

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI İNDOL TÜREVLERİNİN KEMOENZİMATİK
SENTEZLERİ**

Biyolog Kıvılcım ÇAĞLAR

**FBE Biyoloji Bölümünde
Hazırlanan**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı : Yard. Doç. Dr. Zerrin Zerenler ÇALIŞKAN (YTÜ)

İSTANBUL, 2009

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	ii
SİMGE LİSTESİ	iv
KISALTIMA LİSTESİ.....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
ÇİZELGE LİSTESİ	viii
ÖNSÖZ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
2. KİRALİTE VE OPTİKÇE AKTİFLİK	3
2.1 Kiralitenin Biyolojik Önemi.....	4
2.2 Kiral İlaçlar	7
2.3 Kiral Moleküllerin Sentezleri.....	12
2.3.1 Doğal Kaynaktan İzole ile Ayrıştırma	12
2.3.2 Rasemik Sentez ve Rezolüsyonu.....	12
2.3.2.1 Mekanik Ayrıştırma.....	13
2.3.2.2 Diastereoizomerlere Dönüştürerek Ayrıştırma	13
2.3.2.3 Kromotografik Yöntemler ile Ayrıştırma	13
2.3.2.4 Kinetik Rezolüsyon ile Ayrıştırma	13
2.3.3 Asimetrik Sentez	14
2.3.3.1 Kiral Katalizör Yöntemi ile Asimetrik Sentez	15
2.3.3.2 Biyoteknolojik Metodlar ile Asimetrik Sentez.....	15
3. ENZİMLER.....	16
3.1 Enzimlerin Moleküler Yapısı ve Özellikleri	17
3.2 Enzim Katalizi	19
3.3 Enzim Kinetiği	22
3.4 Enzimlerin Adlandırılmaları ve Sınıflandırılması	23
3.5 Lipaz Enzimleri	25
3.5.1 Lipaz Enziminin Özellikleri	28
3.5.2 Lipaz Çeşitleri	29
3.5.3 Mikrobiyal Lipazlar	29
3.5.4 Lipaz Enzimlerinin Kullanım Alanları	31
3.5.5 Lipaz Enzimi İle Enantiyoseçilimli Sentezler	32

3.5.6	Lipaz Katalizi ile Bazı İlaçların Enantiyoseçilimli Sentezleri	32
4.	α -HİDROKSİ KETONLARIN ÖNEMİ	34
5.	ENONLARIN ASETOKSİLASYONU	36
6.	İNDOL TÜREVLERİNİN ÖNEMİ	39
7.	MATERYAL VE METOD	48
7.1	Kullanılan Kimyasallar	48
7.2	4,5,6,7-Tetrahidro-4-okso-1 <i>H</i> -indol-5-il-asetoksi Sentezi.....	49
7.2.1	Mangan (III) Asetat ile 4,5,6,7-Tetrahidro-4-okso-1 <i>H</i> -indol-5 -il-asetoksi Sentezi49	
7.2.2	Mangan (II) Asetat ile 4,5,6,7-Tetrahidro-4-okso-1 <i>H</i> -indol-5 -il-asetoksi Sentezi50	
7.2.3	KMnO ₄ ile 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1 <i>H</i> -indol-5-il-asetoksi Sentezi.....	51
7.2.4	4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1 <i>H</i> -indol-5-il-asetoksi Bileşiğinin Hidroliz Reaksiyonu52	
7.3	Lipaz Katalizli Reaksiyonlar	52
8.	SONUÇLAR ve TARTIŞMA	55
8.1	Çalışmanın Yönü	55
8.1.1	1,5,6,7-tetrahidro-4 <i>H</i> -indol-4-on Bileşiğinin α Seçilimli Asetoksilasyonu.....	57
8.1.2	Enzim Ortamında Asetoksi Ketonların Hidrolizi	59
8.1.3	Enantiyoseçimli Sentezleri Etkileyen Parametreler	60
8.1.4	4,5,6,7-Tetrahidro-4-okso-1 <i>H</i> -indol-5-il-asetoksi Bileşiğinin Lipaz Katalizli Reaksiyonları.....	60
8.2	Sonuç	65
	KAYNAKLAR.....	67
	EK-1 NMR ve IR Spektrumları.....	71
	EK-2 HPLC Analiz Sonuçları	78
	ÖZGEÇMİŞ.....	83

SİMGE LİSTESİ

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

KISALTMA LİSTESİ

AOL	Aspergillus oryzae lipazı
CAL	Candida antarctica lipazı
ee	Enantiomeric excess
ES	Enzim substrat kompleksi
D	Dekstro
DMSO	Dimetilsülfoksit
HPL	Hog pancreas lipazı
FDA	Food Drug Adminisration
L	Levorotary
Mn	Mangan
MgSO ₄	Magnezyum sülfat
MML	Mucor miehei lipazı
PPL	Penisillium poqueferti lipazı
PFL	Pseudomanas fluorences lipazı
KMnO ₄	Potasyum permanganat
R	Rektus
RAL	Rhizopus arrhizus lipazı
S	Sinister
NaHCO ₃	Sodyum bikarbonat
THF	Tetrahidrofuran

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Ayna görüntüsü	3
Şekil 2.2 Bütanol	4
Şekil 2.3 Kiral biyomoleküller	5
Şekil 2.4 Bazı kiral doğal bileşiklerin molekül yapıları.....	6
Şekil 2.5 Talidomit ilacının enantiyomerleri.....	7
Şekil 2.6 İbuprofen' in enantiyomerleri	8
Şekil 2.7 (S)-(+)- Omeprazol	8
Şekil 2.8 Metildopa' nın (S) enantiyomeri	8
Şekil 2.9 Fluoksetin molekülünün enantiyomerleri	9
Şekil 2.10 Penisilamin molekülünün enantiyomerleri	9
Şekil 2.11 Kiral ilaçlarının yıllara göre yıllık satış oranları	11
Şekil 2.12 Kiral moleküllerin elde edilme yolları	12
Şekil 2.13 Tartarik asit	13
Şekil 2.14 Kiral moleküllerin biyoteknolojik yollarla elde edilme yüzdeleri	15
Şekil 3.1 Aminoasitlerde kiralite	18
Şekil 3.2 Enzimatik kinetik rezolüsyon enerji diyagramı	19
Şekil 3.3 Anahtar kilit modeli	20
Şekil 3.4 Sonradan uyumluluk modeli	20
Şekil 3.5 Michealis-Menten eşitliği	22
Şekil 3.6 Kazlauskas kuralı	25
Şekil 3.7 Lipaz enzimlerinin katalizlediği tepkimeler	26
Şekil 3.8 Lipazların üç boyutlu yapısı	27
Şekil 3.9 Serin hidrolaz mekanizması	27
Şekil 4.1 Hidroksipropiyofenon türevleri	34
Şekil 4.2 α -asetoksi ketonların enantiyoseçilimli hidroliz reaksiyonu	35
Şekil 5.1 Enonların α oksidasyonu	36
Şekil 5.2 Mangan III asetatın dolaylı oksidasyon mekanizması	37
Şekil 6.1 İndometazin	39
Şekil 6.2 Etodolak.....	39
Şekil 6.3 Avitriptan.....	39
Şekil 6.4 Sumatriptan.....	40
Şekil 6.5 Stobadin.....	40
Şekil 6.6 Triptofan.....	41
Şekil 6.7 Melatonin.....	41
Şekil 6.8 Serotonin.....	41
Şekil 6.9 İndol-3-karbinol	42
Şekil 6.10 Meridianin.....	43
Şekil 6.11 Topsentin	43
Şekil 6.12 Hapaloindol.....	43
Şekil 6.13 Staurosporin	44
Şekil 6.14 Roseophilin	44
Şekil 6.15 Mitosenez.....	45
Şekil 6.16 Murraykuinon	45
Şekil 6.17 Pindalol	45
Şekil 6.18 Vindolin.....	46
Şekil 6.19 Elliptisin.....	46
Şekil 7.1 Mn(III) asetat ile yapılmış reaksiyonun İTK sonucu	50
Şekil 7.2 Mn(II) asetat ile yapılmış reaksiyonun İTK sonucu	50

Şekil 7.3 KMnO ₄ ile yapılmış reaksiyonun İTK sonucu.....	51
Şekil 7.4 Lipaz katalizli reaksiyonların İTK ile kontrolü	52
Şekil 8.1 Reaksiyon şeması.....	57
Şekil 8.2 1,5,6,7-tetrahidro-4H-indol-4-on bileşiğinin α seçilimli asetoksilasyonu.....	58
Şekil 8.3 Standart olarak kullanılan rasemik 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1H-indol-5-il-asetoksi bileşiğinin HPLC kromatogramı.....	63
Şekil 8.4 6,7-dihidro-5-hidroksi-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin THF ortamında <i>Penisillium roqueferti</i> lipazı ile HPLC analiz sonucu	63
Şekil 8.5 6,7-dihidro-5-hidroksi-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin asetonitril ortamında HPL lipazı ile HPLC analiz sonucu	64
Şekil Ek 1.1 1 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1H-indol-5-il-asetoksi bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	72
Şekil Ek 1.2 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1H-indol-5-il-asetoksi bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu.....	73
Şekil Ek 1.3 6,7-dihidro-5-hidroksi-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu.....	74
Şekil Ek 1.4 6,7-dihidro-5-hidroksi-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu.....	75
Şekil Ek 1.5 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1H-indol-5-il-asetoksi bileşiğinin IR spektrumu	76
Şekil Ek 1.6 6,7-dihidro-5-hidroksi-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin IR spektrumu	1
Şekil Ek 2.1 Standart olarak kullanılan rasemik 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1H-indol-5-il-asetoksi bileşiğinin HPLC analiz sonucu	78
Şekil Ek 2.2 Standart olarak kullanılan rasemik 6,7-dihidro-5-hidroksi-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin HPLC analiz sonucu	78
Şekil Ek 2.3 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1H-indol-5-il-asetoksi ve 6,7-dihidro-5-hidroksi-1H-indol-4(5H)-on bileşiklerinin <i>Rhizopus arrhizus</i> lipazı ile THF ortamında hidrolizinin HPLC analiz sonucu.....	79
Şekil Ek 2.4 6,7-dihidro-5-hidroksi-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin THF ortamında <i>Penisillium roqueferti</i> lipazı ile HPLC analiz sonucu.....	79
Şekil Ek 2.5 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1H-indol-5-il-asetoksi bileşiğinin THF ortamında <i>Penisillium roqueferti</i> lipazı ile HPLC analiz sonucu.....	80
Şekil Ek 2.6 6,7-dihidro-5-hidroksi-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin asetonitril ortamında HPL lipazı ile HPLC analiz sonucu	80
Şekil Ek 2.7 6,7-dihidro-5-hidroksi-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin asetonitril ortamında HPL lipazı ile HPLC analiz sonucu	81
Şekil Ek 2.8 6,7-dihidro-5-hidroksi-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin DMSO ortamında CAL lipazı ile HPLC analiz sonucu	81
Şekil Ek 2.9 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1H-indol-5-il-asetoksi ve 6,7-dihidro-5-hidroksi-1H-indol-4(5H)-on bileşiklerinin DMSO ortamında PFL lipazının HPLC analiz sonucu.....	82
Şekil Ek 2.10 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1H-indol-5-il-asetoksi bileşiğinin THF ortamında HPL lipazının HPLC analiz sonucu	82

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 2.1 Kiral ilaç satışlarının yıllık dağılımı.....	10
Çizelge 3.1 Lipaz enzimi üreten bazı mikroorganizmalar	30
Çizelge 3.2 Bazı lipaz enzimlerinin endüstride kullanım alanları.....	31
Çizelge 6.1 Canlı yapısında bulunan bazı indol türevleri	41
Çizelge 6.2 Bazı indol alkaloid yapıları.....	43
Çizelge 6.3 Doğal kaynaklardan elde edilen bazı oksoindol türevleri	47
Çizelge 7.1 Kullanılan Kimyasallar	48
Çizelge 7.1 (Devam)	49

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın her aşamasında yapmış olduğu değerlendirmeleri ile beni yönlendiren, destekleyen ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam tez danışmanım Sayın Yard. Doç. Dr.Zerrin ZERENLER ÇALIŞKAN' a;

Tezimin hazırlanmasında laboratuvar olanaklarını kullanabilme fırsatını sunan Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. İnci ARISAN ve Sayın Doç. Dr. Ayşegül PEKSEL' e

Tezimin hazırlanma aşamasında gerekli olan HPLC analizleri için olanak sağlayan, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü Organik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ayhan SITKI DEMİR' e

Tez çalışmalarım boyunca göstermiş oldukları yardım ve dostlukları için sevgili çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Nurdagül ORHAN ve Arş. Gör. Nilay ALTAŞ KIYMAZ' a

ODTÜ'de bulunduğum süre içerisinde göstermiş oldukları yardım ve destekleri için Betül SOPACI, ve çok sevgili Farah TALPUR'a

Hayatımın her döneminde olduğu gibi tezimin hazırlanma aşamasındaki bu zorlu süreçte de ilgi ve desteklerini esirgemeyen, maddi ve manevi olarak hep yanımda olan sevgili aileme,

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Kıvılcım ÇAĞLAR

ÖZET

Tetrahidroindoller, kolay aromatize olmalarından dolayı farmakolojik olarak önemli vindolin, vindoresin gibi birçok alkaloidin öncü maddelerini temsil etmektedir. Son yıllarda ilaç endüstrisinde, kiral ilaçların kullanımının artmış olması, biyolojik olarak yüksek aktiviteye sahip bu moleküllerin, optikçe saf formlarının elde edilmesini önemli hale getirmiştir.

Bu çalışmada; tetrahidroindol türevi bileşiklerin, mangan (III) asetat ve potasyum permanganat katalizörlüğünde oksidasyonu yapılarak, lipaz kaynaklı enzimlerle enantiyoseçimli hidrolizleri gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada amaç, lipaz enzimleriyle yüksek enantiyomerik saflığa sahip indol türevleri elde etmek ve kullanılan farklı çözücülerin enantiyoseçiciliğe olan etkisini belirlemektir.

Anahtar Kelimeler: indol, lipaz, enantiyoseçimli sentez

ABSTRACT

Due to their easy aromatization, tetrahydroindoles are good intermediates to synthesize pharmacologically important substances and precursors for a wide variety of alkaloids such as vindoline, vindoresine, ellipticine. In conjunction with the recent increase in chiral drug usage in pharmaceutical industry, providing optically pure forms of these molecules which have high biological activity gained importance.

In this study, the acetoxylation of tetrahydroindole derivatives catalysed by manganese (III) acetate and potassium permanganate and enantioselective hydrolysis utilising lipase based enzymes have been presented.

The aim of this study is to obtain high enantiopure indole derivatives and determine the effects of different solvents to enantioselectivity.

Keywords: Indoles, lipases, enantioselective synthesis

1. GİRİŞ

Biyokatalizör olarak, enzim ya da canlı organizma kullanılması ile gerçekleştirilen kimyasal dönüşümlere biyotransformasyon denir. Bu yöntemde biyokatalizörler, doğal substratları olmayan bileşiklerin kimyasal dönüşümünü sağlamaktadır.

Biyotransformasyon, endüstri ve akademik araştırmalarda kullanılabilen, çok çeşitli uygulama alanlarına sahip, interdisipliner bir çalışma yöntemidir. Deneysel uygulamalarında, kolay ve ucuz metodlar gerektirmesi, gıda teknolojisi, kozmetik endüstrisi, endüstriyel kataliz, medikal kimyası ve ilaç metabolizması gibi endüstrinin pek çok alanında yaygın olarak tercih edilmesini sağlamaktadır. Biyokatalizör olarak kullanılan enzimler, göstermiş oldukları enantiyoseçici, stereoseçici ve regioseçici özellikler sayesinde, optikçe aktif maddelerin sentezinde kullanılarak, asimetrik organik sentezlere alternatif oluştururlar (Doble vd., 2004; Buchholz vd., 2005).

Biyotransformasyon yönteminde, biyolojik sistem olarak canlı organizma ya da bundan izole edilmiş enzimler kullanılmaktadır. Her iki yöntemin de birbirlerine göre çeşitli avantaj ve dezavantajları mevcuttur. Canlı organizma ile yapılan biyokataliz reaksiyonları, kofaktör gerektirmez iken izole edilen enzimlerin büyük bir kısmında kofaktöre gerek duyulmaktadır. Bu da hücrelerin kullanımının, saflaştırılmış enzimlere göre daha ekonomik ve kolay olmasını sağlamaktadır. Buna karşılık, çok basit yapıları hücrelerin bile binlerce enzim içermesi, istenmeyen yan reaksiyonları oluşturmada ve ortam, bu reaksiyonların ürünleri ile kirlenmektedir. Enzimlerin kullanılmasında ise bu sakınca ortadan kalkmaktadır. Ayrıca, mikroorganizmaların sulu ortamlarda aktivite göstermelerine karşılık pek çok organik bileşiğin suda çözünmemesi özelliği taşıması, bu yöntemin uygulanabilirliğini zorlaştırmaktadır. İzole edilmiş enzimlerin büyük bir çoğunluğu ise organik ortamlarda reaksiyon verirler. Ayrıca mikroorganizmalar birden fazla ürün oluşturarak, ürün izolasyonu sırasında parçalanır ve bir başka reaksiyonda tekrar kullanılamazlar. Enzimlerle yapılan çalışmalarda ise reaksiyon sonunda tek bir ürün oluşmakta ve ürün reaksiyon ortamından kolayca ayrılabilir. Ayrıca enzimler, organik ortamdan filtrasyonla geri kazanılarak başka reaksiyonlarda da kullanılabilirler. Canlı organizmalardan izole edilmiş olan enzimler, organik çözücülerde aktivite göstermeleri, reaksiyon ortamından kolay saflaştırılabilirlikleri gibi özellikleri dolayısıyla, canlı organizmalarla yapılan biyotransformasyona karşı üstünlük sağlamak ve endüstriyel alanlarda daha yaygın olarak kullanılmaktadır (Liese, 1999; Skwarczynski, 1999; Panke, 2004).

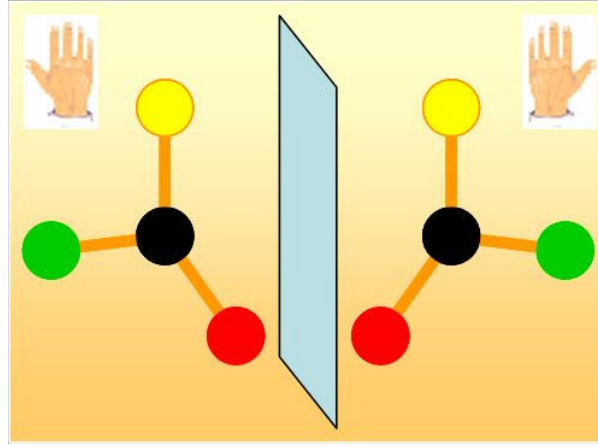
Son yıllarda, endüstriyel ve akademik alanlarda gerçekleştirilen biyokataliz reaksiyonlarında, izole edilmiş enzimlerin kullanımında artış görülmektedir. Biyotransformasyonun, kimyasal katalize kıyasla, ılımlı reaksiyon koşulları, düşük aktivasyon enerjisi ve spesifiklik gibi çok önemli üstünlükleri vardır. Bu üstünlükler, kimyasal olarak çok kompleks yollarla gerçekleştirilebilen veya hiç gerçekleştirilemeyen pek çok reaksiyonun enzimler yardımı ile kolaylıkla yürütmesini sağlar. Bu tür reaksiyonlar aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir;

- Benzer fonksiyonel gruplardan yalnız birinin reaksiyona sokulması,
- Enantiyomerlerden birinin seçimli dönüşüme uğratılması ile rasemik karışımların ayrılması,
- Asimetrik merkeze bir grup sokulması,
- Aktive edilmiş karbon atomunun seçimli olarak fonksiyonel grup haline dönüştürülmesi (Telefoncu, 1997).

2. KİRALİTE VE OPTİKÇE AKTİFLİK

Kiralite konusu ilk olarak, Pasteur'un 1848 yılında, sodyum amonyum tartarat kristallerinin enantiyomerlerini ayırmasıyla ortaya çıkmıştır. Pasteur'un bu keşfi; 1874 yılında, Vant Hoff ve Le Bel'in karbonun düzgün dört yüzlü yapısını öne sürmesine öncülük etmiştir.

Kiral kelimesi “el” anlamındaki Yunanca “cheir” kelimesinden gelmektedir. Kiral moleküller, merkez atomuna 4 farklı grubun bağlanmasından dolayı ayna görüntüsü birbiri ile çakışmayan ve düzlem polarize ışığı sağa veya sola döndürebilen, sp^3 melezleşmesi yapmış, optikçe aktif moleküllerdir. Doğada bulunan birçok madde optikçe aktiftir. Eldiven, ayakkabı gibi pek çok bildik nesne kiraldır.



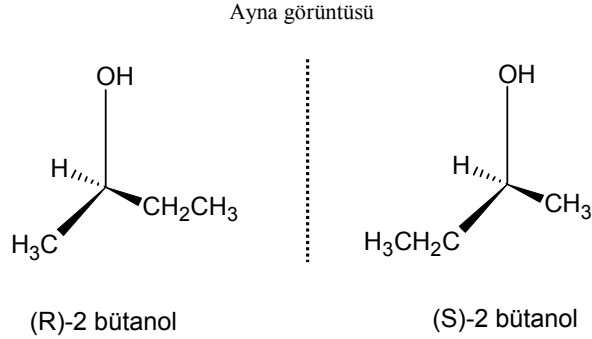
Şekil 2.1 Ayna görüntüsü

Kiral bileşikler, asimetric moleküller olup ayna görüntüsü birbiri ile çakışmayan, birbirine simetrik iki konfigürasyon izomerine sahiptir. Bu iki konfigürasyon izomeri, enantiyomer olarak adlandırılır.

Enantiyomerlerin, erime ve kaynama noktaları, molekül formülleri ile fiziksel özellikleri tamamen birbirinin aynısıdır. Bu moleküller, sadece polarize ışığı farklı yöne çevirmelerine bağlı olarak ayrılmaktadırlar (Solomons, 2002).

Düzlem polarize ışık üzerindeki etkilerinden dolayı enantiyomerlere optikçe aktif bileşikler denilmektedir. Bir enantiyomer polarize ışığı saat yönünde çevirirse dekstro (+), saat yönünün tersi yönde çevirirse ise levorotary (-) ismini almaktadır. Cahn, Ingold ve Prelog terminolojisine göre tetrahedral yapıdaki kiral moleküllerin konfigürasyonları saat yönünde R (rektus) ve saat yönünün tersi S (sinister) olarak tekrar adlandırılmıştır.

Zıt yönde fakat aynı derecede çevirme açısına sahip olan enantiyomerler, ayrı ayrı optikçe aktif olmasına rağmen eşit miktardaki karışımları optikçe aktif değildir.



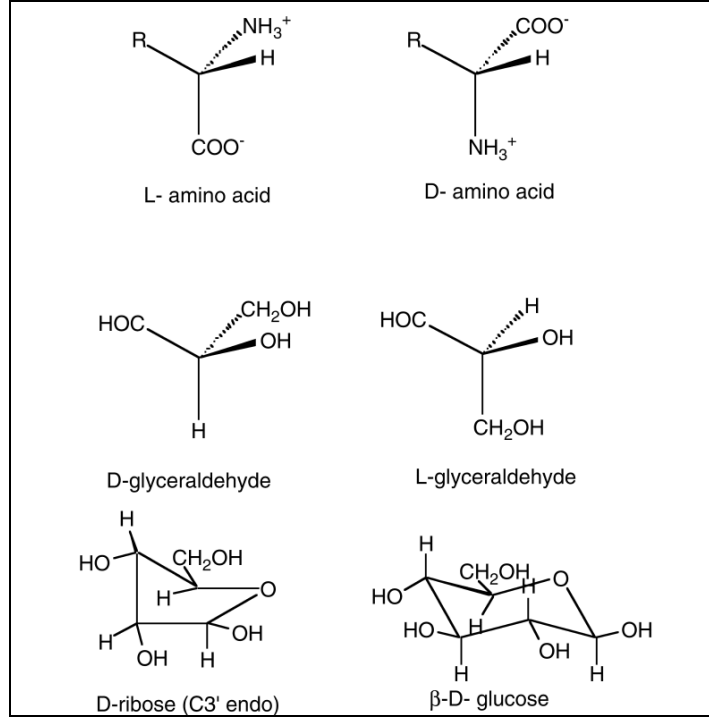
Şekil 2.2 Bütanol

Bir canlı sistemi gibi el seçicilik kazandıracak bir etkinin olmaması durumunda, kimyasal tepkimeler her iki ayna görüntüsünün eşit karışımını oluşturmaktadır. Her bir enantiyomerin 50:50 oranında bulunması sonucu oluşan yapılar rasemik karışım denilmektedir. Rasemik karışımlar, polarize ışığı sağa veya sola döndüremezler. Bu sebeple (+₋) şeklinde gösterilmektedir.

Canlı sistemlerdeki biyolojik makromoleküllerin önemli yapıtaşlarının çoğu tek bir enantiyomerik yapıdadır. Enantiyomerler kiral ortamda farklı iki bileşik gibi davranırlar. Bu nedenle kiral çevrelerdeki kimyasal özellikleri de farklıdır (Davies ve Teng, 2003).

2.1 Kiralitenin Biyolojik Önemi

Doğada bulunan birçok biyomolekül kiral özelliğe sahiptir. DNA, RNA, proteinler ve polisakkaritlerin yapı birimi olan şeker ve aminoasitler, birbirinin ayna görüntüsü olan D ve L enantiyomerik formlarından oluşmuştur. Canlı organizmalarda, bazı istisnalar dışında (örneğin bakterilerin hücre duvarları D-aminoasitlerinden oluşmuş kısa peptit bağları içermektedir) D-şekerleri ve L-aminoasitleri olmak üzere sadece bir enantiyomer formu seçilmiştir. DNA, sağa dönüşlü D-riboz şekerlerinden oluşmuş olarak tanımlanmıştır. Bitki ve hayvanları meydana getiren moleküllerin çoğunluğu kiraldir ve bir türde kiral moleküllerin yalnızca bir formu bulunmaktadır. Doğal proteinleri oluşturan 20 aminoasitin glisin hariç hepsi kiraldir ve hepsi L-aminoasit olarak sınıflandırılır (Johnson, 2005).

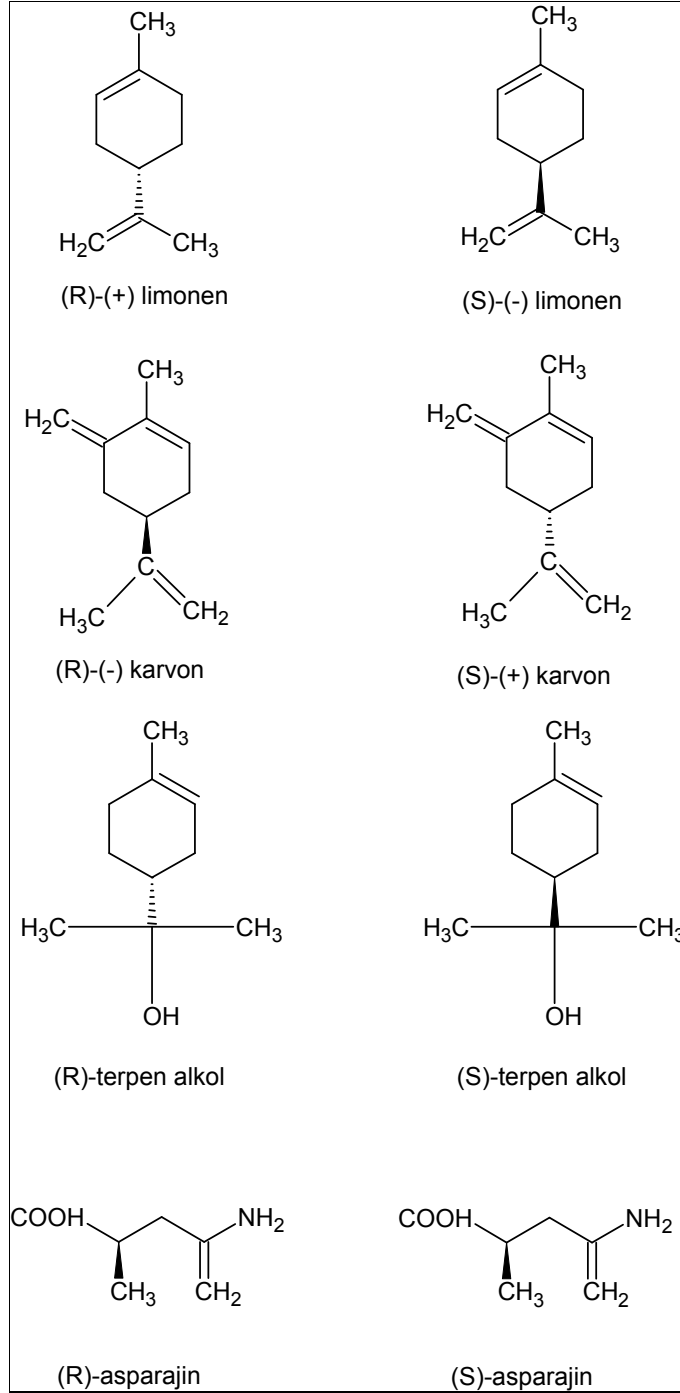


Şekil 2.3 Kiral biyomoleküller

Kiralite, birçok biyomoleküle önemli özellikler kazandırarak, pek çok farklı yolla farklı el seçicilik göstermelerini sağlamaktadır. Özellikle koku ve tat duyularımızda bulunan reseptörlerin kendilerinin de kiral yapıda olmaları, yapılarına uygun olan enantiyomer ile etkileşime geçmelerine olanak vermektedir. Bu da aynı molekülün farklı enantiyomerlerinin farklı özellik taşıması sonucunu doğurur. Doğada buna pek çok örnek verilebilir. Örneğin; limonen (Şekil 2.4) olarak adlandırılan bir bileşiğin bir enantiyomeri portakal kokusundan sorumlu iken, diğer enantiyomeri, limonların kokusundan sorumludur. Karvon (Şekil 2.4) olarak adlandırılan bir bileşiğin bir enantiyomeri keraviye (karaman kimyonu) esansı iken, diğeri nane esansıdır. Ayrıca terpen alkolünün (Şekil 2.4) (R) enantiyomeri leylak kokusunu sağlarken, (S) enantiyomeri pipo kokusunu sağlamaktadır. İlk kez kuşkonmaz bitkisinin yapısından izole edilen asparajin aminoasitinin (Şekil 2.4) (R) enantiyomeri tatlı iken, (S) enantiyomeri acı özellik göstermektedir Yapılan araştırmalar, (R)-nikotin (S)-nikotinden daha zehirli olduğunu göstermiştir.

