

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LİPAZ ENZİM KATALİZÖRLERİ İLE DİHİDROİNDOL
TÜREVLERİNİN ENANTİOSELEKTİF SENTEZİ

Hazal BÜYÜKKAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Doç. Dr. Zerrin ÇALIŞKAN

Temmuz, 2023

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**LİPAZ ENZİM KATALİZÖRLERİ İLE DİHİDROİNDOL
TÜREVLERİNİN ENANTİOSELEKTİF SENTEZİ**

Hazal BÜYÜKKAYA tarafından hazırlanan tez çalışması 06.07.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Zerrin ÇALIŞKAN
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Zerrin ÇALIŞKAN, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Nehir Özdemir ÖZGENTÜRK, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Aslıhan GÜNEL, Üye
Ahi Evran Üniversitesi

Danışmanım Doç. Dr. Zerrin ÇALIŞKAN sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Lipaz Enzim Katalizörleri İle Dihidroindol Türevlerinin Enantioselektif Sentezi başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Hazal BÜYÜKKAYA

İmza



Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün FYL-2020-3905 numaralı projesi ile desteklenmiştir.



Aileme...

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın hazırlanmasında bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren ve hoşgörüsüyle her zaman yanımda olan değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Zerrin ÇALIŞKAN'a;

Bana her zaman destek olan, karşılaştığım sorunları aşmamı sağlayan, bildiği her şeyi benimle paylaşmaktan çekinmeyen, canım çalışma arkadaşım Zeynep GARİPCAN'a;

Bütün eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen, varlıklarıyla bana güç veren ve her zaman bana inanan canım annem, canım babam ve canım kardeşime;

Bu süreçte yanımda oldukları için sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	xi
KISALTMA LİSTESİ	xii
ŞEKİL LİSTESİ	xv
TABLO LİSTESİ	xix
ÖZET	xx
ABSTRACT	xxii
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	4
1.3 Hipotez	5
2 STEREOKİMYA	6
2.1 İzomerlik Kavramı	6
2.2 Stereoizomerler	6
2.3 Kirallik ve Enantiyomerler.....	7
2.4 Kiral Moleküllerde Optikçe Aktivlik.....	8
2.5 Rasemik Karışım	10
2.6 Enantiyomerlerin Biyolojik Önemi.....	10
2.7 Kiralitenin Biyolojik Önemi ve Kiral İlaçlar	14
2.8 Enantiyomerlerin Saf Olarak Elde Edilmesi	16
2.9 Enantiyosaf Bileşikleri Sentezleme Yöntemleri	18
2.9.1 Kiral Havuz	18
2.9.2 Rasematların Rezolüsyonu.....	18
2.9.3 Tercihli Kristalizasyon	19
2.9.4 Diastomer Kristalizasyonu	19
2.9.5 Kinetik Rezolüsyon.....	20
2.9.6 Kromatografi	21
2.10 Enantiyomerik Saflık (Enantiomeric Excess)	21
2.10.1 Enantiyosaf İlaç Eldesinde Kullanılan Yöntemler	24
2.11 Metil Grubunun İlaç Aktivitesi Üzerindeki Etkisi	25
3 ENZİMLER	29

3.1	Enzimlerin Yapısı ve Özellikleri.....	29
3.2	Enzimlerin Aktivitesini Etkileyen Faktörler	31
3.2.1	pH.....	31
3.2.2	Sıcaklık.....	31
3.2.3	Solvent Etkisi	32
3.2.4	Substrat Etkisi	32
3.2.5	Reaksiyon Ürünleri	33
3.2.6	Zaman.....	33
3.2.7	Aktivatör ve İnhibitörler	33
3.3	Enzimlerin Sınıflandırılması	34
3.4	Lipaz Enzimleri	35
3.4.1	Lipazların Yapısı	37
3.4.2	Lipazların Sınıflandırılması	38
3.4.2.1	Substrat Spesifik Lipazlar	38
3.4.2.2	Regioselektif Lipazlar	39
3.4.2.3	Enantiyoselektif Lipazlar	39
3.4.2.4	Bitki Kaynaklı Lipazlar	40
3.4.2.5	Hayvan Kaynaklı Lipazlar	40
3.4.2.6	Mikroorganizma Kaynaklı Lipazlar.....	40
3.4.3	Lipazların Katalizlediği Reaksiyon Türleri.....	41
3.4.4	Lipaz Aktivitesine Etki Eden Faktörler.....	42
3.4.5	Lipaz Enzimlerinin Kullanım Alanları	43
4	BİYOTRANSFORMASYON	45
4.1	Geçmişten Günümüze Biyotransformasyon	45
4.2	Biyotransformasyonun Kimyasal Sentez Yöntemlerine Göre Avantajları..	47
4.3	Biyotransformasyonun Bazı Sınırlılıkları	47
4.4	Kullanılan Biyokatalizöre Göre Biyotransformasyonun Sınıflandırılması..	47

4.4.1	Biyokatalizör Olarak Enzimler	47
4.4.2	Biyokatalizör Olarak Bütün Hücre Sistemleri	49
4.4.3	Enzim Ve Bütün Hücre Sistemlerinin Karşılaştırılması	50
4.5	Biyotransformasyon Reaksiyon Türleri	51
4.6	Biyotransformasyonu Etkileyen Faktörler	51
4.7	Biyotransformasyon ve Yeşil Kimya	52
4.8	Biyotransformasyon ve Farmasötik Endüstrisi	54
4.9	Bazı İlaçların Enzimatik Enantiyosaf Sentezi	55
4.9.1	Antiviral İlaç – Lobucavir	55
4.9.2	Antihipertansif İlaç – Zofenopril ((S)-3 Benzoiltiyo-2 Metilpropanoik Enzimatik Sentezi)	55
4.9.3	Antialzheimer İlacı – (S)-2-Pentanol ve (S)-2-Heptanol	56
5	İNDOL İSKELET YAPISINA SAHİP BİLEŞİKLER	57
6	MATERYAL METOT	61
6.1	Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar	62
6.2	Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar	64
6.3	Sentez Rotası	67
6.3.1	6,7-Dihidro-6-metilbenzofuran-4(5H)-on Sentezi	68
6.3.2	Benzofuran Bileşiğinin Seal Tüp Reaksiyonu	71
6.3.3	Potasyum Permanganat Katalizörlüğünde Asetoksi-İndol Sentezi	75
6.3.4	Asetoksi-İndol Bileşiğinin Lipaz Katalizli Esterifikasyon Reaksiyonları	79
7	SONUÇ	82
7.1	Benzofuran Sentezi	82
7.2	İndol Türevlerinin Sentezi	82
7.3	KMnO ₄ Katalizörlüğünde İndol Türevlerinin Asetoksilasyonu	84
7.4	Lipaz Katalizli Esterifikasyon Reaksiyonları	85
7.5	Sonuç	90
	KAYNAKÇA	92
	A 6,7-dihidro-6-metilbenzofuran-4(5H)-on(2) Bileşiği İçin Spektral Analizler	104

B 1-benzil-6,7-dihidro-6-metil-1H-indol-4(5H)-on (3) Bileşigi İçin Spektral Analizler	108
C 1-benzil-6-metil-4-okso-4,5,6,7-tetrahidro-1H-indol-5-il asetat (4) Bileşigi İçin Spektral Analizler	112
D 1-benzil-5-hidroksi-6-metil-6,7-dihidro-1H-indol-4(5H)-on (5) Bileşigi İçin Spektral Analizler	116
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	119



SİMGE LİSTESİ

α	Alfa
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Celcius
δ	Delta
γ	Gama
$\sim$	yaklaşık
%	yüzde
μl	Mikrolitre
cm	Santimetre
ml	Mililitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre

KISALTMA LİSTESİ

Ab1	Abelson interactor 1
atm	Atmosfer basıncı
BMS	Bristol Myers Squibb
C ₁₆ H ₁₇ ON	1-benzil-6,7-dihidro-6-metil-1H-indol-4(5H)-on
C ₂₀ H ₂₀ O ₃ N	α -asetoksi-1-benzil-6,7-dihidro-6-metil-1H-indol-4(5H)-on
C ₂ HCl ₃ O	Kloroasetaldehit
CaCO ₃	Kalsiyum karbonat
CC	Kolon kromatografisi
CCL	<i>Candida cylindracea</i> lipazı
CD	Dairesel dikroizm
CE	Kapiler elektroforez
CH ₃ C ₆ H ₇ O ₂	5-metil-1,3-sikloheksadion
CRL	<i>Candida rugosa</i> lipaz
D-	Dekstrorotatory
ddH ₂ O	Double distile su
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
E.C.	Enzim komisyonu numarası
ee	Enantiyomerik fazlalık
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GC	Gaz Kromatografisi
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

HPTLC	Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi
ID	İzotop seyreltme
IR	Infrared
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
K ₂ CO ₃	Potasyum karbonat
KMnO ₄	Potasyum permanganat
L-	Levorotatory
MAO-B	Monoamin Oksidaz-B
Me	Metil grubu
MHH-ES-1	Human Bone Ewing's sarcoma hücre hattı
MisC	Çeşitli Metodlar
MJL	<i>Mucor javanicus</i> lipaz
NaHCO ₃	Sodyum bikarbonat
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
PDGFR	Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü Reseptörü (Platelet-derived growth factor reseptor)
PPL	Porcine pancreatic lipase
PS-30	Amano lipaz (<i>Burkholderia cepacia</i> lipaz)
(R)	Rektus (sağ)
Rac	Rasemik
RNA	Ribonükleik asit
ROL	<i>Rhizopus oryzae</i> lipaz
(S)	Sinister (sol)
SFC	Süperkritik Akışkan Kromatografisi
SMBC	Simüle Hareketli Yatak Kromatografisi
sp.	Species (tür)

THF	Tetrahidrofuran
TLC	Thin Layer Chromatography
TNF	Tümör nekroz faktörü
UV	Ultraviyole



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1	İndol halkası yapısı.....	1
Şekil 1.2	4-[(4-Floro-2-metil-1H-indol-5-il)oksi]-6-metoksi-7-[3-(pirolidin-1-il) propoksi].....	2
Şekil 1.3	(1S,4aS,5aS,6R,10aR)-1-metil-2'-oksospiro [1,4a,5,5a,7,8,10,10a-oktahidropirano[3,4-f]indolizin-6,3' -1H-indol]-4-karboksilat.....	2
Şekil 1.4	Thalidomide ve Thalidomide kullanımı sonrası uzuv eksikliğiyle dünyaya gelmiş bir çocuk	3
Şekil 1.5	Lipaz enzimi aktivitesi	4
Şekil 2.1	İzomerlerin Sınıflandırılması	6
Şekil 2.2	Kiral karbon atomu.....	7
Şekil 2.3	Kiralitenin anlaşılmasında verilen el örneği	7
Şekil 2.4	Laktik asidin enantiyomerleri.....	8
Şekil 2.5	Polarimetre	8
Şekil 2.6	Louis Pasteur	9
Şekil 2.7	Tartarik asit enantiyomerleri	10
Şekil 2.8	Rasemik karışım	10
Şekil 2.9	Ibuprofen, Propranolol ve Betaxolol	11
Şekil 2.10	İbuprofenin (S) ve (R) enantiyomerlerinin moleküler yapısı	11
Şekil 2.11	Sotalolün (S) ve (R) enantiyomerlerinin moleküler yapısı	12
Şekil 2.12	Ketaminin (S) ve (R) enantiyomerlerinin moleküler yapısı	12
Şekil 2.13	Fluoksetinin (S) ve (R) enantiyomerlerinin moleküler yapısı	13
Şekil 2.14	Penicillamine, Bupivacaine, Thalidomid	13
Şekil 2.15	Bupivacaine moleküler yapısı	13
Şekil 2.16	Hamilelikte Talidomit kullanımı sonucu dünyaya gelen bir çocuk	14
Şekil 2.17	Talidomit enantiyomerler	15
Şekil 2.18	Talidomidin neden olduğu doğum kusurları	15
Şekil 2.19	Prof. Dr. Süreyya Tahsin Aygün	16
Şekil 2.20	Enantiyosaf bileşiklerin eldesi.....	17
Şekil 2.21	a)stereoselektif sentez b)rasematların resolüsyonu	18
Şekil 2.22	Rasemat resolüsyonu yöntemleri.....	19
Şekil 2.23	Enantiyomerlerin diastereomerlere dönüştürülmesi.....	20
Şekil 2.24	Katalitik kinetik resolüsyon.....	20
Şekil 2.25	a) geleneksel kinetik rezolüsyon b)dinamik kinetik rezolüsyon	21

Şekil 2.26 Enantiyomerik saflık tespitinde kullanılan yöntemler.....	22
Şekil 2.27 Enantiyosaf ilaç elde etme yöntemleri	24
Şekil 2.28 2010-2020 dönemi boyunca yıllık FDA onaylı ilaçların karşılaştırması (saf enantiyomerler, rasematlar ve akiral ilaçlar).....	25
Şekil 3.1 Anahtar kilit modeli.....	30
Şekil 3.2 Uyarılmış uyum modeli.....	31
Şekil 3.3 Sıcaklığın tepkime hızına etkisi	32
Şekil 3.4 Substrat konsantrasyonunun tepkime hızına etkisi	33
Şekil 3.5 Aktivatörlerin ve inhibitörlerin reaksiyon hızına etkisi	33
Şekil 3.6 Enzim sınıflandırmasında kullanılan kod örneği (Asit fosfataz enziminin EC kodu)	34
Şekil 3.7 Lipaz enziminin EC kodu.....	36
Şekil 3.8 Lipazların genel reaksiyonu	36
Şekil 3.9 Lipazların kullanım alanları	37
Şekil 3.10 Lipazların sınıflandırılması	38
Şekil 3.11 Lipaz katalizli hidroliz genel reaksiyon	41
Şekil 3.12 Lipaz katalizli esterifikasyon genel reaksiyon	41
Şekil 3.13 Alkolizis genel reaksiyonu	42
Şekil 3.14 Asidolizis genel reaksiyonu.....	42
Şekil 3.15 İnteresterifikasyon genel reaksiyonu.....	42
Şekil 3.16 Lipaz katalizli aminolizis genel reaksiyonu	42
Şekil 4.1 Biyotransformasyonun tarihçesi.....	46
Şekil 4.2 Kinetik rezolüsyon ve asimetrik sentez verimi örneği	48
Şekil 4.3 Enzimlerin biyokatalizör olarak kullanıldığı biyokatalitik süreçlerin sınıflandırılması	49
Şekil 4.4 Biyotransformasyon reaksiyon türleri	51
Şekil 4.5 Lobucavirin regioselektifenzimatik aminoaçılaması (1) Lobucavir, (2) Elde edilmesi istenilen ürün, (3) Lobucavir öncül ilaç maddesi	55
Şekil 4.6 Zofenopril yan zincirinin sentezi: rasemik 3-benziltiyo-2-metilpropanoik asidin enantioselektif enzimatik esterifikasyonu	56
Şekil 4.7 Anti-Alzheimer ilaçları için kiral ara maddelerin sentezi: <i>Candida antarctica</i> lipaz ile rasemik 2-pentanol ve 2-heptanolün enzimatik rezolüsyonu	56
Şekil 5.1 İndol halkası yapısı.....	57
Şekil 5.2 İndol nükleusunun farmakolojik önemi	58
Şekil 6.1 Sentez rotası	67
Şekil 6.2 (2) numaralı bileşik sentezi reaksiyon düzeneği	68
Şekil 6.3 pH metre ile reaksiyon pH değerinin 1'e ayarlanması.....	69

Şekil 6.4 Ekstraksiyon aşaması	69
Şekil 6.5 (1) bileşiğinden (2) bileşiği sentezi	70
Şekil 6.6 (2) numaralı bileşiğin 254 nm UV ışık altındaki İTK görüntüsü	70
Şekil 6.7 Petroleum eter ile yıkama sonucu elde edilen single kristaller	70
Şekil 6.8 (3) numaralı bileşiğin sentez düzeneği	71
Şekil 6.9 (3) numaralı bileşiğin sentezinin gerçekleştiği seal tüp	72
Şekil 6.10 Ekstraksiyon aşaması	72
Şekil 6.11 (2) numaralı bileşikten benzilamin aracılı (3) numaralı bileşiğin sentezi	73
Şekil 6.12 (3) numaralı bileşiğin 254 nm UV ışık altındaki İTK görüntüsü	73
Şekil 6.13 Kolon sonrası elde edilen saf indol (3).....	74
Şekil 6.14 Reaksiyonun gerçekleştiği yan kollu balon ve sentez içeriği.....	75
Şekil 6.15 (4) numaralı bileşiğin reaksiyon düzeneği	75
Şekil 6.16 Ekstraksiyon aşaması	76
Şekil 6.17 (3) numaralı bileşikten (4) numaralı asetat bileşiğinin sentezi reaksiyonu ...	76
Şekil 6.18 (4) numaralı bileşiğin 254 nm UV ışık altındaki İTK görüntüsü	77
Şekil 6.19 Preparatif İTK ile saflaştırma	77
Şekil 6.20 Rasemik (4) numaralı bileşiğin lipaz katalizörlü biyotransformasyon reaksiyonu.....	79
Şekil 6.21 Lipaz katalizli esterifikasyon (biyotransformasyon) reaksiyonları deney aşamaları.....	79
Şekil 6.22 Lipaz katalizli gerçekleştirilen biyotransformasyon reaksiyonlarının İTK görüntüleri.....	80
Şekil 7.1 Bileşik (2) bileşiği kristalleri.....	82
Şekil 7.2 (3) numaralı bileşiği sentezinin süre optimizasyonu İTK görüntüsü.....	83
Şekil 7.3 İndol sentezleri ve verimleri.....	83
Şekil 7.4 Saf olarak elde edilen (3) numaralı bileşik.....	84
Şekil 7.5 Dean – Stark Trap düzeneği	84
Şekil 7.6 42. saat sonunda (4) numaralı bileşiğin 254 nm UV ışıktaki İTK görüntüsü	85
Şekil 7.7 Asetonitril’in esterifikasyon reaksiyonları üzerindeki etkisi.....	87
Şekil 7.8 DMSO’nun esterifikasyon reaksiyonları üzerindeki etkisi	88
Şekil 7.9 THF’in esterifikasyon reaksiyonları üzerindeki etkisi	89
Şekil A. 1 Bileşik (2)’nin ¹ H NMR sonucu	105
Şekil A.2 Bileşik (2)’nin ¹³ C NMR sonucu.....	106
Şekil A.3 Bileşik (2)’nin IR sonucu	107
Şekil B.1 Bileşik (3)’ün ¹ H NMR sonucu.....	109
Şekil B.2 Bileşik (3)’ün ¹³ C NMR sonucu	110

Şekil B.3 Bileşik (3)'ün IR spektrumu.....	111
Şekil C.1 Bileşik (4)'ün ^1H NMR sonucu.....	113
Şekil C.2 Bileşik (4)'ün ^{13}C NMR sonucu.....	114
Şekil C.3 Bileşik (4)'ün IR spektrumu	115
Şekil D.1 Bileşik (5)'ün ^1H NMR sonucu.....	117
Şekil D.2 Bileşik (5)'ün IR spektrumu	118



TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Enantiyomerik saflık tespitinde kullanılan yöntemlerin özellikleri.....	23
Tablo 2.2 Metil grubunun molekül aktivitesine etkisi	26
Tablo 3.1 Enzimlerin sınıflandırılması	35
Tablo 4.1 Katalizör olarak enzimlerin ve bütün hücre sistemlerinin karşılaştırılması ..	50
Tablo 4.2 Yeşil kimya ilkeleri ve biyokatalizör uyumluluğu	53
Tablo 4.3 Biyotransformasyon reaksiyonları ile elde edilmiş ilaç piyasasında bulunan farmakolojik olarak aktif metabolitler.....	54
Tablo 5.1 İndol halkası içeren bazı ilaçlar	58
Tablo 6.1 Kullanılan cihazlar	62
Tablo 6.2 Kullanılan kimyasallar	64
Tablo 6.3 1-benzil-6-metil-4-okso-4,5,6,7-tetrahidro-1H-indol-5-il asetat (rac(4)) bileşiğinin bileşiğinin lipaz katalizli biyotransformasyon reaksiyonları ve enantiyomerik fazlalık değerleri.....	81

Lipaz Enzim Katalizörleri İle Dihidroindol Türevlerinin Enantioselektif Sentezi

Hazal BÜYÜKKAYA

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Zerrin ÇALIŞKAN

Doğada sıklıkla görülen indol türevleri sahip oldukları biyolojik aktivitelerden dolayı ilaç endüstrisinde ilgi çekmektedir. Antikanser, antiviral, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, anti-HIV ve antidiyabetik aktiviteleri ile ilaç piyasasında birçok ilacın etken maddesini indol türevleri oluşturmaktadır.

Bu çalışmada farmakolojik olarak önemli olan enantiosaf indol türevleri kimyasal olarak elde edilmesi zor olan metodlar yerine biyotransformasyon reaksiyonları ile elde edilmiştir.

Çalışmamızda asimetrik sentez yöntemleri kullanılarak 3 aşamalı bir sentez rotası izlenmiştir. Sırasıyla 6,7-Dihidro-6-metilbenzofuran-4(5H)-on; 1-benzil-6,7-dihidro-6-metil-1H-indol-4(5H)-on ve 1-benzil-6-metil-4-okso-4,5,6,7-tetrahidro-1H-indol-5-il asetat sentezlenmiştir. Daha sonra bir ester türevi olan 1-benzil-6-metil-4-okso-4,5,6,7-tetrahidro-1H-indol-5-il asetat bileşiğinin lipaz enzimleri katalizörlüğünde biyotransformasyon reaksiyonları gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada ilk olarak dihidroindol türevlerinin asimetrik sentezi gerçekleştirilmiş ve rasemik indol türevleri elde edilmiştir. Daha sonraki aşamada rasemik indol türevlerinin

lipaz enzimleri katalizörlüğünde farklı çözücü sistemlerinde biyotransformasyon reaksiyonları yapılmıştır. En yüksek enantio fazlalığı (ee) veren substrat çözücü ilişkisi tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: indol türevleri, lipaz enzimi, rasemik, enantiosaf, biyotransformasyon reaksiyonları



Enantioselective Synthesis of Dihydroindole Derivatives via Lipase Enzyme Catalysts

Hazal BÜYÜKKAYA

Department of Molecular Biology and Genetics

Master of Science Thesis

Supervisor: Assoc.Prof. Dr. Zerrin ÇALIŞKAN

Indole derivatives which are widely seen in nature, attract attention in the pharmaceutical industry due to their biological activities. Indole derivatives constitute the active ingredient of many drugs in the pharmaceutical market with their anticancer, antiviral, antimicrobial, anti-inflammatory, anti-HIV and antidiabetic activities.

In this study, enantiopure indole derivatives, which are pharmacologically important, were obtained by biotransformation reactions instead of methods that are difficult to obtain chemically.

In our study, a three-stage synthesis route was followed by using asymmetric synthesis methods. 6,7-dihydro-6-methylbenzofuran-4(5H)-one, 1-benzyl-6,7-dihydro-6-methyl-1H-indole-4(5H)-one and 1-benzyl-6-methyl-4oxo-4,5,6,7-tetrahydro-1H-indole-5-yl acetate were synthesized, respectively. Then, biotransformation reactions of compound 1-benzyl-6-methyl-4oxo-4,5,6,7-tetrahydro-1H-indole-5-yl acetate which is an ester derivative, were carried out under the catalysis of lipase enzymes.

In the study, firstly, asymmetric synthesis of dihydroindole derivatives was performed and racemic indole derivatives were obtained. In the next step, biotransformation

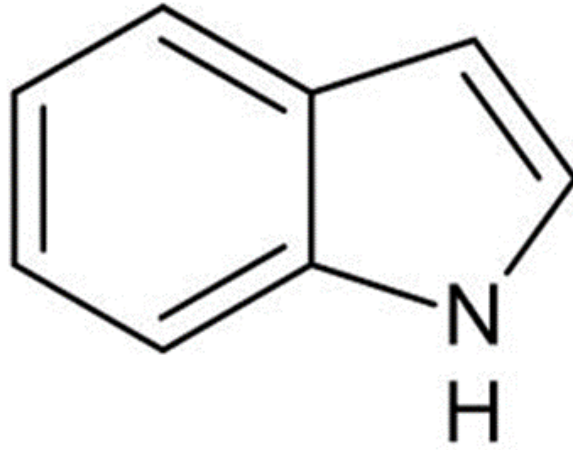
reactions of racemic indole derivatives originating from different solvents were carried out under the catalysis of lipase enzymes. Substrate-solvent relation giving the highest enantiomeric excess (ee) was determined.

Keywords: indole derivatives, lipase enzyme, racemic, enantiopure, biotransformation reactions.



1.1 Literatür Özeti

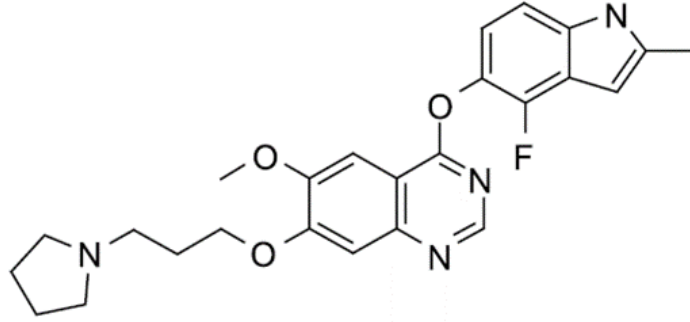
Benzen ve pirol halkasının bir araya gelmesi sonucu oluşan ve benzopirol olarak da adlandırılan tipik bir heterosiklik bileşik olan indol türevleri, biyolojik olarak aktiftirler (Şekil 1.1). Anti-inflamatuar, anti-analjezik, anti-mikrobiyal, anti-HIV, anti-hepatit, anti-oksidant, anti-kanser, anti-malaryal, anti-diabetic, anti-tüberkuloz, anti-konsulvant, anti-histamik, anti-hipertansif başta olmak üzere geniş bir biyolojik aktivite spektrumuna sahip olmalarından dolayı ilaç aktif maddesi olarak kullanılabilirler ve bu nedenle farmasötik endüstriler için oldukça değerli moleküllerdir.



Şekil 1.1 İndol halkası yapısı

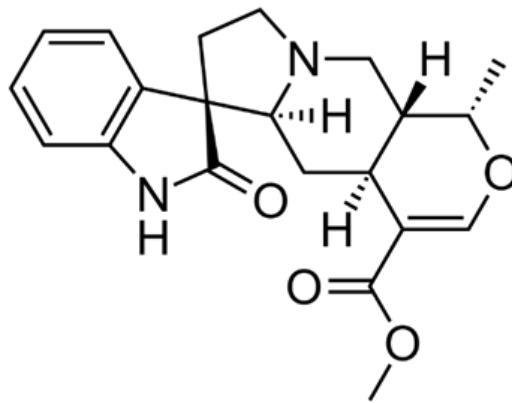
Günümüzde ilaç piyasasında indol temelli birçok ilaç bulunmaktadır. Örneğin, Wedge ve ekibinin yapmış olduğu bir çalışmada 4-[(4-Floro-2-metil-1H-indol-5-il)oksi]-6-metoksi-7-[3-(pirolidin-1-il)propoksi] (Şekil 1.2) kinazolin molekülünün bir kanser tedavisi yaklaşımı olan Vasküler endotelial büyüme faktörü-A (VEGF) sinyalinin inhibisyonunda; VEGF reseptörü olan tirozin kinazların inhibitörü olduğunu tespit

etmişleridir. 4-[(4-Floro-2-metil-1H-indol-5-il)oksi]-6-metoksi-7-[3-(pirolidin-1-il)propoksi] ilaç piyasasında ‘CEDIRANIB’ ismiyle yer almaktadır [1].



Şekil 1.2 4-[(4-Floro-2-metil-1H-indol-5-il)oksi]-6-metoksi-7-[3-(pirolidin-1-il)propoksi]

Diğer bir çalışmada ise Giménez ve ekibi metil Güney Amerikada yetişen bir bitki olan *Uncaria tomentosa*’ dan elde ettikleri (1S,4aS,5aS,6R,10aR)-1-metil-2'-oksospiro[1,4a,5,5a,7,8,10,10a-oktahidropirano[3,4-f]indolizin-6,3'-1H-indol]-4-karboksilat (Şekil 1.3) adlı indol türevini sarkoma hücre hattı MHH-ES-1 ve göğüs kanseri hücre hattı MT-3 üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Bu araştırmalar sonucunda (1S,4aS,5aS,6R,10aR)-1-metil-2'-oksospiro[1,4a,5,5a,7,8,10,10a-oktahidropirano [3,4-f]indolizin-6,3'-1H-indol]-4-karboksilat bileşiğinin sarkoma ve göğüs kanserine karşı etkili bir ajan olduğunu kanıtlanmışlardır ve bu indol türevi günümüzde ilaç piyasasında ‘MITRAPHYLLINE’ ismiyle kullanıma sunulmaktadır [2].



Şekil 1.3 (1S,4aS,5aS,6R,10aR)-1-metil-2'-oksospiro[1,4a,5,5a,7,8,10,10a-oktahidropirano[3,4-f]indolizin-6,3' -1H-indol]-4-karboksilat

İlaç sanayi için önemli diğer konulardan biri de enantiyosaf (bir molekülün tek enantiyomerini içeren) ilaç öncü maddelerinin sentezidir. Günümüzde ilaç piyasasındaki birçok ilaç bir molekülün her iki enantiyomerini eşit miktarda içermektedir yani rasemik formdadır. Rasemik formdaki bir ilacın kullanımı hastada iki şekilde etki yaratabilir. Bunlardan birincisi rasemik olarak hastaya verilen ilacın enantiyomerlerinden birinin tedavi edici özellik taşıırken diğerinin zararlı bir etki göstermesidir. Bu duruma verilebilecek en iyi örnek 1960'lı yıllarda meydana gelen "Thalidomide faciası" olarak adlandırılan olaydır. Thalidomide molekülü rasemik bir glutamic asit analogudur. Thalidomide molekülünün (R) enantiyomeri hamilelerde mide bulantısını tedavi ederken (S) enantiyomeri teratojenik etki göstermektedir. Bu ilacın hamilelerde mide bulantısı giderici olarak kullanılmasıyla birlikte uzuv eksikliği veya deformasyonuna sahip çocuklar dünyaya gelmiştir (Şekil 1.4) [3].



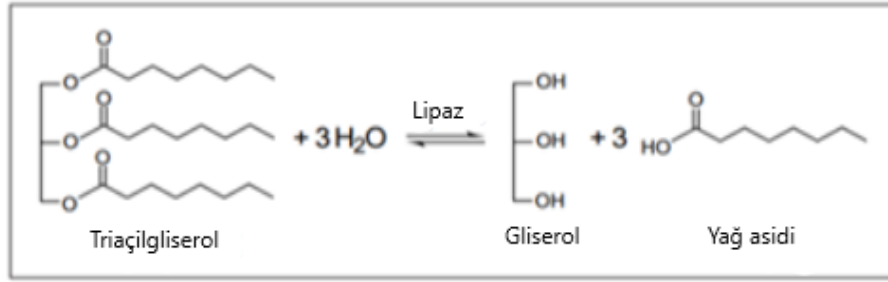
Şekil 1.4 Thalidomide ve Thalidomide kullanımı sonrası uzuv eksikliğiyle dünyaya gelmiş bir çocuk

İkinci olarak ise rasemik olarak hastaya verilen ilacın enantiyomerlerinden birinin tedavi edici özellik taşıırken diğeri etkisiz olabilir. Bu durumda ise hastanın aldığı ilaç dozu iki katına çıkmaktadır.

Rasemik formdaki ilaçların kullanılmasıyla ortaya çıkabilecek yukarıda bahsedilen etkiler enantiyosaf ilaç öncü madde sentezinin önemini ortaya çıkarmıştır. Rasemik formdaki bir molekülün enantiyomerlerinin birbirinden ayrılması biyotransformasyon denilen reaksiyonlarla gerçekleştirilebilmektedir. Enzimlerin veya mikroorganizmaların biyokatalizör olarak kullanıldığı bir molekülün kimyasal dönüşümlerinin gerçekleştiği reaksiyonlar biyotransformasyon olarak adlandırılmaktadır. Biyotransformasyon reaksiyonları, kimyasal olarak sentezlenmesi zor veya olanaksız olan bileşiklerin sentezini gerçekleştirebilirler; tepkime şartları ılımlıdır; kullanılan biyokatalizöre göre

stereospesifiklik ve regiospesifiklik özelliğine sahiptirler ve yeşil kimya prosedürlerine uygundur.

Biyotransformasyon reaksiyonlarında biyokatalizör olarak kullanılan enzimlere lipazlar örnek verilebilir. Gıda, ilaç, deri, kozmetik, deterjan, süt ürünleri, içecek, tıbbi alanda ilaç üretimi ve kağıt endüstrilerinde kullanılan lipaz enzimleri, triağılglicerollerini yağ asidi ve gliserole dönüştürürler (Şekil 1.5).



Şekil 1.5 Lipaz enzimi aktivitesi

Lipaz enzimleri yüksek enantioselektif ve regioselektif özellik göstermeleri ve organik çözücülerdeki aktivitelerinden dolayı biyotransformasyon reaksiyonlarında tercih edilmektedirler.

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmada, başta antikanser, antifungal, antihipertansif, antiviral, antiinflamatuvar olmak üzere yüksek biyoaktiviteye sahip ve heterohalkalı yapıdaki indol türevlerinin enantiyomerik olarak saf bir formda sentezi ile ilaç öncül maddesi elde edilmesi amaçlanmaktadır. Enantiyosaf olarak ilaç öncül maddesi eldesi; ilaç piyasasında yer alan rasemik formda bulunan ilaçlara göre avantajlar sağlamaktadır. Enantiyosaf formdaki ilaç kullanımı; rasemik formdaki ilaç kullanımında ortaya çıkabilecek yan etkileri veya ilaç dozu yetersizliği gibi durumları ortadan kaldırır. Bu nedenle biyolojik olarak aktif olan indol türevlerinin enantiyosaf eldesi farmakolojik endüstriler için son derece önemlidir.

Çalışmamızda ilk olarak indol türevlerinin sentezi asimetric sentez yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 1-benzil-6-metil-6,7-dihidro indol (**3**) bileşiğinin KMnO₄ aracılı açillendirilmesi yapılmıştır. Daha sonra ise sentezlenen indol türevlerinin enantiyosaf sentezi için yeşil kimya prosedürlerine uygun bir biyoteknolojik yöntem olan biyotransformasyon reaksiyonları kullanılmıştır. Biyotransformasyon reaksiyonlarında biyokatalizör olarak lipaz enzimleri kullanılarak enantiyosaf indol türevleri elde edilmiştir ve enantiyomerik fazlalık değerleri HPLC ile saptanmıştır.

Çalışmamız literatürde bulunmayan özgün bir çalışmadır. Elde edilen sonuçlar ile hem literatüre hem de ilaç sanayisine katkı sağlayacaktır.

1.3 Hipotez

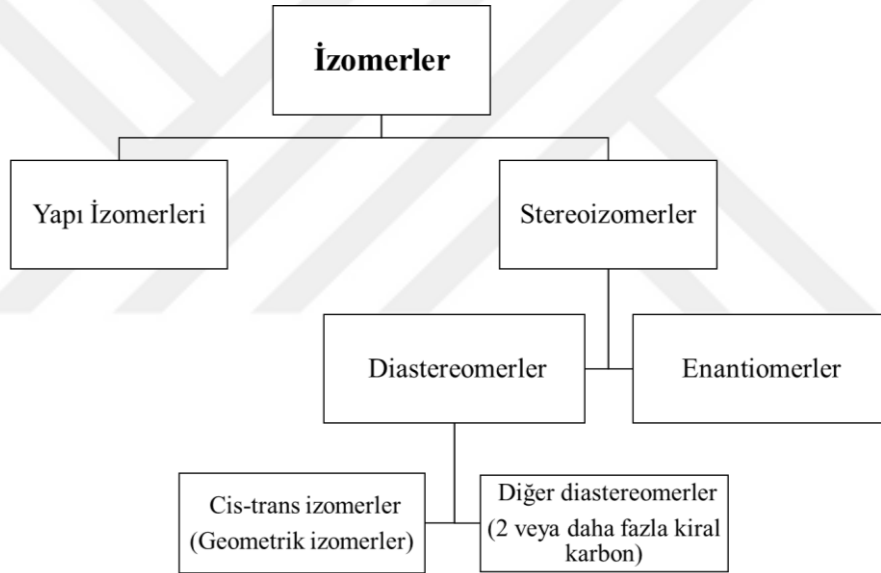
Bu tez çalışmasında, kimyasal metodlarla sentezlenmesi zor olan indol türevlerinin lipaz enzimi ile enzimatik biyotransformasyon reaksiyonlarını gerçekleştirerek yüksek enantiyomerik saflıkta, yüksek verim ve seçicilikte sentezlenmesi planlanmaktadır. Ayrıca ilaç etken maddesi olma potansiyeline sahip indol türevleri basit ve kimyasal metodlarla başlangıç maddesi olarak sentezlenecek ve daha sonra uygun katalizörler kullanılarak regioselektif asetoksilasyon reaksiyonu ile rasemik α -asetoksi türevleri elde edilecektir. Sentezlenen türevlerin spektral yöntemlerle yapıları tayin edilecektir.

Rasemik olarak sentezlenecek α -asetoksi indol türevi bileşikler çeşitli lipaz enzimleri ile reaksiyona tabi tutulacak ve yeni enantiosaf indol türevleri elde edilecektir. Elde edilen yeni enantiosaf indol türevlerinin HPLC analizleri yapılarak ee değerlerinin tespiti yapılacaktır. Çeşitli spektral yöntemler kullanılarak maddelerin yapısı tayin edilecektir. Ayrıca lipaz enzimleri reaksiyonlarına farklı çözücü sistemlerinin etkisi de karşılaştırılarak tespit edilecektir.

İlk olarak van't Hoff ve Le Bel tarafından keşfedilen stereokimya, moleküler geometri ile ilgilidir. Moleküllerin uzay düzlemindeki üç boyutlu yapılarını ve birbirleri ile ilişkilerini inceleyen kimya dalı olarak tanımlanır.

2.1 İzomerlik Kavramı

Moleküler formülü aynı olan bileşikler uzaydaki dizilimleri ile birbirlerinden ayrılabilir. Aynı moleküler formüle sahip ancak uzaydaki konformasyonları farklı olan bileşikler izomer olarak adlandırılır [4]. İzomerlerin sınıflandırılması aşağıdaki gibidir (Şekil 2.1):



Şekil 2.1 İzomerlerin Sınıflandırılması [4]

2.2 Stereoizomerler

Moleküllere bağlı atomların ve grupların yönelimi farklılık gösterdiğinde stereoizomerizm ortaya çıkar. Bu nedenle stereoizomerler aynı bağlanma yapısına sahiptirler, ancak konfigürasyonel olarak farklılık gösterirler ve konfigürasyonel izomerler olarak da adlandırılırlar. Stereoizomerler birbirleri ile benzer özellikler gösterirken; moleküllerin kimyasal özelliklerindeki farklılıklardan sorumludurlar. Stereokimyanın temelini bu farklılıklar oluşturur. Biyolojik olarak önemli moleküllerin çoğu spesifik stereoizomerik formdadır; kimyasal ve biyokimyasal davranışları moleküler yapıları tarafından düzenlenir [5].

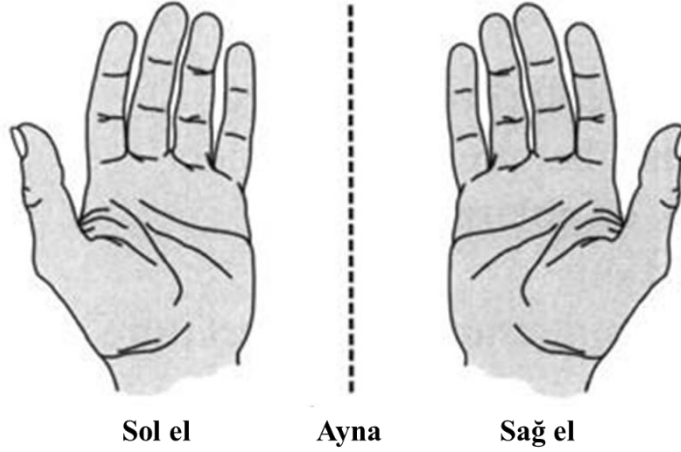
2.3 Kirallik ve Enantiyomerler

Bir molekül (veya bir nesne) yalnızca bir ayna görüntüsüne sahip olabilir. Molekül (ya da nesne) aynaki yansımasıyla ile çakışiyorsa akiral olarak adlandırılır. Öte yandan molekül (ya da nesne) aynaki yansıması ile çakışmıyorsa kiral olarak adlandırılır ve bu moleküller enantiyomerleri ortaya çıkarır (Şekil 2.2) [5]. Kiral bir molekülün en önemli yapısal özelliği kiral karbon veya kiral merkez olarak adlandırılan bir karbona sahip olmasıdır. Kiral karbon atomu dört farklı grup içermektedir. Kiral moleküller optikçe aktiftir çünkü polarize ışığı sağa ya da sola çevirebilirler [6].



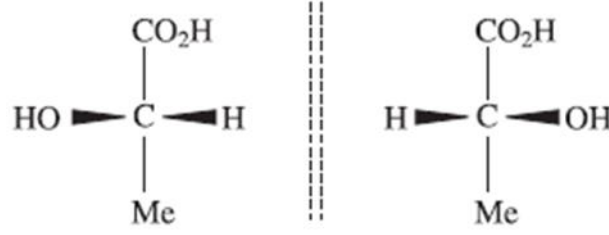
Şekil 2.2 Kiral karbon atomu [1]

Bir enantiyomer çifti, sağ el ve sol elin üst üste çakışmaması gibi kiralite açısından farklılık gösterir (Şekil 2.3) [5].



