

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BENZOFURANON VE İNDOL TÜREVLERİNİN BİYOKATALİTİK
REZOLÜSYONU**

EDA SOYDAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. ZERRİN ZERENLER ÇALIŞKAN**

İSTANBUL, 2015

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BENZOFURANON VE İNDOL TÜREVLERİNİN BİYOKATALİTİK
REZOLÜSYONU**

Eda SOYDAN tarafından hazırlanan tez çalışması 18.08.2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Zerrin Zerenler ÇALIŞKAN
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Yrd. Doç. Dr. Zerrin Zerenler ÇALIŞKAN
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Semra HASANÇEBİ
Trakya Üniversitesi

Yrd. Doç Dr. Emel ORDU
Yıldız Teknik Üniversitesi

Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' nün 2012-01-07-KAP03 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Tez çalışmalarım süresince bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, karşılaştığım zorluklarla mücadele etmem için beni cesaretlendiren, her konuda yardımını ve ilgisini benden esirgemeyen değerli hocam tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Zerrin ZERENLER ÇALIŞKAN'a;

Mikrobiyal biyotransformasyon çalışmalarımda yardım ve destekleri ile yanımda olan, samimiyetle her sorumu yanıtlayıp, güler yüzlerini esirgemeyen değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Emel ORDU ve Arş. Gör. Dr. Günseli Kurt Gür'e;

Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü ve Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü değerli hocalarıma;

NMR spektral analizlerini yapan, yardım ve dostluğunu esirgemeyen Uzm. Pınar ÇAĞLAR'a;

Aynı laboratuvarıda güzel anılar biriktirdiğim, birçok konuda tecrübe edinmeme katkıda bulunan, yardım ve destekleri ile yanımda olan, değerli arkadaşlarım Tuğba DAYIOĞLU, Tuğba GÜLBAY, Ebru Nur AY ve Hüseyin SERVİ'ye; laboratuvar tecrübesi edinmemde yardımcı olan sevgili arkadaşım Mediha SÜLEYMAOĞLU'na;

Hayatımın her döneminde maddi ve manevi destekleri ile yanımda olan, bana güvenen ve benimle gurur duyan, sabır ve sevgilerini eksik etmeyen, canım aileme;

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ağustos, 2015

Eda SOYDAN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	ix
KISALTMA LİSTESİ.....	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
ÇİZELGE LİSTESİ	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT.....	xvi
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı.....	5
1.3 Hipotez.....	6
BÖLÜM 2	
KİRALİTE VE KURAMSAL TERİMLER.....	7
2.1 Kiralılık	7
2.2 Stereoizomer ve Stereoizomerlerin Özellikleri.....	8
2.2.1 Enantiyomerler	8
2.2.2 Diastereoizomer	9
2.3 Polarimetre ve Optikçe Aktivite.....	9
2.4 Rasemik Karışım.....	9
2.5 Enantiyomerlerin Biyolojik Etkileri	10
2.5.1 Distomerin Ciddi Yan Etkiler Göstermediği İlaçlar	10
2.5.2 Distomerin Yan Etkiler Gösterdiği İlaçlar.....	11
2.5.3 Her İki İzomerin Bağımsız Tedavi Edici Etkiye Sahip Olduğu İlaçlar ...	11
2.5.4 Her İki İzomerin Tedavi İçin Avantaj Sağladığı İlaçlar	12
2.6 Kiralitenin Biyolojik Önemi ve Kiral İlaçlar.....	12
2.7 Enantiyomerik Olarak Saf Bileşiklerin Elde Edilme Yöntemleri	15
2.7.1 Doğal Kaynaktan İzolasyon ile Elde Etme	15
2.7.2 Asimetrik Sentez	15

2.7.2.1	Kiral Başlangıç Substratı	16
2.7.2.2	Optikçe Aktif Kiral İndüksiyon Yöntemi	16
2.7.2.3	Kiral Reaktif Yöntemi.....	17
2.7.2.4	Kiral Katalizör Yöntemi.....	17
2.7.2.5	Kiral Çevre	18
2.8	Rasemik Karışımların Rezolüsyonu	18
2.8.1	Tercihli Kristalizasyon	18
2.8.2	Diastereomerik Tuzların Kristalizasyonu	19
2.8.3	Kromatografi.....	19
2.8.4	Kinetik Rezolüsyon.....	19
2.9	Derasemizasyon Prosesleri.....	21
2.9.1	Enantiyodönüşüm Prosesi	22
2.9.2	Dinamik Kinetik Rezolüsyon	22
2.9.3	Stereoinvertasyon.....	23
BÖLÜM 3		
BİYOTRANSFORMASYON		24
3.1	Biyotransformasyonun Tanımı	24
3.2	Biyotransformasyonun Tarihçesi	25
3.3	Biyotransformasyonun Özellikleri ve Kimyasal Tepkimlere göre Avantajları	25
3.4	Biyotransformasyon Teknikleri.....	26
3.4.1	Büyüyen Hücreler ile Biyotransformasyon.....	26
3.4.2	Stasyonere Hücreler ile Biyotransformasyon.....	27
3.4.3	Sporlar ile Biyotransformasyon	27
3.4.4	İmmobilize Hücreler ile Biyotransformasyon	27
3.4.5	Serbest ve İmmobilize Enzimler ile Biyotransformasyon	27
3.5	Başlıca Biyotransformasyon Reaksiyonları.....	27
3.6	Biyotransformasyon Reaksiyonlarını Etkileyen Faktörler.....	28
BÖLÜM 4		
BİYOKATALİZÖRLER.....		29
4.1	İzole Enzimler.....	29
4.2	Bütün Hücre Sistemleri	30
4.2.1	Canlı Bitki, Bitki Doku ve Hücre Kültürü	30
4.2.2	Canlı Hayvan, Hayvan Doku ve Hücre Kültürleri	30
4.2.3	İnsan Metabolizması.....	30
4.2.4	Mikroorganizmalar	30
BÖLÜM 5		
ENZİMLER.....		32
5.1	Enzimlerin Yapısı.....	32
5.2	Enzimlerin Çalışma Mekanizması ve Enzim Kinetiği	33
5.3	Enzimlerin Özellikleri	34

5.4	Enzimlerin Sınıflandırılması	35
5.4.1	Oksidoredüktazlar (EC 1):	35
5.4.2	Transferazlar (EC 2):	35
5.4.3	Hidrolazlar (EC 3):	35
5.4.4	Liyazlar (EC 4):.....	36
5.4.5	İzomerazlar (EC 5):.....	36
5.4.6	Ligazlar (EC 6):	36
5.5	Lipazlar.....	36
5.5.1	Lipazların Kullanım Alanları	39
5.5.2	Lipaz Enziminin Aktivitesi	41
5.5.3	Organik Solventlerde Lipaz Enziminin Uygulanabilirliği	43
 BÖLÜM 6		
MİKROORGANİZMALAR		44
6.1	Bakteriler	46
6.1.1	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	46
6.1.2	<i>Bacillus subtilis</i>	46
6.2	Funguslar	47
6.2.1	Makroskobik Funguslar (Şapkalı mantarlar).....	47
6.2.2	Tek Hücreli Funguslar (Mayalar).....	48
6.2.3	Filamentli Funguslar (Küfler)	48
6.2.3.1	<i>Hypocrea jecorina</i>	48
6.2.3.2	<i>Aspergillus niger</i>	49
6.3	Mikrobiyal Biyotransformasyon Örnekleri	51
 BÖLÜM 7		
MANGAN (III) ASETAT REAKSİYONLARI		56
7.1	Mangan (III) asetat ve Mangan (III) asetat Reaksiyonlarının Önemi	56
7.2	Mangan(III) asetat Ortamında Enonların Asetoksillenmesi	57
7.3	Mangan(III) asetat Oksidasyon Reaksiyonları	58
7.3.1	Doğrudan Oksidasyon.....	58
 BÖLÜM 8		
BİYOAKTİF MOLEKÜLLER.....		60
8.1	α -Hidroksi Ketonlar.....	60
8.2	Benzofuranon Türevleri	61
8.3	İndol Türevleri.....	63
 BÖLÜM 9		
MATERYAL METOD		67
9.1	Kullanılan Kimyasallar, Lipaz Enzimleri, Mikroorganizmalar	67
9.2	7,7-Dimetil-6,7-dihidrobenezofuran-4(5H)-on Sentezi	72
9.3	Mangan (III) Asetat Katalizörü ile 4,5,6,7-Tetrahidro-4-okso-7,7-dimetil benzo-furan-5-il asetat Sentezi.....	73

9.4	Seal Tüp Reaksiyonu ile 1-Benzil-6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7-dimetil-1H-indol-4(5H)-on Sentezi.....	74
9.5	Biyotransformasyon Reaksiyonları	76
9.5.1	Lipaz Katalizli Reaksiyonlar	76
9.5.1.1	4,5,6,7-Tetrahidro-4-okso-7,7-dimetil benzofuran-5-il asetat bileşiği'nin Lipaz Katalizli Reaksiyonları	76
9.5.1.2	1-Benzil-6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7-dimetil-1H-indol-4(5H)-on Bileşiği'nin Lipaz Katalizli Reaksiyonları	76
9.5.2	Mikrobiyal Biyotransformasyon Reaksiyonları.....	77
9.5.2.1	<i>Bacillus subtilis</i> ile Biyotransformasyon.....	77
9.5.2.2	<i>Agrobacterium rhizogenes</i> ile Biyotransformasyon	78
9.5.2.3	<i>Hypocrea jecorina</i> ile Biyotransformasyon	80
9.5.2.4	<i>Aspergillus niger</i> ile Biyotransformasyon	82
9.6	Reaksiyon Rotası.....	84
BÖLÜM 10		
SONUÇ VE ÖNERİLER		85
10.1	Benzofuranon Türevlerinin Sentezi	85
10.2	İndol Türevlerinin Sentezi.....	88
10.3	Biyotransformasyon Reaksiyonlarının Sonuçları	90
10.3.1	Lipaz Katalizli Reaksiyonların Sonuçları	90
10.3.1.1	4,5,6,7-Tetrahidro-4-okso-7,7-dimetil benzofuran-5-il asetat Bileşiğinin Lipaz Katalizli Reaksiyonları	91
10.3.1.2	1-Benzil-6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7-dimetil-1H-indol-4(5H)-on Bileşiğinin Lipaz Katalizli Reaksiyonları	93
10.3.2	Mikrobiyal Biyotransformasyon Sonuçları	96
KAYNAKLAR.....		103
EK-A		
7,7-Dimetil-6,7-dihidrobenezofuran-4(5H)-on BİLEŞİĞİNİN SPEKTRAL ANALİZ SONUÇLARI (¹ H-NMR, ¹³ C-NMR ve IR).....		113
EK-B		
4,5,6,7-Tetrahidro-4-okso-7,7-dimetil benzofuran-5-il asetat BİLEŞİĞİNİN SPEKTRAL ANALİZ SONUÇLARI (¹ H-NMR, ¹³ C-NMR ve IR)		117
EK-C		
1-Benzil-6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7dimetil-1H-indol-4(5H)-on BİLEŞİĞİNİN SPEKTRAL ANALİZ SONUÇLARI (¹ H-NMR, ¹³ C-NMR ve IR)		121
EK-D		
6,7-Dihidro-5-hidroksi-7,7dimetil-1H-indol-4(5H)-on BİLEŞİĞİNİN SPEKTRAL ANALİZ SONUÇLARI (¹ H-NMR, ¹³ C-NMR, IR ve LC- MS Q-TOF).....		125
ÖZGEÇMİŞ.....		130

SİMGE LİSTESİ

α	Alfa
atm	Atmosfer Basıncı
β	Beta
γ	Gamma
g	Gram
C	Konsantrasyon
dk	Dakika
Hz	Hertz
L	Litre
MHz	Megahertz
μ	Mikro
μ l	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
μ mol	Mikromol
mg	Miligram
ml	Mililitre
M	Molar
nm	Nanometre
°C	Santigrat derece

KISALTMA LİSTESİ

AL	Amano lipazı
AOL	<i>Aspergillus oryzae</i> lipazı
AsL	<i>Aspergillus sp.</i> lipazı
BL	<i>Burkholderia</i> lipazı
CAL	<i>Candida antarctica</i> lipazı
ee	Enantiomeric excess (Enantiomerik fazlalık)
EtOAC	Etilasetat
D	Dekstro
DMAP	4-dimetilaminopiridin
DMSO	Dimetilsülfoksit
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPL	Hog pancreas lipazı
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi (TLC: Thin Layer Chromatography)
L	Levorotary
Mn	Mangan
MgSO ₄	Magnezyum sülfat
MJL	<i>Mucor javanicus</i> lipazı
KMnO ₄	Potasyum permanganat
R	Rektus (Sağ)
ROL	<i>Rhizopus oryzae</i> lipazı
PDA	Potato dextrose agar
PFL	<i>Pseudomonas flourescens</i> lipazı
S	Sinister (Sol)
NaHCO ₃	Sodyum bikarbonat
THF	Tetrahidrofuran
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
WGL	Buğday ruşeym lipazı (Wheat Germ Lipase)
YMA	Yeast mannitol agar
YMB	Yeast mannitol broth

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Sol el ve onun ayna görüntüsü sağ el.....	7
Şekil 2.2 Kiral ve Akiral Cisimler.....	8
Şekil 2.3 Karvon Bileşiğinin iki enantiyomeri.....	9
Şekil 2.4 Rasemik karışım	10
Şekil 2.5 Propanolol ve Noradrenalin	11
Şekil 2.6 Ketamin	11
Şekil 2.7 Propoksifen	12
Şekil 2.8 Talidomit	13
Şekil 2.9 Hecogenina'nın steroide dönüşümü [74]	15
Şekil 2.10 Kiral substratlarla kiral bileşiğin sentezi	16
Şekil 2.11 Yeni kiral molekül sentezi	17
Şekil 2.12 Akiral bir maddenin, kiral reaktif ile kiral maddeye dönüşümü	17
Şekil 2.13 Akiral bir maddenin kiral katalizör ile kiral maddeye dönüşmesi.....	17
Şekil 2.14 Kinetik rezolüsyonun gerçekleşmesi ($k_r \neq k_s$).....	20
Şekil 2.15 Derasemizasyon prosesleri [79].....	21
Şekil 5.1 Enzimlerin çalışma mekanizması	33
Şekil 5.2 Lipaz katalizli reaksiyonların şeması	39
Şekil 5.3 Lipaz ve esteraz aktivite grafiği	42
Şekil 5.4 DMAP Molekülü	43
Şekil 6.1 <i>A.niger</i> organizması.....	50
Şekil 6.2 Kortizon üretiminde ilk reaksiyon olan progesterondan, 11 α -hidroksiprogesteron oluşumu	51
Şekil 6.3 Nocardia sp. 108 ile indol-3-asetamid sentezi	52
Şekil 6.4 Rhizopus oryzae ile derasemizasyon prosesi	52
Şekil 6.5 <i>Agrobacterium sp.</i> biyotransformasyonu	53
Şekil 6.6 Triptofan'ın mikrobiyal biyotransformasyonu	53
Şekil 6.7 Benzil türevinin mikrobiyal biyotrasformasyonu	54
Şekil 6.8 İndol molekülünün <i>A. niger</i> ile degradasyonu	54
Şekil 7.1 α,β -Doymamış ketonların α -asetoksillenmesi	58
Şekil 7.2 Mangan(III) asetatın dolaylı oksidasyon mekanizması	59
Şekil 8.1 Benzofuranon Bileşiği	62
Şekil 8.2 İndol Bileşiği	63
Şekil 9.1 7,7-dimetil-6,7-dihidrobenezofuran-4(5H)-on Sentezi.....	72

Şekil 9.2	4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-7,7-dimetil benzofuran-5-il asetat Sentezi	74
Şekil 9.3	1-benzil-6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7dimetil-1H-indol-4(5H)-on sentezi	75
Şekil 9.4	4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-7,7-dimetil benzofuran-5-il asetat bileşiği'nin lipaz katalizli reaksiyonları.....	76
Şekil 9.5	1-benzil-6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiği'nin lipaz katalizli reaksiyonları	77
Şekil 9.6	Reksiyon Rotası	84
Şekil 10.1	7,7-dimetil-6,7-dihidrobenezofuran-4(5H)-on bileşiğinin İTK sonucu.....	86
Şekil 10.2	4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-7,7-dimetil benzofuran-5-il asetat bileşiğinin İTK sonucu	87
Şekil 10.3	1-benzil-6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin İTK sonucu	89
Şekil 10.4	4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-7,7-dimetil benzofuran-5il asetat bileşiğinin Lipaz Katalizli Reaksiyonlarının İTK sonuçları	91
Şekil 10.5	1-benzil-6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7-dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin Lipaz Katalizli Reaksiyonlarının İTK sonuçları	94
Şekil 10.6	<i>A. niger</i> büyüyen hücre kültür ortamı	97
Şekil 10.7	6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin sentezi	97
Şekil 10.8	6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin İTK sonucu... ..	98
Şekil 10.9	Substrat içeren biyotransformasyon ortamında <i>A. niger</i> organizmasının ürettiği renk pigmentlerinin TLC sonucu	100

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2.1	Tedavi edici özellikte çeşitli kiral ilaç örnekleri [73]..... 14
Çizelge 5.1	Mikrobiyal Kaynaklı Lipazlar..... 37
Çizelge 5.2	Lipazların endüstride kullanım alanlarından bazıları 40
Çizelge 9.1	Kemosentez reaksiyonlarda kullanılan lipaz enzimleri ve marka kodları 68
Çizelge 9.2	Mikrobiyal biyotransformasyon çalışmalarında kullanılan mikroorganizmalar..... 68
Çizelge 9.3	Kullanılan kimyasallar ve marka kodları..... 69
Çizelge 9.4	YMA besiyeri içeriği..... 79
Çizelge 9.5	YMB besiyeri içeriği..... 79
Çizelge 9.6	YS25 besiyeri içeriği..... 81
Çizelge 10.1	4,5,6,7-Tetrahidro-4-okso-7,7-dimetil benzofuran-5-il asetat bileşiğinin lipaz katalizli reaksiyon sonuçları..... 92
Çizelge 10.2	1-Benzil-6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7-dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin lipaz katalizli reaksiyon sonuçları..... 94
Çizelge 10.3	6,7-Dihidro-5-hidroksi-7,7dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin LC-MS Q-TOF spekturum pik listesi. (Şekil D.4) 99
Çizelge 10.4	Mikrobiyal biyotransformasyon sonuçları 101

BENZOFURANON VE İNDOL TÜREVLERİNİN BİYOKATALİTİK REZOLÜSYONU

Eda SOYDAN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Zerrin ZERENLER ÇALIŞKAN

Biyolojik aktiviteleri nedeni ile ilaç öncü ve ara maddelerinden olan benzofuranon ve indol türevlerinin sentezi bilimsel alanda ve ilaç sanayinde oldukça önem taşımaktadır. Benzofuranon ve indol türevi bileşiklerin kimyasal olarak yüksek saflık ve seçicilikte sentezlenmesi oldukça zordur. Enzimler ve mikrobiyal hücreler ile biyolojik aktivitesi yüksek olan enantiomerik saflıkta benzofuranon ve indol türevlerinin biyotransformasyon ile kolay bir şekilde sentezlenmesi ilaç endüstrisi için büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmada ilk olarak 7,7-dimetil-6,7-dihydrobenzofuran-4(5H)-on bileşiğinden başlanarak regioselektif asetoksilasyon ile farmakolojik açıdan önemli bir molekül olan 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-7,7-dimetil benzofuran-5-il asetat bileşiğinin iki enantiyomeri kemoenzimatik olarak sentezlenmiştir. Enzim katalizli kinetik rezolüsyon ile rasemik asetoksi türevleri yüksek enantiyomerik fazlalıkla asetoksi ve hidroksi türevlerine dönüşmüştür. Çalışmanın ikinci basamağında 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-7,7-dimetil benzofuran-5-il asetat bileşiği benzil amin varlığında indol türevine dönüştürülmüş sonrasında enzimatik kinetik rezolüsyonu gerçekleştirilmiştir. α -asetoksi ve α -hidroksi indol türevleri yüksek verim ve yüksek enantiyomerik fazlalıkla elde edilmiştir. Ayrıca, farmakolojik olarak önemli olan 6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiği mikroorganizmalar kullanılarak biyotransformasyon ile elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Benzofuranon, indol, lipaz, mikroorganizma, biyotransformasyon

ABSTRACT

BIOCATALYTIC RESOLUTIONS OF BENZOFURANONE AND INDOLE DERIVATIVES

Eda SOYDAN

Department of Molecular Biology and Genetics

MSc. Thesis

Adviser: Asist Prof. Dr. Zerrin ZERENLER CALISKAN

Drug precursors and intermediates leading to the synthesis of benzofuranone and indole type derivatives are very important field of science and pharmaceutical industry since their biological activities. Chemical synthesis of pure and enantioselective benzofuranone and indole derivatives are very difficult. It is important to synthesize easily enantiomerically pure benzofuranone and indole derivatives with high biological activity using biotransformation methods as enzymes and microbial cells for drug industry.

In this study, first of all the chemoenzymatic synthesis of both enantiomers of pharmacologically interesting compound such as 4,5,6,7-tetrahydro-4-oxo-7,7-dimethyl benzofuran-5-yl acetate is synthesized starting from 7,7-dimethyl-6,7-dihydrobenzofuran-4(5H)-one by regioselective acetoxylation reaction. Enzyme catalyzed kinetic resolution of this racemic acetoxy derivative furnished the corresponding enantiomers of acetoxy and hydroxy derivatives in high enantiomeric excesses. In the second part of the study, 4,5,6,7-tetrahydro-4-oxo-7,7-dimethyl benzofuran-5-yl acetate is converted its indole derivative via benzyl amine, then enzyme-mediated kinetic resolution is applied. The α -acetoxy and α -hydroxy indole derivatives are obtained in good yields and high enantiomeric excesses.

Furthermore, in this study the biotransformation of pharmacologically interesting compound such as 6,7-dihydro-5-hydroxy-7,7dimethyl-1H-indol-4(5H)-on is also obtained by using microorganisms.

Keywords: Benzofuranone, indole, lipase, microorganisims, biotransformation

1.1 Literatür Özeti

Benzofuranon ve indol türevleri biyolojik aktiviteleri yüksek olan bileşiklerdir. Özellikle ilaç kimyası çalışmaları benzofuranon moleküllerinin biyolojik aktivitelerinin çok çeşitli olduğunu göstermektedir[1],[2]. Benzofuranon türevleri; gram pozitif ve gram negatifler üzerinde antibakteriyal [1], [3], [4], antifungal [1], [5], antimalaryal [6], [7], antiinflamatuvar [1], anti-HIV [8], [9], antitümör, antikanser [1], [10], [11], [12], [13], antioksidant [14], sitotoksik [11], antialzheimer [15], multi ilaç düzenleyici aktivite [16], antiülser, antidepresan gibi çeşitli aktiviteler göstermektedir[1], [17], [18], [19]. Benzofuranon türevlerinin biyolojik aktivite göstermelerinin yanı sıra ilaç sentezlerinde de aracı moleküller oldukları bilinmektedir. Önemli biyolojik aktiviteleri olan indol bileşiklerinin sentezinde de öncü molekül olarak benzofuranonlar kullanılmaktadır. [20].

Farmakoloji alanında çok önemli olan heterohalkalı aromatik bileşiklerden biri olan indoller, ilaç kimyasından tarım kimyasallarına kadar, doğal ve sentetik pek çok kimya ürünlerinde çok fazla kullanılmaktadır. İndol çekirdeği çok sayıda biyolojik ve endüstriyel moleküller için iskelet olarak görev almaktadır. Bilindiği gibi indol halkası içeren bileşiklerin farklı aktivitelere ve özellikle de antikanser aktiviteye sahip oldukları bilinmektedir[21], [22], [23], [24], [25], [26], [27], [28], [29], [30], [31], [32]. Antikanser aktivitesinin dışında indol çekirdeğinin ve indol türevlerinin; antifungal [33], [34], [35], antibakteriyal [33], [34], [35], [36], [37], [38], antiviral [39], [40], anti-HIV

[41], antioksidant, antiinflamatuvar, gibi çeşitli aktivitelerinin de bulunduğu literatürde yer almaktadır. İsatın ve indol oksimes'in antiviral aktivite, indol-3-asetik asitin antiinflamatuvar aktivite, 2-substitüe, 3-substitüe indollerin oksimes türevlerinin fungisidal aktivite, 3-aril ve 3-heteroaril indollerin antibakteriyal aktivite, yeni pirimido (5,4-b) indollerin antikanser ve anti HIV aktivite, çeşitli indol türevlerinin antioksidan aktivite ve 1H-indol-2,3-dion türevlerinin ise antitüberküloz aktivite gösterdiği belirtilmiştir [42].

İnsan sağlığı üzerinde olumlu biyolojik aktiviteleri bulunan ilaç öncü ve ara maddeleri olan indol türevleri, α hidroksi ketonlar ve benzofuranon türevleri gibi bileşiklerin, kiral olarak eldesi bunun yanı sıra ürünlerin enantiomerik olarak saflaştırılması için biyoteknolojik yöntemlerin kullanılması farmakolojide sıklıkla çalışılan konulardır[43].

Biyotransformasyon, biyolojik sistemlerin veya enzimlerin katalizör olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilen, kimyasal dönüşüm reaksiyonlarıyla endüstriyel öneme sahip bileşiklerin elde edilmesi yöntemidir. Biyotransformasyon yönteminde biyolojik sistem olarak mikroorganizma ya da bunlardan izole edilmiş enzimler kullanılmaktadır. Biyokatalizörler, optikçe aktif bileşiklerin en önemli stereoseçici ayırıcılarından biridir [44]. Kimya ve ilaç endüstrisinde enantiomerik saf ara ürün eldesi, ürün verimliliği ve ekonomik ürün eldesi amacıyla biyotransformasyon reaksiyonlarından faydalanılmaktadır. Biyotransformasyon sürecinde gerçekleştirilen reaksiyon türlerinden bazıları oksidasyon, dehidrasyon, hidroliz, indirgenme tepkimeleri, C-C bağlarının koparılması ve esterleşme reaksiyonlarıdır [45]. İlaç etken maddesi özelliğine sahip moleküllerin içerdiği fonksiyonel grupların stereo kimyası, ilaçların etkinliği bakımından çok önemlidir. Etkin bir ilacın farmakolojik aktivitesi için kiral merkez etrafında dizili olan sübstitüe grupların konfigürasyonu ve etkinliği son zamanlarda araştırılan konular arasındadır. İlaç etken maddelerinin seçiminde biyolojik aktivitesi fazla olan kiral maddeler üzerinde durulur [46]. Bu maddeler kimyasal yöntemlerle rasemik karışım halinde sentezlenirler. Tedavi edici etkiler ise genellikle sadece bir enantiyomerde bulunmakta ve bu moleküllerin hazırlanmasında çoğu zaman rasemik bir karışım sağlayan güncel kimyasal yöntemler yetersiz kalmaktadır. Rasemik karışım halinde bulunan maddelerin bir formu tedavi edici özellikteyken, diğer formunun yan etkilerinin olduğu görülmüştür. Özellikle 1960'lardaki talidomit felaketiyle diğer

enantiyomerlerin yan etkisi hatta toksik olabileceği anlaşılmıştır. Bu nedenle spesifik enantiyomerin üretimi ilaç endüstrisinde önemlidir. Rasemik karışımlardan biri tedavi edici özellikte olabilirken diğer formunun aktivitesi ya hiç yoktur ya da toksik özelliktedir [47]. İlaçların rasemik olarak kullanılmasında, vücuda alınması gereken birim miktardaki etken maddeyi karşılamak için iki kat rasemik karışım almak gerekmektedir. Bu şekilde kaynakların ve ürünün yarısının boşa harcanması ekonomik açıdan istenmeyen bir durumdur. Bu yüzden tek bir enantiyomer her zaman için rasemik karışıma göre daha fazla tercih edilir. Bu sebeple bileşiklerin enantiomerikçe saf olarak elde edilmesi gerekmektedir[48], [49]. Biyoaktif moleküllerin tek enantiyomerlerinin eldesinde kullanılan biyotransformasyon reaksiyonlarında lipaz enzimi çok fazla tercih edilen bir biyokatalizördür. Lipazlar, rasemik karışımlardan, prokiral veya mezokiral bileşiklerin; ya da diastomerik karışımlardan enantiomerik olarak saf bileşiklerin hazırlanmasında geniş ölçüde kullanılmaktadırlar [50]. *Pseudomonas cepacia*'dan alınan lipazlar, % 70-83 gibi yüksek verimde karboksilik asidin doğrudan esterifikasyonunu yapabilmektedir [51]. *Candida antarctica* lipaz enzimi, organik çözücülerde transesterifikasyon reaksiyonlarını çok verimli olarak katalizlemektedir [21]. Çok fonksiyonlu organik bileşiklerin bölgesel seçimli modifikasyonu, özellikle AIDS tedavisi alanında lipaz uygulamasının yine hızla genişleyen diğer bir alanıdır [52], [53].

Enzimler, birçok biyotransformasyon çalışmasında başarıyla kullanılmasına rağmen biyotransformasyon çalışmalarında saf enzim yerine daha çok mikrobiyal hücreler tercih edilmektedir. Bu tercihin sebebi, mikrobiyal hücrelerin stabil kofaktör sistemlerinin olması, yüksek verimde çalışmaları, çok çeşitli moleküllerde etkili olmalarıdır. Örneğin; *Rhizopus arrhizus* ketonlar ve keto esterler üzerinde çalışılmış ve stereoseçiciliği gösterilmiş olan bir mikroorganizmadır[54]. İndolin-2-on, indol türevlerinin sentezi için kullanışlı olan bir öncü maddedir. İndol-2-on'nun enzim katalizli kemoselektif asetilasyonu *Candida antarctica* mikroorganizması ile verimli bir şekilde yapılmıştır [21]. *Caldarimycetes fumago* küfünde bulunan kloroperoksidazın H₂O₂ varlığında indol molekülünü indoksile ve bazı mantar türlerinde de kloroperoksidazın indolü oksiindole çevirdiği [55]. *Beauveria bassiana* ve *Aspergillus niger* mantarlarının 3-indolylaacetonitril ve triptamin dönüşümünü gerçekleştirdiği gösterilmiştir [56].

Biyodegradasyon özellikleri sayesinde *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Mucor* türü mantarlar zenobiyotik substratların biyodönüşümü ve hidroksilasyon katalizinde ve enantiomerikçe saf ara ürünler oluşturma kapasiteleri ile farmasötik eldesindeki biyodönüşüm çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır [57], [58]. *Aspergillus niger* organizması biyodegradasyon çalışmalarında çevre kirleticilerinin etkisini daha az indirmek için de kullanılmaktadır. Çevre için toksik olabilen İndol molekülünün *A.niger* ile degradasyonu sonucu çeşitli ürünlerin oluştuğu raporlanmıştır [59]. *S.cerevisiae* anaerobik koşullarda üretilebilme, hücre duvarının yapısı sayesinde kimyasal ve organik çözücülere, düşük pH'lara ve endüstriyel fermentasyonda kontaminasyon riskini azaltan yüksek şeker ve etanol konsantrasyonlarına tolerans gösterebilme özelliği sayesinde biyodönüşüm reaksiyonlarında kullanılabilen bir organizmadır [60], [61]. Romano ve ark. tarafından çeşitli *Acetobater* ve *Gloconobacter* türleri farklı primer alkollerin ve kiral diollerin biyotransformasyonunu başarıyla gerçekleştirmiştir. *Nocardia* grubu bakteriler karboksilik asit ve aldehid redüksiyonu, fenol metilasyonu gibi geniş enzimatik kapasiteleri nedeniyle çeşitli biyotransformasyon araştırmalarında tercih edilmişlerdir. Anti- HIV ve anti kanser aktiviteleri olan tripen asit, ursolik asit, oleanolik asit gibi pentasiklik asitlerin enantioselektif biyotransformasyonu sağladıkları gösterilmiştir [62]. İndollerin ketonizasyonu ve hidroksilasyonu için *Pseudomonas indologidans*, *P. putida*, *P. mendocina* bakterilerinin, *Sphingomonas* ve *Chromobacterium* cinsi çeşitli bakteri türlerinden yararlanıldığı bilinmektedir. Bakterilerde çok sayıda enzimin bazı indol bileşiklerini okside edebildiği ve bunların çoğunlukla aromatik monooksidazlar, aromatik dioksigenazlar ve peroksidazlara ait olduğu tanımlanmıştır [55].

Birçok bakteri ve fungus türleri ile bütün hücre biyodönüşümü gerçekleştirmek mümkündür. Enzimatik aktivitelerinden dolayı biyoaktif moleküllerin üretimi için birçok farklı dönüşüm mekanizması uygulanabilir. Mikrobiyal transformasyon için hücreler genellikle canlı olmak zorunda değildir. Hatta büyüyen hücre yerine dinlenen hücre ile çalışmak daha avantajlı olabilir. Ayrıca biyoteknoloji alanındaki gelişmeler doğrultusunda rekombinant olarak üretilen strainlerdeki enzimlerin, yabancıl tip mikroorganizmalara göre daha yüksek verimde çalıştıkları görülmüştür [63]. Bir indol molekülü üzerinde mutant *Pseudomonas mendocina* ile madde biyodönüşümü

gerçekleştirilerek, indol molekülünün biyolojik transformasyonu sağlanmıştır [64]. α,β -unsature sistemlerde rekombinant *E.coli* ile gerçekleştirilen mikrobiyal biyotransformasyon çalışmalarında olumlu sonuçlar [65], [66]. Örneğin, biyokatalizör olarak kullanılan rekombinant *E.coli* hücreleriyle bir keton türevinin mikrobiyal biyodönüşümü gerçekleştirilmiştir [63]. Enantiyomerik olarak saf kimyasalların üretimi gıda, tarım ilaçları ve ilaç sanayi için oldukça önemlidir. Biyokatalizör kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyonlar, ihtiyaç duyulan ürünün yüksek saflıkta sentezi için etkin yöntemlerdendir. Kimyasal sentez yolları ile karşılaştırıldıklarında, işlem basamaklarının azlığı, ılımlı reaksiyon şartları, kolaylığı ve yüksek seçiciliği biyotransformasyonun avantajlarından ve kullanımı için tercih sebeplerindendir.

1.2 Tezin Amacı

Biyotransformasyon, biyolojik sistemlerin veya enzimlerin katalizör olarak kullanılması ile gerçekleştirilen kimyasal dönüşüm reaksiyonları ile endüstriyel öneme sahip bileşiklerin elde edilmesi yöntemidir. Biyoteknolojik çalışmaların önemli bir alanını oluşturan biyotransformasyon reaksiyonları ilaç, kozmetik, gıda ve enerji sanayii gibi pek çok alanda kullanılmaktadır. Ayrıca çevre sorunlarının giderilmesi amacı ile toksik endüstriyel atıkların yıkımı, atık suların temizlenmesi ve geri kazanılması gibi çalışmalarda da etkin olarak kullanılmaktadır [44].

Farmakoloji alanında kiral merkezli moleküllerin sentezi kimyasal yöntemlerle gerçekleştirildiğinde rasemik karışımlar elde edilirken, biyokatalizör kullanılarak yapılan biyotransformasyon reaksiyonlarında enantiyomerik saflıkta ürünler elde edilebilir [50]. İnsan sağlığı üzerinde olumlu etkileri saptanan ilaç öncü ve ara maddeleri olan indol türevleri, α hidroksi ketonlar ve benzofuran türevleri gibi bileşiklerin, kiral olarak eldesi ya da ürünlerin enantiyomerik olarak saflaştırılması, farmakolojide giderek artan araştırmalar arasındadır. Bu moleküller yalnızca ilaç sanayinde değil, zirai kimyasallar, tat ve koku vericiler, kozmetik ürünler ve insektisitlerde de sıklıkla kullanılmaktadır.

Antitümör, antiülser, antidepresan, antifungal, antibakteriyal, antioksidan, antiinflamatuar ve antibiyotik gibi çeşitli biyoaktiviteleri bulunan benzofuranon ve indol türevi bileşiklerin [1], [5], [8], [22], [33], [39] optikçe saf ve seçici olarak sentezlenmesi oldukça zordur. Bu projede amaçlanan zor metodlarla sentezlenen

optikçe saf, öncü ilaç hammaddeleri verebilecek yeni benzofuranon ve indol türevlerinin enzimler yardımı ile yüksek enantiomerik saflıkta, biyoteknolojik ve kimyasal yöntemlerle, yüksek verim ve seçicilikte sentezlenmesidir. Bunun yanında mikrobiyal reaksiyonlarla yeni indol türevlerinin biyodönüşüm reaksiyonları ile sentezi ve indol bileşiklerinin mikroorganizmalar üzerindeki değişimlerin incelenmesi de amaçlarımız arasındadır.

1.3 Hipotez

İlaç öncü ve ara maddelerinden olan benzofuranon, indol ve α -hidroksi ketonlar çeşitli biyolojik aktiviteler gösteren bileşiklerdir. Biyoaktif benzofuranon ve indol molekülleri doğal kaynaklardan izole edilebildikleri gibi kimyasal olarak da sentezlenebilmektedir. Ancak benzofuranon ve indol türevi bileşiklerin kimyasal olarak yüksek saflık ve seçicilikte sentezlenmesi oldukça zordur. Kiral merkezli moleküllerin sentezi kimyasal yöntemlerle gerçekleştirildiğinde rasemik karışımlar elde edilirken, biyokatalizör kullanılarak yapılan sentez reaksiyonları enantiomerik saflıkta ürün elde edilmesine imkan vermektedir. Mikroorganizma veya enzimlerin biyokatalizör olarak kullanılması ile benzofuranon ve indol türevi bileşikler optikçe aktif olarak sentezlenmektedir.

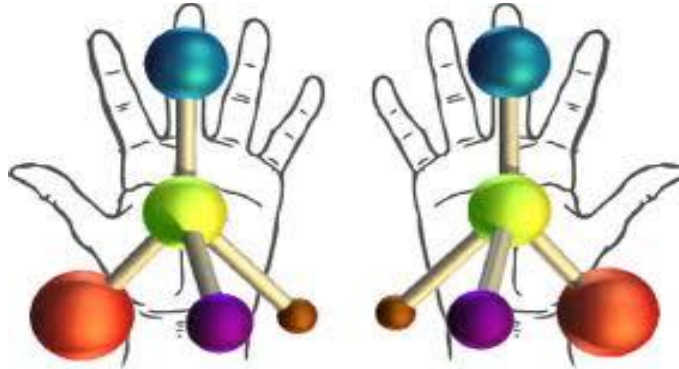
Bu çalışmada ön görülen hipotez:

- 1- Rasemik karışım halinde sentezlenen benzofuranon ve indol türevlerinin, çeşitli kaynaklardan izole edilen lipaz enzimi katalizörlüğünde ve çeşitli organik çözücüler varlığında enantiyo saf olarak elde edilmesi ayrıca en yüksek ee değerini veren çözücü ve lipaz enziminin bulunması.
- 2- İndol türevi bileşiğin farklı mikroorganizmalar (küf, bakteri) ile biyodönüşüm reaksiyonunun incelenmesi ve yeni indol türevlerinin elde edilmesi. Biyodönüşüm reaksiyonlarını gerçekleştiren mikroorganizmaların saptanması. Biyokatalizör olarak kullanılan mikroorganizmalar üzerinde substrat etkisinin incelenmesi.
- 3- Tüm basamaklar için reaksiyon koşullarının optimizasyonu ve sentezlenen tüm bileşiklerin spektral yöntemlerle yapısının tayini.

KİRALİTE VE KURAMSAL TERİMLER

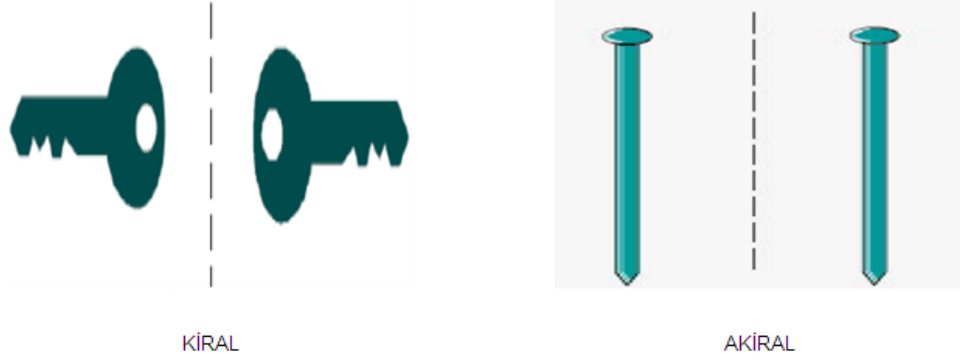
2.1 Kirallik

Kiral sözcüğü Yunanca'da el anlamına gelen cheiros kelimesinden türemiştir. Kiral terimini ilk olarak Lord Kelvin kullanmıştır [52]. Ayna görüntüsü ile üst üste çakışmayan nesneler ve özellikle moleküller kiraldır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Sol el ve onun ayna görüntüsü sağ el

sp^3 hibritleşmesine uğramış tetrahedral bir karbon atomu eğer dört farklı substitüent taşıyorsa üst üste çakışmaz. Bu molekül kiral olarak isimlendirilir. Kiral moleküller, molekül içi simetri düzlemi içermediğinden asimetric yapıdadırlar. Eğer bir molekül simetri düzlemine sahipse kiral olmaz. Böyle bir cismin veya molekülün ayna görüntüsü üst üste çakışır ve akiral (Şekil 2.2) olarak isimlendirilir [52].



Şekil 2.2 Kiral ve Akiral Cisimler

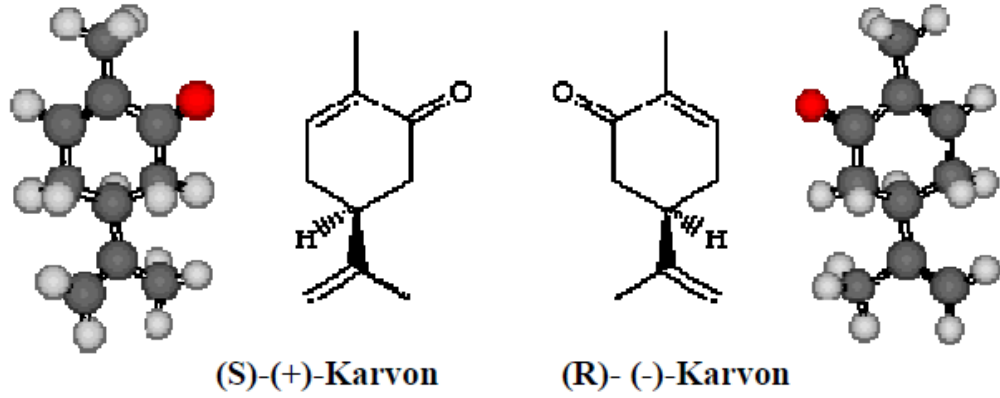
2.2 Stereoizomer ve Stereoizomerlerin Özellikleri

Stereoizomerler aynı molekül formülüne sahip atom veya atom gruplarının bağlantılarının aynı olduğu fakat uzaydaki dizilişlerinin farklı olduğu bileşiklerdir. Enantiyomerler ve diastereoizomerler olarak iki sınıfta incelenirler [68].