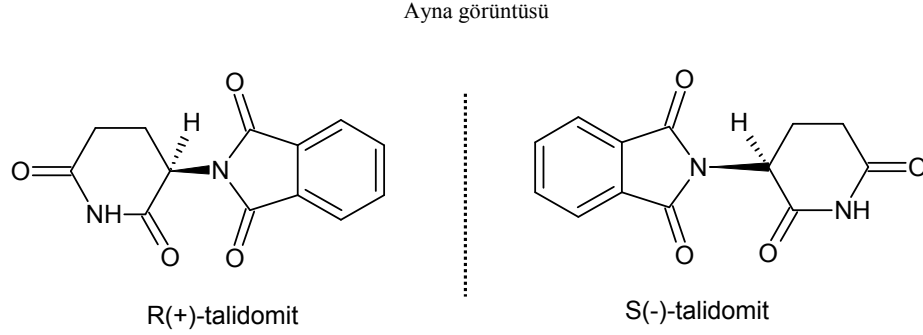
Hormonlar, tiroid tarafından üretilen, çok uzaktaki hücreleri değiştirmek için kana salgılanan kimyasallardır. Hormonların bağlandığı hücre reseptörleri molekülün sadece bir kiral versiyonunu tanırlar. Adrenalin hormonunda, kan damarlarını sıkıştırma özelliği (S) enantiyomerde (R) enantiyomere göre daha fazladır. (R)-Tiroksin metabolizmayı

hızlandırarak heyecanlanmaya ve kilo kaybına neden olan bir hormon iken, (S)-tiroksin bu özelliklerin hiçbirini göstermez. Tiroksin azlığından kaynaklanan Mycodema hastalığına sahip bir hastaya (S)-tiroksin etkili olmadığı için (R)-tiroksin verilmek zorundadır (Solomons 2002; Faber, 1999).



Şekil 2.4 Bazı kiral doğal bileşiklerin molekül yapıları

Enantiyosaf ilaçların önemi, 1960'lı yıllarda hamile kadınlarda sabah bulantıları için kullanılan ve trajik sonuçlar doğuran talidomit (Şekil 2.5) ilacı ile anlaşılmıştır. Bu ilacın kullanımı; USA'de 1000' den fazla çocuğun kusurlu doğmasına sebep olmuştur. Daha sonra yapılan çalışmalarda; talidomitin (R) ve (S) enantiyomerlerinden oluşmuş rasemik bir bileşik olduğu, (R) formunun , hamile kadınlarda ağrı kesici ve sabah bulantılarında tedavi edici etki gösterirken, (S) formunun kusurlu dokuların oluşmasına sebep olduğu ortaya çıkmıştır.



Şekil 2.5 Talidomit ilacının enantiyomerleri

İlaç ham maddesi olarak kullanılan enantiyomer çiftlerinden her birinin farklı reseptörlerle etkileşim halinde bulunarak, farklı farmakolojik etkilere yol açabildiğinin anlaşılması, kiraliteyi ilaç endüstrisinde çok önemli bir konu haline getirmiştir (Davies ve Teng, 2003; Johnson, 2005).

2.2 Kiral İlaçlar

Son yıllarda, enantiyomerik olarak saf elde edilen ilaç ürünlerinin ve tarım kimyasallarının öneminin anlaşılmasıyla birlikte, ilaç endüstrisinde kiral bileşiklerin kullanımı hızla artış göstermiştir (Patel, 2002).

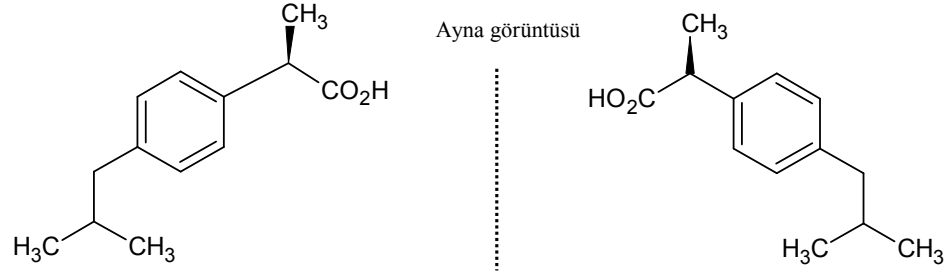
Enantiyomerlerin ilaç dizaynı üzerinde etkileri çok geniş çeşitliliğe sahiptir. “Eutomer” terimi etkili izomer için, “distomer” terimi ise daha az etkili, etkisiz ya da toksik etkili izomer için kullanılmaktadır. Enantiyomer çiftlerinin canlı sistem üzerindeki etkileri aşağıdaki gibi sıralanabilmektedir;

- i. *Enantiyomerlerden biri aktif iken diğeri inaktif özellik göstermektedir.*
- ii. *Her iki enantiyomerde aynı terapötik ya da toksik etkiye sahiptir.*
- iii. *Her iki enantiyomerde aktiftir fakat farklı terapötik ve toksik etkilere sahiptir.*

i. Bir enantiyomer aktif iken diğeri inaktif özellik göstermektedir.

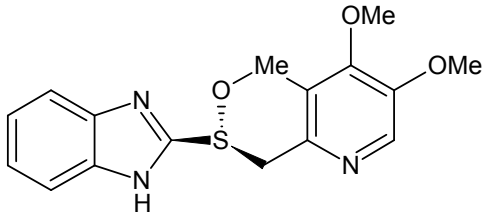
Örneğin ibuprofen, omeprazol, metildopa gibi ilaçlarda enantiyomerlerin bir tanesi diğere göre daha fazla etkilidir.

İbuprofen (Şekil 2.6), rasemik olarak iltihap tedavisinde ağrı giderici ve antipiretik olarak uzun yıllar kullanılmıştır. İbuprofenin yalnızca (S) enantiyomerinin farmakolojik olarak aktif (R) enantiyomerinin ise etkisiz olduğu son yıllarda yapılan çalışmalar sonucu bulunmuştur.



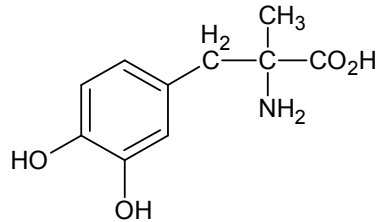
Şekil 2.6 İbuprofen' in enantiyomerleri

Omeprazole (Şekil 2.7), (S)-(+) enantiyomeri, H^+ , K^+ -ATP az inhibitörü olarak ülser tedavisinde kullanılmaktadır. Omeprazolün (S) enantiyomeri diğ er formuna göre 4 kat daha fazla etkilidir.



Şekil 2.7 (S)-(+) Omeprazol

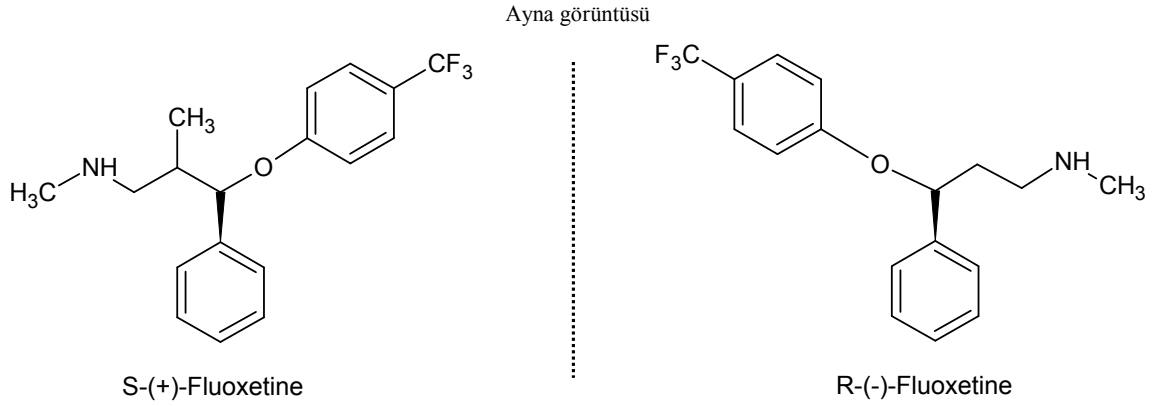
Metildopa (Şekil 2.8), yüksek tansiyona karşı kullanılan bir ilaçtır ve etkisini yalnızca (S) izomeriyle göstermektedir.



Şekil 2.8 Metildopa' nın (S) enantiyomeri

ii. Her iki enantiyomerde aynı terapötik ya da toksik etkiye sahiptir.

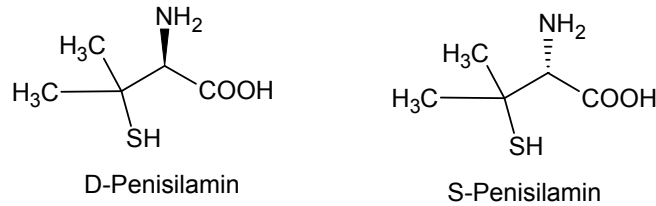
Örneğin Fluoxetine, (Şekil 2.9) serotoninin tekrar geri alınımını inhibe eden, rasemik halde bulunan ve depresyon tedavisinde kullanılan antidepresanların etken maddesidir. Yapılan araştırmalar, her bir enantiyomerin farmakolojik ve biyolojik aktivitelerinin hemen hemen birbirinin aynısı olduğunu göstermektedir. Fluoxetine'nin (S) ve (R) izomerleri, sinirlilik, anksiyete bozukluğu, uykusuzluk gibi rasemik karışımının yol açtığı yan etkilere yol açmamaktadır.



Şekil 2.9 Fluoxetin molekülünün enantiyomerleri

iii. Her iki enantiyomerde aktiftir fakat farklı terapötik ve toksik etkilere sahiptir.

Örneğin penisilaminin (Şekil 2.10), D ve L enantiyomerleri farklı etki göstermektedirler. D-penisilamin vücuttan ağır metallerin atılmasına yol açarken S-penisilamin körlüğe neden olmaktadır.



Şekil 2.10 Penisilamin molekülünün enantiyomerleri

1992 yılında FDA, stereoizomerik ilaç dizaynı ile ilgili bildirisinde; kiral ilaç formlarından sadece bir tanesinin tercih edilir olduğu ancak bu konuda herhangi bir yaptırımda bulunulmadığını belirtmiştir.

Aşağıda sıralanan avantajlar sayesinde enantiyosaf ilaçlarının kullanımı rasemik ilaçlara göre artış göstermektedir.

- İstenmeyen toksik etkiye sahip enantiyomer uzaklaştırılmış olmaktadır.
- Hastanın ilaç dozu yarıya inmiş olmaktadır.
- Stereokimyasal olarak saf aktif enantiyomerlerin farmokinetik/farmokodinamik etkinliğinin ve toksikliğinin değerlendirilmesi sağlanmaktadır.

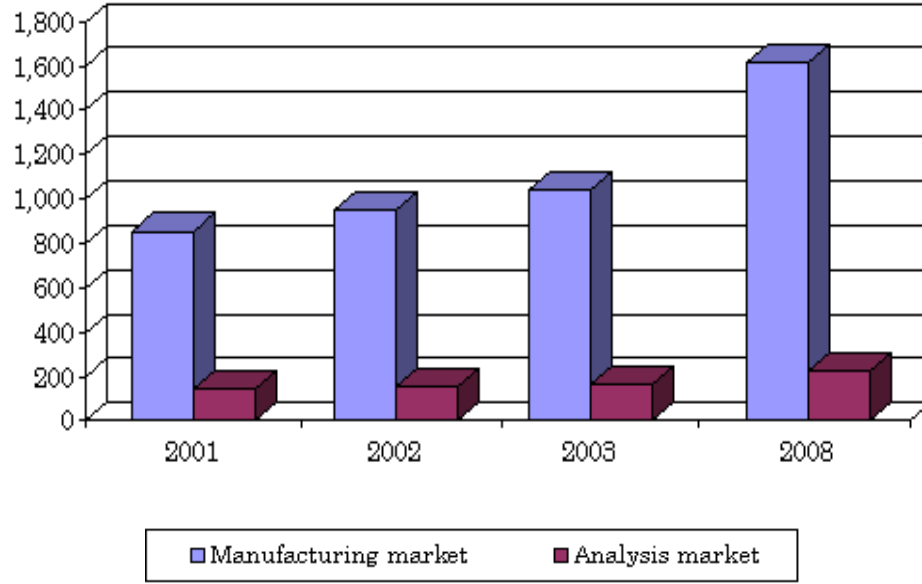
Bu farmakodinamik ve farmokinetik faktörler, tek enantiyomerlerin tercih edilmesini arttırmıştır (Agranat ve Caner, 1999; Davies ve Teng, 2003).

Şekil 2.11' de 2000-2005 yılları arasında çeşitli alanlarda kullanılan rasemik ve kiral ilaçların, 5 yıllık satış raporları tablo halinde verilmektedir (Chiral Pharmaceuticals (2005)).

Çizelge 2.1 Kiral ilaç satışlarının yıllık dağılımı

	Bütün ilaçlar		Kiral ilaçlar		
\$ Milyon	1999	2000	1999	2000	2005
Ağrı kesici	\$21,500	\$23,000	\$1,173	\$1,291	\$1,395
Antibiyotik	29,3	31,7	24,918	26,14	29,747
Antiviral	17,7	19,1	6,717	8,82	12,201
Kanser	13,7	15,6	8,891	10,69	13,605
Kalp-damar	42,7	46,6	24,895	27,65	34,627
Merkezi sinir sistemleri	47,7	53,9	8,439	9,094	14,7
Deri hastalıkları	17,9	18,4	16,202	1,272	1,54
Hormon	20	22	14,51	15,384	19,79
Göz hastalıkları	7,1	7,4	1,27	2,265	2,705
Solunum sistemleri	36,5	40,5	5,696	6,615	9,62
Diğer	45,5	49,2	8,751	10,381	14,05
Toplam	\$360,000	\$390,000	\$117,763	\$132,514	\$171,865

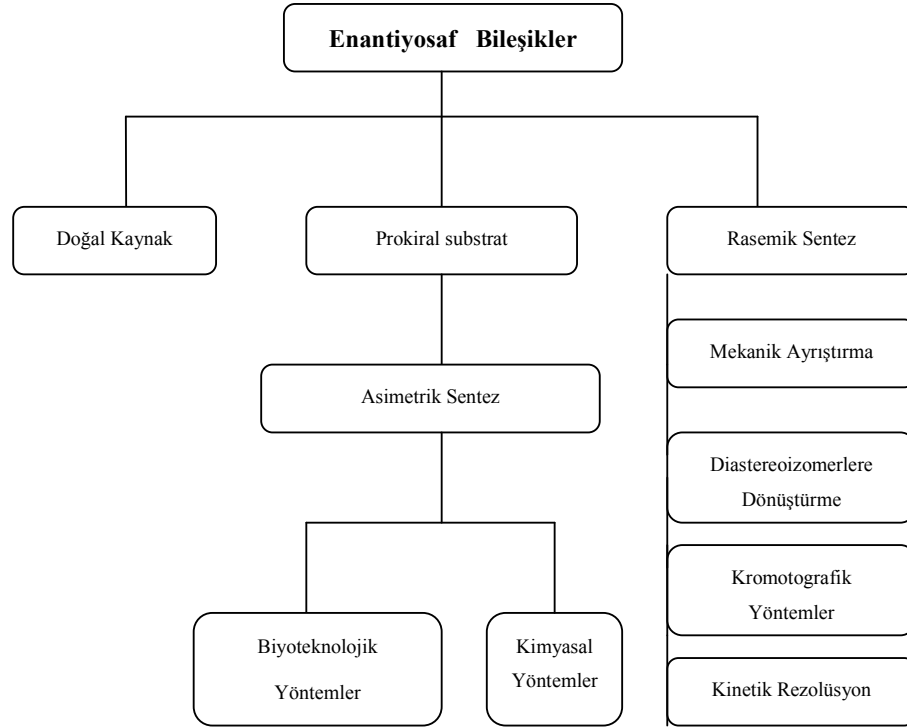
Şekil 2.11’de 2001 ve 2008 yılları arasında kiral ilaçların yıllık satış miktarlarındaki artış görülmektedir (bbc research, 2008).



Şekil 2.11 Kiral ilaçlarının yıllara göre yıllık satış oranları

2.3 Kiral Moleküllerin Sentezleri

Enantiyosaf bileşikler, genel olarak doğal kaynaktan izole edilebildikleri gibi, prokiral substratlardan veya rasemik karışımlardan da elde edilmektedirler.



Şekil 2.12 Kiral moleküllerin elde edilme yolları

2.3.1 Doğal Kaynaktan İzole ile Ayırıştırma

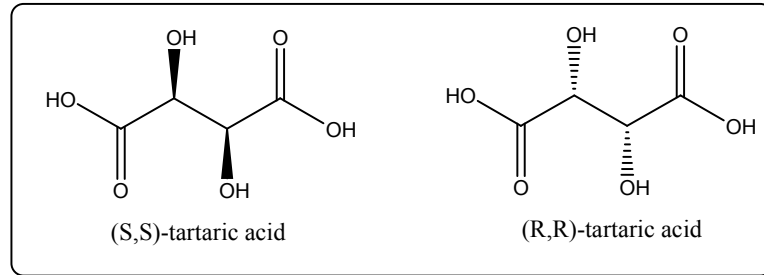
Doğada bulunan moleküller kiral yapıdadır. Bu yöntemde kiral bileşik, doğal bir kaynaktan izole edilir ya da izole edilen kiral bir ön madde üzerinde kimyasal değişiklikler yapılarak elde edilir. Uygun ve ekonomik bir metod olması sebebiyle, doğal kaynaktan izole edilebilen maddeler tercih edilmektedir (Ramsay, 1981).

2.3.2 Rasemik Sentez ve Rezolüsyonu

Rasemik bir karışımın kiral çözücü, absorbant ya da reaktif kullanılarak ayrıştırılmasına rezolüsyon denilir. Enantiyomerlerin kiral ve akiral çevreye karşı farklı davranışları ayrıştırmayı kolaylaştırmaktadır. Bu yöntemde, prokiral bileşiklerden rasemik olarak elde edilen kiral bileşikler, mekanik yol, diastereoizomerlere dönüştürme, kromotografik yöntemler ve kinetik rezolüsyon gibi yöntemler kullanılarak ayrıştırılmaktadır.

2.3.2.1 Mekanik Ayırıştırma

Bu şekilde yapılan ayırıştırma, ilk olarak Pasteur tarafından, rasemik halde bulunan tartarik asiti (şekil 2.13), sodyum amonyum tartarik asit tuzu kristallerine dönüştürerek, enantiyomerlerine ayırması ile 18. yüzyılın ortalarında gerçekleştirilmiştir. Bazı kiral bileşiklerin enantiyomerlerinin tuzları, farklı kristal yapıya sahiptir. Rasemik karışım, uygun bir asit ya da baz ile tuzlarına dönüştürülüp, kristal yapılarının farkından yararlanılarak ayırıştırılma sağlanabilmektedir (Ramsay, 1981).



Şekil 2.13 Tartarik asit

2.3.2.2 Diastereoizomerlere Dönüştürerek Ayırıştırma

Rasemik bileşik, optikçe aktif bir madde ile reaksiyona sokularak diastereomerlerine dönüştürülür. Elde edilen diastereomerler çözünürlük farkından dolayı fraksiyonlu kristalizasyon ile birbirinden ayırıştırılabilirler. Diastereomerler ayırıştırıldıktan sonra uygun bir yöntemle her iki enantiyomer ayrı ayrı geri kazanılır (Blaschke, 1980).

2.3.2.3 Kromatografik Yöntemler ile Ayırıştırma

Enantiyomerlerin, kiral bileşik ya da kiral ortamlarla farklı özellik göstermelerinden dolayı, rasemik karışımları kiral maddelerle yüklü kolonlarla ayırmak mümkündür. Ayırma işlemi için, kullanılan kromatografik yöntemler; ince tabaka kromatografisi, kolon kromatografisi, gaz kromatografisi ve sıvı kromatografisidir (Blaschke, 1980).

2.3.2.4 Kinetik Rezolüsyon ile Ayırıştırma

Rasemik karışımındaki enantiyomerlerin kiral katalizörler yardımıyla başka bir kiral bileşiğe dönüşümü sırasında enantiyomerlerin birisi diğerine göre daha hızlı hareket etmektedir. Bu özellikten yararlanılarak enantiyomerlerin ayırıştırılmasına kinetik rezolüsyon denilmektedir.

Kinetik rezolüsyon;

- Kimyasal kinetik rezolüsyon,
- Enzimatik kinetik rezolüsyon olmak üzere iki şekilde yapılır.

Enantiyomerlerin ürüne dönüşümü sırasında oluşturdıkları geçiş komplekslerinin aktivasyon enerjileri kullanılan kiral katalizörden dolayı farklı olur. Düşük aktivasyon enerjisine sahip geçiş kompleksini oluşturan enantiyomer daha hızlı ürüne dönüşür. Aktivasyon enerjileri arasındaki fark arttıkça düşük enerjili olan enantiyomerin dönüşüm hızı diğerine göre daha fazla olacağından % ee değeri de (enantiyomerik saflık) artacaktır (Strauss ve Faber,1998).

2.3.3 Asimetrik Sentez

Optikçe aktif maddelerin elde edilmesinde kullanılan en önemli yöntemlerden biri asimetrik sentezdir. Prokiral ve meso bileşiklerin deasimetrizasyonu ile yapılır (Strauss ve Faber,1998).

Asimetrik sentezde kiral grup, kiral çevre ve kiral başlangıç maddesinin seçimi oldukça önemlidir.

Bu gruplar seçilirken aşağıda belirtilen faktörler göz önünde tutularak yapılmalıdır:

- Yüksek enantioseçici olmalı,
- Kullanılan grup reaksiyon sırasında yeni bir kiral merkez oluşturmali,
- Reaksiyon bittikten sonra hiçbir rasemizasyona neden olmamalı ve ortamdan basit bir şekilde uzaklaştırılabilmeli,
- Kullanılan kiral grubun enantiyomerik saflığında hiçbir değişiklik olmadan yüksek verimle geri kazanılabilmeli,
- Kiral grubun elde edilmesi ucuz ve hızlı olmalıdır.

Asimetrik sentez büyük ölçeklerde çalışıldığı zaman kullanışlı bir yöntem iken, ilaç sentezlerinin ilk aşamalarında küçük ölçekli çalışmalarda yetersiz kalmaktadır. Asimetrik sentezin diğer bir dezavantajı ise sadece tek bir enantiyomerin elde edilebilir olmasıdır. Oysa rasemat rezolusyonunda her iki enantiyomer çifti de elde edilebilmektedir Optikçe aktif bileşiklerin saf olarak elde edilmesinde kullanılan asimetrik sentez yöntemi, diğer iki yönteme nazaran; uygun koşullar sağlandığında , yüksek verim ve yüksek enantiyosaflik elde edildiği için oldukça fazla tercih edilmektedir.

Kiral substratlar, kiral reaktifler, kiral çevre ya da kiral katalizörler kullanılarak optikçe aktif maddeler elde edilebilmektedir. Kiral katalizör yönteminde, organik katalizörler ve geçiş metallerinin oluşturduğu katalizörler tercih edilmektedir. Son yıllarda gelişen biyoteknoloji yöntemleriyle birlikte biyokatalizörler olan enzimlerle de bu işlemler gerçekleştirilmektedir. Kimyasal yöntemlere göre enzimler; spesifitesi, kolaylığı ve ucuzluğu gibi birçok sebep dolayısıyla daha çok tercih edilmektedir (Anderson ve Allenmark, 2002).

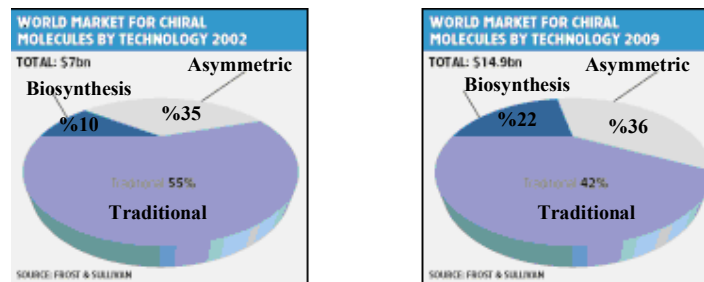
2.3.3.1 Kiral Katalizör Yöntemi ile Asimetrik Sentez

Akiral başlangıç maddesi yine akiral bir reaktif ile kiral katalizör varlığında reaksiyona sokularak kiral bir ürüne dönüştürülür. Bahsedilen diğer yöntemlerde kullanılan yardımcı kiral bileşikler başlangıç maddeleriyle aynı miktarlarda kullanılırken bu yöntemde katalitik miktarda kiral katalizör kullanılır.

Kiral katalizörler, organik katalizörler ve geçiş metallerinin oluşturduğu kiral katalizörler (Rutenyum komplekslerinin oluşturduğu kiral katalizörler gibi) olarak iki farklı şekilde ele alınabilir.

2.3.3.2 Biyoteknolojik Metodlar ile Asimetrik Sentez

Ticari uygulamalarda enzim katalizlerinin kullanılmaya başlanması, biyoteknoloji endüstrisi açısından çok önemli bir gelişmedir. En önemli uygulama alanlarından biri asimetrik organik sentezlerde enzimlerin kullanılmasıdır. Enzimler ılıman şartlarda yüksek etkili çalıştıkları ve enantiyospesifik oldukları için rasemik karışım halinde bulunan kimyasalların optikçe aktif bileşiklerine dönüştürülmesinde kullanılmaktadırlar. Özellikle ilaç endüstrisinde, rasemik karışım halindeki ilaçların yerine tek stereoizomer ilaçların tercih edilmesi organik sentezlerde enzim kullanımının önemini arttırmıştır (Bugg, 2002, Biocatalysis, 2009).



Şekil 2.14 Kiral moleküllerin biyoteknolojik yollarla elde edilme yüzdeleri

3. ENZİMLER

Enzimler, biyokimyasal olayları katalizleyen makromolekül yapısında bulunan kimyasal ajanlardır. Enzimlerin, endüstriyel alanlarda kullanılmaları, çok eski devirlere kadar dayanmaktadır. Antik Mısırdaki, fermentasyon yöntemiyle bira ve ekmek gibi gıda maddelerinin üretildiği bilinmektedir. Enzimler, 1800'lerin başlarında, mide salgıları yoluyla; etin sindirilmesinin, tükürük ve çeşitli bitki ekstraktları vasıtasıyla; nişastanın şekere dönüştürülmesinin incelenmesi üzerine, ilk kez biyolojik katalizör olarak tanımlanarak biyokimya araştırmalarının odak noktası olmuştur. Maya hücrelerinden bazı enzimleri ayırmayı başarak enzimlerin canlı hücre yapısından çıkarıldığında da fonksiyon gösterebildiğini ispat eden Buchner (1897), yeni araştırmalar için öncülük etmiştir. Bu olay, biyokimyacıları birçok farklı enzimin izolasyonunu denemek ve onların katalitik özelliklerini incelemek üzere teşvik etmiştir.

Üreazı izole ve kristalize eden James Sumner (1926), molekülün büyük bir kısmının protein olduğunu göstererek bu alanda yapılan çalışmalara ivme kazandırmıştır. Bugün, binlerce enzim saflaştırılmış ve bunların yüzlercesinin yapısı ve kimyasal mekanizması aydınlatılmıştır. Günümüzde halen modern biyoteknoloji yöntemlerinden faydalanılarak enzimlerle yapılan araştırmalar devam etmekte ve yeni enzimler bulunmaktadır.

Enzimler, kimyasal reaksiyonlardan daha ılıman ortamlarda reaksiyona girmeleri ve yüksek seçiciliğe sahip olmaları nedeni ile başta ilaç endüstrisi olmak üzere tıp, eczacılık, tarım, hayvancılık, çevre, gıda, kağıt, tekstil, deterjan, gıda gibi endüstrinin birçok alanında ve akademik araştırma alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Bugg, 2002).

Enzim kullanımının avantaj ve dezavantajları aşağıdaki gibi sıralanabilir;

Avantajları:

- Etkili katalizörlerdir. Kimyasal katalizlere oranla enzim aracılığıyla gerçekleştirilen reaksiyonlar daha hızlı ve daha etkili gerçekleşmektedir.
- Kimyasal katalizörlere göre daha ılımlı ortam koşullarında etkilidirler. Enzimlerin çalıştığı sıcaklık 20-40 derece arasında değişmektedir.
- Katalizledikleri reaksiyon aralıkları oldukça geniştir. Doğal substrat aralıkları ile sınırlı değildir.

- Kemoselektivite, regioselektivite ve enantiyoselektivite, diastereoselektivite göstermektedirler.
- Bazı enzimler sulu ortamlarda çalışabildikleri gibi organik çözücüler içerisinde de aktivite gösterirler.
- Ekonomiktirler ve yüksek kararlılığa sahiptirler.
- Doğal katalizör oldukları için çevreye zararlı değildirler.
- Reaksiyon ortamından geri kazanılıp tekrar kullanılabilirler.

