



TÜBİTAK

TÜRKİYE BİLİMSEL VE
TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA

THE SCIENTIFIC AND TECHNOLOGICAL
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

2006-401

MAKALAKURUMU

**SİMETRİK OLMAYAN KİRAL BENZOİNLERİN
BİYOTEKNOLOJİK-KİMYASAL YÖNTEMLERLE
ÜRETİM YÖNTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

PROJE NO: TBAG-2387 (103T131)

Temel Bilimer Araştırma Grubu
Basic Sciences Research Grant Committee

90877

EK-1

**SİMETRİK OLMAYAN KİRAL BENZOİNLERİN
BİYOTEKNOLOJİK-KİMYASAL YÖNTEMLERLE
ÜRETİM YÖNTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

PROJE NO: TBAG-2387 (103T131)

PROF. DR. AYHAN S. DEMİR
DR. ÖMER REİS
DR. A. NESE DUYGU
PERUZE AYHAN

MAYIS 2006
ANKARA

PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Kodu: TBAG-2387 (103T131)
Proje Başlığı: SİMETRİK OLMAYAN KİRAL BENZOİNLERİN BIYOTEKNOLOJİK-KİMYASAL YÖNTEMLERLE ÜRETİM YÖNTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ
Proje Yürüttücsü ve Yardımcı Araştırmacılar: Prof. Dr. Ayhan S. DEMİR (proje yöneticisi) Dr. Ömer Reis Dr. A. Nese DUYGU Peruze Ayhan
Projenin Yürüttüğü Kuruluş ve Adresi: Orta Doğu Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü, 06531, Ankara, TÜRKİYE
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK Tunus Cd. No:80 06100, Kavaklıdere /Ankara
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01.04.2004 – 01.04.2006
Öz (en çok 70 kelime) Bu proje kapsamında aldehitlerden başlanarak kimyasal yöntemler kullanılarak biyokatalizörler için substrat olabilecek simetrik ve simetrik olmayan birçok benzoil benzoin ve benzoin fosfonat türevleri sentezlenmiştir. Sentezlenen bu türevlerin değişik mikroorganizma ve enzimlerle reaksiyonları gerçekleştirılmıştır. Bu reaksiyonlar sonucunda enzimatik-kinetik ayrıştırma, dinamik kinetik ayrıştırma ve insitu derasemikleştirme reaksiyonları kullanılarak kiral benzoin türevlerinin yüksek kimyasal ve optik verimle sentezlenmesi için uygun biyokatalizör sistemleri geliştirilmiştir.
Anahtar Kelimeler: <i>Kiral benzoinler, biyokatalizörler, enansiyoseçici sentezler, yeşil kimya</i>
Projeden Kaynaklanan Yayınlar: <ol style="list-style-type: none">DEMİR A. S., Reis Ö., İğdir A. Ç., Esiringü I., Eymür S., Generation of Acyl Anion Equivalents from Acylphosphonates via Phosphonate-Phosphate Rearrangement: A Highly Practical Method for Cross-Benzoin Reaction, <i>J. Org. Chem.</i>, 70, 10584-10587, (2005).DEMİR A. S., Hamamcı H., Ayhan P., Duygu A. N., İğdir A. Ç., Çapanoğlu D., Fungi mediated conversion of benzil to benzoin and hydrobenzoin, <i>Tetrahedron: A symmetry</i>, 15, 2579-2582, (2004).
Bilim Dalı: Kimya
Doçentlik B. Dalı Kodu: 201

ÖNSÖZ

Bu projede sentezlenmesi kolay başlangıç maddelerinden yola çıkılarak kimyasal ve biyoteknolojik(enzim ve mikroorganizmalar) teknikler kullanılarak simetrik olmayan benzoinlerin kiral sentezleri için genel uygulanabilir yöntemler geliştirme çalışmaları yapılmıştır.

Proje TÜBİTAK Temel Bilimler Araştırma Grubu tarafından desteklenmiştir.

ÖZET:

Enzimler ve tüm-hücre biyokatalizörleri kompleks kiral yapılarından dolayı optikçe aktif, saf sterioizomerlerin sentezlenmenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kimya sektöründe gittikçe daha da ağırlık kazanan özellikli kimyasal (fine chemicals) üretiminde biyokatalizörler geçmişte tercih edilmezlerken bugün sıkılıkla kullanılan üretim araçları olmuşlardır.

Kiral simetrik olmayan benzoinler, biyoaktif maddelerin eldesinde önemli ara ürünüdürler ve bu maddelerin kiral, seçici sentezleri için genel uygulanabilir bir yöntem yoktur.

Projede kolay elde edilebilir-bulunur başlangıç maddelerinden kimyasal ve biyoteknolojik(enzim ve mikroorganizmalar) tekniklerle simetrik olmayan benzoinlerin kiral sentezlerinin gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir.

Bu proje kapsamında aldehitlerden başlanarak kimyasal yöntemler kullanılarak biyokatalizörler için substrat olabilecek simetrik ve simetrik olmayan birçok benzoil benzoin ve benzoin fosfonat türevleri sentezlenmiştir. Sentezlenen bu türevlerin değişik mikroorganizma ve enzimlerle reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyonlar sonucunda enzimatik-kinetik ayrıştırma, dinamik kinetik ayrıştırma ve insitü derasemikleştirme reaksiyonları kullanılarak kiral benzoin türevlerinin yüksek kimyasal ve optik verimle sentezlenmesi için uygun biyokatalizör sistemleri geliştirilmiştir.

Kiral benzoinler, biyokatalizörler, enansiyoseçici sentezler, yeşil kimya

ABSTRACT

Enzymes and whole-cell biocatalysts are widely used in the syntheses of active, pure stereoisomers because of their complex chiral structures. Biocatalysis which were once not preferred in the growing field of chemistry, i.e., the synthesis of fine chemicals have become production vehicles in this field.

Chiral unsymmetrical benzoins are important building blocks for the synthesis of bioactive materials, and these materials lack an efficient and acceptable selective synthesis method.

In this project, the syntheses of unsymmetrical benzoins from readily and easily available starting materials via chemical and biotechnological (both enzymatic and microbiologic) methods are aimed.

In the scope of this project, firstly starting from different aldehydes symmetrical and unsymmetrical benzoyl benzoin and benzoin phosphonate derivatives are synthesized using chemical methods. For the chiral synthesis of benzoin derivatives several biocatalysts are screened with the benzoylbenzoin derivatives. The chiral benzoins are obtained in good chemical and optical yields via biocatalysts mediated kinetic resolution, dynamic-kinetic resolution and insitu-racemization. As a result of these reactions, appropriate enzyme and microorganism systems are found for the syntheses of unsymmetrical benzoins.

Chiral benzoins, biocatalysts, enantioselective synthesis, green chemistry

İÇİNDEKİLER:

1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	1
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	2
4. BULGULAR.....	5
4.1. Mikroorganizmaların kullanıldığı hidroliz reaksiyonları.....	9
i. Aerobik mikroorganizmalar.....	9
ii. Küfler.....	10
4.2. Enzimlerin kullanıldığı hidroliz reaksiyonları.....	17
i. Lipazlarla gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları.....	17
ii. Lipazlar dışındaki enzimlerle gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları.....	26
5. TARTIŞMA/ SONUÇLAR.....	26
6. REFERANSLAR.....	27
7. PROJE ÖZET BİLGİ FORMU.....	30

ŞEKİL LİSTESİ:

1.	Benzilin C-C bağlı kopmasıyl aldehite dönüşmesinde tahmini mekanizma.....	3
2.	Korunmuş benzoin (benzoil benzoin) molekülü.....	4
3.	Benzaldehitten başlanarak benzil sentezlenmesi için izlenen yol.....	4
4.	Benzoil benzoinin hidrolizi.....	5
5.	Benzillerden açil anyon eşleniği reaktiflerin eldesi.....	6
6.	Benzillerin Cu(OAc) ₂ oksidasyonuyla sentezlenmesi.....	6
7.	Benzilden gerçekleştirilen benzoin kondanzasyonunun bilgisayarla modellenmiş mekanizması.....	7
8.	Benzilden oluşan açil anyon eşleniği ile 4-F-Benzaldehitin reaksiyonu.....	7
9.	Simetrik olmayan flor substituentli benzilin sentezi.....	8
10.	Benzoil benzoinin hidroliz reaksiyon şeması.....	9
11.	<i>Aspergillus flavus</i> 'un benzoil benzoin hidroliz reaksiyonunun HPLC sonucu.....	10
12.	<i>Aspergillus niger</i> 'in benzoil benzoin hidroliz reaksiyonunun HPLC sonucu.....	12
13.	<i>Aspergillus oryzae</i> 'nin benzoil benzoin hidroliz reaksiyonunun HPLC sonucu.....	13
14.	<i>Aspergillus parasiticus</i> 'un benzoil benzoin hidroliz reaksiyonunun HPLC sonucu.....	14
15.	<i>Aspergillus nidulans</i> 'in benzoil benzoin hidroliz reaksiyonunun HPLC sonucu.....	16
16.	PspLL lipazıyla gerçekleştirilen benzoil benzoin hidrolizinin HPLC sonucu.....	19
17.	Benzoil benzoinin dinamik kinetik rezolüsyonu.....	20
18.	Benzoin fosfonat molekülü.....	21
19.	Benzoin fosfonatın kinetik ayrışması.....	21
20.	MML enzimiyle gerçekleştirilen benzoin fosfonatın hidroliz reaksiyonunun HPLC analiz sonucu.....	23
21.	PCL enzimiyle gerçekleştirilen benzoin fosfonat hidroliz reaksiyonunun HPLC analiz sonucu.....	23
22.	Benzoin fosfonatın hidrolizinin kör (kontrol) deneyinin HPLC sonucu.....	24

TABLO LİSTESİ

1. <i>Aspergillus flavus</i> 'un katalizörlüğünde benzoilbenzoinin benzoine tamamıyla dönüştüğü durum için enantiyosaflık tablosu.....	10
2. <i>Aspergillus flavus</i> 'da enantiyosaflığın pH ile değişimi.....	11
3. <i>Aspergillus niger</i> 'ın katalizörlüğünde benzoilbenzoinin benzoine tamamıyla dönüştüğü durum için enantiyosaflık tablosu.....	11
4. <i>Aspergillus oryzae</i> 'nin katalizörlüğünde benzoilbenzoinin benzoine tamamıyla dönüştüğü durum için enantiyosaflık tablosu.....	12
5. <i>Aspergillus parasiticus</i> 'un katalizörlüğünde benzoilbenzoinin benzoine tamamıyla dönüştüğü durum için enantiyosaflık tablosu.....	13
6. <i>Aspergillus nidulans</i> 'ın katalizörlüğünde benzoilbenzoinin benzoine tamamıyla dönüştüğü durum için enantiyosaflık tablosu.....	15
7. PspLL ve AL enzimleriyle benzoil benzoin hidrolizi sonucu elde edilen benzoil benzoin ve benzoinin enantiyosaflık tablosu.....	19

2. GENEL İNDEKS

Genel bir yapılar, 4
bir çok ilaçlardan
Lever, D. C., 49
W. Herbst, 1
R. Chen, 1
Marmur, 1
Takayama, 1
1997, 1
yapılıkları, 1
değerlendirmeleri
klinik, 1
kullanımları, 1
Sakaguchi, K., Chem., 4
Oncology, 1, 174-176
6
karbon-karboon No. vi

S. Pohl, M. Müller ARAŞTIRMA PROJESİ KESİN RAPORU

S. Seseçoglu, D. Bayrak

**Simetrik Olmayan Kiral Benzoinlerin Biyoteknolojik-Kimyasal
Yöntemlerle Üretim Yöntemlerinin Geliştirilmesi**

Öneren: M. Çelenkoglu

İzleyen: 1993. 11. 04.

Simetrik olmayan benzoinlerin sentezi

1. GİRİŞ

Önerilen projenin konusu kolay elde edilebilir-bulunur başlangıç maddeleri kullanarak kimyasal ve biyoteknolojik(enzim ve mikroorganizmalar) teknikler kullanılarak simetrik olmayan benzoinlerin kiral sentezleri için genel uygulanabilir yöntemler geliştirmektir. Kimyasal ve biyoteknolojik yöntemler kullanarak korunmuş, simetrik olmayan benzoinlerin sentezleri yapılacak ve daha sonra mikroorganizma ve enzimlerin katalizörlüğünde enansiyoseçici hidroliz reaksiyonlarıyla kiral simetrik olmayan benzoinler için yöntem geliştirilmeye çalışılacaktır.

