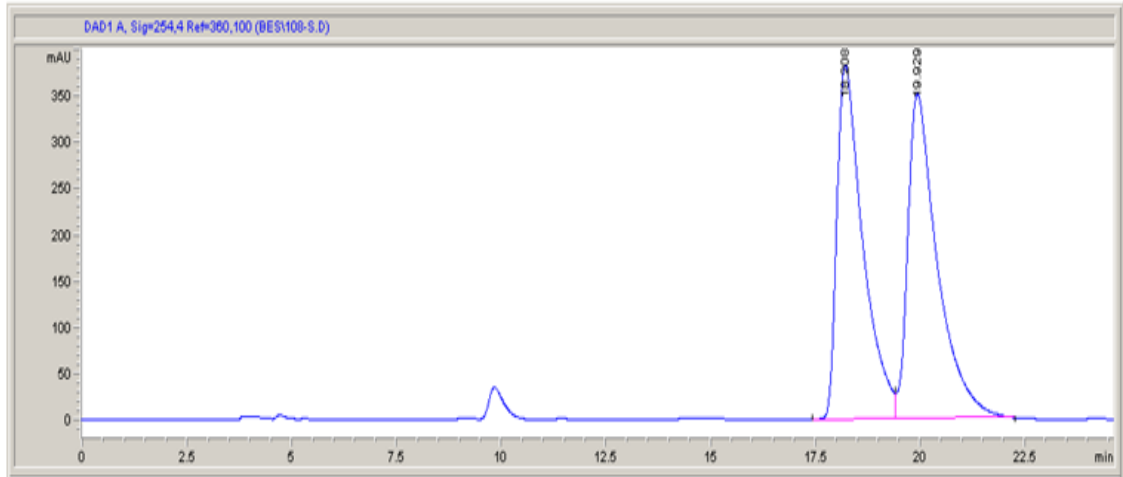
24. Collins, A. N.; Sheldrake, G. N.; Crosby, J. *Chirality in Industry, Developments in the Manufacture and Applications of Optically Active Compounds* John Wiley & Sons, Chichester, UK, 1997.
25. Nakamura, K.; Yamanaka, R.; Matsuda, T.; Harada, T. *Tetrahedron: Asymm.* **2003**, 14, 2659-2681.
26. Riva, S. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, 5, 106-111.
27. Flickinger, M.; Drew, S. *Encyclopedia of Fermentation Biotechnology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*, USA, 1999.
28. Telefoncu, A. *Biyoteknoloji Ege Üniversitesi Fen Fakültesi yayınları*, Ege Üniversitesi, 1995.
29. Secundo, F; Riva, S; Carrea, G. *Tetrahedron: Asymm.* **1992**, 3, 267-280.
30. Gruber, C. C.; Lavendera, I.; Kroutil, W.; Faber, K. *Adv. Syn. Catal.* **2006**, 348, 1789–1805.
31. Nakamura, K.; Yamanaka, R.; Matsuda, T.; Harada, T. *Tetrahedron: Asymm.* **2003**, 14, 2659-2681.
32. Buchholtz, K.; Kasche, V.; Bornscheuer, U. T. Wiley-WCH, *Biocatalysis and Enzyme Technology*, Weinheim, 2005.
33. Stampfer W.; Kosjek, B.; Moitzi, C.; Kroutil, W. Faber, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41,1014–1017.
34. Zelinski, T.; Kula, M. R. *Bioorg. Med. Chem.* 1994, 2, 421-428.
35. Ni, Y.; Xu, J-H. *Biotech. Adv.* **2012**, 30, 1279-88.

36. Ma, S. K.; Gruber, J.; Davis, C.; Newman, L.; Gray, D.; Wang, A. *Green Chem.* **2010**, 12, 81-86.
37. Machielsen, R.; Leferink, N. G. H.; Hendriks, A.; Brouns, S. S. J.; Henneman, H-G.; Baußmann, T. *Extramophiles* **2008**, 12,587-594.
38. Musa, M. M.; Lott, N.; Laivenieks, M.; Watanabe, L.; Vielle, C.; Philips, R. S. *ChemCatChem.* **2009**, 1, 89-93.
39. Liang,J.; Mundorf, E.; Voldary, R.; Jenne, S.; Gilson, L.; Convey, A. *Org. Proc. Res. Dev.* 2010b, 14, 188-192.
40. Öztürk, B. *Gıda Mühendisliği Dergisi* **2002**, Haziran, 20-21.
41. Roberts, S. M. edited by Fogarty, W. M.; Kelly, C. T. *Microbial Enzymes and Biotechnology* Elsevier Science Publishers Co. New York, 1990.
42. Anthonsen,T. edited by Straathof, J.J.; Adlercreutz, P. *Applied Biocatalysis 2<sup>nd</sup> edition* Harwood Acedemic Publishers, Amsterdam, 2000.
43. Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248-251.
44. Demir, A. S.; Jeganathan, A. A. *Synthesis* **1991**, 235-246.