Dezavantajları :

- Enzimler çoğunlukla L-aminoasitlerden meydana gelmiştir. Bu sebeple farklı konfigürasyona sahip substratlarla etkileşimleri zor olabilmektedir. Ancak, son yıllarda geliştirilen modern biyoteknoloji yöntemleriyle, aktif bölgenin modifikasyonu mümkün olabilmektedir.
- Bazı enzimler, organik çözücülerde deaktivite olmaktadır, bu nedenle yüksek katalitik aktivitelerini sulu ortamlarda gerçekleştirirler. Bu durum organik sentezlerde enzim kullanımını kısıtlamaktadır.
- Enzimler oldukça dar optimum koşullar gerektirirler. Yüksek sıcaklık, pH veya yüksek tuz konsantrasyonu, enzimin deaktivite olmasını sağlamaktadır (Wendy, 2000; Rasor, 2001).

3.1 Enzimlerin Moleküler Yapısı ve Özellikleri

Enzimler, protein yapısında bulunan makromoleküllerdir. Enzimlerin fonksiyonları biyokimyasal reaksiyonları katalizlemektir. Her bir enzim milyonlarca yıldır belirli reaksiyonları katalizlemek üzere evrimleşmiştir. Bu da sentetik katalizlerle karşılaştırıldıklarında, mükemmel katalizörler olmalarının hiç de sürpriz olmadığını göstermektedir. Enzimler bir veya daha fazla substratla etkileşerek ve sadece tek tip kimyasal reaksiyon katalizleyerek oldukça fazla spesifiklik göstermektedirler. Enzimlerin spesifikliği veya özgülüğü, katalize ettikleri belirli reaksiyonlar ile ilgili özellikleridir. Enzimler için çeşitli spesifiklikler (özgüllükler) tanımlanmıştır. Bunlar:

Mutlak spesifiklik: Bir enzimin, yalnızca spesifik bir substratın spesifik bir reaksiyonunu katalize etmesi özelliğidir. Enzimlerin çoğu mutlak spesifiklik gösterirler.

Grup spesifikliği: Bir enzimin, benzer fonksiyonel grupları içeren sınırlı sayıda substrat ile reaksiyonlaşması özelliğidir. Örneğin glukozidazlar glukozidler üzerine, alkol dehidrojenaz ise alkol üzerine etkilidir.

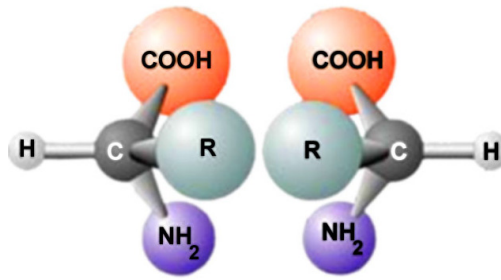
Bağ spesifikliği: Bir enzimin proteinlerin peptid bağı, karbonhidratların glukozidik bağı gibi belli bağ tipleri üzerine etkili olması özelliğidir. Kimotripsin, peptid bağlarının hidrolitik parçalanmasında görevli bir enzimdir; etkili olduğu bağlar ise aromatik halkalı amino asitlerin oluşturduğu peptid bağlarıdır.

Stereospesifiklik: Bir enzimin yalnızca glukozun D veya L izomerleri gibi belli optik izomerlere etkili olması özelliğidir. Örneğin maltaz, α glukozidlere etkili fakat β glukozidlere etkili değildir.

Bazı enzimler aktivite için, protein yapıyı oluşturan amino asit kalıntılarından başka kimyasal komponent gerektirmezler. Bazı enzimler ise kofaktör diye adlandırılan bir ek kimyasal komponent gerektirirler. Kofaktör, ya Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} gibi bir veya daha fazla inorganik iyon ya da koenzim denen organik veya metaloorganik kompleks bir moleküldür. Holoenzim, kofaktörü ile birlikte enzimi ifade ederken, apoenzim holoenzimin protein kısmını ifade etmektedir (Champe, 2000; Bugg, 2002).

Enzimler, peptid bağlarıyla bağlı, α -aminoasit linear sekanslarından oluşan polipeptid zincirleridirler. Linear polipeptid zincirleri daha sonra katlanarak enzime 3 boyutlu yapı kazandırmaktadır.

α -Aminoasitler ayna görüntüsü birbiri ile çakışmayan kiral moleküllerdir. α -Karbon atomunun konfigürasyonuna bağlı olarak her bir α -aminoasit D veya L izomer yapısında bulunabilmektedir. Tüm proteinler sadece L- aminoasitlerinden oluşurlar ve sonuç olarak enzimler kiral yapıdadırlar. D-aminoasitler biyolojik sistemlerde çok nadir olarak bulunmaktadır (Bugg, 2002).

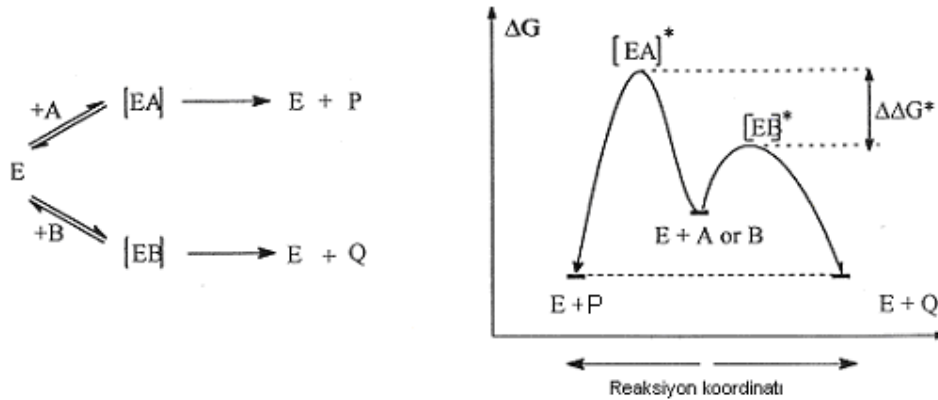


Şekil 3.1 Aminoasitlerde kiralite

Enzimin 3 boyutlu yapısının bir kısmını zayıf bağ kuvvetleriyle stabilize olan ve aktif bölge olarak isimlendirilen, katalitik aktiviteden sorumlu olan kısım oluşturmaktadır. Aktif bölgeyi saran bu kuvvetler, alifatik zincirlerin etkileşimini sağlayan Van der Waals bağları, aromatik bileşiklerdeki Π - Π bağları, molekülün tuz köprüleri arasındaki yükleri, -S-S-kovalent disülfid köprüleri ve enzimin yüzeyini örten su tabakasıdır. Bu özellikler, enzimin üç boyutlu yapısı ve katalitik aktivitenin devamlılığı açısından oldukça önemlidir. Aminoasit yan zincirlerinin dizilişinden oluşmuş hidrofilik oyuk veya yarık şeklinde bulunan aktif bölge, enzimin toplam gücünün % 10-20 sini oluşturur (Wendy ve Loughlin, 2000).

3.2 Enzim Katalizi

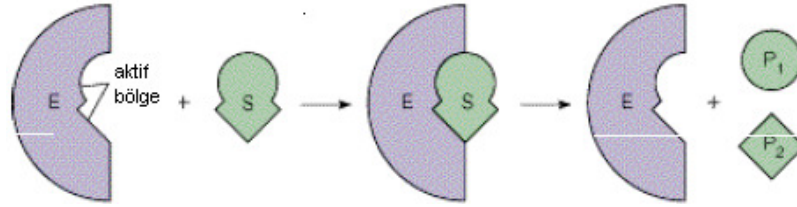
Enzimleri proteinlerden ayıran en önemli özellik, katalitik aktivite göstermeleridir. Aktif bölgedeki aminositlerin yan zincirleri substratın yapısına uyumlu üç boyutlu bir yapı oluşturarak, enzimin katalitik fonksiyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Aktif bölgenin substratı bağlamasıyla önce enzim-substrat kompleksi (ES) daha sonra ise enzim-ürün kompleksi oluşmaktadır. Katalizleme işlemi bittikten sonra ise, serbest enzim ve ürüne dönüşmektedir. Enzimler, substratın bağlanmasıyla oluşturdıkları geçiş kompleksi ile reaksiyonun aktivasyon enerjisini düşürürler. Enzimlerin spesifikliğı, E-S kompleksi oluşumundaki aktivasyon enerjisiyle doğrudan ilgilidir. Enantiyomerik karışımlar için E-S kompleksinin aktivasyon enerjisi farklıdır ve bu fark arttıkça seçicilikte artmaktadır. Rasemik karışımların ayrılmasında enzimlerin bu özelliklerinden yararlanılır (Bugg, 2002).



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

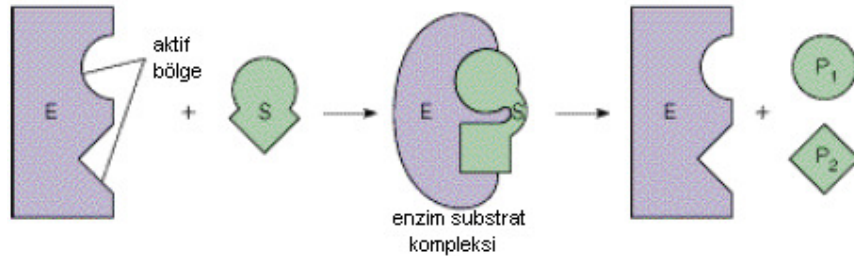
Şekil 3.2 Enzimatik kinetik rezolüsyon enerji diyagramı

Aktif bölgenin substratla ilişkisini açıklamak için anahtar-kilit modeli ve sonradan uyumluluk modeli olmak üzere iki model geliştirilmiştir. 1894 yılında E. Fischer tarafından geliştirilmiş ve enzimin yapısının sabit olarak kabul edildiği anahtar kilit modelinde, enzimlerin kiral moleküller olduğu ve reaksiyonun gerçekleşebilmesi için, tepkimeye giren maddelerin bu kiralılığı tamamlaması gerektiği vurgulanmıştır. Fischer, substrat yapısı ve enzim yapısı arasındaki uyumu anahtarın kilide uyması ile karşılaştırarak, enzimin substratı tanıması için stereokimyasının tümüyle uyum içinde olması gerektiğini belirtmiştir (Fessenden, 1990).



Şekil 3.3 Anahtar kilit modeli

Sonradan uyumluluk modeli ise 1960 yılında Kosland tarafından geliştirilmiştir. Bu modele göre enzimin aktif bölgesi sabit değildir. Substratın enzim ile etkileşmesinden sonra enzimin aktif bölgesi değişikliğe uğrayarak substrata uygun bir yapı kazandırmaktadır.



Şekil 3.4 Sonradan uyumluluk modeli

Dört çeşit enzim substrat etkileşimi mevcuttur :

Elektrostatik Etkileşim : İyon içeren fonksiyonel gruba sahip substratlar aktif bölgelerinde ters iyon içeren yan zincir bulunduran enzimler ile elektrostatik etkileşim göstererek birbirlerine bağlanırlar. Örneğin pozitif grup içeren substrat, glutamat ve aspartat gibi negatif yük bulunduran enzimlerle etkileşim göstermektedirler.

Hidrojen bağları : Bu etkileşim genellikle, polar fonksiyonel grubu içeren substratlarla gerçekleşmektedir.

Non-polar etkileşim (Van der Waals bağları): Van der Waals bağları substrat ve aktif bölge arasında gerçekleşen atom içi etkileşimidir. Aktif Bölgenin yapısı ve substrat yapısı birbirine yüksek uygunluk gösterirse zayıf bir enzim-substrat kompleksi oluştururlar.

Hidrofobik Etkileşim: Substrat hidrofobik yüzeye ya da yan zincire sahip ise enzimin aktif bölgesinin hidrofobik kısmı ile güçlü bir etkileşim gerçekleştirebilir. Hidrofobik etkileşimler, proteinin üçüncül yapısının sürekliliği için oldukça önemli görülmektedir (Champe, 2000; Bugg, 2002).

Enzim kataliz hızı; enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu, sıcaklık, pH, ortamdaki su miktarı, inhibitör ve aktivatör gibi çeşitli faktörlerin etkisi altında kalmaktadır.

Enzim Konsantrasyonu : Enzim ile katalizlenen reaksiyonlarda ortamda yeterli miktarda substrat var ise; reaksiyonun başlangıç hızı (V_1) enzim konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak artar. Reaksiyon hızı belli bir düzeye geldiğinde ise azalır.

Substrat Konsantrasyonu : Enzim ile katalizlenen bir reaksiyonun hızı (V), ortamda enzim miktarının sabit olması koşuluyla, substrat konsantrasyonu (S) ile birlikte hızla artar ve maksimal hız (V_{max}) seviyesine gelinceye kadar hız devam eder. Ancak substrat miktarını arttırmaya devam ettiğimizde bir müddet sonra reaksiyonun hızı sabitleşir.

Enzimlerin çoğu Michaelis-Menten Kinetiği gösterirler. Bu kinetiğe uyan enzimler, değişen substrat konsantrasyonu ve başlangıç hızı (V_0) arasında hiperbolik bir eğri çizerler. Buna karşılık allosterik enzimlerde, bu eğri sigmoidal özellik taşımaktadır.

Sıcaklık : Enzimle katalizlenen reaksiyonlarda, sıcaklığın yükselmesi reaksiyon hızını arttırmaktadır. Ancak enzimler protein yapısında maddeler olduklarından, belli bir ısı derecesinden itibaren enzimin denatürasyonu söz konusu olacaktır.

pH : Enzimatik reaksiyonlar, ortamın H^+ iyonu konsantrasyonundan çok fazla etkilenirler. Her enzimin en iyi çalıştığı pH aralığı farklıdır. Bu aralık genellikle nötr değerine yakındır. Fakat asidik ve bazik ortamlarda çalışan enzimlerde vardır.

Ortamdaki Su Miktarı : Enzimler genellikle sulu ortamda etkili olup su miktarının % 18'in altında olduğu ortamlarda çalışmazlar.

İnhibitörler : Substratlara çok benzeyen ve enzim reaksiyonlarını yavaşlatan bu maddeler, enzimlerle birleşerek enzimleri etkisiz hale getirirler. Bazı inhibitörler ise enzimlerle birleşip enzimlerin parçalanmasına sebep olurlar.

Aktivatörler : Mangan, nikel, klor ve magnezyum iyonları enzimlerin etkinliğini artırır. Bazı aktivatörler enzimin substratla birleşmesini kolaylaştırırken bazıları ise enzimin aktif yüzeyini daha da aktif hale getirerek reaksiyon hızını artırırlar (Champe,2000).

3.3 Enzim Kinetiği

Enzimatik reaksiyonların hızlarının deneysel parametrelerdeki değişmelerle nasıl değiştiklerinin incelenmesi, enzim kinetikleri olarak bilinir. Bir enzimatik reaksiyonun hızı, enzim etkisiyle zaman birimi başına (1 dakikada veya 1 saniyede) oluşan ürünün veya ürüne dönüşen substratın miktarına göre ifade edilir. Bir enzimin aktivitesi, o enzim tarafından katalizlenen enzimatik reaksiyonun hızının, enzim etkisiyle optimal koşullarda belirli sürede ürüne dönüştürülen substrat miktarına göre ifadesidir.

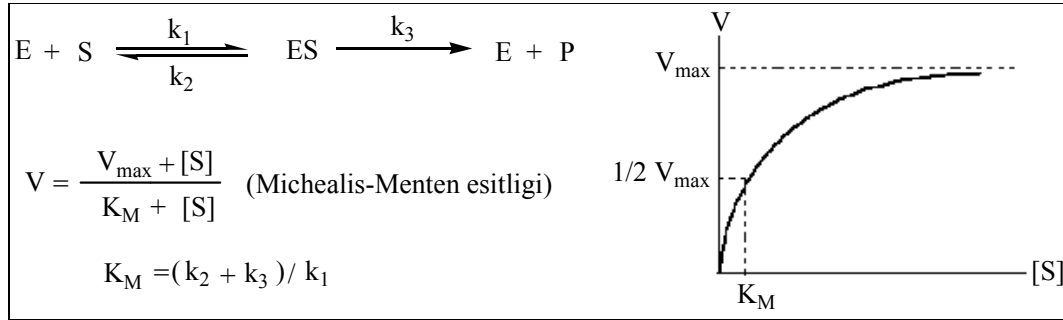
Michealis ve Menten enzimle katalizlenen reaksiyonların birçoğunu kapsayan basit bir model öne sürmüşlerdir. Michaelis Menten denklemi reaksiyon hızının subsrat konsantrasyonuyla nasıl değiştiğini göstermektedir.

V_0 = ilk hız,

$V_{\max}$ = maksimum hız

K_m = Michaelis sabiti

S = Subsrat konsantrasyonu



Şekil 3.5 Michealis-Menten eşitliği

Bu görüşe göre;

E ve S nin göreceli konsantrasyonları : Substrat konsantrasyonu enzim konsantrasyonundan çok daha fazladır. Böylece herhangi bir zamanda enzim tarafından bağlanan substrat miktarı küçüktür.

Denge durumu varsayımı : (ES) zamanla değişmez. Yani ES nin oluşum hızı ES nin yıkım hızına eşittir.

İlk hız : Enzim reaksiyonlarında genel olarak ilk hız kullanılmaktadır.

Bu görüşün sonuçları ;

K_m nin Özellikleri: Michealis sabiti bir enzim belli bir substrata özgüdür ve o enzimin söz konusu substrata ilgisini yansıtır. K_m sayısal olarak $\frac{1}{2} V_{max}$ a eşit olduğu esnadaki substrat konsantrasyonudur. K_m enzim konsantrasyonu ile değişmez.

Hız ile enzim konsantrasyonu arasındaki ilişki : Bütün substrat konsantrasyonlarında reaksiyonun hızı enzim konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Örneğin enzim konsantrasyonu yarıya indirildiğinde reaksiyonun hızı orijinalin yarısına düşer.

Reaksiyon basamağı : (S) K_m den çok küçük ise reaksiyonun hızı substrat konsantrasyonu ile kabaca orantılıdır. (S) K_m den çok büyükse hız sabit ve V_{max} a eşittir. Bu durumda reaksiyon hızı substrat konsantrasyonlarından bağımsızdır (Champe,2000).

3.4 Enzimlerin Adlandırılmaları ve Sınıflandırılması

Kiralitenin öneminin anlaşılmasıyla birlikte, kolesterol, alzheimer, antikanserojen, hipertansiyon gibi birçok alanda etki gösteren ilaçların sentezinde kullanılan ilaç yapı taşlarının stereoseçici dönüşümlerinde enzimlerden yararlanılmaktadır. Bu tür biyodönüşümlerde, değişik enzim sınıfları kullanılmaktadır.

Günümüzde Uluslararası Biyokimya Birliğinin (UIB) enzim komisyonu tarafından kabul edilen sistematik isimlendirme kullanılmaktadır. UIB'a göre; her enzim katalizlediği reaksiyon tipine ve mekanizmasına göre isimlendirilmektedir.

Bu sisteme göre enzimler 6 grupta incelenir:

- Oksido-redüktazlar (EC.1): Elektron transferi yapan enzimlerdir. Yani oksidasyon redüksiyon reaksiyonlarını katalizler.
- Transferazlar (EC.2): Grup transferi yapan reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir. Hidrojen dışında herhangi bir atom veya atom grubunun (metil, karboksil, amino, fosfat grupları) bir molekülden diğerine aktarılmasını sağlar.
- Hidrolazlar (EC.3) : Glikozidaz, anhidrid, esterler, amidler, peptidler ve diğer C-N grupları içeren fonksiyonların hidrolizini sağlar.

Hidrolaz enzimlerinin alt grupları:

E.C.3 Hidrolazlar

E.C.3.1 Ester bağıny hidroliz edenler

E.C.3.1.1 Karboksilik ester hidrolazlar

E.C.3.1.1.3 Triasilgliserol lipaz

E.C.3.2 Glikozil bileşiklerini hidroliz edenler

E.C.3.3 Ester bağlarını hidroliz edenler

E.C.3.4 Peptid bağlarını hidroliz edenler

E.C.3.5 Peptid dışında kalan C-N bağlarını hidrolize edenler

E.C.3.6 Asit anhidrit bağlarını hidroliz edenler

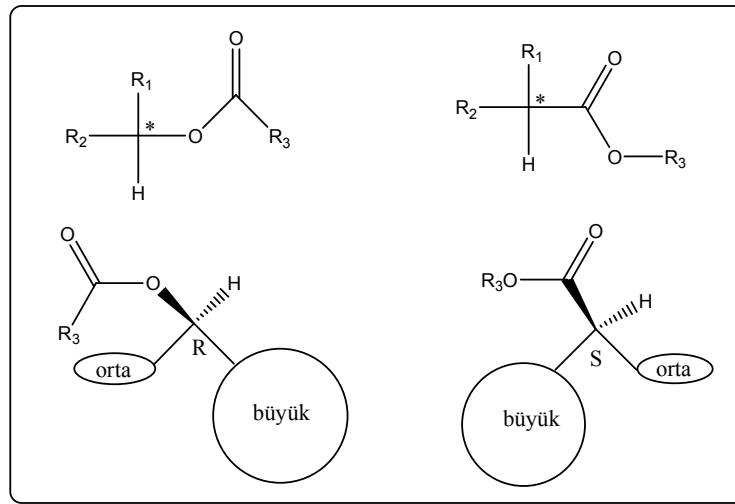
- Liyazlar (EC.4) : Bir molekülden su molekülü çıkarmadan bir grubu koparan enzimlerdir. HX gibi grupların uzaklaştırılıp bağlanarak C=C, C=N ve C=O gibi çift bağlı yapıları katalizleyen enzim grubudur.
- İzomerazlar (EC.5) : Geometrik, optik veya yapısal izomerlerin birbirine dönüşümünü katalizleyen enzimlerdir. Cis-trans izomerleri, rasemazlar bu gruba giren enzimlerdir.
- Ligazlar (EC.6) : ATP ve GTP gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinden fosfat bağının kopması sonucu ortaya çıkan enerji yardımıyla iki molekülün bağlanmasını katalizleyen enzimlerdir (Wendy ve Loughlin, 2000; Bugg, 2002).

3.5 Lipaz Enzimleri

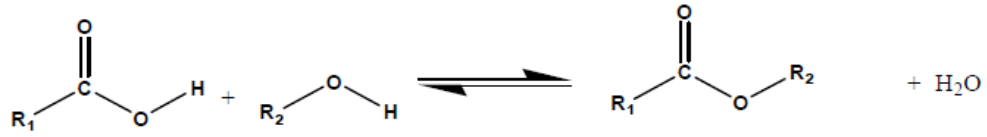
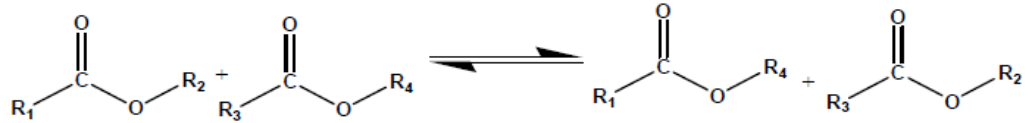
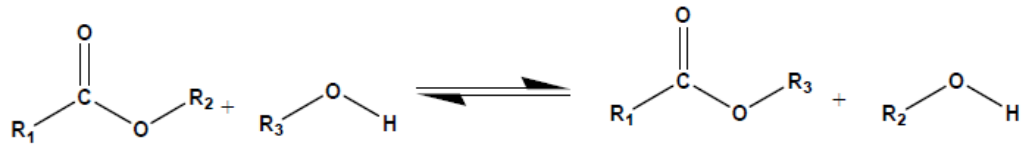
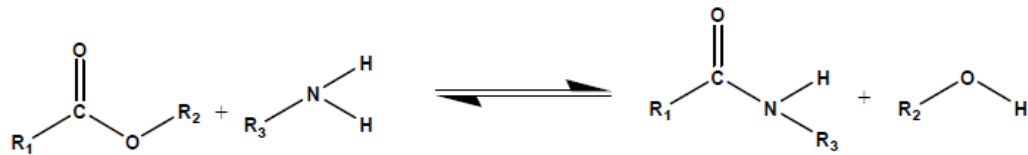
Lipaz enzimi, ökaryotik canlılarda sindirim, absorpsiyon gibi çeşitli lipid ve lipoprotein metabolizmasından sorumludur. Su-yağ arabiriminde, triaçilgliserollerin hidrolizlerini katalizleyerek gliserol ve yağ asitlerine dönüştürme özelliğine sahip olan lipazlar (trigliserol açilhidrolazlar, E.C. 3.1.1.3), doğada çok yaygın olarak mikroorganizmalar, bitkiler ve yüksek yapıllı hayvansal organizmalarda bulunmaktadır (Hasan vd., 2006).

Organik çözücüler içerisinde katalitik aktivite gösterebilme özellikleri, endüstrinin çeşitli alanlarında yaygın olarak kullanılmasını sağlamıştır. Doğal substratlarından farklı olarak, organik çözücüler içerisinde daha geniş aralıkta substratları etkileyerek transesterleşme, iç esterleşme ve esterleşme gibi, sulu ortamda gerçekleşmesi mümkün olmayan reaksiyonları katalizleyebilmektedirler (Castro, 1995; Sharma vd., 2001).

Doğal substratı olan trigliseridlere ek olarak, bazı düşük ve yüksek molekül ağırlıklı esterler, amidler, poliol/poliasit esterleri ve bunların alkolleri lipaz enzimi tarafından substrat olarak kabul edilir. Lipazlar, kiral asitlerin esterlerinin hidrolizinden daha çok kiral alkollerin esterlerinin hidrolizi için yararlıdırlar. Lipaz enzimlerinin büyük çoğunluğu, sekonder alkollerin “Kazlauskas kuralına” uygun esterlerini tercih ederler (Faber, 1999).



Şekil 3.6 Kazlauskas kuralı

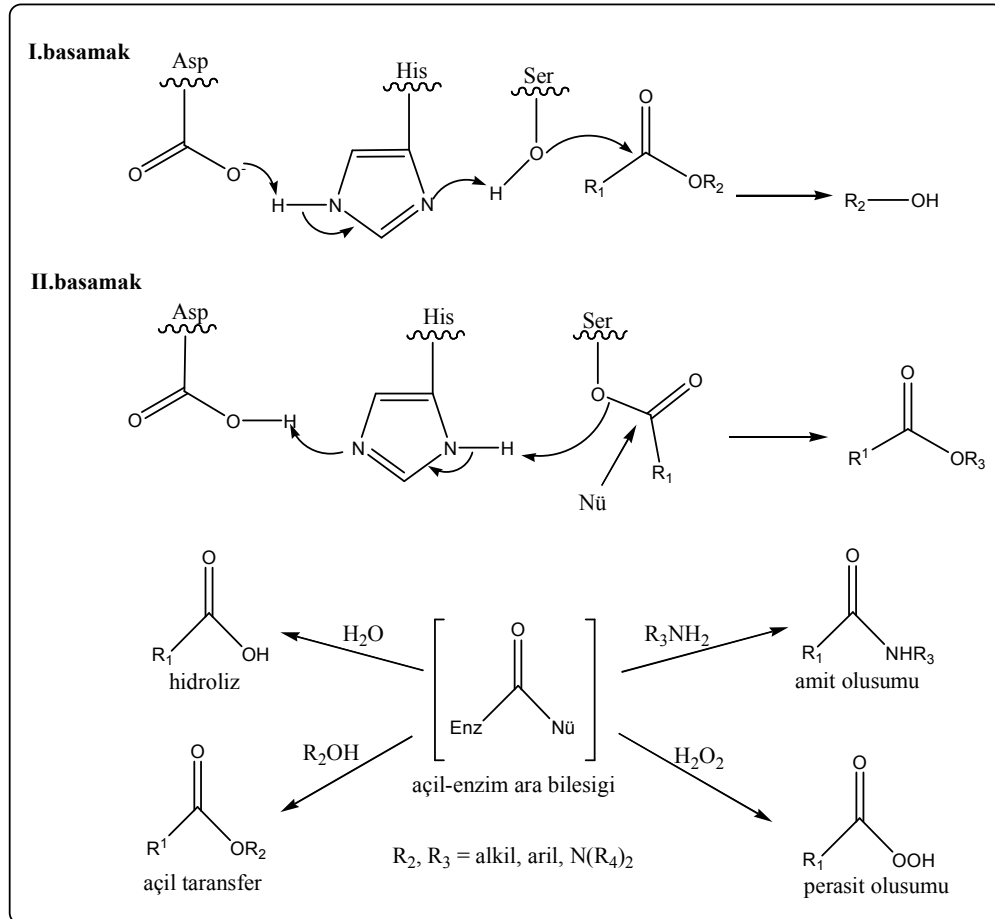
1. Hidroliz**2. Esterleşme****3. Transesterleşme****A. Asidoliziz****B. İnteresterleşme****C. Alkoliz****D. Aminoliziz**

Şekil 3.7 Lipaz enzimlerinin katalizlediği tepkimeler

Lipazlar, α ve β hidrolaz sınıfı ailesine ait, serin hidrolazlardır. Aktif bölgede, her iki taraftan α -heliksler ile kaplanan hidrofobik β düzlemi ve katalitik triad olarak adlandırılan serin, glutamat aspartat ve histidin formlarını içermektedir (Schmidt,1998; Faber, 1999).



Şekil 3.8 Lipazların üç boyutlu yapısı



Şekil 3.9 Serin hidrolaz mekanizması.

Lipaz enziminin aktif bölgesi α -heliks yapısında bulunan bir oligopeptid tarafından korunmaktadır. Su yağ ortamının yokluğunda aktif bölge bu kısa α -heliks zinciri tarafından kapatılır ve enzim inaktif duruma geçer. Su yağ ortamı varlığında ise enzim yüzeyinin su ve yağ ile etkileşmesi ile enzimin aktif bölgesini kapatan α -heliks kapağı geri katlanarak açılır ve enzim aktif hale gelir (Faber, 1999 ; Manfred, 2002).

