

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KEMOENZİMATİK REAKSİYONLARLA DİHİROBENZOFURANON VE
DİHİROİNDOLON TÜREVLERİNİN ENANTİOSELEKTİF HİDROLİZİ

TUĞBA DAYIOĞLU

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

**KEMOENZİMATİK REAKSİYONLARLA DİHİROBENZOFURANON VE
DİHİROİNDOLON TÜREVLERİNİN ENANTİOSELEKTİF HİDROLİZİ**

Tuğba DAYIOĞLU tarafından hazırlanan tez çalışması 16.02.2015 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

Prof. Dr. Sezgin ÇELİK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Semra HASANÇEBİ
Trakya Üniversitesi



Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' nün 2012-01-07-YL02 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Tez çalışmalarımın hazırlanmasında bilgi ve tecrübesiyle rehberlik eden, karşılaştığım zorluklarla mücadele etmem için beni cesaretlendiren, kendisinden sabretmeyi öğrendiğim değerli danışman hocam Sayın Yrd. Doç.Dr. Zerrin ZERENLER ÇALIŞKAN'a;

Engin bilgilerinden çekinmeden yararlanmama müsaade eden, laboratuvar çalışmalarında yardımını ve sohbetini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Nezhun GÖREN'e;

Tecrübesiyle kriz anlarında yol gösteren ve destek olan, NMR spektral analizleri yapan ve laboratuvar çalışmalarına destek olan sevgili arkadaşım Uzm. Pınar ÇAĞLAR'a;

Her konudaki yardımı ve desteğiyle her zaman yanımda olup, birçok konuda tecrübe edinmeme katkıda bulunan, aynı laboratuvar da birçok güzel anı biriktirdiğim değerli dostum Hüseyin SERVİ'ye; laboratuvar tecrübesi edinmeme yardımcı olan sevgili arkadaşım Mediha SÜLEYMAOĞLU'na; dostluğu ve desteğiyle zor zamanlarımda yanıma olan değerli arkadaşım Tuğba GÜLBAY'a; hayata bakışı ve güzel kalbiyle beni neşelendiren, çok defa destek ve yardımcı olan değerli arkadaşım Eda SOYDAN'a; analizlerde bana yardımcı olup, iyi niyeti ve sohbetiyle yanımda olan sevgili arkadaşım Ebru Nur AY'a;

Hayatımın her döneminde olduğu gibi akademik çalışmalarımı da ilgi ve sevgilerini, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen kıymetli annem Nuran DAYIOĞLU, biricik kardeşlerim Büşra, Kübra ve Muhammet Atilla DAYIOĞLU'na ve özellikle kendisinin akademik bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım sevgili babam Prof. Dr. Habip DAYIOĞLU'na;

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Şubat, 2015

Tuğba DAYIOĞLU

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	viii
KISALTMA LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÇİZELGE LİSTESİ	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT.....	xv
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı.....	18
1.3 Hipotez.....	19
BÖLÜM 2	
STEROKİMYASAL KAVRAMLAR.....	20
2.1 Kirallik	20
2.2 Stereojenik Merkez.....	21
2.3 Moleküler Yapı İle İlgili Temel Tanımlar	21
2.4 Polarize Işık, Optikçe Aktiflik ve Asimetrik Karbon	23
2.4.1 Özgül Çevirme Açısı	24
2.4.2 Optikçe Aktiflik	24
2.4.3 Mutlak Konfigürasyona Ait R-S Tanımlama Sistemi	24
2.5 Enantiyomerler	25
2.5.1 Enantiyomerlerin Biyolojik Etkileri	26
2.5.1.1 Tat ve Koku Vericiler	27
2.5.1.2 Zirai Kimyasallar	27
2.5.1.3 Farmasotikler	28
BÖLÜM 3	
KİRAL İLAÇLAR	36

3.1	İlacın Tanımı, Gelişimi ve Türkiye'nin İlaç Sektöründeki Yeri	36
3.2	İlaç Tasarımı	38
3.2.1	İlaç Tasarımında Benzofuranon Türevlerinin Yeri	38
3.2.2	İlaç Tasarımında İndol Türevlerinin Yeri	40
3.2.2.1	İndol Kimyası ve Reaksiyonları	42
3.2.2.1.1	Fisher İndol Sentezi	43
3.2.3	İlaç Tasarımında α -Hidroksi Keto'nun Yeri ve Eldesi	44
3.3	Saf Enantiyomer Kaynakları	45
3.4	Enantiyomerleri Ayırma Yöntemleri	46
3.4.1	Enantiyomerleri Kristallendirerek Ayırma	46
3.4.2	Enantiyomerleri Diastereomerlere Dönüştürme	47
3.4.3	Asimetrik Sentez	47
3.4.4	Kinetik Rezolüsyon	47
3.4.5	Dinamik Kinetik Rezolüsyon	48
3.4.6	Kromatografik Yöntemle Ayırıştırma	49

BÖLÜM 4

BİYOTRANSFORMASYON	50	
4.1	Başlıca Biyotransformasyon Reaksiyonları	51
4.2	Kiral Seçicilik	51
4.3	Biyotransformasyon Teknikleri	52
4.3.1	Büyüyen hücreler ile biyotransformasyon	52
4.3.2	Stasyonere hücreler ile biyotransformasyon	53
4.3.3	Sporlar ile biyotransformasyon	53
4.3.4	İmmobilize hücreler ile biyotransformasyon	53
4.3.5	İmmobilize enzimler ile biyotransformasyon	54
4.3.6	Çok fazlı sistemler ile biyotransformasyon	54
4.4	Tüm Hücre Biyodönüşümü ve Serbest Enzim Reaksiyonlarının Karşılaştırılması	55
4.5	Biyodönüşüm Çalışmalarında Enzimler	56
4.5.1	Enzimlerin Avantajları:	56
4.5.1.1	Enzimler çok hızlı çalışan biyokatalizörlerdir	56
4.5.1.2	Enzimler geniş substrat spesifikliğine sahiptir	56
4.5.1.3	Enzimlerin geniş bir reaksiyon spektrumu vardır	56
4.5.1.4	Enzimler ılımlı koşullarda çalışırlar	57
4.5.1.5	Enzimler aynı ortamda birbirlerini etkilemeden kalabilirler	57
4.5.1.6	Enzimler üstün seçicilik gösterirler:	57
4.5.1.6.1	Kimyasal seçicilik	57
4.5.1.6.2	Bölgesel seçicilik	57
4.5.1.6.3	Enantiyomerik seçicilik	57
4.5.2	Enzimlerin Sınırlılıkları	58
4.5.3	Genel Enzimatik Reaksiyonlar ve Enzim Sınıfları	59
4.5.3.1	Oksidoredüktazlar	60
4.5.3.2	Transferazlar	61
4.5.3.3	Hidrolazlar	61
4.5.3.4	Liyazlar	62

4.5.3.5	İzomerazlar.....	62
4.5.3.6	Ligazlar	63
4.5.4	Enzimlerin Asimetrik Sentez ve Kinetik Rezolüsyonda Kullanımı.....	64
4.6	Lipaz Enzimi	65
4.6.1	Lipazların Katalizlediği Tepkimeler	66
4.6.2	Lipazların Avantajları	67
4.6.3	Yaygın Olarak Kullanılan Lipaz Çeşitleri	68
4.6.3.1	Candida türü lipazlar	68
4.6.3.2	Pseudomonas türü lipazlar	69
4.6.3.3	Mucor türü lipazlar.....	69
4.6.3.4	Porcine Pancreatic Lipaz (PPL)	69
4.6.3.5	Aspergillus Lipaz	69
4.6.3.6	Amano Lipaz	70
4.6.3.7	Rhizopus Lipaz	71
4.6.3.8	Wheat Germ Lipaz (WGL) (Buğday Ruşeym Lipazı)	71
BÖLÜM 5		
MATERYAL METOD		74
5.1	Kullanılan Kimyasallar	75
5.2	Kullanılan Cihazlar	78
5.3	İzolasyon ve Yapı Tayininde Kullanılan Yöntemler	80
5.3.1	Anisaldehit Ayırıcı	80
5.3.2	Kromatografik Yöntemler	80
5.3.2.1	Kolon Kromatografisi (CC).....	80
5.3.2.2	İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)	81
5.3.2.3	Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (HPTLC)	82
5.3.2.4	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	83
5.3.3	Spektroskopik Yöntemler	84
5.3.3.1	Infra-Red Spektroskopisi (IR).....	84
5.3.3.2	Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (NMR)	85
5.3.4	Erime Noktası Tayini	85
5.4	Sentez Rotası	86
5.4.1	6,7-Dihidro-6-metilbenzofuran-4(5H)-on Sentezi	86
5.4.2	Mangan (III) Asetat Katalizörü ile Asetoksi-Benzofuranon Sentezi....	88
5.4.3	Asetoksi-Benzofuranon Bileşiklerinin Lipaz Katalizli Esterifikasyon Reaksiyonları.....	90
5.4.4	Asetoksi-Benzofuranon Bileşiğinin Seal Tüp Reaksiyonu	93
5.4.5	Benzofuranon Bileşiğinin Seal Tüp Reaksiyonu	93
5.4.6	Potasyum Permanganat Katalizörlüğünde Asetoksi-İndol Sentezi	95
BÖLÜM 6		
SONUÇ VE ÖNERİLER		96
6.1	İndol Türevlerinin Sentezi.....	96
6.2	Benzofuranon Türevlerinin Sentezi	97

6.3 Lipaz Enzimlerinin ve Organik Çözücülerin Kiral Rezolüsyon Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi	97
KAYNAKLAR	102
EK-A	
NMR SPEKTRUMLARI	113
EK-B	
IR SPEKTRUMLARI	124
EK-C	
HPLC SONUÇLARI	128
C-1 Asetonitril Ortamında Lipaz Enzimleri ile Kiral Rezolüsyon	129
C-2 DMSO Ortamında Lipaz Enzimleri ile Kiral Rezolüsyon	130
C-3 THF Ortamında Lipaz Enzimleri ile Kiral Rezolüsyon.....	131
C-4 Toluen Ortamında Lipaz Enzimleri ile Kiral Rezolüsyon.....	132
ÖZGEÇMİŞ	133

SİMGE LİSTESİ

α	Alfa
β	Beta
γ	Gamma
g	Gram
C	Konsantrasyon
L	Litre
μ	Mikro
μ l	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
μ mol	Mikromol
mg	Miligram
ml	Mililitre
M	Molar
nm	Nanometre
$^{\circ}$ C	Santigrat derece

KISALTMA LİSTESİ

Asp.	<i>Aspergillus</i> sp. lipazı
CAL	<i>Candida antarctica</i> lipazı
CCL	<i>Candida cylindracea</i> lipazı
ee	Enantiomeric excess (Enantiomerik fazlalık)
D	Dekstro
DMSO	Dimetilsülfoksit
HPL	Hog pancreas lipazı
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi (TLC: Thin Layer Chromatography)
KMnO ₄	Potasyum permanganat
L	Levorotary
Mn	Mangan
MgSO ₄	Magnezyum sülfat
NaHCO ₃	Sodyum bikarbonat
R	Rektus (Sağ)
RAL	<i>Rhizopus arrhizus</i> lipazı
RNL	<i>Rhizopus niveus</i> lipazı
S	Sinister (Sol)
THF	Tetrahidrofuran
WGL	Buğday ruşeym lipazı (Wheat Germ Lipase)

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1.1 Çeşitli Benzofuranon Halkaları	1
Şekil 1.2 Noscapin ((S)-6,7-dimetoksi-3-((R)-4-metoksi-6-metil-5,6,7,8-tetrahidro- [1,3]diokzolo[4,5-g]izoquinolin-5-il) izobenzofuran-1(3H)-on)'in moleküler yapısı	2
Şekil 1.3 <i>Pestalotiopsis microspora</i> ve besiyeri kültürü.....	2
Şekil 1.4 İzobenzofuranon analogu olan izopestasin ve pestacin moleküler yapısı	3
Şekil 1.5 Kırmızı propolis'in metanol ekstresinden elde edilen 2-(20,40- dihidroksifenil)- 3-methyl-6-methoxybenzofuran (a) ve 2,6- dihidroksi-2-[(4-hidroksi- fenil)metil]-3-benzofuranon (b).....	3
Şekil 1.6 Auron moleküler yapısı.....	4
Şekil 1.7 4,6-Dimetoksiauron ve 4'türevlendirilmiş 5-hidroksiauron moleküler yapısı	5
Şekil 1.8 4,6-Dimetoksi-4'-etilazaauron moleküler yapısı	6
Şekil 1.9 <i>Pterocarpus marsupium</i> ve öz odunundan elde edilen odun bardak	8
Şekil 1.10 <i>Rhus chinensis</i> bitkisi ve bu bitkiden izole edilen benzofuranon türevleri	8
Şekil 1.11 İndol halkası genel sentez rotası	9
Şekil 1.12 <i>Daboia russelli</i> yılanının morfolojik görüntüsü	11
Şekil 1.13 Biyolojik aktivite gösteren çeşitli azaindoller	13
Şekil 1.14 OLED ekran teknolojisine sahip teknolojik ürünler	14
Şekil 1.15 α -Hidroksi keton molekül formülü	15
Şekil 1.16 <i>Zanthoxylum simulans</i> var. <i>podocarpum</i> bitkisi yaprak ve meyvesi	15
Şekil 1.17 <i>Gardenia jasminoides</i> bitkisi.....	17
Şekil 1.18 4,5,6,7-Tetrahidro-4-okso-benzofuran-5-il asetat (2a,2b) ve 1-benzil-4,5,6,7- tetrahidro-4-okso-1(H)-indol-5-il asetat (5) bileşikleri enzimatik rezolüsyonu (b)	17
Şekil 2.1 Kiral (solda) ve akiral (sağda) nesnelere ayna görüntüleri	20
Şekil 2.2 Kiral molekülde stereojenik merkez	21
Şekil 2.3 İzomerlerin alt sınıfları.....	21
Şekil 2.4 C_3H_8O 'nun yapı izomerleri	22
Şekil 2.5 2-Klorbütanın enantiyomerleri.....	22
Şekil 2.6 2,3-Dibrombütanın diastereomerleri	22
Şekil 2.7 Polarimetre ölçülerinin şematik gösterilişi.....	23
Şekil 2.8 Mutlak konfigürasyon gösterimi	24
Şekil 2.9 2-Klorbütan enantiyomerlerinin özellikleri	26
Şekil 2.10 Karvon enantiyomerleri.....	26

Şekil 2.11 Limonen bileşiği enantiyomerleri	27
Şekil 2.12 Kiral ilaçların tek bir enantiyomer ve rasemat şeklinde kullanımı	28
Şekil 2.13 Dekstropoksifen ve levopoksifen moleküler yapısı.....	31
Şekil 2.14 a) (S)-Propanolol, b) Noradrenaline	32
Şekil 2.15 İbuprofen bileşiği.....	32
Şekil 2.16 Metildopa bileşiği	33
Şekil 2.17 Kloroamfenikol'un enantiomerik formları	33
Şekil 2.18 Talidomit ilacı, ilaca bağlı doğum anomalileri ve Talidomid'in Kanada'daki kurbanlarının dernek logosu	34
Şekil 2.19 Talidomit'in sinirleri yatıştırıcı (R)-enantiyomeri ile teratojenik etki gösteren (S)-enantiyomeri.....	34
Şekil 2.20 a) S-(+)-Ketaminin ve b) R-(-)-Ketamin	35
Şekil 2.21 D-L Penisilamin	35
Şekil 3.1 Furan halkası.....	38
Şekil 3.2 2-Kloro-1-(furan-2-il)etanol (1), 2-kloro-1-(furan-2-il)etil asetat (2) bileşikleri	39
Şekil 3.3 Benzofuran-3-il-(indol-3-il)maleimides bileşiği moleküler yapısı ve ana şablonu	39
Şekil 3.4 Doğal ürünlerden izole edilen indol türevleri.....	40
Şekil 3.5 Sentetik olarak üretilen ve ilaç aktif maddesi	41
Şekil 3.6 Benzen, pirol, naftalin ve indol bileşiklerinin moleküler yapıları	42
Şekil 3.7 Fisher indolizasyonunun mekanizması	43
Şekil 3.8 Rasemik benzoin asetatın lipaz katalizli hidroliz tepkimesi.....	44
Şekil 3.9 α,β -Doymamış ketonların α' -asetoksillenmesi.....	45
Şekil 3.10 Başlıca saf enantiyomer kaynakları	46
Şekil 3.11 Enantiyomerlerin distereomerlere dönüştürülmesi	47
Şekil 3.12 Rasemik karışımın %50 verimle kinetik rezolüsyonu	48
Şekil 3.13 Rasemik karışımların kinetik rezolüsyonu	48
Şekil 4.1 Enzim sınıflandırmasındaki kodların transferaz enzimi örneğinde gösterimi ..	60
Şekil 4.2 Oksidoredüktazların genel reaksiyonu	60
Şekil 4.3 Transferazların genel reaksiyonu	61
Şekil 4.4 Hidrolazların genel reaksiyonu	61
Şekil 4.5 Lipazların genel reaksiyonu.....	62
Şekil 4.6 İzomerazların genel reaksiyonu.....	63
Şekil 4.7 Ligazların genel reaksiyonu	63
Şekil 4.8 Enzimatik kinetik rezolüsyon enerji diyagramı	64
Şekil 4.9 Lipaz katalizli reaksiyonların genel şeması	65
Şekil 4.10 Serin hidrolaz mekanizması	66
Şekil 4.11 Lipazların katalizlediği hidroliz tepkimeleri	66
Şekil 4.12 Lipazların katalizlediği esterleşme tepkimeleri	66
Şekil 4.13 Lipazların katalizlediği transesterleşme tepkimeleri.....	67
Şekil 4.14 <i>Aspergillus niger</i> morfolojik görüntüsü	70
Şekil 4.15 Buğday ruşeymi	72
Şekil 4.16 Buğday tanesinin kısımları.....	72
Şekil 5.1 HPTLC sistemi ve modülleri	82
Şekil 5.2 HPLC cihazı ve modülleri.	84
Şekil 5.3 IR spektrometre.....	84

Şekil 5.4 NMR cihazı.....	85
Şekil 5.5 Erime noktası tayin cihazı.....	85
Şekil 5.6 Reaksiyon rotası.....	86
Şekil 5.7 5-Metil-1,3-sikloheksandion bileşiğinden (1) 6,7-dihidro-6-metilbenzofuran-4(5 <i>H</i>)-on (2) sentezi.....	87
Şekil 5.8 Benzofuranon sentezi TLC sonucu.....	87
Şekil 5.9 Yan kollu balonda Mn(OAc) ₃ reaksiyonu.....	88
Şekil 5.10 Mn(OAc) ₃ reaksiyonu önemli deney takip TLC'leri.....	89
Şekil 5.11 6,7-Dihidro-6-metilbenzofuran-4(5 <i>H</i>)-on bileşiğinden (2) 4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-okso-6-metil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (3) ve 4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-7-il asetat bileşiği (4) sentezi	89
Şekil 5.12 Mn(OAc) ₃ reaksiyonu TLC sonucu	89
Şekil 5.13 4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (3) ve 4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-7-il asetat (4) izomerlerinin esterifikasyonu	91
Şekil 5.14 İndol sentezi reaksiyon şeması.....	93
Şekil 5.15 6,7-Dihidro-6-metilbenzofuran-4(5 <i>H</i>)-on bileşiğinden (2) benzilamin aracılı 1-benzil-6,7-dihidro-6-metil-1 <i>H</i> -indol-4(5 <i>H</i>)-on (7) sentezi.....	94
Şekil 5.16 Sıvı azot yardımı ile basıncı uzaklaştırılan seal tüpün kapatılmak üzere hazırlanması	94
Şekil 5.17 TLC sonucu.....	94

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2.1 Konfigürasyonların karşılaştırılması	25
Çizelge 2.2 1990 yılına ait satış gelirleri	29
Çizelge 2.3 BCC research 2007-2014 kiral teknoloji market raporu	30
Çizelge 2.4 BCC research 2011-2016 kiral teknoloji market raporu	30
Çizelge 4.1 Enzim sınıfları ve reaksiyonları	59
Çizelge 5.1 Kullanılan kimyasalların marka kodları	75
Çizelge 5.2 Kullanılan cihazların marka modelleri	78
Çizelge 5.3 HPLC analiz sonuçları	91
Çizelge 6.1 Asetonitril'in kiral kataliz üzerindeki etkisi	98
Çizelge 6.2 DMSO'nun kiral kataliz üzerindeki etkisi	99
Çizelge 6.3 THF'in kiral kataliz üzerindeki etkisi	100
Çizelge 6.4 Toluen'in kiral kataliz üzerindeki etkisi	101

KEMOENZİMATİK REAKSİYONLARLA DİHİROBENZOFURANON VE DİHİROİNDOLON TÜREVLERİNİN ENANTİOSELEKTİF HİDROLİZİ

Tuğba DAYIOĞLU

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

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

Doğal ürünlerde yaygın olarak bulunan benzofuranon ve indol türevleri, stereomerkez taşımaları nedeniyle asimetric sentezde oldukça önemlidirler.

Benzofuranon ve indol türevleri aynı zamanda antiülser, antioksidant, antidepresant, antibakteriyel, antifungal, antibiyotik, antikanser, anti-HIV-1, antileichmanyal ve anti-anjiyogenez ajan olarak da önemli biyolojik aktiviteler göstermektedirler.

Bu çalışmada zor metodlarla sentezlenen öncü ilaç hammaddelerinin yüksek enantiomerik fazlalıkta, biyoteknolojik ve kimyasal yöntemlerle, yüksek verim ve seçicilikte lipaz enzimleri ile sentezlenmeleri hedeflenmiştir. Bu amaçla öncelikle 6,7-dihidro-6-metilbenzofuran-4(5H)-on bileşiği sentezlendikten sonra, mangan (III) asetat asetoksilasyonu ile 4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-5-il asetat ve 4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-7-il asetat bileşiğine açillendirilmiştir. Daha sonra asetoksi benzofuranon türevlerinin lipaz enzim katalizörlüğünde yüksek verim ve enantiomerik fazlalıkta kinetik rezolüsyonu gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Dihydrobenzofuranon, benzofuranon, indol, regioselectivity, enantiomerik fazlalık, lipaz

**ENANTIOSELECTIVE HYDROLYSIS OF DIHYDROBENZOFURANONE AND
DIHYDROINDOLONE DERIVATIVES WITH CHEMOENZYMATIC REACTIONS**

Tuğba DAYIOĞLU

Department of Molecular Biology and Genetics

MSc. Thesis

Adviser: Asist Prof. Dr. Zerrin Zerenler CALIŞKAN

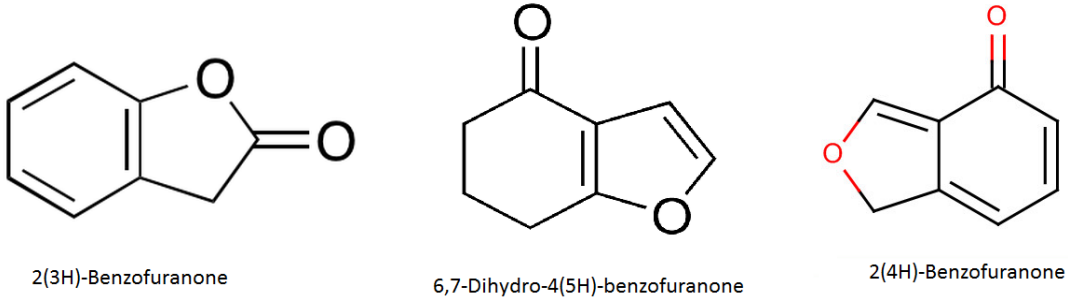
Benzofuranone and indole compounds are presences extensively in natural products which are very important in asymmetric synthesis, since these type of derivatives contain stereocenter in their structures. In addition Benzofuranone and indole derivatives exposes important biological activities such as antiulcer, antioxidant, antidepressant, antibacterial, antifungal, antibiotic, anticancer, anti-HIV-1, antileishmanial and anti-angiogenesis agent.

In this study, robust synthesised drug precursor compounds aimed to obtain in high enantiomeric purity, yield and selectivity with biotechnologic and chemical methods by using lipase enzymes. For this purpose, firstly we synthesised 6,7-dihydro-6-methylbenzofuran-4(5*H*)-one derivate, then acylated into 4,5,6,7-tetrahydro-6-methyl-4-oxobenzofuran-5-yl acetate and 4,5,6,7-tetrahydro-6-methyl-4-oxobenzofuran-7-yl acetate by using manganese (III) acetate-mediated acetoxylation, and followed by the lipase enzyme-mediated kinetic resolution of acetoxy benzofuranone derivatives in good yields and high enantiomeric excesses.

Keywords: Dihydrobenzofuranone, benzofuranone, indole, regioselectivity, enantiomeric excess, lipase

1.1 Literatür Özeti

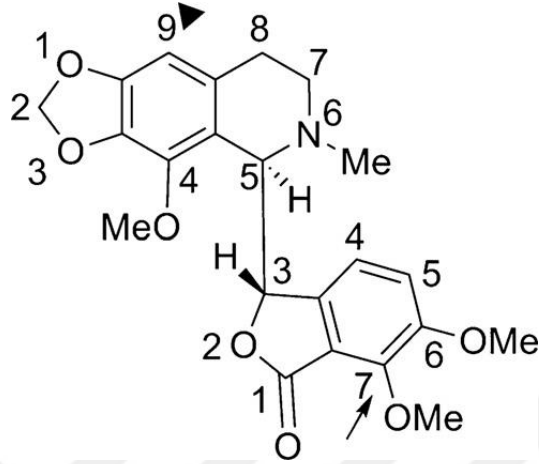
Stereomerkez taşıyan dihidrobenzofuranon ve indol yapısındaki bileşikler asimetric sentezde oldukça önemlidirler ve doğal ürünlerde yaygın olarak bulunmaktadır. Benzofuranonlar (Şekil 1.1) antinosiseptif, anti-inflamatuar, antitümör, antibakteriyal, antifungal ve antileichmanyal gibi biyolojik aktivitelere sahiptir [1].



Şekil 1.1 Çeşitli Benzofuranon Halkaları

Benzofuranonlar üstün özellikleri nedeniyle sıklıkla kullanılan bileşiklerdendir. R.C. Mishra ve ark. mitoz safhasında tübülün bağlanma ajanı olarak çalışan ve apoptoze neden olan ve bu özellikleri nedeniyle kanser tedavisinde tercih edilen kimyasal bileşiklerden olan noscipine analoglarının oluşturduğu yan etkileri gidermek amacıyla benzofuranon halkası içeren noscipin analogları sentezlemişlerdir (Şekil 1.2). Sentezlenen benzofuranon bileşiklerinin hayvanlar üzerindeki deneyleri ile bu bileşiklerin kanser hücrelerindeki tübülün üzerine etki göstererek antikanser özellikte

ilaç öncü maddeleri olarak kullanılabilirliklerini göstermişlerdir [2]. R. Aneja ve ark. sentezledikleri benzofuranon halkası içeren halojenlendirilmiş noscapine analoglarının, basit noscapine bileşiklerine kıyasla tübülüne daha fazla bağlandıklarını ve bunun sonucunda kanser hücrelerinin apoptozisinde daha etkili olduklarını saptamışlardır [3].

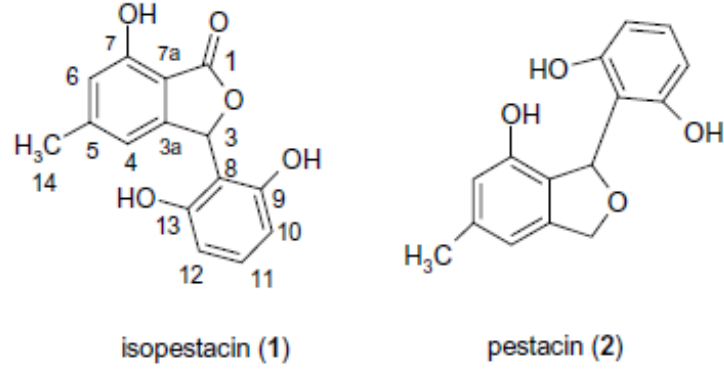


Şekil 1.2 Noscapin ((S)-6,7-dimetoksi-3-((R)-4-metoksi-6-metil-5,6,7,8-tetrahidro-[1,3]diokzolo[4,5-g]izoquinolin-5-il) izobenzofuran-1(3H)-on)'in moleküler yapısı

Stobel tarafından endofit bir fungus olan *Pestalotiopsis microspora*'dan (Şekil 1.3) 2002 yılında izole edilen izobenzofuranon analogu izopestasin (Şekil 1.4); antifungal aktiveye sahip olması yanında serbest hidroksi radikalleri ve süper oksit radikallere karşı antioksidan özellik de göstermektedir [4]. Harper ve ark. tarafından *Pestalotiopsis microspora*'dan izole edilen pestacin'in (Şekil 1.4) antioksidan özellik gösterdiği saptanmıştır [5].

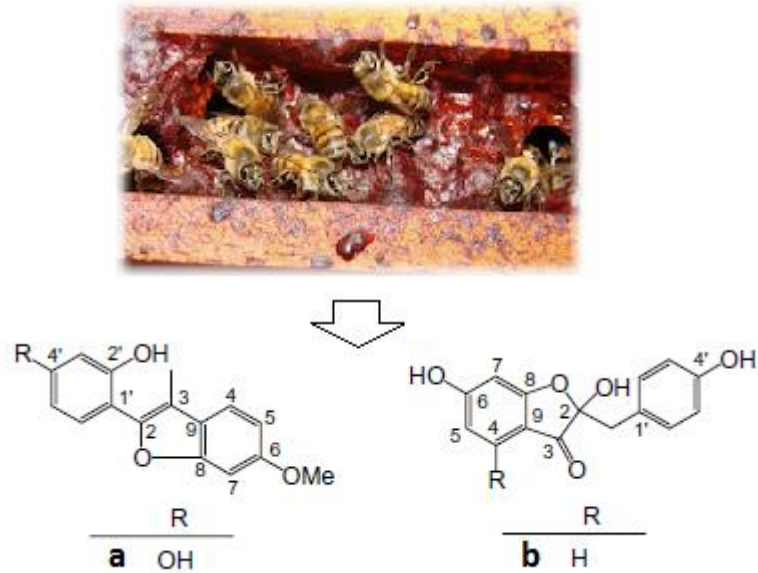


Şekil 1.3 *Pestalotiopsis microspora* ve besiyeri kültürü



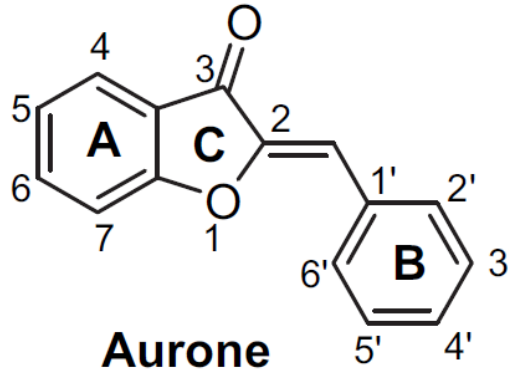
Şekil 1.4 İzobenzofuranon analogu olan izopestasin ve pestacin moleküler yapısı

Ayers ve ark. *in vitro* fare beyin homejenatı inhibisyonunda, E vitaminiyle ilişkili olan benzofuranil türevlerinden piperazin'in etkin sıvı otooksidasyonu gerçekleştirdiğini saptamışlardır [6]. Brezilya'nın Paraíba eyaletinden toplanan, %100 sitotoksik aktivite gösteren kırmızı propolis'in metanol ekstresinden 2-(20,40-dihidroksifenil)-3-methyl-6-metoksibenzofuran ve 2,6-dihidroksi-2-[(4-hidroksi-fenil)metil]-3-benzofuranon (Şekil 1.5) bileşiklerini izole eden Awale ve ark. bu bileşiklerin seçici besiyerindeki insan karaciğer kanser hücreleri PANC-1 üzerinde seçici sitotoksik aktivitesini gözlemlemiş ve olumlu sonuçlar elde etmişlerdir [7].



Şekil 1.5 Kırmızı propolis'in metanol ekstresinden elde edilen 2-(20,40- dihidroksifenil)-3-methyl-6-methoxybenzofuran (a) ve 2,6- dihidroksi-2-[(4-hidroksi-fenil)metil]-3-benzofuranon (b)

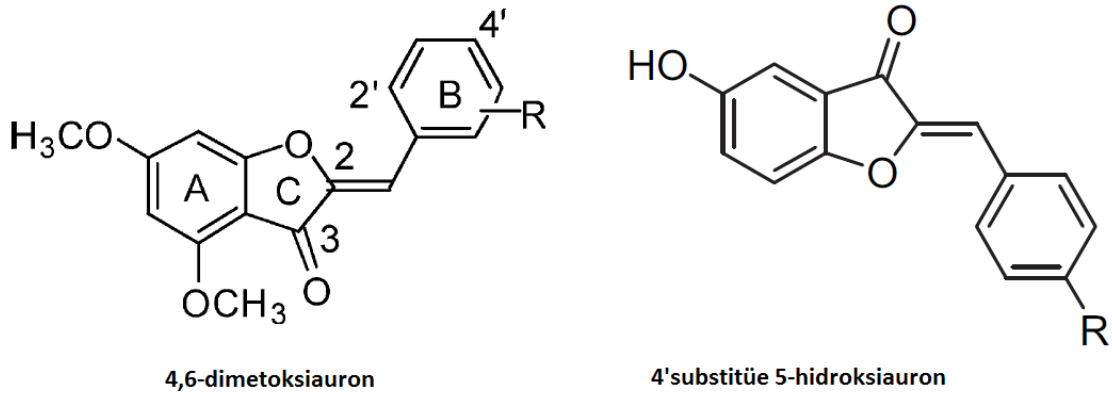
Benzofuranon halka sistemi içeren kalkon analogu olan auronların (Şekil 1.6), anti-malarial (sıtma karşıtı) ve anti-histamin özellik göstermelerinin yanı sıra antihiperpigmentasyona karşı insan melanosit tirozinaz inhibitörü oldukları da deneysel verilerle kanıtlanmıştır [8].



Şekil 1.6 Auron moleküler yapısı

Flavonların yapı izomeri olan flavanoidler grubundan auronlar (2-benziliden benzofuran-3(2H)-on) bitkilerde altın sarısı rengin oluşmasında ve bitkiler tarafından mikrobik, fungal ve fiziksel uyarılara karşı üretilen antimikrobiyal ve antifungal etkili bir bileşik olmalarından dolayı fitoaleksin olarak görev almaktadırlar [9]. Boumendjel 2003 yılında yayınladığı makalesinde auronların tiroid hormon mekanizmasına etki eden enzim inhibitörü olarak görev almalarına ek olarak parazitik ve mikrobiyal enfeksiyonlara karşı savaşan ajanlar olarak üstlendikleri rol ile kanser kemoterapisindeki potansiyel önemini vurgulamıştır [10]. Auronlar ile ilgili çıkan yayınlara göre hücre döngüsünün G2/M fazıyla çakışan antiproliferatif ajanı olarak [11] ve alzheimer hastalığındaki amiloid plakların görüntülenmesinde [12] kullanışlı oldukları belirtilmiştir. Auronların Pgp (P-glikoprotein) içeren multiilaç düzenleyicisi olarak kullanılabilirliği üzerine çeşitli çalışmalar yayınlanmıştır [10], [13], [14], [15]. Auronun benzofuranon halkası ile ATP molekülünün adenini arasındaki yapı ve davranış benzerliği nedeniyle auronların inhibitör aktivitesine sahip olduğu saptanmıştır [10]. Boumendjel ve ark. bu hipotezi desteklemek amacıyla fare P-glycoprotein sitosolik nükleotid bağlanma bölgesine auronların bağlanışını gösteren bir çalışma yapmışlardır [13]. Aynı davranış flavonların kromenon halkası için gösterilmiş olsa da diğer flavanoidlerle kıyaslandığında auronlar Pgp düzenleyici olarak daha iyi

aktivite ve bağlanma eğilimi göstermiştir [10], [14], [15]. Auronların bu üstün özellikleri ATP-bağlanma bölgesi için daha uyumlu taşıyıcılar olarak kullanımlarını sağlamıştır [10]. Sim ve ark. sentezledikleri 4,6-dimetoksi auron türevlerinin (Şekil 1.7), ABCG2 (göğüs kanseri direnç proteini) inhibitörü olarak potansiyellerini araştırmış ve bazı hücre dizilerine karşı düşük antiproliferatif aktivite gösterdiklerini saptamışlardır. Ek olarak auronların, kanser hücrelerinin gelişimini ve yayılmasını engelleyen bir kanser ilacı olan ve aynı zamanda MS tedavisinde de kullanılan MX (mitoksantron)'in düşük mikromolar konsantrasyonlarında ABCG2'yi ifade eden kanser hücrelerini yeniden duyarlı hale getirdiğini göstermişlerdir [16]. Yapılan çalışmalar auronların ABCG2 ve ABCB1 (P-glikoprotein) için iyi inhibitörler olduklarını göstermiştir [16].



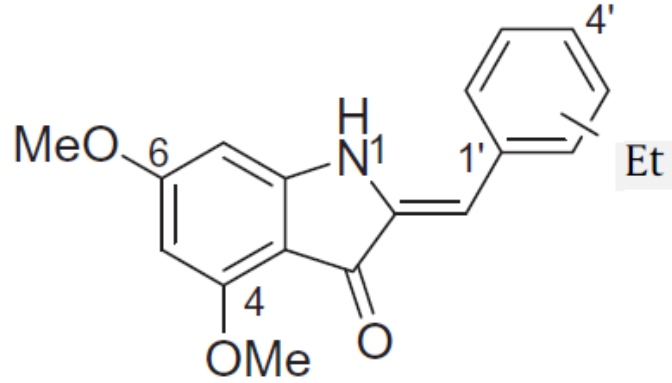
Şekil 1.7 4,6-Dimetoksiauron ve 4'türevlendirilmiş 5-hidroksiauron moleküler yapısı

H. Cheng ve ark. sentezledikleri 5-hidroksiauron türevlerinin (Şekil 1.7), aktifleşen endotel hücrelerinin uyarılmasıyla düzenli olarak çoğalan tümör hücrelerinin uyarı mekanizması üzerine etki ederek kanser hücrelerinin artışında bir gerilemeye sebep olduğunu ve kanser hücrelerinin besin sağlamak amacıyla kan damarı oluşturma durumu olan anjiyogenezi engellediklerini saptamışlardır [17].

C.-Y. Lee ve ark. AhR/XRE ve Nrf2/ARE sinyal yollarını aktifleştirerek kanser oluşumuna neden olan NAD(P)H:quinon oksidoredüktazın indirgenmesini gerçekleştiren auron türevleri sentezlemişlerdir [18].

F. Souard ve ark. her yıl 1,5 milyonun üzerinde insanın ölümüne neden olan sıtma hastalığı etkeni protozoal parazit sınıfından *Plasmodium falciparum*'a karşı, antimalaryal (sıtma karşıtı) özellikte doğal auron içeren otuzbeş bileşik sentezlemiştir.

Sentezledikleri bileşiklerin içinden özellikle bir azaaaron türevi olan 4,6-dimetoksi-4'-etilazaaron'un (Şekil 1.8) dikkate değer herhangi bir toksiditeye yol açmadan üstün antimalaryal özellik gösterdiğini saptamışlardır [19].



Şekil 1.8 4,6-Dimetoksi-4'-etilazaaron moleküler yapısı

Amiolid fibrilasyonunun inhibitörü olarak da özellik gösteren benzofuranonlar, biyolojik aktiviteleri ve bitki savunma mekanizmasında üstlendikleri ilgi çekici rolleri nedeniyle, doğal olarak meydana gelen bileşiklerin ana grubunu oluşturmaktadır [20]. Alzheimer hastalığının erken tanısında yardımcı olabilmesi amacıyla M. Ono ve ark. sentezledikleri auron türevleri ile *in vivo* ve *in vitro* olarak β -amiloid plaklarını görüntülemeyi başarmışlardır [12]. H. Watanabe ve ark. ise radyo-izsürücü olarak tasarlamış oldukları florlanmış ve iyotlanmış auron bileşiklerinin PET ve SPECT taramaları ile hastaların beyin dokusundaki β -amiloid plaklarının görüntülenmesine kolaylık sunmuşlardır [21].

H. Nadri ve ark. Alzheimer hastalarının hipotalamus ve korteks dokusunda biriken asetilkolinesteraz'ın (AChE) inhibitörü olarak yüksek aktivite gösteren benzofuranon içeren bileşikler sentezlemişlerdir [22].

α , β doymamış ketonlar olarak da bilinen ve flavanoid biyosentezinin öncülleri olan benzofuranon yapısındaki kalkonlar; antinosiseptif ve anti-inflamatuar, antitümöral, antibakteriyal, antifungal ve antileishmanyal özellikler sergilemektedir [1]. Hidroksillenmiş benzofuran türevi olan ve antifungal özellik gösteren siserfuran'ın, bitkileri solduran bir çeşit hastalık olan Fusarium solgununa karşı savunma metabolizmasında ana faktör olduğu belirlenmiştir [23]. P. Padaratz ve ark. 3-[2-(2-

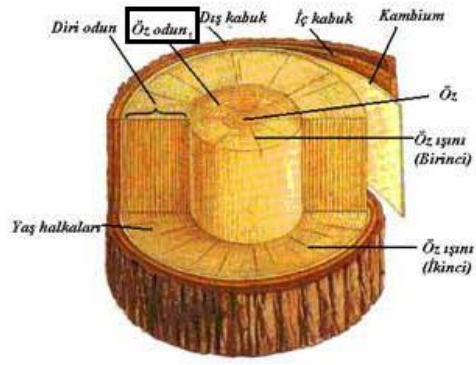
hidroksi-4, 6-dimetoksifenil)-2-oksoetil]-2-benzofuran-1(3H)-on'un orjinal kalkon analoguna ve hatta bazı klinik ilaçlara kıyasla daha üstün antinosiseptif özellikte olduğunu göstermişlerdir [24]. C.J. Gonçalves, P. Padaratz ve ark. sentezledikleri çeşitli benzofuranon türevlerinin antinosiseptif aktivitesini araştırmış, sentezledikleri kalkon türevi benzofuranonlardan 3-[2-(4-klorofenil)-2-oksoetil]-2-benzofuran-1(3H)-on'un aktif özellikte olduğunu, 3-[2-(3-metoksifenil)-2-oksoetil]-2-benzofuran-1(3H)-on etkin farmakokinetik ve antinosiseptif özelliklik gösterdiğini kanıtlamışlardır [25].

Epitel hücrelerini matrikse veya bazal laminaya bağlayan integrin proteinlere karşı antagonist özellik [26] gösteren benzofuranon türevleri; oksijen ve karbon merkezli radikallere karşı antioksidan [27], [28], Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı antibiyotik [1] ve polipropilen [28] özellikler de sergilemektedir.

S.H. Mehdi ve ark. hastalık yapıcı mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal ve bütül kolinesteraz enzimine karşı seçici inhibitör etki gösteren 4b,9b-dihidroksi-7,8-dihidro-4bH-indeno[1,2-b]benzofuran-9,10(6H,9bH)-dion bileşiğini sentezlemişlerdir [29].

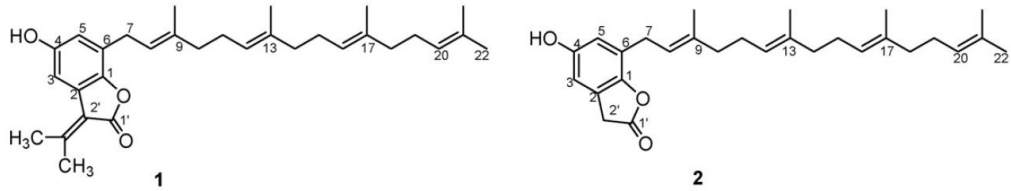
Büyüme proteini, onkoprotein ve hücre düzenleyici proteinlerin sentezlenmesinde etkili olan m(TOR)'un (mammalian target of rapamycin) tümör hücrelerinde fazla üretimi ise kanser teşvik edici özellik göstermesine neden olmaktadır. H.-R. Tsou ve ark. sentezledikleri 2-(4-substitute-pirrolo[2,3-b]piridin-3-il)metilen-4-hidroksbenzofuran-3(2H)-on bileşiğinin, m(TOR)'un ATP yarışmalı inhibitörü olarak üstün özellikler sergilediğini saptamışlardır [30].

Hindistan'da özellikle kandaki şeker seviyesini kontrol etmek için kullanılan Hint kino ya da Bijay olarak da bilinen *Pterocarpus marsupium*'un öz odunundan elde edilen odun bardak (Şekil 1.9); diyare, ateş, diş ağrısı, üriner sistem rahatsızlıkları ve cilt enfeksiyonları gibi rahatsızlıklara karşı da geneksil ilaç olarak halen kullanılmaktadır [31]. Birçok tıbbi özelliğinden dolayı Hindistan'da içinden su içilmesi yoluyla geleneksel ilaç olarak kullanılan Hint kino'nun içeriği araştırılmıştır. *Pterocarpus marsupium*'un bitki ekstresinin araştırılması sonucu polifenolik bileşiklerce zengin olduğu [32], özellikle yüksek oranda benzofuranon bileşiği içerdiği bildirilmiştir [33], [34].



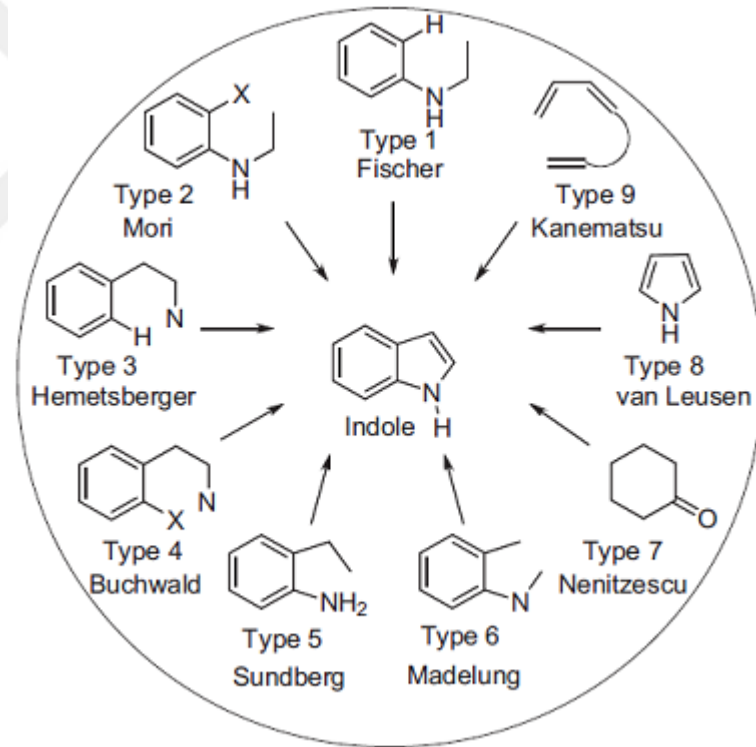
Şekil 1.9 *Pterocarpus marsupium* ve öz odunundan elde edilen odun bardak

Gu ve ark. *Rhus chinensis* bitkisinden izole ettikleri benzofuranon türevlerinin (Şekil 1.10) HIV-1 replikasyonunu baskıladığını saptamışlardır [35].



Şekil 1.10 *Rhus chinensis* bitkisi ve bu bitkiden izole edilen benzofuranon türevleri

Doğal ürünlerde ve terapötik ajanlarda yaygın olarak bulunan benzofuranon bileşikleri yanında indol halkaları da tıbbi kimyada önemli bir yere sahiptir [36]. *Brassicaceae* familyasında (turpgiller) yüksek miktarda glukobrassikin türevi olan indol-3-ilmetilglukosinolat bulunmaktadır [37]. Biyolojik aktivitesi yüksek olan ve heterosiklik bileşiklerin önemli bir sınıfını oluşturan indol halkası (Şekil 1.11); floresan boyanması, ilaçların sentetik analogu olması, antiinflamatori ve leukotin gibi biyolojik aktivite göstermesi nedeniyle organik kimyada sıklıkla kullanılmaktadır [38]. Koroner dilator (kan damarı genişletici) özellik gösteren ve antibakteriyal aktiviteye sahip olan indol halkası içeren bileşikler; bazı substitüye bis(indolil) türevlerinin, dokuların, organların, özellikle nekroz hastalıkları ile miyokardiyal-serebral enfarktüsün teşhisi ve görüntülenmesi için kontrast ajanı olarak medikal, biyokimya ve biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır [38].



Şekil 1.11 İndol halkası genel sentez rotası [39]

E.S.H. El Ashry ve ark. 1,2-Dihidro-5-(1H-indol-2-il)-1,2,4-triazole-3-thion'dan sentezledikleri *S*-glikozid ve *S,N*-diglikozid'in, referans aldıkları kloramfenikol ve baneosin'e kıyasla daha güçlü inhibisyonla antibakteriyal ve antifungal aktivite sergilediğini belirtmişlerdir [40].

N-(1-metil-1*H*-indol-3-il)metilenamin türevleri ve 3,3-diaril-4-(1-metil-1*H*-indol-3-il)azetid-2-on bileşiğinin 8 farklı türevi üzerinde yapılan çalışmalar sonucu G. S. Singh ve ark. sentezledikleri indol türevlerinin, *Leishmania major*'a karşı tıbbi ilaç olarak kullanılan amfoterisin B'ye kıyasla üstün antileishmanyal aktivite gösterdiklerini saptamışlardır [41].

Bir indol türevi olan 1,3-dihidro-2*H*-indol-2-on'ların potansiyel antitüberküloz [42], [43]; antiviral [44]; antikonvülsant [45], [46]; anti-tümör terapötik [47]; antibakteriyal [42], [48]; antifungal [42], [48]; anti-HIV [49] ve GAL3 reseptör antagonist [50] aktivite gösterdikleri bilinmektedir.

M. Kumar ve ark. sentezledikleri 4-(1-aril-5-kloro-2-okso-1,2-dihidro-indol-3-ilidenamino)-*N*-substitute benzensülfonamid serilerinin Gram pozitif, Gram negatif bakterilere ve fungal suşlara karşı *in vitro* antimikrobiyal aktivitesini araştırmış; *N*-(4-(5-bromo-1-(4-klorobenzoil)-2-oksoindolin-3-ilidenamino)fenilsülfonil)-4-izopropoksbenzamid bileşiğinin en aktif antimikrobiyal ajan olduğunu saptamışlardır [51]. Sentezledikleri bileşiklerin fare lösemi monosit makrofaj (RAW 264.7) ve kolon kanseri (HCT116) hücre dizilerine karşı antikanser aktivitesini inceleyen M. Kumar ve grubu kolon kanseri (HCT116) hücrelerine karşı 4-(5-bromo-1-(4-klorobenzoil)-2-oksoindolin-3-ilidenamino)-*N*-(4,6-dimetilpirimidin-2-il)benzen sülfonamid'in, fare lösemi monosit makrofaj (RAW 264.7) hücrelerine karşı 4-(5-bromo-1-(4-klorobenzoil)-2-oksoindolin-3-ilidenamino)-*N*-(6-metoksipiridazin-3-il)benzene sülfonamid ve *N*-(4-(5-bromo-1-(4-klorobenzoil)-2-oksoindolin-3-ilidenamino)fenilsülfonil)-4-izopropoksbenzamid'in en iyi potansiyel sitotoksik ajan olduğunu saptamışlardır [51]. 2-amino-4-(50-substitute 20-fenil-1*H*-indol-30-il)-6-aril-4*H*-piran-3-karbonitril bileşiği üzerinden sentezlenen türevlerden 4-(50-substitüye 20-fenil-1*H*-indol-30-il)-6-aril-1,4-dihidropirano[2,3-*c*]pirazol-3-amin analogları *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *S. aureus*, *K.pneumoniae* ve *P. aeruginosa*'ya karşı antibakteriyal aktivite; 4-amino-5-(50-substitüye 20-fenil-1*H*-indol-3-il)-7-aril-1*H*-pirano[2,3-*d*]pirimidin-2(5*H*)-on analogları *Aspergillus oryzae* ve *Aspergillus flavus*'a karşı antifungal aktivitenin yanı sıra antioksidant aktivite [52]; 6-metil-4-[1-(2-substitüye-fenilamino-asetil)-1*H*-indol-3-il]-2-okso/thiokso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-

5-karboksilik asit etil esterlerinin antimikrobiyal ve antikanser özellik gösterdiği saptanmıştır [53].

İndol halkasının sahip olduğu antimikrobiyal özellikten faydalanılarak mikroorganizmaların neden olduğu hastalıkların üstesinden gelmek amacıyla birçok çalışma yapılmıştır. Mide ülseri ve mide kanserine neden olan *Helicobacter pylori*'ye karşı anti bakteriyel özellik gösteren CJ-13,015, CJ-13,102, CJ-13,104 ve CJ-13,108 indol analogları tanımlanmıştır [54].

R. Balasubramanya ve ark. *Daboia russelli pulchella* yılanının (Şekil 1.12) zehirinden izole edilen PLA2 enzimlerini indol türevlerinin inaktive ettiğini saptamışlardır [55].



Şekil 1.12 *Daboia russelli* yılanının morfolojik görüntüsü [56]

Antikanser/antitümör özellikleri nedeniyle indol türevleri birçok çalışmaya konu olmuştur. 3-(Benzilthio)-5-(1H-indol-3-il)-1,2,4-triazol-4-aminlerin Bcl-2 inhibitörü olarak antikanser özellik gösterdiği saptanmıştır [57]. (αE)- α -(1H-indol-3-iletillen)benzenacetik asit ve amid türevleri DU145 hücre dizisi üzerinde (androjenden etkilenmeyen insan prostat kanser hücreleri) seçici antitümör özellik yanı sıra antiproliferatif aktivite göstermiştir [58]. Di-5-floroindol-3-il disülfid ve di-5-iyodoindol-3-il disülfid bileşiğinin prostat kanser hücresi PC-3'ün büyümesini azalttığı saptanmıştır [59]. Pirano[3,4-b]indol-1(9H)-on türevlerinin HeLa (human cervix adenocarcinoma - insan servikal adenokarsinoması) hücrelerine karşı antikanser potansiyel taşıdığı belirtilmiştir [60]. 2-[1-(4-Kloro-3-nitrobenzil)-1H-indol-3-il]-2-okso-N-(piridin-4-

il)asetamid bileşiği, HeLa/KB (human cervix carcinoma), L1210 (murine leukemia) ve SKOV3 (human ovarian carcinoma) hücre dizilerine karşı yüksek antitümör özellik göstermiştir [61]. 2-(Substitüye benzo[c,d]indol-2(1H)-iliden)malononitril türevlerinin MCF-7 (insan meme kanseri hücresi) ve 7721 (insan karaciğer kanseri hücresi) hücre dizilerine karşı antikanser özellikte olduğu belirtilmiştir [62]. P. Diana ve ark. unsubstitüye ve dimethoxy-pyrrolizinoindolone'un HL-60(TB) insan lösemi hücre dizine karşı, N-methy dimethoxy-pyrrolizinoindolone'un MOLT-4 lösemi, A549/ATCC, HOP-92 ve NCI-H460 küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre dizisi ile CAKI-1 renal kanser hücre dizisine karşı aktivite gösterdiğini kanıtlamıştır [63].

N. R. Penthala ve ark. tarafından sentezlenen 5-((1-aroil-1H-indol-3-il)metilen)-2-thioksodihidropirimidin-4,6(1H,5H)-dion'lar (3a-z), SR (lösemi kanser hücre dizisi), OVCAR-3 (yumurtalık kanser hücre dizisi), HOP-92 (küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre dizisi) ve MDA-MB-435 (melanoma hücre dizisi) insan tümör hücre dizilerine karşı göstermiş olduğu sitotoksik aktivite ile kanser terapisi için potansiyel olarak görölmektedir [64].

Aromatik doymuş 5-((1-benzil-1H-indol-3-il)metilen)-1,3-dimetilpirimidin-2,4,6(1H,3H,5H)-trion analoglarının 60 tür insan tümör hücre dizisine karşı *in vitro* büyüme inhibisyonu ve sitotoksik aktivitesi araştırılmış; yumurtalık, renal ve göğüs kanseri hücre dizilerine karşı etkin olduğu kanıtlanmıştır [65].

DNA minor büyüme alkilasyon ajanını değiştiren seçici hipoksi metabolizmasına etkiyen nitro seco-1,2,9,9a-tetrahidrosiklopropa[c]benz[e]indol-4-on (nitroCBIs) türevlerinin antitümör terapi için öncül ilaç olarak kullanılabilir olduğu saptanmıştır [66].

Antimikrobiyal, antitümör özelliklerine ek olarak indollerin inhibitör özellikleri de bildirilmiştir. 3-[2-İndol-1-il-etil]-1H-indol analogları, hücre bölünme döngüsünün farklı kontrol noktalarında görev alan siklin bağımlı kinazlardan (CDKs) CDK4'ün seçici inhibitörü olarak [67]; 2-fenilindol analogları, HCV (Kronik Hepatit C virüsü) replikasyon inhibitörü olarak görev almaktadır [68].

G. Groszek ve ark. sentezledikleri indol türevi enantiomerleri elektrografik, antiaritmik, hipotansiyon ve spazm giderici özelliğinden ötürü α 1-, α 2- ve β 1-adrenoseptör

10H-Benzo[4,5]furo[3,2-b]indol-1-karboksilik acit ve 5,10-dihidro-indeno[1,2-b]indol-1-karboksilik acit bileşikleri potasyum kanal açıcı [73], 2-(5H-[1,2,4]triazino[5,6-b]indol-3-iltio)-N-(substitüye fenil)asetamid bileşiği ise antidepresan [74] özellik göstermektedir.

N-piridinil(metil)-indol-3-ilpropanamid bileşiklerinin doku nakillerinde uygulama alanı olan immünosupressif etkenlere daha az toksik bir alternatif olduğu saptanmıştır [75].

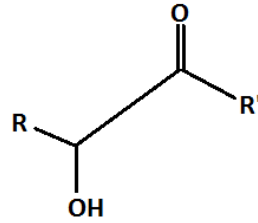
Şizofreni tedavisinde kullanılan atipikal antipsikotik ilaçlar temel alınak sentezlenen indol türevi ilaç öncü maddelerin istenen biyolojik aktiviteleri sergiledikleri belirtilmiştir [76].

Biyolojik aktivitelerinin dışında indoller teknolojik cihazların üretiminde, gelişen OLED (Şekil 1.14) teknolojisinin altyapısında kullanım alanı bulmaktadır. Elastik veya kıvrık ekranlı televizyon, bilgisayar ve ışıklı panolarda kullanılan electrofosforescent diod'lar için 3,6-bis(indol-1-il)-9-fenilkarbazol türevleri elektroaktif materyal olarak J. Keruckas ve ark. tarafından sentezlenmiştir [77].



Şekil 1.14 OLED ekran teknolojisine sahip teknolojik ürünler

Benzofuranon ve indol halka yapısında da bulunabilen kiral α -hidroksi ketonlar (Şekil 1.15), çoğu biyolojik aktivite gösteren doğal ürün için önemli yapı birimleridir [78]. Rasemik alkollerin kinetik rezolüsyonu için etkin prokiral substratlardır [79]. Kiral α -hidroksi ketonlar, antibiyotiklerin, antibakteriyellerin, antidepresyon ve anti-virütik ilaçların sentezlenmesinde önemli yapı taşlarıdır [80].



Şekil 1.15 α -Hidroksi keton molekül formülü

Travmatik yaralanmalar, boğaz ağrısı ve yılan ısırmasına karşı tedavi edici özelliği olan [81] *Zanthoxylum podocarpum*'dan (Şekil 1.16) elde edilen α , β -doymamış ketonların, enfeksiyon, alerji, tümeftaksiyon (kabartı), rheumatoid arthritıs ve kanser gibi rahatsızlıklara neden olabilen nitrik oksit üretimini inhibe edici özellik gösterdiği kanıtlanmıştır [82].



Şekil 1.16 *Zanthoxylum simulans* var. *podocarpum* bitkisi yaprak ve meyvesi [81]

Enantiosaf alkoller; geniş çapta doğal ürünün, kiral ligandların ve biyolojik olarak aktif bileşiklerin sentezi için çok önemli yapı birimleridir [79]. Kiral bileşikler; kimyasal katalizörler, sıvı kristaller, aromalar, zirai ilaçlar ve tıbbi ilaçlar olarak kimya ile ilaç endüstrisinde büyük bir öneme sahiptirler [83]. Ayrıca 2-hidroksi propiyofenon türevlerinin sentezinde anahtar ara ürünlüdürler. Aerolik asit antibiyotiklerin, anti-

bakteriyel, antidepresyon, anti-virütik, potasyum kanal açıcıları ve çeşitli kalp ilaçlarının sentezlenmesi için önemli yapı taşlarıdır [84].

Optikçe saf α -hidroksi ketonlar çeşitli kimyasal ve enzimatik yöntemlerle üretilebilirler. Biyokatalitik olarak enantiyoseçimli α -hidroksi ketonların eldesi aromatik aldehitlerden C-C bağı oluşumuyla, α -diketonların indirgenmesi, rasemik α -hidroksi, perokso ve asetoksi ketonların kinetik rezolüsyonu ve derasemizasyonu yöntemleri ile gerçekleştirilmektedir [84]. Tüm hücre ya da izole enzimler olarak kullanılan biyokatalizörler etkin kemo-, regio- (bölge-) ve stero-selektivite ile prokiral ketonların stero-selektif üretimini katalizlemektedirler [83]. Y.K. Kösalı α -hidroksi ketonların enantiyoseçimli olarak üretimini biyotransformasyonla gerçekleştirmiştir [80].

Biyotransformasyon çalışmaları ile yeni kimyasal bileşiklerin eldesi, HeLa kanser hücre dizilerine karşı sitotoksik aktivite [85], antioksidan aktivite [86], geliştirilmiş antimalaryal (sıtma karşıtı) aktivite [87], yüksek antikanser özellik gösteren ilaçların toksiditesini gidererek kullanıma uygun hale getirme [88], zenginleştirilmiş katalitik aktivite [89] ve kiral bileşiklerin enantiomerik olarak saf eldesi [90] gibi kimyasal yöntemlerle elde edilemesi zor olan birçok sentez, çevreci bir yaklaşımla elde edilmektedir.

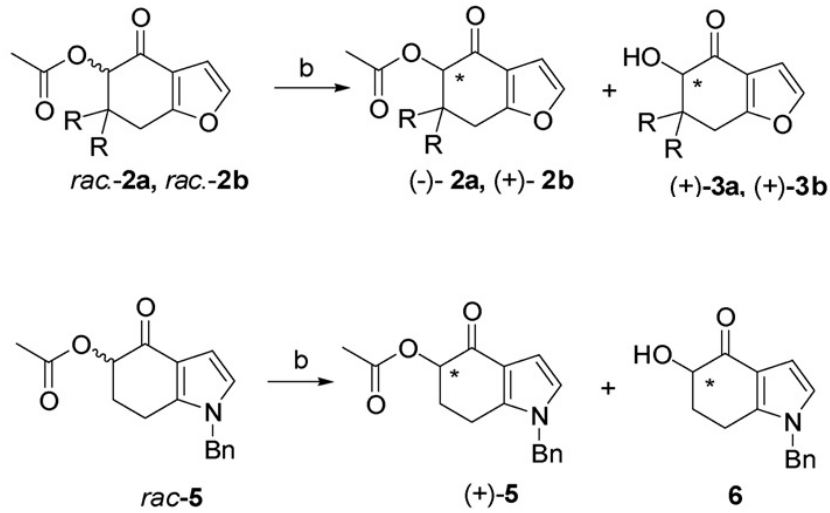
Biyotransformasyon çalışmalarında izole enzimler veya bu enzimlerin elde edildiği mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Tüm hücre sistemi olarak genellikle fungus ve bakterilerden faydalanılmaktadır, ancak bazı çalışmalarda doku kültürlerinden de yararlanılmıştır. C. Magallanes-Noguera ve ark. *Gardenia jasminoides* (Şekil 1.17) bitki doku kültüründe sekonder alkollerin derasemizasyonunu gerçekleştirmişlerdir [91].

Biyotransformasyon çalışmalarının her aşamasında sıklıkla kullanılan enzimler, katalizör olarak sentetik organik kimyada büyük bir potansiyele sahiptir. Kinetik rezolüsyonla kiral synthonların hazırlanmasında kullanılan enzimler; enantiyoseçicilik, regio-seçicilik ve kimyasal seçicilik özelliklerinden dolayı enantiosaf ürün eldesinde sıklıkla kullanılmaktadır. T. A. Ayers ve ark. antioksidan özellikteki E vitamini öncül birimi olan benzofuranil grubunun enantiomerik sentezini *Candida rugosa* lipaz aracılığıyla gerçekleştirdikleri enzimatik biyokatalizle sağlamışlardır [6].



Şekil 1.17 *Gardenia jasminoides* bitkisi

A. S. Demir ve ark. α -asetoksi aril ketonların enantiomerik hidrolizini *Rhizopus oryzae* hücre kültüründe yüksek enantiomerik fazlalık (e.e.) ile sağlamışlardır [92]. A. S. Demir, Z. Çalışkan ve ark. 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-benzofuran-5-il asetat ile 1-benzil-4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1(*H*)-indol-5-il asetat bileşiklerinin (Şekil 1.18) enzimatik rezolüsyonla enantiomerik sentezini yüksek enantiomerik fazlalık (e.e.) ile gerçekleştirmişlerdir [93].



Şekil 1.18 4,5,6,7-Tetrahidro-4-okso-benzofuran-5-il asetat (2a,2b) ve 1-benzil-4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1(*H*)-indol-5-il asetat (5) bileşikleri enzimatik rezolüsyonu (b)

Rasemik hidroksilli bileşiklerin biyotransformasyonu için bu çalışmada hidrolitik enzimler kullanılmıştır. Lipazlar ucuz ve kolay bulunabilmelerinin yanı sıra organik çözücülere karşı yüksek dayanıklılığa ve yüksek enantiyoseçicilik için gerekli geniş

substrat aralığına sahip olmalarından dolayı kiral bileşiklerin enantiosaf olarak elde edilmelerinde diğer enzimlere ve metodlara karşı uygulama üstünlüğü sağlamaktadır.

Enantiomerlerin saf olarak elde edilmesi ilaç sanayiinde önemli bir konudur. Bir enantiyomer ilgili aktiviteden sorumlu iken diğeri inaktif olabilir, aktif enantiyomere zıt özellik gösterebilir ya da istenilen veya istenilmeyen ayrı bir aktiviteye sahip olabilir. FDA'nın verilerine göre tek-enantiyomer formundaki kiral ilaçların dünya piyasasındaki değeri gittikçe artan bir ivme göstermektedir. Rasemik haldeki kiral ilaçların kullanılmasının istenmeyen yan etkilere sebep olması nedeniyle hedef bileşiklerin enantiyomerikçe saf olarak elde edilmesi amaçlanmıştır.

1.2 Tezin Amacı

İnsan sağlığı üzerinde olumlu etkileri saptanan ilaç öncü ve ara maddeleri olan α -hidroksi keton, indol ve benzofuranon türevlerinden elde edilen kiral ürünlerinin enantiomerik olarak saf eldesi, ilaç sanayiinde artan bir öneme sahiptir.

Amacımız ilaç öncü hammaddeleri sentezlemek ve setezlenen bileşiklerin yüksek enantiomerik fazlalıkta, yüksek verim ve seçicilikte hidrolitik enzimler ile saflaştırılmasıdır. Bu hedefle gerçekleştirilen ilk sentezde öncelikle 6,7-dihidro-6-metilbenzofuran-4(5H)-on bileşiği **(2)** sentezlenerek, mangan (III) asetat asetoksilasyonu ile 4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-okso-oksobenzofuran-5-il asetat bileşiğine **(3)** açillendirilmiştir. Çeşitli lipaz enzimleri ve çeşitli çözücü sistemleri kullanılarak seçici hidrolizi gerçekleştirilen asetoksi benzofuranon bileşiği kiral hidroksi türevlerine dönüştürülmüştür. Reaksiyon koşulları optimize edilmiş ve kiral hidroksi türevlerinin HPLC analizleri yapılarak e.e. (enantiomerik fazlalık) değerleri saptanmıştır.

Diğer bir sentez 6,7-dihidro-6-methylbenzofuran-4(5H)-on bileşiği **(2)** ile bir alkilaminin yüksek sıcaklık ve düşük basınçta reaksiyona sokulması ile elde edilen 1-benzil-6,7-dihidro-6-metil-1H-indol-4(5H)-on bileşiği **(7)** ile gerçekleştirilmiştir. 1-Benzil-6,7-dihidro-6-metil-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin **(7)** potasyum permanganat ile açılması sonucu 1-benzil-4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-okso-1H-indol-5-il asetat bileşiği **(8)** sentezlenmiştir. Asetoksillenen indol türevinin saflaştırma çalışmalarına devam edilmektedir.

1.3 Hipotez

Doğal ürünlerde yaygın olarak bulunan benzofuranon ve indol türevleri; antiülser, antidepresant, antibakteriyel, antifungal, antienflamatori, antibiotik ve antikanser gibi önemli biyolojik aktiviteleri ve bitki savunma mekanizmasında üstlendikleri rolleri nedeniyle bilimsel çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. İndol ve benzofuranonlara ek olarak α -hidroksi ketonlar; biyolojik olarak aktif doğal ürünlerin asimetrik sentezlerinde yapı birimleri olmaları sebebiyle, endüstri ve akademik çalışmalar açısından büyük bir önem taşımaktadırlar.

Çalışma kapsamında doğal ürünlerde ve terapötik ajanlarda yaygın olarak bulunduğu bilinen ve yüksek biyolojik aktiviteye sahip ilaç öncü hammaddeleri olan dihidrobenzofuranon ve dihidroindolon türevlerinin kemoenzimatik metodlarla sentezi gerçekleştirilmiştir.

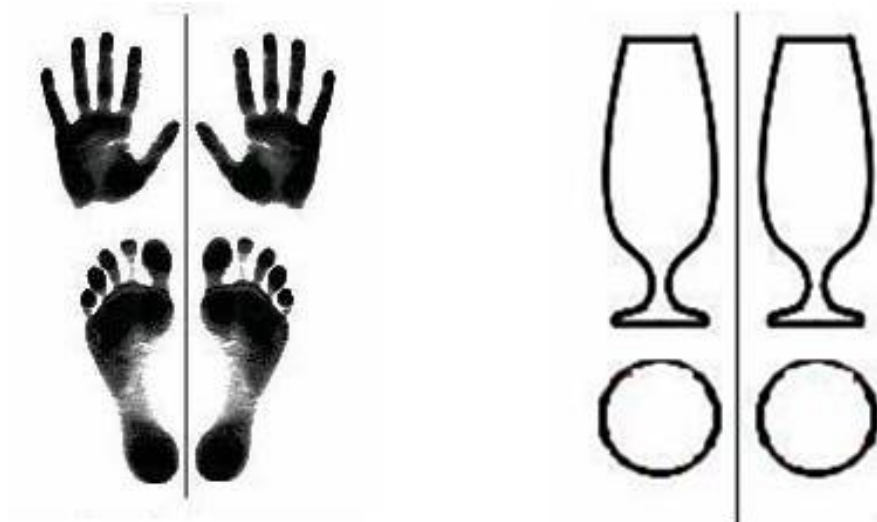
Reaksiyon koşulları optimize edilerek, bileşiklerin yüksek saflıkta eldesi üzerinde çalışılmış ve NMR, IR gibi yöntemlerle moleküler yapıları teyit edilmiştir.

STEROKİMYASAL KAVRAMLAR

Atomların ve moleküllerin uzaysal düzenlenmeleri ve üç boyutlu yapısı ile ilgilenen bölümü stereokimyaı oluşturur [94].

2.1 Kirallik

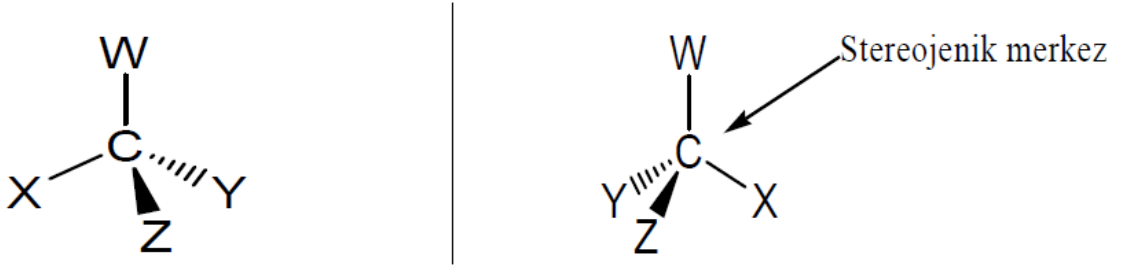
Kiral sözcüğü Yunanca'da el anlamına gelen *chiros* kelimesinden gelmektedir. Ayna görüntüsü ile üst üste çakışmayan nesne ya da moleküller kiral olarak tanımlanır (Şekil 2.1). Ayna görüntüsü ile üst üste çakışan nesne kiral olmayıp akiraldir. Bir akiral nesne ya da molekül kendi ayna görüntüsü ile aynıdır (Şekil 2.1) [95]. Kiralite olgusu canlı sistemlerde yaygındır. Aminoasitler, nükleik asitler, lipitler, karbonhidratlar, metabolik ara bileşikler ve diğer birçok biyomolekül kiraldir [96].



Şekil 2.1 Kiral (solda) ve akiral (sağda) nesnelerin ayna görüntüleri

2.2 Stereojenik Merkez

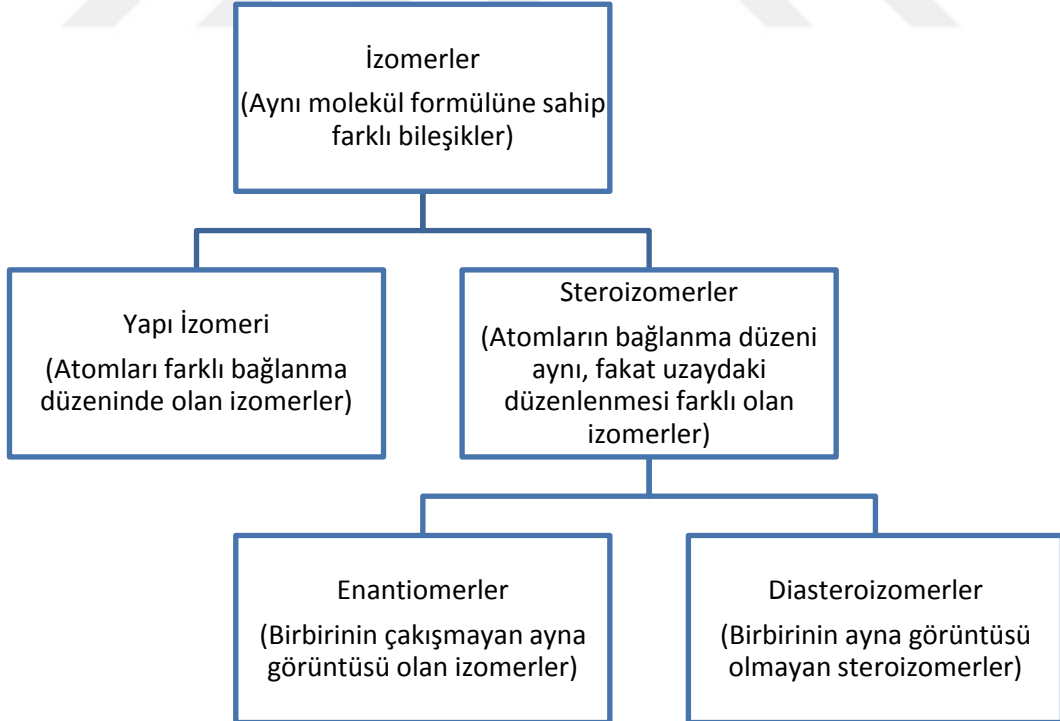
Genel olarak w, x, y ve z gibi dört farklı atom ya da grubunun bağlı olduğu karbon içeren moleküller kiral moleküller olarak adlandırılır; karbon merkezi stereojenik merkez olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2.2). Stereojenik merkez ayrıca kiral merkez, asimetric merkez ve stereomerkez olarak da adlandırılmaktadır [80].



Şekil 2.2 Kiral molekülde stereojenik merkez

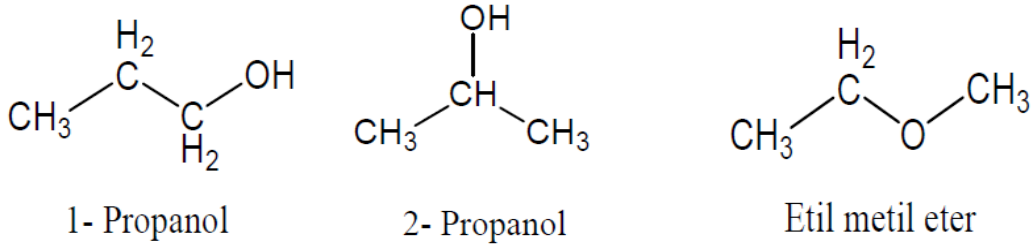
2.3 Moleküler Yapı İle İlgili Temel Tanımlar

İzomerler, aynı molekül formülüne sahip ancak farklı olan bileşiklerdir (Şekil 2.3). Yapısal ve stereoizomerler olarak iki grupta incelenebilirler:



Şekil 2.3 İzomerlerin alt sınıfları

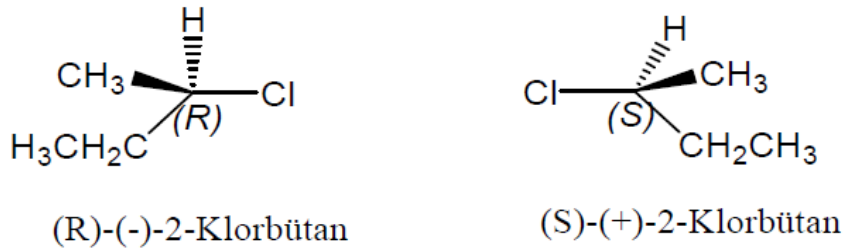
- *Yapısal izomerler* aynı molekül formülüne sahip ancak atom ya da atom gruplarının bağlantıları farklı olan bileşiklerdir (Şekil 2.4). Bu tür izomerlik gösteren bileşiklerin yapıları ve fiziksel özellikleri birbirinden tamamen farklıdır [80].



Şekil 2.4 $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ 'nun yapı izomerleri

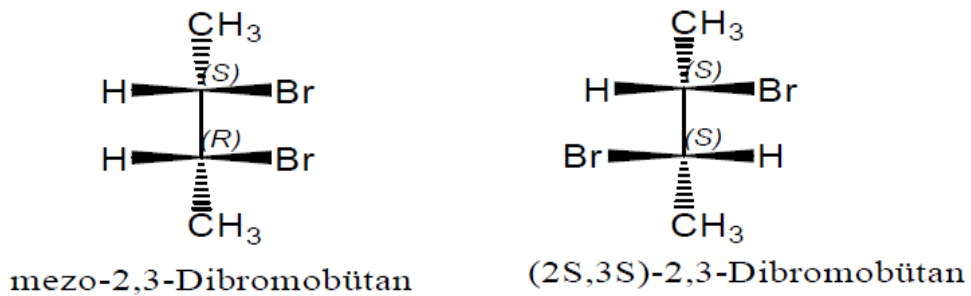
- *Stereoizomerler* ise aynı molekül formülüne sahip atom ya da atom gruplarının bağlantıları aynı ancak uzaydaki dizilişlerinin farklı olduğu bileşiklerdir [80]. Stereoizomerler de enantiyomerler ve diastereomerler olarak iki sınıfa ayrılırlar:

- ✓ *Enantiyomerler*, birbirinin ayna görüntüsü olan stereoizomerlerdir (Şekil 2.5) [80].



Şekil 2.5 2-Klorbütanın enantiyomerleri

- ✓ *Diastereomerler*, birbirinin ayna görüntüsü olmayan stereoizomerlerdir (Şekil 2.6) [80].

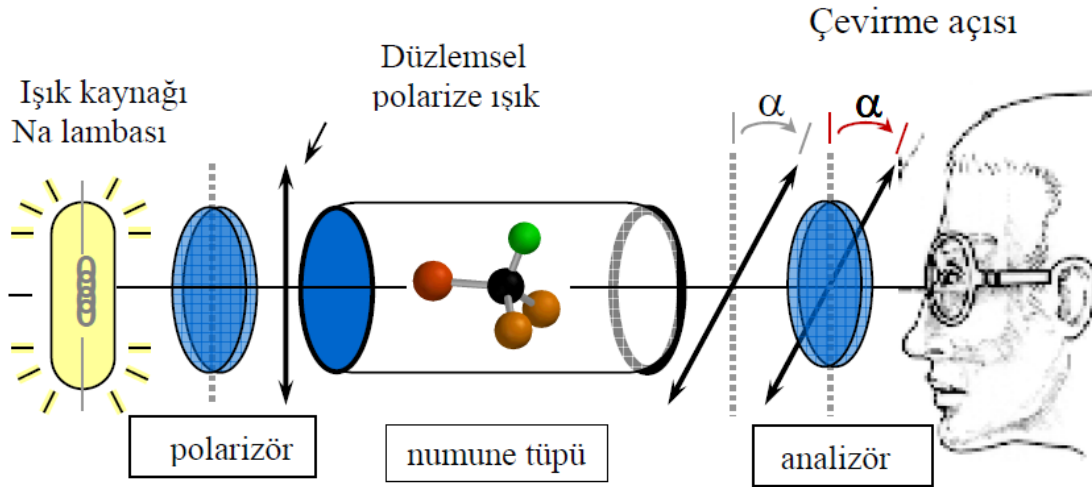


Şekil 2.6 2,3-Dibromobütanın diastereomerleri

2.4 Polarize Işık, Optikçe Aktiflik ve Asimetrik Karbon

Kendisinden veya çözeltisinden geçirilen polarize ışığın düzlemini çevirebilen bileşiklere optikçe aktif bileşikler denilmektedir [80]. Stereoizomerlerin saf çözeltileri düzlem polarize ışığı aynı derecede ve farklı yönlerde çevirirler. Bu nedenle stereoizomerler, optik izomerler olarak da adlandırılmaktadır [80]. Kiral bir molekülün her bir enantiyomeri optikçe aktiflik gösterirken [95] her iki optik izomerin eşit miktardaki karışımını içeren bir çözelti, iki izomerin zıt etkileri birbirini yok edeceği için, düzlem polarize ışığı çevirmez [80]. Bir kiral bileşiğin enantiyomerlerinden eşit miktarda içeren karışım *rasemik karışım* olarak adlandırılır ve herhangi bir optikçe aktiflik göstermez. Akiral moleküllerde optikçe aktiflik göstermez. Bir maddenin optikçe aktiflik gösterebilmesi için madde kiral olmalı ve enantiyomerlerden birinin miktarı diğerinden fazla olmalıdır [98].

Optikçe aktif bileşenlerin polarize ışık düzlemini sağa veya sola ne kadar çevirdiğini ölçmek için polimetre denilen aygıttan yararlanılır (Şekil 2.7) [80].



Şekil 2.7 Polarimetre öğelerinin şematik gösterilişi

Kiral bir maddenin tek bir enantiyomerini içeren bir çözelti içerisinde düzlem polarize olmuş ışık demeti geçirildiğinde bu ışığın, polarizasyon düzlemini α açısı kadar sağa ya da sola çevirdiği gözlenir (Şekil 2.7) [95]. Optikçe aktifliğin ölçüsü çevirme açısı ile bağlantılıdır. Bir maddenin optikçe aktifliği özgül çevirme olarak ifade edilir ve $[\alpha]$ sembolü ile gösterilir [99].

İzomer polarize ışığı saat yönünde çevirirse, D veya + (dexter = sağ), saat yönünün tersine çevirirse L veya - (laevus = sol) olarak ifade edilir [80].

2.4.1 Özgül Çevirme Açısı

$$\text{Özgül çevirme açısı: } [\alpha]_D^t \quad [a]_{Dt} = \frac{a}{cl} \quad [80] \quad (2.1)$$

2.4.2 Optikçe Aktiflik

Optikçe aktiflik, bir bileşiğin polarize ışık düzleminin yönünü çevirmesidir [80].

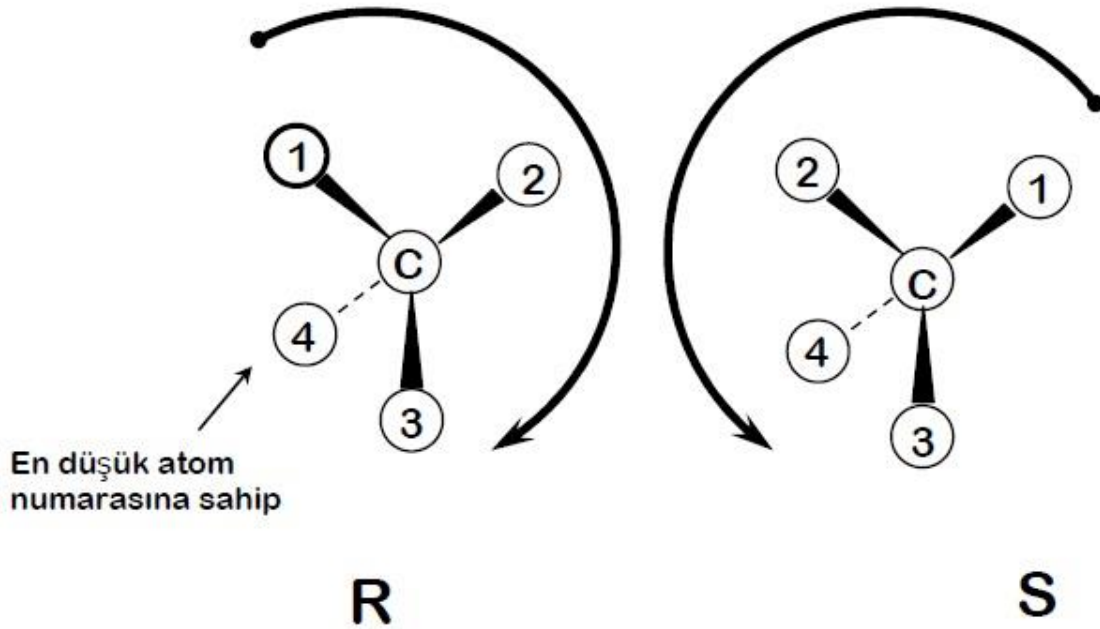
$$\% \text{ Optikçe saflık} = 100 * \frac{[a_k]}{[a_{se}]} \quad (2.2)$$

$$\% \text{ Enantiomerik aşırılık (\%ee)} = \frac{[R]-[S]}{[R]+[S]} * 100 \quad (2.3)$$

$$\% \text{ Optikçe saflık} = \% \text{ Optikçe verim} = \% \text{ Enantiomerik aşırılık} \quad (2.4)$$

2.4.3 Mutlak Konfigürasyona Ait R-S Tanımlama Sistemi

Konfigürasyon, bir atoma bağlanmış grupların üç boyutlu düzenlenmesidir. Aşağıdaki kurallarla belirlenir (Şekil 2.8):



Şekil 2.8 Mutlak konfigürasyon gösterimi

- Stereojenik karbon atomuna bağlı gruplar belirlenir ve atom numarasına göre sıralanır.

- En az öncelikli atom ya da grup sayfa düzleminin arkasında kalacak şekilde molekül yönlendirilir.
- En öncelikli olan gruptan azalan öncelik sırasına göre (1 > 2 > 3) gidildiğinde saat ibresinin yönünde gidilmişse mutlak konfigürasyon R (rectus “sağ”) olarak, saat ibresinin tersi yönünde gidilmişse S (sinister “sol”) olarak tanımlanır.

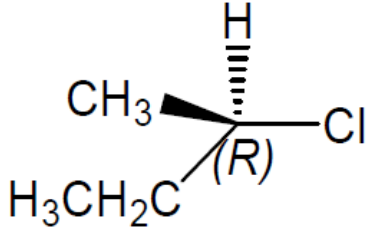
Mutlak konfigürasyon, bağıl konfigürasyon ve spesifik konfigürasyon arasında bir bağıntı yoktur (Çizelge 2.1). Konfigürasyonu D veya L olan aynı zamanda + veya -, R veya S olabilir [80].

Çizelge 2.1 Konfigürasyonların karşılaştırılması

<i>D-</i> , <i>L-</i>	Bağıl Konfigürasyon
	Stereojenik merkezde atom veya grupların üç boyutlu düzenlenmesidir. Mutlak değil karşılaştırmalıdır.
<i>R-</i> , <i>S-</i>	Mutlak Konfigürasyon
	Atom veya grupların stereojenik merkez etrafında üç boyutlu düzenlenmesidir.
(+), (-)	Spesifik Rotasyon
<i>d-</i> , <i>l-</i>	Polarize ışığın sağa veya sola çevrilmesi ile belirlenir.

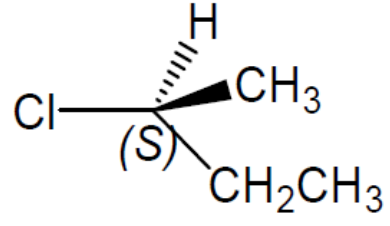
2.5 Enantiyomerler

Enantiyomerlerin genellikle fiziksel ve kimyasal özellikleri aynıdır (Şekil 2.9). Aynı kaynama noktası, erime noktası, yoğunluk, çevirme açısı büyüklüğüne sahiptirler. Enantiyomerler, kristalizasyon, ekstraksiyon vb. yöntemlerle ayrılamazlar. Enantiyomerlerin çevirme açılarının yönü ve biyolojik aktiviteleri farklıdır [80].



(R)-(-)-2-Klorbütan

Kaynama noktası : 328,11 [K]
 Erime noktası : 149,26 [K]
 Kritik Sıcaklık : 512,09 [K]
 Kritik Basınç: 37,59 [Bar]
 Kritik Hacim : 302,5 [cm³/mol]
 Gibbs Enerjisi : -31,57 [kJ/mol]
 Log P : 2,1
 Henry sabiti : 0,11

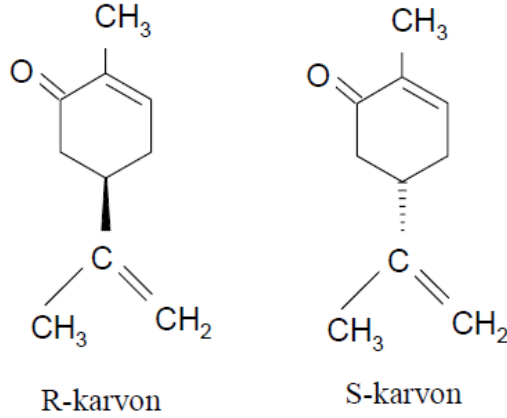


(S)-(+)-2-Klorbütan

Kaynama noktası : 328,11 [K]
 Erime noktası : 149,26 [K]
 Kritik Sıcaklık : 512,09 [K]
 Kritik Basınç: 37,59 [Bar]
 Kritik Hacim : 302,5 [cm³/mol]
 Gibbs Enerjisi : -31,57 [kJ/mol]
 Log P : 2,1
 Henry sabiti : 0,11

Şekil 2.9 2-Klorbütan enantiyomerlerinin özellikleri

Enantiyomerler, üç boyutlu uzayda atomların düzenlenmesine bağlı olarak farklı özellikler gösterebilirler. Örneğin, *R*-(-) karvon nane yağının ana bileşiği iken, *S*-(+)-karvon ise kimyon kökü yağının ana bileşiğidir (Şekil 2.10).



Şekil 2.10 Karvon enantiyomerleri

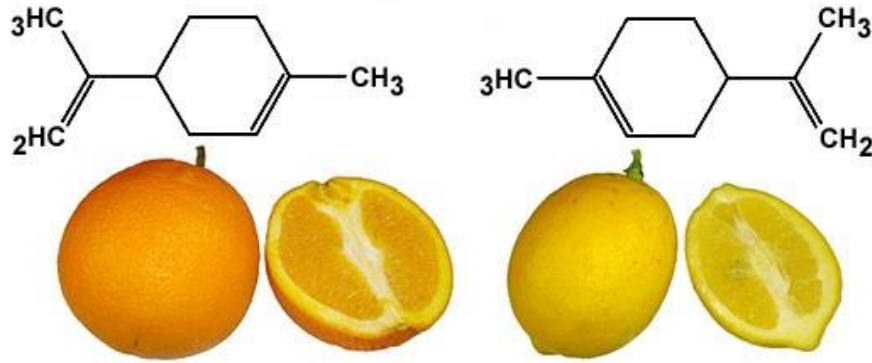
2.5.1 Enantiyomerlerin Biyolojik Etkileri

Kiralitenin, biyolojik aktivite için önemli olmasının nedeni moleküler seviyede simetrisinin biyolojik süreçlere hakim olmasıdır. Kiralite biyoaktivite için önkoşul değildir; ancak stereojenik merkeze sahip biyoaktif moleküllerde enantiyomerlerin

aktivitelerinde büyük farklılıklar gözlenmektedir. Canlı organizmaların moleküler bileşenleri çoğunlukla kiraldir ve kiralite bu moleküllerin biyoaktif maddelerle etkileşimlerinde baskın bir rol oynamaktadır. İlaç, insektisit, herbisit, tat -koku vericiler ve gıda katkı maddeleri gibi tüm biyoaktif maddelerde enantiyomerik yapının görülmesi mümkündür [97].

2.5.1.1 Tat ve Koku Vericiler

Tat ve koku algısı, dil ve burundaki reseptörler ile aroma maddeleri arasındaki özel etkileşimler ile belirlenir. Örneğin karvonun iki enantiyomerinin her birinin kendi karakteristik kokusu vardır. (*R*)- ve (*S*)- karvon arasındaki koku farklılığı burundaki alıcı sinir bölgelerine karşı farklı davranış göstermelerinden kaynaklanmaktadır. Burundaki alıcı sinirler kiraldir ve bir enantiyomer, alıcı sinirlerin bir bölgesi için uygunken diğer enantiyomer farklı bir bölge için uygunluk göstermektedir [97]. Limonen bileşiği enantiyomerinden (*S*)-Limonen limon kokusu; (*R*)-Limonen portakal kokusu olarak algılanmaktadır (Şekil 2.11) [95].



Şekil 2.11 Limonen bileşiği enantiyomerleri

2.5.1.2 Zirai Kimyasallar

Bitkiler, böcekler ve mantarlar gibi canlı organizmalar üzerinde etkili olan zirai kimyasallar enantiyoseçicilik sergilemektedir. Hedef organizmadaki enzim ya da reseptör ile biyoaktif maddelerin etkileşimi söz konusudur. İlaçlar ile kıyaslandığında pestisitlerin miktarı milyon tonlar ile ifade edilmektedir; bu nedenle kiral pestisitlerin tek bir optik izomer şeklinde üretimi çevre üzerindeki kimyasal yükün % 50 azalması

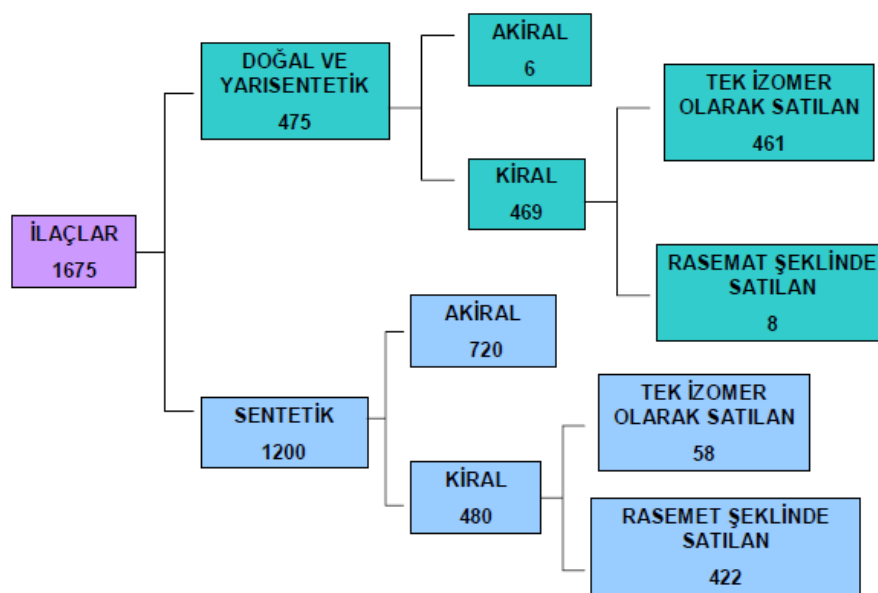
anlamına gelmektedir. Tek bir izomer şeklinde tasarlanan pestisitler düşük dozlarda daha etkili, daha seçici ve daha çevre dostudur [95].

Herbisit tarımda istenmeyen otların yok edilmesinde kullanılan kimyasalların genel adıdır. α -ariloksipropionik asitler herbisitlerin ticari olarak önemli bir sınıfını oluşturmaktadır, tümünde herbisidal etki (R)-enantiyomerine aittir. (R)-enantiyomeri herbisidal etkisini bitki büyüme hormonu olan indol-3-asetik asiti inhibe ederek gösterir. Geçmiş yıllarda Hollanda hükümeti herbisitlerin rasemat şeklinde kullanımını sınırlamış ve bu nedenle bir herbisit olan karbetamit saf (R)-enantiyomeri şeklinde üretilmiştir [95].

Tarım zararlısı böcekleri öldürmede kullanılan kimyasal maddelere insektisit denilmektedir. Nöroaktif bir insektisit olan deltametrin üç asimetrik merkeze sahiptir ve mümkün olan sekiz optik izomerinden sadece biri olan *R,R,S* izomeri şeklinde satılmaktadır. Deltametrin 1950'li yıllardaki DDT kadar aktif olan ancak memeli ve kuşlara zarar vermeyen günümüzdeki en etkili insektisit olarak görülmektedir [95].

2.5.1.3 Farmasotikler

Doğal tedavi edici ajanların büyük çoğunluğu kiral moleküllerdir ve doğada tek enantiyomer şeklinde bulunmasına rağmen uzun yıllar boyunca sentetik kiral ilaçlar rasemat şeklinde satışa sunulmaktadır (Şekil 2.12).



Şekil 2.12 Kiral ilaçların tek bir enantiyomer ve rasemat şeklinde kullanımı [97]

1990 yılına ait satış gelirleri esas alınarak hazırlanan liste incelendiğinde kiral sentetik ilaçlarda enantiyosafliğin önem kazandığı görülmektedir (Çizelge 2.2) [95].

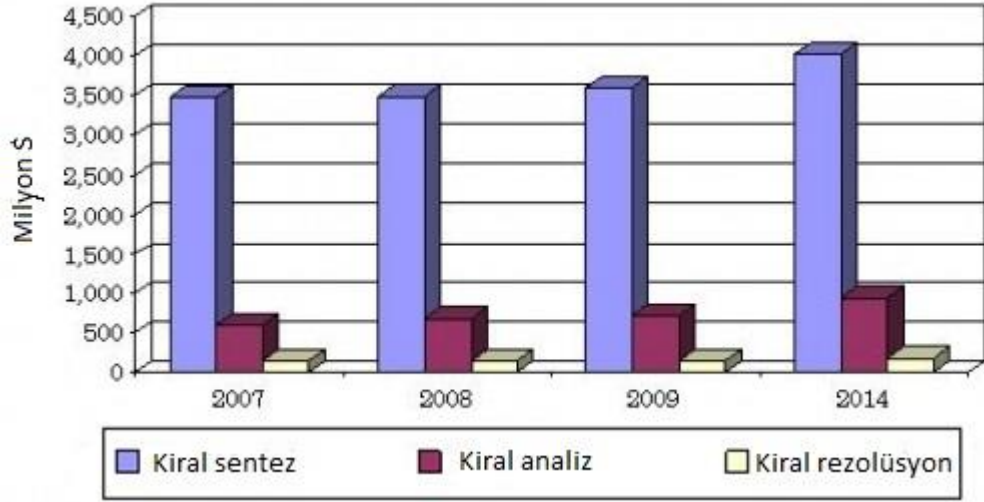
Çizelge 2.2 1990 yılına ait satış gelirleri

	İLAÇ	TERAPOTİK SINIFI	SATIŞ TUTARLARI (MİLYON \$)
◇	Ranitidin	Antiülser	2370
+	Amoksisilin	Antibiyotik	2000
+	Ampisilin	Antibiyotik	1800
+	Kaptopiril	ACE-inhibitörü	1520
+	Enalapril	ACE-inhibitörü	1500
•	İbuprofen	NSAID	1400
◇	Nifedipin	Kalsiyum antagonisti	1290
+	Sefaklor	Antibiyotik	1040
◇	Simetidin	Antiülser	1030
•	Atenolol	Beta-bloker	1020
◇	Diklofenak	NSAID	975
+	Diltiazem	Kalsiyum antagonisti	960
+	Naproksen	NSAID	950
+	Sefaleksim	Antibiyotik	900
+	Lovastatin	Antihiperkolesteromi	750
◇	Famotidin	Antiülser	630
•	İyoheksol	Kontrast madde	620
+	Seftriakson	Antibiyotik	600
◇	Piroksikam	NSAID	585
•	Albuterol	Bronşaçıcı	555

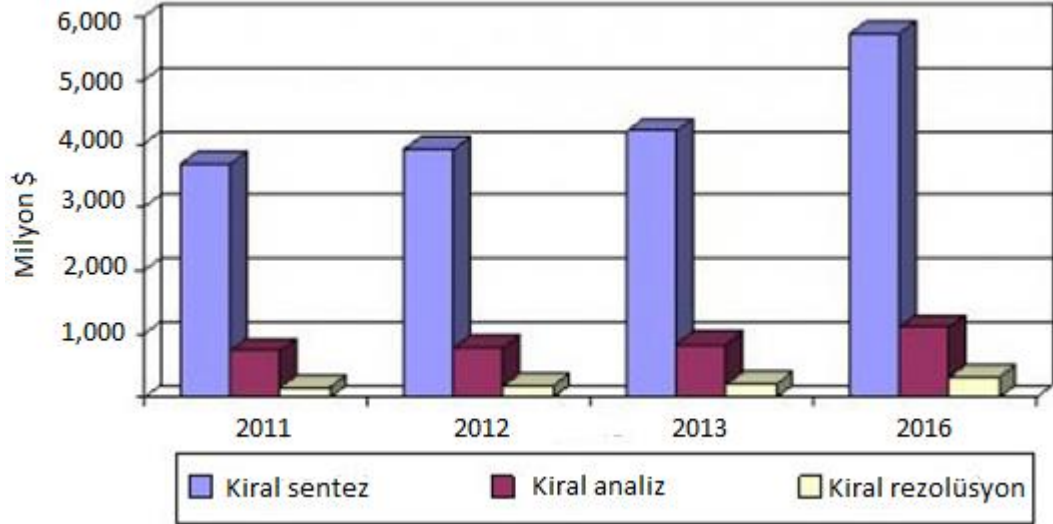
+ Optikçe aktif (10 ilaç), • Rasemik (4 ilaç), ◇ Akiral (6 ilaç)

BCC research araştırma verilerine göre; global kiral teknoloji marketinin 2008 yılında %3,3 büyümeyle toplamda yaklaşık 4,3 milyar dolar, 2009 yılında ise toplamda 4,5 milyar dolara yükseldiği bildirilmiştir [100]. 2009 yılında kiral sentez ürünlerinin 3,6 milyar dolar, kiral analiz marketinin ise 714 milyon dolar değerinde olduğu hesaplanmıştır (Çizelge 2.3). BCC research Nisan 2012 raporuna göre; 2011 yılında global kiral teknoloji marketinin toplamda yaklaşık olarak 5,3 milyar dolar değerinde olduğu saptanmış, küresel kiral teknoloji marketinin 2011 yılından 2016 yılına kadar yıllık bileşik büyüme oranının (CAGR) %6,5 artarak toplamda 7,2 milyar dolara ulaşacağı öngörülmektedir [100] (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.3 BCC research 2007-2014 kiral teknoloji market raporu



Çizelge 2.4 BCC research 2011-2016 kiral teknoloji market raporu



Enantiyomerlerin kiral ayrımı; özellikle ilaç endüstrisi, klinik analizler, gıda analizleri ve adli analiz alanları için oldukça önemli bir çalışma alanıdır. Bir enantiyomer, arzu edilen psikolojik, farmakolojik, farmakodinamikler ve farmakokinetik özelliklere tesir edebilirken; diğer enantiyomerler çok farklı psikolojik rol, canlı organizmalarla farklı etkileşimler ve kimyasal ve biyoteknolojik proste farklı aktivite sergileyebilmektedir [101].

Enantiyomerler farmakolojik etkilerine göre eutomer ve distomer olarak adlandırılır. Tedavi edici aktif izomer için 'eutomer' terimi, daha az etkili inaktif izomer için 'distomer' terimi kullanılır. Bir rasemik ilacın tedavi edici olmayan inaktif izomeri

(distomer) istenmeyen safsızlık olarak nitelendirilir ve farklı farmakolojik etkiler gösterir [95];

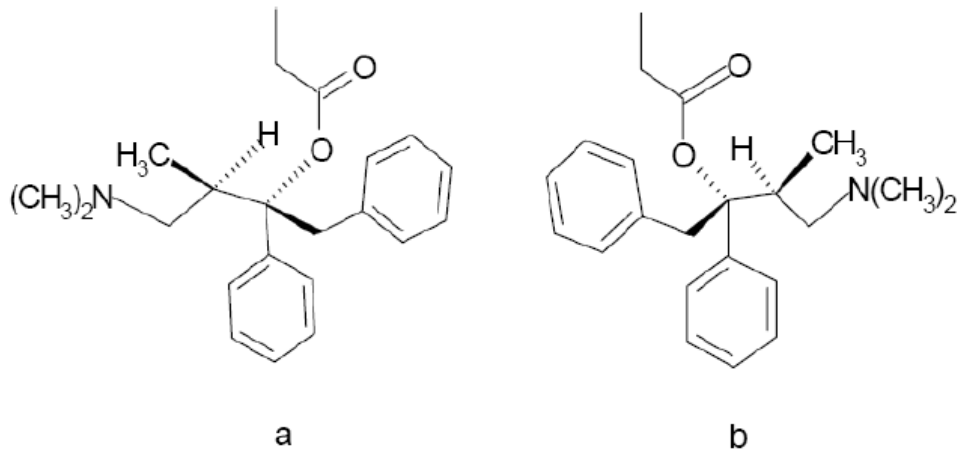
A. Her iki enantiyomer bağımsız veya birlikte tedavi edici etkiye sahiptir.

B. Enantiyomerlerden biri aktif diğeri inaktif özellik gösterebilir.

C. Enantiyomerler birbirinin tam tersi bir etki gösterebilirler.

A. Her iki enantiyomer bağımsız veya birlikte tedavi edici etkiye sahiptir;

Her iki enantiyomer bağımsız tedavi edici etkiye sahip olabilir. Bir kiral ilacın her iki izomeri istenen, ancak farklı tedavi etkisi gösterebilir. Örnek olarak dekstropoksifen analjezik bir ajan iken, levopoksifen etkili bir öksürük önleyicidir (Şekil 2.13). İlginç olan birbirinin ayna görüntüsü olan bu iki molekül iki farklı ilaç olarak Eli Lilly firması tarafından piyasada satılmaktadır [95].



a) (2R,3S)-(+)-Dekstropoksifen b) (2S,3R)-(-)-Levopoksifen

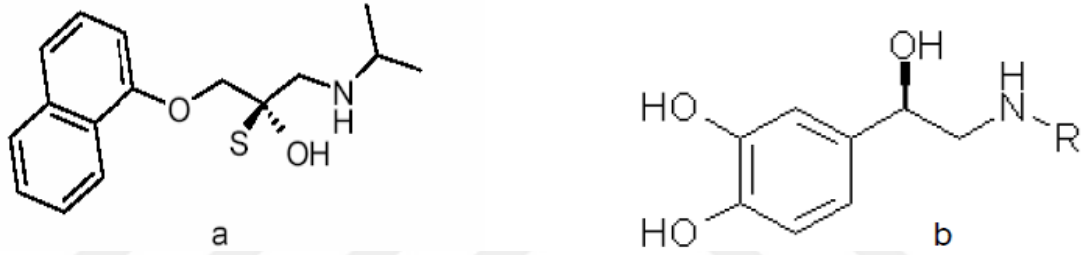
Şekil 2.13 Dekstropoksifen ve levopoksifen moleküler yapısı

Her iki enantiyomer tedavi için avantaj sağlayabilir. Her iki enantiyomerin istenen tedavi etkisini sağlamada farklı yollardan katkıda bulunduğu kiral ilaçlar mevcuttur. Örneğin, diüretik olarak kullanılan indakrinonun *R*-(+)-enantiyomeri aktif bir diüretiktir. *R*-enantiyomeri ürik asit oluşumunu engelleyerek istenmeyen yan etkiler gösterirken, *S*-enantiyomeri ürik asit salgısını artırarak *R*-izomerinin antagonisti (karşıtı) olarak görev yapar. Bu gibi durumlarda ilaçların rasemat şeklinde satışı iyi bir fikir olarak

görülebilmektedir, ancak yapılan çalışmalar iki enantiyomeri 9/1 oranında içeren karışımların tedavi için daha uygun olduğunu göstermiştir [97].

B. Enantiyomerlerden biri aktif diğeri inaktif özellik gösterebilir;

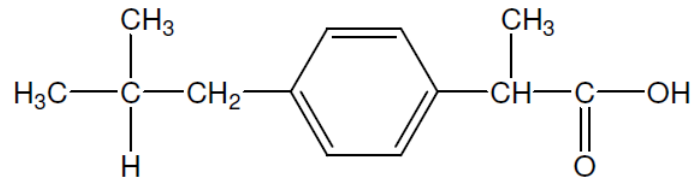
Distomerin ciddi yan etki göstermediği durumlar için kiral ilaçlar rasemat şeklinde uygulanır. Örneğin beta blokerler, adrenerjik reseptörlerin bloke edilmesi yoluyla antihipertensif etki (kan basıncının düşmesi) gösterirler. Beta blokerlerin neredeyse tümünde *S*-enantiyomerinin tedavi edici etkiye sahip olmasının nedeni *S*-enantiyomerinin adrenerjik hormon olan noradrenaline yapısal olarak çok benzemesidir (Şekil 2.14). Piyasada üç önemli beta-bloker olan propanolol, atenolol ve metoprolol'ün rasemat şeklinde satılmasının nedeni klasik yöntemler ile ayrılmasının zor olması ve distomerlerin ciddi yan etkiler göstermemesidir [95].



Şekil 2.14 a) (*S*)-Propranolol, b) Noradrenaline

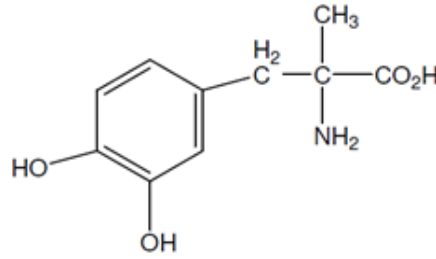
Eğer beta-blokerler yeni ilaçlar olarak bugün tanımlanmış olsaydı, hemen hemen hepsi tek bir enantiyomer şeklinde satılırdı. Çünkü rasemat şeklinde satılanlarda distomer gereksiz bir izomerik yük oluşturmaktadır [95].

Beta blokerlere ek olarak iltihap giderici bir madde olan ibuprofen'in (Advil, Motrin, Nuprin) yalnızca (*S*) izomeri etkindir (Şekil 2.15) [103].



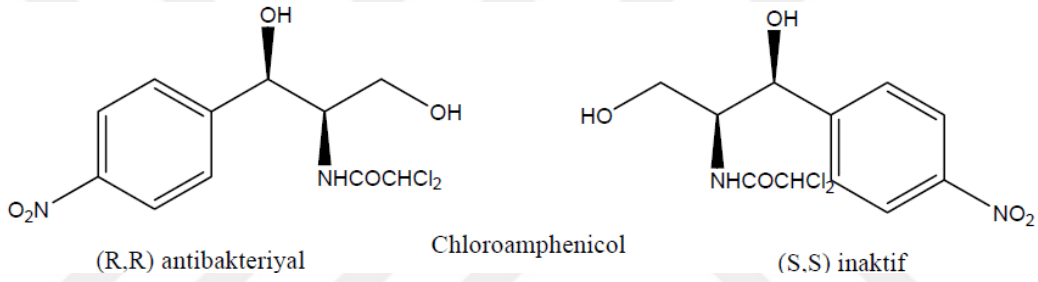
Şekil 2.15 İbuprofen bileşiği

Yüksek tansiyona karşı kullanılan bir ilaç olan metildopa (Aldomet) etkisini yalnızca (S) izomeriyle göstermektedir (Şekil 2.16) [103].



Şekil 2.16 Metildopa bileşiği

Kiral bir bileşik olan Kloroamfenikol rasemat şeklinde satılan ilaçlar arasındadır. (R,R)-Kloroamfenikol antibakteriyal özellik gösterirken, (S,S)-Kloroamfenikol inaktif özellik göstermektedir (Şekil 2.17) [102].



Şekil 2.17 Kloroamfenikol'un enantiomerik formları

Örneklerden anlaşılacağı üzere; ilaçların rasemik olarak kullanılmasında, vücuda alınması gereken birim miktardaki etken maddeyi karşılamak için iki kat rasemik karışım almak gerekmektedir. Kaynakların ve ürünün yarısının boşa harcanmış olması bakımından, ilaçların bir enantiomeri etkisiz olsa dahi rasemat şeklinde satılması ekonomik açıdan istenmeyen durumdur. Sonuç olarak tek bir enantiomer her zaman için rasemik karışıma göre daha fazla tercih edilmektedir [102].

C. Enantiyomerler birbirinin tam tersi bir etki gösterebilirler;

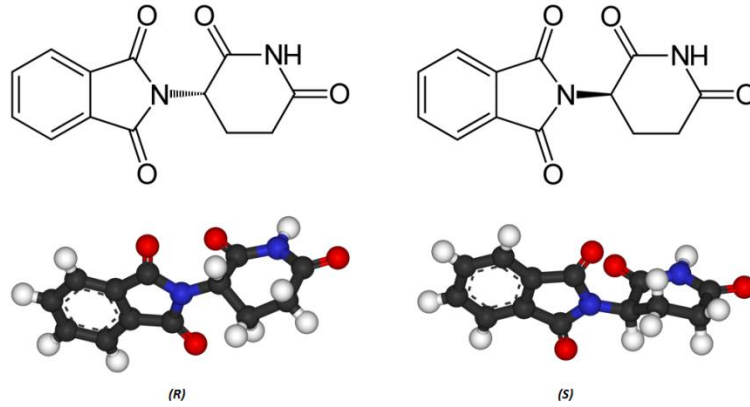
Distomer istenmeyen yan etkiler gösterebilmektedir. Distomerin ciddi yan etkilere sebep olduğu bilinen ilaçlara en iyi örnek talidomit yani N-ftalilglutamik asit amid'dir. (Şekil 2.18). Talidomit'in her iki enantiyomerini bir arada içeren ve 1957 yılında Almanya'da satışa sunulan, gebelerin mide bulantısı gibi sıkıntılarını gidermek amacıyla zamanla kullanımı yaygınlaşan ilacın gebeler tarafından tüketilmesi ile binlerce sakat doğum gerçekleşmiştir. İlacın etkisi ancak 1963'te keşfedilmiştir. Talidomidin

teratojenik (fetüsün normal gelişimini engelleyen ve çeşitli anomalilere yol açan) etkisinden dolayı meydana gelen doğum anomalileri tarihteki en önemli ilaç facialarından bir olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2.18) [98].



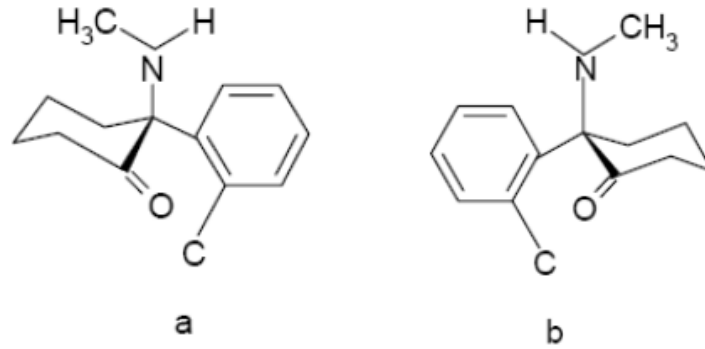
Şekil 2.18 Talidomit ilacı, ilaca bağlı doğum anomalileri ve Talidomid'in Kanada'daki kurbanlarının dernek logosu

Facia neticesinde yapılan inceleme ile talidomidin (*R*)-enantiyomerinin sinirleri yatıştırıcı, (*S*)-enantiyomerinin teratojenik etki gösterdiği tespit edilmiş (Şekil 2.19); sadece (*R*)-enantiyomeri içeren ilaç kullanılması halinde bu facianın yaşanmayacak olduğu açıklanmıştır [98].



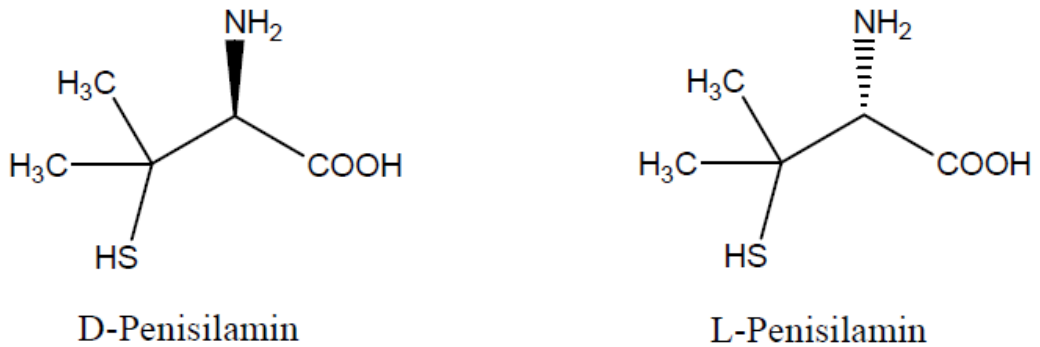
Şekil 2.19 Talidomit'in sinirleri yatıştırıcı (*R*)-enantiyomeri ile teratojenik etki gösteren (*S*)-enantiyomeri

Distomerin istenmeyen yan etkiler gösterdiği diğer bir örnek ise ketamindir. Ketamin anestezi ve analjezik olarak kullanılan bir maddedir. Rasemat şeklinde uygulanmasından dolayı anestezi sonrası hastalarda halüsinasyon ve zihinsel karışıklıklar gözlenmiştir. Ketaminin enantiyomerleri araştırıldığında *S*(+)-Ketaminin anestezi olduğu, istenmeyen yan etkilerin büyük çoğunlukla *R*(-)-Ketamin ile ilişkili olduğu görülmüştür (Şekil 2.20) [95].



Şekil 2.20 a) *S*(+)-Ketaminin ve b) *R*(-)-Ketamin

Örneğin vücudun ağır metal zehirlenmesinde antipod olarak kullanılan ve bir α -amino asit olan penisilaminin D- ve L-enantiyomerleri farklı etki göstermektedirler. D-penisilamin ağır metallerin vücuttan atılmasına yardımcı olurken L-penisilamin körlüğe neden olmaktadır (Şekil 2.21) [102].



Şekil 2.21 D-L Penisilamin

Örneklere anlaşılabileceği üzere distomerlerin ciddi yan etkilere neden olabilmesi ilaçların kesinlikle tek bir enantiyomer şeklinde üretimini zorunlu hale getirmektedir [95].

KİRAL İLAÇLAR

Kiral ilaçların gerek maliyet, gerekse insan sağlığına olumsuz etkilerinden ötürü enantiyomerik olarak saf üretimlerinin öneminin giderek artması, kiral bileşenlerin enantiyomerik saflaştırılmasını da gerekli hale getirmiştir. Bu amaçla çeşitli yöntemler kullanılmakta ise de en büyük başarıya, hammaddeye bağlı olmak üzere canlı sistemlerde ya da canlı sistemlerin enzimleriyle ulaşılmıştır.

Bu çalışmada insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri saptanan ilaç öncü ve ara maddeleri olan indol türevleri, α -hidroksi ketonlar, benzofuranonlar gibi kiral bileşiklerin ya da ürünlerinin enantiyomerik fazlalaştırılması amacıyla; ucuz, tekrar kullanılabilir, yeşil kimya prosesine uygun, düşük aktivasyon enerjisi şartları sağlayan ve optikçe saflığı çok yüksek olan enzimler ile biyotransformasyonundan bahsedilmiştir. Bu amaçla; kullanılan bileşiklerin, enzimlerin ve çeşitli reaksiyonların açıklamaları yapılmış, avantaj ve sınırlılıkları değerlendirilmiştir.

3.1 İlacın Tanımı, Gelişimi ve Türkiye'nin İlaç Sektöründeki Yeri

Dünyadaki gelişen tüm olayların odak noktasında insan yer almaktadır ve her olay insan üzerine dayandırılmaktadır. Konu insan üzerine gelince, insan yaşamı dolayısıyla, insan sağlığı ön plana geçmektedir. İnsan sağlığının korunması ve tedavisinde ilaç en önemli rolü oynamaktadır [104].

İlk ilaç M.Ö. 1500 yıllarında Mısır'da kullanılmaya başlanmıştır. M.Ö. 1500'den M.S. 1930'lu yıllara kadar çok az sayıda ilaç mevcuttu ve bunlar bazı hastalıkların iyileştirilmesinde veya belirtilerinin giderilmesinde, uykuyu kolaylaştırmada ve ağrı dindirmede kullanılan doğa kökenli ve sentetik olmayan ilaçlardı. Sentetik kökenli

ilaçların bulunması 1930'lu yıllara rastlamaktadır. Sülfanilamidlerin keşfiyle terapötik devrim adı verilen süreç başlanmıştır [104]. 1950'lerden sonra ilaç metabolizmasının gelişiminde;

- ilaç bilimcilerin istenmeyen ilaç yan etkilerine neden olan metabolitler üzerindeki çalışmalarının artması,
- metabolik reaksiyonların önemi ve çeşitliliği ile ilgili farkındalığının artması,
- ilaç öncülleri üzerindeki çığır açan çalışmalar,
- analitik cihazların hızla gelişmesi,
- bilimsel kabul gören bilimsel didaktik kitapların yayınlanması etkili olmuştur [105].

Bilimsel olarak kabul gören didaktik kitaplardan en önemlileri R. T. Williams tarafından yayınlanan 'Detoxication Mechanisms' (Detoksifikasyon Mekanizmaları) ve özellikle 1959 yılındaki ikinci baskısıdır [105]. 1950'lerden sonra ilaç metabolizması ile diğer xenobiyotiklerin metabolizmaları üzerindeki çalışmalar; kimya (analitik, fiziko, organik, organomekanik, yapı vb.), biyoloji (biyokimya, enzimoloji, genetik vb.), yapı eğilimi (absorpsiyon, dağılma, yığılma, ekstresyon, farmakokinetik), çevre bilimleri, farmakoloji ve toksikolojinin (moleküler ve klinik) birlikte değerlendirildiği multidisipliner bir bilim dalı haline gelmiştir.

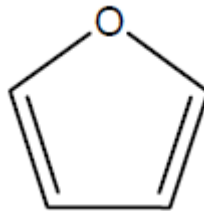
Ülkelerin hızla gelişen ilaç sektörünün gelişimindeki payı A, B, C₁, C₂ ve D olmak üzere çeşitli gruplara ayrılmıştır. A grubunda yer alan ülkeler, büyük ve çağdaş ilaç sanayiine sahip, bünyelerinde üç çeşit ilaç firmasını bulundurmakla beraber büyük birleşen firmaların sektöre hakim olduğu ülkelerdir. B grubunda yer alan ülkelerde ilaç sanayii sadece buluş yapan ve kopya eden firmalardan oluşmuştur. C grubunda yer alan ülkelerde ilaç sanayii çoğunlukla kopya eden firmalar tarafından oluşturulmuş olmakla birlikte faaliyet gösteren firmalar ithal edilen girdileri üretimde kullanarak mamul ilaç haline getirilmektedirler. Türkiye C grubunda terapötik parçacıklar ve nihai ürün (mamul ilaç) üreten ülkeler arasında yer almaktadır. D grubunda yer alan ülkelerde ise pazar payı küçük olduğundan ve ilaç üretimi olmadığından talep tamamen ithalat yolu ile karşılanmaktadır [104].

3.2 İlaç Tasarımı

"İlaç adayı tasarımı" araştırmaları, genellikle molekül yapısı bilinen moleküller üzerinde yoğunlaştırılmıştır. "Rasyonel ilaç tasarımı" olarak adlandırılan yöntemde amaç; biyoinformatik ve işlemsel biyoloji gibi bilgisayar yöntemlerini kullanarak, hedef protein veya diğer moleküllerin aktif veya işlevsel bölgelerine karşı uyum gösterecek moleküllerin bilgisayar ortamında tasarımı yapılarak tespit edilmesidir. "Rasyonel ilaç tasarımı" aynı zamanda tedavi edici özelliği olan yeni etkin maddelerin bulunmasını hızlandıran yöntemleri de içermektedir. Örneğin, bilgisayar destekli tasarım ve moleküler modelleme kullanılarak yeni bileşiklerin tasarlanması mümkün olmaktadır. İlaç adayı tasarımı çalışmalarında seçilmiş olan kimyasal moleküllerin sentezlenmesi, etkinlik derecelerinin belirlenmesi ve etkinliği saptanan moleküllerin daha ileri çalışmalar yapılarak ilaç olarak kullanılabilmesi, ilaç geliştirmedeki diğer aşamaları oluşturmaktadır [106].

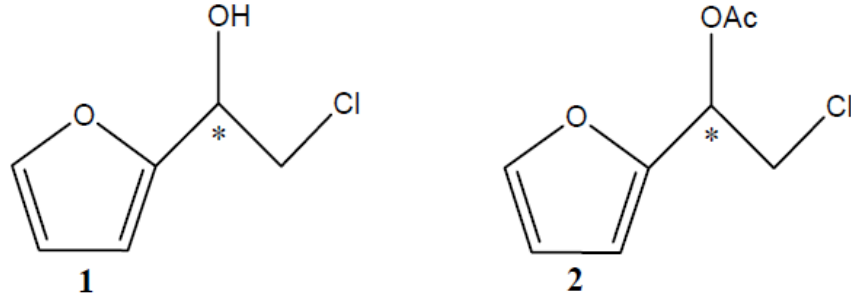
3.2.1 İlaç Tasarımında Benzofuranon Türevlerinin Yeri

Heterosiklik organik bir bileşik olan furan halkasını (Şekil 3.1) içeren bileşikler; α -amino asitler, β -laktamlar, indilozinler, quinolizidinler ve piperidin alkaloidler gibi pek çok doğal ürünün sentezinde önemli yapı taşlarıdır [107]. Furan bileşiği sentezi için, elde edilmek istenilen bileşiğe özgü yöntemler kullanılmaktadır. Örneğin, 1,3-sikloheksandion'dan kloroasetaldehit katalizörlüğü ile 4-okso-4,5,6,7-tetrahidrobenzofuran bileşiği sentezlenmektedir [108].

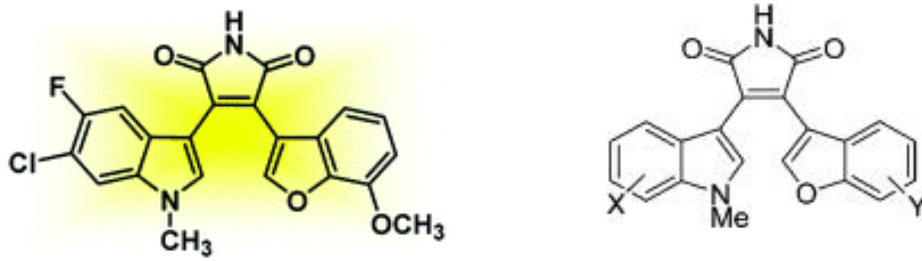


Şekil 3.1 Furan halkası

2-kloro-1-(furan-2-il)etanol ve 2-kloro-1-(furan-2-il)etil asetat bileşiklerinin sentezi için α -haloketonların asimetrik hidrojen transferi ile indirgenmesi veya kiral olmayan ortamlarda indirgeyici gruplarla oluşturulan rasemik karışımdan biyokatalizörlerle kinetik rezolüsyon yöntemi kullanılabilir (Şekil 3.2) [102].



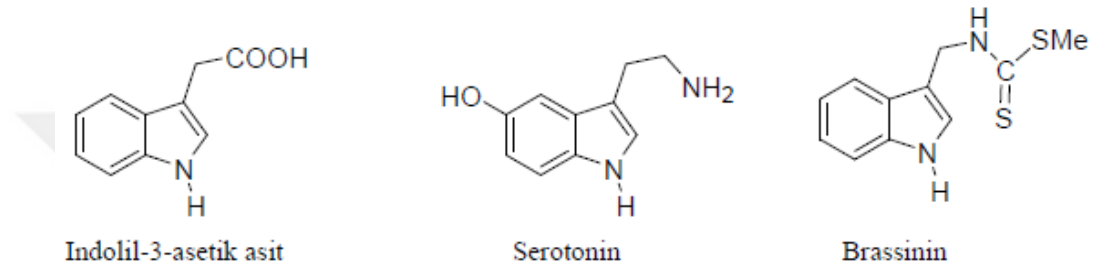
Şekil 3.2 2-Kloro-1-(furan-2-il)etanol (1), 2-kloro-1-(furan-2-il)etil asetat (2) bileşikleri Furan bileşiği türevlerinden olan benzofuran halkası incelendiğinde benzer şekilde biyolojik aktivite gösterdiği gözlenmektedir. Örneğin, insan bağırsak ve pankreasında kanserojen etki gösteren glikojen sentaz kinaz 3β (GSK-3β) inhibitörü olarak görev yapan benzofuran-3-il-(indol-3-il)maleimides bileşiğinin; kanser terapisi ve merkezi sinir sisteminde (MSS) bozukluklarına karşı önemli uygulamaları bulunduğu saptanmıştır (Şekil 3.3) [109].



Şekil 3.3 Benzofuran-3-il-(indol-3-il)maleimides bileşiği moleküler yapısı ve ana şablonu Benzofuranonların, antimalaryal [8], [19]; anti-HIV-1 [35]; seçici sitotoksik aktivite [7]; multi ilaç düzenleyici aktivite [16]; antinosiseptif [1], [23]; anti-inflamatuar [1]; antitümör [1], [2], [7], [10], [18]; anti-anjiyogenez [17]; antibakteriyal [1], [9]; antifungal [1], [4], [9]; antileichmanyal [1] gibi birçok biyolojik aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Ayrıca amiloid plaklarının görüntülenmesinde [12], [21]; MS [16] ve Alzheimer [22] hastalıklarının tedavisinde kullanım alanı bulan benzofuranon bileşikleri, oksijen ve karbon merkezli radikallere karşı antioksidan olarak [27] görev yapması yanında, polipropilen [28] özellik de göstermektedir.

3.2.2 İlaç Tasarımında İndol Türevlerinin Yeri

İndol türevleri üzerinde yoğun araştırmalar yapılmasının başlıca nedeni, birçok indol türevinin geniş bir biyolojik aktiviteye sahip olmasıdır. Örneğin, *Brassicaceae* familyasında (turpgiller) yüksek miktarda glukobrassikin türevi indol-3-ilmetilglukosinolat bulunmaktadır [37]. Bitki hormonu indolil-3-asetik asit (IAA), merkezi sinir sisteminde önemli etkinlikleri olan bir nörotransmitter olan serotonin (3-(2-aminoetil)5-hidroksiindol) ve kanser önleyici özelliği olan brassinin doğal ürünlerden izole edilen indol türevleridir (Şekil 3.4) [110].



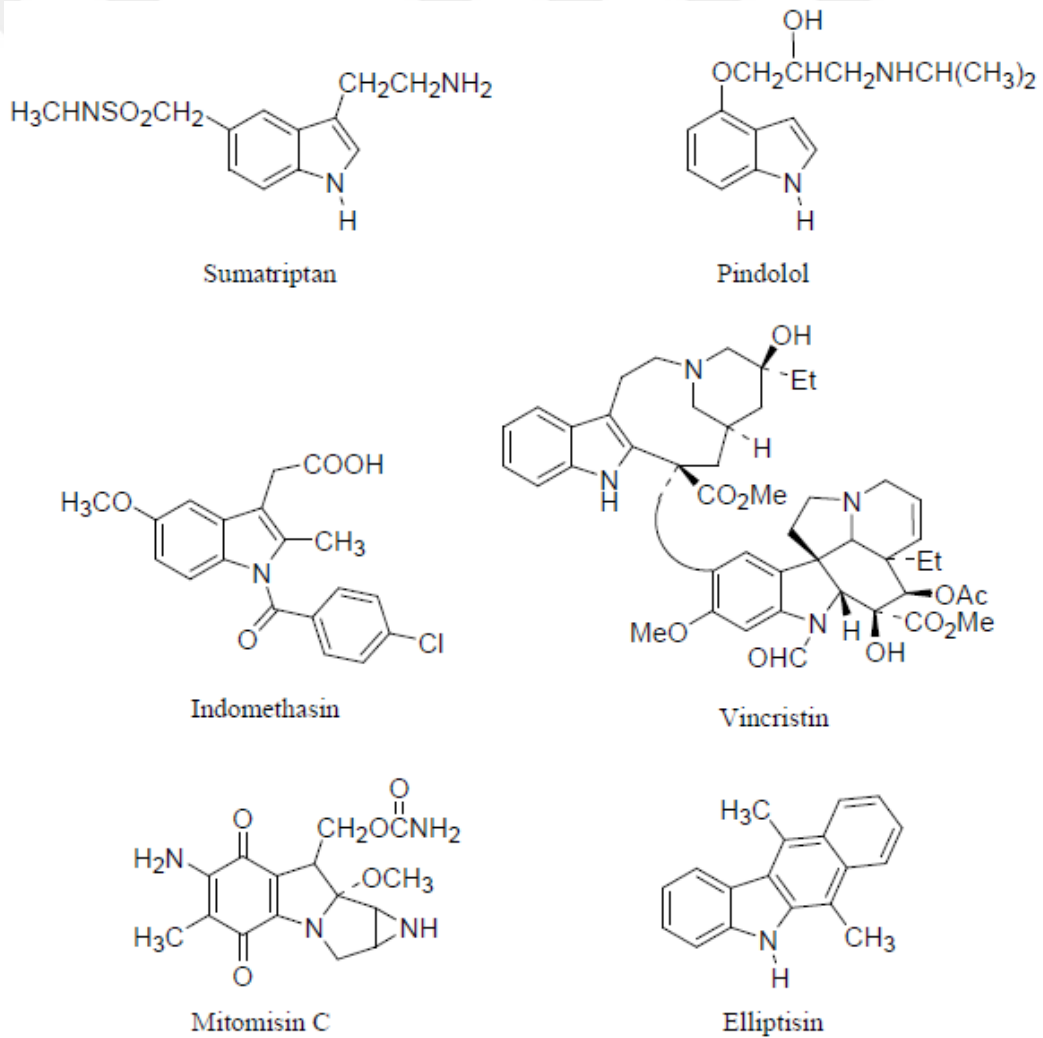
Şekil 3.4 Doğal ürünlerden izole edilen indol türevleri

İndol halkası taşıdığı terapötik değer nedeniyle medisinal kimya için önemli kondanse halkalardan biridir. İndol azotu doymuş olsun ya da olmasın, halkanın 3. konumu her zaman reaksiyonlara açık bir durumda bulunmaktadır. Açık olan 3. konum, bir elektrofil ile doyurularak benzenin aromatisasyonunu bozmadan kararlı bir ara ürün oluşturulmasını sağlamaktadır. İndol halkasının iki totomerik formda bulunmaktadır. Bunlar; daha kararlı olan enamin ve 3*H*-indol ile imin formlarıdır. İndol halkasındaki 2. ve 3. karbonlar arasında yer alan pi bağı sikloadisyon reaksiyonlarına imkân sağlamaktadır (İntramoleküler sikloadisyonlar, intermoleküler olanlara kıyasla daha kolay oluşmaktadır) [111]. İndol halkasının bu özelliklerinden faydalanılarak sentezlenen bileşiklerde birçok biyolojik aktivite saptanmıştır.

İndol halkası içeren bileşiklerin, koroner dilator (kan damarı genişletici) özellik [38], antibakteriyal [40], [42], [48], [51], [53], [54]; antifungal [40], [42], [48]; antileishmanyal [41], [70]; antitüberküloz [42], [43]; antiviral [44]; antikonvülsant [45], [46] anti-tümör [47], [51], [53], [57], [58], [59], [60], [61], [62], [63], [64], [65], [66], [67]; antiproliferatif [58]; antidepresan [74]; HCV (Kronik Hepatit C virüsü) replikasyon inhibitör [68]; anti-HIV [49] ve GAL3 reseptör antagonist [50] aktivite gösterdikleri

bilinmektedir. Üstün biyolojik aktiviteler gösteren indoller; astım, alerjik rinit [71], kalp damar rahatsızlıkları [69], şizofreni tedavisinde [76] uygulama alanı bulmaktadır. OLED teknolojisinin altyapısında kullanım alanı bulunan [77] indollerden; dokuların, organların ve özellikle nekroz hastalıkları ile miyokardiyal-serebral enfarktüsün teşhisi ve görüntülenmesi için kontrast ajanı olarak da yararlanılmaktadır [38] .

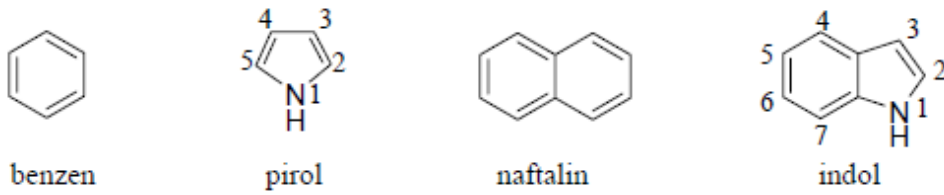
Sentetik olarak üretilen ve ilaç aktif maddesi olarak kullanılanlar indol türevlerine örnek olarak; ağrı kesici ve ateş düşürücü etkisi olan indomethasin, migren tedavisinde kullanılan sumatriptan, yüksek tansiyon ve kalp ritmi tedavisinde kullanılan pindolol, lösemi tedavisinde kullanılan vincristin ve anti-tümör özellik gösteren mitomisinler ile bazı elipsin türevleri verilebilmektedir (Şekil 3.5) [110].



Şekil 3.5 Sentetik olarak üretilen ve ilaç aktif maddesi

3.2.2.1 İndol Kimyası ve Reaksiyonları

İndolün kimyasal olarak pek çok değişik modifikasyonu bulunmaktadır. İndol molekülünün tercih edilen sistematik adı 1-benzo[b]piroldür [112]. İndol halkası; benzen ve pirol halkalarının birleşimiyle meydana gelmesine karşın, kendisini oluşturan iki bileşikten farklı aromatik karakterler sergilemektedir. Yapısındaki azot atomu üzerindeki ortaklanmamış elektronlarının, halkadaki π -elektronlarına dahil olmasıyla naftalin gibi 10 π -elektronuna sahip, aromatik bir bileşiktir (Şekil 3.6) [110].



Şekil 3.6 Benzen, pirol, naftalin ve indol bileşiklerinin moleküler yapıları

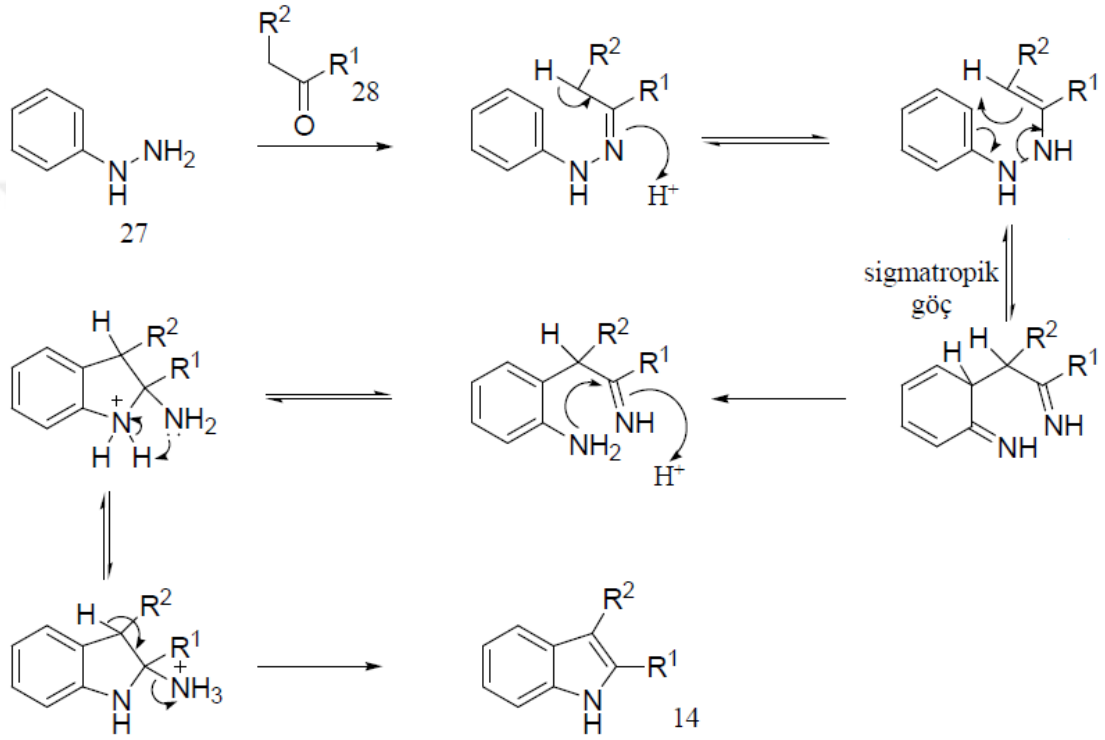
İndoller sentezlemek için kullanılan reaksiyonlar genel olarak;

- 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 halkalaşması yoluyla indol sentezi
- Nenitzescu indol sentezi

şeklinde sıralanabilir. Genel bilinen indol sentez reaksiyona ek olarak daha özel sentez reaksiyonları da bulunmaktadır [108], ancak içlerinde en eski ve en çok kullanılanına değinirsek:

3.2.2.1.1 Fisher İndol Sentezi

Fisher indol sentezi; arilhidrazonların bir asit katalizörlüğünde ısıtılması ve yapıdan amonyak ayrılmasını içeren bir halkalaşma reaksiyonudur (Şekil 3.7).



Şekil 3.7 Fisher indolizasyonunun mekanizması

Halkalı indol (14); arilhidrazon (26); fenil hidrazin (27); aldehit veya ketonlar (28)

Reaksiyon genel olarak iki aşamada incelenebilmektedir. Birinci aşamada fenil hidrazin türevleri aldehit veya ketonlar ile kondenzasyon reaksiyonu vererek arilhidrazonları oluşturmakta; ikinci aşamada ise oluşan arilhidrazonu, bir asit veya bir Lewis asidi ile yüksek sıcaklıklarda yapıdan amonyanın uzaklaştırılması ile halkalı indol yapısı elde edilmektedir [110].

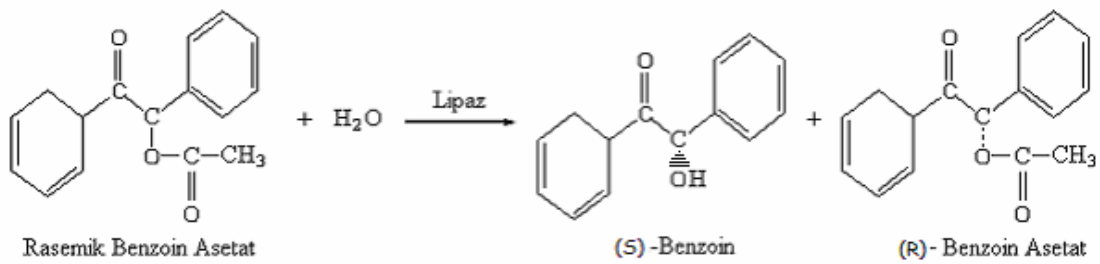
3.2.3 İlaç Tasarımında α -Hidroksi Keto'nun Yeri ve Eldesi

Enantiyomerik olarak saf α -hidroksi ketonlar, biyolojik aktif bileşiklerin sentezinde önemli yapı taşlarıdır ve çeşitli maddelerin asimetrik sentezi için başlangıç molekülleridir. Endüstriyel açıdan önemli ilaçların ve doğal ürünlerin sentezi için gerekli olan kiral alkollerin üretiminde kullanılmalarına ek olarak 2-hidroksi propiyofenon türevlerinin sentezinde anahtar ara ürünlerdir.

Kimyasal olarak; kiral triazolium tuzlarının katalizör olarak kullanıldığı C-C bağ oluşum tepkimeleri ve C-C bağı oluşumuna dayanmayan optikçe aktif enolatların stereoseçimli oksidasyonu, optikçe aktif okzaziridinler kullanılarak prokiral enolatların oksidasyonu, kiral titanyum onolatlarının seçimli oksidasyonu ve silil enol esterlerin asimetrik oksidasyonu yollarıyla yapılmaktadır [97].

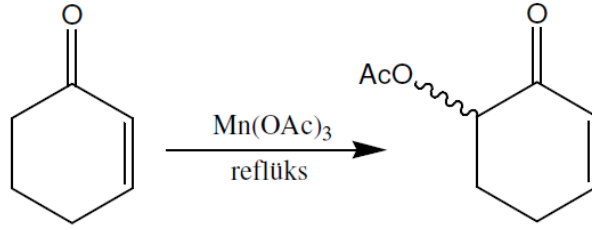
Biyokatalitik olarak; enantiyoseçimli α -hidroksi ketonların sentezi ise aromatik aldehitlerden C-C bağı oluşumuyla, α -diketonların indirgenmesi, rasemik α -hidroksi, perokso ve asetoksi ketonların kinetik rezolüsyonu ve derasemizasyon yöntemleri ile gerçekleştirilmektedir [97].

Örnek olarak bir α -hidroksi keton olan benzoinin rasemik benzoin asetatın hidroliz tepkimesi ile enantiyomerik sentezi Şekil 3.8'de görülmektedir [107].



Şekil 3.8 Rasemik benzoin asetatın lipaz katalizli hidroliz tepkimesi

α,β -Doymamış ketonların asetoksillenmesi reaksiyonlarında Mangan (III) asetat da yaygın olarak kullanılmaktadır (Şekil 3.9) [103]. Mangan (III) asetat ve Mangan (II) asetatın katalizlediği doymamış ketonların asetoksillenme reaksiyonları [113]; potasyum permanganat aracılığıyla da gerçekleştirilmektedir [114].

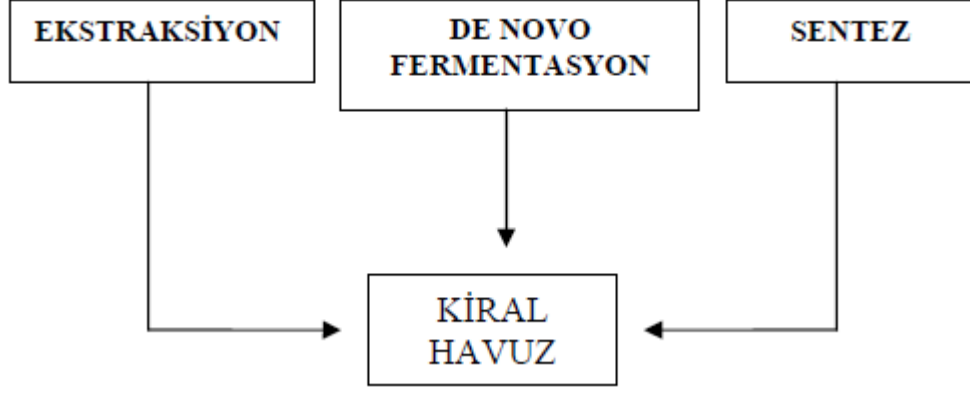


Şekil 3.9 α,β -Doymamış ketonların α' -asetoksillenmesi

Kiral α -hidroksi ketonlar, biyolojik aktivite gösteren doğal ürünler için önemli yapılardır. Rasemik alkollerin kinetik rezolüsyonu için iyi prokiral substratlardır [79]. Kiral α -hidroksi ketonlar, antibiyotik [80]; antibakteriyel [80]; antifungal [23]; antinosiseptif [23], [24], [25]; antidepresyon [80]; anti-virütik [80] etkilerine ek olarak potasyum kanal açıcıları [97] ve çeşitli kalp ilaçlarının [97] sentezlenmesinde önemli yapı taşlarıdır. α -Hidroksil ketonların enfeksiyon, alerji, tümefaksiyon (kabartı), rheumatoid arthritıs ve kanser gibi rahatsızlıklara karşı üstün özellikler gösterdiği de saptanmıştır [82].

3.3 Saf Enantiyomer Kaynakları

Enantiyomerikçe saf ilaçların ve zirai kimyasalların sentezlenmesi için kullanılan saf enantiyomerler başlıca üç kaynaktan elde edilmektedir (Şekil 3.10) [97]. Birinci kaynak saf enantiyomer şeklinde doğal olarak var olan karbonhidrat, terpen, alkaloid türevi kiral moleküllerin bitki ve hayvan materyallerinden ekstraksiyon yoluyla elde edilmesidir. İkinci kaynak, ucuz ve bolca bulunan karbonhidrat kaynaklarından De novo fermentasyonu ile mikroorganizmalarca üretilmesidir. De novo fermentasyonu; laktik asit, tartarik asit ve L-amino asit gibi basit yapılı kiral moleküller ile antibiyotikler, hormonlar ve vitaminler gibi daha kompleks moleküllerin önemli üretim kaynağıdır. Saf enantiyomerlerin elde edilmesi için üçüncü kaynak ise kiral veya prokiral başlangıç maddelerinden kimyasal veya biyokimyasal olarak sentezlenmesidir [95].



Şekil 3.10 Başlıca saf enantiyomer kaynakları

Kiral havuz; ucuz ve doğal olarak bulunan ürünler veya türevleri olarak tanımlanmaktadır. Kiral moleküller konfigürasyon dönüşümü ya da kiralite transferi gibi kimyasal yollarla sentetik ürünlere dönüştürülmektedir [95].

3.4 Enantiyomerleri Ayırma Yöntemleri

Eşit miktarda enantiyomer içeren karışıma “rasemat” denilmektedir. İki enantiyomeri içeren karışımdan istenen enantiyomerin ayrılmasına ise “rezolüsyon” denilmektedir. Rezolüsyon yöntemleri aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir:

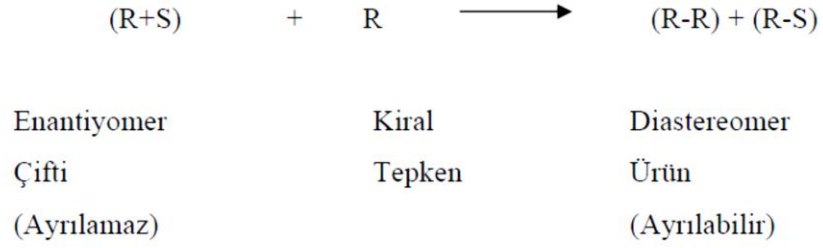
- Enantiyomerleri Kristallendirerek Ayırma
- Enantiyomerleri Diastereomerlere Dönüştürme
- Asimetrik Sentez
- Kinetik Rezolüsyon
- Dinamik Kinetik Rezolüsyon
- Kromatografik Yöntemle Ayırma

3.4.1 Enantiyomerleri Kristallendirerek Ayırma

Konglomerat (kümeleşmiş) türde katı kristallere uygulanabilen bir yöntemdir. Enantiyomerlerden birinin kristallenmesi, diğerinin kristallenmemesi için aşırı kristalleri veya katkı maddeleri eklenerek tercihli kristalizasyon sağlanabilmektedir [98].

3.4.2 Enantiyomerleri Diastereomerlere Dönüştürme

Diastereomerlerin özelliklerinin farklı olmasından yararlanılarak uygun yöntemle ayırma işlemi gerçekleştirilir. Diastereomerler ayrıldıktan sonra, kiral bileşeni ve ayrılmış olan enantiyomeri elde etmek için tepkimeler gerçekleştirilmektedir (Şekil 3.11) [98].



Şekil 3.11 Enantiyomerlerin distereomerlere dönüştürülmesi

3.4.3 Asimetrik Sentez

Asimetrik sentezde optikçe aktiflik (kiralite); kullanılacak olan kiral grup, kiral çevre ve kiral başlangıç maddesi ile bağlantılıdır. Optikçe aktiflik için reaktiflerin seçiminde aşağıdaki durumlar dikkate alınmalıdır:

- Yüksek enantiyoseçicilik,
- Kullanılan grubun reaksiyon sırasında yeni bir kiral merkez oluşturması,
- Reaksiyon bittikten sonra rasemizasyona neden olunmamalı ve ortamdaki kolayca uzaklaştırılabilirliği,
- Kullanılan kiral grubun enantiomerik fazlalığında değişiklik olmadan yüksek verimle geri kazanılabilirliği,
- Kiral grubun elde edilmesi ucuz ve hızlı olmalıdır [102].

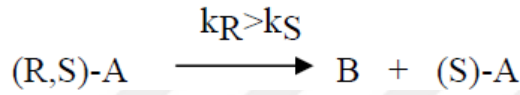
3.4.4 Kinetik Rezolüsyon

Rasemik karışımdaki enantiyomerlerin kiral katalizörler yardımıyla başka bir kiral bileşiğe dönüşümü sırasında enantiyomerlerin biri diğerine göre daha hızlı hareket etmektedir. Oluşan hız farkından yararlanılarak enantiyomerlerin ayrıştırılmasına kinetik rezolüsyon denilmektedir. Kinetik rezolüsyon;

— Kimyasal kinetik rezolüsyon

— Enzimatik kinetik rezolüsyon

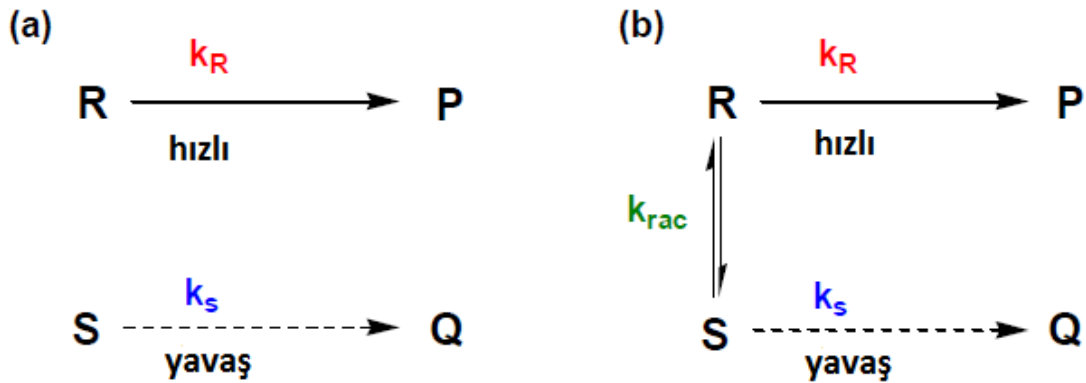
olarak ikiye ayrılır. Kiral katalizör farklılığı, enantiomerlerin ürüne dönüşümü sırasında oluşturdukları geçiş komplekslerinin aktivasyon enerjilerinde değişikliğe neden olmaktadır. Düşük aktivasyon enerjisine sahip geçiş kompleksini oluşturan enantiyomerin ürüne dönüşümü daha hızlı gerçekleşmektedir (Şekil 3.12). Aktivasyon enerjileri arasındaki fark arttıkça düşük enerjili olan enantiyomerin dönüşüm hızı, yüksek enerjili olan enantiyomere göre daha yüksek olacağından enantiyomerik fazlalık (e.e.) artmaktadır [102].



Şekil 3.12 Rasemik karışımın %50 verimle kinetik rezolüsyonu [112]

3.4.5 Dinamik Kinetik Rezolüsyon

Kinetik ve dinamik kinetik rezolüsyonda, (*R*)-enantiyomer, (*S*)-enantiyomerden daha hızlı tepkimeye girererek (*R*)-enantiyomeri *R*-ürüne dönüştürülür. Kinetik ve dinamik kinetik rezolüsyon arasındaki fark, kinetik rezolüsyonda (*S*)-enantiyomeri reaksiyona girmeden kalırken; dinamik kinetik rezolüsyonda (*S*)-enantiyomeri (*R*)-substrata, (*R*)-substrat ise (*R*)-ürüne dönüşmektedir (Şekil 3.13). Sonuç olarak teorikte %100 verime ulaşılmaktadır [98].



Şekil 3.13 Rasemik karışımların kinetik rezolüsyonu

(a) Kinetik resolüsyon, (b) Dinamik kinetik resolüsyon; R , S = Substrat enantiyomerleri, P , Q =Ürün enantiyomerleri, k_R , k_S =özgün ürün değişmezleri ($k_R \gg k_S$), k_{rac} =rasemizasyon değişmezleri ($k_{rac} \geq k_R$) [115]

3.4.6 Kromatografik Yöntemle Ayrıştırma

Enantiyomerlerin, kiral bileşiklerle etkileşimlerinin farklı olmasından faydalanılarak hazırlanan kiral maddelerle yüklü kolonlar ile rasemik karışımların ayrımı gerçekleştirilebilmektedir.

Her bir enantiyomerin kiral maddelerle etkileşiminin farklı olmasından ötürü R_f değerleri farklı olmaktadır. R_f değerleri farkından yararlanılarak enantiyomerlerin birbirinden ayrıştırılması sağlanmaktadır. Ayrım için kullanılan kromatografik yöntemler; ince tabaka, kolon, gaz ve sıvı kromatografisidir [102].

BİYOTRANSFORMASYON

Biyotransformasyon; biyolojik sistemlerin veya enzimlerin katalizör olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilen, kimyasal dönüşüm reaksiyonlarıyla endüstriyel öneme sahip bileşiklerin elde edilmesi olarak tanımlanır. Biyotransformasyon reaksiyonlarında biyolojik sistemlerin, doğal yaşam alanlarında doğal substratları üzerinde gerçekleştirdikleri biyosentezden farklı olarak; doğal substratları olmayan moleküller üzerinde meydana getirdikleri dönüşümler söz konusudur. Günümüzde önemi giderek artan biyoteknolojik çalışmaların önemli bir alanını oluşturan biyotransformasyon reaksiyonları, aşağıda sıralandığı gibi pek çok kullanım alanı dışında toksik endüstriyel atıkların yıkımı, atık suların temizlenmesi ve geri kazanılması gibi çevre sorunlarının giderilmesi amacıyla da uygulanabilmektedir [116].

- İlaç etken maddeleri üretimi,
- Koku maddeleri üretimi,
- Gıda katkı maddesi üretimi,
- Enerji üretimi,
- Antibiyotik üretimi,
- Aminoasit üretimi.

Biyokatalizörlerin kullanımı, kimya prosesinde alışlagelmiş olan izomerizasyon, rasemizasyon, epimerizasyon ve yeniden düzenleme problemlerini de minimize eder. Üstelik immobilize mikrobiyal hücre ya da enzimler, biyodönüşüm prosesi esnasında geri dönüştürülebilir ve tekrar kullanılabilirler. [115].

Kimya ve ilaç endüstrisinde enantiyomerik saf ara ürün eldesi, ürün verimliliği ve ekonomik ürün eldesi oldukça önemlidir. Esterazlar, lipazlar ve proteazlar rasemik karışımlardan, prokiral veya mesokiral bileşiklerin ya da diasteromerik karışımlardan enantiyomerik olarak saf bileşiklerinin hazırlanmasında geniş ölçüde kullanılmaktadırlar. Biyodönüşüm prosesi hazırlarken sırasıyla şu konulara önem verilmelidir; yüksek enantiyomerik saflık, yüksek verim, ürün standardizasyonu. Biyokatalizin, mükemmel bölge seçilim ve stereo seçilim gibi özellikleri zor sentezlerin başarılmasını mümkün kılmaktadır [115].

4.1 Başlıca Biyotransformasyon Reaksiyonları

Bu reaksiyon tipleri yedi şekilde gruplandırılabilir [117]:

- Oksidasyon
- Redüksiyon
- Hidroliz reaksiyonlar
- Katılım ve kondenzasyon
- İzomerleşme
- Yeni C-C bağlarının oluşumu
- Yeni hetero atomların ilavesi

4.2 Kiral Seçicilik

Kiral tanıma ya da kiral seçicilik; canlı sistemlerdeki kiral alıcıların veya kimyasal bileşiklerin, bir kiral molekülün enantiyomerlerinden biri ile seçici olarak etkileşmesidir [95]. Özellikle biyolojik etkileşimlerde kiral seçicilik baskın şekilde rol oynamaktadır. Canlı sistemlerde bir kiral molekülün enantiyomerlerini ayırt edebilen yapılar enzim ve reseptörlerdir.

Canlı sistemlerde dış ve iç ortamda meydana gelen kimyasal, fiziksel, elektriksel gibi tüm değişiklikler serbest sinir uçları veya sinirlerin bağlı oldukları duyu almaçları olan reseptörler tarafından algılanır. Fizyolojik fonksiyonları ne olursa olsun reseptörlerde

ortak olan nokta hepsinin kiral moleküller olmasıdır. Bu nedenle reseptörlerin uyarıcı moleküllerine bağlanmalarında enantiyoseçici davranmaları beklenmektedir [97].

Protein yapısında olan ve canlılarda kimyasal tepkimeleri katalizleyen biyokatalizörlere enzim denilmektedir. Canlı sistemlerde çoğu biyokimyasal tepkime enzimler tarafından katalizlenir. Enzimler kiraldır ve tek bir enantiyomer halinde bulunmaktadır. Üzerlerinde kimyasal reaksiyonların meydana geldiği asimetrik bir bölge (aktif merkez) vardır ve bu şekilde enzimlerin katalizledikleri reaksiyonların çoğunda ürünün yalnızca bir enantiyomerik şekli oluşmaktadır [95].

Biyotransformasyon reaksiyonları; tüm hücre biyodönüşümü ve serbest enzim reaksiyonları olarak iki ana biyokatalitik başlığa ayrılırlar ve biyotransformasyonda kullanılan beş teknik vardır [118].

4.3 Biyotransformasyon Teknikleri

Biyokatalitik biyotransformasyon yöntemlerinden tüm hücre biyodönüşümünde büyüyen hücrelerle, stasyonere hücrelerle, sporlar ile, immobilize hücrelerle olmak üzere dört; serbest ve immobilize enzimler ile gerçekleşen biyotransformasyonlarda bir teknik uygulama alanı bulmaktadır [116]. Altıncı teknik olan çok fazlı sistemler ile biyotransformasyon ise hem tüm hücre hem enzim sistemlerinde kullanılmaktadır [119].

4.3.1 Büyüyen hücreler ile biyotransformasyon

Hücreler ideal besi ortamında üretilir. Yapılan ön testlerle belirlenen konsantrasyonda ortama biyotransformasyona uğrıtılacak substrat katılır [116]. Mikrobiyal üreme sırasında tepkime ortamına eklenen substrat için optimum ekleme zamanı belirlenir. Biyotransformasyon, aşılardan sonra maksimum verime ulaşınca kadar sürdürülmelidir [119].

4.3.2 Stasyonel hücreler ile biyotransformasyon

Mikroorganizmanın ideal besi ortamında üretimi, filtrasyon ile ayrımı, biyotransformasyon ortamında dağılması ve substrat ilave edilmesi esasına dayanır [116].

İlk adımda mikroorganizma optimum koşullar altında çoğaltılır. Biyokütle, filtrasyon ile ya da santrifüj ile ayrılır. İkinci adımda hücreler substrat içeren optimum pH değerindeki destek çözeltisi ya da su eklenerek süspansiyon hale getirilir. Bazı durumlarda biyotransformasyon ortamının glikoza benzeyen bileşen ve kolay metabolize olan tuzlar ile desteklenmesi gerekmektedir. Böylelikle, kofaktör rejenasyonu ile hücre ömrünü uzatarak enzim aktivitesinin korunmasını sağlanmaktadır [119].

Büyüyen hücrelerde gerçekleştirilen biyotransformasyonlara karşı üstünlükleri şunlardır;

- Substratın ya da ürünün mikroorganizma büyümesine olan negatif etkisi ortadan kaldırılır.
- Her adımda substrat optimizasyonu yapılmaktadır.
- Ortam bileşenleri mikroorganizma kontaminasyonuna neden olmaz ve steril olmayı gerektirmez.
- Optimum dönüşüm oranını hızını veren hücre derişimi kolaylıkla belirlenir.
- Ortam karmaşık olmadığından ürün uzaklaştırması kolaydır [119].

4.3.3 Sporlar ile biyotransformasyon

Mikroorganizmalar spor oluşumu için ideal koşullarda üretilir ve sporlar misellerden ayrılıp soğukta saklanır. Biyotransformasyon yapılacağı zaman bu spordan yararlanılır [116].

4.3.4 İmmobilize hücreler ile biyotransformasyon

Mikroorganizmalar ürün ve substratın geçişine izin veren bir polimer matrikste tutulur. [116]. Tutuklanmış hücreler ile gerçekleştirilen biyotransformasyonlar, serbest hücreler

ile gerçekleştirilenlere göre daha kararlı işletme olanağına sahiptir. Tutuklanmış hücreler biyoteknik ortamından kolaylıkla uzaklaştırılabilir ve tekrar kullanılabilirler. Tutuklanmış biyokütle ortamda tutulabildiği ölçüde biyotransformasyon sürekli olarak gerçekleştirilebilir. Ürün oluşum hızı yüksektir ve inhibisyon etkisi minimumdur. Böylelikle biyokatalizörün kararlılığı ve maksimum etkinliği korunmuş olur. Tutuklamanın ek maliyet getirmesi ve difüzyonun neden olduğu kısıtlamalar bu yöntemin dezavantajlarındandır [119].

4.3.5 İmmobilize enzimler ile biyotransformasyon

İmmobilize hücreler ile gerçekleştirilen tutuklama yönteminin tek bir enzime özgü olan çeşididir. İmmobilize hücrelerin biyotransformasyon reaksiyonlarında kullanılması daha ekonomik olmasına rağmen çok basit yapılı bir hücre bile binlerce enzim içerdiğinden istenmeyen yan reaksiyonların oluşması ve ortamın bu reaksiyonların ürünleri ile kirlenmesi söz konusudur. Yalnız biyotransformasyonu katalizleyen enzimin kullanılması durumunda bu sakınca ortadan kalkmaktadır [116].

4.3.6 Çok fazlı sistemler ile biyotransformasyon

Lipofilik bileşiklerin (steroidler ya da terpenoidler gibi yağda çözünen bileşiklerdir) biyotransformasyonu, mikroorganizmaların sulu ortamda üremeleri ve çözülmüş substrat ile enzim-substrat kompleksi oluşturmamaları nedeniyle sınırlıdır. Suda çözünen çözücülerin eklenmesi ile biyotransformasyonun etkinliğinin artırılması mümkün olmaktadır; ancak yüksek yoğunluktaki çözücü, inhibisyona neden olabilmektedir. Oluşan inhibisyonu önlemek amacıyla biyoteknik ortamına katı ya da sıvı faz sonradan eklenmektedir [119]. Mikroorganizma ya da enzim sulu fazda, lipofilik substrat ise organik fazdadır.

Biyoteknik substratın uygunluğuna, sudaki çözünürlüğüne ve iki faz arasındaki arayüze bağlıdır. Suda az çözünen substratın biyotransformasyonu, su ile karışabilen çözücü varlığında etkin bir şekilde gerçekleşebilmektedir. Kullanılan çözücü su ile karışabilmeli, substrat ve ürün için yüksek çözünürlüğe sahip olmalı ve biyokatalizör üzerine toksik etki yapmamalıdır [119]. Çok fazlı sistemlerin avantajları genel olarak aşağıdaki gibidir;

- ✓ Sudaki çözünürlüğü düşük olan substrat ve/veya ürünlerin yüksek derişimlerinde çalışılması mümkündür.
- ✓ Tepkimenin dengesi, ilgili fazlar arasında ürün ve substrat dağılımı ile değiştirilebilmektedir.
- ✓ Su aktivitesinin azalmasıyla tepkime dengesi değişmektedir.
- ✓ Substrat ve ürün inhibisyonu azaltılmaktadır.
- ✓ Biyokatalizör ya da ürünü uzaklaştırmak kolaydır.
- ✓ Mikroorganizma bulaşma riski düşüktür.
- ✓ Biyokatalizörler daha kararlıdır.
- ✓ Tepkime hızı yüksektir [119].

4.4 Tüm Hücre Biyodönüşümü ve Serbest Enzim Reaksiyonlarının Karşılaştırılması

Biyotransformasyonda saf enzim kullanımının nedenleri aşağıda belirtilmiştir;

- Hücre zarı, uygun substrat ve ürünün geçmesini önlemektedir.
- Hücre içerisindeki reaksiyona yönelik olmayan enzimler ürünlerin bozunmasına ya da istenmeyen yan tepkimelere neden olmaktadır.
- İlgili enzim biyokütleden uzaklaştırıldıktan sonra kolayca saflaştırılmaktadır.
- Kullanılan enzimler ticari kullanım alanına sahip olabildiklerinden hazır alımları mümkündür.
- Enzimler hayvan ve bitki dokularından veya mikroorganizmalardan elde edilebilmektedir.
- Tüm hücre biyotransformasyonlarında, antibakteriyel veya antifungal özellik gösteren maddeler ile çalışılması mümkün olmamaktadır.

Ticari olarak elde edilemeyen enzimlerin saflaştırma işlemi uzun zaman alan, yorucu ve pahalı bir yöntemdir ve hücrenin parçalanması, ekstraksiyon, deriştirme, fraksiyonlama, çöktürme ve kurutma gibi basamakları gerektirmektedir [119]. Ticari olarak elde edilebilen enzimlerin ise maliyetleri yüksek olabilmektedir.

4.5 Biyodönüşüm Çalışmalarında Enzimler

Temelde tüm biyotransformasyon reaksiyonları enzimatik olarak gerçekleşmektedir [116]. Enzimlerin seçicilik ve hızlandırılmış reaksiyon oranları biyodönüşüm çalışmalarında büyük avantajlar sağlamaktadır. İlimli reaksiyon koşullarından dolayı yeşil kimya prosedürleri tarafından tanınmışlardır. Sulu ortamda, ılımlı sıcaklık ve pH değerlerinde çalışmaktadırlar, bununla birlikte sıra dışı koşullarda reaksiyon veren enzimler de bilinmektedir [115].

4.5.1 Enzimlerin Avantajları:

4.5.1.1 Enzimler çok hızlı çalışan biyokatalizörlerdir

Enzimatik bir reaksiyon, enzimsiz gerçekleşen aynı reaksiyona göre 10^8 - 10^{10} kez daha hızlıdır. Hız oranı değeri kimi zaman 10^{12} düzeyine ulaşabilmektedir ki kimyasal katalizörlerin ulaşamayacağı bir hızı ifade etmektedir. Kimyasal bir katalizörün işlevini gerçekleştirme için genellikle % 0,1–1 mol miktarına ihtiyaç duymaktadır, ancak enzimatik bir reaksiyonda bu miktar % 10^{-3} – 10^{-4} mol düzeyine düşmektedir [116].

4.5.1.2 Enzimler geniş substrat spesifikliğine sahiptir

Enzimler doğal substratları olmayan sentetik substratlar üzerinde de etkili olabilmektedirler. Enzimlerin bifazik (iki fazlı) ortamlarda çalışabilmesi organik çözücülerin kullanılmasını gerektiren durumlar için bir avantajdır [116].

4.5.1.3 Enzimlerin geniş bir reaksiyon spektrumu vardır

Tüm katalizörler gibi enzimler de reaksiyonları hızlandırmaktadır, ancak reaksiyonun termodinamik dengesi yönünde etkileri olmadığından, bazı enzim katalizli reaksiyonlar her iki yönde de gerçekleşebilmektedir. Ayrıca organik reaksiyonların hemen her tipine karşılık gelen bir enzimatik reaksiyon bulunmaktadır. Örnek olarak; ester, amid, lakton, laktam, eter, asit anhidrit, epoksit ve nitrillerin hidrolizi ya da sentezi, alkan, alken, aromatik, alkol, aldehit ve keton, sülfid ve sülfoksitlerin yükseltgenmesi ya da indirgenmesi, halojenleme ve dehalojenleme, alkilleme ve dealkilleme, izomerleşme, alkiloin ve aldol reaksiyonları verilebilir [116].

4.5.1.4 Enzimler ılımlı koşullarda çalışırlar

Enzimatik reaksiyonlar pH=5–8 (genellikle pH=7) ve 20–40°C (genellikle 30°C) koşullarında gerçekleşir. Bu ılımlı koşullar sayesinde istenmeyen yan reaksiyonlar minimum düzeye indirgenmektedir [116].

4.5.1.5 Enzimler aynı ortamda birbirlerini etkilemeden kalabilirler

Enzimlerin çalışma koşulları benzer ya da aynı olduğundan tek bir ortamda çeşitli biyokatalitik reaksiyonlar gerçekleştirilebilir. Multienzim sistemleriyle ardışık reaksiyonlar gerçekleştirilebilmesi, karmaşık reaksiyonları kolaylaştırır [116].

4.5.1.6 Enzimler üstün seçicilik gösterirler:

4.5.1.6.1 Kimyasal seçicilik

Fonksiyonel grubun bir tek tipi üzerine seçicilik gösterilmektedir. Enzimlerin kimyasal seçiciliği, yan ürün oluşumunu azaltarak reaksiyon verimini artırır [116].

4.5.1.6.2 Bölgesel seçicilik

Enzimlerin kompleks üç boyutlu yapıları, aynı substrat molekülün farklı bölgelerindeki fonksiyonel gruplara seçicilik göstermelerine neden olmaktadır[116].

4.5.1.6.3 Enantiyomerik seçicilik

Enzimlerin substratlara karşı kiral seçiciliğidir. Enantiyomerik olarak yüksek saflıkta istenen ürünün hazırlanmasında oldukça önemli bir özelliktir [116].

Organik sentez yöntemleriyle gerçekleştirilmesi çok zor ya da imkânsız reaksiyonlar enzimatik olarak kolayca gerçekleştirilebilir.

Enzimatik reaksiyonların sağladığı önemli avantajlardan ötürü biyotransformasyon uygulamaları, kimyasal reaksiyonlarla karşılaştırıldığında önemli üstünlüklere sahiptir [116]:

- ✓ Gıda katkı maddeleri gibi çeşitli kimyasalların, ilaçların ve zirai kimyasalların hazırlanmasında,

- ✓ Doğal olarak ya da kimyasal olarak sentezlenmiş bileşiklerin özel türevlerinin hazırlanmasında,
- ✓ Bileşiklerin yapı-etki ilişkilerinin araştırılması için türevlerin hazırlanmasında,
- ✓ Biyolojik sistemlerdeki metabolizma olaylarının açıklanmasında,
- ✓ Biyolojik sentezler ile biyolojik sistemlerin taklit edilmesinde,
- ✓ Biyodegradasyonda (çevre, çevrebilim, geri dönüşüm, biyokütle, biyoenerji konularında) ön plana çıkmaktadırlar.

Enzimlerin tüm bu özellikleri nedeniyle biyotransformasyon reaksiyonları daha ekonomik ve çevre dostu olarak nitelendirilmektedirler [116].

4.5.2 Enzimlerin Sınırlılıkları

Enzimler, özelleşmiş katalizörde olduğu gibi sınırlılıklara sahiptir. Enzim seçiciliğinin dikkat çekici özelliği, substrata özel bağlanma yapısı ile başlı başına bir reaksiyon türü olmasıdır. Seçiciliğin dezavantajı ise organik kimyada sentezlenmek istenilen kimyasal için birçok özel enzim gerektirebilmesidir ve bu gibi özel durumlarda enzim ihtiyacı hazırda uygun halde olmayabilmektedir [115].

Reaksiyon koşulları, pH ve sıcaklık gibi etkenlere karşı toleranslı olan enzimlerin kimyasal özellikleri de sınırlılık meydana getirebilmektedir [115]. Enzimlerin 50-60°C aralığında bozunarak parçalanmaları biyotransformasyonlar için sorun teşkil etmesine rağmen enzimlerin yüksek sıcaklıklardaki reaksiyonları oda koşullarında sağlaması, enzimlerle yüksek sıcaklıklarda çalışmasını gereksiz kılmaktadır. Zorunlu durumlarda sıradışı koşullarda çalışan enzimlerin varlığı ile reaksiyonları sürdürmek teknik olarak mümkün olmasına rağmen, enzim spesifikliğı ve sıradışı enzimlerin elde edilmesinden kaynaklanan zorlukların maliyetlerini arttırması nedeniyle yüksek sıcaklıklarda enzimlerle çalışılması tercih edilmemektedir.

Çoğu kimyasal ve polimer suda çözünmediğinden suda çözünmeyen substratlar enzimatik reaksiyonlar için uygun değildir [115]. Bifazik sistemler, tutuklanmış enzim veya uygun organik çözücü kullanımı (lipazlarda) ile enzimlerin su fazındaki sınırlı aktivitelerinin üstesinden gelinmesi mümkün olmaktadır.

4.5.3 Genel Enzimatik Reaksiyonlar ve Enzim Sınıfları

Enzimlerle katalizlenen hemen hemen tüm reaksiyon tipleri asimetrik sentezde uygulanmaktadır; amid ve ester bağlarının hidrolizi, ketonların redüksiyonu, alkol ve aldehitlerin oksidasyonu, C-C bağının formasyonu, ekleme, eliminasyon ve dehalojenasyon reaksiyonları gibi. Başlıca enzimatik dönüşümler ve karşılıklı enzim sınıfları Çizelge 4.1.'de özetlenmiştir [115].

Çizelge 4.1 Enzim sınıfları ve reaksiyonları

Enzim sınıfları	Reaksiyon tipi
1 Oksidoredüktazlar	Oksidasyon-redüksiyon: C-H, C-C, C=C bağlarının oksijenasyonu, ya da kapsamlı giderme ya da hidrojen atomu eşdeğeri katılma
2 Transferazlar	Grupların transferi: aldehidik, ketonik, açıl,şeker, fosforil ya da metil.
3 Hidrolazlar	Esterlerin, amidlerin, laktonların, laktamların,epoksitlerin, nitrillerin, anhidritlerin, glikozidlerin hidrolizi-formasyonu
4 Liyazlar	C=C, C=N, C=O bağlarına küçük moleküllerin eklenmesi-eliminasyonu.
5 İzomerazlar	Rasemizasyon, epimerizasyon gibi birkaç izomerizasyon.
6 Ligazlar	Trifosfat-yarılma ile beraber C-O, C-S, C-N, C-C bağlarının formasyonu-yarılması.

International Union of Biochemistry (IUB) (Uluslararası Biyokimya Birliği)'nin adlandırma sistemine göre (1965):

- Reaksiyonlar ve onları katalizleyen enzimler 6 sınıfa ayrılmaktadır ve her sınıfın 4-13 alt sınıfı bulunmaktadır.
- Enzim adı 2 kısımdan oluşmaktadır: (substrat veya substratların adı) + (katalize edilen reaksiyon tipi)-az. Örneğin; L-malat = NADP + oksiredüktaz.

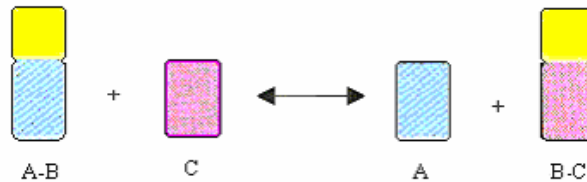
- Reaksiyon için ilave bilgi gerektiği durumlarda parantez içinde gösterilebilir. Örneğin; L-malat + NADP + Piruvat + CO₂ + NADPH + H + L-malat : NADP + oksiredüktaz (dekarboksile eden)
- Her enzimin bir kod numarası bulunmaktadır (Şekil 4.1). 1. sayı reaksiyon tipini, 2. sayı alt sınıfı, 3. sayı alt alt sınıfı, 4. sayı ise enzim için spesifik özelliği tanımlamaktadır [120].

EC 2.7.1.1	2: Transferaz
	7: Fosfat transferi
	1: Fosfat transferi görevini yapan alkoldür
	1: Glukozun 6. karbonuna fosfat transferi yapan hegzokinaz

Şekil 4.1 Enzim sınıflandırmasındaki kodların transferaz enzimi örneğinde gösterimi

4.5.3.1 Oksidoredüktazlar

Oksidasyon ve indirgeme reaksiyonlarını katalizlemektedirler. CH-OH, CH=CH, C=O, CH-NH₂, CH-NH gibi grupların indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonlarını katalizleyen enzim grubudur [116]. Genel reaksiyon tipi Şekil 4.2'deki gibidir;



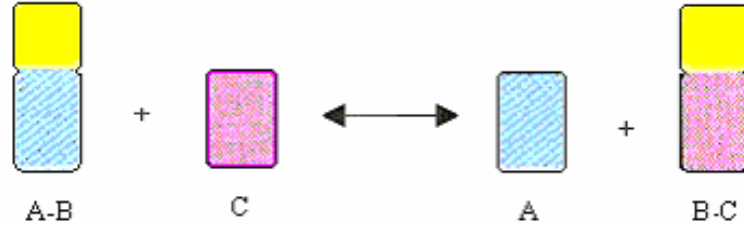
Şekil 4.2 Oksidoredüktazların genel reaksiyonu

Alt grupları:

- E.C.1.1 CH-OH bağına etki edenler
- E.C.1.2 C=O bağına etki edenler
- E.C.1.3 C-C bağına etki edenler
- E.C.1.4 C-NH₂ bağına etki edenler
- E.C.1.5 C-NH- grubuna etki edenler
- E.C.1.6 NADH veya NADPH'a etki edenler [121]

4.5.3.2 Transferazlar

Fonksiyonel grupların transferini katalizlemektedirler. Fosfat, asetat, glikozil ve açıl gibi fonksiyonel grupların bir substrattan başkasına eklemesini sağlarlar [116]. Genel reaksiyon tipi Şekil 4.3'deki gibidir:



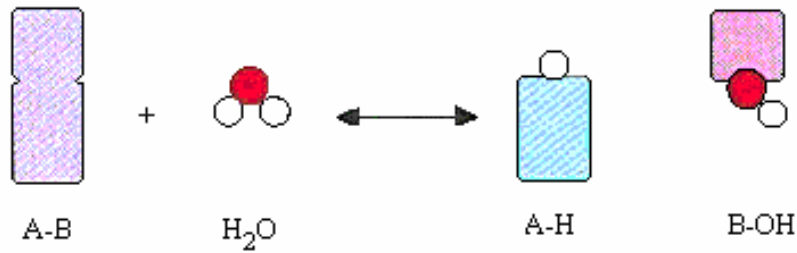
Şekil 4.3 Transferazların genel reaksiyonu

Alt grupları:

- E.C.2.1 Tek karbon grubu aktaranlar
- E.C.2.2 Aldehit ya da keton grubunu aktaranlar
- E.C.2.3 Açıl transferazlar
- E.C.2.4 Glikosiltransferazlar
- E.C.2.5 Alkil benzeri grupları aktaranlar
- E.C.2.6 Azotlu grupları aktaranlar
- E.C.2.7 Fosfor içeren grupları aktaranlar [121]

4.5.3.3 Hidrolazlar

Ester, glikozit, amit ve peptit hidrolizini katalizleyen enzim sistemleridir [116]. Genel reaksiyon tipi Şekil 4.4'deki gibidir:



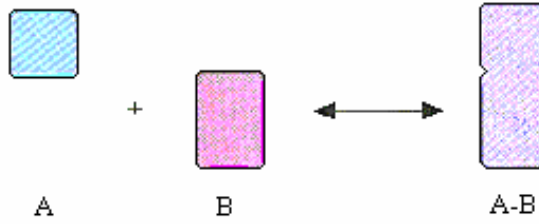
Şekil 4.4 Hidrolazların genel reaksiyonu

Alt grupları:

- E.C.3.1 Ester bağıny hidroliz edenler
- E.C.3.2 Glikozil bileşiklerini hidroliz edenler
- E.C.3.3 Eter bağıny hidroliz edenler
- E.C.3.4 Peptid bağıny hidroliz edenler
- E.C.3.5 Peptid dışında kalan C-N bağıny hidroliz edenler
- E.C.3.6 Asit anhidrit bağıny hidroliz edenler [121]

4.5.3.4 Liyazlar

Genelde H-X Őeklindeki fonksiyonların C=C, C=O ve C=N ĉifte bağıny katılımy veya ĉıkıřını sağılayan reaksiyonları katalizini gerĉekleřtiren enzim sınıfıdır [116]. Genel reaksiyon tipi Şekil 4.5'deki gibidir:



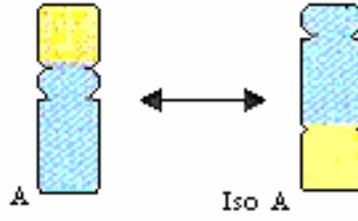
Şekil 4.5 Liyazların genel reaksiyonu

Alt grupları:

- E.C.4.1 C-C bağıny bolenler
- E.C.4.2 C-O bağıny bolenler
- E.C.4.3 C-N bağıny bolenler
- E.C.4.4 C-S bağıny bolenler
- E.C.4.5 C-halojenür bağıny bolenler [121]

4.5.3.5 İzomerazlar

ĉifte bağıny bölge değışimi, Z/E ve cis/trans izomerizasyon, rasemizasyon ve epimerizasyonları katalizlemektedirler [116]. Genel reaksiyon tipi Şekil 4.6'deki gibidir:



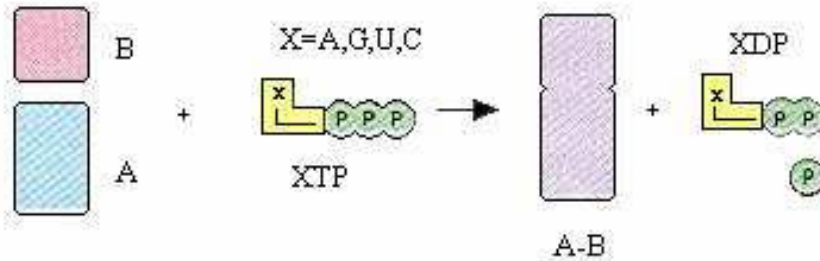
Şekil 4.6 İzomerazların genel reaksiyonu

Alt grupları:

- E.C.5.1 Rasemaz ve epimerazlar
- E.C.5.2 Cis-Trans izomerazlar
- E.C.5.3 Moleküller arası oksido-redüktazlar
- E.C.5.4 Moleküller arası transferazlar
- E.C.5.5 Moleküller arası liyazlar [121]

4.5.3.6 Ligazlar

ATP enerjisi sayesinde C-O, C-S, C-N ve C-C gibi katılımları katalizleyen enzim grubudur [116]. Genel reaksiyon tipi Şekil 4.7'deki gibidir:



Şekil 4.7 Ligazların genel reaksiyonu

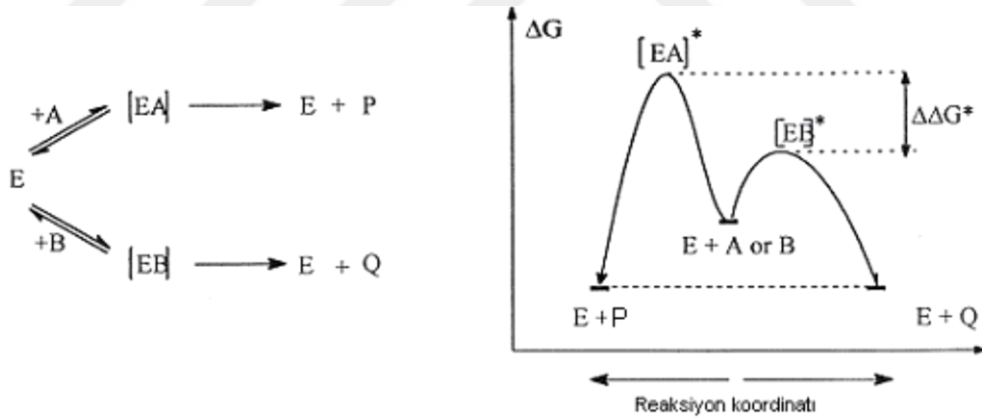
Alt grupları:

- E.C.6.1 C-O bağlarını oluşturanlar
- E.C.6.2 C-S bağlarını oluşturanlar
- E.C.6.3 C-N bağlarını oluşturanlar
- E.C.6.4 C-C bağlarını oluşturanlar [121]

4.5.4 Enzimlerin Asimetrik Sentez ve Kinetik Rezolüsyonda Kullanımı

Biyoteknolojik yöntemler, kimyasal katalizörlerle yapılan asimetrik sentez metotlarına kıyasla üstün özellikler göstermektedir. Enzimler kimyasal katalizörlere göre aktivasyon enerjisini daha fazla düşürdüklerinden etkili ve seçicidirler. Genel asimetrik sentez metodlarıyla çok daha zor koşullarda hatta bazen iki veya daha fazla basamakta sentezlenebilen kiral bir bileşik, biyoteknolojik metodlarla normal koşullarda (Normal pH değeri, oda sıcaklığında, 1 atm'de v.b.) yüksek enantiomerik fazlalıkta sentezlenebilmektedir [102].

Enzimlerin kullanım alanlarının bir diğeri ise, rasemik karışımların kinetik rezolüsyonudur. Enzimler substratın bağlanmasıyla oluşturdukları E-S (Enzim-Substrat) geçiş kompleksiyle reaksiyonun aktivasyon enerjisini düşürürler (Şekil 4.8). Enzimlerin spesifikliği, E-S kompleksi oluşumundaki aktivasyon enerjisiyle doğrudan ilgilidir. Enantiomerik karışımlar için E-S kompleksinin aktivasyon enerjisi farklıdır ve bu fark arttıkça seçicilikte artmaktadır. Rasemik karışımların ayrılmasında enzimlerin bu özelliklerinden yararlanılmaktadır [102].



Şekil 4.8 Enzimatik kinetik rezolüsyon enerji diyagramı

(E= enzim, A ve B=enantiyomer çifti, P ve Q= enantiyomerik ürünler, [EA] ve [EB]= enzim-substrat kompleksi, $\Delta\Delta G^*$ = aktivasyon enerjileri farkı)

Enzimatik kinetik rezolüsyon ile rasematların ayrıştırılmasında en çok kullanılan enzim sınıfı hidrolazlardır. Kullanılan hidrolazların büyük çoğunluğunu lipaz enzimleri oluşturmaktadır [102].

4.6 Lipaz Enzimi

Lipazlar “serin hidrolaz” grubuna ait enzimler olup geniş bir substrat aralığına sahiptirler. Bilinen diğer isimleri; gliserol ester hidrolaz, triaçil gliserol hidrolaz ve tributiraz'dır [121].

— E.C.3. Hidrolazlar

— E.C.3.1. Ester bağına etki edenler

— E.C.3.1.1. Karboksilik ester hidrolazlar

— E.C.3.1.1.3 Triaçilgliserol lipaz [121]

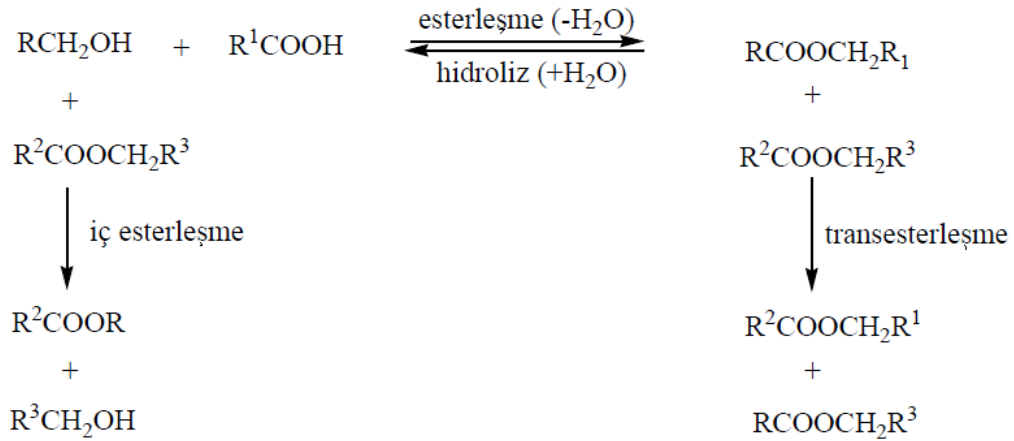
Lipazlar, seçicilik gösterdikleri substratın hidroliz reaksiyonları yanında esterleşme, iç esterleşme ile trans-esterleşme reaksiyonlarını da kolaylıkla katalizlemektedirler [102].

Genel reaksiyon formülü:



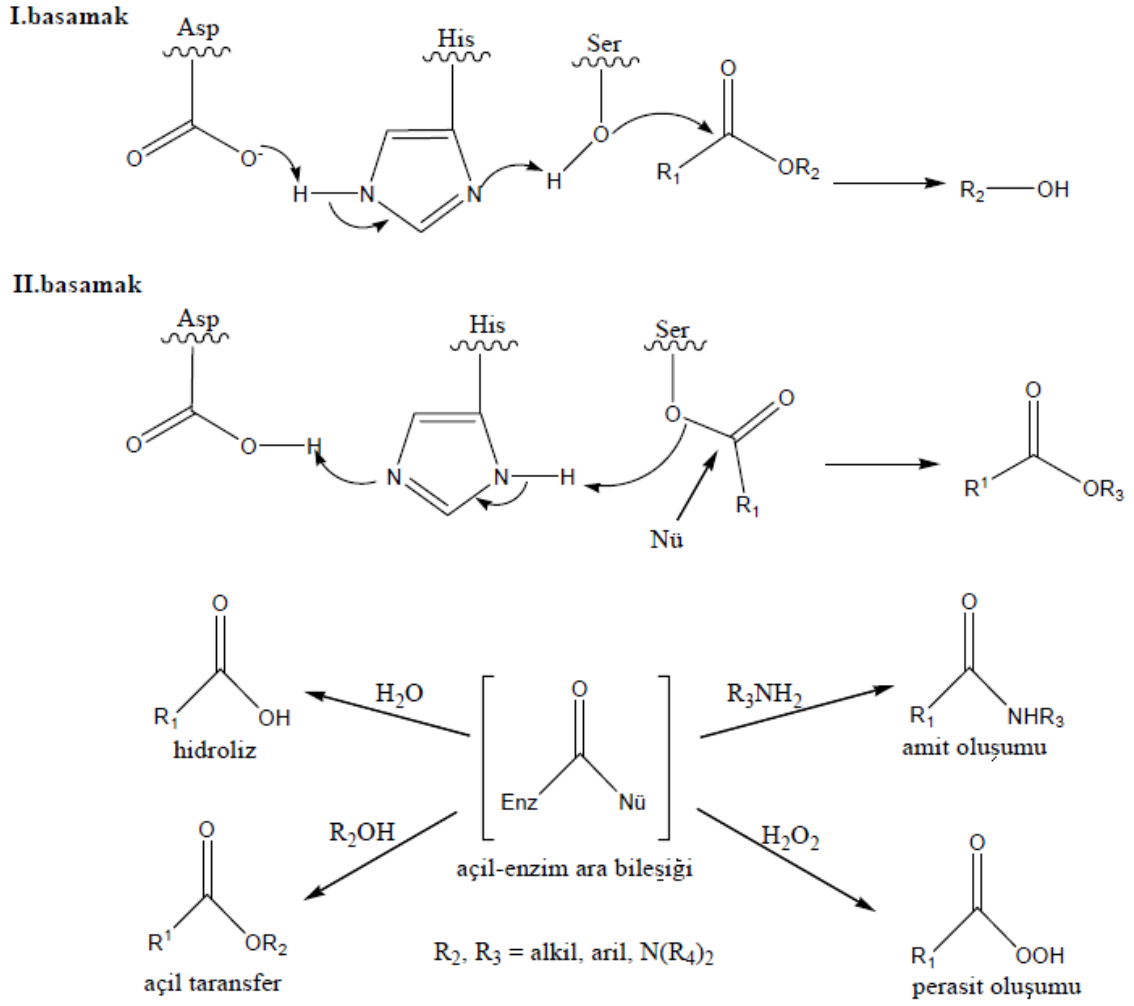
şeklindedir.

Reaksiyon modeli Şekil 4.9’de verilmiştir:



Şekil 4.9 Lipaz katalizli reaksiyonların genel şeması

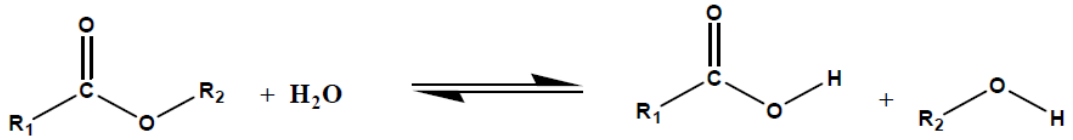
Serin hidrolazların katalitik bölgesi; aspartik asit, histidin ve serin amino asit içeren “katalitik triad” üçlü grubundan oluşur. Reaksiyon üçlü grup üzerinden gerçekleşmektedir. Katalitik bölge ve reaksiyon mekanizması birçok lipaz enzimi için benzerlik göstermektedir (Şekil 4.10) [102].



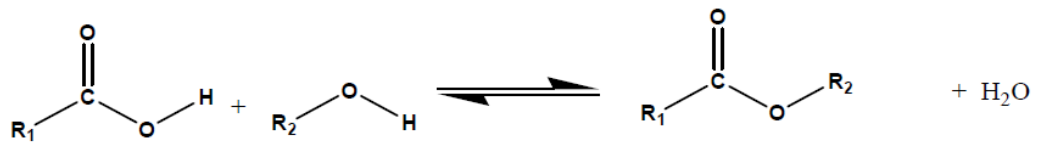
Şekil 4.10 Serin hidrolaz mekanizması

4.6.1 Lipazların Katalizlediği Tepkimeler

Lipazlar; hidroliz, esterleşme ve transesterleşme tepkimelerini katalizlemektedir (Şekil 4.11, 4.12) [123].



Şekil 4.11 Lipazların katalizlediği hidroliz tepkimeleri



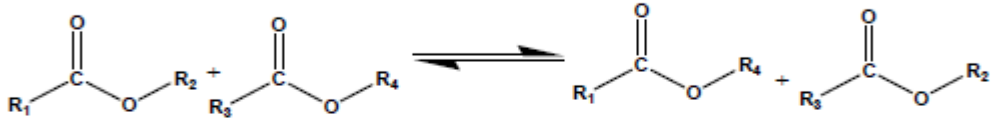
Şekil 4.12 Lipazların katalizlediği esterleşme tepkimeleri

Transesterleşme tepkimeleri esterdeki açil grubu değişimini, bir asit ile yapıyorsa asidoliziz; alkol kullanılıyorsa alkoliziz; başka bir ester kullanılıyorsa interesterleşme; amin kullanılıyorsa aminoliziz ismini almaktadır (Şekil 4.13) [123].

A. Asidoliziz



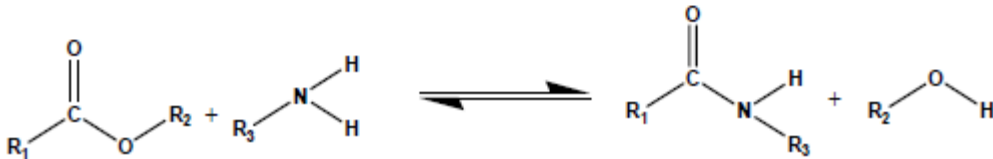
B. İnteresterleşme



C. Alkoliz



D. Aminoliziz



Şekil 4.13 Lipazların katalizlediği transesterleşme tepkimeleri

4.6.2 Lipazların Avantajları

Lipazların doğal substratları trigliseridlerdir ancak; esterler, amidler, polioli/poliasit esterleri ve bunların alkolleri de lipaz enzimi tarafından substrat olarak kabul edilmektedir. Lipazlar, kiral asit esterlerinin hidrolizine kıyasla kiral alkol esterlerinin hidrolizi için daha uygundur. Lipaz enziminin; hidroliz ve esterleşme reaksiyonlarını katalizleme özelliği, substrat aralığının geniş olması, düşük fiyatlı ve bütün canlılarda bulunmasından dolayı kolay elde edilebilirliği organik sentez reaksiyonlarında kullanımlarının artmasını sağlamaktadır [102].

Lipazların organik çözücüde aktivite gösterebilmesi özelliği ile sulu ortamda çözünemeyen bileşiklere uygulanabilirliği sağlanmıştır. Enzimler genellikle ince bir su

tabakasıyla (hidrat kabuğu) kaplıdır. Hidrat kabuğu ile lipazlar, organik solventlerde kararlılığını koruyarak aktivitesini yitirmemektedir. Örneğin, *Parain Pankreatik lipazı* toluen ya da dekanol içinde 100°C’de birkaç saat kararlı kalabilmektedir. Lipaz katalizli reaksiyonlar organik solventte gerçekleştirildiğinde enzim aktivitesi için solvent seçimine dikkat edilmesi gerekmektedir. Seçilen organik solvent enzimin hidrat kabuğuna zarar vermemelidir. Lipaz enzimi ile 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 imkân sağlamaktadır [102].

4.6.3 Yaygın Olarak Kullanılan Lipaz Çeşitleri

Enzim katalizli esterifikasyon ve hidroliz reaksiyonlarında yaygın olarak kullanılan lipazlar “şampiyon lipazlar” olarak adlandırılan *Candida* türü lipazlar, *Pseudomonas* türü lipazlar, *Mucor* türü lipazlar ve *Porcine Pancretic* lipazlarıdır [102].

4.6.3.1 *Candida* türü lipazlar

Candida türü lipaz enzimleri, *Candida lipolytica*, *Candida antarctica* ve eskiden *Candida cylindracea* olarak tanımlanan *Candida rugosa* mayalarından elde edilmektedir. *Candida* enzimleri, sekonder alkol esterlerinin rezolüsyonunda ve α -substitüye karboksilatların rezolüsyonunda yaygın olarak kullanılmaktadırlar. *Candida cylindracea* (*C. Rugosa*) lipazı ticari olarak birçok kaynaktan elde edilebilmektedir. Farklı kaynaklardan izole edilen *Candida cylindracea*’nın aktivitesinde değişiklik görülebilmesine karşın seçicilikleri benzer olmaktadır [102].

Candida cylindracea’nın substrat olarak kalabalık grup içeren esterleri tercih etmesinden ötürü halkalı yapıya sahip alkol esterlerinin hidrolizinde *C. cylindracea* enzimleri yaygın olarak kullanılmaktadır [102].

(*R-S*)-ketoprofen’in enantiyoseçilimi amacıyla *Candida antarctica* lipaz B (CALB)’nin enzimatik membran reseptörleri üzerindeki etkinliği araştırılmış; yüksek reaksiyon

kapasitesi, iyi termal durağanlık ve tekrar kullanılabilirlik gibi avantajlarının olduğu saptanmıştır [124].

4.6.3.2 Pseudomonas türü lipazlar

Pseudomonas Fluorescens, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Pseudomonas Cepacia* ve *Pseudomonas Glumae*'den izole edilmiş bakteriyal lipazlar etkin seçicilik gösteren biokatalizörlerdir. Aktif bölgeleri X-ray analiziyle aydınlatıldığında bu bölgelerinin *Candida Cylindracea*'ya göre daha dar olduğu belirlenmiştir. *Pseudomonas* lipazları büyük substratlarla etkileşimde başarılı olamamalarına rağmen substrat molekülünde meydana gelen küçük dallanmalarla çok yüksek seçiciliğe ulaşabilmektedirler. Sekonder alkollerin R-ester hidrolizi için *Pseudomonas* enzimleri tercih edilmektedir [102].

4.6.3.3 Mucor türü lipazlar

Mucor lipazları olan *Mucor Miehei* ve *Mucor Javanicus* biyotransformasyon amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. *Mucor* enzimleri, katalizlediği substratın yapısı ve hidrolitik seçicilikleri bakımından *Pseudomonas* türü lipazlara benzerler. *Mucor* türü enzimlerin aktif bölgelerinin üç boyutlu yapısının aydınlatılmasıyla aktif bölgelerinin diğer lipaz enzimlerine uygun olarak "Asp-His-Ser" üçlüsünü (triad) içerdikleri bildirilmiştir [102].

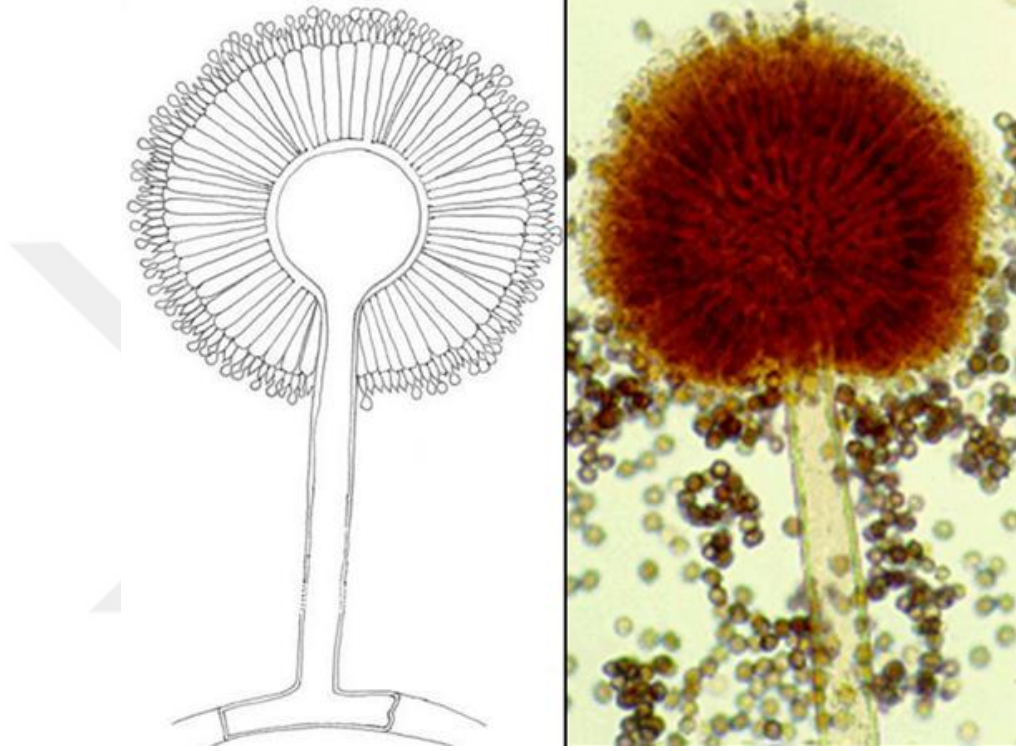
4.6.3.4 Porcine Pancreatic Lipaz (PPL)

PPL, piyasada "porcine" ya da "hog" olarak tanınan ve Türkçe karşılığı "domuz" anlamına gelen domuz pankreasından izole edilen ve ucuz olduğu için yaygın olarak kullanılan bir enzimdir. Saf olarak izole edilmeyen karışımları, PPL'in yanında birçok hidrolaz enzimi içerir. Safsızlık olarak nitelendirilen hidrolazların başlıcaları; kolesterolesteraz, fosfo lipazlar, karboksipeptidaz B ve diğer bilinmeyen hidrolazlardır. PPL enzimi primer alkollerin esterlerinin hidrolizinde kullanılır [102].

4.6.3.5 Aspergillus Lipaz

Aspergillus'lar yeryüzünde her yerde yaygın olarak bulunan hifli mantarlardır. Toprakta çürüyen bitki materyalleri doğal yaşam ortamını oluşturur. Bu mantarlar ürettikleri

enzimler sayesinde organik maddeleri ayrıştırarak kullanır ve saprofit olarak yaşarlar. Uygun koşullarda bitki, hayvan ve insanlarda patojen hale geçebilirler. Üreme hızları yüksektir. *Aspergillus* türleri zincirler halinde çok miktarda konidi üretirler ve bunlar olgunlaştıklarında ortama dağılırlar. Konidyumlar genelde 2-5 μ çapındadırlar ve hava ile taşınırlar. Konidyumlar bir hücreli, duvarları düz veya pürüzlü, dikenli; şeffaf veya pigmentli olabilirler (Şekil 4.14) [125].



Şekil 4.14 *Aspergillus niger* morfolojik görüntüsü [126]

Aspergillus türü olan *Aspergillus niger* için minimum gelişme sıcaklığı 6-8°C, optimum 35-37°C ve maksimum 45-47°C'dir. Kserofilik bir küf olup, 35°C'de 0.77 a_w gelişebildiğini belirtmiştir. Yüksek su aktivitesine sahip ortamda pH=2'nin altında gelişme göstermektedir. *Aspergillus niger* sitrik asit, glukonik asit gibi organik asitleri ve alfa amilaz, glukoz oksidaz, invertaz, pektinaz, lipaz gibi enzimleri sentezlemektedir [127].

4.6.3.6 Amano Lipaz

Ticari olarak *Aspergillus niger*, *Pseudomonas fluorescens* ve *Pseudomonas cepacia*'dan izole edilen amano lipazlar; allilik ve alifatik klorohidrinler [128], rasemik α -fenilalanin

amidlerin [129], asetamid fenilpropanoik asit ve türevlerinin [129] reaksiyonlarında ve özellikle sekonder alkollerin enzimatik kiral hidrolizinde görev almaktadırlar [130].

4.6.3.7 Rhizopus Lipaz

Flamentli funguslardan olan *Rhizopus*'tan elde edilen lipazlar, primer alkollerin 1 ve 3. bölgelerindeki üstün seçicilikleri nedeniyle kimyasal sentezlerde sıkça kullanılmaktadırlar [126]. Özellikle triaçilgliserolden bazı özel endüstriyel ürünün hidrolizi, *Rhizopus* lipazlarının 1,3-regioseçicilikleri ile katalizlenmektedir [131]. *Rhizopus* lipazları bu üstün özellikleri nedeniyle enantioselektif kataliz ile kimyasal olarak değerli saf ürün eldesinde tercih edilmektedirler [126].

Rhizopus niveus'tan elde edilen lipaz enziminin (RNL) *sn*-2 pozisyonundaki oleik asite etki ederek doymuş yağların interesterifikasyonunu arttırdığı saptanmıştır [132].

Optimum koşulları pH=8,5 ve 40°C olan *Rhizopus oryzae* lipazları (ROL) *Pichia pastoris* ve *Saccharomyces cerevisiae*'den elde edilebilmektedir [126].

Filamentli bir fungus olan *Rhizopus arrhizus*'dan hücre içi ve hücre dışı elde edilen lipaz enzimleri, doymuş ve doymamış yağların interesterifikasyonundaki üstünleri nedeniyle ilaç sanayinde sıklıkla kullanılmaktadırlar [133]. *Rhizopus arrhizus* lipazının (RAL) pH=6,9 ve %95 su ortamında 0,3 mm partikül boyutlu buğday kepeği üzerine 1.10^8 spor/ml konsantrasyonda maksimum enzim aktivitesi gösterdiği saptanmıştır [134].

4.6.3.8 Wheat Germ Lipaz (WGL) (Buğday Ruşeym Lipazı)

Besleyici değerinin çok yüksek olmasının yanı sıra, tat ve lezzetinin de güzel oluşu nedeniyle buğday ruşeymi (Şekil 4.15), gıda maddelerinin protein ve vitaminlerce zenginleştirilmesine kullanılabilir çok uygun bir kaynaktır. Özellikle de ekmekte, bisküvilerde, keklerde, bebek mamalarında ve bazı et ürünlerinde kullanıldığı bilinmektedir [135].

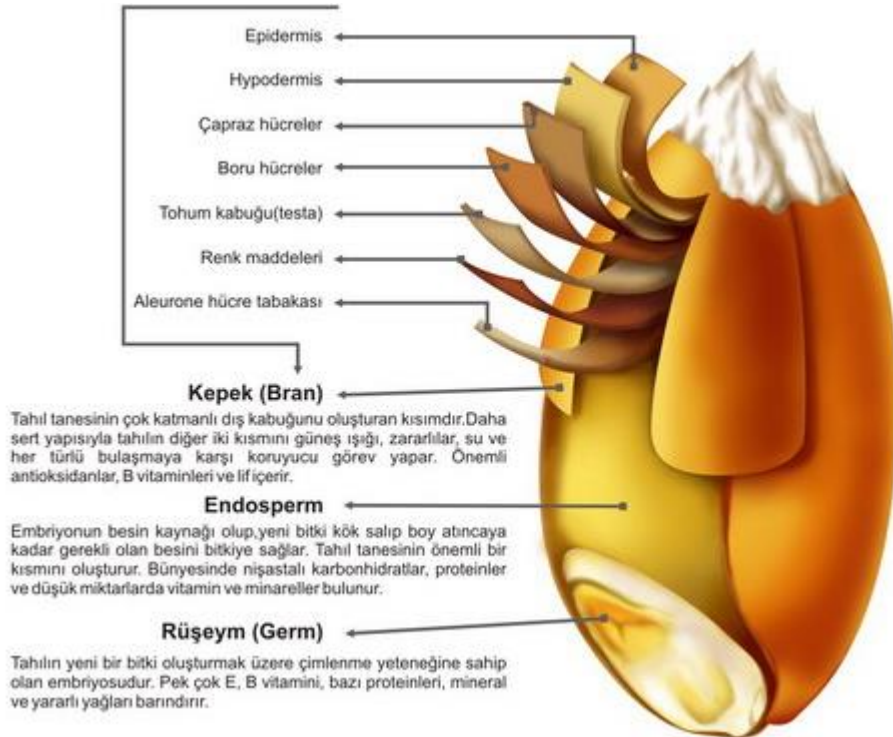
Ruşeym buğday ununa göre, daha fazla protein (3 kat), yağ (7 kat), şeker (15 kat), mineral madde (6 kat) içeriğine sahiptir. İçerdiği proteinlerin biyolojik değeri, hayvansal kaynaklı proteinlere yakındır. Yapılan çalışmalar buğday ruşeymi ve ekstraktlarının antikanserojenik özelliğe sahip olduğunu göstermektedir. Tokoferollerin (E vitamini) en

zengin kaynağı olan ruşeym; aynı zamanda B grubu vitaminlerin, doymamış yağ asitlerinin (özellikle oleik, linoleik ve α -linoleik asit) ve fonksiyonel özellikli fitokimyasalların (flavonoidler ve steroller), esansiyel amino asitlerin oldukça zengin bir kaynağıdır [135].



Şekil 4.15 Buğday ruşeymi

Buğday tanesi dıştan içe doğru; perikarp (%3,5- 5,5), testa (%0,5), hiyalin tabakası (%2), aleron hücreleri (%6-9), unlu endosperm tabakası (%80-85), tanenin ucunda yer alan embriyo (%2-3) ve sakal kısımlarından oluşmaktadır (Şekil 4.16) [136].



Şekil 4.16 Buğday tanesinin kısımları

Buğday tanesinin kimyasal bileşimi; karbonhidratlar (%65–75), proteinler (%7–18), su (%8–14), lipitler (%1–3), mineral maddeler (%1–2) ve eser miktarda vitaminler ile enzimlerden oluşmaktadır. Bu maddelerin tanedeki oranları; çeşide, yetiştirme koşullarına ve iklime bağlı olarak değişmektedir [136].

Buğday ruşeymi lipazı olan wheat germ lipazının (WGL) optimum çalışma değerleri; pH=7,5'da 30°C sıcaklık ve 3.30×10^3 IU/ml konsantrasyon olarak belirlenmiştir [137].



MATERYAL METOD

Proje kapsamında Aldrich ve Alfa Aesar firmalarından ticari olarak elde edilen 5-metil-1,3-sikloheksandion bileşiği üzerinden çeşitli kimyasal reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir.

Saflaştırmalar öncelikle kolon kromatografisi ile Merck silika jel 60 (0,063- 0.200 mm) kullanılarak yapıldı. Kolon kromatografisi ile saflaştırılmayan bileşikler preparatif tabaka kromatografisi yöntemiyle saflaştırıldı. Reaksiyon ve saflaştırma sonuçları ince tabaka kromatografisi (İTK) ile Merck silika jel 60 F₂₅₄ ve UV lambası camag UV (254nm) kullanılarak belirlendi. TLC (İTK) sonuçları hazırlanan *p*-anisalhehit boyası ile boyanarak ısı yardımı ile sabitlendi.

Sentezlenen bileşiklerin yapı tayini, uluslararası standart TMS (tetrametilsilan), standart çözücü olarak CDCl₃ (dötörokloroform) (¹H: δ = 7.27) (¹C: δ = 77.0, 96.4) kullanılarak Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisiyle (NMR) (Bruker Avance III 500 Mhz) gerçekleştirildi. IR spektrumları Perkin Elmer Spectrum One cihazında belirlendi. Erime noktası tayini Büchi Melting Point B-540 cihazıyla yapıldı.

Kemosentez reaksiyonlarında kullanılan lipazlar; *Aspergillus* lipaz (*Aspergillus sp.* Lipaz) BioChemika (84205), CCL (*Candida cylindracea* Lipaz) BioChemika (62316), CAL (*Candida antarctica* Lipaz) BioChemika (62299), HPL (Hog pancreas Lipaz) BioChemika (62300), RAL (*Rhizopus arrhizus* Lipaz) BioChemika (62305), RNL (*Rhizopus niveus* Lipaz) BioChemika (62310) lipaz basic kit ve WGL (Wheat germ Lipaz) BioChemika (62306) extension kit olmak üzere Fluka'dan, Amano Lipase PS Aldrich'den temin edildi.

5.1 Kullanılan Kimyasallar

Kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 5.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 5.1 Kullanılan kimyasalların marka kodları

Kimyasal Adı	Marka	Kod Numarası
5-Methylcyclohexane-1,3dione %98 (C ₇ H ₁₀ O ₂)	Alfa Aesar	A15280
(5-Methyl-1,3-cyclohexanedione)		
(5-Metil-1,3-sikloheksandion)	Sigma Aldrich	279951
Benzen	Merck	1.01783.2500
Dietil eter	Merck	1.00091.5000
Kloroform	Merck	1.02445.2500
n-Hexane for HPLC	Merck	1.04391.2500
2-Propanole for HPLC	Merck	1.01040.2500
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

Çizelge 5.1 Kullanılan kimyasalların marka kodları (devamı)

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
Sodyum bi karbonat (NaHCO ₃)	Teknik	-
Sodyum hidroksid	Merck	106482
Sülfirik asit	Merck	1.00731.2500
Magnezyum sülfat (MgSO ₄)	Teknik	-
Potasyum karbonat (K ₂ CO 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 ₂ HPO ₄)	Merck	1.05101.1000
Potasyum dihidrojen fosfat (KH ₂ PO ₄)	Merck	1.04873.1000
Mangan II asetat	Fluka	63537
Potasyum permanganat (KMnO ₄)	Merck	1.05082.0250
Mangan (III) asetat	Merck	805929.0100

Çizelge 5.1 Kullanılan kimyasalların marka kodları (devamı)

<i>p</i> -anisaldehit (4-Methoxybenzaldehyde)	Aldrich	88107
	Merck	8.22314.0250
H ₂ O	Ultra saf	-
Kloroasetaldehyd	Aldrich	31,727-6
Diklorometan	Merck	106049
Benzilamin	Aldrich	185701
Silica Gel 60 F ₂₅₄ 25 TLC alüminyum sheet 20x20	Merck	1.05554.0001
Silica Gel 60 (0,063-0.200 mm) for column 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
CCL (<i>Candida cylindracea</i> Lipaz)	Fluca	62316
CAL (<i>Candida antarctica</i> Lipaz)	Fluca	62299
HPL (Hog pancreas Lipaz)	Fluca	62300
RAL (<i>Rhizopus arrhizus</i> Lipaz)	Fluca	62305

Çizelge 5.1 Kullanılan kimyasalların marka kodları (devamı)

RNL (<i>Rhizopus niveus</i> Lipaz)	Fluca	62310
Aspergillus Lipaz (<i>Aspergillus sp.</i> Lipaz)	Fluca	84205
Lipase extencion kit	Fluca	62323
WGL (Wheat germ Lipaz)	Fluca	62306
Amano Lipase PS, from <i>Burkholderia cepacia</i> (<i>Pseudomonas cepacia</i>)	Aldrich	534641

5.2 Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihazlar Çizelge 5.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 5.2 Kullanılan cihazların marka modelleri

Cihaz Adı	Markası	Modeli
Su Distilasyon Cihazı	Millipore	Milli-Q Akademik A10
Evaporatör	Bucci	Rotavapor R-200
Ultrasonik Su Banyosu	Bandelin	RK-31
Vakum pompası	Welch	2522C-02
Manyetik Isıtıcı Karıştırıcı	IKA	Yellow Line MSC Basic C
Çalkalayıcı Su Banyosu	Gfl Gesellschaft Labortechnik	1083/1086
pH Metre	Hanna Instruments	pH Microprocessor pH Meter- 520518
Zaman ayarlı etüv	WTC binder	1505330000202 #980706

Çizelge 5.2 Kullanılan cihazların marka modelleri (devamı)

Otomatik pipet	Socorex Acura	Acura Manuel	825-16061880
Analitik Terazi	Precisa	320-9204-007 XB	220A SCS/ W50124
Erime Noktası Tayini Cihazı	Büchi	Melting Point B-540	
HPTLC (Yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi)	CAMAG	Linomat5-	022.7808/150428
		Reprostar3-	022.9610/150515
HPLC (Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi)	Shimadzu	Kontrolör	CBM-20A
		UV Dedektörü	SPD-M20A 230V
		Pompa 1	LC-6AD
		Kolon fırını	CTO-20AC
IR	Perkin Elmer	Spectrum One	
OD-H Kiral Analitik Kolon (Cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate))	Daicel Corporation- Chiral 250x4.6 mm, 5 µm (Analytical)	14325	
OJ-H Kiral Analitik Kolon (Cellulose tris(4-methylbenzoate))	Daicel Corporation- Chiral 250x4.6 mm, 5 µm (Analytical)	17325	

Çizelge 5.2 Kullanılan cihazların marka modelleri (devamı)

AD Kiral Analitik Kolon (Amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate))	Daicel Corporation- Chiral 250x4.6 mm, 10 µm (Semi-Prep)	19025
UV lamba	CAMAG	022.9120/1305
NMR	Bruker	Avance III 500 Mhz

5.3 İzolasyon ve Yapı Tayininde Kullanılan Yöntemler

5.3.1 Anisaldehit Ayıracı

Projede kullanılan benzofuranon ve indol gibi bileşiklerin TLC yöntemiyle alüminyum tabakalardaki konumlarının ve *R_f* değerlerinin belirlenmesinde kullanılan floresans özellik gösteren anisaldehit boyasından yararlanılmaktadır. Boyanan tabakanın ısıtılması ile bileşiklerin renk değiştirerek konumlarının belirlenmesi esasına dayanır. Sırasıyla 169 ml %95'lik EtOH (etanol), 6,25 ml H₂SO₄ (sülfirik asit), 1,875 ml AcOH (asetik asit) ve 9 ml *p*-anisaldehit ışık geçirmeyen bir kaptaki karıştırılarak hazırlanan anisaldehit soğukta muhafaza edilmelidir.

5.3.2 Kromatografik Yöntemler

Kimyasal reaksiyonlar ile elde edilmesi istenen saf maddelerin izolasyonu amacıyla, kolon kromatografisi (CC), ince tabaka kromatografisi (TLC), yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (HPTLC) kullanılmıştır. Biyotransformasyon çalışmaları sonucunda elde edilen bileşiklerin içeriklerinin belirlenmesinde ise yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılmıştır.

5.3.2.1 Kolon Kromatografisi (CC)

Sentezler sonucu elde edilen bileşiklerin saf madde izolasyonu için öncelikle kolon kromatografisinden yararlanılmıştır. Bu amaçla kolon kromatografisinde ayrımı

yapılacak karışımların önce ince tabaka kromatografisi sonuçları incelenmiş, geliştirme çalışmaları doğrultusunda uygun çözücü belirlenerek uygun sistem kolon kromatografisinde uygulanmıştır.

Kolon kromatografisi cam kolonlarda dolgu maddesini ıslak yükleme yaparak gerçekleştirilmiştir. Ekstre uygun bir çözücüde çözülmüştür ve ardından içine silika jelin bir miktarı eklenmiştir. Kolona ilk olarak silika jel doldurulmuş ve vakum pompası yardımıyla kolon içine iyice oturması sağlanmıştır. Silika jelin kolon içindeki üst tabakası düzleştirildikten sonra toz silika jel ve ekstre karışımı kolona doldurulmuştur. Tekrar vakum pompası yardımıyla bu ikinci katmanın kolona düzgün bir şekilde oturması sağlanmıştır.

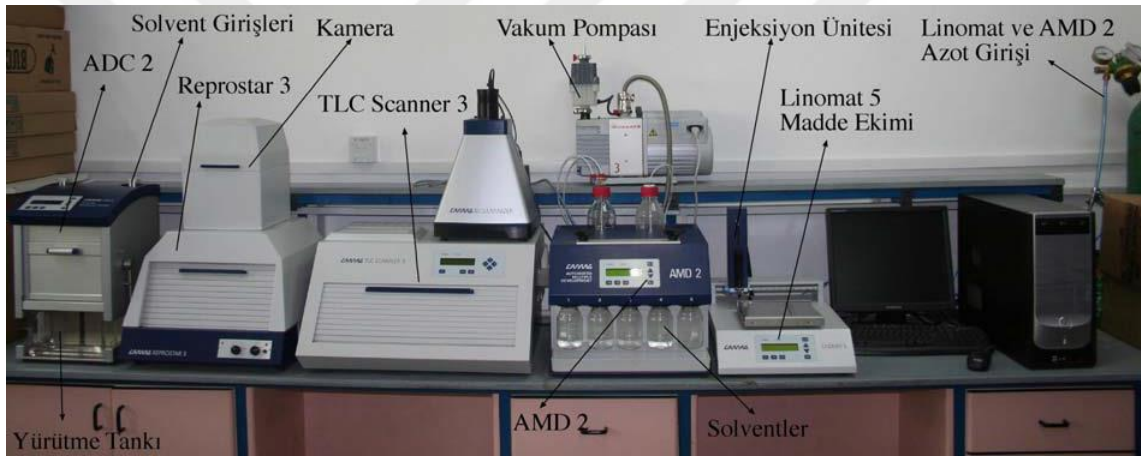
5.3.2.2 İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

İnce tabaka kromatografisi, bileşiklerin hassas saflaştırma gerektiren izolasyonlarında kullanılmıştır. Camag TLC hazırlama aparatı ile 0.5 µm kalınlığında hazırlanan plaklar ile ticari olarak hazır elde edilen Merck cam (105715) ve alüminyum (105554) hazır plaklar ince tabaka kromatografisinde kullanılmıştır. Hazır plaklar daha ince ayırma gerektiren durumlarda kullanılmıştır. Laboratuarda hazırlanan plakalar için 100 g Silika Jel 60 G (1/2; Silika Jel 60 F₂₅₄/Silika Jel 60 HF₂₅₄) ve 50 g Silika Jel 60 H₂₅₄₊₃₆₆ bir balon jöjeye doldurulmuş ve içerisine 350mL distile su eklenerek karışım akışkan hale gelene kadar çalkalanmıştır. Elde edilen süspansiyon Camag TLC hazırlama aparatı yardımıyla 20 x 20 cm boyutlarındaki cam plakların üzerine 0.5 µm kalınlığında çekilmiştir. Hazırlanan plaklar kullanımdan önce oda sıcaklığın kurutulmuş ardından etüvde 100°C'de bir saat süre ile aktive edilmiştir. İnce tabaka kromatografisi çözücü sistemine karar verilen madde karışımı uygun çözücüde çözüldürülerek, alüminyum plakların tabanından 1 cm yukarıya ince kapiler boru yardımıyla ekilmiştir. Ekim yapılan plaklar uygun çözücülerin bulunduğu cam tankların içerisine yerleştirilerek yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir. Yürüme işlemi çözücü sınırı plağın en üst noktasına geldiğinde durdurulmuştur. Bu plaklar yapılan ayırımın görülmesi için karanlık odada Camag marka UV lamba altında 254 nm ve 366 nm'de değerlendirilmiştir. Daha düşük dalga boylarında absorbans veren maddelerin belirlenmesi amacıyla anisaldehit belirteci değerlendirme yapılacak plakanın bir kısmına püskürtülmüş ve hotplate üzerinde ısıtılarak UV ışıkta

görünmeyen maddelerin görünmesi sağlanmıştır. İnce tabaka kromatografisinde kullanılan çözücü sistemleri literatürdeki veriler ve ayrımı yapılacak karışımın verdiği tepkiler doğrultusunda deneme yanılma ile bulunmuştur.

5.3.2.3 Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (HPTLC)

Ekstrelerin içerdiği maddelerin birbirleriyle karşılaştırılmasında, saf maddelerin R_f değerlerinin bulunmasında ve zor ayrılan maddelerin saflaştırılmasında yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi kullanılmaktadır. Çalışmalarda kullanılan Camag marka HPTLC; Limomat 5 TLC ekim modülü, AMD2 TLC yürütme modülü, ADC2 TLC yürütme modülü, TLC Scanner 3 UV tarama modülü, ve Reprostar 3 TLC görüntüleme modülünden oluşmaktadır (Şekil 5.1) [138].



Şekil 5.1 HPTLC sistemi ve modülleri

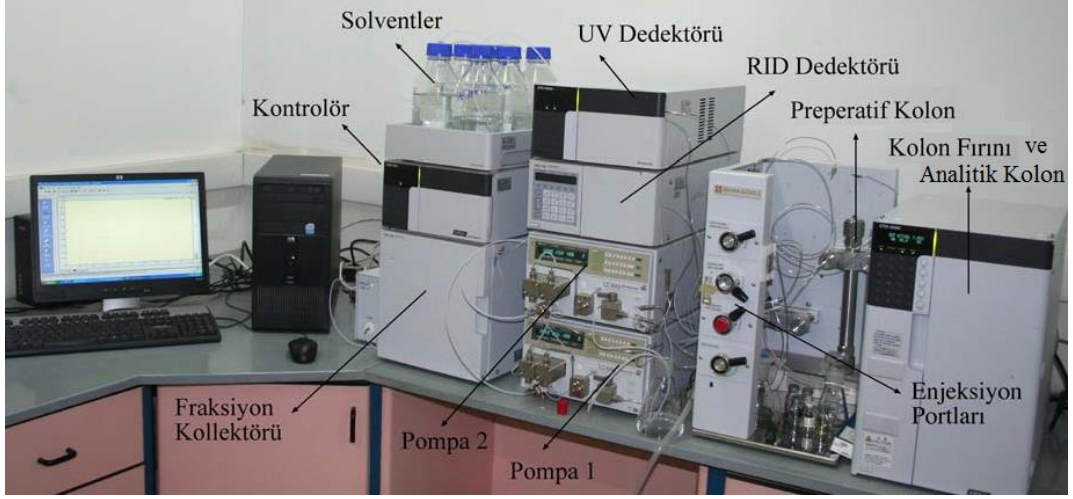
HPTLC cihazı ile birbirinden zor ayrılan maddelerin ayrılması için hazır cam ve alüminyum TLC plakları kullanılmıştır. Yapılan sistem çalışmaları ile en iyi ayrımın olduğu çözücü sistemi belirlenmiştir. Proje kapsamında HPTLC cihazının Linomat 5 Madde Ekimi ünitesi ve Enjeksiyon ünitesinden faydalanılmış preparatif TLC plakaların hassas ekim sağlanarak uygun çözücü sisteminde ayırım gerçekleştirilmeye çalışılmıştır.

TLC sonuçlarının görüntülenmesi fotoğraflanması amacıyla Reprostar 3 birimi ve kamerasından yararlanılmıştır.

5.3.2.4 Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi; madde karışımlarından saf maddelerin izolasyonunda (preparatif) ve madde miktarlarındaki oran ve değişimler gibi etkenlerle kalitatif ve kantitatif tayininde (analitik) kullanılmaktadır. Araştırmada kullanılan Shimadzu marka HPLC CBM-20A model kontrolör, 2 adet LC-60AP pompa, SPD-M20A Diode Array UV dedektörü ve CTO-2AC kolon fırını modüllerinden oluşmaktadır. Şekil 5.2'de HPLC cihazı ve modülleri görülmektedir. HPLC'de yapılan çalışmalarda OD-H, OJ-H ve AD-H kiral analitik kolonlar kullanılmıştır.

HPLC sistemlerinde, çözücü ve ayrımı yapılan madde çözeltisi içerisinde bulunan çözünmüş hava kromatogramda hayalet piklere neden olabilmektedir. Kullanılacak çözücü sisteminde çözünmüş olarak bulunan hava ultra sonik banyo kullanılarak uzaklaştırılır. HPLC cihazında çalışmaya başlamadan önce cihazdaki solvent boruları içerisinde ve dedektör hücresinde kalmış olabilecek hava boşluklarının sistemden atılması için sistem sadece mobil faz ile bir müddet çalıştırılır. Ayrıca bu esnada kromatogramlarda mobil fazın dedektörde verdiği sinyallerin görülmemesi için bu sinyaller sıfırlanır. Mobil faz içeriği, mobil faz akış hızı, maksimum ve minimum basınç değerleri, analiz süresi, fırın sıcaklığı gibi analiz parametreleri bilgisayardan girildikten sonra uygun bir çözücüde (Merck 2-propanol) hazırlanan madde enjeksiyon portundan loopa enjekte edilir. Looptan maddenin kolona aktarılması ile beraber ayırma işlemi otomatik olarak başlamaktadır. HPLC cihazında yapılan ayırmalarda analiz koşulları (mobil faz türü, mobil faz akış hızı v.b.) literatürde verilen değerlerden faydalanılarak yapılan çözücü ve analitik kolon değişimleriyle, deneme yanılma yöntemi ile bulunmuştur. Analitik ayırmalarda analiz edilecek madde karışımının, enzimatik reaksiyon öncesi ve sonrası maddelerin dedektörde görüldükleri zamanlar belirlenerek optimum pik standardizasyonu gerçekleştirilmiştir. HPLC cihazının pik alan verileri kullanılarak enzimatik biyodönüşümlerin enantiomerik fazlalık (e.e.) değerleri saptanmış ve başarı yüzdeleri kıyaslanmıştır.



Şekil 5.2 HPLC cihazı ve modülleri.

5.3.3 Spektroskopik Yöntemler

5.3.3.1 Infra-Red Spektroskopisi (IR)

Saf maddelerin infra red spektrumları Perkin Elmer Spectrum One cihazında belirlenmiştir. Şekil 5.3'te kullanılan IR spektrometresi görülmektedir. Infra red spektrumları çekilecek az miktardaki saf maddeler uygun bir çözücüde çözüldükten sonra cihazda ATR kristalinin üzerine bir damla olarak damlatılmıştır. Çözücü tamamen uçurulduktan sonra spektrum alınmıştır. Miktarı yeterli maddelerde ise madde kristalin üzerini örtecek şekilde konulup spektrum alınmıştır. Infra red spektrometresinde maddenin yapısında bulunan fonksiyonel gruplar belirlenebilmektedir [138].



Şekil 5.3 IR spektrometre

5.3.3.2 Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (NMR)

Saf maddelerin yapı tayininde temel olarak nükleer manyetik rezonans spektroskopisi kullanılmıştır. Çalışmalarda Bruker Avance III 500 Mhz model NMR kullanılmıştır (Şekil 5.4). NMR spektrumları Uzman Pınar Çağlar tarafından çekilmiştir. Yapı tayinlerinde maddelerin bir boyutlu, iki boyutlu, çoklu puls, NMR spektrumları alınmıştır. NMR spektroskopisinde tek boyutlu yöntemlerinden ^1H NMR ve ^{13}C NMR kullanılmıştır.



Şekil 5.4 NMR cihazı

5.3.4 Erime Noktası Tayini

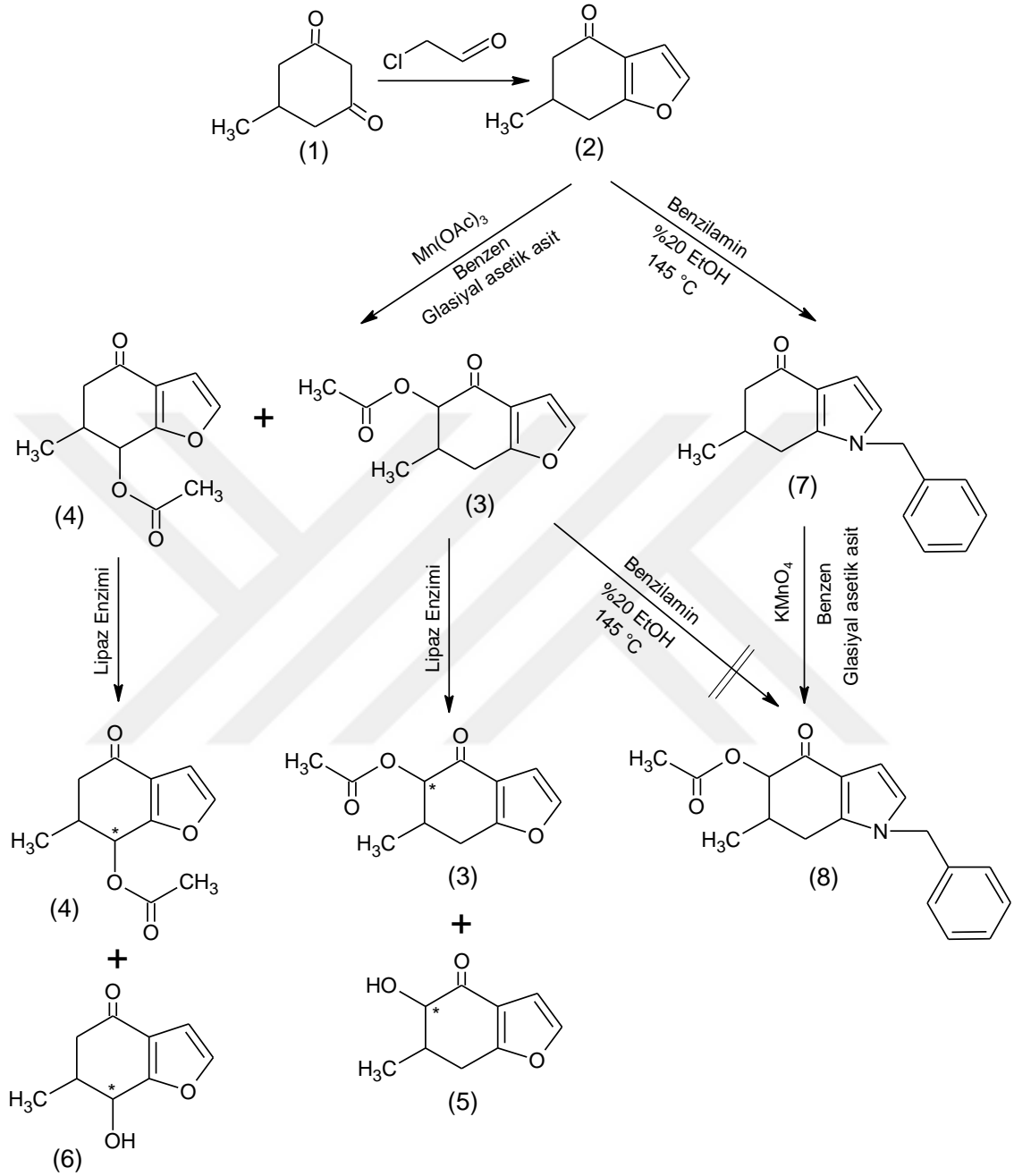
Saf maddelerin erime noktaları Buchi marka B-540 model erime noktası tayin cihazı ile bulunmuştur (Şekil 5.5). Maddelerin erime noktalarını saptamak amacıyla cihazın özel tüplerine saf madde doldurulmuş ve sıkıştırılmıştır. Cihaza yerleştirilen tüpler önceden hazırlanan ısıtma programıyla erime noktasına kadar 1°C artımlarla ısıtılmıştır. Erime noktası katı maddenin homojen sıvıya dönüştüğü noktada ölçülmüştür [138].



Şekil 5.5 Erime noktası tayin cihazı

5.4 Sentez Rotası

Aşağıdaki sentez rotası takip edilmiştir:

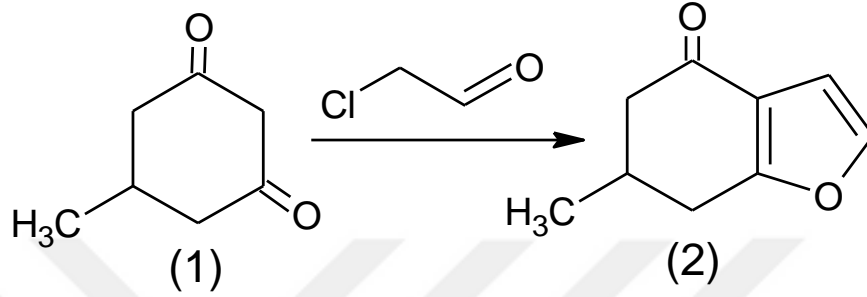


Şekil 5.6 Reaksiyon rotası

5.4.1 6,7-Dihidro-6-metilbenzofuran-4(5H)-on Sentezi

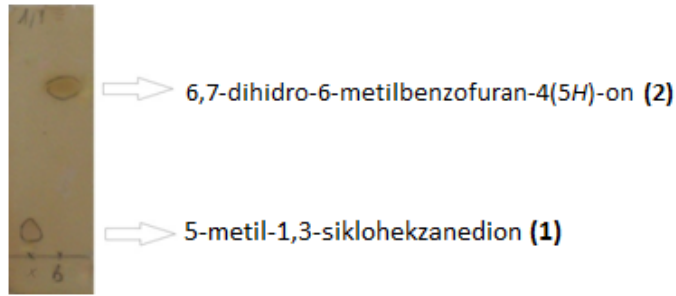
8 ml H_2O içersine 1 g $NaHCO_3$ ve %40'lık 2 ml kloroasetaldehit ($ClOC_2H_3$) eklenmiştir. Karışım 0-5°C'ye soğutularak 9 ml H_2O içindeki 10 mmol 5-metil-1,3-siklohekzanedion bileşiğine (1) dakikada 0,4 ml damlatılarak ilave edilmiştir. Reaksiyon oda sıcaklığında

devam etmiştir. 17 saat sonunda karışıma 10 ml etil asetat (EtOAc) eklenmiş ve reaksiyonun pH'ı ölçülerek (~8,63) pH=1'e ayarlanmıştır. 1 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılan reaksiyonun organik faz ayrımı potasyum karbonat (K₂CO₃) solüsyonu ile gerçekleştirilmiştir. Ayırma hunisinde reaksiyon ortamından uzaklaştırılan organik faz, magnezyum sülfat (MgSO₄) ile kurutulmuştur. Çözücü ortamdaki evaporatör vasıtasıyla uzaklaştırılmıştır.



Şekil 5.7 5-Metil-1,3-sikloheksandion bileşiğinden **(1)** 6,7-dihidro-6-metilbenzofuran-4(5H)-on **(2)** sentezi

Saflaştırma, sentezlenen kristallerin petrol eteri ile yıkanması yoluyla gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma işlemi sonucunda 6,7-dihidro-6-metilbenzofuran-4(5H)-on bileşiği **(2)** elde edilmiştir (Şekil 5.7, 5.8).



Şekil 5.8 Benzofuranon sentezi TLC sonucu

6,7-Dihidro-6-metilbenzofuran-4(5H)-on bileşiği **(2)** için (Şekil Ek 1,2 ve 11):

Erime noktası: 52,1 °C

R_f: 0,75 (Silika jel, 1:1 EtOAc:Hekzan)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.2 (d, J= 6.5 Hz, 3H, -CH₃), 2.26 (dd, J= 11.4, 16.3 Hz, 1H, 5-H), 2.47 (m, 1H, -CH), 2.56 (m, 2H, -CH₂), 2.98 (dd, J= 4.7, 15.7 Hz, 1H, 5-H), 6.68 (d, J= 1.8 Hz, 1H, -CH), 7.34 (d, J= 1.8 Hz, 1H, -CH)

^{13}C NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 21.35; 30.74; 31.49; 46.33; 106.60; 120.92; 142.32; 166.56; 194.46

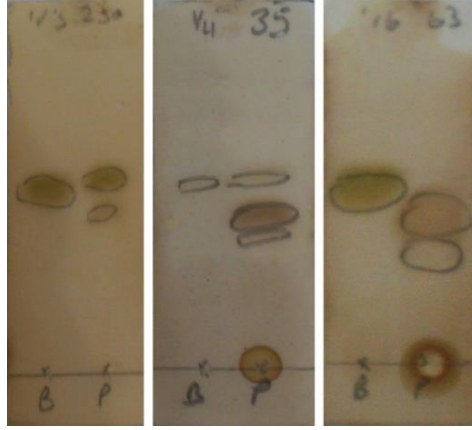
IR (CHCl_3) $\nu(\text{max})$: 1658.10 cm^{-1}

5.4.2 Mangan (III) Asetat Katalizörü ile Asetoksi-Benzofuranon Sentezi

7,4 mmol $\text{Mn}(\text{OAc})_3$, 55 ml benzen:asetik asit (10:1) karışımı içerisinde yan kollu balonda Dean-stark-trap düzeneğinde reaksiyon ortamı tarçın kahverengisi oluncaya kadar reflux edilmiştir (Şekil 5.9). Daha sonra 1,8 mmol 6,7-dihidro-6-metilbenzofuran-4(5H)-on bileşiği (**2**) yan kollu balona eklenmiş, reaksiyon takibi TLC ile yapılmıştır (Şekil 5.10). Deney 63 saatte sonlandırılmıştır. Eter ile seyreltilen organik fazın ayrımı, doymuş tuz çözeltisi ile ayırma hunisinde gerçekleştirilmiştir. MgSO_4 ile kurutulan organik fazı yoğunlaştırmak amacıyla evaporatör kullanılmıştır.

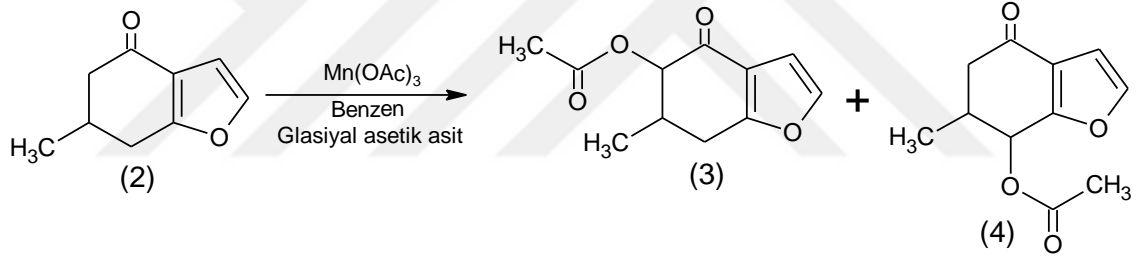


Şekil 5.9 Yan kollu balonda $\text{Mn}(\text{OAc})_3$ reaksiyonu



Şekil 5.10 Mn(OAc)₃ reaksiyonu önemli deney takip TLC'leri

Saflaştırma işlemi; önce kolon kromatografisi 1:8 (EtOAc:Hekzan) sisteminde, ardından preparatif TLC tabakalarda 2:9:18 (EtOAc:CHCl₃:Hekzan) sisteminde gerçekleştirilmiştir. ~%72 verimle 4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (**3**) ve 4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-7-il asetat (**4**) izomerleri karışık olarak elde edilmiştir (Şekil 5.11, 5.12) ancak, ayrı ayrı izole edilememiştir.



Şekil 5.11 6,7-Dihidro-6-metilbenzofuran-4(5*H*)-on bileşiğinden (**2**) 4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (**3**) ve 4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-7-il asetat bileşiği (**4**) sentezi



- ⇒ 6,7-Dihidro-6-metilbenzofuran-4(5*H*)-on (**2**)
- ⇒ 4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (**3**)
4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-7-il asetat (**4**)

Şekil 5.12 Mn(OAc)₃ reaksiyonu TLC sonucu

4,5,6,7-Tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (3) ve 4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-7-il asetat (4) izomerleri için (Şekil Ek 3, 4, 5, 6 ve 12):

R_f: 0,50 (Silika jel, 1:8 EtOAc:Hekzan)

IR (CHCl₃) ν (max): 1690.06, 1745.95 cm⁻¹

4,5,6,7-Tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-5-il asetat bileşiği (3) için;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,04 (d, *J*:6.9 Hz, 3H, -CH₃), 2.16 (s, 3H, -COCH₃), 2.53- 2.72 (m, 2H, 7-H), 3.06 (dd, *J*= 5.2, 17.3 Hz, 1H, 6-H), 5.19 (d, *J*= 11.9 Hz, 1H, -CH), 6.60 (d, *J*= 1.8 Hz, 1H, 3-H), 7.31 (br s, 1H, 2-H)

¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 13.83; 20.80; 29.71; 33.78; 76.49; 106.69; 119.49; 143.88; 164.45; 170.12; 187.77

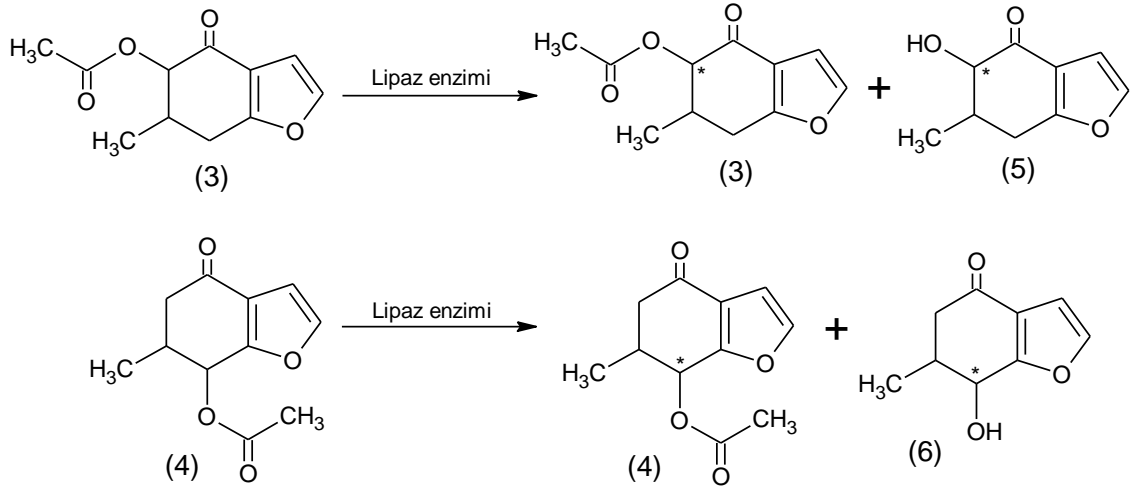
4,5,6,7-Tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-7-il asetat bileşiği (4) için;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,15 (d, *J*= 6.5 Hz, 3H, -CH₃), 2.19 (s, 3H, -COCH₃), 2.70- 2.79 (m, 2H, 7-H), 3.19 (dd, *J*= 5.4, 17.4 Hz, 1H, 6-H), 5.54 (d, *J*= 4.3 Hz, 1H, -CH), 6.61 (d, *J*= 1.8 Hz, 1H, 3-H), 7.34 (br s, 1H, 2-H)

¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 18.01; 20.67; 30.66; 35.32; 78.76; 106.79; 119.91; 143.66; 164.95; 170.43; 187.92

5.4.3 Asetoksi-Benzofuranon Bileşiklerinin Lipaz Katalizli Esterifikasyon Reaksiyonları

0,024 mmol'ar 4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (3) ve 4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-7-il asetat (4) izomer karışımına, 1 ml organik çözücü eklenmiştir. pH=7 olan tampon çözeltisinden 300 μ l ilave edilen solüsyona lipaz enzimi konularak 37°C'de reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Katalizör yüzeyi ile substrat difüzyonunun sağlanması amacıyla reaksiyonda çalkalayıcı su banyosu kullanılmıştır. Reaksiyon belirli aralıklarla TLC ile takip edilerek %50 dönüşüme ulaşıldığında sonlandırılmıştır (Şekil 5.13).



Şekil 5.13 4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (**3**) ve 4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-7-il asetat (**4**) izomerlerinin esterifikasyonu

4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (**3**) ve 4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-7-il asetat (**4**) izomerlerinin biyodönüşümleri için, 4 farklı çözücü (DMSO, THF, asetonitril, toluen) ve 8 farklı enzim (*Aspergillus sp.* Lipaz, CCL (*Candida cylindracea* Lipaz), CAL (*Candida antarctica* Lipaz), HPL (Hog pancreas Lipaz), RAL (*Rhizopus arrhizus* Lipaz), RNL (*Rhizopus niveus* Lipaz), WGL (Wheat germ Lipaz) ve (*Burkholderia cepacia*'dan elde edilen) Amano Lipaz PS denenmiştir. Çözücü ve lipaz enzimlerinin kiral kataliz üzerindeki etkisini incelemek için HPLC kullanılarak, enantiomerik fazlalık (e.e.) değerleri saptanmıştır (Çizelge 5.3). HPLC analizleri OD-H kiral kolonda, akış hızı 1 ml/dk ve 2-propanol:hekzan (1:15) çözücü sisteminde yapılmıştır (Şekil Ek 14, 15, 16, 17 ve 18). Rasemik α -asetoksi-benzofuranon enantiyomer çiftine ait HPLC piki ~9,5. dk ve ~11. dk'da; rasemik γ -asetoksi-benzofuranon enantiyomer çiftine ait HPLC piki ~11,5. dk ve ~12. dk'da gözlenmiştir.

Çizelge 5.3 HPLC analiz sonuçları

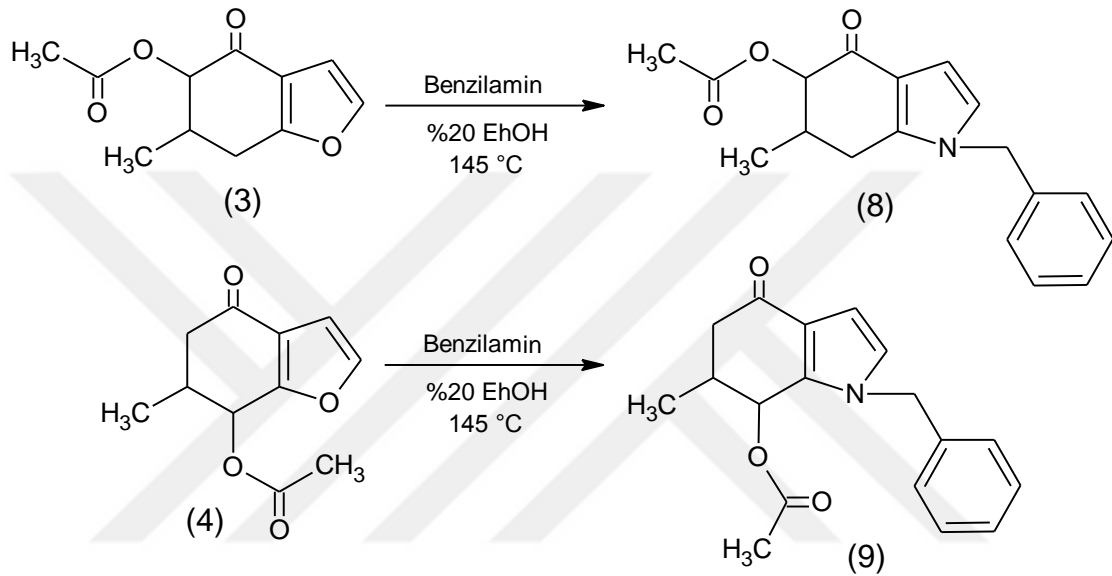
Enzim	Çözücü	Zaman	α . Asetoksi benzofuranon (3) e.e.	γ . Asetoksi benzofuranon (4) e.e.	Negatif seçicilik
Amano PS Lipaz	Asetonitril	5sa,30dk	%94	%74	x
	DMSO	50dk	%42	%13	x

Çizelge 5.3 HPLC analiz sonuçları (devamı)

	THF	8sa, 40dk	%92	%76	x
	Toluen	13sa	%99,7	%92,8	x
Aspergillus Lipaz	Asetonitril	5sa,30dk	%64	%18	x
	DMSO	48dk	%88	%76	x
	THF	3sa,20dk	%81	%63	x
CAL	Asetonitril	16sa	%61	%56	√
	DMSO	4sa,50dk	%37	%33	√
	THF	11sa, 10dk	%80	%68	√
	Toluen	10sa	%4,4	%25	√
CCL	Asetonitril	7sa	%40	%31	√
	DMSO	5sa,51dk	%76	%66	√
	THF	16sa, 30dk	%46	%36	√
	Toluen	2sa,20dk	%21	%14	√
HPL	DMSO	312sa,20dk	%43	%11	x
RAL	DMSO	143sa,43dk	%55	%27	x
RNL	DMSO	559sa,50dk	%29	%11	x
WGL	Asetonitril	7sa	%50	%47	x
	DMSO	2sa,14dk	%67	%43	x
	THF	8sa, 20dk	%36	%21	x
	Toluen	10sa	%38	%28	x

5.4.4 Asetoksi-Benzofuranon Bileşiğinin Seal Tüp Reaksiyonu

2,9 mmol'ar 4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (**3**) ve 4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-7-il asetat (**4**) izomer karışımı, %20'lik 5 ml etanol:H₂O ve 16,8 mmol benzilamin ile ~0 atm basınçta seal tüpe konulmuştur. 145°C'de 12 saat boyunca reaksiyon devam etmiştir (Şekil 5.14). Distile su ve diklorometan kullanılarak reaksiyon karışımından ekstrakte edilen organik faz, MgSO₄ ile kurutulmuş ve evaporatörde yoğunlaştırmıştır.

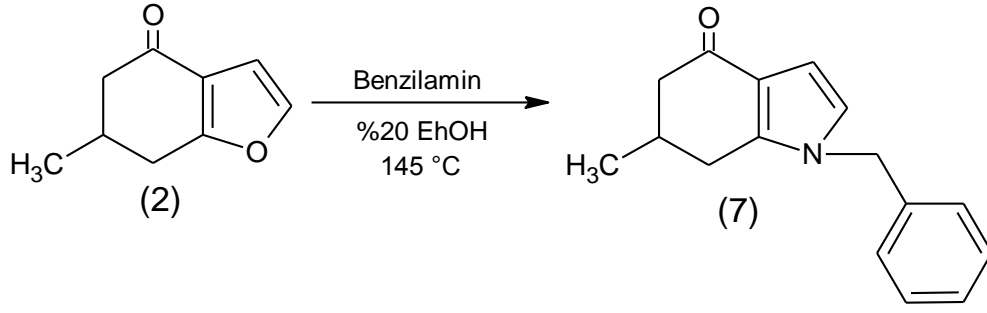


Şekil 5.14 İndol sentezi reaksiyon şeması

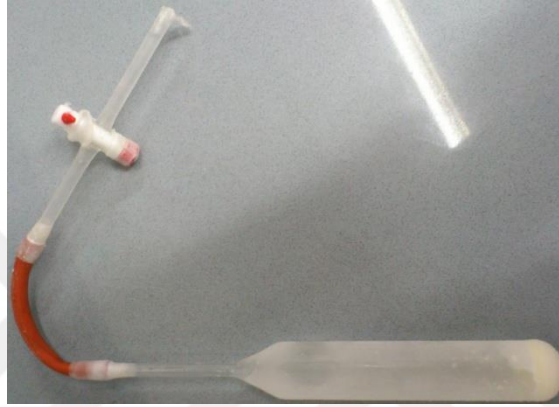
Saflaştırma işlemi için sırasıyla 1:1 (EtOAc:Hekzan); 2:5:1 (EtOAc: CHCl₃:Hekzan); 6:31:19 (EtOAc: CHCl₃:Hekzan) ve 2:3 (EtOAc: CHCl₃) çözücü sistemleriyle kolon kromatografisi yapılmıştır. Ancak saflaştırma işlemi gerçekleştirilemediği için yapı aydınlatılamamıştır.

5.4.5 Benzofuranon Bileşiğinin Seal Tüp Reaksiyonu

6,25 mmol 6,7-dihidro-6-metilbenzofuran-4(5H)-on bileşiğinin (**2**) %20'lik 5 ml etanol:H₂O ve 16,8 mmol benzilamin ile 145°C ve ~0 atm basınçta 12 saat boyunca seal tüpte reaksiyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 5.15, 5.16, 5.17). Distile su ve diklorometan ile ekstrakte edildilen organik faz, MgSO₄ ile kurutulmuş ve evaporatörde yoğunlaştırmıştır.

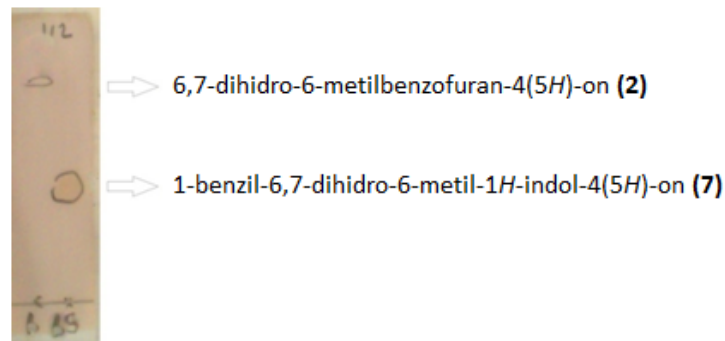


Şekil 5.15 6,7-Dihidro-6-metilbenzofuran-4(5H)-on bileşiğinden **(2)** benzilamin aracılı 1-benzil-6,7-dihidro-6-metil-1H-indol-4(5H)-on **(7)** sentezi



Şekil 5.16 Sıvı azot yardımı ile basıncı uzaklaştırılan seal tüpün kapatılmak üzere hazırlanması

Saflaştırma için sırasıyla kolon kromatografisi 9:7:31 (EtOAc:CHCl₃:Hekzan) ve 1:1 (EtOAc:Hekzan) çözücü sistemi kullanılmıştır. 1-Benzil-6,7-dihidro-6-metil-1H-indol-4(5H)-on bileşiği **(7)** %76 verimle sentezlenmiştir.



Şekil 5.17 TLC sonucu

1-Benzil-6,7-dihidro-6-metil-1H-indol-4(5H)-on bileşiği **(7)** için (Şekil Ek 7, 8, 9 ve 13) [139]:

Erime noktası: 108,5°C

R_f : 0,47 (Silika jel, 1:2 EtOAc:Hekzan)

IR (CHCl₃) ν (max): 1638.18, 2964.80 cm⁻¹

5.4.6 Potasyum Permanganat Katalizörlüğünde Asetoksi-İndol Sentezi

55 ml benzen:asetik asit (10:1) karışımı içerisinde 1,8 mmol KMnO₄ konularak yan kollu balonda Dean-stark-trap düzeneğinde reaksiyon ortamı mordan kahverengi olana kadar reflux edilmiştir. Daha sonra 0,6 mmol 1-benzil-6,7-dihidro-6-metil-1*H*-indol-4(5*H*)-on bileşiği (**7**) reaksiyon ortamına eklenmiştir. Deneyin takibi TLC ile yapılmıştır. Kloroform ile seyreltilen organik fazın ayrımı, doymuş NaHCO₃ çözeltisi ile ayırma hunisinde gerçekleştirilmiştir. MgSO₄ ile kurutulan organik faz, evaporatörde yoğunlaştırılmıştır.

Saflaştırma işlemi için sırasıyla 2:9:18 (EtOAc: CHCl₃:Hekzan) ve 1:7 (EtOAc: CHCl₃) çözücü sistemleriyle kolon kromatografisi, ardından preparatif TLC tabakalarda 1:1 (Petrol eteri:Dietil eter) ve 1:7:1 (EtOAc: CHCl₃:Hekzan) çözücü sistemleri kullanılmıştır. Yapının anlaşılması amacıyla kullanılan NMR spektrometrisi analiz sonuçları, yapıda istenmeyen safsızlıklar olduğunu göstermiştir. Saflaştırma çalışmalarına devam edilmektedir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Dünyadaki gelişen tüm olayların odak noktasında insan yer almaktadır ve dolayısıyla, insan sağlığı ön plana geçmektedir. İnsan sağlığının korunması ve tedavisinde ilaç etken maddelerinin sentezi önemli rol oynamaktadır [104].

Doğal ürünlerde bulunan ve sentetik olarak türevleri sentezlenen benzofuranon ve indol türevi bileşiklerinin sahip olduğu birçok biyolojik aktivite sebebiyle ilaç sanayinde önemli ilaç etken maddeler olarak kullanıldığı bilinmektedir. Bu çalışmada yüksek biyolojik aktiviteleri nedeniyle kiral hidroksi benzofuranon ve indol türevleri sentezlenmesi hedeflenmiştir. Sentezlenen kiral hidroksi benzofuranon bileşiklerinin enzimatik rezolüsyonu gerçekleştirilerek enantiomerik fazlalık (e.e.) değerleri saptanmıştır.

6.1 İndol Türevlerinin Sentezi

Reaksiyon iki farklı yoldan yürütülmüştür. İlk olarak, 4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (**3**) ve 4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-7-il asetat (**4**) izomerininin seal tüp reaksiyonu gerçekleştirilmiş; hedeflenen ürün (**8**) reaksiyon sonucunda oluşmamıştır. Reaksiyonun diğer sentez rotasında ise 6,7-dihidro-6-methylbenzofuran-4(5H)-on bileşiğinden (**2**) seal tüp reaksiyonu ile sentezlenen 1-benzil-6,7-dihidro-6-metil-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin (**7**) potasyum permanganat aracılı reaksiyonu gerçekleştirilmiş ancak, hedeflenen ürün (**8**) istenilen saflıkta elde edilememiştir.

Reaksiyonlar sonucu elde edilen bileşiklerin saflaştırma ve analizlerine ilerleyen çalışmalarda devam edilerek, biyoaktivite testlerinin yapılması planlanmaktadır.

6.2 Benzofuranon Türevlerinin Sentezi

İlk aşamada 6,7-dihidro-6-metilbenzofuran-4(5H)-on bileşiği **(2)** sentezlenmiştir. Daha sonra 6,7-dihidro-6-metilbenzofuran-4(5H)-on bileşiği **(2)** mangan (III) asetat asetoksilasyonu ile 4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-5-il asetat bileşiğine **(3)** açillendirilendirilmiştir. Safılaştırma işlemleri sonrasında 4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-5-il asetat bileşiği **(3)** ve 4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-7-il asetat **(4)** izomeri literatürde ilk defa sentezlenmiştir.

6.3 Lipaz Enzimlerinin ve Organik Çözücülerin Kiral Rezolüsyon Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi

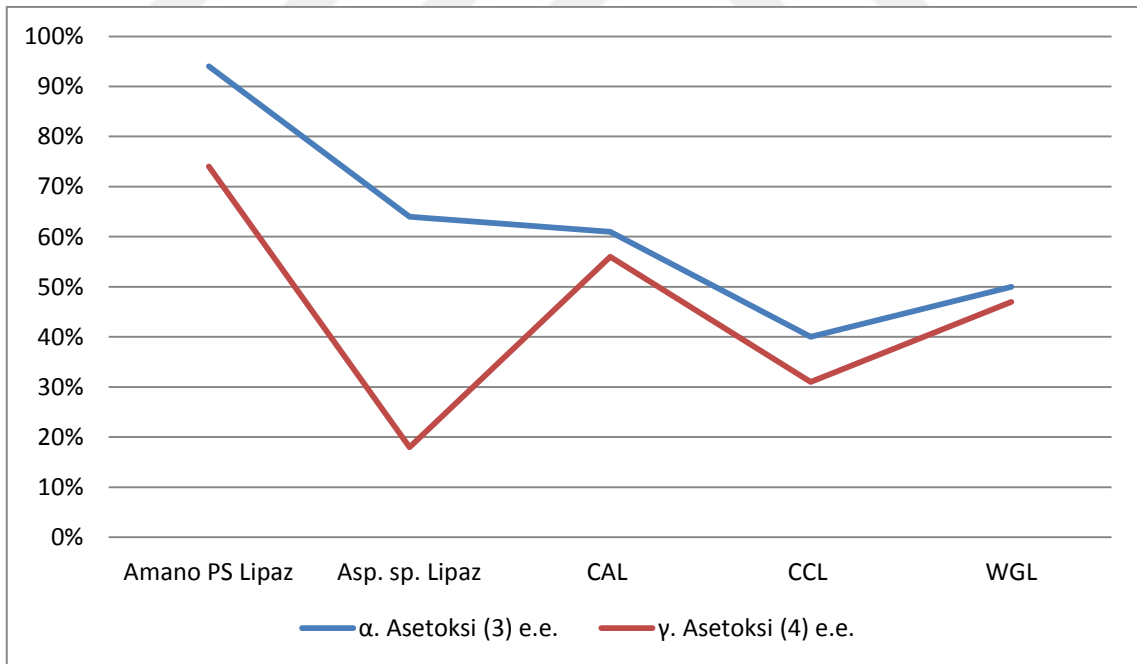
Çizelge 5.3 incelendiğinde, *Candida antarctica* Lipaz (CAL) ve *Candida cylindracea* Lipazın (CCL) 4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-5-il asetat **(3)** ve 4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-7-il asetat **(4)** bileşiklerinin enantiyomerlerine karşı negatif seçicilik (reverse selectivity) gösterdiği belirlenmiştir. Kullanılan enzimlerin α -asetoksi benzofuranon **(3)** ve γ -asetoksi benzofuranon **(4)** bileşiklerindeki enantiomerik fazlalığın (e.e.) kullanılan organik çözücü ile değiştirilebilir ve geliştirilebilir olduğu saptanmıştır.

Enzimatik rezolüsyon sonucu her iki izomerin **(3)**, **(4)** en yüksek enantiomerik fazlalık (e.e.) değerleri, toluen ortamındaki Amano PS lipaz enziminde (%99.7 e.e. **(3)**; %92.8 e.e. **(4)**) olduğu saptanmıştır. 4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-5-il asetat bileşiğinde **(3)** gözlenen en düşük enantiomerik fazlalık (e.e.) toluendeki *Candida antarctica* Lipaz (CAL) enziminde (%4.4 e.e.); 4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-7-il asetat bileşiğinde **(4)** gözlenen en düşük enantiomerik fazlalık (e.e.) değerinin ise DMSO'daki Hog pancreas Lipaz (HPL) ve *Rhizopus niveus* Lipaz (RNL) enzimlerinde (%11 e.e.) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 5.3). Ayrıca, en kısa süreli biyodönüşümün DMSO çözücüsündeki *Aspergillus* sp. lipaz enzimiyle 48 dakikada (%88 e.e. **(3)**; %76 e.e. **(4)**); en uzun süreli biyodönüşümlerin ise DMSO çözücüsündeki *Rhizopus niveus* Lipaz (RNL) (%29 e.e. **(3)**; %11 e.e. **(4)**), Hog pancreas Lipaz (HPL) (%43 e.e. **(3)**; %11 e.e. **(4)**) ve *Rhizopus arrhizus* Lipaz (RAL) (%55 e.e. **(3)**; %27 e.e. **(4)**) enzimleriyle sırasıyla 23 gün 6 saat 55 dakika, 13 gün 4 saat 20 dakika ve 5 gün 23 saat 43 dakikada gerçekleştiği saptanmıştır (Çizelge 5.3).

En yüksek ve en düşük biyodönüşüm zamanlarının aynı çözücüde saptanması ayrıca, artan zaman ile birlikte enantiomerik fazlalık (e.e.) değerinin azalması; reaksiyon zamanında organik çözücülere kıyasla enzim çeşidinin daha etken rol oynadığını göstermektedir. Organik çözücülerin ise enzim-substrat kompleksine etki ederek enzimlerin çalışmasında farklılık meydana getirdiği ve enantiyomerik dönüşüm değerleri üzerinde etkili olduğu bilinmektedir [140].

Çözücüler enzimatik katalizde; reaksiyon verimi ve seçicilik üzerindeki kapsamlı etkiye sahiptirler. Enzim çalışmalarında organik çözücülerin kullanımıyla reaksiyon ortamında kapsamlı varyasyonlara ulaşılabilmektedir. Çözücüler, substrat özelliklerini ve yüzeyini değiştirerek veya enzim inhibitörü olarak, enzim dinamiklerine etki gösterir ve sonuçta enzim üzerinde konformasyonel değişimlere neden olurlar. Enzim-substrat kompleksi, reaksiyon ortamı ve ürünlerin etkileşimi, çözücü etkisi ile yakından ilişkilidir [141]. Enantiomerik fazlalık (e.e.) üzerindeki çözücü etkisini incelemek amacıyla oluşturulan grafikler aşağıdaki gibidir:

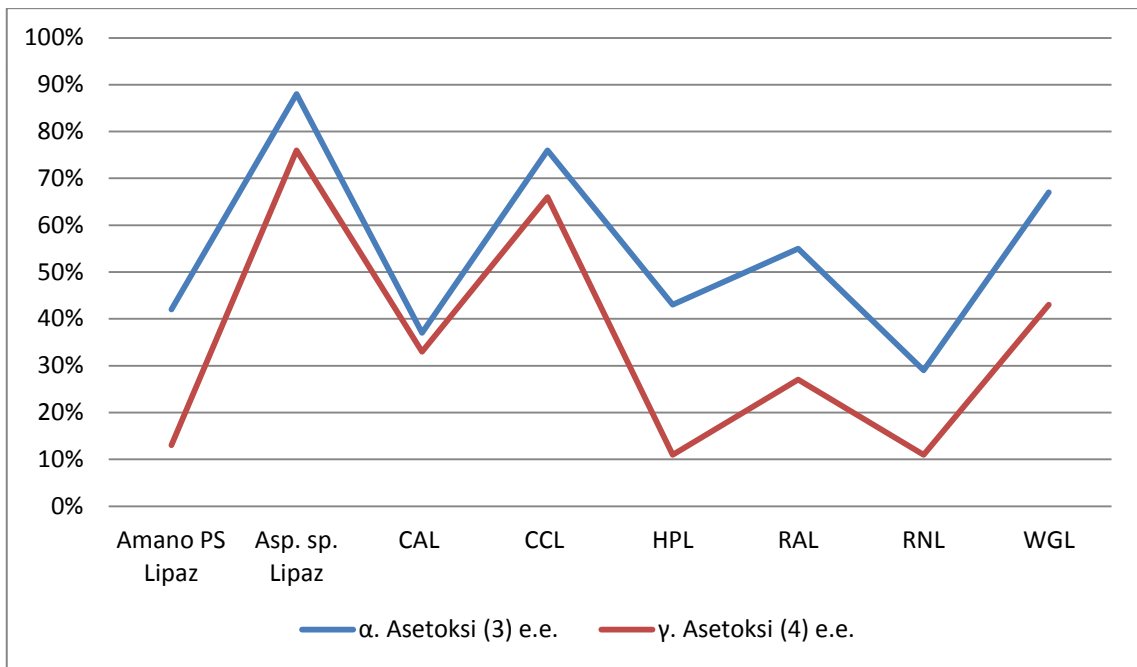
Çizelge 6.1 Asetonitril'in kiral kataliz üzerindeki etkisi



Asetonitril ortamında gerçekleştirilen kiral katalizin en yüksek enantiomerik fazlalık (e.e.) değerine, Amano PS lipaz enziminde (%94 e.e. **(3)**; %74 e.e. **(4)**) ulaşılmıştır (Çizelge 6.1). En düşük ee. değerleri, 4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-5-il asetat bileşiğinde **(3)** *Candida cylindracea* Lipaz (CCL) enziminde (%40 e.e.); 4,5,6,7-

tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-7-il asetat bileşiginde **(4)** ise *Aspergillus* lipaz enziminde (%18 e.e.) saptanmıştır. Asetonitril çözücüsündeki tüm enzimlerde α -hidroksi benzofuranon **(3)** bileşiginin γ -hidroksi benzofuranon **(4)** izomerine oranla üstün enantiomerik fazlalık (e.e.) gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, *Aspergillus* enzimiyle gerçekleştirilen kiral kataliz reaksiyonunda, α - ve γ -hidroksi benzofuranon izomerlerinin enantiomerik fazlalık (e.e.) oranları arasında oluşan dikkat çekici farkın; asetonitril çözücüsünün, *Aspergillus* enzimi ile γ -hidroksi benzofuranon **(4)** substrat kompleksi üzerinde inhibitör etki göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

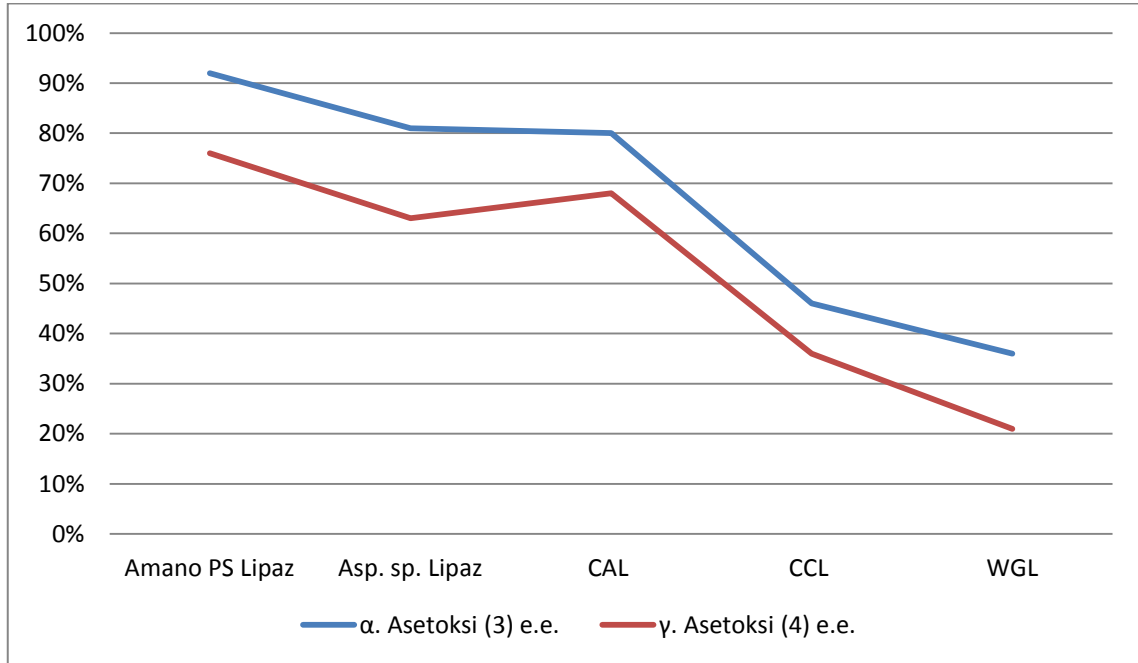
Çizelge 6.2 DMSO'nun kiral kataliz üzerindeki etkisi



Dimetilsülfoksit ortamında gerçekleştirilen kiral katalizde en yüksek enantiomerik fazlalık (e.e.) değerine, *Aspergillus* lipaz enzimiyle (%88 e.e. **(3)**; %76 e.e. **(4)**) ulaşılmıştır (Çizelge 6.2). En düşük ee. değerleri, 4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-5-il asetat bileşiginde **(3)** *Rhizopus niveus* Lipaz (RNL) enzimi (%29 e.e.); 4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-7-il asetat bileşiginde **(4)** ise Hog pancreas Lipaz (HPL) ve *Rhizopus niveus* Lipaz (RNL) enzimlerinde (%11 e.e.) saptanmıştır. DMSO çözücü ortamındaki Hog pancreas Lipaz (HPL), *Rhizopus arrhizus* Lipaz (RAL) ve Amano PS lipaz enzimlerinin α - ve γ -hidroksi benzofuranon izomerleri ile gerçekleştirdiği kiral katalizin enantiomerik fazlalık (e.e.) oranları arasındaki farkın önemli olmadığı; ayrıca α -hidroksi benzofuranon **(3)** bileşiginin γ -hidroksi

benzofuranon (**4**) izomerine kıyasla DMSO'daki tüm enzimlerde üstün enantiomerik fazlalık (e.e.) gösterdiği belirlenmiştir.

Çizelge 6.3 THF'in kiral kataliz üzerindeki etkisi

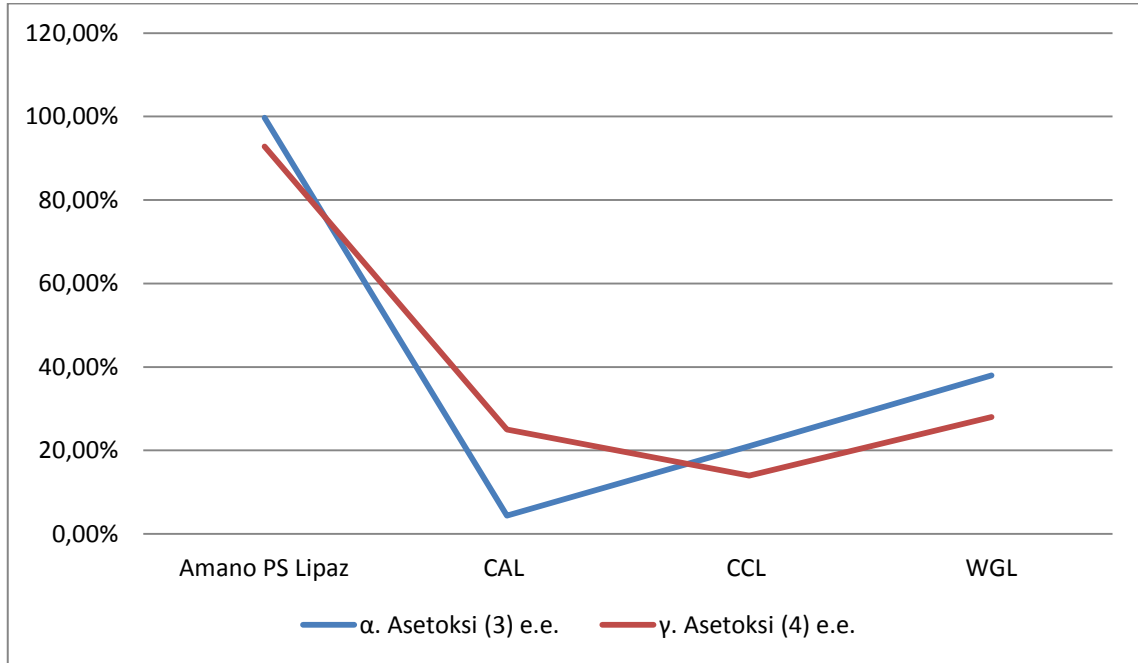


Tetrahidrofuran ortamında gerçekleşen kiral katalizde, en yüksek enantiomerik fazlalık (e.e.) değeri Amano PS lipaz enziminde (%92 e.e. (**3**); %76 e.e. (**4**)); En düşük ee. değeri Wheat germ Lipaz (WGL) enziminde (%36 e.e. (**3**); %21 e.e. (**4**)) belirlenmiştir (Çizelge 6.3). THF çözücündeki tüm enzimatik rezolüsyonlarda α -hidroksi benzofuranon (**3**) bileşiğinin γ -hidroksi benzofuranon (**4**) izomerine göre daha üstün enantiomerik fazlalık (e.e.) gösterdiği saptanmıştır.

Toluen çözücüsündeki kiral katalizin en yüksek enantiomerik fazlalık (e.e.) değeri Amano PS lipaz enziminde (%99.7 e.e. (**3**); %92.8 e.e. (**4**)) gözlenmiştir (Çizelge 6.4). En düşük ee. değeri, 4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-5-il asetat bileşiği (**3**) için *Candida antarctica* Lipaz (CAL) enziminde (%4.4 e.e.); 4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-7-il asetat bileşiği (**4**) için ise *Candida cylindracea* Lipaz (CCL) enziminde (%14 e.e.) belirlenmiştir. Toluen'in enzim katalizli kiral rezölüsyonunda *Candida antarctica* Lipaz (CAL) enzimi dışındaki tüm enzimlerde, α -hidroksi benzofuranon (**3**) bileşiğinin γ -hidroksi benzofuranon (**4**) izomerine kıyasla daha üstün enantiomerik fazlalık (e.e.) gösterdiği saptanmıştır. Oluşan dikkat çekici farkın ve çok düşük enantiomerik fazlalık (e.e.) değerininin, toluenin *Candida antarctica* Lipaz (CAL)

enzimi ve α -hidroksi benzofuranon (**4**) substrat kompleksi üzerine inhibitör etki göstermesinden kaynaklandığı düşünülmüştür.

Çizelge 6.4 Toluen'in kiral kataliz üzerindeki etkisi



Lipaz katalizli enzimatik rezolüsyonlarda genel olarak α -hidroksi benzofuranon (**3**) substratının γ -hidroksi benzofuranon (**4**) substratına kıyasla daha üstün enantiomerik fazlalık (e.e.) gösterdiği belirlenmiştir. *Candida antarctica* Lipaz (CAL) ve *Candida cylindracea* Lipaz (CCL) enzimlerinin α -hidroksi benzofuranon (**3**) ve γ -hidroksi benzofuranon (**4**) bileşiklerinde negatif seçiciliğe neden olduğu saptanmıştır. Kullanılan farklı organik çözücülerin, bazı enzimlerin çalışma hızı ve enantiomerik fazlalığını (e.e) arttırırken; bazı enzimler üzerinde inhibitör etki gösterdiği gözlemlenmiştir.

Reaksiyonlar sonucu elde edilen bileşiklerin saflaştırma ve analizlerine ilerleyen çalışmalarda devam edilerek, biyoaktivite testlerinin yapılması ve farmakolojik etkileri araştırılan bileşiklerin literatüre kazandırılması planlanmaktadır.

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] Mishra R.C., (2011). "Second Generation Benzofuranone Ring Substituted Noscapine Analogs: Synthesis and Biological Evaluation", *Biochemical Pharmacology*, 82:110-121.
- [3] Aneja R. ve Vangapandu S.N., (2006). "Synthesis of Microtubule-Interfering Halogenated Noscapine Analogs that Perturb Mitosis in Cancer Cells Followed by Cell Death", *Biochemical Pharmacology*, 72:415-426.
- [4] Strobe G., (2002). "Isopestacin, an Isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, Possessing Antifungal and Antioxidant Activities", *Phytochemistry*, 60:179-183.
- [5] Haper J.K., (2003). "Pestacin: a 1,3-dihydro Isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* Possessing Antioxidant and Antimycotic Activities", *Tetrahedron*, 59:2471-2476.
- [6] Ayers T.A., (1997). "Enzymatic Resolution for an Improved Enantioselective Synthesis of Benzofuranyl Derivatives: Precursors to a Class of Vitamin E Related Antioxidants", *Tetrahedron: Asymmetry*, 8:45-55.
- [7] 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.
- [8] Reddy J.S., (2011). "(Z)-2-(2-Hydroxy-4-methoxybenzylidene)-1-benzofuran-3(2H)-one", *Acta Crystallographica Section E*, 67:1330.
- [9] Pare, P.W., (1991). "Phytoalexin Aurone Induced in *Cephalocereus Senilis* Liquid Suspension Culture", *Phytochemistry*, 30:1133-1135.
- [10] Boumendjel, A., (2003). "Aurones: a Subclass of Flavones with Promising Biological Potential", *Current Medicinal Chemistry*, 10:2621-2630.
- [11] Lawrence, N.J., (2003). "The Total Synthesis of an Aurone Isolated from *Uvaria hamiltonii*: Aurones and Flavones as Anticancer Agents", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13:3759-3763.

- [12] Ono, M., (2007). "Aurones Serve as Probes of Beta-Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 361:116-121.
- [13] Boumendjel, A., (2002). "4-Hydroxy-6-methoxyaurones with High-Affinity Binding to Cytosolic Domain of P-glycoprotein", *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 50:854-856.
- [14] Hadjeri, M., (2003). "Modulation of P-glycoprotein-mediated Multidrug Resistance by Flavonoid Derivatives and Analogues", *Journal of Medicinal Chemistry*, 46:2125-2131.
- [15] Václavíková, R., (2006). "Modulation of Paclitaxel Transport by Flavonoid Derivatives in Human Breast Cancer Cells. Is There a Correlation Between Binding Affinity to NBD of P-gp and Modulation of Transport?", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14:4519-4525.
- [16] Sim, H.M., (2008). "Dimethoxyaurones: Potent Inhibitors of ABCG2 (Breast Cancer Resistance Protein)", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 35:293-306.
- [17] Cheng, H., (2010). "Design, Synthesis and Discovery of 5-Hydroxyaurone Derivatives as Growth Inhibitors Against HUVEC and Some Cancer Cell Lines", *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45:5950-5957.
- [18] 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.
- [19] Souard, F., (2010). "1-Azaaurones Derived from the Naturally Occurring Aurones as Potential Antimalarial Drugs", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18:5724-5731.
- [20] Rabiee, A., (2011). "Benzofuranone Derivatives as Effective Small Molecules Related to Insulin Amyloid Fibrillation: A Structure-Function Study", *Chemical Biology & Drug Design*, 78: 659–666
- [21] Watanabe, H. ve Ono, M., (2011). "A Dual Fluorinated and Iodinated Radiotracer for PET and SPECT Imaging of β -amyloid Plaques in the Brain", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21:6519-6522.
- [22] Nadri, H., (2010). "Design, Synthesis and Anticholinesterase Activity of a Novel Series of 1-Benzyl-4-((6-alkoxy-3-oxobenzofuran-2(3H)-ylidene)methyl)pyridinium Derivatives", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18:6360-6366.
- [23] Stevenson, P.C. ve Aslam, S.N., (2005). "The Chemistry of the Genus Cicer L. In *Studies in Natural Product Chemistry*" Bioactive Natural Products, United Kingdom, 33:905-957; Derleyen: Atta-ur-Rahman, (2006). *Studies in Natural Products Chemistry*, Elsevier Science, Amsterdam.
- [24] Aslam, S.N., (2006). "Synthesis of Cicerfuran, an Antifungal Benzofuran, and Some Related Analogues", *Tetrahedron*, 62:4214-4226.

- [25] Gonçalves, C.J., (2012). "Benzofuranones as Potential Antinociceptive Agents: Structure-Activity Relationships", *European Journal of Medicinal Chemistry*, 56:120-126.
- [26] Coleman, P.J., (2000). "Syntheses of 5- and 6-[2,3]-Dihydrobenzofuran β -amino Acids", *Tetrahedron Letters*, 41:5803-5806.
- [27] Hadj-esfandiari, N., (2007). "Synthesis, Antibacterial Activity, and Quantitative Structure-Activity Relationships of New (Z)-2-(Nitroimidazolymethylene)-3(2H)-benzofuranone Derivatives", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17:6354-6363.
- [28] Meng, X., (2010). "Structure Effect of Benzofuranone on the Antioxidant Activity in Polypropylene", *Polymer Degradation and Stability*, 95:2076-2081.
- [29] Mehdi, S.H., (2011). "Synthesis, Characterization, Antimicrobial And Enzymatic Activity of 4b,9b-Dihydroxy-7,8-dihydro-4bH-indeno[1,2-b]benzofuran-9,10(6H,9bH)-dione", *Journal of Molecular Structure*, 1006:318-323.
- [30] Tsou, H.-R., (2010). "4-Substituted-7-azaindoles Bearing a Ureidobenzofuranone Moiety as Potent and Selective, ATP-competitive Inhibitors of the Mammalian Target of Rapamycin (mTOR)", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20:2259-2263.
- [31] Adinarayana, D. ve Syamasundar, K.V., (1982). "A New Sesquiterpene Alcohol from *Pterocarpus marsupium*", *Phytochemistry*, 21:1083-1085.
- [32] Seshadri, T.R., (1972). "Polyphenols of *Pterocarpus* and *Dalbergia Woods*", *Phytochemistry*, 11:881-898.
- [33] Grover, R.K., (2004). "Dynamic NMR Investigation of Two New Interconvertible Diastereomeric Epimers of Natural 2-Benzyl-2-hydroxybenzofuranone Derivative from *Pterocarpus marsupium*", *Tetrahedron*, 60:2005-2010.
- [34] Maurya, R., (2004). "Constituents of *Pterocarpus marsupium*: an Ayurvedic Crude Drug", *Phytochemistry*, 65:915-920.
- [35] Wang, R.-R., (2008). "Anti-HIV-1 Activities of Compounds Isolated from the Medicinal Plant *Rhus chinensis*", *Journal of Ethnopharmacology*, 117:249-256.
- [36] Yang, Y., (2011). "A Facile Synthesis of Indole-furan Conjugates via Integration of Convergent and Linear Domino Reactions", *Tetrahedron*, 67:5142-5149.
- [37] Buskov, S., (2000). "Supercritical Fluid Chromatography as Basis for Identification and Quantitative Determination of Indol-3-ylmethyl Oligomers and Ascorbigens", *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 43:175 - 195.
- [38] Kutubi, Md.S. ve Kitamura, T., (2011). "Regioselective Synthesis of 3,3-Bis(indolyl)propanoic Acid Derivatives by Iron(III)-catalyzed Hydroarylation of Propynoic Acid Derivatives with Indoles", *Tetrahedron*, 67:8140-8145.
- [39] Taber, D.F. ve Tirunahari, P.K., (2011). "Indole Synthesis: a Review and Proposed Classification", *Tetrahedron*, 67:7195-7210.

- [40] 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.
- [41] Singh, G.S., (2012). "Synthesis of *N*-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)methyleneamines and 3,3-diaryl-4-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)azetid-2-ones as Potential Antileishmanial Agents", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22:5704-5706.
- [42] 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.
- [43] Aboul-Fadl, T., (2010). "Anti-Tubercular Activity of Isatin Derivatives", *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1:113-126.
- [44] Terzioğlu, N. ve Karalı, N., (2006). "Synthesis and Primary Antiviral Activity Evaluation of 3-Hydrazono-5-nitro-2-indolinone Derivatives", *ARKIVOC*, 2006:109-118.
- [45] De-Sarro, G. and Carotti, A., (2000). "Benzodiazepine Receptor Affinities, Behavioral, and Anticonvulsant Activity of 2-Aryl-2,5-dihydropyridazino[4,3-*b*]indol-3(3*H*)-ones in Mice", *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 65:475-487.
- [46] Verma, M., (2004). "Anticonvulsant activity of Schiff Bases of Isatin Derivatives", *Acta Pharmaceutica*, 54:49-56.
- [47] Sun, L., (2000). "Identification of Substituted 3-[(4,5,6,7-Tetrahydro-1*H*-indol-2-yl)methylene]-1,3-dihydroindol-2-ones as Growth Factor Receptor Inhibitors for VEGF-R2 (Flk-1/KDR), FGF-R1, and PDGF-R β Tyrosine Kinases", *Journal of Medicinal Chemistry*, 43:2655-2663.
- [48] 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.
- [49] Pandeya, S.N., (2005). "Biological Activities of Isatin and Its Derivatives", *Acta Pharmaceutica*, 55:27-46.
- [50] Konkel, M.J., (2006). "3-Arylimino-2-indolones are Potent and Selective Galanin GAL₃ Receptor Antagonists", *Journal of Medicinal Chemistry*, 49:3757-3758.
- [51] 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.
- [52] Saundane, A.R., (2013). "Synthesis of Novel 2-Amino-4-(5'-substituted 2'-phenyl-1*H*-indol-3'-yl)-6-aryl-4*H*-pyran-3-carbonitrile Derivatives as Antimicrobial and Antioxidant Agents", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23:1978-1984.

- [53] 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.
- [54] 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.
- [55] Balasubramanya, R., (2005). "Crystal Structure of the Complex of the Secretory Phospholipase A₂ from *Daboia russelli pulchella* with an Endogenic Indole Derivative, 2-Carbamoylmethyl-5-propyl-octahydro-indol-7-yl-acetic Acid at 1.8 Å Resolution", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1752:177-185.
- [56] Indian snakes, *Daboia russelli*, <http://indiansnakes.org/content/russells-viper>, 22 Augustos 2014.
- [57] Hamdy, R., (2013). "Synthesis and Evaluation of 3-(Benzylthio)-5-(1*H*-indol-3-yl)-1,2,4-triazol-4-amines as Bcl-2 Inhibitory Anticancer Agents", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23:2391-2394.
- [58] Forte, G., (2013). "Antitumor Properties of Substituted (αE)- α -(1*H*-indol-3-ylmethylene)benzeneacetic Acids or Amides", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21:5233-5245.
- [59] Niemyjska, M., (2008). "Structural Characterization of Di-indol-3-yl Disulfide Derivatives, Potential Antitumoral Agents", *Journal of Molecular Structure*, 891:463-470.
- [60] Praveen, C., (2011). "Gold(III) Chloride Catalyzed Regioselective Synthesis of Pyrano[3,4-*b*]indol-1(9*H*)-ones and Evaluation of Anticancer Potential Towards Human Cervix Adenocarcinoma", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21:4170-4173.
- [61] Marchand, P., (2009). "Synthesis and Structure–activity Relationships of *N*-aryl(indol-3-yl)glyoxamides as Antitumor Agents ", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17:6715-6727.
- [62] Li, X., (2010). "Novel DNA Intercalators without Basic Side Chains as Efficient Antitumor Agents: Design, Synthesis and Evaluation of Benzo-[*c,d*]-indol-malononitrile Derivatives", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18:3279-3284.
- [63] Diana, P., (2011). "Synthesis of the New Ring System Pyrrolizino[2,3-*b*]indol-4(5*H*)-one", *Tetrahedron*, 67:3374-3379.
- [64] Penthala, N.R., (2013). "5-((1-Aroyl-1*H*-indol-3-yl)methylene)-2-thioxodihydropyrimidine-4,6(1*H*,5*H*)-diones as Potential Anticancer Agents with Anti-Inflammatory Properties", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23:1442-1446.
- [65] Madadi, N.R., (2014). "Synthesis and Anti-proliferative Activity of Aromatic Substituted 5-((1-Benzyl-1*H*-indol-3-yl)methylene)-1,3-dimethylpyrimidine-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-trione Analogs Against Human Tumor Cell Lines", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24: 601-603.

- [66] Terce, M., (2010). "Hypoxic Selectivity and Solubility-Investigating the Properties of A-Ring Substituted Nitro *Seco*-1,2,9,9a-tetrahydrocyclopropa[*c*]benz[*e*]indol-4-ones (nitroCBIs) as Hypoxia-activated Prodrugs for Antitumor Therapy", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18:4997-5006.
- [67] Aubry, C., (2005). "The Design and Synthesis of Novel 3-[2-Indol-1-yl-ethyl]-1*H*indole Derivatives as Selective Inhibitors of CDK4", *Tetrahedron Letters*, 46:1423-1425.
- [68] Chen, G., (2013). "Discovery of *N*-(4'-(indol-2-yl)phenyl)sulfonamides as Novel Inhibitors of HCV Replication", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23:3942-3946.
- [69] Groszek, G., (2009). "Synthesis and Adrenolytic Activity of 1-(1*H*-Indol-4-yloxy)-3-(2-(2-methoxy phenoxy)ethylamino)propan-2-ol Analogs and Its Enantiomers. Part 2", *Journal of Medicinal Chemistry*, 44:5103-5111.
- [70] M  rour, J.-Y., (2013). "Recent Advances in the Synthesis and Properties of 4-, 5-, 6- or 7-Azaindoles", *Tetrahedron*, 69:4767-4834.
- [71] Valdenaire, A., (2013). "Evolution of Novel Tricyclic CRTh2 Receptor Antagonists from a (*E*)-2-cyano-3-(1*H*-indol-3-yl)acrylamide Scaffold", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23:944-948.
- [72] Molnár, A., (1995). "Anti-calmodulin Potency of Indol Alkaloids in in vitro Systems", *European Journal of Pharmacology*, 291:73-82.
- [73] Butera, J.A., (2001). "Synthesis and Potassium Channel Opening Activity of Substituted 10*H*-Benzo[4,5]furo[3,2-*b*]indole- and 5,10-Dihydro-indeno[1,2-*b*]indole-1-carboxylic Acids", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 11:2093-2097.
- [74] Shelke, S.M. and Bhosale, S.H., (2010). "Synthesis, Antidepressant Evaluation and QSAR Studies of Novel 2-(5*H*-[1,2,4]triazino[5,6-*b*]indol-3-ylthio)-*N*-(substituted phenyl)acetamides", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20:4661-4664.
- [75] Carbonnelle, D., (2007). "Synthetic *N*-pyridinyl(methyl)-indol-3-ylpropanamides as New Potential Immunosuppressive Agents", *European Journal of Medicinal Chemistry*, 42:686-693.
- [76] Bali, A., (2014). "Synthesis, Docking and Pharmacological Evaluation of Novel Indole Based Potential Atypical Antipsychotics", *European Journal of Medicinal Chemistry*, 74,:477-490.
- [77] Keruckas, J., (2014). "3,6-Bis(indol-1-yl)-9-phenylcarbazoles as Electroactive Materials for Electrophosphorescent Diodes", *Dyes and Pigments*, 100:66-72.
- [78] Krawczyk, E., (2004). " α -Hydroxy Ketones in High Enantiomeric Purity from Asymmetric Oxidation of Enol Phosphates with (Salen) Manganese(III) Complex", *Tetrahedron: Asymmetry*, 15:2599-2602.

- [79] Muthupandi, P. and Sekar, G., (2011). "Chiral Zn-catalyzed Aerobic Oxidative Kinetic Resolution of α -Hydroxy Ketones", *Tetrahedron: Asymmetry*, 22:512-517.
- [80] Kösalı, Y.K, (2005). α -Hidroksi Ketonların Enantiyoseçimli Olarak Biyotransformasyonla Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [81] Innerpath Natural Therapies Armidale Australia, *Zanthoxylum simulans* var. *podocarpum* Family Rutaceae, <http://www.innerpath.com.au/matmed/herbs/Zanthoxylum~simulans.html>, 22 Ağustos 2014.
- [82] Zhou, X.-J., (2011). "Two Dimeric Lignans with an Unusual α,β -Unsaturated Ketone Motif from *Zanthoxylum podocarpum* and their Inhibitory Effects on Nitric Oxide Production", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21:373-376.
- [83] Goldberg, K., (2007). "Biocatalytic Ketone Reduction-A Powerful Tool for the Production of Chiral Alcohols-Part I: Processes with Isolated Enzymes", *Applied Microbiol Biotechnology*, 76:237-248.
- [84] Demir, A.S., (2002). "Fungal Deracemization of Benzoin", *Tetrahedron Letters*, 43:6447-6449.
- [85] Choudhary, M.I., (2011). "Biotransformation of (20S)-20-Hydroxymethylpregna-1,4-dien-3-one by Four Filamentous Fungi", *Steroids*, 76:1288-1296.
- [86] Abourashed, E.A., (2012). "Bioconversion of Silybin to Phase I and II Microbial Metabolites with Retained Antioxidant Activity", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20:2784-2788.
- [87] Parshikov, I.A., (2012). "Microbial Transformation of Antimalarial Terpenoids", *Biotechnology Advances*, 30:1516-1523.
- [88] Zhao, W., (2012). "Optimization of a Biotransformation Process to Produce 4-(2,3,5,6-Tetramethylpyrazine-1)-4'-demethylepipodophyllotoxin", *Process Biochemistry*, 47:1522-1531.
- [89] Wang, J., (2013). "Enhanced Biotransformation of Nitrobenzene by the Synergies of *Shewanella* Species and Mediator-Functionalized Polyurethane Foam", *Journal of Hazardous Materials*, 252-253:227-232.
- [90] Valadez-Blanco, R. and Livingston, A.G., (2009). "Enantioselective Whole-Cell Biotransformation of Acetophenone to *S*-Phenylethanol by *Rhodotorula glutinis* Part I. Product Formation Kinetics and Feeding Strategies in Aqueous Media", *Biochemical Engineering Journal*, 46:44-53.
- [91] Magallanes-Noguera, C., (2012). "Deracemization of Secondary Alcohols by Chemo-Enzymatic Sequence with Plant Cells", *Journal of Biotechnology*, 160:189-194.

- [92] Demir, A.S., (1998). "Synthesis and *Rhizopus oryzae* Mediated Enantioselective Hydrolysis of α -Acetoxy Aryl Alkyl Ketones", *Tetrahedron: Asymmetry*, 9:1673-1677.
- [93] Demir, A.S., (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.
- [94] Sheldon, R.A., (1993). "Industrial Synthesis of Optically Active Compounds", *Chirtechnology*, New York, xvii-423; Derleyen: Aboul-Enein, H.Y., (1994). *Chirality*, Wiley-Liss, USA.
- [95] Karadeniz, F., (2007). Rasemik 1-Fenil 1-Propanolün Lipaz Katalizörlüğünde Enantiyoseçimli Esterleşme Tepkimesiyle Kinetik Rezolüsyonu, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [96] Nejem, R.M. (2004). Enantioselective Sensors and Biosensors for Clinical Analysis, Doktora Tezi, University of Pretoria, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, Pretoria.
- [97] Çelebi, N., (2007). Süperkritik Akışkan Ortamında Kiral Hidroksi Ketonların Sentezi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [98] Soyer, A., (2007). Lipaz Enzimi Biyokatalizörlüğünde Kinetik Rezolüsyon İle Enantiyomerik Safılıkta 1-Fenil-1-propanolün Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [99] Atkins, R.C. ve Carey, F.A., (1997). "Organic Chemistry: a Brief Course", New York, 184-212; Derleyen: Oktay, G. ve Yıldırım, Y., (1999). *Organik Kimya: Kısa ve Öz*, Bilim Kitabevi, Ankara.
- [100] Chiral Pharmaceuticals, Technology Catalysts International, Global Markets for Chiral Technology Report Overview, <http://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/chiral-products-technology-global-markets-bio012f.html>, 27 Ekim 2014.
- [101] İzake, L.E., (2007). "Chiral Discrimination and Enantioselective Analysis of Drugs: An Overview", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96: 1659-1676.
- [102] 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.
- [103] 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.
- [104] Şahin, B., (2005). Türk İlaç Endüstrisi ve Avrupa Birliğine Uyumu, Doktora Tezi, Abant İzzet Baysal Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü, Bolu.
- [105] Testa, P., (2012). "Foundation Review: Reactions and Enzymes in the Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics", *Drug Discovery Today*, 17:549-560.

- [106] Williams, R.T. (1947). Detoxification Mechanisms: The Metabolism and Detoxification of Drugs, Toxic Substances and Other Organic Compounds, First Edition, Chapman & Hall, United Kingdom.
- [107] Williams, R.T. (1959). Detoxification Mechanisms: The Metabolism and Detoxification of Drugs, Toxic Substances and Other Organic Compounds, Second Edition, Chapman & Hall, United Kingdom.
- [108] Matsumoto, M. ve Watanabe, N., (1984). "A Facile Synthesis of 4-Oxo-4,5,6,7-tetrahydroindoles", *Heterocycles*, 22:2313-2316
- [109] 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.
- [110] Avan, İ., (2006). Bazı İndol Bileşikleri Üzerine Kimyasal Çalışmalar, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- [111] Gürkök, A.G., (2007). Biyolojik Önemi Olan İndol Türevi Bileşiklerin Sentezleri, Yapı Aydınlatmaları ve Aktivitelerinin Değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [112] Kaymaz, S., (2006). İndol-3-Karbinol'ün *in vitro* Mikrozomal Metabolik Reaksiyonlarının İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [113] Demir, A.S., Jeganathan, A. ve Watt, D.S., (1989). "Synthesis of α' -Acyloxy Enones from Enones Using Manganese(III) Acetate in Combination with Manganese(II) Carboxylates or Carboxylic Acids", *Journal of Organic Chemistry*, 54:4020-4022.
- [114] Demir, A.S. ve Findik H., (2008). "Potassium Permanganate/Carboxylic Acid/Organic Solvent: A Powerful Reagent for Enone Oxidation and Aryl Coupling Reactions", *Tetrahedron*, 64:6198-6201.
- [115] Sopacı, Ş.B., (2009). Microorganism Mediated Stereoselective Bio-Oxidation and Bio-Hydrogenation Reactions and Thiamine Pyrophosphate Dependent Enzyme Catalyzed Enantioselective Acyloin Reactions, Doktora Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Ankara.
- [116] Durceylan, Z., (2007). Karyofillen Oksit'in *Neurospora crassa* ile Biyotransformasyonunun İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- [117] Faber, K., (2004). "Biotransformation in Organic Chemistry", 6th Edition, Springer-Verlag, Berlin.
- [118] Geiger, O., (1993). "Enzymes in Organic Chemistry", *Enzymology*, Germany, 424-446; Derleyen: Telefoncu, A., (1997). *Enzimoloji*, Lisansüstü Yaz Okulu, Ege Üniversitesi Matbaası, İzmir.

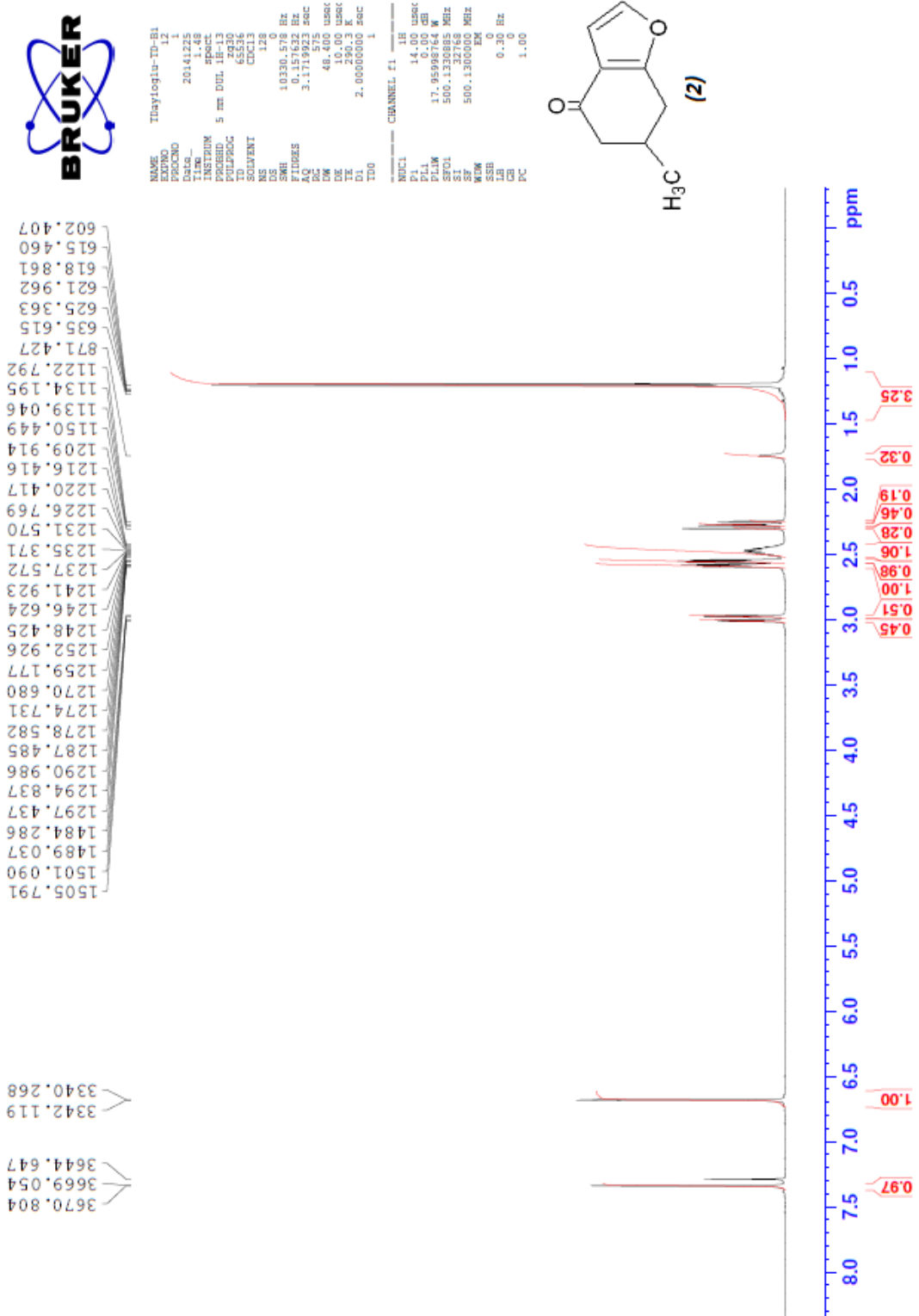
- [119] Söngür, R., (2009). Rasemik Benzoin Asetattan Mikrobiyal Hidroliz Tepkimesi ile Enantiyomerik Saflıkta Benzoin Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [120] Celal Bayar Üniversitesi Gıda Mühendisliği Veri Bankası, Enzimler, <http://www2.bayar.edu.tr/muhendislik/gida/docs/databank/enzimler.pdf>, 3 Aralık 2014.
- [121] İşbakan, N., (2006). Lipaz Enzimi Biyokatalizörlüğünde Enantiyomerik Saflıkta 1-Fenil-1-propanolün Transesterleşme Tepkimesiyle Kinetik Rezolüsyonu, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [122] Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB), Hydrolases EC 3.1.1.3, <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/1/1/3.html>, 3 Aralık 2014.
- [123] Bakış, P., (2007). Enantiyomerik Saflıkta 1-Fenil-1-propanolün Transesterleşme Tepkimesiyle Biyoreaktörde Kinetik Rezolüsyonu, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [124] Ong, A.L., (2008). "Enantioseparation of (R,S)-Ketoprofen Using *Candida antarctica* Lipase B in an Enzymatic Membrane Reactor", Journal of Separation Science, 31:2476-2485.
- [125] Uçar, A., (2011). *Aspergillus sp.* Tarafından Üretilen Amilaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- [126] Dinçer, S., (2010). *Aspergillus niger* as an Expression System for Heterologous Expression of ROL and BTL2, Yüksek Lisans Tezi, Sabancı Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, İstanbul.
- [127] Aras, Ü., (2007). Farklı Ürünlerden İzole Edilen "*Aspergillus niger*" Küflerinin Lipaz Aktivitelerinin Yağca Zengin Kuru Meyvelerde İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [128] Ferreira, I.M., (2014). "Highly Enantioselective Acylation of Chlorohydrins Using Amano AK Lipase from *P. fluorescens* Immobilized on Silk Fibroin-Alginate Spheres", Tetrahedron Letters, 55:5062-5065.
- [129] Wang, B., (2012). "Efficient Kinetic Resolution of Amino Acids Catalyzed by Lipase AS 'Amano' via Cleavage of an Amide Bond", Tetrahedron: Asymmetry, 23:1338-1342.
- [130] Bora, P.P., (2011). "First Example of Hydrolytic Kinetic Resolution of Acrylate of Secondary Alcohols by Lipase Amano AK", Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 72:270-275.
- [131] Li, D., (2006). "Production Enhancement of *Rhizopus arrhizus* Lipase by Feeding Oleic Acid", Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 43:40-43.
- [132] Tweddell, R.J., (1998). "Esterification and Interesterification Activities of Lipases from *Rhizopus niveus* and *Mucor miehei* in Three Different Types of Organic Media: A Comparative Study", Enzyme and Microbial Technology, 22:439-445.

- [133] Rajendran, A. ve Thangavelu, V., (2009). "Statistical Experimental Design for Evaluation of Medium Components for Lipase Production by *Rhizopus arrhizus* MTCC 2233", LWT-Food Science and Technology, 42:985-992.
- [134] Orhan, A., (2002). *Rhizopus arrhizus*'dan Katı Hal Fermantasyonu ile Lipaz Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- [135] Demir, K.M. ve Elgün A., (2011). "Buğday Ruşeyminin Beslenmedeki Yeri", 1. Ulusal Helal ve Sağlıklı Gıda Kongresi, 19-20 Kasım 2011, Ankara.
- [136] Güven, M., (2012). Farklı Buğday Çeşitlerinden Elde Edilen Rüşeym Yağlarının Yağ Asidi Dağılımları ve Antioksidan Aktiviteleri Üzerine Bir Araştırma, Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyon.
- [137] Pancholy, S.K. ve Lynd, J.Q., (1972). "Characterization of Wheat Germ Lipase", Phytochemistry, 11:643-645.
- [138] Polatoğlu, K., (2009). *Tanacetum chiliophyllum* (Fisch. & Mey.) Schultz Bip. Türü Varyeteleri Üzerinde Karşılaştırmalı Fitokimyasal ve Biyolojik Araştırmalar, Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [139] US 6,407,261 B1 (2002). Process for Preparing 4-Hdryoxy Indole, Indazole and Carbazole Compounds, United States Patent, Indianapolis.
- [140] Synthetic Exploitation of Enzymes: Biocatalysis In Organic Solvents: Fundamentals, http://users.unimi.it/ScDotChi/documents/lezioni/riva_sergio/Riva%20Organic%20solvents%20%207%20fundamentals.pdf, 8 Ocak 2015.
- [141] Fransson, L., (2008). "Enzyme Substrate Solvent Interactions: A Case Study on Serine Hydrolases", Doktora tezi, Royal Institute of Technology School of Biotechnology, Stockholm.

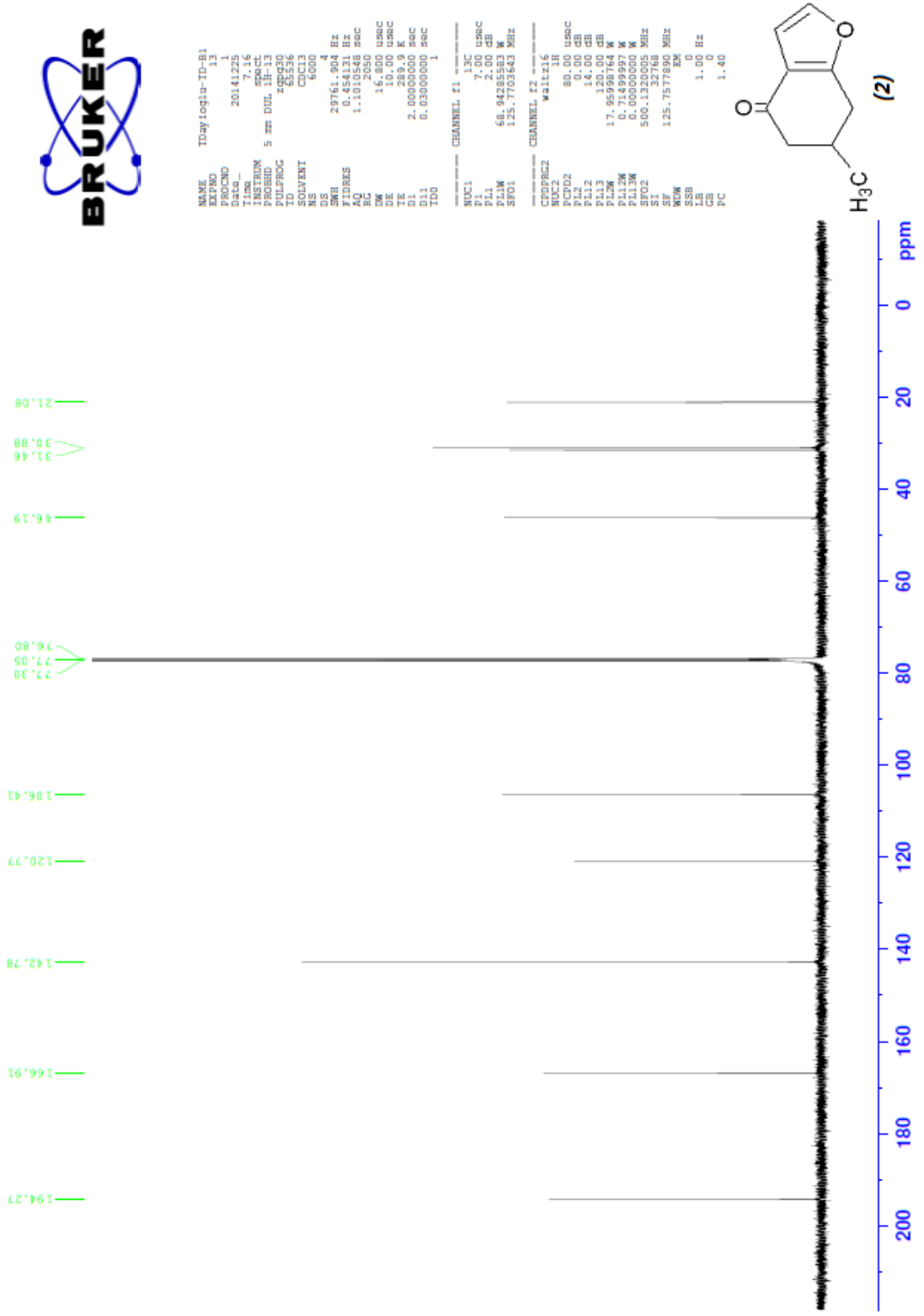
EK-A

NMR SPEKTRUMLARI

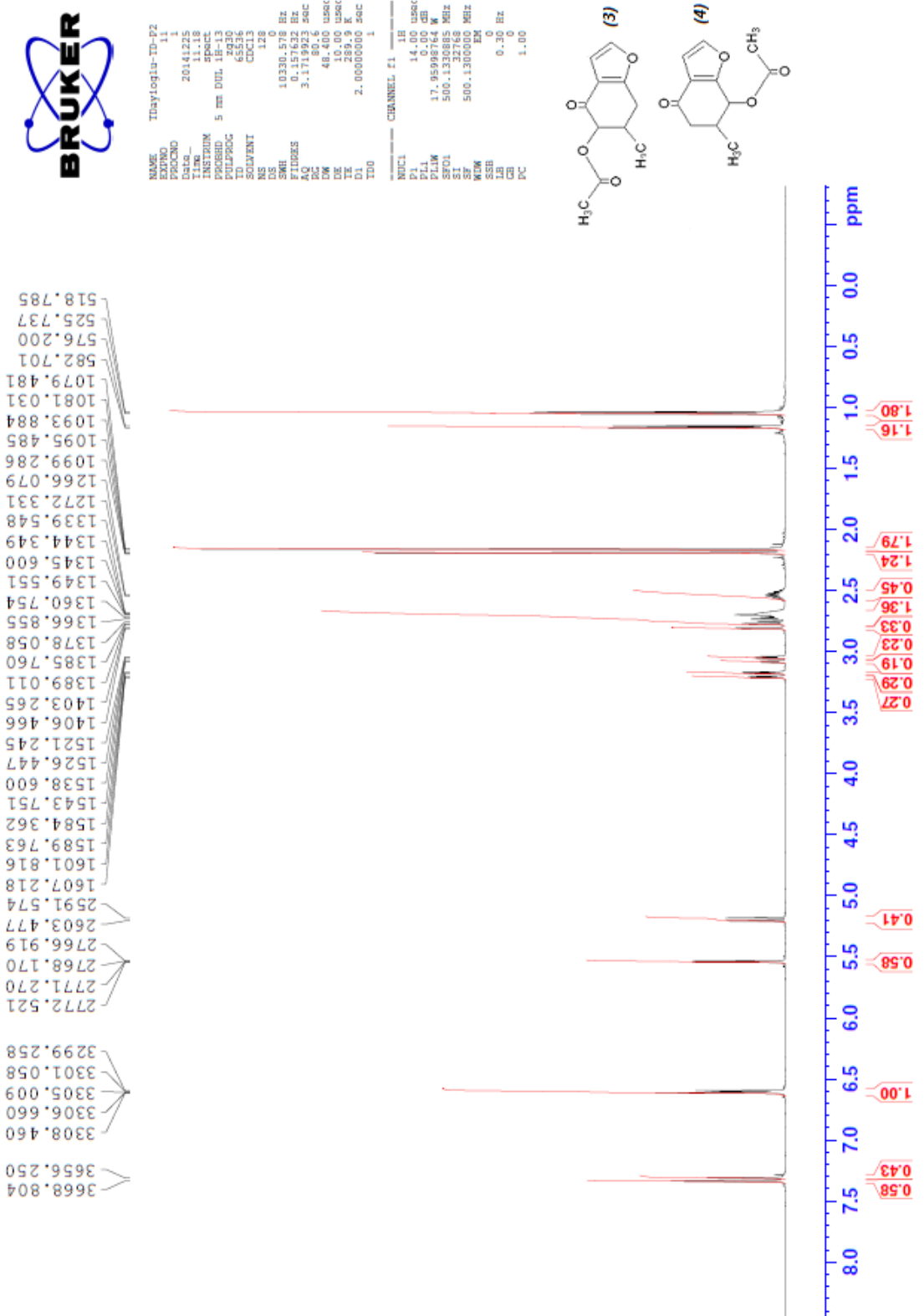




Şekil Ek 1 6,7-dihidro-6-metilbenzofuran-4(5H)-on ^1H NMR sonucu



Şekil Ek 2 dihidro-6-metilbenzofuran-4(5H)-on C¹³NMR sonucu



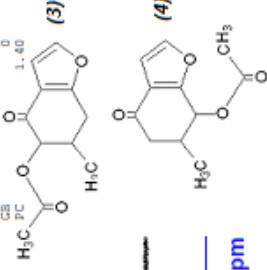
Şekil Ek 3 4,5,6,7-tetrahydro-6-metil-4-oksobenzofuran-5-il asetat bileşiği **(3)** ve 4,5,6,7-tetrahydro-6-methyl-4-oxobenzofuran-7-yl acetate **(4)** ^1H NMR sonucu



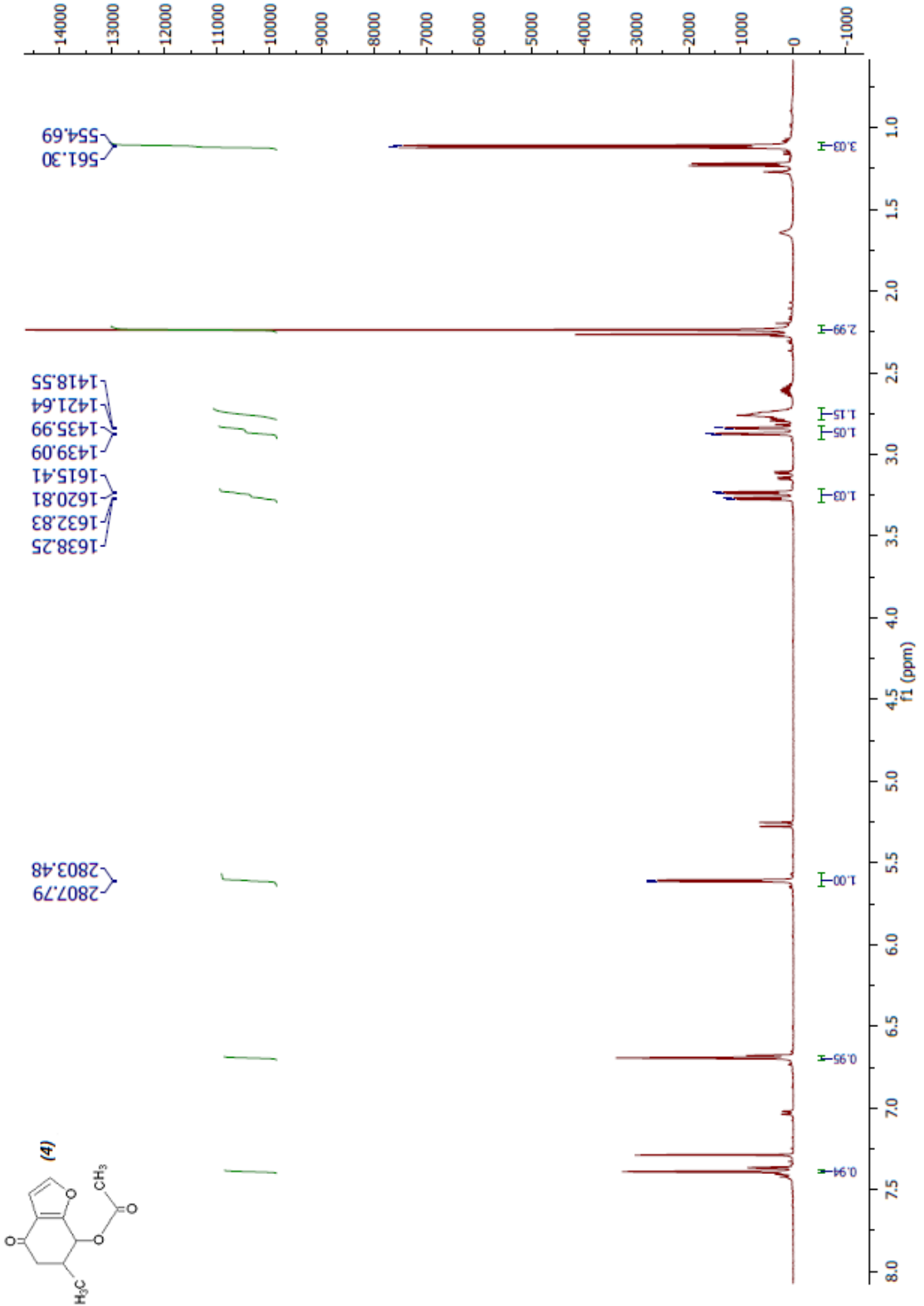
NAME Tdayloglu-ID-F2
EXPNO 12
PROCNO 1
Date_ 20141225
Time 9.06
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm DUL ABXCL
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 2048
DS 4
AQ 29761.908 Hz
F2 10.45431 Hz
F3 1.1010548 kHz
RG 2050
DM 16.800 uS/kc
DE 18.00 uS/kc
TE 300.2 K
D1 2.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 7.00 uS/kc
PL1 2.00 dB
PL1W 68.9428583 W
SFO1 125.7703643 MHz

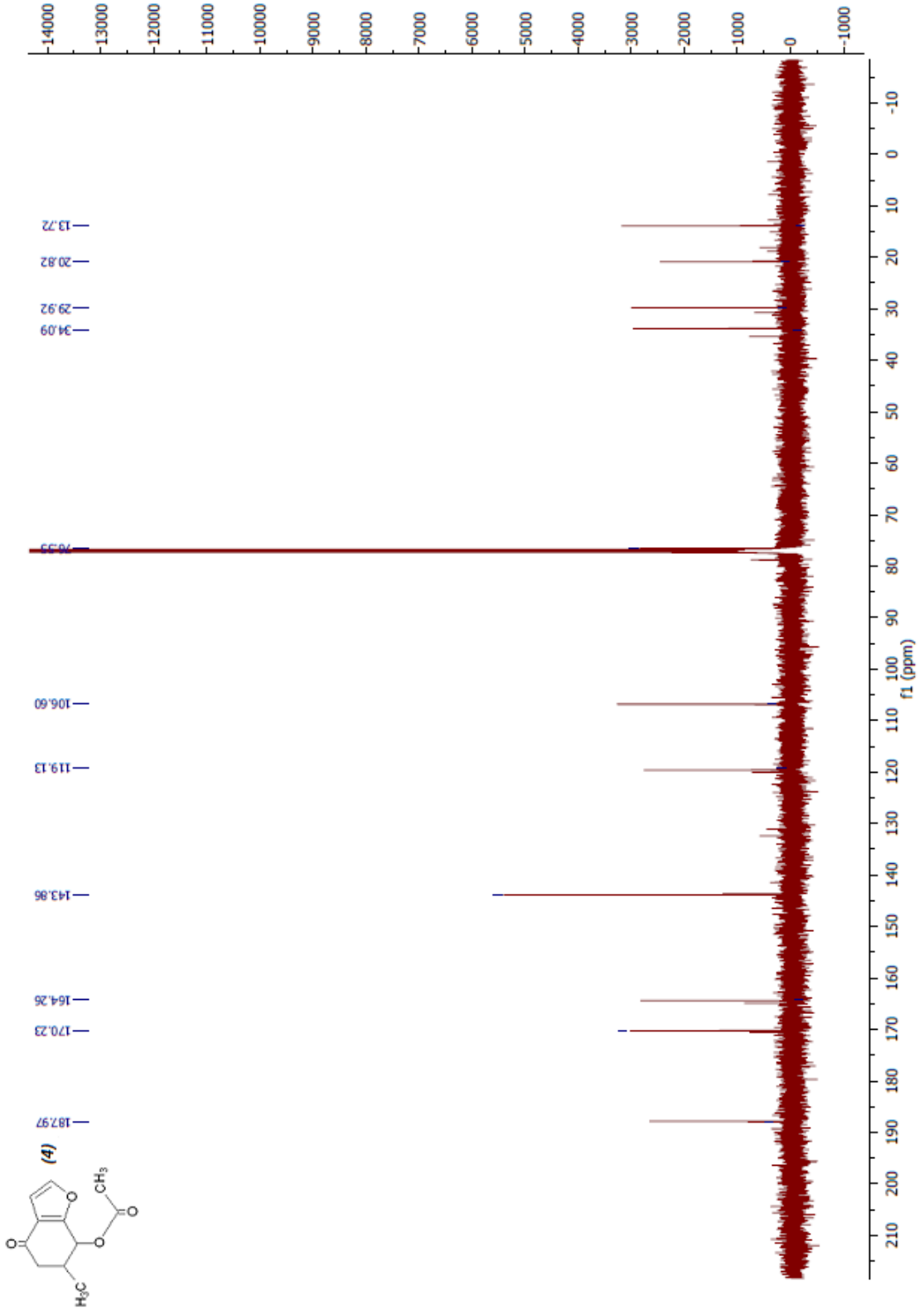
===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 uS/kc
P12 0.00 dB
PL2 0.00 dB
PL2W 0.0000000 W
P13 120.00 dB
PL3 17.95998764 W
P13W 0.71499997 W
P14 0.00000000 W
SFO2 500.135092 MHz
SF 125.7577896 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40



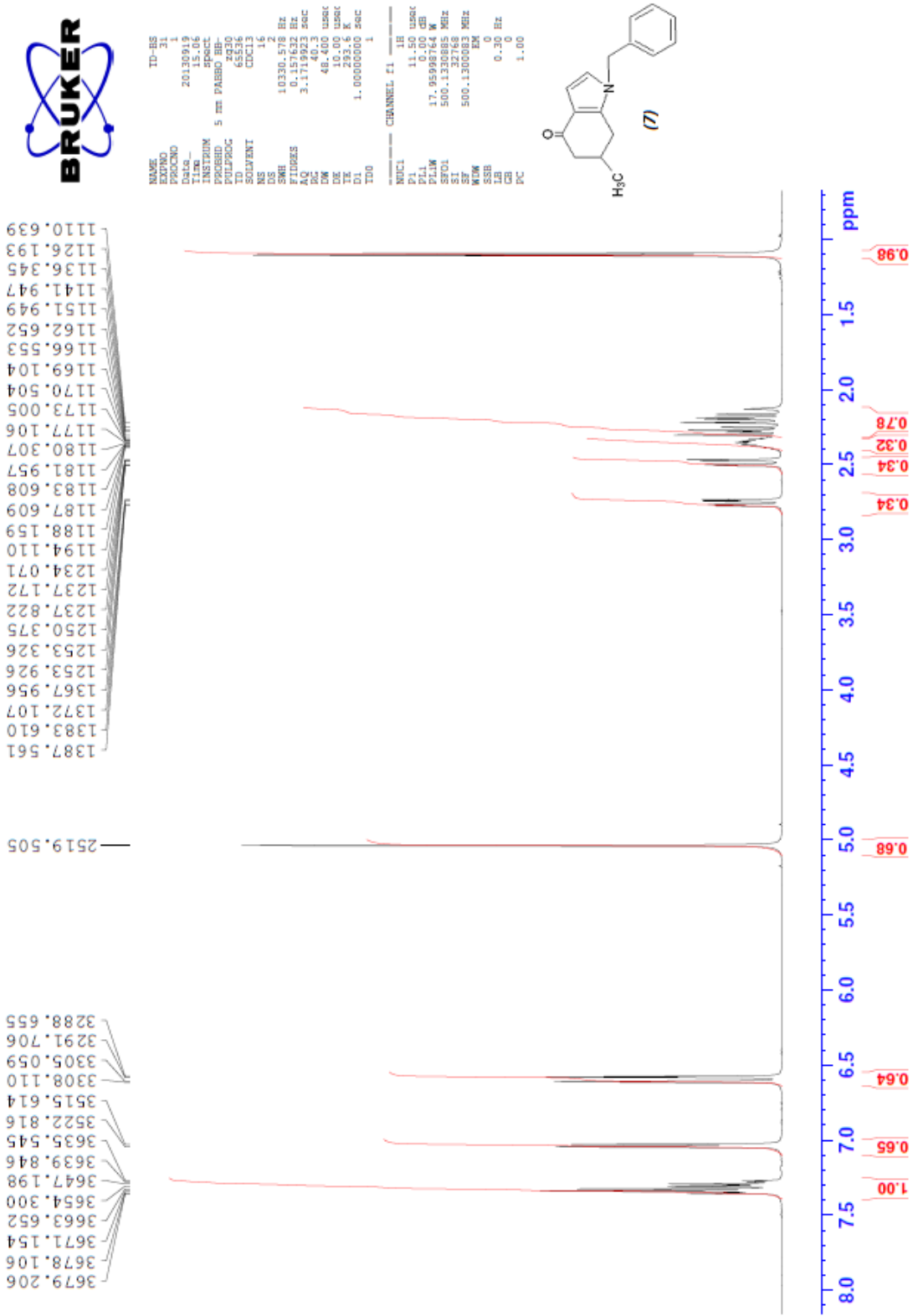
Şekil Ek 4 4,5,6,7-tetrahydro-6-metil-4-oksobenzofuran-5-il asetat bileşiği **(3)** ve 4,5,6,7-tetrahydro-6-methyl-4-oksobenzofuran-7-yl acetate **(4)** C^{13} NMR sonucu



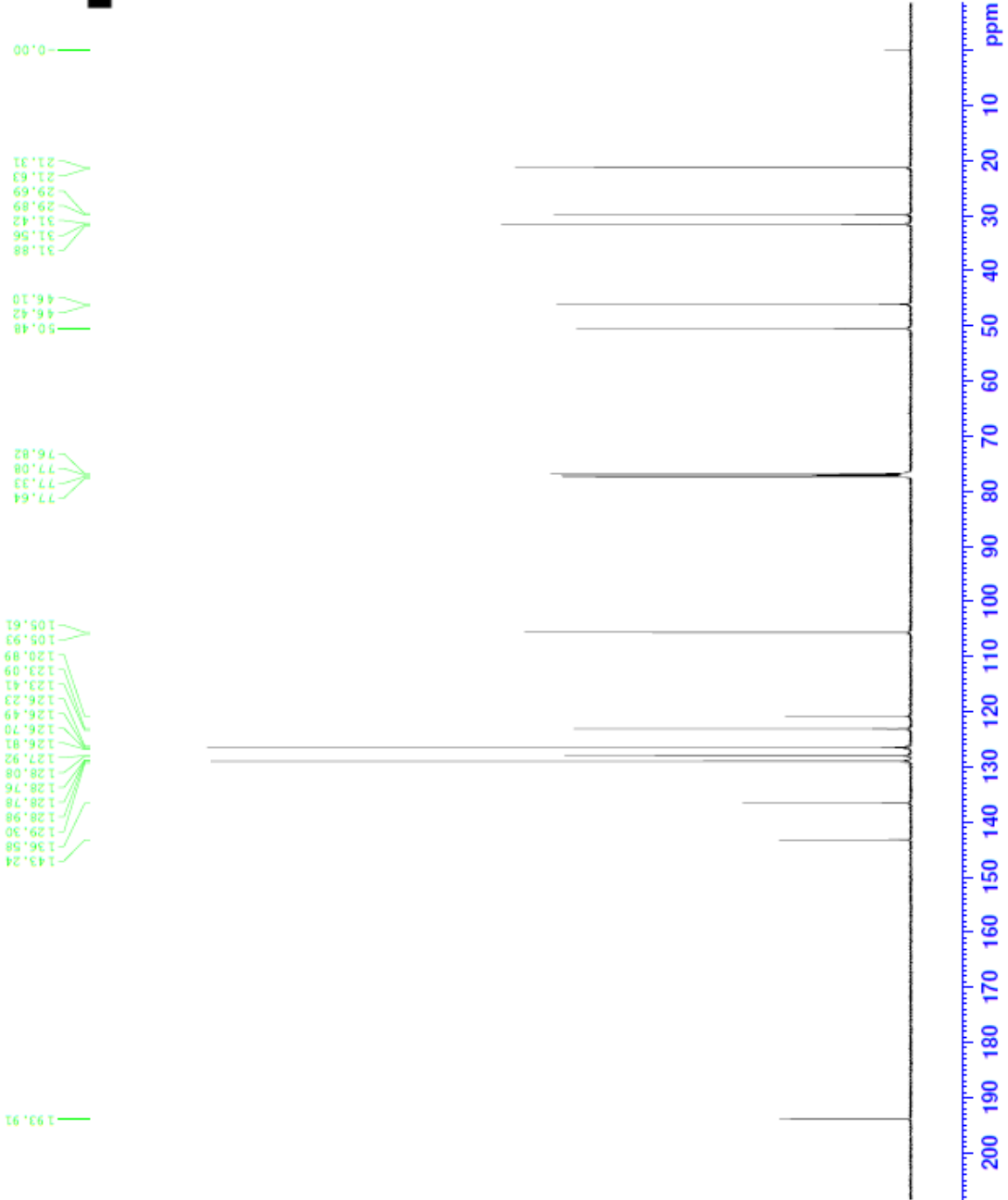
Şekil Ek 5 HPLC OD-H kiral kolonda saflaştırılan (12,5dk) 4,5,6,7-tetrahydro-6-methyl-4-oxobenzofuran-7-yl acetate (**4**) H¹NMR sonucu (4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-5-il asetat bileşiği (**3**) az miktarda)



Şekil Ek 6 HPLC OD-H kiral kolonda saflaştırılan (12,5dk) 4,5,6,7-tetrahydro-6-methyl-4-oxobenzofuran-7-yl acetate (**4**) C^{13} NMR sonucu (4,5,6,7-tetrahydro-6-metil-4-oksobenzofuran-5-il asetat bileşiği (**3**) az miktarda)



Şekil Ek 7 1-Benzil-6,7-dihidro-6-metil-1H-indol-4(5H)-on (7) H¹NMR sonucu

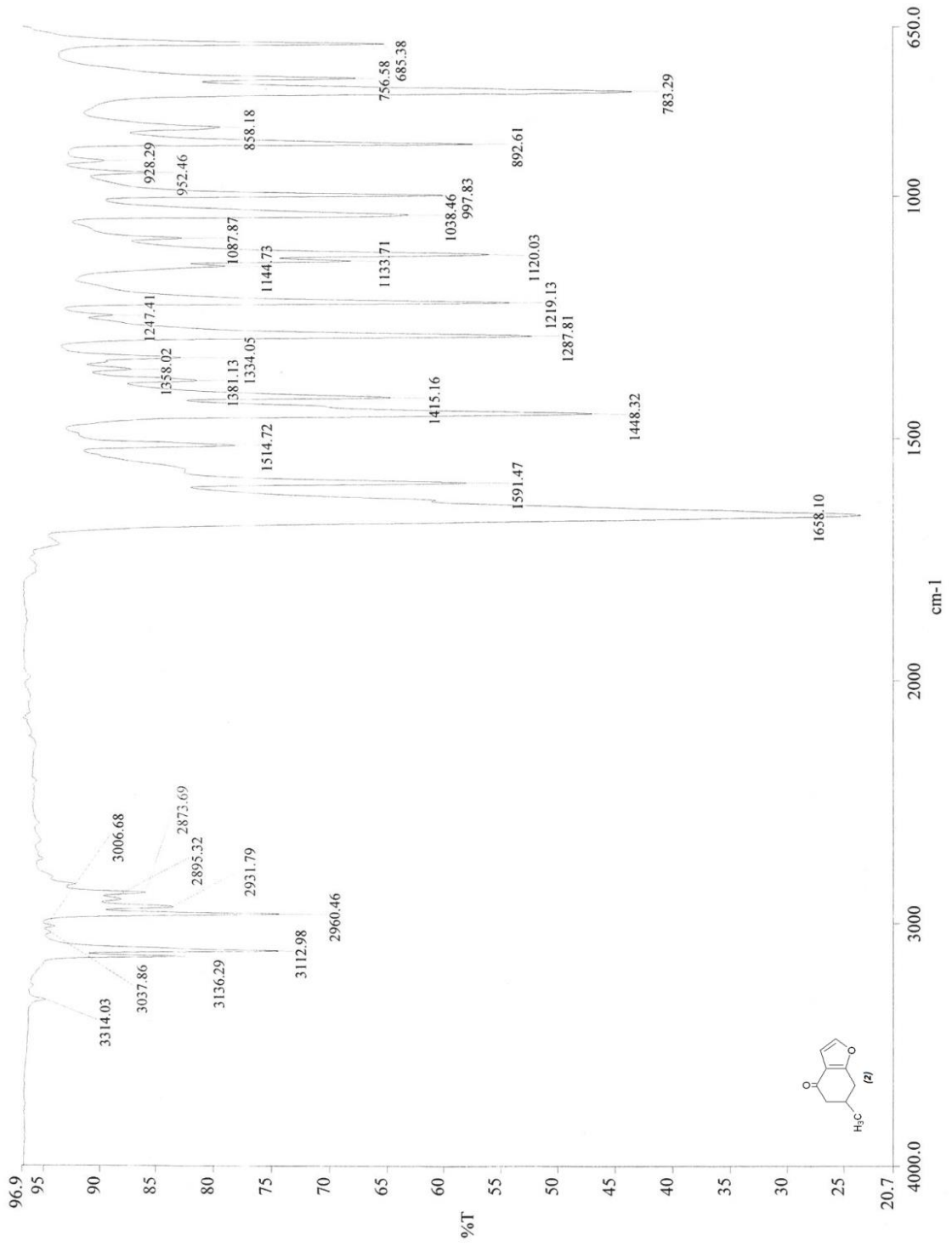


Şekil Ek 8 1-Benzil-6,7-dihidro-6-metil-1H-indol-4(5H)-on (7) C¹³NMR sonucu

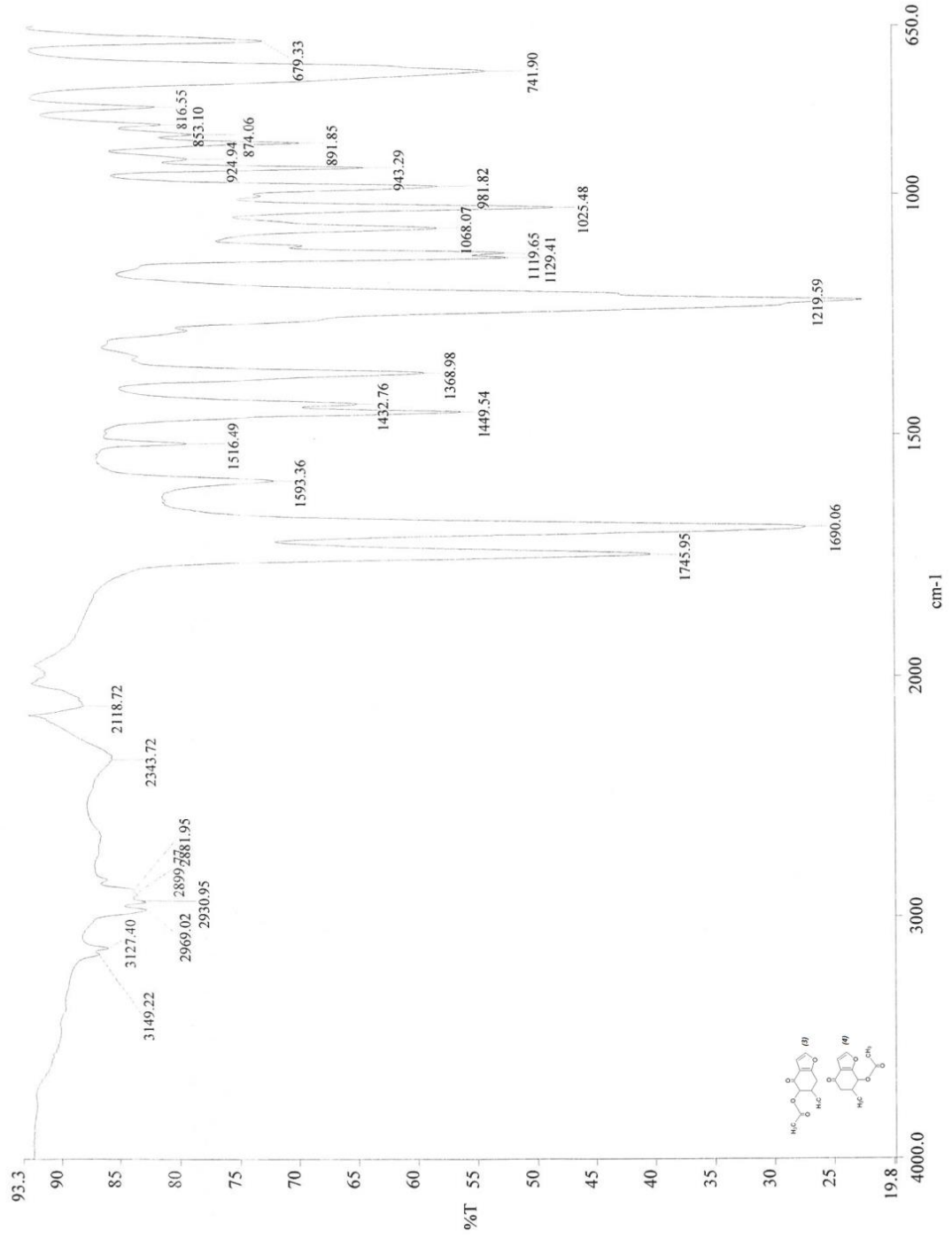
EK-B

IR SPEKTRUMLARI

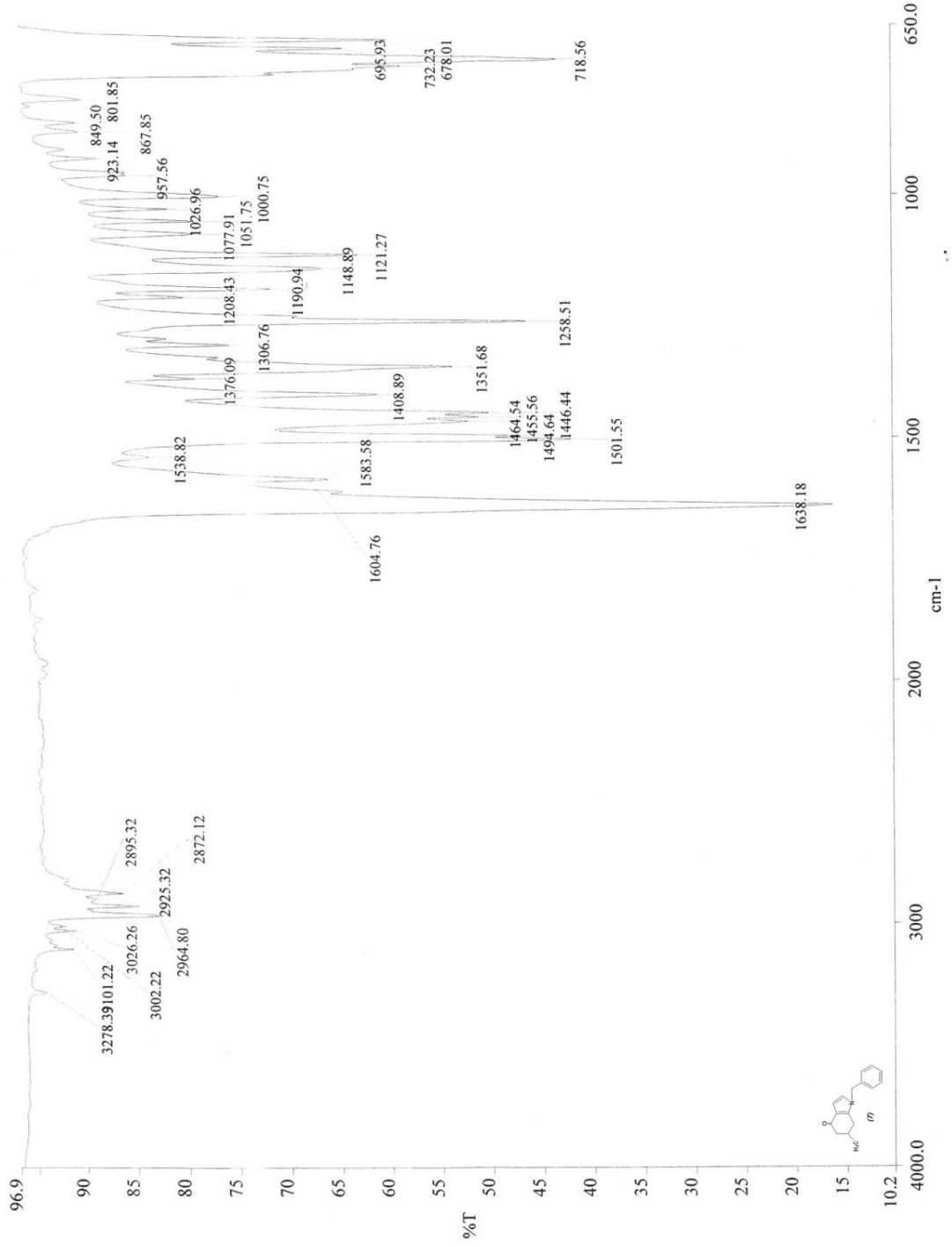




Şekil Ek 11 6,7-Dihidro-6-metilbenzofuran-4(5H)-on IR sonucu



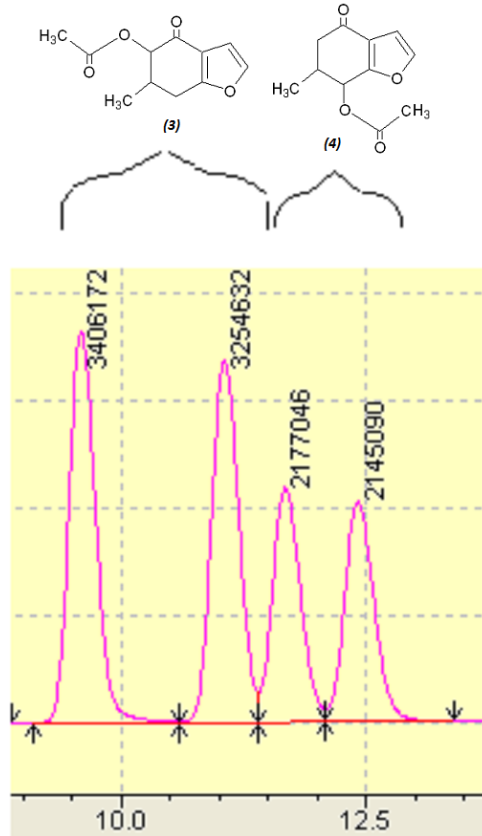
Şekil Ek 12 4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-5-il asetat bileşiği (**3**) ve 4,5,6,7-tetrahidro-6-methyl-4-oxobenzofuran-7-yl acetate (**4**) IR sonucu



Şekil Ek 13 1-Benzil-6,7-dihidro-6-metil-1H-indol-4(5H)-on (**7**) IR sonucu

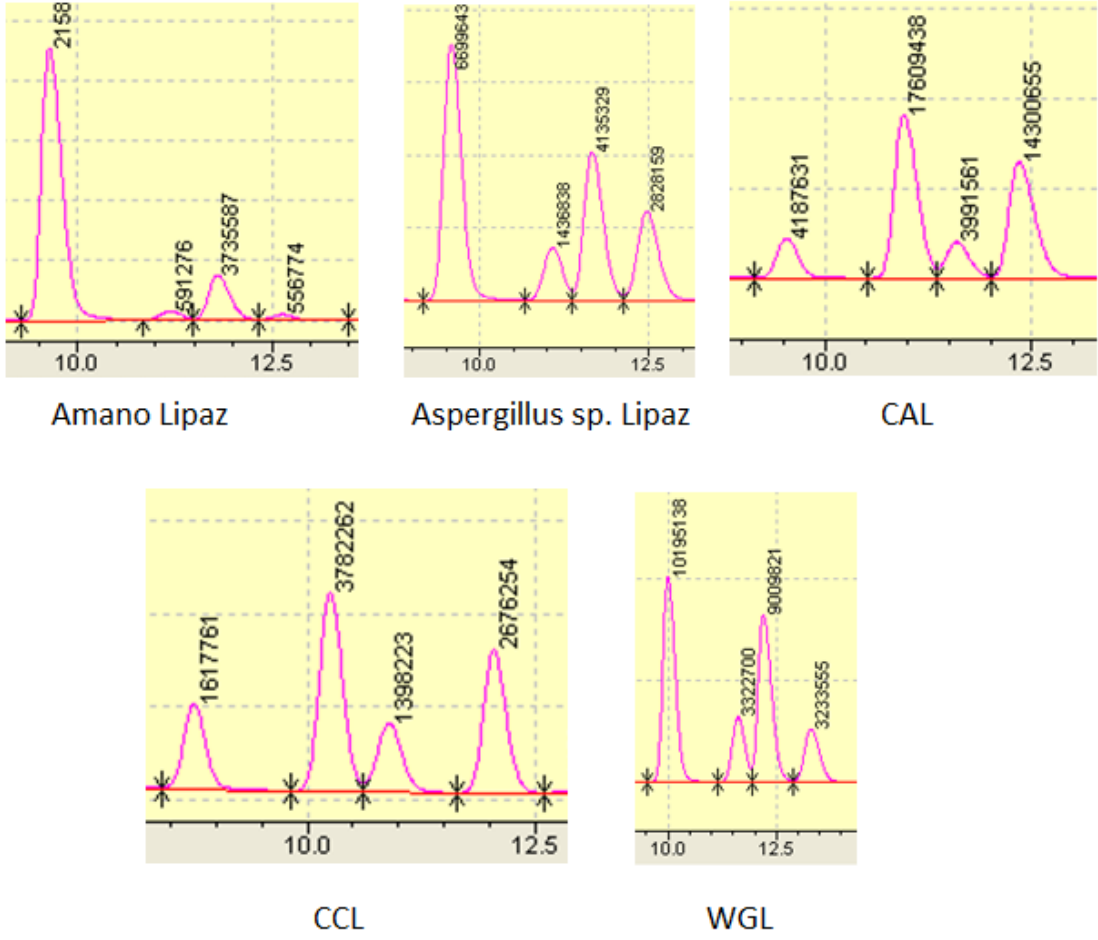
HPLC SONUÇLARI

HPLC OD-H analitik kiral kolonda (cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)) 1:15 (2-propanole:hexane) çözücü sistemi ve akış hızı 0,5'te saflaştırılarak konumları belirlenen 4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (**3**) ve 4,5,6,7-tetrahidro-6-methyl-4-oxobenzofuran-7-yl acetate (**4**) bileşiklerinin HPLC OD-H analitik kiral kolondaki (1:15 2-propanole:hexane; akış hızı: 1) analiz sonuçları aşağıdaki gibidir:



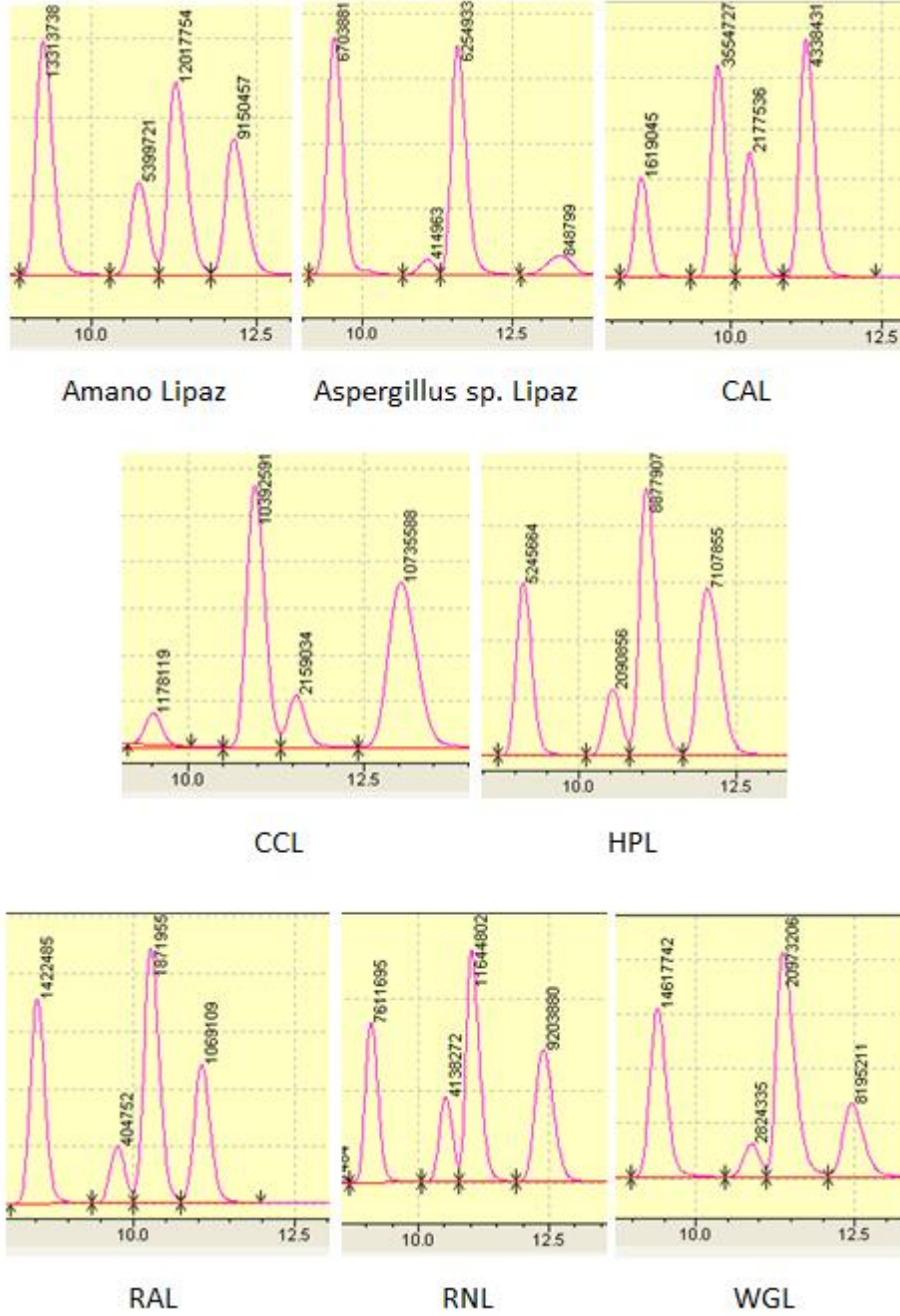
Şekil Ek 14 4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (**3**) ve 4,5,6,7-tetrahidro-6-methyl-4-oxobenzofuran-7-yl acetate (**4**) bileşiklerinin HPLC OD-H analitik kiral kolondaki analiz sonuçları

C-1 Asetonitril Ortamında Lipaz Enzimleri ile Kiral Rezolüsyon



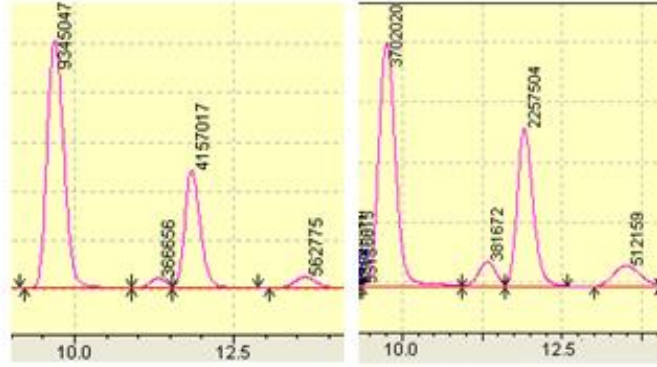
Şekil Ek 15 4,5,6,7-tetrahydro-6-metil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (**3**) ve 4,5,6,7-tetrahydro-6-methyl-4-oxobenzofuran-7-yl acetate (**4**) bileşiklerinin asetonitril ortamındaki kiral rezolüsyonunun HPLC analiz sonucu

C-2 DMSO Ortamında Lipaz Enzimleri ile Kiral Rezolüsyon



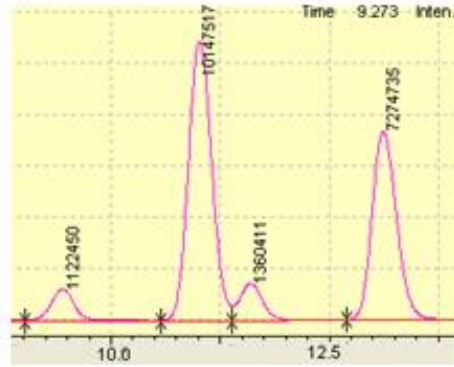
Şekil Ek 16 4,5,6,7-tetrahydro-6-metil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (**3**) ve 4,5,6,7-tetrahydro-6-methyl-4-oxobenzofuran-7-yl acetate (**4**) bileşiklerinin DMSO ortamındaki kiral rezolüsyonunun HPLC analiz sonucu

C-3 THF Ortamında Lipaz Enzimleri ile Kiral Rezolüsyon

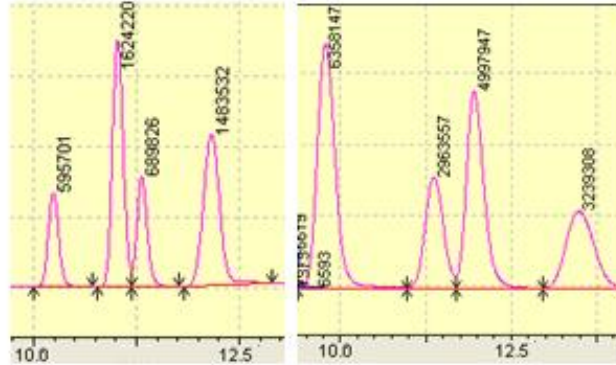


Amano Lipaz

Aspergillus sp. Lipaz



CAL

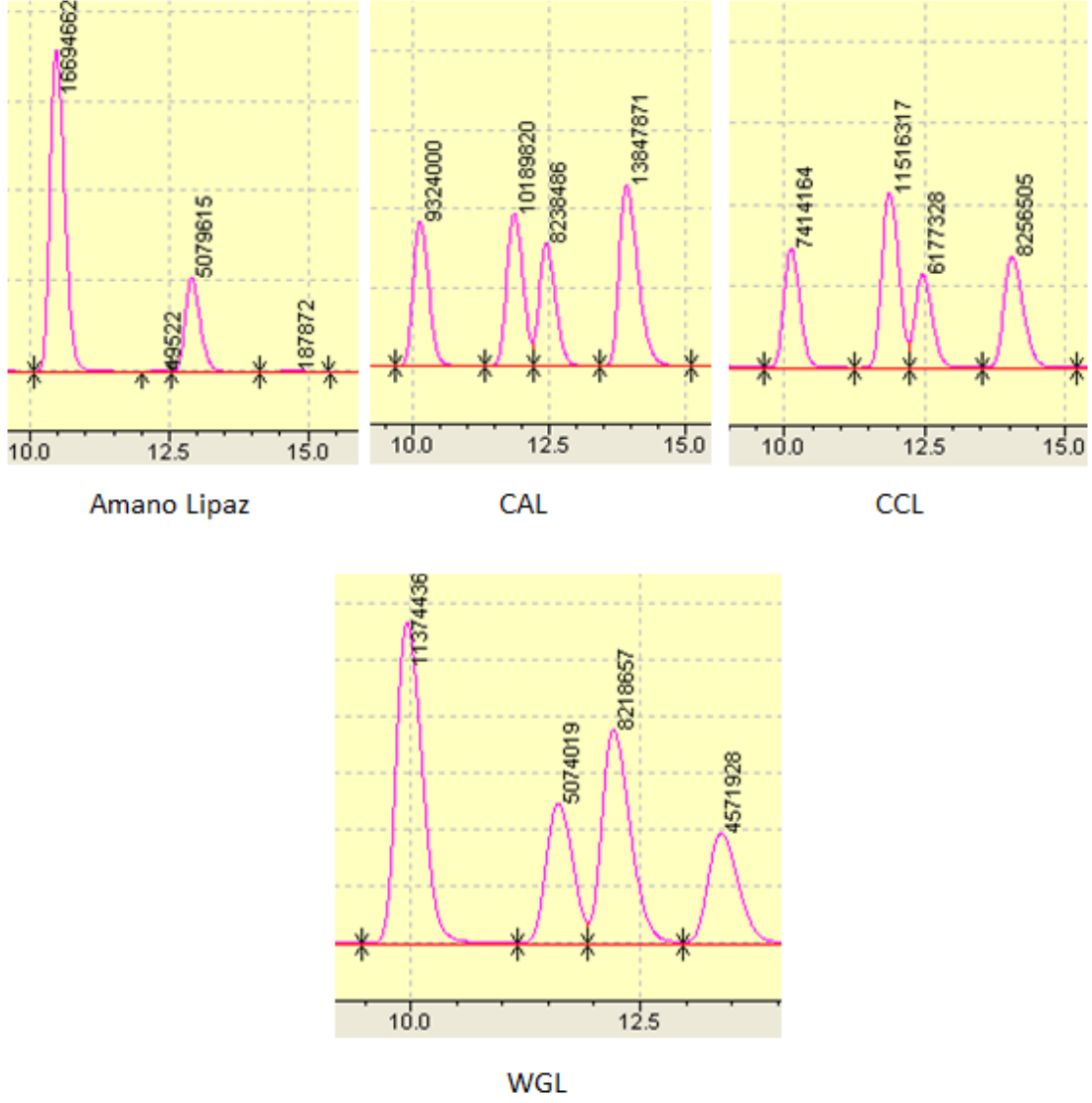


CCL

WGL

Şekil Ek 17 4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (**3**) ve 4,5,6,7-tetrahidro-6-methyl-4-oksobenzofuran-7-yl acetate (**4**) bileşiklerinin THF ortamındaki kiral rezolüsyonunun HPLC analiz sonucu

C-4 Toluen Ortamında Lipaz Enzimleri ile Kiral Rezolüsyon



Şekil Ek 18 4,5,6,7-tetrahidro-6-metil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (**3**) ve 4,5,6,7-tetrahidro-6-methyl-4-oxobenzofuran-7-yl acetate (**4**) bileşiklerinin toluen ortamındaki kiral rezolüsyonunun HPLC analiz sonucu

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Tuğba DAYIOĞLU
Doğum Tarihi ve Yeri : 20/07/1985 Of
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : t.dayioglu@yahoo.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans	Biyoloji Öğretmenliği	Atatürk Üniversitesi	2010
Lise	Fen Bilimleri	Bahçelievler Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi	2003

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2014	Sultanahmet Teknik ve Endüstri Meslek Lisesi	Ücretli Öğretmen

YAYINLARI

Bildiri

1. Dayioğlu T., Çalışkan Z., Enantioselective Hydrolysis of Dihydrobenzofuranone Derivatives with Chemoenzymatic Reactions, MOLCHEM, 19.12.2014, İstanbul.