Şekil 2.3 Kiralitenin anlaşılmasında verilen el örneği [7]

Kiralite canlıların sahip olduğu sistemlerde yaygın olarak yer almaktadır. Canlı sistemlerinde yer alan moleküllere örnek olarak karbonhidratlar, nükleik asitler, aminoasitler, lipidler verilebilir [8]. Örneğin elde mevcut olan kiralite durumu gibi laktik asit için de geçerlidir. Laktik asit molekülü ayna görüntüsüne sahiptir fakat ayna görüntüsü ile çakışmaz (Şekil 2.4) [7].

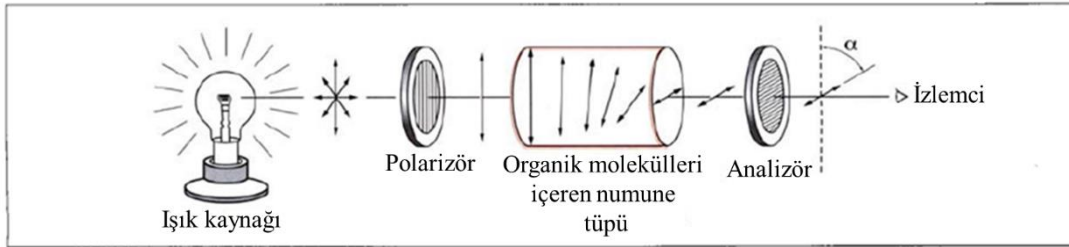


Şekil 2.4 Laktik asidin enantiyomerleri [5]

Enantiyomerlerin erime noktası, kaynama noktası, yoğunluğu gibi fiziksel özellikleri birbirleriyle aynı iken kimyasal özellikleri farklıdır. Enantiyomerlerin ayırt edilmesi oldukça zordur. Enantiyomerler arasındaki farklar, yalnızca enzimlerin aktif bölgeleri veya bir HPLC kolonunun kiral durağan fazı gibi kiral reaktiflerle etkileşime girdiklerinde anlaşılabilir. Ayrıca enantiyomerler polarize ışığı çevirmeleri ile de farklılık gösterir. Polarize ışığı aynı miktarda fakat farklı yönlerde çevirirler [4].

2.4 Kiral Moleküllerde Optikçe Aktiflik

Kendisinden veya çözeltisinden polarize ışık geçirildiğinde, polarize ışığın düzlemini çevirebilen bileşikler optikçe aktif olarak adlandırılır [9]. Polarize ışığın yönünü sağa çevirirlerse “+” sola çevirirlerse “-” olarak sembolize edilirler [10]. Optikçe aktiflik polarimetre ile ölçülür (Şekil 2.5).



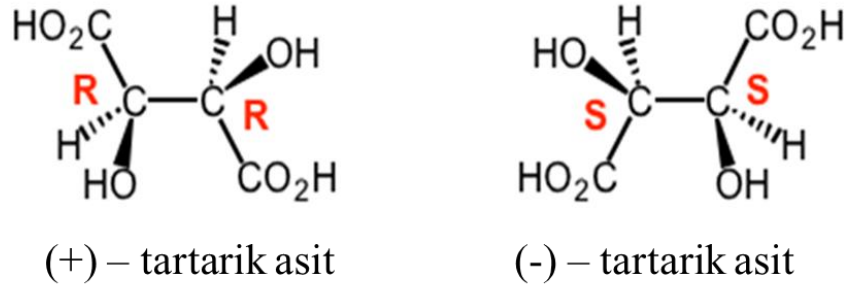
Şekil 2.5 Polarimetre [7]

Optikçe aktifliğin kirallik ile ilgili olduğunu ilk olarak Louis Pasteur fark etmiştir. Polarize ışığı eşit fakat zıt yönde çevirebilen benzer moleküllerin, enantiyomer çifti olmaları gerektiğini keşfetmiştir. Pasteur (Şekil 2.6) 19. yüzyılda, şarap üretimi ile ünlü bir köyde çalışmaktaydı ve mayalanma sırasında şarap fiçilerinin dibinde izomer iki maddenin çökeldiğini gözlemledi [11].



Şekil 2.6 Louis Pasteur

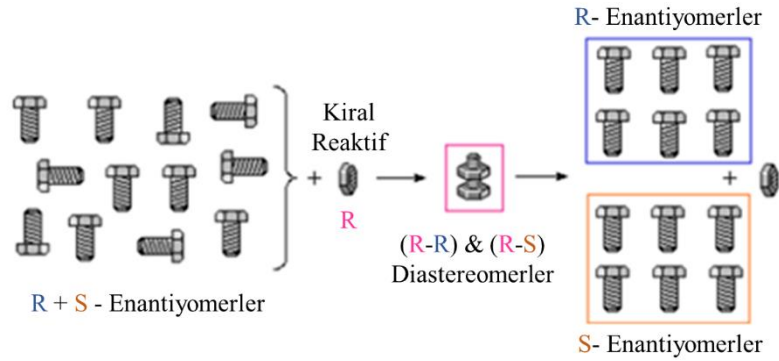
Bu iki maddeden birincisine tartarik asit; ikincisine ise rasemik asit adını verdi. Tartarik asit adı verdiği maddeyi incelediğinde bu maddenin optikçe aktif olduğunu keşfetti. Rasemik asidi incelediğinde ise tartarik asidin aksine bu maddenin optik aktivite yeteneğinin olmadığını gördü. Pasteur bu iki asidin tuzlarını hazırladı. Tartarik asidin sodyum amonyum tuzu kristallerinin ayna görüntüsünün aynı olmadığını yani kiral olduğunu keşfetti. Rasemik asidin sodyum amonyum tuzunu incelediğinde ise, bunların da kiral olduğunu anladı. Daha sonra Pasteur çok önemli bir gözlemde daha bulunarak; rasemik asidi ayırdı ve her iki çözeltinin de optikçe aktif olduğunu gözlemledi. Çözeltilerden birinin çevirmesinin tartarik asidin sodyum amonyum tuzunun çevirmesi ile aynı olduğunu saptadı. Diğerinin çevirmesi ise eşit ama zıt yöndeydi. Bunun anlamı, ikinci çözeltideki kristallerin birincisinin ayna görüntüsü ya da sola çeviren tartarik asit olmasıydı. Bunun üzerine Pasteur, rasemik asidin tek bir madde olmadığını fakat (+) ve (-) tartarik asitlerin 50:50 oranında bir karışımı olduğunu saptadı (Şekil 2.7). Rasemik asidin optikçe aktif olmaması da buna bağlıdır çünkü bir karışım da biri optikçe aktif biri optikçe aktif olmayan iki enantiyomerin eşit miktarda bulunduğu enantiyomerlerin optik çevirmeleri birbirini götürceği için karışım optikçe aktif değildir [11].



Şekil 2.7 Tartarik asit enantiyomerleri [11]

2.5 Rasemik Karışım

Çoğu biyoorganik molekül kiral yapıdadır ve bu moleküllerin sahip olduğu enantiyomerler fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak farklılık göstermektedir. Canlı organizmalarda biyoorganik moleküllerin sentezi enantiyosaf olarak gerçekleşirken laboratuvar koşullarında sentezlendiğinde rasemik karışım elde edilir [12]. Rasemik karışım, bir kiral bileşiğin her iki enantiyomerlerinin (-R,S) de eşit oranlarda (50:50) bulunduğu karışımlardır (Şekil 2.8). Rasemat olarak da adlandırılmaktadırlar [13]. Rasemik karışımı oluşturan enantiyomerlerin birbirinden ayrılması ve enantiyosaf ürün elde edilmesi oldukça önemlidir. Çünkü bu enantiyomerlerden biri terapötik etkiye sahipken diğeri toksik etki gösterebilir [12].



Şekil 2.8 Rasemik karışım

2.6 Enantiyomerlerin Biyolojik Önemi

Kiralite, moleküllerin biyolojik aktivitelerinde önemli bir role sahiptir. Bir molekülün biyolojik aktiviteye sahip olması için kiral yapıda olması şart değildir fakat kiral merkeze sahip biyoaktif moleküllerin enantiyomerlerinin birbirlerinden farklı aktiviteler göstermesinde etkilidir. Bu durum özellikle ilaçlarda görülmektedir [14].

Enantiyomerlerin farklı aktivite göstermeleri farmakoloji için de önemli bir konudur. Günümüzde piyasadaki ilaçların yaklaşık %60'ı kiraldir ve bu ilaçların pek çoğu rasemik olarak uygulanmaktadır [15], [16]. Bu nedenle kiral yapıda bulunan ilaçların enantiyomerlerinin belirlenmesi, aktivitelerinin saptanması ve enantiyomerlerin saf olarak elde edilmesi gibi konular farmasötik araştırmalar için ilgi çeken konulardır.

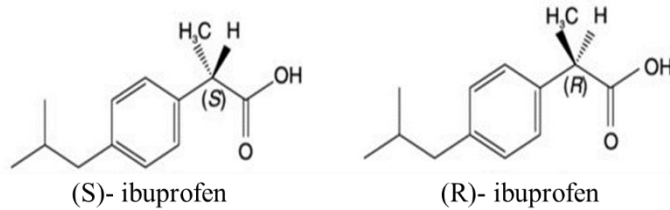
Enantiyomerlerin atomik bileşimleri, bağları ve fizikokimyasal özellikleri aynıdır. Aynı zamanda belirli reseptörlere ve aktif bölgelere stereospesifik tanıma gösterdikleri için biyolojik, farmakokinetik, ve farmakodinamik özellikleri farklıdır. Bu nedenle, enantiyomerlerden biri istenilen biyolojik aktiviteyi gösterirken, diğer enantiyomerler farklı durumlar söz konusu olabilir [17].

- İbuprofen, Propranolol veya Betaxololde olduğu gibi inaktif olabilir (Şekil 2.9) [18], [19].



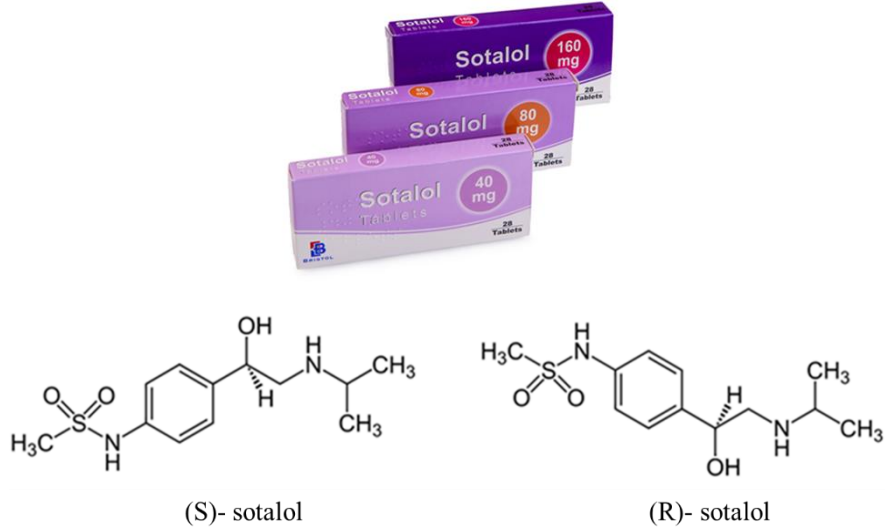
Şekil 2.9 İbuprofen, Propranolol ve Betaxolol

İbuprofen iltihap giderici ve ağrı kesici bir ilaçtır. (S) enantiyomeri iltihap giderici aktiviteye sahipken (R) enantiyomeri etkisizdir (Şekil 2.10). İbuprofenin saf olarak (S) enantiyomerinden oluşması durumunda, rasemik karışım formundan daha etkin bir aktivite göstermektedir [20].



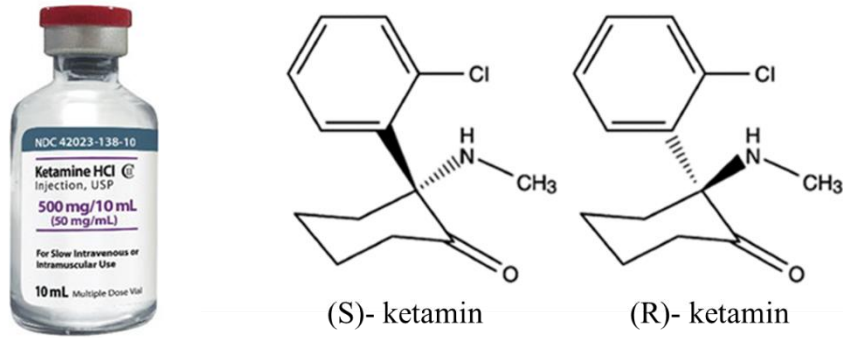
Şekil 2.10 İbuprofenin (S) ve (R) enantiyomerlerinin moleküler yapısı

- Anormal kalp ritimlerini tedavi etmek için kullanılan antiaritmik özelliklere sahip olan Sotalol'de olduğu gibi iki enantiyomer de aynı aktiviteye sahip olabilir (Şekil 2.11) [21].



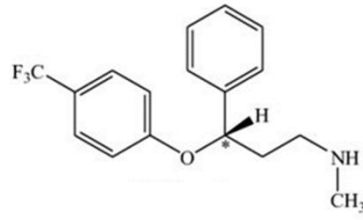
Şekil 2.11 Sotalolün (S) ve (R) enantiyomerlerinin moleküler yapısı [22]

- Biyolojik aktivite gösteren enantiyomerin dışındaki diğer enantiyomer de aktif olabilir. Örneğin; Ketaminde olduğu gibi (S) enantiyomeri anestezik özellik gösterirken (R) enantiyomeri daha az anestezik özellik göstermektedir (Şekil 2.12) [23]. Ayrıca ancak anestezi sonrası hastalarda görülen halüsinasyon gibi yan etkilerin Ketamin'in (R) enantiyomeriyle ilişkili olduğu düşünülmektedir [24].

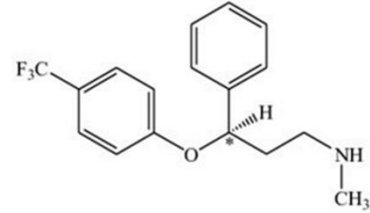


Şekil 2.12 Ketaminin (S) ve (R) enantiyomerlerinin moleküler yapısı [25]

- Her iki enantiyomer de farklı biyolojik aktiviteye sahip olabilir. Bunlara örnek olarak Fluoxetin, Levomethorphan, ve Dextrometohorphan'ı örnek verebiliriz. Örneğin; Fluoxetin'in (S) enantiyomeri migrene karşı etkili iken (R) enantiyomeri anksiyeteye karşı etkilidir (Şekil 2.13) [26], [27].



(S)- fluoksetin



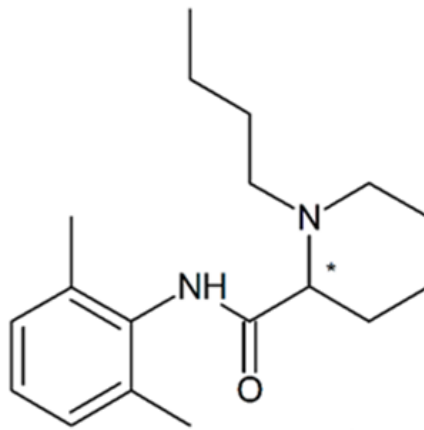
(R)- fluoksetin

Şekil 2.13 Fluoxetin (S) ve (R) enantiyomerlerinin moleküler yapısı [28]

- Bir enantiyomer biyolojik aktiviteye sahipken diğer enantiyomer toksik etki gösterebilir. Buna örnek olarak Penicillamine, Bupivacaine veya Thalidomide örnek verilebilir (Şekil 2.14) [29], [30]. Örneğin; Bupivacaine'in (S) enantiyomeri anestezik etkiye sahipken (R) enantiyomeri kardiyak toksisiteye neden olur (Şekil 2.15) [31, 32, 33, 34].



Şekil 2.14 Penicillamine, Bupivacaine, Thalidomid



Şekil 2.15 Bupivacaine moleküler yapısı

2.7 Kiralitenin Biyolojik Önemi ve Kiral İlaçlar

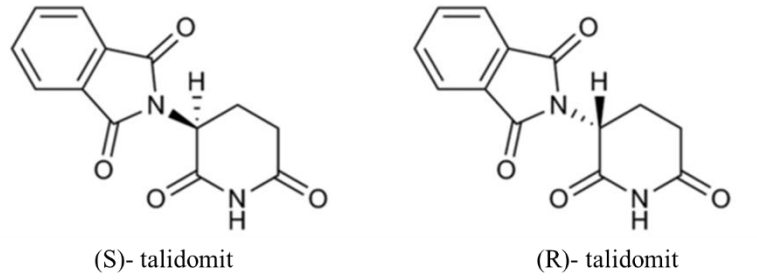
Günümüzde kullanılan ilaçların yarısından fazlası kiral yapıdaki bileşiklerden oluşur ve bunların %90'ından fazlası rasemik karışımdır [19]. Kiral ilaçların enantiyomerleri birbirlerinden farklı özelliklere sahiptir. Örneğin biyokimyasal aktiviteleri, toksisiteleri, vücutta taşınma ve metabolize edilme mekanizmaları gibi özellikleri açısından farklılık gösterirler [35].

Kiral ilaçlar arasında en çok bilineni 1950'lerin sonunda yaşanan ve küresel bir felakete neden olan "Talidomit"tir. Talidomit, 1957'de aslında yatıştırıcı olarak kullanılan bir ilaçtır. Aynı zamanda hamile kadınların mide bulantısını gidermek amacıyla da kullanılmıştır ancak bu ilacın hamileliğin erken dönemlerinde kullanıldığında teratojenik bir etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir ve bu etki sonucunda doğum kusurlarına sahip çocuklar dünyaya gelmiştir (Şekil 2.16). 1960'lı yılların başlarında dünyada 40'tan fazla ülkeye hamile kadınların Talidomit kullanılması ile birlikte ortaya çıkan sonuçlar doğrultusunda bu olay "Talidomit Faciası" olarak adlandırılmıştır [36, 37, 38, 39].



Şekil 2.16 Hamilelikte Talidomit kullanımı sonucu dünyaya gelen bir çocuk

Talidomit molekülü uygun fizyolojik koşullar altında birbirine dönüşebilen (S) ve (R) enantiyomerlerinden oluşan rasemik bir glutamik asit analogudur. (S) enantiyomeri periferik mononükleer kan hücrelerinden tümör nekroz faktörü olan TNF- α salınımını inhibe ederken; (R) enantiyomeri beyindeki uyku reseptörlerine etki ederek yatıştırıcı görevi görür (Şekil 2.17) [3].



Şekil 2.17 Talidomit enantiyomerler

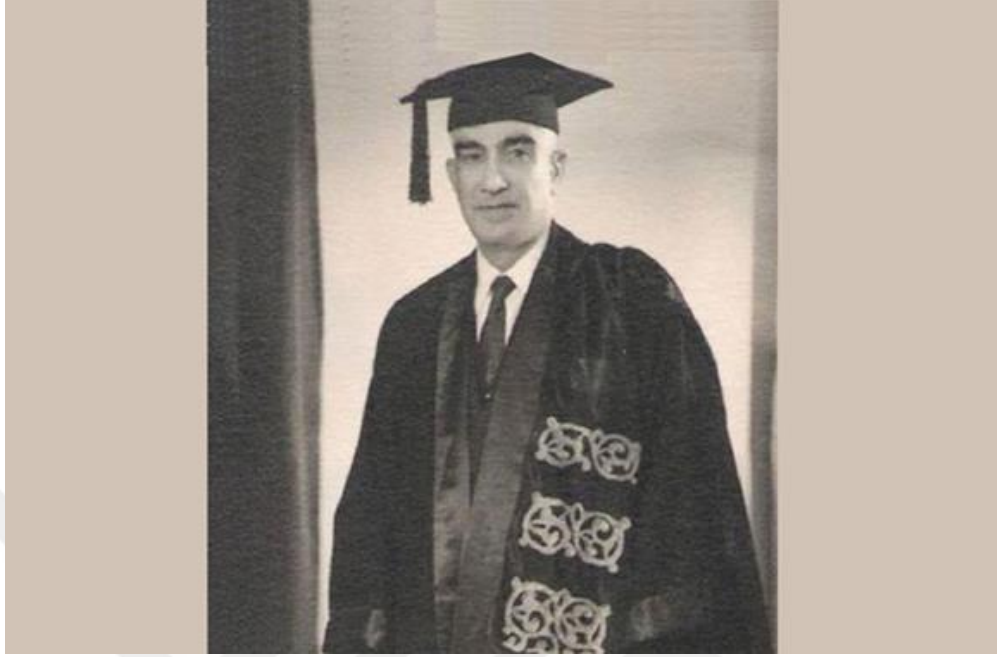
Hamilelerde Talidomit kullanımında (R) enantiyomeri mide bulantısını dindirirci etki gösterirken; (S) enantiyomeri teratojenik etkilere sahiptir, bu nedenle doğum kusurları oluşmaktadır. Gelişim kusurlarını indüklemek için tek bir tablet Talidomit kullanımı yeterli olmaktadır. Talidomidin uzuv, kulak, göz, iç organlar, yüz, genital bölge ve merkezi sinir sistemi malformasyonları dahil olmak üzere olumsuz birçok etkisi olduğu tespit edilmiştir. Talidomit hamileliğin evrelerine göre farklı etkiler gösterir. Döllenmeden sonraki 20. ile 24. gün arasında eksik dış kulak oluşumuna; 24. günden sonra iç kulakta hasar, kulak deformasyonu, oküler anomaliler ve üst ekstremité hasarına; 27. günden sonra alt ekstremité hasarına; 31. günden sonra başparmak malformasyonuna neden olur (Şekil 2.18) [40]. Talidomide bağlı doğum kusurları olan bebeklerde ölüm oranı %30- 40 olarak bildirilmiştir. 1961 yılında da piyasadan kaldırılmıştır [41], [42].



Şekil 2.18 Talidomidin neden olduğu doğum kusurları

Türkiye ‘‘Talidomit Faciası’’ olarak adlandırılan bu küresel felaketten Prof. Dr. Süreyya Tahsin Aygün sayesinde etkilenmemiştir (Şekil 2.19). Aygün Talidomit’in ülkemize

girişini ve kullanımını yasaklatmış ve böylece binlerce çocuğun sakat doğmasını engellemiştir.



Şekil 2.19 Prof. Dr. Süreyya Tahsin Aygün

2.8 Enantiyomerlerin Saf Olarak Elde Edilmesi

Enantiyosaf ürün sentezi için 3 kaynaktan faydalanılarak elde edilir:

1. Bitkisel veya hayvansal materyallerden ekstraksiyon yoluyla doğal olarak enantiyomerikçe saf formda bulunan terpen, karbonhidrat, alkaloid türevi moleküller elde edilebilir.
2. Mikroorganizmalar kullanılarak de novo fermentasyon yolu ile elde edilebilirler. Bu yol ile hem basit yapıli kiral moleküller (laktik asit, tartarik asit gibi) hem de kompleks yapıli kiral moleküller (antibiyotikler, hormonlar gibi) üretilebilir.
3. Kiral ya da prokiral başlangıç maddeleri kullanılarak kimyasal olarak sentezlenebilirler [14].

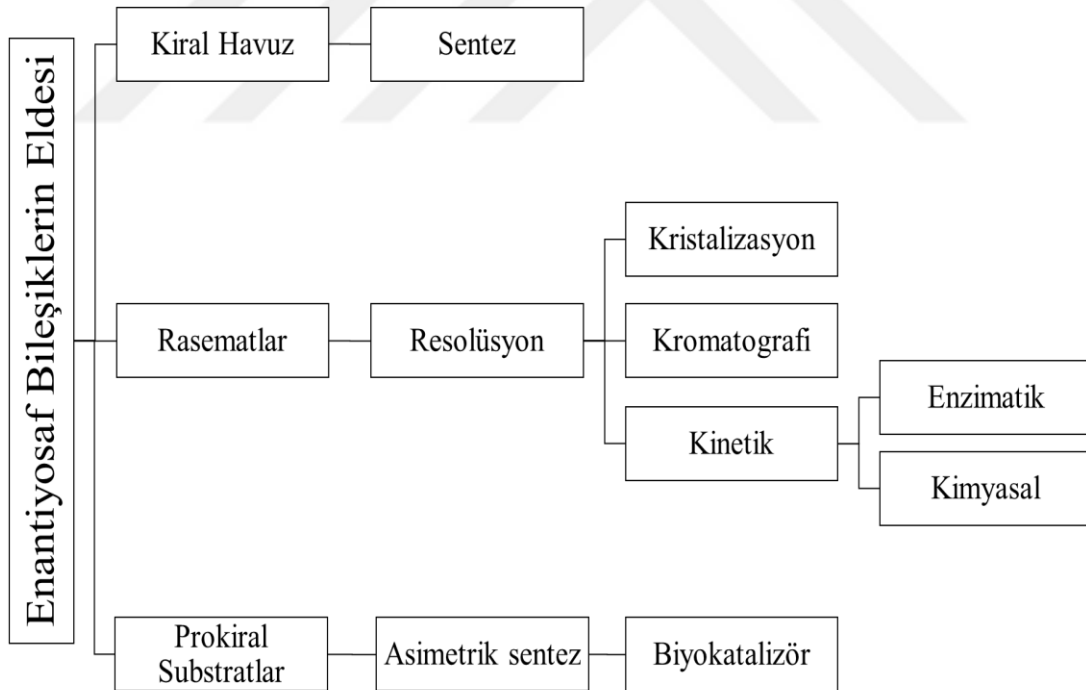
(S) ve (R) olmak üzere her iki enantiyomeri de eşit miktarda içeren çözeltiler “rasemik karışım (rasemat)” olarak adlandırılmaktadır. Bu enantiyomerler biyolojik olarak tedavi edici özelliğe sahip olabilecekleri gibi inaktif veya zararlı etkilere de sahip olabilirler. Bu nedenle her bir enantiyomerin farmakolojik ve toksikolojik özelliklerinin tespit edilmesi

aynı zamanda tek bir enantiyomerin saf olarak elde edilmesi özellikle ilaç sanayi için büyük önem arz etmektedir [43].

Enantiyosaf olarak üretilen ilaçlar rasemik ilaçlara göre daha etkindir. Rasemik formdaki ilaçların ancak iki enantiyomer birbirine tamamlayıcı biyolojik aktivite gösterdiğinde kullanılması önerilmektedir [44]. İlaçların rasemik karışım olması, bir dozda hastanın alması gereken etken madde miktarının yarısının bulunduğu anlamına gelmektedir. Bu nedenle iki kat rasemik karışım alınması durumunda gereken miktar karşılanmış olur. Bu nedenle hem kaynaklar hem de ürünün yarısı boş yere harcanmış olur. Bu durum hem ekonomik açıdan hem de hasta için olumsuz etkilere neden olur [6].

Enantiyosaf bileşiklerin eldesi için kullanılan yöntemler 3 başlıkta sınıflandırılabilir (Şekil 2.20).

1. Kiral havuz (Stereoseçilimli sentez)
2. Rasematların rezolüsyonu
3. Prokiral substratların asimetrik sentezi [14].



Şekil 2.20 Enantiyosaf bileşiklerin eldesi [14]

2.9 Enantiyosaf Bileşikler Sentezleme Yöntemleri

2.9.1 Kiral Havuz

Kiral havuz, doğada kendiliğinden varolan ve saf olamasa da optikçe aktif formda bulunan materyalleri ve türevlerini ifade eder [9] [24].

Kiral havuz kullanılarak enantiyosaf bileşik sentezi kiral bir başlangıç maddesi, biyolojik veya kimyasal kiral ayırıcılar ve kiral ortam kullanımı ile gerçekleştirilir [13].

Kiral başlangıç substratları asimetric sentez için başlangıç maddesi olarak kullanılabilirler. Rasemik yapıda bulunmayan kiral ayırıcılar ise kimyasal veya biyolojik formda bulunabilirler ve stereoseçimli sentezde rol oynar. Tepkimeye giren ürünlerin stereoseçimliliğini sağlarlar. Tepkimeden sonra ortamdaki uzaklaştırılırlar ve optik olarak aktif moleküller elde edilir. Ayrıca kiral çözücü veya kiral ligand kullanımı ile de kiral çevre oluşturulur [24].

2.9.2 Rasematların Rezolüsyonu

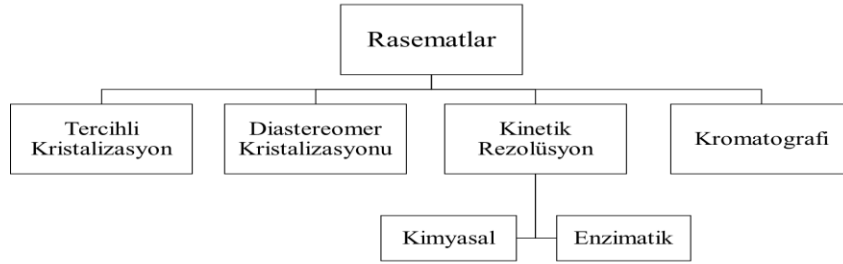
Enantiyomerlerin farklı özelliklere ve farklı etkilere sahip olması enantiyosaf bileşiklerin sentezinde bilim insanları için süregelen bir zorluk teşkil etmiştir. Asimetric sentezdeki muazzam ilerlemeler ve gelişmelere rağmen endüstriyel ölçekte tek bir enantiyomer sentezlemek için rasematların rezolüsyonu daha etkin bir yöntemdir. Rasemik karışım hazırlanması ve ardından rasemat rezolüsyonu özellikle stereoseçimli sentezin mümkün olmadığı durumlarda rasemik karışımın içerdiği her iki enantiyomeri ayrı ayrı elde etmek, istenmeyen enantiyomeri basit kimyasal işlemlerle arzu edilene dönüştürmek ve saf enantiyomer sentezlemek için tercih edilmektedir (Şekil 2.21) [45], [46].

Rasemik karışımların içerdiği iki enantiyomerin birbirinden ayrılmasına ‘‘rezolüsyon’’ denir. Rezolüsyon özdeş fiziksel özelliklere sahip olan enantiyomerlerin öncelikle diastereoizomerlere dönüştürülmesine; daha sonra oluşan diastereoizomerlerin fiziksel özelliklerindeki farklılıklardan faydalanılarak ayrılmasına dayanan bir yöntemdir [7].



Şekil 2.21 a)stereoselektif sentez b)rasematların rezolüsyonu [45]

Enantiyomerlerin rezolüsyonu için dört metod mevcuttur. Bu yöntemler Şekil 2.22’da şematize edilmiştir [45].



Şekil 2.22 Rasemat rezolüsyonu yöntemleri [45]

2.9.3 Tercihli Kristalizasyon

Bu yöntem endüstriyel üretimde (örneğin kloramfenikol) sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yöntem teknik olarak sadece konglomeratları oluşturan rasematlar ile mümkündür. Konglomerat, her iki enantiyomerin kristallerini eşit miktarda içeren mekanik karışımdır. Rasematların yaklaşık %20’si konglomerat formundadır ve tercihli kristalizasyonun gerçekleştirilebilmesi için konglomerat formundaki rasemik karışımın sahip olduğu enantiyomerlerin birinin çözünürlüğünden daha yüksek bir çözünürlüğe sahip olması gerekmektedir. Bu nedenle tercihli kristalizasyon her ne kadar enantiyomerlerin endüstriyel ölçekte rezolüsyonu için kullanışlı bir yöntem olsa da bahsedilen özelliklerinden dolayı yöntem çeşitli kısıtlamalara sahiptir [14].

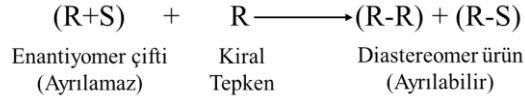
Tercihli kristalizasyonun uygulanabilmesi için konglomerat yapıdaki rasemik karışımın iki enantiyomerin birinden daha yüksek çözünürlüğe sahip olması gerekmektedir.

2.9.4 Diastomer Kristalizasyonu

Rasemik karışım formunda bulunan rasematlar tercihli kristalizasyon ile ayrılamazlar. Bu rasematların ayrımı ancak 1848 yılında Pasteur tarafından geliştirilmiş olan diastereomerlerin kristalizasyonu ile gerçekleştirilir. Metanol ya da su içerisindeki rasemik karışımın saf bir enantiyomerle tepkimeye girmesine izin verilir. Böylece kristalleştirme ile ayrılabilen diastereomerler oluşur [45].

Şekilde rasemik bir karışım olan R,S’ nin tek bir R* enantiyomeri ile reaksiyonu yoluyla enantiyomerlere ayrılması gösterilmektedir. Bu reaksiyon sonucunda RR* ve SR* diastereoizomerleri, kovalent bileşikler ve tuzlar oluşabilir. R*, RR* ve SR* diastereoizomerlerinin belirli bir çözücü içerisinde çözünürlüklerinin farklı olacağı

şekilde bir ortam seçilir. Daha sonra R*ile tepkimeye girmiş ve RR* ve SR* diastereoizomerlerini içeren rasemik karışım , tekrar kristalleştirilir. Böylece RR* ve SR* diastereoizomerlerinden biri kristalleşecekken diğeri çözelti içinde kalacaktır. Örneğin RR* kristalleşirken; SR* çözelti içerisinde kalır. Bu reaksiyonlar sonucunda tek bir enantiyomer saf olarak elde edilmiş olur. Tuzlar genellikle tercih edilen diastereoizomerlerdir çünkü kolaylıkla oluşurlar ve ayrılmanın ardından başlangıç enantiyomerine kolaylıkla dönüştürülürler (Şekil 2.23) [7].

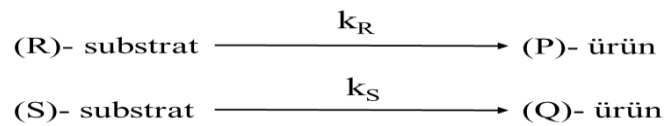


Şekil 2.23 Enantiyomerlerin diastereomerlere dönüştürülmesi

2.9.5 Kinetik Rezolüsyon

Kinetik rezolüsyonun temel prensibi, biyokatalizör (enzimler ve mikroorganizmalar) ve kemokatalizör olabilen kiral tepken ile enantiyomerlerin reaksiyon hızı farkıdır [47].

Kinetik rezolüsyonun etkinliği, tüm enantiyomerlerin kiral bir tepken ile farklı oranlarda reaksiyona girmesiyle ilişkilidir. Enzim veya mikroorganizma gibi biyolojik bir katalizör ya da kiral asit ya da kiral baz gibi kimyasal bir katalizör tepkime ortamında katalitik miktarda bulunmalıdır. Kinetik rezolüsyonda kullanılan enzimlere örnek olarak lipazları verebiliriz. Rasemik bileşiklerin rezolüsyonu, lipaz enzimleri tarafından katalize edilen en yaygın transformasyondur. Burada lipaz enzimleri iki enantiyomer arasında seçim yapar ve böylece enantiomerlerden biri diğerinden daha önce ürüne dönüştürülür. Bu işlem katalitik kinetik rezolüsyon olarak tanımlanır (Şekil 2.24) [45].



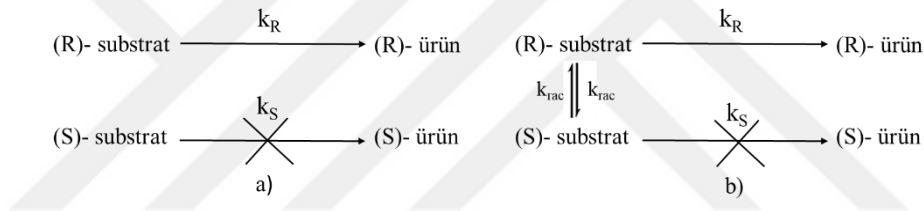
Şekil 2.24 Katalitik kinetik rezolüsyon [45]

Kinetik rezolüsyon, k_R ve k_S birbirine eşit olmadığında durdurulur. Bir enantiyomerin diğerine göre çok daha çabuk tepkimeye girmesi ideal olandır. Örneğin, enantiyomerlerden sadece (R) tepkimeye girdiğinde $k_S = 0$ 'dır. Bu durumda 50:50 oranında enantiyomer içeren rasemik karışımda %50 dönüşüm gerçekleştiğinde karışım içerisinde %50 tepkime vermeyen girdi (S) ve %50 (R)'nin dönüşümü sonucunda oluşan

ürün olan (P) kalır. Bu yöntemin avantajı tek enzim kullanımı ile enantiyomerlerin birbirinden kolaylıkla ayrılmasıdır [45].

Geleneksel kinetik rezolüsyon çoğunlukla enantiyomerikçe saf veya enantiyomerce zenginleştirilmiş bileşiklerin eldesi için tercih edilen bir yöntemdir. Fakat bu yöntem her iki enantiyomerin de veriminin en fazla %50'yi aşamaması ve kalan substratın üründen ayrılmasının zor olması gibi sınırlamalara sahiptir. Bu nedenle kinetik dinamik rezolüsyon bu sınırlamaları aşmak için kullanılabilir [29].

Hem geleneksel hem de dinamik kinetik rezolüsyonda bir enantiyomerin dönüşüm hızı diğerinden daha fazladır. Örneğin (R) enantiyomerinin (R) ürüne dönüşme hızı (S) enantiyomerinden daha fazla yani $k_R > k_S$ olsun. Bu durumda iki yöntem arasındaki tek fark geleneksel kinetik rezolüsyonda (S) enantiyomerinin reaksiyona girmemiş başlangıç materyali olarak ortamda kalması dinamik kinetik rezolüsyonda ise sürekli izomerleştirilmesidir (Şekil 2.25) [48].



Şekil 2.25 a) geleneksel kinetik rezolüsyon b) dinamik kinetik rezolüsyon [45]

2.9.6 Kromatografi

Rasematların durağan faz ve hareketli faza karşı gösterdikleri afinite farkı kullanılarak kromatografik ayırma gerçekleştirilir. Kolon dolgu maddesi olarak kiral katı maddeler (kiral kolon) kullanılır. Rasemik karışımın kolondan geçirilmesiyle birlikte durağan faza ilgisine göre enantiyomerler ayrılır. Böylelikle rezolüsyon gerçekleşir. Kiral katı maddelerin maliyetli olması ve çok fazla çözücü harcanması yöntemin sınırlılıkları arasında yer almaktadır. HPLC, GC, TLC ve HPTLC yüksek hassasiyete sahip kiral ayırma gerçekleştiren tekniklerdir [49].

2.10 Enantiyomerik Safılık (Enantiomeric Excess)

Enantiyomerlerin birbirlerinden farklı biyolojik aktiviteye sahip olmaları nedeniyle enantiyomerik olarak saf formda kullanım tercih edilmektedir. Biyokimya, gıda, kozmetik, tarım ve farmakoloji gibi alanlarda enantiyomerlerin birbirinden ayrılması ve bununla birlikte enantiyosaf ürün eldesi önem teşkil etmektedir. Özellikle ilaç

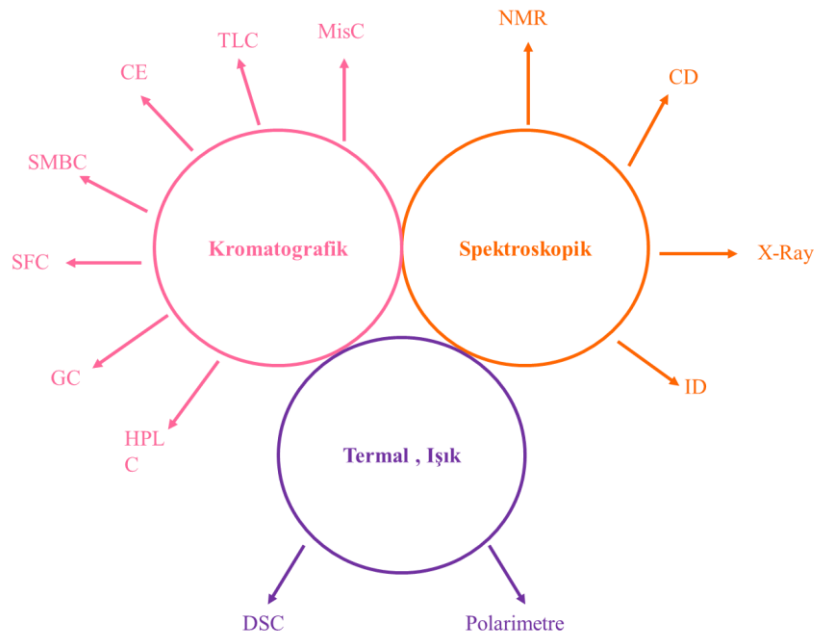
sanayisinde rasemik formdaki ilaçlara kıyasla enantiyomerik saflıktaki ilaçların kullanılması avantaj sağlamaktadır. Çünkü enantiyosaf formda bulunan ilaç, aktif enantiyomerin istenmeyen enantiyomerden ayrılması sonucu elde edilir ve böylelikle istenmeyen enantiyomerin hastada oluşturacağı olumsuz etkilerin önüne geçilmiş olur. Safsızlık olarak tanımlanan bu enantiyomer; yan etki gösterebilir, toksik olabilir veya diğer enantiyomerin aktivitesini olumsuz yönde etkileyebilir. Bu nedenle enantiyomerik saflıkta ürün elde edilmesi konusunda çalışmalar giderek artmaktadır.

Kiral bir bileşiğin tek bir enantiyomerini içeren bir numunenin enantiyomerik olarak saf olduğu ifade edilir [7]. Enantiyomerik bileşim, enantiyomerik saflık (enantiomeric excess- ee) ile aynı anlamı taşır. Bir numunedenki (S) ve (R) enantiyomerlerin mol farkının, mol toplamına oranı enantiyomerik saflığı sayısal olarak verir:

$$\text{Enantiyomerik saflık (ee)} = \frac{[R] - [S]}{[R] + [S]} \quad [51]. \quad (2.1)$$

1960'lı yılların sonlarına doğru enantiyomerik saflığın belirlenmesi için yöntemler geliştirilmiştir ve bununla birlikte enantiyosalektif sentezin değerlendirilmesinde kritik bir nokta haline gelmiştir [29].

Enantiyomerik saflık tespitinde kullanılan yöntemler aşağıdaki şemada verilmiştir (Şekil 2.26):



Şekil 2.26 Enantiyomerik saflık tespitinde kullanılan yöntemler [50]

Enantiyomerik saflık tespitinde kullanılan yöntemlerle hem kalitatif hem de kantitatif değerlendirme yapılabilmektedir. Ayrıca bu yöntemlerin bazı sınırlılıkları, avantajları ve

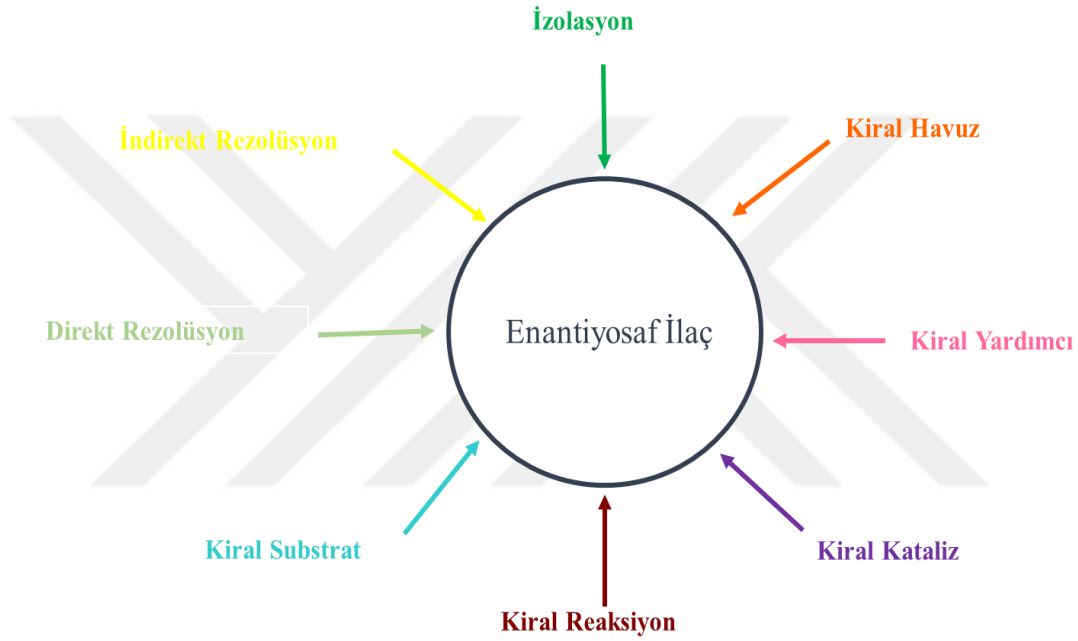
dezavantajları bulunmaktadır. Aşağıda verilen tabloda enantiyomerik saflık tespitinde kullanılan yöntemlerin kalitatif/kantitatif değerlendirme özellikleri ile birlikte avantaj ve dezavantajları özetlenmektedir (Tablo 2.1):

Tablo 2.1 Enantiyomerik saflık tespitinde kullanılan yöntemlerin özellikleri [50]

Yöntem	Kalitatif / Kantitatif	Avantaj	Dezavantaj
HPLC	Kalitatif / Kantitatif	Çok yönlü, hassas, hızlı, kesin, saf örnek gereksinimi yok, tekrarlanabilir, polar, uçucu olmayan ve iyonik enantiyomer analizi yapılabilir.	Uygun kiral sabit faz seçimi, mobil faz hazırlama, pahalı kiral sabit fazlar (kolon), düşük verim, yöntem geliştirme ihtiyacı, pahalı ekipmanlar.
GC	Kalitatif / Kantitatif	Kesin, hızlı, yüksek verimli, hassas, saf numune gereksinimi yok, az miktarda numune kullanımı, geniş ee aralığı tespiti, saflık pik alanı ile belirlenir.	Yöntem geliştirme gereklidir.
SFC	Kalitatif / Kantitatif	Düşük işlem maliyeti, yüksek verim, birçok rasematı çözer, düşük mobil faz viskozitesi, ısıya duyarlı moleküller analiz edilebilir, HPLC'den daha hızlıdır ve daha düşük sıcaklıkta çalışabilir.	Düşük çözme kapasitesi, yüksek basınçlı çalışma koşulları, basıncı koruyabilme zorluğu, sınırlı polarite aralığı.
SMBC	Kalitatif / Kantitatif	Sürekli çalışma, kolon kullanımı, en verimli, yüksek geri kazanım ve saflık, düşük solvent tüketimi, çoğu rasematı çözer, yüksek ölçekte ürün saflaştırma, nispeten ucuz sabit faz gereksinimi.	Yalnızca ikili ayırma, düşük çözme kapasitesi, yüksek yatırım maliyeti.
CE	Kalitatif	Hızlı, çok yönlü, hassas, taşınabilir, verimli, geniş uygulanabilirlik, ucuz proses, HPLC'den daha yüksek kolon verimliliği.	Zaman alıcı, zor tekrarlanabilirlik.
TLC	Kalitatif	Hassas, hızlı, ucuz, laboratuvar ve endüstri çalışmaları için uygun, kromatografik çalışma taraması yapılabilir.	Yalnızca preparative ölçekte sonuç verir,
NMR	Kalitatif	Hızlı, basit (aktivasyon, ısıtma, çözücü buharlaştırma veya ürünün izolasyonu gerekmez)	Saf numune gereklidir.
CD	Kalitatif	Hızlı, hassas, daha az numune, ucuz, her molekül boyutunda, kiral moleküller için doğal selektivite.	Pahalı ekipmanlar gerektirir. Tampon ve solüsyon hazırlığı zaman alıcıdır.
X-Ray	Kalitatif	Hızlı, daha az numune gereksinimi.	Sadece katı numuneler, saf ve daha fazla numune gereksinimi, az gelişmiş, enantiyomer ee değeri tespit edemez.
ID	Kalitatif	Hızlı, hassas, kesin.	Saf numune gereksinimi, pahalı ekipman, izotopik material.
DSC	Kalitatif	Hızlı, daha az numune gereksinimi, numune hazırlığı gerekmez.	Saf numune gereksinimi.
Polarimetre	Kalitatif	Hızlı, basit, kesin, ucuz.	Saf ve fazla numune gereksinimi.

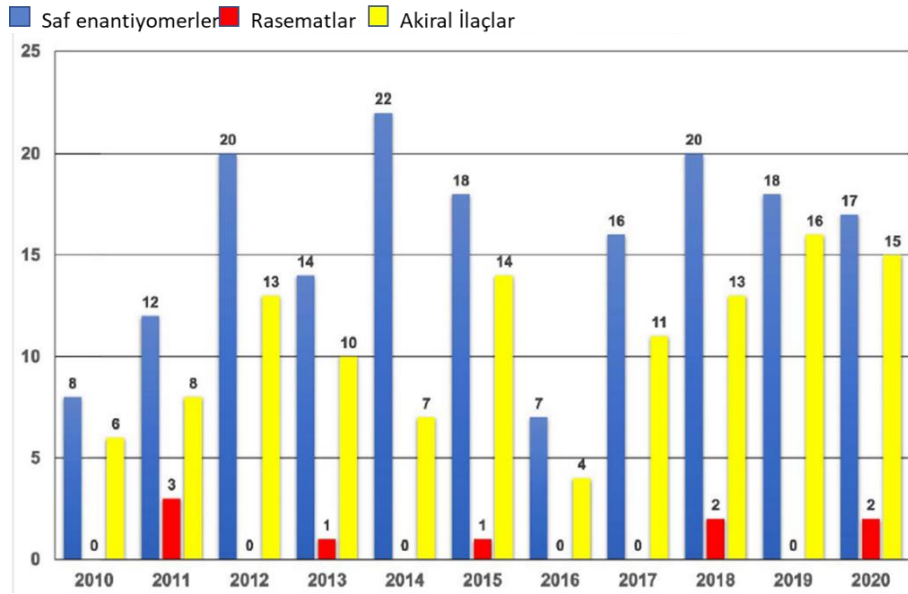
2.10.1 Enantiyosaf İlaç Eldesinde Kullanılan Yöntemler

İlaç moleküllerinin doğal kaynaklardan ekstraksiyonu eski, ucuz, ve küçük ölçekli üretimler için kullanışlı bir yöntemdir fakat bu metod ile tüm ilaç moleküllerinin sentezi gerçekleştirilememektedir. Bir diğer yöntemle enantiyosaf ilaçların sentezi katalizör, reaktif veya substrat gibi kiral ajanlar kullanılarak asimetrik sentez yöntemleriyle gerçekleştirilebilir. Enantiyosaf ilaçların sentezinde kullanılan yöntemler aşağıdaki şemada belirtilmiştir (Şekil 2.27) [50]:



Şekil 2.27 Enantiyosaf ilaç elde etme yöntemleri

Enantiyosaf ilaç eldesi ilaç sanayi için önemli konulardan biridir. Aşağıdaki grafik 2010-2020 yılları aralığında üç kategoride (enantiyosaf, rasemat ve akiral ilaçlar) FDA tarafından onaylanan ilaçların sayısı gösterilmektedir (Şekil 2.28). Rasemat olarak onaylanan ilaçlarının sayısının az olması ve onaylanan enantiyosaf ilaç formlarının sayısındaki fazlalık dikkat çekicidir [51].



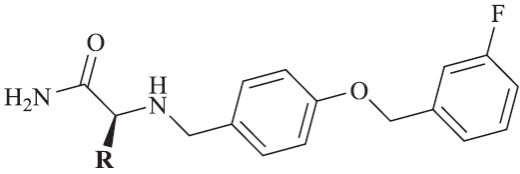
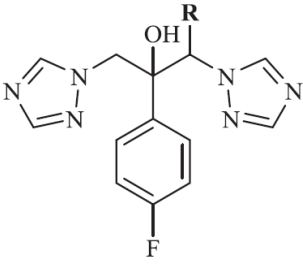
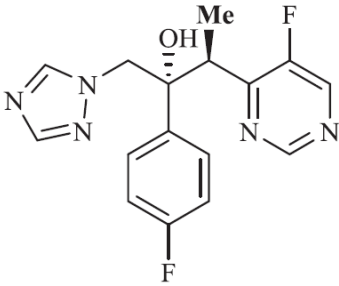
Şekil 2.28 2010-2020 dönemi boyunca yıllık FDA onaylı ilaçların karşılaştırması (saf enantiyomerler, rasematlar ve akiral ilaçlar)

2.11 Metil Grubunun İlaç Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

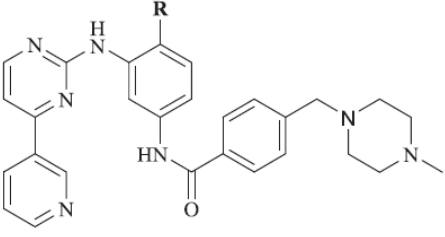
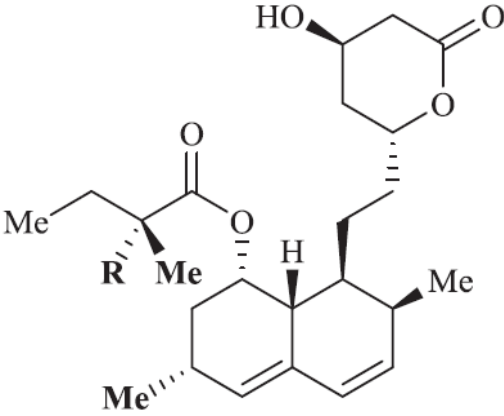
Bir karbona üç hidrojen bağlanması ile oluşan metil grubu, biyolojik aktivite gösteren moleküllerde işlevsellik gösteren yapılardan biridir. Metil gruplarının biyolojik olarak aktif olan moleküllerin aktivitesi, çözünürlüğü, seçiciliği, metabolizması ve farmakokinetik özellikleri üzerindeki yararlı etkisi bilinmektedir. Bir moleküldeki hidrojen atomu ile metil grubunun yer değiştirmesi molekülün aktivitesini olumlu yönde etkiler. İlaç öncü maddesi sentezi veya tasarımında, bir molekülün biyolojik aktivitesini artırmak ve fiziksel özelliklerini iyileştirmek için çoğunlukla metil grupları yer almaktadır. Bu nedenle metil grupları içeren sentetik reaksiyonlar, ilaç endüstrileri için önem taşımaktadır.

Aşağıda yer alan tabloda biyolojik olarak aktif moleküllerin seçiciliği ve aktivitesi üzerindeki etkileri ile ilgili örnekler yer almaktadır (Tablo 2.2) [52], [53]:

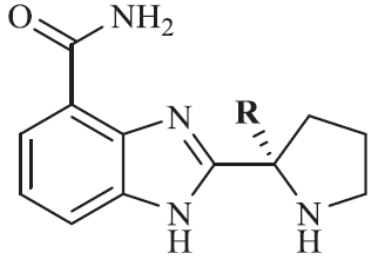
Tablo 2.2 Metil grubunun molekül aktivitesine etkisi

ÖRNEK	METİL GRUBU ÖZETİ
 Safinamid R : Me	Safinamid, ilk olarak sodyum kanalı inhibitörü olarak keşfedilmiştir. Daha sonra rat beyinde yapılan çalışmalarda MAO-B (Monoamin Oksidaz-B) inhibitörü olduğu tespit edilmiştir. Molekülün yapısına metil grubu eklendiğinde tek bir metil grubunun MAO-B üzerindeki etkisinin 20 kat daha fazla ve seçiciliğinin 1000 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir. Safinamid, Avrupa İlaç Ajansı (European Medicines Agency) tarafından 2015 yılında orta ve geç evre Parkinson hastalığı tedavisinde kullanılmak üzere onaylanmıştır [54], [55].
 Fluconazole R : H  Voriconazole R : Me	Fluconazole, <i>Candida albicans</i> ve <i>Cryptococcus neoformans</i> olmak üzere iki insan patojeninden kaynaklanan enfeksiyonlarda etkilidir. Bunun dışında, <i>Aspergillus fumigatus</i> üzerinde de zayıf etkiye sahiptir. Pfizer bilim insanları Fluconazole triazol halkalarından birine metil grubu ekleyerek Voriconazole adlı molekülü elde etmişlerdir. Metil grubunun eklenmesiyle bu molekülün <i>Aspergillus fumigatus</i> üzerindeki etkisinin arttığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda da diğer iki patojene karşı etkisinde de bir değişiklik olmamıştır. Voriconazole, 2002 yılında bir dizi mantar tedavisinde kullanılmak üzere onaylanmıştır [56], [57].

Tablo 2.2 Metil grubunun molekül aktivitesine etkisi (devamı)

 Imatinib R : Me	Abı ve pdgfr kinaz inhibitörü olan imatinib, kronik miyeloid lösemi ve gastrointestinal stromal tümörlerin tedavisinde kullanılmıştır. Imatinibin des-metil analogu r grubu olarak hidrojen atomu içermektedir ve bu analogun etkisi zayıftır. Metil grupları bir molekülün yapısına katıldığında molekülün biyolojik aktivitesini arttırdığı gibi aynı zamanda konformasyonunda da değişiklik yapabilir. Merkezi fenil halkasına orto metil grubunun dahil edilmesi imatinib molekülünün konformasyonu abı reseptör cebine sığacak forma gelmiştir ve abı kinaz bölgesinin aktif olmayan bir konformasyonuna yüksek özgüllükle bağlanarak abı kinazı inhibe etmektedir [58], [59].
 Lovastatin R : H Simvastatin R : Me	Kandaki kolesterol düzeyini düzenleyen enzimi inhibe eden ve kolesterol miktarını düşüren 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A redüktazı bloke eden Lovastatin, fungal bir metabolittir. 1987 yılında dislipidemi (kandaki yağ, kolesterol ve diğer lipid türlerinin düzeyindeki anormallik) ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılması için Merck tarafından piyasaya sürülen ilk ilaç öncü maddesidir. Lovastatinin, 2-metilbütiril ester yan zincirinin karbon α konumunda H yer almaktadır. Bu karbonil grubuna metil eklenerek gerçekleştirilen modifikasyon ile Simvastatin elde edilmiştir ve bu modifikasyonla birlikte molekül etkinliği 2.5 kat artmıştır. Sübstituent uzunluğu arttıkça molekül aktivitesinde kayıp olduğu tespit edilmiştir ve bu nedenle boyut olarak lipofilik cebe uygun olan metil grubu molekül etkinliğinin

Tablo 2.2 Metil grubunun molekül aktivitesine etkisi (devamı)

	Arttırılmasında tercih edilmiştir. Ayrıca metil grubu molekülde sterik bir etkiye neden olarak esterin hidrolizini yavaşlatmış ve plazma yarı uzatmıştır. Böylece ilaç alındıktan sonraki etki süresi uzamıştır [60].
 Veliparib R : Me	R grubunda hidrojen içeren des-metil analoguna göre 9 kat daha fazla etkiye sahip olan Veliparid, R grubuna metil eklenmesiyle elde edilmiştir. Potensiyel bir kanser önleyici ilaçtır. Ayrıca kemoterapötiklerle kombinasyonunda kemoterapötik etkisini arttırdığı bilinmektedir [61].

Enzimler, hayatın devamlılığını sağlamakta olan kimyasal reaksiyonların daha hızlı bir şekilde gerçekleşmesini sağlarlar. Enzimlerin katalizleme gücü tüm canlıların hayatını kolaylaştırmaktadır. Özellikle canlı organizmadan ekstrakte edildiğinde de katalizleme yeteneğini kaybetmemesi hayatımızı kolaylaştırdığı gibi ticari olarak da önemlidir. Peynir, ekmek ve alkollü içecekler enzimlerin günlük hayatta kullanımına dair ilk örnekler olarak bilinse de günümüzde birçok alanda kullanılmaktadır [62]. Ayrıca enzimler akademik çalışmalarda da ilgi çekici bir konudur. Özgül bir seçiciliğe sahip olmaları sağlık alanında hastalık teşhisi için kullanımına olanak verir. Akademik araştırmaların yanında endüstride de yaygın olarak kullanılmaktadırlar [63].

3.1 Enzimlerin Yapısı ve Özellikleri

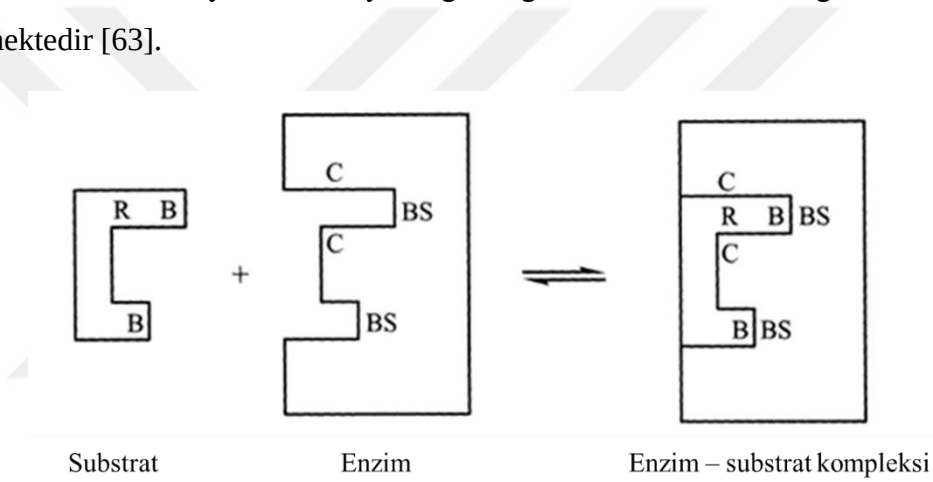
Enzimler, canlı organizmalar tarafından sentezlenen, organizmalardaki kimyasal reaksiyonları katalize ederek hızlandıran, %100 verimle reaksiyonu gerçekleştiren ve kendisi herhangi bir değişikliğe uğramayan protein yapılı biyolojik katalizörlerdir [64].

Canlı organizmalarda gerçekleşen bu kimyasal reaksiyonların laboratuvarda gerçekleştirilmesi için uygun koşulların sağlanması oldukça zordur. Reaksiyonları laboratuvar ortamında gerçekleştirebilmek için çok yüksek sıcaklık ve basınç gerekli olabilmektedir. Bu nedenle kimyasal reaksiyonları kolaylaştıran ve hızlandıran enzimlere ihtiyaç duyulmaktadır. Örneğin; yağ asitlerinin hidrolizi herhangi bir katalizör olmadığı durumda oldukça zor ve yavaşken; vücut içerisindeki biyokatalizörlerin yani enzimlerin yardımıyla ılıman koşullarda ve hızlı bir şekilde gerçekleşir [65].

Enzimlerin etki ederek dönüştürdükleri maddelere “**substrat**” denir. Her enzim belirli bir ürün oluşturmak için belirli bir substrata spesifiktir. Bütün enzimler protein yapılıdır ancak “**kofaktör**” adı verilen ve protein yapısında olmayan bir bileşiğin yoksunluğunda katalitik aktivite gösteremezler. Kofaktörler organik moleküller veya metal iyonları olabilir. Kofaktör bağlı olmayan enzimin inaktif protein bileşimi “**apoenzim**” ve protein yapıda olmayan kısmı “**koenzim**” olarak isimlendirilir. Apoenzim ve koenzimin oluşturduğu yapıya ise “**haloenzim**” adı verilmektedir [63].

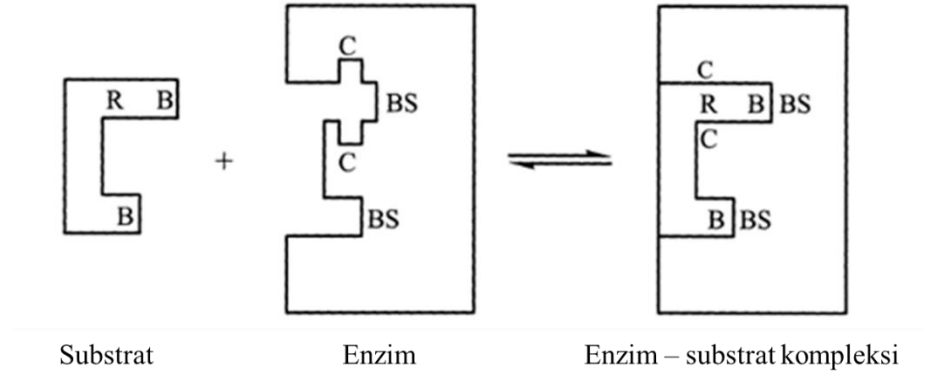
Enzimlerin substrata bağlanması iki modelle açıklanır. Bunlar, anahtar-kilit modeli ve uyarılmış uyum modelidir. Enzimlerin üzerinde aktif bölge adı verilen bir merkez vardır ve burada enzimatik reaksiyonlar gerçekleşmektedir [66].

Anahtar- kilit modeli Emil Fischer tarafından 1890 yılında bulunmuştur. Fischer, anahtarla kilidin birbirine uyumluluğu gibi enzim ve substrat arasında bir tamamlayıcılık olduğunu öne sürmüştür. Aşağıdaki şekilde anahtar – kilit modeli şematik olarak gösterilmektedir (Şekil 3.1). Şekilde enzim üzerindeki bağlama bölgeleri BS (binding site) harfleri, enzimin katalitik bölgeleri C harfi, substrat üzerindeki bağlanma grupları B harfi ve reaksiyona giren grup R harfi ile sembolize edilmektedir. Substrat iki farklı bağlanma bölgesiyle enzim üzerinde bulunan bağlanma bölgelerinden enzime bağlanmaktadır ve böylece reaksiyona giren grubu iki katalitik bölgenin de yakınına getirmektedir [63].



Şekil 3.1 Anahtar kilit modeli [63]

Anahtar – kilit modeli, proteinlerin yapısal olarak esnekliğini hesaba katmadan bir enzimin spesifikliğıyle ilgili özellikleri ortaya koyar. X ışını spektroskopisi ve NMR gibi analizlerle birlikte bir enzimin substrata bağlanmadan önceki yapısıyla substrata bağlandıktan sonraki yapısının farklı olduğu ortaya çıkmıştır. Bu da enzimlerin substrata bağlandıktan sonra enzimin aktif bölgesinde konformasyonel bir değişiklik meydana geldiğini gösterir. Bir substratın enzime bağlanmasıyla birlikte enzimin üçüncül yapısında değişiklik meydana gelebilir ancak birincil yapısı değişmez. 1958 yılında Daniel Koshland uyarılmış uyum modelini ortaya atmıştır ve bir substratın enzimin aktif bölgesine tamamlayıcı olabileceğini ancak enzimin substrata bağlandıktan sonra konformasyonel değişikliğe uğradığını savunmuştur. Bu modele göre substratın yapısı sabitken enzimin aktif bölgesi değişken bir yapıdadır. Böylece enzim substratın etrafını sarak katalitik bölgeler ile reaksiyona girecek olan grupları birleştirir (Şekil 3.2) [63].



Şekil 3.2 Uyarılmış uyum modeli [63]

3.2 Enzimlerin Aktivitesini Etkileyen Faktörler

Enzim aktivitesi birçok fiziksel faktörden etkilenmektedir. Sıcaklık, basınç, iyonik kuvvet, solvent polaritesi, immobilizasyon, substrat konsantrasyonu enzimlerin aktivitesini etkileyen bu faktörler arasında yer almaktadır. Enzimlerin kimyasal ve fiziksel yapısının oldukça karmaşık olması enzim aktivitesinin birçok şekilde etkilenebileceği anlamını taşır. Enzimler, aktivitelerini ve yapılarını etkileyebilecek faktörlerle karşılaştığında kimi zaman enzimin tüm yapısı değişirken kimi zaman da sadece aktif bölge etkilenir. Enzim aktivitesinin nasıl etkilendiğinin anlaşılması özellikler kimyagerler ve moleküler yaşam bilimciler için ilgi çekicidir [67].

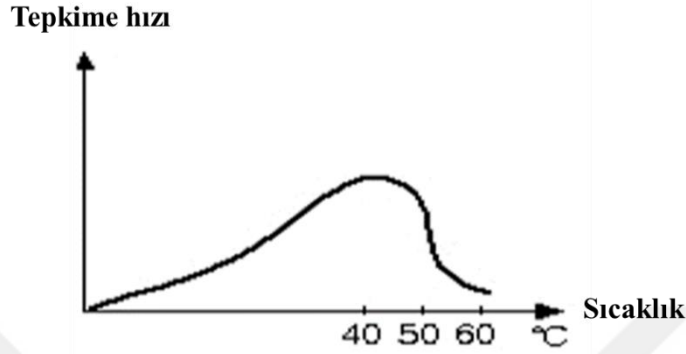
3.2.1 pH

Her enzimin aktif olabileceği kendine özgü bir pH derecesi vardır. Bu değer enzimin optimum pH değeri olarak adlandırılır. Optimum pH değeri haricindeki değerlerde enzim aktivitesi yavaşlamaktadır. Bazı enzimlerin aktif bölgelerinde yer alan iyonik gruplar işlevsel olabilmesi için uygun formda olması gerekir. Ortamın pH derecesindeki değişiklikler de bu grupların yapısında değişikliklere neden olur dolayısıyla enzim aktivitesini etkiler. Bazen de substratlar iyonik grup içerir ve ortamın pH'ı substratın enzime olan afinitesini etkileyebilir. Bu nedenle enzimler belli bir pH aralığında aktivite gösterir. Ayrıca ortamın pH derecesi maksimum reaksiyon hızını, doyumluk katsayısını ve enzimin stabilitesini etkileyebilir [68].

3.2.2 Sıcaklık

Enzimlerin katalizlediği reaksiyonlarda sıcaklık sürekli artmaya devam etse de reaksiyon hızı belirli bir sınıra kadar artar. Çünkü belirli bir sıcaklık değerinden sonra enzimler

protein yapısından dolayı denatüre olurlar. Enzimlerin aktivite gösterebileceği yani substratını değişikliğe uğratabileceği maksimum bir sıcaklık değeri vardır. Bu değere optimum sıcaklık değeri denir. 37- 40 °C enzimlerin katalizlediği in vitro reaksiyonlar için optimum sıcaklıktır [68], [69]. Şekil 3.3'te enzim ve aktive olduğu sıcaklıkla ilgili örnek grafik yer almaktadır [69].



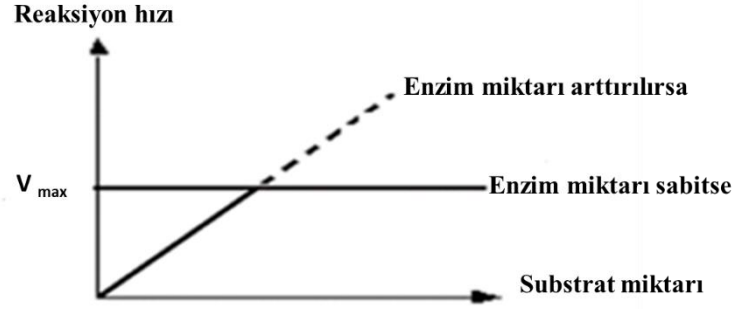
Şekil 3.3 Sıcaklığın tepkime hızına etkisi [69]

3.2.3 Solvent Etkisi

Enzim aktivitesi etkileyen faktörlerden biri de solventtir. Özellikle enzimlerin enantiyoselektivitesi üzerindeki etkisi yapılan çalışmalarca kanıtlanmıştır. Optik olarak saf bileşiklerin eldesinin susuz ortamda gerçekleştirmek daha etkin yöntemdir ve kullanılan solventlerin enzimin enantiyoselektivitesini etkiler. Solventler, enzimin yapısında veya aktif bölgesinde değişikliklere neden olabilir. Bu durum da enzim ve substrat arasındaki moleküler tanıma sürecini etkileyebilir [70], [71]. Enzimlerin organik çözücülerdeki aktivitesi düşüktür ve stabilitesi azdır.

3.2.4 Substrat Etkisi

Enzim konsantrasyonu da dahil olmak üzere tüm parametrelerin sabit olduğu bir ortamda enzim tarafından katalizlenen bir tepkimenin hızı; ortama substrat ilave edilmesi ve substrat konsantrasyonunun artmasıyla birlikte artar. İlerleyen zamanlarda substrat ilave edilmeye devam ettikçe ortamda tepkimeye girebilecek enzim bulunmadığından tepkime hızının artışı yavaşlar ve belirli bir maksimum hız düzeyinde sabit kalır. Şekil 3.4'te enzim ve substrat ilikisi ile ilgili örnek grafik yer almaktadır [69].



Şekil 3.4 Substrat konsantrasyonunun tepkime hızına etkisi [69]

3.2.5 Reaksiyon Ürünleri

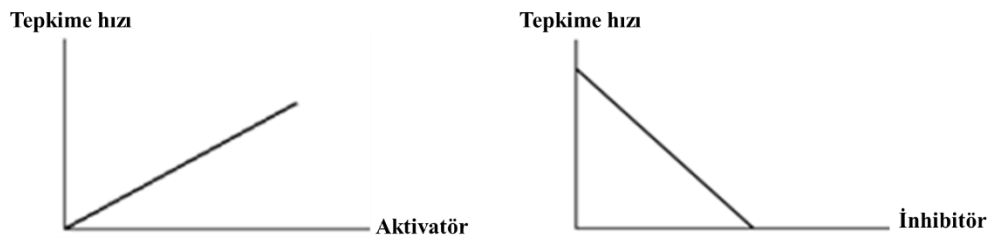
Enzimlerin substratı ile reaksiyona girmesi sonucu ürün oluşmaktadır. Reaksiyon ortamındaki ürünlerin artmasıyla birlikte enzim aktivitesi olumsuz yönde etkilenir ve reaksiyon hızı düşer. Bu durumun nedeni reaksiyon ürünlerinin yapısal olarak substrata benzemesi ve enzime karşı olan afinitesinin substratinkine göre daha fazla olmasıdır [72].

3.2.6 Zaman

Enzimlerin katalizlediği reaksiyonlarda, reaksiyonun başlamasının ardından geçen zaman ile reaksiyon hızının yavaşlamasına neden olan bazı durumlar ortaya çıkabilir. Substratın bitmesi, enzim aktivitesini engelleyen madde oluşumu ve reaksiyon ürünlerinin birleşerek tersinir tepkime vermeleri reaksiyon hızını yavaşlatan durumlara örnek olarak verilebilir [69].

3.2.7 Aktivatör ve İnhibitörler

Vitamin ve mineraller gibi aktivatörler enzimin çalışma hızını artırırken; siyanür, arsenic kurşun gibi inhibitörler enzimin çalışma hızını azaltır. Enzimin çalışma hızı ortamdaki aktivatör miktarının artmasıyla doğru orantılı; inhibitor miktarının artmasıyla ters orantılıdır (Şekil 3.5) [73].



Şekil 3.5 Aktivatörlerin ve inhibitörlerin reaksiyon hızına etkisi [73]

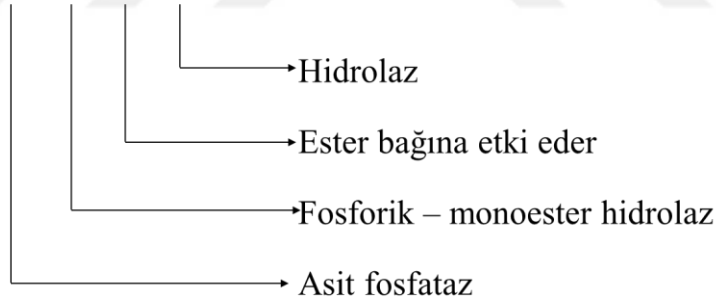
3.3 Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimlerin sayısının artmasıyla birlikte isimlendirmede karışıklık yaşanması enzimlerin isimlendirilmesinde ve sınıflandırılmasında sistematik bir yol gerektiğini ortaya çıkarmıştır [63]. Bu nedenle Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği tarafından EC kodları ile ifade edilen isimlendirme sistemi geliştirilmiştir. Tablo 3.1 enzim sınıflarını listelemektedir [24].

1961 yılında Enzim Komisyonu'nun yayınladığı rapora göre enzimler katalize ettikleri reaksiyon türüne göre 6 sınıfa ayrılır ve her sınıf 4-13 alt sınıfa sahiptir. Enzimlere noktalarla ayrılmış 4 haneli bir kod numarası verilir:

- Birinci sayı enzimin 6 sınıftan hangisine ait olduğunu ifade eder.
- İkinci sayı alt sınıfı (subclass) ifade eder.
- Üçüncü sayı alt alt sınıfı (sub-subclass) ifade eder.
- Dördüncü sayı ise alt sınıfındaki enzim seri numarasını ifade eder (Şekil 3.6).

EC 3.1.3.2



Şekil 3.6 Enzim sınıflandırmasında kullanılan kod örneği (Asit fosfataz enziminin EC kodu)

Tablo 3.1 Enzimlerin sınıflandırılması [24]

GRUP	TEPKİME	ALT GRUP
1. OKSİDOREDÜKTAZLAR	İndirgenme- yükseltgenme tepkimeleri	1.1. CH-OH
		1.2. C=O
		1.3. CH=CH
		1.4. CH-NH ₂
		1.5. CH-NH
		1.6. NADH,NAD ₂ PH
2. TRANSFERAZLAR	Grup veya molekül transferi	2.1. Tek C'lu gruplar
		2.2. Aldehit/keton grubu
		2.3. Açıl grubu
		2.4. Glukozil grubu
		2.5. Alkil/aril grubu
		2.6. Fosfat grubu
		2.7. S içeren gruplar
3.HİDROLAZLAR	Hidroliz	3.1. Esterler
		3.2. Glukosidik bağlar
		3.3. Eter bağları
		3.4. Peptit bağları
		3.5. Diğer C-N bağları
		3.6. Asit anhidritler
4. LİYAZLAR	Substrattan grup uzaklaştırma ve çift bağlara katılım	4.1. C=C
		4.2. C=O
		4.3. C=N
5. İZOMERAZLAR	İzomerleştirme	5.1. Rasemazlar
		5.2. Cis-Trans
6. LİGAZLAR	ATP enerjisi kullanılarak moleküllerin birleştirilmesi	6.1. C-O
		6.2. C-S
		6.3. C-N
		6.4. C-C

3.4 Lipaz Enzimleri

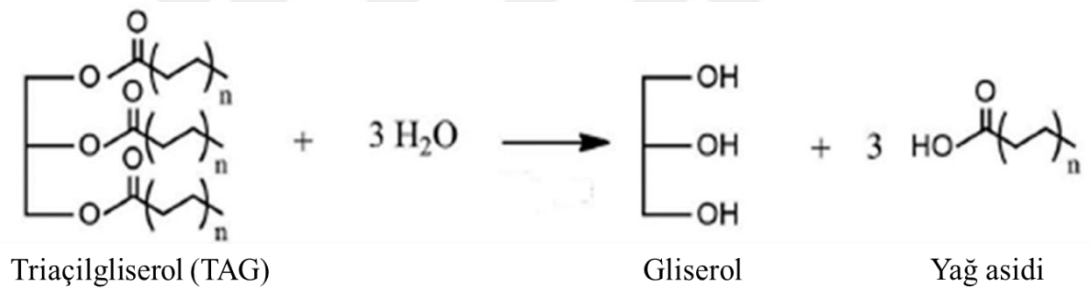
Enzimler hücre içinde ve hücre dışı ortamda kimyasal ve biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen, substratına özgü olarak yüksek spesifite gösteren, ılımlı ortam koşullarında (pH, sıcaklık, basınç ...) aktivite gösterebilen protein yapılı katalizörlerdir [74].

Lipaz enzimi de en çok kullanılan enzimler sıralamasında protezlar ve amilazlardan hemen sonra bulunmaktadır. Lipazlar, gliserin ester bağlarının hidrolizini gerçekleştirerek triaçilgliserollerini yağ asidi ve gliserole dönüştüren enzimlerdir (Şekil

3.8). Bu nedenle gliserol ester hidrolaz veya triaçilgliserol hidrolaz olarak da bilinirler ve enzimlerin üçüncü sınıfı olan hidrolazlar grubunda yer almaktadır [75]. Şekil 3.7’de lipaz enzimi enzim komisyonu kodu (EC) verilmiştir.

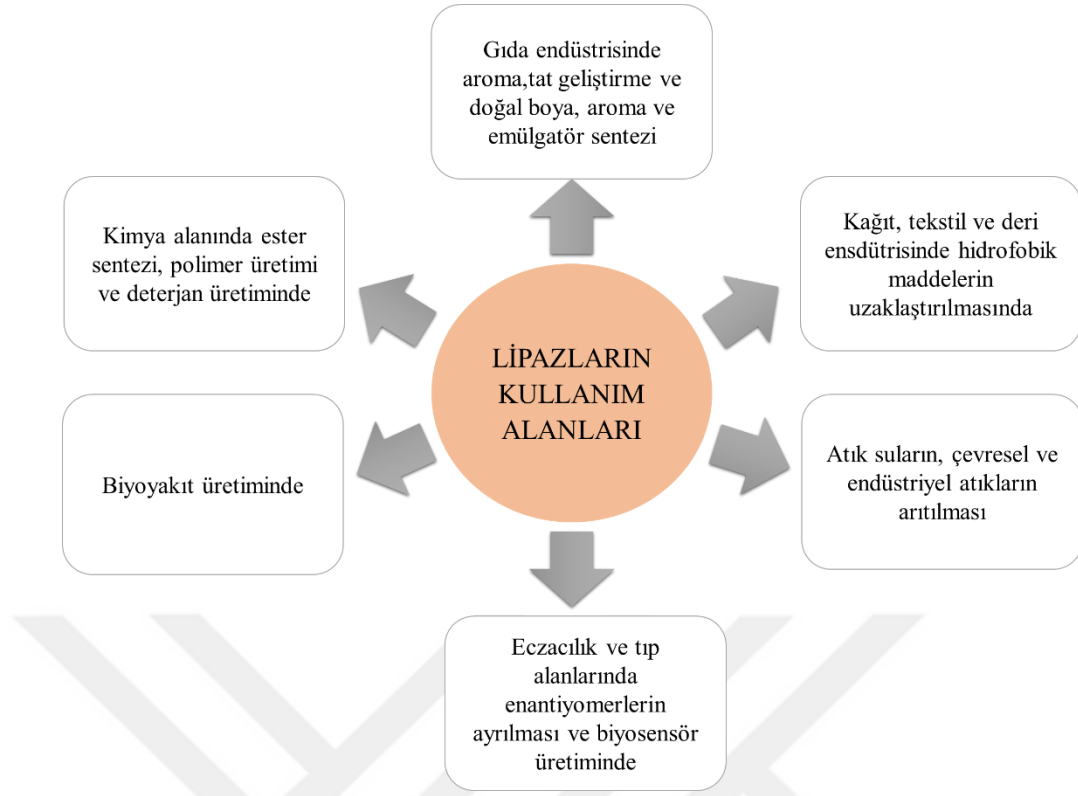


Şekil 3.7 Lipaz enziminin EC kodu



Şekil 3.8 Lipazların genel reaksiyonu

Gıda, ilaç, deri, kozmetik, deterjan, süt ürünleri, içecek, tıbbi alanda ilaç üretimi ve kağıt endüstrilerinde sıklıkla tercih edilmektedir. Lipazlar, regioselektif ve enantioselektif yeteneğe sahip olmaları, güvenli olmaları ve yeşil kimya prosedürlerine uymaları gibi özellikleriyle biyoteknolojik süreçlerde tercih edilen etkin bir enzim grubudur [75]. Şekil 3.9’da lipazların kullanım alanları şematize edilmiştir.



Şekil 3.9 Lipazların kullanım alanları [76]

3.4.1 Lipazların Yapısı

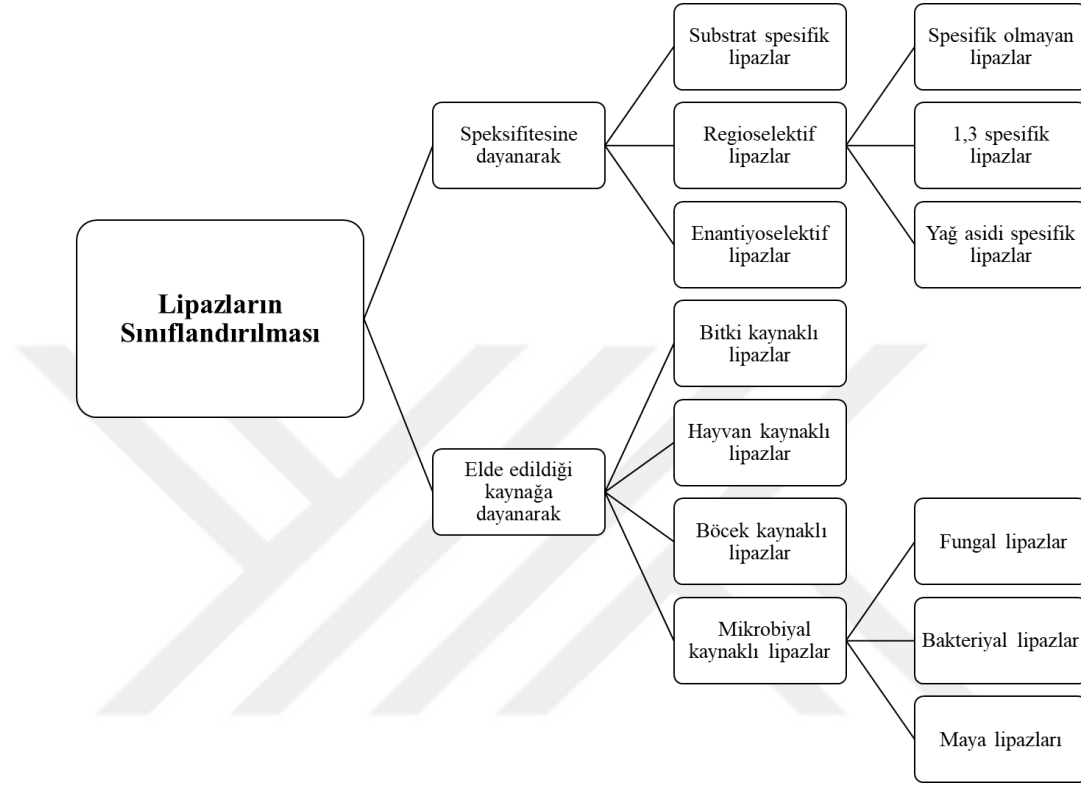
Bugüne kadar tanımlanmış lipaz enzimlerinin molekül ağırlığı, substrat spesifiklikleri ve aktivatörleri birbirinden farklı olsa da üç boyutlu yapıları oldukça benzerdir. Yapılan çalışmalar incelendiğinde lipazların α/β hirolaz protein yapısında olduğu ve iç yapıları incelendiğinde birbirine paralel olarak bulunan β kıvrımlı bantların heliks oluşturarak α yapılarından ayrı konumlanabildiği ayrıca süper heliks dönüşler gerçekleştirerek şerit halini aldığı tespit edilmiştir. β bantları katalitik gruplar içeren bir merkezdir. Lipazların aktif bölgesinde glisin, serin, histidin ve aspartat veya glutamattan oluşan katalitik bir dizi mevcuttur [77].

Lipaz yapısını oluşturan 3 ana bileşen vardır. Bu bileşenlerden ilki olan ve bağlanma cebi olarak adlandırılan hidrofobik yapı protein yüzeyinin yakınında bulunur. İkinci bileşen ise oksianyon boşluğudur. Oksianyon boşluğu reaksiyonda ara ürün olarak oluşan oksijenin stabilizasyonundan sorumludur ve bu nedenle lipaz enzimlerinin katalitik özelliği için önem arz etmektedir. Disülfid bağları üçüncü ana bileşendir ve enzimin yapısal olarak kararlılığının sağlanmasında görevlidir. Bu üç ana bileşene ek olarak bazı lipazlar kapak adı verilen bir yapı içermektedir. Bu kapak oldukça esnek yapısından dolayı enzim inaktivasyonu olmadan konformasyonel değişikliklerin

gerçekleştirilebilmesini ve aktif bölgenin reaksiyon ortamıyla etkileşim halinde olmasını sağlar [78], [79].

3.4.2 Lipazların Sınıflandırılması

Şekil 3.10’da lipazların sınıflandırılması şematize edilmiştir.



Şekil 3.10 Lipazların sınıflandırılması [79]

Lipazlar spesifitelerine göre üçe ayrılmaktadır. (Substrat spesifik lipazlar, regioselektif lipazlar, enantiospesifik lipazlar)

3.4.2.1 Substrat Spesifik Lipazlar

Substrat spesifik lipazlar biodizel üretiminde kullanımının yanı sıra yüksek saflıkta diaçilgliserol eldesinde de kullanılmaktadır. Bu lipaz enzimlerinin etki ettikleri substratlar genellikle yağ asitleri ve alkollerdir. Ayrıca esterifikasyon tepkimelerini katalizlerler. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda özellikle endüstriyel alanda kullanılan enzimlerde stabilitenin yanında enzimin spesifikliğin de önemli bir rol oynadığını ortaya koymaktadır. Bu nedenle substrat spesifik lipazların endüstriyel alanda önemi büyüktür [44], [80], [81] [82].

3.4.2.2 Regioselektif Lipazlar

Regioselektif yani bölge seçici lipazlar, reaksiyonun en elverişli şekilde gerçekleştirilmesini sağlama eğilimindeki enzimlerdir. Bu özellikleri nedeniyle kimya ve farmasötik alanlarında büyük öneme sahiptirler. Özellikle belirli bir konfigürasyonda optimal işlev gösteren izomerik bileşiklerin eldesinde kritik öneme sahiptir. Asidolizis, transesterifikasyon ve hidroliz gibi reaksiyonları katalizlerler. *C. rugosa*, *C. antarctica*, *R. oryzae* gibi organizmalardan elde edilen regioselektif lipazlar bilinmektedir. Regioselektif lipazlar; üçe ayrılır [83], [84], [85].

- 1. Spesifik Olmayan (Non-spesifik) Lipazlar:** Spesifik olmayan lipazların etki ettiği substrat sayısı oldukça fazladır. Örneğin bu grupta yer alan *M. meihei* lipazı kozmetik ürünleri üretiminden biyodizel üretimine kadar uzanan geniş bir kullanım alanına sahiptir. Spesifik olmayan lipazlar genellikle triaçilgliserollerin hidrolizi reaksiyonlarını katalizleyerek monoaçilgliserol, diaçilgliserol ve yağ aside eldesini sağlar. Ayrıca yapılan bir çalışmada *C. antarctica* spesifik olmayan lipazının kanola yağının kaprilik asit ile asidolizisini katalizleyerek yüksek saflıkta lipit üretimini gerçekleştirdiği tespit edilmiştir. Bu grup lipazların bir diğer avantajı da yüksek sıcaklığa karşı toleranslı olmalarıdır [86].
- 2. 1,3 Spesifik Lipazlar:** Bu grupta bulunan lipazlar 1,3 spesifik konformasyonuna sahip ürünler elde edilmesi sağlarlar. Triaçilgliserollerin C₁ ve C₃ pozisyonundaki hidrolizini katalize ederler. Katalizledikleri bu reaksiyon sonucunda 2-monoaçilgliseroller ve 1,3 veya 2,3 diaçilgliseroller oluşur. Triaçil gliserollerden, diaçilgliserol oluşumu monoaçilgliserol oluşumuna göre daha hızlıdır. Yapılan son çalışmalarda, *R. meihei* lipazı ve *R. deleamar* lipazı ceviz yağının kaprilik asit ile asidolizisi tepkimelerinde kullanılmaktadır ve bu tepkime sonucunda uzun zincirli yağ asitleri elde edilmektedir. Ayrıca *P. pastoris* ve *R. oryzae* lipazları da biyodizel üretiminde kullanılmaktadır [44] [85], [87], [88].
- 3. Yağ Asidi Spesifik Lipazlar:** Bu grupta bulunan lipazlar C₉ üzerinde çift bağlar içeren uzun yağ asitlerine sahip esterlerin hidrolizini katalize eder [44].

3.4.2.3 Enantiyoselektif Lipazlar

Bu grupta bulunan lipazlar rasemik bir karışımda bulunan enantiyomerleri birbirinden ayırabilmektedir. Farmasötik ürünlerde bulunan sekonder alkollerin transfeksiyonu, kozmetik ve gıda ürünlerinde kullanılan mentol benzoatın hidrolizi ve tıbbi bakım

ürünlerinde bulunan glisidik asit metil esterlerinin hidrolizini gibi birçok alanda enantiyoselektif lipazlar kullanılmaktadır [80], [87], [89], [90].

Lipazlar elde edildikleri kaynağın türüne göre sınıflandırıldıklarında ise 4 gruba ayrılırlar (Bitki, hayvan, mikroorganizma):

3.4.2.4 Bitki Kaynaklı Lipazlar

Bitki kaynaklı lipazlar, tohum, meyve, yapraklar ve bitkisel sıvı gibi bitkilerin çeşitli kısımlarından veya ürettikleri ürünlerden elde edilirler. Bitkinin büyümesi için gerekli olan enerji kaynağı olan tohumlarda triaçilgliserol miktarı fazladır bu nedenle lipaz aktivitesi de yüksektir [91]. Fakat bu lipazlar düşük maliyetli olmaları nedeniyle ekonomiktirler ancak saflaştırıldıklarında düşük miktarlarda elde edilmeleri, aktivitelerini azalması gibi sınırlamalara sahiptir. Bu nedenle bitki kaynaklı lipazlarla ilgili yapılan çalışma sayısı azdır [92].

3.4.2.5 Hayvan Kaynaklı Lipazlar

Bitki ve mikroorganizma kaynaklı lipazlara göre bugüne kadar tanımlanmış hayvan kaynaklı lipazların sayısı daha azdır. Hayvan kaynaklı lipazların klinik alanda hastalık tanısı için kullanımı ticari alanda kullanımlarına göre daha yaygındır [93]. Hayvan kaynaklı lipazlar arasında en çok tercih edilen lipaz enzimi, **Porcine Pankreatic Lipaz (PPL)** dır. Hayvan kaynaklı lipazlardan en çok bilineni olan domuz pankreatik lipazı, mikroorganizma ve bitki kaynaklı lipazlara göre daha ekonomiktir. PPL'nin ham ekstraktı esterazları, proteazları ve amilazları içerir [94]. Biyotransformasyon çalışmalarında da kullanımı oldukça yaygındır. Domuz Pankreatik Lipazının katalitik bölgesini Ser-Asp-His triadı oluşturmaktadır [95]. Mezofilik bir enzim olan PPL'nin aktivitesi için gereken optimum sıcaklık aralığı 35°C- 45°C; optimum pH aralığı 7.3-9.0 olarak belirlenmiştir. Triaçilgliserollerin hidrolizindeki maksimum aktivite gösterdiği ortam koşulları ise pH aralığının 6.7- 7.5 ; sıcaklık aralığının ise 35°C - 40°C'dir [96], [97], [98].

3.4.2.6 Mikroorganizma Kaynaklı Lipazlar

Mikrobiyal lipazlar; katalitik aktivitelerinin , stabiliteilerinin ve verimliliklerinin yüksek olması ayrıca mikroorganizmaların üretim koşullarının bitkisel ve hayvansal dokulara göre daha ekonomik olması nedeniyle gıda , temizlik ürünleri, biyoyakıt, tekstil,

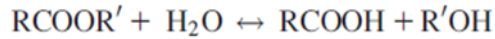
kozmetik, ilaç üretimi, kimyasal madde üretimi, biyosensör üretimi gibi birçok endüstriyel alanda kullanılmaktadırlar [99], [100], [101]. Mikrobiyal lipazlar bakteriler, funguslar ve mayalardan elde edilirler.

Fungal kaynaklı lipazlar, değişik sıcaklık ve pH değerlerindeki stabilitesi, substrat spesifikliğı, düşük maliyetle elde edilebilirliğı ve organik solventlerdeki aktivitesi gibi çeşitli özellikleri nedeniyle tercih edilmektedirler [91]. **Maya kaynaklı lipazlar**, önemli lipaz enzimlerindendir. *Candida* ve *Saccharomyces* türleri üretimlerinin kolay olması nedeniyle eczacılık, kimya, biyoloji ve biyodisel gibi alanlarda tercih edilmektedir [79]. Bakteriler bir diğer lipaz enzimi kaynaklarıdır. Bazı lipoprotein yapıdaki hücre dışı lipazlar haricinde genellikle glikoprotein yapına sahip olan **bakteriyal lipazlar**, hücre dışında (ekstraselüler), hücre içinde (intraselüler) veya hücre zarına bağlı olarak bulunmaktadır [102].

3.4.3 Lipazların Katalizlediğı Reaksiyon Türleri

- **Hidroliz**

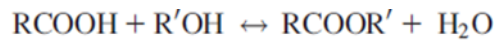
Lipaz katalizli hidroliz ile lipaz enzimleri yağların veya esterlerin yağ aside ve gliserole veya alkole parçalanmasını sağlar (Şekil 3.11) [103].



Şekil 3.11 Lipaz katalizli hidroliz genel reaksiyon

- **Esterifikasyon**

Lipaz katalizli esterifikasyon, alkol ve karboksilik asit arasında gerçekleşen bir çift yer değiştirme reaksiyonudur. Reaksiyon sonucunda su ve ester meydana gelmektedir (3.12) [79].

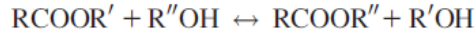


Şekil 3.12 Lipaz katalizli esterifikasyon genel reaksiyon

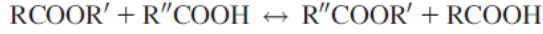
- **Transesterifikasyon**

Lipaz katalizli transesterifikasyon, alkolizis, asidolizis ve interesterifikasyon olmak üzere üç reaksiyon tipini kapsar ve bu reaksiyonlar sırasıyla bir estere ait organik grup ile alkol, asit veya bir diğer esterin organik grubu yer değiştirmesi ile gerçekleşir (Şekil 3.13'te

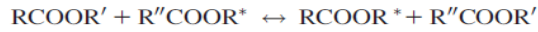
alkolizis örneği; Şekil 3.14'te asidolizis örneği ve Şekil 3.15'te interesterifikasyon örneği verilmiştir.) [79].



Şekil 3.13 Alkolizis genel reaksiyonu



Şekil 3.14 Asidolizis genel reaksiyonu



Şekil 3.15 İnteresterifikasyon genel reaksiyonu

- **Aminolizis**

Lipaz katalizli aminolizis, bir molekülün amin veya amonyak ile reaksiyona girmesi sonucu bölünmesini kapsayan hem kimyasal yollarla hem de enzimler gibi biyolojik katalizörlerle gerçekleştirilebilen bir reaksiyon türüdür (Şekil 3.16) [79].



Şekil 3.16 Lipaz katalizli aminolizis genel reaksiyonu

3.4.4 Lipaz Aktivitesine Etki Eden Faktörler

Lipazların, doğada su/lipid arayüzünde yer aldıkları ve aktif oldukları bilinmektedir. Laboratuvar ortamında yani in vitro koşullarda ise sulu ve susuz organik çözücülerde aktivite göstermektedirler [104]. Lipazların su/lipid arayüzündeki yüksek aktivitesi arayüzey aktivasyonu olarak adlandırılır ve bu işlem ile lipaz enzimi aktif forma dönüşür. Aktif forma geçiş süreci aktif bölgenin etrafında hidrofobik bir alan oluşmasıyla başlar. Bu hidrofobik alan lipaz enziminin su/lipid arayüzünde kalmasında ve katalizin başlamasında görevlidir. Su/lipid arayüzünde denatürasyona karşı oluşan bu direnç lipaz enzimlerinin organik çözücülerdeki stabilitesini açıklamaktadır [105].

Organik çözücüler lipaz enzimlerinin denatürasyonuna ve deaktivasyonuna neden olabildiği gibi bazı organik çözücüler de lipaz enzime substrat bağlanmasını engelleyerek inhibitör etkisi yaratabilir. Lipaz enzimlerinin kullanıldığı reaksiyonlarda organik çözücü seçimi bu nedenle çok önemlidir. Seçilen organik çözücülerin lipaz enziminin etrafında bulunan ve lipaz enzimini koruyan hidrat kabuğuna zarar vermemesi

gerekir. Eğer organik çözücü hidrat kabuğununda tahribata neden olursa lipaz enziminin moleküler yapısında değişikliklere neden olabilir [105]. Benzen, toluene, n-heksan, sikloheksan, oktan, heptan, izo-oktan, nonan, triasetin, petrol eteri, karbontetraklorr, etil asetat ve kloroform en çok tercih edilen organic çözücülerdir. Organik zc kullanımının avantajı ise işlem tamamlandıktan sonra filtrasyon yardımıyla enzimin geri kazanımının sağlanabilmesidir [6].

3.4.5 Lipaz Enzimlerinin Kullanım Alanları

Lipaz enzimleri, su bulunmayan ortamda hidroliz, esterifikasyon, transesterifikasyon, interesterifikasyon gibi birçok tepkimeyi katalizledikleri ve bu tepkimelerin ılıman koşullarda gerçekleşmesi nedeniyle gıda, deterjan, farmasötik, deri, tekstil, kozmetik, kağıt üretimi, biodiesel eldesi ve çevresel atıkların uzaklaştırılması gibi birçok alanda tercih edilmektedir.

Gıda endüstrisinde, süt ürünleri üretimi, fırınlanmış yiyecek üretimi, meyve suyu üretimi ve aroma eldesi gibi birçok alanda lipaz enzimleri kullanılmaktadır [106]. Örneğin *Penicillium roquefortii* mikroorganizmasından elde edilen lipaz enzimi rokfor peyniri gibi çeşitli peynirlere aromasını veren metil ketonlarının sentezini gerçekleştirebildiği için peynir üretiminde kullanılmaktadır [107], [108].

Lipaz enzimleri temizlik ürünleri üretiminde de kullanılmaktadır. Lipaz enzimlerinin deterjan endüstrisindeki kullanımına örnek olarak *Staphylococcus aureus* lipazı ile deterjan katkı maddelerinin üretilmesi işlemini örnek verebiliriz [109].

Lipaz enzimlerinin sıklıkla kullanıldığı alanlardan biri de farmasötik endüstrisidir. Biyokatalizin kimyasal senteze göre daha avantajlı olması ilaç üretiminde bir biyokatalizör olan enzimlerin kullanımına olan ilgiyi arttırmaktadır. Lipaz enzimlerinin de enantiyoselektif ve regioselektif özelliklere sahip olması ilaç üretiminde önemli rol oynamaktadır. Lipaz enzimlerinin rasemik karışımların rezolüsyonunu gerçekleştirmesi sonucu enantiyosaf madde eldesi ilaç endüstrisi için oldukça önemlidir [110]. Rasemik formdaki ilaçlarda genellikle bir enantiyomer terapötik etkiye sahiptir; diğer enantiyomer ise etkisiz olabildiği gibi toksik etkiye de sahip olabilir. Bu durum ilacın etkinliğinin azalmasına veya yan etkilere neden olabilir. Bu nedenle enantiyosaf ilaç üretimi son derece önemli ve ilgi çekici bir konudur.

Taxus brevifolia olan Pasifik Porsuğu olarak da bilinen bir ağaç trden elde edilmektedir. *Taxus brevifolia*'dan Taxol retimi çok düşük verimle

gerçekleştirilmektedir. Aynı zamanda bu maddenin üretimi *Pseudomonas cepecia*’ dan elde edilen PS-30 lipaz ve *Pseudomonas sp.* ‘den elde edilen Bristol-Myers Squibb (BMS) lipazın katalizlediği hidroliz tepkimesi ile de elde edilmektedir. Bu işlem sonucunda enantiyomerik excess (ee) değeri % 99.5 ve teorik olarak maksimum %50 olabilecek tepkime verimi ise %48 olarak tespit edilmiştir [111].

Piyasada Advil ve Motril ismiyle satılan ve antiinflamatuvar bir ilaç olan İbuprofen, propiyonik asit ve araşidonik asidin bağlanmasını engeller ve inflamatuvar yanıtı etki eden prostaglandinlerin sentezini engeller. Rasemik formda bulunan İbuprofen’in (S) enantiyomeri (R) enantiyomerine kıyasla prostaglandin sentezini engellemede 160 kat daha etkilidir. İbuprofen’in enantiyomerlerine ayrılmasında kullanılan bir uygulama da metanol veya butanol ortamında uygun lipaz (örneğin *Candida sp.* lipazlar) katalizli esterifikasyon ile (S) enantiyomerinin elde edilmesidir. Bu sentez ile (R)- enantiyomeri tamamen ayrılır ve kimyasal tepkimelerle (S)- enantiyomerine dönüştürülür [110], [112].

Fizik, kimya, biyokimya, mikrobiyoloji, moleküler biyoloji, genetik gibi birçok disiplini bir arada bulunduran biyoteknoloji; biyolojik sistemlerden yararlanarak ihtiyaç duyulan maddelerin elde edilmesi ve yaşanan sorunlara çözüm getirilmesi esasını temel alır. Kimyasal sentez yöntemleriyle gerçekleştirilmesi zor veya olanaksız olan sentezlerin gerçekleştirilmesini sağlayan biyotransformasyon reaksiyonları da biyoteknoloji uygulamalarından biridir.

Biyotransformasyon, biyokatalizör olarak mikroorganizmalar veya izole enzimlerin kullanıldığı; doğal veya sentetik maddelerden organik bileşiklerin transformasyonun gerçekleştiği reaksiyonlardır.

Biyotransformasyon reaksiyonları; yüksek verimlilik kapasitesi, ılıman koşullarda gerçekleşmesi, yeşil kimya prosedürlerine uygunluğu ve ekonomik olmaları gibi özelliklerinden dolayı kimyasal sentez yöntemlerine göre daha avantajlıdır [113].

İndirgenme, yükseltgenme, hidroliz, izomerleşme, esterleşme, dekarboksillenme, C-C bağlarının koparılması ve fosforillenme tepkimeleri en sık gerçekleşen biyotransformasyon dönüşümleridir. İlaç aktif maddeleri, gıda katkı maddeleri, antibiyotik üretimi, enerji üretimi, aminoasit üretimi, endüstriyel atık yıkımı, atık suların arıtılması gibi alanlarda faydalanılan biyotransformasyon reaksiyonlarına ilgi giderek artmaktadır [114], [115].

4.1 Geçmişten Günümüze Biyotransformasyon

Biyotransformasyon reaksiyonları, tarihi eskiye dayanan biyoteknolojik uygulamalardan biridir. Her ne kadar biyotransformasyon olarak tanımlanmamış olsa da milattan önceki zamanlarda bile biyotransformasyon örneklerine rastlanmaktadır. Biyotransformasyon alanında yapılan çalışmalar ve biyotransformasyonun gelişimini etkileyen bazı önemli olayların tarihsel çizelgesi Şekil 4.1’de verilmiştir [116], [117], [118], [119], [120]:



Şekil 4.1 Biyotransformasyonun tarihçesi

4.2 Biyotransformasyonun Kimyasal Sentez Yöntemlerine Göre Avantajları

- Regiospesifik, stereospesifik ve enantiyospesifik özelliklere sahiptirler. Enantiyospesifik özellikleri sayesinde rasemik karışımlardan kiral ürün elde edilmesini katalizlerler.
- Biyotransformasyon reaksiyonları özel koşullar gerektirmeden oda sıcaklığında ve atmosferik basınçta gerçekleşirler.
- Genellikle kimyasal sentez yöntemlerine göre daha ekonomiktirler.
- Kimyasal katalizörlere göre biyokatalizörler parçalanabildikleri için biyotransformasyon reaksiyonları çevre dostudur ve yeşil kimya prosedürlerine uygundur.
- Biyokatalizörler immobilize edilebilmekte ve tekrar kullanılabilir [121].

4.3 Biyotransformasyonun Bazı Sınırlılıkları

- Hücreler ve enzimler yüksek sıcaklıklarda, aşırı pH değerlerinde, bazı agresif solventlerde kararsızdır.
- Hücreler ve enzimler peptidazlar tarafından hidrolize edilebilirler.
- Hücreler ve enzimler bazı metal iyonları tarafından inhibe edilebilirler.
- Bazı izole enzimler çok pahalıdır veya pahalı substratlara ihtiyaç duyarlar.
- Bazı enzimler solunduğunda alerjen etki yapabilirler [121].

4.4 Kullanılan Biyokatalizöre Göre Biyotransformasyonun Sınıflandırılması

Enzimlerin ya da biyolojik sistemlerin katalizör olarak kullanıldığı belirli bir substratın biyokimyasal türevlerinin sentezlendiği reaksiyonlar biyotransformasyon olarak adlandırılmaktadır [20].

Kullanılan biyokatalizör türüne göre biyotransformasyon, enzimatik biyotransformasyon ve bütün hücre biyotransformasyonu olarak ikiye ayrılır.

4.4.1 Biyokatalizör Olarak Enzimler

Biyotransformasyonda kullanılan enzimler serbest formda, immobilize yapıda veya bir biyolojik sistem içerisinde bulunabilir.

Enzimlerin biyolojik katalizör olarak kullanılmasının birçok avantajı vardır. Enzimlerin genelde pH 5-8 ve 20-40 °C aralığında ılıman şartlarda reaksiyona girmeleri bu avantajlardan biridir. Böylece biyolojik katalizör olarak enzim kullanılmasıyla izomerleşme, çevrilme, rasemizasyon ve bozunma gibi yan reaksiyon oluşumu gözlenmez. Ayrıca enzimlerin tepkime hızının yüksektir. Biyolojik katalizör olan enzimler doğada parçalanabilen çevre dostu biyomoleküllerdir [122].

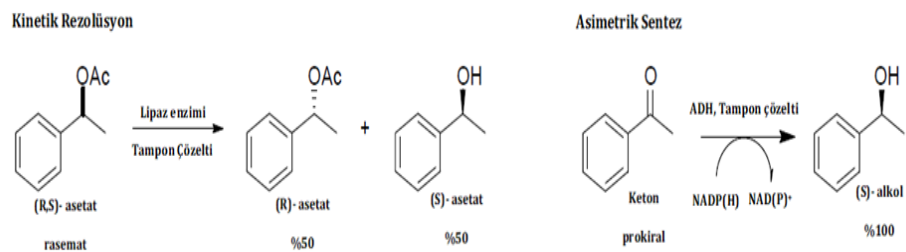
Enzimler regioselektif, kemoselektif ve enantiyoselektif özellik gösterirler. Regioselektif aktiviteleri ile aynı substratın farklı bölgelerindeki fonksiyonel grupların ayrılmasını gerçekleştirebilir [122].

Kemoselektif aktiviteleri ile bir substratın belirli bir fonksiyonel grubu üzerinde etki gösterirler, böylece enzimlerin katalizör olarak kullanıldığı tepkimelerde yan ürün oluşumu gözlenmez [122].

Enantiyoselektif aktiviteleri ile ise prokiral bir substratın tek bir enantiyomere dönüşmesini sağlarlar. Ayrıca rasemik karışımda sadece bir enantiyomer için seçici olup enantiyomerlerin birbirinden ayrılmasını gerçekleştirmeleri de enantiyoselektif aktivitelerinden kaynaklanmaktadır [122].

Enzimler sahip oldukarı bu özellikler ile kimyasal sentez yöntemleri aracılığıyla sentezlenmesi olanaksız olan bileşiklerin sentezini daha kolay gerçekleştirirler.

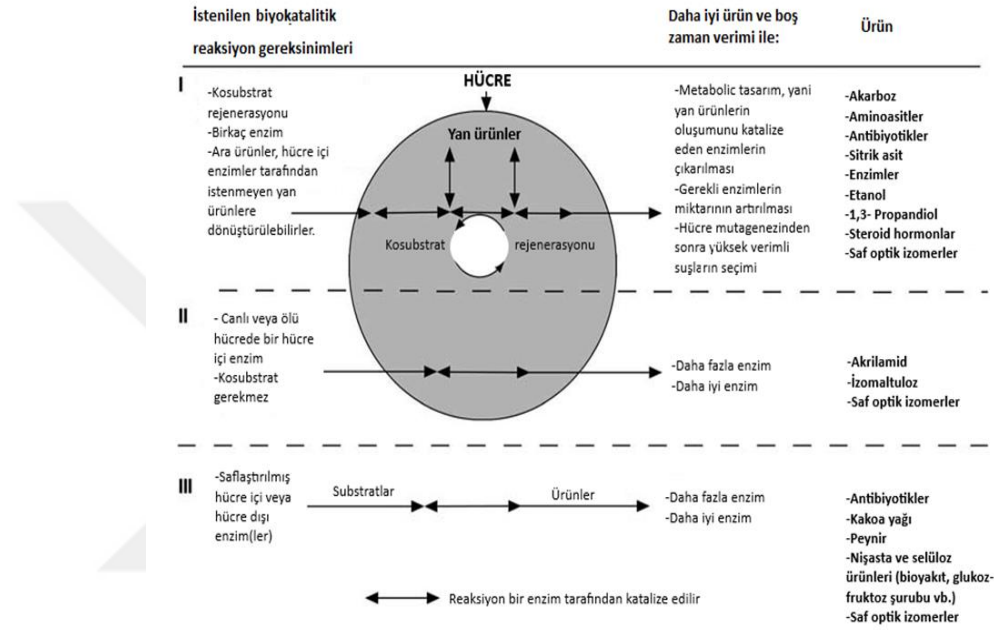
Ayrıca enzimlerin rasemik karışımların rezolüsyonu ve asimetrik sentez ile optikçe aktif bileşiklerin sentezini gerçekleştirmeleri değerli biyoteknolojik uygulamalardan biridir. Kinetik rezolüsyon ile her iki enantiyomer %50 verim ile optikçe saf olarak sentezlenebilir. Bunun yanında asimetrik sentez ile bir enantiyomerin %100 verim ile elde edilmesi gerçekleştirilebilir (Şekil 4.2) [121].



Şekil 4.2 Kinetik rezolüsyon ve asimetrik sentez verimi örneği [121]

Enzimler 3 farklı formda biyotransformasyonda kullanılabilir. Canlı hücrede bulunan intrasellüler enzimler; canlı veya ölü hücrede bulunan intrasellüler enzimler veya

saflaştırılmış hücre içi veya hücre dışı enzimler olmak üzere biyotransformasyon reaksiyonlarını gerçekleştirmede görev alırlar. Ayrıca biyoteknolojik yöntemlerle, hücre içindeki yan ürün oluşumuna neden olan enzimlerin çıkartıldığı ve biyotransformasyonu hedeflenen metabolite spesifik enzimin miktarının artırıldığı recombinant hücrelerin üretimi biyotransformasyon verimini artıracaktır. Şekil 4.3'te enzimlerin biyokatalizör olarak kullanıldığı biyokatalitik süreçlerin sınıflandırılması verilmiştir [121].



Şekil 4.3 Enzimlerin biyokatalizör olarak kullanıldığı biyokatalitik süreçlerin sınıflandırılması [121]

4.4.2 Biyokatalizör Olarak Bütün Hücre Sistemleri

Biyotransformasyon reaksiyonlarında katalizör olarak izole enzimler veya bütün hücre sistemleri kullanılmaktadır. Bütün hücre sistemleri;

- bitki hücresi
- hayvan hücresi
- doku ve organ kültürleri
- mikroorganizmalar olarak sıralanabilir [94].

Biyotransformasyon reaksiyonlarında bütün hücre sistemlerinin tercih edilmesinin nedenleri arasında hücre içi enzimlerin in vitro koşullarda kararsız olabilmeleri, hücre içerisindeki enzimlerin izolasyonunun zor olması, homojenizasyon aşamasında hücre içi

enzimlerin proteolitik enzimler tarafından hidrolize edilmeleri, hücre içi enzimlerin kofaktör ihtiyacının sürekli karşılanması, hücre içi enzimlerin izolasyonunun pahalı olması ve yüksek aktiviteleri sayılabilir [94].

Bütün hücre sistemleri içerisinde de en çok tercih edilen biyolojik sistem mikroorganizmalardır. Üreme hızlarının yüksek olması, substrat çeşitliliği ve yapılarının küçük olmasından dolayı bitki ve hayvan hücrelerine göre daha kararlı bir yapıda olmaları biyotransformasyon reaksiyonlarının gerçekleştirilmesi açısından avantaj sağlar [94].

4.4.3 Enzim Ve Bütün Hücre Sistemlerinin Karşılaştırılması

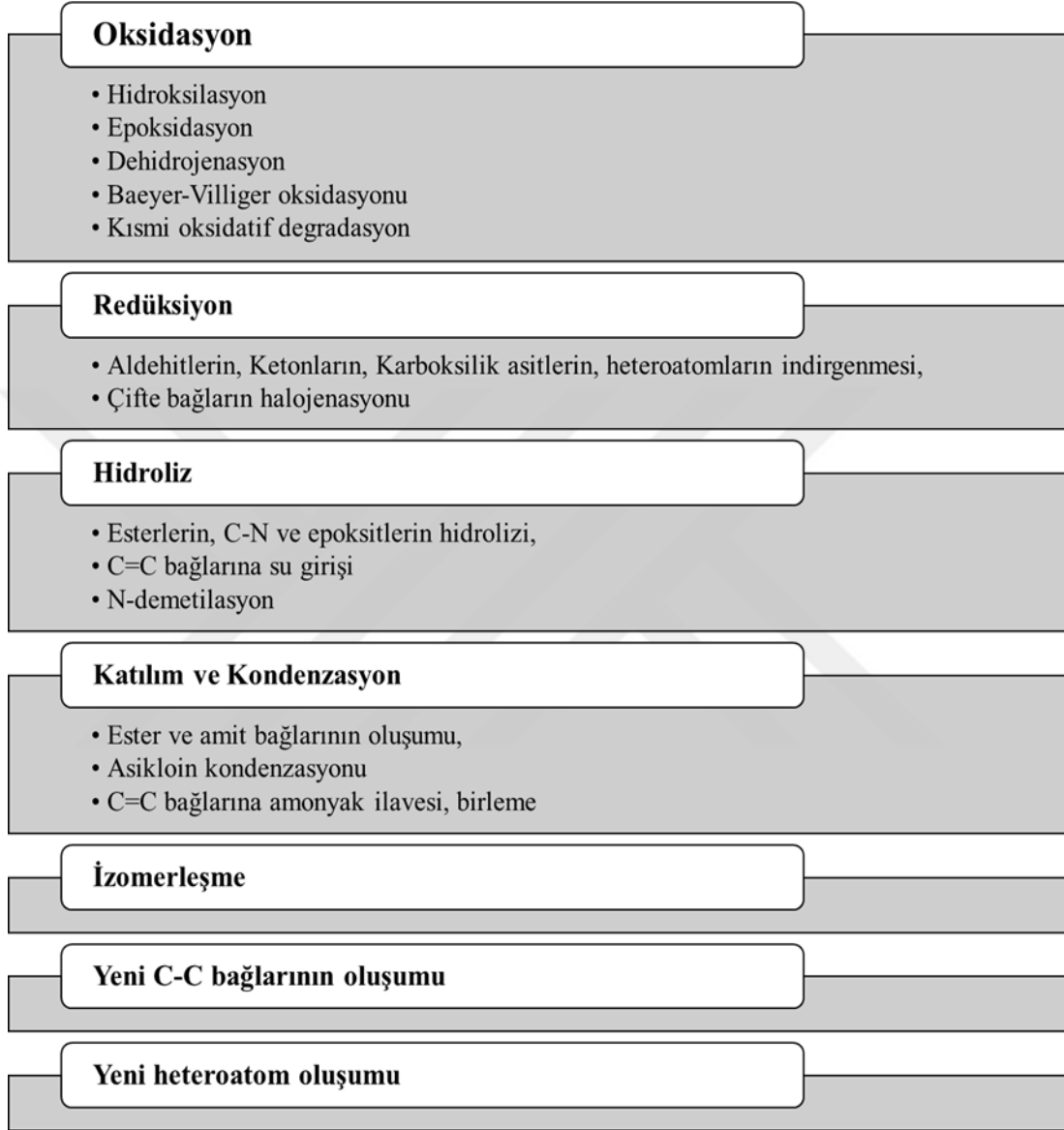
Biyotransformasyon reaksiyonlarında katalizör olarak hem enzimler hem de bütün hücre sistemleri kullanılabilir. Bütün hücre sistemlerinin karşılaştırılması verilmiştir (Tablo 4.1) [94].

Tablo 4.1 Katalizör olarak enzimlerin ve bütün hücre sistemlerinin karşılaştırılması

Biyokatalizör	Form	Avantaj	Dezavantaj
İzole Enzimler	Genel	- Basit sentez sistemleri, - Kolay işlemler, - Konsantrasyon toleransının yüksekliği nedeniyle iyi verim	Kofaktöre ihtiyaç duyulur
	Sulu Ortamda	Yüksek enzim aktivitesi	- Yan reaksiyon olasılığı, - Çözünmeyen lipofilik substratlar, - Ekstraksiyon gerekliliği
	Organik Çözücüde	- Çalışma kolaylığı, - Lipofilik substrat çözünürlüğü, - Enzimin geri kazanım kolaylığı	Düşük aktivite
	İmmobilize	Tekrar kullanılabilirlik	İmmobilizasyon esnasında aktivite kaybı
Bütün Hücreler	Genel	Kofaktöre ihtiyaç duyulmaz	- Pahalı donanım, - Büyük hacimlerle çalışma zorluğu, - Düşük konsantrasyon toleransından kaynaklanan düşük verim, - Organik solventlerde düşük verimlilik, - İstenmeyen safsızlık olasılığı
	Büyüyen Hücreler	Yüksek aktivite	- Çok miktarda biyokütle, - Türev ürün fazlalığı, - Proses kontrol güçlüğü
	Durağan Kültür	- Çalışma kolaylığı, - Daha az türev ürün	Düşük aktivite
	İmmobilize Hücreler	Tekrar kullanılabilirlik	Düşük aktivite

4.5 Biyotransformasyon Reaksiyon Türleri

Biyotransformasyon reaksiyonları 8 ana başlık altında sınıflandırılmaktadır. Biyotransformasyon reaksiyon türleri aşağıdaki şemada verilmiştir (Şekil 4.4) [94].

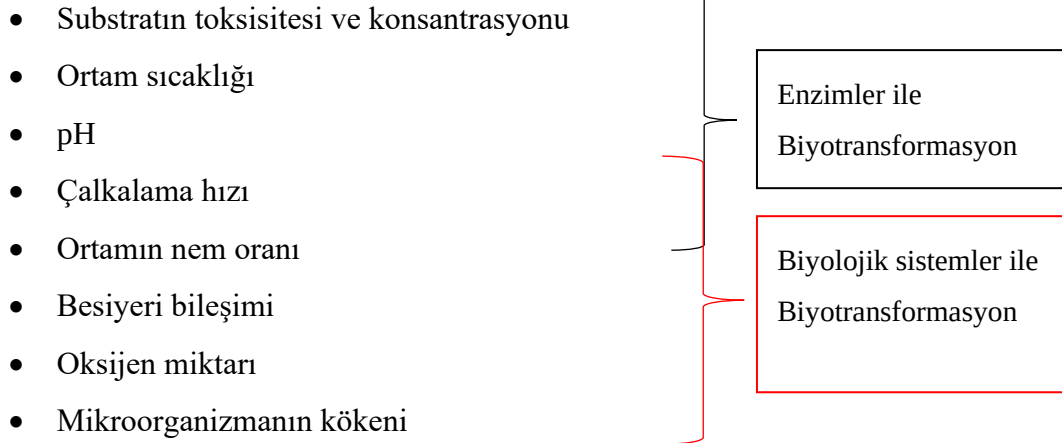


Şekil 4.4 Biyotransformasyon reaksiyon türleri

4.6 Biyotransformasyonu Etkileyen Faktörler

Biyotransformasyonda katalizör olarak enzimler ve biyolojik sistemler kullanılmaktadır. Bu nedenle biyotransformasyon reaksiyonları gerçekleştirilirken kullanılan katalizörler için optimum koşullar sağlanmalıdır.

Biyotransformasyonu etkileyen faktörler aşağıda listelenmiştir [114].



4.7 Biyotransformasyon ve Yeşil Kimya

Biyotransformasyon gibi biyokatalitik sentez yöntemleri, kimyasal sentez yöntemlerinin aksine çevre dostu yöntemleri içermektedir ve 1988 yılında Anastas ve Warner tarafından önerilen ‘‘Green Chemistry’’ ilkeleriyle örtüşmektedir [123].

Biyotransformasyon reaksiyonlarında biyolojik katalizörler (enzimler ve biyolojik sistemler) kullanılmaktadır ve bu katalizörler bazı avantajlar sağlamaktadır. Enzimlerin ve biyolojik sistemlerin doğada parçalabilmeleri ve ılımlı koşullar altında (pH, sıcaklık, basınç...) sentez gerçekleştirebilmeleri biyolojik katalizörlerin sağladığı avantajların başında gelmektedir. Ayrıca enzimler sulu ortamlarda aktivite gösterebilir ve böylece organik çözücü kullanımı gerektirmez [124].

Yeşil kimya prosedürleri, çevre dostu sentezlerin gerçekleştirilebilmesi için tam bir çözüm olmasa da enzimler ve biyolojik sistemler gibi biyokatalizörler çevre açısından temiz kimyanın sorun olduğu yerlerde değerlidir [124].

Tablo 4.2’de Anastas ve Warner tarafından düzenlenen 12 ‘‘Yeşil Kimya’’ ilkesi ve biyokatalizörlerin bu ilkelerle uyumluluğu belirtilmiştir [123].

Tablo 4.2 Yeşil kimya ilkeleri ve biyokatalizör uyumluluğu [123], [124]

	Yeşil Kimya İlkeleri	Biyokatalizör Uyumluluğu
1	Atık oluşumunu önleme	
2	Atom Ekonomisi (Yapılan sentetik proseslerde kullanılan tüm ürünlerin son ürüne dahil edilmesi)	
3	Daha Az Tehlikeli Kimyasal Sentezler	Biyokatalizörler, doğal toksisite sorunları olmayan doğal ürünlerdir.
4	Daha Güvenli Kimyasalların Tasarlanması (Kullanılan kimyasallar hem toksik olmayacak hem de etkinliği yüksek olacak şekilde tasarlanmalı)	
5	Daha Güvenli Çözücüler ve Yardımcı Maddeler	Biyokatalizörler genellikle sulu ortamlarda kullanılır.
6	Enerji Verimliliği için Tasarım	Çoğu biyokatalizör hem oda sıcaklığında hem de atmosferik basınçta aktivite gösterir.
7	Yenilenebilir Hammaddelerin Kullanımı	Biyokatalizörler, yenilenebilir enerji işlemedeki uygulamaları için yoğun bir şekilde araştırılmaktadır.
8	Türevleri Azalt (fiziksel ve kimyasal proseslerde geçici bile olsa değişiklikler yapılması atık üretimine yol açabilir)	Biyokatalizörler genellikle hem regioselektif hem de stereoselektiftir ve substratın diğer bölgeleri için koruma ihtiyacını ortadan kaldırır.
9	Kataliz – Katalitik reaktifler	Biyokatalizörler katalitiktir.
10	Bozunma için Tasarım (kullanılan kimyasalar proses sonunda zararsız ürünlere dönüşmeli ve çevrede kalıcı olmamalıdır)	Biyokatalizörler, doğal gereği kullanımdan sonra biyolojik olarak parçalanabilirler.
11	Kirlilik Önleme için gerçek zamanlı analiz	
12	Kaza Önleme İçin Doğal Olarak Daha Güvenli Kimya (patlama, yangın, kimyasal kaza vb.)	Biyokatalizörlerin kullanımı bu tehlikelerin riskini azaltır.

4.8 Biyotransformasyon ve Farmasötik Endüstrisi

Kiralite, birçok ilaç molekülünün aktivitesinde kilit bir role sahiptir ve bu nedenle kiral moleküllerin enantiyosaf (tek bir enantiyomer formda) üretimi farmasötik endüstrilerde giderek önemli hale gelmiştir. Organik sentez, tekli enantiyomerlerin sentezine bir yaklaşımdır ve biyotransformasyon farmasötik açıdan faydalı kiral bileşiklerin elde edilmesi için alternatif bir fırsat sağlar. Biyotransformasyon kimyasal sentez yöntemlerine göre ılımlı koşullarda gerçekleşmesi, enantio-, stereo- ve regio- seçimli olması enantiyosaf ilaç molekülü eldesinde önemlidir. Biyotransformasyon reaksiyonları ile elde edilmiş halihazırda ilaç piyasasında bulunan farmakolojik olarak aktif metabolitler Tablo 4.3'te listelenmektedir [125].

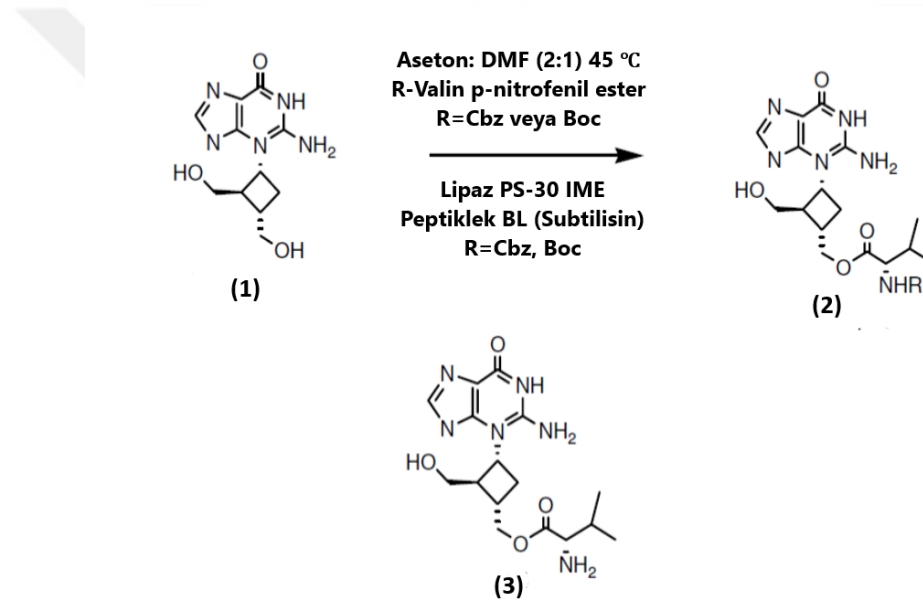
Tablo 4.3 Biyotransformasyon reaksiyonları ile elde edilmiş ilaç piyasasında bulunan farmakolojik olarak aktif metabolitler

İlaç	Metabolit	Biyotransformasyon	Terapötik Aktivite
Atomoxetine	4-Hydroxyatomoxetine	Aromatik Hidroksilasyon	Dikkat eksikliği, hiperaktivite bozukluğunun tedavisi
Indapamide	5-Hydroxyindapamide		Antihipertansif
Propranolol	4-Hydroxypropranolol		Antiaritmik
Ibuprofen	Hydroxyibuprofen	Alifatik Hidroksilasyon	Anti-inflamatuvar
Metronidazole	Hydroxymetronidazole		Antibiyotik
Risperidone	9-Hydroxyrisperidone		Antipsikotik
Azonafade	N-Desmethylazonade	N-Dealkilasyon	Antitümoral
Clomipramine	N-Desmethylclomipramine		Antidepresan
Zolmitriptan	N-Desmethylzolmitriptan		Migren tedavisi
Tramadol	O-Desmethyltramadol	O-Dealkilasyon	Analjezik
Acebutol	Diacetolol	N-Asetilasyon	Antihipertansif
Carbamazepine	Carbamazepine-10,11 epoxide	Epoksidasyon	Antiepilepsi
Diacerein	Rhein	Deasetilasyon	Osteoartrit tedavisi
Procainamide	N-Acetyl procainamide	N-asetilasyon	Antiaritmik

4.9 Bazı İlaçların Enzimatik Enantiyosaf Sentezi

4.9.1 Antiviral İlaç – Lobucavir

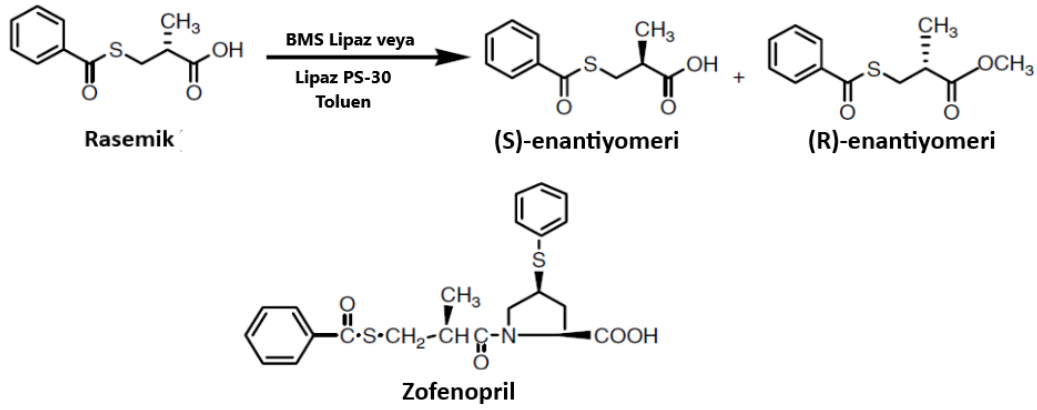
Herpes virüsü ve Hepatit B tedavisi için kullanılan bir antiviral ajan olan Lobucavir, bir siklobütil guanin nükleozid analogudur. İki hidroksilden birinin valine bağlı olduğu bir ilaç geliştirmek istenmiştir regioselektif aminoasılasyon ile bu sentezin gerçekleştirilmesi düşünülmüştür. Regioselektif aminoasılasyonun kimyasal sentez yöntemleri ile elde edilmesi zordur; bu nedenle enzimatik sentez yöntemleri kullanılmıştır. Lobukavirin hidroksil gruplarından herhangi birinin aminoasılasyonu için enzimatik prosesler geliştirilmiştir. *Pseudomonas cepacia* lipaz kullanılarak % 84 verim ile Lobucavir ilaç öncül maddesi elde edilmiştir (Şekil 4.5) [126], [127].



Şekil 4.5 Lobucavirin regioselektifenzimatik aminoasılasyonu (1) Lobucavir, (2) Elde edilmesi istneilen ürün, (3) Lobucavir öncül ilaç maddesi

4.9.2 Antihipertansif İlaç – Zofenopril ((S)-3 Benzoiltiyo-2 Metilpropanoik Enzimatik Sentezi)

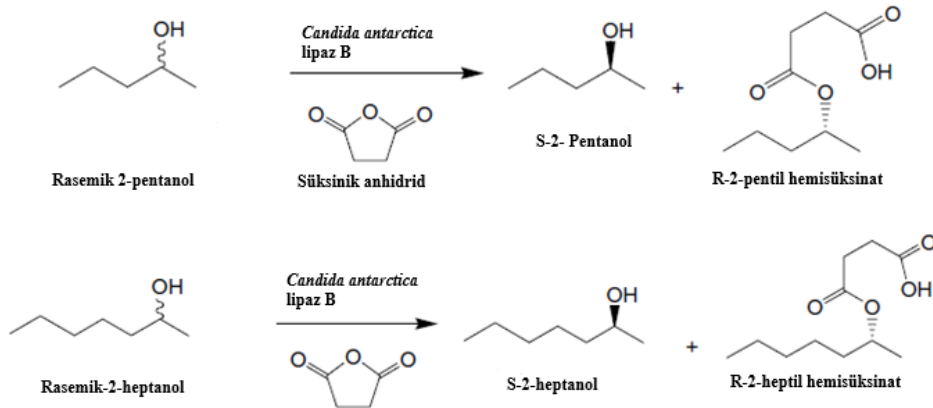
Zofenopril (1) in kiral yan zincirinin eldesinde alternatif bir yaklaşım olarak rasemik 3-benzoiltiyo-2-metilpropanoik asidin bir organic çözücü olan toluene içerisinde nükleofil olarak metanolün kullanıldığı lipaz katalizli enantiyoselektif esterifikasyonu kullanılmıştır. Sentezde katalizör olarak BMS lipaz ve Lipaz PS-30 aktivite göstermektedir. Lipaz enzimi katalizli bu esterifikasyon reaksiyonu sonucunda % 97 ee oranı ile (S) enantiomer sentezlenmiştir (Şekil 4.6) [128].



Şekil 4.6 Zofenopril yan zincirinin sentezi: rasemik 3-benziltiyo-2-metilpropanoik asidin enantioselektif enzimatik esterifikasyonu

4.9.3 Antialzheimer İlacı – (S)-2-Pentanol ve (S)-2-Heptanol

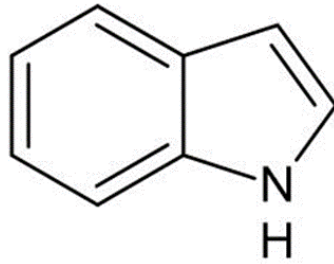
(S)-2-Pentanol β -amiloid peptit salınımını ve/veya sentezini inhibe eden birkaç potansiyel anti-Alzheimer ilacının sentezinde kullanılan bir ilaç öncül maddesidir. *C. antarctica* 'dan izole edilmiş bir lipaz olan Lipaz-B rasemik 2-pentanol ve 2-heptanolün enzimatik rezolüsyonunu sağlar. Bu sentez %98'lik bir ee oranı ile gerçekleşti. (S)-2-Heptanolün enzimatik rezolüsyonu da benzer koşullarda Lipaz B ile gerçekleşti ve e oranı %99 olarak tespit edildi (Şekil 4.7) [129].



Şekil 4.7 Anti-Alzheimer ilaçları için kiral ara maddelerin sentezi: *Candida antarctica* lipaz ile rasemik 2-pentanol ve 2-heptanolün enzimatik rezolüsyonu

İNDOL İSKELET YAPISINA SAHİP BİLEŞİKLER

Birçok doğal maddenin yapısında bulunabildiği gibi sentetik olarak da sentezlenebilen indol türevleri, tipik heterosiklik yapıya sahip bileşiklerdir. Benzopirrol olarak da adlandırılan bu bileşiklerin yapısını benzen ve pirol halkası oluşturmaktadır (Şekil 5.1) [130].

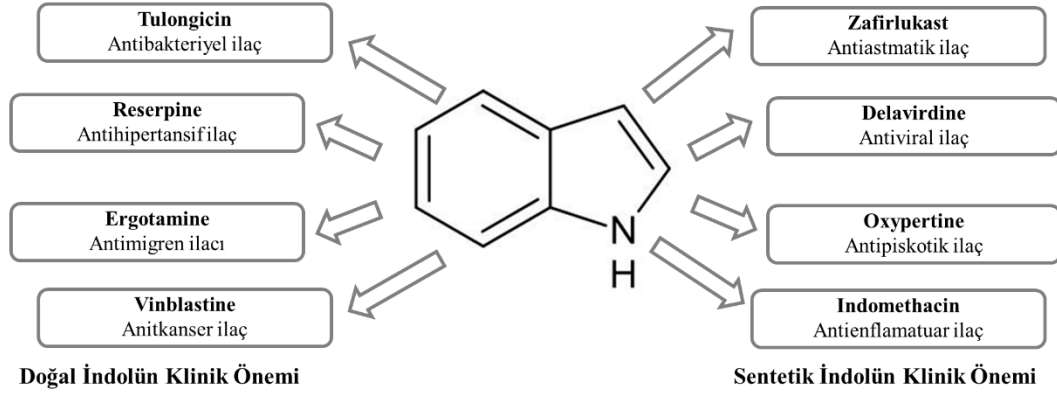


Şekil 5.1 İndol halkası yapısı

İndol türevleri, biyolojik aktivitelerinden dolayı doğada sıklıkla bulunmaktadır. Örneğin indol-3-asetik asit oksin sınıfına ait bir bitki hormonudur [131]. Ayrıca indoller doğada bulunan 20 aminoasitten biri olan triptofan formunda proteinlerin yapısında bulunur [132]. Örneğin triptofan aminoasidinden türeyen bir nörotransmitter olan serotoninin ve hayvani bitki ve mikropların mevsimsel saat olarak kullandıkları melatoninin yapısında bulunmaktadır [133], [134].

İndol türevleri doğada bulundukları gibi sentetik olarak da elde edilebilirler. Antihipertansif bir ajan olan Rezerpin (Reserpine), antikanser bir ajan olan Vinblastin (Vinblastine) ve migren ağrısı tedavisinde kullanılan Ergotamin (Ergotamine) indol halkası içeren biyoaktif doğal bileşiklere örnek verilebilirken; esansiyel bir aminoasit olan triptofan, bir nörotransmitter olan serotonin ve bir nörohormon olan melanin de örnek verilebilir [135].

Sentetik olarak elde edilmiş indollere ise antiastmatik bir ajan olan Zafirlukast (Zafirlukast), antiviral bir ajan olan Delavirdin (Delavirdine), antipiskotik bir ajan olan Oksertin (Oxypertine) ve antienflamatuar bir ajan olan İndometazin (İndomethacin) örnek verilebilir [135]. Şekil 5.2’de indol nükleusunun farmakolojik önemi ile ilgili örnekler verilmiştir.



Şekil 5.2 İndol nükleusunun farmakolojik önemi [135]

Anti-inflatuar, anti-analjezik, anti-mikrobiyal, anti-HIV, anti-hepatit, anti-oksidant, anti-kanser, anti-malaryal, anti-diabetic, anti-tüberkuloz, anti-konsulvant, anti-histamik, anti-hipertansif gibi farmakolojik aktivitelerinden dolayı klinik olarak kullanılan ilaçların yapısında bulunurlar [136]. Amerika’da 2014 yılında yayınlanan bir çalışmaya göre FDA veri tabanında 17 adet indol temelli ilaç bulunduğu belirtilmektedir [137]. İndol halkası içeren ilaçların bazıları Tablo 5.1’de verilmiştir [138]:

Tablo 5.1 İndol halkası içeren bazı ilaçlar

İlaç	Uygulama
Vincristine	Antikanser
Vinblastine	Antikanser
Panobinostat	Antilösemi
Pindolol	Antihipertansif
Indalpine	Antidepresan
Indomethacin	Antiinflatuvar
Arbidol	Antiviral
Bucindolol	β -Blokör

İlaç şirketleri tarafından üretimi gerçekleştirilen indol türevli ilaçlar, çeşitli biyolojik aktiviteleri, uygun pazarlama süresi ve klinik araştırmalardaki yüksek başarı oranı gibi

birçok faydası ile farklı hastalıkların tedavisinde önemli rol oynamaktadır ve oynamaya devam edecektir [139].

İndoller sentetik olarak elde edilebilirler. İndol sentezi yöntemleri aşağıda sıralanmıştır:

- Bartoli sentezi
- Bischler sentezi
- Fischer sentezi
- Hemetsberger sentezi
- Julia sentezi
- Larock sentezi
- Leimgruber–Batcho sentezi
- Madelung sentezi
- Nenitzescu sentezi
- Reissert sentezi
- Sundberg sentezi [140].

İndol türevleri optikçe aktif olmaları nedeniyle her zaman ilgi çekici bileşikler olmuştur ve olmaya devam edecektir. Çalışkan ve ekibi tarafından yapılan bir çalışmada ilaç sanayi için önemli moleküller olan γ -asetoksi-4-okso-tetrahidro indol ve γ -hidroksi-4-okso-tetrahidro indol türevlerinin lipaz katalizli esterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonları ile elde edilmiştir ve yüksek ee değerleri tespit edilmiştir [4]. Yine Çalışkan ve ekibi tarafından yapılan diğer bir çalışmada *Aspergillus niger* kullanılarak 1-benzil- 5-hidroksi 7,7-dimetil-6,7-dihidro-1H-indol-4(5H)- on bileşiğinden 5-hidroksi-7,7 dimetil-6,7 dihidro-1H-indol-4-(5H)-on bileşiği mikrobiyal biyotransformasyon yoluyla elde edilmiştir ve bu durum literatürde ilktir. Bu çalışma ileride ilaç endüstrisi alanında yapılacak çalışmalara ışık tutmaktadır [141].

İndollerin biyolojik aktivitesiyle ilgili literatürde birçok çalışma bulunmaktadır. Xue ve çalışma arkadaşları 6-Amino-4-substitue alkil-1H-indol-2 substitue karboksilat türevlerinin antiviral aktiviteye sahip olduğunu tespit etmiştir [142]. Cihan-Üstündağ ve ekibi ise 4-Alkil-1-(5-fluoro-3-fenil-1H-indol-2-karbonil) tiyosemikarbazid türevlerinin RNA ve DNA virüsleri için geniş bir antiviral aktivite yelpazesine sahip olduğunu keşfetmişlerdir [143]. Chavan ve çalışma arkadaşları indol yapılı bir bileşik olan 3-(2-Aminopirimidin-4-il) türevlerinin ülserojenik, antiinflamatuvar ve aneljezik aktiviteleri araştırılmıştır ve indometasin benzeri etkiler gösterdiği tespit edilmiştir [144]. Elshemy

ve arkadaşları piridin içeren 2-(1H-indol-3-il)-4,6-difenilnikotinonitril türevlerinin *Plasmodium falciparum*'a karşı antimalarial etki gösterdiğini rapor etmişlerdir [145].



Proje kapsamında ticari olarak satın alınan Sigm Aldrich marka 5-metil-1,3-sikloheksandion bileşiğinden başlanılarak 3 aşamalı bir sentez rotası izlenmiştir.

Her bir sentez aşaması sonrasında elde edilen bileşiklerin saflaştırılması 0,063-0,200 mm, Merck marka silika jel ile gerçekleştirilmiştir. Kolon kromatografisi ile saflaştırmanın yetersiz kaldığı durumlarda preparatif ince tabaka kromatografisi (Preparatif İTK) tekniğinden yararlanılmıştır. Preparatif İTK tabakalarının hazırlığında Merck Silika jel 60 GF₂₅₄, Merck Silika jel 60 HF₂₅₄ ve Merck Silika jel HF₂₅₄₊₃₆₆ kullanılmıştır.

Yapılan sentezlerin ve saflaştırmaların sonuçları ince tabaka kromatografisi (İTK) ile takip edilmiştir. Macherey-Nagel Silika jel 60 F₂₅₄ kullanılmıştır. İTK plakalarının görüntülenmesi Camag UV (254 nm) ile yapılmıştır.

Sentezlenen maddelerin yapı tayini, dötöro kloroform (CDCl₃) (¹H: δ= 7.27) (¹³C: δ= 77.0, 96.4) uluslararası standartlarda Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisiyle (NMR) (Varian Unity Inova 500 MHz) ile gerçekleştirilmiştir. IR spektrumları Thermo FT-IR (Nicolet Is 10) ile tespit edilmiştir. Elde edilen maddelerin erime noktası tespiti Büchi Melting Point B-540 cihazı kullanılarak yapılmıştır.

Biyotransformasyon reaksiyonlarında katalizör olarak kullanılan lipaz enzimleri CRL (*Candida rugosa* Lipaz) Sigma Aldrich (62316), CCL (*Candida cylindracea* Lipaz) BioChemika (62316), PPL (Porcine pancreas Lipaz) Sigma Aldrich (L3126), ROL (*Rhizopus oryzae* Lipaz) Sigma Aldrich (62305), BioChemika (62306), Amano Lipaz PS (*Burkholderia cepacia*) Sigma Aldrich (534641) ve MJL (*Mucor javanicus* lipaz) Sigma Aldrich (L8906) 'den temin edilmiştir.

HPLC analizleri Shimadzu markalı cihazda gerçekleştirilmiş olup kolon olarak OD-H ve OJ-H kolonları kullanılmıştır.

6.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar Tablo 6.1’de listelenmiştir.

Tablo 6.1 Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Markası	Modeli
Evaporatör	Büchi	Rotavapor R-200
Ultrasonik Su Banyosu	Sartorius	Arium Pro
Vakum Pompası	Welch	2522C-02
Manyetik Karıştırıcı	IKA	Yellow Line MSC Basic C
Çalkalayıcılı İnkübatör	Mikrotest	MC55
pH Metre	Hanna Instruments	pH Microprocessor pH Meter - 520518
Zaman Ayarlı Etüv	WTC Binder	1505330000202
Otomatik Pipet 1000 µL	Socorex Acura	Acura Manuel 825-16061880
Otomatik pipet 200 µL	Isolab	011.06.200
Analitik Terazî	Precisa	230-9204-007 XB 220A SCS/W50124
Erime Noktası Tayin Cihazı	Büchi	Melting Point B-540
IR	Thermo FT-IR	Nicolet İs 10
UV Lamba	Camag	022.9120/1305
NMR	Varian	Unity Inova 500 Mhz

Tablo 6.1 Kullanılan cihazlar (devamı)

HPLC	Shimadzu	Kontrolör	CBM-20A
		UV Dedektörü	SPD-M20A 230V
		Pompa	LC-6AD
		Kolon Fırını	CTO-20AC
OD-H Kiral Analitik Kolon (Cellulose tris (3,5-dimethylphenylcarbamate), 250x4.6 mm, 5 µm, Analytical)	Daicel Corporation	14325	
OJ-H Kiral Analitik Kolon (Cellulose tris (4-methylbenzoate), 250x4.6 mm, 5 µm, Analytical)	Daicel Corporation	17325	
AD Kiral Analitik Kolon (Amylose tris (3,5-dimethylphenylcarbamate), 250x4.6 mm, 10 µm, Semi-Prep)	Daicel Corporation	19025	

6.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar

Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar Tablo 6.2’de listelenmiştir.

Tablo 6.2 Kullanılan kimyasallar

Kimyasal Adı	Marka	Kod Numarası
5-metil-1,3- sikloheksadion	Sigma Aldrich	279951
Benzen	Merck	1.01782.2500
n-Hekzan (HPLC Grade)	Merck	1.04391.2500
2-Propanol (HPLC Grade)	Merck	1.01040.2500
Kloroform	Teknik Kalitede	-
Hekzan	Teknik Kalitede	-
Etil Asetat	Teknik Kalitede	-
Aseton	Teknik Kalitede	-
Asetik Asit	Merck	1.00056.2500
Etanol	Isolab	920.026.2500
Sikloheksan	Merck	1.02832.2500
Asetonitril	Merck	1.00030.2500
Toluen	Sigma Aldrich	24529
Tetrahidrofuran	Merck	1.08114.2500
Diklorometan	Carlo Erba	412622000
Dimetilsülfoksit	Merck	1.16743.1000

Tablo 6.2 Kullanılan kimyasallar (devamı)

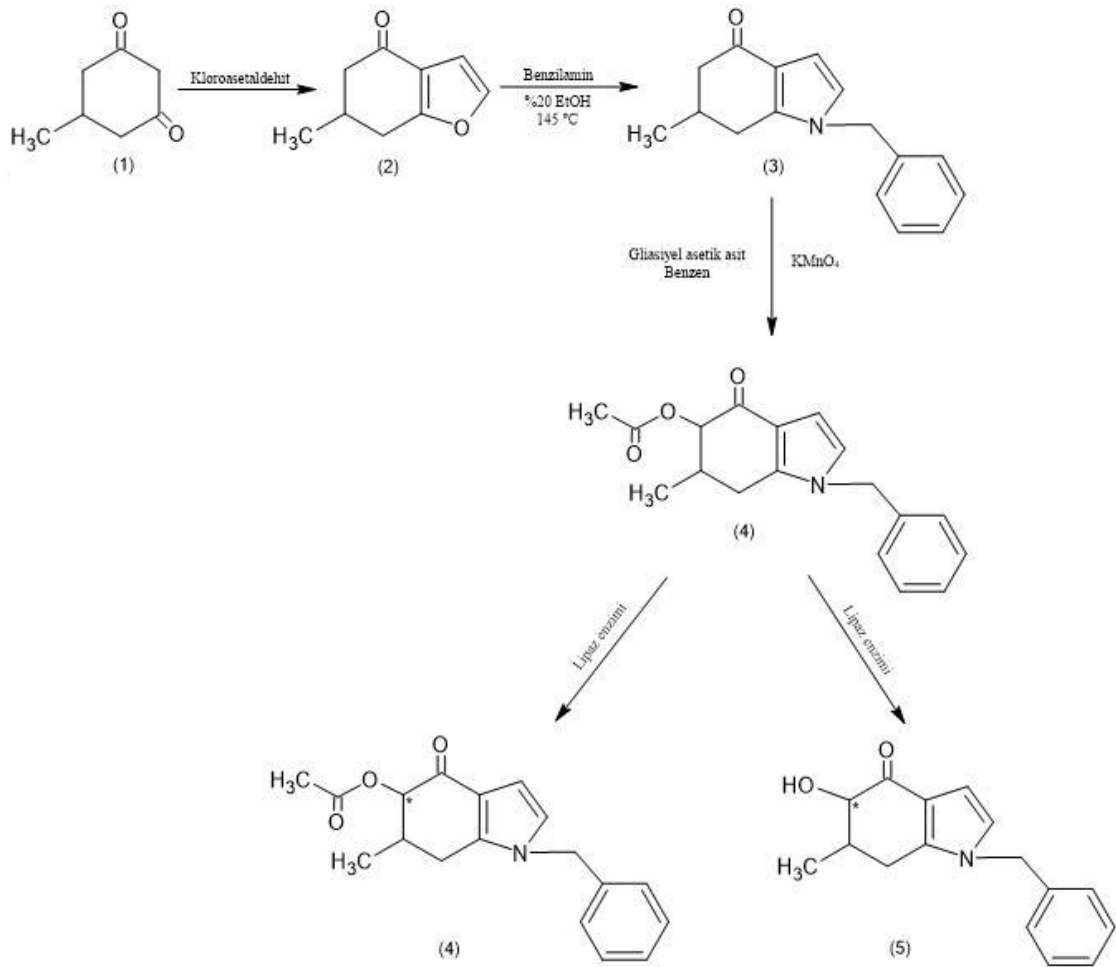
Sodyum Bikarbonat	Teknik Kalitede	-
Sodyum Hidroksit	Merck	1.06482.1000
Potasyum Karbonat	Tekkim	TK.150430.01000
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck	1.04873.1000
Dipotasyum hidrojen fosfat	Merck	1.05104.1000
pH 4.00 Tampon Çözeltisi	Merck	1.09435.1000
pH 7.00 Tampon Çözeltisi	Merck	1.09439.1000
Hidroklorik Asit	Tekkim	TK.080230.01000
Potasyum Permanganat	Merck	1.05082.0250
Ultra Saf Su	-	-
Kloroasetaldehit	Aldrich	317276-250
Benzilamin	Aldrich	185701-100
TLC Silika Jel F₂₅₄ Alüminyum Plaka	Merck	1.05554.0001
CC Silika Jel 60 (0.063-0.200 mm)	Merck	1.07734.9025
Silica Gel 60 HF254+366 (preparative TLC için)	Merck	1.07741.1000
Silica Gel 60 HF254 (preparative TLC için)	Merck	107739.1000
Lipase Basic Kit	Fluca	62327

Tablo 6.2 Kullanılan kimyasallar (devamı)

CCL (<i>Candida cylindracea</i> Lipaz)	Fluca	62316
CRL (<i>Candida rugosa</i> Lipaz)	Sigma Aldrich	62316
PPL (Porcine pancreas Lipaz)	Sigma Aldrich	L3126
ROL (<i>Rhizopus oryzae</i> Lipaz)	Sigma Aldrich	62305
MJL (<i>Mucor javanicus</i> lipaz)	Sigma Aldrich	L8906
Lipase Extencion Kit	Fluca	62323
Amano Lipase PS, from <i>Burkholderia cepacia</i> (<i>Pseudomonas cepacia</i>)	Sigma Aldrich	534641

6.3 Sentez Rotası

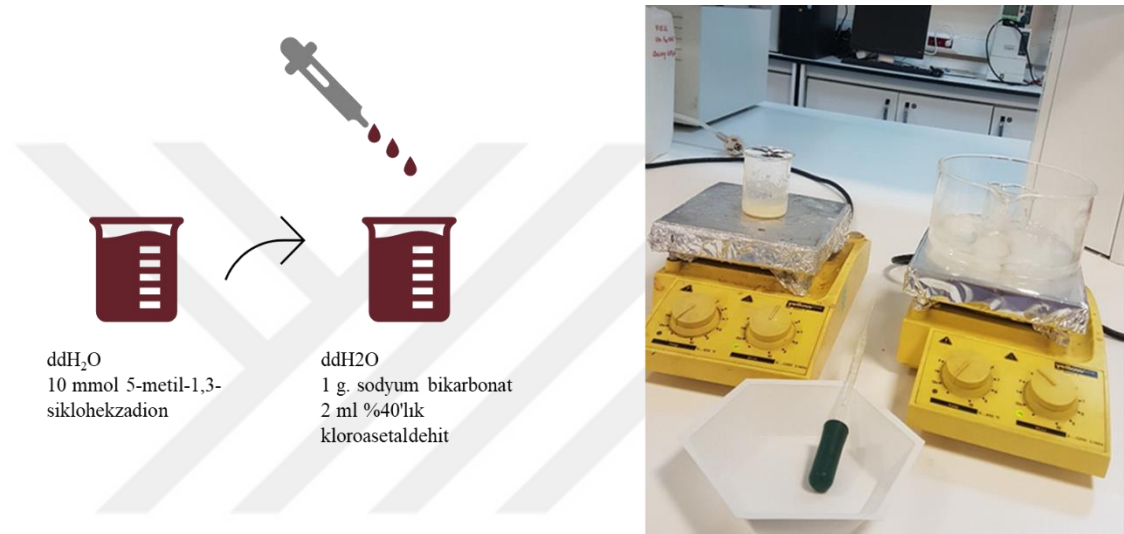
Çalışma 2 aşamalı olarak gerçekleştirilmiş olup ilk aşamada asimetrik sentez yöntemleri kullanılarak indol türevleri sentezlenmiştir. İkinci aşamada ise sentezlenen indol türevlerinin lipaz enzimleri katalizörlüğünde biyotransformasyon reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Çalışmada aşağıdaki şemada gösterilen sentez rotası izlenmiştir (Şekil 6.1):



Şekil 6.1 Sentez rotası

6.3.1 6,7-Dihidro-6-metilbenzofuran-4(5H)-on Sentezi

Bir beher içerisine 9 ml ddH₂O ve 10 mmol 5-metil-1,3-sikloheksadion (CH₃C₆H₇O₂) (**1**) eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılmıştır. Bir diğ er beher içerisine ise 8 ml ddH₂O, 1 g sodyum bikarbonat (NaHCO₃) ve 2 ml %40'lık kloroasetaldehit (C₂HCl₃O) eklenerek hazırlanan karışım soğutulmuştur (0-5  C). 9 ml ddH₂O ve 10 mmol 5-metil-1,3-sikloheksadion karışımı dakika bir 0,4 ml olacak şekilde soğutulan karışım içerisine damlatılmıştır. 6,7-Dihidro-6-metilbenzofuran-4(5H)-on (C₉H₁₀O₂) (**2**) sentezi reaksiyon düzeneği Şekil 6.2'de verilmiştir.



Şekil 6.2 (2) numaralı bileşik sentezi reaksiyon düzeneği

Reaksiyon 17 saat ve oda ısısında gerçekleştirilmiştir. 17 saat tamamlandıktan sonra karışım içerisine 10 ml etil asetat ilave edilmiş ve reaksiyon durdurulmuştur. Reaksiyon durdurulması işleminden sonra pH değeri ölçülmüş (~6,86) ve pH=1 olacak şekilde ayarlanmıştır (Şekil 6.3).

pH ayarı yapıldıktan sonra manyetik karıştırıcı ile 1 saat reaksiyon karıştırılmıştır. 1 saat sonunda ekstraksiyonu gerçekleştirmek için karışım ayırma hunisine alınmıştır ve su fazı olarak doymuş potasyum karbonat (K₂CO₃); organik faz olarak ise kloroform kullanılmıştır (Şekil 6.4).



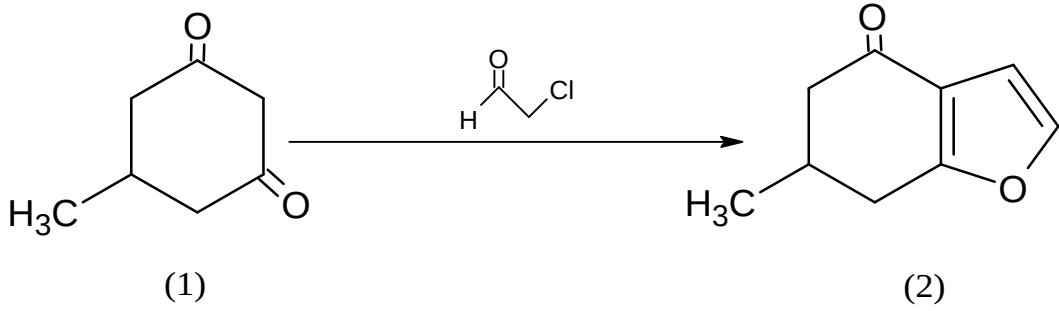
Şekil 6.3 pH metre ile rekasyon pH değerinin 1'e ayarlanması



Şekil 6.4 Ekstraksiyon aşaması

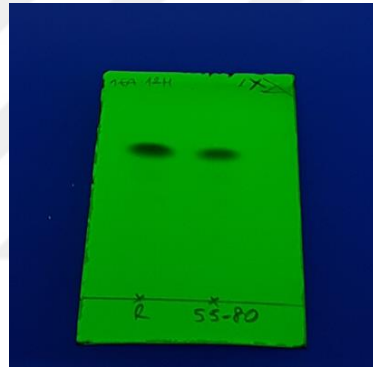
Ekstraksiyon sonrasında toplanan organik faz içerisine su fazından iyice uzaklaştırabilmek amacıyla kalsiyum karbonat (CaCO_3) eklenmiştir. Daha sonra CaCO_3

süzülmüş ve organik faz evaporatör yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Şekil 6.5'te (1) numaralı bileşikten (2) numaralı bileşiğin sentez reaksiyonu yer almaktadır.



Şekil 6.5 (1) bileşiğinden (2) bileşiği sentezi

Sentez sonrası saflaştırma işlemi kolon kromatografisi ile gerçekleştirilmiştir. Kolon çözücü sistemi olarak 1 EtOAc:6 Hex kullanılmıştır. Şekil 6.6'da bileşik (2)'nin 254 nm UV ışık altındaki İTK görüntüsü verilmiştir.



Şekil 6.6 (2) numaralı bileşiğin 254 nm UV ışık altındaki İTK görüntüsü

Kolon sonrası saflaştırılan madde petroleum eter ile yıkanmış ve single kristal oluşumu gerçekleşmiştir (Şekil 6.7).



Şekil 6.7 Petroleum eter ile yıkama sonucu elde edilen single kristaller

Bileşik (2) için;

Verim: %74

Erime noktası (M.P.): 52,1 °C

Rf: 0,75 (Silika jel, 1:2 EtOAc:Hekzan)

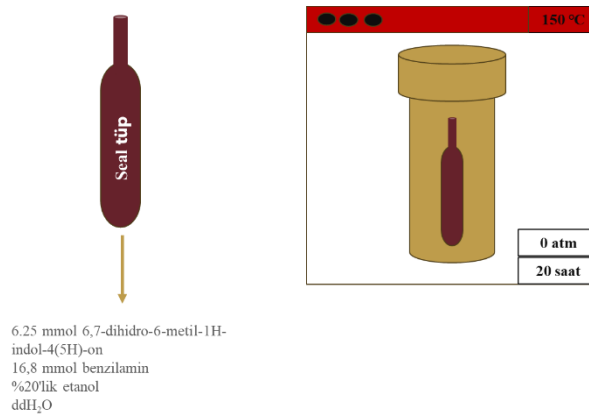
IR (CHCl₃) γ (max): 1658.10 cm⁻¹

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)

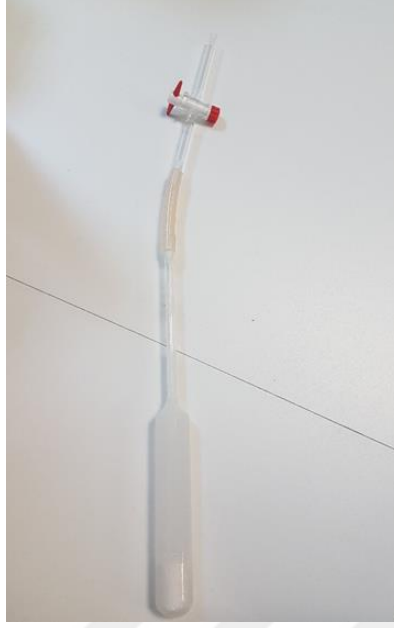
¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 21.35; 30.74; 31.49; 46.33; 106.60; 120.92; 142.32; 166.56; 194.46

6.3.2 Benzofuran Bileşiğinin Seal Tüp Reaksiyonu

1-benzil-6,7-dihidro-6-metil-1H-indol-4(5H)-on (C₁₆H₁₇ON) (3) bileşiğinin sentezi için 6,25 mmol bileşik (2), 16,8 mmol benzilamin ve 5ml %20'lik etanol: ddH₂O ile 145-150°C sıcaklıkta ve ~0 atm basınçta 20 saat süre ile seal tüp olarak adlandırılan cam tüpün içerisinde sentez gerçekleştirilmiştir (Şekil 6.8, Şekil 6.9). Gerçekleştirilen indol sentezleri ilk olarak 12 saatte gerçekleştirilmiştir. Fakat (2) numaralı bileşiğin, (3) numaralı bileşiğe dönüşümünün 12 saatte istenilen verimle gerçekleşmediği gözlemlenmiştir. Bu nedenle sentez süresi kademeli olarak 15 saat, 18 saat ve 20 saat olarak artırılmıştır ve sentezin en verimli olarak 20 saatte gerçekleştiği tespit edilmiştir. Sentez sonrası ekstraksiyon için su fazı olarak distile su; organik faz olarak diklorometan kullanılmıştır. Organik faz CaCO₃ ile tamamen sudan arındırılmış ve daha sonra organik faz evaporatör yardımıyla uzaklaştırılmıştır (Şekil 6.10).



Şekil 6.8 (3) numaralı bileşiğin sentez düzeneği

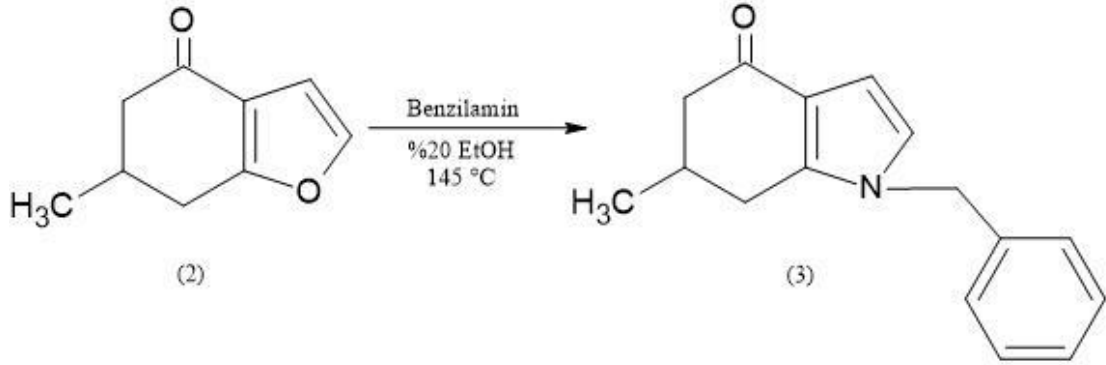


Şekil 6.9 (3) numaralı bileşiğin sentezinin gerçekleştiği seal tüp



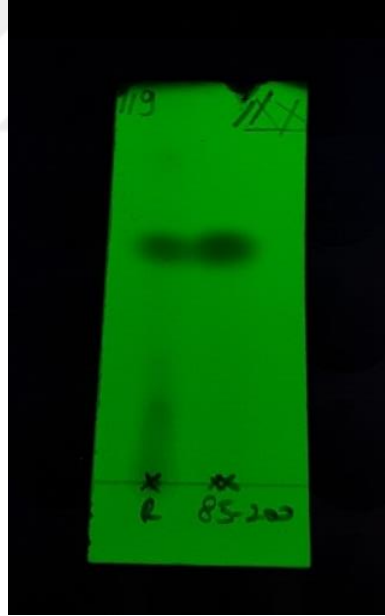
Şekil 6.10 Ekstraksiyon aşaması

Şekil 6.11’da (2) numaralı bileşikten benzilamin aracılı (3) numaralı bileşiğin sentezi reaksiyonu yer almaktadır.