3.5.1 Lipaz Enziminin Özellikleri

Günümüzde lipazlar, hem sulu hem de susuz ortamlarda yapılması çok güç olan reaksiyonları katalizleyebilen önemli biyokatalizörler arasında yer almaktadır. Farklı kaynaklardan elde edilen lipazlar, konumsal spesifiklik, yağ asiti spesifikliğı, termostabilite, optimum pH koşulları gibi birçok durum açısından çok büyük bir çeşitlilik göstermektedir. Fakat genel olarak taşıdıkları özellikler aşağıda sıralanmaktadır:

- Ilıman koşullarda aktivite göstermektedirler.
- Doğal substrat spesifitelerinin yanında, geniş bir substrat aralığına sahiptirler.
- Kemo, regio ve stereoseçici özellik taşımaktadırlar.
- Organik çözücülerde yüksek aktivite gösterebilmektedirler.
- Uygulandıkları reaksiyonlarda kofaktöre gerek duyulmamaktadır.
- Reaksiyonlarda göstermiş oldukları yüksek spesifikliklerinden dolayı, istenmeyen yan ürünler az elde edilmektedir.
- Doğada yaygın olarak bulunması sebebiyle kolay ve ucuz uygulama alanları sağlamaktadırlar.
- Lipazların kristal yapısının tamamıyla çözülmesi istenilen şekilde dizayn edilebilmesini sağlamaktadır (Sharma, 2001; Eggert ve Erich, 2002).

3.5.2 Lipaz Çeşitleri

Lipazlar mikrobiyal, bitkisel ve hayvansal olmak üzere çok çeşitli kaynaklardan elde edilebilmektedirler. Mikrobiyal enzimler, bitki ve hayvan kaynaklı enzimlere göre daha fazla tercih edilmektedir. Bunların sebepleri aşağıda görüldüğü gibi sıralanmaktadır;

- Fazla miktarda lipaz saflaştırılabilmektedir.
- Hayvan ya da bitki kaynaklı lipazlara göre daha kararlıdır.
- Genetik manipulasyonu kolaydır.
- Çok çeşitli katalitik aktivite göstermektedirler.
- Yüksek ürün eldesi gösterirler.
- Mikroorganizmaların çabuk büyümeleri sebebiyle kolay ve ucuz elde edilebilmektedir.
- Elde edilen ürünler, daha güvenilir ve kullanım için uygundur (Hasan vd., 2006).

3.5.3 Mikrobiyal Lipazlar

Mikrobiyal lipazlar; bakteri, mantar veya maya kaynaklı olabilmektedir. Ticari olarak kullanılan lipaz enzimlerinin büyük bir kısmı mikroorganizmalardan ekstrasellüler olarak elde edilmektedir. Endüstride kullanılan lipaz enzimlerinden sadece 6 tanesi bakteri kaynaklıdır. Bu enzimler, maya kaynaklı enzimlerle karşılaştırıldıklarında; yüksek aktivitesi, nötral ya da alkalın pH'a sahip olmaları ve termostabil özellik taşımaları sebebiyle daha çok tercih edilmektedir. Endüstride en çok tercih edilen lipaz kaynaklı bakteri türleri; *Achromobacter sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus sp.* ve *Chromobacterium sp.* şeklinde sıralanabilmektedir.

Pseudomonas türü bakteri lipazları (*Pseudomonas Fluorescens*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Pseudomonas Cepacia* ve *Pseudomonas Glumae*) çok seçici biyokatalizörlerdir. Aktif bölgelerinin dar yapılı olmasından dolayı büyük substratlarla etkileşimlerinde başarısız oldukları görülmüştür. Fakat substrattaki küçük dallanmalarla yüksek seçicilik gösterebilmektedirler. Enantiyoseçilimli sentezlerde en çok tercih edilen enzim çeşidi lipazdır.

Endüstride en çok tercih edilen lipaz kaynaklı mantar türleri; *Aspergillus niger*, *Candida cylindracea*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Rhizopus arrhizus*, *R. Delemar*, *R. Japonicus*, *R. Niveus* ve *R. Oryzae* şeklinde sıralanmaktadır. *Mucor miehei* (IM 20) ve *Candida antarctica* (Sp 382) lipazları organik çözücü yokluğunda yağ asitlerinin esterifikasyonu ve transesterifikasyonundan sorumludur.

Candida (*Candida lipolytica*, *Candida anatractica* ve eskiden *Candida Cyclindracea*) türüne ait lipazlar, sekonder alkollerin esterlerinin rezolüsyonunda ve α -substitüye karboksilatların rezolüsyonunda yaygın olarak kullanılırlar. *Candida cylindracea* substrat olarak büyük grup içeren esterleri tercih ettiklerinden, halkalı yapıya sahip esterlerin hidrolizinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar.

Mucor türü lipazlar (*Mucor miehei*, *Mucor javanicus*) biyotransformasyon çalışmalarında oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır.

Çizelge3.1’de lipaz enzimi üreten bazı bakteri, mantar ve mayaların listesi verilmiştir (Sharma vd., 2001; Hasan vd., 2006).

Çizelge 3.1 Lipaz enzimi üreten bazı mikroorganizmalar

mantar	maya	bakteri (gram pozitif)	bakteri (gram negatif)
<i>Rhizopus niveus</i>	<i>Candida rugosa</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Pseudomonas cepecia</i>
<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Candida antarctica</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Rhizopus arrhizus</i>	<i>Candida cylindracea</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Cromobacterium viscosum</i>
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Acinebacter radioresistens</i>
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Pichia sivicola</i>	<i>Staphylococcus canosus</i>	<i>Aeromonas Hydrophila</i>
<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Sirobasidium magnum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Penicillium roqueforti</i>	<i>Sterigmalomycetes elviae</i>	<i>Staphylococcus hyicus</i>	
<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Rhodotorulaminula</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
<i>Penicillium camambertii</i>		<i>Lactobacillus delbruckii</i>	
<i>Mucor miehei</i>		<i>Streptococcus lactis</i>	
<i>Mucor javanicus</i>		<i>Micrococcus luteus</i>	
<i>Mucor hiemalis</i>		<i>Propionibacterium acne</i>	
<i>Rhizomucor miehei</i>		<i>Burcholderia glumae</i>	
<i>Alternaria brassicicola</i>		<i>Bifidobacterium bifidum</i>	

3.5.4 Lipaz Enzimlerinin Kullanım Alanları

Lipaz enzimleri, hem sulu hem de organik çözücülerde yüksek aktivite göstermeleri, geniş substrat aralıkları ve uygun çalışma koşulları sebebiyle endüstrinin birçok alanında tercih edilir duruma gelmiştir. Lipazların endüstri alanındaki en önemli uygulama alanları deterjan, gıda, kağıt mamülü, tekstil, organik sentezler, kozmetik ve ilaç sanayiidir. Özellikle kemo, regio, ve enantioseçilimli davranışlar göstermesi bu enzimlerin ilaç sanayiinde kullanımını yaygınlaştırmaktadır.

Lipazların yağları hidrolizleme yetenekleri, onları deterjan endüstrisinde önemli bir katalizör haline getirmiştir.

Lipazlar gıda endüstrisinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Peynir ve ekmek yapımında, et ve balık ürünlerinden yağ asitlerinin uzaklaştırılması, peynir aromasının artırılması ve peynir olgunlaşmasının hızlandırılması gibi çok çeşitli alanda kullanılmaktadır.

Kağıt endüstrisinde ise kağıt hamurundan çeşitli maddeler uzaklaştırılarak kağıt yapımını sağlamaktadır. Bu alanda *Candida rugosa* lipazı odun triglisaridlerinin % 90 nının hidrolize edilmesini sağlamaktadır.

Lipaz enziminin göstermiş olduğu kemo, regio ve enantiyoseçicilik ise organik sentezlerde yaygın olarak tercih edilmesini sağlamaktadır (Sharma vd., 2001; Hasan vd., 2006).

Çizelge 3.2 Bazı lipaz enzimlerinin endüstride kullanım alanları

Tip	Kaynak	Uygulama alanları
Bakteri	<i>Burkholderia cepacia</i>	Organik Sentezler
	<i>P.alkaligenes</i>	Deterjan sanayii
	<i>P. mendocina</i>	Deterjan sanayii
	<i>P.fluorences</i>	Gıda sanayii
Mantar ve Mayalar	<i>Candida rugosa</i>	Organik Sentez
	<i>Candida antarctica</i>	Organik Sentez
	<i>R. miehei</i>	Gıda sanayii

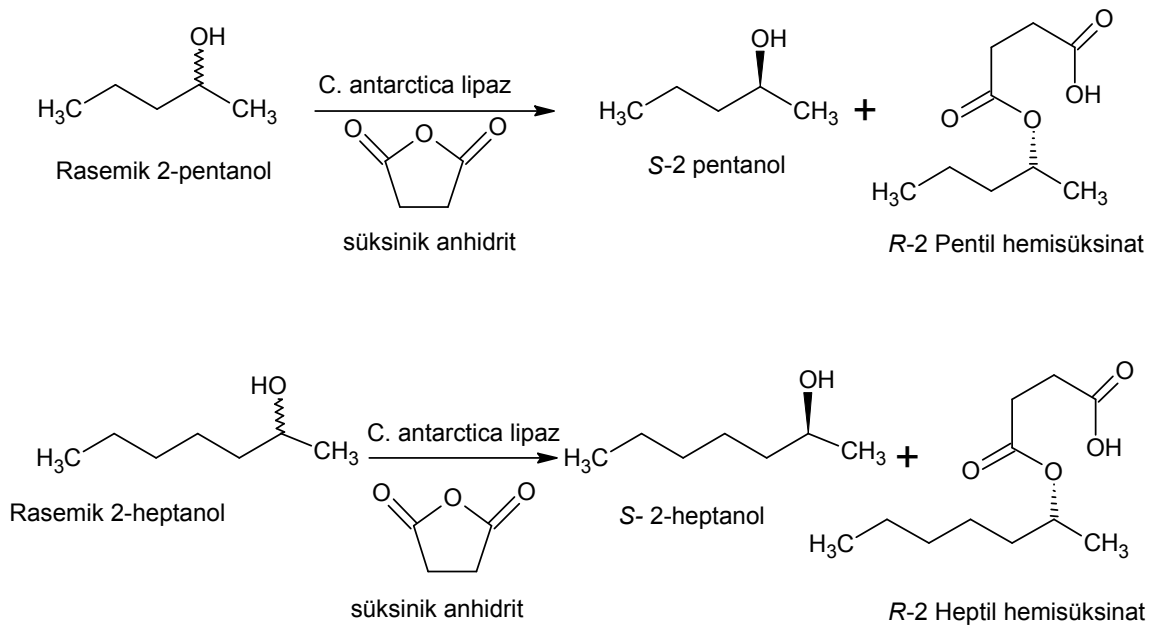
3.5.5 Lipaz Enzimi İle Enantiyoseçilimli Sentezler

Lipaz enzimleri, rasemik karışımların rezolüsyonunda, farmakolojik, agrokimyasal ve pestisit gibi kiral yapı birimlerinin sentezinde katalizör olarak kullanılabilir. Son yıllarda, kiral ilaçların öneminin anlaşılması ve lipaz enzimlerinin bu alanda kullanılabilirliği, lipaz katalizörlüğünde gerçekleştirilen enantiyoseçilimli sentezlerde artışa neden olmuştur.

Gelişen moleküler biyoloji teknikleri; lipaz enziminin üç boyutlu yapısının belirlenmesini sağlayarak bu alanda yapılan çalışmalara hız kazandırmaktadır. Bu sebeple; lipaz enziminin enantiyoseçiciliğini artırma ya da istenilen konfigürasyonu elde etmek amacıyla, aktif bölgenin modifikasyonu sağlanmakta; istenilen özelliğe sahip rekombinant lipaz enzimleri üretilebilmektedir. Örneğin iltihap giderici olarak kullanılan naproxen ve ibuprofen; ACE inhibitörü olarak kullanılan captopril, enalapril, ceranopril, zofenapril ve lisinopril ve kalsiyum kanallarının bloklanmasında kullanılan diltiazem gibi ilaçlar lipaz enzimi kullanılarak enantiyosaf olarak elde edilmiştir (Schmidt, 1998).

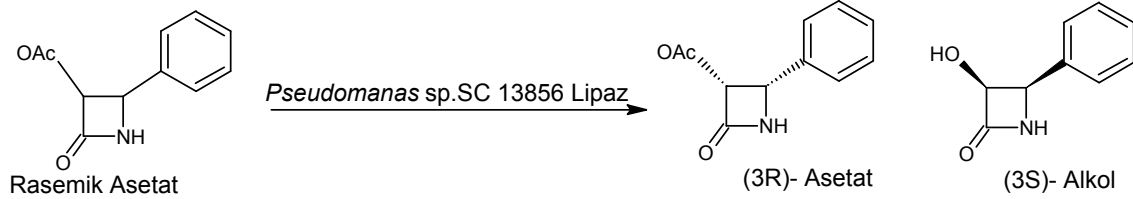
3.5.6 Lipaz Katalizi ile Bazı İlaçların Enantiyoseçilimli Sentezleri

Anti-Alzheimer ilaçlarında önemli bir aracı molekül olarak kullanılan (S)-2-Pentanol'un enantiyoseçilimli sentezleri lipaz katalizi ile gerçekleştirilmiştir. *Candida antarctica* kaynaklı lipaz enzimi kullanılarak, (S)-2-pentanol % 49 verimlilikte ve % 99 ee değeriyle, (S)-2-heptanol ise % 44 verim % 99 ee değeriyle elde edilmiştir.



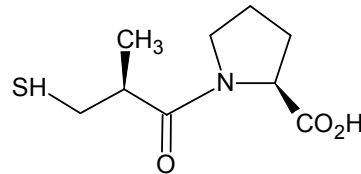
Şekil 3.10 Rasemik 2-pentanol ve 2-heptanol' ün lipaz katalizli reaksiyon şeması

Çeşitli kanser tiplerinin tedavisinde kullanılan paclitaxel'in, lipaz enzimiyle enantioseçilimli sentezleri yapılmıştır. Paclitaxel yan zincirleri olan C-13 cis-3-(asetoksi)-4-fenil-2-azetidinon rasemik asetatının enantioseçilimli hidrolizleri *Pseudomonas cepecia* PS-30 ve *Pseudomonas sp* SC 13856 lipazı ile gerçekleştirilerek, (3R) asetat için % 48 verimlilikte ve % 99.5 ee değerinde ürün elde edilmiştir (Patel, 2002).

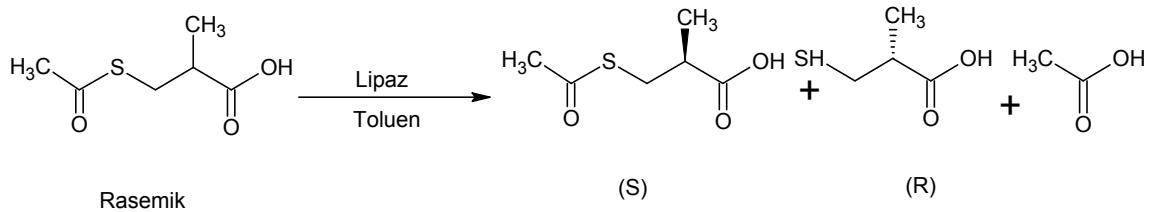


Şekil 3.11 Paclitaxel yan zinciri rasemik asetat'ın *Pseudomonas sp* SC 13856 lipazı ile sentezi

Renin-angiotensin-aldosteron sisteminin baskılanmasında antihipertansiyon ajanı olarak kullanılan captopril'in lipaz enzimiyle enantioseçilimli sentezi yapılmıştır. Captopril, ACE (Angiotension Converting Enzyme) inhibitörlüğü ile angiotensin I'in angiotensin II'ye dönüşmesini engelleyerek, mercapto alkonil konfigürasyonuna bağlı olarak ACE inhibitörü özelliği taşımaktadır. S konfigürasyonunun R konfigürasyonuna kıyasla 100 kat daha aktif olduğu tespit edilen captopril'in yan zinciri, *Rhizopus oryzae* ATCC 24563 ve *Pseudomonas cepecia* lipazı PS-30 ile (S) enantiyomeri % 24 verimlilikte % 95 ee ile elde edilmiştir (Patel, 2002).



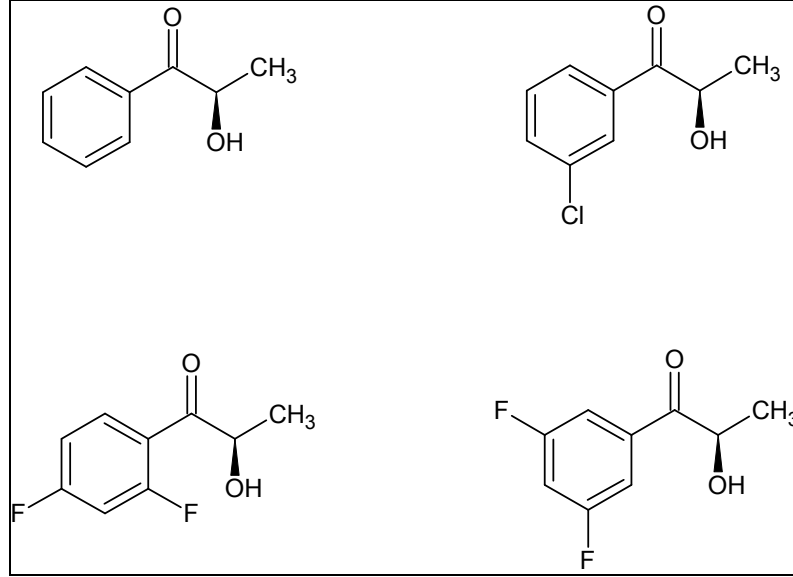
Şekil 3.12 Captopril



Şekil 3.13 Captopril yan zincirinin lipaz katalizli reaksiyon şeması

4. α -HİDROKSİ KETONLARIN ÖNEMİ

α -Hidroksi ketonlar, biyolojik olarak aktif doğal ürünlerin asimetrik sentezlerinde yapı birimleri olmaları sebebiyle, endüstri ve akademik çalışmalar açısından çok büyük bir önem taşımaktadırlar. Ayrıca 2-hidroksipropiyofenon türevlerinin sentezinde anahtar ara üründürler. Aşağıda belirtilen (Şekil 4.1) hidroksi ketonlar, farmakolojik olarak önemli çeşitli hidroksipropiyofenon türevleri için aracı yapı birimleridir.



Şekil 4.1 Hidroksipropiyofenon türevleri

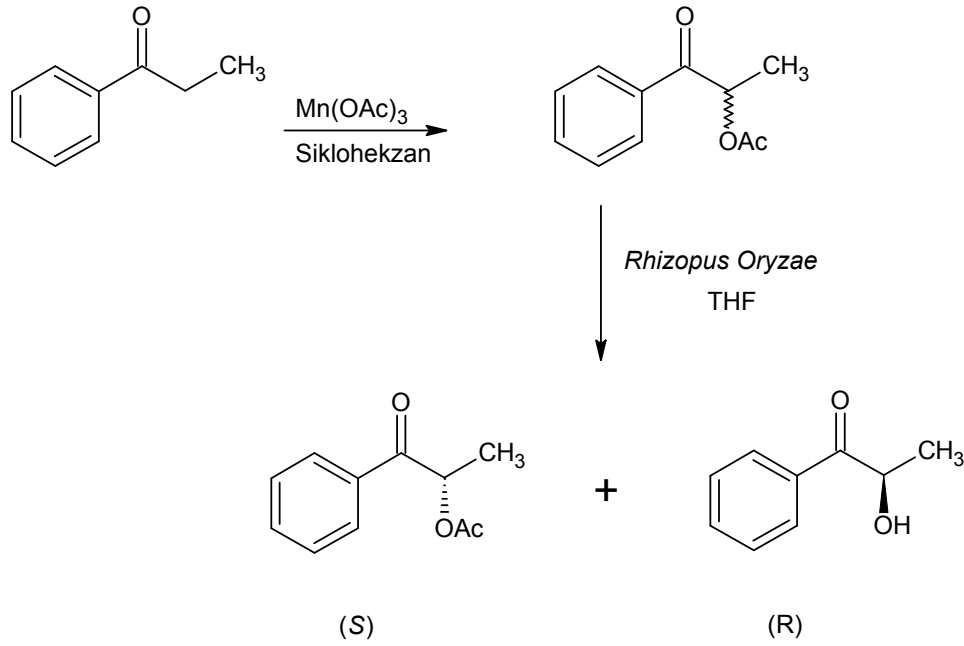
Optikçe aktif α -hidroksi ketonların elde edilebilmesi için, birçok kimyasal metod geliştirilmiştir.

Bunlar;

- Optikçe aktif enolatların stereoselektif oksidasyonları,
- Prokiral enolatların oksidasyonunda optikçe aktif oksoziridinlerin kullanılması,
- Kiral titanyum enolatların oksidatif seçilimleri,
- Silil enol eterlerin asimetrik oksidasyonları gibi yöntemlerdir.

Kimyasal metodlara alternatif olarak optikçe aktif α -hidroksi ketonların biyokatalizör kullanılarak sentezleri; aromatik aldehytlerden C-C bağı oluşumuyla, α -diketonların indirgenmesiyle, rasemik α -hidroksi ve α -asetoksi ketonların kinetik rezolüsyonu ve derasemizasyonu ile gerçekleştirilmektedir (Demir ve Hamamcı; 1998, 2001,2002).

Demir ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, α -asetoksi enonların α -hidroksi enona hidrolizi için birçok enzim grubu denenmiş ve en iyi sonucun *Rhizopus oryzae* mantarı ile elde edildiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada; ilk önce $Mn(OAc)_3$ katalizörlüğünde ketonun oksidasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra *Rhizopus oryzae* lipazı ile yüksek enantiyomerik saflığa sahip α -hidroksi keton elde edilmiştir (Demir ve Hamamcı, 2001).



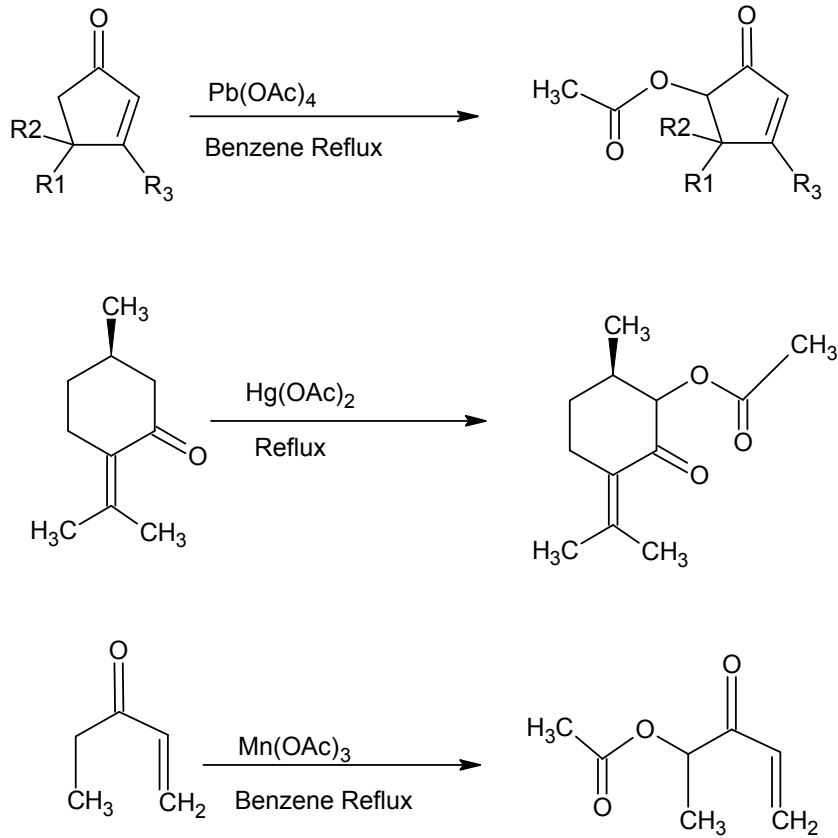
Şekil 4.2 α -asetoksi ketonların enantiyoseçilimli hidroliz reaksiyonu

5. ENONLARIN ASETOKSİLASYONU

Enonların seçici α -asetoksilasyonu, farmakolojik olarak önemli bileşikler ve kiral ligandlar için anahtar rolü oynamaktadır. Kurşun (IV) asetat, civa asetat, mangan (III) asetat gibi katalizörlerle enonların α -asetoksilasyonu gerçekleştirilebilmektedir. William ve Hunter, enonlarla yapmış oldukları çalışmalarda; $Mn(OAc)_3$ katalizörlüğünde elde edilen oksidasyon ürünleri ile kurşun(IV) asetat kullanılarak elde edilen oksidasyon ürünlerini karşılaştırmışlar ve mangan (III) asetat ile elde edilen ürünlerin daha verimli sonuçlar verdiğini, daha ılımlı reaksiyon koşulları gerektirdiğini görmüşlerdir.

Watt ve arkadaşları ise; yapmış oldukları oksidasyon çalışmalarında, susuz $Mn(OAc)_3$ kullanmışlar ve daha verimli sonuçlar elde etmişlerdir.

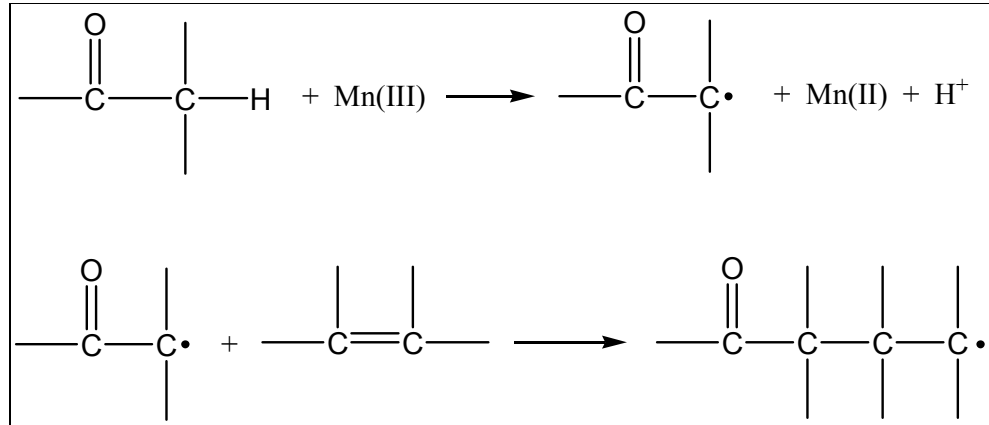
Günümüzde, $Mn(OAc)_3$ katalizörlüğünde yapılan asetoksilleme reaksiyonları α -asetoksi ve α,β doymuş ketonların elde edilmesini sağlayan en verimli ve en çok tercih edilen metottur (Demir vd., 2004).



Şekil 5.1 Enonların α oksidasyonu

Mangan (III) asetat aracılığıyla yapılan oksidasyon çalışmaları genel olarak iki sınıfa ayrılmaktadır.

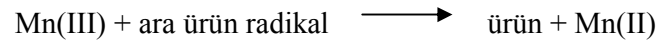
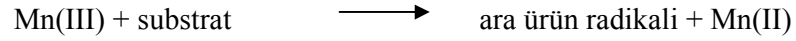
1. Direkt Oksidasyon : İç veya dış tabakadan substratın bir elektron oksidasyonudur. Bu oksidasyonla; mangan (III) kompleksi oluştuktan sonra ara ürün radikalinin oksidasyonu ürün belirleyici olmaktadır. Bu oksidasyon sınıfına; alkollerin oksidasyonu, amino ve kükürtlü bileşiklerin, karboksilik asit ve çeşitli aromatik grupların oksidasyonu gibi çok çeşitli örnekler verilebilmektedir.
2. Dolaylı Oksidasyon : Mangan (III) asetat ile etkileşime geçmiş olan aracı radikalın formasyonundan sonra gerçekleşen substratın dolaylı yoldan oksidasyonudur. mangan(III) asetat, α -hidrojen atomu taşıyan bileşiklerin karbonil grubuyla birlikte olefinik ve aromatik doymamış sistemlere katılma reaksiyonlarını sağlamaktadır.



Şekil 5.2 Mangan III asetatın dolaylı oksidasyon mekanizması

Substrat yapısı ve reaksiyon koşulları primer radikal ürünün yapılandırılması açısından oldukça önemlidir. Eğer substrat genel oksidantlardan daha az reaktif ise, mangan (III) asetat serbest radikal üreticisi olarak kullanılabilir. Co(III), Ce(IV) gibi bir elektron yükseltgeyicileri ve Tl(III), Pb(IV) gibi iki elektron yükseltgeyicileri mangan(III) asetat ile benzer özellikler gösterirler. Mn(III) asetatın diğer oksidantlara üstünlüğü, düşük reaktivite vermesine rağmen yüksek selektivite göstermesidir.

Fazla miktarda Mn(III) asetat kullanılması hızlı oksidasyona ve ligand transfer reaksiyonu ile asetat reaksiyonuna neden olmaktadır. Mangan (III) asetat katalizörlüğünde gerçekleşen reaksiyonların basit şeması aşağıda gösterilmiştir:



Suyun varlığında komplikasyonlar gelişebilmektedir. Su, trivalent manganın Mn(IV) ve Mn(II)'ye disproporsiyonuna yol açar ve alternatif 2-elektron oksidasyonlar Mn(IV) tarafından meydana gelebilir.

Mangan (III) asetat ayrıca, doymamış olefinik sistemlere aldehit grubunun ve ketonların katılması, doymamış sistemlere haloalkanların katılması gibi reaksiyonlarda kullanılabilmektedir (De klein, 1986).