## EKLER

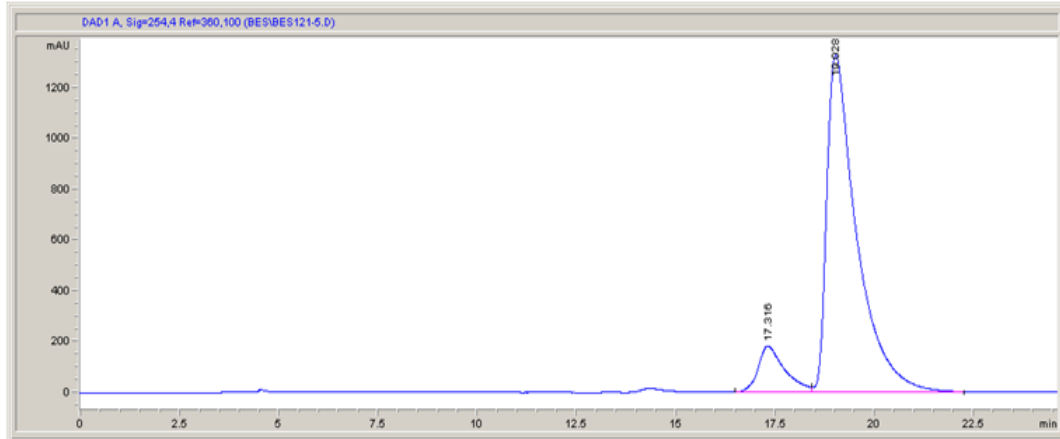


**Şekil E1.** 4-Metoksi-2-okzasikloheks-3-enil asetat'ın 2 esteraz katalizörlüğünde deasetilleme tepkimesine ait GC kromatogramı ve ürüne ait (6-Hidroksi-3-metoksiklohex-2-enon) kütle spektrumu.



#	Time	Area	Height	Width	Area%	Symmetry
1	18.208	16647.2	382.9	0.6372	48.936	0.443
2	19.929	17371	351.3	0.7168	51.064	0.441

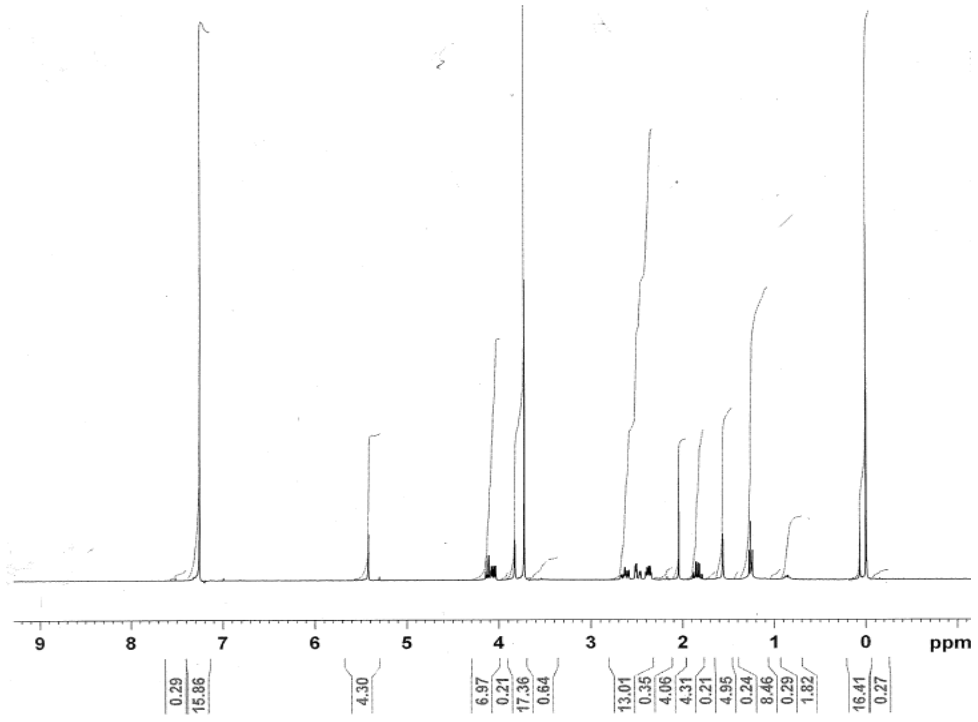
**Şekil E2.** Esteraz tepkimesinde 50 saat sonra oluşan 6-hidroksi-3-metoksiklohex-2-enon'un HPLC analizi



#	Time	Area	Height	Width	Area%	Symmetry
1	17.316	8531	181.6	0.6722	10.888	0.55
2	19.028	69823.9	1327	0.7599	89.112	0.387

**Şekil E3.** Esteraz tepkimesinde 22 saat sonra oluşan 6-hidroksi-3-metoksiklohex-2-enon'un HPLC analizi.





**Şekil E4.** 4-Metoksi-2-okzasikloheks-3-enil asetat'ın GatDH katalizörlüğünde gerçekleştirilen tepkime ürününe ait NMR spektrumu.