Şekil 6.11 (2) numaralı bileşikten benzilamin aracılı (3) numaralı bileşiğin sentezi

Sentez sonrası bileşik (3)’ün saflaştırılması kolon kromatografisi ile gerçekleştirilmiştir ve saf olarak elde edilmiştir (Şekil 6.13). Kolon kromatografisinde çözücü sistemi olarak 1 EtOAc:6 Hex sistemi kullanılmıştır. Şekil 6.12’de (3) numaralı bileşiğin 254 nm UV ışık altındaki İTK görüntüsü verilmiştir.



Şekil 6.12 (3) numaralı bileşiğin 254 nm UV ışık altındaki İTK görüntüsü



Şekil 6.13 Kolon sonrası elde edilen saf indol (**3**)

Bileşik (**3**) için;

Verim: %92.8

Erime noktası (M.P.): 108,5 °C

Rf: 0,37 (1:2 EtOAc:Hekzan, Silika jel)

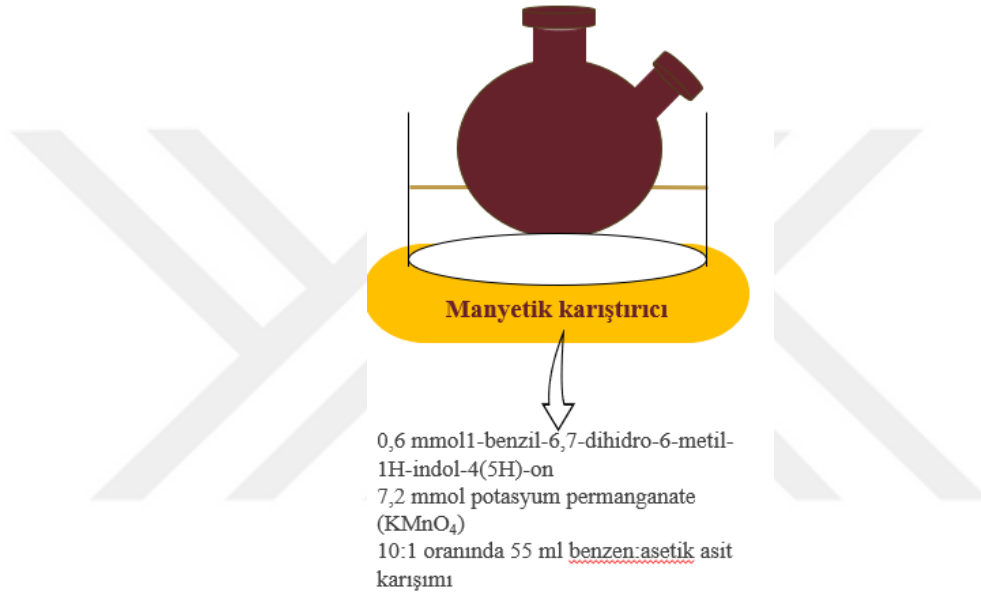
IR (CHCl₃) γ (max): 1651.10, 2923.32 cm⁻¹

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.02 (d, J: 6.8 Hz, 3H, -CH₃), 2.16 – 2.66 (m, 1H, -CH), 2.23-2.48 (d.d, J: 4, 12, Hz, 2H, -CH₂), 2.73-2.85 (d.d, J: 4, 12, Hz, 2H, -CH₂), 5.06 (s, 2H, CH₂Ph), 6.57 (d, J = 3.00 Hz, 1H, H-3), 6.73 (d, J = 3.00 Hz, 1H, H-2), 7.02-7.80 (m, 5H, Ph).

¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 20.22; 28.59; 28.81; 30.48; 45.02; 49.39; 104.56; 119.83; 121.98; 125.38; 126.83; 127.69; 127.89; 135.48; 142.11; 192.81

6.3.3 Potasyum Permanganat Katalizörlüğünde Asetoksi-İndol Sentezi

1-benzil-6-metil-4-okso-4,5,6,7-tetrahidro-1H-indol-5-il asetat ($C_{20}H_{20}O_3N$) (**4**) bileşiği sentezi için 10:1 oranında 110 ml benzen:asetik asit karışımına 7,2 mmol potasyum permanganate ($KMnO_4$) eklenerek yan kollu balonda Dean-stark-trap düzeneğine konulmuştur (Şekil 6.14, Şekil 6.15). Reaksiyonun gerçekleştiği ortamın rengi mordan kahverengiye dönene kadar reflux gerçekleştirilmiştir. Daha sonra 0,6 mmol bileşik (**3**) balonun yan kolundan reaksiyon ortamına eklenmiştir. Reaksiyonun takibi İTK ile yapılmıştır ve reaksiyon 42 saat devam ettirilmiştir.

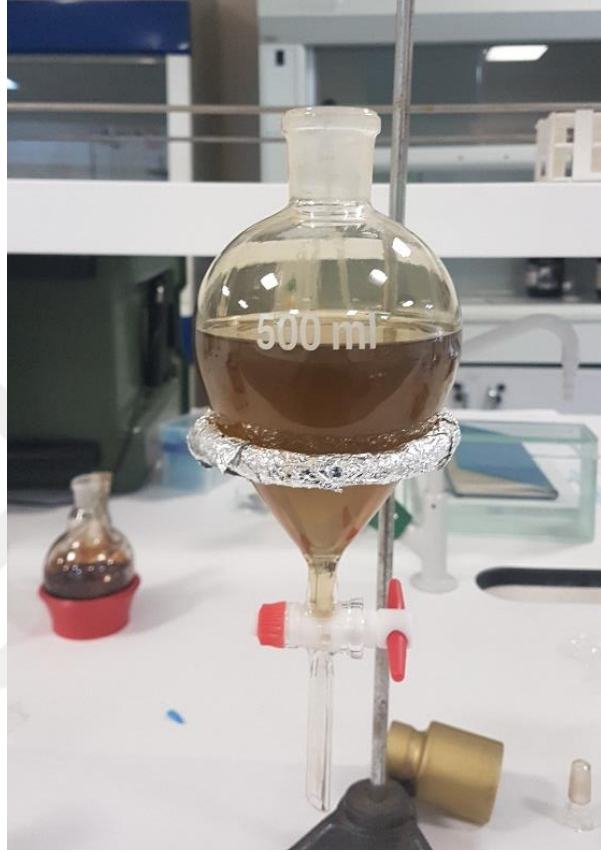


Şekil 6.14 Reaksiyonun gerçekleştiği yan kollu balon ve sentez içeriği



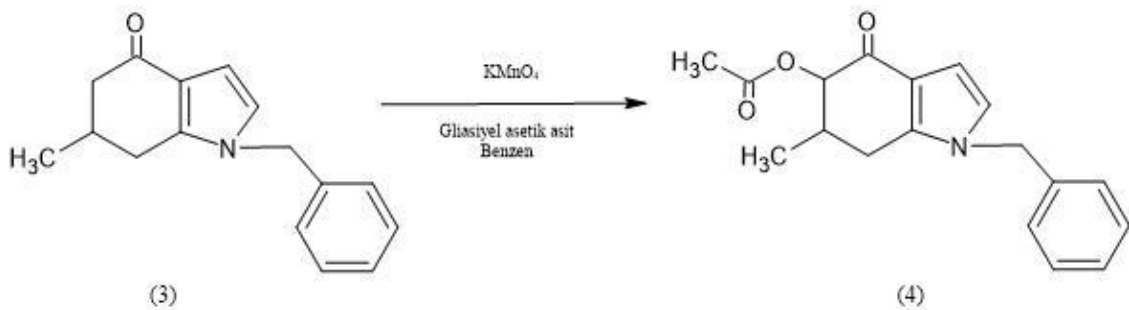
Şekil 6.15 (**4**) numaralı bileşiğin reaksiyon düzeneği

Sentez sonrası KMnO_4 'ü uzaklaştırmak için süzme işlemleri yapılmış ve süzme işleminden sonra ekstraksiyon aşamasına geçilmiştir. Ekstraksiyonda su fazı olarak doymuş NaHCO_3 ; organik faz olarak ise kloroform kullanılmıştır. Organik faz CaCO_3 ile tamamen sudan arındırılmış ve daha sonra organik faz evaporatör yardımıyla uzaklaştırılmıştır (Şekil 6.16).



Şekil 6.16 Ekstraksiyon aşaması

(3) numaralı bileşikten (4) numaralı bileşiğinin sentezi reaksiyonu Şekil 6.17’te verilmiştir.



Şekil 6.17 (3) numaralı bileşikten (4) numaralı asetat bileşiğinin sentezi reaksiyonu

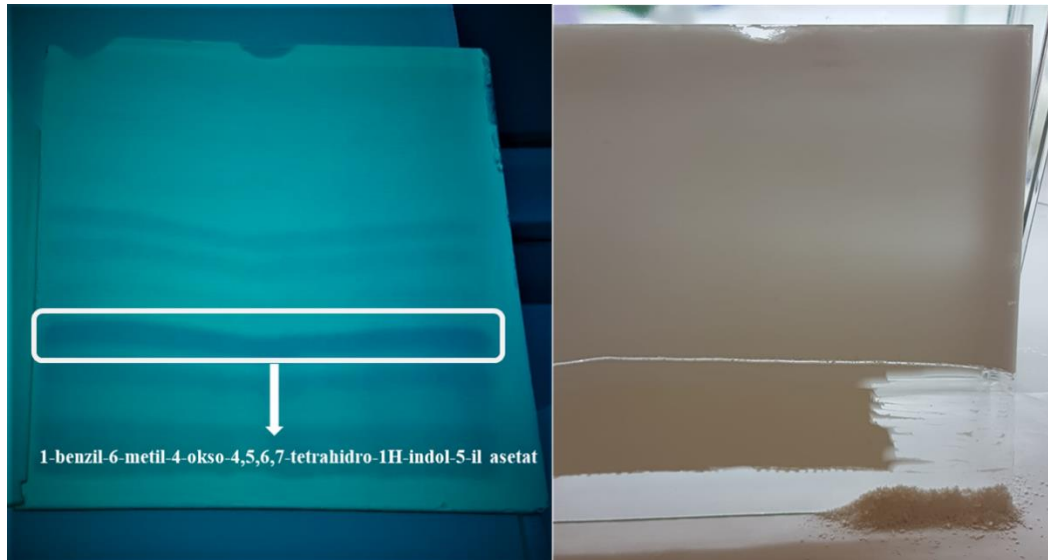
Sentez sonrası (4) numaralı bileşğin saflaştırılması kolon kromatografisi ile gerçekleştirilmiştir. Kolon kromatografisinde çözücü sistemi olarak 1 EtOAc:15 Hex sistemi kullanılmıştır.

(4) numaralı bileşğinin 254 nm UV ışık altındaki İTK görüntüsü Şekil 6.18’de verilmiştir.



Şekil 6.18 (4) numaralı bileşğinin 254 nm UV ışık altındaki İTK görüntüsü

Saflaştırma işlemi kolon kromatografisiyle sağlanamamıştır. Bu nedenle ikinci bir saflaştırma işlemi için preparatif İTK yöntemi kullanılmıştır. Preparatif İTK ile saflaştırma 1 EtOAc:6 Hex sisteminde gerçekleştirilmiştir (Şekil 6.19).



Şekil 6.19 Preparatif İTK ile saflaştırma

(4) numaralı bileşik için;

Verim: %61

Rf: 0,44(Silika jel, 1:2 EtOAc:Hekzan)

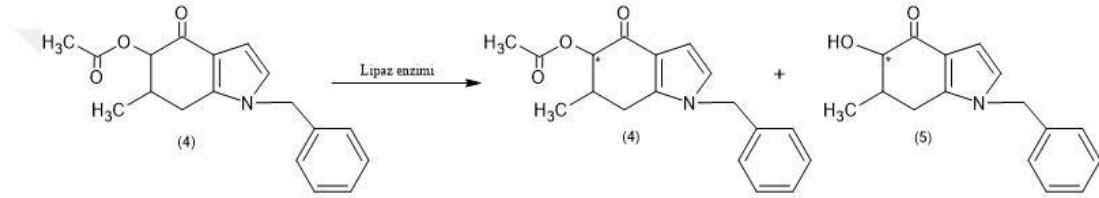
IR (CHCl₃) γ (max): 1666.93, 1741.74, 2924.63 cm⁻¹

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.65 (d, J: 6.8 Hz, 3H, CH₃), 2.05 (s, 3H, COCH₃), 2.09 (t, J = 9.9 Hz, 1H, 6-CH), 3.45-2.65 (dd, J = 7.1, 11.9 Hz, 2H, CH₂), 5.04 (s, 2H, CH₂Ph), 5.55 (d, J:4.3 Hz, 1H, CHO), 6.66 (d, J = 3.1 Hz, 1H, H-3), 6.84(d, J = 2.951 Hz, 1H, H-2), 6.99–7.50 (m, 5H, Ph).

¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 12.50; 19.69; 19.78; 28.58; 39.66; 49.38; 62.21; 105.62; 120.47; 125.07; 125.31; 127.27; 127.43; 127.72; 127.81; 127.82; 135.45; 136.26; 169.52; 186.48

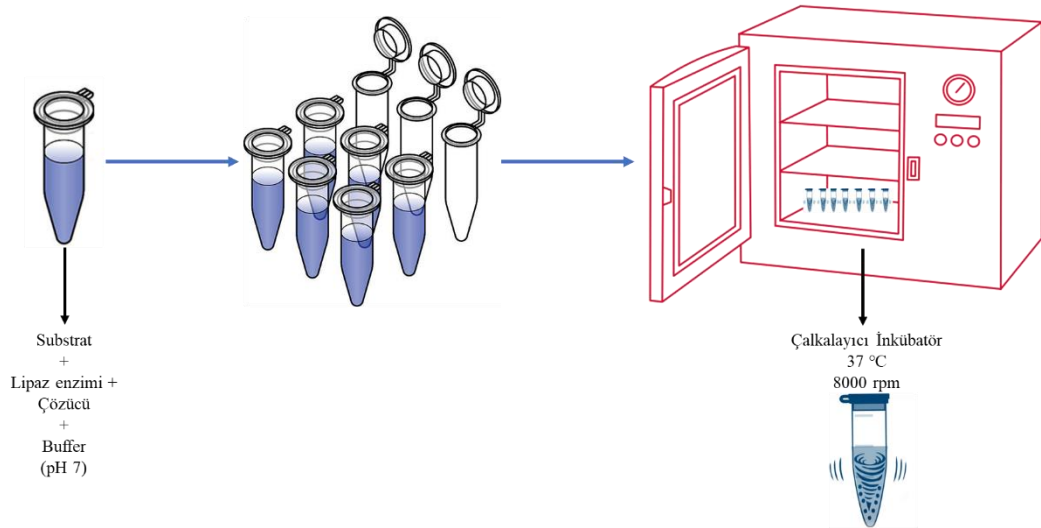
6.3.4 Asetoksi-İndol Bileşiğinin Lipaz Katalizli Esterifikasyon Reaksiyonları

0,024 mmol 1-benzil-6-metil-4-okso-4,5,6,7-tetrahidro-1H-indol-5-il asetat (**4**) bileşiği, organik çözücü ve fosfat tamponu (150 µl, pH=7) eklenerek karışım hazırlanmıştır. Daha sonra hazırlanan karışıma lipaz enzimi eklenmiş ve 37°C sıcaklıkta çalkalayıcı inkübatörde (katalizör yüzeyi – substrat difüzyonunun oluşabilmesi amacıyla) gerçekleştirilmiştir. Lipaz katalizle esterifikasyon reaksiyonları asetonitril, DMSO ve THF olmak üzere 3 farklı çözücü sisteminde pH=7 de gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon belirlenen aralıklarla İTK ile takip edilmiştir ve substrat dönüşümünün %50 olduğu tespit edildiğinde reaksiyon sonlandırılmıştır. Şekil 6.20’de rasemik (**4**) bileşiğinin lipaz katalizörlü biyotransformasyon reaksiyonu verilmiştir.



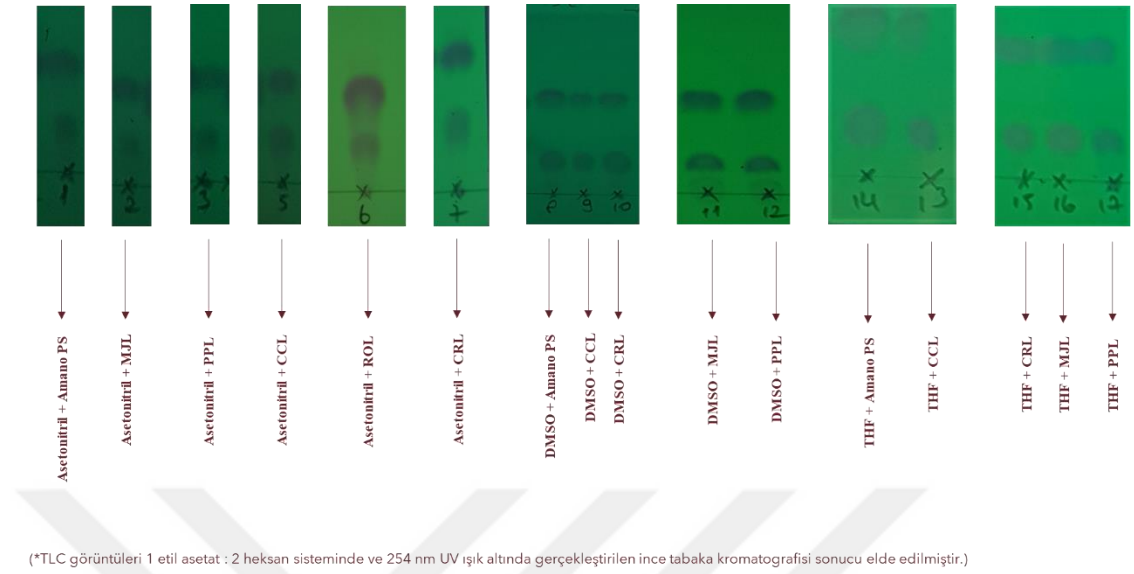
Şekil 6.20 Rasemik (**4**) numaralı bileşiğin lipaz katalizörlü biyotransformasyon reaksiyonu

Aşağıdaki şemada lipaz katalizli esterifikasyon reaksiyonlarının gerçekleştirilme aşamaları gösterilmektedir (Şekil 6.21):



Şekil 6.21 Lipaz katalizli esterifikasyon (biyotransformasyon) reaksiyonları deney aşamaları

Şekil 6.22’de gerçekleştirilen biyodönüşümlerin 254 nm UV altındaki İTK görüntüsü verilmiştir.



Şekil 6.22 Lipaz katalizli gerçekleştirilen biyotransformasyon reaksiyonlarının İTK görüntüleri

(*İTK görüntüleri 1 etil asetat: 2 heksan sisteminde ve 254 nm UV ışık altında gerçekleştirilen ince tabaka kromatografisi sonucu elde edilmiştir.)

Rasemik **(4)** numaralı bileşiğin lipaz katalizörlü biyotransformasyon reaksiyonu sonucunda enantiyosaf 1-benzil-6-metil-4-okso-4,5,6,7-tetrahidro-1H-indol-5-il asetat **(4)** ve 1-benzil-5-hidroksi-6-metil-6,7-dihidro-1H-indol-4(5H)-on **(5)** bileşikleri elde edilmiştir. Tablo 6.3’te biyotransformasyon sonucunda elde edilen bileşiklerin HPLC analizleri yapılarak hesaplanan ee değerleri verilmiştir.

1-benzil-5-hidroksi-6-metil-6,7-dihidro-1H-indol-4(5H)-on **(5)** için;

IR (CHCl₃) γ (max): 2923.64, 3351.66 cm⁻¹

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.25 (d, J: 6.8 Hz, 3H, CH₃), 2.09 (t, J = 9.9 Hz, 1H, 6-CH), 4.10-4.30 (dd, J = 7.1, 11.9 Hz, 2H, CH₂), 5.20 (s, 2H, CH₂Ph), 5.30 (d, J: 4.3 Hz, 1H, CHO), 6.50 (d, J = 3.1 Hz, 1H, H-3), 6.64 (d, J = 2.951 Hz, 1H, H-2), 7.00–7.40 (m, 5H, Ph).

Tablo 6.3 1-benzil-6-metil-4-okso-4,5,6,7-tetrahidro-1H-indol-5-il asetat (rac- **(4)**) bileşiminin lipaz katalizli biyotransformasyon reaksiyonları ve enantiyomerik fazlalık değerleri

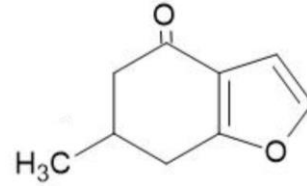
Örnek No	Enzim	Süre	Çözücü	Asetat (%ee)	Alkol (%ee)
1	Amano PS	22 sa. 20dk.	Asetonitril	%83*	%47
2	CCL	22 sa. 50 dk.	Asetonitril	%87*	%47
3	CRL	28 sa.	Asetonitril	%82*	%27
4	MJL	22 sa. 20 dk.	Asetonitril	%69*	%48
5	PPL	22 sa.	Asetonitril	%52*	%41
6	ROL	30 sa.	Asetonitril	%83*	%65
7	Amano PS	165 dk.	DMSO	%85*	%61
8	CCL	165 dk.	DMSO	%57	%87
9	CRL	165 dk.	DMSO	%72	%67
10	MJL	100 dk.	DMSO	%80	%99
11	PPL	100 dk.	DMSO	%57	%95
13	Amano PS	145 dk.	THF	%34	%99
14	CCL	145 dk.	THF	%49	%59
15	CRL	35 dk.	THF	%70	%85
16	MJL	35 dk.	THF	%70	%65
17	PPL	35 dk.	THF	%41	%99

(*Negatif seçicilik)

Günümüzde ilaç piyasasında ilaç aktif maddesi olarak yaygın bir kullanıma sahip olan indol türevleri, sahip oldukları biyolojik aktivitelerden dolayı ilgi çekmektedirler. Bu çalışmada, sahip oldukları biyolojik aktivitelerinden dolayı indol türevleri sentezlenmiştir ve sentezlenen indol türevlerinin lipaz enzimi aracılı biyotransformasyon reaksiyonları gerçekleştirilmiştir.

7.1 Benzofuran Sentezi

İndol türevlerinin sentezi için başlangıç maddesi olan (2) numaralı bileşik, ticari olarak satın alınan (1) numaralı bileşikten başlanılarak elde edilmiştir. Kloroasetaldehit aracılı (2) numaralı bileşiğin sentezi %74 verimle gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma işlemi 1 EtOAc:6 Hex sisteminde yapılmıştır. Elde edilen saf (2) numaralı bileşik petrol eteri ile kristallendirilmiştir (Şekil 7.1). Single kristal yapının oluşması sentez sonrası elde edilen (2) numaralı bileşiğin saf olarak elde edildiğın bir diğer göstergesidir.

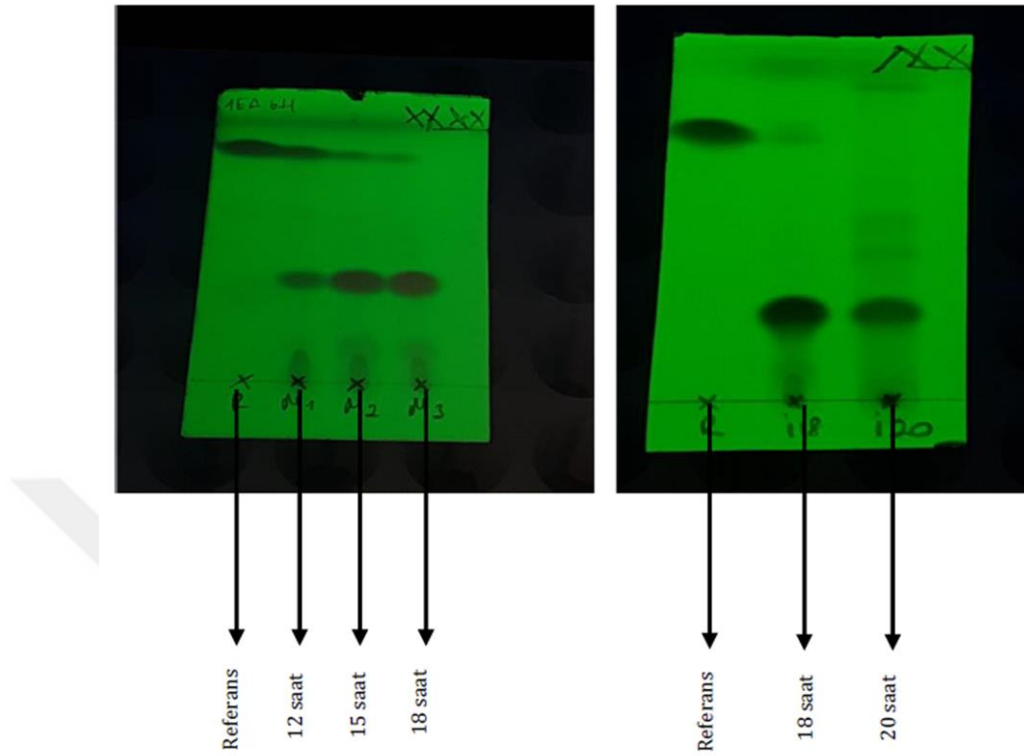


Şekil 7.1 Bileşik (2) bileşiği kristalleri

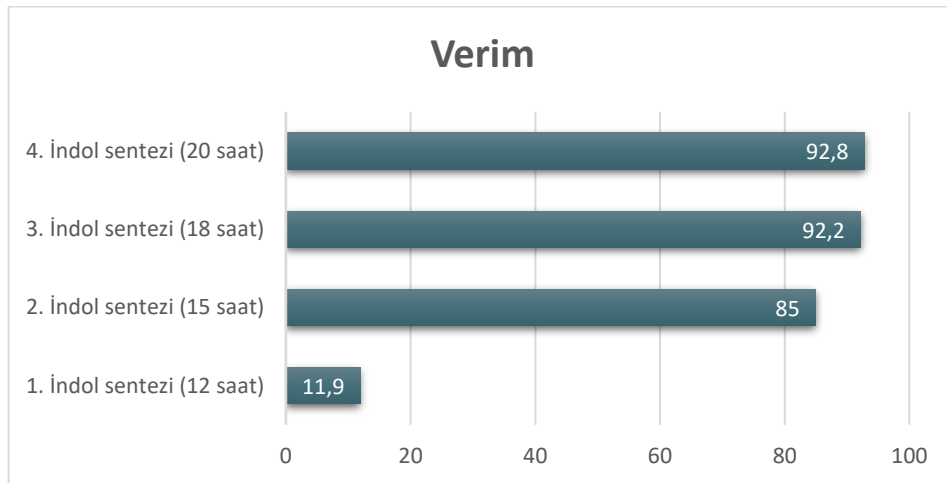
7.2 İndol Türevlerinin Sentezi

(2) numaralı bileşikten başlanılarak benzil amin katalizörlüğünde (3) numaralı bileşik sentezi gerçekleştirilmiştir. Seal tüp içerisinde ve 150 °C’de gerçekleştirilen sentez sırasıyla 12, 15, 18 ve 20 saatte gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon süresi arttıkça başlangıç maddesi olan bileşik (2)’nin bileşik (3)’e dönüşüm veriminin arttığı gözlemlenmiştir. En verimli sentezin 20 saatte gerçekleştiği tespit edilmiştir. 20 saatte gerçekleşen sentezde başlangıç maddesi olan bileşik (2)’nin tamamı bileşik (3)’e dönüşmüştür (Şekil 7.2). Yapılan süre optimizasyonunda sentez süresi arttıkça sentez veriminin de artması; süre

ve verimin doğru orantılı olduğunu ortaya koymuştur. Şekil 7.3'te (3) numaralı bileşiğin sentez verim grafiği verilmiştir.

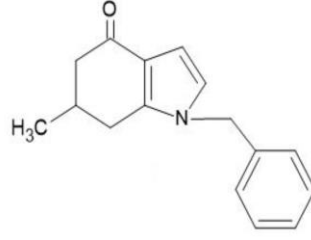


Şekil 7.2 (3) numaralı bileşiği sentezinin süre optimizasyonu İTK görüntüsü



Şekil 7.3 İndol sentezleri ve verimleri

Saflaştırma işlemleri kolon kromatografisinde 1 EOAc:6 Hex sisteminde gerçekleştirilmiştir ve saf olarak bileşik (3) elde edilmiştir. 1-benzil-6,7-dihidro-6-metil-1H-indol-4(5H)-on (3) bileşiği literatürde ilk defa sa olarak sentezlenmiştir (Şekil 7.4).



Şekil 7.4 Saf olarak elde edilen (3) numaralı bileşik

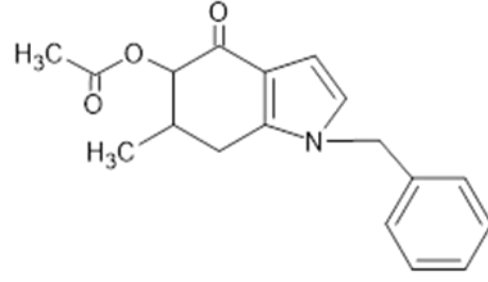
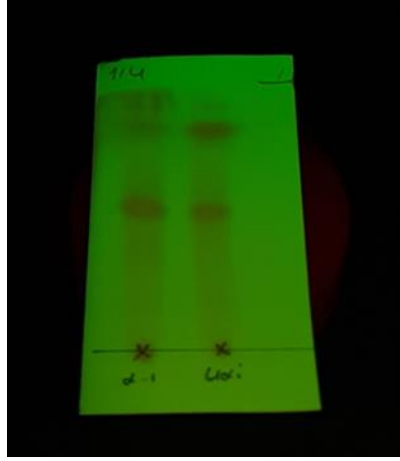
7.3 KMnO₄ Katalizörlüğünde İndol Türevlerinin Asetoksilasyonu

(3) numaralı bileşiğin asetoksilasyonu, Dean – Stark Trap düzeneğinde potasyum permanganate (KMnO₄) katalizörlüğünde ve 10 benzen: 1 asetik asitten oluşan reaksiyon ortamında gerçekleştirilmiştir (Şekil 7.5).



Şekil 7.5 Dean – Stark Trap düzeneği

Öncelikle potasyum permanganatın yaklaşık 2 saat reflux edilmiştir. Reflux sağlandığında (3) numaralı bileşik reaksiyon ortamına eklenmiştir. Sentez süresinin optimizasyonu yapılmış ve (4) numaralı bileşiğin sentezinin 42 saatte gerçekleştiği tespit edilmiştir. Şekil 7.6’de 42. saat sonunda oluşan (4) numaralı bileşiğin 254 nm UV ışıktaki İTK görüntüsü verilmiştir.



Şekil 7.6 42. saat sonunda (4) numaralı bileşiğin 254 nm UV ışıktaki İTK görüntüsü

Saflaştırma işlemleri kolon kromatografisinde 1 EtOAc:15 Hex sisteminde gerçekleştirilmiştir ve saf 1-benzil-6-metil-4-okso-4,5,6,7-tetrahidro-1H-indol-5-il asetat (4) bileşiği elde edilmiştir. Kolon sonrası sentez verimi %61'dir. Kolon kromatografisi ile saflaştırma işlemi sonrası (4) numaralı bileşik saf olarak elde edilememiştir. Bu nedenle bir diğer saflaştırma yöntemi olan preparatif İTK yöntemi kullanılmıştır ve 1 EtOAc:6 Hex sisteminde ikinci bir saflaştırma gerçekleştirilmiştir. (4) numaralı bileşik literatürde ilk defa sentezlenmiştir ve saflaştırılmıştır.

7.4 Lipaz Katalizli Esterifikasyon Reaksiyonları

Bu çalışmada, ilaç endüstrisinde önemli hedefler olan α -asetoksi-dihidroindol ve α -hidroksi-dihidroindol türevlerinin kinetik çözünürlük yoluyla ilk etkili sentezi gerçekleştirilmiştir. Literatürde ilk defa sentezlenen 1-benzil-6-metil-4-okso-4,5,6,7-tetrahidro-1H-indol-5-il asetat (4) bileşiğinin lipaz enzimleri katalizörlüğünde biyotransformasyon reaksiyonları yapılmıştır. Biyotransformasyon reaksiyonları sonucunda 1-benzil-6-metil-4-okso-4,5,6,7-tetrahidro-1H-indol-5-il asetat (4) ve 1-benzil-5-hidroksi-6-metil-6,7-dihidro-1H-indol-4(5H)-on (5) bileşikleri enantiyosaf olarak elde edilmiştir. Biyotransformasyon reaksiyonlarında kullanılan lipaz enzimleri CCL (*Candida cylindracea* Lipaz), CRL (*Candida rugosa* Lipaz), PPL (Porcine pancreas Lipaz), ROL (*Rhizopus oryzae* Lipaz), Amano Lipaz PS (*Burkholderia cepacia*) ve MJL (*Mucor javanicus* lipaz) lipazdır. 6 çeşit lipaz enzimi ile gerçekleştirilen biyotransformasyon reaksiyonları asetonitril, DMSO ve THF çözücü sistemlerinde pH 7 tamponunda gerçekleştirilmiştir. 3 farklı çözücü sisteminde farklı lipaz enzimleri kullanılarak gerçekleştirilen biyotransformasyon reaksiyonlarının tümünde dönüşüm olduğu tespit edilmiştir.

Enantiyomerik fazlalık değerleri belirlenmesi HPLC ile kiral kolonlar kullanılarak hesaplanmıştır. Öncelikle OD-H kiral kolonu kullanılmıştır fakat enantiyomerlerin ayrımı sağlanamamıştır. Bu nedenle bir diğer kiral kolon olan OJ-H kolonu kullanılmıştır ve bu kolon ile ayırım sağlanmış olup enantiyomerik fazlalık değerleri hesaplanmıştır.

Bu çalışmada **(4)** numaralı bileşiğin lipaz katalizli esterleştirme reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Belirli solvent sistemlerinde spesifik lipazlar ile esterifikasyon reaksiyonu yürütüldüğünde genel olarak yüksek enantiyomerik fazlalıklar ile sonuçlar elde edilmiştir. En yüksek ee değeri %87 olup asetonyril çözücüsünde CCL enzimi katalizörlüğünde gerçekleşmiştir. En düşük ee değeri ise %34 olup THF çözücüsünde Amano PS lipaz katalizörlüğünde gerçekleşmiştir.

(5) numaralı bileşiğin lipaz katalizli esterleştirme reaksiyonlarında gerçekleştirilmiştir. Belirli solvent sistemlerinde spesifik lipazlar ile esterifikasyon reaksiyonu yürütüldüğünde genel olarak yüksek enantiyomerik fazlalıklar ile sonuçlar elde edilmiştir. En yüksek ee değeri %99 olup DMSO çözücüsünde MJL katalizörlüğünde; THF çözücüsünde Amano PS lipaz ve PPL katalizörlüğünde gerçekleşmiştir. En düşük ee değeri ise %27 olup asetonyril çözücüsünde MJL katalizörlüğünde gerçekleşmiştir.

Ayrıca **(4)** numaralı bileşik için asetonyril çözücüsünde gerçekleştirilen tüm biyotransformasyon reaksiyonlarında ve DMSO çözücüsünde Amano PS lipaz ile gerçekleştirilen biyotransformasyon reaksiyonunda negative seçicilik tespit edilmiştir.

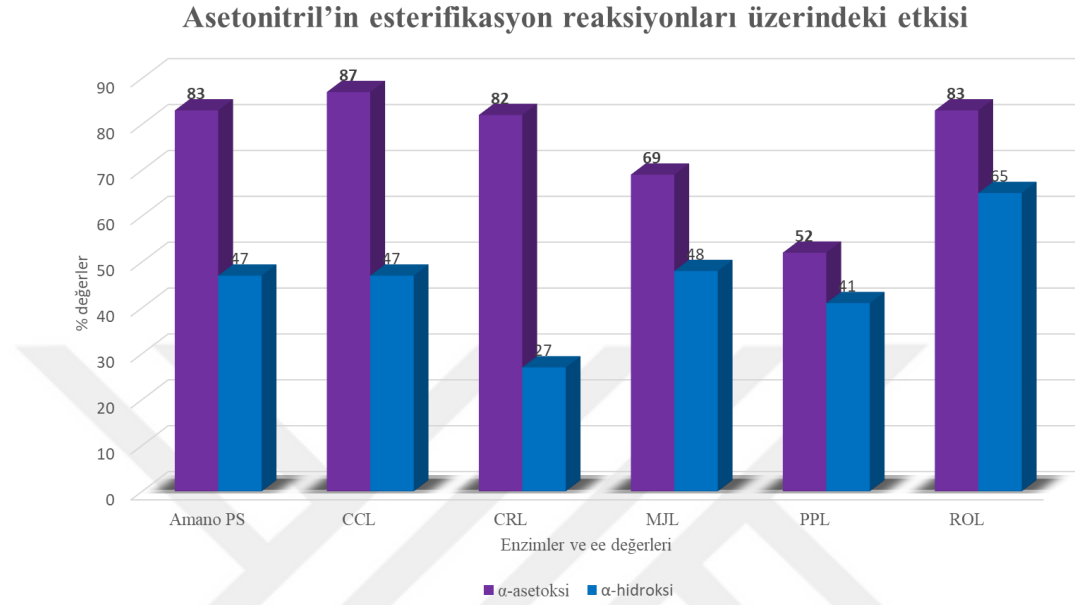
En uzun süreli biyodönüşüm asetonyril çözücüsünde ROL lipaz (% 83* e.e **(4)**; %63 ee **(5)**) ile 30 saatte; en kısa süreli biyodönüşüm ise THF çözücüsünde MJL lipaz (%70 e.e **(4)**; % e.e **(5)**); CRL lipaz (%70 e.e **(4)**; %85 e.e **(5)**) ve CCL lipaz (%41 e.e **(4)**; %59 e.e **(5)**) ile 35 dakikada gerçekleşmiştir.

Enantiyomerik fazlalık değerinin farklı çözücülerle gerçekleştirilen biyotransformasyon reaksiyonlarında farklı olması reaksiyon ortamını oluşturan çözücülerin enzim aktivitesini etkilediğini ortaya koymaktadır. Yani farklı çözücülerin kullanımı ile enantiyomerik fazlalık değeri iyileştirilebilir ve geliştirilebilir. Ayrıca optikçe saf bileşiklerin eldesinin susuz ortamlarda gerçekleştirilmesinin daha etkin bir yöntem olduğu ve kullanılan solventlerin enzimin enantiyoselektivitesini etkilediği yapılan çalışmalarca kanıtlanmıştır.

Aynı enzim ile farklı çözücülerde gerçekleştirilen biyotransformasyon reaksiyonlarında farklı enantiyomerik fazlalık değerlerinin elde edilmesi de solventlerin enzim yapısında

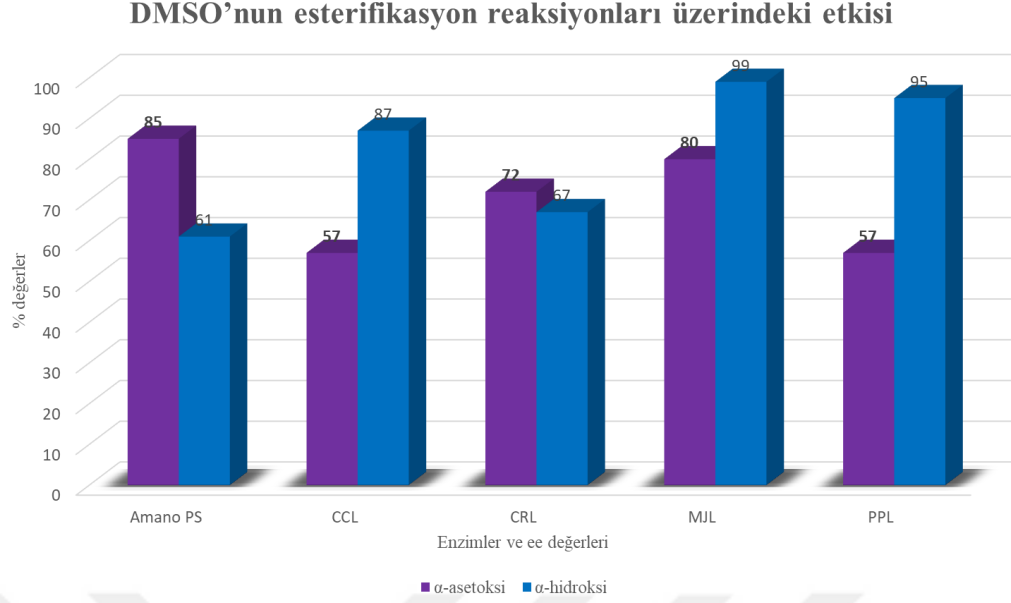
değişikliklere neden olması ile ilgilidir. Solventler enzim ve substratın birbirini tanıması üzerinde de etkilidirler.

Solventlerin enantiyomerik fazlalık üzerindeki etkisinin daha iyi anlaşılabilmesi için aşağıda verilen grafikler oluşturulmuştur.