Çok çeşitli reaksiyonların C-C ve C-O bağ formasyonlarını sağlamada çok başarılı sonuçlar elde edilmiş olsa da Mn(III) asetat ile yapılan çalışmaların çeşitli dezavantajları bulunmaktadır. Bunlar;

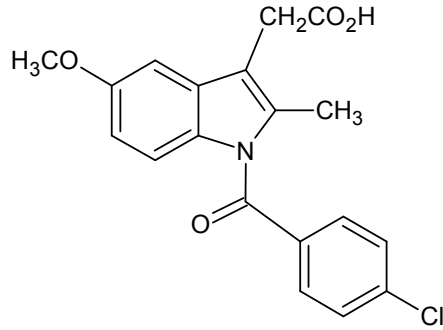
- Kabul edilir reaksiyon zamanı ve ürün miktarı için fazla miltarda Mn(III) asetat gerektirmesi,
- Literatür raporları dikkatle incelendiğinde bazı çalışmalar sonucunda Mn(III) asetatın iyi sonuçlar vermediği ve reaksiyon verimlerini düşürdüğüne görülmesi şeklinde sıralanabilmektedir.

Literatürde; enonların ve aromatik ketonların α -asetoksilasyonlarına farklı bir yaklaşım olarak % 74-96 verim ile elde edilen KMnO₄ ve asetik asit/karboksilik asit ile yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Bu şekilde yapılan çalışmalar; kolay yolla gerçekleşen reaksiyon mekanizmaları, yüksek seçicilik göstermeleri ve ekonomik oluşları ile diğer katalizörlere üstünlük sağlamaktadırlar (Demir ve Fındık, 2008).

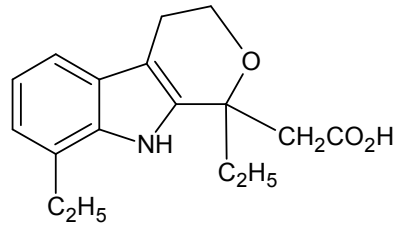
6. İNDOL TÜREVLERİNİN ÖNEMİ

Endüstriyel ve akademik çalışmalarda önemli bir yere sahip olan indol türevleri, biyolojik aktivitesi yüksek, heterohalkalı bileşik sınıflarından biridir. Pek çok bileşik, çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olan indol halkasını, yapısında bulundurmaktadır. Doğal ürünlerin ve sentetik olarak elde edilen ilaç öncü maddelerinin, büyük bir kısmında indol çekirdeğine rastlamak mümkündür (Kuethe ve Davies 2006, Huleatt vd., 2008).

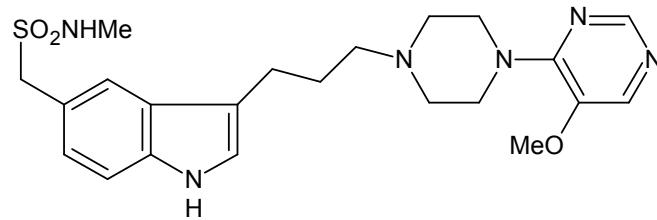
İndol halkası içeren çok iyi bilinen ilaçlar arasında, iltihap giderici özellik gösteren indometazin (Şekil 6.1), etodolak, (Şekil 6.2), migren tedavisinde kullanılan avitriptan (Şekil 6.3), sumatriptan (Şekil 6.4), ve antidisritmik özellik gösteren stobadin (Şekil 6.5) yer almaktadır (Soltes vd., 2000; Horton vd., 2002 ; Singh vd., 2008).



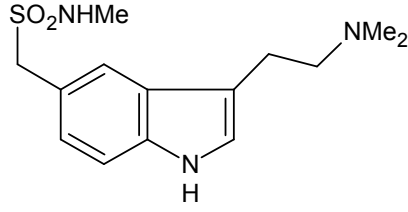
Şekil 6.1 İndometazin



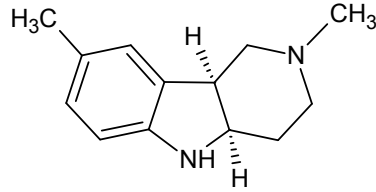
Şekil 6.2 Etodolak



Şekil 6.3 Avitriptan



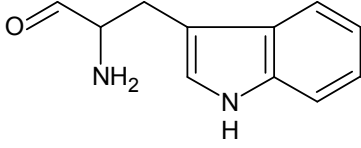
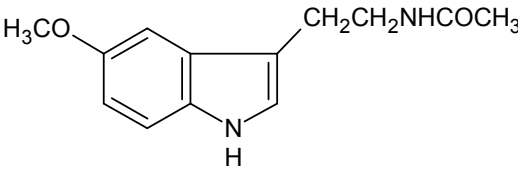
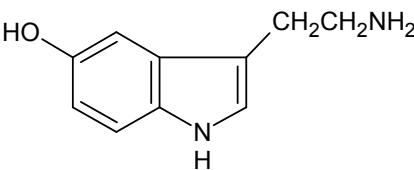
Şekil 6.4 Sumatriptan



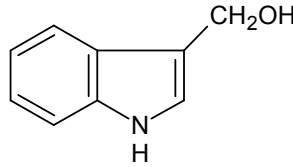
Şekil 6.5 Stobadin

Canlı organizmaların, bazı temel yapıtaşlarında da indol halkası bulunmaktadır. Örneğin triptofan (Şekil 6.6) aminoasitinin yapısında, önemli bir yapıtaşı olarak indol çekirdeği yer almaktadır. Ayrıca melatonin (Şekil 6.7), serotonin (Şekil 6.8), triptamin, 3-metil-indol gibi triptofan türevi birçok doğal üründe de bulunmaktadır. Bu yapılar arasında en dikkat çekici olanı; triptofanın hidroksilasyonu ve dekarboksilasyonu sonucu oluşan nörotransmitter bir madde olan serotonin (Şekil 6.8) molekülüdür. Bunun yanında; 3-metil-indol, melatonin ve serotonin, ilaç geliştirilmesinde kullanılan önemli bileşiklerdir (Reddy vd., 2002; Horton vd., 2003; Spadoni vd., 2006).

Çizelge 6.1 Canlı yapısında bulunan bazı indol türevleri

İndol Yapısı	Bulunduğu yapı	Aktivite
 Şekil 6.6 Triptofan	Aminoasit	Melatonin, serotonin, triptamin gibi yapıların oluşturulmasını sağlar. B3 vitaminin oluşumuna katılır.
 Şekil 6.7 Melatonin	Hormon	Kardiyovasküler sistem, sindirim sistemi ve immun cevabı düzenleme etkileri vardır. Suproksit dismutaz, glutation peroksidaz, glutain redüktaz, katalaz ve glukoz-6-fosfat dehidrojenaz gibi birçok antioksidan enziminin üretilmesi sağlamakta ve aktivitesini kuvvetlendirmektedir. MT₁ ve MT₂ membran reseptörlerine bağlanma özelliği göstermektedir.
 Şekil 6.8 Serotonin	Hormon	kardiyovasküler, gastrointestinal sistemlerin kas fonksiyonunun düzenlenmesi ile trombosit fonksiyonunun düzenlenmesinden sorumlu bir (5-hidroksitriptamin) yapıdır

İndol halkası, sentetik olarak elde edilebildiği gibi, doğal olarak bazı canlılarda da bulunmaktadır. İndol-3-karbinol bileşiği (Şekil 6.9), lahana, brokoli gibi sebzelerin ana ürünü olarak bulunmakta ve kimyasal koruyucu özellik göstermektedir. İndol-3-karbinol (Şekil 6.9) ve diindolmetan ürünlerinin, insanlarda meme ve prostat kanser hücreleri üzerinde apoptasis (doğal hücre ölümü) etki gösterdikleri bilinmektedir. Deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda, indol-3-karbinol bileşiğinin birçok kanser çeşitine karşı koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir (Chemopr, 1997 ; Kemdi vd., 2004).

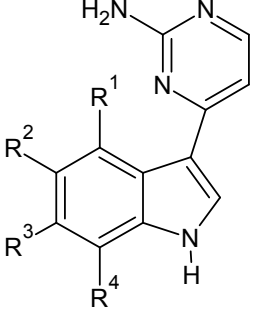
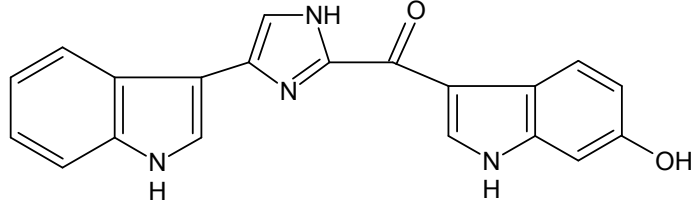
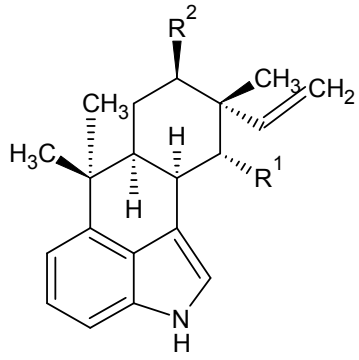


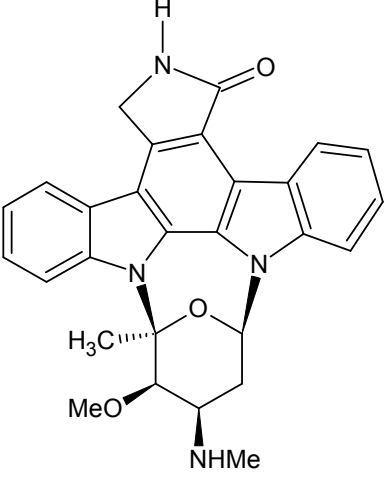
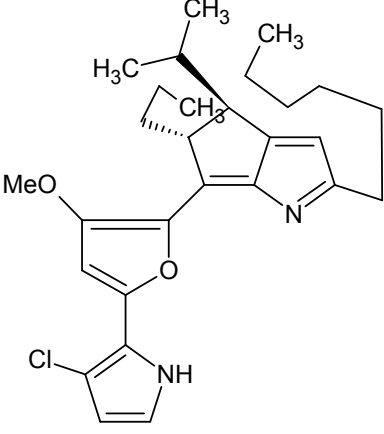
Şekil 6.9 İndol-3-karbinol

İndol türevlerinin genel olarak; apoptasis (doğal hücre ölümü) uyarıcı, sitotoksik özellikleri, antioksidan etkileri, hücre bölünmesine karşı etkileri, hücre döngüsü parametrelerinin modülasyonu, BRCA1 ve BRCA2 gibi tümör baskılayıcı genlerin aktivasyonu, çeşitli hücre sinyal yollarına etkileri, androjen ve östrojen hormonlarının değişmesine sebep olmaları gibi çok çeşitli antitümör ve koruyucu özelliklerinin yanında, HPV16 onkogen transkripsiyon mekanizmasının indirgenmesini sağlayarak, antiviral aktiviteye sahip olduğu, in vitro ve in vivo olarak ispatlanmıştır. Ayrıca, antibakteriyel, antikonvülzan, antitumor, antimetastaz olarak kullanılan ilaç etken maddeleri ile depresyon tedavisi ve nörojenik aktivitelerde etkili olduğu bilinmektedir (Pathak vd., 2004 ; Gendy vd., 2008; Rieck ve Fiander, 2008).

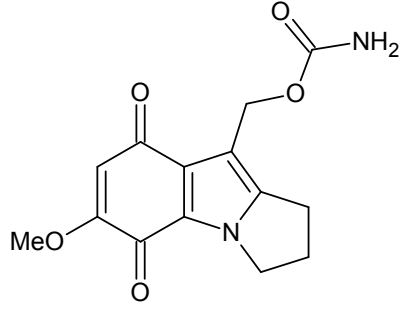
Çeşitli mikroorganizmalardan, bitkilerden ve deniz canlılarından izole edilen indol alkaloidleri, antimikrobiyal, sitotoksik, antikanserojen özellikler göstererek önemli bileşik sınıflarını oluşturmaktadırlar. Biyoaktif alkaloidler, en fazla indol çekirdeğine bağlı olarak bulunmaktadır (Çavdar ve Saraçoğlu, 2005). 3-sübstitüye indoller, yüksek biyolojik aktiviteye sahip deniz alkaloid sınıfının yapısını temsil ederek, imidazole (topsentin, nortopsentin), dihidroimidazole (discodermindol), oxazole (martefrgin,amazol), oxadiazin(alboinon), maliemid (didemidines), piperazine (dragmacidon) gibi halkalı yapıları oluşturmaktadır. 3-sübstitüye indoller, genel olarak anti enflamatuar ve analjezik etkiye sahiptirler. Çizelge 6.2' de çeşitli deniz canlılarından ve bakterilerden izole edilmiş bazı indol alkaloidlerinin yapıları gösterilmiştir (Franco vd., 1998; Radvan vd., 2006; 2007).

Çizelge 6.2 Bazı indol alkaloid yapıları

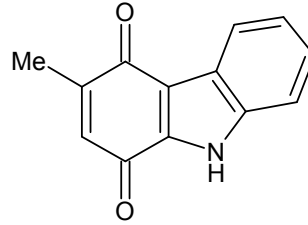
İndol yapısı	Bulunduğu canlı	Biyolojik aktivitesi
 Şekil 6.10 Meridianin $R^1=OH, R^2=R^3=R^4=H$	<i>Splidium meridianin</i> <i>Aplidium meridianum</i> (deniz canlısı)	sitotoksik etki (tümör hücrelerine karşı protein kinaz inhibitörlüğü) (Franco vd., 1998; Radvan ve El-Sherbiny, 2006)
 Şekil 6.11 Topsentin	<i>Spongosorites ruetzleri</i> (deniz süngeri)	sitotoksik antifungal antiviral (Sakemi ve Sun, 1990).
 Şekil 6.12 Hapaloindol $R^1=NC, R^2=Cl$	<i>Hapalosiphon fontinalis</i> (mavi yeşil alg)	antibakteriyel antimikotik aktivite (Moore vd., 1986)

 Şekil 6.13 Staurosporin	<i>Streptomyces staurospores</i> (bakteri)	antimikrobiyal, hipotansiyon, sitotoksik özellik (protein kinaz C inhibitörlüğü) (Çavdar ve Saraçoğlu, 2006).
 Şekil 6.14 Roseophilin	<i>Streptomyces griseovirus</i> (bakteri)	sitotoksik özellik (K562 lösemi ve KB epidermoid kanser hücrelerine karşı etki göstermektedir) (Fürstner ve Weintritt, 1997)

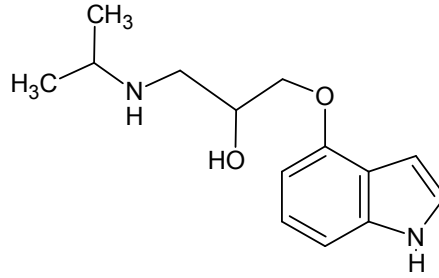
4-süstitüye indoller, biyolojik olarak önemli alkaloid ve kuinonlar için önemli yapılarıdır. 4-okso-4,5,6,7-tetrahidroindoller, 4-süstitüye indollerin sentezinde aracı olarak kullanılmaktadır. Mitosenes (Şekil 6.15), murraykuinon (Şekil 6.16) ve pindalol (Şekil 6.17), 4-süstitüye indollerden sentezlenen önemli alkaloidlerdir (Nayyar, vd., 1996; Demir vd., 2006).



Şekil 6.15 Mitosenez

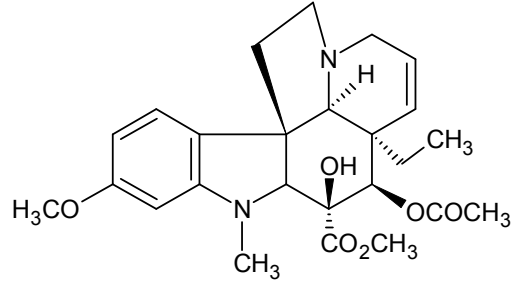


Şekil 6.16 Murraykuinon

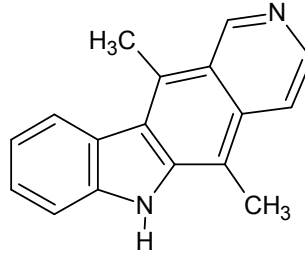


Şekil 6.17 Pindalol

4,5,6,7 Tetrahidroindoller, kolay aromatize olmalarından dolayı, indol sentezleri için aracı molekül olarak kullanılmaktadırlar. Sonuç olarak 2-fonksiyonelize 4,5,6,7-tetrahidroindoller, 2-fonksiyonelize indol hazırlamak için başlangıç materyali olarak kullanılabilir. Bu yapılar; farmakolojik olarak önemli birçok maddeyi ve vindolin (Şekil 6.18), vindoresine, elliptisin (Şekil 6.19) gibi önemli alkaloidlerin öncü maddelerini temsil etmektedirler (Modi vd., 1989; Kuehne vd., 1986; Bhandra vd., 1992 ve Trofimov, vd., 2008).



Şekil 6.18 Vindolin



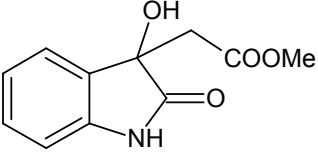
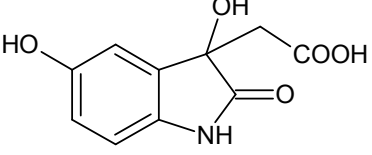
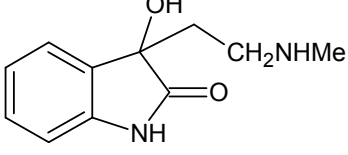
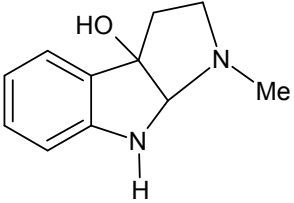
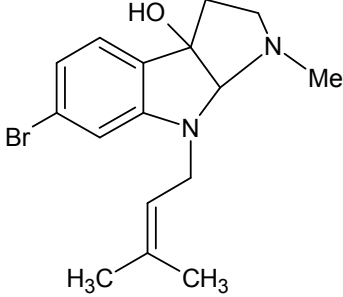
Şekil 6.19 Elliptisin

Bazı pirol türevlerinin biyolojik aktiviteleri, 4,5,6,7-tetrahidroindollerin, yeni süstitüye örnekleriyle birlikte, çeşitli sentetik yollarının gelişimini teşvik etmektedir. Farklı tetrahidroindol yapıları; antibiyotik, antipsikotik ajan ve kan pıhtılaşma inhibitörleri gibi çok farklı biyolojik aktiviteye sahip bileşiklerin yapısında da bulunmaktadır. Ayrıca geçiş metalleri için, ligand olarak da kullanılmaktadır (Tanyeli vd., 2004).

Oksoindol türevlerinin biyolojik aktiviteleri ve indollerle olan yapısal ilişkisi, bu bileşik sınıflarını ilaç ve sentetik organik kimya alanında önemli hale getirmiştir. 4-okso-tetrahidroindoller, indol kuinon analogu olan, mitomisin antibiyotiğinin sentezi için oldukça önemli bileşiklerdir (Wang ve Jimenez, 1994).

Oksoindol halkası, özellikle 3,3-spiro-oksoindol çekirdeği, birçok doğal ürünün (horsfiline, spirotriprostatin, alstotin, gelsemin, welwistatin, rhynchophylline..vb) anahtar yapısını oluştururken, aynı zamanda 3-aril-metiliden oksoindolleri, kinaz inhibitörü olarak sentezlenmektedir. Doğal kaynaklardan elde edilen, birçok 3 ve 3 α -hidroksi-süstitüye oksoindol alkaloidleri, önemli biyolojik aktivitelere sahiptir. Çizelge 6.3' te indol yapıları belirtilmiştir (Castillo vd., 2006; Pudlo vd., 2007).

Çizelge 6.3 Doğal kaynaklardan elde edilen bazı oksoindol türevleri

	<i>Hibiscus moscheutos</i> (ebe gümece)
	lahana
	<i>Arundo donax</i> (kargı kamışı)
	<i>Allium odorum</i> L. (Bitki)
	<i>Flustra foliacea</i> (deniz omurgası)

7. MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada bütün bileşikler Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisiyle (NMR) (Bruker DPX 400 Mhz), standart çözücü olarak dötörokloroform ve uluslararası standart olarak da tetrametilsilan (TMS) kullanılarak belirlendi. IR spektrumları Perkin Elmer FT-IR Spectrometer ile yapıldı.

Bütün saflaştırmalar kolon kromatografisi merck silika jel 60 (40-63 μ m mesh büyüklüğünde) ve merck MN preparatif plaklar kullanılarak yapıldı. Reaksiyonlar ince tabaka kromatografisi (İTK) merk silika jel 60 GF₂₅₄ ile kontrol edilerek, camag UV (254 nm) ile belirlendi. Erime noktası tayini Stuart SMP3 cihazıyla belirlendi.

Optik rotasyonlar Bellingham-Stanley P20 polarimetre kullanılarak yapıldı. Enantiyomerik saflık derecesi, kiral kolon takılı Agilent 1100 HPLC cihazı ile belirlendi. Kemosentez reaksiyonlarında kullanılan lipazlar; PFL (*Pseudomonas fluoresces* Lipaz) BioChemika (95608); CAL (*Candida antarctica* Lipaz) BioChemika (65986); HPL (Hog pancreas Lipaz) BioChemika (62300); MML (*Mucor miehei* Lipaz) BioChemika (62298); RAL (*Rhizopus arrhizus* Lipaz) BioChemika (62305); PPL (*Penisillium roqueferti* Lipaz) BioChemika (62308); AOL (*Aspergillus oryzae* Lipaz) Biochemica (62285), lipaz basic ve extension kit olmak üzere Fluka'dan temin edilmiştir.

7.1 Kullanılan Kimyasallar

Kullanılan kimyasal maddeler çizelge 7.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 7.1 Kullanılan Kimyasallar

KİMYASAL	FİRMA/NO
Benzen	Merck 101782
Dietil eter	Merck 100092
Kloroform	Merck 102431
Asetik asit	Merck 100056
Etanol	Merck 100986
Sikloheksan	Merck 102832

Çizelge 7.1 (Devam)

Fosfor pentaoksit	Merck 21-470-1
Silikagel	Merck 107734
Sodyum hidroksit	Merck 106482
Tetrahidrofuran	Merck 108114
Dimetilsülfoksit	Merck 116743
2-propanol	Merck 100995
Sikloheksan	Merck 102832
Asetonitril	Merck100003
Diklorometan	Merck 106049
Dipotasyum hidrojen fosfat	Merck 105102
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck 104873
Mangan II Asetat	Merck 63537
Potasyum permanganat	Merck 105080
Mangan III asetat	Aldrich 215880
1,5,6,7-Tetrahidro-4-H indol	Merck 357839
p-anisaldehyd	Aldrich 88107

7.2 4,5,6,7-Tetrahidro-4-okso-1*H*-indol-5-il-asetoksi Sentezi

7.2.1 Mangan (III) Asetat ile 4,5,6,7-Tetrahidro-4-okso-1*H*-indol-5 -il-asetoksi Sentezi

Mangan (III) asetat (2 mmol), 50 ml benzen ve asetik asit karışımında çözülerek, Dean-Stark tuzağı ile, reaksiyon ortamı kahverengi oluncaya kadar reflux yapıldı. Daha sonra, 1,5,6,7-tetrahidro-4*H*-indol-4-on (0.5 mmol) ilave edilerek, İTK ile kontrol edilip, başlangıç maddesi tamamen ürüne dönüşüncüye kadar reaksiyona 75 dakika devam edildi. Reaksiyon karışımı, kloroform ile seyreltilip doymuş NaHCO₃ ve tuzlu su ile ekstrakte edildi. Organik faz, MgSO₄ üzerinden kurutulup, solvent vakum altında uzaklaştırıldı

Ürünün saflaştırılması, kolon kromatografisinde 2:3 (EtOAc:Hekzan) sistemi ve sikloheksan/diklorometan sistemi ile kristalizasyon işlemi yapılarak % 35 verimle 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1*H*-indol-5-il-asetoksi elde edildi.



Şekil 7.1 Mn(III) asetat ile yapılmış reaksiyonun İTK sonucu

7.2.2 Mangan (II) Asetat ile 4,5,6,7-Tetrahidro-4-okso-1*H*-indol-5-il-asetoksi Sentezi

Mangan (II) asetat (1.5 mmol), KMnO₄ (1.5 mmol), 50 ml benzen ve asetik asit karışımında çözülerek, Dean-Stark tuzağı ile reaksiyon ortamı kahverengi oluncaya kadar reflux edildi. Daha sonra, 1,5,6,7-tetrahidro-4*H*-indol-4-on (0.5 mmol) bileşiği ilave edilerek, İTK ile kontrol edilip, başlangıç maddesi tamamen ürüne dönüşünceye kadar reaksiyona 75 dakika devam edildi. Reaksiyon karışımı, kloroform ile seyreltilip, doymuş NaHCO₃ ve tuzlu su ile ekstrakte edildi. Organik faz, MgSO₄ üzerinden kurutulup solvent vakum altında uzaklaştırıldı. Ürünün saflaştırılması, kolon kromatografisinde 2:3 (EtOAc:Hekzan) sistemi ve sikloheksan/diklorometan sisteminde kristalizasyon işlemi yapıp % 40 verimle 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1*H*-indol-5-il-asetoksi bileşiği elde edildi.



Şekil 7.2 Mn(II) asetat ile yapılmış reaksiyonun İTK sonucu

7.2.3 KMnO₄ ile 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1*H*-indol-5-il-asetoksi Sentezi

Potasyum permanganat (1.5 mmol), 50 ml benzen ve asetik asit ile çözülerek, Dean-Stark tuzağı ile, reaksiyon ortamı kahverengi oluncaya kadar reflux edildi. Daha sonra, 1,5,6,7-tetrahidro-4*H*-indol-4-on (0.5 mmol) bileşiği ilave edilerek, İTK ile kontrol edilip, başlangıç maddesi tamamen ürüne dönüşünceye kadar 75 dakika reaksiyona devam edildi. Reaksiyon karışımı, kloroform ile seyreltilip, doymuş NaHCO₃ ve tuzlu su ile ekstrakte edildi. Organik faz, MgSO₄ üzerinden kurutulup solvent vakum altında uzaklaştırıldı. Ürünün saflaştırılması, kolon kromatografisinde 2:3 (EtOAc:Hekzan) sistemi ve sikloheksan/diklorometan ile kristalizasyon işlemi yapılarak, % 63 verimle 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1*H*-indol-5-il-asetoksi elde edildi.



Şekil 7.3 KMnO₄ ile yapılmış reaksiyonun İTK sonucu

Erime sıcaklığı: 184.3 °C

R_f: 0.5 (silika jel, 2:3 EtOAc:Hekzan)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃ + CCl₄) δ (ppm) : 2.01 (s, 3H, -CH₃)

2.25-2.44 (m, 2H, -CH₂)

2.69-2.79 (m, 2H, -CH₂)

5.52 (d.d, J= 4.58, 12 Hz, 1H, CHO)

6.43 (d, J= 2.58 Hz, 1H, H-3)

6.53 (d, J= 2.95 Hz, 1H, H-2)

¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃ + CCl₄) δ (ppm) : 21.0, 29.3, 33.9, 64.2, 96.1, 105.9, 120.1, 138.7, 173.2, 192.1)

IR (CHCl₃) γ(max) : 1664, 1727, 3019 cm⁻¹

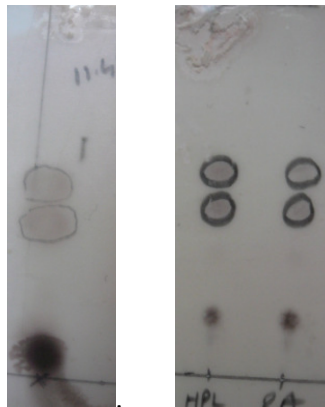
7.2.4 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1*H*-indol-5-il-asetoksi Bileşiğinin Hidroliz Reaksiyonu

LiOH monohidrat (16.5 mmol), 150 ml MeOH içerisinde 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1*H*-indol-5-il-asetoksi (2.85 mmol) ile karıştırıldı. Daha sonra, İTK ile kontrol edilerek, başlangıç maddesi tamamen ürüne dönüşüncüye kadar, oda sıcaklığında 2 saat reaksiyona devam edildi. Reaksiyon karışımı, etil asetat ile seyreltilip 1 N HCl ve tuzlu su ile ekstrakte edildi. Organik faz, MgSO₄ üzerinden kurutulup solvent vakum altında uzaklaştırıldı. Ürünün saflaştırılması kolon kromatografisinde 2:3 (EtOAc:Hekzan) yapılarak α -hidroksi-1,5,6,7-tetrahidro-4*H*-indol-4-on % 20 verim ile elde edildi.

7.3 Lipaz Katalizli Reaksiyonlar

Saf rasemik 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1*H*-indol-5-il-asetoksi (0.2mmol) bileşiğine, organik çözücü (0.4 ml) ve fosfat tamponu (220 μ l) eklenerek lipaz enzimi (100 mg) ilave edilip, 37 °C sıcaklıkta inkübatörde karıştırıldı. Substratın dönüşüm oranı belirli aralıklarla İTK ile takip edilerek dönüşüm %50 olduğunda reaksiyon durduruldu. Reaksiyon karışımına kloroform ilave edilip enzim filtrasyonla ortamdan alındıktan sonra, kloroform vakum altında uzaklaştırıldı. Daha sonra oluşan (*R/S*)-4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1*H*-indol-5-il-asetoksi ve (*R/S*)-6,7-dihidro-5-hidroksi-1*H*-indol-4(5*H*)-on bileşikleri, preparatif plaklar ile 9.8:0.2 (Benzen:Propanol) sisteminde birbirinden ayrıştırıldı.

HPLC ile yapılan ölçümler, Chiralcel ODH kolon 254 nm' de UV tarama Hekzan/2-propanol=90:10, 0.8 ml/dak. akış hızında gerçekleştirilmiştir.