2.2.1 Enantiyomerler

Bir molekül ile onun ayna görüntüsü olan ve üst üste çakışmayan stereoizomere enantiyomer denir. Enantiyomerlerden biri ışık düzlemini sağa çevirirken, diğeri sola çevirir. Enantiyomerlerin, fiziksel ve kimyasal özellikleri aynıdır. Aynı kaynama noktası, erime noktası, yoğunluk, çevirme açısı büyüklüğüne sahiptirler. Bu nedenle enantiyomerleri kristalizasyon, ekstraksiyon, distilasyon gibi fiziksel yöntemlerle ayırmak mümkün değildir. Enantiyomerlerin uzayda atomlarının düzenlenişine bağlı olarak biyolojik aktiviteleri ve çevirme açılarının yönü farklılık gösterir[68].

Örneğin, karvonun enantiyomerlerinden (Şekil 2.3) (R)-(-)- karvon, nane yağının ana bileşiği iken Karvonun diğeri enantiyomeri olan (S)-(+)- karvon ise, kimyon kökü yağının ana bileşenidir. Karvonun bu iki enantiyomerinin kendine has, farklı karakteristik kokuları vardır. Bu koku farklılığının sebebi ise burundaki alıcı sinir bölgelerine karşı iki enantiyomerin de farklı davranmalarıdır. Zencefil ise rasemik karvon içermektedir [67] [69].



Şekil 2.3 Karvon Bileşiğinin iki enantiyomeri

2.2.2 Diastereoizomer

Birbirinin ayna görüntüsü olmayan stereoizomerlerdir. Aynı açık formüle sahip olmalarına rağmen diastereoizomerlerin çoğunun erime noktası, kaynama noktası, yoğunlukları gibi fiziksel özellikleri farklılık gösterir. Bu sebeple kristalizasyon, distilasyon gibi fiziksel yöntemlerle birbirlerinden ayrılabilirler. Biyolojik aktiviteleri birbirinden tamamen farklıdır [47], [70].

2.3 Polarimetre ve Optikçe Aktiflik

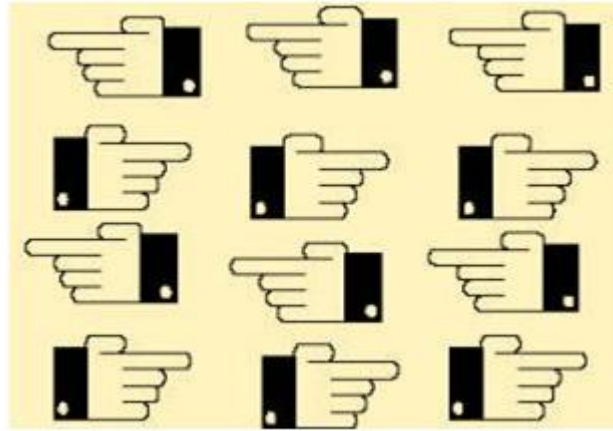
Optikçe aktiflik, kiral moleküller tarafından sergilenen fiziksel bir özellik olup polarize ışığın polarizasyon düzlemini çevirme yeteneğidir. Aynı molekülün enantiyomerlerinden her biri düzlem polarize ışığın polarizasyon düzlemini eşit miktarda ama zıt yönlü çevirirler.

Polarimetre, optikçe aktif bileşenlerin polarize ışık düzlemini ne kadar sağa veya ne kadar sola çevirdiğini ölçmek için yararlanılan bir cihazdır. Kiral bir maddenin bir enantiyomerini içeren bir çözelti içerisinde düzlem polarize olmuş bir ışık demeti geçirildiğinde ışığın, polarizasyon düzlemini α açısı kadar sağa/ sola çevirdiği gözlenir. Optikçe aktiflikten bahsedilen bu çevirmedir.

2.4 Rasemik Karışım

Enantiyomerlerinden eşit miktarda içeren karışım optikçe aktiflik göstermez ve rasemik karışım veya rasemat olarak adlandırılır (Şekil 2.4). Maddelerin optikçe aktiflikleri

polarimetre cihazı ile ölçülür. Enantiyomerlerin her biri düzlem polarize ışığı eşit ancak zıt yönlerde değiştirir ve düzlem polarize ışığın net değişimi sıfır olur [67], [68].



Şekil 2.4 Rasemik karışım

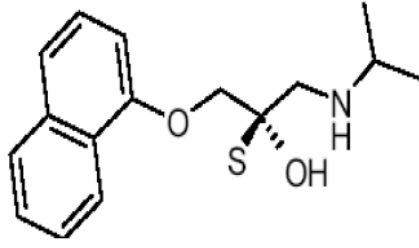
2.5 Enantiyomerlerin Biyolojik Etkileri

Farmakolojik aktivitelerine göre enantiyomerler eutomer ve distomer olarak isimlendirilirler. Biyolojik aktivite gösteren ve tedavi edici izomer için eutomer, daha az etkili inaktif molekül için de distomer terimi kullanılır. Distomer ilaçta istenmeyen safsızlık olarak da nitelendirilebilir.

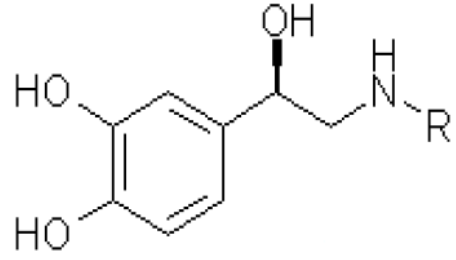
Distomer ve eutomerin gösterdiği etkilere göre ilaçlar:

2.5.1 Distomerin Ciddi Yan Etkiler Göstermediği İlaçlar

Ciddi boyutta yan etki göstermeyen distomerin, klasik yöntemlerle ayrılması zor olduğundan ilaç rasemik karışım şeklinde uygulanır. Bu ilaçlarda distomer, gereksiz izomerik yüküttür. Beta-bloker buna örnek olarak verilebilir. Beta-bloker, adrenerjik reseptörlerin bloke edilmesi yoluyla kan basıncını düşürmek için kullanılır. S-enantiyomeri, adrenerjik hormon olan noradrenaline yapısal olarak çok benzer ve tedavi edici etkiye sahip olan enantiyomerdir. Rasemik karışım halinde uygulanan beta-blokerlara örnek olarak propanolol (Şekil 2.5), atenolol ve metoprolol verilebilir.



(S)- Propanolol

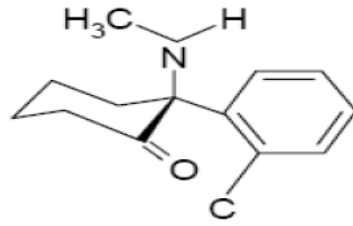


Noradrenalin

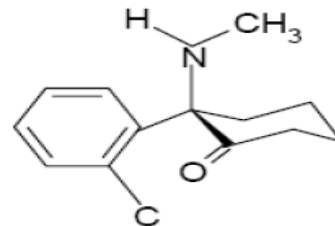
Şekil 2.5 Propanolol ve Noradrenalin

2.5.2 Distomerin Yan Etkiler Gösterdiği İlaçlar

Anestezik ve analjezik özellikte olan ketamin, distomerin istenmeyen yan etkiler gösterdiği bir ilaçtır. Rasemik karışım halinde uygulanan hastalarda S-(+)- ketamin anestezik etki gösterirken, R-(-) ketamin hastalarda anestezi sonrası halüsinasyonlar ve zihinsel karışıklıklara sebep olur (Şekil 2.6). Bu şekilde etki gösteren ilaçlarda hastaya yalnızca tedavi edici özellikte olan enantiyomer uygulanmalıdır.



S- (+)- Ketamin

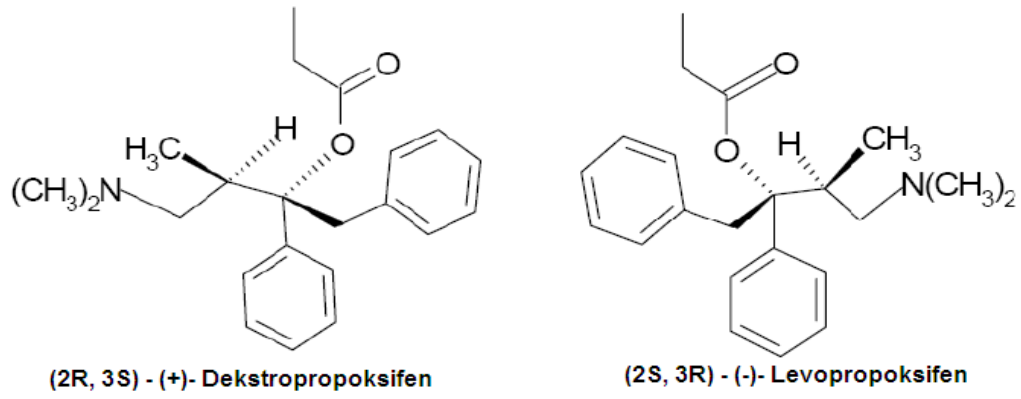


R-(-) - Ketamin

Şekil 2.6 Ketamin

2.5.3 Her İki İzomerin Bağımsız Tedavi Edici Etkiye Sahip Olduğu İlaçlar

Birçok doğal ürün ya da sentetik ilacın her iki enantiyomeri de istenen fakat farklı aktivite gösteren etkilere sahip olabilir. Bunlara örnek olarak, propoksifen (Şekil 2.7) verilebilir. Birbirinin ayna görüntüsü olan iki molekülden biri dekstropoksifen, analjezik bir ajan iken, levopoksifen öksürük önleyicidir.



Şekil 2.7 Propoksifen

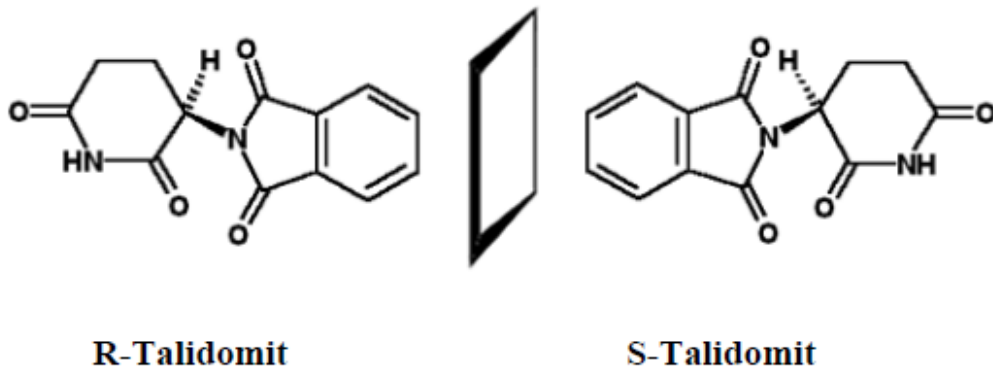
2.5.4 Her İki İzomerin Tedavi İçin Avantaj Sağladığı İlaçlar

Bazı kiral ilaçlarda her iki enantiyomerde farklı yollardan tedaviye katkıda bulunur. Örneğin, bir diüretik olan indakrinon'un R-(+)- enantiyomeri aktif bir diüretiktir fakat bu R enantiyomeri ürik asit oluşumunu engelleyerek istenmeyen yan etkiler gösterir. S enantiyomeri ise R izomerinin antagonisti olarak görev yapar ve ürik asit salgısını artırır. Bu gibi durumlarda ilacın rasemik karışım halinde uygulanması tedavi açısından uygun bir durumdur[68], [71].

2.6 Kiralitenin Biyolojik Önemi ve Kiral İlaçlar

İnsan vücudu yapısal olarak kiraldir. Merkezin sağına karaciğer, soluna ise kalp yerleşmiştir ve çoğu insan sağ elini kullanır. Sağa doğru vida gibi kıvrım yapan sarmal deniz kabukları da kiraldir. Lonicera sempervirens familyasından olan hanımeli çiçeği sola kıvrılırken, Convolvulus sepium familyasından olan çit sarmaşığı ise sağa kıvrım yapmaktadır. Canlıları oluşturan makromoleküller de kiraldir. Doğal proteinleri oluşturan 20 aminoasitten biri hariç (glisin) diğerleri kiraldir ve solak (L formu) olarak sınıflandırılırlar. Deoksiriboz şekeri de dahil tüm şekerler ise sağlak (D formu) olarak sınıflandırılırlar. Örneklerde de görüldüğü gibi canlı organizmalar kiral olarak seçici özelliktedirler. Kiral ilaçlarda her iki enantiyomerin aynı etkiyi göstermesi imkansızdır. Bir enantiyomer biyolojik aktivite gösterirken, diğeri biyolojik aktivite göstermeyebilir. Bu durumda ilaç %50 saf bir ilaçtır ve %50 gereksiz madde içermektedir [47], [68], [72].

Talidomit (Şekil 2.8), 1959- 1962 yıllarında Avrupa’da hamile bayanlarda mide bulantısı önleyici ve yatıştırıcı olarak kullanılan bir ilaçtı. O yıllarda hamileliği sırasında talidomit kullanan kadınların 2000’den fazlasının sahip olduğu çocuklarda ciddi boyutta doğum kusurları gözlenmiştir. Yapılan araştırmalar, rasemik karışım olarak kullanılan talidomitin R formunun tedavi edici özellik gösterdiğini, S formunun ise doğum kusurlarına sebep olan teratojenik etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Talidomitin teratojenik etkisinden dolayı meydana gelen doğum anomalileri tarihteki en önemli ilaç faciyalarından biridir. Bu olaydan önce gebelik sırasında alınan bu tarz ilaçların dölütü fazla etkilemediği düşünülüyordu fakat talidomit kullanan hamile bayanlarda engelli doğumlar tespit edildikten sonra 1961 yılında ilaç piyasadan çekilmiştir. Talidomit faciyasının ardından bu alanda çok fazla çalışma ve araştırma başlatılmıştır ve bu sayede kiralite ve enantiyomerlerin biyoloji dünyasındaki etkisi ve öneminin çok büyük olduğu anlaşılmıştır[48]. Bu gelişmelerden sonra kimyasal reaksiyonların stereokimyasını anlamaya yönelik çalışmalar, kiral moleküllerin enantiyomerlerinin saf olarak elde edilmesini sağlayan yeni sentetik metodların gelişmesine yol açmıştır.



Şekil 2.8 Talidomit

Farmakoloji endüstrisinde safsızlık olarak nitelendirilen ve biyolojik aktivite göstermeyen enantiyomerler ya toksik özellik gösterir ya da aktif olan enantiyomerin etkisini azaltıcı yönde etki gösterir. İlaç olarak kullanılacak aktif enantiyomeri ayırmak, diğer enantiyomerin hastada oluşturduğu yan etkileri engellemek açısından büyük önem taşır [70]. Bu sebeple enantiyomerlerin ayrılması ve optikçe aktif bileşiklerin kullanılması farmakoloji, biyokimya, gıda, zirai ilaç ve parfüm endüstrisi için oldukça önemlidir [68].

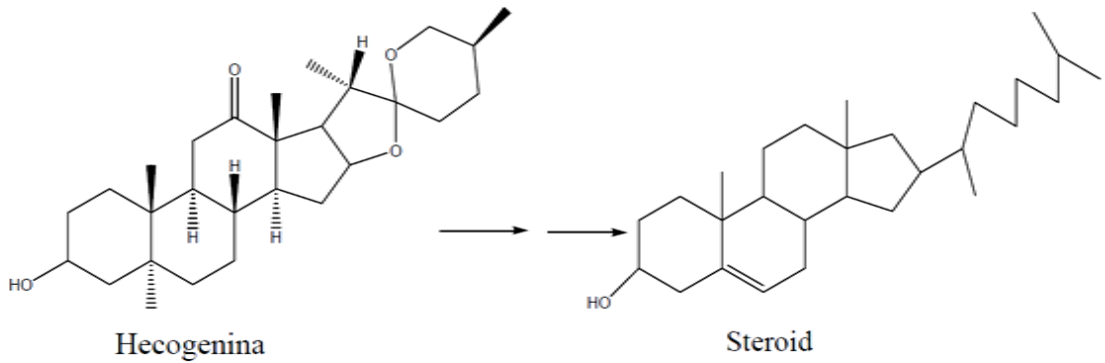
Çizelge 2.1 Tedavi edici özellikte çeşitli kiral ilaç örnekleri [73]

Antiaritmikler	Propafenone, Tocainide
Antibiyotikler	Ofloxacin, Moxalactam
Antikoagülanlar	Warfarin, Acenocoumarol
Anestezikler	Prilocaine, Ketamine, Pentobarbital
Antiemetikler	Ondansetron
Antihistamin	Terfenadine, Loratadine
Antihiperlipidemik	Atorvastatin
Antineoplastikler	Cyclophosphamide, İphosphamide
Antimalaryaller	Chloroquine, Halofantrine, Mefloquine
Kas gevşelticiler	Methocarbamol, Baclofen
NSAIDS	Ibuprofen, Ketorolac
β- bloklers	Propranolol, Metaprolol
β - adrenerjikler	Salbutamol, Terbutaline
Kalsiyum kanal bloke ediciler	Verapamil, Nimodipine
Uyuşturucu analjezikler	Methadone, pentazocine
Proton pompa inhibitörleri	Omeprazole, Pantoprazole, lansoprazole

2.7 Enantiyomerik Olarak Saf Bileşiklerin Elde Edilme Yöntemleri

2.7.1 Doğal Kaynaktan İzolasyon ile Elde Etme

Kiral bileşik, doğal bir kaynaktan doğrudan uygun bir yöntemle izole edilir. İzole edilen kiral bileşik ya doğrudan kullanılır ya da bu molekül öncü bileşik olarak kullanılır ve üzerinde kimyasal değişiklikler yapılarak istenilen molekül sentezlenir. Örneğin; steroid sentezi için sisal bitkisinden elde edilen hecogenina (Şekil 2.9) kiral başlangıç maddesi olarak kullanılır. Steroid sentezi için doğal yolu, sentetik olan yola tercih etmek oldukça ekonomiktir [74].



Şekil 2.9 Hecogenina'nın stereoide dönüşümü [74]

2.7.2 Asimetrik Sentez

Optikçe aktif bileşiklerin elde edilmesinde kullanılan en önemli yöntemlerden biri asimetrik sentezdir. Asimetrik sentez, yüksek verim ve yüksek enantiyomerik saflık (e.e.) elde edildiği için tercih edilen bir yöntemdir.

Asimetrik sentezde kullanılacak olan kiral grup, kiral çevre ve kiral başlangıç maddesinin seçimi çok önemlidir. Bu üç ana unsurun seçiminde sağlanması gereken şartlar şunlardır:

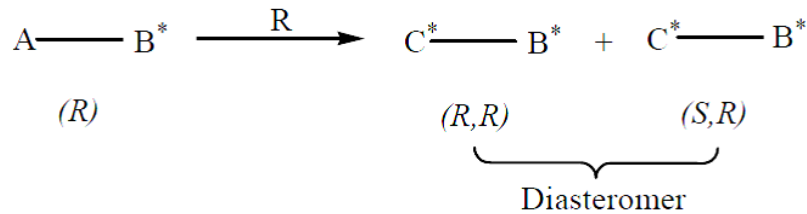
- Yüksek enantioseçici olmalı.
- Kullanılan grup reaksiyon sırasında yeni bir kiral merkez oluşturmalı.
- Reaksiyon bittikten sonra hiçbir rasemizasyona neden olmamalı ve ortamdan kolayca uzaklaştırılabilmeli.

- Kullanılan kiral grubun enantiyomerik saflığında hiçbir değişiklik olmadan yüksek verimle geri kazanılabilmeli.
- Kiral grubun elde edilmesi ucuz ve hızlı olmalıdır.

Asimetrik sentez yolları kiralitenin kaynağına göre 5 grupta incelenir [74]. Bunlar:

2.7.2.1 Kiral Başlangıç Substratı

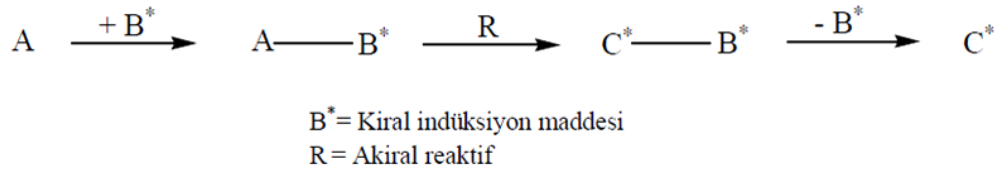
Doğada optik olarak aktif materyallerin büyük bir kısmı bulunmaktadır. Bunlar da asimetrik sentez için başlangıç maddesi olarak kullanılır. Bu yöntem enantiyomerik olarak saf bir kiral başlangıç maddesi üzerinde yeni bir kiral merkezin oluşturulması şeklinde gerçekleştirilir. Yeni kiral merkez iki farklı şekilde oluşabileceğinden, birbirlerinin diastereoizomerleri oluşur. Diastereoizomerlerin oranı başlangıç maddesinden dolayı eşit değildir. Moleküle bir eksen boyunca bakıldığında, kiral merkezin etrafındaki grupların sterik engel oluşturduğu ve reaksiyona girecek olan bileşiğin sterik engelin az olduğu yönü tercih ettiği görülür. Bu metodta kiral bir başlangıç maddesine kesinlikle ihtiyaç duyulmaktadır [74].



Şekil 2.10 Kiral substratlarla kiral bileşiğin sentezi

2.7.2.2 Optikçe Aktif Kiral İndüksiyon Yöntemi

İhtiyaç duyulan her kiral bileşiğin doğada bulunmaması veya kiral başlangıç maddesinden istenilen bileşiğin sentezinin çok fazla basamakta zor metodlarla sentezlenmesi gibi olumsuzluklar nedeni ile kullanılan bir yöntemdir. Kiral olmayan bir başlangıç maddesi ile kiral bir madde reaksiyona girerek yeni bir kiral ürün oluşturur. Başlangıç maddesi üzerinde bir kiral merkez oluşturulduktan sonra kullanılan kiral madde uzaklaştırılarak yeni kiral molekül sentezlenir.

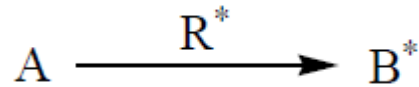


Şekil 2.11 Yeni kiral molekül sentezi

AB* bileşiğinin R ile reaksiyonu sonucu iki diastereomerik ürünü oluşur. Diastereoizomerler, kristalizasyon veya kromatografi gibi yöntemlerle saflaştırıldığında yüksek enantiyomerik saflıkta ürün elde edilir [74].

2.7.2.3 Kiral Reaktif Yöntemi

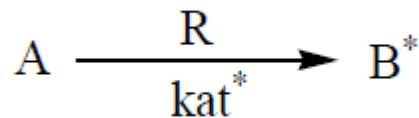
Akiral başlangıç maddesi kiral bir reaktif ile tek basamakta ve ara ürün oluşmadan kiral bileşiğe dönüşür. Bu tür yöntemlerde kiral reaktif, yüksek enantiyoseçiciliğe sahip ve kolay elde edilebilir olmalıdır [74].



Şekil 2.12 Akiral bir maddenin, kiral reaktif ile kiral maddeye dönüşümü

2.7.2.4 Kiral Katalizör Yöntemi

Akiral başlangıç maddesi, akiral bir reaktif ve kiral katalizör ile reaksiyona sokularak kiral bir ürün oluşturur. Yardımcı kiral bileşikler, diğer yöntemlerde başlangıç maddesi ile aynı miktarda kullanılırken bu yöntemde kiral katalizör katalitik miktarda kullanılır[74].



Şekil 2.13 Akiral bir maddenin kiral katalizör ile kiral maddeye dönüşmesi

2.7.2.5 Kiral Çevre

Kimyasal tepkime ortamına kiral çözücüler ya da kiral ligand gibi katkılar eklenerek kiral çevre oluşturulur. Kiral çevre, reaksiyonunun diastereomerik geçiş halinin serbest enerjisini değiştirerek, iki diastereomerik yol izinin bir tanesinin gerçekleşmesini sağlar. Bazı reaksiyonlarda kullanılan kiral ligantlar yüksek verim sağlarken, kiral çözücülerin kullanımı verimli bir yöntem değildir [67], [74].

2.8 Rasemik Karışımların Rezolüsyonu

Endüstriyel alanda tek bir enantiyomerin eldesi için en çok tercih edilen yöntemlerden biri rasemik karışımların rezolüsyonudur. Rezolüsyon, rasemik karışım halindeki bir bileşiğin enantiyomerlerine ayrılma işlemidir. İlk rezolüsyon işlemi, 1848 yılında Pastör tarafından, rasemik haldeki sodyum amonyum tartarat çözeltisinin 27°C'den daha düşük bir sıcaklıkta yavaş yavaş buharlaştırılarak kristallendirilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Pastör, oluşan büyük kristallerin bir kısmının diğerlerinin ayna görüntüsü olduğunu keşfetmiştir. Aynı türden olan kristalleri ayırarak bunları ayrı ayrı suda çözdüğünde, birinin polarize ışığı sağa, diğerinin ise sola çevirdiğini görmüştür. Rezolüsyonun birçok uygulama alanı vardır. Örneğin; ilaç olarak kullanılan ve disimetrik bir bileşik olan molekül kimyasal olarak sentezlendiğinde rasemik karışım halinde elde edilir. Enantiyomerlerinden biri etkinken, diğerinin bir etkinliği yoktur veya çok azdır. Bu sebeple, rasemik karışımın rezolüsyonu yapılır ve etkin enantiyomer elde edilir. Enantiyomerlerin rezolüsyonu için fiziksel ve kimyasal olarak birçok yöntem geliştirilmiştir [75]. Bunlar:

- 1-Tercihli kristalizasyon
- 2- Diastereomerik tuzların Kristalizasyonu
- 3- Kromatografi
- 4-Kinetik Rezolüsyon yöntemleri olmak üzere dört gruba ayrılır.

2.8.1 Tercihli Kristalizasyon

Tercihli kristalizasyon yöntemi enantiyomerlerin büyük çaplı rezolüsyonunda kullanışlıdır ancak bu işlem için rasemik karışımların konglomerat şeklinde olması

gerekmektedir. Konglomerat, eşit miktarda her iki enantiyomerin kristallerinin mekanik karışımı olarak tanımlanır. Rasemik karışımların % 20'den az bir bölümü konglomerat şeklinde olduğundan çok avantajlı bir yöntem değildir.

2.8.2 Diastereomerik Tuzların Kristalizasyonu

Pastör tarafından 1848 yılında geliştirilen bir yöntem diastereoizomerlerin kristalizasyonudur. Rasemik bileşik, optikçe aktif bir bazın enantiyomeri ile tuz oluşturduğunda, oluşan tuzlar fiziksel özellikleri ve çözünürlükleri farklı olan diastereomer tuzlardır. Uygun bir çözücüde kristallendirilerek birbirinden ayrılan bu tuzlar bir mineral asitle etkileşerek (asidin anyonu proton alarak) serbest hale dönüşür. Diastereomer tuzları oluşturmak için kullanılan optikçe saf organik asit ve bazlar doğal bileşiklerdir ve çok çeşitli türevleri bulunmaktadır [75], [76].

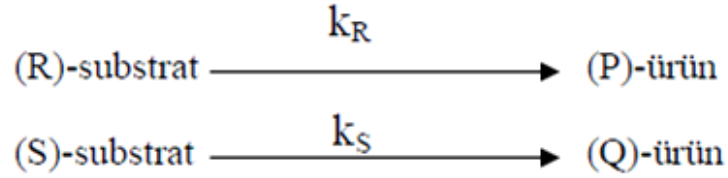
2.8.3 Kromatografi

Kolon kromatografi yönteminde kolon dolgu maddesi olarak glikoz, sakaroz, laktoz şekeri gibi katı maddeler kullanıldığında, kolon içerisinden çözelti halinde rasemik karışım geçirilir. Kolonda enantiyomerlerden biri diğerinden daha güçlü tutulur ve rezolüsyon gerçekleşir. Her enantiyomer, kiral maddeler ile farklı etkileşeceğinden R_f değerleri farklı olacaktır. Eğer kolon uzunluğu yeterli ölçüde ise çözeltide yalnızca bir enantiyomer bulunur. Kolonda tutulmuş olan diğer enantiyomer ise farklı bir çözücü kullanılarak alınabilir. Ayırım için kullanılan kromatografik yöntemler ince tabaka kromatografisi, kolon kromatografisi, gaz kromatografisi ve sıvı kromatografisidir[67], [71].

2.8.4 Kinetik Rezolüsyon

Rasemik karışımların rezolüsyonunda kullanılan dördüncü yöntem ise kinetik rezolüsyondur. Bu yöntem, iki enantiyomerin farklı hızda tepkime vermesine dayanır. Kinetik rezolüsyon, rasemik karışımların enantiyomerlerinden birinin, kiral yapıya sahip kimyasal ya da biyokimyasal bir katalizör yardımı ile enantioseçilimli olarak, hızlı bir şekilde farklı bir yapıya dönüştürülmesinin sağlandığı rezolüsyon yöntemidir. Tepkime ortamında katalitik miktarda kiral biyokatalizör (enzim, mikroorganizma) ya da

kimyasal katalizör (kiral asit, kiral baz, kiral metal) bulunur. Rasemik bileşiklerin kinetik rezolüsyon yöntemi ile dönüşümünde genelde lipaz enzimi görev alır. Lipaz enzimi rasemik karışımdaki iki enantiyomer arasında ayrımı yapar ve bir enantiyomer diğerinden daha hızlı ürüne dönüşür.



Şekil 2.14 Kinetik rezolüsyonun gerçekleşmesi ($k_r \neq k_s$)

Şemadaki tepkimelerde $k_r \neq k_s$ olduğu durumda kinetik rezolüsyon gerçekleşir. Tepkime dönüşümü % 0 - % 100 arasında bir değere ulaştığında tepkime durdurulur. Bir enantiyomerin diğerinden daha hızlı tepkimeye girmesi beklenir. Örneğin; tepkimeye giren (R), tepkimeye girecek tek enantiyomer ise $k_s = 0$ olur. Bu gibi durumlarda enantiyomerlerin oranı 50:50 olan rasemik karışımda %50 dönüşüm gerçekleştikten sonra ortamda %50 (S) ve %50 oluşan ürün (P) bulunur. Bu yöntemle tek bir enzim kullanılarak iki enantiyomerin kolay şekilde ayrılması sağlanır. Enantiyomerik saflıkta veya enantiyomerikçe zenginleştirilmiş bileşiklerin elde edilmesinde etkin bir yöntemdir. Fakat, bu yöntemde iki enantiyomerin ayrılması maksimum %50 verimle gerçekleşir. Bu kısıtlama bazı çalışma alanları için mezobileşikler ya da prokiral substratlar kullanılarak, istenmeyen enantiyomerin sterodönüşümü, rasemizasyon ve istenmeyen enantiyomerin geri dönüştürülmesi ve de dinamik kinetik rezolüsyon gibi farklı yöntemler kullanılarak giderilebilir [75].

Yaygın olarak kullanılan Kinetik rezolüsyon yönteminin bazı önemli özellikleri:

- Dönüşüm % 50 olduğu an tepkimenin sonlandırılması gerekir.
- Dönüşüm sonucu substratın üründen ayrılması ekstraksiyon veya distilasyon ile mümkün değildir bu sebeple kromatografik yöntemlerle saflaştırma yapılır.
- Her bir enantiyomerin teorik verimi maksimum % 50'dir [77].

2.9 Derasemizasyon Prosesleri

Derasemizasyon, rasemik karışımdan tek bir izomerin yüksek verimle elde edilmesidir. Yaygın olarak kullanılmakta olan kinetik rezolüsyon yöntemine alternatif olarak geliştirilmiş olup, kimyasal veya biyokatalitik rasemizasyon ile enantiyoseçimli katalitik dönüşümü kapsamaktadır. Derasemizasyon prosesinde hızlı olarak tepkimeye giren (R) enantiyomeri, (P) ürününü oluştururken, yavaş tepkimeye giren (S) enantiyomeri, diğer (R) enantiyomer bittikçe rasemizasyon tepkimesi ile (R) enantiyomerine dönüşür. Böylelikle ortamda (R) enantiyomeri hiç bitmemekte ve her iki enantiyomer de ürüne dönüşmektedir ve teorik verim % 100'e çıkabildiğinden avantajlı bir yöntemdir.

Rasemizasyon enzimatik ve kimyasal olarak gerçekleştirilebilir:

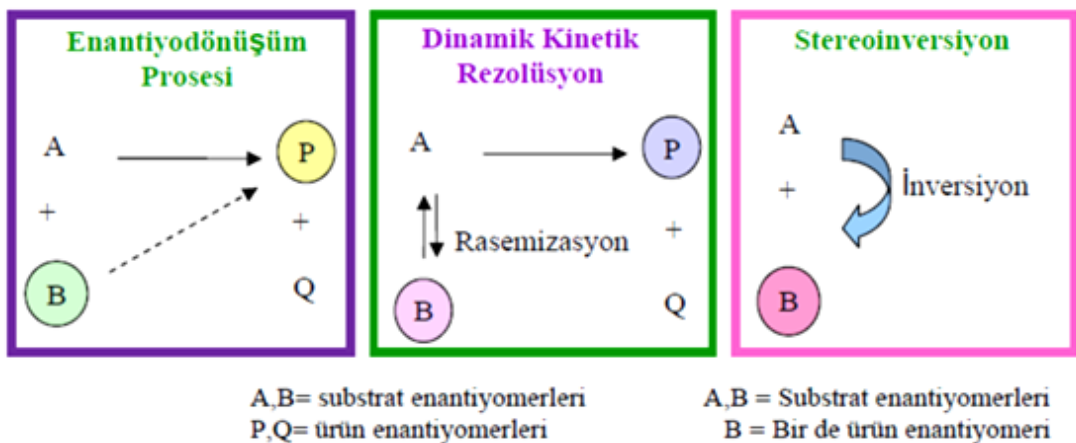
-Kimyasal rasemizasyon; ağır reaksiyon koşullarında (sıcaklık, kuvvetli asit/baz katalizörlüğünde) gerçekleştirilir.

-Enzimatik rasemizasyon; ılımlı reaksiyon koşullarında (oda sıcaklığı, atmosferik basınç, nötral pH) ve yüksek seçimlilikle gerçekleştirilmektedir [78]. Derasemizasyon prosesleri (Şekil 2.15) üç şekilde gerçekleşmektedir [79].

1-Enantiyodönüşüm prosesi

2- Dinamik Kinetik Rezolüsyon

3-Stereoinvertasyon



Şekil 2.15 Derasemizasyon prosesleri [79]

2.9.1 Enantiyodönüşüm Prosesi

Bu proseste substratın enantiyomerlerinin her ikisi de (A ve B) farklı yapıdaki bir ürüne farklı yollardan dönüşür. Bir enantiyomerin konfigürasyonu sabit kalırken, diğer enantiyomerinki değişir. Enantiyodönüşüm prosesleri genellikle iki basamaktan oluşur. Birinci basamakta, enantiyospesifiklik ve sterospesifiklik için kiral tanıma enzimlerle sağlanır. İkinci basamakta ise, (S) enantiyomerinin dönüşümü gerçekleşmektedir. Bunun için de kimyasal katalizör kullanılır. Dikkat edilmesi gereken, reaksiyon koşullarının birbirine uygunluğudur. Başarılı bir enantiyodönüşüm için reaksiyonun tek reaktörde ve aynı anda gerçekleşmesi gerekmektedir. Enzimler ve kimyasal katalizörler genellikle çok farklı koşullarda aktivite gösterirler. Bunları tek bir reaktörde reaksiyona sokmak pratikte oldukça zordur. Aynı zamanda enzimler ılıman koşullarda reaksiyon gösterdiklerinden birbirleri ile yarışmalı haldedirler. Bu gibi sebepler, yöntemin dezavantajlarıdır [77].

2.9.2 Dinamik Kinetik Rezolüsyon

Dinamik kinetik rezolüsyonda, enzim katalizli kinetik rezolüsyon ve rasemizasyon birlikte gerçekleşir ve oluşan ürün ortamdan ayrılmaz. Yaygın olarak kullanılan kinetik rezolüsyon ve dinamik kinetik rezolüsyonda (R) enantiyomeri, (S) enantiyomerinden daha hızlı (R) ürününe dönüşür [75]. ($k_R > k_S$)

Kinetik rezolüsyonda hızlı reaksiyon veren (R) enantiyomeri bitince %50 dönüşüm sonunda reaksiyon yavaşlar veya durma noktasına gelir. Yavaş reaksiyon veren (S) enantiyomeri ortamda kalır. Dinamik rezolüsyonda ise reaksiyon devam ederken (S) enantiyomerinden (R) enantiyomeri oluşmaktadır. Böylece reaksiyon boyunca (R) enantiyomerinin ortamda bitmesi önlenmektedir. Sonuçta reaksiyon hiç durmadan rasemik başlangıç maddesinin tamamı ürüne dönüşene kadar reaksiyon sürer. Prosesin statik olmayan bu davranışı “dinamik rezolüsyon” terimi ile ifade edilir. Başarılı bir dinamik kinetik rezolüsyonu tasarlamak için dikkat edilmesi gereken faktörler:

-Yüksek enantiyoseçimlilik sağlamak için kinetik rezolüsyon tepkimesi tersinir olmamalıdır.

-Enantiyomerik oran ($E = k_R/k_S$) en az 20’den büyük olmalıdır.

-(R) enantiyomerinin ortamda bitmemesi için $k_{rac} \geq k_R$ olmalıdır.

-Dinamik rezolüsyon genellikle tek bir stereomerkeze sahip bileşikler için tercih edilir.

Sonuç olarak dinamik kinetik rezolüsyon yöntemi ile ürün % 100 tam verim ve % 100 ee ile elde edilebilir [77].

2.9.3 Stereoinvertiyon

Stereoinvertiyon yolu ile derasemizasyonda substratın A enantiyomeri B enantiyomerine dönüşerek tek ürün olarak B enantiyomeri elde edilir. Bu proses enantiyomerizasyon olarak da adlandırılır. Stereoinvertiyon yöntemi enantiyodönüşüm prosesi ve dinamik kinetik rezolüsyon yöntemlerine göre biraz daha üstün bir yöntemdir. Stereoinvertiyonda, başlangıç maddesinin yarısı dönüşür, zaten diğer yarısı istenilen enantiyomer olarak ortamda bulunmaktadır. Bu sebeple, stereoinvertiyon yönteminde diğer yöntemlere oranla iki kat daha az reaktant bulunur ve yöntem oldukça ekonomiktir [79].

BİYOTRANSFORMASYON

3.1 Biyotransformasyonun Tanımı

Biyotransformasyon, biyolojik sistemlerin veya enzimlerin katalizör olarak kullanılması ile gerçekleştirilen kimyasal dönüşüm reaksiyonları ile endüstriyel öneme sahip bileşiklerin elde edilmesi olarak tanımlanır. Biyotransformasyon reaksiyonları biyolojik sistemlerin doğal yaşam alanlarında doğal substratları üzerinde gerçekleştirdikleri biyosentezden farklı olarak, doğal substratı olmayan moleküller üzerinde meydana getirdikleri dönüşümleri içerir. Biyoteknolojik çalışmaların önemli bir alanını oluşturan biyotransformasyon reaksiyonları ilaç, kozmetik, gıda ve enerji sanayii gibi pek çok alanda kullanılmaktadır. Ayrıca çevre sorunlarının giderilmesi amacı ile toksik endüstriyel atıkların yıkımı, atık suların temizlenmesi ve geri kazanılması gibi çalışmalarda da etkin olarak kullanılmaktadır [80], [81].

Mikroorganizmalar ve/veya izole enzimlerin kullanıldığı biyotransformasyon reaksiyonlarının, kimyasal reaksiyonlara üstünlüğü, klasik yöntemlerle sentezlenmesi zor ya da olanaksız olan birçok maddenin ucuz, hızlı ve verimli bir şekilde elde edilebilirliğine olanak sağlamasıdır. Aynı zamanda ürünlerin stereokimyasal özelliklerini korumaları, rasemik ürünler veren kimyasal yöntemlere karşı üstünlükleridir [82]. Biyotransformasyon tepkimeleri ile optikçe saf bileşiklerin üretimi, rasemik karışımların ayrılması, benzer reaktif gruplar arasında fonksiyonel grup seçimi, seçimli olarak yapıya fonksiyonel grup katılması gibi işlemler kolaylıkla gerçekleştirilir. Bu işlemlerin kimyasal yöntemler ile gerçekleştirilmeleri ise oldukça zordur [50].

3.2 Biyotransformasyonun Tarihçesi

Modern çağda araştırmacıların en fazla yoğunlaştıkları araştırma konularından olan ve biyoteknolojinin en önemli prensiplerinden biri olan biyotransformasyon hızla gelişmektedir. Biyotransformasyonun tarihçesi incelendiğinde, biyotransformasyon ve biyoteknoloji terimleri bilinip kullanılmasa da biyotransformasyon çalışmalarının M.Ö. 3000 yılına kadar dayandığı görülmüştür [81]. M.Ö 3000 yılında, ilk ekmek mayası, ilk alkolik mayalanma ve ilk sirke yapımı gerçekleşmiştir. 1858 yılında Pastör, *Penicillium glaucum* fungal kültürü ile DL-amonyum tartarattan, D-enantiyomerlerinin seçimli yıkımı ile L- amonyumun elde edilmesini sağlamıştır. Bu çalışma laboratuarda gerçekleştirilen biyotransformasyonun ilk uygulamasıdır. [80], [83]. Steroid hormonlarının mikrobiyal biyotransformasyonu modern uygulamaların temelini oluşturmuştur. 1952’ de Murray *Rhizopus arrhizus* fungusu ile progesteronun 11. pozisyonuna α - konumunda stereospesifik olarak hidroksil grubunu eklemiştir. Sonuçta 11 α - hidroksiprogesteron molekülü sentezlenmiştir [84]. 1960’larda talidomit felaketi ortaya çıkmıştır. İlaç etken maddeleri sahip oldukları fonksiyonel grupların stereo kimyası ve ilaç etkinliği bakımından çok önemlidir. *Pseudomonas putida* kullanılan biyotransformasyon reaksiyonları ile tek enantiyomerin seçimli üretimi kimyasal yöntemlere göre daha kolay gerçekleşmiştir [85]. Günümüzde de biyotransformasyon çalışmaları ve enantiysaf ürünlerin üretilmesine yönelik çalışmalar hızla devam etmektedir.

3.3 Biyotransformasyonun Özellikleri ve Kimyasal Tepkimlere göre Avantajları

- ✓ Tepkime spesifikliği: Biyotransformasyonda; enzimler, yan tepkimeler olmadan tek bir tepkime gerçekleştirir. Kimyasal reaksiyonlara göre biyotransformasyon reaksiyonları oldukça hızlıdır.
- ✓ Bölgesel spesifiklik: Biyotransformasyon tepkimeleri benzer reaktif gruplar arasında fonksiyonel grup seçimini yaparlar. Bunların yanı sıra mikrobiyal biyotransformasyonlar ile seçimli olarak yapıya istenilen pozisyonda fonksiyonel grup katılabilir. Bu işlemi kimyasal yöntemlerle yapmak çok güçtür.