Chem. 1993, 38

benzoinlerin sentezi

2. GENEL BİLGİLER

Benzoin yapıları, aktif hidroksiketon grupları içermeleri açısından biyolojik aktiviteye sahip birçok maddenin sentezlerinde önemli başlangıç maddeleridir. ((a) Pirrung, M. C.; Fallon, L.; Lever, D. C.; Shuey, S. W. *J. Org. Chem.* 1996, 61, 2129-2136. (b) Pettit, G. R.; Lippert, J. W.; Herald, D. L. *J. Org. Chem.* 2000, 65, 7438-7444. (c) Ager, D. J.; Prakash, I.; Schaad, D. R. *Chem. Rev.* 1996, 96, 835-875. (d) Jackson, W. R.; Jacobs, H. A.; Jayatilake, G. S.; Matthews, B. R.; Watson, K. G. *Aust. J. Chem.* 1990, 43, 2045-2062. (e) Shirai, R.; Takayama, H.; Nishikawa, A.; Koiso, Y.; Hashimoto, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1998, 8, 1997-2000.). Simetrik olan benzoinlerin sentezleri için çok sayıda literatür mevcuttur. Bu yapıların kiral sentezleri için de birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin en güncelleri kiral, tiyazolyum tuzları katalizörlüğünde benzoin kondenzasyonu reaksiyoları ((a) Enders, D.; Breuer, K.; Teles, J. H. *Helv. Chim. Acta* 1996, 79, 1217. (b) Enders, D.; Kallfass, U. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002, 41, 1743.) ile TÜBİTAK projeleri kapsamında geliştirdiğimiz biyoteknolojik yöntemlerle karbon-karbon bağının oluşturulması((a) Demir, A. S.; Dunnwald,

T.; Iding, H.; Pohl, M.; Muller, M. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, *10*, 4769. (b) Demir, A. S.; Pohl, M.; Janzen, E.; Muller, M. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 1* **2001**, 633. (c) Demir, A. S.; Sesenoglu, O.; Eren, E.; Hosrik, B.; Pohl, M.; Janzen, E.; Kolter, D.; Feldmann, R.; Dunkelmann, P.; Muller, M. *Ad. Synth. Cat.* **2002**, *344*, 96.)
Ve asetoksibenzoinlerin biyoteknolojik yöntemlerle hidrolizi reaksiyonlarıdır (Demir, A. S.; Hamamci, H.; Sesenoglu, O.; Neslihanoglu, R.; Asikoglu, B.; Capanoglu, D. *Tetrahedron Lett.*, **2002**, *43*, 6447.).).

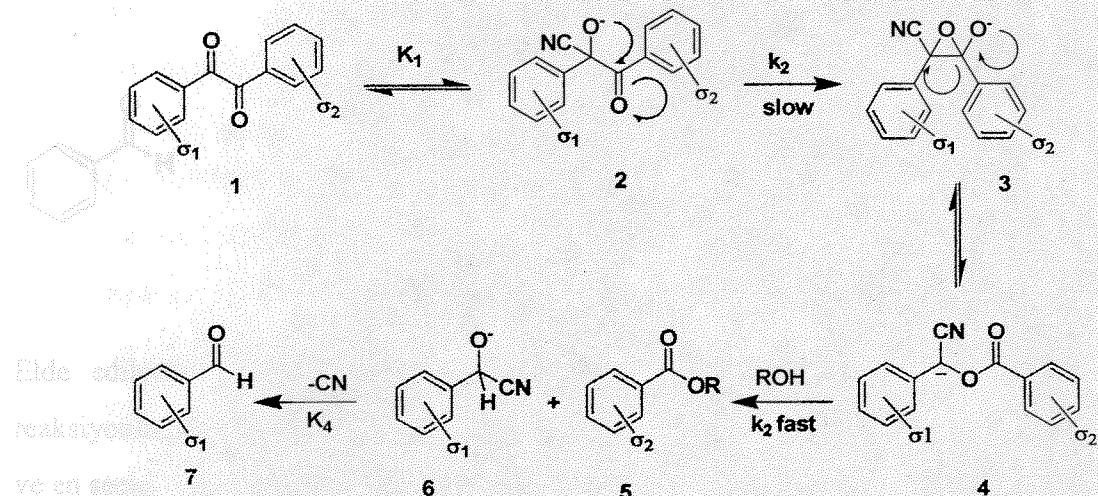
Simetrik olmayan rasemik benzoinlerin sentezi için az sayıda yöntem geliştirilmiştir. Klasik benzoin kondenzasyonunda ürün çokluğu ve bazı simetrik olmayan benzoinlerin içerdığı aromatik grupların özelliğine göre izomerleşmesi, rasemik simetrik olmayan benzoinlerin sentezleri için sorunlar çıkarmaktadır. Genel olarak simetrik olmayan benzoinlerin sentezleri aldehitlerin trimetilsillısiyanür ile oluşturdukları eterlerin deprotonasyonu ve başka bir aldehitle reaksiyonu (Corrie, J. E. T. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 5407), Corey-Seebach ditiyan metodu ((a) Stowell, M. H. B.; Rock, R. S.; Rees, D. C.; Chan, S. I. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 307. (b) Lee, H. B.; Balasubramanian, S. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 3454.), benzoilsiyanürlerin Ti(III) iyonları ile redüktif bağlanması (Clerici, A.; Porta, O. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 2889.) en önemli çalışmalarдан sayılabilir. Kiral simetrik olmayan benzoinlerin sentezleri için genel bir yöntem yoktur. Bu konuda yapılan en son çalışma TÜBİTAK desteği ile yaptığımız uluslararası ortak çalışma sonucu yapılan yayındır (Dunkelmann, P.; Kolter-jung, D.; Nitsche, A.; Demir, A. S.; Siegert, P.; Lingen, B.; Baumann, M.; Pohl, M.; Muller, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12084). Bu çalışma hermekadar simetrik olmayan benzoinlerin kiral sentezi için çözüm getiriyorsa da kullanabilecek aldehit yapıları sınırlıdır ve her reaksiyon için değişik türde enzim mutantları kullanma zorluğu vardır. Özet olarak bu konuda genel uygulanabilir bir yöntem yoktur.

Kiral simetrik olmayan benzoinler, biyoaktif maddelerin eldesinde önemli ara ürünüdürler ve bu maddelerin kiral, seçici sentezleri için genel uygulanabilir bir yöntem yoktur. Önerilen projenin amacı kolay elde edilebilir-bulunur başlangıç maddeleri kullanarak kimyasal ve biyoteknolojik(enzim ve mikroorganizmalar) teknikler kullanılarak simetrik olmayan benzoinlerin kiral sentezleri için genel uygulanabilir yöntemler geliştirmektir.

Projenin ilk bölümünde rasemik, korunmuş simetrik olmayan benzoinlerin siyanür iyonları katalizörlüğünde simetrik benzillerden ve aromatik aldehitlerden eldesi çalışılacak ve bunun için de gerekli simetrik benziller hazırlanacaktır. Daha sonra kullanılan aldehit ve benzillerin aromatik gruplarının taşıdıkları sübstiyentlerin reaksiyonlar için etkileri incelenecaktır. İkinci basamakta aroil grupları ile korunmuş simetrik olmayan benzoinlerin kiral hidrolizleri için biyokatalizör taraması yapılacak ve uygun yöntemler preparatif olarak gerçekleştirilecektir.

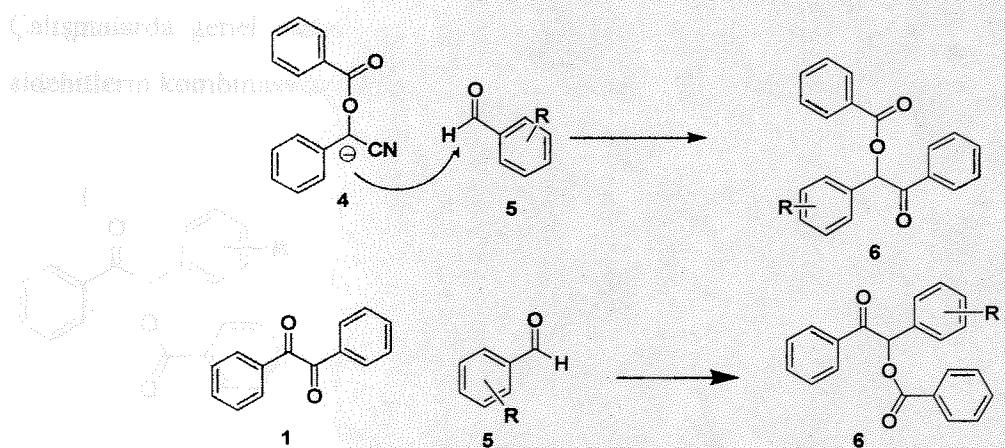
3. GEREÇ VE YÖNTEM

Benzil türevlerinde siyanid iyonlarının katalizörlüğünde C-C bağıının koparak asit(ester) ve aldehite dönüşmesi reaksiyonu için tahmin edilen mekanizma aşağıda gösterilmiştir (Şekil 1). Bu mekanizma incelendiğinde 4 nolu yapının bir aromatic aldehitin polaritesinin değiştirilmiş bir siyanhidrin türevi olduğu görülmektedir.

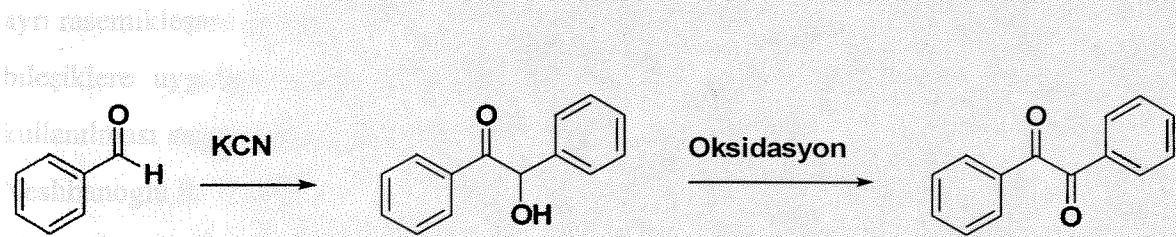


Şekil 1

Bu yapının bir elektrofille örneğin bir aromatik aldehit ile reaksiyonu normal siyanhidrin reaksiyonu ürünü olan aroilbenzoini vermesi gerekmektedir. Bu durumda aroil benzoinle, benzoin kısmı iki farklı aromatik grup içerecektir. Bu da bir aroil grubu ile korunmuş simetrik olmayan benzoindir. Aromatik grumlardaki sübtiyentler ne olursa olsun doğrudan korunmuş bileşik oluşacağından, aromatik grupların değişik redoks potansiyellerinin bir etkisi olmayacağı (Şekil 2).



Başlangıç maddeleri olarak kullanılacak benzillerin sentezi için literatürde bir çok yöntem vardır. Şekil 3'te görüldüğü gibi aromatik aldehitlerle yapılacak standart benzoin kondenzasyonu ile elde edilecek benzoinler kolayca oksitlenerek benzilleri vermektedirler. Bu tür deneyler son derece basittir ve üniversitelerde öğrenci laboratuvarlarında uygulanmaktadır.

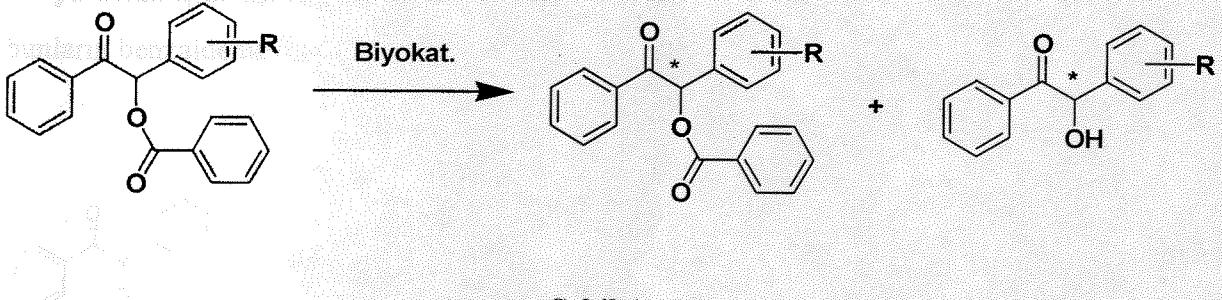


Elde edilecek olan benzoilbenzoinler için enzim tarama reaksiyonları uygulanacak, bu reaksiyonlar gerek HPLC ve gerekse GC, GC-MS te kiral kolonlar kullanılarak takip edilecek ve en seçici ve uygun enzim ve koşullar araştırılacaktır. Bulunan en uygun yöntem preparative olarak uygulanacak ve oluşan ürünler(hidroksi ve benzoil) kolon kromatografisi kullanılarak ayırtılacaktır. Aynı şartlarda hidroliz yapabilecek mikroorganizmalar (*rhizopus oryzae*, *rhizomucor pusillus*, *rhizomucor miehei* ve satın alınacak diğer mikroorganizmalar. Küfler (fungi) MAM da bulunan data bankasından satın alınacaktır) taranarak uygun şartlar bulunup hidroliz gerçekleştirilecektir (Şekil 4). Bu ılımlı şartlarda hidroliz (pH 7, su/organik solvent , oda sıcaklığı) aromatik halkaların farklı redoks potansiyelleri nedeni ile oluşabilecek izomerleşmelerinde önlenebileceği sanılmaktadır.

Çalışmalarda genel olarak elektron iten(I)-elektron çeken(C) sübstituentleri içeren aromatic aldehitlerin kombinasyonu ile İ-İ, İ-C, C-İ ve C-C örnekleri yapılmaya çalışılacaktır.

oçenitdetit direksyon re.

ıçaya konusunur ölüme



Şekil 4

Bu dönüşümlerde enansiyoseçilik HPLC, GC, GC-MS te kiral kolonlarla tesbit edilecek , yapı aydınlatmaları NMR teknikleri kullanılarak gerçekleştirilecektir.

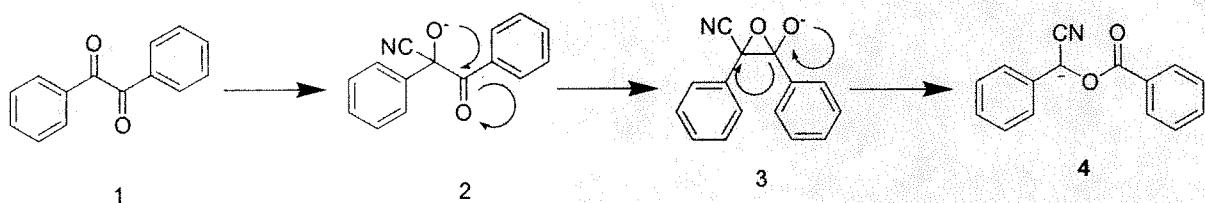
En yüksek verimin %50 den % 90 ların üzerine çıkarılabilmesi için her enansiyomerin ayrı ayrı rasemikleşme deneyleri yapılacaktır. Bu konuda daha önce bulunan değişik yöntemler bu bileşiklere uygulanarak gerektiğinde istenmeyen enansiyomerin tekrar rasemikleştirilerek kullanılması sağlanacaktır (Demir AS, Hamamci H, Sesenoglu O, Aydogan F, Capanoglu D, Neslihanoglu R. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2001, 12, 1953.).

Elde edilecek olan benzoil benzoin türevlerine daha önce simetrik benzoin için bulduğumuz biyoteknolojik derasemizasyon yöntemi uygulanarak doğrudan tek enansiyomer eldesi için yöntem geliştirilmeye çalışılacaktır("Fungal deracemization of benzoin" Demir AS, Hamamci H, Sesenoglu O, Neslihanoglu R, Asikoglu B, Capanoglu D, *Tetrahedron Lett.* 2002, 43 , 6447.).

4. BULGULAR

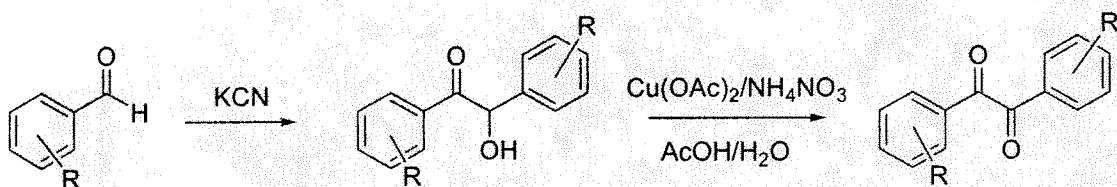
Proje temel olarak simetrik olmayan benzoinlerin asimetrik sentezini amaçlamaktadır. Öngörülen metod simetrik olmayan benzoin esterlerinin enzimler yada mikroorganizmalar ile kinetik resolüsyonunu içerdiginden öncelikli hedef bahsi geçen benzoin esterlerinin sentezi için bir metod geliştirilmesidir.

Bu amaçla benzillerin (**1**) siyanür iyonu katalizörlüğünde karbon-karbon bağının kırılması ve düzenlenmesi ile oluşan açil anyon eşleniği reaktiflerin (**4**) değişik gruplar içeren benzaldehit türevleri ile reaksiyonlarına dayanan yeni bir metod geliştirilmesi ilk hedef olarak ortaya konmuştur (Şekil 5). Çalışmanın ilk kısmı gerekli olan benzillerin sentezlenmesini ve bunların benzaldehit türevleri ile reaksiyonlarının ön çalışmasını gerektirmektedir.



Şekil 5

Benzil ve fonksiyonel grup içeren benzillerin sentezi klasik benzoin reaksiyonu sonucu elde edilen benzoinlerin $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ ile oksidasyonu ile elde edilmiştir (Şekil 6). Benzoinlerin oksidasyonu için birçok oksidayon metodu olmasına rağmen kullanılan metod üzerinde çalışılan bütün türevlerde başarı ile uygulanabilen basit bir metod olması nedeni ile tercih edilmiştir. Bu metod ile 7 değişik benzil (R : 2-F, 2-Br, 2-Me, 2-OMe, 2-Cl, 2-naftil, 2-piridil) elde edilmiştir. Elde edilen tüm benzil türevleri literaturde bilinmektedir ve yapılarının spektoskopik verileri literatur ile tamamen uyumludur.



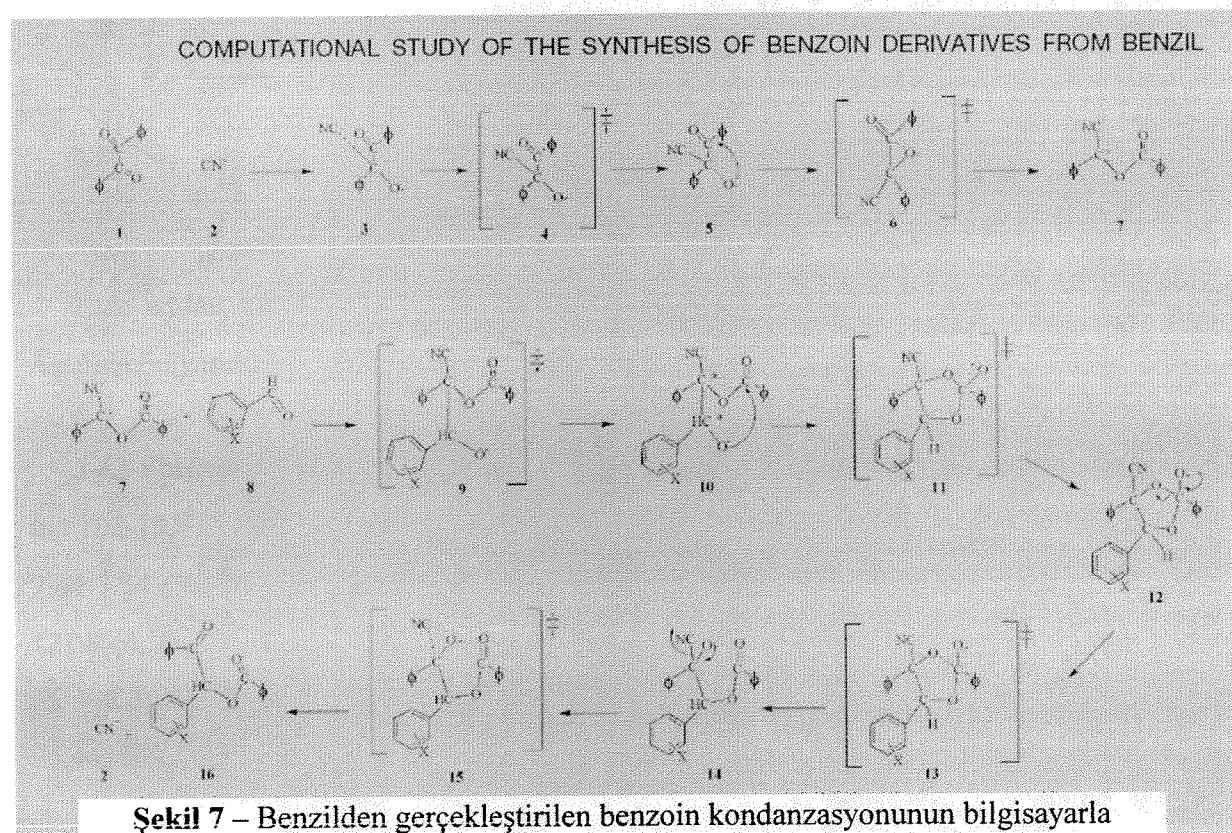
Şekil 6

Geliştirilmesi amaçlanan simetrik olmayan benzoin sentez metodu için gerekli benzil türevlerinin sentezinden sonra, siyanür iyonu katalizörlüğünde açil anyon eşlenığının oluşturulması ve aldehit ile olan reaksiyonu için ön çalışmalar yapılmıştır.

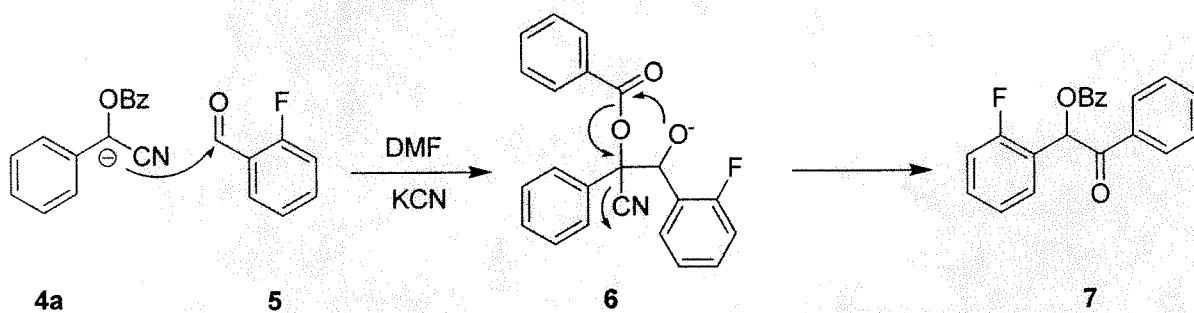
Yapılan ön çalışmalar sonucu benzilden oluşan ara ürün **4a** ile 4-F-Benzaldehyde (**5**) arasındaki reaksiyonun DMF içerisinde 20% siyanür katalizörlüğünde çok başarılı bir şekilde

gerçekleştiği bulunmuştur (Şekil 8). Hedeflenen simetrik olmayan benzoin esteri (**7**) 99% gibi çok yüksek bir verimle elde edilmiştir. Bu ürünün bu kadar pratik ve yüksek verimli bir eldesinin literaturde bulunmaması bu metodun potansiyelinin ayrı bir göstergesidir. Geliştirilen benzoin sentez metodunun kullanılabilirliğinin ve değişik fonksiyonel gruplar içeren benzaldehit türevleri ile nasıl bir sonuç elde edileceğinin teorik incelemesi Boğaziçi Üniversitesi Kimya Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Viktorya Aviyente tarafından incelenmiş ve yayınlanmıştır **Kevser Göçmen-Topal, Canan Ünaleroğlu, Viktorya Aviyente, International Journal of Quantum Chemistry, Vol 106, 1596–1610 (2006)**.

(Şekil 7)

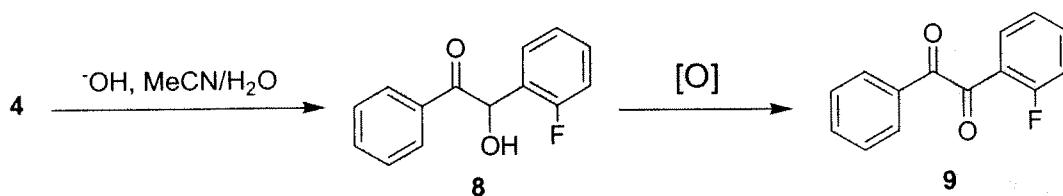


Şekil 7 – Benzilden gerçekleştirilen benzoin kondanzasyonunun bilgisayarla modellenmiş mekanizması



Şekil 8

Bu projenin nihai amacının elde edilen benzoin esterlerinin enzimatik hidrolizi ile rasemik olmayan benzoin türevlerinin eldesi olduğu düşünülürse, bu esterlerin karşılık gelen benzoinlere kimyasal hidrolizi de gerekmektedir. Bu amaç ile metod geliştirilmiş ve 7 bazik ortamda yüksek verimle hidroliz edilmiştir. Ayrıca daha sonraki çalışmalar için 8'nin oksidasyonu gerçekleştirilmiş ve karşılık gelen benzil 9 yüksek verimle elde edilmiştir (Şekil 9). Bu iki maddenin sentezi için literatürde bu kadar basit ve yüksek verimli bir reaksiyon henüz bilinmemektedir. Bilinen sentez metodları çok pahalı, neme hassas ve toksik reaktiflerin kullanımını gerektirmektedir.



Şekil 9

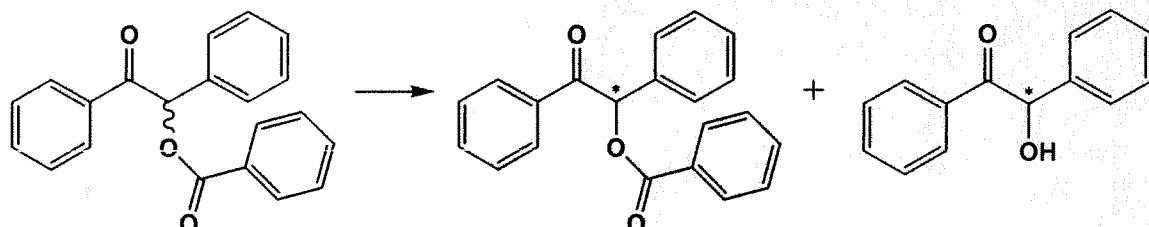
Elde edilen tüm ürünler spetroskopik olarak analiz edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır. Aşağıda bu yapılara ait veriler görülebilir.

1-(2-Fluorophenyl)-2-oxo-2-phenylethyl benzoate (7): 99% verim, beyaz katı (1.66 g), mp 102-103°C; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.03-7.11 (2H, m), 7.25-7.31 (1H, m), 7.34-7.38 (5H, m), 7.44-7.54 (3H, m), 7.93 (2H, m), 8.03 (2H, m); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 70.7, 116.4 (d, $J=22$), 121.8 (d, $J=13$), 125.2 (d, $J=2.7$), 128.7, 128.9, 129.12, 129.7, 130.4, 130.5 (d, $J=1.9$), 131.7 (d, $J=8.2$), 133.6, 134.0, 134.7, 160.5 (d, $J=250$), 165.9, 192.8; Anal. Calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{FO}_3$: C, 75.44; H 4.52 found C, 75.45; H, 4.61.

2-(2-Fluorophenyl)-2-hydroxy-1-phenylethan-1-one (8). 95% verim, beyaz katı (0.26 g), en 87°C; ^1H NMR (CDCl_3) δ 4.44 (br s, 1H), 6.13 (s, 1H), 6.90-7.00 (2H, m), 7.08-7.19 (2H, m), 7.29-7.33 (2H, m), 7.41-7.45 (1H, m), 7.84 (2H, m); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 69.6, 116.4 (d, $J=22$), 125.1 (d, $J=3.4$), 127.0 (d, $J=14.1$), 129.0, 129.1, 129.5 (d, $J=3.6$), 130.7 (d, $J=8.5$), 133.5, 134.3, 160.4 (d, $J=246$), 198.4; Anal. Calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{FO}_2$: C, 73.03; H 4.82 found C, 73.09; H, 4.91.

1-(2-Fluorophenyl)-2-phenylethane-1,2-dione (9). (87% verim); sarımtarak beyaz katı; MS(EI), m/z 228 (M^+ , 4), 123 (44), 105 (100), 95 (24), 77 (59); 1H NMR ($CDCl_3$) δ 7.02-7.07 (1H, m), 7.25-7.29 (1H, m), 7.42-7.46 (2H, m), 7.53-7.59 (2H, m), 7.89 (2H, m), 7.95-7.99 (1H, m); ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 116.9 (d, $J=21.6$), 122.9 (d, $J=10.8$), 125.2 (d, $J=3.4$), 129.2, 130.2, 131.2, 132.5, 134.7, 136.83 (d, $J=8.7$), 163.2 (d, $J=257$), 191.7, 192.7; Anal. Calcd. for $C_{14}H_9FO_2$: C, 73.68; H, 3.97 found C, 73.71; H, 4.19.

Amaçlanan ana reaksiyon daha önce de belirtildiği gibi benzoil benzoinin hidrolizidir.



Şekil 10

Bu hidroliz reaksiyonunun temel olarak iki sistemde denenmesi gerçekleştirilmiştir:

- 4.1. MİKROORGANİZMALARIN KULLANILDIĞI HİDROLİZ REAKSİYONLARI
- 4.2 ENZİMLERİN KULLANILDIĞI HİDROLİZ REAKSİYONLARI

Proje çerçevesinde yukarıda belirtildiği gibi birçok enzim ve mikroorganizmada deneyler gerçekleştirilmiştir. Denenen sistemler ve elde edilen sonuçlar aşağıda belirtilmiştir.

4.1. MİKROORGANİZMALARIN KULLANILDIĞI HİDROLİZ REAKSİYONLARI

i) Aerobik mikroorganizmalar:

Bacillus licheniformis

Bacillus subtilis

Bacillus amyloliquefaciens

Yukarıdaki mikroorganizmalar tanımlı ortamda büyütülmüş (glikoz, azot, tuz ve mineral kaynağı olan) ve büyütülme ortamlarına DMSO'da çözülen benzoil benzoin

eklenmiştir. Reaksiyon ince tabaka kromatografisi ile takip edilmiştir. Ortamda az miktarda, mikroorganzima kaynaklı olamayan hidroliz olmuş ama oluşan benzoin, benzile oksitlenmiştir.

Sonuç: Denenen aerobik organizmaların benzoil benzoin hidrolizi reaksiyonu için uygun olmadığı anlaşılmıştır.

ii) **Küfler:**

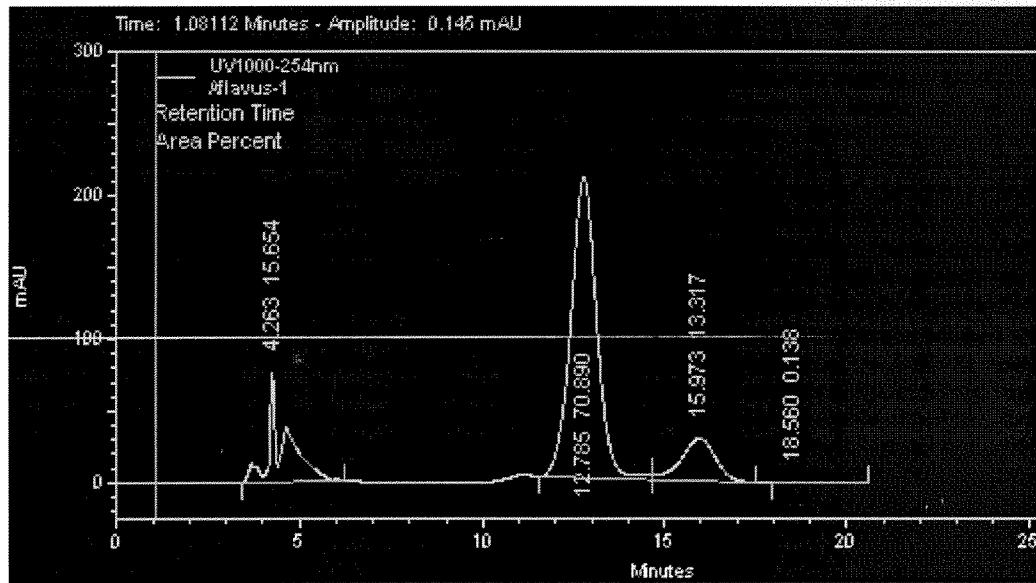
ASPERGILLUS FLAVUS:

Patates özü ortamında 48 saat büyütülmüş mikroorganizmaya %1'lik DMSO çözgeninde çözülmüş 0.02%'lik benzoilbenzoin çözeltisi eklenmiş ve biyodönüştüm ince tabaka kromatografisi ile takip edilmiştir. Reaksiyonun kinetik ayırtırma olduğu konum için 50%lik dönüşümde durdurulması gerekken yapılan deneylerde bu 50%lik dönüşüm yakalanamamıştır. İleri proje olarak reaksiyon tekrar edilecek ve 50%lik dönüşüm yakalanacaktır.

Tablo 1 - Benzoilbenzoinin tamamıyla dönüştüğü durum için enantiyosaflık

Rt (dakika)	Alan (%)	Enantiyosaflık
		ee (%)
12.785	70.890	
15.973	13.317	68.37

Enantiyosaflık HPLC analiziyle 1ml/dak akış hızıyla 90:10, n-hekzan:i-propanol çözücü sisteminde OB kolonunda analiz yapıldı. Bu kolonda benzoinin Rt değerleri; (*S*)-benzoin 13.dakika, (*R*)-benzoin 16.dakika.



Şekil 11 – *Aspergillus flavus*'un benzoil benzoin hidroliz reaksiyonunun HPLC analiz sonucu

Bu analizden *Aspergillus flavus*'un (*S*)-benzoilbenzoinin seçici olarak hidrolizini gerçekleştirdiği bulunmuştur.

Buradan sonra enantiosaflığı artırmak için enantiosaflığın pH ile değişiminin incelendiği deneyler yapılmıştır. Bu deneyler sırasında bazı dönüşümlerde 50% dönüşümdeğeri aşılmıştır.

Tablo 2

	1.gün			7.gün		
	Rt (dak.)	Alan %	ee %	Rt (dak.)	Alan %	ee %
pH 5	-	-	-			
	-	-	-			
pH 6	13.673	69.664	41.96	13.365	83.410	78.43
	17.345	26.363		16.807	10.081	
pH 7	14.032	69.666	44.61	13.545	82.430	65.03
	17.855	26.663		17.092	17.467	
pH 8	13.727	70.566	44.2	13.352	66.455	43.05
	17.465	27.322		16.835	26.459	

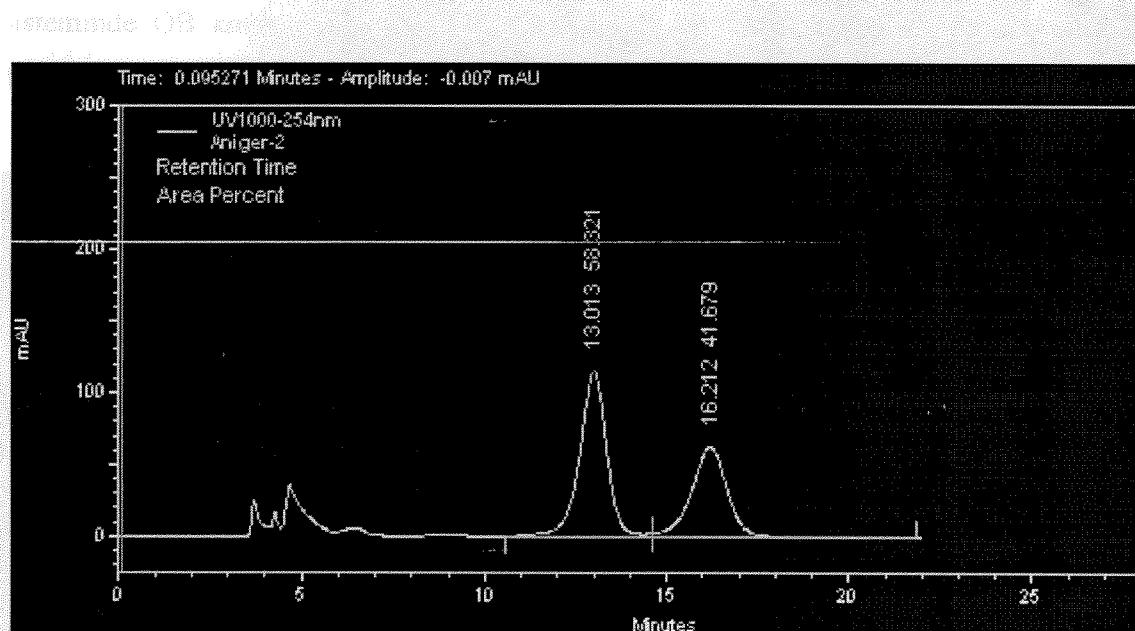
ASPERGILLUS NIGER:

Patates özütü ortamında 48 saat büyütülmüş mikroorganizmaya %1'lik DMSO çözgeninde çözülmüş 0.02%'lik benzoilbenzoin çözeltisi eklenmiş ve biyodönüştüm ince tabaka kromatografisi ile takip edilmiştir. Reaksiyonun kinetik ayrıştırma olduğu konum için 50%lik dönüşümde durdurulması gerekirken yapılan deneylerde bu 50%lik dönüşüm yakalanamamıştır.

Tablo 3 - Benzoilbenzoinin tamamıyla dönüştüğü durum için enantiyosaflik

Rt (dakika)	Alan (%)	Enantiyosaflik ee (%)
13.013	58.321	
16.212	41.679	17

Enantiyosaflik HPLC analiziyle 1ml/dak akış hızıyla 90:10, n-hegzan:i-propanol çözücü sisteminde OB kolonunda analiz yapılmıştır. Bu kolonda benzoinin Rt değerleri; (*S*)-benzoin 13.dakika, (*R*)-benzoin 16.dakika.



Şekil 12 - *Aspergillus niger*'in benzoil benzoin hidroliz reaksiyonunun HPLC analiz sonucu

Sonuç: Bu analizden *Aspergillus niger*'in (*S*)-benzoilbenzoinin seçici olarak hidrolizini gerçekleştirdiği bulunmuştur. *Aspergillus niger*'ın benzoilbenzoinin hidrolizini daha düşük

enantiyosafılıkta gerçekleştirmesi üzerine biyodönüşümün *Aspergillus flavus* ile optimize edilmesi ve enantiyosafılığın artırılması çalışmasına karar verilmiştir.

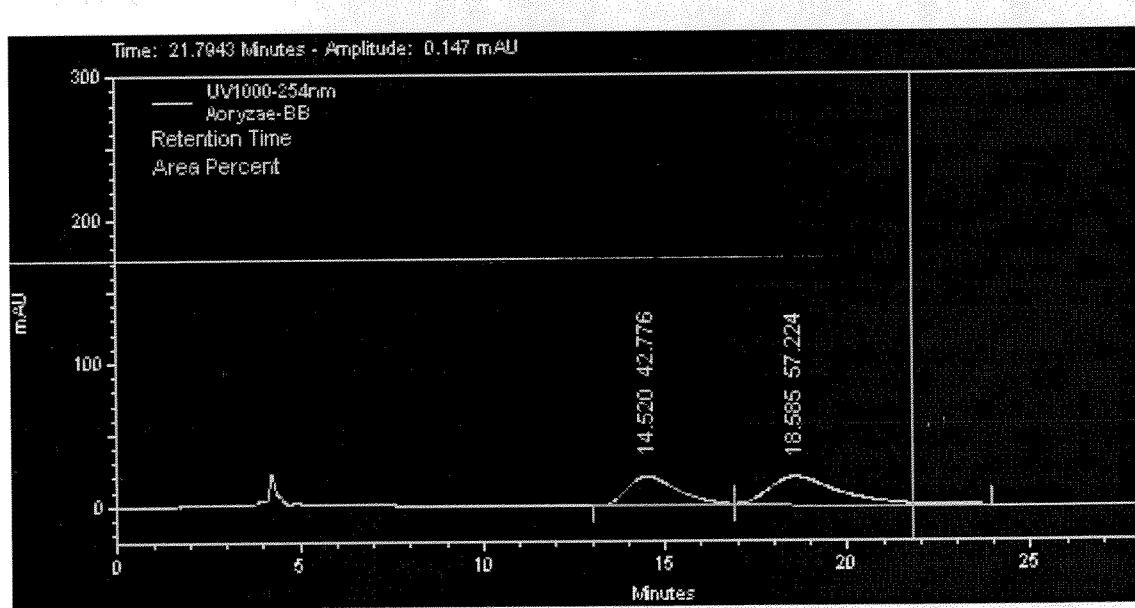
ASPERGILLUS ORYZAE

Patates özütü ortamında 48 saat büyütülmüş mikroorganizma-ya %1'lik DMSO çözgeninde çözülmüş 0.02%'lik benzoilbenzoin çözeltisi eklenmiş ve biyodönüşüm ince tabaka kromatografisi ile takip edilmiştir. Reaksiyon 50% dönüşümde durdurulmuştur.

Tablo 4 - *Hidroliz sonucu oluşan benzoinin enantiyosafılığı*

Rt (dakika)	Alan (%)	Enantiyosafılık ee (%)
14.520	42.776	
18.585	57.224	14.45

Enantiyosafılık HPLC analiziyle 1ml/dak akış hızıyla 90:10, n-hegzan:i-propanol çözücü sisteminde OB kolonunda analiz yapıldı. Bu kolonda benzoinin Rt değerleri; (*S*)-benzoin 13.dakika, (*R*)-benzoin 16.dakika.



Şekil 13 - *Aspergillus oryzae*'nın benzoil benzoin hidroliz reaksiyonunun HPLC analiz sonucu

Sonuç: Bu analizden *Aspergillus oryzae*'nin (*R*)-benzoilbenzoinin seçici olarak hidrolizini gerçekleştirdiği ortaya çıkmış oldu. *Aspergillus oryzae*'nin benzoilbenzoinin hidrolizini daha düşük enantiyosaflıkta gerçekleştirmesi üzerine biyodönüştümün *Aspergillus flavus* ile optimize edilmesi ve enantiyosaflığın artırılması çalışılmıştır.

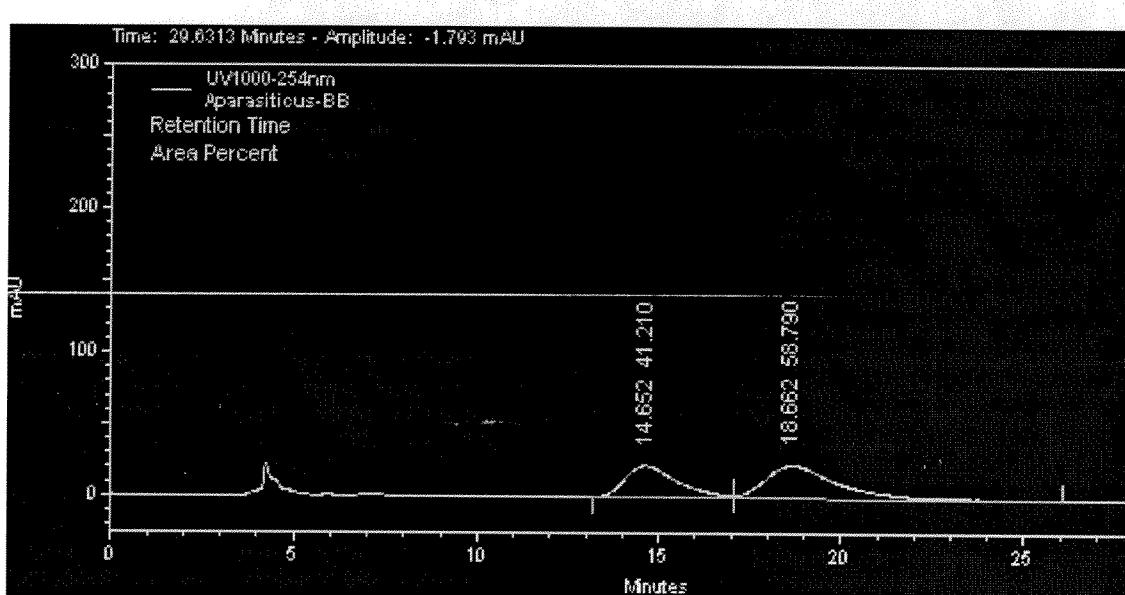
ASPERGILLUS PARASITICUS

Patates özütü ortamında 48 saat büyütülmüş mikroorganizma-ya %1'lik DMSO çözgeninde çözülmüş 0.02%'lik benzoilbenzoin çözeltisi eklenmiş ve biyodönüştüm ince tabaka kromatografisi ile takip edilmiştir. Reaksiyon 50% dönüşümde durdurulmuştur.

Tablo 5 - Hidroliz sonucu oluşan benzoinin enantiyosaflığı

Rt (dakika)	Alan (%)	Enantiyosaflık ee (%)
14.652	41.210	
18.662	58.790	17.58

Enantiyosaflık HPLC analiziyle 1ml/dak akış hızıyla 90:10, n-hegzan:i-propanol çözücü sisteminde OB kolonunda analiz yapıldı. Bu kolonda benzoinin Rt değerleri; (*S*)-benzoin 13.dakika, (*R*)-benzoin 16.dakika.



Şekil 14 - *Aspergillus parasiticus*'un benzoilbenzoin hidroliz reaksiyonunun HPLC analiz sonucu

Sonuç: Bu analizden *Aspergillus parasiticus*'un (*R*)-benzoilbenzoinin seçici olarak hidrolizini gerçekleştirdiği ortaya çıkmış oldu. *Aspergillus parasiticus*'un benzoilbenzoinin hidrolizini daha düşük enantiyosaflikta gerçekleştirmesi üzerine biyodönüştümün *Aspergillus flavus* ile optimize edilmesi ve enantiyosafliğin arttırılması çalışmasına geçilmiştir.

ASPERGILLUS FUMARUS

Patates özütü ortamında 48 saat büyütülmüş mikroorganizmaya %1'lik DMSO çözgeninde çözülmüş 0.02%'lik benzoilbenzoin çözeltisi eklenmiş ve biyodönüştüm ince tabaka kromatografisi ile takip edilmiştir. Reaksiyon 50% dönüşümde durdurulmuştur.

Hidroliz sonucu oluşan benzoinin enantiyosaflığı: Ürün rasemik olarak elde edilmiştir.

Enantiyosaflik HPLC analiziyle 1ml/dak akış hızıyla 90:10, n-heptan:i-propanol çözücü sisteminde OB kolonunda analiz yapıldı. Bu kolonda benzoinin Rt değerleri; (*S*)-benzoin 13.dakika, (*R*)-benzoin 16.dakika.

Sonuç: *Aspergillus fumarus*'un enantiyoseçici olarak benzoilbenzoinin hidrolizini gerçekleştirilmemesi üzerine biyodönüştümün *Aspergillus flavus* ile optimize edilmesi ve enantiyosafliğin artırılması çalışmasına geçilmiştir.

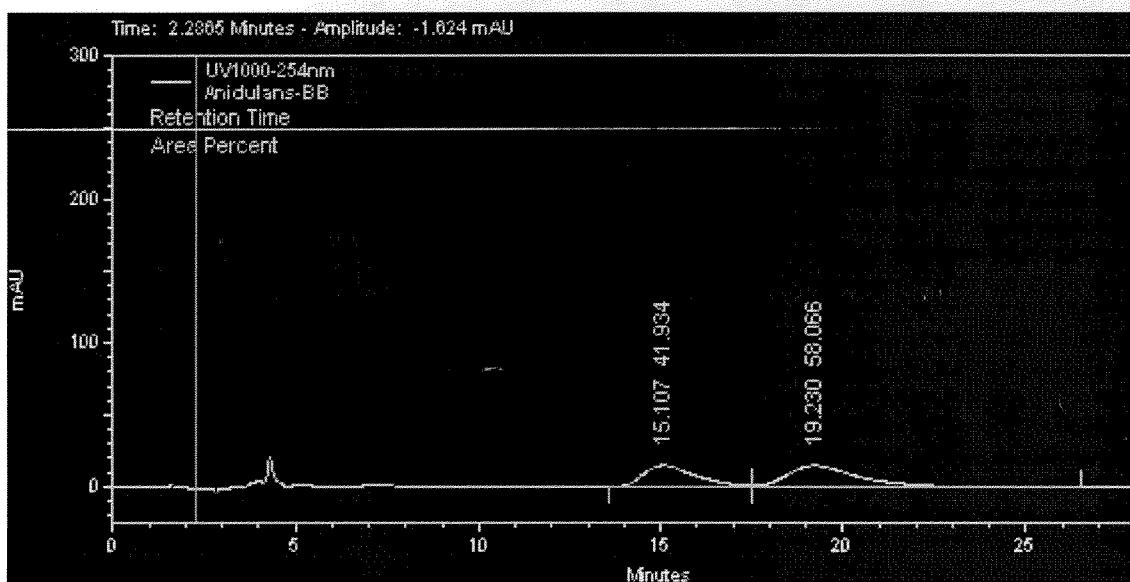
ASPERGILLUS NIDULANS

Patates özütü ortamında 48 saat büyütülmüş mikroorganizmaya %1'lik DMSO çözgeninde çözülmüş 0.02%'lik benzoilbenzoin çözeltisi eklenmiş ve biyodönüştüm ince tabaka kromatografisi ile takip edilmiştir. Reaksiyonun kinetik ayırtırma olduğu konum için 50%lik dönüşümde durdurulması gerekirken yapılan deneylerde bu 50%lik dönüşüm tam yakalanamamıştır.

Tablo 6 - Hidroliz sonucu oluşan benzoinin enantiyosaflığı

Rt (dakika)	Alan (%)	Enantiyosaflik
		ee (%)
15.107	41.934	
19.230	58.066	16.13

Enantiyosaflik HPLC analiziyle 1ml/dak akış hızıyla 90:10, n-hegzan:i-propanol çözücü sisteminde OB kolonunda analiz yapıldı. Bu kolonda benzoinin Rt değerleri; (*S*)-benzoin 13.dakika, (*R*)-benzoin 16.dakika.



Şekil 15 - *Aspergillus nidulans*'ın benzoil benzoin hidroliz reaksiyonunun HPLC analiz sonucu

Sonuç: Bu analizden *Aspergillus nidulans*'ın (*R*)-benzoilbenzoinin seçici olarak hidrolizini gerçekleştirdiği bulunmuştur. *Aspergillus nidulans*'ın benzoilbenzoinin hidrolizini daha düşük enantiyosaflikta gerçekleştirmesi üzerine biyodönüştümün *Aspergillus flavus* ile optimize edilmesi ve enantiyosafliğin arttırılması çalışmasına karar verilmiştir.

RHIZOPUS ORYZAE

YPG (maya özüttü, pepton, glükoz, tuz) ortamında 48 saat büyütülmüş mikroorganizmaya %1'lik DMSO çözgeninde çözülmüş 0.02%'lik benzoilbenzoin çözeltisi eklenmiş ve biyodönüştüm ince tabaka kromatografisi ile takip edilmiştir.

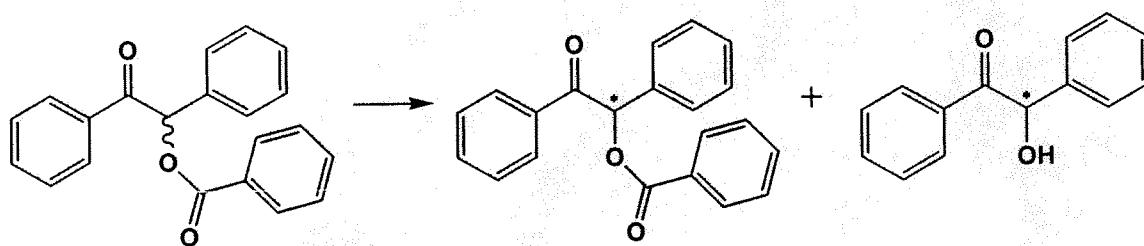
Sonuç: *Rhizopus oryzae* reaksiyonunda iki değişik ürün az miktarda olduğu gözlenmiş bunlardan biri (*R*)-benzoin olarak tanımlamış ve kiral kolon ile HPLC de yapılan analizlerde enantiyosafığının %65 değerinde olduğu görülmüştür.

4.2. ENZİMLERİN KULLANILDIĞI HİDROLİZ REAKSİYONLARI

i) Lipazlarla gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları

Birçok organizmada bulunan lipazlar (triasilgiserol ester hidrolazları, EC 3.1.1.3), canlı ortamda trigliseritlerin hidrolizini katalizlemektedirler. Bugün lipazlar organik kimyada en çok çalışılan ve en çok kullanılan biyokatalizörlerin başında gelmektedirler. Bu enzimlerin çeşitliliği ve popülerliği, geniş bir substrat aralığındaki yüksek katalitik verimliliğe, yüksek regioselektiviteye ve kiral ayrima sahip olmalarına; yüksek sıcaklığa ve organik çözücülere yüksek derecede dayanıklı olmalarına, ester sentezlerinde etki yönlerinin değişebilir olmasına, çevreye dost ve toksik olmayan yapılarına ve son olarak düşük fiyatlarına, bağlanabilinir.

- Öncelikli olarak benzoil benzoinin hidroliz reaksiyonu denenmiştir



Deney setlerinde değişik lipazlar değişik pH'larda ve değişik çözücülerle denenmiştir.

DENEY I

Kullanılan lipazlar: Lipaz SL; Lipaz UL; Lipaz TL; Lipaz AL; Lipaz PL; Lipaz QLM şeklindedir.

Yukarıda belirtilen bütün enzimler pH 7 ve 8'de reaksiyona sokulmuştur. Bu reaksiyonlarda denenen çözüçüler şöyledir; toluen, DMF, DMSO. Bütün reaksiyonlar 37 °C'de potasyum fosfat tamponunda gerçekleştirılmıştır. Bunlara ek olarak, Lipaz AL 37 °C'de, pH 6'da fosfat tamponunda ve DMSO çözünlüğünde bir kez daha denenmiştir. Bu reaksiyonlar sonucunda benzoin bazı reaksiyon ortamlarında oluşmuştur ancak yapılan analizler oluşan benzoinin rasemik olduğunu göstermiştir.

DENEY II

İkinci bir deney setinde, değişik lipazlar; Lipaz CC, Lipaz HP, Lipaz PC, Lipaz Asp, Lipaz MM, Lipaz PF, Lipaz RA, Lipaz RN ve Lipaz CA, benzoil benzoinle denenmiştir.

Bu lipazların 25 °C, pH 7'de fosfat tamponunun ve DMSO çözünlüğünde (30% DMSO) benzoil benzoinle reaksiyonları gerçekleştirılmıştır. Kontrol deneyinden anlaşıldığı üzere, benzoil benzoin fosfat tamponu ve DMSO'nun bulunduğu ortamda rasemik olarak benzoine bozunmaktadır. Bu bozunmada enzimin spesifik bir etkisi olmadığı görülmüştür.

Daha sonra bütün lipazlar; Lipaz CC, Lipaz HP, Lipaz Asp, Lipaz PC, Lipaz MM, Lipaz PF, Lipaz RA, Lipaz RN, Lipaz CA, Lipaz SL, Lipaz UL, Lipaz TL, Lipaz AL, Lipaz PL & Lipaz QLM; pH 8 ve 37 °C'de fosfat tamponu ve 30% DMSO'da denenmiştir. Bu reaksiyonlarda çalkalamalı su banyosu kullanılarak başlangıç maddesinin çökmesi ve reaksiyona geç girmesi veya girmemesi engellenmek istenmiştir.

Diğer denemelerde olduğu gibi kontrol deneyi de dahil ependorf tüplerinde rasemik benzoin oluşumu gözlemlenmiştir. Biyotransformasyon verimi kullanılan lipaz türüyle değişmiş, en iyi verim Lipaz CC & Lipaz HP' de elde edilmiştir.

DENEY III

Üçüncü bir set olarak yeniden genel bir lipaz taraması yapılmıştır. Bu taramada daha önceki taramadan farklı olarak pH 5,5 olan fosfat tamponu kullanılmıştır. Yapılan denemeler sonucunda bu pH değerinin bu hidroliz için optimum olduğu saptanmıştır.

Bu sette denenen lipazlar şöyle sıralanabilir:

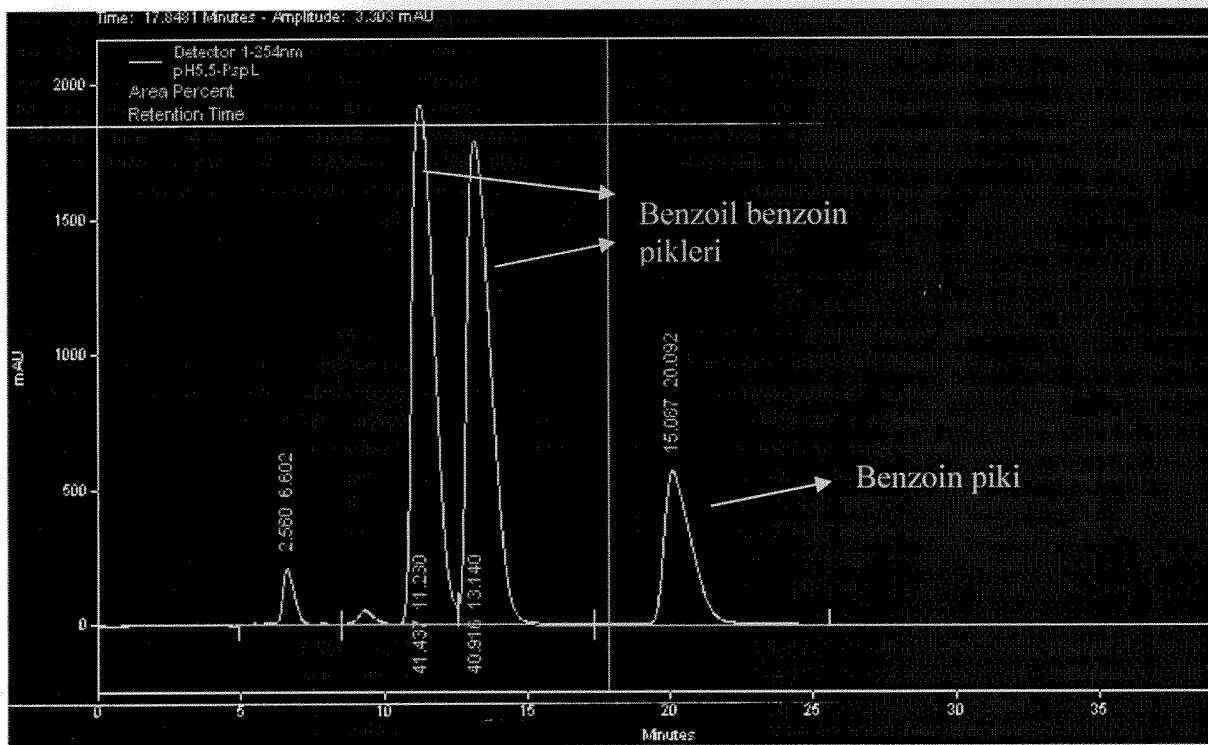
- * *Candida cyclarea* lipazı (CCL)
- * *Aspergillus oryzae* lipazı (AOL)
- * *Candida lipolytica* lipazı (CLL)
- * *Mucor javanicus* lipazı (MJL)
- * *Penicillium roqueforti* lipazı (PRL)
- * *Aspergillus oryzae*'de rekombinant olarak üretilmiş *Rhizomucor miehei* lipazı (r-AOL)
- * Buğday tohumu lipazı (WGL)
- * *Chromobacterium viscosum* lipoprotein lipazı (CVLL)
- * *Pseudomonas sp.* lipoprotein lipazı (PspLL)
- * *Aspergillus* lipazı (AL)
- * *Candida antarctica* lipazı (CAL)
- * *Mucor miehei* lipazı (MML)
- * *Pseudomonas fluorescens* lipazı (PFL)
- * *Rhizopus arrhizus* lipazı (RAL)
- * *Rhizopus niveus* lipazı (RNL)
- * Domuz pankreası lipazı (HPL)

Denenen bu lipazlardan sadece *Aspergillus* lipazı (AL) ve *Pseudomonas sp.* lipoprotein lipazının (PspLL) benzoilbenzoinin hidrolizini gerçekleştirdikleri gözlemlenmiştir. Bu iki enzimle elde edilen sonuçlar şöyledir:

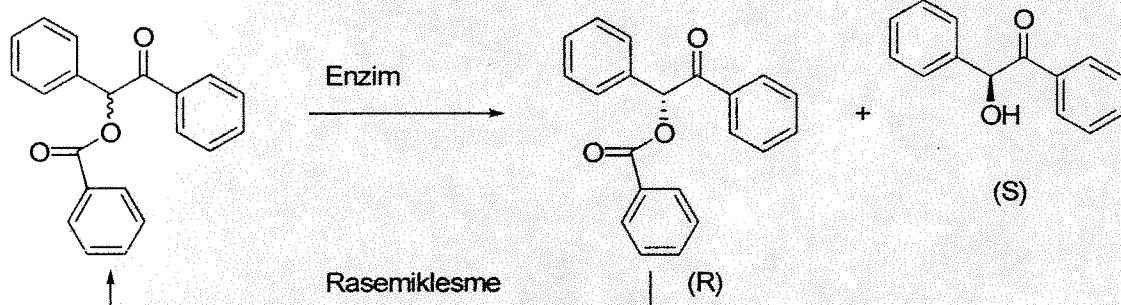
Enzim	ee % Benzoil benzoin	ee % Benzoin
AL	3.9 %	6.46 %
PspLL	Rasemik	100 %

Tablo 7

Bu sonuçlar ışığında *Pseudomonas sp.* lipoprotein lipazının (PspLL) benzoilbenzoinin enantiyoseçici olarak hidrolizinde kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 16 – Pseudomonas lipoprotein lipazla katalizlenen hidroliz reaksiyonunun HPLC analiz sonucu; benzoil benzoinin steryoçevici hidrolizi sonucu sadece bir benzoin enantiomerinin olduğu görülmekte.



Şekil 17 - Benzoil benzoinin dinamik kinetik rezolüsyonu

Bu deneylerde elde edilen sonuç PspLL enziminin iki türde reaksiyon gerçekleştirdiğidir. Benzoilbenzoin in bir enansiyomeri (*S*) hidroliz olmuş geriye kalan (*R*)-benzoilbenzoin rasemikleşmiştir (Şekil 12). Konfigürasyonlar standartlar kullanılarak kiral kolonlu (Chiralcel OD) kullanılarak belirlenmiştir.

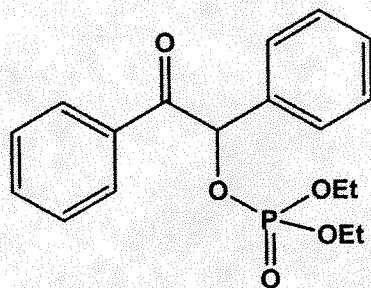
Dinamik-kinetik rezolusyana iyi bir örnek teşkiledebilecek bu reaksiyon tekrar edilme ve kontrol aşamasındadır. Bu bölümde *(S)* benzoin ve *(R)* benzoilbenzoin enzimle reaksiyona sokularak herhangibir rasemikleşme olup olmadığı kontrol edilmesi hedeflenmiştir.

Sonuc: *Pseudomonas sp.* lipoprotein lipazi (PspLL) benzoil benzoin türevlerinin hidrolizinde denenmiştir ve bu enzimle hidrolizin yüksek enantiyoafılıkla gerçekleştiği görülmüştür. Fakat Enzimin “turnover sayısı” olarak bilinen sayısı düşük olduğundan yani bu hidroliz çok düşük verimle gerçekleştiğinden bu enzimin kullanılmasından vazgeçilmiştir.

- **Benzoin fosfanatın hidroliz reaksiyonları**

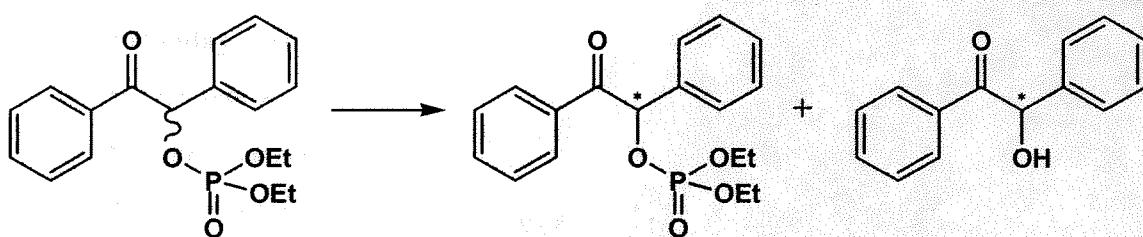
Kiral benzoinlerin sentezlenmesinde başlangıç ürünleri olarak benzoin fosfonatlar

Asil fosfonatlar [18] siyanat anyonunun varlığında fosfonat-fosfat tekrar düzenlenmesi ile asil anyon eşlenikleri ortaya çıkartan asil anyon öncü molekülleridirler. Bu anyonlar aldehitlerle reaksiyona girerek çapraz-benzoin ürünleri verirler. Bu yolla birçok aromatik-aromatik, aromatik-alifatik ve alifatik-aromatik benzoinlerin sentezlenmesi mümkün.



Şekil 18 – Benzoin fosfonat molekülü

Bu yolla sentezlenen değişik rasemik benzoin fosfonatların enantiyoseçici hidrolizi sonucu (kinetik ayırması ile) benzoin fosfonatın yanlışca bir enantiomerinin hidrolisinin olup o enantiomerin benzoininin olması ve reaksiyona girmeyen diğer benzoin fosfonat enantiomerinin reaksiyon ortamında kalması beklenmektedir. Enantiyoseçici enzimatik hidroliz sonucu ortamda kiral benzoin fosfonat ve kiral benzoinin olması beklenmektedir. [19]



Şekil 19 – Benzoin fosfonatın kinetik ayrışması

Genel olarak enzimatik reaksiyonlar iki farklı sistemde gerçekleştirilirler:

- Tek fazlı sistemler: Bu tür sistemlerde organik veya sulu fazlardan biri kullanılır.
- İki fazlı sistemler: Bu tür sistemlerde iki faz (organik ve sulu faz) birarada kullanılır.

Benzoin fosfonatın hidroliz reaksiyonu iki şekilde gerçekleştirildi.

1. Tek fazlı sistemler
2. İki fazlı sistemler

1. İKİ FAZLI SİSTEMLER:

Literatürde değişik fosfonatların hidrolizi için iki fazlı sistemlerin geniş bir şekilde kullanılmasından yola çıkılarak benzoin fosfonatların organik ve sulu faz olmak üzere birbiriyle karışmayan iki sulu fazın kullanıldığı model sistemde hidroliz reaksiyonu denendi.

DENEY 1:

Reaksiyonlar 3 μ l benzoin fosfonatın hacim olarak 2 (organik faz): 5 (pH 7 50mM fosfat tampon) oranında iki fazın karışımında çözülüp, enzim eklenmesi suretiyle 35°C çalkalamalı su banyosunda başlatılmıştır. Organik faz hacim olarak 1: 1 oranlarında hegzan ve t-butil metil eterin karıştırılmasıyla elde edilmiştir.

Kullanılan Enzimler:

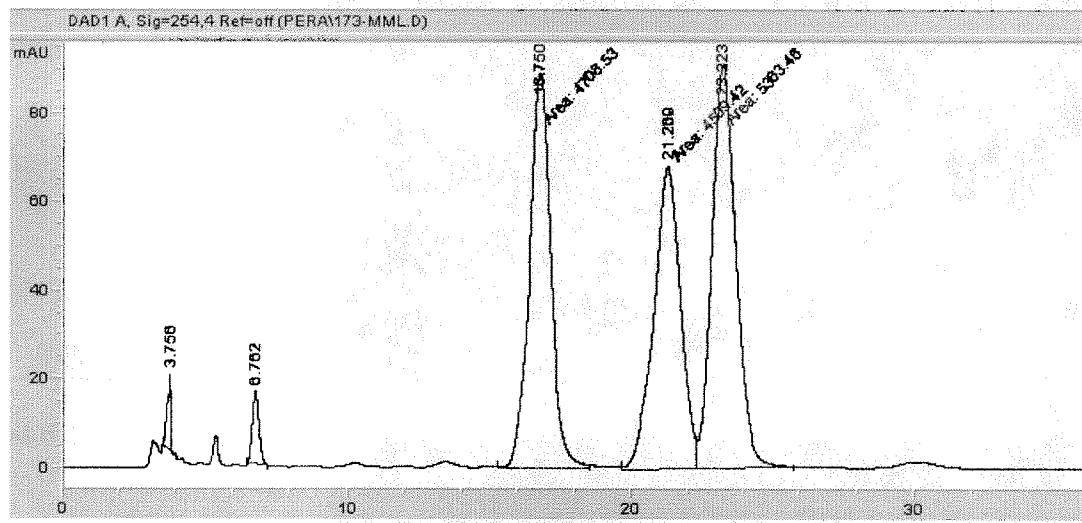
* *Pseudomonas fluorescens* lipazı

* *Aspergillus* lipazı

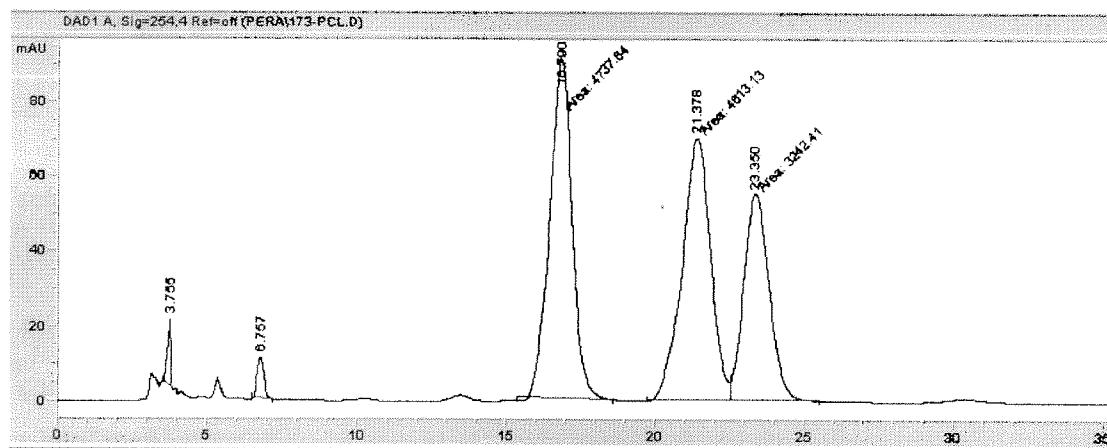
* *Candida cylindracea* lipazı

- * Buğday filizi lipazı
- * *Rhizopus niveus* lipazı
- * *Penicillium roqueoforti* lipazı
- * *Mucor mihei* lipazı
- * Domuz pankreası lipazı
- * *Rhizopus arrhizus* lipazı
- * *Pseudomonas cepacia* lipazı
- * *Aspergillus oryzae* lipazı
- * *Mucor javanicus* lipazı
- * Lipaz PL
- * Lipaz TL
- * Lipaz QLM
- * Lipaz AL
- * Lipaz MY30
- * Lipaz OF
- * Lipaz SL
- * Lipaz UL

Deneysel ince tabaka sistemiyle takip edildi. Öncelikli olarak MML ve PCL enzimlerinin kullanıldığı reaksiyonlarda ürün olması muhtemel spot görüldü. Bunun üzerine bu ortamlar HPLC ile IA kolonda 90:10 (n-hekzan:i-propanol) çözücü sisteminde, 1ml/dak akış hızında analiz edildi. Bu koşullarda benzoin 15.457 ve 17.905 dakikalarda pikler vermektedir.



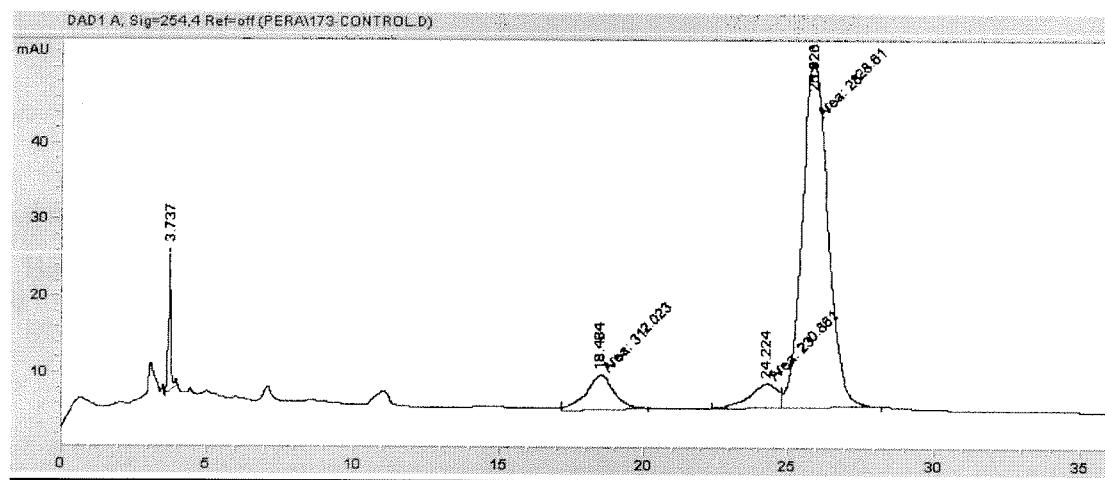
Şekil 20 – MML enzimiyle gerçekleştirilen benzoin fosfonatın hidroliz reaksiyonunun HPLC analiz sonucu



Şekil 21 – PCL enzimiyle gerçekleştirilen benzoin fosfonat hidroliz reaksiyonunun HPLC analiz sonucu

MML ve PCL enzimiyle gerçekleştirilen enzimatik reaksiyonların HPLC analizleri (şekil 3, 4) incelendiğinde 16, 21 ve 23. dakikalarda pikler görüldü. Bu piklerin ne olduğunu anlamak için kör deney (kontrol) de analiz yapıldı (şekil 5).

Bu analizlerde görülen pikler kontrol deneyinin HPLC analizinde de görülünce bu piklerin ortamdan (enzimin varlığından değil) kaynaklandığı ortaya çıktı. Bu yüzden farklı bir deneye geçildi.



Şekil 22 – Benzoin fosfonatın hidrolizinin kör (kontrol) deneyinin HPLC sonucu

DENEY 2:

Daha sonra pH'ın hidroliz üzerinde bir etkisinin olup olmadığını anlaması için pH etkisinin incelendiği bir deney yapıldı bu deney setinde;

- * pH 6,
- * pH 7 ve
- * pH 8 fosfat tamponları, kullanılarak örnek olarak seçilen enzimlerde hidroliz reaksiyonu yukarıda belirtilen reaksiyonun aynı şartlarında denendi.

Reaksiyonlar 3 µl benzoïn fosfonatın hacim olarak 2 (organik faz): 5 (pH 6-7-8 50mM fosfat tampon) oranında iki fazın karışımında çözülmüş, enzim eklenmesi suretiyle 35°C çalkalamalı su banyosunda başlatılmıştır. Organik faz hacim olarak 1: 1 oranlarında hegzan ve t-butil metil eterin karıştırılmasıyla elde edilmiştir.

Bu deney setinde kullanılan enzimler şöyle:

- * Lipaz PL
- * Lipaz TL
- * Lipaz QLM
- * Lipaz AL
- * Lipaz MY30
- * Lipaz OF
- * Lipaz SL
- * Lipaz UL

Sonuç: Denenen bütün reaksiyon ortanlarında kontrol amacıyla gerçekleştirilen kör deneyde de aynı ürün görüldü. Bu ürün hidroliz ürününden çok izomerleşme ürününü andırdı. Buradan sulu sistemin hidrolize sebep olabileceği sonucu çıkarıldı. Buradan tek fazlı sisteme geçilmesi kararı alındı.

2. TEK FAZ SİSTEMLER:

Burada sulu sistem kullanılmayarak sadece organik çözücülerde reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir.

Reaksiyonlarda: 5µl benzoïn fosfonat 600 µl organik çözücüde çözülmüş ve ilgili enzim eklenip 35°C çalkalamalı su banyosunda başlatılmıştır.

Kullanılan organik solventler şöyledir:

- * THF
- * Toluene

Denenen enzimler şunlardır:

- * Lipaz PL
- * Lipaz TL
- * Lipaz QLM
- * Lipaz AL
- * Lipaz MY30
- * Lipaz OF
- * Lipaz SL
- * Lipaz UL

ii) Lipazlar dışındaki enzimlerle gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları

Burada denenen enzimler şöyle sıralanabilir;

β-laktamaz: Sprey kurutucuya hazırlanan toz formu ve ham-saflaştırılmamış enzim (enzim içeren hücre dışı ortamı) kullanılmıştır. Reaksiyonlar pH 7, 37 °C'de DMSO çözünlüğünde gerçekleştirilmişdir.

Serin alkin proteaz: sprey kurutucuya hazırlanan toz formu kullanılarak fosfat + DMSO tamponunda pH 7, 37 °C'de reaksiyon denenmiştir.

Asit proteaz: (serin alkin proteazla aynı koşullar uygulanmıştır).

Sonuç: Kullanılan enzimlerin hiçbir benzoilbenzoinin biyotransformasyonunda başarılı olamamıştır.

5. TARTIŞMA/ SONUÇLAR:

- 1) Bu proje kapsamında birçok benzoil benzoin ve benzoin fosfonat türevi sentezlenmiştir. Sentezlenen bu türevlerin birçok mikroorganizma ve enzimle reaksiyonları gerçekleştirilmiştir.
- 2) Mikroorganizmayla gerçekleştirilen reaksiyonlarda aerobik organizmalar istenen biyodönümleri gerçekleştirimezken küfler nispeten iyi sonuçlar vermiştir. Denenen küflerin hepsi değişik enantiyomerlik saflikta benzoil benzoinin hidrolizini gerçekleştirmiştir. Küflerden *Aspergillus flavus* yüksek enantiyo saflikta benzoil benzoinin hidrolizi gerçekleştirildiğinden bu biyodönümlü için en uygun mikroorganizma olmuştur.
- 3) Enzimlerle gerçekleştirilen reaksiyonlarda lipazlarla benzoil benzoinin ve benzoin fosfonatın hidrolizi denenmiştir. Benzoin fosfonatın hidrolizi ele alınan bütün sistemlerde başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Benzoil benzoinin hidrolizi denenen lipazlar içerisinde *Pseudomonas sp.* lipoprotein lipazı (PspLL) başarılı olmuş fakat enzimin bu hidrolizi düşük verimlilikle gerçekleştirmesinden dolayı tercih edilmemiştir. Lipazlar dışında denenen enzimlerin hiçbirini başarılı sonuç vermemiştir.

6. REFERANSLAR:

1. AGER D. J., Prakash I., Schaad D. R., 1,2-Amino Alcohols and Their Heterocyclic Derivatives as Chiral Auxiliaries in Asymmetric Synthesis. *Chem. Rev.*, 96, 835-875, (1996).
2. AVİYENTE V., Göçmen-Topal K., Ünaleroğlu C., Computational study of the synthesis of benzoin from benzil, *International Journal of Quantum Chemistry*, 106, 1596-1610, (2006).
3. Clerici A., Porta O., Reductive coupling of benzoyl cyanide and carbonyl compounds by aqueous titanium(III) ions. A new convenient and selective access to the less stable mixed benzoins, *J. Org. Chem.* 1993, 58, 2889-2893, (1993).
4. Corrie, J. E. T. Preparation and properties of unsymmetrical benzoins and related compounds, *Tetrahedron*, 54, 5407-5416, (1998).

5. DEMİR A. S., Hamamcı H., Şeşenoğlu Ö., Neslihanoglu R., Aşikoğlu B., Çapanoğlu D., Fungal deracemization of benzoin, *Tetrahedron Lett.* 43, 6447-6449, (2002).
6. DEMİR A. S., Hamamcı H., Şeşenoğlu Ö., Aydoğan F., Çapanoğlu D., Neslihanoglu R., Simple chemoenzymatic access to enantiopure pharmacologically interesting (*R*)-2-hydroxypropiophenones, *Tetrahedron: Asymmetry*, 12, 1953-1956, (2001).
7. DEMİR A. S., Şeşenoğlu Ö., Eren E., Hoşrik B., Pohl M., Janzen E., Kolter D., Feldmann R., Dünkelmann P., Müller M., Enantioselective Synthesis of α -Hydroxy Ketones via Benzaldehyde Lyase-Catalyzed C-C Bond Formation Reaction, *Ad. Synth. Cat.* 344, 96-103, (2002).
8. DEMİR A. S., Pohl M., Janzen E., Müller M., Enantioselective synthesis of hydroxy ketones through cleavage and formation of acyloin linkage. Enzymatic kinetic resolution via C-C bond cleavage, *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 1*, 633-635, (2001).
9. DEMİR A. S., Dünnwald T., Iding H., Pohl M., Müller M., Asymmetric benzoin reaction catalyzed by benzoylformate decarboxylase, *Tetrahedron: Asymmetry*, 10, 4769-4774, (1999).
10. DÜNKELMANN P., Kolter-jung D., Nitsche A., Demir A. S., Siegert P., Lingen B., Baumann M., Pohl M., Müller M., Development of a Donor-Acceptor Concept for Enzymatic Cross-Coupling Reactions of Aldehydes: The First Asymmetric Cross-Benzoin Condensation, *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 12084-12085, (2002).
11. ENDERS D., Breuer K., Teles J. H., A novel asymmetric benzoin reaction catalyzed by a chiral triazolium salt, *Helv. Chim. Acta*, 79, 1217-1221, (1996).
12. ENDERS D., Kallfass U., An efficient nucleophilic carbene catalyst for the asymmetric benzoin condensation, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41, 1743-1745, (2002).
13. JACKSON W. R., Jacobs H. A., Jayatilake G. S., Matthews B. R., Watson K. G., Applications of optically active aryl cyanohydrins in the synthesis of α -hydroxy aldehydes, α -hydroxy ketones and β -hydroxy amines, *Aust. J. Chem.*, 43, 2045-2062, (1990).
14. LEE H. B., Balasubramanian S., Studies on a dithiane-protected benzoin photolabile safety catch linker for solid-phase synthesis, *J. Org. Chem.*, 64, 3454-3460, (1999).

15. PETTIT G. R., Lippert J. W., Herald D. L. A pinacol rearrangement/oxidation synthetic route to hydroxyphenstatin, *J. Org. Chem.*, 65, 7438-7444, (2000).
 16. PIRRUNG M. C., Fallon L., Lever D. C., Shuey S. W., Inverse phosphotriester DNA synthesis using photochemically-removable dimethoxybenzoin phosphate protecting group, *J. Org. Chem.*, 61, 2129-2136, (1996).
 17. SHIRAI R., Takayama H., Nishikawa A., Koiso Y., Hashimoto Y., Asymmetric synthesis of antimitotic combretadioxolane with potent antitumor activity against multi-drug resistant cells, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8, 1997-2000, (1998).
 18. STOWELL M. H. B., Rock R. S., Rees D. C., Chan S. I., Efficient synthesis of photolabile alkoxy benzoin protecting groups, *Tetrahedron Lett.*, 37, 307-310, (1996).

7. PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Kodu: TBAG-2387 (103T131)
Proje Başlığı: SIMETRİK OLМАYAN KIRAL BENZOINLERİN BIYOTEKNOLOJİK-KIMYASAL YÖNTEMLERLE ÜRETİM YÖNTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ
Proje Yürüttücsü ve Yardımcı Araştırmacılar: Prof. Dr. Ayhan S. DEMİR (Proje yöneticisi) Dr. Ömer Reis Dr. A. Nese DUYGU Peruze Ayhan
Projenin Yürüttüldüğü Kuruluş ve Adresi: Orta Doğu Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü, 06531, Ankara, TÜRKİYE
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK Tunus Cd. No:80 06100, Kavaklıdere /Ankara
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01.04.2004 – 01.04.2006
Öz (en çok 70 kelime) Bu proje kapsamında aldehitlerden başlanarak kimyasal yöntemler kullanılarak biyokatalizörler için substrat olabilecek simetrik ve simetrik olmayan birçok benzoil benzoin ve benzoin fosfonat türevleri sentezlenmiştir. Sentezlenen bu türevlerin değişik mikroorganizma ve enzimlerle reaksiyonları gerçekleştirılmıştır. Bu reaksiyonlar sonucunda enzimatik-kinetik ayrıştırma, dinamik kinetik ayrıştırma ve insitu derasemikleştirme reaksiyonları kullanılarak kiral benzoin türevlerinin yüksek kimyasal ve optik verimle sentezlenmesi için uygun biyokatalizör sistemleri geliştirilmiştir.
Anahtar Kelimeler:

Kiral benzoinler, biyokatalizörler, enansiyoseçici sentezler, yeşil kimya

Projeden Kaynaklanan Yayınlar:

- DEMİR A. S., Reis Ö., İğdir A. Ç., Esiringü İ., Eymür S., Generation of Acyl Anion Equivalents from Acylphosphonates via Phosphonate-Phosphate Rearrangement: A Highly Practical Method for Cross-Benzoin Reaction, *J. Org. Chem.*, 70, 10584-10587, (2005).
- DEMİR A. S., Hamamcı H., Ayhan P., Duygu A. N., İğdir A. Ç, Çapanoğlu D., Fungi mediated conversion of benzil to benzoin and hydrobenzoin, *Tetrahedron: Asymmetry*, 15, 2579-2582, (2004).

Bilim Dalı: Kimya

Doçentlik B. Dalı Kodu: 201