Şekil 7.4 Lipaz katalizli reaksiyonların İTK ile kontrolü

Rasemik 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1*H*-indol-5-il-asetoksi bileşiğinin *Penisillium roqueferti* lipaz (PPL) enzimiyle 37 °C’ de tetrahidrofuran içinde 2 saat 50 dakika sürede oluşan reaksiyonu sonucu gözlenen değerler aşağıda verilmiştir.

6,7-dihidro-5-hidroksi-1*H*-indol-4(5*H*)-on bileşiği için:

Erime noktası : 130.2 °C

R_f : 0.5 (silika jel, 2:3 EtOAc:Hekzan)

Enantiyomerik saflık (ee) : %95

Optik çevirme : $[\alpha]_D^{25} = +12.5$

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃ + CCl₄) δ (ppm) :

- 2.33-2.42 (m, 2H, -CH₂)
- 2.57-2.64 (m, 2H, -CH₂)
- 3.67-3.75 (m, 1H, OH)
- 4.6 (d d, J= 3.7 Hz, 12 Hz, 1H, CH)
- 6.47 (d, J= 2.6 Hz, 1H, CH)
- 6.66 (d, J= 2,7 Hz, 1H, CH)

¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃ + CCl₄) δ (ppm) : 30.7, 32.3, 64.3, 96.5, 106.6, 119.6, 143, 193,

IR (CHCl₃) γ (max) ; 1618, 3020, 3423 cm⁻¹

4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1*H*-indol-5-il-asetoksi bileşiği için :

Enantiyomerik saflık (ee) : % 75

Optik çevirme : $[\alpha]_D^{25} = (-) 34.5$

Farklı çözücü ve farklı lipaz kaynakları kullanılarak gerçekleştirilen, enantiyoseçilimli sentezlerin HPLC sonuçları Çizelge 7.2’ de verilmiştir.

Çizelge 7.2 Lipaz enzimiyle gerçekleştirilen enantiyoseçilimli sentez sonuçları

ENZİM	Zaman (saat)	Çözücü	ASETOKSİ		HİDROLİZ	
			% ee ^a	verim ^b	% ee ^a	verim ^b
RAL	3.42	DMSO	65		73	
PFL	6.45	DMSO	38		70 ^c	
HPL	5	DMSO	28		71	
PPL	3	DMSO	34		61	
CAL	5	DMSO	71		74	
MML	2.5	DMSO	73		54	
AOL	17.5	DMSO	69		65	
RAL	2	THF	65 ^c		79	
PFL	3.5	THF	17		35	
HPL	3.5	THF	74 ^c		86	
PPL	2.5	THF	75	% 71	95	% 52
CAL	6	THF	58		89	
RAL	7.5	asetonitril	53		52	
PFL	4	asetonitril	65		79	
HPL	4	asetonitril	17		94	
PPL	3	asetonitril	19		75	
RAL	6	toluen	3.8		85	
PFL	6	toluen	19		93	
HPL	6	toluen	53		49	
PPL	2.2	toluen	65		73	

^aRasemik bileşiklerin standart olarak kullanıldığı HPLC ölçümleri, chiralcel ODH kolonu ile (254 nm UV tarama yapılarak) hekzan/2-propanol=90:10 çözücü sisteminde (0.8 ml/dak. akış hızında) gerçekleştirilmiştir

^bFlash kolon kromatografisiyle izole edilen ürünlerin verimi

^cters seçicilik (reverse selectivity)

8. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

8.1 Çalışmanın Yönü

İlaç sanayisinde göstermiş oldukları biyolojik aktivite nedeniyle indol türevleri oldukça önemli heterohalkalı bileşik sınıflarından biridir. Doğal ürünlerin ve sentetik olarak elde edilen ilaç öncü maddelerinin, büyük bir kısmında indol çekirdeğine rastlamak mümkündür. Biyolojik olarak aktif birçok bileşiğin yapısında bulunan 4,5,6,7-tetrahidroindol türevleri, antibiyotik, antipsikotik, antikanser etki gösteren pek çok ilaç öncü maddelerinin yapı birimleridir. Canlı organizmaların bazı temel yapılarında da indol halkası bulunmaktadır.

Doğal kaynaklardan elde edilen birçok oksoindol türevleri de önemli biyolojik aktivitelere sahiptir. Ayrıca aritmik ajan olan pindalolün ve mitosenes, murraykuinon gibi biyolojik olarak çok büyük bir öneme sahip olan alkaloid ve kuinonların yapıtaşları olan 4-süstitüye indollerin sentezinde aracı olarak görev yapmaktadır. 4-Okso-4,5,6,7-tetrahidroindol elde etmek için bilinen en pratik metod endosiklik oksijen atomunun nitrojen atomunda 4-okso-4,5,6,7-tetrahidrobenzofuran iskeletine transformasyondur.

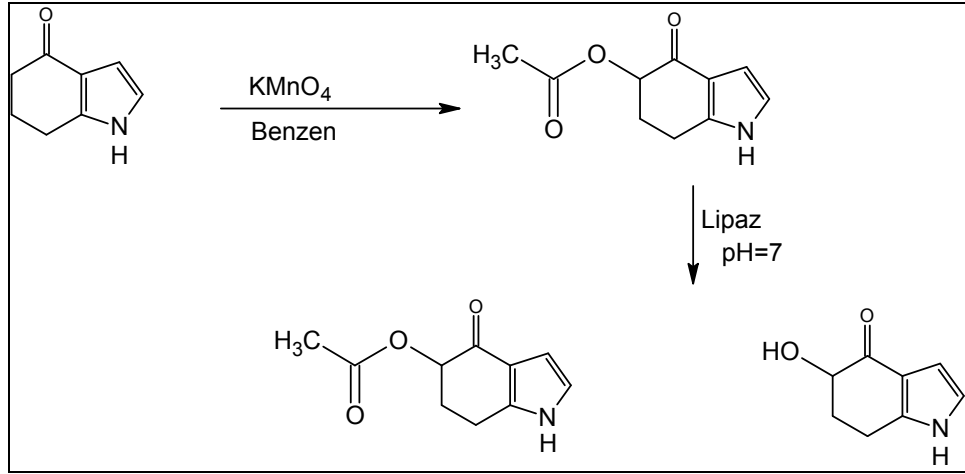
İndol türevi içeren doğal bileşikler, stereomerkez taşıdıkları için asimetric sentezde oldukça önemlidirler. Optikçe aktif maddelerin elde edilmesinde kullanılan en önemli yöntemlerden biri asimetric sentezdir. Son yıllarda gelişen biyoteknoloji yöntemleriyle birlikte, biyokatalizörler olan enzimlerle de asimetric sentez yapılmaktadır. Kimyasal yöntemlere göre enzimler, spesifitesi, kolaylığı ve ucuzluğu gibi birçok sebep dolayısıyla daha çok tercih edilmektedir. Enzimler, kimyasal olayları katalizleyen makromolekül yapısında bulunan kimyasal ajanlardır. Enzimleri proteinlerden ayıran en önemli özellik katalitik aktivite göstermeleridir. Enzimler, ılıman şartlarda yüksek verimde çalıştıkları, ve enantiyospesifik oldukları için rasemik karışım halinde bulunan kimyasalların optikçe aktif bileşiklerine dönüştürülmesinde kullanılmaktadır. Özellikle ilaç endüstrisinde, rasemik karışım halindeki ilaçların yerine tek stereoizomer ilaçların tercih edilmesi enzim kullanımının önemini attırmıştır.

Çalışmamızda, enzim olarak lipazlardan yararlanılmıştır. Lipazlar hem sulu ortamlarda hem de organik çözücülerde aktivite gösteren enzimlerdir. Organik çözücülerde aktivite göstermeleri, enantiyoseçilimli sentezler açısından oldukça önemlidir. Özellikle kemo, regio, ve enantiyoseçilimli davranışlar göstermesi bu enzimlerin ilaç sanayiinde kullanımını yaygınlaştırmaktadır.

Bu çalışmada; 1,5,6,7-tetrahidro-4H-indol-4-on bileşiğinden başlanarak, bir okso indol türevi olan, 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1*H*-indol-5-il-asetoksi ve 6,7-dihidro-5-hidroksi-1*H*-indol-4(5*H*)-on bileşiklerinin enantiyoseçilimli sentezleri, iki basamaklı olarak başarılı bir şekilde elde edilmiştir. Çalışmanın ilk aşamasında, literatür araştırmaları doğrultusunda, enonların α seçilimli asetoksilasyonlarında etkili bir katalizör olduğu belirlenen Mn (III) asetat aracılığı ile reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Fakat bu çalışma sonucunda elde edilen madde miktarının düşüklüğü, yan ürünlerin fazlalığı gibi sebepler, reaksiyon verimini oldukça düşürmüştür. Bu sebeple farklı yöntemler denenerek verimin artırılması için çalışmalar yapılmıştır. Mn (II) asetat katalizörlüğünde gerçekleştirilen sentezde, KMnO_4 eklenerek, reaksiyon ortamında Mn(III) asetat sentezi gerçekleştirilmiş ve verimin artış göstermesi hedeflenmiştir. Mn (III) asetat ile yapılan α seçilimli asetoksilasyona kıyasla Mn(II) asetat ile yapılan sentezin veriminin daha yüksek olduğu görülmüş fakat elde edilen madde miktarının yeterli olmayışı, farklı katalizör denenmesine yol açmıştır. Demir ve grubunun, enonların KMnO_4 katalizörlüğünde α seçilimli asetoksilasyonları ile ilgili çalışmaları ışığında, enonların α seçilimli asetoksilasyonları için KMnO_4 kullanılmış ve daha yüksek verim ile 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1*H*-indol-5-il-asetoksi bileşiği elde edilmiştir. KMnO_4 ile yapılan reaksiyonlar sonucunda yan ürün oluşumu görülmemiştir. Üç farklı katalizör ile yapılan reaksiyon sonucunda en yüksek verimin KMnO_4 ile gerçekleştirildiği saptanmıştır. Çözücü olarak benzen kullanılması, oksidasyonun α seçilimli olmasını sağlamaktadır (Demir ve Fındık, 2008).

Çalışmanın ikinci aşamasında, KMnO_4 katalizörlüğünde elde edilmiş olan 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1*H*-indol-5-il-asetoksi bileşiğinin her iki enantiyomeri kemoenzimatik yöntemlerle sentezlenerek enantiyoseçicilik için en uygun koşullar sağlanmıştır.

Bu çalışmayla birlikte literatürde ilk kez kiral 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1*H*-indol-5-il-asetoksi ve 6,7-dihidro-5-hidroksi-1*H*-indol-4(5*H*)-on bileşiklerinin enantiyoseçilimli sentezleri kemoenzimatik yöntemle yüksek verimle ve yüksek enantiosafılıkta elde edilerek (Şekil 8.1) literatüre bu bileşiklerin sentezleri için yeni bir metod kazandırılmış olacaktır.



Şekil 8.1 Reaksiyon şeması

Reaksiyonların kontrolü İTK ile izlenmiştir. Saflaştırma işlemleri kolon kromatografisi ve kristalizasyon yöntemi ile yapılmıştır. Ürünlerin yapı tayini ve karakterizasyonu NMR ve IR kullanılarak yapılmıştır.

8.1.1 1,5,6,7-tetrahidro-4*H*-indol-4-on Bileşiğinin α Seçilimli Asetoksilasyonu

1,5,6,7-tetrahidro-4*H*-indol-4-on bileşiği, enonların α seçilimli asetoksilasyonu için üç farklı katalizör vasıtasıyla reaksiyona sokulmuştur.

a. $\text{Mn}(\text{OAc})_3$ kullanılarak yapılan α seçilimli asetoksilasyon

1,5,6,7-tetrahidro-4*H*-indol-4-on bileşiği, 4 equivalent $\text{Mn}(\text{OAc})_3$, benzen, asetik asit ile Dean Stark tuzağı altında, benzenin reflux sıcaklığında tepkimeye sokuldu. Ürün oluşumu İTK ile kontrol edilerek başlangıç maddesi tamamen ürüne dönüştüğünde reaksiyon durduruldu. Ürünün saflaştırılması, 2:3 (EtOAc:Hekzan) sistemi ile kolon kromatografisinde ve sikloheksan/diklorometan sistemi ile kristalizasyon işleminde gerçekleştirilerek % 35 verimle 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1*H*-indol-5-il-asetoksi bileşiği elde edildi.

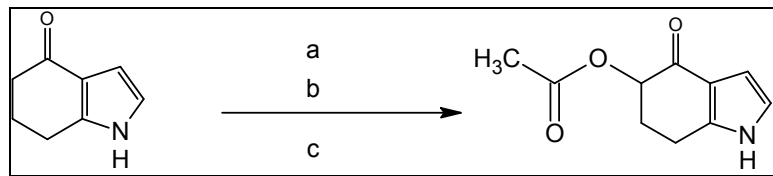
b. Mn(OAc)₂·4H₂O kullanılarak yapılan α seçimli asetoksilasyon

1,5,6,7-tetrahidro-4H-indol-4-on bileşiği, 3 equivalent Mn(OAc)₂·4H₂O, KMnO₄, benzen, asetik asit ile Dean Stark tuzağı altında, benzenin reflux sıcaklığında tepkimeye sokuldu. Ürün oluşumu İTK ile kontrol edilerek başlangıç maddesi tamamen ürüne dönüştüğünde reaksiyon durduruldu. Ürünün saflaştırılması, 2:3 (EtOAc:Hekzan) sistemi ile kolon kromatografisinde ve sikloheksan/diklorometan sistemi ile kristalizasyon işleminde gerçekleştirilerek % 40 verimle 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1H-indol-5-il-asetoksi bileşiği elde edildi.

c. KMnO₄ kullanılarak yapılan α seçimli asetoksilasyon

1,5,6,7-tetrahidro-4H-indol-4-on bileşiği, 3 equivalent KMnO₄, benzen, asetik asit ile Dean Stark tuzağı altında, benzenin reflux sıcaklığında tepkimeye sokuldu. Ürün oluşumu İTK ile kontrol edilerek başlangıç maddesi tamamen ürüne dönüştüğünde reaksiyon durduruldu. Ürünün saflaştırılması, 2:3 (EtOAc:Hekzan) sistemi ile kolon kromatografisinde ve sikloheksan/diklorometan sistemi ile kristalizasyon işleminde gerçekleştirilerek % 63 verimle 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1H-indol-5-il-asetoksi bileşiği elde edildi.

Yapılan verim analizleri sonucunda, en yüksek verimin KMnO₄ ile yapılan reaksiyonlar sonucunda gerçekleştiği görülmüştür. KMnO₄, yüksek seçiciliği, ucuzluğu ve kolay uygulanır yöntemleriyle enonların asetoksilasyonlarında çok önemli bir yere sahiptir (Demir ve Fındık, 2008).



Şekil 8.2 1,5,6,7-tetrahidro-4H-indol-4-on bileşiğinin α seçimli asetoksilasyonu

- a Mn(OAc)₃/Benzen/Asetik asit
- b Mn(OAc)₂·4H₂O/ KMnO₄/ Benzen/Asetik asit
- c KMnO₄/ Benzen/Asetik asit

4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1H-indol-5-il-asetoksi bileşiğinin ¹H-NMR spektrumunda, 2.25-2.44 ppm'de C-6 protonları ve 2.69-2.79 ppm'de C-7 protonları için birer multiyet, 5.52 ppm'de C-5 protonu için dubletin dubleti (J= 4.58Hz ve 12 Hz), C-3 ve C-2 protonu için

sırasıyla 6.43 ppm'de ($J = 2.58$ Hz) ve 6.53 ppm'de ($J = 2.95$ Hz) birer dublet göstermektedir. Ayrıca 2.01 ppm'de asetil grubunun protonları için singlet gözlenmektedir (Şekil Ek 1).

^{13}C -NMR spektrumunda ise; C-5 karbonu için 64.2 ppm'de bir sinyal, ester grubunun karbonil karbonu için 173.2 ppm'de ve C-4'teki karbonil karbonu için 192.1 ppm'de birer sinyal, C-3 ve C-2 karbonu için sırası ile 96.1 ve 105.9 ppm'de birer sinyal, pirol halkasına ait C-4 ve C-5 karbonu için 120.1 ve 138.7 ppm'de sinyal gözlenmiştir (Şekil Ek 2).

IR spektrumunda; indol halkasındaki N-H grubu için 3019 cm^{-1} 'de, ester grubunun karbonil karbonu için 1727 cm^{-1} ve C-4'teki karbonil karbonu için 1664 cm^{-1} 'de karakteristik sinyaller gözlenmiştir (Şekil Ek 5).

8.1.2 Enzim Ortamında Asetoksi Ketonların Hidrolizi

Enzimler oldukça verimli katalizörlerdir, ılıman koşullar altında yaklaşık 4-8 pH aralığında ve 20-40 °C sıcaklık aralığında yüksek aktivite gösterirler. Reaksiyonları çok geniş bir substrat aralığında katalizleyebilirler. Bütün katalizörler gibi enzimler sadece bir reaksiyonu hızlandırır fakat onların reaksiyonlarının termodinamik dengesinin pozisyonu üzerinde bir etkileri yoktur. Organik reaksiyonların hemen hemen her tipine denk bir enzim katalizli işlem vardır. Bunları aşağıdaki gibi sıralayabiliriz:

- Hidroliz reaksiyonları (yağlar, amidler, laktonlar, laktamlar, eterler, asit anhidritleri, epoksitler ve nitriller)
- Oksidasyon redüksiyon reaksiyonları (alkanlar, alkenler, aromatik bileşikler, alkoller, aldehid ve ketonlar, sülfidler, ve sülfonoksitler)
- Adisyon eliminasyon reaksiyonları (su, amonyak, hidrojen siyanür)
- Halojenlendirme–dehalojenlendirme reaksiyonları
- Alkinlendirme, alkil çıkarılması, izomerizasyon, asiloin ve aldol reaksiyonları,

Kimyasal seçicilik, regioseçicilik ve enantioseçicilik göstermesi enzim katalizli reaksiyonların önemini arttırmaktadır. Hidrolitik enzimler, organik sentezlerde en fazla kullanılan biyokatalizörlerdir. Ester ve amit bağlarının hem hidrolizini hem de oluşumunu katalizleyen hidrolitik enzimler arasında en önemli olanlar amidazlar, proteazlar, esterazlar ve lipazlardır. Bunların arasında lipazlar, ucuz ve kolay bulunabilir olmaları, çok geniş bir substrat aralığı için yüksek enantioseçiciliğe sahip olmaları ve organik çözücülerde yüksek dayanıklılık göstermeleri sebebiyle, yaygın olarak kullanılmaktadır.

8.1.3 Enantiyoseçimli Sentezleri Etkileyen Parametreler

Lipaz katalizli enantiyoseçimli tepkimelerde enzim kaynağı, çözücü türü ve sıcaklık enantioseçimliliği arttırmada önemli parametrelerdir.

Enzim kaynaklarının enantiyoseçimli sentezler üzerine etkisini incelemek amacıyla, farmakolojik olarak önemli bileşiklerden olan 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-benzofuran-5-asetatın farklı lipazlar kullanılarak kemoenzimatik sentezi yapılmıştır. Aynı çözücü kullanılarak sekiz farklı lipaz çeşiti denenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda en yüksek enantiyoseçimlilik; Amona PS ve *Pseudomonas fluoresces* lipazında elde edildiği görülmüştür. Aynı şekilde 3-metoksi-4-metil-2-oksosiklohek-3-enil asetatın enzimatik hidrolizi 11 farklı lipaz enzimi denenmiştir. En yüksek enantiyoseçimlilik *Candida cylindracea* lipazında elde edilmiştir (Demir vd., 2006).

Ortam sıcaklığı lipaz enziminin aktivitesini etkileyen çok önemli bir faktördür. Yapılan çalışmalar lipaz katalizörlüğünde gerçekleştirilen enantiyoseçimli sentezler için optimum ortam sıcaklığının 20-60 derece arasında olması gerektiğini göstermektedir (Manfred, 2002).

Lipazlar hem sulu ortamlarda hem de organik çözücülerde aktivite gösteren enzimlerdir. Organik çözücülerde aktivite göstermeleri, enantiyoseçimli sentezler açısından oldukça önemlidir. Bu sentezlerde dikkat edilmesi gereken en önemli unsur; kullanılan organik çözücünün, enzimin hidrat kabuğuna zarar vermeyecek şekilde seçilmiş olmasıdır. Genel olarak lipaz enzim ile yapılan biyokataliz reaksiyonlarında; hidrofobik çözücülerde yüksek aktivite, hidrofilik çözücülerde ise düşük aktivite görülmektedir. Bu nedenle lipaz enzimi için en çok kullanılan organik çözücüler, benzen, toluen, asetonitril, n-hekzan, siklohekzan, heptan, oktan, izo-oktan, nonan, petrol eter, triasetin, karbontetraklorür, kloroform ve etil asetattır (Castro, 1995; Faber, 1999 ; Berglund, 2001).

8.1.4 4,5,6,7-Tetrahidro-4-okso-1H-indol-5-il-asetoksi Bileşiğinin Lipaz Katalizli Reaksiyonları

Lipaz enzimlerinin organik çözücülerde de aktivite göstermesi, biyokataliz reaksiyonlarında yaygın olarak kullanılmasının önemli sebeplerindendir. Bu çalışmada, 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1H-indol-5-il-asetoksi bileşiğinin kemoenzimatik reaksiyonları için biyokataliz reaksiyonlarında yaygın olarak kullanılan ve organik çözücülerde de aktivite gösteren lipaz enzimleri kullanılmıştır. Bu amaçla, toluen, asetonitril, DMSO, THF olmak üzere dört farklı organik çözücü ve HPL (Hog Pancreas lipazı; domuz pancreasında elde edilmiştir), PFL (*Pseudomonas fluoresces* lipazı; *Pseudomonas* bakterisinin alt sınıfına aittir),

RAL (*Rhizopus arrhizus* lipazı; *Rhizopus* mantarının alt sınıfına aittir.), PPL (*Penicillium roqueferti* lipazı; *Penicillium* mantarının alt sınıfına aittir.), CAL (*Candida antarctica* lipazı; *Candida* mayasının alt sınıfına aittir.), olmak üzere beş farklı lipaz enzimi kullanılmıştır. Kemosentez reaksiyonları sonucunda, organik çözücülerin moleküllerin enantiyosafılık değerlerine ve seçiciliğine farklı etkileri olmuştur. Bu çalışmadaki bütün enzim reaksiyonları fosfat tampon çözeltisinde (pH=7), 37°C sıcaklığında yapılmış olup, katalizörün yüzeyine substratın difüzyonunu sağlamak amacı ile reaksiyon çalkalayıcı inkübatör varlığında gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon İTK ile takip edilmiş ve yaklaşık %50 dönüşüme ulaştığında durdurularak ham ürün, kolon kromatografisi ile ayrılmıştır. Ayırma sonunda kiral 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1*H*-indol-5-il-asetoksi ve 6,7-dihidro-5-hidroksi-1*H*-indol-4(5*H*)-on bileşiği saf olarak elde edilmiştir. Ürünler NMR ve IR spektroskopisi ile aydınlatılmıştır.

6,7-dihidro-5-hidroksi-1*H*-indol-4(5*H*)-on bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu, 2.33-2.42 ppm'de C-6 protonları ve 2.57-2.64 ppm'de C-7 protonları için birer multipler, 4.61 ppm'de C-5 protonu için dubletin dubleti (J=3.7 Hz, 12 Hz), C-3 ve C-2 protonu için sırasıyla 6.47 ppm'de (J=2.6 Hz) ve 6.66 ppm'de (J=2.7 Hz) birer dublet göstermektedir. Ayrıca 3.67-3.75 ppm'de OH grubunun protonu için multipler gözlenmiştir. Genel olarak OH grubunun 3.8 ppm' de broad singlet olarak görülmesi beklenirken, primer alkollere bağlı OH gruplarında bazen 3.8 ppm' de multipler görülmesi beklenmektedir (Şekil Ek 3).

¹³C-NMR spektrumunda; C-5 karbonu için 64.3 ppm'de bir sinyal, ve C-4'teki karbonil karbonu için 193.2 ppm'de bir sinyal, C-3 ve C-2 karbonu için sırası ile 96.5 ve 106.6 ppm'de birer sinyal, pirol halkasına ait C-4 ve C-5 karbonu için 119.6. ve 143 ppm'de sinyaller gözlenmiştir (Şekil Ek 4).

6,7-dihidro-5-hidroksi-1*H*-indol-4(5*H*)-on bileşiği, verimin çok düşük olması, kolay bozulan bir yapıya sahip olması ve başlangıç maddesi ile çok yakın R_f değerlerine sahip olması gibi nedenlerle tam olarak saflaştırılamamış ve reaksiyon esnasında oluşan yan ürünlerden kurtulunamamıştır. Bu nedenle 6,7-dihidro-5-hidroksi-1*H*-indol-4(5*H*)-on bileşiğinin ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumlarında, 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1*H*-indol-5-il-asetoksi bileşiğinin 2.01 ppm'de beklenen asetil grubunun protonları için singlet yapısı ve yan ürünlerden kaynaklanan kirliliklere rastlanmaktadır.

IR spektrumunda: O-H grubu için 3423 cm⁻¹'de broad bir sinyal, indol halkasındaki N-H grubu için 3020 cm⁻¹'de ve C-4'teki karbonil karbonu için 1618 cm⁻¹'de karakteristik sinyaller gözlenmiştir (Şekil Ek 5).

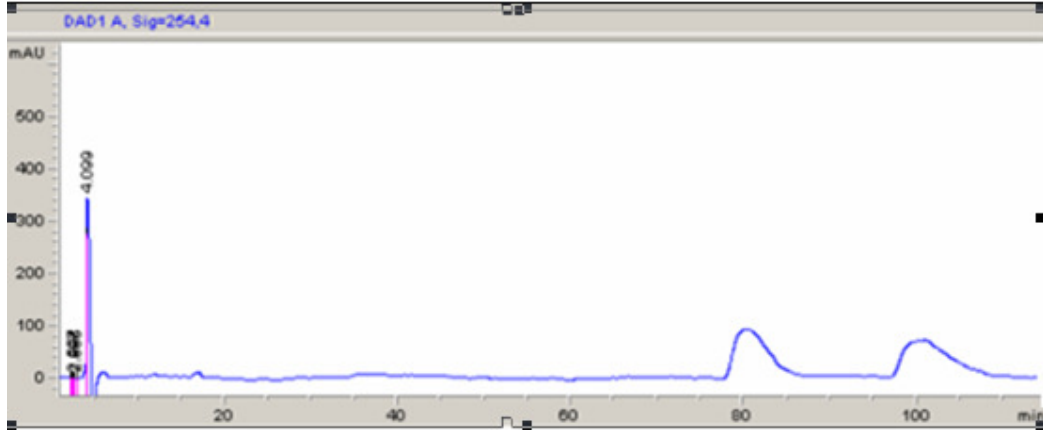
Kemosentez reaksiyonları sonucunda, organik çözücülerin moleküllerin enantiyosaflık değerlerine ve seçiciliğine farklı etkileri olmuştur. Yapılan değerlendirmeler aşağıdaki gibidir:

Çözücülerin, molekülün enantiyosaflık değerlerine olan etkisi: Hog pancreas (HPL) lipazı ile asetonitril çözücüsünde % 94 ee değeri, DMSO çözücüsünde % 71 ee değeri, THF ile % 86 ee değeri, toluen ile % 49 ee değeri elde edilmiştir. *Rhizopus arrhizus* lipazı (RAL) ile yapılan çalışmada, DMSO’ da % 73 ee, THF’te % 79 ee, asetonitrilde % 52 ee, toluende % 52 ee değeri görülmüştür. *Pseudomonas fluoresces* lipazı (PFL) ile DMSO’ da % 70 ee, THF’de % 35 ee, asetonitrilde % 79 ee, toluende % 93 ee sonucu bulunmuştur. *Penisillium roqueferti* lipazı (PPL) ile yapılan dönüşümde, DMSO ile % 61, THF ile % 95, asetonitril ile % 75, toluen ile % 73 ee değerleri elde edilmiştir. *Candida antarctica* lipazı (CAL) ile ise, DMSO’ da % 74 ee, THF ile % 89 ee değerleri elde edilmiştir.

Ters seçicilik (reverse selectivity) etkisi : *Pseudomonas fluoresces* lipazı ile gerçekleştirilen kemosentez reaksiyonlarında, DMSO, 6,7-dihidro-5-hidroksi-1*H*-indol-4(5*H*)-on bileşiğinin, *Rhizopus arrhizus* ve *Hog pancreas* lipazları ile yapılan biyodönüşümde ise, THF, 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1*H*-indol-5-il-asetoksi bileşiğinin konfigürasyon yapısını diğer organik çözücülere göre farklı etkileyerek ters seçicilik etkisi göstermiştir.

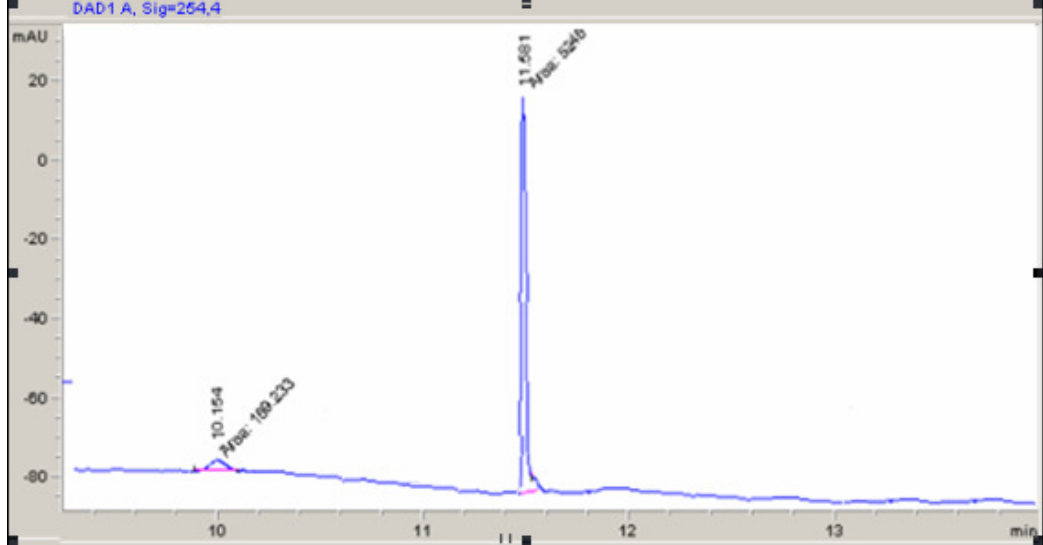
Enantiyomerlerin en iyi şekilde ayrılmasını sağlamak için çeşitli kiral HPLC kolonları denenmiştir. chiralcel OD ve OJ kolonları kullanıldığında, enantiyomerlerin iyi ayrılmadıkları görülmüştür. chiralcel OD-H kolonu (hekzan/2-propanol=90:10/0.8 akış hızı) kullanıldığında en iyi sonuç alınarak, α -hidroksi ve α -asetoksi 4-okso-tetrahydroindol türevlerinin enantiyosaf olarak elde edilmesi sağlanmıştır.