- ✓ İlimli tepkime koşulları: Biyotransformasyon tepkimeleri atmosferik basınç altında, nötral pH'da, oda sıcaklığında maksimum 40 C°'de gerçekleşir.
- ✓ Stereospesifiklik: Enzimin aktif merkezi asimetrik çevre sağlar ve bu da rasemik substratların enantiyomerleri arasında bir ayırım gerçekleştirir. Böylece tercih edilen enantiyomerden yalnızca biri katalizlenir.
- ✓ Biosentez çalışmaları ve biyolojik sistemlerin modellenmesi biyotransformasyon reaksiyonları ile gerçekleşir. Ayrıca biyotransformasyon reaksiyonları ile biyolojik sistemlerin metabolizma çalışmalarının aydınlatılması sağlanır.
- ✓ Biyotransformasyon reaksiyonları, ilaç etken maddeleri, gıda katkı maddeleri ve koku hammaddeleri gibi özel kimyasalların dönüşümünü ve üretimini sağlar. Biyotransformasyon ile antibiyotik ve steroidler daha kolay ve ucuz olarak üretilir.
- ✓ Çevre ve ekoloji alanında geri dönüşüm prosesleri ve biyoenerji eldesi gibi pek çok uygulamada biyodegradasyon çalışmaları biyotransformasyon reaksiyonları ile yapılmaktadır [80], [82].

3.4 Biyotransformasyon Teknikleri

Biyotransformasyonda kullanılan beş teknik vardır [81].

- 1- Büyüyen hücreler ile biyotransformasyon
- 2- Stasyoner hücreler ile biyotransformasyon
- 3- Sporlar ile biyotransformasyon
- 4- İmmobilize hücreler ile biyotransformasyon
- 5- Serbest ve immobilize enzimler ile biyotransformasyon

3.4.1 Büyüyen Hücreler ile Biyotransformasyon

Hücreler ideal besi ortamında üretilir. Ön testlerle belirlenen konsantrasyonda ve optimum ekleme zamanında ortama substrat konulur. Biyotransformasyon maksimum verime ulaşıncaya kadar devam ettirilir.

3.4.2 Stasyoner Hücreler ile Biyotransformasyon

Mikroorganizmalar uygun besiyerinde, optimum koşullar altında üretilir. Oluşan biyokütle, filtrasyon veya santrifüj ile ayrılır. Bu hücreler optimum koşullardaki biyotransformasyon ortamına aktarılır ve substrat ilavesinin ardından biyotransformasyon gerçekleşir.

3.4.3 Sporlar ile Biyotransformasyon

Mikroorganizmalar spor oluşumu için optimum koşullarda üretilir. Oluşan sporlar misellerden ayrılır ve soğukta bekletilir. Biyotransforasyon gerçekleşeceği zaman kullanılır.

3.4.4 İmmobilize Hücreler ile Biyotransformasyon

Mikroorganizmalar, ürün ya da substratın geçişine izin veren polimer matrikse tutulur. Tutuklanmış bu hücreler biyotransformasyon ortamından kolayca uzaklaştırılabilirler ve yeniden kullanılabilirler. Bu tutuklanmış hücreler ortamda ise biyotransformasyon gerçekleşir. Ürün oluşum hızı oldukça yüksektir ve inhibisyon etkisi minimumdur. Tutuklanmış hücrelerin ek maliyet getirmesi ve difüzyon kısıtlamaları yöntemin dezavantajıdır.

3.4.5 Serbest ve İmmobilize Enzimler ile Biyotransformasyon

İmmobilize hücrelerin biyotransformasyon reaksiyonlarında kullanılmaları, serbest enzim kullanımına göre daha ekonomik olmasına rağmen, çok basit yapıdaki bir hücrenin bile binlerce enzim içerdiği bilinmektedir. Bu durum istenmeyen yan ürün oluşumuna neden olur. Biyotransformasyonu katalizleyecek olan enzimin yalnız başına ortamda bulunması reaksiyon verimini arttırır. Enzim kullanımının dezavantajı ise, enzimin saflaştırılmasının uzun zaman alan yorucu bir iş ve pahalı olmasıdır [81].

3.5 Başlıca Biyotransformasyon Reaksiyonları

- Oksidasyon
- Redüksiyon

- Hidroliz reaksiyonları
- Katılım ve kondenzasyon
- İzomerleşme
- Yeni C-C bağlarının oluşumu
- Yeni hetero atomların ilavesi

Yukarıda sıralanan reaksiyonlar, biyotransformasyon reaksiyonlarının hemen hemen tüm sentetik reaksiyonlara eşdeğer reaksiyonlar olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda sentetik olarak gerçekleştirilemeyen reaksiyonları gerçekleştirme olanakları da vardır. Örneğin;

- ✓ Enantiyomerlerden birinin seçimli dönüşüme uğratılması ile rasemik karışımların ayrılması
- ✓ Benzer fonksiyonel gruplardan yalnız birinin reaksiyona sokulması
- ✓ Asimetrik merkeze bir grup sokulması
- ✓ Aktive edilmemiş C atomunun seçimli olarak fonksiyonel grup haline dönüştürülmesi gibi [44], [80].

3.6 Biyotransformasyon Reaksiyonlarını Etkileyen Faktörler

Biyotransformasyon reaksiyonlarında katalizör olarak enzim veya mikroorganizmalar kullanılır. Bu katalizörler, canlı organizmalardan izole edildikleri için kimyasal katalizörlere göre daha hassas çalışırlar. Biyokatalizörlerin işlevliği için,

- Besiyeri bileşimi
- Substratın derişimi
- Çalkalama hızı
- Ortam sıcaklığı
- Ortamın nem oranı
- Ortamın pH'sı gibi faktörlerin uygun değerlerde olması gerekmektedir [80].

BİYOKATALİZÖRLER

Biyotransformasyon reaksiyonlarında biyokatalizör olarak bütün hücre sistemleri veya izole enzim sistemleri işlev görür. Bu reaksiyonlarda kullanılan biyokatalizörler aşağıdaki gibi sıralanabilir [86], [87].

- 1- İzole Enzimler
- 2- Bütün hücre sistemleri;
 - ✓ Canlı bitki, bitki doku ve hücre kültürü
 - ✓ Canlı hayvan, hayvan doku ve hücre kültürü
 - ✓ İnsan metabolizması
 - ✓ Mikroorganizmalar

4.1 İzole Enzimler

Biyotransformasyonlar, doğal kaynaklarından izole edilen ya da ticari olarak elde edilebilen saf veya yarı saf enzimlerin kullanılması ile gerçekleşir. İzole enzimler ile yapılan biyotransformasyon çalışmalarında hedeflenen dönüşümler çoğunlukla gerçekleşir. Ancak izole enzimlerin pahalı olması, özel reaksiyon koşulları ve kofaktör gerektirmesi bunların dezavantajları arasındadır. En büyük avantajı ise reaksiyon ürününün kolay elde edilmesidir [80].

4.2 Bütün Hücre Sistemleri

4.2.1 Canlı Bitki, Bitki Doku ve Hücre Kültürü

Canlı bitki ve doku kültürü laboratuvarlarında üretilmiş dokular ve hücreler biyotransformasyon reaksiyonlarında kullanılabilirler. Canlı bitkinin katalizör olarak kullanılacağı reaksiyonlarda, dönüşümü araştırılacak olan materyal, toprağa, suya veya bitkinin iletim sistemine doğrudan verilir. Ökaryotik olan bitki hücrelerindeki enzimlerin çeşitliliği göz önüne alınırsa bu tip reaksiyonların çok kararlı olmayacağı anlaşılır. Tüm canlı bitki hücresi kullanılarak gerçekleştirilen biyotransformasyon reaksiyonlarının kontrolü oldukça zordur.

4.2.2 Canlı Hayvan, Hayvan Doku ve Hücre Kültürleri

Tüm canlı hayvan, doku ve hücre kültürleri içerdikleri enzimler sebebiyle biyotransformasyon çalışmalarında kullanılmaktadır. Solucan, fare ve tavşan ile yapılan biyodönüşüm araştırmaları mevcuttur. Bitkilerle yapılan biyotransformasyon çalışmalarındaki olumsuzlukların çoğu hayvanlar içinde söylenebilir. Ayrıca hayvanlarla yapılan deneyler sonrasında kan, idrar gibi vücut sıvılarının incelenmesi için daha özel laboratuvar koşulları gerekmektedir.

4.2.3 İnsan Metabolizması

İnsan vücudunda biyotransformasyon reaksiyonları sürekli gerçekleşmektedir. Bundan dolayı insanlarda bu tip reaksiyonlar sonucu oluşan ürünler vücut sıvılarında aranır. Bitki ve hayvanlardaki biyotransformasyon reaksiyonlarında geçerli olan dezavantajlar insandaki biyotransformasyon reaksiyonlarında da geçerlidir. Bunların yanında etik kuralları bu tip deneylerin daha az uygulanmasına sebep olur [88].

4.2.4 Mikroorganizmalar

Prokaryotlar ve ökaryotlar olmak üzere iki ana grupta toplanırlar. Prokaryotlar tek hücreli, çekirdek zarı olmayan canlılardır ve biyoçeşitlilikte önemli rol oynarlar. Teknik nedenlerden dolayı araştırılmaları zordur [89]. Ökaryotik hücreler ise hem mikroorganizmaları hem de bitki ve hayvan hücrelerini kapsar. Tipik ökaryotik canlılar,

prokaryotik organizmaların tersine membran ile çevrilmiş gerçek çekirdeğe sahip, tek veya çok hücreli organizmalardır. Bitki ve hayvan hücrelerine oranla araştırılmaları zor olmasına rağmen mikrobiyal biyotransformasyonlara pek çok örnek verilebilir. İlaç etken maddelerinin eldesinde, çevre, koku, gıda ve kimya sanayinde mikroorganizmalardan faydalanılır [88].

Bütün hücre sistemleri içinden mikrobiyal hücrelerin tercih edilmesinin nedenleri [80], [87] :

- Mikroorganizmaların büyüme ve gelişme hızı ve buna bağlı olarak metabolik hızı, bitki ve hayvan hücreleri ile karşılaştırıldığında oldukça fazladır. Bu sebeple mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonları hızlı ve kısa sürede gerçekleşir.
- Bitki ve hayvan hücrelerine oranla mikrobiyal hücrelerin substrat çeşitliliği daha fazladır.
- Mikrobiyal hücreler sahip oldukları hücre duvarı ve hücresel boyutlarından dolayı bitki ve hayvan hücrelerine oranla mekanik olarak daha sağlamdırlar. Bu sebeple değişik ortam ve tekniklerle biyotransformasyon olanaklarına sahiptirler.

BÖLÜM 5

ENZİMLER

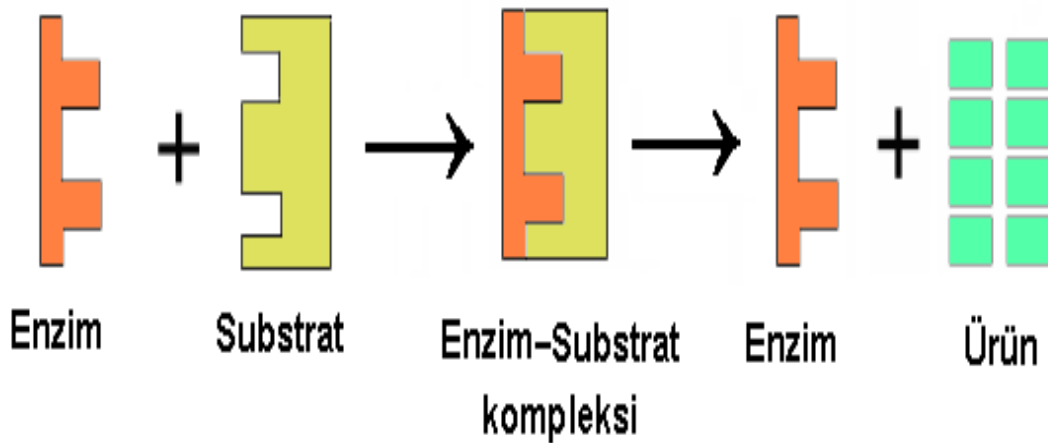
Enzimler, canlı organizmalarda oluşan tüm reaksiyonların ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan ve bu reaksiyonları koordine eden protein ana yapısındaki spesifik biyokatalizörlerdir. Canlı organizmalarda bulunan enzimler, hücrede gerçekleşen binlerce biyokimyasal reaksiyonun katalizini canlılığa zarar vermeden ve çok hızlı bir şekilde gerçekleştirirler.

5.1 Enzimlerin Yapısı

Enzimler kimyasal olarak protein yapısındadır. Enzimin sadece protein yapısındaki kısmına apoenzim denir. Tüm, kofaktör ya da koenzimleri içeren katalitik olarak aktif haline ise haloenzim denir. Kofaktör, enzimin aktivite gösterebilmesi için gerekli olan genelde metal iyonlarından oluşan kısımdır. Koenzim ise enzimin aktivite göstermesi için gereksinim duyduğu kompleks organik moleküllerdir. Enzimlerin dönüşüme uğrattıkları moleküllere substrat denir. Enzim molekülünün belirli bir bölgesinde enzimatik reaksiyonların gerçekleştiği bir merkez bulunur. Buna aktif merkez adı verilir ve bu kısım genellikle oluk veya yarık şeklini alır. Aktif merkezde yer alan aminoasitlerin bazıları substratın buraya doğru olarak bağlanmasını sağlar. Aktif merkezde, substratın bağlandığı bölgeye bağlanma bölgesi ve bir de katalitik dönüşüme uğratıldığı katalitik aktivite bölgesi bulunur. Substratın enzime bağlanmasında etkili olan kuvvetler hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler, iyonik etkileşimler ve kovalent bağlardır[90].

5.2 Enzimlerin Çalışma Mekanizması ve Enzim Kinetiği

Enzimlerin çalışma mekanizması için iki önemli görüş bulunmaktadır. Bunlardan birincisi anahtar-kilit modeli (Şekil 5.1), ikincisi ise indüklenmiş uyum modelidir. Enzimatik reaksiyonlarda substrat, enzimin aktif merkezine bağlanarak dönüşüme uğratılır. Aktif merkez bir oluk şeklindedir ve substratın buraya bağlanmasını sağlayacak ve katalitik süreçte görev alacak aminoasit yan zincirlerinden oluşur. Enzimlerin (anahtar) kompleks tersiyer yapıları, substratın (kilit) bu merkeze kolaylıkla bağlanmasını sağlar. Bu konuda Emil Fischer'in 1894 yılında yapmış olduğu çalışmaya Anahtar- kilit modeli denir. Bir diğer çalışma ise 1958'de Daniel Koshland'ın ileri sürdüğü İndüklenmiş Uyum Modelidir. Bu model kataliz mekanizması için kabul gören ve yaygın olarak kullanılan bir modeldir. Substrat ve enzimin yapı değiştirmesine dayanan bir modeldir. Enzim aktif merkezi, substratın buraya bağlanması ile yeni bir şekil kazanır. Proses tamamlandığında enzim, ürün veya ürünleri bırakarak eski orijinal haline döner ve yeni katalizlere hazırlanır.



Şekil 5.1 Enzimlerin çalışma mekanizması

Enzim kinetiği, enzim katalizli reaksiyonlarda enzimlerin çalışma mekanizmasının fiziksel ve kimyasal çevre farklılıklarından fonksiyonun nasıl değiştiğinin anlaşılması için temel bir yaklaşımdır. Enzim kinetiği, katalizin biyolojik öneminin miktar olarak ifade edilmesidir. Bir enzimatik reaksiyonun hızı, enzim etkisiyle zaman birimi başına (1 dakikada veya 1 saniyede) oluşan ürünün veya ürüne dönüşen substratın miktarına göre ifade edilir. Bir enzimin aktivitesi, o enzim tarafından katalizlenen enzimatik

reaksiyonun hızının, enzim etkisiyle optimal koşullarda belirli sürede ürüne dönüştürülen substrat miktarına göre ifadesidir [90].

5.3 Enzimlerin Özellikleri

- ✓ Ilımlı tepkime koşullarında aktivite gösterirler. Enzimler pH 5-8 arasında genellikle nötral pH olan 7'ye yakın değerlerde etki gösterirler.
- ✓ Kimyasal tepkimelerde genellikle yan ürün meydana gelirken enzim katalizli tepkimelerde yan ürün meydana gelmez verim oldukça yüksektir [80].
- ✓ Enzimlerin üç tür özgünlüğü vardır. Bunlar: Substrat özgünlüğü, grup özgünlüğü ve etki özgünlüğü [90].
- ✓ Enzimler çok hızlı çalışan biyokatalizörlerdir. Enzimatik bir reaksiyon, enzimsiz gerçekleşen bir reaksiyona oranla 10⁸-10¹⁰ kez daha hızlıdır. Bu değer 10¹² düzeyine ulaşabilir ve kimyasal katalizörler bu değere ulaşamaz [80].
- ✓ Enzimler genelde kararsız moleküllerdir ve tepkimelerde kofaktör gerektirebilirler.
- ✓ Doğal katalizörlerdir ve çevreye zararlı değildirler. Reaksiyon ortamından geri kazanılarak tekrar tekrar kullanılabilirler.
- ✓ Bazı enzimler sulu ortam dışında organik çözücülerde de aktivite gösterebilirler.
- ✓ Çok yüksek katalitik etkinlik gösterirler. Kimyasal katalizörlere oranla etkinlikleri oldukça yüksektir [88].
- ✓ Enzimler üç tip seçicilik gösterirler: Kimyasal seçicilik, bölgesel seçicilik ve enantiyoseçiciliktir.
- ✓ Organik sentez yöntemleri ile gerçekleştirilmesi çok zor veya imkansız olan reaksiyonlar enzimatik tepkimeler ile kolayca gerçekleşebilir.
- ✓ Enzimler geniş bir reaksiyon spektrumuna sahiptir.
- ✓ Enzimler aynı ortamda birbirini etkilemeden kalabilirler. Enzimlerin çalışma koşulları benzer veya aynıdır. Dolayısıyla aynı ortamda çeşitli biyokatalitik reaksiyonları aynı anda gerçekleştirebilirler. Multienzim sistemleriyle ardışık reaksiyonlar gerçekleştirebilmesi, reaksiyonları kolaylaştırır [80].

5.4 Enzimlerin Sınıflandırılması

5.4.1 Oksidoredüktazlar (EC 1):

İndirgenme ve yükseltgenme (redoks) reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Substrat üzerinde bir uçtan diğer uca elektron aktarımını sağlarlar. Enzim substratları genellikle elektron ve hidrojen donörleridir. Katalizledikleri reaksiyona göre dehidrojenaz veya redüktaz olarak da adlandırılır. Oksitlenen substrat hidrojen verici olarak kabul ediliyorsa enzim, dehidrojenaz olarak adlandırılır. Moleküler oksijen (O₂) alıcı ise enzim oksidaz olarak adlandırılır.

Enzimatik redoks prosesleri genellikle fermentasyon ile gerçekleşir böylece çoğalan hücreler ile gerçekleşen fermentasyon sırasında kofaktör rejenerasyon işlemine gerek kalmaz. Mikrobiyal hidroksilasyon ve ekmek mayası katalizörlü indirgenme reaksiyonları bu yöneme örnektir [67].

5.4.2 Transferazlar (EC 2):

Fonksiyonel grupların transferinde görev yaparlar. Donör üzerindeki fonksiyonel grubun (metil, açıl, amino, glikozil, fosfat gibi) akseptör substrat molekülüne taşınmasını katalizlerler. Bu sınıfa giren enzimler iki molekül arasında grupların ya da atomların aktarılmasını hızlandırır [90]. Transferazlar endüstride çok fazla kullanılmazlar. Çünkü transferazların denge tepkimeleri yüksek dönüşüm vermez, tepkimenin gerçekleşmesi yüksek ekonomiye ihtiyaç duyar ve reaksiyon sonucu elde edilen ürünler ortamdan kolaylıkla ayrılamazlar [67].

5.4.3 Hidrolazlar (EC 3):

Suyun katıldığı parçalanma ve kondenzasyon reaksiyonlarını katalizlerler. C-O, C-N, C-C gibi bağlar hidrolitik olarak yıkılırlar. Kısaca hidroliz reaksiyonlarını katalizlerler [90].

Hidrolazlar genelde deterjan endüstrisinde ve gıda endüstrisinde; protein, yağ ve karbonhidratları parçalamak için çeşitli tepkimelerde kullanılır. Hidrolazlar, endüstriyel proseslerde en çok kullanılan enzimlerdir. Lipazlar, esterazlar ve amidazlar bu sınıftandır[67].

5.4.4 Liyazlar (EC 4):

Hidrolitik olmayan yoldan çifte bağ oluşumunu ve çifte bağa katılma reaksiyonlarını katalizlerler. C-O, C-N, C-C gibi bağlar eliminasyon yolu ile yıkılır [90]. Genellikle kiral merkezler bağ oluşumu sırasında oluşur. Endüstride fenil alenin amonoliyaz kullanılarak, Parkinson tedavisinde kullanılan L- dihiroksi-L- fenil alanin (L-DOPA) üretilmiştir[67].

5.4.5 İzomerazlar (EC 5):

Molekül içindeki geometrik veya yapısal yeniden düzenlenmeyi katalizlerler. Molekül içinde oksidasyon-redüksiyonu, grup transferini ve çifte bağ oluşumunu gerçekleştirirler. Katalizledikleri izomerizasyon tiplerine göre rasemaz, epimeraz, izomeraz, tautomeraz gibi önerilen isimler alırlar. İzomerazlar değerli ürünleri elde etmek için daha ucuz substratlara uygulanırlar. Rasemazlar özellikle kinetik ayrımlarda kullanılır. Glukoz izomeraz ise sıklıkla kullanılan bir enzimdir ve endüstride glukozdan fruktoz (endüstriyel tatlandırıcı) oluşumunu katalizler [67], [90].

5.4.6 Ligazlar (EC 6):

ATP'nin hidrolizi yardımı ile açığa çıkan enerjiden yararlanarak iki molekülü bağlayıp sentez yapan enzimlerdir. Endüstride ligaz kullanılarak büyük ölçekte üretim yoktur fakat doğada DNA'nın tamirinde ve ribozomal peptid sentezinde önemli görevleri vardır[67], [90].

5.5 Lipazlar

E.C.3.-.-.- Hidrolazlar

E.C.3.1.-.- Ester bağına etki edenler

E.C.3.1.1.- Karboksilik ester hidrolazlar

E.C.3.1.3.3 Triaçilgliserol lipaz

Diğer isimleri:

- Gliserol Ester Hidrolaz
- Triaçil Gliserol Hidrolaz
- Tributiraz

Lipazlar (trیاçilgliserol ester hidrolazlar, EC 3.1.1.3.) serin hidrolaz sınıfından olup geniş bir substrat aralığına sahiptirler.

Lipazlar:

a) Bitki ve hayvanların çeşitli dokularından elde edilir.

b) Mantar ve bakteri kullanılarak fermentasyon yolu ile üretilir.

Endüstriyel uygulamalardaki kolaylıkları ve ekonomik olmalarından dolayı mikroorganizmalardan elde edilmiş olan lipazlar, daha çok tercih edilirler. Çünkü mikroorganizma kaynaklı enzimlerin katalitik aktiviteleri yüksektir, istenmeyen yan ürün oluşturmazlar, daha kararlı ve ucuz üretilirler, büyük boyutta ve yüksek saflıkta elde edilebilirler. Bunun yanında, izole edilmiş enzimler, kendilerini içeren mikroorganizmalara çoğu kez tercih edilmektedirler (Çizelge 5.1). Çünkü izole enzimler daha spesifik olarak etki etmekte, satış ve saklama için kolaylık sağlamaktadırlar [67], [90].

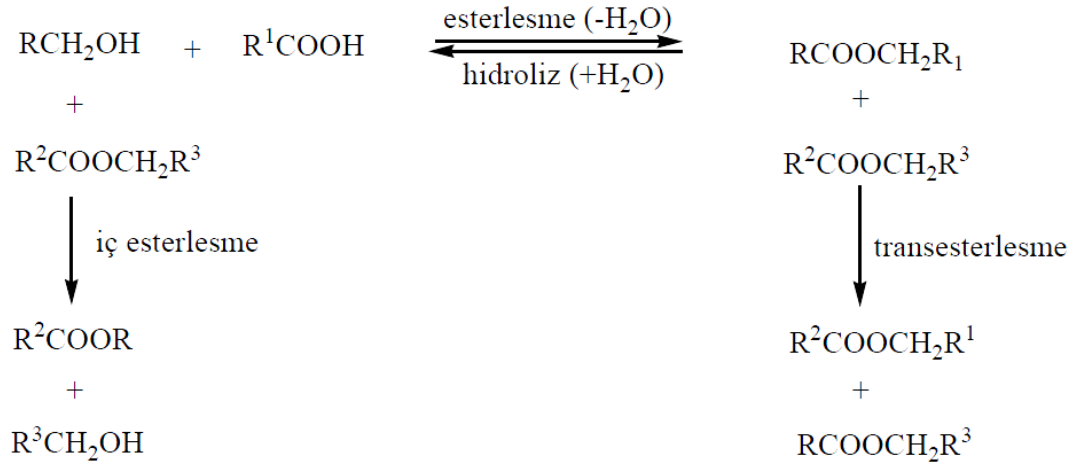
Çizelge 5.1 Mikrobiyal Kaynaklı Lipazlar

Kaynak	Mikroorganizma
Bakteri (Gram pozitif)	<i>Bacillus</i>
	<i>Staphylococcus</i>
	<i>Lactobacillus</i>
	<i>Streptococcus</i>
	<i>Micrococcus</i>
	<i>Propionibacterium</i>
	<i>Burkholderia</i>

Çizelge 5.1 Mikrobiyal Kaynaklı Lipazlar (devamı)

Kaynak	Mikroorganizma
Bakteri (Gram negatif)	<i>Pseudomonas</i>
	<i>Chromobacterium</i>
	<i>Acinetobacter</i>
	<i>Aeromonas</i>
Mantar	<i>Rhizopus</i>
	<i>Spergillus</i>
	<i>Penicillium</i>
	<i>Mucor</i>
	<i>Ashbya</i>
	<i>Geotrichum</i>
	<i>Beaveria</i>
	<i>Humicola</i>
	<i>Rhizomucor</i>
	<i>Fusarium</i>
	<i>Acremonium</i>
	<i>Alternaria</i>
	<i>Eurutrium</i>
	<i>Ophiostoma</i>
Maya	<i>Candida</i>
	<i>Yarrowia</i>
	<i>Pichia</i>
	<i>Saccharomyces</i>
	<i>Torulospora</i>
	<i>Trichosporon</i>
Aktinomisetler	<i>Streptomyces</i>

Günümüzde lipazlar hem sulu hem de susuz ortamda, yapılması güç tepkimeleri katalizleyen en önemli biyokatalizörler arasında yer almaktadır. Lipazlar suda çözünebilen enzimlerdir ve yağların ester bağlarının hidrolizini katalizler (Şekil 5.2). Lipazlar seçicilik gösterdikleri substratın hidroliz reaksiyonlarının tersi olan esterleşme, iç esterleşme ile trans-esterleşme reaksiyonlarını da kolaylıkla katalizleyebilirler. Bu reaksiyonların şeması aşağıdaki gibidir [50],[51].



Şekil 5.2 Lipaz katalizli reaksiyonların şeması

5.5.1 Lipazların Kullanım Alanları

Lipazlar, esterleşme, transesterleşme ve hidroliz tepkimelerini düşük sıcaklıkta katalizlemeleri, susuz ortamda kararlı ve aktif olmaları, kofaktör gerektirmemeleri, yüksek katalitik güçleri, ucuz olmaları, yüksek substrat seçimlilikleri, yan ürün oluşumunu önlemeleri nedeniyle yaygın olarak kullanılırlar. Lipazlar, stereo ve bölgesel spesifik olmaları nedeniyle kimyasal olarak katalizlenemeyen tepkimeleri katalizleyebilirler. Lipazlar, triaçilgliserolü sulu ortamda gliserol ve yağ asidine çevirirler [52]. Bu sebeple endüstriyel alanda lipazlardan çok fazla faydalanılır. Lipazların uygulama alanları bileşiklerin sentezi, karbonhidrat ester sentezi, poli doymamış yağ asitlerinin elde edilmesi, biyolojik aktif bileşenlerin sentezi, parfüm ve tat esterlerinin üretimi, yapısal lipidlerin sentezi ve organik karbonatların sentezi olarak sınıflandırılabilir. Lipazlar ile gerçekleştirilen optik ayırma prosesleri tipik olarak ya bir esterlin rasemik karışımının enantiyoseçimli hidrolizi (örneğin iki izomerden sadece bir tanesinin hidrolizinin tercih edilmesi) ya da rasemik bir asit/esterin enantiyoseçimli

esterleşmesi/transesterleşmesi ile esterden asidin ayrılması şeklinde gerçekleşir. Bu tür çeşitli lipaz katalizli kiral sentez yöntemleri endüstride kullanılır.

Çizelge 5.2 Lipazların endüstride kullanım alanlarından bazıları

Endüstri	Tepkime	Ürün/Uygulama
Deterjan	Yağların hidrolizi	Fabrikalardan yağ atıklarının uzaklaştırılması
Süt Ürünleri	Süt yağının hidrolizi, Peynirin olgunlaşması	Süt, peynir ve tereyağında tat geliştirme
İçki	Aroma geliştirme	İçkiler
Yağ	Transesterleşme, hidroliz	Kakao yağı, margarin, yağ asitleri, gliserol
Et ve balık	Tat artırma	Et balık ürünleri
Kimyasallar	Enantiyoseçimlilik, sentez	Kiral yapı taşları
Farmasotik	Transesterleşme, Hidroliz	Sindirime yardımcı, özel yağlar
Kozmetik	Sentez	Nemlendirme
Deri	Hidroliz	Deri Ürünleri
Kağıt	Hidroliz	Kaliteli kağıt üretimi
Temizlik	Hidroliz	Yağların uzaklaştırılması

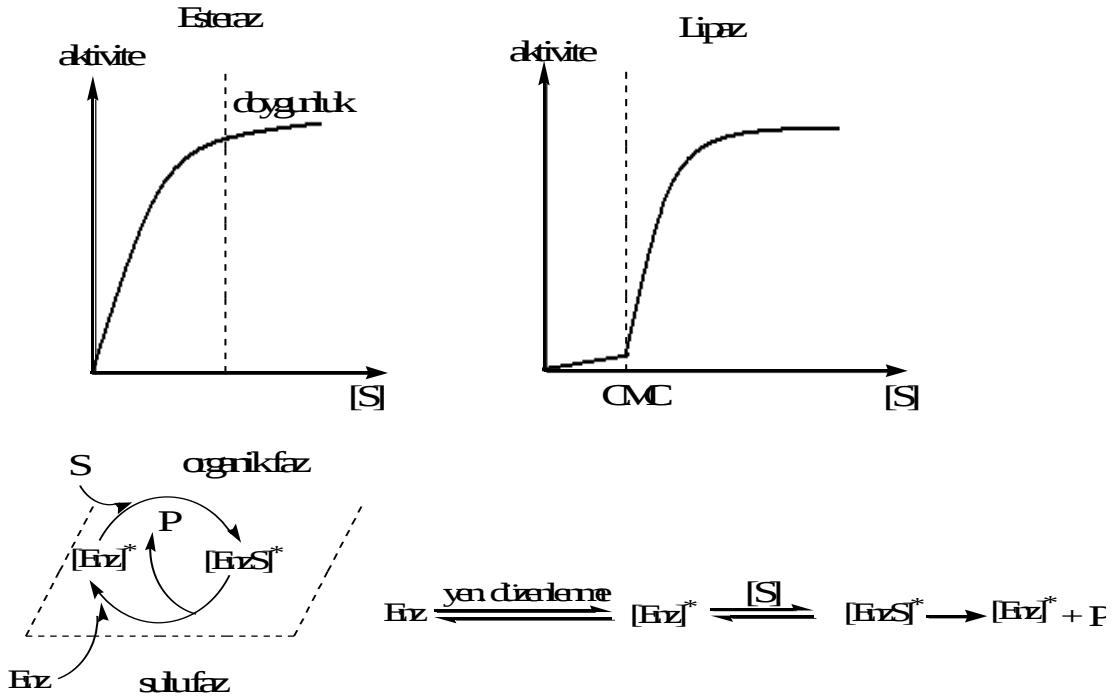
Lipazlar, rasemik karışımlardan, prokiral veya mesokiral bileşiklerin; ya da diastereomerik karışımlardan enantiomerik olarak saf bileşiklerinin hazırlanmasında geniş ölçüde kullanılmaktadırlar. *Pseudomonas cepacia*'dan alınan lipazlar, % 70-83 gibi yüksek verimde karboksilik asidin doğrudan esterifikasyonunu yapabilmektedirler [51]. *Candida antarctica* lipaz enziminin, organik çözücülerde transesterifikasyon reaksiyonlarını çok verimli olarak katalizlediği gösterilmiştir [21].

Kiral ilaçların üretiminde lipazların faydası oldukça iyi bilinmektedir. Fenoksipropiyonat herbisitlerin sentezi için başlangıç materyalleri olan 2- halopropiyonik asitlerin eldesi, (S) izomerlerinin bütanolle Porcine Pankreatik Lipazının (PPL) hegzan içerisinde katalizlenen enantiyoseçimli esterleşmesine dayalı bir işlemdir. Çok fonksiyonlu organik

bileşiklerin bölgesel seçimli modifikasyonu, özellikle AIDS tedavisi alanında lipaz uygulamasının yine hızla genişleyen diğer bir alanıdır [52], [53].

5.5.2 Lipaz Enziminin Aktivitesi

Bir enzimin aktivitesi, o enzimin katalizlediği reaksiyonun hızıdır. Uluslararası Birim, standart koşullar altında dakikada bir mikromol substratı dönüşüme uğratan enzim miktarıdır. Aktivite birimi Unite (U)'dir. Lipazlar yüzey aktif enzimler olup sadece uzun zincirli yağ asitlerinin ve suyun temas yüzeyine bağlanmasıyla aktiflik kazanırlar. Bu özellik, lipazı esteraz enziminden ayıran en önemli özelliktir. Lipazlar bu özellikleriyle diğer enzimlerin gösterdikleri “Michealis-Menten” aktivitesini göstermezler. Esteraz enzimi substrat konsantrasyonun artışıyla birlikte enzimin aktivasyonunda da keskin bir artış gözlenmektedir. Lipazlar ise kritik konsantrasyonun (CMC: critical micellar concentration) altındaki değerlerde hiçbir aktivite göstermezler. CMC noktasının üstündeki değerlerde substrat konsantrasyonun artışıyla beraber enzimin aktivitesinde de keskin bir yükseliş gözlenir. Bu ikilemin mantıksal açıklaması son yıllarda enzimlerin yeniden düzenlenmesi durumu olarak gösteriliyor. Su-yag ortamının yokluğunda lipazın aktif bölgesi kısa bir α -helix zinciri tarafından kapalıdır ve inaktif durumunda bulunur. Su-yag ortamı oluştuğunda enzim yüzeyinin su ve yağ ile etkileşmesiyle enzimin aktif bölgesini kapatan α -helix kapağı geri katlanarak aktif bölge açılır. Bu yeniden düzenlenmeyle enzim aktif hale gelir. Bu nedenle lipaz katalizli hidroliz reaksiyonları bifazik ortamlarda gerçekleştirilir. Enzim aktivitesini konsantrasyonla birlikte pH, sıcaklık ve solvent seçimi de etkilemektedir [80].

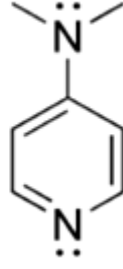


Şekil 5.3 Lipaz ve esteraz aktivite grafiği

Lipaz aktivitesi gerçekleşmesi için kofaktörlere gerek yoktur. Ca^{+2} gibi iki değerlikli iyonlar genellikle aktiviteyi etkilemektedir. Bunun nedeninin, uzun zincirli yağ asitleri üzerinde kalsiyum tuzlarının oluşmasıdır. Lipaz aktivitesi, Co^{+2} , Ni^{+2} , Hg^{+2} ve Sn^{+2} tarafından kuvvetli bir şekilde; Zn^{+2} , Mg^{+2} , EDTA ve SDS tarafından zayıf bir şekilde inhibe edilmektedir [76].

Bazı durumlarda ise lipaz aktivitesini çeşitli ilave maddeler arttırmaktadır. Lipaz aracılı transesterifikasyon reaksiyonlarında DMAP, 2,4- lutidin, 2,6- lutidin ve piridin gibi çeşitli bazlar varlığında reaksiyon koşulları denenmiştir ve bu maddeler arasında özellikle reaksiyon oranı arttıran bazın DMAP olduğu saptanmıştır [91].

DMAP (4-Dimetilaminopridin) oldukça bazik bir moleküldür ve tepkime hızını arttırmaktadır. DMAP molekülü (Şekil 5.4), enzim ile etkileşerek enzimin stereoseçiciliğini etkilemektedir ve istenilen molekülün enantiyomerik aşırılıkta eldesini sağlamaktadır. Yapılan farklı bir çalışmada optimum koşullardaki deney ortamına katkı maddesi olarak DMAP ve trietilamin eklenmiş ve bu maddelerin enantiyomerik aşırılığa etkisi incelenmiştir. Trietilaminin enantiyomerik aşırılığa etkisinin negatif, DMAP molekülünün ise pozitif etkisi olduğu bulunmuştur [76].



Şekil 5.4 DMAP Molekülü

5.5.3 Organik Solventlerde Lipaz Enziminin Uygulanabilirliği

Lipazların en önemli avantajlarından biri organik çözücülerde de aktivite göstermesidir. Lipazların bu avantajı sulu ortamda çözünmeyen bileşiklere uygulanmasını sağlamıştır. Enzimler genellikle ince bir su tabakasıyla (hidrat kabuğu) kaplıdır. Hidrat kabuğu sayesinde lipazlar organik solventlerde kararlılığını koruyarak aktivitesini yitirmezler. Örneğin, Parain Pankreatik lipazı toluen ya da dekanol içinde 100°C’de birkaç saat kararlı kalabilirler. Lipaz katalizli reaksiyonlar organik solvent içinde yapılacaksa enzimin aktivitesi için solvent seçimi çok önemlidir. Seçilen organik solvent enzimin hidrat kabuğuna zarar vermemelidir. Bu nedenle lipaz enzimi için en çok kullanılan organik solventler; benzen, toluen, n-hekzan, siklohekzan, heptan, oktan, izo-oktan, nonan, petrol eteri, triasetin, karbontetraklorür, kloroform ve etil asetatdır. Organik solvent kullanımı, reaksiyon tamamlandıktan sonra filtrasyonla enzimin geri kazanılıp tekrar kullanılmasına imkan sağlamaktadır[50].

MİKROORGANİZMALAR

Mikroorganizmalar, gözle göremediğimiz ancak mikroskop kullandığımızda görebildiğimiz prokaryotik ve ökaryotik organizmalardır. Arkea ve bakterilerin sahip olduğu prokaryotik hücre yapısı çekirdek etrafında membran içermez. Kalıtsal bilginin saklı olduğu DNA hücre içerisinde serbest halde bulunur. Aynı zamanda prokaryotik hücrelerin sahip olduğu diğer yapılar ise, hücre çeperi, sitoplazmik membran, inklüzyon ve nükleoidlerdir. Prokaryot hücreler, ökaryotlar ile kıyaslandığında çok küçük hücrelerdir. Küçük hücrelerin, hücresel metabolik hızı ve büyüme hızı daha fazladır. Kısa sürede popülasyonlarının hızlı biçimde artması ekosistemde önemli fizikokimyasal değişimlere neden olur. Dolayısı ile küçük olan boyutları onların biyolojik özelliklerini etkiler ve onlara ekolojik açıdan avantaj sağlar. Mikroorganizmaların gerçekleştirdiği biyotransformasyon reaksiyonları için en önemli avantaj budur. Hızlı büyümeleri sonucunda daha hızlı biyotransformasyon reaksiyonlarını gerçekleştirirler ve çok çeşitli substratlara etki edebilirler.

Biyotransformasyon reaksiyonlarında kullanılan mikroorganizmaların esas kaynağı doğadır. Mikrobiyolojide kullanılan başlıca organizmalar funguslar (maya ve küfler) ve bakterilerdir. Mikroorganizmalar istenilen reaksiyonu çok yüksek verimde ve kısa sürede gerçekleştirirler. Ve kimyasal reaksiyonlar ile gerçekleşmeyen özgül basamak veya basamakları mikroorganizmalar biyolojik olarak katalizlerler. Her organizma, çoğu az miktarda üretilen ve hücresel süreçte yer alan yüksek çeşitlilikte enzim üretir. Bununla birlikte bazı mikroorganizmlarda bazı enzimler çok fazla üretilir ve hücre içinde tutulmadan dış ortama salınır. Ekzoenzim denilen bu ekstrasellüler enzimler özellikle biyokataliz reaksiyonlarında ve endüstriyel ölçekte üretimler için kullanılır. Doğadan

elde edilen yabancı tip organizmalar güncel biyoteknolojik gelişmeler kullanılarak daha verimli rekombinant soylara dönüştürülür. Özellikle istenilen işleme uygun olarak değiştirilen bu organizmalar, yalnızca ilgilenilen maddeyi dönüşüme tabi tutarlar. Böylece reaksiyonda istenilmeyen yan tepkimeler gerçekleşmeden yüksek verimde biyokataliz gerçekleşir. Biyotransformasyon reaksiyonlarında kullanılan mikroorganizmalardan beklenen özellikler;

- İstenilen ürünü yüksek verimde üretmesi,
- Büyük miktarlarda hazırlanabilen ve pahalı olmayan besiyerinde üreme yeteneğinde olması,
- Üretim ortamında hızlı ve yoğun olarak büyümesi,
- Sahip olduğu özellikleri kaybetmemesi,
- Genetik manipulasyona uygun olması,
- Bitki, hayvan ve özellikle insanlar için patojen olmaması gerekmektedir.

Mikroorganizmaların sahip oldukları organik madde potansiyelinden yararlanabilmek için onların çevre koşullarındaki değişikliklere karşı duyarlı olmalarından yararlanılır. Mikroorganizmaların fizyolojik faaliyetleri çevre koşullarındaki değişikliklere karşı oldukça duyarlıdır. Onlar kendi normal habitatlarından besin olarak aldıkları organik bileşiklerin bir kısmını enerji üretmede, bir kısmını da yapısal madde olarak kullanırlar. Fakat çevresel koşullarında az çok değişiklik olan biyotransformasyon ortamlarında mikroorganizmalar kendi doğal yaşamlarından soyutlanırlar. Böyle durumlarda aldıkları organik maddelerin bir kısmını enerji için kullanmalarına rağmen, bir kısmını yapısal madde olarak kullanmaz ve bazı metabolik ürünlere dönüştürürler. Bu gibi uygulamalar sonucunda özellikle funguslardan penisilin, alkoller, sitrik asit, kojik asit, glukonik asit, fumarik asit gibi organik asitler, renk pigmentleri, enzimler, vitaminler ve büyüme maddeleri gibi çok çeşitli biyotransformasyon ürünleri elde edilmiştir. Bakteriler ise, laktik asit, aseton-bütanol, 2,3 bütandiol, bakterial proteaz, dekstran, kobalamin ve 2-ketoglukonik asit gibi ürünler vermiştir[89].

6.1 Bakteriler

Bacteria domaini çok fazla çeşitlilikte patojenik olan ya da olmayan prokaryotik canlıdan oluşur. Bakteri morfolojisine bakıldığında, hücre yapılarının ilkel olduğu görülür. Bakterilerde zarla çevrili nükleus yoktur fakat kalıtsal materyal sitoplazma içinde yer alır. Ayrıca bakterilerle ilgili bilinmesi gereken diğer bir yapı endospordur. Sporulasyon bakterinin kötü koşullara dayanıklılık gösterebilmesi için oluşturduğu bir savunma mekanizmasıdır. Endosporlar sıcaklığa ve çeşitli kimyasallara dayanıklı yapılardır ve parçalanmaları çok güçtür. Ortam şartları düzeldiğinde spor çimlenerek vejetatif yapıyı oluşturur [89]. Bazı bakteri örnekleri:

6.1.1 *Agrobacterium rhizogenes*

Agrobacterium, Rhizobiaceae familyasına ait olan bir Alfa Proteobacterium'dur. Çubuk şeklinde, gram negatif bir bakteridir. Bu grubun birçok üyesi bitkilerde çeşitli hastalıklara yol açar. *A. rhizogenes* türü ise saçaklı kök oluşumuna neden olur. Saçaklı kökler sekonder bitki metabolitlerinin üretimi için önemlidir çünkü bol dallanmaları, kılcal köklerinin çok yoğun olması ve yüksek miktrada biomass üretim potansiyelleri mevcuttur.

Bu bakteriyal etmen biyolojik özelliklerinden dolayı en fazla incelenen organizmalar arasındadır. Bu özelliğinden dolayı moleküler biyoloji ve genetik ile bitki ıslahı çalışmalarında oldukça fazla tercih edilir. Uygulamanın kolay ve ekonomik oluşu, transformasyon oranının yüksek oluşu, yüksek oranda sekonder metabolit üretimi ve hızlı kök büyümesi gibi özelliklere sahip olması bu bakteri üzerindeki çalışmaların asıl sebebidir [89], [92].

6.1.2 *Bacillus subtilis*

Endospor oluşturan, filogenetik olarak düşük GC oranına sahip olan, gram pozitif bakterilerdir. Aerobik veya fakültatif olan ve katalaz oluşturan canlılardır. *Bacillus* cinsi bakteriler topraktan, toz partiküllerinden veya havadan izole edilebilir. İzole edilen bu doğal örnekler 80°C'de 10 dakika tutulduğunda diğer organizmalar elimine olur. *Bacilluslar* ise sporlarından dolayı canlı kalır. *Bacilluslar* tek karbon kaynağı olarak,

şeker, organik asit, alkol gibi ürünleri, tek azot kaynağı olarak ise amonyağı kullanırlar. Bazı strainler ise vitamine ihtiyaç duyarlar. *Bacillus* cinsi bakteriler hücre dışı hidrolitik enzimler üretirler ve polisakkarit, nükleik asit, lipid gibi kompleks molekülleri yıkarlar. Ve bunları karbon kaynağı ve elektron vericisi olarak kullanırlar. Basil cinslerinin çoğu, basitrasın, polimiksin, tirosidin, gramisidin ve sirkulin gibi antibiyotikler üretirler. Bu antibiyotiklerin çoğu sporlanma sırasında üretilir yani kültürün durgunluk fazına girdiği süreçte üretilir [89]. *Bacillus* cinsi bakteriler sahip oldukları önemli özellikleri sayesinde endüstriyel alanlarda çok fazla tercih edilmektedir[93].

6.2 Funguslar

Ökaryotik hücre yapısına sahip olan fungusların habitatları oldukça geniştir. Bazıları sucul olup tatlı sularda yaşarlar, birkaçı ise denizde yaşar. Ancak fungusların çoğu karasaldır. Onlar toprak veya ölü bitki materyali üzerinde yaşarlar ve organik karbonun minerilizasyonunda önemli rol oynarlar. Funguslar basit besinsel gereksinimleri olan kemoorganotrof canlılardır. Bunun yanında düşük pH ve yüksek sıcaklıklarda (62°Cderece'ye kadar) çoğalabilmeleri ve fungal sporlara sahip olmaları bu canlıların habitatlarının çeşitliliğinin en temel sebebidir. Fungusların hücrelerinin etrafında selüloz, kitin veya her ikisinden oluşan iyi gelişmiş bir hücre çeperi vardır. Protoplastlarının içinde ökaryotik canlılarda bulunan ve farklı işlevlere sahip organeller vardır. Ayrıca prokaryotlardan farklı olarak gerçek nükleuslara sahiptirler. Çok geniş habitata sahip olan funguslar küfler, mayalar ve şapkalı mantarlar olmak üzere 3 büyük grupta incelenirler [89], [94].

6.2.1 Makroskopik Funguslar (Şapkalı mantarlar)

Şapkalı mantarlar filamentli bazidiyomisetler olup yenilebilen büyük fruktifikasyon organları vardır. Şapkalı mantar fungusları yaşamlarının büyük bölümünü toprakta, yaprak atıkları ve çürümekte olan odunlar üzerinde geçirirler ve çevre şartları uygun olduğunda fruktifikasyon organları toprak üstünde belirir. Şapkalı mantar sporları rüzgarla dağılır ve genellikle nemli ve organik madde bakımından zengin bir yere düştüklerinde döngü tekrarlanır.

6.2.2 Tek Hücreli Funguslar (Mayalar)

Maya hücreleri küre biçimli, oval veya silindirik yapıdadır. Hücre bölünmesi tomurcuklanma ile olur. Maya hücreleri bakterilerden çok daha büyüktür ve nükleusa sahiptir. Çoğu maya aerobiktir ve bunun yanı sıra fermentatif metabolizma yapma yeteneğindedir. Mayalar meyve, çiçek ve ağaç kabukları gibi şeker bakımından zengin habitatları tercih ederler. Bazıları hayvanlar ve insanlar için patojendir. Mayalar ekmek ve bira yapımında ticari olarak kullanılır.

6.2.3 Filamentli Funguslar (Küfler)

Doğada yaygın olan bu funguslar daha çok ekmek, peynir ve meyveler üzerinde bulunurlar. Küflerin çoğu zorunlu aerobtur. Tek bir filament hif olarak isimlendirilir. Hiflerin büyümesi eşeysiz üremedir. Eşeyli üreme sonucu ise bazı küfler sporlar oluşturur. Bu sporlar kuraklığa, ısıya, donmaya ve bazı kimyasal ajanlara dirençlidir. Eşeyli veya eşeysiz bir fungus sporu çimlenebilir ve bundan yeni hif gelişir [89]. Bazı küf örnekleri:

6.2.3.1 *Hypocrea jecorina*

Alem: Fungi

Bölüm: Ascomycota

Sınıf: Sordariomycetes

Familiya: Hypocreaceae

Cins: *Hypocrea* (Trichoderma)

Tür: *Hypocrea jecorina* (Sinonim: *Trichoderma reesei*) [95]

Hypocrea cinsi organizmalar dünyada geniş yayılıma sahip, hızla çoğalabilen, filamentli funguslardır. Sıklıkla ormanlardan ve tarımsal topraklardan izole edilir [96]. Ormanlardaki ağaç kabukları üzerinde ve tahtalar üzerinde yetişir. *Hypocrea* türleri misel gelişimi için uygun olan nemli yaprak yığınlarının bulunduğu toprağın üst katmanından izole edilen saprofit organizmalardır. Besi ortamında ilk birkaç gün tüm besiyerini kaplayan beyaz gevşek bir misel görülür. Bir süre sonra misel daha da

sıkılaşıp yünümsü bir örgü görünümü kazanır ve konidyumlar oluşmaya başladığında renk yeşile döner. Sıcaklık, nem ve pH tüm mantarlarda olduğu gibi bu cinsin de gelişimini etkilemektedir. *Hypocrea sp.* türleri çok sıcak tropikal topraklardan izole edilebildiği gibi soğuk topraklarda da gelişir. 0-40 °C arasında varlığını sürdürebilirler fakat gelişmeleri için optimum sıcaklık aralığı 22-26 °C' dir. Toprak nemi ise gelişmeleri için gerekli olan en önemli parametrelerdendir. Tüm funguslarda olduğu gibi optimum miktarda nem varlığı gelişmelerini hızlandırırken, nem miktarının çok yüksek olması fungusun hif gelişimi, spor üretimi ve germinasyonunu negatif olarak etkilemektedir. pH parametresi ile ilgili araştırmalar ise cinsteki organizmaların asidik ortamdaki gelişimlerinin pozitif yönde olduğunu gösterir ve optimum pH aralığı 3,5- 5,6 arasındadır [97]. *Hypocrea jecorina* (anamorf *Trichoderma reesei*) kağıt, gıda, tekstil, deterjan endüstrisi için büyük öneme sahip selüloz enzimini üretir. [98], [99].

6.2.3.2 *Aspergillus niger*

Alem: Fungi

Bölüm: Ascomycota

Sınıf: Eriothymycetes

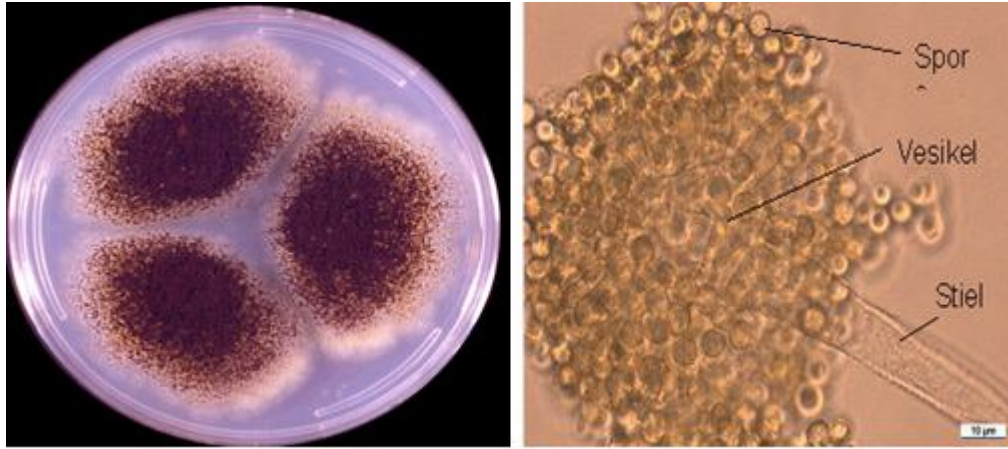
Familia: Trichocanoceae

Cins: *Aspergillus*

Tür: *Aspergillus niger*

Aspergillus cinsi, saprofit beslenen funguslardan oluşan ve doğada yaygın olarak bulunan organizmalardır. Antartika dahil her yerde, toprakta ve özellikle çürüyen organik maddelerde bulunurlar. Çok geniş çeşitlilikte substratları kullanan bu funguslar çürümüş yaprak yüzeylerinde, depo edilmiş tohumlarda, gübre yığınları ve çürümüş sebzeler üzerinde bulunur. Bazı türler saprofit olmasına rağmen bazıları ise bitki ve hayvanlarda patojen olabilirler. *Aspergillus* cinsi organizmaların kolonileri genellikle çok hızlı gelişir. Renkleri türlere ve gelişme koşullarına bağlı olarak beyaz, sarı, kahverengi, yeşil ve siyah olmaktadır. *A.niger*'i diğer türlerden ayıran en önemli özelliği çok koyu kahverengi ve koyu siyah sporlar oluşturmalarıdır. Ayrıca *Aspergillus* türleri besiyerine

dağılan pigment üretebilirler ve bu pigmentlerin rengi koloninin hava miselli kısmının renginden farklı olabilir. [100].



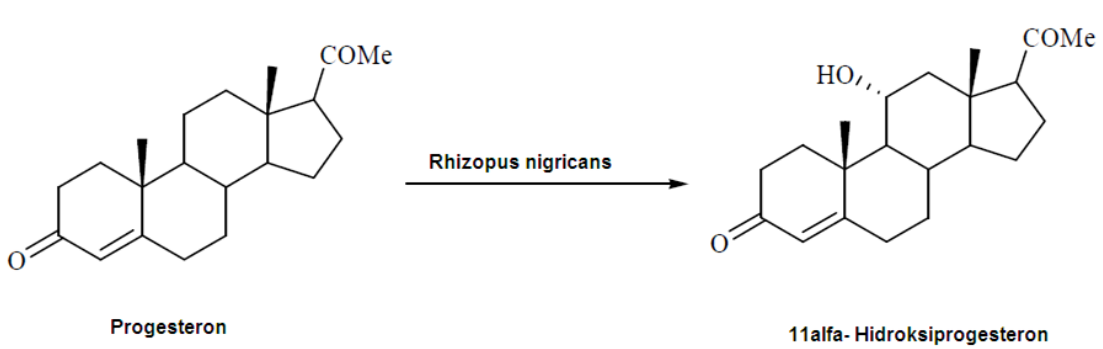
Şekil 6.1 *A.niger* organizması

Aspergillus türleri aerobiktir ve oksijenli her ortamda bunlara rastlanır, yüzeyde küf olarak büyürler. Glikoz, fruktoz, maltoz ve nişasta gibi karbon kaynaklarıyla büyümelerinin yanı sıra; çoğu *Aspergillus* türü, besin maddelerinin çok düşük derişimde olduğu veya başka organizmaların kullanamadığı besin kaynaklarının bulunduğu ortamlarda da büyüme yeteneğine sahiptir. Bunun başlıca örneği *A. niger*, nemli duvarlar üzerinde büyür, banyo gibi nemli yerlerdeki duvar küflerini oluşturur.

A. niger çok çeşitli alanlarda kullanılan bir küftür. Özellikle sitrik asit üretiminde bu fungus tercih edilir. Sitrik asit ticari önemi yüksek olan bir kimyasaldır. Sitrik asit fermentasyonu, *A.niger* kullanılarak ucuz ve kolay bir şekilde gerçekleşir. Bunun dışında gıda katkı maddesi olan glukonik asit de *A. niger* ile sentezlenir. Ayrıca *A. niger* saf enzim kaynağı olarak kullanılır. Endüstride bu enzimlerden sıkça faydalanılır. Bu enzimler: α -Amilaz, Amiloglukozidaz, Selülaz, Laktaz, invertaz, Pektinaz, Asit proteaz'dır. *A. niger* küfü Cu(II), Pb(II) ve Cr(VI) gibi ağır metallerin ortamdan uzaklaştırılması amacı ile biyosorpsiyonda da kullanılır. Bunların dışında *A. niger* biyotransformasyon reaksiyonlarında da kullanılır. Terpen, doğal lakton veya karmaşık yapıli halkalara stereospesifik grup ilavesi gibi kimyasal yollarla gerçekleşmesi zor olan reaksiyonları gerçekleştirir. Fermentasyon ortamındaki bileşenlere bağıli olarak *A. niger* değışik enzimler üretir ve bu enzimler sayesinde biyotransformasyon reaksiyonlarını gerçekleştirir [89], [100], [101].

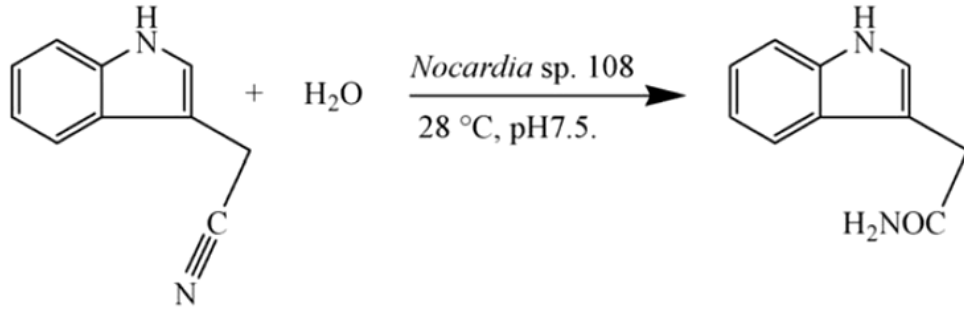
6.3 Mikrobiyal Biyotransformasyon Örnekleri

Birçok bakteri ve fungus türleri ile bütün hücre biyodönüşümü gerçekleştirmek mümkündür. Enzimatik aktivitelerinden dolayı biyoaktif moleküllerin üretimi için birçok farklı dönüşüm mekanizması uygulanabilir. Mikrobiyal transformasyon için hücreler genellikle canlı olmak zorunda değildir. Hatta büyüyen hücre yerine dinlenen hücre ile çalışmak daha avantajlı olabilir. Ayrıca biyoteknoloji alanındaki gelişmeler doğrultusunda rekombinant olarak üretilen strainlerdeki enzimlerin, yabanıl tip mikroorganizmalara göre daha yüksek verimde çalıştıkları görülmüştür [63]. Mikroorganizmaların endüstride ve bilimsel alanda çeşitli amaçlarla kullanıldığı bilinmektedir. Mikroorganizmalar biyoteknolojik olarak çeşitli moleküllerin biyodönüşüm reaksiyonlarında da kullanılmaktadır. Örneğin; küçük deri tahrişi sonucu oluşan şişme ve kaşıntıyı azaltmak amaçlı kullanılan kortikosteroidlerden olan hidrokortizon ve kortizonun üretiminde *Rhizopus nigricans* fungusu kullanılmıştır (Şekil 6.2). Bu fungus bir kortizon öncülünün sterospesifik hidroksilasyonunu gerçekleştirmiştir. Çoğu steroid molekülü bu tarz hidroksilasyonları içermektedir. Bu transformasyon organik kimya ile çok zor olarak yapılabilmesine karşın, mikrobiyal olarak basit ve ekonomik olarak gerçekleştirilmektedir[89].



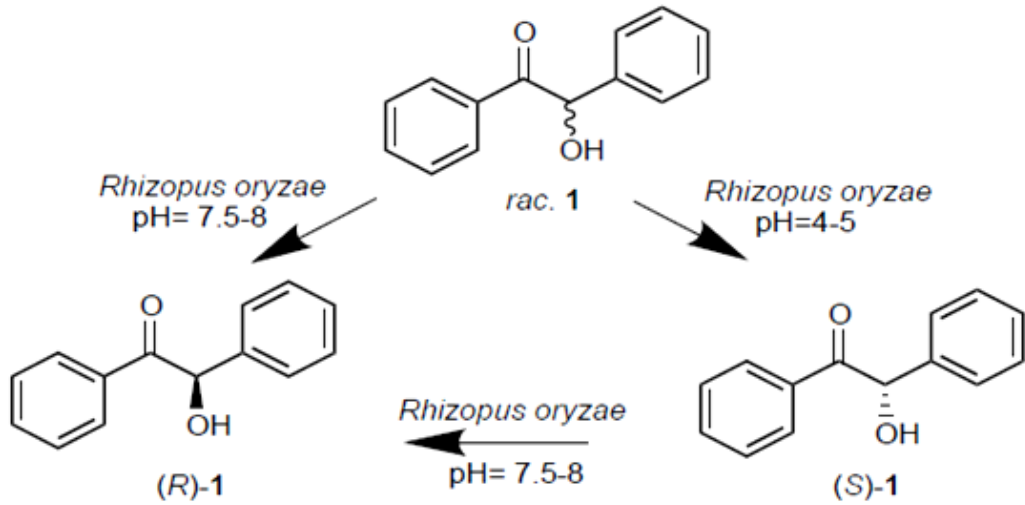
Şekil 6.2 Kortizon üretiminde ilk reaksiyon olan progesterondan, 11 α -hidroksiprogesteron oluşumu

Organik nitril bileşiklerinin toksik olduğu bilinmesine rağmen pek çok organizma bu durumu asimile ederek bileşiği karbon ya da nitrojen kaynağı olarak kullanmaktadır ve yapısını değiştirmektedir. İndol-3-asetonitril bileşiği *Nocardia sp. 108* mikroorganizması tarafından indol-3-asetamide (Şekil 6.3) dönüştürülmüştür [102].



Şekil 6.3 *Nocardia* sp. 108 ile indol-3-asetamid sentezi

Rhizopus oryzae (NRRL 9363) mikroorganizmasının rasemik haldeki benzoin üzerindeki derasemizasyon aktivitesi tespit edilmiştir (Şekil 6.4). *R. oryzae*'nin enzim sistemi rasemik benzoinden, kiral benzoin oluşumunu katalizlemektedir. Bunu iki basamakta gerçekleştirir. İlk olarak substratın derasemizasyonunu sağlar ardından bir enantiyomerin, enantiyosaf degradasyonu gerçekleştirir [103].



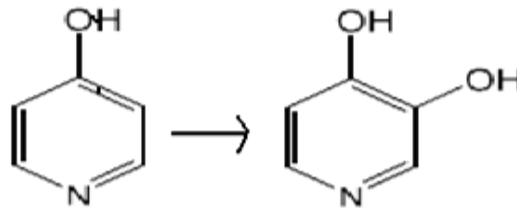
Şekil 6.4 *Rhizopus oryzae* ile derasemizasyon prosesi

Rhizopus arrhizus ketonlar ve keto esterler üzerinde çalışılmış ve stereoseçiciliği gösterilmiş olan bir mikroorganizmadır [46]. Doğal ürün olan başlangıç maddesinden başlanarak çeşitli kimyasal reaksiyonlar sonucunda sentezlenen maddelerden bazılarının, *Rhizopus nigricas* ile biyotransformasyonu gerçekleştirilmiş ve yeni biyoaktif metabolitler elde edilmiştir [104].

Biyodegradasyon özellikleri sayesinde *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Mucor* türü mantarlar zenobiyotik substratların biyodönüşümü ve hidroksilasyon katalizinde ve enantiomerikçe saf ara ürünler oluşturma kapasiteleri ile farmakolojik ürün eldesi biyodönüşüm çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır [57],[58].

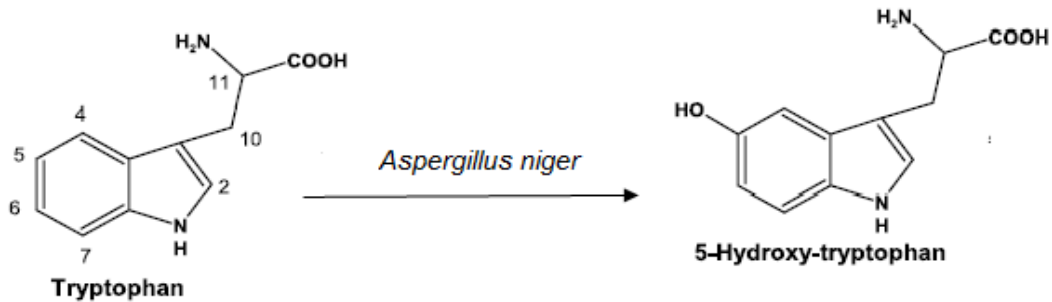
Nocardia grubu bakteriler karboksilik asit ve aldehid redüksiyonu, fenol metilasyonu gibi geniş enzimatik kapasiteleri nedeniyle çeşitli biyotransformasyon araştırmalarında tercih edilmiş ve anti kanser ve anti HIV aktiviteleri olan tripen asit, ursolik asit, oleanolik asit gibi pentasiklik asitlerin enantioselektif biyotransformasyonu sağladıkları gösterilmiştir[62].

Agrobacterium sp. mikroorganizmalarının da 4-hidroksipiridini biyotransforme ederek 3,4-dihidroksipridine (Şekil 6.5) dönüştürdükleri belirlenmiştir [105].



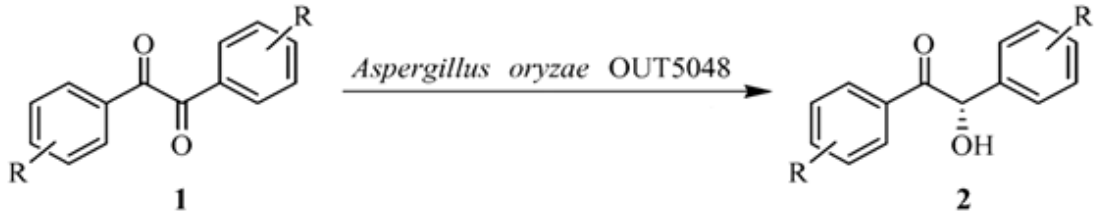
Şekil 6.5 *Agrobacterium sp.* biyotransformasyonu

A. niger ile yapılan biyotransformasyon çalışmasında başlangıç maddesi olarak triptofan molekülü kullanılmıştır. Triptofan mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonu sonucu 5-hidroksi-triptofana dönüşmektedir (Şekil 6.6). Bu tür çalışmalar, mikrobiyal biyotransformasyon yöntemi ile hidroksiindol türevlerini sentezlemek amacıyla kullanılan *Aspergillus niger* mikroorganizmasının etkin biyokatalizörler olduğunu göstermektedir [106].



Şekil 6.6 Triptofan'ın mikrobiyal biyotransformasyonu

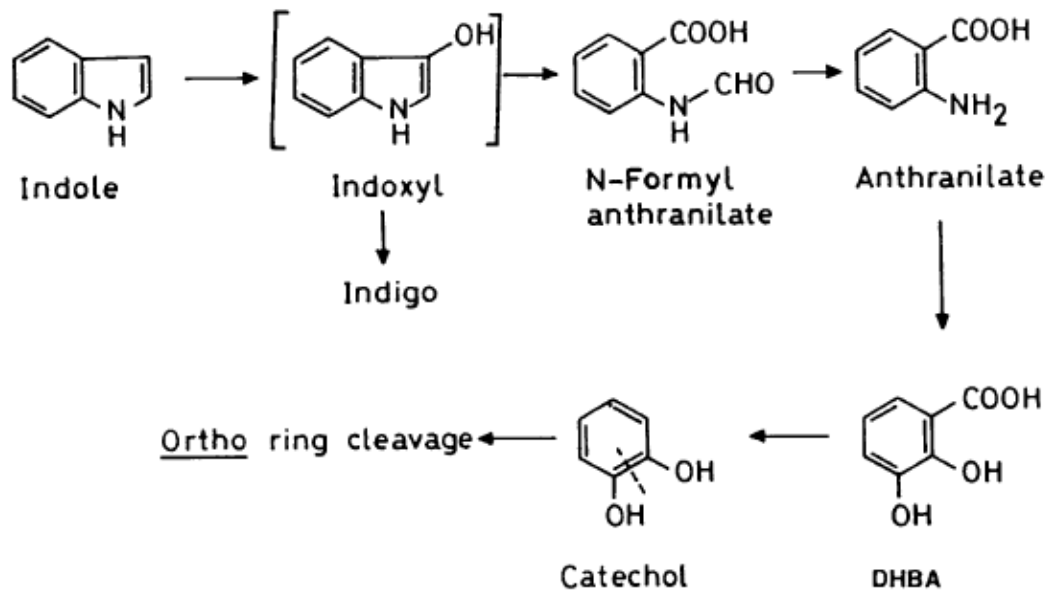
A. oryzae ile yapılan fungal biyotransformasyon (Şekil 6.7) çalışmasında benzil türevlerinin, benzoin türevlerine dönüştüğü görülmektedir [107].



Şekil 6.7 Benzil türevinin mikrobiyal biyotransformasyonu

Caldarimycetes fumago küfünde bulunan kloroperoksidazın H_2O_2 varlığında indol molekülünü indoksile ve bazı mantar türlerinde de kloroperoksidazın indolü oksiindole çevirdiği [55], *Beauveria bassiana* ve *Aspergillus niger* mantarlarının 3-indolilaacetonitril ve triptamin dönüşümünü gerçekleştirdiği gösterilmiştir [56].

Aspergillus niger organizması biyodegradasyon çalışmasında çevre kirleticilerinin etkisini daha aza indirmek için de kullanılmaktadır. Çevre için toksik olabilen indol molekülünün *A.niger* ile degradasyonu sonucu çeşitli ürünlerin oluştuğu raporlanmıştır (Şekil 6.8) [59].



Şekil 6.8 İndol molekülünün *A. niger* ile degradasyonu

İndolin-2-on, indol türevlerinin sentezi için kullanışlı olan bir öncü maddedir. İndol-2-on'un enzim katalizli kemoselektif asetilasyonu *Candida antarctica* mikroorganizması ile verimli bir şekilde yapılmıştır [21].

S.cerevisiae anaerobik koşullarda üretilebilme, hücre duvarının yapısı sayesinde kimyasal ve organik çözücülere, düşük pH'lara ve endüstriyel fermentasyonda kontaminasyon riskini azaltan yüksek şeker ve etanol konsantrasyonlarına tolerans gösterebilme özelliği sayesinde biyodönüşüm reaksiyonlarında sıklıkla kullanılabilen bir organizmadır [60], [61].

İndollerin ketonizasyonu ve hidroksilasyonu için *Pseudomonas indoloxidans*, *P. putida*, *P. mendocina* bakterilerinin, *Sphingomonas* ve *Choromobacterium* cinsi çeşitli bakteri türlerinden yararlanıldığı bilinmektedir. Bakterilerde çok sayıda enzimin indolü okside edebildiği ve bunların çoğunlukla aromatik monooksidazlar, aromatik dioksigenazlar ve peroksidazlara ait olduğu tanımlanmıştır [55].

Anti-diabetik bir ilacın içinde yeralan, 2,5-dimetilpirazin maddesi üzerinde *Pseudomonas putida* mikroorganizması ile bir biyodönüşüm çalışması yapılmış ve 2,5-dimetilpirazin molekülünün karboksilasyonu yüksek verimde gerçekleştirilmiştir [108]. Biyokatalizör olarak kullanılan rekombinant *E.coli* hücreleriyle bir keton türevinin mikrobiyal biyodönüşümü gerçekleştirilmiştir [63].

MANGAN (III) ASETAT REAKSİYONLARI

7.1 Mangan (III) asetat ve Mangan (III) asetat Reaksiyonlarının Önemi

Serbest radikal kimyası, tek elektron aktarımı yapan geçiş metali tuzlarının organik moleküllerde radikal oluşturma temeline dayanır. Geçiş metali tuzları ile oluşan radikaller, redoks reaksiyonu sonucunda meydana gelir. Bu nedenle bu tür bileşiklere redoks başlatıcılar denilmektedir. Bunların üstünlüğü, alışılmış yöntemlerle elde edilmesi mümkün olmayan yeni tip radikaller oluşturmalarıdır. Yükseltgen radikal oluşturmada Mn^{+3} , Co^{+3} , Cu^{+3} , Ce^{+4} gibi geçiş metali tuzları kullanılır [109], [110].

Çeşitli yükseltgenme basamaklarına sahip olan Manganın +3 (Mn^{+3}) basamağındaki bileşikler oldukça kararsızdır ve bu sebeple +3 (Mn^{+3}) yükseltgenme basamağındaki mangandan çok az sayıda kararlı bileşik elde edilir. Mangan (III) asetat, +3 yükseltgenme basamağına sahip az sayıdaki moleküllerden biridir ve susuz ortamda çok iyi bir yükseltgendir. Bundan dolayı, Mangan (III) iyonunun kullanılması gereken birçok çalışmada bu molekülden faydalanılır [111].

Organik sentezlerde C-C bağı oluşturmak için kullanılan Mangan (III) asetat'ın kristal yapısı 1969'da Hessel ve Romers tarafından belirlenmiştir. Susuz Mangan (III) asetat'ın yapısı X-ışınları kristalografisi ile açıklanmış ve yapısında oksijen merkezli üç çift asetat köprüsü ile birbirine bağlanmış üç Mangan atomunun bulunduğu görülmüştür. Bu birimler arasındaki asetik asit molekülleri ve asetat köprüleri Mangan atomlarının etrafında bir oktahedral koordinasyon oluşturmaktadır. Kristal halindeki Mangan (III) asetat'ın amprik formülü, yapının çizgisel bir polimer olduğunu belirtir.

Organik kimyada sentez çalışmalarında son derece önemli olan Mangan (III) asetat molekülü ile çok çeşitli reaksiyonlar gerçekleşmektedir. Moleküler arası katılma ve halkalaşma reaksiyonları, molekül içi halkalaşma reaksiyonları, aktif metilen bileşiklerinin Mangan (III) asetat aracılığıyla doymamış gruplara katılma ve halkalaşma reaksiyonları, β ketoester ve β diketonların alken ve alkinlerle reaksiyonları, Mangan (III) asetat aracılığıyla molekül içi mono ve ardışık halkalaşma reaksiyonları, karboksilik asit ve esterlerin alkin ve alkenlere katılma reaksiyonları bunlara örnek verilebilir[110].

İyi bir yükseltgen olan Mangan (III) asetat, tersiyer radikalleri katyonlara yükseltger. Katyonlar ya bir proton kaybederek alkenlere dönüşür ya da asetik asit ile reaksiyona girerek asetat esterlerini verir [112]. Mangan (III) asetat, α , β , doymamış ketonların asetoksillenmesi reaksiyonlarında sıklıkla kullanılır.

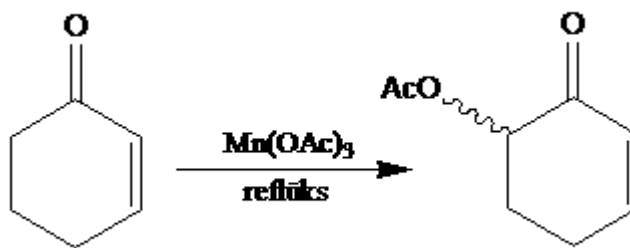
7.2 Mangan(III) asetat Ortamında Enonların Asetoksillenmesi

Kiral ligantların ve ilaç sektöründe kullanılan önemli moleküllerin hazırlanmasında etkin olan α,β -doymamış ketonların, α -asetoksillenmesi önemli bir prosedürdür [113]. Enonların seçici olarak oksidasyonu için Kurşun (IV) asetat, MoOPH, TPPO, MCPBA ve Mn(III) asetat'ın kullanılması geniş bir uygulama alanına sahiptir. Williams ve Hunter [114], α -asetoksi enonların, $Mn(OAc)_3$ ile oksidasyonunun, Kurşun (IV) asetat ile oksidasyonuna göre daha yüksek bir verim ve daha ılımlı reaksiyon koşullarında gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Watt ve çalışma arkadaşları [115] kurutulmuş $Mn(OAc)_3$ kullanmışlar ve bunun sonucunda verimin büyük oranda arttığını tespit etmişlerdir. Bu çalışmaların dışında α -asetoksi ketonlar çeşitli yollar ile hazırlanabilirler. Bunlar: Karboksilat iyonları ile α - bromo ketonların reaksiyonu, talyum (III) asetat ile morfolinin yükseltgenmesi, asetik asit içinde enon asetatların yükseltgenmesi ve formik asit veya asetik asit içinde α -keto triftalat reaksiyonları'dır. Çalışılan birçok metotta, bir enonun α -asetoksi enona oksidasyonu için çok tatmin edici sonuçlar vermemesi üzerine Demir ve çalışma arkadaşları Mangan (III) asetatı kullanarak α,β -doymamış enonların oksidasyonu üzerinde çalışmışlar ve tatmin edici sonuçlar almışlardır. Literatürde yer alan birçok α -asetoksillenme yönteminin içinde en çok kullanılan iki tanesi kurşun (IV) asetat ve mangan (III) asetat ile oksidasyon yöntemidir. Bunlardan kurşun (IV) asetat yüksek derecede zehirli olduğundan Mangan (III) asetat ile oksidasyon ön plana

geçmiştir. Mangan (III) asetat genel olarak yüksek kimyasal verime ve α -aseteillenme için yüksek stereoseçiciliğine sahiptir.

Günümüzde α -asetoksi α,β -doymamış ketonların sentezi için en çok kullanılan metot $Mn(OAc)_3$ ile asetillemedir(Şekil 7.1). Çünkü Mangan (III) Asetat:

- Düşük toksisiteye sahiptir.
- Yüksek bölgesel seçiciliği vardır.
- Reaksiyon ılıman koşullarda gerçekleşir.
- Yüksek kimyasal verim sağlanmaktadır.



Şekil 7.1 α,β -Doymamış ketonların α -asetoksillenmesi

7.3 Mangan(III) asetat Oksidasyon Reaksiyonları

Mangan(III) asetatlı reaksiyonlar doğrudan ve dolaylı oksidasyon olmak üzere iki şekilde gerçekleşir.

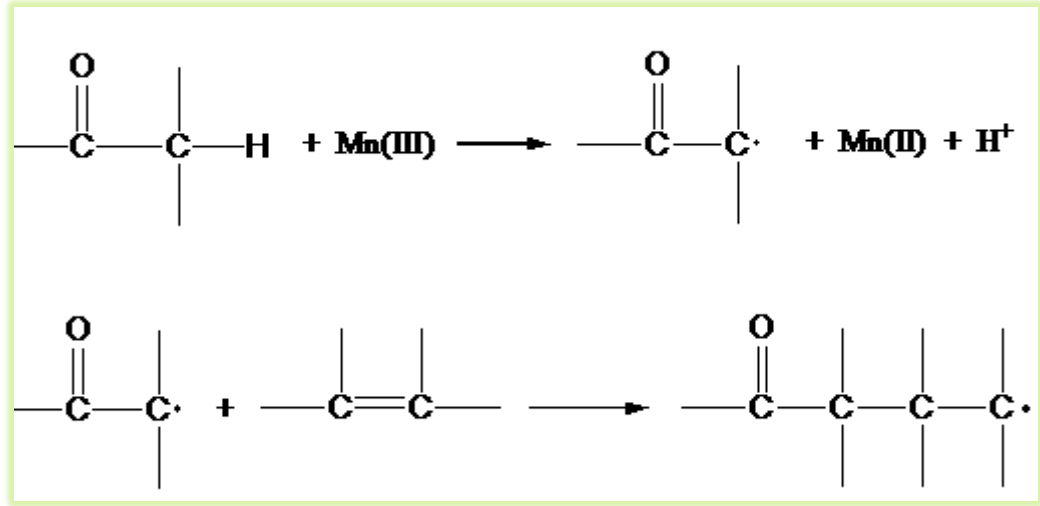
7.3.1 Doğrudan Oksidasyon

Alkollerin, amino ve kükürtlü bileşiklerin, karboksilik asit ve bazı aromatik bileşiklerin oksidasyonu doğrudan oksidasyona örnek olarak verilebilir. Bu yöntem substratın doğrudan iç veya dış tabakadan bir elektron ile oksidasyonuna dayanır. Genelde Mangan (III) kompleksi oluşumundan sonra ara ürün radikalinin oksidasyonu ürün belirleyicidir.

7.3.2 Dolaylı Oksidasyon

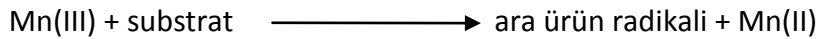
Mangan (III) asetat ve bileşiğin enol formunun etkileşiminden ara ürün serbest radikali oluşuktan sonra, bu radikalin substrata eklenmesi veya yer değiştirmesi ile gerçekleşir.

Mangan(III) asetat, karbonil grubuyla birlikte α -hidrojen atomu taşıyan bileşiklerin olefinik ve aromatik doymamış sistemlere katılma reaksiyonlarını sağlamaktadır. Ara ürün serbest radikali Mangan (III) asetatın moleküller arası etkileşimi ile oluşur. Substratın dolaylı oksidasyonu bu basamaktan sonra gerçekleşir.



Şekil 7.2 Mangan(III) asetatın dolaylı oksidasyon mekanizması

Primer radikal ürünün açığa çıkması, reaksiyon şartlarına ve substratın türüne bağlıdır. Eğer substratlar, oksidant maddelere karşı daha az reaktif ise, Mangan(III) asetat serbest radikal üretici olarak kullanılabilir. Co(III), Ce(IV) gibi bir elektron yükseltgeyicileri ve Tl(III), Pb(IV) gibi iki elektron yükseltgeyicileri Mangan(III) asetat ile benzer özellikler gösterirler fakat düşük reaktivite ve yüksek seçicilik açısından Mn(III) asetat daha iyi sonuç vermektedir. Ancak suyun varlığında komplikasyonlar gelişebilir. Sulu reaksiyon ortamında, trivalent manganın Mn(IV) ve Mn(II)'ye dönüşümüne neden olur ve alternatif 2-elektron oksidasyonlar Mn(IV) tarafından meydana gelir [50],[116]. Reaksiyon mekanizması:



BİYOAKTİF MOLEKÜLLER

8.1 α -Hidroksi Ketonlar

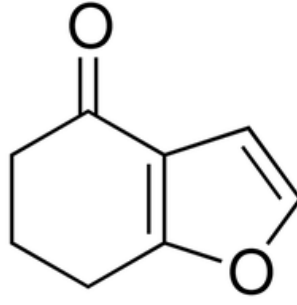
Biyolojik olarak aktif bileşiklerin sentezinde önemli yapı taşı olan bileşiklerden birisi enantiyomerikçe saf α -hidroksi ketonlardır. α -Hidroksi ketonlar çeşitli maddelerin asimetrik sentezi için başlangıç maddesi olarak kullanılırlar [117], [118]. Kiral α -hidroksi ketonlar özellikle farmakoloji ve kimya endüstrilerinde çok fazla tercih edilen ve sıkça kullanılan moleküllerdir [119]. Farmakolojide antibiyotiklerin, antibakteriyel, antidepresan, antivirütik, potasyum kanal açıcıları ve çeşitli kalp ilaçlarının sentezlenmesi için önemli yapı taşları olarak kullanılmaktadırlar. Örneğin, (*R*)-1-(3-klorofenil)-2-hidroksipropan-1- on, depresyon tedavisinde kullanılan bupropion için başlangıç maddesidir. Bupropion, Wellbutrin(Glaxo Wellcome) ticari isimi ile satılmakta olan ve depresyon tedavisinde kullanılan ilacın etken maddesidir. Sigarayı bırakma tedavisinde kullanılan Zyban (Glaxo Wellcome) ticari isimli ilacın da etken maddesi bupropiondur [118]. Optikçe saf α -hidroksi ketonlar bazı antitümör antibiyotiklerinin (olivomycin A, chromomycin A3 gibi) ve Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan amiloid- β protein üretim inhibitörlerinin elde edilmesinde de önemli yapı taşlarıdır [120].

Optikçe saf α -hidroksi ketonlar kimyasal ve enzimatik yöntemlerle üretilirler. Kimyasal üretim yollarına örnek olarak; optikçe aktif enolatların stereoseçimli oksidasyonu, optikçe aktif oksaziridinler kullanılarak prokiral enolatların oksidasyonu, kiral titanyum enolatlarının seçimli oksidasyonu, silil enol eterlerin asimetrik oksidasyonu

gösterilebilir. $\text{MoO}_5 \cdot \text{Py} \cdot \text{HMPA}$ [121] ve CrO_2Cl_2 [122] gibi ağır metal içeren oksidantlarla klasik kimyasal metotlar gerçekleşir ancak, bu tür maddeler kuvvetli kirletici oldukları için bunların kullanımı mümkün olduğu kadar en aza indirgenmeye çalışılmaktadır. α -hidroksi ketonları sentezlemek için flor ve sulu asetonitrilden yapılan bir kompleks olan $\text{HOF} \cdot \text{MeCN}$ de kullanılmıştır [123]. Oksaziridin (kamforsülfonil) kullanılarak ester ve amit lityum enolatların α -hidroksi karbonil bileşiklerine asimetric oksidasyonunu gerçekleştirmiştir [124]. Kiral faz transfer katalizörleri kullanarak da, akiral ketonlardan α -hidroksi ketonlar elde edilmiştir [125]. Kimyasal metotlara alternatif olarak, optikçe aktif α -hidroksi ketonlar enzimatic yollarla da hazırlanırlar. Enzimatic yöntemler genellikle; aromatik aldehytlerden C-C bağı oluşumu, α -diketonların indirgenmesi, derasemizasyon yöntemi, rasemik α -hidroksi ve asetoksi ketonların kinetik rezolüsyonu şeklinde gerçekleşmektedir [126], [127], Nakamura ve arkadaşları [128] tarafından yapılan çalışmada α -diketonlar maya ile indirgenerek α hidroksi ketonlar elde edilmiştir. Ancak bu metot, diketonun visinal diol'e indirgenmesi ve kimyasal veriminin düşük olması gibi dezavantajlara sahiptir. Gala ve arkadaşları [129] ,lipaz kullanarak α -hidroksi aril ketonların enantiyoseçimli olarak sentezini yapmışlardır. Adam ve arkadaşları [126], rasemik α -hidroksi ketonların lipaz katalizörlüğünde, izopropenil asetat ve t-bütil metil eter kullanarak kinetik rezolüsyonunu gerçekleştirmişlerdir. Demir ve çalışma arkadaşları ise, *Rhizopus oryzae* [130] ve çeşitli lipazları [131] kullanarak α -hidroksi ketonların enantiyoseçimli sentezlerini gerçekleştirmişlerdir. Nestl ve arkadaşları da biyokatalizör olarak mikroorganizma kullanarak kinetik rezolüsyon ile α -hidroksi ketonların rezolüsyonunu gerçekleştirmişlerdir.

8.2 Benzofuranon Türevleri

Benzofuranonlar (Şekil 8.1), benzen ve furan zincirlerinden oluşan heterosiklik moleküllerdir ve heterosiklik moleküller organik kimyada oldukça geniş bir yere sahiptir [19].



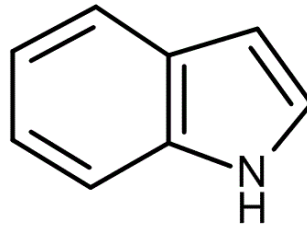
Şekil 8.1 Benzofuranon Bileşiğı

Aktiviteleri ve bitki savunma mekanizmasında üstlendikleri roller nedeni ile benzofuranon türleri üzerine son yıllarda çok sayıda araştırma yapılmıştır [1]. Doğal olarak birçok canlıda bulunan [9], [5] bu moleküllerin aktivitelerinin fazla olması benzofuranon türlerinin kimyasal olarak sentezini de arttırmıştır [17]. Özellikle ilaç kimyası çalışmaları benzofuranon moleküllerinin biyolojik aktivitelerinin çok çeşitli olduğunu göstermektedir. Örneğin; auronlar birbirleri ile kaynaşmış benzofuran halka sistemi içeren kalkon analoglarıdır. Auronlar, çeşitli biyolojik özelliğe sahip olan birkaç doğal ve sentetik molekül içinde bulunup temel yapı iskeletini şekillendirirler. Bazı auron yapısındaki bileşiklerin, anti-malarial [7] ve anti-histamin [8] özellik gösterdiği rapor edilmiştir. Örneğin (Z)-2-(2-Hydroxy-4-methoxybenzylidene)-1-benzofuran-3(2H)-one bileşiğı, doğal olarak auron meydana getiren analogun, anti-hiperpigmentasyona karşı melanosit tirozinaz inhibitörü olarak özellik göstermektedir [132]. Yüksek biyolojik aktiviteye sahip olan benzofuranon türevlerinden bazıları ise, yüksek anti-mikrobiyal aktiviteye ve beyinde birikerek alzheimer hastalığına neden olan β -amiloid proteininin birikmesini engelleyici etki göstermektedirler. Böylece, benzofuranon bileşikleri alzheimer ilaçlarında yer alabilecek potansiyel ilaç etken maddesi olabilmektedirler [133]. Benzofuran türevlerinin yalnız başına aktivite göstermelerinin yanında ilaç sentezlerinde önemli aracı moleküller oldukları da bilinmektedir. Bir aritmik ajan olan pindalolun sentezinde anahtar molekül olan 4-hidroksiindolün sentezinde benzofuran türevleri öncü bileşik olarak kullanılmaktadır. Endosiklik oksijen atomunun, azot atomuna 4-okso-4,5,6,7-tetrahidrobenzofuran iskeletinde transformasyonu ile 4-okso-4,5,6,7-tetrahidroindol elde edilmektedir. Benzofuranon türevleri antiülser, antidepresan, sitotoksik, gram pozitif ve gram negatifler üzerinde antibakteriyal,

antifungal, antiinflamator, antioksidant, antibiyotik, anti- HIV ve antikanser gibi önemli biyolojik aktiviteler göstermektedirler [1], [2], [3],[8],[19].

8.3 İndol Türevleri

Benzen ve pirol halkalarını yapısında bulunduran indol bileşiği (Şekil 8.2) benzo [b] benzopirol olarak da adlandırılır. İndoller, benzen ve pirol halkalarının birleşmesiyle oluşmaktadır ancak indol molekülleri her ikisinden de farklı aromatik karakter göstermektedir.



Şekil 8.2 İndol Bileşiği

Farmakoloji alanında çok önemli olan heterohalkalı aromatik bileşiklerden indoller, yapısındaki azot atomu üzerindeki ortaklanmamış elektronların, halkadaki π -elektronlarına dahil olmasıyla, naftalin gibi 10 π -elektronuna sahip aromatik özellik gösterir. İndol halkası taşıdığı terapötik özellik nedeniyle ilaç sanayinde oldukça önemlidir. İndol halkasının 3. konumu her zaman reaksiyonlara açık bir durumdadır. Bu konumun bir elektrofil ile yer değiştirmesi, benzenin aromatisasyonunu bozmadan kararlı bir ara ürün oluşmasını sağlar. İndol halkasındaki 2. ve 3. karbonlar arasında yer alan π bağı halka katılması reaksiyonlarına imkân sağlar. Molekül içi halka katılma reaksiyonları, moleküller arası halka katılma tepkimelerine göre daha kolay oluşmaktadır. İndol halkasının bu özelliklerinden faydalanılarak birçok biyoaktif bileşik sentezlenebilir[22].

Yüzyılı aşkın süredir sentezlenmesi ve reaktivitesi incelenen indol bileşikleri ilk olarak 1866 yılında sentezlenmiştir. Sentetik olarak indol türevi elde etme reaksiyonları şu şekilde sıralanabilir:

- Fisher indol sentezi
- Reissert indol sentezi
- Leimgruber-Batcho indol sentezi
- Madelung indol sentezi
- Bischler indol sentezi
- Bartoli indol sentezi
- Gassman indol sentezi
- Fukuyama indol sentezi
- Sugasawa indol sentezi
- Nitrenlerin halkalaşmasıyla indol sentezi
- Nenitzescu indol sentezi [134]

En çok kullanılan sentez yöntemi olan Fischer yöntemi ise 1883 yılında Fischer tarafından bulunmuştur. O günden bu güne kadar çok sayıda bilimsel çalışma yapılmış ve bu molekülün önemini vurgulamıştır [135]. Biyolojik aktivitesi nedeni ile indol türevi bileşikler günümüzde de son derece öneme sahip olan araştırmalara konu olmaktadır.

Bunun sebebi indol türevlerinin çok çeşitli biyolojik aktivitelerinin olmasıdır. Örneğin; triptofan, birçok proteinin yapısında bulunan çok önemli bir aminoasittir. İndol-3-asetik asit, bitki büyümesi ve gelişmesinde rol oynayan bir hormondur. Serotonin ise merkezi sinir sistemi içinde ruh hali, uyku, cinsellik ve iştahın düzenlenmesinde etkinlik gösteren önemli bir nörotransmitterdir. Brassinin, bitkilerce mikroorganizmalara karşı koruyucu olarak üretilen bir indol türevidir ve kanser önleyicidir. Biyolojik aktiviteleri indol türevleri üzerindeki araştırmaları günümüzde oldukça ilgi çekici kılmıştır. İndol türevleri, doğal ürünlerden izole edilebildikleri gibi sentetik olarak da üretilmekte ve ilaç aktif maddesi olarak kullanılmaktadırlar. Ağrı kesici ve ateş düşürücü ilaç olarak kullanılan indomethasin, migren ağrılarının tedavisinde kullanılan Sumatriptan, hipertansiyon ve kalp ritim düzenleyici özellik gösteren Pindolol, lösemi tedavisinde kullan Vincristin, anti-tümör özellikte olan Mitomisinler ve Elliptisinler ilaç aktif özelliği gösteren indol türevleridir [135].

4,5,6,7-tetrahidroindol türevi moleküller biyolojik olarak aktif bir çok bileşiğin yapısında bulunmaktadır. 4-oxo-4,5,6,7-tetrahidroindoller, 4-süstitüe indollerin sentezinde kolay aromatize olmalarından dolayı ara molekül olarak kullanılmaktadır. 4-okso-tetrahidroindoller, indol kuinon analogu olan, mitomisin antibiyotiğinin sentezi için oldukça önemli bileşiklerdir. Bir aritmik ajan olan pindalolun sentezinde anahtar molekül olan 4-hidroksiindolün sentezinde benzofuran türevleri öncü bileşik olarak kullanılmaktadır. Endosiklik oksijen atomunun, azot atomuna 4-okso-4,5,6,7-tetrahidrobenzofuran iskeletinde transformasyonu ile 4-okso-4,5,6,7-tetrahidroindol elde edilmektedir[20].

İndoller antibiyotik, antiinflamatuvar, antiülser, antimalaryal, antioksidant ve antikonvulsant aktiviteler de göstermektedirler [26]. İndol ve türevleri antikanser aktiviteleri sebebiyle doğal yollardan izole edilir ya da sentetik olarak sentezlenmektedir. Doris Kaufmann ve çalışma arkadaşları insan akciğer kanser hücreleri üzerinde antimitotik aktivite gösteren 2- fenilindol-3- karbaldehit molekülünü sentezlemişlerdir[23]. Fan Zang ve çalışma arkadaşları 2011 yılında in vitro anti-tümör aktivite gösteren 2-amino-3 siyano-6-(1 H- indol-3-yl)-4-fenilpiridin molekülünü sentezlemişlerdir [24]. Ulric Jacquemard ve çalışma arkadaşları CDK inhibitörü ve sitotoksik ajan olarak görev yapan 3,5- bis(2-indolyl)pridin ve 3-[(2-indolyl)-5-fenil]-piridin türevlerini sentezlemişlerdir [25]. Ekhlass Nassar ve arkadaşları indole bağlı pirazolin, piridin ve pirimidin türevlerinin antitümör ve antimikrobiyal aktivitesi olduğunu raporlamışlardır [26]. Hauheng Ding ve arkadaşları α -metilen- γ -laktonların, AKT-m TOR kinaz sinyal yollizleri için inhibitör olduğunu raporlamışlardır [27]. Magdy A.H. Zahran ve arkadaşları, antitümör aktiviteye sahip olan indolilik alkons ve onların pirazolin analoglarını sentezlemişlerdir [28]. Abdel-Rahman Farghaly ve arkadaşları antitümör aktiviteye sahip pirazollerini içeren indollerini sentezlemişlerdir [29]. Ahmet Kamal ve arkadaşları $FeCl_3$ ile 3,3- diindolil oksindollerini sentezlemiş ve evrimsel boyutta onların in vitro şartlarda anti kanser aktivitesini incelemişlerdir [30]. Yu- Shan Wu ve çalışma arkadaşları antikanser ajanı olan 3- Aroyindollerin sentezini gerçekleştirmişler ve onları evrimsel açıdan incelemişlerdir [31]. Palwinder Singh ve arkadaşları barbitürik asit ve indol hibritlerini sentezlemiş ve antikanser aktivitelerini incelemişlerdir [32].

Son yıllarda indoller üzerine yapılan çalışmalar özellikle antitümör aktivitesi olduğunu net olarak göstermektedir.

Antikanser aktivitesinin dışında indol çekirdeğinin ve indol türevlerinin antifungal, antibakteriyal, antiinflamatuvar, antiviral, anti-HIV, antioksidant gibi çeşitli aktivitelerinin bulunduğu da rapor edilmiştir. İsatın ve indol oksimes'in antiviral aktivite, indol-3-asetik asitin antiinflamatuvar aktivite, 2-substitüe, 3-substitüe indollerin oksimes türevlerinin fungisidal aktivite, 3-aril ve 3-heteroaril indollerin antibakteriyal aktivite, yeni pirimido (5,4-b) indollerin antikanser ve anti HIV aktivite, çeşitli indol türevlerinin antioksidant aktivite ve 1H-indol-2,3-dion türevlerinin ise antitüberküloz aktivite gösterdiği belirtilmiştir. İndol ve türevleri farmakolojide oldukça önemli moleküllerdir [42], [136].

BÖLÜM 9

MATERYAL METOD

Çalışmada sentezlenen tüm bileşikler için yapı tayini Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisiyle (NMR) (Bruker Avance III 500 Mhz) yapıldı. NMR cihazı için standart çözücü olarak $CDCl_3$ (dötörökloroform), metanol- d_4 (dötörometanol) ve uluslar arası standart olarak da TMS (Tetrametilsilan) kullanıldı. IR spektrumları Perkin Elmer (precisely) Spectrum one FT- IR Spektrometre ile yapıldı. Erime noktası tayini Büchi Melting Point B-540 cihazıyla yapıldı. LC-MS Q-TOF ölçümleri Agilent G6530B cihazıyla yapıldı.

Sentezlenen bileşiklerin saflaştırılma işlemi kolon kromatografi yöntemi ile yapıldı. Kolon dolgu maddesi olarak Merck Silika jel 60 (0,063-0.200 mm) kullanıldı. Kolon kromatografi yöntemi ile saflaştırılamayan bileşikler preparatif olarak hazırlanan tabakalar ile saflaştırıldı. Preparatif tabaka kromatografisi için ise Merck Silika jel 60 GF_{254} , Merck Silika jel 60 HF_{254} ve Merck Silika jel $HF_{254+366}$ kullanıldı. Reaksiyon takibi ve saflaştırma işlemlerinin takibi İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) ile gerçekleştirildi. İnce tabaka kromatografisi için Merck Silika jel 60 F_{254} kullanıldı ve Camag UV (254nm) ile kontrolü sağlandı.

9.1 Kullanılan Kimyasallar, Lipaz Enzimleri, Mikroorganizmalar

Kullanılan lipaz enzimleri Çizelge 9.1' de, mikroorganizmalar Çizelge 9.2'de ve kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 9.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 9.1 Kemosentez reaksiyonlarda kullanılan lipaz enzimleri ve marka kodları

1	Amano(AL)	Aldrich (534641)
2	Aspergillus oryzae (AOL)	Sigma (62285)
3	Burkholderia (BL)	Sigma (62285)
4	Rhizopus oryzae (ROL)	Sigma (80612)
5	Wheat Germ (WGL)	BioChemika(62306)
6	Mucor javanicus (MJL)	Sigma (62304)
7	Aspergillus sp. (AsL)	BioChemika(84205)
8	Pseudomonas fluorescens (PFL)	Sigma (28602)
9	Candida antractica (CAL)	BioChemika(65986)

Çizelge 9.2 Mikrobiyal biyotransformasyon çalışmalarında kullanılan mikroorganizmalar

1	<i>Aspergillus niger</i>	YTÜ Biyokimya Labortuvarından temin edilmiştir.
2	<i>Hypocrea jecorina</i>	YTÜ Biyokimya Labortuvarından temin edilmiştir.
3	<i>Agrobacterium rhizogenes</i> (A4 suşu)	İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Laboratuvarından temin edilmiştir.
4	<i>Bacillus subtilis</i>	İTÜ Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarından temin edilmiştir.

Çizelge 9.3 Kullanılan kimyasallar ve marka kodları

Kimyasal Adı	Marka	Kod Numarası
4,4 Dimetil- 1,3 sikloheksandion	Aldrich	341258
	Acros	381260250
Benzen	Merck	1.01783.2500
Dietil eter	Merck	1.00091.5000
Kloroform	Merck	1.02445.2500
Kloroform	Teknik	-
Hegzan	Teknik	-
Etil asetat	Teknik	-
Aseton	Teknik	-
Asetik asit (AcOH)	Merck	1.00063.2500
Etanol	Merck	1.00983.2500
Sikloheksan	Merck	102832
Fosfor pentoksit	Merck	21-470-1
Asetonitril	Merck	1.00003.1000
Toluen	Merck	1.08323.2500
Tetrahidrofuran	Merck	1.08114.2500
Diklorometan	Merck	1.06050.2500
Dimetilsülfoksit	Merck	1.02952.2500

Çizelge 9.3 Kullanılan kimyasallar ve marka kodları (devamı)

Sodyum bikarbonat (NaHCO_3)	Teknik	-
Sodyum hidroksit	Merck	106482
Sülfirik asit	Merck	1.00731.2500
Magnezyum sülfat (MgSO_4)	Teknik	-
Potasyum karbonat (K_2CO_3)	Teknik	-
pH 7.00 +/- 0.01 Buffer solüsyonu	Merck	1.09439.1000
pH 4.00 +/- 0.01 Buffer solüsyonu	Merck	1.09435.1000
Hidroklorik asit	Tekkim	TK.080230.01000
Dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4)	Merck	1.05101.1000
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)	Merck	1.04873.1000
Mangan II asetat	Fluka	63537
Mangan (III) asetat	Merck	805929.0100
<i>p</i> -anisaldehit (4-Methoxybenzaldehyde)	Aldrich	88107
	Merck	8.22314.0250
H_2O	Ultra saf	-
Kloroasetaldehid	Aldrich	31,727-6
Diklorometan	Merck	106049
Benzilamin	Aldrich	185701

Çizelge 9.3 Kullanılan kimyasallar ve marka kodları (devamı)

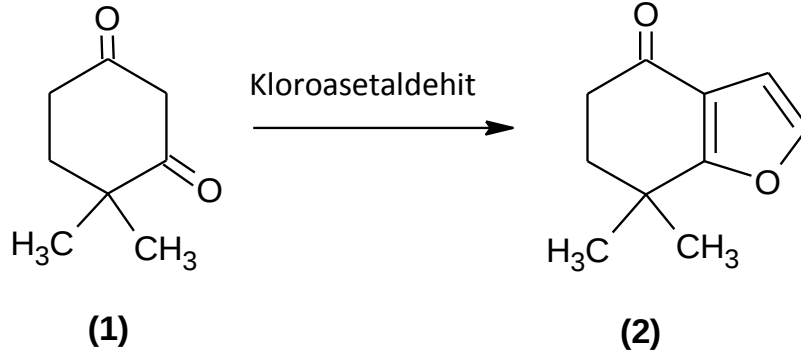
Silica Gel 60 F ₂₅₄ 25 TLC alüminyum sheet 20x20	Merck	1.05554.0001
Silica Gel 60 (0,063-0.200 mm) for coloumn chromatography	Merck	1.07734.2500
Silica Gel 60 GF ₂₅₄ for thin-layer chromatography	Merck	107730.1000
Silica Gel 60 HF ₂₅₄ for thin-layer chromatography	Merck	107739.1000
Silica Gel 60 HF ₂₅₄₊₃₆₆ for thin-layer chromatography	Merck	1.07741.1000
TLC Silica Gel 60 F ₂₅₄ 25 glass plates 20x20 cm	Merck	1.05715.0001
Lipase basic kit	Fluca	62327
Lipase extencion kit	Fluca	62323
Magnezyum sülfat	Merck	172572
Dipotasyum hidrojen fosfat	Merck	105101
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck	104873
Sodyum Klorür	Teknik	
Sodyum Klorür	Merck	106404
D(-)-Mannitol	Merck	105982
Yeast extract	Fluka	70161
Agar	Fluka	05039
Dimetil Sülfoksit	Merck	102952

Çizelge 9.3 Kullanılan kimyasallar ve marka kodları (devamı)

Potato Dextrose Agar	Merck	110130
Nutrient Broth	Merck	105450
Pepton mycological	Fluka	77199
D-(+)-Glukoz	Aldrich	49159
4-Dimetilaminopiridin	Merck	851055

9.2 7,7-Dimetil-6,7-dihidrobenzofuran-4(5H)-on Sentezi

4,4-dimetil-1,3-siklohekzandion maddesinden **(1)** başlanarak 7,7-dimetil-6,7-dihidrobenzofuran-4(5H)-on maddesinin **(2)** sentezi gerçekleştirilmiştir (Şekil 9.1).



Şekil 9.1 7,7-dimetil-6,7-dihidrobenzofuran-4(5H)-on **(2)** Sentezi

1g NaHCO₃ 0-5°C'de 8 ml distile suya eklenmiştir ve tamamının çözünmesi sağlanmıştır. Bu karışım üzerine %40'lık kloroasetaldehit (ClOC₂H₃) solüsyonundan 2 ml eklenmiştir. Hazırlanan karışım manyetik karıştırıcı üzerinde bulunan buz banyosu içerisine yerleştirilmiştir. 9 ml distile su içerisinde bulunan, 10 mmol 4,4-dimetil-1,3-siklohekzandion maddesi **(1)** dakikada 0,4 ml olacak şekilde buz banyosu içerisinde bulunan karışıma damlatılarak ilave edilmiştir ve reaksiyon 17 saat boyunca devam etmiştir. Reaksiyon pH 6-9 arasında gerçekleşmiştir. 17 saat sonunda karışıma 10 ml etilasetat (EtOAc) eklenmiş ve pH 1'e ayarlanmıştır. 1 saat boyunca manyetik

karıştırıcıda karıştırılan reaksiyonun faz ayrımı potasyum karbonat (K_2CO_3) solüsyonu ile gerçekleştirilmiştir. Ayırma hunisi yardımı ile reaksiyon ortamından uzaklaştırılan organik faz, $MgSO_4$ ile kurutulmuştur. Çözücü ortamdan evaporatör veya vakum ile uzaklaştırılmıştır. Saflaştırma için kolon kromatografi yöntemi kullanılmıştır. Çözücü sistemi olarak 1:20 (EtOAc:Hekzan) kullanılmıştır. 7,7-dimetil-6,7-dihidrobenzofuran-4(5H)-on maddesinin **(2)** sentezi %40 verim ile gerçekleştirilmiştir. Yapısı spektral yöntemler ile aydınlatılmıştır.

7,7-dimetil-6,7-dihidrobenzofuran-4(5H)-on bileşiğinin:

R_f : 0,50 (Silika jel, 1:3 EtOAc:Hekzan)

Erime noktası: 45°C

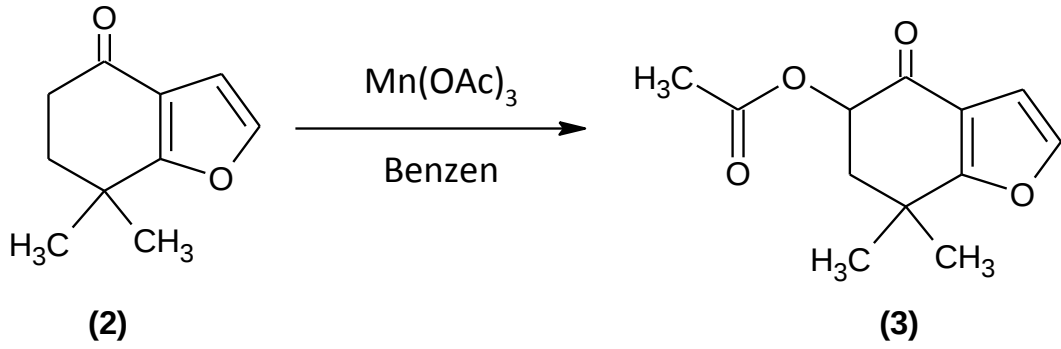
1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 1.37 (s, 6H), 2,00 (t, J=6.72, J=6.72, 2H), 2,57 (t, J=6.51, J=6.51, 2H), 6.63(d, J=1.93, 1H), 7.32 (d, J=1.94, 1H)

^{13}C -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 25.60, 32.61, 35.45, 38.06, 106.60, 119.06, 142.78, 172.98, 194.61

IR ($CHCl_3$) ν (max): 1658.76 cm^{-1}

9.3 Mangan (III) Asetat Katalizörü ile 4,5,6,7-Tetrahidro-4-okso-7,7-dimetil benzofuran-5-il asetat Sentezi

50 ml benzen ve 5 ml asetik asit karışımı ile 7,4 mmol $Mn(OAc)_3$ yan kollu balonda Dean-Stark tuzağı ile reaksiyona sokulmuştur. Reaksiyon ortamı kahverengi oluncaya kadar reflux edilmiştir. Karışımın sıcaklığı uygun koşullara geldiğinde ortama 1,8 mmol 7,7-dimetil-6,7-didrobenzofuran-4(5H)-on bileşiği **(2)** ilave edilmiştir. Reaksiyon İTK ile kontrol edilmiştir. 7,7-dimetil-6,7-didrobenzofuran-4(5H)-on bileşiğinin **(2)** tamamı 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-7,7-dimetil benzofuran-5-il asetat bileşiğine **(3)** dönüşünceye kadar reaksiyon 20 saat devam etmiştir (Şekil 9.2).



Şekil 9.2 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-7,7-dimetil benzofuran-5-il asetat **(3)** Sentezi

Reaksiyon karışımı eter ile seyreltilip, doymuş tuz çözeltisi ile ekstrakte edilmiştir. Organik faz ayrılmış ve MgSO_4 ile kurutulmuştur. Organik çözücüler evaporatör veya vakum ile uzaklaştırılmıştır. Ürünün saflaştırılması için kolon kromatografi yöntemi kullanılmıştır. Çözücü sistemi olarak 1:15 (EtOAc:Hekzan) kullanılmıştır. 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-7,7-dimetil benzofuran-5-il asetat bileşiği **(3)** literatürde ilk defa % 73 verim ile sentezlenmiştir. Yapısı spektral yöntemler ile aydınlatılmıştır.

4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-7,7-dimetil benzofuran-5-il asetat bileşiğinin;

R_f : 0,575 (Silika jel, 1:20 EtOAc:Hekzan)

Erime noktası: 62°C

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm):

1.44 (s, 3H), 1.47 (s, 3H), 2.21 (s, 3H), 5.65 (dd, $J=5.19$, $J=12.71$, 1H), 6.64(d, $J=2.01$, 1H), 7.35 (d, $J=2.02$, 1H),

$^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 20.90, 25.85, 27.62, 34.17, 43.57, 106.82, 118.01, 143.59, 170.14, 171.71, 188.64,

IR (CHCl_3) $\nu(\text{max})$: 1689.58 cm^{-1} , 1741.84 cm^{-1}

9.4 Seal Tüp Reaksiyonu ile 1-Benzil-6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7-dimetil-1H-indol-4(5H)-on Sentezi

2,9 mmol 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-7,7-dimetil benzofuran-5il asetat **(3)**, 18,6 mmol benzilamin ve 5 ml %20'lik etanol karışımı seal tüpe konulmuştur ve ~0 atm basınç altında, 145-150°C'de 12 saat boyunca reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon ürünü

distile su ve diklorometan çözücüsü ile ekstrakte edilmiştir. MgSO₄ ile kurutulmuş ve evaporatörde yoğunlaştırmıştır. Ürünün saflaştırılması için kolon kromatografi yöntemi kullanılmıştır. 1:4 (EtOAc:Heksan) çözücü sistemi kullanılarak yapılan saflaştırma işlemi sonunda 1-benzil-6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7-dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiği **(4)** % 84 verimle literatürde ilk defa sentezlenmiştir (Şekil 9.3). Yapısı spektral yöntemler ile aydınlatılmıştır.

1-benzil-6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin;

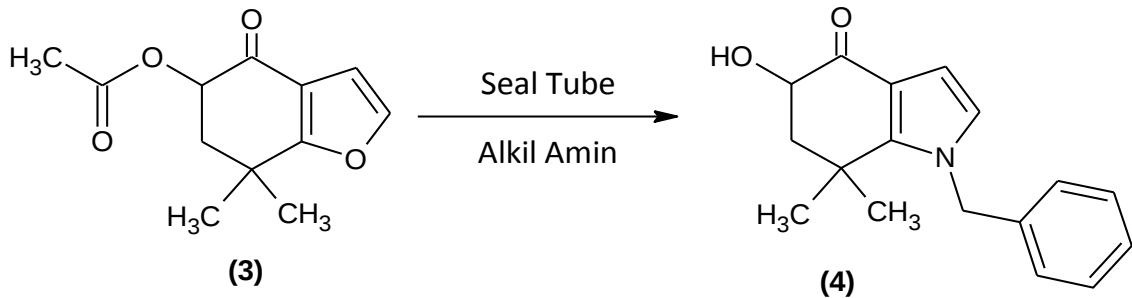
R_f: 0,375 (Silika jel, 1:3 EtOAc:Hekzan)

Erime noktası: 134°C

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃ + CCl₄)δ (ppm): 1.01 (s, 3H), 1.09 (s, 3H), 2.33 (d, J=16.33, 1H), 2,52 (d, J=16.34, 1H), 4.58 (d, J=5.52, 1H), 6.23 (d, J=2.25, 1H), 6.87 (d, J=2.34, 1H), 7.14-7.27(m, 5H, Ph).

¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃ + CCl₄) δ (ppm): 21.64, 26.86, 40.96, 50.58, 51.85, 73.46, 107.32, 124.68, 127.41, 127.66, 128.71, 130.00, 137.75, 138.11, 188.10

IR (CHCl₃) ν(max): 1626.17 cm⁻¹, 3411.72 cm⁻¹



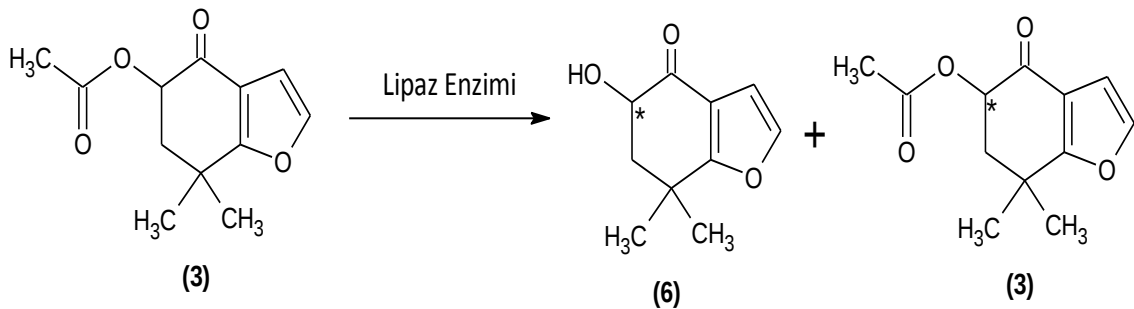
Şekil 9.3 1-benzil-6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7dimetil-1H-indol-4(5H)-on **(4)** sentezi

9.5 Biyotransformasyon Reaksiyonları

9.5.1 Lipaz Katalizli Reaksiyonlar

9.5.1.1 4,5,6,7-Tetrahidro-4-okso-7,7-dimetil benzofuran-5-il asetat bileşiği'nin Lipaz Katalizli Reaksiyonları

0,024 mmol 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-7,7-dimetil benzofuran-5-il asetat bileşiği **(3)** ve bu bileşiği çözebilecek 0,05 ml organik çözücü reaksiyon ortamına eklenmiştir. pH=7 olan tampon çözeltisinden 300 µl eklendikten sonra lipaz enzimi konularak 37°C'de reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Katalizör yüzeyi ile substrat difüzyonunun sağlanması amacıyla reaksiyon süresince çalkalayıcı su banyosu kullanılmıştır. Reaksiyon belirli aralıklarla İTK ile takip edilerek %50 dönüşüme ulaşıldığında sonlandırılmıştır (Şekil 9.4). Reaksiyon karışımına kloroform ilave edilmiş; enzim, filtrasyon ile ortamdaki ayrılmıştır. Kloroform çözücüsü vakum altında uzaklaştırılmıştır.

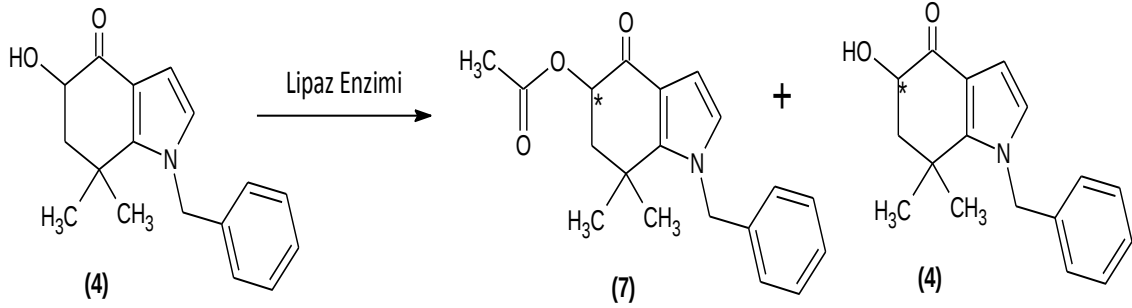


Şekil 9.4 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-7,7-dimetil benzofuran-5-il asetat bileşiği'nin **(3)** lipaz katalizli reaksiyonları

9.5.1.2 1-Benzil-6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7-dimetil-1H-indol-4(5H)-on Bileşiği'nin Lipaz Katalizli Reaksiyonları

0,5 mmol 1-benzil-6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7-dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiği **(4)** 0,05 ml organik çözücüde çözüldükten sonra içerisine 10 mmol vinil asetat eklenmiştir. Daha sonra reaksiyon ortamına lipaz enzimi ve 2,5 mmol DMAP additive olarak ilave edildikten sonra 37°C'de çalkalayıcı su banyosunda karıştırılarak biyodönüşüm reaksiyonu başlatılmıştır. Substratın dönüşümü belirli aralıklarla İTK ile takip edilerek

dönüşüm %50 olduğunda reaksiyon sonlandırılmıştır.(Şekil 9.5) Farklı çözücü ve farklı lipaz kaynakları kullanılarak gerçekleştirilen enantiyoseçimli sentezlerin biyodönüşümleri karşılaştırılmıştır.



Şekil 9.5 1-benzil-6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiği'nin (4) lipaz katalizli reaksiyonları

9.5.2 Mikrobiyal Biyotransformasyon Reaksiyonları

9.5.2.1 *Bacillus subtilis* ile Biyotransformasyon

Mikroorganizmanın temini ve saklanması:

Bacillus subtilis organizması İstanbul Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarından temin edilmiş ve + 4°C'de muhafaza edilmiştir.

Kullanılan besiyeri bileşenleri:

Katı besiyeri:

Besiyeri olarak Nutrient Agar kullanılmıştır. Ortam, Nutrient Broth besiyeri içerisine agar ilave edilerek hazırlanmıştır. (15g agar/1L). Besiyeri 1 atm basınç, 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Petrilere dökülen besiyeri mikroorganizma ekimi için hazırlanmıştır.

Sıvı besiyeri:

Sıvı besiyeri olarak Nutrient Broth kullanılmıştır. Besiyeri 1 atm basınç, 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. 100 ml'lik erlenlere 50 ml besiyeri ilave edilerek mikroorganizma inokülasyonuna hazır hale getirilmiştir.

Bacillus subtilis'in hazırlanması:

-80 °C stoğundan alınan 1 öze dolusu mikroorganizma Nutrient Agar ortamına inoküle edilmiştir. Mikroorganizma 12 saat süre ile 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında tek koloni tespiti yapılmıştır. Tek koloni öze yardımı ile Nutrient Broth ortamına inoküle edilmiştir. Sıvı besiyerine aktarılan mikroorganizma 6 saat süre ile 120 rpm dönüş hızında ve 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır.

Substratın hazırlanması:

20 mg saf 1-benzil-6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7-dimetil-1H-indol-4(5H)-onbileşiği(4) 0,625 ml DMSO'da çözüldükten sonra 50 ml besiyerinde 6 saat inkübe edilen *Bacillus subtilis* içeren 100 ml'lik erlene ilave edilmiştir. İnkübasyon 120 rpm'de ve 37°C'de çalkalamalı inkübatörde 10 gün süre ile devam ettirilmiştir ve İTK ile kontrol edilmiştir. Biyotransformasyonun durdurulması için mikroorganizmaların öldürülmesi işlemi erlenler üzerine etil asetat çözücüsü eklenerek yapılmıştır.

Biyotransformasyon ürünlerinin ortamdaki izolasyonu:

Biyotransformasyon işlemini durdurmak için ortama etil asetat eklenmiştir. Daha sonra mikroorganizmaların ayrılması için ortam Buchner hunisinden vakum altında süzölmüştür. Elde edilen süzöntü ayırma hunisinde faz farkına göre ayrılmıştır.

9.5.2.2 Agrobacterium rhizogenes ile Biyotransformasyon

Mikroorganizmanın temini ve saklanması:

Agrobacterium rhizogenes organizması İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünden temin edilmiş ve -80 °C'de saklanmıştır.

Kullanılan Besiyeri Bileşenleri:

Katı besiyeri:

YMA besiyeri (Yeast Mannitol Agar) hazırlanmıştır. Besiyeri içeriği Çizelge 9.4’de gösterilmiştir.

Çizelge 9.4 YMA besiyeri içeriği

Mannitol	10 g/L
Yeast Extract	0,4 g/L
K ₂ HPO ₄	0,5 g/L
NaCl	0,1 g/L
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,2 g/L
Agar	15 g/L

1000 ml distile su içerisine besiyeri bileşenleri karıştırıldıktan sonra 1 atm basınç, 121 °C derece sıcaklıkta 15 dakika otoklavlanmıştır. Petrilere dökülen besiyeri mikroorganizma ekimi için hazırlanmıştır.

Sıvı besiyeri:

YMB besiyeri (Yeast Mannitol Broth) hazırlanmıştır. Besiyeri içeriği Çizelge 9.5’de gösterilmiştir.

Çizelge 9.5 YMB besiyeri içeriği

Mannitol	10 g/L
Yeast Extract	0,4 g/L
K ₂ HPO ₄	0,5 g/L
NaCl	0,1 g/L
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,2 g/L

1000 ml distile su içerisinde besiyeri bileşenleri karıştırıldıktan sonra 1 atm basınç, 121 °C derece sıcaklıkta 15 dakika otoklavlanmıştır. Ortam mikroorganizma ekimi için hazırlanmıştır.

Agrobacterium rhizogenes'in hazırlanması:

-80 °C stoğundan bir öze dolusu alınan mikroorganizma (*Agrobacterium rhizogenes* A4) YMA besiyeri içeren petrilere inoküle edilmiştir. 28°C'de 48 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. A4 suşunun bulunduğu petriden tek koloni öze yardımı ile alınarak sıvı besiyerine inoküle edilmiştir ve sıvı besiyerinde mikroorganizma 28°C'de 120 rpm dönüş hızında çalkalamalı inkübatörde 12 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Substratın hazırlanması:

20 mg saf 1,benzil-6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7-dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiği(4) 0,625 ml DMSO'da çözüldükten sonra 50 ml besiyerinde 12 saat inkübe edilen *Agrobacterium rhizogenes* içeren 100 ml'lik erlene ilave edilmiştir. İnkübasyon 120 rpm'de ve 28°C'de çalkalamalı inkübatörde 10 gün süre ile devam ettirilmiştir. Bu süreç içerisinde reaksiyonun takibi İTK kromatografisi ile kontrol edilmiştir.

Biyotransformasyon ürünlerinin ortamdan izolasyonu:

Biyotransformasyon işlemini durdurmak için ortama etil asetat eklenmiştir. Daha sonra mikroorganizmaların ayrılması için ortam Buchner hunisinden vakum altında süzölmüştür. Elde edilen süzöntü ayırma hunisinde faz farkına göre ayrılmıştır.

9.5.2.3 *Hypocrea jecorina* ile Biyotransformasyon

Mikroorganizmanın temini ve saklanması:

Hypocrea jecorina organizması Yıldız Teknik Üniversitesi Biyokimya Laboratuvarı koleksiyonundan sağlanmıştır. Ve + 4°C'de muhafaza edilmiştir.

Kullanılan besiyeri bileşenleri:

Katı besiyeri:

PDA Besiyeri kullanılmıştır. Ortam 1000 ml distile su içerisinde 39 gr PDA besiyeri çözünerek hazırlanmıştır. 1 atm basınç, 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak ortam steril

edilmiştir. Steril edilen ortam petrilere dökülmüş ve katı besiyeri mikroorganizma ekimi için hazır hale getirilmiştir.

Sıvı besiyeri:

YS25 Besiyeri kullanılmıştır. Besiyeri içeriği Çizelge 9.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 9.6 YS25 besiyeri içeriği

Pepton	10 gr/L
Yeast extract	10 gr/L
Glikoz	5 gr/L
K ₂ HPO ₄	5 gr/L
MgSO ₄ . 7H ₂ O	1 gr/L

Yukarıda belirtilen bileşenler ile hazırlanan ortamın pH'sı 6,5'a ayarlanmıştır. Besiyeri 1 atm basınç, 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. 100 ml'lik erlenlerin her birine 50 ml olacak şekilde konularak mikroorganizma ekimi için hazırlanmıştır.

Hypocrea jecorina'nın hazırlanması:

+4 °C'deki kültürden iğne öze yardımı ile PDA besiyerine mikroorganizmanın inokülasyonu sağlanmıştır. Katı besiyerinde 30°C'de 5 gün süre ile inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. Inkübasyon sonunda genç kültürden 50 ml sıvı besiyeri içeren ortama iki öze dolusu mikroorganizma inoküle edilmiştir. 30°C'de 120 rpm dönüş hızında 48 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır.

Substratın hazırlanması:

20 mg saf 1-benzil-6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7-dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiği (**4**), 0,5 ml DMSO'da çözündükten sonra 50 ml besiyerinde 48 saat inkübe edilen *Hypocrea jecorina* içeren 100 ml'lik erlene ilave edilmiştir. Inkübasyon 120 rpm'de ve 30°C'de çalkalamalı inkübatörde 10 gün süre ile devam ettirilmiştir. Bu süreç içerisinde reaksiyonun takibi İTK kromatografisi yöntemi ile kontrol edilmiştir.

Biyotransformasyon ürünlerinin ortamdan izolasyonu:

Biyotransformasyon işlemini durdurmak için ortama eter eklenmiştir. Substratı, mikroorganizmaların hif ve sporlarından ayırmak için ortam filtre kağıdı ile süzölmüştür. Daha sonra ortam Buchner hunisinden vakum altında süzölmüştür. Elde edilen süzöntü ayırma hunisinde faz farkına göre ayrılmıştır.

9.5.2.4 *Aspergillus niger* ile Biyotransformasyon

Mikroorganizmanın temini ve saklanması:

Aspergillus niger organizması Yıldız Teknik Üniversitesi Biyokimya Laboratuvarı koleksiyonundan sağlanmıştır. Ve + 4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Kullanılan besiyeri bileşenleri:

Katı besiyeri:

PDA Besiyeri kullanılmıştır. Ortam 1000 ml distile su içerisinde 39 gr PDA besiyeri çözünerek hazırlanmıştır. 1 atm basınç, 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak ortam steril edilmiştir. Steril edilen ortamdan petrilere dökülmüş ve katı besiyeri mikroorganizma ekimi için hazır hale getirilmiştir.

Sıvı besiyeri:

YS25 Besiyeri kullanılmıştır. Besiyeri içeriği Çizelge 9.6'da gösterilmiştir. YS25 besiyeri içeriği ve 1000 ml su ile hazırlanan ortamın pH'sı 6,5 olacak şekilde ayarlanmıştır. Besiyeri 1 atm basınç, 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. 100 ml'lik erlenlerin her birine 50 ml olacak şekilde konularak mikroorganizma ekimi için hazırlanmıştır.

Aspergillus niger'in hazırlanması:

+4 °C'deki kültürden iğne öze yardımı ile PDA besiyerine mikroorganizmanın inokülasyonu sağlanmıştır. Katı besiyerinde 30°C'de 5 gün süre ile inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. Inkübasyon sonunda genç kültürden 50 ml sıvı besiyeri içeren ortama iki öze dolusu mikroorganizma inoküle edilmiştir. 30°C'de 120 rpm dönüş hızında 48 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Çalışmanın bir aşaması olarak sporlar ile çalışılmıştır. Katı besiyerinde 30°C'de 5-7 gün süre ile üretilen sporelerden 1 öze

dolusu alınarak 2 ml FTS içerisine aktarılmıştır. Daha sonra 50 ml'lik sıvı besiyerine mikroorganizma inoküle edilmiştir. 30°C'de 120 rpm dönüş hızında 48 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır.

Substratın hazırlanması:

50 mg saf 1-benzil-6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7-dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiği(4) 1,25 ml DMSO'da çözündükten sonra 50 ml besiyerinde 48 saat inkübe edilen *Aspergillus niger* içeren 100 ml'lik erlene ilave edilmiştir. İnkübasyon 120 rpm'de ve 28°C'de çalkalamalı inkübatörde 10 gün süre ile devam ettirilmiştir. Bu süreç içerisinde reaksiyonun takibi İTK kromatografi yöntemi ile kontrol edilmiştir. En yüksek verim 75 saat sonra sonlandırılan çalışmada saptanmıştır.

Biyotransformasyon ürünlerinin ortamdan izolasyonu:

Biyotransformasyon işlemini durdurmak için ortama eter eklenmiştir. Substratı, mikroorganizmaların hif ve sporlarından ayırmak için ortam filtre kağıdı ile süzölmüştür. Daha sonra ortam Buchner hunisinden vakum altında süzölmüştür. Elde edilen süzöntü ayırma hunisinde faz farkına göre ayrılmıştır.

Biyotransformasyon ürünlerinin izolasyonu:

Mikroorganizmalardan ve besiyerinden ayrılan organik faz içerisindeki ürünlerin saflaştırılması için 1:3 (EtOAc:Hekzan) çözücü sistemi ile kolon kromatografisi yapılmıştır. Ardından 20:15:1 (Diklorometan:Toluen:İzopropil alkol) çözücü sistemi kullanılarak preparatif TLC ile saflaştırılma işlemine devam edilmiştir. Elde edilen 6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin yapısı spektral yöntemler ile aydınlatılmıştır.

6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin;

R_f: 0,575 (Silika jel, 1:5 Hekzan: EtOAc)

Erime noktası: 134 °C

¹H-NMR (500 MHz, metanol-d₄+ CCl₄) δ (ppm): 1.01 (s, 3H), 1.10 (s, 3H), 2.34 (d, J=16.43, 1H), 2.48 (d, J=16.46, 1H), 6.30 (d, J=2.29, 1H), 7.12(d, J=2.17, 1H)

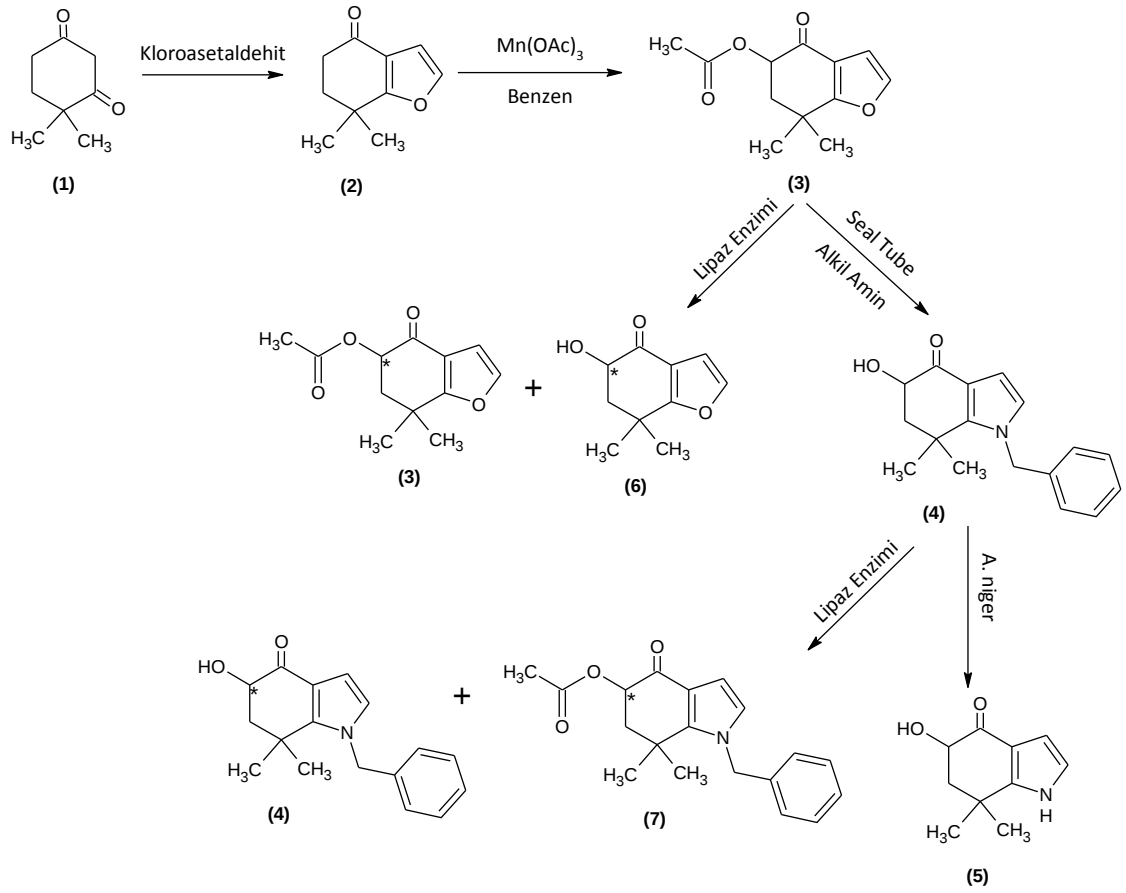
^{13}C -NMR (500 MHz, metanol- d_4 + CCl_4) δ (ppm): 22.32, 27.24, 42.90, 50.66, 73.63, 109.81, 127.26, 127.78, 139.79, 189.54

IR (CHCl_3) $\nu(\text{max})$:

1618.10 cm^{-1} , 3452.65 cm^{-1} , 3223.05 cm^{-1}

9.6 Reaksiyon Rotası

Aşağıdaki reaksiyon rotası takip edilmiştir:



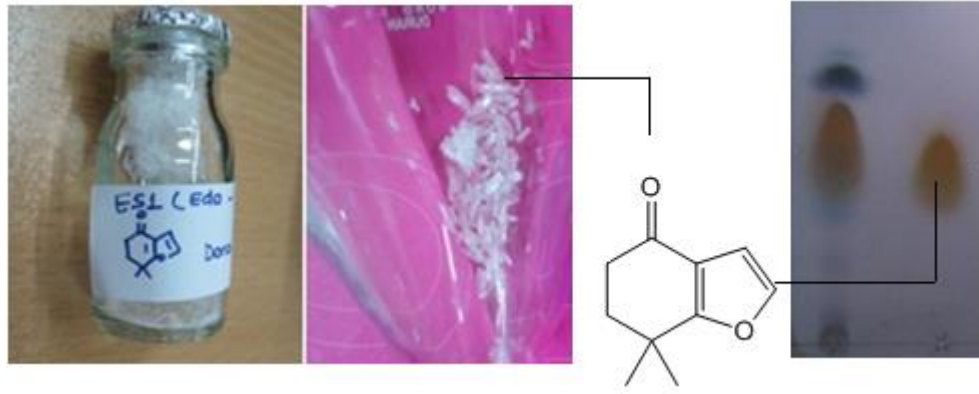
Şekil 9.6 Reaksiyon Rotası

SONUÇ VE ÖNERİLER

10.1 Benzofuranon Türevlerinin Sentezi

Benzofuranon türevleri biyolojik aktiviteleri yüksek olan bileşiklerdir [1], [2]. Özellikle ilaç kimyası çalışmaları benzofuranon bileşiklerinin antiülser, antidepresan, sitotoksik [1], gram pozitif ve gram negatifler üzerinde antibakteriyal [1], [3] antifungal, antiinflamatuvar, antioksidant [14], antialzheimer, antibiyotik, anti-HIV ve antikanser [1], [10], [11], [12], [13] gibi çeşitli biyolojik aktivitelerinin olduğunu göstermektedir. Benzofuranon türevlerinin yalnız başına aktivite göstermelerinin yanı sıra ilaç sentezlerinde de aracı moleküller oldukları bilinmektedir. Önemli biyolojik aktiviteleri olan indol bileşiklerinin sentezinde de öncü molekül olarak benzofuranon bileşikleri kullanılmaktadır [20].

Benzofuranon bileşiklerinin farmakolojideki öneminden dolayı 4,4-dimetil-1,3-sikloheksandion bileşiğinden **(1)** başlanarak 7,7-dimetil-6,7-dihidrobenezofuran-4(5H)-on bileşiği **(2)** literatürde yeni bir yöntem ile sentezlenmiştir. 7,7-dimetil-6,7-dihidrobenezofuran-4(5H)-on bileşiği **(2)**, kloroasetaldehit varlığında gerçekleştirilen yöntemle %40 verim ile beyaz renkli tek kristaller şeklinde literatürde ilk defa sentezlenmiştir (Şekil 10.1). 7,7-dimetil-6,7-dihidrobenezofuran-4(5H)-on **(2)** bileşiğinin yapısı NMR ve IR spektral yöntemleri ile aydınlatılmıştır.



Şekil 10.1 7,7-Dimetil-6,7-dihidrobenzofuran-4(5H)-on bileşiğinin İTK sonucu

7,7-Dimetil-6,7-dihidrobenzofuran-4(5H)-on bileşiğinin:

R_f: 0,50 (Silika jel, 1:3 EtOAc:Hekzan)

Erime noktası: 45°C

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm):

1.37 ppm'de 7 numaralı karbona ait metil protonları üst üste çakışık durumda singlet olarak gözlenmiştir. Furan halkasının 2. pozisyonundaki hidrojen atomu 7.32 ppm'de (J=1.94 Hz) rezonans olmuştur. Aşağı alanda rezonans olmasının nedeni ise doğrudan oksijen atomuna bağlı olmasıdır. Furan halkasının 3. pozisyonundaki hidrojen atomu 6.63 ppm'de (J=1.93 Hz) dublet olarak rezonans olmuştur. 5 numaralı alilik karbona ait hidrojen atomları 2.57 ppm'de (J=6.51 Hz, J=6.51 Hz) triplet şeklinde rezonans olmuştur. 6 numaralı karbona ait hidrojen atomları ise 2.00 ppm'de (J=6.72Hz, J=6.72 Hz) triplet olarak rezonans olmuştur (Şekil A.1).

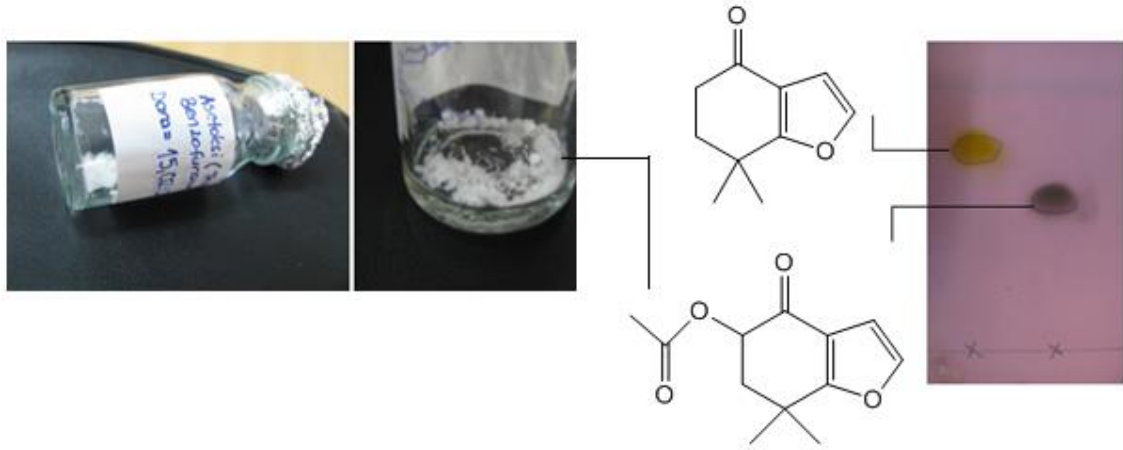
¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm):

C-4'teki karbonil grubuna ait karbon atomunun sinyali 194.61 ppm'de çıkmıştır. Alifatik bölgede yer alan C-7 karbonuna bağlı -CH₃ gruplarının sinyali 25.60 ppm'de çakışık olarak görülmektedir. C-7 karbonuna ait sinyaller 32.61 ppm'de çıkmıştır. 35.45 ve 38.06 ppm'de görülen sinyaller -CH₂ gruplarındaki karbon atomlarına aittir. 106.60, 119.06, 142.78, 172.98 ppm'de görülmekte olan sinyaller ise diğer karbonların sinyalleridir (Şekil A.2).

IR (CHCl₃) ν (max):

C-4' teki karbonil grubu için 1658.76 cm⁻¹'de karakteristik sinyaller gözlenmiştir (Şekil A.3).

7,7-dimetil-6,7-dihydrobenzofuran-4(5H)-on bileşiğinin (**2**) mangan (III) asetat ile asetoksilasyonu sonucu ikinci bir benzofuranon türevi olan 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-7,7-dimetil benzofuran-5-il asetat bileşiği (**3**) %73 verimle beyaz kristaller halinde sentezlenmiştir (Şekil 10.2). 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-7,7-dimetil benzofuran-5-il asetat bileşiğinin (**3**) sentezi literatürde ilk defa gerçekleştirilmiştir. Mangan (III) asetat asetoksilasyon yönteminde seçici açillenme ile α pozisyonuna asetoksi grubunun eklendiği görülmüştür. 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-7,7-dimetil benzofuran-5-il asetat bileşiğinin (**3**) yapısı NMR ve IR spektral yöntemleri ile aydınlatılmıştır.



Şekil 10.2 4,5,6,7-Tetrahidro-4-okso-7,7-dimetil benzofuran-5-il asetat bileşiğinin İTK sonucu

4,5,6,7-Tetrahidro-4-okso-7,7-dimetil benzofuran-5-il asetat bileşiğinin:

R_f: 0,575 (Silika jel, 1:20 EtOAc:Hekzan)

Erime noktası: 62°C

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm):

1.44 ppm ve 1.47ppm'de 7 numaralı karbona ait metil protonları singlet olarak gözlenmiştir. Asetoksi grunda bulunan -CH₃ bileşiğin protonları ise 2.21 ppm'de singlet olarak rezonans olmuştur. C-5'te bulunan -CH protonu 5.65 ppm'de dubletin dubleti

olarak rezonans olmuştur. ($J=5.19$ Hz ve $J=12.71$ Hz) C-6'da bulunan $-CH_2$ protonları asetoksi metilinin altında kalarak 2,23 ppm civarında görülmektedir. Furan halkasının C-3 ve C-2'de bulunan $-CH$ gruplarının protonları sırası ile 6,64 ppm ($J=2.01$ Hz) ve 7.35ppm'de(2.02 Hz) dublet olarak rezonans olmuştur (Şekil B.1)

^{13}C -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm):

C-4'teki karbonil grubuna ait karbon atomunun sinyali 188.64 ppm'de, asetoksi grunda bulunan karbonilin karbon atomunun sinyali ise 171.71 ppm'de görülmektedir. Alifatik bölgede yer alan $-CH_3$ gruplarının sinyalleri 20.90, 25.85 ve 27.62 ppm'de görülmektedir. C-7 karbonu 34.17ppm'de sinyal vermiştir. 43.57 ppm'de $-CH_2$ sinyali görülmektedir. Diğer C atomlarının sinyalleri 106.82, 118.01, 143.59 ve 170.14 ppm'de görülmektedir. (Şekil Ek B2)

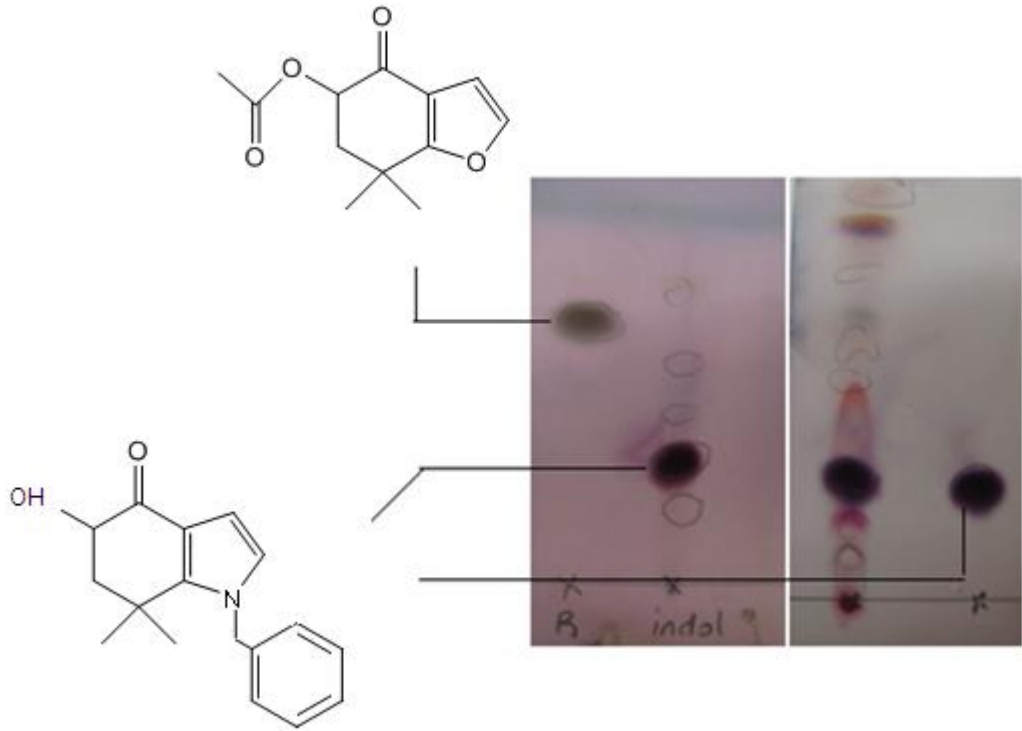
IR ($CHCl_3$) ν (max):

1689.58 ve 1741.84 cm^{-1} 'de görülen sinyaller karakteristik karbonil pikleridir (Şekil B.3).

10.2 İndol Türevlerinin Sentezi

İndol çekirdeği çok sayıda biyolojik ve endüstriyel moleküller için iskelet olarak görev alır. İndol halkası içeren bileşiklerin farklı aktivitelere ve özellikle de antikanser aktiviteye sahip oldukları bilinmektedir [21], [22], [23], [24], [25], [26], [27], [28], [29], [30], [31], [32]. Antikanser aktivitesinin dışında indol çekirdeğinin ve indol türevlerinin antifungal, antibakteriyal [33], [34], [35], antiinflamatuvar, antiviral [39], [40], anti-HIV [41], antioksidant gibi çeşitli aktivitelerinin bulunduğu da rapor edilmiştir. Farmakoloji alanında önemli olan heterohalkalı aromatik indol bileşikleri, ilaç kimyasında, tarım kimyasallarında, doğal ve sentetik kimya ürünlerinde çok fazla kullanılmaktadır.

Biyolojik aktivitelerinin çeşitliliğinden dolayı bir indol türevi olan 1-benzil-6,7-dihidro-5 hidroksi-7,7dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiği (**4**) seal-tüp deneyi ile sentezlenmiştir. Literatürde ilk defa sentezlediğimiz ve bir benzofuranon bileşiği olan 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-7,7-dimetilbenzofuran-5-il asetat bileşiğinin (**3**) benzilamin varlığında seal-tüp reaksiyonu sonucu % 84 verim ile 1-benzil-6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiği (**4**) beyaz renkli toz halinde literatürde ilk defa sentezlenmiştir (Şekil10.3). NMR ve IR spektral yöntemleri ile yapısı aydınlatılmıştır.



Şekil 10.3 1-Benzil-6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin İTK sonucu

1-Benzil-6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin;

R_f 0,375 (Silika jel, 1:3 EtOAc:Hekzan)

Erime noktası: 134°C

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm):

C-7'ye ait -CH₃ gruplarının hidrojen atomları 1.01 ve 1.09 ppm'de singlet şeklinde rezonans olmuştur. C-6 protonları sırası ile 2.33 ppm'de (J=16.33) ve 2.52ppm (J=16.34) dublet olarak rezonans olmuştur. C-5 protonu 4.58 ppm'de (J=5.52) dublet olarak görülmektedir. Azota bağlı benzilik -CH₂ protonları 5.52 ppm'de rezonans olmuştur. C-3 ve C-2 protonları sırası ile 6.23 ppm'de (J=2.25) ve 6.87 ppm'de(J=2.34) dublet şeklinde rezonans olmuştur. Fenil grubuna ait pikler 7.14ppm'de ve 7.27 ppm'de multipler olarak görülmektedir (Şekil C.1).

¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm):

C-4'teki karbonil grubuna ait karbon atomunun sinyali 188.10 ppm'de çıkmıştır. Alifatik bölgede yer alan C-7 karbonuna bağlı -CH₃ gruplarının sinyalleri 21.64ppm ve 26.86 ppm'de görülmektedir. C-7 karbonuna ait sinyaller 40.96 ppm'de çıkmıştır. 50.58ppm ve 51.85 ppm'de görülen sinyaller -CH₂ gruplarındaki karbon atomlarına aittir. 73.46 ppm, 107.32ppm, 124.68 ppm, 127.41ppm ve 137.75 ppm'de görülen sinyaller ise diğer karbonların sinyalleridir. Aromatik bölgede 127.66, 128.71, 130.00 ve 138.11 ppm'de çıkan sinyaller ise fenil grubundaki karbon atomlarına ait piklerdir (Şekil C.2).

IR (CHCl₃) ν (max):

C-4' teki karbonil grubu için 1626.17 cm⁻¹'de karakteristik sinyaller gözlenmiştir. 3411.72 cm⁻¹'de görülen sinyaller ise C-5'teki- OH grubundan kaynaklanmaktadır (Şekil C.3).

10.3 Biyotransformasyon Reaksiyonlarının Sonuçları

10.3.1 Lipaz Katalizli Reaksiyonların Sonuçları

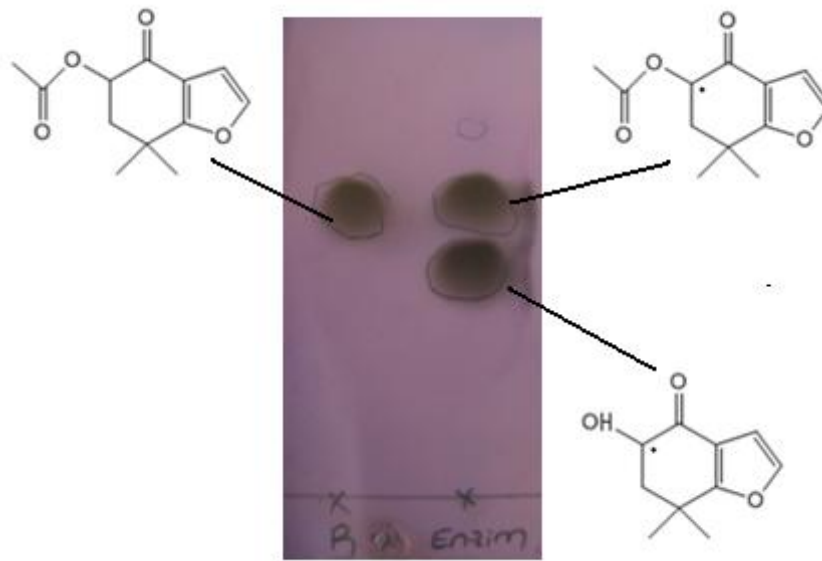
Enzim katalizli reaksiyonlar özellikle biyoteknolojik çalışmalarda sıklıkla kullanılan yöntemlerdendir [137]. Kimyasal seçicilik, regioseçicilik ve enantiyoseçicilik göstermesi enzim katalizli reaksiyonların önemini arttırmaktadır. Hidrolitik enzimler, organik sentezlerde en fazla kullanılan biyokatalizörlerdir. Ester ve amit bağlarının hem hidrolizini hem de oluşumunu katalizleyen hidrolitik enzimler arasında en önemli olanlar amidazlar, proteazlar, esterazlar ve lipazlardır. Bunların arasında lipazlar, ucuz ve kolay bulunabilir olmaları, çok geniş bir substrat aralığı için yüksek enantiyoseçiciliğe sahip olmaları ve organik çözücülerde yüksek dayanıklılık göstermeleri sebebiyle, yaygın olarak kullanılmaktadır[52].

Günümüzde lipazlar hem sulu hem de susuz ortamda, yapılması güç tepkimeleri katalizleyen en önemli biyokatalizörler arasında yer almaktadır. Lipazlar seçicilik gösterdikleri substratın hidroliz reaksiyonlarının tersi olan esterleşme, iç esterleşme ile trans-esterleşme reaksiyonlarını da kolaylıkla katalizleyebilirler. Lipazlar, stereo ve bölgesel spesifik olmaları nedeniyle kimyasal olarak katalizlenemeyen tepkimeleri

katalizleyebilirler[50]. Bu sebeple endüstriyel alanda ve akademik çalışmalarda lipazlardan faydalanılır.

10.3.1.1 4,5,6,7-Tetrahidro-4-okso-7,7-dimetil benzofuran-5-il asetat Bileşiğinin Lipaz Katalizli Reaksiyonları

Rasemik halde sentezlenen α -asetoksi benzofuranon türevi olan 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-7,7-dimetil benzofuran-5-il asetat bileşiği (**3**), optikçe aktif bir forma lipaz enzimi ile dönüştürülmüştür (Şekil 10.4).



Şekil 10.4 4,5,6,7-Tetrahidro-4-okso-7,7-dimetil benzofuran-5-il asetat bileşiğinin Lipaz Katalizli Reaksiyonlarının İTK sonuçları

Çeşitli kaynaklardan elde edilmiş dokuz farklı lipaz türü ve üç farklı organik çözücü ile çalışılmıştır. Reaksiyon sonuçları verilerine (Çizelge 10.1) göre kullanılan tüm çözücülerde ve tüm enzimlerde biyodönüşümün gerçekleştiği saptanmıştır. Biyodönüşümün sonlandırıldığı süreler incelendiğinde 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-7,7-dimetil benzofuran-5-il asetat bileşiğini (**3**) en hızlı dönüştüren enzimlerin *Burkholderia*, *Wheat Germ*, *Aspergillus sp.* lipazlarının olduğu görülmektedir. En yavaş gerçekleşen reaksiyonlarda kullanılan lipaz türleri ise *Rhizopus oryzae* ve *Aspergillus oryzae*'dir. Ayrıca, çözücü etkisinin reaksiyon süresini çok fazla değiştirmedeği görülmektedir.

Çizelge 10.1 4,5,6,7-Tetrahidro-4-okso-7,7-dimetil benzofuran-5-il asetat bileşiğinin
lipaz katalizli reaksiyon sonuçları

ENZİM	ÇÖZÜCÜ		pH:7 BUFFER	BİYODÖNÜŞÜM	SÜRE
Amano	DMSO	0,05 ml	300 µl	+	23 saat 15 dk
	THF	0,05 ml	300 µl	+	8 saat 20 dk
	Asetonitril	0,375 ml	300 µl	+	9 saat 16 dk
Aspergillus oryzae	DMSO	0,05 ml	400 µl	+	393saat36dk
	THF	0,05 ml	400 µl	+	267saat 20dk
	Asetonitril	0,375 ml	300 µl	+	8 saat 37 dk
Burkholderia	DMSO	0,05 ml	300 µl	+	51 dk
	THF	0,05 ml	300 µl	+	58 dk
	Asetonitril	0,375 ml	300 µl	+	54 dk
Rhizopus oryzae	DMSO	0,05 ml	400 µl	+	188saat11dk
	THF	0,05 ml	400 µl	+	170saat10dk
	Asetonitril	0,375 ml	400 µl	+	243 saat
Wheat Germ	DMSO	0,05 ml	300 µl	+	56 dk
	THF	0,05 ml	300 µl	+	55 dk
	Asetonitril	0,375 ml	300 µl	+	56 dk
Mucor javanicus	DMSO	0,05 ml	400 µl	+	125saat 43dk
	THF	0,05 ml	400 µl	+	101saat 20dk
	Asetonitril	0,375 ml	400 µl	+	74 saat

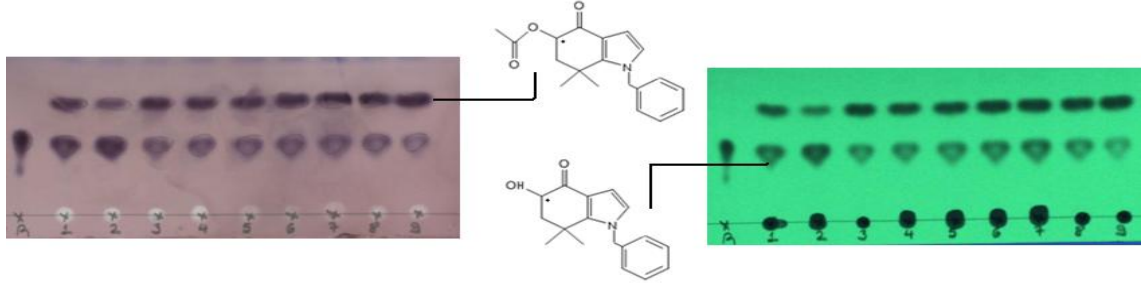
Çizelge 10.1 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-7,7-dimetil benzofuran-5-il asetat bileşiğinin lipaz katalizli reaksiyon sonuçları (devamı)

Aspergillus sp.	DMSO	0,05 ml	300 µl	+	52 dk
	THF	0,05 ml	300 µl	+	32 dk
	Asetonitril	0,375 ml	300 µl	+	81 dk
Pseudomonas flourescens	DMSO	0,05 ml	350 µl	+	126 saat
	THF	0,05 ml	350 µl	+	32 saat 34 dk
	Asetonitril	0,375ml ml	400 µl	+	72 saat 15 dk
Candida antractica	DMSO	0,05 ml	300 µl	+	3 saat 35 dk
	THF	0,05 ml	300 µl	+	5 saat 11 dk
	Asetonitril	0,375 ml	300 µl	+	5 saat 58 dk

10.3.1.2 1-Benzil-6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7-dimetil-1H-indol-4(5H)-on Bileşiğinin Lipaz Katalizli Reaksiyonları

1-benzil-6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7-dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin **(4)** lipaz katalizli transesterifikasyon reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlarda vinilasetat açıl kaynağı olarak kullanılmıştır. Enzimatik reaksiyonlar su ve alkol varlığında geri dönüşümlü reaksiyonlardır ve vinil asetat kullanılması geri dönüşümü engeller. Vinil asetat kullanılmasının sebebi, vinil asetattan asetil transferi sonrasında oluşan alkolün daha kararlı olan asetaldehite dönüşmesidir[50]. Enzimatik reaksiyonlarda verimi arttırmak için ortama additivler eklenmektedir. Additive olarak kullanılan bileşikler, enzimlerin katalitik aktivitesini arttırarak daha yüksek performans göstermelerini sağlar. Özellikle lipaz katalizli reaksiyonlarda additive kullanmak olumlu sonuçlar vermektedir. Lipaz aracılı transesterifikasyon reaksiyonlarında DMAP, 2,4- lutidin, 2,6- lutidin ve piridin gibi çeşitli additivler kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyonlarda reaksiyon oranını arttıran bazın DMAP olduğu literatürde daha önce saptanmıştır [76], [137].

1-benzil-6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7-dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin **(4)**, dokuz farklı lipaz türü ve üç farklı organik çözücü ile transesterifikasyon reaksiyonu gerçekleşmiştir (Şekil 10.5).



Şekil 10.5 1-Benzil-6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7-dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin Lipaz Katalizli Reaksiyonlarının İTK sonuçları

Reaksiyon sonuçlarına göre tüm çözücü tiplerinde ve kullanılan tüm enzim çeşitlerinde 1-benzil-6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7-dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin **(4)** lipaz katalizli transesterifikasyon reaksiyonu sonucu biyotransformasyon gerçekleşmiştir (Çizelge 10.2).

En kısa sürede 1-benzil-6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7-dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiğini **(4)** dönüşüme uğratan enzimler, *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia*, *Amano* türü lipazlardır. Organik çözücü çeşitlerinin reaksiyon süresine etkisinin çok fazla olmadığı görülmektedir.

Çizelge 10.2 1-Benzil-6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7-dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin lipaz katalizli reaksiyon sonuçları

ENZİM	ÇÖZÜCÜ	ADDITIVE (10mmol)	BİYODÖNÜŞÜM	SÜRE
Amano	DMSO	-	-	260 saat
Amano	DMSO	DMAP	+	12 saat 10 dk
	THF	DMAP	+	9 saat 20 dk
	Asetonitril	DMAP	+	10 saat 4 dk
Aspergillus oryzae	DMSO	DMAP	+	75 saat

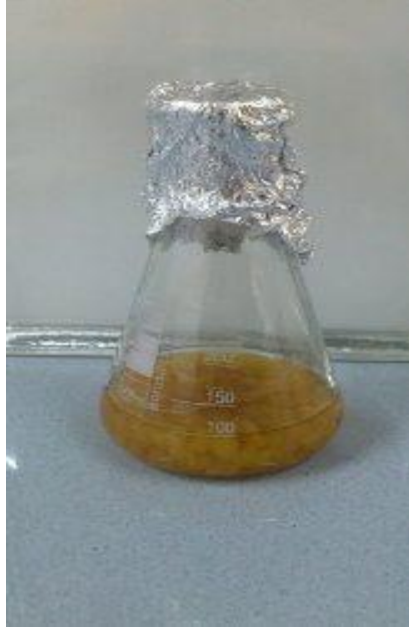
Çizelge 10.2 1-benzil-6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7-dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin lipaz katalizli reaksiyon sonuçları (devamı)

Aspergillus oryzae	THF	DMAP	+	11 saat 43 dk
	Asetonitril	DMAP	+	11 saat 16 dk
Burkholderia	DMSO	DMAP	+	10 saat 34 dk
	THF	DMAP	+	9 saat 15 dk
	Asetonitril	DMAP	+	8 saat
Rhizopus oryzae	DMSO	DMAP	+	30 saat 43 dk
	THF	DMAP	+	23 saat 45 dk
	Asetonitril	DMAP	+	23 saat 22 dk
Wheat Germ	DMSO	DMAP	+	30 saat 40 dk
	THF	DMAP	+	23 saat 44 dk
	Asetonitril	DMAP	+	23 saat 21 dk
Mucor javanicus	DMSO	DMAP	+	29 saat 7 dk
	THF	DMAP	+	23 saat 40 dk
	Asetonitril	DMAP	+	23 saat 20 dk
Aspergillus sp.	DMSO	DMAP	+	29 saat 13 dk
	THF	DMAP	+	23 saat 40 dk
	Asetonitril	DMAP	+	23 saat 20 dk
Pseudomonas fluorescens	DMSO	DMAP	+	10 saat 49 dk
	THF	DMAP	+	8 saat 9 dk
	Asetonitril	DMAP	+	6 saat 20 dk
Candida antractica	DMSO	DMAP	+	23 saat 31 dk
	THF	DMAP	+	12 saat
	Asetonitril	DMAP	+	11 saat 36 dk

10.3.2 Mikrobiyal Biyotransformasyon Sonuçları

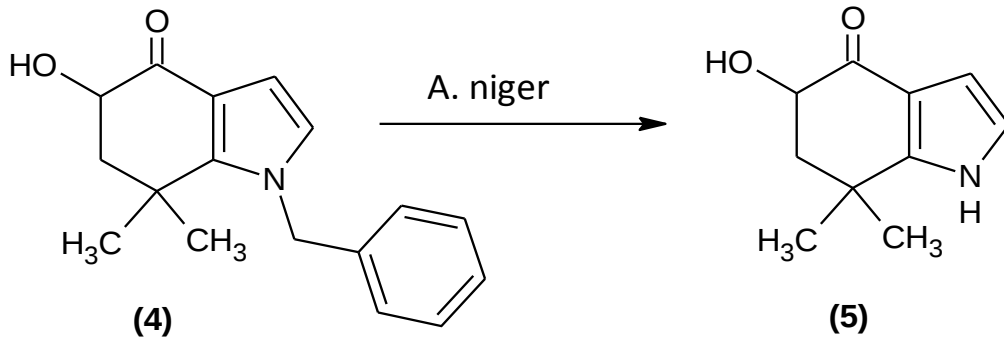
1-benzil-6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7-dimetil-1H-indol-4(5H)-on **(4)** bileşiğinin mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonları, bakteriler ve küfler olarak iki farklı canlı türü ile yürütülmüştür. Bakteriler ile yapılan çalışmalarda, *Agrobacterium rhizogenes* ve *Bacillus subtilis* organizmaları prosedür doğrultusunda kültüre edilmiştir. Hücrelerin biyotransformasyonu gerçekleştirebilecekleri koşullar sağlandıktan sonra substrat biyotransformasyon ortamına eklenmiştir. Belirli aralıklarla İTK yöntemi ile reaksiyon kontrol edilmiştir ancak herhangi bir dönüştürme gözlenmemiştir. *Agrobacterium rhizogenes* ve *Bacillus subtilis* bakterileri ile gerçekleştirilen biyotransformasyon çalışmalarında herhangi bir biyodönüştürme ürününün oluşmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

Küfler ile gerçekleştirilen mikrobiyal biyotransformasyon çalışmalarında *Aspergillus niger* ve *Hypocrea jecorina* organizmaları kullanılmıştır. *Hypocrea jecorina* ile gerçekleştirilen biyotransformasyon reaksiyonu sonucunda herhangi bir ürün oluşmamıştır. *Aspergillus niger* için yapılan çalışmada hem büyüyen hücre kültürü hem de spor kültürü kullanılmıştır. Kültür ortamına substratın (Şekil 10.6) eklenmesinden 6 saat sonra İTK ile yapılan kontrollerde biyodönüştürme ürünleri görülmeye başlanmıştır. Reaksiyon devam ettiği süreçte İTK kontrollerinde biyodönüştürme ürünlerinin sayısının ve miktarının arttığı gözlenmiştir. Reaksiyon 20 gün devam ettirilmiş fakat başlangıç maddesi bitmemiştir. Spor kültürü ve büyüyen hücre kültürü ile yapılan iki ayrı çalışmanın da ürünlerinin aynı oldukları ve reaksiyon verimlerinin çok yakın olduğu saptanmıştır. Reaksiyonun sonlandırılacağı sürenin tespiti için çalışmalar yapılmıştır ve mikroorganizmaların canlılıklarının devam etmemesinden dolayı sürenin uzatılmasının verimi arttırmada herhangi bir etkisinin olmadığı anlaşılmıştır. En verimli sonucun 75 saat sonunda alındığı belirlenmiştir.



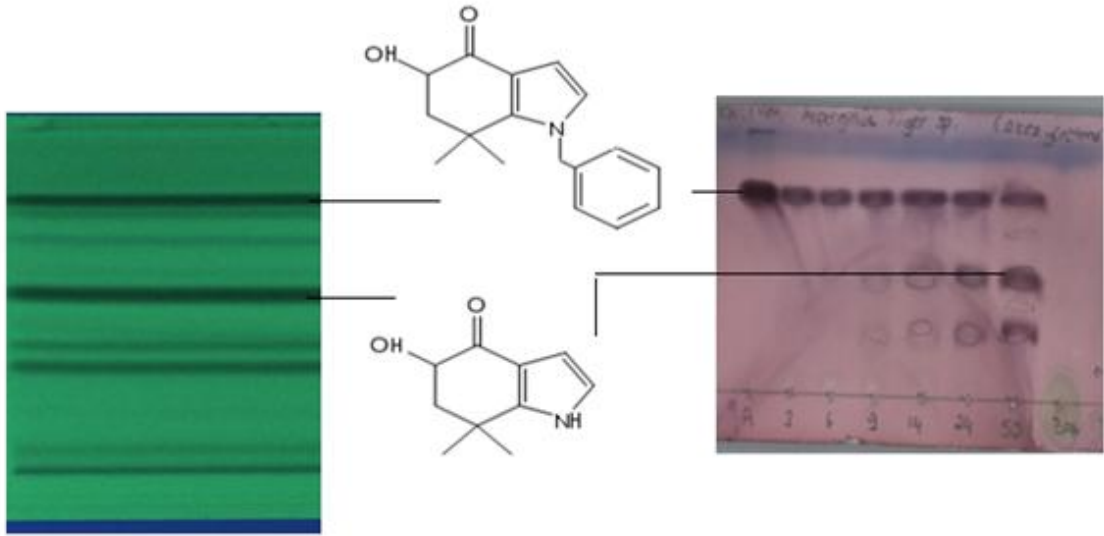
Şekil 10.6 *A. niger* büyüyen hücre kültür ortamı

Biyotransformasyon ortamından izolasyonu yapılan 6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiği **(5)** literatürde ilk defa *A. niger* organizması kullanılarak mikrobiyal biyotransformasyon yöntemi ile %10 verim ile sentezlenmiştir (Şekil 10.7).



Şekil 10.7 6,7-Dihidro-5-hidroksi-7,7dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin **(5)** sentezi

Literatürde ilk kez sentezlenen 6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin **(5)** yapısı NMR ve IR spektral yöntemleri ile aydınlatılmıştır.



Şekil 10.8 6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin İTK sonucu

6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin;

R_f: 0,575 (Silika jel, 1:5 Hekzan: EtOAc)

Erime noktası: 134 °C

¹H-NMR (500 MHz, metanol-d₄) δ (ppm):

C-7'ye ait -CH₃ gruplarının hidrojen atomları 1.01 ppm ve 1.10 ppm'de singlet şeklinde rezonans olmuştur. C-6 protonları sırası ile 2.34ppm (J=16.43) ve 2.48ppm'de(J= 16.46) dublet olarak rezonans olmuştur. C-5 protonu 4.59 ppm'de görülmektedir. C-3 ve C-2 protonları sırası ile 6.30 ppm(J=2.29) ve 7.12ppm'de(J=2.17) dublet şeklinde rezonans olmuştur (Şekil D.1).

¹³C-NMR (500 MHz, metanol-d₄) δ (ppm):

C-4'teki karbonil grubuna ait karbon atomunun sinyali 189.54 ppm'de çıkmıştır. Alifatik bölgede yer alan C-7 karbonuna bağlı -CH₃ gruplarının sinyalleri 22.32 ppm ve 27. 24 ppm'de görülmektedir. C-5 karbonun sinyali 73.63 ppm'de, C-6 ve C-7 karbonuna ait sinyaller sırası ile 42.90 ppm ve 50.66 ppm'de çıkmıştır. 109.81, 127.26 127.78 ve 139.79 ppm'de görülen sinyaller ise diğer karbonların sinyalleridir (Şekil D.2).

IR (CHCl₃) ν (max):

C-4' teki karbonil grubu için 1618.10cm⁻¹'de karakteristik sinyaller gözlenmiştir. 3452.65 cm⁻¹'de görülen sinyaller ise C-5'teki -OH grubundan kaynaklanmaktadır. İndol halkasındaki N-H grubu için 3223.05 cm⁻¹'de karakteristik sinyaller görülmektedir. (Şekil D.3)

LC-MS Q-TOF analiz verileri:

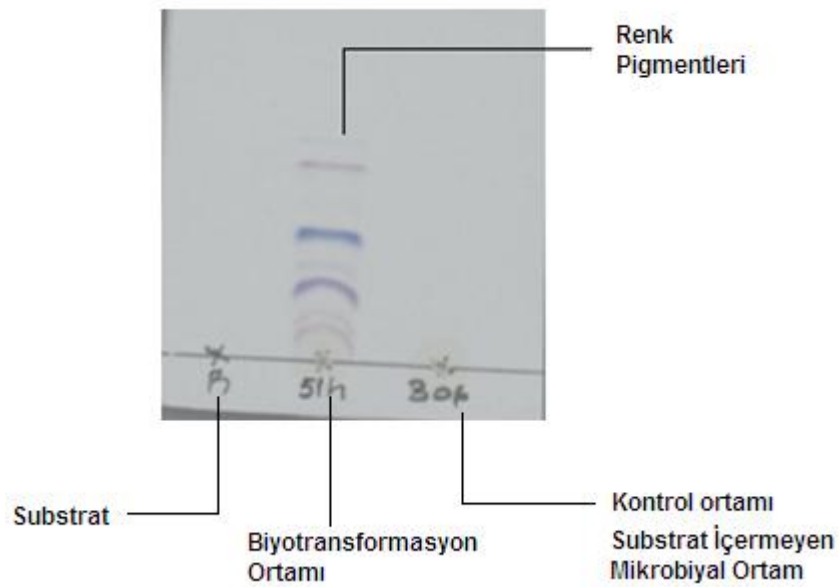
Çizelge 10.3 6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin LC-MS Q-TOF spekturum pik listesi. (Şekil D.4)

Peak List				
<i>m/z</i>	<i>z</i>	Abund	Formula	Ion
102.1278		11658.37		
121.0508	1	114058.46		
162.0909	1	41622		
180.1015	1	161549.56	C ₁₀ H ₁₃ N O ₂	(M+H) ⁺
181.1043	1	19543.52	C ₁₀ H ₁₃ N O ₂	(M+H) ⁺
193.9736		16584.16		
352.3394	1	10931.4		
622.0282	1	14175.22		
922.0098	1	200566.05		
923.0119	1	35949.49		

A. niger organizması ile biyotransformasyon sonucu elde edilen C₁₀H₁₃NO₂ formülüne sahip 6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin molekül ağırlığı teorik olarak 179.09, 180.10 ve 181.10 olabilmektedir. LC-MS Q-TOF analizi sonuçlarına göre 180.1015 ve 181.1043 değerlerin saptanması, 6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin yapısını aydınlatmıştır.

A. niger organizması ile biyotransformasyon reaksiyonu süresince, substrat etkisinin gözlenmesi amacı ile paralel iki çalışma yapılmıştır. Birincisi kontrol amaçlı substrat eklenmeyen mikroorganizma kültürüdür ikincisi ise biyotransformasyon reaksiyonu kültürüdür yani hem mikroorganizma hem de substrat bulunduran ortamdır. Reaksiyon boyunca ortamlarının renklerinde farklılık olduğu görülmüştür. Reaksiyonun 48. saat ve sonrasında substrat içeren ortam turuncudan, pembe-mor renge dönüşmüştür.

Kontrol ortamında ise bu renk değişiminin gerçekleşmediği görölmüştür. İTK ile yapılan kontrolde ise başlangıç maddesi (substrat), substrat içeren ortam (biyotransformasyon ortamı) ve substrat içermeyen boş ortam (kontrol ortamı) görünür bölge ışığında incelenmiştir. (Şekil 10.8) Substrat içeren ortamda görünür bölgede, herhangi bir boyama işlemi olmadan çeşitli renklilikler görölmektedir. Substrat içermeyen ortamda ise renklilikler görölmemektedir. *A.nigerin* renk pigmentleri ürettiğine dair bilgiler literatürde mevcuttur. Substrat içeren ortamda böyle bir sonucun görölmesi bu substratın yani literatürde ilk kez sentezlenen 6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin **(5)** renk pigmenti üretmesi için *A. niger* organizmasını uyardığını göstermektedir. Substrat içermeyen ortamda ise renkliliklerin oluşmaması bu organizmanın kendiliğinden bu pigmentleri ortama vermediğinin kanıtıdır.



Şekil 10.9 Substrat içeren biyotransformasyon ortamında *A. niger* organizmasının ürettiği renk pigmentlerinin TLC sonucu

Mikrobiyal biyotransformasyon çalışmalarda substrat olarak 1-benzil-6,7- dihidro-5hidroksi-7,7dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiği **(4)**, biyokatalizör olarak ise *Agrobacterium rhizogenes* ve *Bacillus subtilis* bakterileri ve *Hypocrea jecorina* ve *Aspergillus niger* küfleri kullanılmıştır. Biyotransformasyon sonuçları izelge 10.4’de gösterilmektedir.

Çizelge 10.4 Mikrobiyal biyotransformasyon sonuçları

Mikroorganizma	Biyodönüşüm	Ürün
Agrobacterium rhizogenes	×	-
Bacillus subtilis	×	-
Hypocrea jecorina	×	-
Aspergillus niger	✓	6,7- dihidro- 5 hidroksi- 7,7 dimetil- 1H- indol – 4(5H)-on

Bu çalışmada:

- ✓ 7,7-dimetil-6,7-dihidrobenzofuran-4(5H)-on bileşiği **(2)** literatürde yeni bir yöntem ile beyaz renkli tek kristal halde sentezlenmiştir.
- ✓ Bir benzofuranon türevi olan **4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-7,7-dimetil benzofuran-5-il asetat (3)** ve bir indol türevi olan **1-benzil-6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7-dimetil-1H-indol-4(5H)-on (4)** bileşikleri literatürde ilk kez sentezlenmiştir.
- ✓ 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-7,7-dimetil benzofuran-5-il asetat **(3)** ve 1-benzil-6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7-dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşikleri **(4)** ile **lipaz katalizli enzimatik biyotransformasyon reaksiyonları ilk defa** gerçekleştirilmiştir. Biyotransformasyon reaksiyonları farklı lipaz ve farklı organik çözücü gibi parametreler değiştirilerek tekrarlanmıştır. **Tüm reaksiyonlarda biyodönüşümün gerçekleştiği saptanmıştır.**
- ✓ 1-benzil-6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7-dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin **(4)** mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonları için çeşitli mikroorganizmalar taranmıştır.
- ✓ *A.niger* organizması ile gerçekleştirilen biyodönüşüm reaksiyonu sonucu substrat olarak kullanılan 1-benzil-6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7-dimetil-1H-indol-4(5H)-on

bileşiği **(4)**, 6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7-dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiğine **(5)** dönüşmüştür. **İlk defa mikrobiyal biyotransformasyon yöntemi** kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyon sonucu oluşan **6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7-dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiği (5)** literatürde ilk kez elde edilmiştir.

- ✓ *A.niger* ile gerçekleştirilen mikrobiyal biyodönüşüm reaksiyonu sırasında substrat olarak kullanılan 1-benzil-6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7-dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiği'nin **(4)** *A. niger* organizmasını uyarak bu organizmanın ortama renk pigmenti vermesine sebep olmuştur. ***A. niger* organizmasının yeni bir indol türevi olan 1-benzil-6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7-dimetil-1H-indol-4(5H)-on bileşiği (4) varlığında renk pigmenti ürettiği tespit edilmiştir.**

KAYNAKLAR

-
- [1] Padaratz. P., (2009). "Antinociceptive Activity of a New Benzofuranone Derived from a Chalcone", Nordic Association for the Publication of BCPT, 105:257-261.
 - [2] Khanam, H. ve Shamsuzzaman, (2014). "Bioactive Benzofuran Derivatives: A review", European Journal of Medicinal Chemistry, 1-22.
 - [3] Pare, P.W., (1991). "Phytoalexin Aurone Induced in *Cephalocereus Senilis* Liquid Suspension Culture", Phytochemistry, 30: 1133-1135.
 - [4] Khotune,N.A., Mossodik, M.S., Rahman, M.M., Khondkar,P., Hague, M.E., ve Gray,I.A.,(2005). "A Benzofuranone from the Flowers of *Nyctanthes arbortristis* and its Antibacterial and Cytotoxic Activities", Dhanka University Journal of Pharmaceutical Sciences, 4(1).
 - [5] Strobe G., (2002). "Isopestacin, an Isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, Possessing Antifungal and Antioxidant Activities", Phytochemistry, 60: 179-183.
 - [6] Reddy J.S., (2011). "(Z)-2-(2-Hydroxy-4-methoxybenzylidene)-1-benzofuran-3(2H)-one", Acta Crystallographica Section E, 67: 1330.
 - [7] Souard, F., Okambi, S., ve Beney, C., (2010). "Azaaurones Derived from the Naturally Occurring Aurones as Potential Antimalarial Drugs", Bioorganic & Medicinal Chemistry, 18(15): 5724–5731.
 - [8] Wang, R.R., (2008). "Anti-HIV-1 Activities of Compounds Isolated from the Medicinal Plant *Rhus chinensis*", Journal of Ethnopharmacology, 117: 249-256.
 - [9] Gu, Q., Wang, R. R., Zhang, X. M., Wang, Y. H., Zheng, Y. T., ve Zhou, J., Chen, j.j., (2006). "Anew Benzofuranone and Anti-HIV Constituents from the Stems of *Rhus chinensis*", Planta letter.
 - [10] Mishra R.C., (2011). "Second Generation Benzofuranone Ring Substituted Noscaphine Analogs: Synthesis and Biological Evaluation", Biochemical Pharmacology, 82: 110-121.
 - [11] Awale S., (2008). "Constituents of Brazilian Red Propolis and Their Preferential Cytotoxic Activity Against Human Pancreatic PANC-1 Cancer Cell Line in Nutrient-Deprived Condition", Bioorganic & Medicinal Chemistry, 16: 181-189.

- [12] Boumendjel, A., (2003). "Aurones: a Subclass of Flavones with Promising Biological Potential", *Current Medicinal Chemistry*, 10: 2621-2630.
- [13] Lee, C.Y., (2010). "Functionalized Aurones as Inducers of NAD(P)H:quinone Oxidoreductase 1 that Activate AhR/XRE and Nrf2/ARE Signaling Pathways: Synthesis, Evaluation and SAR", *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45: 2957-2971.
- [14] Rhinde, S.S., Rode, M.A., Karole B.K., (2010). "New Benzofuran Derivatives as on Antioxidant Agent", *Indian J. Pharm. Sci.* 72(2): 231- 235.
- [15] Nadri, H., (2010). "Design, Synthesis and Anticholinesterase Activity of a Novel Series of 1-Benzyl-4-((6-alkoxy-3-oxobenzofuran-2(3*H*))ylidene)methyl)pyridinium Derivatives", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18: 6360-6366.
- [16] Sim, H.M., (2008). "Dimethoxyaurones: Potent Inhibitors of ABCG2 (Breast Cancer Resistance Protein)", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 35: 293-306.
- [17] Erb S., (2006). "Single- Enantiomer Drugs Poised for Further Market Growth", *Pharmaceutical Technolog.*
- [18] Wanger, B. R., ve Tome, j.M., (1950). "Derivatives of Benzofuran"
- [19] Sausa, C.C.S., Morais, V.M.F., Matos, M.A.R.,(2013). "Experimental and Computational Thermochemistry of 6,7- dihydro- 4(5*H*)- Benzofuranone", *J. Chem. Thermodynamics*, 56: 83-88.
- [20] Demir, A.S., Çalışkan, Z., ve Şahin E., (2007). "Enantioselective Synthesis of 4,5,6,7-tetrahydro-4-oxo-benzofuran-5-yl acetate and 1-benzyl-4,5,6,7-tetrahydro-4-oxo-1(*H*)-indol-5-yl acetate Using Chemoenzymatic Methods", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 44: 87-92.
- [21] Jha M., Chou T. Y., Blunt B., (2011). "General Synthesis of Mono-, di-, and tri Acetylated Indoles from Indolin-2-ones", *Tetrahedron*, 67: 982-989.
- [22] Patel,H.,Darji, N., Pillai, J., ve Patel, B.,(2012). "Recent Advance in Anti-cancer Activity of Indole Derivatives", *International Journal of Drug Research and Technology*, 225-230.
- [23] Kaufmann, D., Pajarova, M., Vagel, S., ve Angere, E.,(2007). "Antimitotic activities of 2-phenyl indole-3 carbaldehyde in Human Breast Cancer Cell", *Bioorganic and Medicinal chemistry*, 15: 5122-5136.
- [24] Zhang, F., Zhao, Y., Sun, L., Ding, L., ve Gong, P., (2011). "Synthesized in vitro Anti-tumor Activity of 2- amino-3- cyano-6-(1*H*-indol-3-yl)-4-phenylpyridine Derivatives", *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46: 3149-3157.
- [25] Jacquemard, U., Dias, N., Lansiaux, A., Bailly, C., ve Rounter, S., (2008). "Synthesized 3,5-bis(2-indolyl)pyridine and 3-[(2 indolyl)-5-phenyl]-pyridine Derivatives as CDK Inhibitors and Cytotoxic Agents", *Bioorganic and Medicinal chemistry*,16: 4932-4953.

- [26] Nassar, E., (2010). "Synthesis (in vitro) Antitumor and Antimicrobial Activity of some Pyrazoline, Pyridine, and Pyrimidine Derivatives Linked to Indole Moiety", *Journal Of American Science*, 6(8): 463-471.
- [27] Ding, H., Zhang, C., Wu, X., Yang, C., ve Xie,Y., (2005). "Novel Indole α -methylene- γ -lactones as Potent Inhibitors for AKT –mTOR Signaling Pathway Kinase", *Bioorganic and Medicinal chemistry Letters*, 15: 4799-4802.
- [28] Magdy, A. H., (2010). "Synthesized Antitumor Activity of Indolylchalcones and Their Pyrazoline Analogs", *Journal Of Chemistry science*,122: 587-595.
- [29] Farghaly, A. R., (2010). "Synthesized Indole Derivatives Containing Pyrazoles with Potential Antitumor Activity", *Arkivoc*,11: 177-187.
- [30] Kamal, A., Srikanth, Y.V.V., ve Naseer, M., (2010). "Synthesis of 3,3-diindolyl Oxyindoles Efficiently Catalysed by FeCl₃ and Their in vitro Evaluation for Anticancer Activity", *Bioorganic and Medicinal chemistry Letters*, 20: 5229-5231.
- [31] Wu, Y.S., Coumar, M.S., Chang, J.Y., ve Sun, H.Y., (2009). "Synthesis and Evaluation of 3-Aroylindoles as Anticancer Agents", *Journal of Medicinal Chemistry*,52: 4941-4945.
- [32] Singh, P., Kaur, M., Verma, P., (2009). "Design, Synthesis and Anticancer Activities of Hybrids of Indole and barbituric Acids" ,*Bioorganic and Medicinal chemistry Letters*,19: 3054-3058.
- [33] El-Ashry, E.S.H., (2013). "Regioselective Synthesis, Characterization and Antimicrobial Evaluation of S-glycosides and S,N-diglycosides of 1,2-Dihydro-5-(1*H*-indol-2-yl)-1,2,4-triazole-3-thione", *European Journal of Medicinal Chemistry*, 66:106-113.
- [34] Akhaja, T.N., ve Raval, J.P., (2011). "1,3-Dihydro-2*H*-indol-2-ones Derivatives: Design, Synthesis, in vitro Antibacterial, Antifungal and Antitubercular Study", *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46: 5573-5579.
- [35] George, S., (2008). "Synthesis and Evaluation of the Biological Activities of some 3-{{[5-(6-Methyl-4-aryl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl]-imino}-1,3-dihydro-2*H*-indol-2-one Derivatives", *Acta Pharmaceutica*, 58: 119-129.
- [36] Kumar, M., (2014). "4-(1-Aryl-5-chloro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylideneamino)-N-substituted Benzene Sulfonamides: Synthesis, Antimicrobial, Anticancer Evaluation and QSAR Studies", *Arabian Journal of Chemistry*, 7: 436-447.
- [37] Sharma, S.K., (2012). "Synthesis, Antimicrobial, Anticancer Evaluation and QSAR Studies of 6-Methyl-4-[1-(2-substituted-phenylamino-acetyl)-1*H*-indol-3-yl]-2-oxo/thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylic Acid Ethyl Esters", *European Journal of Medicinal Chemistry*, 48:16-25.
- [38] Wilson, Z.E., (2007). "Synthesis of Indole Analogues of the Anti-*Helicobacter pylori* Compounds CJ-13,015, CJ-13,102, CJ-13,104 and CJ-13,108", *Tetrahedron*, 63: 5379-5385.

- [39] Terzioğlu, N., ve Karalı, N., (2006). "Synthesis and Primary Antiviral Activity Evaluation of 3-Hydrazono-5-nitro-2-indolinone Derivatives", ARKIVOC, 2006: 109-118.
- [40] Gul, W., ve Hamann, M.T., (2005). "Indole Alkaloid Marine Products: An Established Source of Cancer Drug Leads with Considerable Promise for the Control of Parasitic, Neurological and Other Diseases", Life Sciences, 78: 442-453.
- [41] Pandeya, S.N., (2005). "Biological Activities of Isatin and Its Derivatives", Acta Pharmaceutica, 55: 27-46.
- [42] Amit, K., Raj, K.P., ve Chandra, S., (2013). "Synthesis, Characterization and Pharmacological Evaluation of Some Novel 3-indol Derivatives", Der Pharma Chemica, 5(2):311-319.
- [43] Homann M. J., Vail R.B., Previte E., Tamarez M., Morgan B., Dodds D.R., ve Zaks A., (2004). "Rapid Identification of Enantioselective Ketone Reductions Using Targeted Microbial Libraries", Tetrahedron, 60: 789-797.
- [44] Loughlin W. A., (2000). "Biotransformations in Organic Synthesis, Bioresource Technology", 74: 49-62.
- [45] Patel R. N., (2002). "Microbial/enzymatic Synthesis of Chiral Intermediates for Pharmaceuticals", Enzyme and Microbial Technology, 31: 804-826.
- [46] Salvin A., (2008). "Chattopadhyay S., Asymmetric Reduction of Halo-substituted Arylalkanones with Rhizopus arrhizus", Tetrahedron: Asymmetry, 19:1992-1997.
- [47] Solomons, T.W.G., ve Fryhle, C.B., (2002). Organik Kimya, Literatür Yayınları, İstanbul.
- [48] Soyer, A., (2007). Lipaz Enzimi Biyokatalizörlüğünde Kinetik Rezolüsyon İle Enantiyomerik Saflıkta 1-Fenil-1-propanolün Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [49] Karakaya, D., (2005). 2-Kloro-1-(Furan-2-il)etanolün Her İki Enantiomerinin Kemoenzimatik Sentezi, Bilim Uzmanlığı Tezi, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Zonguldak.
- [50] Ersez, M.S., (2011). Biyoteknolojik Yöntemlerle Kiral 4-Okso-Tetrahidroindol Türevlerinin Sentezleri, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [51] Priya, K., ve Chadha, A., (2003). "Synthesis of Hydrocinnomic Esters by Pseudomonas cepacia Lipases", Enzyme and microbial Technology, 32:485-490.
- [52] Lurçi, B., (2007). Rasemik Benzoin Asetattan Lipaz Katalizli Hidroliz Tepkimesi ile Enantiyomerik Saflıkta Benzoin Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [53] Sharma, U.K., Schreiber, G. B., Glynn, S. A., Nass, C.C.,(2001). "Knowledge of HIV/AIDS Transmission and Screening in United States Blood Donors", Transfusion, 41(11): 1341-1350.

- [54] Salvi, N. A., (2008). "Chattopadhyay S., Asymmetric Reduction of Halo-Substituted Arylalkanones with *Rhizopus arrhizus*", *Tetrahedron: Asymmetry*, 19: 1992–1997.
- [55] Yuan J.L., Liu B.J., ve Xiao X.G., (2011). "Biooxidation of Indole and Characteristics of the Responsible Enzymes", *African Journal of Biotechnology* 10(86): 19855-19863.
- [56] Boaventura M.A.D., Lopez R.F.A.P., ve Takahashi J.A., (2004). "Microorganism as Tools in Modern Chemistry: The biotransformation of 3- indolyacetonitrile and Tryptamine by Fungi", *Brazilian Journal of Microbiology*, 35: 345-347.
- [57] Torshabi, M., (2011). "Biotransformation of Methyltestosterone by the Filamentous Fungus *Mucor racemosus*", *Chemistry of Natural Compounds*, 47: 59-63.
- [58] Lubertozzi, D., ve Keasling, J.D., (2008). "Developing *Aspergillus* as a Host for Heterologous Expression, *Biotechnology Advances*", 27: 53-75.
- [59] Kamath, A. V., ve Vaidyanathan C. S.,(1990). "New Pathway For the Biodegradation of Indol in *A. niger*", *Applied and Environmental Microbiology*, 275-280.
- [60] Marti, E.J., Zuzuarregui, A., Alba G.M., Gutierrez,D., ve Olmo M.D., (2011). "Molecular Response of *Saccharomyces cerevisiae* Winw and Labrotory Strains to High Sugar Stres Conditions", *International Journal of Food Microbiology*, 145: 211-220.
- [61] Khor, G. K., ve Uzir, M., (2011). "*Saccharomyces cerevisiae*: a Potential Stereospesific Reduction Tool for Biotransformation of Mono-and Sesquiterpenoids" , *Yeast*, 28: 93-107.
- [62] Zhang J., Cheng ZH., Yu BY., CordellGA., ve Qiu SX., (2005). "Novel Biotransformation of Pentacyclic Triterpenoid Acids by *Nocardia sp.* NRRL 5646", *Tetrahedron Letters*, 46, 2337–2340.
- [63] Bräutigam S., Dennewalda D., Schürmann M., ve Spelberg J.L., (2009). "Whole-cell biocatalysis: Evaluation of New Hydrophobic Ionic Liquids for Efficient Asymmetric Reduction of Prochiral Ketones", *Enzyme and Microbial Technology*, 45: 310-316.
- [64] Carballeira, J.D., Quezada, M.A., Hoyos, P., Simeó, Y., Hernaiz, M.J., Alcantara, A.R., ve Sinisterra,J.V., (2009). " Microbial Cells as Catalysts for Stereoselective Redox Reactions", *Biotechnology Advances*, 27(6): 686-714.
- [65] Mihovilovic, M.D., Muller, B., Spina, M., Durrani, A., Stanetty, P.,Dazinger, G., ve Kirchner, K., (2006). "Microbial Baeyer-Villiger Oxidation of Ketones by Cyclohexanone and Cyclopentanone Monooxygenase - A Computational Rational for Biocatalyst Performance", *Monatshefte fur Chemie*, 137(6): 785-794.
- [66] Shen, Z.Q., Eisenreich, W., ve Kutchan, T.M., (1998). "Bacterial Biotransformation of 3 alpha(S)-strictosidine to the Monoterpenoid Indole Alkaloid Vallesiachotamine", *Phytochemistry*, 488(2): 293-296.

- [67] Babaarslan, Ç., (2008). Biyokatalitik Olarak Enantiyoseçimli α - Hidroksi Keton Üretim Prosesinin Geliştirilmesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [68] Songür, R., (2009). Rasemik Benzoin Asetattan Mikrobiyal Hidroliz Tepkimesi ile Enantiyomerik Saflıkta Benzoin Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [69] Atkins, R.C., ve Carey, F.A., (1997). "Organic Chemistry", The McGraw-Hill companies, Inc, 184–212, New York.
- [70] Köseali, Y.K., (2005). α - Hidroksi Ketonların Enantiyoseçimli Olarak Biyotransformasyola Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [71] Sheldon, R.A., (1993). "Industrial Synthesis of Optically Active Compounds", Chirotechnology, New York, xvii-423; Derleyen: Aboul-Enein, H.Y., (1994). Chirality, Wiley-Liss, USA.
- [72] Toka, Y., (2005). 2-Bromo-6-Hidroksi-3-Metoksi-2-Sikloheksen-1-On'un Kemoenzimatik Yöntemlerle Enantiyoseçimli Sentezi, Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale.
- [73] Davies, N.M., ve Teng, X.W., (2003). "Importance of Chirality in Drug Therapy and Pharmacy Practice: Implications for Psychiatry", Advances in Pharmacy, 1(3): 242-252.
- [74] Karakaya, D., (2005). 2-Kloro-1-(Furan-2-il) Etanolün Her İki Enantiyomerinin Kemoenzimatik Sentezi, Bilim Uzmanlığı Tezi, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Zonguldak.
- [75] Ghanem, A., ve Aboul-Enein, H.Y., (2004). "Lipase-mediated Chiral Resolution of Racemates in Organic Solvents", Tetrahedron: Asymmetry, 15: 3331-3351.
- [76] Çelebi, N., (2007). Süperkritik Akışkan Ortamında Kiral Hidroksi Ketonların Sentezi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [77] Strauss, U., Felfer, U., ve Faber, K., (1998). "Biocatalytic Transformation of Racemates into Chiral Building Blocks in 100% Chemical Yield and 100% Enantiomeric Excess", Tetrahedron: Asymmetry, 10: 107-117.
- [78] Schnell, S., ve Maini, P. K.,(2003), " A Century of Enzyme Kinetics: Reliability of the Km and Vmax Estimates",Commentes on Theoretical Biology, 18: 169-187.
- [79] Gruber, C. C., Lavandera, I., Faber, K., ve Kroutil,W.,(2006). "From a Racemate to a Single Enantiomer; Deracemization by Stereo-inversion", Advances synthesis and Catalysis, 348(14): 1789-1805.
- [80] Faber, K., (2004). "Biotransformation in Organic Chemistry", 6th Edition, Springer Verlag, Berlin.
- [81] Telefoncu, A.,(1995). Biyoteknoloji, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, No: 152, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir.

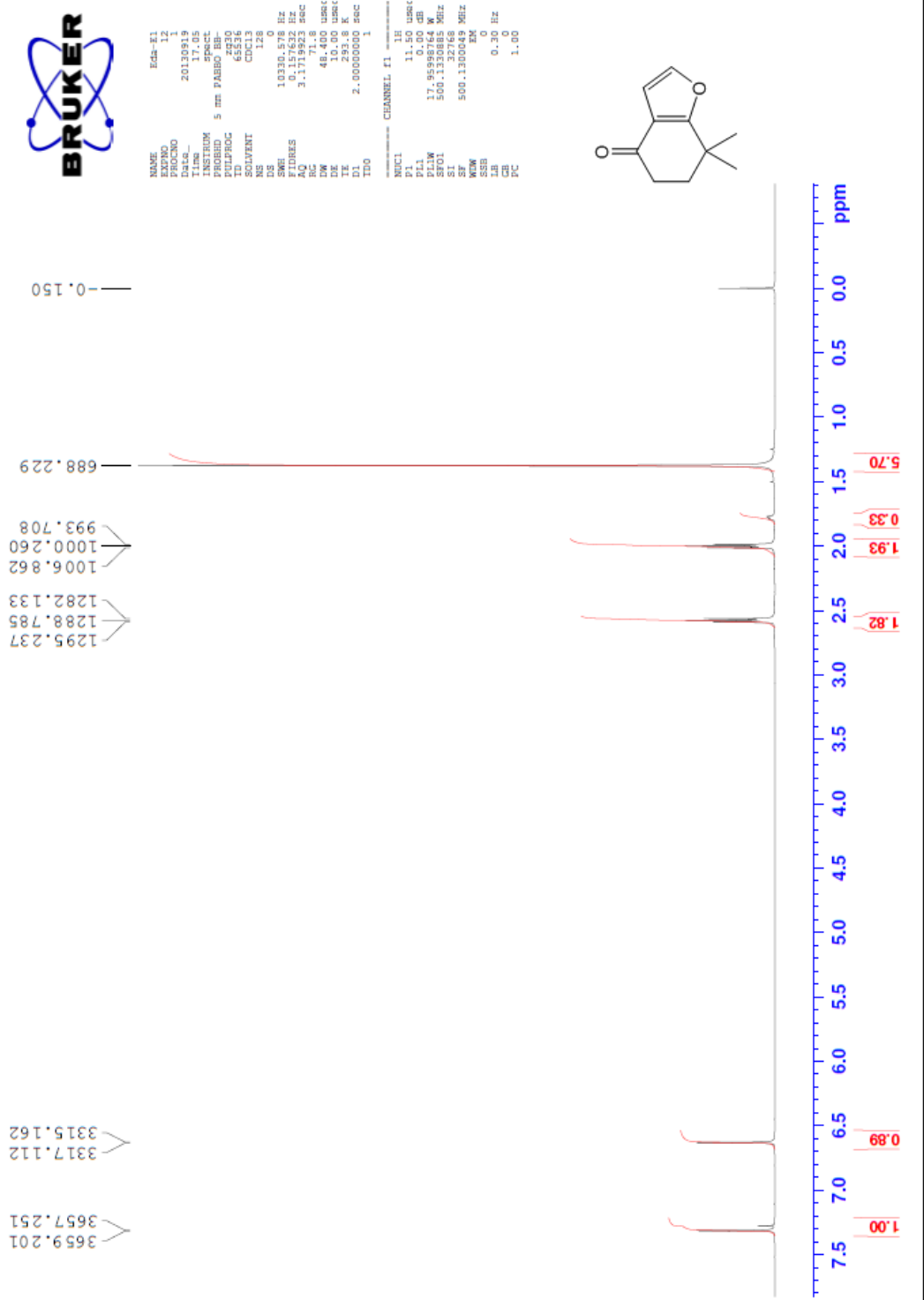
- [82] Kırimer, N., vd., (2002). "Monoterpenlerin Mikrobiyal Transformasyonu", 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, Eczacılık Fakültesi, Farmakognosi Anabilim Dalı Anadolu Üniversitesi, Eskişehir.
- [83] Roberts, S.M., Turner, N.J., Willets, A.J., ve Turner M.K., (1995). Introduction to Biocatalysis Using Enzymes and Microorganisms, Cambridge University press, Cambridge, 195.
- [84] Murray, H.C., ve Peterson, D.H.,(1952). "Oxygenation of Steroids by Mucorales Fungi", U.S., Patent 2602769.
- [85] Hanson, J.R., (1995). An Introduction to Biotransformations in Organic Chemistry, Oxford University Press, Oxford, 92.
- [86] Demirci, F., (2000). Biyoaktif Monoterpenlerin Mikrobiyal Biyotransformasyonu, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- [87] Akar, T., (2005). Furanosteroid Yapılı Bazı Bilesiklerin Antifungal Etkinliğinin ve *Neurospora crassa* Fungal Kültürünün Biyotransformasyon ve Biyosorpsiyon Özelliklerini İncelenmesi, Doktora Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- [88] Duruceylan, Z., (2007). Karyofillen Oksit'in *Neurospora crassa* ile Biyotransformasyonun İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- [89] Martinko, M., ve Clark, D., (2009). Brock Biology of Microorganisms, Twelfth Edition, Pearson International Edition, U.S.
- [90] Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, ve M., Tanyolaç, B., (2007). Moleküler Biyoloji, 1. Baskı, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.
- [91] Demir, A.S., Caliskan, Z., Aydın, E.A., ve Biçer,İ.,(2006). "A New and Efficient Chemoenzymatic Route to Both Enantiomers of α - acetoxy and α -hidroxy- α methoxy cyclic enones", Tetrahedron: Asymetry 17: 786-791.
- [92] Cetin, B., (2006). *Rubia tinctorum* Bitkisinde *Agrobacterium rhizogenes* Aracılığıyla Transforme Saçak Kök Kültürlerinin Oluşturulması ve Sekonder Metabolitlerin Üretimi, Doktora tezi, Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa.
- [93] Coşkun, A., (2010). Endüstriyel Enzimler Üreten Yeni *Bacillus sp.* Suşlarının İzolasyonu ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [94] Öner, M., (2004). Genel Mikrobiyoloji, 5. Baskı, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.
- [95] Ulutürk, C., Orhan, N., Kıymaz, N., ve Peksel, A.,(2011). "Hypocrea jecorinaQM9414 Suşundan Saflaştırılan Pullulanazın İmmobilizasyonu ve Bazı Özelliklerinin İncelenmesi" BP-TR-009.
- [96] Chaverri, P., ve Samuels G. J., "Hypocrea/Trichoderma Species with Gren ascospores", USA.

- [97] Göğüşgören, N., (2009). *Trichoderma* spp.'e Etkili Antibiyotik Üreten *Bacillus* spp. Suşlarının Saptanması ve Bunların *Ganoderma lucidum* Misel Kültürlerinde in situ Kullanılma Olanaklarının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- [98] Lee, T.M., Farrow, M.F., Arnold, F.H., ve Mayo, S.L., (2011). "A Structural Study of *Hypocrea jecorina* Cel 5A", *Protein Science*, 20: 1935-1940.
- [99] Lantz, S.E., Goedegebuur, F., Hommes, R.,(2010). " *Hypocrea jecorina* CEL6A protein engineering", *Biotechnology for Biofuels*, 3: 20.
- [100] Gün, G., (2008). Adamantane ve Türevlerinin *Aspergillus niger* ve *Fusarium solani* ile Biyotransformasyon Reaksiyonlarının İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- [101] Kazak, Y., (2008). Benzoin'in *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani* ve *Neurospora crassa* Fungal Kültürleri ile Biyotransformasyon Reaksiyonlarının İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- [102] Wang, Y. J., Zheng, Y.G., Xue, J.P., ve Shen Y.C.,(2006). "Microbial Transformation of Indol-3-acetonitrile to Indol-3-acetamide by *Nocardia* sp. 108.", *Process Biochemistry*, 41: 1746-1750.
- [103] Demir, A.S., (2002). "Fungal Deracemization of Benzoin", *Tetrahedron Letters*, 43: 6447-6449.
- [104] García-Granados, A., (2000). "Chemical Semisynthesis and Biotransformation with *Rhizopus nigricans* of Several Sesquiterpenes: Obtention of New 1 α - and 2 α -Hydroxyselinane Derivatives", *Tetrahedron*, 56(35): 6517–6526.
- [105] Parshikov, I. A., ve Netrusov, A. I.,(2012) "Microbial Transformation of Azoarens and Potential Uses in Pharmaceutical Synthesis", *Appl. Microbial Biotechnol.* 95: 871-889.
- [106] Alarcon, J., (2008). "Biotransformation of Indole Derivatives by Mycelial Cultures", *pubmedid*: 18386493, 63(1-2):82-4.
- [107] Demir, A.S., vd., (2008). "Fusarium Roseum and *Aspergillus oryzae*-mediated Enantioselective Reduction of Benzils to Benzoin", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 55: 164-168.
- [108] Zaks, A., ve Dodds, D.R., (1997). "Application of Biocatalysis and Biotransformations to the Synthesis of Pharmaceuticals", *DDT* 2(12).
- [109] Snider, B.B., (1996). "Manganese(III) based Oxidative Free-radical Cyclizations", *Chem. Rev.*, 96: 339-363.
- [110] Burgaz, E.V., (2006). Okso-propannitrillerin Mangan (III) asetat Aracılığında Doymamış Amitlerle Radikalik Halkalaşma Reaksiyonları, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniv. Ankara.
- [111] Şakıyan, İ., (1992). Mangan (III) Asetatın Yeni Bir Yöntemle Hazırlanması, Sağlığının ve Kullanılabilirliğinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniv. Ankara.

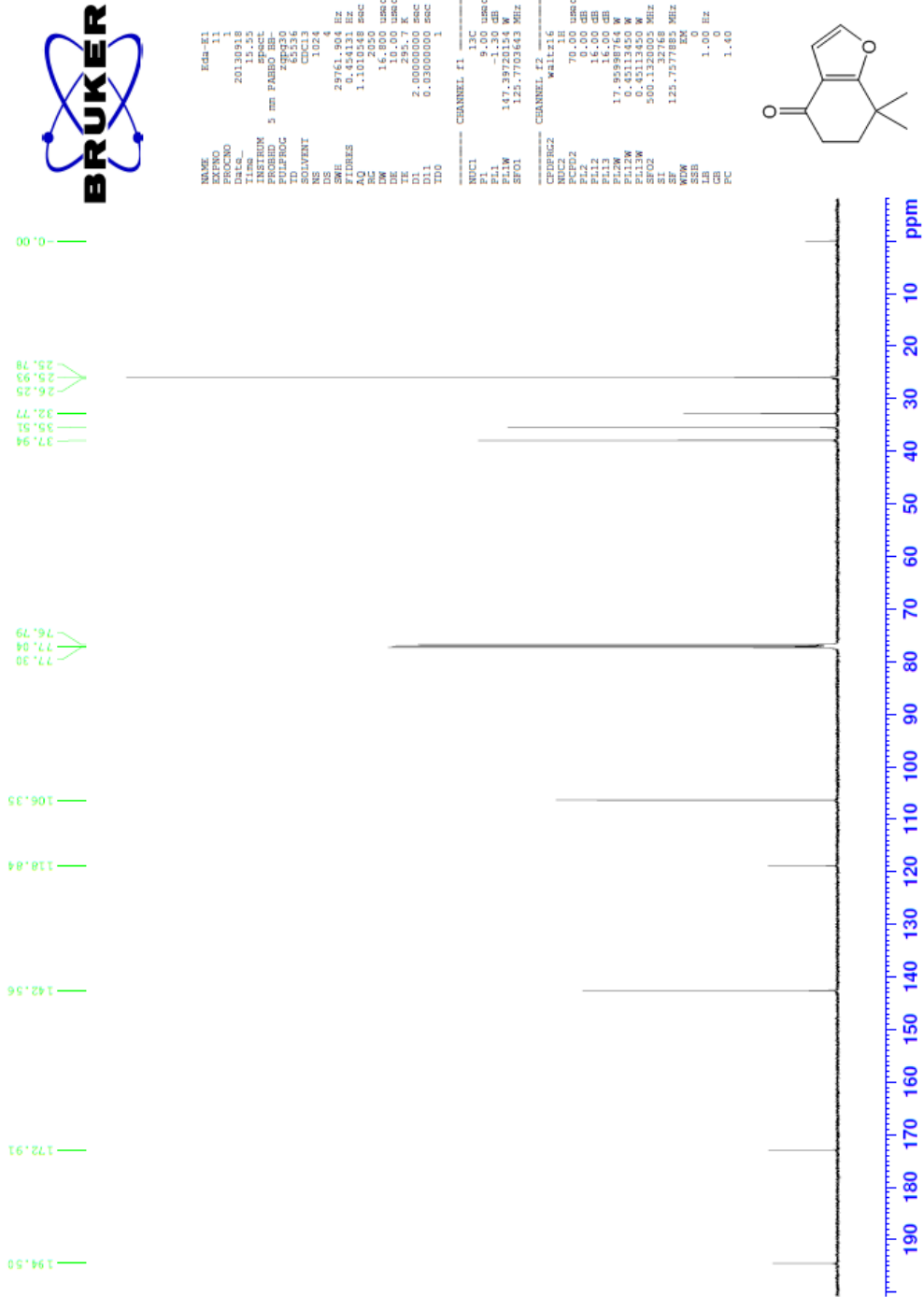
- [112] Gümüş, M.K., (2002). Aril-Substitue Heteroçiklik Bileşiklerin Sentezi ve Türevleri, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniv. İstanbul.
- [113] Demir, A.S., Reis, Ö., ve Igdir, Ç., (2004). "Reinvestigation of the Synthetic and Mechanistic Aspects of Mn(III) Acetate Mediated Oxidation of Enones", *Tetrahedron*, 60: 3427-3432.
- [114] Williams, G.J., Hunter, N.R., ve Norman, R., (1976). "Site-selective α -acetoxylation of Some α , β -enones by Manganic Acetate Oxidation", *Canadian Journal of Chemistry*, 54: 3830-3832.
- [115] Dunlop, K.N., Sabol, M.R., ve Watt, D.S., (1984). "Synthesis of Quassinoids. 3. Oxidation of Enones to α -acetoxyenones Using Manganese Triacetate", *Tetrahedron Lett.*, 25: 5839-5842.
- [116] Demir, A. S., Tural, S.,(2008). "Manganese(III) acetate Mediated Oxidation of 1-alkyl-1H-indole and 9methyl-9H-carbazole Derivatives", *Arkivoc*, 72-79
- [117] Nestl, B. M., Bodlenner A., Stuermer, R., Hauer, B., Kroutil, W., ve Faber, K., 2007. "Biocatalytic Racemization of Synthetically Important Functionalized α -Hydroxyketones Using Microbial Cells", *Tetrahedron Asymmetry*, 18: 1465-1474
- [118] Demir, A.S., Hamamcı, H., Sesenoğlu, O., Aydoğan, F., Capanoğlu, C., Ve Neslihanoglu, R., (2001). "Simple Chemoenzymatic Access to Enantiopure Pharmacologically Interesting (*R*)-2-hydroxypropiophenone", *Tetrahedron Asymmetry*, 12: 1953–1956.
- [119] Ward, O.P., and Singh, A., (2000). "Enzymatic Asymmetric Synthesis by Decarboxylases", *Current Opinion in Biotechnology*, 11: 520-526.
- [120] Hoyos, P., Fernandez, M., Sinisterra, J.V., and Alcantara, A.R., 2006. "Dynamic Kinetic Resolution of Benzoines by Lipase-metalcomplex Catalysis", *Journal of Organic Chemistry*, 71: 7632-7637.
- [121] Vedejs, E., Engler, D.A., ve Telschow, J.E., (1978). "Transition-metal Peroxide Reactions: Synthesis of α -hydroxycarbonyl Compounds From Enolates", *J. Org. Chem.*, 43: 188-196.
- [122] Lee, T.V., ve Toczek, J., (1982). "The Reaction of Chromyl Chloride and O-silylated Enolates: A New Regiospecific Route to α -hydroxy Ketones", *Tetrahedron Lett.*, 23: 2917-2920.
- [123] Rozen, S., ve Bareket, Y., (1996). "Synthesis of α -hydroxy Ketones Using a HOF-MeCN Complex", *Chem. Commun.*, 5: 627-628.
- [124] Davis, F.A., Haque, M.S., Ulatowski, T.G., ve Towson, J.C., (1986). "Asymmetric Oxidation of Ester and Amide Enolates Using New(camphorylsulfonyl)oxaziridines", *J. Org. Chem.*, 51: 2402-2404.
- [125] Masui, M., Ando, A., ve Shioiri, T., (1988). "New Method and Reagents in Organic Synthesis. 75. Asymmetric Synthesis of α -hydroxy ketones Using Chiral Phase Transfer Catalysts", *Tetrahedron Lett.*, 29: 2835-2838.

- [126] Adam, W., Saha-Möller, C.R., ve Zhao, C., (1999). "Asymmetric C-H Oxidation of vic-Diols to α -hydroxy Ketones by a Fructose-Derived Dioxirane: Electronic Effects on the Enantioselectivity of Oxygen Transfer", J. Org. Chem., 64: 7492-7497.
- [127] Demir, A.S. ve Şeşenoğlu, Ö., (2002). "A New and Efficient Chemoenzymatic Route to Both Enantiomers of 4-hydroxycyclohex-2-en-1-one", Organic Letters, 4: 2021-2023.
- [128] Nakamura, K., Kondo, S.L., Kawai, K., Hida, K., Kitano, K., ve Ohno, A., (1996). "Enantio and Regioselective Reduction of α -diketones by Baker's Yeast", Tetrahedron Asymmetry, 7: 409-412.
- [129] Gala, D., Dibenedetto, D.J., Clark, J.E., Murphy, B.L., Schumacher, D.P. ve Steinman, M., (1996). "Preparations of Antifungal Sch 42427 MS 9164: Preparative Chromatographic Resolution and Total Asymmetric Synthesis via Enzymic Preparation of Chiral α -hydroxy Arylketones", Tetrahedron Lett. 37: 611-614.
- [130] Demir, A.S., Hamamcı, H., Tanyeli, C., Akhmedov, İ.M. ve Doğanlı, F., (1998). "Synthesis and *Rhizopus oryzae* Mediated Enantioselective Hydrolysis of α -Acetoxy Aryl Ketones", Tetrahedron Asymmetry, 9: 1673-1677.
- [131] Demir, A.S., Aybey, A., Şeşenoğlu, Ö., ve Polat, F., (2003). "Chemoenzymatic Synthesis of Both Enantiomers of 3-hydroxy-2,3-dihydro-4H-chromen-4-one", Tetrahedron Asymmetry, 14: 1489-1493.
- [132] Okombi, S., (2006). "Discovery of Benzylidenebenzofuran-3(2H)-one (Aurones) as Inhibitors of Tyrosinase Derived from Human Melanocytes", J. Med. Chem, 49 (1): 329-333.
- [133] Onoa. M., (2007). "Aurones Serve as Probes of β -amyloid Plaques in Alzheimer's Disease", Biochemical and Biophysical Research Communications, 361(1): 116-121.
- [134] Gürgök, A. G., (2007). Biyolojik Önemi Olan indol Türevi Bileşiklerin Sentezleri, Yapı Aydınlatmaları ve Aktivitelerinin Değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [135] Avan, İ., (2006). Bazı İndol Bileşikleri Üzerine Kimyasal Çalışmalar, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- [136] Patel, H., Darji, N., Pillai, J., ve Patel, B., (2012). "Recent Advancement in Anti-cancer Activity of Indol Derivatives", International Journal of Drug Research and Technology, 2(3): 225-230.
- [137] Caliskan, Z. Z., ve Ersez, M., (2015). "Stereoselective Synthesis of Optically Active 1-benzyl-4,5,6,7-tetrahydro-6,6-dimethyl-4-oxo-1H-indol-7-yl acetate and 1-benzyl-6,7-dihydro-7-hydroxy-6,6-dimethyl-1H-indol-4(5H)-one Through Lipase-Catalyzed Esterification and Transesterification Processes", Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 111: 64-70.

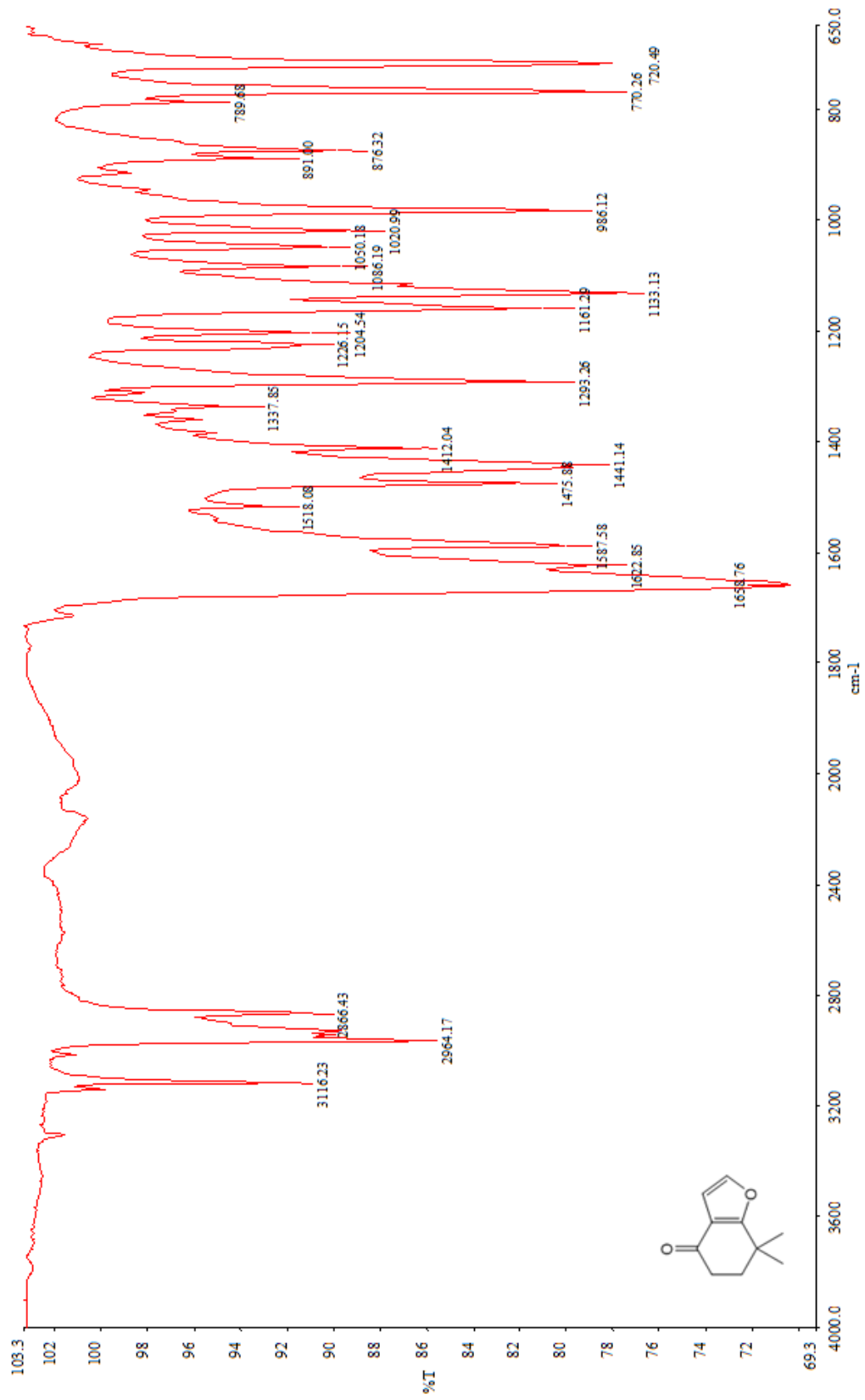
**7,7-Dimetil-6,7-dihidrobenzofuran-4(5H)-on BİLEŞİĞİNİN SPEKTRAL
ANALİZ SONUÇLARI (¹H-NMR, ¹³C-NMR ve IR)**



Şekil A.1 ^1H -NMR sonucu

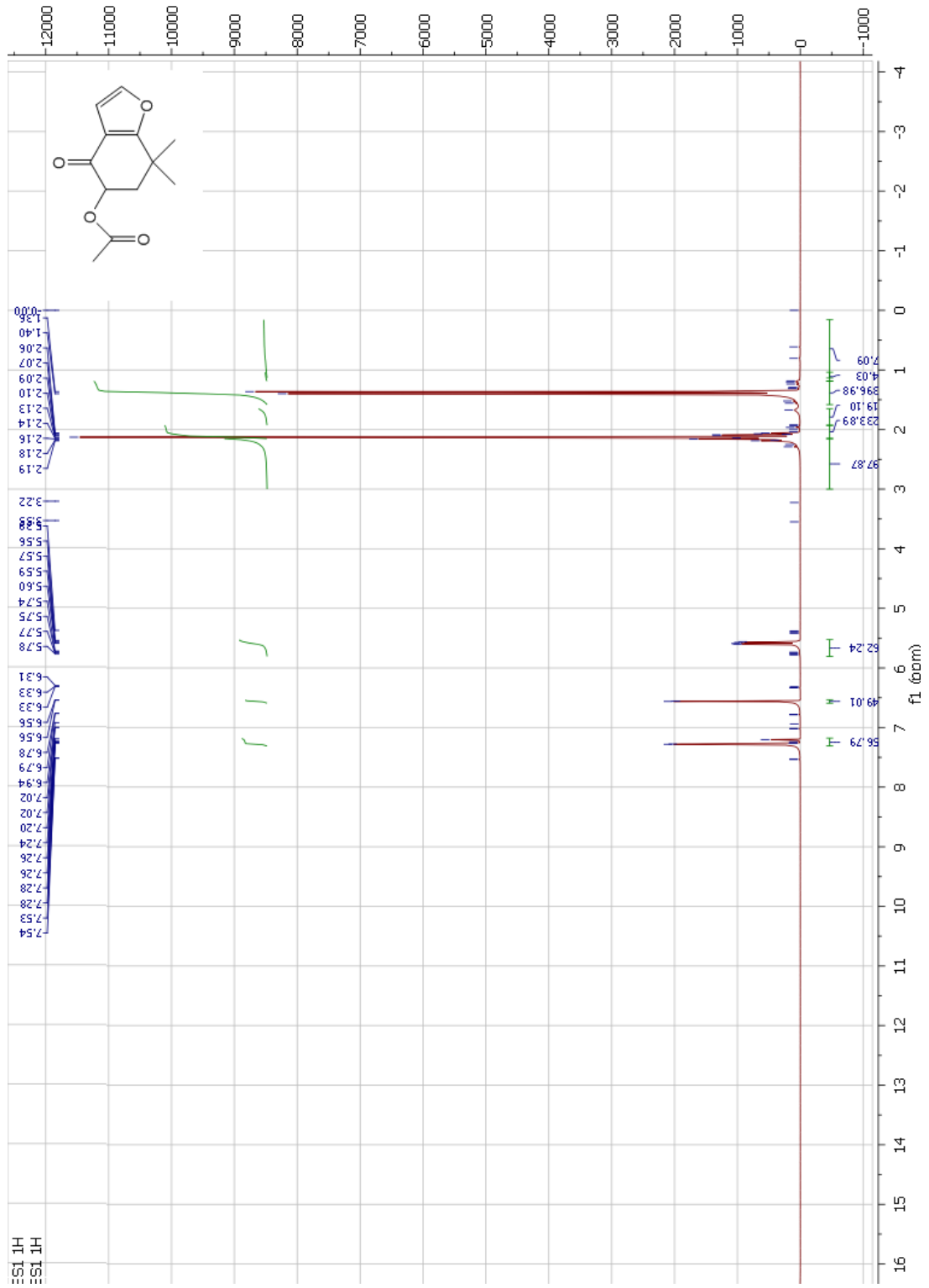


Şekil A.2 C^{13} NMR sonucu

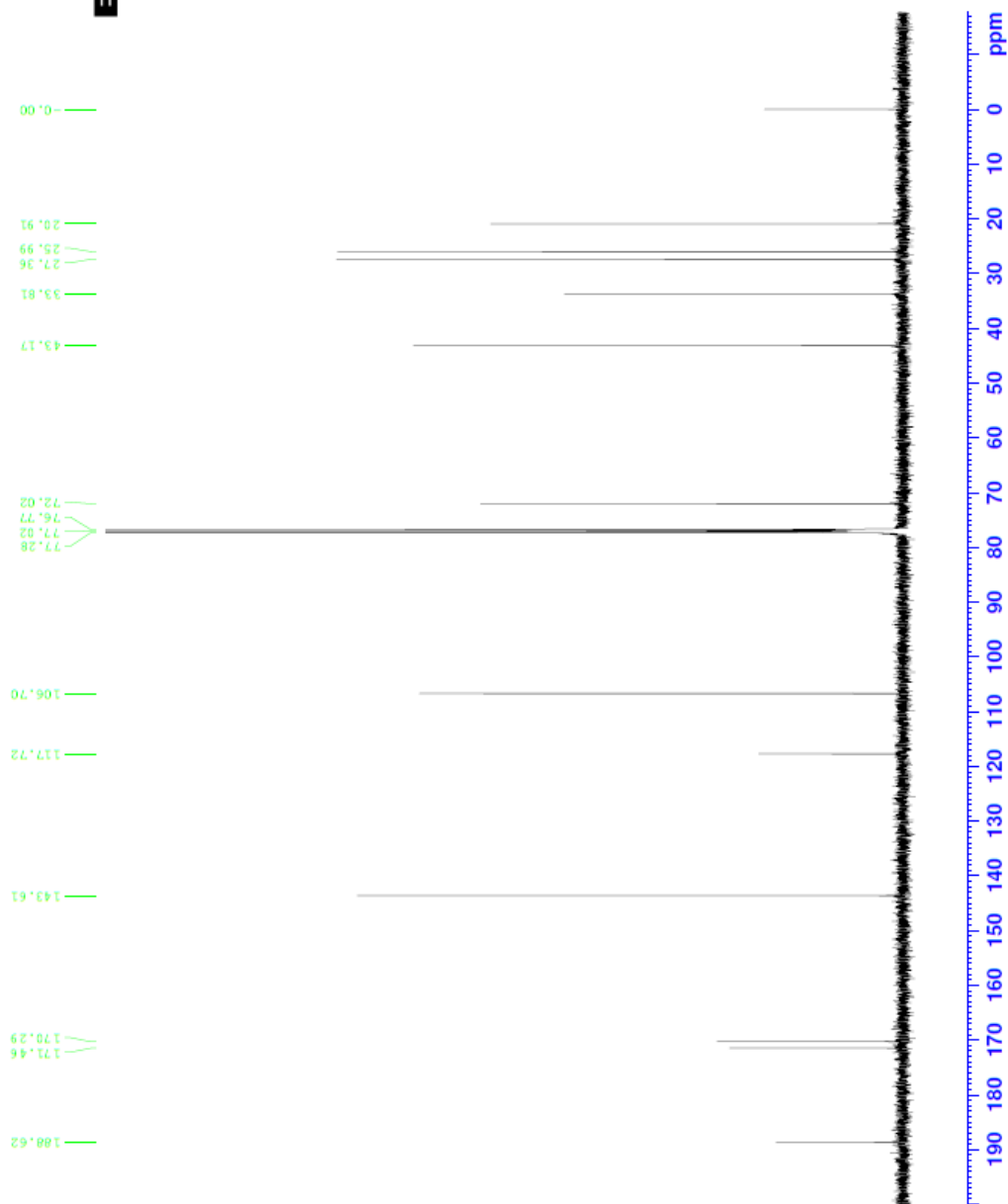


Şekil A.3 IR sonucu

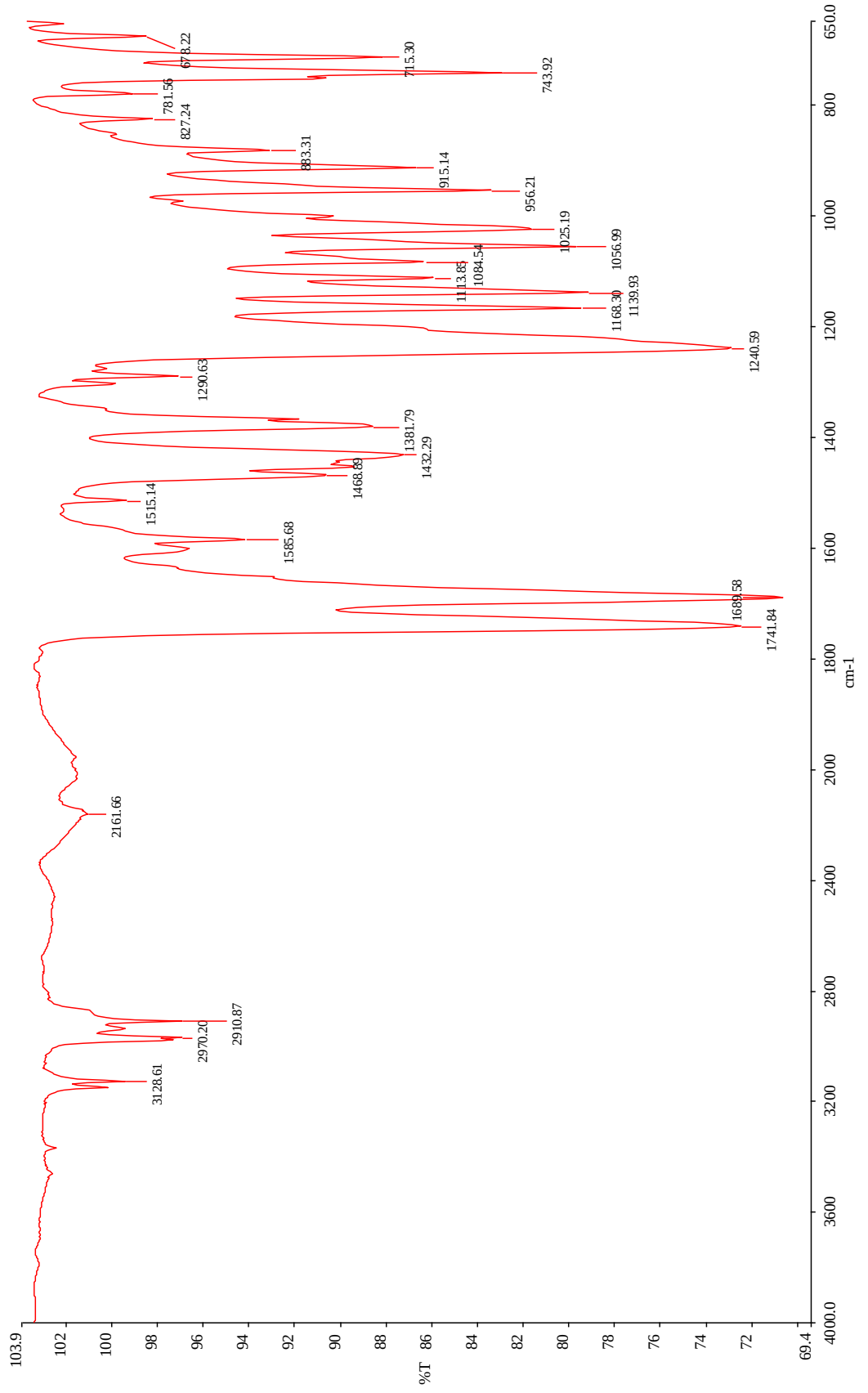
**4,5,6,7-Tetrahidro-4-okso-7,7-dimetil benzofuran-5-il asetat BİLEŞİĞİNİN
SPEKTRAL ANALİZ SONUÇLARI (^1H -NMR, ^{13}C -NMR ve IR)**



Şekil B.1 ^1H NMR sonucu

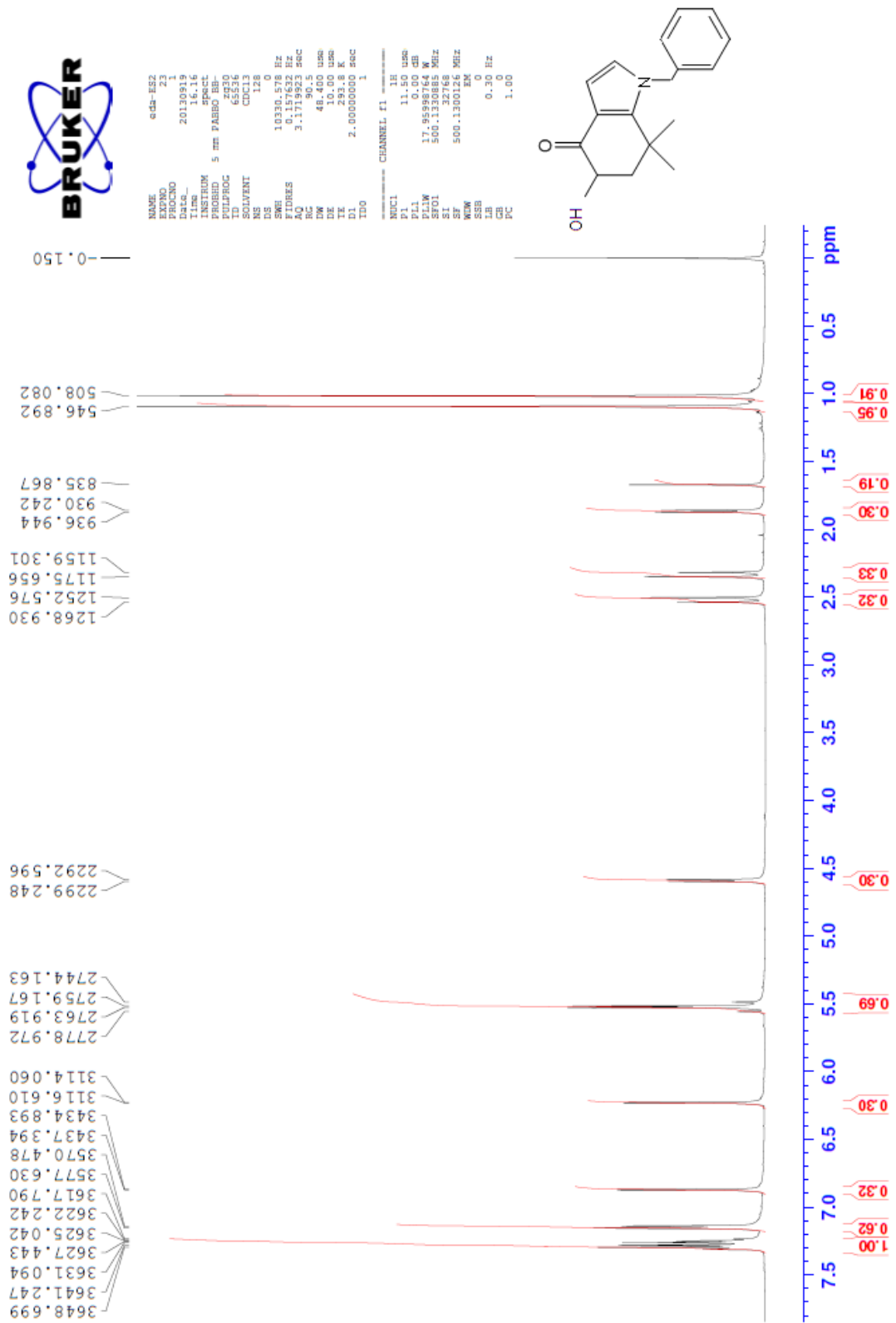


119

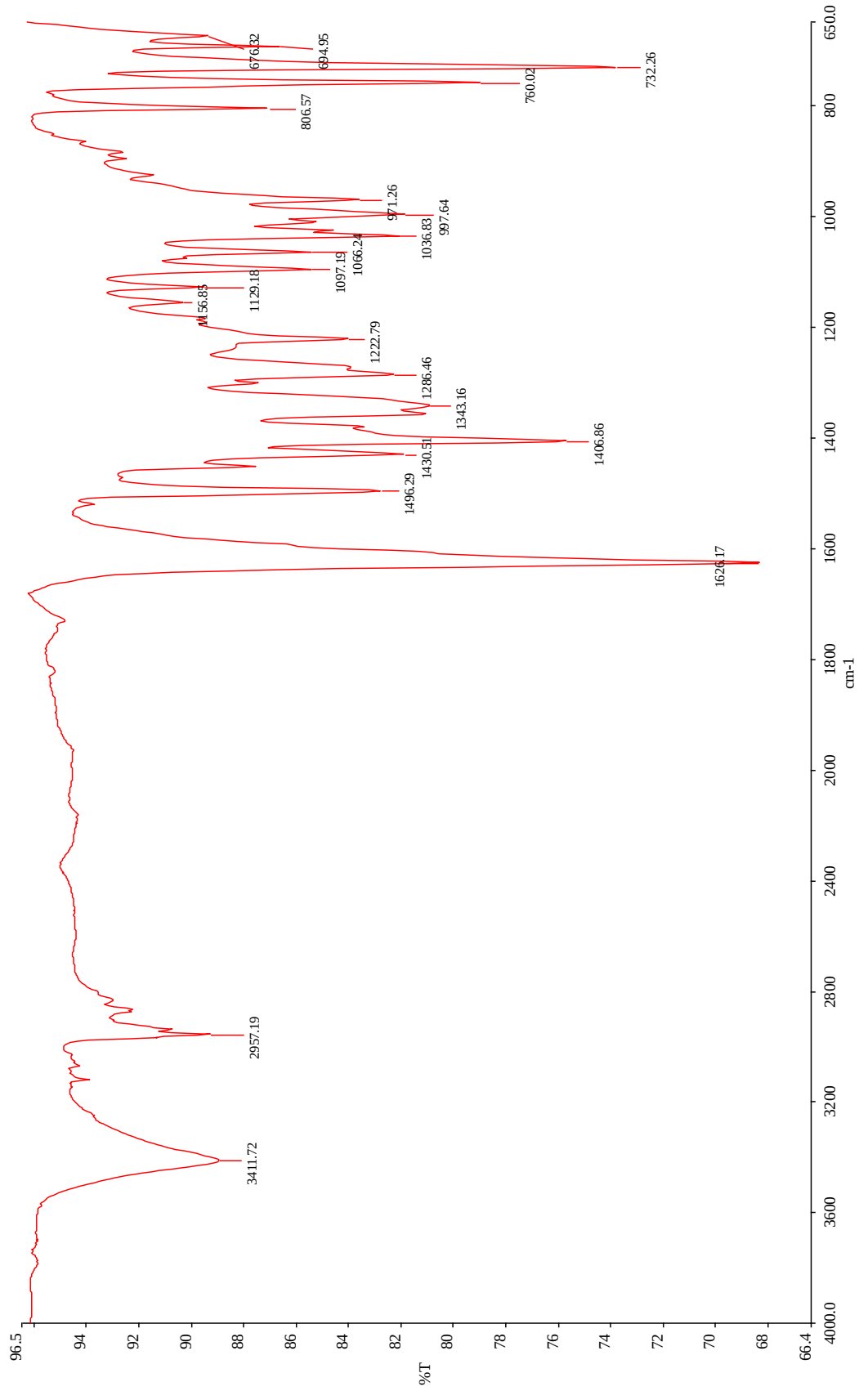


Şekil B.3 IR sonucu

**1-Benzil-6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7dimetil-1H-indol-4(5H)-on BİLEŞİĞİNİN
SPEKTRAL ANALİZ SONUÇLARI (¹H-NMR, ¹³C-NMR ve IR)**

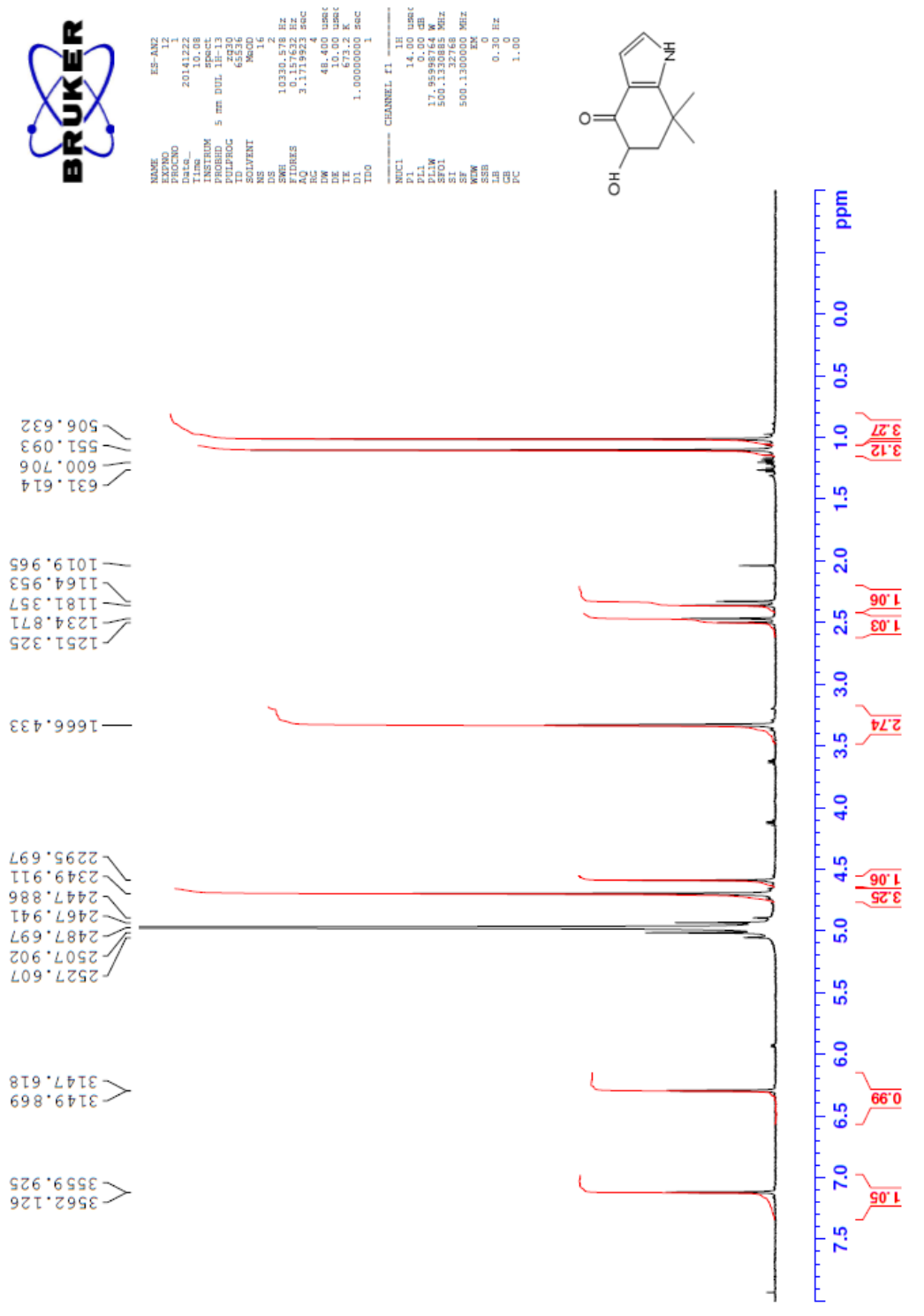


Şekil C.1 ^1H NMR sonucu

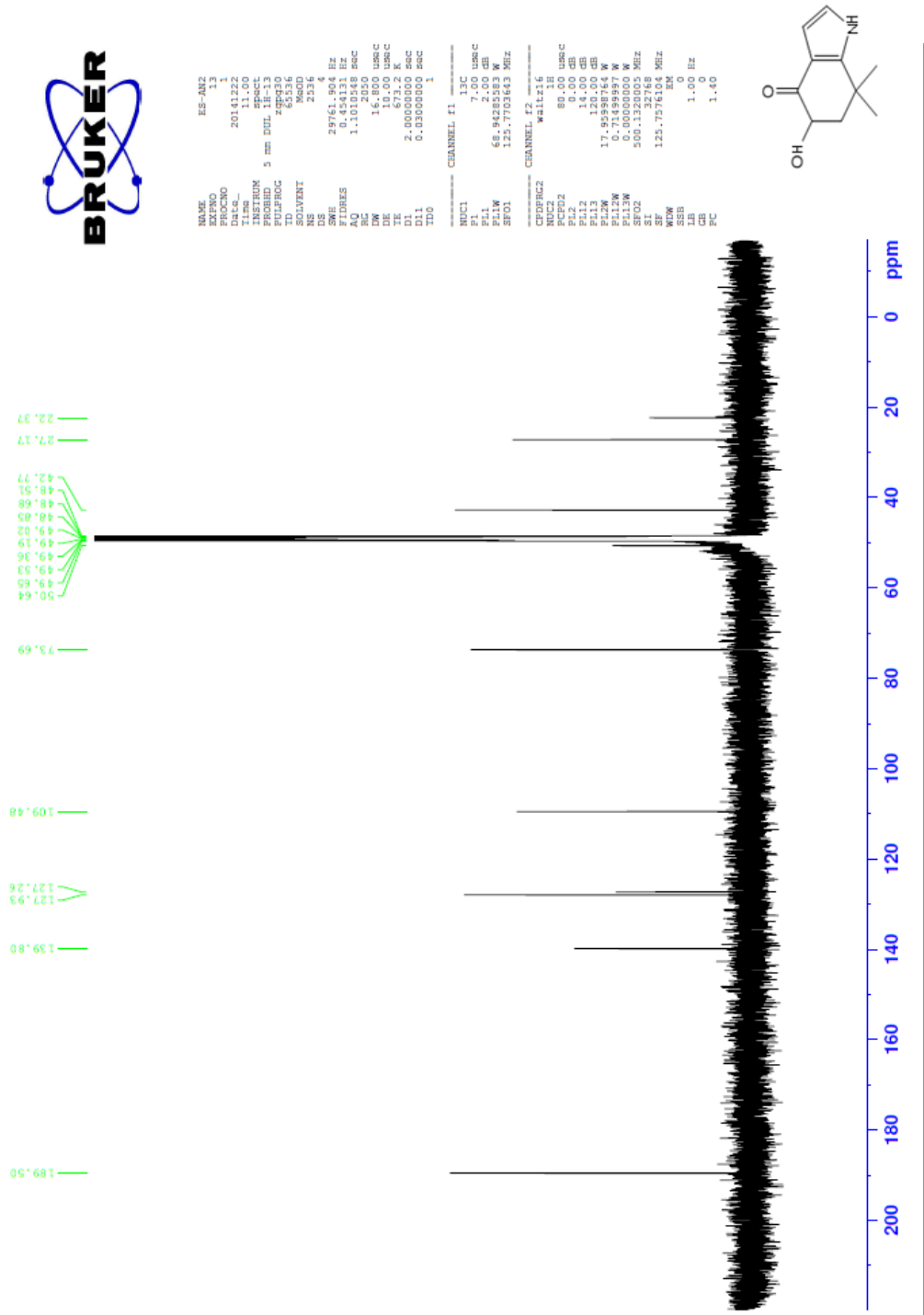


Şekil C.3 IR sonucu

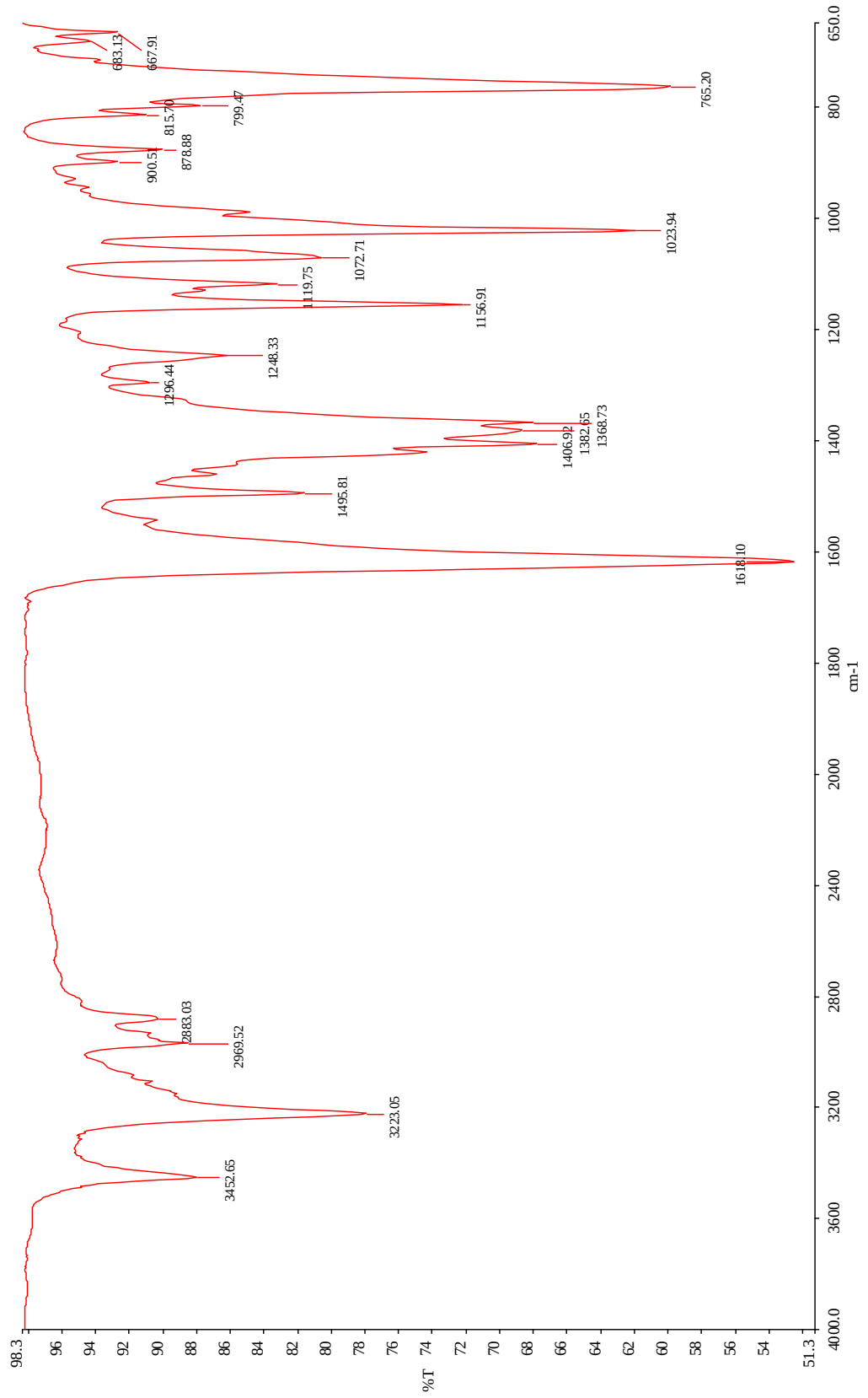
**6,7-Dihidro-5-hidroksi-7,7dimetil-1H-indol-4(5H)-on BİLEŞİĞİNİN
SPEKTRAL ANALİZ SONUÇLARI (¹H-NMR, ¹³C-NMR, IR ve LC- MS Q-TOF)**



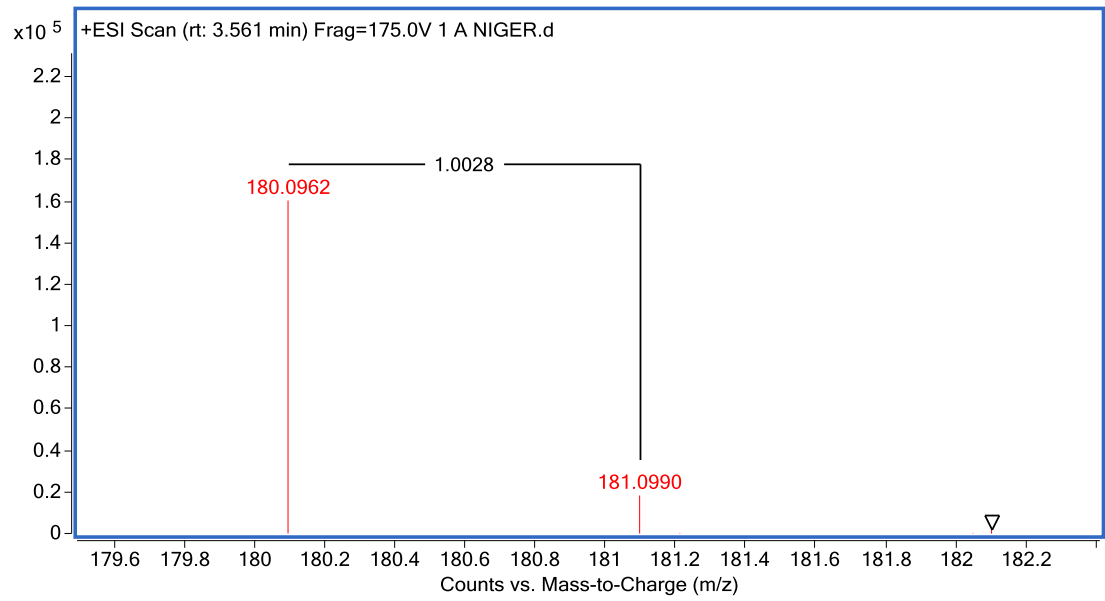
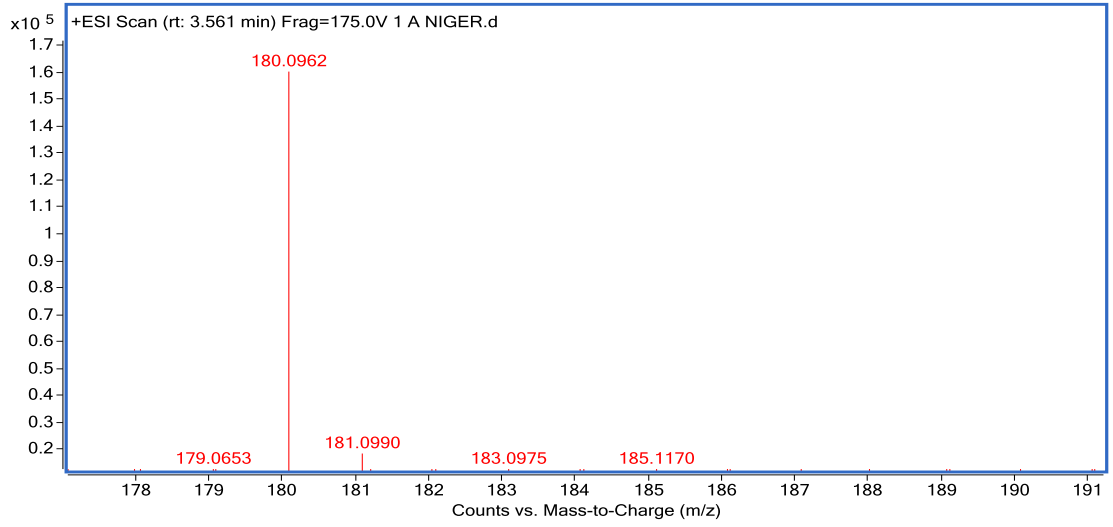
Şekil D.1 ^1H NMR sonucu



Şekil D.2 C^{13} NMR sonucu



Şekil D.3 IR sonucu



Şekil D.4 LC-MS Q-TOF sonucu

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Eda SOYDAN
Doğum Tarihi ve Yeri : 31.03.1987 / Beyoğlu
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : eda87soydan@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans	Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Ağırlıklı Biyoloji	Ege Üniversitesi	2010
Lise	Fen Bilimleri	Saray- Mustafa Elmas Arıcı Anadolu Lisesi	2005