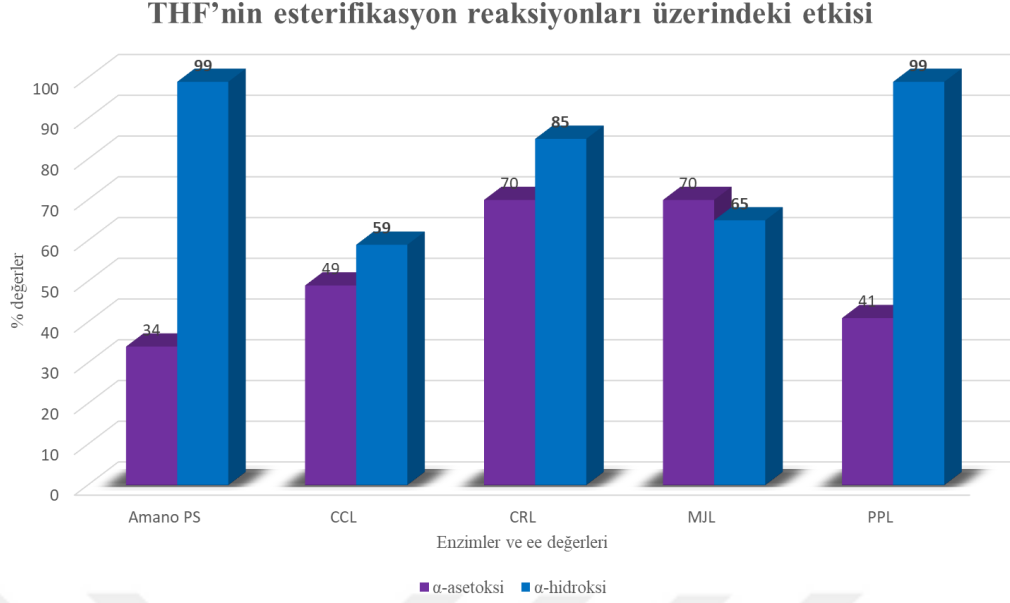
Şekil 7.7 Asetonitril'in esterifikasyon reaksiyonları üzerindeki etkisi

Asetonitril ile gerçekleştirilen esterifikasyon reaksiyonları sonucunda en yüksek enantiyomerik fazlalık değeri **(4)** numaralı bileşik için %87 olup CCL lipaz katalizörlüğünde; **(5)** numaralı bileşik için %65 olup ROL katalizörlüğünde gerçekleşmiştir. En düşük enantiyomerik fazlalık değeri **(4)** numaralı bileşik için %52 olup PPL lipaz katalizörlüğünde; **(5)** numaralı bileşik için %27 olup CRL katalizörlüğünde gerçekleşmiştir. Ayrıca asetonitril ile gerçekleştirilen tüm biyotransformasyon reaksiyonlarında negatif seçicilik gözlemlenmiştir. Bu durum solventlerin enzim-substrat ilişkisi üzerindeki etkisini ortaya koymaktadır (Şekil 7.7).



Şekil 7.8 DMSO'nun esterifikasyon reaksiyonları üzerindeki etkisi

DMSO ile gerçekleştirilen esterifikasyon reaksiyonları sonucunda en yüksek enantiyomerik fazlalık değeri **(4)** numaralı bileşik için %85 olup Amano PS lipaz katalizörlüğünde **(5)** numaralı bileşik için %99 olup MJL katalizörlüğünde gerçekleşmiştir. En düşük enantiyomerik fazlalık değeri **(4)** numaralı bileşik için %57 olup PPL lipaz ve CCL lipaz katalizörlüğünde; **(5)** numaralı bileşik için %61 olup Amano PS katalizörlüğünde gerçekleşmiştir (Şekil 7.8). Ayrıca DMSO çözücüsünde Amano PS lipaz ile gerçekleştirilen biyotransformasyon reaksiyonunda negative seçicilik tespit edilmiştir. DMSO ile gerçekleştirilen biyotransformasyon reaksiyonları içinde sadece Amano PS lipaz katalizörlüğündeki reaksiyonda negatif seçicilik gözlemlenmesi çözücünün enzim üzerindeki etkisini göstermektedir. Solventlerin enzimlerin aktivitesini etkilediği bilinmektedir.



Şekil 7.9 THF'in esterifikasyon reaksiyonları üzerindeki etkisi

Asetonitril ile gerçekleştirilen esterifikasyon reaksiyonları sonucunda en yüksek enantiyomerik fazlalık değeri **(4)** numaralı bileşik için %70 olup CRL ve MJL katalizörlüğünde; **(5)** numaralı bileşik için %99 olup Amano PS ve PPL katalizörlüğünde gerçekleşmiştir. En düşük enantiyomerik fazlalık değeri **(4)** numaralı bileşik için %34 olup Amano PS lipaz katalizörlüğünde; **(5)** numaralı bileşik için %59 olup CCL katalizörlüğünde gerçekleşmiştir (Şekil 7.9).

3 farklı çözücü ile yapılan esterifikasyon reaksiyonları sonucunda elde edilen veriler çözücülerin enzim aktivitesi ve enzim-substrat ilişkisi üzerindeki etkisini göstermektedir. Kullanılan çözücülerden biri olan asetonitril ile farklı lipaz enzimleri katalizörlüğünde gerçekleştirilen esterifikasyon reaksiyonlarının sonuçları incelendiğinde **(4)** numaralı bileşiğin enantiyomerik fazlalık değerlerinin **(5)** numaralı bileşiğin enantiyomerik değerlerinden daha yüksek olduğu görülmektedir.

THF ile farklı lipaz enzimleri katalizörlüğünde gerçekleştirilen esterifikasyon reaksiyonlarının sonuçları incelendiğinde **(5)** numaralı bileşiğin enantiyomerik fazlalık değerlerinin **(4)** numaralı bileşiğin enantiyomerik değerlerinden daha yüksek olduğu görülmektedir.

DMSO ile farklı lipaz enzimleri katalizörlüğünde gerçekleştirilen esterifikasyon reaksiyonlarının sonuçları incelendiğinde ise hem **(4)** numaralı bileşik için hem de **(5)** numaralı bileşik için genel olarak yüksek enantiyomerik fazlalık değerleri görülmektedir.

Ayrıca asetonitril çözücüsünde farklı enzimlerle gerçekleştirilen tüm esterifikasyon reaksiyonlarında ve DMSO çözücüsünde Amano PS lipaz ile gerçekleştirilen esterifikasyon reaksiyonunda **(4)** numaralı bileşik için negatif seçicilik mevcutken; DMSO çözücüsünde diğer lipazlar katalizörlüğünde gerçekleştirilen esterifikasyon reaksiyonlarında ve THF çözücüsünde gerçekleştirilen esterifikasyon reaksiyonlarında negatif seçicilik söz konusu değildir. Negatif seçicilik katalizör olarak kullanılan enzimin her iki enantiyomer için de seçici olması ve böylelikle hem (S)- hem de (R)- enantiyomerlerinin elde edilmesi anlamına gelmektedir. Yani **(4)** numaralı bileşik için negatif seçicilik ile gerçekleşen esterifikasyon reaksiyonlarında hem (S)- hem de (R)- enantiyomerleri asetat olarak elde edilmiştir.

Yapılan tüm çalışmalar sonucu elde edilen bileşiklerin analizlerine devam edilecektir. Biyolojik aktivite testleri yapılarak literatüre katkı sağlanacaktır.

7.5 Sonuç

Bu çalışma, enzimatik kinetik rezolüsyon yoluyla ilaç endüstrisinde önemli hedefler olan α -asetoksi-indol **(4)** ve α -hidroksi-indol **(5)** türevlerinin literatürde ilk sentezini sunmaktadır.

Çalışmamızda sentezlenen optikçe aktif, indol bileşiklerinin enantiomerik olarak saflaştırılması amacıyla lipaz enzimlerinden faydalanılmıştır.

Bu çalışmada, gerçekleştirilen esterleştirme reaksiyonu çok yüksek seçicilik göstermiştir. Belirli solvent sistemlerinde spesifik lipazlar ile esterifikasyon reaksiyonu yürütüldüğünde genel olarak iyi sonuçlar elde edilmiştir.

Yapılan çalışmada, 1-benzil-6-metil-4-okso-4,5,6,7-tetrahidro-1H-indol-5-il asetat **(4)** bileşiğinin enantiyoselektif sentezi %87 enantiyomerik fazlalık ile elde edilmiştir. 1-benzil-5-hidroksi-6-metil-6,7-dihidro-1H-indol-4(5H)-on **(5)** bileşiğinin enantiyoselektif sentezi, lipaz katalizli esterleştirme reaksiyonlarında yüksek enantiyomerik fazlalıklar (%99) ile gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada biyotransformasyon basamağında kullanılan esterleştirme reaksiyonu sonuç ürün bileşimi açısından tamamlayıcı olarak kabul edilebilir.

Bu yöntem, farmakolojik olarak ilginç bileşikler için önemli öncüler olan asetoksi-4-okso-tetrahidro indol türevlerinin sentezine basit ve yeni bir yöntem sağlamaktadır. Yeni

ilaçların geliştirilmesi için bu çalışmada sentezlenen bileşikler umut vaat eden hedeflerdir.

Teşekkür

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde mali desteği sağlayan Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'ne (BAP-FYL-2020-3905) teşekkür ederiz.



- [1] S. R. Wedge, J. Kendrew, L. F. Hennequin, P. J. Valentine, S. T. Barry, S. R. Brave, N. R. Smith, N. H. James, M. Dukes, J. O. Curwen, R. Chester, J. A. Jackson, S. J. Boffey, L. L. Kilburn, S. Barnett, G. H. Richmond, P. F. Wadsworth, M. Walker, A. L. Bigley, S. T. Taylor, L. Cooper, S. Beck, Jürgensmeier, Juliane M, J. M. Jürgensmeier ve D. J. Ogilvie, «AZD2171: A Highly Potent, Orally Bioavailable, Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 Tyrosine Kinase Inhibitor for the Treatment of Cancer,» *American Association for Cancer Research*, pp. 4389-4400, 2005.
- [2] D. García Giménez, E. García Prado, T. Sáenz Rodríguez, A. Fernández Arche ve R. De La Puerta, «Cytotoxic effect of the pentacyclic oxindole alkaloid mitraphylline isolated from *uncaria tomentosa* bark on human ewing's sarcoma and breast cancer cell lines,» *Planta Medica*, pp. 133-136, 2010.
- [3] R. Frederickson, I. Slater, W. Dusenberry, C. Hewes, G. T. Jones ve R. Moore, «A comparison of thalidomide and pentobarbital - new methods for identifying novel hypnotic drugs,» *The Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, pp. 240-251, 1977.
- [4] D. Cairns, *Essentials of Pharmaceutical Chemistry*, Pharmaceutical Press, 2008.
- [5] D. Nasipuri, *Stereochemistry of Organic Compounds Principles and Applications*, New Academic Science Limited, 2013.
- [6] M. Süleymanoğlu Ersez, *Biyoteknolojik Yöntemlerle Kiral 4-Okso-Tetrahidroindol Türevlerinin Sentezleri*, İstanbul: Yıldız Teknik Üniversitesi, 2011.
- [7] D. G. Morris, *Stereochemistry*, Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2001.
- [8] R. M. Nejem, *Enantioselective Sensors And bSensors For Clinical Analysis*, Pretoria: University of Pretoria, 2004.
- [9] A. Soyer, *Lipaz Enzimi Biyokatalizörlüğünde Kinetik Rezolüsyon İle Enantiyomerik Saflıkta 1-Fenil-1-Propanolün Üretimi*, Ankara: Ankara Üniversitesi, 2007.
- [10] A. Soyer Malyemez, *Rasemik-2-Pentanolün Lipaz Katalizli Kinetik Rezolüsyonu*, Ankara: Ankara Üniversitesi, 2015.
- [11] L. Craine, D. Hart, H. Hart ve C. Hadad, *Organic Chemistry: A Short Course* 12th Edition, Brooks Cole, 2006.
- [12] J. Škvára, I. Nezbeda ve P. Izák, «Molecular dynamics study of racemic mixtures. II. Temperature dependence of the separation of ibuprofen racemic mixture with β -cyclodextrin in methanol solvent,» *Journal of Molecular Liquids*, 2020.

- [13] N. İşbakan, *Lipaz Enzimi Biyokatalizörlüğünde Enantiyomerik Saflıkta 1-Fenil-1-Propanolün Transesterleşme Tepkimesiyle Kinetik Rezolüsyonu*, Ankara: Ankara Üniversitesi, 2006.
- [14] R. A. Sheldon, *Chirotechnology: Industrial Synthesis of Optically Active Compounds*, Marcel Dekker, 1993.
- [15] A. Fortuna, G. Alves ve A. Falcão, «Chiral chromatographic resolution of antiepileptic drugs and their metabolites: A challenge from the optimization to the application,» *Biomedical Chromatography*, pp. 27-58, 2014.
- [16] X.-F. Wang, Y.-K. Sun, K. Sun, Y.-Z. Ding ve R.-J. Yuan, «Separation and Pharmacology of Chiral Compounds in Traditional Chinese Medicine,» *Analytical Letters*, pp. 33-49, 2017.
- [17] N. Casado, J. Valimaña-Traverso, M. Á. García ve M. L. Marina, «Enantiomeric Determination of Drugs in Pharmaceutical Formulations and Biological Samples by Electrokinetic Chromatography,» *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, pp. 1-31, 2019.
- [18] E. Garcí'a-Martí'n, C. Martí'nez, B. Tabare's, J. Fri'as ve J. A. G. Agu'ndez, «Interindividual variability in ibuprofen pharmacokinetics is related to interaction of cytochrome P450 2C8 and 2C9 amino acid polymorphisms,» *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, pp. 119-127, 2004.
- [19] L. A. Nguyen, H. He ve C. Pham-Huy, «Chiral Drugs: An Overview Lien,» *International Journal of Biomedical Science*, pp. 85-100, 2006.
- [20] K. Avcı, *Mikrobiyal Biyotransformasyon İle 4,5,6,7-Tetrahidro-6-Fenil-4-Oksobenzofuranon Türevlerinin Sentezi*, İstanbul: Yıldız Teknik Üniversitesi, 2019.
- [21] J. McConathy ve M. J. Owens, «Stereochemistry in Drug Action,» *The Primary Care Companion to The Journal of Clinical Psychiatry*, pp. 70-73, 2003.
- [22] G. Blay, V. Hernández-Olmos ve J. R. Pedro, «Synthesis of (S)-(+)-sotalol and (R)-(-)-isoproterenol via a catalytic enantioselective Henry reaction,» *Tetrahedron Asymmetry*, pp. 578-581, 2010.
- [23] H. Y. Aboul-Enein ve I. Ali, *Chiral separations by liquid chromatography and related technologies*, Marcel Dekker Inc., 2003.
- [24] R. Songür, *Rasemik Benzoin Asetattan Mikrobiyal Hidroliz Tepkimesi İle Enantiyomerik Saflıkta Benzoin Üretimi*, Ankara: Ankara Üniversitesi, 2009.
- [25] M. A. Peltoniemi, N. M. Hagelberg, K. T. Olkkola ve T. I. Saari, «Ketamine : A Review of Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in Anesthesia and Pain Therapy,» *Clinical Pharmacokinetics*, pp. 1059-1077, 2016.

- [26] A. Bertaso, . G. Musile, . R. Gottardo, C. Seri ve F. Tagliaro, «Chiral analysis of methorphan in opiate-overdose related deaths by using capillary electrophoresis,» *Journal of Chromatography B*, pp. 130-135, 2015.
- [27] P. P. T, Shinesudev, M. Kurian, M. P, M. PS, M. Hiscam C ve S. Shrikumar, «Pharmaceutical Review And Its Importance Of Chiral Chromatography,» *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry*, pp. 476-484, 2016.
- [28] D. M. Carvalho, G. Campos de Oliveira Filgueira, M. P. Marques, J. A. Caris, G. Duarte, R. Carvalho Cavalli, V. L. Lanchote ve E. C. Dantas Moisés, «Analysis of Fluoxetine and Norfluoxetine Enantiomers in Human Plasma and Amniotic Fluid by LC-MS/MS and Its Application to Clinical Pharmacokinetics in Pregnant Women,» *Journal of Research Analytica*, 2017.
- [29] A. Ghanem ve H. Y. Aboul-Enein, «Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents,» *Tetrahedron: Asymmetry* 15, 2004.
- [30] K. M. Rentsch, «The importance of stereoselective determination of drugs in the clinical laboratory,» *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, pp. 1-9, 2002.
- [31] X. Li ve M. Cai, «The effect of L-bupivacaine on BIS levels in the maintenance doses of propofol and fentanyl during general anesthesia in Chinese people,» *Drug Research*, pp. 675-679, 2014.
- [32] D. A. Scott, B.-M. Emanuelsson, P. H. Mooney, R. J. Cook ve C. Junestrand, «Pharmacokinetics and efficacy of long-term epidural ropivacaine infusion for postoperative analgesia,» *Anesthesia and Analgesia*, pp. 1322-1330, 1997.
- [33] D. A. Sidebotham ve S. A. Schug, «Stereochemistry in anaesthesia,» *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, pp. 126-130, 1997.
- [34] B. T. Veering, A. G. Burm, H.-M. Feyen, W. Olieman , J. H. Souverijn ve J. W. Van Kleef, «Pharmacokinetics of bupivacaine during postoperative epidural infusion: Enantioselectivity and role of protein binding,» *Anesthesiology*, pp. 1062-1069, 2002.
- [35] S. J. Khan, L. Wang, N. H. Hashim ve J. A. Mcdonald, «Distinct Enantiomeric Signals of Ibuprofen and Naproxen in Treated Wastewater and Sewer Overflow,» *Chirality*, pp. 739-746, 2014.
- [36] D. M. Burley ve W. Lenz, «Thalidomide and Congenital Abnormalities,» *The Lancet*, pp. 271-272, 1962.
- [37] W. Lenz, «A short history of thalidomide embryopathy,» *Teratology*, pp. 203-215, 1988.

- [38] W. G. McBride, «Thalidomide and Congenital Abnormalities,» *The Lancet*, pp. 291-293, 1961.
- [39] W. G. McBride, «Thalidomide embryopathy,» *Teratology*, pp. 79-82, 1977.
- [40] N. Vargesson, «Thalidomide-Induced Teratogenesis: History and Mechanisms,» *Birth Defects Research (Part C)*, pp. 140-156, 2015.
- [41] M. T. Miller ve K. Strömmland, «Teratogen Update: Thalidomide: A Review, With a Focus on Ocular Findings and New Potential Uses,» *TERATOLOGY*, pp. 306-321, 1999.
- [42] D. Spouge ve P. A. Baird, «Imperforate Anus in 700,000 Consecutive Liveborn Infants,» *American Journal of Medical Genetics Supplement*, pp. 151-161, 1986.
- [43] P. Lees, R. P. Hunter, P. T. Reeves ve P. L. Toutain , «Pharmacokinetics and pharmacodynamics of stereoisomeric drugs with particular reference to bioequivalence determination,» *Journal Of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, pp. 17-30, 2012.
- [44] A. R. Ribeiro, A. S. Maia, Q. B. Cass ve M. E. Tiritan, «Enantioseparation of chiral pharmaceuticals in biomedical and environmental analyses by liquid chromatography: An overview,» *Journal of Chromatography B*, p. 14, 2014.
- [45] A. Ghanem ve H. Y. Aboul- Enein, «Application of Lipases in Kinetic Resolution of Racemates,» *Chirality*, pp. 1-15, 2005.
- [46] G. Kesslin ve K. W. Kelly, «Resolution Of Racemic Mandelic Acid,» *United States Patent*, 1982.
- [47] I. Alfonso, C. Astorga, F. Rebolledo ve V. Gotor, «Sequential biocatalytic resolution of (f)-trans-cyclohexane-1,2-diamine. Chemoenzymatic synthesis of an optically active polyamine,» *Chemical Communications*, pp. 2471-2472, 1996.
- [48] J. M. Williams, R. J. Parker ve C. Neri, «Enzymatic Kinetic Resolution,» %1 içinde *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: A Comprehensive Handbook, Second Edition*, Wiley-VCH Verlag GmbH, 2002, pp. 287-312.
- [49] E. A. Yücel, «Synthesis Of Tempo Containing Chiral Polymers For Kinetic Resolution Of Secondary Alcohols,» *Yüksek Lisans Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı*, Ocak 2020.
- [50] S. Mane, «Racemic drug resolution: a comprehensive guide,» *The Royal Society of Chemistry*, pp. 7567-7586, 2016.
- [51] G. Hancu ve A. Modroiu, «Chiral Switch: Between Therapeutical Benefit and Marketing Strategy,» *Pharmaceuticals*, 2022.

- [52] S. Sun ve J. Fub, «Methyl-containing pharmaceuticals: Methylation in drug design,» *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2018.
- [53] H. Schçnherr ve T. Cernak, *Angewandte Chemie International Edition*, 2013.
- [54] P. Pevarello, A. Bonsignori, P. Dostert, F. Heidempergher, V. Pinciroli, M. Colombo, R. A. McArthur, P. Salvati, C. Post, R. G. Fariello ve M. Varasi, «Synthesis and Anticonvulsant Activity of a New Class of 2-[(Arylalkyl)amino]alkanamide Derivatives,» *Journal of Medicinal Chemistry*, 1988.
- [55] F. Leonetti, C. Capaldi, L. Pisani, O. Nicolotti, G. Muncipinto, A. Stefanachi, S. Cellamare, C. Caccia ve A. Carotti, «Solid-Phase Synthesis and Insights into Structure-Activity Relationships of Sefnamide Analogues as Potent and Selective Inhibitors of Type B Monoamine Oxidase,» *Journal of Medicinal Chemistry*, 2007.
- [56] M. Zervos ve F. Meunier , «Fluconazole (Diflucan): a review,» *International Journal of Antimicrobial Agents*, 1993.
- [57] N. C. Karyotakis ve E. J. Anaissie, «The new antifungal azoles: fluconazole and itraconazole,» *Current Opinion in Infectious Diseases*, 1994.
- [58] J. Zimmermann , E. Buchdunger, H. Mett, T. Meyer ve N. B. Lydon, «Potent and selective inhibitors of the Abl-kinase: phenylamino-pyrimidine (PAP) derivatives,» *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1997.
- [59] B. Nagar , W. G. Bornmann, P. Pellicena, T. Schindler, D. R. Veach, W. T. Miller, B. Clarkson ve J. Kuriyan, «Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571),» *Cancer Research*, 2002.
- [60] W. F. Hoffman, A. W. Albert, P. S. Anderson, J. S. Chen, R. L. Smith ve A. K. Willard, «3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors. 4. Side-chain ester derivatives of mevinnolin,» *Journal of Medicinal Chemistry*, 1986.
- [61] T. D. Penning, G. D. Zhu, V. B. Gandhi, J. Gong, X. Liu, Y. Shi, V. Klinghofer, E. F. Johnson, C. K. Donawho, D. J. Frost, V. Bontcheva-Diaz, J. J. Bouska, D. J. Osterling, A. M. Olson, K. C. Marsh, Y. Luo ve V. L. Giranda, «Discovery of the Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor 2-[(R)-2-methylpyrrolidin-2-yl]-1H-benzimidazole-4-carboxamide (ABT-888) for the treatment of cancer,» *Journal of Medicinal Chemistry*, 2009.
- [62] R. A. Copeland, *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, Second Edition, A JOHN WILEY & SONS, INC., PUBLICATION New, 2004 .

- [63] T. Palmer ve P. L. Bonner, Enzymes: Biochemistry, Biotechnology, Clinical Chemistry: Second Edition, WOODHEAD PUBLISHING, 2007.
- [64] E. E. Keha ve İ. Küfrevioğlu, Biyokimya, İstanbul, 2009.
- [65] B. Pekin, Biyokimya Mühendisliği(Biyoteknoloji), 2. kitap, İzmir : Ege Üniversitesi Kimya Fakültesi Yayınları, 1983.
- [66] Ö. Aybastıer, «Bitkisel Atık Yağların Karakterizasyonu Ve Biyodizel Üretiminde Değerlendirilmesi,» *Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı* , 2010.
- [67] D. L. Purich, «Chapter 7: Factors Influencing Enzyme Activity,» %1 içinde *Enzyme Kinetics: Catalysis and Control : A Reference of Theory and Best-Practice Methods*, United States, Elsevier Science Publishing Co Inc, 2010, pp. 379-484.
- [68] S. Liu, «Chapter 7: Enzymes,» %1 içinde *Bioprocess Engineering: Kinetics, Sustainability, and Reactor Design*, Elsevier , 2020, pp. 231-290.
- [69] S. Güner, Biyokimya I., Trabzon: Karadeniz Teknik Üniversitesi Kitap Satış Bürosu, 2007.
- [70] G. Colombo, G. Ottolina ve G. Carrea, «Modelling of Enzyme Properties in Organic Solvents,» %1 içinde *Biocatalysis*, Springer, Vienna, 2000, pp. 1-21.
- [71] T. Ke, R. C. Wescott ve M. A. Klibanov, «Prediction of the Solvent Dependence of Enzymatic Prochiral Selectivity by Means of Structure-Based Thermodynamic Calculations,» *American Chemical Society*, pp. 3336-3374, 1996.
- [72] M. Chaturvedi, M. Singh, C. R. Man ve S. Pandey, «Lipase Production from *Bacillus subtilis* MTCC 6808 by Solid State Fermentation Using Ground Nut Oil Cakes as Substrate,» *Research Journal of Mikrobiology*, pp. 725-730, 2010.
- [73] A. Telefoncu, Enzimoloji, Aydın : Tübitak Yayınları, 1997.
- [74] O. Barbosa, . C. Ortiz, . Á. Berenguer-Murcia, R. Torres, R. C. Rodrigues ve R. Fernandez-Lafuente, «Glutaraldehyde in bio-catalysts design: useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization,» *RSC Advances*, pp. 1-62, 2013.
- [75] S. Hermanová, M. Zarevúcká, D. Bousa, M. Mikulics ve Z. Sofer, «Lipase enzymes on graphene oxide support for high-efficiency biocatalysis,» *Applied Materials Today*, pp. 200-208, 2016.
- [76] D. G. Filho, A. G. Silva ve C. Z. Guidini, «Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications,» *Applied Microbiology and Biotechnology*, pp. 7399-7423, 2019.

- [77] B. Öztürk, «Lipaz Enzimi: Yapısal Özellikleri ve Uygulama Alanları,» *Gıda Mühendisliği Dergisi*, pp. 20-23, 2002.
- [78] M. Muniandy, O. Lasekan, . H. M. Ghazali ve . M. B. A. Rahman, «Lipase - Catalyzed Formation Of Pentyl Nonanoate Using Screened Immobilized Lipase From *Rhizomucor meihei*,» *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, pp. 1089-1097, 2019.
- [79] N. Sarmah, D. Revathi, G. Sheelu, K. Y. Rani, S. Sridhar, V. Mehtab ve C. Sumana, «Recent Advances on Sources and Industrial Applications of Lipases,» *American Institute of Chemical Engineers*, pp. 5-28, 2018.
- [80] P. Borza, F. Peter ve C. Paul, «Improved Enantioselectivity of *Candida antarctica* A Lipase Through Sol-Gel Entrapment,» *Chem. Bull. "POLITEHNICA" Univ*, pp. 49-54, 2015.
- [81] A. I. Brígida, P. F. Amaral, M. A. Coelho ve L. R. Gonçalves , «Lipase from *Yarrowia lipolytica*: Production, characterization and application as an industrial biocatalyst,» *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, pp. 148-158, 2014.
- [82] M. Kapoor ve M. N. Gupta, «Lipase promiscuity and its biochemical application,» *Process Biochemistry*, pp. 555-569, 2012.
- [83] S. Hanamura, K. Hanaya, M. Shoji ve T. Sugai, «Synthesis of acacetin and resveratrol 3,5-di-O--glucopyranoside using lipase-catalyzed regioselective deacetylation of polyphenol glycoside peracetates as the key step,» *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, pp. 19-26, 2016.
- [84] V. Kumar, F. Jahan, . R. V. Mahajan ve R. . K. Saxena, «Efficient regioselective acylation of quercetin using *Rhizopus oryzae* lipase and its potential as antioxidant,» *Bioresource Technology*, pp. 1246-1248, 2016.
- [85] C. W. Rivero ve J. M. Palomo, «Covalent Immobilization of *Candida rugosa* Lipase at Alkaline pH and Their Application in the Regioselective Deprotection of Per-O-acetylated Thymidine,» *Catalyst*, 2016.
- [86] D. Savaghebi, M. Safari, K. Rezaei, P. Ashtari ve J. Farmani, «Structured lipids produced through lipase-catalyzed acidolysis of canola oil,» *Journal of Agricultural Science And Technology*, pp. 1297-1310, 2012.
- [87] M. Barros, L. F. Fleuri ve G. A. Macedo, «Seed Lipases: Sources, Applications And Properties- A Review,» *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, pp. 15-29, 2010.
- [88] T. Todorova, M. Guncheva, R. Dimitrova ve S. Momchilova, «Walnut Oil – Unexplored Raw Material for Lipase-Catalyzed Synthesis of Low-Calorie Structured Lipids for Clinical Nutrition,» *Journal of Food Biochemistry*, pp. 603-611, 2015.

- [89] K. P. Dhake, D. D. Thakare ve B. M. Bhanage, «Lipase: A potential biocatalyst for the synthesis of valuable flavour and fragrance ester compounds,» *Flavour and Fragrance Journal*, pp. 71-83, 2013.
- [90] E. Su, J. Xu ve P. You, «Functional expression of *Serratia marcescens* H30 lipase in *Escherichia coli* for efficient kinetic resolution of racemic alcohols in organic solvents,» *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, pp. 1-16, 2014.
- [91] K. J. Patil, M. Z. Chopda ve R. T. Mahajan, «Lipase biodiversity,» *Indian Journal of Science and Technology*, pp. 971-982, 2011.
- [92] S. Seth, D. Chakravorty, V. K. Dubey ve S. Patra, «An insight into plant lipase research – challenges encountered,» *Protein Expression and Purification*, pp. 13-21, 2014.
- [93] V. M. Pahoja ve M. A. Sethar, «A Review of Enzymatic Properties of Lipase in Plants, Animals and Microorganisms,» *Journal of Applied Sciences*, pp. 474-484, 2002.
- [94] K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, Berlin: Springer, 2018.
- [95] M. E. Lowe, «Molecular Mechanisms of Rat and Human Pancreatic Triglyceride Lipases,» *American Society for Nutritional Sciences*, pp. 549-557, 1997.
- [96] Y.-X. Bai, Y.-F. Li, Y. Yang ve L.-X. Yi, «Covalent immobilization of triacylglycerol lipase onto functionalized nanoscale SiO₂ spheres,» *Process Biochemistry*, pp. 770-777, 2006.
- [97] D.-G. Lee, K. M. Ponvel, M. Kim, S. Hwang, I.-S. Ahn ve C.-H. Lee, «Immobilization of lipase on hydrophobic nano-sized magnetite particles,» *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, pp. 62-66, 2009.
- [98] S. Sharma, S. Gangal ve A. Rauf, «Lipase mediated hydrolysis of *Mimusops elengi* and *Parkinsonia aculeata* seed oils for the determination of positional distribution of fatty acids,» *Industrial Crops and Products*, pp. 325-328, 2009.
- [99] K. C. Badgujar ve B. M. Bhanage, «Lipase immobilization on hydroxypropyl methyl cellulose support and its applications for chemo-selective synthesis of β -amino ester compounds,» *Process Biochemistry*, 2016.
- [100] M. T. Reetz, «Biocatalysis in Organic Chemistry and Biotechnology: Past, Present, and Future,» *Journal Of The American Chemical Society*, 2013.
- [101] A. Sadaf, J. Grewal, I. Jain, A. Kumari ve S. K. Khare , «Stability and structure of *Penicillium chrysogenum* lipase in the presence of organic solvents,» *Preparative Chemistry Nad Biotechnology*, 2018.

- [102] M. E. Vaquero , J. Barriuso, M. J. Martínez ve A. Prieto, «Properties, structure, and applications of microbial sterol esterases,» *Applied Microbiology and Biotechnology*, pp. 2017-2061, 2016.
- [103] R. Zechner, R. Zimmermann, T. O. Eichmann, S. D. Kohlwein, G. Haemmerle, A. Lass ve F. Madeo, «FAT SIGNALS - Lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling,» *Cell Metabolism*, pp. 279-291, 2012.
- [104] N. N. Gandhi, N. S. Patil, S. B. Sawant, J. B. Joshi, P. P. Wangikar ve D. Mukesh, «Lipase-Catalyzed Esterification,» *Catalysis Reviews - Science and Engineering*, pp. 439-480, 2000.
- [105] P. Priyanka, Y. Tan, G. K. Kinsella, G. T. Hennehan ve B. J. Ryan, «Solvent stable microbial lipases: current understanding and biotechnological applications,» *Biotechnology Letters*, 2019.
- [106] S. Ghorai, S. P. Banik, D. Verma, S. Chowdhury, S. Mukherjee ve S. Khowala, «Fungal biotechnology in food and feed processing,» *Food Research International*, pp. 577-587, 2009.
- [107] J. Calzada, A. Del Olmo, A. Picon, P. Gaya ve M. Nuñez, «High-pressure processing decelerates lipolysis and formation of volatile compounds in ovine milk blue-veined cheese,» *Journal of Dairy Science*, pp. 7500-7510, 2013.
- [108] M. Cao, L. M. Fonseca, T. C. Schoenfuss ve S. A. Rankin, «Homogenization and lipase treatment of milk and resulting methyl ketone generation in blue cheese,» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, pp. 5726-5733, 2014.
- [109] A. Ben Bacha, A. Al-Assaf, N. M. Moubayed ve I. Abid, «Evaluation of a novel thermo-alkaline *Staphylococcus aureus* lipase for application in detergent formulations,» *Saudi Journal of Biological Sciences*, pp. 409-417, 2018.
- [110] . A. Houde, A. Kademi ve D. Leblanc, «Lipases and their industrial applications: An overview,» *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, pp. 155-170, 2004.
- [111] R. N. Patel, «Tour de paclitaxel: Biocatalysis for semisynthesis,» *Annual Review of Microbiology*, pp. 361-395, 1998.
- [112] R. Sharma, Y. Chisti ve U. C. Banerjee, «Production, purification, characterization, and applications of lipases,» *Biotechnology Advances*, pp. 627-662, 2001.
- [113] S. Yılmaz Keskin, *Bazı Monoterpenoidlerin Fungal Biyotransformasyonunun İncelenmesi*, Sakarya: Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2010.
- [114] T. Akar, *Furanosteroid yapılı bazı bileşiklerin antifungal etkinliğinin ve *Neurospora crassa* fungal kültürünün biyotransformasyon ve biyosorpsiyon*

özelliklerinin incelenmesi, Sakarya: Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2005.

- [115] A. Telefoncu, *Biyoteknoloji*, İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi, 1995.
- [116] Ö. F. Algur, *Temel Biyoteknoloji Ders Notları*, 3-6, 1992.
- [117] E. Soydan, *Benzofuranon Ve İndol Türevlerinin Biyokatalitik Rezolüsyonu*, İstanbul: Yıldız Teknik Üniversitesi , 2015.
- [118] B. Bodur, *Bazı Şalkon Bileşiklerinin Aspergillus Candidus Küfö İle Biyotransformasyonları*, Sakarya: Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Fakültesi, 2019.
- [119] D. H. Petterson ve H. C. Murray, «Microbiological oxygenation of steroids at carbon 11,» *Journal of the American Chemical Society*, pp. 1871-1872, 1952.
- [120] J. E. Leresche ve H. P. Meyer, «Chemocatalysis and biocatalysis (Biotransformation): Some thoughts of a chemist and of a biotechnologist,» *Organic Process Research and Development*, pp. 572-580, 2006.
- [121] K. Buchholz, V. Kasche ve U. T. Bornscheuer, *Biocatalysts and Enzyme Technology*, Wiley-Blackwell, 2012.
- [122] S. Ergin, *Dehidroepiandrosteron Bileşğinin Bazı Küfler İle Biyotransformasyonu*, Sakarya: Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2020.
- [123] P. T. Anastas ve J. C. Warner, «Green Chemistry Theory and Practice,» Oxford University Press, NewYork, 1988.
- [124] G. Grogan, «Biotransformations, Microbes and Enzymes,» %1 içinde *Practical Biotransformations A Beginner's Guide*, A John Wiley and Sons, 2009, pp. 4-6.
- [125] M. J. Kang, W. H. Song, B. H. Shim, S. Y. Oh, H. Y. Lee, E. Y. Chung, Y. Sohn ve J. Lee, «Pharmacologically Active Metabolites of Currently Marketed Drugs: PotentialResources for New Drug Discovery and Development,» *The Pharmaceutical Society of Japan*, pp. 1325-1337, 2010.
- [126] R. L. Hanson, Z. Shi, D. B. Brzozowski, A. Banerjee, T. P. Kissick, J. Singh, A. J. Pullockaran, J. T. North, J. Fan, J. Howell, S. C. Durand, M. A. Montana, D. R. Kronenhta, R. H. Mueller ve R. N. Patel, «Regioselective Enzymatic Aminoacylation of Lobucavir toGive an Intermediate for Lobucavir Prodrug,» *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, pp. 2681-2687, 2000.
- [127] R. N. Patel, «Biocatalysis for Synthesis for Chiral Pharmaceutical Intermediates,» %1 içinde *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industries*, CRC Press Taylor & Francis Group, 2007, pp. 105-151.

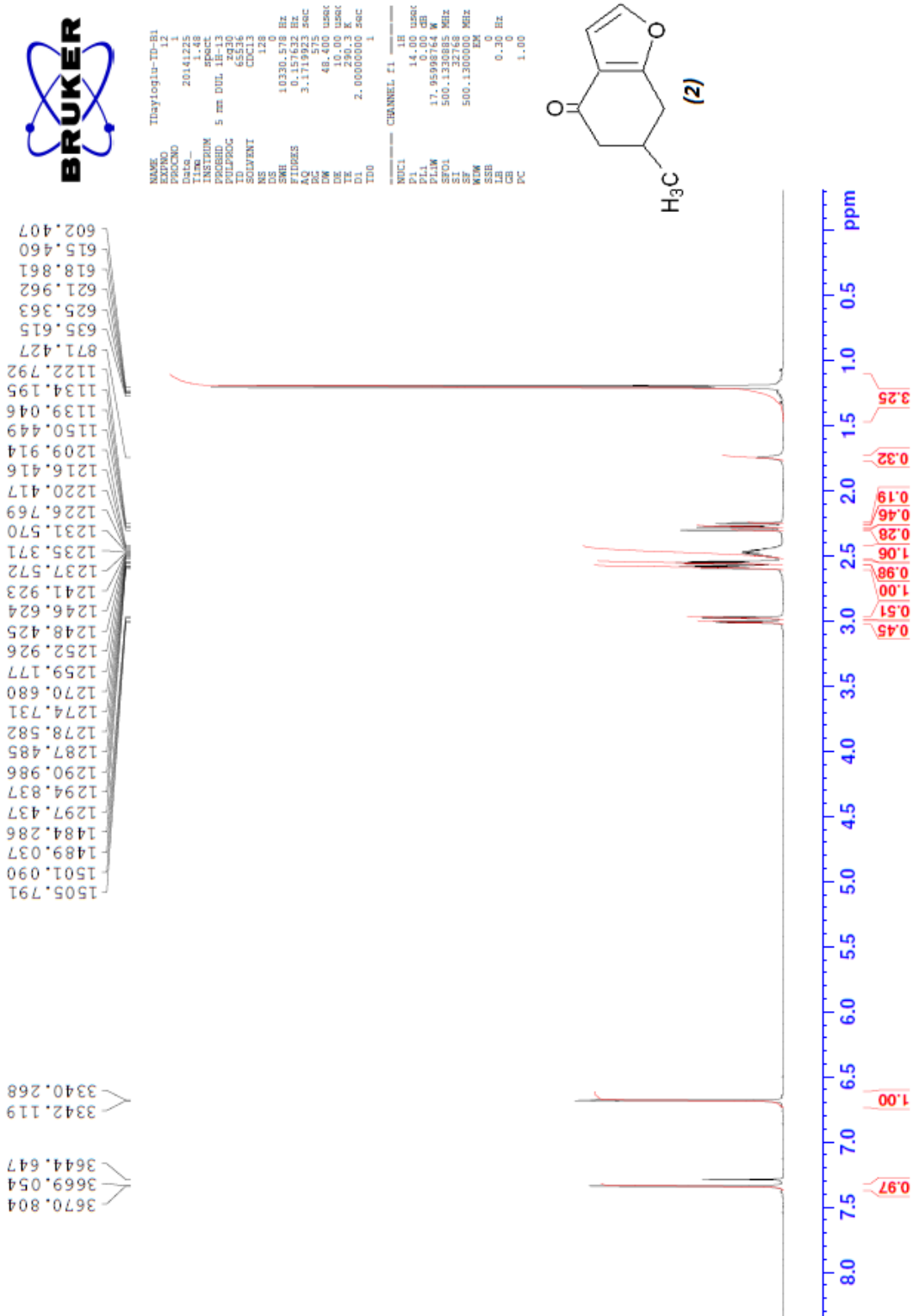
- [128] R. N. Patel, J. M. Howell, A. Banerjee, K. F. Fortney ve L. J. Szarka , «Stereoselective enzymatic esterification of 3-benzoylthio-2-methylpropanoic acid,» *Applied Microbiology and Biotechnology*, pp. 29-34, 1991.
- [129] R. N. Patel, A. Banerjee, V. Nanduri, A. Goswami ve F. Comezoglu, «Enzymatic Resolution of Racemic Secondary Alcohols by Lipase B from *Candida antarctica*,» *Journal of the American Oil Chemists' Society*, pp. 1015-1019, 2000.
- [130] Ö. Öztürk Ceylan, *Antimikrobiyal Etkili Yeni İndol Türevi Bileşiklerin Sentezleri Ve Biyolojik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi*, ANKARA: Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, 2015.
- [131] C. Won, X. Shen, . K. Mashiguchi, Z. Zheng, X. Dai, Y. Cheng, H. Kasahara, Y. Kamiya, J. Chory ve Y. Zhao, «Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by tryptophan aminotransferases of *Arabidopsis* and YUCCAs in *Arabidopsis*,» *National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011.
- [132] M.-Z. Z. Zhang, N. Mulholland, D. Beattie, D. Irwin, Y.-C. Gu, Q. Chen, G.-F. Yang ve . J. Clough, «Synthesis and antifungal activity of 3-(1,3,4-oxadiazol-5-yl)-indoles and 3-(1,3,4-oxadiazol-5-yl)methyl-indoles,» *European Journal of Medicinal Chemistry*, pp. 22-32, 2013.
- [133] L. B. Diss, S. D. Robinson, Y. Wu, S. Fidalgo, M. S. Yeoman ve B. A. Patel, «Age-related changes in melatonin release in the murine distal colon,» *ACS Chemical Neuroscience*, p. 87, 2013.
- [134] S. N. Young, «How to increase serotonin in the human brain without drugs Simon,» *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 2007.
- [135] A. Kumari ve R. K. Singh, «Medicinal chemistry of indole derivatives: Current to future therapeutic pro-spectives,» *Bioorganic Chemistry*, 2019.
- [136] T. P. Singh ve O. M. Singh, «Recent Progress in Biological Activities of Indole and Indole Alkaloids,» *Medicinal Chemistry*, 2018.
- [137] E. Vitaku, D. T. Smith ve J. T. Njardarson, «Analysis of the structural diversity, substitution patterns, and frequency of nitrogen heterocycles among U.S. FDA approved pharmaceuticals,» *Journal of Medicinal Chemistry*, pp. 10257-10274, 2014.
- [138] N. Kaushik, N. K. Kaushik, P. Attri, N. Kumar, C. H. Kim, A. K. Verma ve E. H. Choi, «Biomedical Importance of Indoles,» *Molecules*, 2013.
- [139] S. Biswal, U. Sahoo, S. Sethy, H. K. S. Kumar ve M. Banerjee, «Indole: The molecule of diverse biological activities,» *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, pp. 1-6, 2012.

- [140] D. F. Taber ve P. K. Tirunahari, «Indole synthesis: a review and proposed classification,» *Tetrahedron*, 2011.
- [141] Z. Zerenler Çalışkan, E. Soydan, G. Kurt Gur ve E. Ordu, «Synthesis of New 4-Oxo-Tetrahydroindol Derivatives by Using Chemical and Microbial Biotransformation Methods,» *Polycyclic Aromatic Compounds*, 2019.
- [142] S. Xue, L. Ma, R. Gao, Y. Li ve Z. Li, «Synthesis and antiviral activity of some novel indole-2-carboxylate derivatives,» *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2014.
- [143] G. Cihan-Üstündağ, E. Gürsoy, L. Naesens, N. Ulusoy-Güzeldemirci ve G. Çapan, «Synthesis and antiviral properties of novel indole-based thiosemicarbazides and 4-thiazolidinones,» *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, pp. 240-246, 2016.
- [144] R. S. Chavan, H. N. More ve A. V. Bhosale, «Synthesis, characterization and evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of some novel indoles,» *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, pp. 463-473, 2011.
- [145] H. A. Elshemy, M. A. Zaki, E. I. Mohamed, S. I. Khan ve P. F. Lamie, «A multicomponent reaction to design antimalarial pyridyl-indole derivatives: Synthesis, biological activities and molecular docking,» *Bioorganic Chemistry*, 2020.
- [146] Z. Zerenler Caliskan ve M. Suleymanoglu Ersez, «Stereoselective synthesis of optically active 1-benzyl-4,5,6,7-tetrahydro-6,6-dimethyl-4-oxo-1H-indol-7-yl acetate and 1-benzyl-6,7-dihydro-7-hydroxy-6,6-dimethyl-1H-indol-4(5H)-one through lipase-catalyzed esterification and transesterification processes,» *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, pp. 64-70, 2015.
- [147] X. Yu ve Z.-P. Yao, «Chiral recognition and determination of enantiomeric excess by mass spectrometry: A review,» *Analytica Chimica Acta*, 2017.
- [148] H. Büyükkaya ve Z. Çalışkan, «Enantioselective Synthesis of Dihydro Indole Derivatives by Lipase Enzyme Catalysts,» %1 içinde *AMB 22-I. International Advances in Molecular Biology Congress*, İstanbul, 2022.
- [149] G. Hancu ve A. Modroiu, «Chiral Switch: Between Therapeutical Benefit and Marketing Strategy,» *Pharmaceuticals*, 2022.

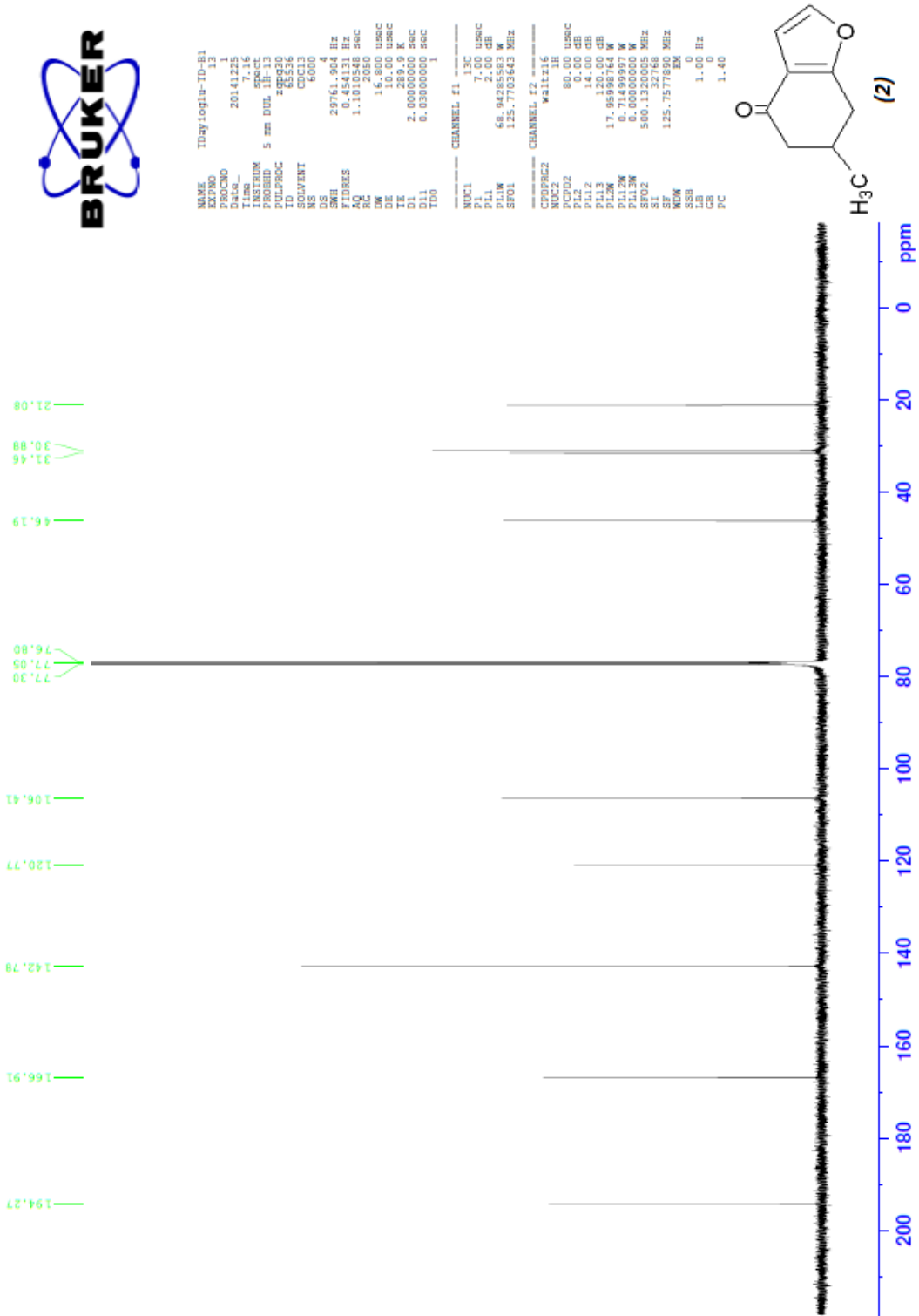
A

**6,7-dihidro-6-metilbenzofuran-4(5H)-on (2) Bileşigi
İçin Spektral Analizler**

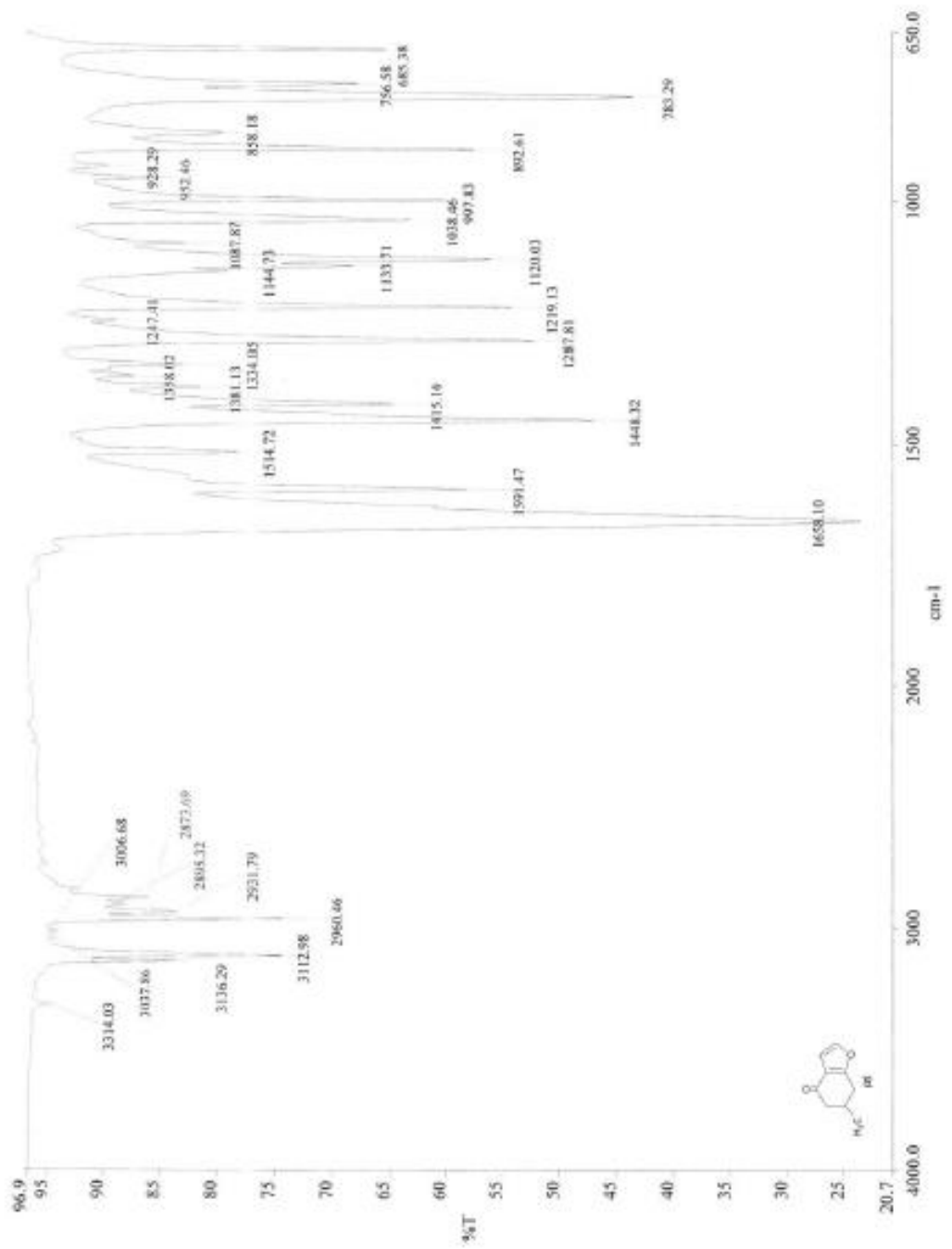




Şekil A. 1 Bileşik (2)'nin ^1H NMR sonucu



Şekil A.2 Bileşik (2)’nin ¹³C NMR sonucu

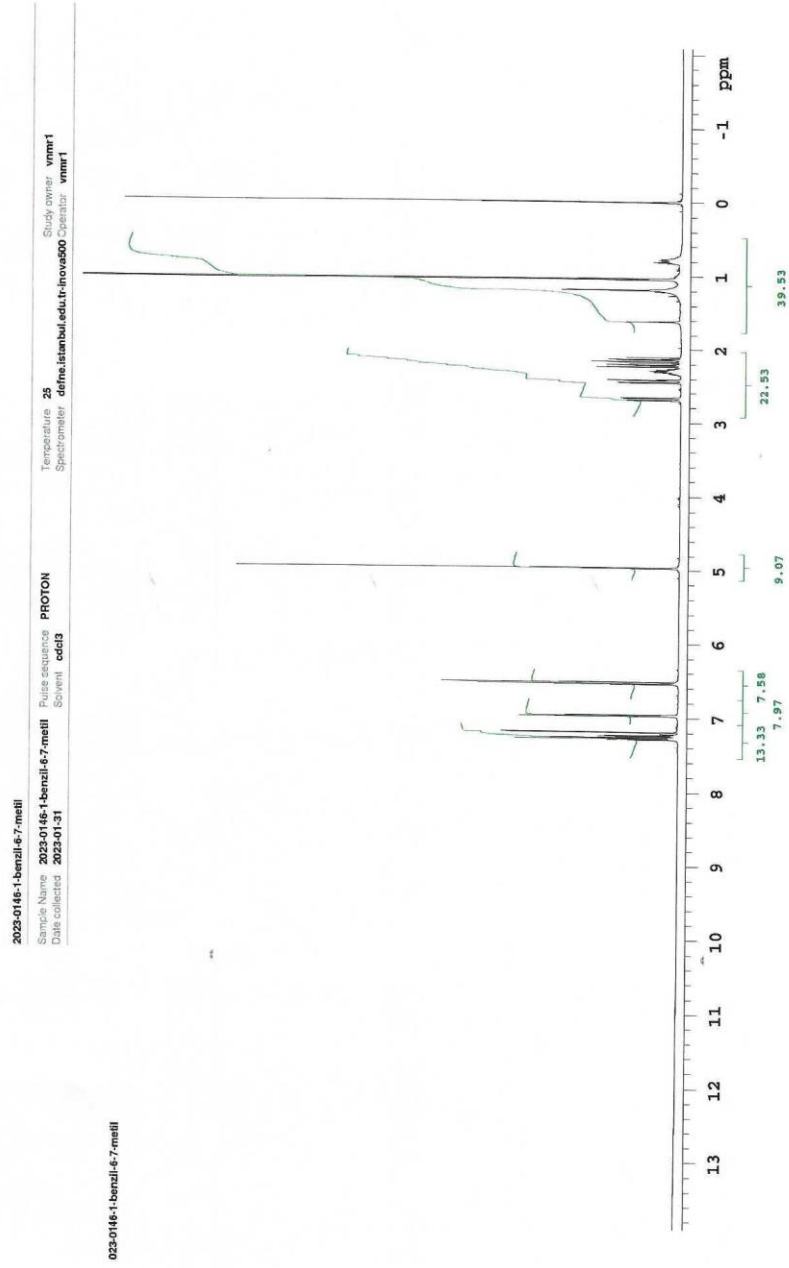


Şekil A.3 Bileşik (2)'nin IR sonucu

B

**1-benzil-6,7-dihidro-6-metil-1H-indol-4(5H)-on (3)
Bileşigi İçin Spektral Analizler**

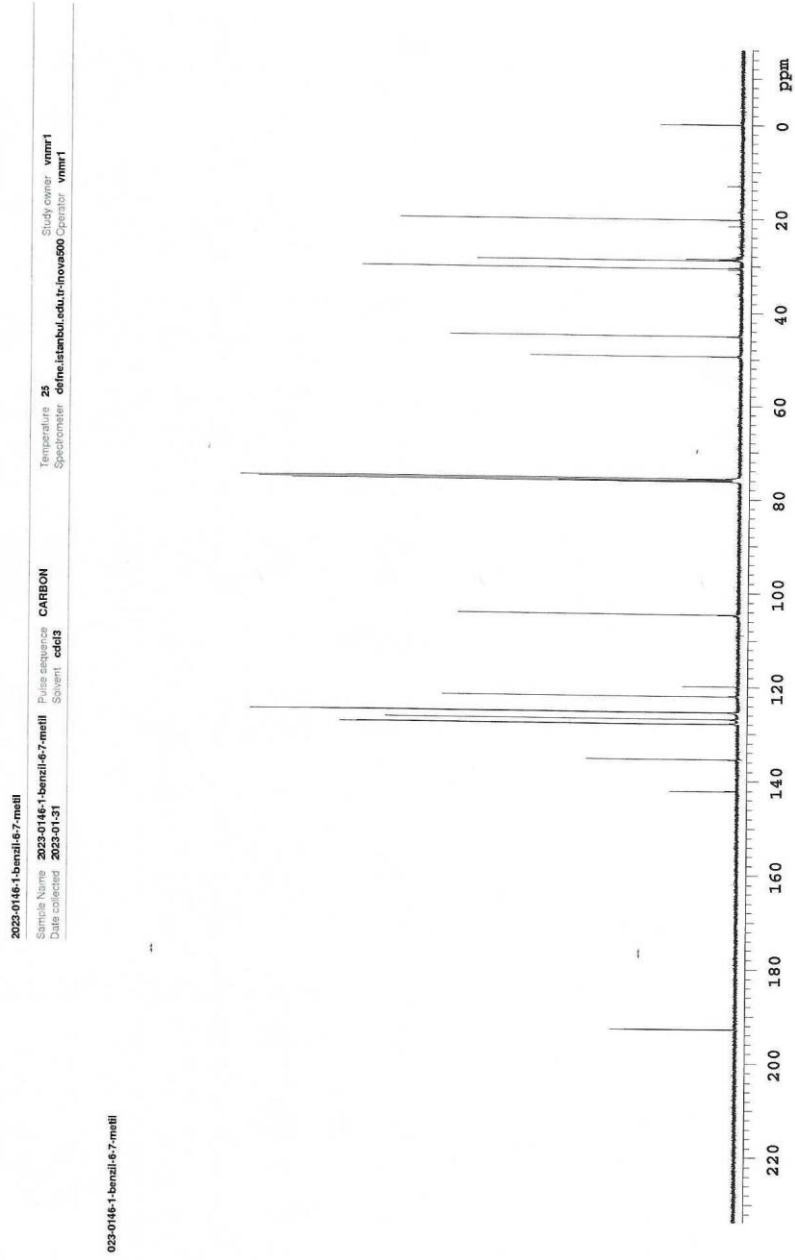




Data file: home\wnmr1\wnmr1\data\2023-0146-1-benzil-6-7-metil_20230131_01.PROTON_01

Plot date: 2023-02-07

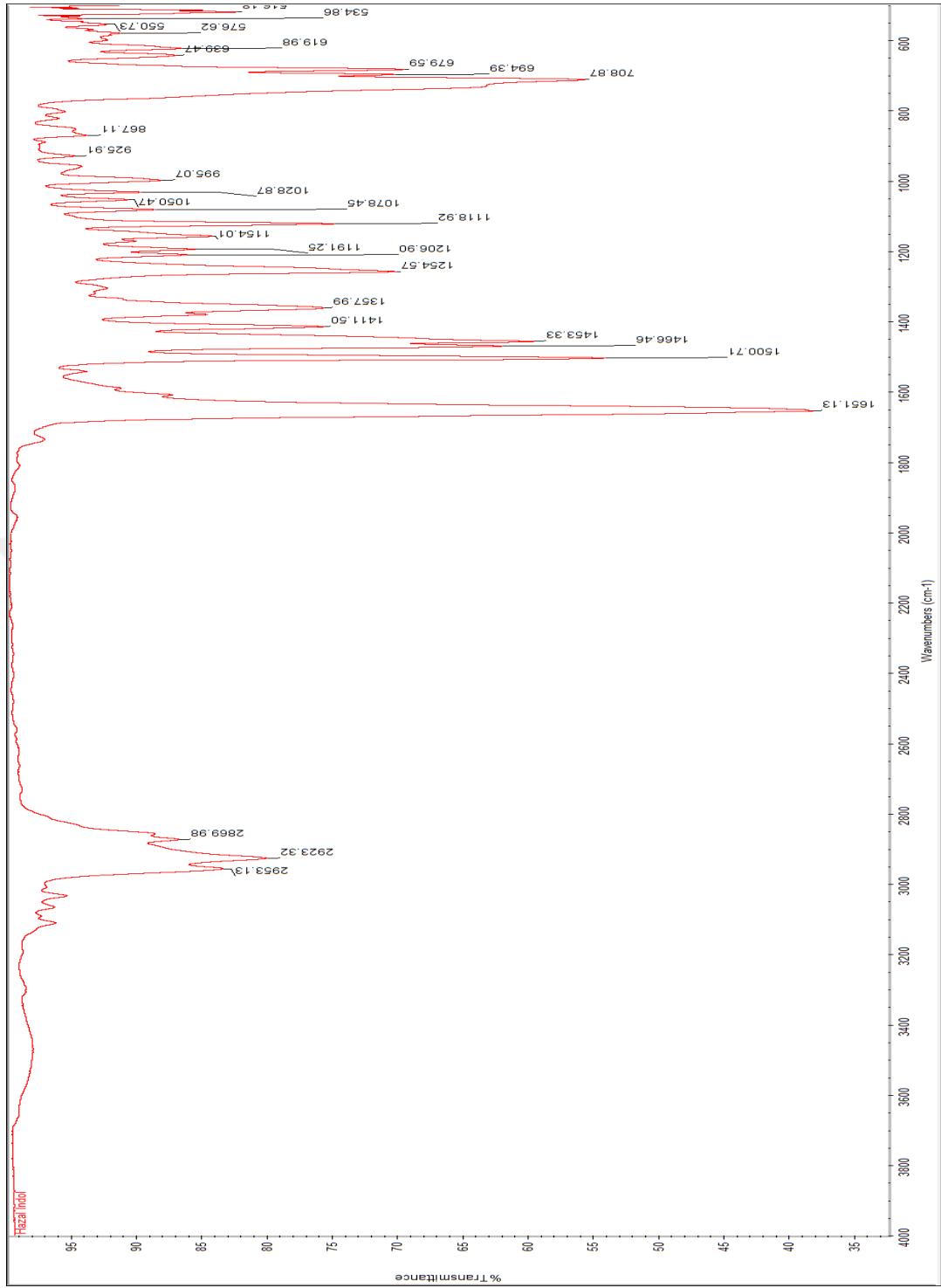
Şekil B.1 Bileşik (3)'ün ^1H NMR sonucu



Plot date 2023-02-07

Data file: home\mmr1\unmmyz\data\2023-0146-1-benzil-6-7-metil_20230131_01\CARBON_01.fid

Şekil B.2 Bileşik (3)'ün ^{13}C NMR sonucu

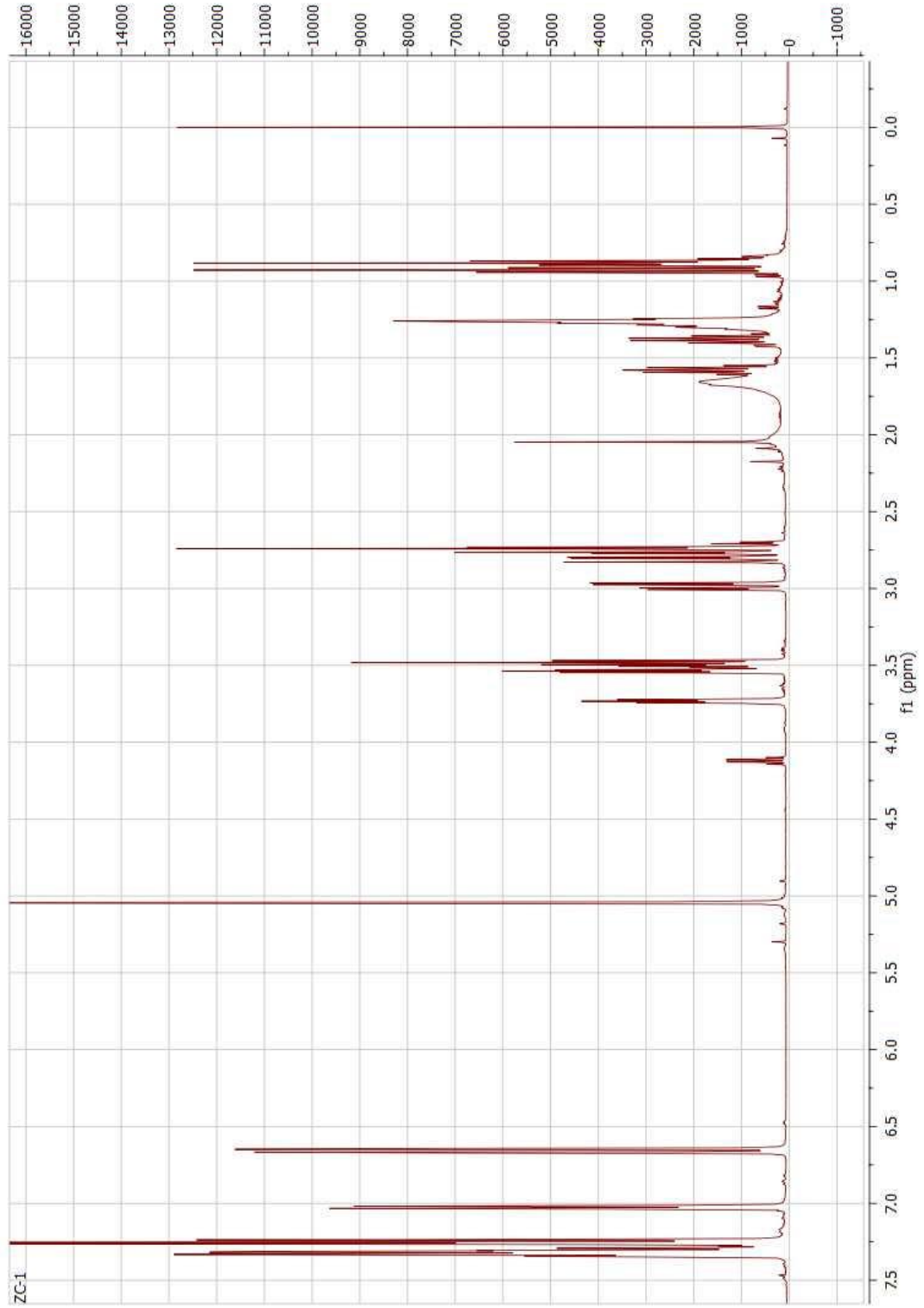


Şekil B.3 Bileşik (3)'ün IR spektrumu

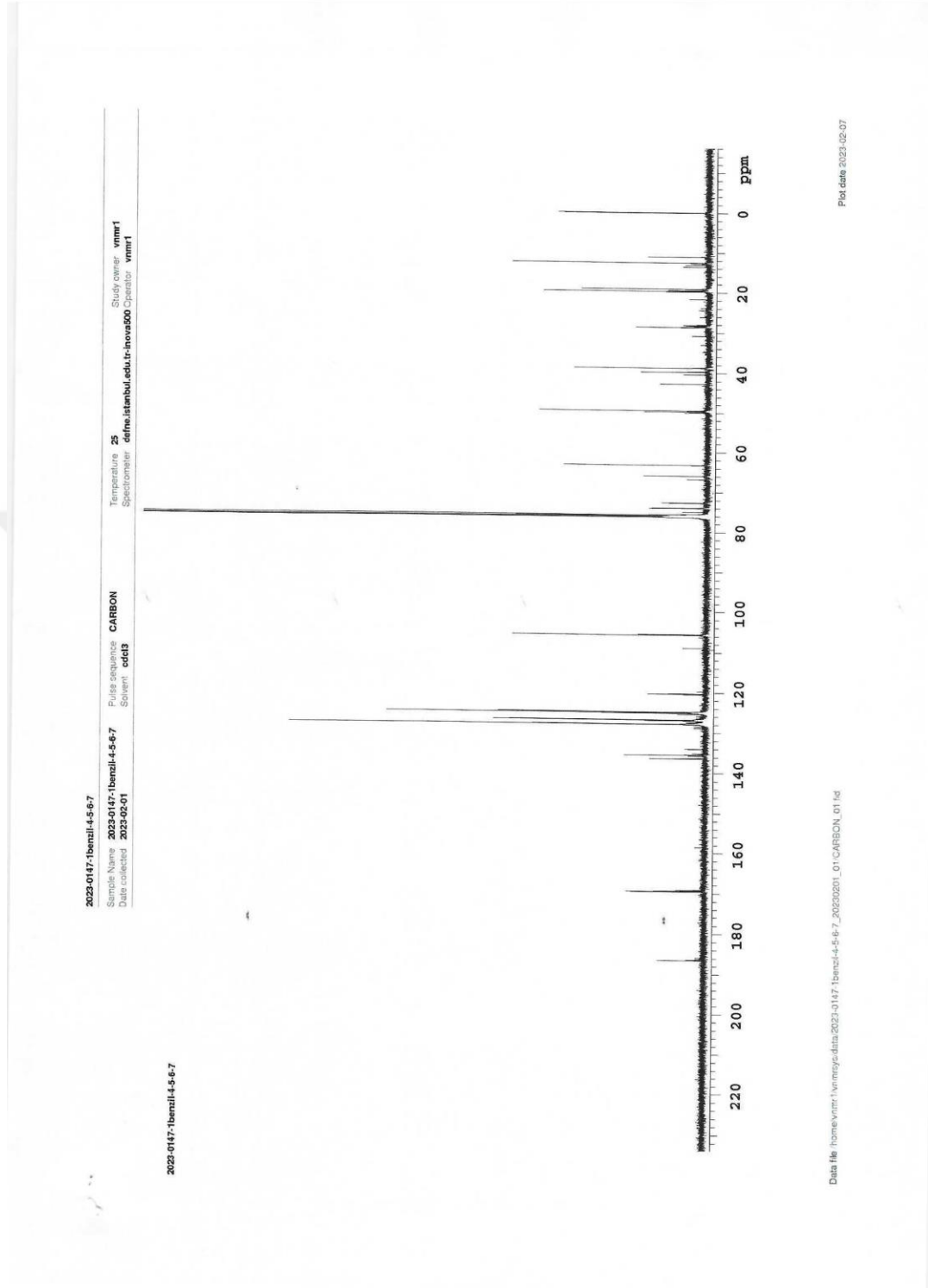
C

1-benzil-6-metil-4-okso-4,5,6,7-tetrahidro-1H-indol-5-il asetat (4) Bileşigi İçin Spektral Analizler

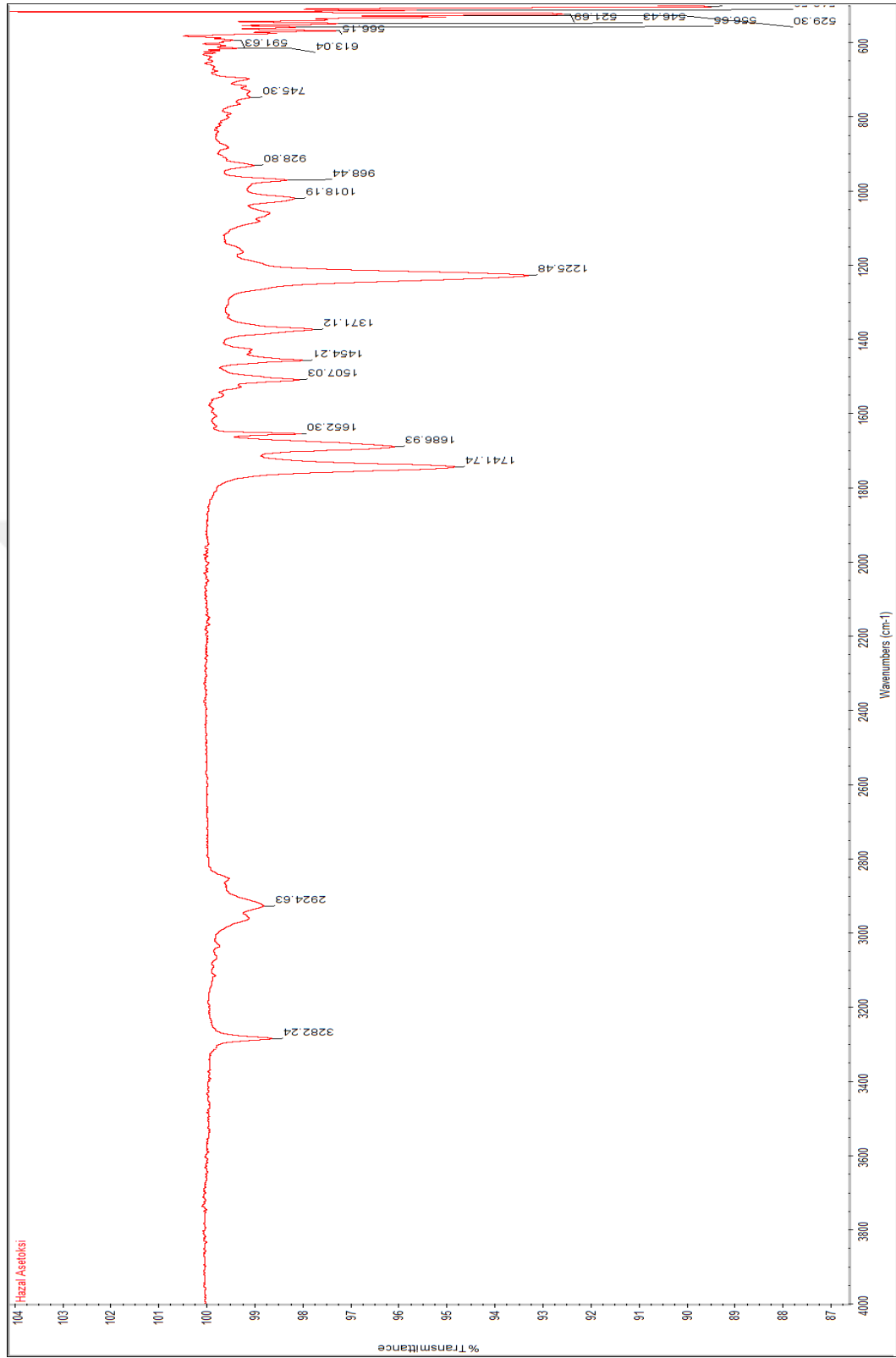




Şekil C.1 Bileşik (4)'ün ^1H NMR sonucu



Şekil C.2 Bileşik (4)'ün ^{13}C NMR sonucu

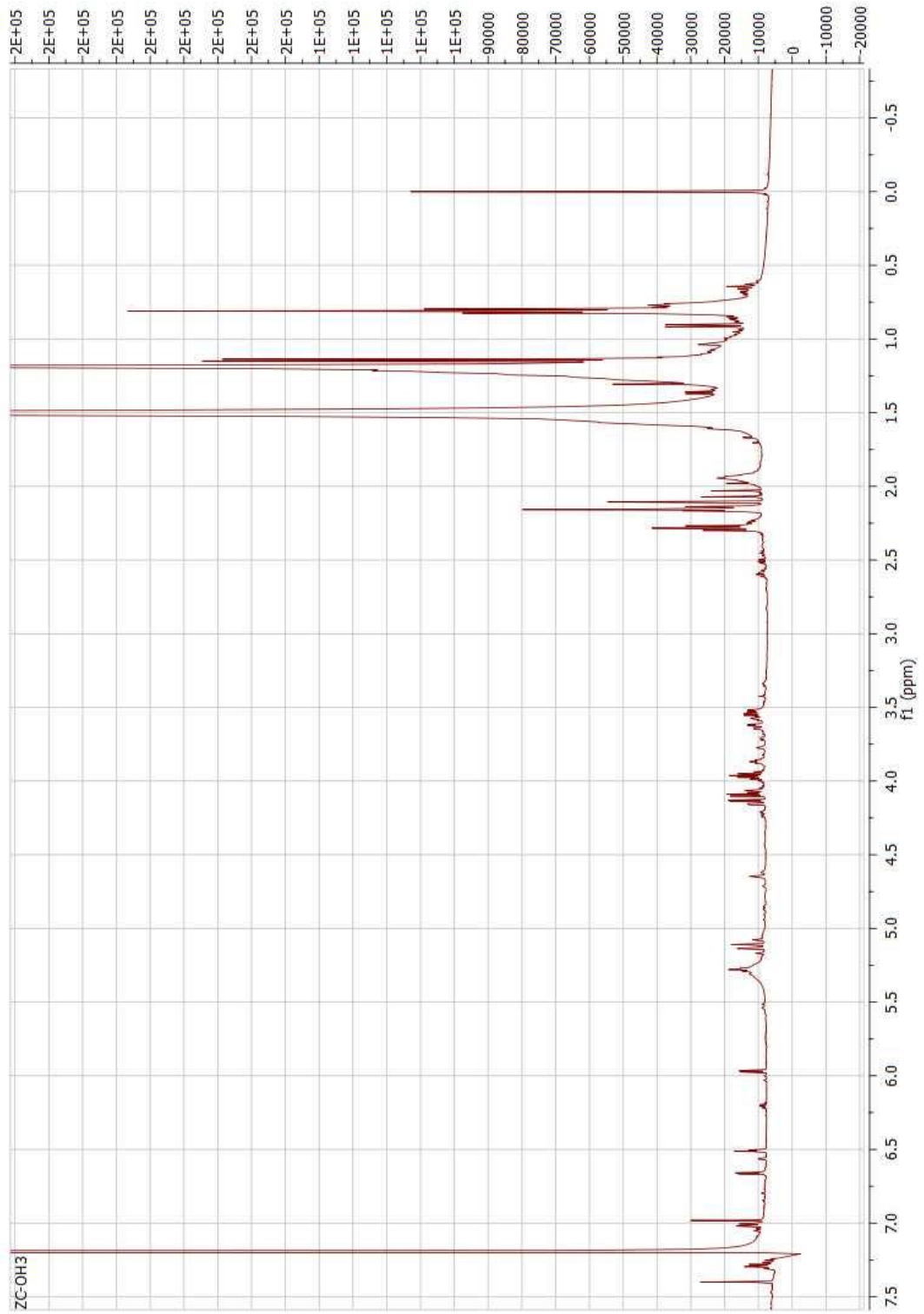


Şekil C.3 Bileşik (4)'ün IR spektrumu

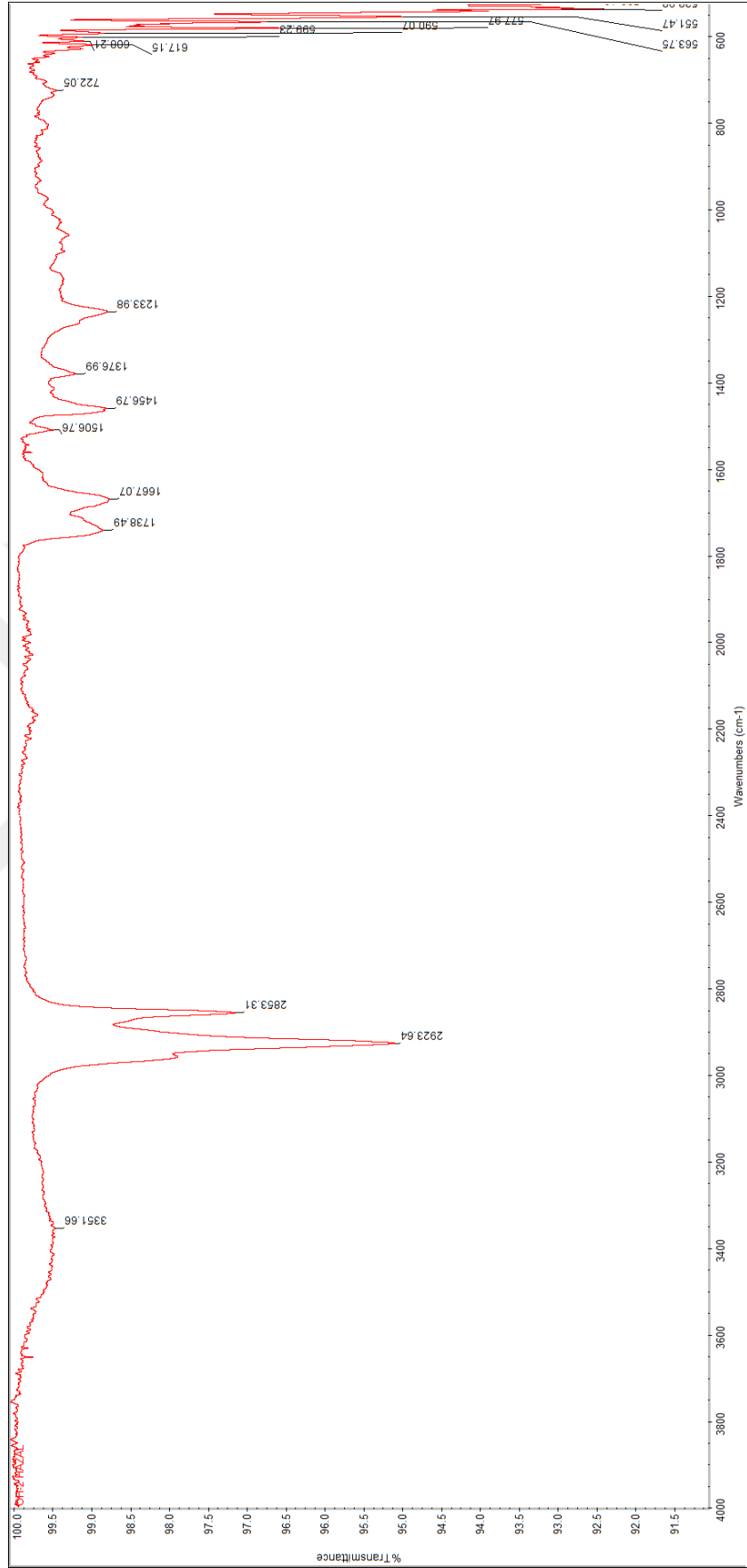
D

**1-benzil-5-hidroksi-6-metil-6,7-dihidro-1H-indol-4(5H)-
on (5) Bileşigi İçin Spektral Analizler**





Şekil D.1 Bileşik (5)'in ^1H NMR sonucu



Şekil D.2 Bileşik (5)'in IR spektrumu

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Büyükkaya H., Çalışkan Z., ‘‘ Enantioselective Synthesis of Dihydro Indole Derivatives by Lipase Enzyme Catalysts’’ I. International Advances in Molecular Biology Congress, 19-22 Eylül 2022, İstanbul, TÜRKİYE, Syf : 94-95.

Projeler

1. Lipaz Enzim Katalizörleri İle Dihidroindol Türevlerinin Enantioselektif Sentezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü – Yüksek Lisans BAP Projesi, FYL-2020-3905, İstanbul/TÜRKİYE