Şekil 8.3 ‘te rasemik 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1*H*-indol-5-il-asetoksi bileşiğinin chiralcel OD-H kolonu (hekzan/2-propanol=90:10/0.8 akış hızı) ile yapılan HPLC analizi sonucu UV 254 nm’ de gözlenen HPLC kromatogramları görülmektedir.

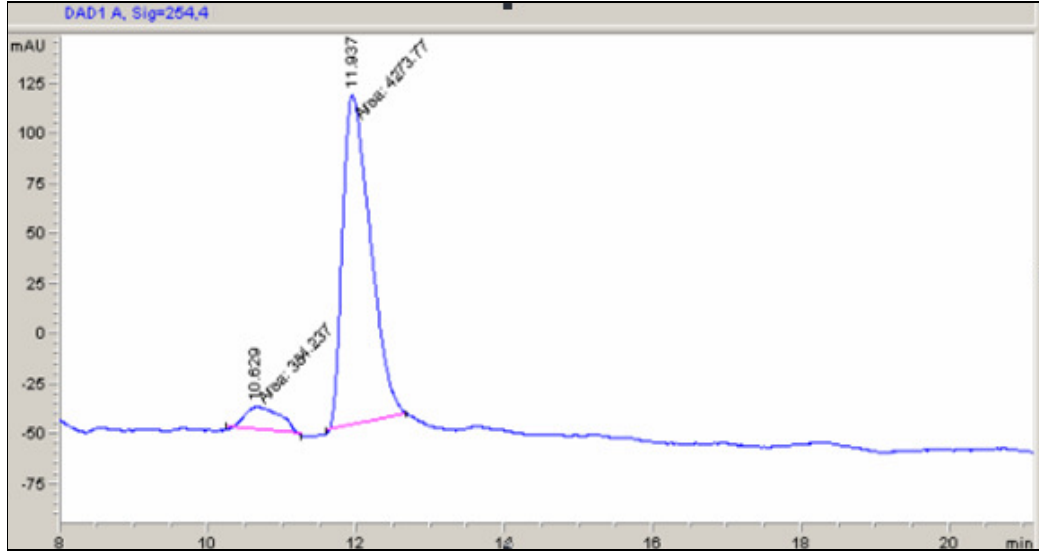


Şekil 8.3 Standart olarak kullanılan rasemik 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1*H*-indol-5-il-asetoksi bileşiğinin HPLC kromotogramı

Kemosentez reaksiyonlarında, en yüksek enantiyomerik saflık değeri *Penisillium roqueferti* lipazı (PPL) ile % 95 değerinde ve % 52 verim ile tetrahidrofuran çözücüsü içerisinde elde edilmiştir (Şekil 8.4). Ayrıca, *Pseudomonas fluoresces* (PFL) toluen içerisinde, % 94 ee değeri ile *Hog pancreas* (HPL) ise asetonitril içerisinde % 93 ee değeri (Şekil 8.5) ile elde edilerek oldukça yüksek enantiyomerik saflıkta ürünler elde edilmiştir.



Şekil 8.4 6,7-dihidro-5-hidroksi-1*H*-indol-4(5*H*)-on bileşiğinin THF ortamında *Penisillium roqueferti* lipazı ile HPLC analiz sonucu



Şekil 8.5 6,7-dihidro-5-hidroksi-1*H*-indol-4(5*H*)-on bileşiğinin asetonitril ortamında HPL lipazı ile HPLC analiz sonucu

4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1*H*-indol-5-il-asetoksi bileşiğinin enzimatik hidroliz reaksiyonlarının, HPLC analizleri chiralcel OD-H kolonu ile 0.8 akış hızında, 90:10 Hekzan:2-propanol çözücü sisteminde UV 254 nm'de yapılmıştır.

8.2 Sonuç

Enantiyomerikçe saf olan α -hidroksi ketonlar doğal birçok üründe yapı taşı olarak kullanıldığından oldukça önemli maddelerdir. İndoller, terapotik ve farmakolojik aktivitelerinden dolayı son yıllarda, oldukça ilgi çekici bileşik sınıfları haline gelmişlerdir. İndol kimyası, heterohalkalı kimya alanında en aktif gruptur. İndol parçaları ilaç kimyasında önemli bir yer teşkil etmektedir. Birçok doğal üründe ve çeşitli sentetik bileşiklerde indol parçacıklarının yapıları bulunmuştur. En çok bilinen alkaloidlerin indol çekirdeklerine dayandığı bilinmektedir. İndol alkaloidler ve dihidroindol içeren doğal yapılar, çeşitli biyolojik aktivitelerinden dolayı ilgi çekici hedef moleküller haline gelmiştir. Ayrıca indol türevleri içeren doğal bileşikler stereomerkez taşıdıkları için asimetric sentezde oldukça önemlidirler. Son yıllarda, ılıman reaksiyon koşulları, kolay uygulanabilir yöntemleri ve yüksek enantiyo, regio spesifiteleri dolayısıyla biyokatalizörler, asimetric organik sentezlere alternatif oluşturmaktadırlar.

Bu çalışmada, biyolojik aktiviteleri ve indollerle yapısal ilişkileri sayesinde bu bileşikleri medikal ve sentetik organik kimya alanında önemli hedef bileşikler haline getirmiş olan 4-okso-4,5,6,7- tetrahidroindol türevlerinin sentezlenmesi hedeflenmiş ve bu amaçla 4-okso-tetrahidroindol türevi olan 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1*H*-indol-5-il-asetoksi ve 6,7-dihidro-5-hidroksi-1*H*-indol-4(5*H*)-on bileşikleri kemosentez yoluyla, enantiyosaf olarak elde edilmiştir. Bilindiği gibi 4,5,6,7 terahidroindoller, kolay aromatize olmalarından dolayı indollerin sentezlerinde iyi aracı moleküllerdir.

Çalışmanın birinci aşamasında 1,5,6,7-tetrahidro-4*H*-indol-4-on bileşiğinden başlanarak enonların α seçilimli asetoksilasyonları sırası ile Mn (III) asetat, Mn (II) aseatat ve KMnO₄ katalizörlüğünde gerçekleştirilmiştir. Gerçekleşen α seçilimli asetoksilasyon reaksiyonları sonucunda 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1*H*-indol-5-il-asetoksi bileşiği elde edilmiştir. Verim analizi sonucu en yüksek verimi gösteren KMnO₄ katalizörlüğünde madde çoğaltılmıştır (Şekil 8.2).

Bilindiği gibi kinetik ayrıştırma başlangıç maddesi reaksiyon koşullarında rasemize olurken ürünün yine aynı koşulda rasemize olması gerekmektedir. Bu nedenle elde etmek istediğimiz hedef maddenin rasemik formda sentezlenmesi, daha sonra optikçe aktif formuna dönüştürülmesi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1*H*-indol-5-il-asetoksi enzimle seçici hidroliz yapılarak kiral hidroksi türevlerine dönüştürülmüş (Şekil 8.1) ve spektral yöntemlerle yapı tayini yapılmıştır (Şekil Ek 1,2,3,4,5,6).

Kinetik ayrıştırma yoluyla optikçe saf α -asetoksi ve α -hidroksi türevlerinin yüksek ee değeri ile eldesi gerçekleştirilmiş ve kiral asetoksi ve hidroksi türevlerinin HPLC analizleri yapılarak ee değerleri saptanmıştır (Çizelge 7.2). Kinetik ayrıştırma enantiyoseçici ürün eldesinde çeşitli lipaz enzimler değişik solvent sistemleri ile denenmiş ve en yüksek ee'yi veren enzim-çözücü sistemi bulunmuştur.

Kemosentez reaksiyonlarında, en yüksek enantiyomerik saflık değeri *Penicillium roqueforti* lipazı (PPL) ile % 95 değerinde tetrahidrofuran çözücüsü içerisinde elde edilmiştir. Ayrıca, % 94 ile *Pseudomonas fluorescens* (PFL) ve % 93 ile *Hog pancreas* lipazlarıyla (HPL) yapılan biyodönüşümler ile oldukça yüksek enantiyomerik saflıkta ürünler elde edilmiştir.

Bu çalışma ile, literatürde ilk defa kiral 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1*H*-indol-5-il-asetoksi ve 6,7-dihidro-5-hidroksi-1*H*-indol-4(5*H*)-on'un kemoenzimatik sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan yöntemler, biyolojik olarak aktif birçok bileşiğin sentezinde kullanılan diğer 4-okso 4,5,6,7-tetrahidroindol türevleri için uygundur.

KAYNAKLAR

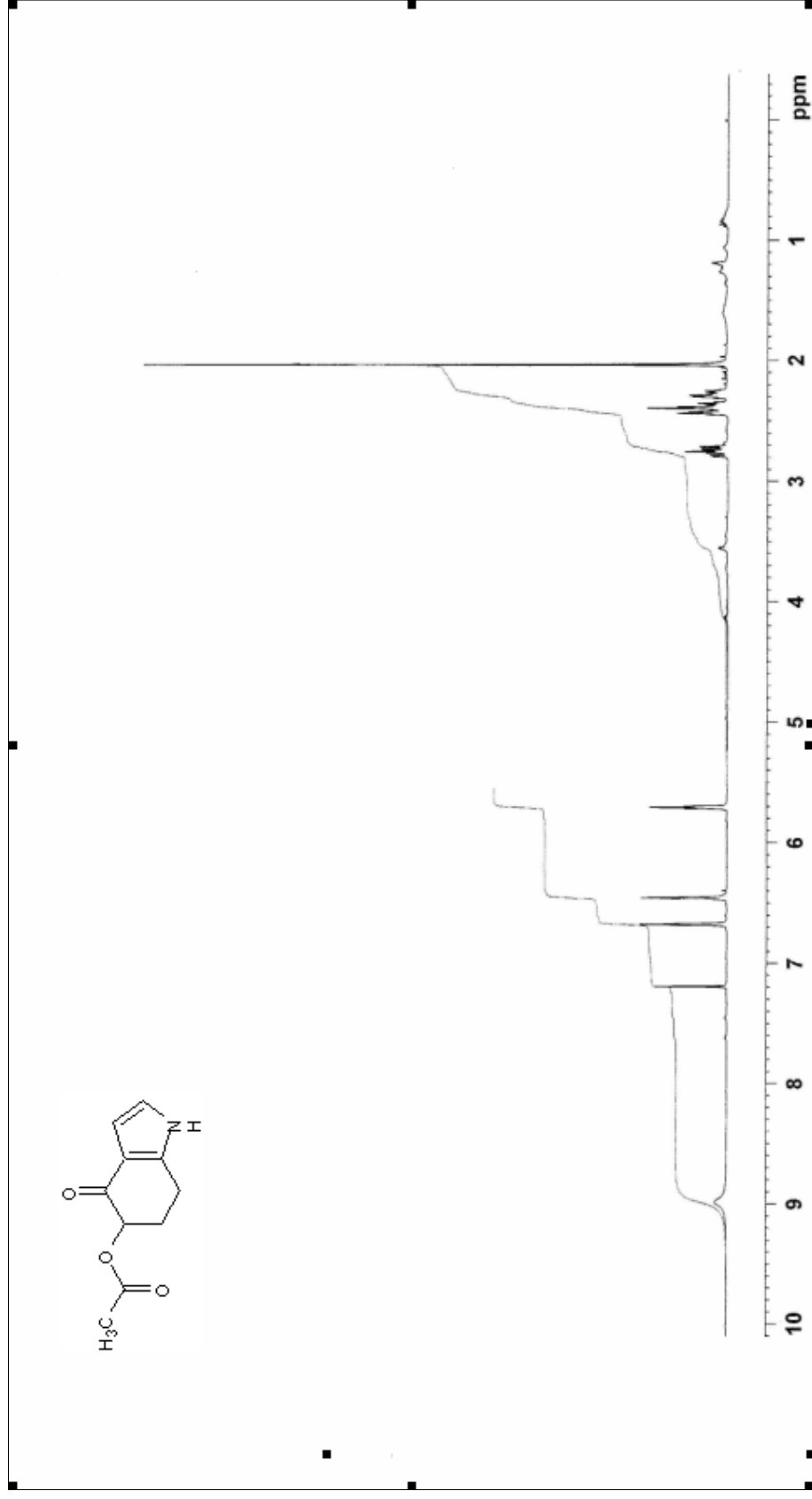
- Agranat, I., Caner H., (1999), "Intellectual Property and Chirality of Drugs", Strategic Focus, 4:313-321
- Andersson, S., Allenmark S., (2002), "Preparative Chiral Chromatographic Resolution of Enantiomers in Drug Discovery", Biochemical and Biophysical Methods, 54:11-23
- Blaschke, G., (1980), "Chromatographic Resolution of Racemates. New analytical methods" *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 19, 13-24.
- Bbb research, (2008), (<http://www.bccresearch.com/report/BIO012D.html>).
- Bhandra, R., Vani S., Shanks J., (1992), "Production of Indole Alkaloids by Selected Hairy Root Lines of *Catharanthus roseus*", Biotechnology and Bioengineering, 41: 581-592
- Biocatalysis, (2009), www.icis.com-assets-getasset
- Buchholz, K., Kasche V., Bornscheuer U., (2005), Biocatalysts and Enzyme Technology, Wiley- VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Bugg, T., (2002), An Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry, Blackwell Science.
- Chemoprevention Branch and Agent Development Committee, (1997), "Clinical Development Plan Indole-3-Carbinol", 26S: 127-136
- Castillo, O., Zavala M., Rodriguez M., Duarte L., Morales -Rios M., Nathan P., (2006), "Preparation of 3-hydroxyindoles with Dimethyldioxirane and Their Use for the Synthesis of Natural Products", Tetrahedron 62: 3040-3051
- Castro, H., (1995), "Fine Chemicals by Biotransformation Using Lipases", Quimica, 18: 6
- Çavdar, H., Saraçoğlu, N., (2006), "Synthesis of New 2-Vinylation Products of Indoles via a Michael-Type Addition Reaction with Dimethyl Acetylenedicarboxylate and Their Diels-Alder Reactivity as Precursors of New Carbazoles", J. Org. Chem, 71: 7793-7799
- Çavdar, H., Saraçoğlu, N., (2005), "A New Approach for The Synthesis of 2-Substituted Indole Derivatives via Michael Type Adducts", Tetrahedron, 61: 2401-2405
- Champe, P., Harvey, R., Ferrier, D., Biyokimya (2000), (E. Ulukaya), Nobel Tıp Kitabevi.
- Chiral Pharmaceuticals (2005), Technology Catalysts International, <http://www.technology-catalysts.com/>
- Davies, M. Neal, Teng, W., (2003), "Importance of Chirality in Drug Therapy and Pharmacy Practice: Implications for Psychiatry", Advances in Pharmacy, 1: 242-252
- De Klein, W.J., (1986) "Reactions With Manganese (III) Acetate" "In Organic Synthesis by Oxidation with Metal Compounds", ed by W.J. Mijs, Jonge, C., R., H., New York.
- Demir, A., Findık, H., (2008), "Potassium permanganate/carboxylic acid/organic solvent: a powerful reagent for enone oxidation and aryl coupling reactions", Tetrahedron, 64: 6196-6201

- Demir, A., Çalışkan, Z., Şahin E., (2006), “ Enantioselective Synthesis of 4,5,6,7-Tetrahydro-4-oxo-benzofuran-5-yl acetate and 1-Benzyl-4,5,6,7-Tetrahydro-4-okso-1(H)-Indol-5-yl Acetate Using Chemoenzymatic Methods”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 44: 87-92
- Demir, A., Hamamcı, H., (2001), “Simple Chemoenzymatic Access to Enantiopure Pharmacologically Interesting (R)-2-Hydroxypropiophenones”, *Tetrahedron Asymmetry*, 12: 1953-1956
- Demir, A., Hamamcı, H., (1998), “Synthesis and *Rhizopus Oryzae* Mediated Enantioselective Hydrolysis of α -Acetoxy Aryl Alkyl Ketones”, *Tetrahedron Asymmetry* 9: 1673-1677
- Demir, A., Hamamcı, H., (2002), “Fungal Deracemization of Benzoin”, *Tetrahedron Letters*, 43: 6447-6449
- Demir, A., Reis, Ö., Iğdır Ç., (2004), “Reinvestigation of the Synthetic and Mechanistic Aspects of Mn(III) Acetate Mediated Oxidation of Enones”, *Tetrahedron*, 60: 3427-3432
- Doble, M., Kruthiventi, A., Gaikar, V., (2004), *Biotransformations and Bioprocesses*, Markel Dekker, Inc, New York Basel
- Erich, K., Eggert, R., (2002),” Lipases for Biotechnology”, *Molecular Enzyme Technology*, 13: 390-397
- Faber, K., (1999), “Biotransformations in Organic Chemistry. Springer, 1:26
- Fessenden, R.J., (1990) *Organik Kimya*, (T., Uyar), Güneş Kitabevi
- Franco, L., Joffe, E., Puricella, L., Tation, M., Seldes, A., Palermo, J., (1997), “ Indole Alkaloids from The Tunicate *Aplidium Meridianum*”, *J. Nat. Prod.*, 61: 1130-1132
- Fürstner, A., Weintritt, H., (1997), “Total Synthesis of Roseophilin”, *J. Am. Chem. Soc.*, 120: 2817-2825
- Gendy, A., Said M., Ghareb N., Mostafa Y., El-Ashry E., (2008), “Synthesis and Biological Activity of Functionalized Indole-2-carboxylates, Triazino-and Pridazino-indoles”, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, 341: 294-300
- Hasan, F., Shah, A., Hameed, A.,(2006),” Industrial Application of Microbial Lipases”, *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 235-251
- Horton, D., Gregory, B., Smythe, M., (2002), “The Combinatorial Synthesis of Bicyclic Privileged Structures of Privileged Substructures”, *Chem Rev.*, 103: 893-930
- Huleatt, P., Choo, S., Chua, S., Chai, C., (2008), ”Expedient Routes to Valuable Bromo-5,6-Dimethoxyindole Building Blocks”, *Tetrahedron Letters*, 49: 5309-5311
- Johnson, N.,(2005), “Asymmetry at The Molecular Level in Biology”, *Academia Europea*, 13:77-95
- Kemdi, M., Fares, F., Yannai, S., (2004), “Therapeutic Activity of 3,3-Diindolylmethane on Prostate Cancer in an In Vivo Model”, *The Prostate*, 61: 153-160
- Kueth, J., Davies, I., (2006), “Preparation of Arylindole-4-Carboxylic Amide Derivatives” *Tetrahedron*, 62: 1-10

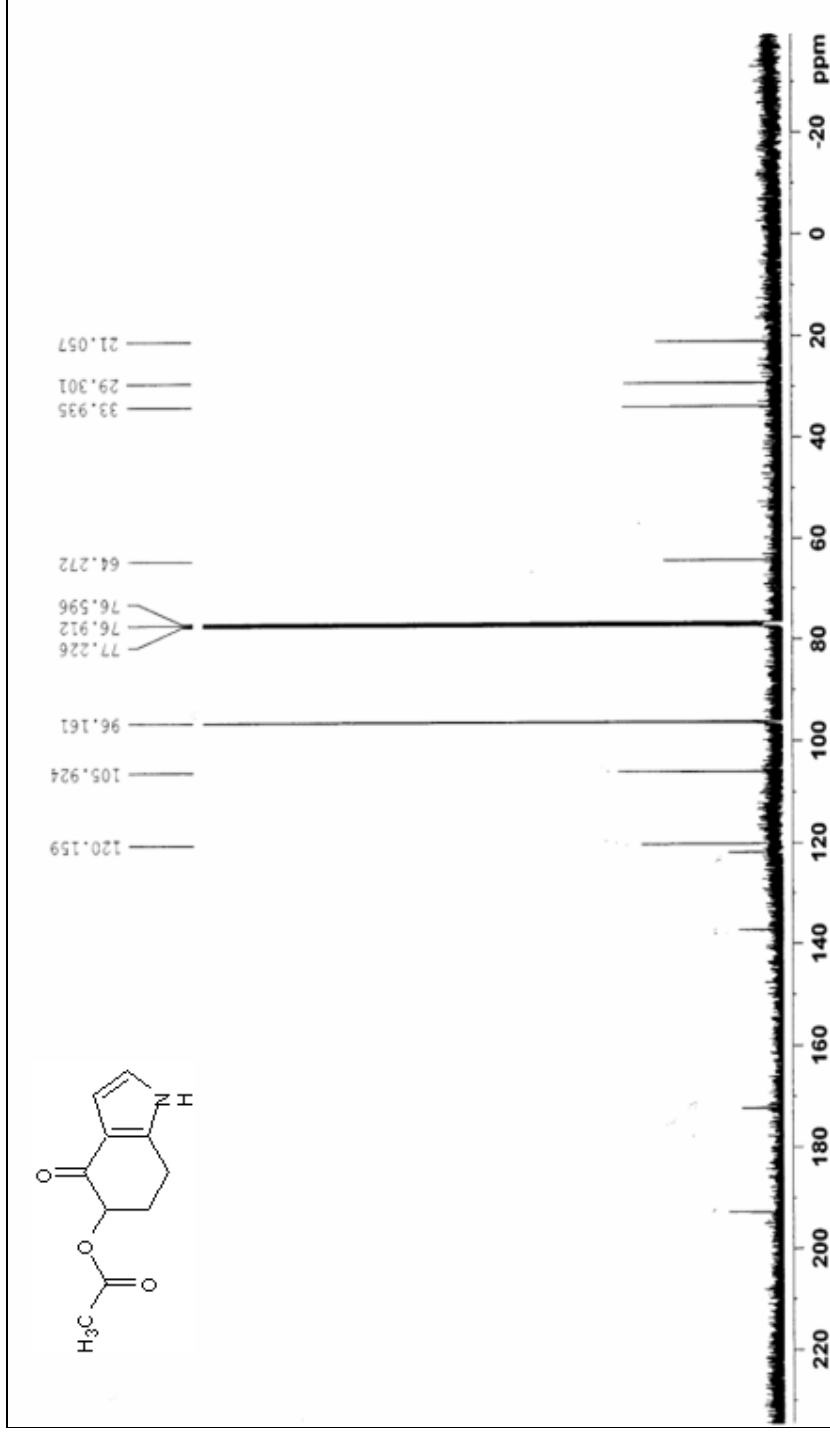
- Kuehne, M., Podhorez, D., Mulamba, T., Bornmann, W., (1986), "Enantioselective Synthesis with Epichlorohydrin: Total Synthesis of (+)-, (-)-, and (+-) Vindoline and a Synthesis of Vindoresine", *J. Org. Chem.*, 52: 347-353
- Liese A., Filho M.V., (1999), 10: 595
- Modi, S., Zayed, A., Archer, S., (1989), "Synthesis of 6-Substituted 7H-Pyrido (4,3-c) Carbozole", *J. Org. Chem.*, 54: 3084-3087
- Moore, R., Cheuk, C., Yang, X., Patterson, G., (1986) "Hapalindoles, Antibacterial and Antimycotic Alkaloids from the Cyanohyete *Hapalosiphon fontinalis*", *J. Org. Chem.*, 52: 1086-1043
- Nayyar, N., Hutchison, D., Martinelli, M., (1997), "New Approach for The General Synthesis of Oxotetrahydroindoles via Intramolecular Cycloaddition of Azomethine Ylides with Tethered Alkynes", *J. Org. Chem.*, 62: 982-991
- Panke, S., Held, M., Wubbolts, M., (2002), *Curr Opin Biotechnology*, 15:272
- Patel, N., (2002), "Microbial Enzymatic Synthesis of Chiral Intermediates for Pharmaceutical", *Enzyme and Microbial Technology*, 31: 804-826
- Pathak, V., Gupta, R., Garg, M., (2004), "Synthesis, Spectral, and Antimicrobial Studies of 1-Butyl-3-Substituted-4-(2-aryl-1-indol-3-yl)-2-Azetidinones", *Heteroatom C.*, 15
- Per, Berglund, (2001), "Controlling lipase enantioselectivity for organic synthesis", *Biomolecular engineering*, 18: 13-22
- Pudlo, M., Gerard, S., Mirand, C., Sapi J., (2007), "A Tandem Radical Cyclization Approach to 3-(2-oxopyrrolidin-3-yl)indolin-2-ones, Potential Intermediates Toward Complex Indole-heterocycles", *Tetrahedron Letters*, 49:1066-1070
- Radvan, M., El-Sherbiny M., (2007), "Synthesis and Antitumor Activity of Indolpyrimidines: Marine Natural Product Meridianin D Analogues", *Bioorganic Medical Chemistry*, 15: 1206-1211
- Radvan, M., Ragab e., Sabry, N., (2007), "Synthesis and Biological Evaluation of New 3-Substituted Indole Derivatives as Potential anti-inflammatory and Analgesic Agents", *Bioorganic Medical Chemistry*, 15: 3832-3841
- Ramsay, O.B., (1981) *Stereochemistry*, Heden, London
- Rasor, Peter, J., Voss Edgar, (2001), "Enzyme-catalyzed in Pharmaceutical Industry", *Applied Catalysis A*, 221: 145-158
- Reddy, V., Storer, R., Laws, G., Armstrong M., Barnum J., Gara J., (2002), "Genotoxicity of Naturally Occurring Indole Compounds: Correlations Between Covalent DNA Binding and Other Genotoxicity tests", *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 40:1-17.
- Reetz Manfred, (2002), "Lipases as Biocatalysts", *Current Opinion in Chemical Biology*, 6: 145-150
- Rieck, G., Fiander, A., (2008), "Human Papillomavirus, Cervical Carcinogenesis Chemoprevention with Indole Derivatives- a Review of Pathomechanisms", *Mol. Nutr. Food*, 52:105-113

- Sakemi, S., Sun, H., (1990), "Nortopsentins A,B and C. Cytotoxic and Antifungal Imidazoledilbis(indoles) from the Sponge *Spongisorites ruetzleri*", J. Org. Chem., 56:4304-4307
- Schmidt, C., (1998), "Recombinant Microbial Lipases for Biotechnological Applications", Bioorganic Medical Chemistry, 7: 2123-2130
- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee U.,(2001), "Production, Purification, Characterization and Applications of Lipases", Biotechnology Advances, 19:627-662
- Singh, P., Surpur, M., Patil, S., (2008), "An expeditious and environmentally benign methodology for the synthesis of substituted indoles from cyclic enol ethers and enol lactones", Tetrahedron Letters, 49: 3335-3340
- Skwarczynski, Mariusz, L., Barbara, K., Pawel, (1999) "Enantioselective Hydrolysis of 1-Butyryloxyalkylphosphonates by Lipolytic Microorganisms: *Pseudomonas fluorescens* and *Penicillium citrinum*", Chirality, 11: 109-114
- Solomons, G., (2002), Organik Kimya, (T., Uyar), 7. Basımdan Çeviri, Literatür Yayınları,
- Soltes, L., Bauer U., (2000), "Extraction and Chromatographic Separation Methods in Pharmacokinetic Studies of Stoppedine-an Indole Related Antioxidant and Free-Radical Scavenger", Biomedical Chromatography, 14: 188-201
- Spadoni, G., Diamantini, G., Bedini, A., Tarzia, G., (2006), "Synthesis Antioxidant Activity and Structure-activity Relationships for a New Series of 2-(N-acetamidoethyl)indoles with Melatonin-like Cytoprotective Activity", J. Pineal Res., 40: 259-269
- Strauss, U., Felfer, U., Faber, K.,(1998), "Biocatalysis Transformation of Racemates into Chiral Building Blocks in 100 % Chemical Yield and 100 Enantiomeric Excess", Tetrahedron: Asymmetry, 10: 107-117
- Tanyeli, C., Akmedov, İ., Yazıcıoğlu, E., (2004), "One-pot Synthesis of N-Substituted 2-methyl-4,5,6,7-tetrahydroindole Derivatives", Tetrahedron Letters, 45: 9627-9629
- Telefoncu, A., (1997), Enzimoloji, Ege Üniversitesi, İzmir.
- Trofimov, B., Sobenina L., Stepanova, Z., Petrova, O., Mikhalevo A., (2008), "Chemo- and Regioselective Ethynylation of 4,5,6,7-Tetrahydroindoles with Ethyl 3-halo-2-propynoates", Tetrahedron Letters, 49: 3946-3949
- Wang, Z., Jimenez, L., (1994), "Synthesis of The Tetracyclic Mitomycin Skeleton via A Dialkylvinylsulfonium Salt", J. Org. Chem., 59: 4977-4978
- Wendy, A., Loughlin, (2000), "Biotransformation in organic synthesis", Bioresource Technology, 74: 49-62

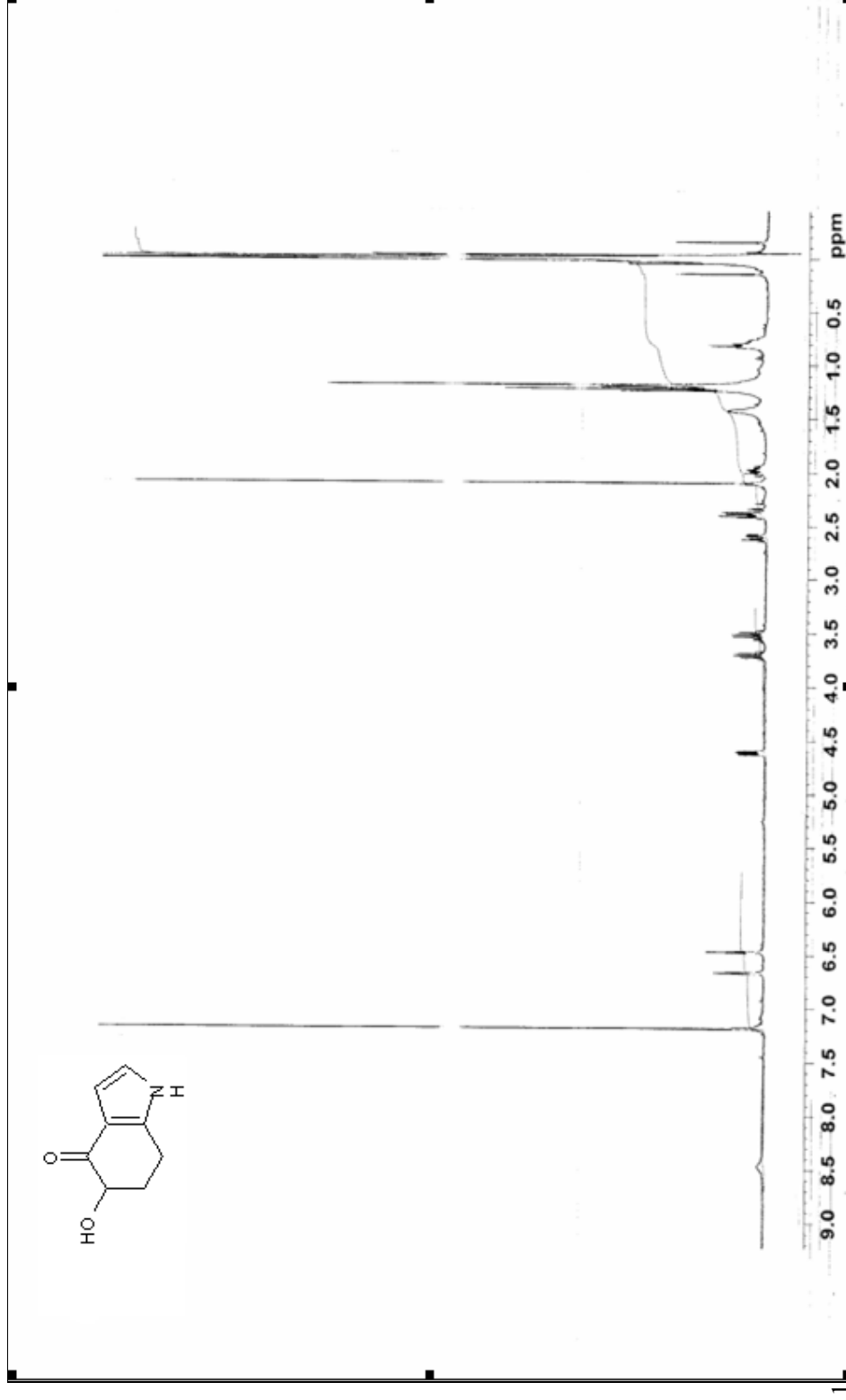
EK-1 NMR ve IR Spektrumları



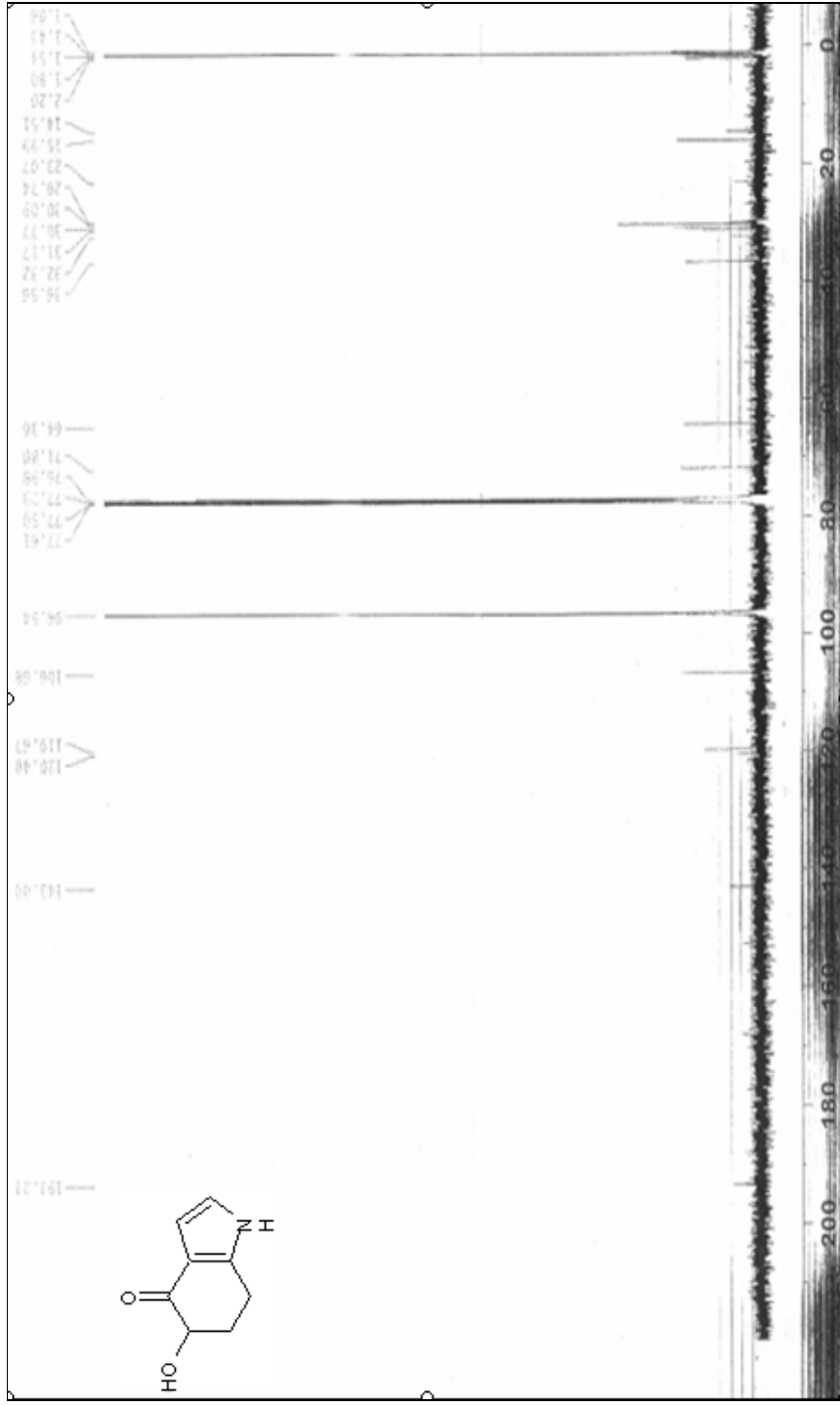
Şekil Ek 1.1 1 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1*H*-indol-5-il-asetoksi bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu



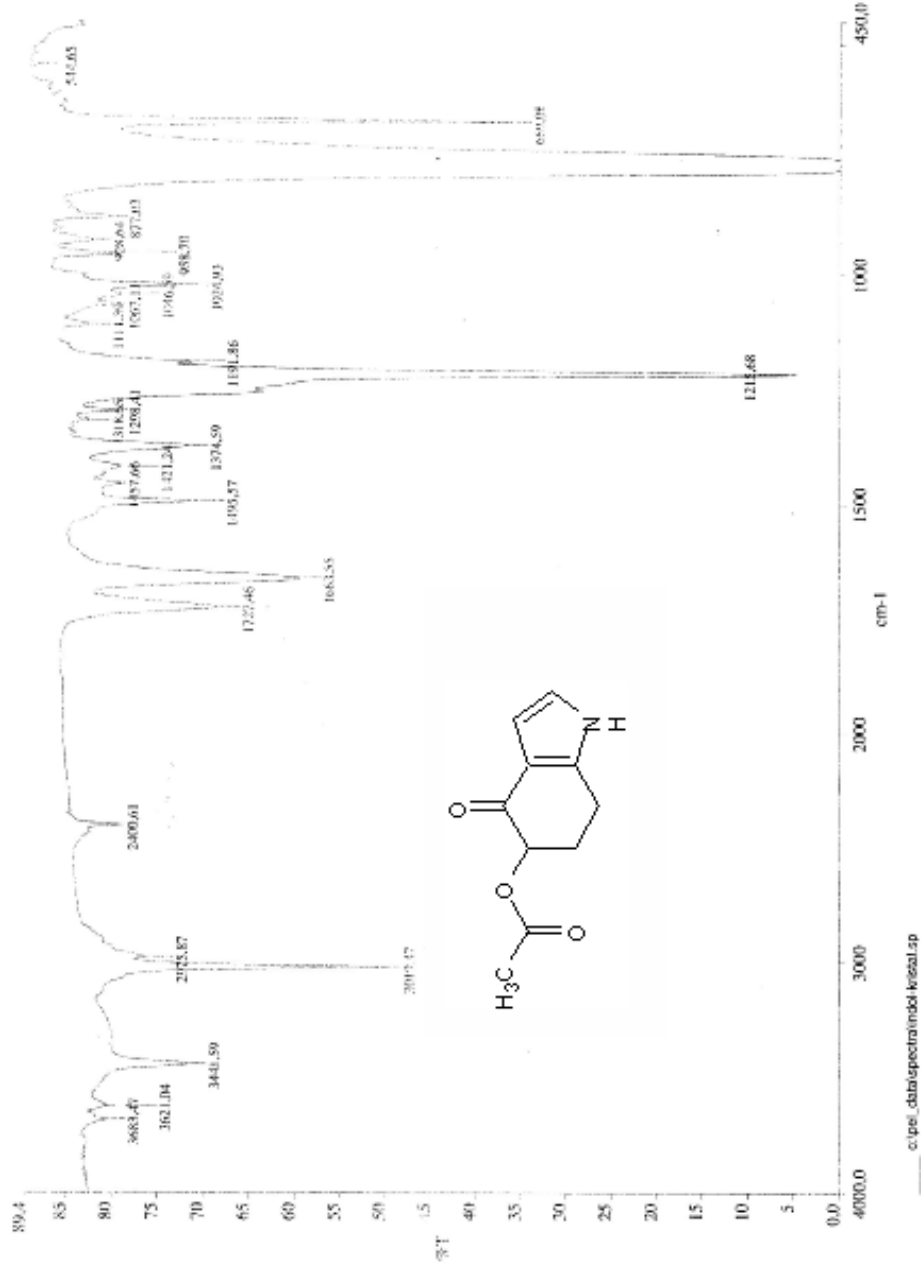
Şekil Ek 1.2 4,5,6,7-tetrahydro-4-okso-1H-indol-5-il-asetoksi bileşiğinin ¹³C-NMR spektrumu



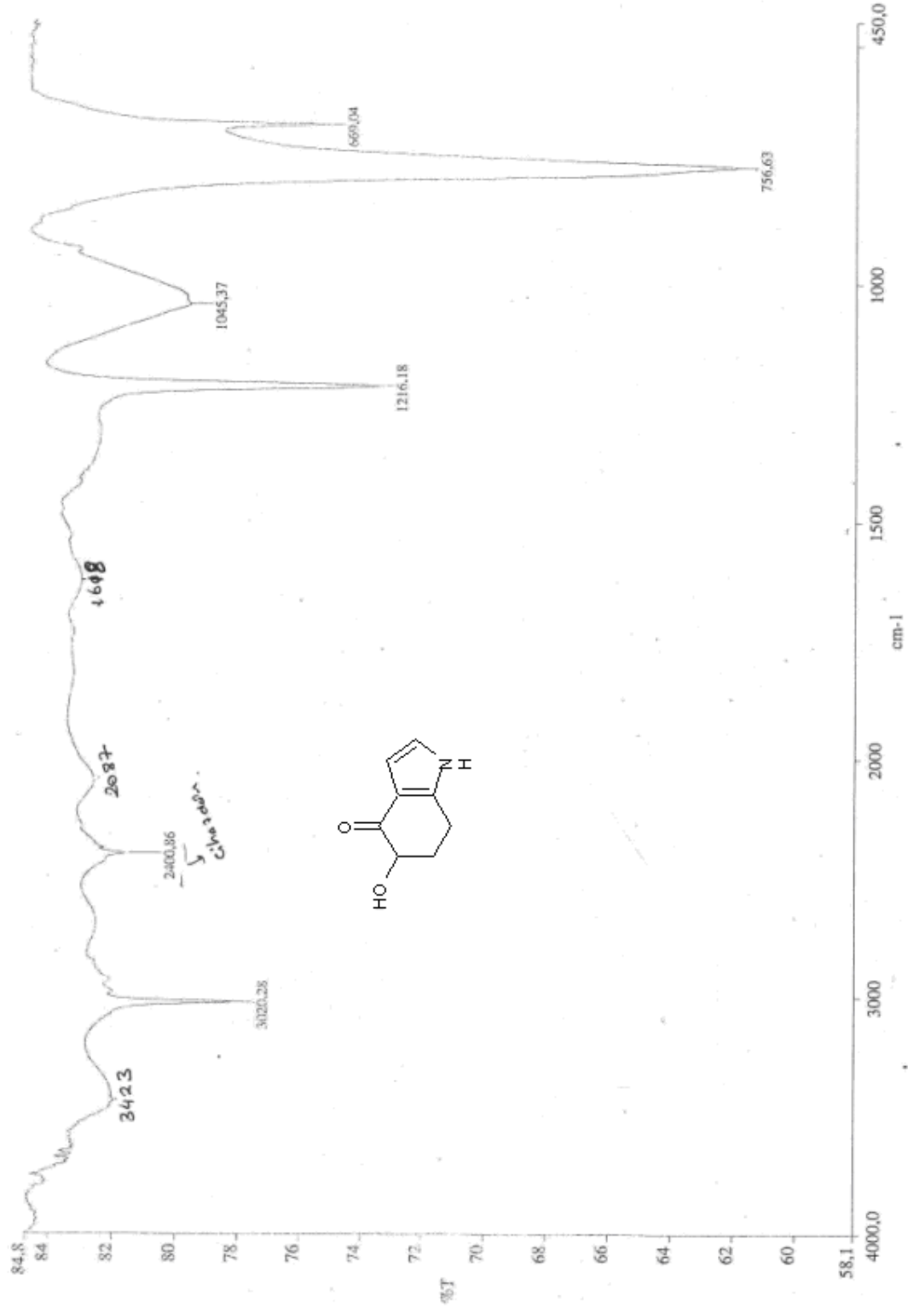
Şekil Ek 1.3 6,7-dihidro-5-hidroksi-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu



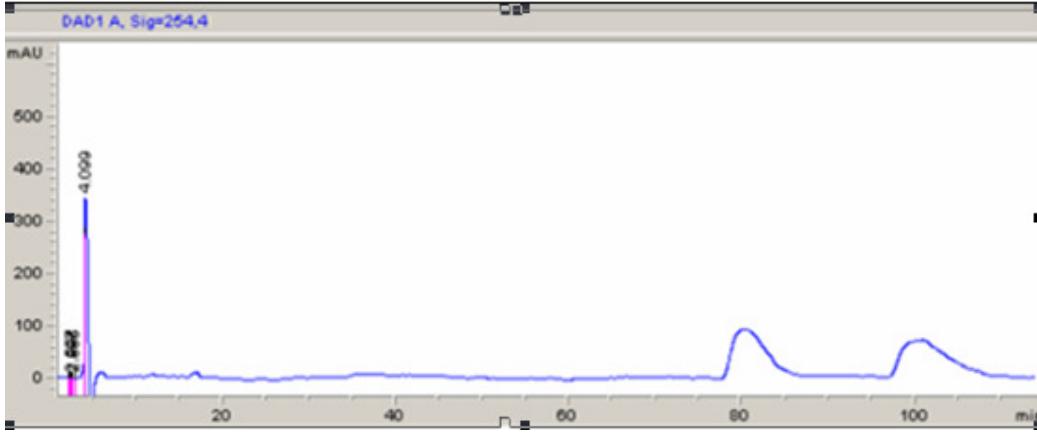
Şekil Ek 1.4 6,7-dihidro-5-hidroksi-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin ¹³C-NMR spektrumu



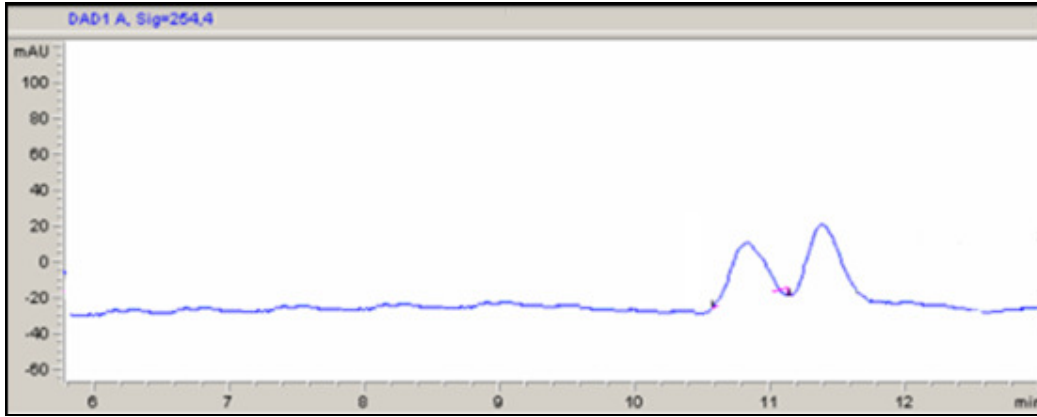
Şekil Ek 1.5 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1H-indol-5-il-asetoksi bileşiğinin IR spektrumu



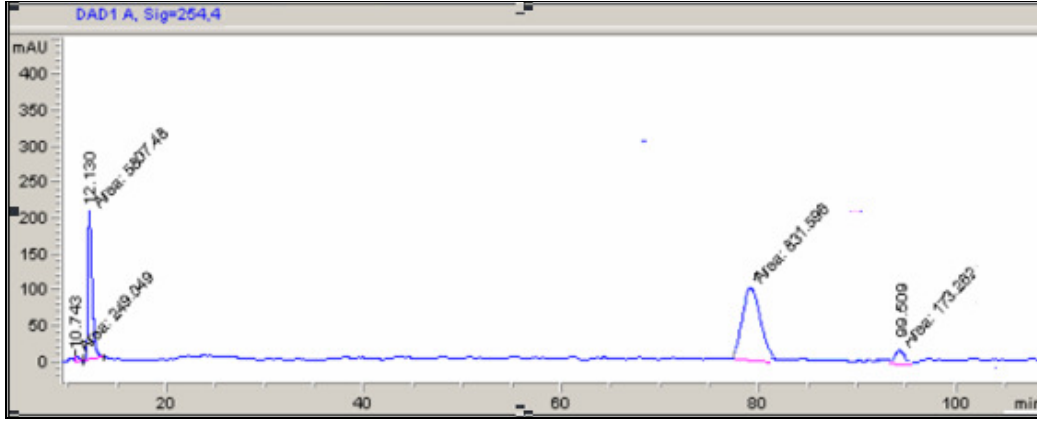
Şekil Ek 1.6.6.7-dihidro-5-hidroksi-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin IR spektrumu

EK-2 HPLC Analiz Sonuçları

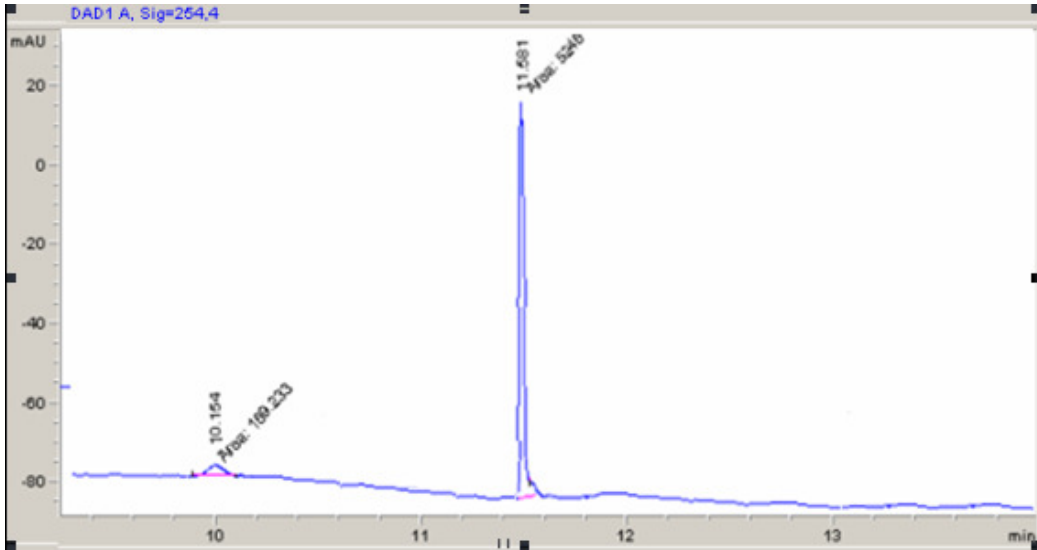
Şekil Ek 2.1 Standart olarak kullanılan rasemik 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1H-indol-5-il-asetoksi bileşiğinin HPLC analiz sonucu



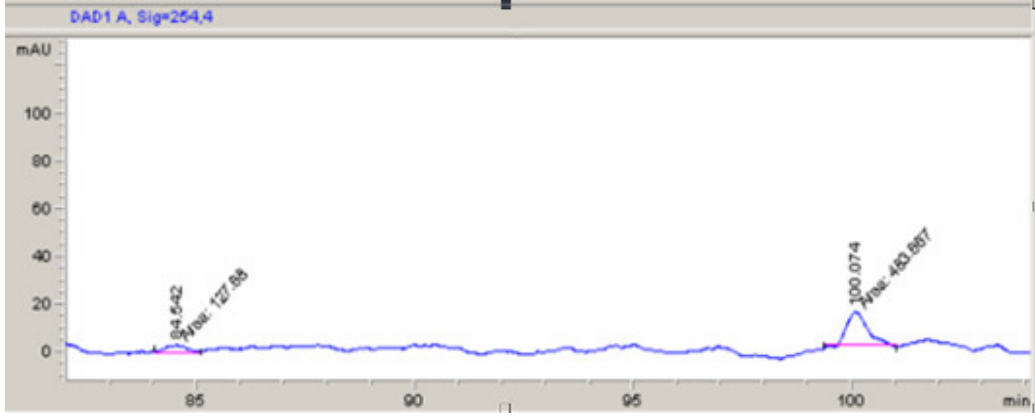
Şekil Ek 2.2 Standart olarak kullanılan rasemik 6,7-dihidro-5-hidroksi-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin HPLC analiz sonucu



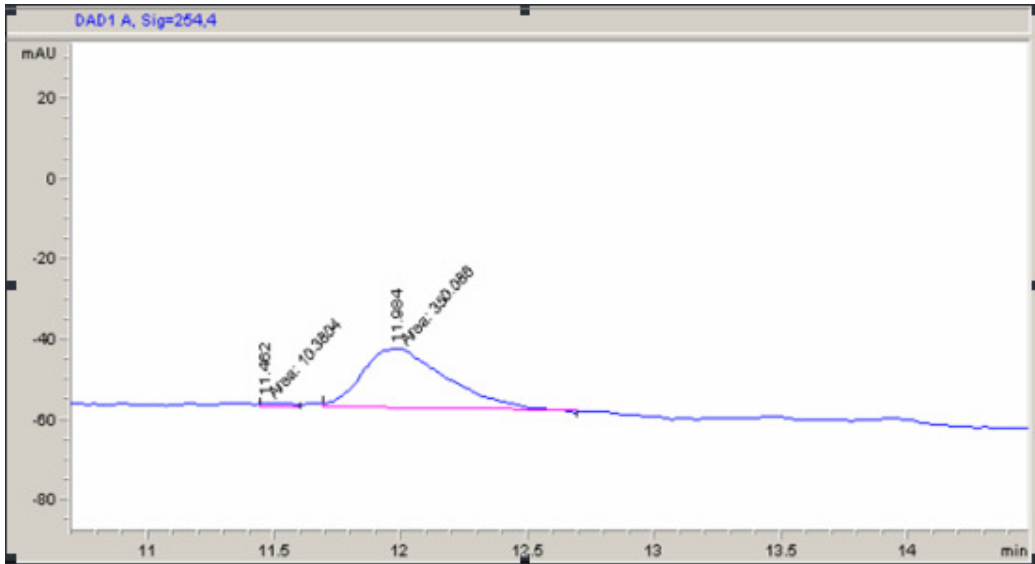
Şekil Ek 2.3 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1H-indol-5-il-asetoksi ve 6,7-dihidro-5-hidroksi-1H-indol-4(5H)-on bileşiklerinin *Rhizopus arrhizus* lipazı ile THF ortamında hidrolizinin HPLC analiz sonucu



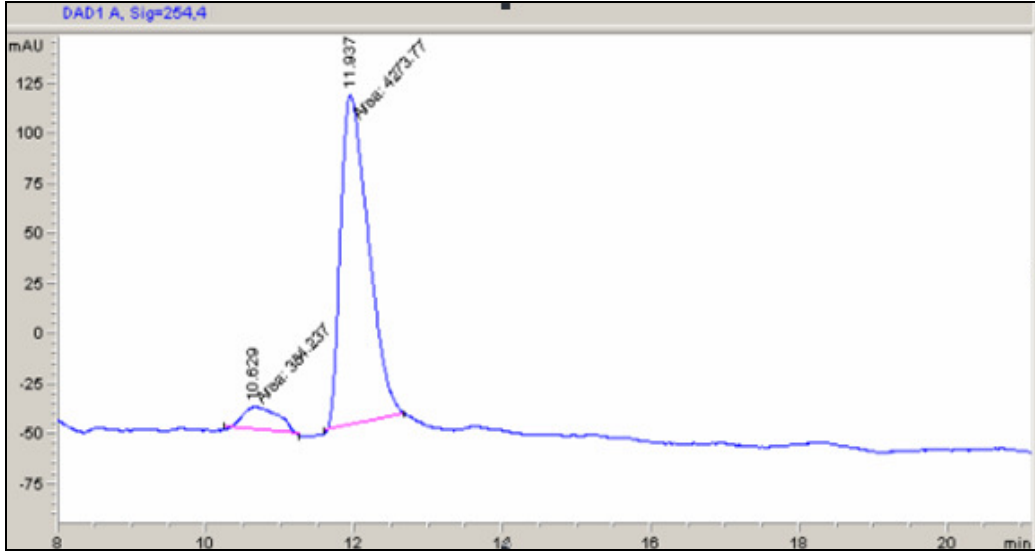
Şekil Ek 2.4 6,7-dihidro-5-hidroksi-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin THF ortamında *Penicillium roqueferti* lipazı ile HPLC analiz sonucu



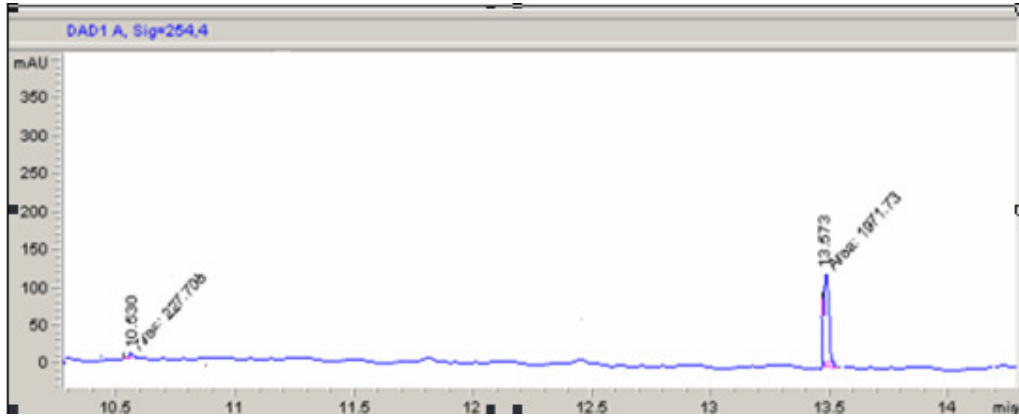
Şekil Ek 2.5 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1H-indol-5-il-asetoksi bileşiğinin THF ortamında *Penisillium roqueferti* lipazı ile HPLC analiz sonucu



Şekil Ek 2.6 6,7-dihidro-5-hidroksi-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin asetonitril ortamında HPL lipazı ile HPLC analiz sonucu



Şekil Ek 2.7 6,7-dihidro-5-hidroksi-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin asetonitril ortamında HPL lipazı ile HPLC analiz sonucu



Şekil Ek 2.8 6,7-dihidro-5-hidroksi-1H-indol-4(5H)-on bileşiğinin DMSO ortamında CAL lipazı ile HPLC analiz sonucu

DAD1 A, Sig=254,4

mAU

260

240

220

200

180

160

140

84.280

Area: 940.839

108.716

Area: 137.388

85

90

95

100

105

110

min

Şekil Ek 2.10 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1H-indol-5-il-asetoksi bileşiğinin THF ortamında HPL lipazının HPLC analiz sonucu

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi	13.08.1979
Doğum yeri	Çorum
Lise	1993-1997 Çorum Atatürk Lisesi (Yabancı Dil Ağırlıklı Lise)
Lisans	1998-2002 Ankara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
Tezsiz Yüksek Lisans	2003-2004 İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ortaöğretim Alan Öğretmenliği
Yüksek Lisans	2005-2009- Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü