

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

**BİYOTEKNOLOJİK METOTLARLA DİHİDROBENZOFURANON
TÜREVLERİNİN SENTEZLERİ**

EBRU NUR AY

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

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

İSTANBUL, 2015

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİYOTEKNOLOJİK METODLARLA DİHİDROBENZOFURANON
TÜREVLERİNİN SENTEZLERİ**

Ebru Nur AY tarafından hazırlanan tez çalışması 18. 08. 2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

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

Jüri Üyeleri

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

Yrd. Doç.Dr. Emel Ordu
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç.Dr. Semra Hasaebi
Trakya Üniversitesi

ÖNSÖZ

Yüksek lisansıma başladığım günden beri gerçekleştirdiğim bu tez çalışmamı yöneten, çalışmalarımda yardımını esirgemeyen, danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Zerrin ZERENLER ÇALIŞKAN'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca, karşılaştığım her zorlukta, hiçbir konuda yardımlarını esirgemeyen, güler yüzleri ve sıcacık ilgileri ve sonsuz destekleri ile ihtiyacım olan her an yanımda olan değerli çalışma arkadaşlarım, Tuğba DAYIOĞLU, Eda SOYDAN ve Tuğba GÜLBAY'a bana gösterdikleri sabır, ilgi ve anlayışları için çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca, önüme çıkan her türlü zorluğu aşmamda bana güç veren, destekleri, ilgileri ve bilimsel bakış açıları beni her durumda rahatlatan, yoğun çalışma tempolarında dahi ilgilerini ve desteklerini üzerimden eksik etmeyen, Uzm. F.Pınar ÇAĞLAR'a ve Hüseyin SERVİ'ye her zaman benimle oldukları için çok teşekkür ederim.

Biyoaktivite çalışmalarımda bana çok yardımcı olan ve her konuda bilgisine güvendiğim kıymetli arkadaşım Mediha SÜLEYMANOĞLU'na çok teşekkür ederim.

Yüksek lisansım ile başlayan arkadaşılığımızdan bu zamana kadar, her zaman ve her koşulda yanımda olduklarını hissettiğim, güleryüzleri ile desteklerini ve dostluklarını benden hiç esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Gizem AKTAŞ, Kadir ÜSTÜNER ve Halil ŞENOL'a çok teşekkür ederim.

Hayata adım attığım ilk günden beri sonsuz ilgi ve sevgisi ile verdiği her kararda bana destek olan, bana her zaman inanan, güvenen, güç ve moral veren, hep yanımda olan canım annem Gülşah AY, sevgili kardeşim Yusuf Emre AY ve onun tatlı eşi Merve AY'a yaşamıma kattıkları tüm güzellikler için sonsuz teşekkür ederim.

Ağustos, 2015

Ebru Nur AY

İÇİNDEKİLER

Sayfa

KISALTMA LİSTESİ.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	x
ÖZET.....	xi
ABSTRACT.....	xii
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	8
1.3 Orijinal Katkı	8
BÖLÜM 2	
STEREOKİMYASAL TANIMLAR.....	10
2.1 Stereokimya ve Moleküllerde Stereoizomerlik.....	10
2.2 Stereoizomeri (moleküler üç boyutlu yapı)	11
2.3 Moleküler Kiralite.....	12
2.3.1 Moleküler Asimetri: Kiral (Chiral) ve Kiral Olmayan (Achiral) Moleküller.....	12
2.3.2 Birden Fazla Kiral Merkez Taşıyan Bileşikler.....	13
2.3.3 Mezo Bileşikler.....	14
2.4 Kiral Moleküllerde Optikçe Aktivite	14
2.4.1 Polarize Işığın Doğası ve Çevirme Açısı.....	14
2.4.2 Çevirme Açısı, α ve Özgül Çevirme Açısı, $[\alpha]$	16
2.5 Optikçe Aktif Bileşiklerin Konfigurasyonları ve Gösterilişleri.....	16
2.6 Enantiyomerler ve Diastereoizomerler	17
2.6.1 Enantiyomerler.....	17
2.6.2 Diastereoizomerler.....	19
2.7 Enantiyomerlerin Farklı Biyoaktivite Özellikleri.....	20
2.8 Rasemik Karışım ve Rezolüsyon	23
2.8.1 Rasemik Bileşiklerin Rezolüsyonunda Kullanılan Yöntemler.....	23

BÖLÜM 3

ENZİMATİK BİYOTRANSFORMASYON YÖNTEMİ.....	27
3.1 Enzimler.....	27
3.1.1 Enzimlerin Sınıflandırılması.....	28
3.1.2 Enzimlerin Substrat Spesifikliği.....	30
3.1.3 Enzimlerin Etki Mekanizmaları.....	31
3.1.4 Enzim Reaksiyonlarının Hızına Etki Eden Faktörler.....	33
3.1.5 Enzimatik reaksiyonlarında serbest enerji değişimleri.....	34
3.1.6 Enzim Katalizli Reaksiyonların Kinetiğinin Denklemi.....	35
3.1.7 Enzimatik Reaksiyonların Mekanizması.....	37
3.2 Biyotransformasyon.....	38
3.2.1 Biyotransformasyon Reaksiyon Tipleri.....	38
3.3 Enzimatik Biyotransformasyon Reaksiyonları.....	40
3.3.1 Biyotransformasyon Reaksiyonlarda Enzimlerin Tercih Edilme Nedenleri.....	40
3.3.2 Enzimlerin Kiral Seçicilik Özellikleri ve Enzimatik Reaksiyon Mekanizması.....	40
3.4 Biyotransformasyon Reaksiyonlarında Kullanılan Lipaz Enzimlerinin Önemi.....	42
3.5 Biyotransformasyon Çalışmalarında Sıklıkla Tercih Edilen Lipaz Enzimler.....	44

BÖLÜM 4

BİYOAKTİVİTE ÇALIŞMALARI - MITOKONDİRİYAL AKTİVİTEYE DAYALI MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyumbromür) DENEYİ.....	47
---	----

4.1 Biyoaktivite Çalışmaları - Mitokondriyal Aktiviteye Dayalı MTT(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) Testi.....	47
---	----

BÖLÜM 5

α - HİDROKSİ KETONLARIN VE MANGAN (III) ASETATIN ÖNEMİ	50
5.1 Farmakolojide α -Hidroksi Ketonların Önemi	50
5.2 α,β -Doymamış Ketonların Sentezinde Mangan (III) Asetatın Önemi	52

BÖLÜM 6

MATERYALLER.....	54
6.1 Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan KimyasallarÇizelge 6.1 Deneyisel çalışmalarda kullanılan kimyasallar	54
6.2 Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar	56

BÖLÜM 7

DENEYSEL ÇALIŞMALAR VE BULGULAR	58
7.1 Kimyasal Sentez Reaksiyonları	59
7.1.1 6,7-Dihidro-6-Fenilbenzofuran-4(5H)-On (2) Bileşiğinin Sentezi.....	59

7.1.2	6,7-Dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on Bileşiğine Mangan (III) Asetat Katalizörü ile α -Asetoksi Benzofuranon Sentezi.....	63
7.2	4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il (4) hidroksi Bileşiğinin Enzimatik Biyotransformasyon Reaksiyonları ile Sentezi	65
7.3	4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (3) ve 4,5,6,7-tetrahidro- 6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi (4) Bileşiklerinin Biyoaktivite Çalışmaları ve MTT deneyi.....	70
BÖLÜM 8		
SONUÇLAR VE ÖNERİLER		72
8.1	Benzofuranon Türevi Bileşiklerin Kimyasal Yöntemlerle Sentezi	73
8.1.1	6,7-Dihidro-6-Fenilbenzofuran-4(5H)-On Bileşiğinin Kimyasal Yöntemler ile Eldesi.....	73
8.2	4,5,6,7-Tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (3) Bileşiğinin Kimyasal Yöntemler ile Eldesi.....	74
8.3	4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi Bileşiğinin Enzimatik Biyotransformasyon Reaksiyonları ile Elde Edilmesi	77
8.3.1	4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi (4) Bileşiğinin Enzimatik Biyotransformasyon Reaksiyonları ile Sentezinin HPLC Sonuçlarının değerlendirilmesi.....	78
8.4	4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetoksi ve 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi bileşiğinin biyoaktivite çalışmaları	83
8.5	ÖNERİLER	84
KAYNAKLAR.....		85
EK-A		
6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on (2) BİLEŞİĞİNİN SPEKTRAL ANALİZ SONUÇLARI		92
(1H-NMR, 13C-NMR ve IR).....		
EK-B		
4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat(3) BİLEŞİĞİNİN SPEKTRAL ANALİZ SONUÇLARI (1H-NMR, 13C-NMR, IR ve LC-MS Q-TOF).....		96
EK-C		
4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi (4) BİLEŞİĞİNİN SPEKTRAL ANALİZ SONUÇLARI (1H-NMR, 13C-NMR, IR ve LC-MS Q-TOF).....		102
EK -D		
4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (3) BİLEŞİĞİ ÜZERİNDE GERÇEKLEŞTİRİLEN ENZİMATİK BİYOTRANSFORMASYON REAKSİYONLARININ HPLC SONUÇLARI.....		107
EK-E		
4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (3) ve 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi (4) BİLEŞİKLERİNİN HEPG2 VE P3HR1 HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK ANALİZLERİ.....		115
ÖZGEÇMİŞ.....		118

KISALTMA LİSTESİ

CAL B	Candida antarctica Lipaz B
CCL	Candida cyclindracea Lipaz
CRL	Candida rugosa Lipaz
D	Dekstro
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
ee	Enantiyomerik fazlalık (Enantiomeric excess)
HPL	Hog pancreas Lipaz
HepG2	Karaciger karsinoma hücre dizisi
KMnO ₄	Potasyum permanganat
L	Levorotary
MgSO ₄	Magnezyum sülfat
Mn	Mangan
MJL	Mucor javanicus Lipaz
MTT	(3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue
NaHCO ₃	Sodyum bikarbonat
P3BH1	Burkitt Lenfoma hücre dizisi
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCL	Penicillum camemberti Lipaz
PLL	Pseudomonas lipoprotein Lipaz
PRL	Penicillum roqueforti Lipaz
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
R	Rektus (Sağ)
S	Sinister (Sol)
THF	Tetrahidrofuran
WGL	Wheat germ Lipaz
XTT	(2,3-bis[2-Methoxy-4-nitro-5-sülfophenyl]-2H-tetrazolium -5-carboxanilide iner salt)
WST-1	2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-[2,4-disulfophenyl]-2H-tetrazolium monosodium salt)

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1.1 Benzofuran türevi moleküllerin farklı biyoaktivite özellikleri	2
Şekil 1.2 α -Hidroksi keton molekül formülü	3
Şekil 1.3 1 no'lu bileşiğin <i>A. alliaceus</i> ile biyotransformasyonundan elde edilen butein (7) ve aurone sulfuretin (10)	5
Şekil 1.4 Triptofan molekülünün <i>Aspergillus niger</i> ile biyotransformasyonu	5
Şekil 1.5 Benzil türevi bileşiğin bir <i>Aspergillus sp.</i> türü ile mikrobiyal biyotransformasyonu .	6
Şekil 1.6 Rekombinant <i>E. coli</i> hücresiyle bir keton türevi bileşiğin mikrobiyal biyodönüşümü	6
Şekil 1.7 4,5,6,7-Tetrahidro-4-okso-benzofuran-5-il asetat (2a,2b) ve 1-benzil-4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1(H)-indol-5-il asetat (5) bileşiklerindeki enzimatik rezolüsyonu (b)	7
Şekil 1.8 Rasemik 1-fenil 1- propanolün esterleşme tepkimesiyle kinetik rezolüsyonu	7
Şekil 2.1 Aynı molekül formülüne sahip bileşiklerin izomerleri.....	10
Şekil 2.2 İzomerlerin sınıflandırılması	11
Şekil 2.3 Maleik asit ile fumarik asit izomerleri	12
Şekil 2.4 Laktik asidin enantiyomerinin uzaysal gösterilişleri	12
Şekil 2.5 Akiral ve kiral yapılar	13
Şekil 2.6 Penisilin G ve Vitamin D ₂ nin stereoizomerlerinin sayısı.....	14
Şekil 2.7 Mezo bileşik	14
Şekil 2.8 Polarize ışığın rotasyonu.....	15
Şekil 2.9 Polarimetrenin çalışma mekanizması.....	15
Şekil 2.10 Alanin aminoasidinin –D ve –L gösterimleri	17
Şekil 2.11 Stereojenik merkez içeren bir karbon atomu.....	17
Şekil 2.12 Kiral maddelerin ayna görüntüleri	18
Şekil 2.13 Enzim reaksiyonlarında + ve – laktik asidi farklı davranışları	18
Şekil 2.14 Karvon bileşiğinin enantiyomerleri	19
Şekil 2.15 Eritrozlar ve Treozlar moleküllerinin diastereomerleri	20
Şekil 2.16 (I) ve (II) birbirlerinin enantiomeridir, (III) ve (IV) ise (I)'in diastereoisomerleridir	20
Şekil 2.17 (+)-Adrenalin molekülü.....	21
Şekil 2.18 (-)-Tiroksin	22
Şekil 2.19 a) S-(+)-Ketamin b) R-(-)-Ketamin	22
Şekil 2.20 Kinetik rezolüsyon	25
Şekil 3.1 Fumarat molekülünün fumaraz enzimi ile reaksiyonu	30
Şekil 3.2 L-malik asit ve D-malik asit	31

Şekil 3.3 Enzim-Substrat kompleksi	31
Şekil 3.4 Bir reaksiyonun aktivasyon enerjisi üzerinde enzimin etkisi.....	32
Şekil 3.5 Enzim konsantrasyonunun reaksiyona etkisi	33
Şekil 3.6 Substrat konsantrasyonunun reaksiyona etkisi.....	33
Şekil 3.7 Sıcaklığın reaksiyona etkisi	34
Şekil 3.8 pH'ın reaksiyona etkisi.....	34
Şekil 3.9 Enzim-Substrat kompleksi	35
Şekil 3.10 Glikozdan etanol eldesinin enzimatik yolu.....	37
Şekil 3.11 Biyotransformasyon reaksiyonlarının genel şeması.....	38
Şekil 3.12 Lipazların katalitik etkisi	42
Şekil 3.13 Lipaz katalizörlüğünde gerçekleşen tepkimeler	44
Şekil 4.1 A. MTT ilkesi ve formazan B. Kimyasal yapıları	48
Şekil 5.1 Hidroksi keton türevi bileşiğin biyotransformasyon reaksiyonları ile sentezi	51
Şekil 5.2 Seçici α,β -doymamış ketonların, α' -asetoksillenmesi	52
Şekil 7.1 5-fenil-1,3-sikloheksandion bileşiğinden (1) 6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran 4(5H)- on (2) sentezi	59
Şekil 7.2 5-fenil-1,3-sikloheksandion bileşiğinden başlanan reaksiyon sonucu	60
Şekil 7.3 Reaksiyonu sonlandırılması	60
Şekil 7.4 Kolon kromatografisinde saflaştırma işlemi.....	61
Şekil 7.5 Reaksiyon sonucunun ve kolon kromatografisini TLC sonucu	61
Şekil 7.6 Saf olarak elde edilen benzofuranon molekülünün (2) TLC sonucu.....	62
Şekil 7.7 6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on (2) bileşiği.....	62
Şekil 7.8 6,7-Dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on bileşiğinden (2) 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil- 4-oksobenzofuran-5-il asetat (3).....	63
Şekil 7.9 Mn(OAc) ₃ reaksiyonunun kolon kromatografisi ile saflaştırma işlemi.....	64
Şekil 7.10 Mn(OAc) ₃ reaksiyonu TLC sonucu	64
Şekil 7.11 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (3) bileşiğinin enzimatik biyotransformasyonu ve sentez ürünü 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4- oksobenzen-5-il hidroksi bileşiği (4)	65
Şekil 7.12 UV altında enzimatik reaksiyonların preparatif TLC sonucu	67
Şekil 8.1 5-fenil-1,3-sikloheksandion bileşiğinden (1) 6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)- on (2) sentezi	73
Şekil 8.2 6,7-Dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on bileşiğinden (2) 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil- 4-oksobenzofuran-5-il asetat (3).....	75
Şekil 8.3 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (3) bileşiğinin enzimatik biyotransformasyonu ve sentez ürünü 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4- oksobenzen-5-il hidroksi bileşiği (4)	77

ÇİZELGE

Sayfa

Çizelge 3.1 Enzimlerin sınıflandırılması.....	29
Çizelge 6.1 Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar.....	55
Çizelge 6.2 Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar.....	57
Çizelge 7.1 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (3) Q-TOF spektrum pik listesi.....	66
Çizelge 7.2 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi (4) Q-TOF spektrum piklistesi.....	67
Çizelge 7.3 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (3) bileşiğinin pH 7’de ve 3 farklı çözücü ortamında farklı lipaz enzimleri ile yapılan enzimatik biyotransformasyon çalışmalarının HPLC analiz bulguları.....	69
Çizelge 7.4 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (3) bileşiğinin pH 6, pH 7 pH 8’de ve DMSO ortamında farklı lipaz enzimleri yapılan enzimatik biyotransformasyon çalışmalarının HPLC analiz bulguları.....	70
Çizelge 7.5 I. Madde: 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat, II. Madde: 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi bileşiğinin HepG2 hücre hattındaki biyoaktivite değerlerinin ELİSA bulguları.....	72
Çizelge 7.6 I. Madde: 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat, II. Madde: 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi bileşiğinin P3HR1 hücre hattındaki biyoaktivite değerlerinin ELİSA bulguları.....	72

BİYOTEKNOLOJİK METODLARLA DİHİDROBENZOFURANON TÜREVLERİNİN SENTEZLERİ

Ebru Nur AY

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

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

Farmakolojik olarak önemli ilaç öncül maddesi benzofuranon türevi bileşikler, antibakteriyel, antifungal, antibiyotik ve antikanser etki gibi yüksek biyoaktiviteye sahip moleküllerdir. Bu moleküller üzerinde gerçekleştirilen biyodönüşüm çalışmaları yeni ilaçların geliştirilmesinde oldukça önemlidir.

Bu çalışmada, biyoteknolojik ve kimyasal yöntemler kullanılarak, biyoaktivite potansiyeli yüksek olan benzofuranon türevi bileşikler enzimatik biyotransformasyon yöntemi ile sentezlenmiştir. Bu çalışma, 2 basamaktan oluşmaktadır. Çalışmamızın 1. aşamasında, 6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on bileşiği başlangıç maddesi olarak sentezlenmiştir. Daha sonra, 6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on bileşiğinin regioselektif asetoksilasyon reaksiyonu ile 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat bileşiği rasemik olarak sentezlenmiştir.

İkinci aşamada ise, 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat molekülü uygun lipaz enzimleri uygun pH'da ve farklı çözücü sistemleri ile kinetik ayrıştırma reaksiyonlarına tabii tutulmuştur. Kinetik ayrıştırma reaksiyonu sonucunda optikçe saf 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat ve optikçe saf 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi türevleri yüksek enantiyomerik saflık ve yüksek verimde kemoenzimatik yöntemle literatürde ilk defa olarak elde edilmişlerdir.

Anahtar Kelimeler: Dihidrobenzofuranon, benzofuranon, lipaz, enzimatik biyotransformasyon

SYNTHESIS OF DIHYDROBENZOFURANONE DERIVATIVES WITH BIOTECHNOLOGICAL METHODS

Ebru Nur AY

Department of Molecular Biology and Genetics

MSc. Thesis

Adviser: Asist Prof. Dr. Zerrin Zerenler CALISKAN

Pharmaceutically important benzofuranone derivatives have high bioactivity as antibacterial, antifungal antibiotics and anticancer effects. Biotransformation studies performed on these molecules are very important in the development of new drugs in pharmaceutical industry.

In this study, using biotechnological and chemical methods, potential high bioactivity benzofuranone derivatives were synthesized by enzymatic biotransformation method. This study consists of two steps. In first stage of our study, 6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5*H*)-on compound was synthesized as starting material. Then, rasemic 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat compound was synthesized by regioselective acetoxylation reaction of 6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5*H*)-on compound.

In the second stage, 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetate molecule, various type of lipases are tested by kinetics resolution reactions in available pH value and different solvent systems. Result of kinetics resolution reactions, 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetate and 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hydroxy derivatives was obtained by chemoenzymatic method with enantiomeric purity and high enantiomeric excesses in first time in literature.

Keywords: Dihydrobenzofuranone, benzofuranone, lipase, enzymatic biotransformation

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

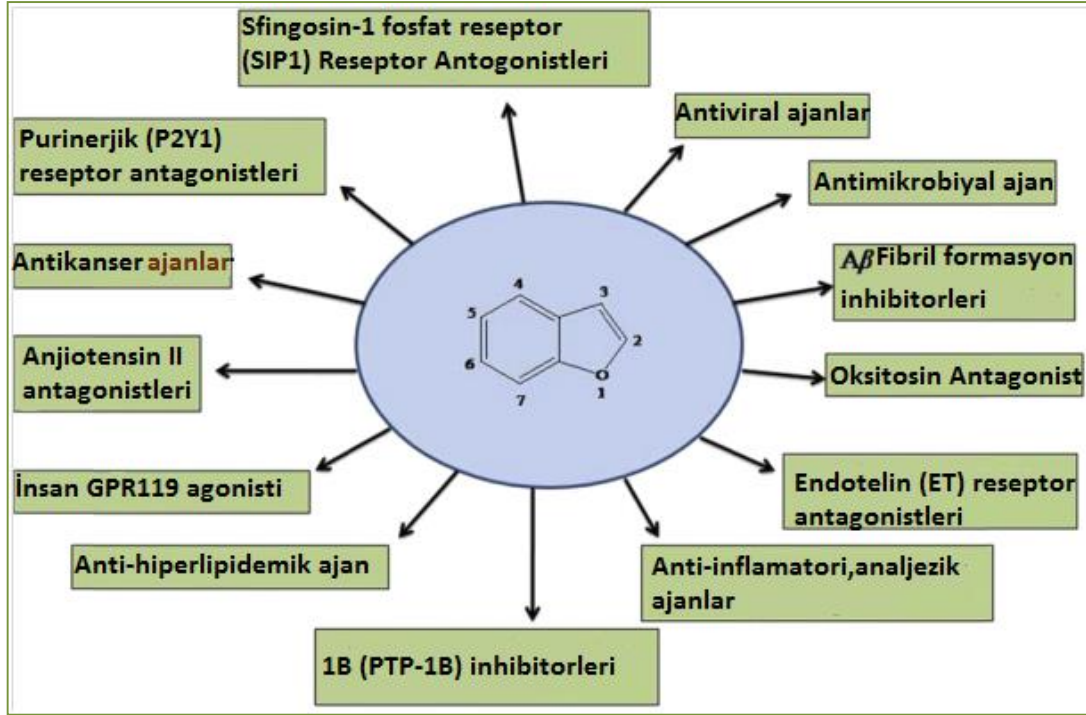
Farmakolojik olarak önemli benzofuranon türevleri ilaç endüstrisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Benzofuranon iskelet yapısındaki bileşiklerin farklı biyoaktivitelere sahip birçok türevi bulunmaktadır [1]. Benzofuranon molekülü, yüksek biyolojik aktiviteye sahip olmasından ve terapötik ajan olarak kullanılmasından dolayı pek çok araştırmada yer almaktadır [2],[3]. **Örneğin,**

Benzofuranon türevi bileşikler, anti-inflamatuar, antitümöral [4], antibakteriyel [3] ve antioksidan [5] gibi etkiler göstermektedirler.

Benzofuranon ve analogları, biyolojik aktiviteleri ve bitki savunma mekanizmasında üstlendikleri rolleri nedeniyle doğal olarak meydana gelen bileşiklerin ana grubunu oluşturmaktadırlar [6].

Auronlar birbiriyle kaynaşmış benzofuran halka sistemi içeren kalkon analoglarıdır. Auronlar, çeşitli biyolojik özelliğe sahip olan birkaç doğal ve sentetik molekül içinde bulunup temel yapı iskeletini şekillendirirler. Bazı auron yapısındaki bileşiklerin, anti-malarial [7] ve antifungal [8] özellik gösterdiği rapor edilmiştir.

(Z)-2-(2-Hydroxy-4-methoxybenzylidene)-1-benzofuran-3(2H)-one bileşiği, doğal olarak auron meydana getiren analogun, anti-hiperpigmentasyona karşı melanosit tirosinaz inhibitörü olarak özellik göstermektedir [9].



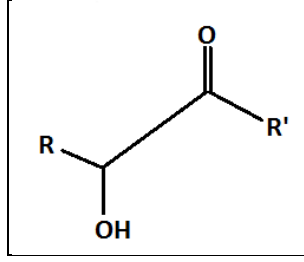
Şekil 1.1 Benzofuran türevi moleküllerin farklı biyoaktivite özellikleri

Yüksek biyolojik aktiviteye sahip olan benzofuranon türevlerinden bazıları ise, yüksek anti-mikrobiyal aktiviteye ve beyinde birikerek alzheimer hastalığına neden olan β -amiloid proteininin birikmesini engelleyici etki göstermektedirler. Böylece, benzofuranon bileşikleri alzheimer ilaçlarında yer alabilecek potansiyel ilaç etken maddesi olabilmektedirler [10].

Yeni yapılan çalışmalar, benzofuranon türevi bileşiklerin göğüs kanseri hücrelerine ve yumurtalık kanseri hücrelerine karşı potansiyel sitotoksik aktivitelerinin olduğunu göstermiştir [11],[12].

Benzofuranon halka yapısında da bulunabilen kiral α -hidroksi ketonlar (Şekil 1.2), çoğu biyolojik aktivite gösteren farmakolojik olarak önemli yapı taşlarıdır [13]. Bu tür yapılar, rasemik alkollerin kinetik rezolüsyonu için etkin prokiral substratlardır [14].

Kiral α -hidroksi ketonlar, antibiyotiklerin, antibakteriyellerin, antidepresyon ve anti-virütik ilaçların elde edilmesinde oldukça önemlidir [15].



Şekil 1.2 α -Hidroksi keton molekül formülü

Bir çalışmada, *Zanthoxylum podocarpum*'dan elde edilen α,β -doymamış ketonların, enfeksiyon, alerji, tümefaksiyon (kabartı), rheumatoid arthritis ve kanser gibi rahatsızlıklara neden olabilen nitrik oksit üretimini inhibe edici özellik gösterdiği belirlenmiştir [16].

Optikçe saf α -hidroksi ketonlar çeşitli kimyasal ve enzimatik yöntemlerle sentezlenebilirler. Biyotransformasyon yöntemiyle enantiyoseçimli α -hidroksi ketonların eldesi aromatik aldehytlerden C-C bağı oluşumuyla, α -diketonların indirgenmesi, rasemik α -hidroksi, peroksi ve asetoksi ketonların kinetik rezolüsyonu ve derasemizasyonu yöntemleri ile gerçekleştirilmektedir [17]. Mikroorganizmalar ya da izole enzimler olarak kullanılan biyokatalizörler etkin kemo-, regio- (bölge-) ve stero-selektiviteleri ile prokiral ketonların stero-selektif sentezini katalizlemektedirler [18]. Kösalı, Y.K., α -hidroksi ketonların enantioseçimli olarak üretimini biyotransformasyon yöntemi ile gerçekleştirmiştir [19]. Biyotransformasyon tepkimeleri, biyolojik olarak aktif bileşiklerin yapılarının çeşitlendirilmesini sağlayan kimyasal dönüşüm reaksiyonlarıdır. Biyotransformasyon çalışmaları, enzimler ve mikroorganizmalar ile yapılmaktadır.

Biyotransformasyon reaksiyonlarının;

- Optikçe aktif bileşenlerin üretilmesinde,
- Rasemik karışımların ayrılmasında,
- Benzer reaktif gruplar arasındaki fonksiyonel grup seçiminde ve
- Seçimli olarak yapıya fonksiyonel grup katılması reaksiyonlarında kullanılabilme gibi avantajları vardır.

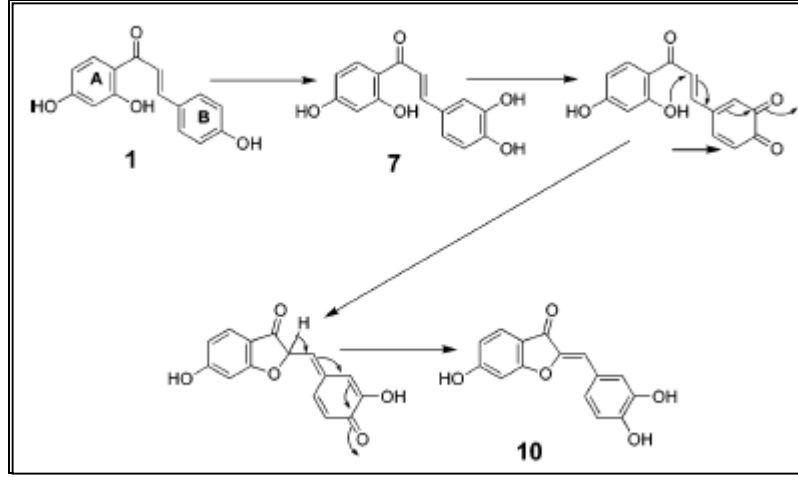
Biyotransformasyon uygulamaları;

- İlaç etken maddeleri,
- Gıda katkı maddeleri,
- Koku hammaddeleri gibi özel kimyasalların dönüşümü,
- Üretiminin sağlanması (antibiyotik ve steroidlerin ucuz ve kolay üretimi),
- Yapı etki ilişkilerinin araştırılması için türevlendirmelerin kolaylıkla yapılması,
- Seçici kimyasal türevlerin (enantyospesifik, stereospesifik vb.) üretimi,
- Rasemik karışımların selektif olarak ayrımı,
- Biyolojik sistemlerde metabolizma çalışmalarının açıklanması,
- Biosentez çalışmaları, biyolojik sistemlerin modellenmesi ve
- Biyodegradasyon (çevre, ekoloji, geri dönüşüm, biyokütle, biyoenerji) gibi çalışmalarında da kullanılmaktadır.

Biyodönüşüm reaksiyonları, ***tepkime spesifikliği, bölgesel spesifiklik, stereospesifiklik, ılımlı tepkime koşullarına sahip olma ve reaksiyonlarda yüksek verim elde etmek*** gibi özelliklere de sahiptir. Yapılan çalışmalar, biyotransformasyon reaksiyonlarının, kimyasal tepkimelere göre birçok avantaj sağladığı ve kimyasal olarak kompleks yollardan gerçekleştirilen veya hiç gerçekleştirilemeyen birçok reaksiyonun çeşitli biyokatalizörler kullanılarak kolaylıkla gerçekleştirildiğini göstermektedir [20].

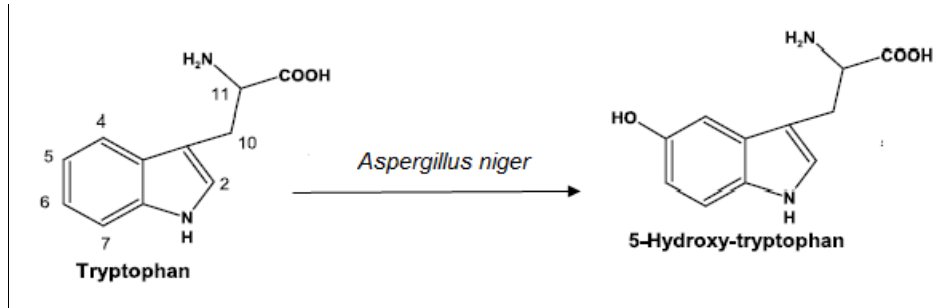
Biyotransformasyon yöntemleri kullanılarak tek enantiyomere sahip optikçe aktif kiral moleküllerin önemi dünya piyasasında da oldukça önem kazanmaktadır. Biyotransformasyon reaksiyonlarında kullanılan biyokatalizörler, biyoaktif moleküllerin sentezinde önemli bir yere sahiptir. Katalizör olarak, **enzimler** veya **mikroorganizmalar** kullanılmaktadır. **Örneğin,**

Benzofuranon türevi olan butein ve sulfuretin molekülleri üzerinde *Aspergillus alliaceus* mikroorganizması ile gerçekleştirilen biyotransformasyon reaksiyonunda madde biyodönüşümü tespit edilmiştir [21].



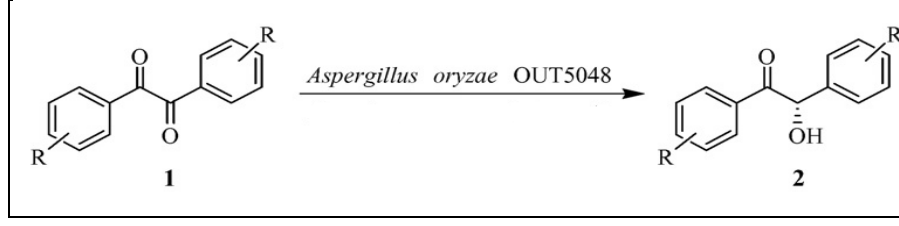
Şekil 1.3 1 no'lu bileşiğin *A. alliaceus* ile biyotransformasyonundan elde edilen butein (7) ve aurone sulfuretin (10)

Alarcon ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonunda, *Aspergillus niger* organizması kullanılmış ve triptofanı 5-hidroksi-triptofana dönüştürdüğü belirlenmiştir [22].



Şekil 1.4 Triptofan molekülünün *Aspergillus niger* ile biyotransformasyonu

Birçok ilacın yapısında yer alan benzil türevleri üzerinde yapılan biyotransformasyon çalışmalarında madde biyodönüşümü gerçekleşmiş ve benzoin türevleri elde edilmiştir [23].



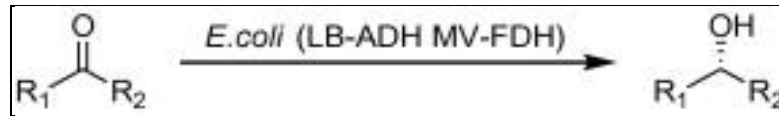
Şekil 1.5 Benzil türevi bileşiğin bir *Aspergillus sp.* türü ile mikrobiyal biyotransformasyonu

Biyodegradasyon özellikleri sayesinde *Aspergillus sp.* ve *Rhizopus sp.* türü mantarlar zenobiyotik substratların biyodönüşümü, hidroksilasyon katalizi ve enantiomerikçe saf ara ürünler oluşturma kapasiteleri ile farmasötik ilaç eldesindeki biyodönüşüm çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır [24],[25],[26].

García-Granados ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, doğal bir ürün olan başlangıç maddesinden başlanarak çeşitli kimyasal reaksiyonlar sonucunda sentezlenen türevlerden bazılarının biyotransformasyonu gerçekleştirilmiş ve yeni biyoaktif metabolitler elde edilmiştir [27].

Anti-diabetik bir ilacın içinde yeralan, 2,5-dimetilpirazin maddesi üzerinde bir biyodönüşüm çalışması yapılmış ve 2,5-dimetilpirazin molekülünün karboksilasyonu yüksek verimde gerçekleştirilmiştir [28].

Biyokatalizör olarak kullanılan rekombinant *E. coli* hücreleriyle bir keton türevi olan bileşiklerin mikrobiyal biyodönüşümü gerçekleştirilmiştir [29].

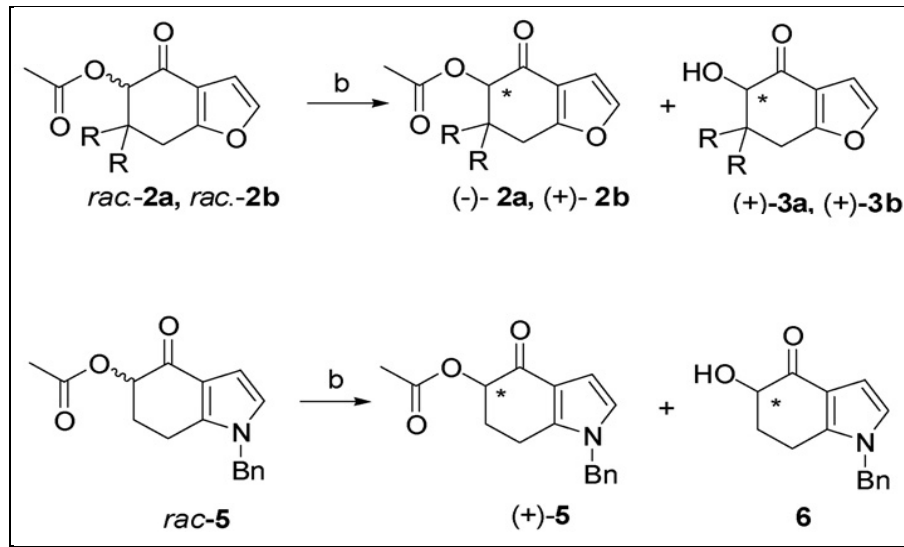


Şekil 1.6 Rekombinant *E. coli* hücresiyle bir keton türevi bileşiğin mikrobiyal biyodönüşümü

Biyotransformasyon çalışmalarının her aşamasında sıklıkla kullanılan “enzimler”, katalizör olarak sentez kimyasında büyük bir öneme sahiptir.

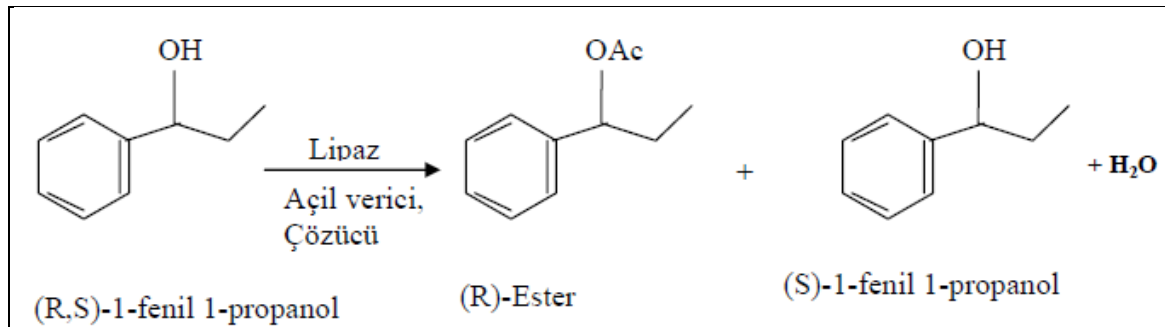
Enzimatik biyotransformasyonda tercih edilen enzimler; enantiyoseçicilik, regioseçicilik ve kimyasal seçicilik özelliklerinden dolayı enantiosaf ürün eldesinde sıklıkla kullanılmaktadır. **Örneğin;**

A. S. Demir ve ark. α -asetoksi aril ketonların enantiomerik hidrolizini *Rhizopus oryzae* hücre kültüründe yüksek enantiomerik fazlalık (e.e.) ile sağlamışlardır [30]. A. S. Demir, Z. Çalışkan ve ark. 4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-benzofuran-5-il asetat ile 1-benzil-4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1(H)-indol-5-il asetat bileşiklerinin (Şekil 1.18) enzimatik biyotransformasyonla enantiyomerik sentezini yüksek enantiomerik fazlalık (e.e.) ile gerçekleştirmişlerdir [31].



Şekil 1.7 4,5,6,7-Tetrahidro-4-okso-benzofuran-5-il asetat (2a,2b) ve 1-benzil-4,5,6,7-tetrahidro-4-okso-1(H)-indol-5-il asetat (5) bileşikleri enzimatik rezolüsyonu (b)

Karadeniz, F., sekonder bir alkol olan rasemik 1-fenil 1-propanolün lipaz enzimi katalizörlüğünde esterleşme tepkimesi ile enantiyomerik saflıkta elde edilmiştir [32].



Şekil 1.8 Rasemik 1-fenil 1- propanolün esterleşme tepkimesiyle kinetik rezolüsyonu

1.2 Tezin Amacı

Farmakolojik olarak önemli yeni benzofuranon türevlerinin kimyasal sentezini ve biyoteknolojik yöntemler kullanılarak enzimatik biyotransformasyonunu gerçekleştirmek tezin amacını oluşturmaktadır.

Bu çalışmada amacımız, çevre kirliliğine neden olmayan yöntemlerle, zor metodlarla sentezlenen ilaç hammaddelerinin biyoteknolojik ve kimyasal yöntemlerle yüksek verim ve seçicilikte sentezlenmesi, yöntemler geliştirilmesi, bu geliştirilen yöntemlerin uygulamaya uygun hale getirilmesi ve uygun biyokatalizörlerin geliştirilmesidir. Böylece, belirlenen biyokatalizörler ile biyotransformasyon reaksiyonlarının tek bir adımda kolaylıkla gerçekleştirilmesi sağlanmış olacaktır.

Bu hedefle gerçekleştirilen ilk sentezde, öncelikle 6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on bileşiği sentezlenerek, mangan (III) asetat asetoksilasyonu ile 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat asetat bileşiği elde edilmiştir. Bu kimyasal sentez reaksiyonları sonucu, rasemik bir karışım olarak elde edilmiş olan α -asetoksi benzofuranon türevi bileşiğin çeşitli lipaz enzimleri biyokatalizörlüğünde ve çeşitli çözücü sistemleri kullanılarak seçici hidrolizi gerçekleştirilmiştir. Biyotransformasyon reaksiyonu sonucunda rasemik α -asetoksi benzofuranon bileşiği kiral asetoksi ve kiral hidroksi türevlerine dönüştürülmüştür. Dönüşüme uğrayan bileşiklerin çeşitli spektral yöntemler kullanılarak karakterizasyonları yapılmıştır.

1.3 Orijinal Katkı

Günümüzde, ilaç tasarımı ile elde edilen ilaçların büyük çoğunluğu, farmasötik kimya laboratuvarlarında birden fazla basamakta ve kompleks yollarla sentezlenmektedir. Biyodönüşüm reaksiyonlarında, çeşitli biyokatalizörler aracılığı ile elde edilen kimyasal sentez ürünleri ise tek basamakta kolaylıkla ve ekonomik olarak sentezlenmektedir.

Çalışmamızda, yüksek biyolojik aktivite potansiyeline sahip ilaç öncü hammaddeleri olan dihidrobenzofuranon türevi bileşiklerin biyoteknolojik ve kimyasal metodlarla sentezi literatürde ilk defa olarak gerçekleştirilmiştir.

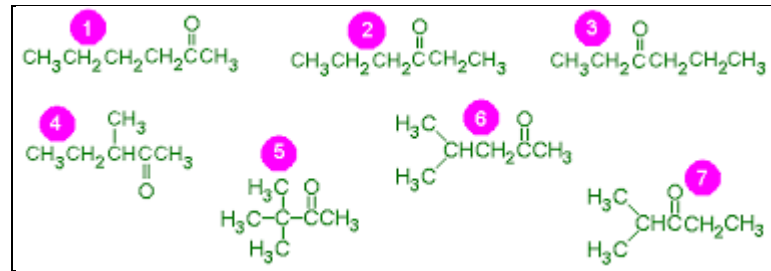
İlaç öncül hammaddelerin biyoteknolojik yöntemlerle üretimi için yeni biyokatalizörlerin araştırılması ve hedef doğrultusunda enzimler ya da gerekli enzimlerin seçilmesi ile daha önce tanımlanmamış bir biyotransformasyon yöntemi literatüre geliştirilmiştir.

Birçok ülkede, hastalıkların tedavileri için ayrılan bütçe ülke ekonomisinde önemli bir paya sahiptir. Bu amaçla, bilgi ve teknoloji transferi ile yerel, ulusal veya uluslararası birçok hastalığın tedavisi için oluşan maddi sorunlara çözüm getirilmesine yönelik pek çok çalışma yapılmaktadır. Benzofuranon türevi bileşiklerin, biyotransformasyon yöntemi ile elde edilmesi hem temel bilimlere hem de endüstri için orijinal bir katkı sağlayacaktır. Bu çalışmada, farmakolojik olarak önemli yeni benzofuranon türevleri literatürde ilk defa olarak sentezlenmiştir.

STEREOKİMYASAL TANIMLAR**2.1 Stereokimya ve Moleküllerde Stereoizomerlik**

Stereokimya, moleküllerin üç boyutlu yapılarını inceleyen bilim dalıdır. Atomların uzayda bir molekül içinde birbirine göre nasıl düzenlenmiş olduklarını araştırır. Moleküllerin uzaydaki yerleşimleri incelendiğinde birbirlerine göre farklı dizilimleri bulunmaktadır. Bu farklılık ise moleküler **izomerizm** olarak açıklanır.

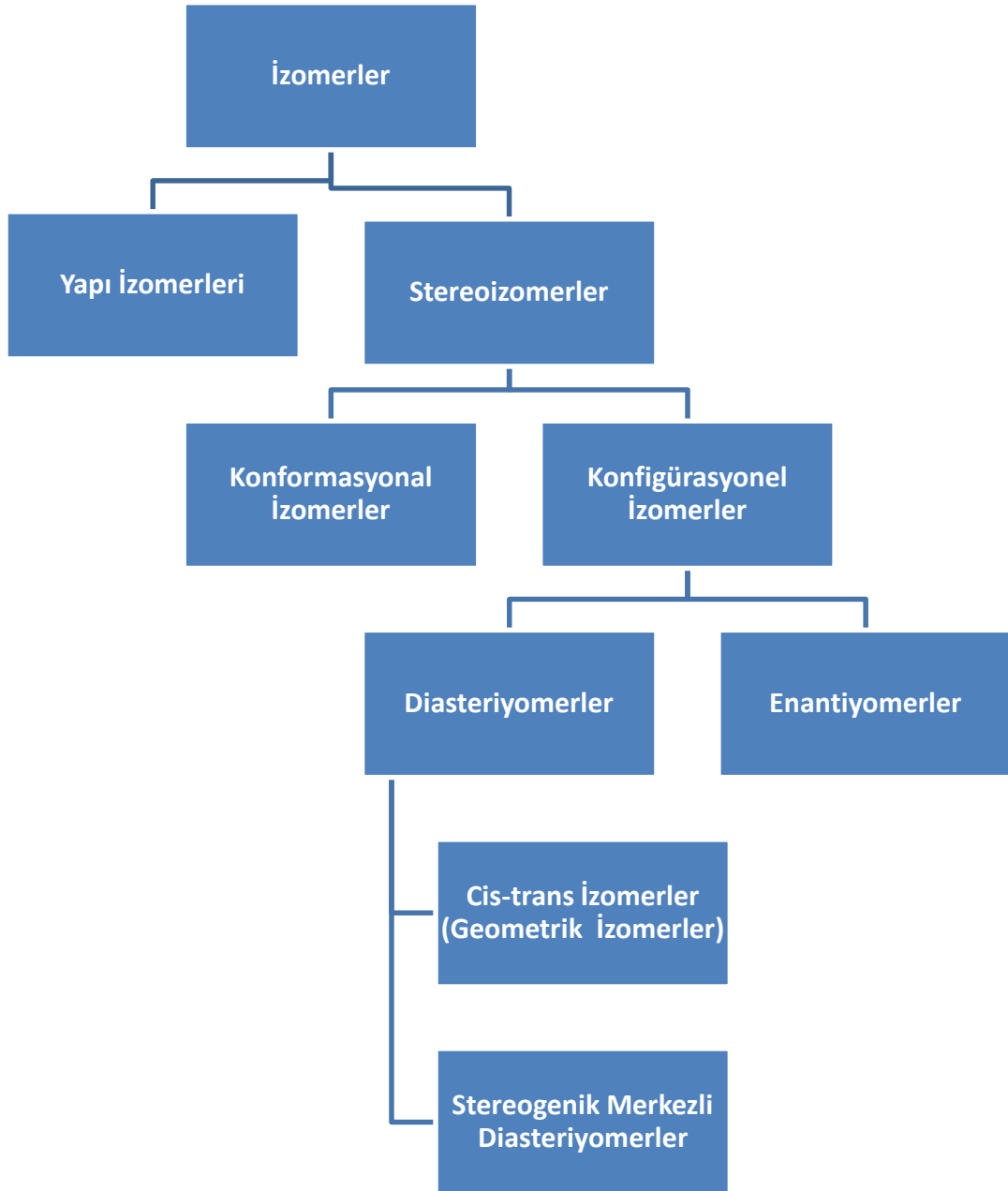
Aynı molekül formülü ile gösterilebilen iki veya daha fazla sayıda farklı bileşiklere **izomer** denir.



Şekil 2.1 Aynı molekül formülüne sahip bileşiklerin izomerleri

İzomerler, aynı molekül formülüne sahip olmalarına rağmen farklı düzlemsel dizilişe sahip bileşiklerdir. İzomer bileşiklerin kimyasal özellikleri birbirlerinden farklıdır.

İzomerler, **yapı izomerleri** ve **stereoizomerler** olmak üzere 2'ye ayrılır :

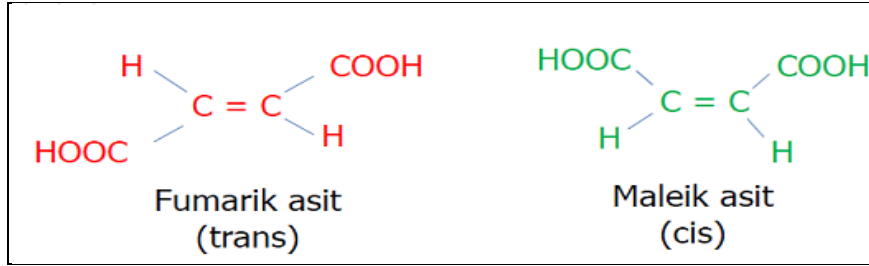


Şekil 2.2 İzomerlerin sınıflandırılması

2.2 Stereoizomeri (moleküler üç boyutlu yapı)

Karbon bileşiklerinin stereoizomer yapıları mevcuttur. Yapı ve bağlar aynı fakat atomların boşluktaki dizilişleri farklıdır.

Örnek: Maleik asit ile fumarik asit izomerdir (geometrik izomer ya da cis-trans izomer)

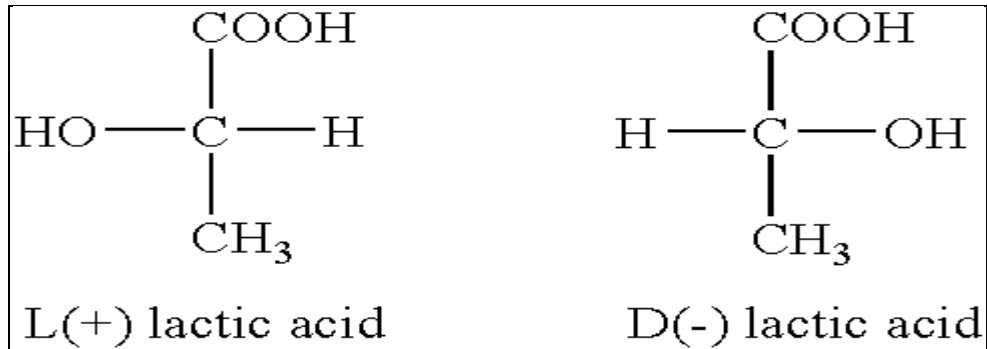


Şekil 2.3 Maleik asit ile fumarik asit izomerleri

2.3 Moleküler Kiralite

Bir molekülde, sp^3 hibritleşmesine uğramış tetrahedral bir karbon atomu eğer dört farklı substitüent taşıyorsa kiral veya asimetric olarak isimlendirilir.

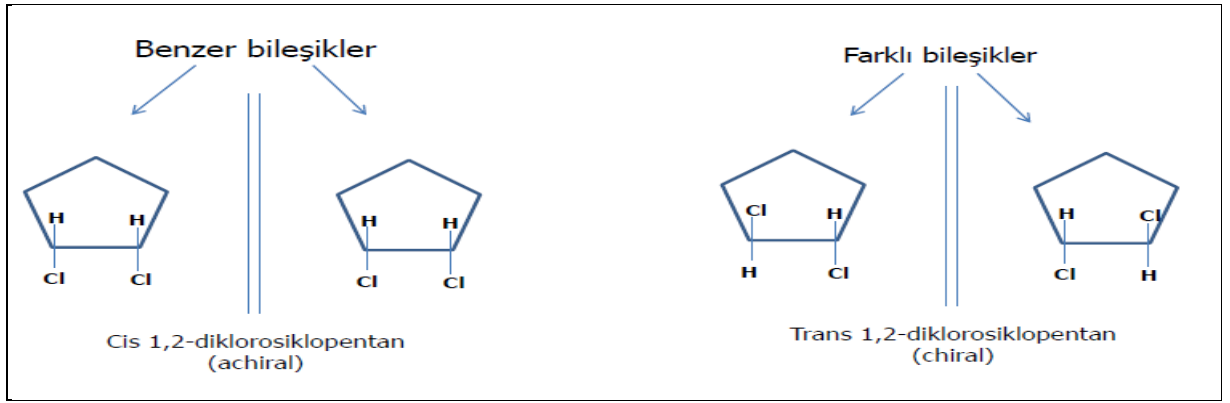
İlk gözlenen optikçe aktif bileşik **laktik asittir**. Asimetrik laktik asitin merkezi C'ü 4 farklı atom ya da gruplara bağlıdır.



Şekil 2.4 Laktik asidin enantiyomerinin uzaysal gösterilişleri

2.3.1 Moleküler Asimetri: Kiral (Chiral) ve Kiral Olmayan (Achiral) Moleküller

“**Kiral**” bir molekül ayna hayali ile üst üste çakışmayandır. “**Kiral olmayan**” bir molekül simetri merkezi ve simetri düzlemini taşımaz.



Şekil 2.5 Akiral ve kiral yapılar

2.3.2 Birden Fazla Kiral Merkez Taşıyan Bileşikler

İki farklı asimetric karbon taşıyan bir molekülde, bu karbonların her biri ya R ya da S konfigürasyonunda olabilir.

1.C* 2.C* toplam konfigürasyon

(R) (S) (1R, 2S)

(S) (R) (1S, 2R)

(R) (R) (1R, 2R)

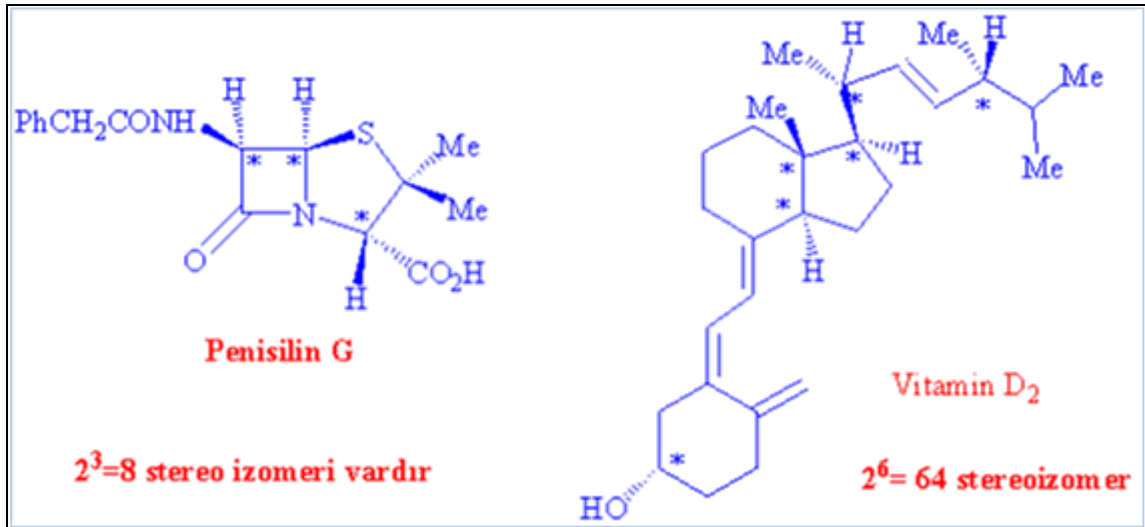
(S) (S) (1S, 2S)

n = kiral karbon sayısı olmak üzere, bir bileşiğin optik izomerlerinin maksimum sayısı 2^n dir.

Örnek:

Kiral karbon sayısı 2 ise, stereoisomer sayısı = 4'tür

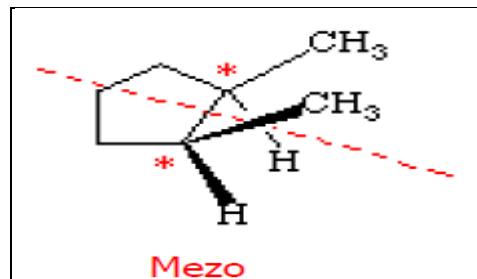
Asimetric karbon sayısı 3 ise, stereoisomer sayısı $2^3 = 8$ 'dir.



Şekil 2.6 Penisilin G ve Vitamin D₂ nin stereoizomerlerinin sayısı

2.3.3 Mezo Bileşikler

Kiral karbonları olan fakat kendi ayna görüntüsü ile çakışan stereoizomere 'mezo' şekli denir. Bir mezo bileşik 2 stereojenik merkez içerir fakat optik aktivitesi yoktur. Bu sebeple, mezo bileşikler kiral değildir.



Şekil 2.7 Mezo bileşik

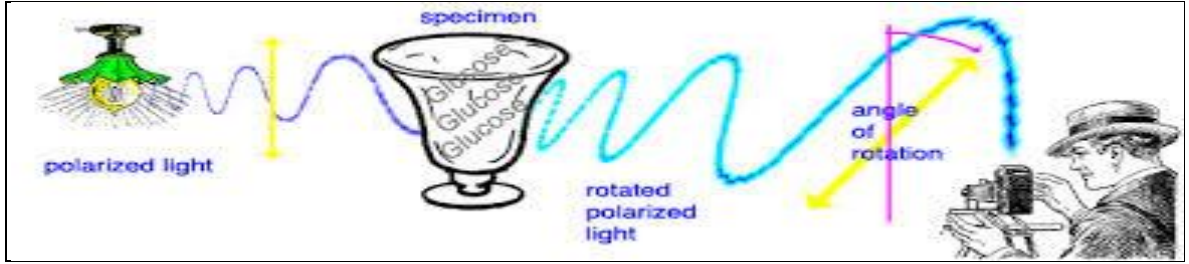
2.4 Kiral Moleküllerde Optikçe Aktivlik

Kendisinden veya çözeltisinden geçirilen polarize ışığın düzlemini çevirebilen bileşiklere **optikçe aktif moleküller** denir.

2.4.1 Polarize Işığın Doğası ve Çevirme Açısı

Optik izomerlik, bir uzay izomerliğidir ve inceleme aracı ise **polarize ışık**'tır.

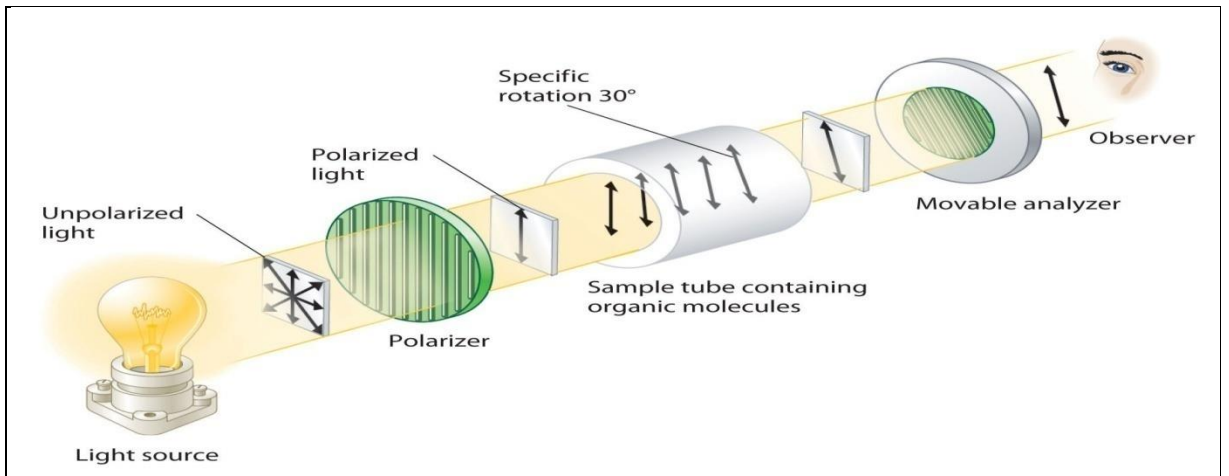
Olağan ışık her doğrultuda titreşerek yayılır. Polarize ışık haline dönüşünce titreşimler bir düzlem içinde kalacak şekilde yayılır. Optikçe aktif maddeler ve kiral maddeler, polarize ışık bir maddeden geçtiğinde titreşim düzlemini belirli bir açı kadar çevirme özelliğine sahiptirler.



Şekil 2.8 Polarize ışığın rotasyonu

Maddelerin ışıkla etkileşmelerini gösteren bir alet olan **polarimetre**, polarize edilmiş bir ışığın bu madde içerisinden geçirilmesi ile derişimleri ölçen bir cihazdır.

Polarimetre, birine polirizör diğetine analizör denilen nicol prizmasından, ölçülecek çözeltinin içine konulduğu madde tüpünden ve açı bölmeli ekseni etrafında çevrilebilen bir diskten oluşur. Işık kaynağının monokromatik ışık vermesi gerekir, bunun için sodyum lambası kullanılır. Sodyum lambası, sarı renkli olup, dalga boyu 589 nm olan ışık polarimetrelerde yaygın olarak kullanılır.



Şekil 2.9 Polarimetrenin çalışma mekanizması

Bir polarimetrede numune kabına konularak polaritesi ölçülen maddeler için üç ihtimal vardır:

1-Polarize ışığın yönünü hiç döndürmemesi, ki bu maddenin optikçe aktif olmadığını gösterir,

2-Polarize ışığı “ dextrarotatori” (+) sağa çevirebilir,

3- Polarize ışığı “Levorotatori” (-) sola çevirebilir.

Herhangi bir ölçüm anında ışığı sağa ya da sola çevirdiğinin bilinmesi de mümkün değildir. Eğer ışık + 10° sağa gözüktüyorsa ise bu gerçekten + 10° sağ mı, yoksa - 350° sol mu diye bir karışıklık ortaya çıkar ki bu durum, ancak konsantrasyona bağlı bir durum olduğu için, konsantrasyonu değiştirilerek anlaşılabilir.

2.4.2 Çevirme Açısı, α ve Özgül Çevirme Açısı, $[\alpha]$:

Bir bileşiğin polarize ışığı çevirme açısı, ışığın madde içinden geçtiği yola, derişimine sıcaklığına ve ışığın dalga boyuna bağlıdır. Polarize ışık olarak sodyumun D bandına ait ışık ve sıcaklık; $[\alpha]_D^{20}$ simgesi ile belirlenir. Işığın madde içinden geçtiği yol (numune tüpünün boyu) **1 dm**, çözeltinin **derişimi g/ml** olarak alınır [33].

Bu koşullarda ölçülen α , özgül çevirme açısıdır ve aşağıdaki bağıntı ile hesaplanır:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha}{1 \cdot c} \quad (2.1)$$

α : Spesifik döndürme açısı,

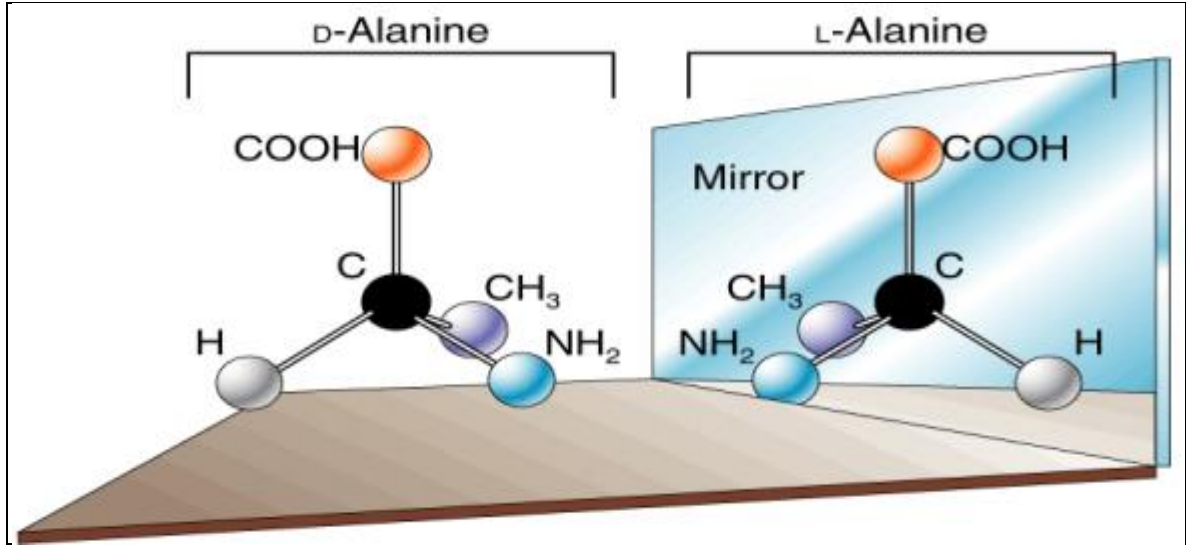
c: Derişim g/ml olarak konsantrasyon,

1: Numune tüpünün boyu (1 dm).

2.5 Optikçe Aktif Bileşiklerin Konfigurasyonları ve Gösterilişleri

Konfigürasyon, kiral C atomu çevresindeki 4 grubun düzenlenme sırası ile ilgilidir.

Mutlak konfigürasyon iki enantiyomerin ayırt edilmesini sağlar ve onların kiralitesini tanımlar. En yaygın olarak kullanılan gösterimler D- ve L- gösterimi, R- ve S- gösterimidir [34].

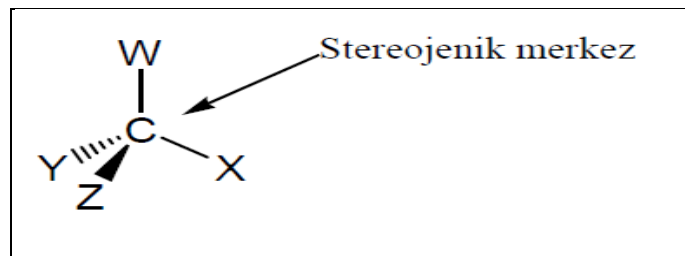


Şekil 2.10 Alanin aminoasidinin –D ve –L gösterimleri

2.6 Enantiyomerler ve Diastereoizomerler

2.6.1 Enantiyomerler

- Optikçe aktif bir bileşiğin, polarize ışığı sağa ve sola çeviren izomerlerine **enantiyomerler** denir.
- Enantiyomerler kiral moleküllerdir, 4 farklı grubun bağlı olduğu karbon atomu (kiral merkez-stereojenik) içerirler.



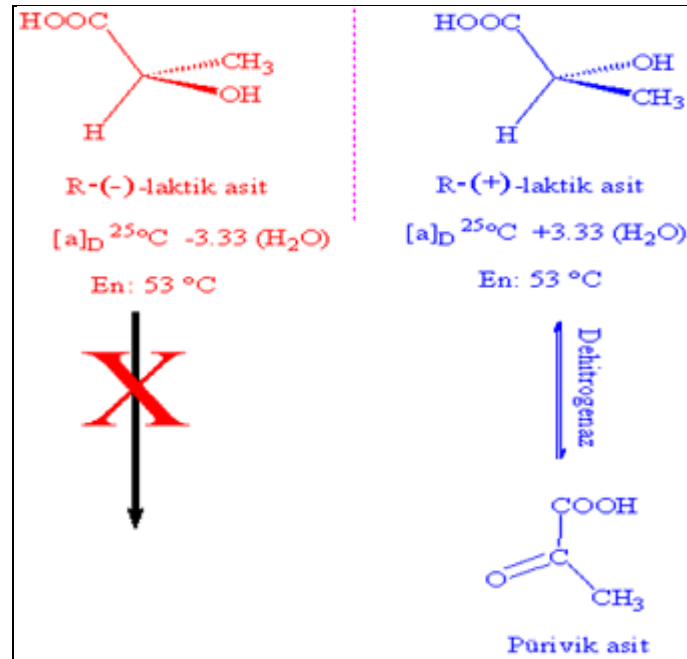
Şekil 2.11 Stereojenik merkez içeren bir karbon atomu

- Enantiyomerler üst üste çakışmazlar ve birbirlerinin ayna görüntüleridir.



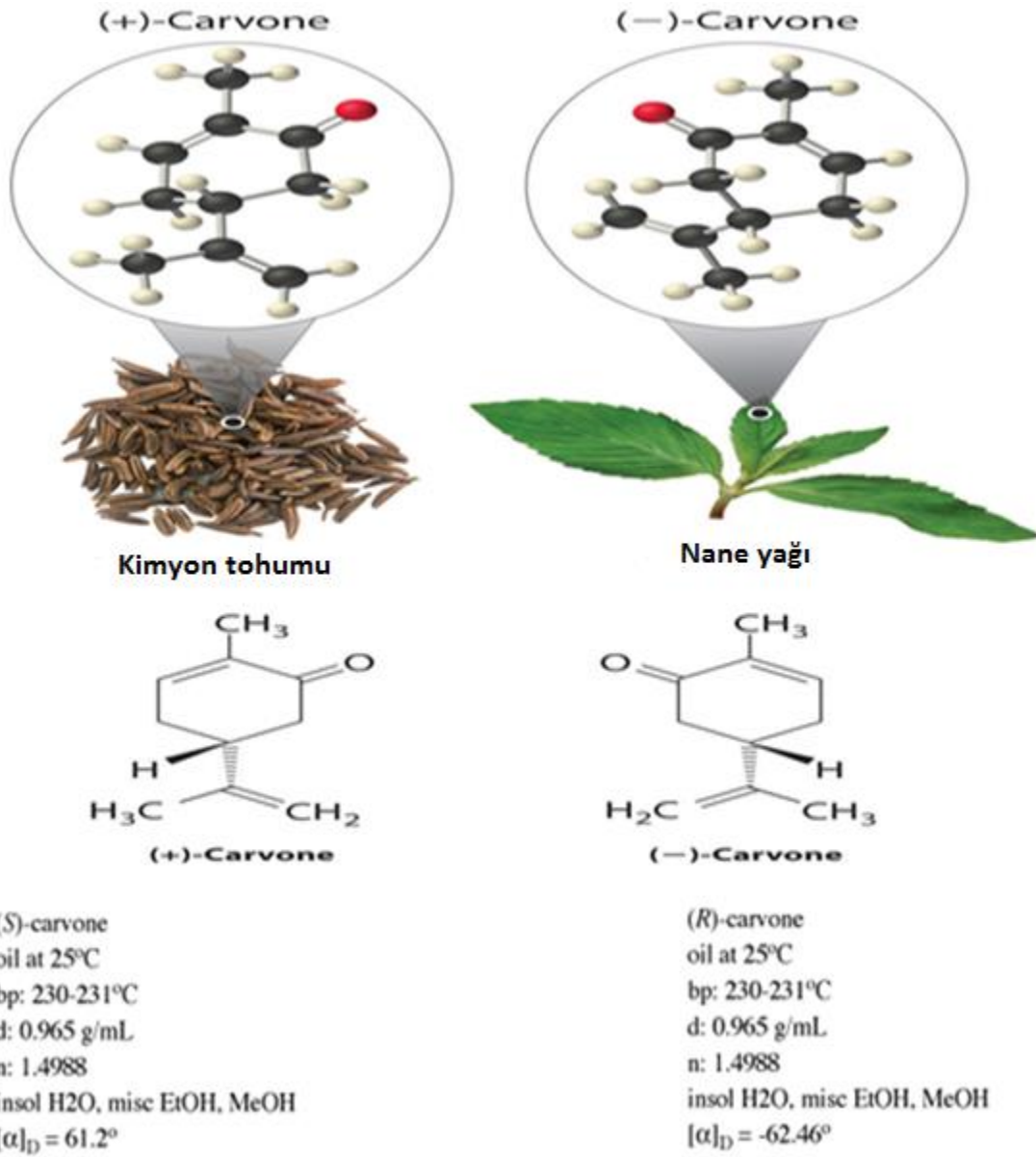
Şekil 2.12 Kiral maddelerin ayna görüntüsü

- Enantiyomerler, kimyasal özellikleri benzemekle birlikte **biyolojik özellikleri** bakımından farklı özellikler gösterirler.
- Enantiyomerler, reaksiyon esnasında hızları farklı olabilir ve farklı ürünler verebilirler. Bu farklardan yararlanılarak enantiomerlerin birbirinden ayrılması sağlanır.
- Örnek, enzimler (+) laktik asidi pürivik aside dönüştürürken, (-) laktik asidi dönüştürmezler.



Şekil 2.13 Enzim reaksiyonlarında + ve – laktik asidi farklı davranışları

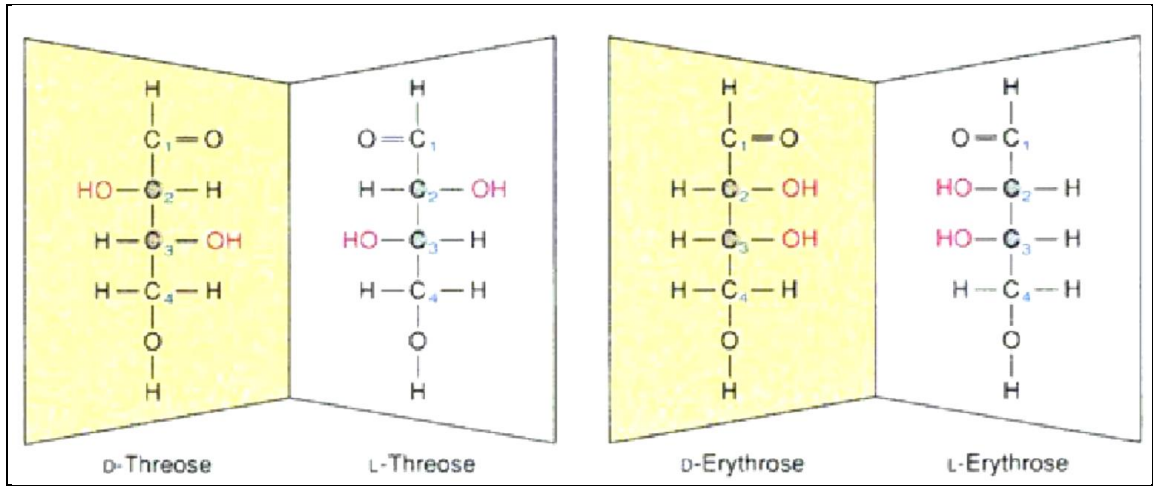
- **Örnek,** Karvonun (R)-enantiyomeri nane kokusu verirken, (S)-enantiyomeri kimyon kokusu verir (Şekil 2.14). Zencefil ise rasemik karvon içermektedir.



Şekil 2.14 Karvon bileşiğinin enantiyomerleri

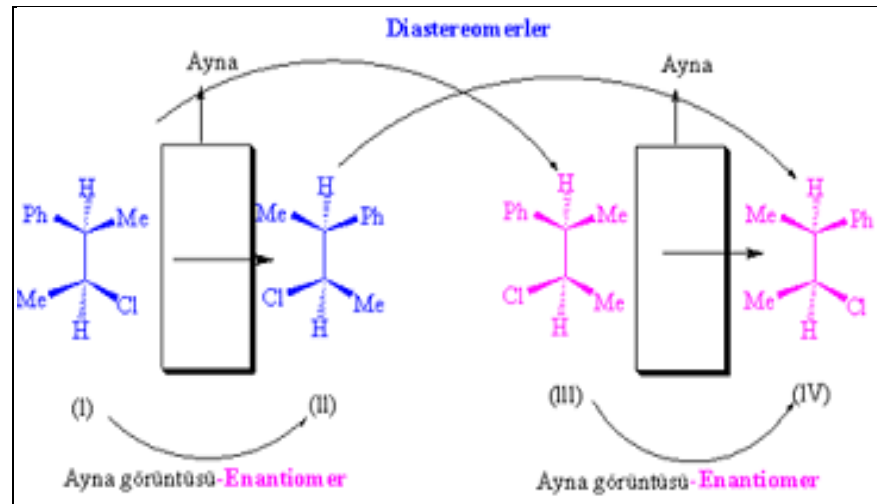
2.6.2 Diastereoizomerler

- ❖ Stereoizomerlerin ayna görüntüsü olmayan çiftleridir.
- ❖ Molekülde birden fazla sayıda asimetric karbon atomu vardır.
- ❖ Diastereomerlerin tüm fiziksel, kimyasal özellikleri ve polarize ışığı çevirme yönleri farklıdır.



Şekil 2.15 Eritrozlar ve Treozlar moleküllerinin diastereomerleri

- ❖ Fiziksel ve kimyasal açıdan enantiomerler birbirlerine benzerken, diastereomerler büyük farklılıklar gösterebilirler. Diastereomerler, farklı erime noktalarına, kaynama noktalarına ve fiziksel sabitlere sahiptirler.



Şekil 2.16 (I) ve (II) birbirlerinin enantiomeridir, (III) ve (IV) ise (I)'in diastereoisomerleridir

2.7 Enantiyomerlerin Farklı Biyoaktivite Özellikleri

Kiralitenin, canlılar için önemli olmasının nedeni moleküler seviyede simetrisinin biyolojik süreçlere hakim olmasıdır. Kiralite biyoaktivite için bir ön koşul değildir. Ancak stereojenik merkeze sahip biyoaktif moleküllerde enantiyomerlerin aktivitelerinde büyük farklılık gözlenmektedir.

Bu olgu ilaç, insektisit, herbisit, tat ve koku vericiler ve gıda katkı maddeleri gibi tüm biyoaktif maddelerde görülür. Canlı organizmaların moleküler bileşenleri çoğunlukla kiraldir ve kiralite bu moleküllerin biyoaktif maddelerle etkileşimlerinde baskın bir rol oynar [36].

Enantiyomerler farmakolojik etkilerine göre eutomer ve distomer olarak adlandırılır. Tedavi edici aktif izomer için '**eutomer**' terimi, daha az etkili inaktif izomer için '**distomer**' terimi kullanılır.

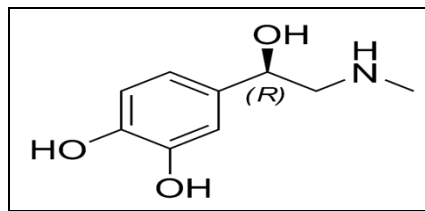
Bir rasemik ilacın tedavi edici olmayan inaktif izomeri (distomer) istenmeyen safsızlık olarak nitelendirilir ve farklı farmakolojik etkiler gösterir. Kısacası rasemik bir ilaçta eutomer ve distomerin farmakodinamik ve farmakokinetik fazlarının farklı oluşu inaktif izomer ile ilgili çeşitli etkilerin ortaya çıkmasına yol açabilir.

i) Her iki enantiyomer bağımsız veya birlikte tedavi edici etkiye sahiptir.

Bazı ilaçlarda her iki enantiyomer bağımsız tedavi edici etkiye sahip olabilmektedir.

Örneğin,

- Dekstropoksifen analjezik bir ajan iken, levopoksifen etkili bir öksürük önleyicidir.
- (+)-adrenalin kan damarlarını sıkıştırmada (-)-adrenalinden daha aktiftir.

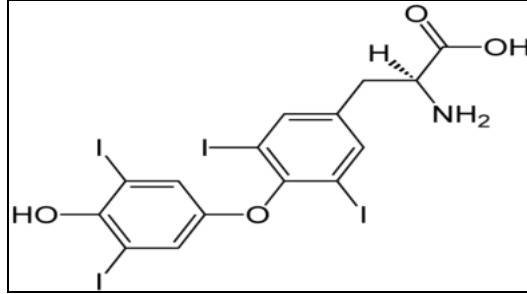


Şekil 2.17 (+)-Adrenalin molekülü

ii) Enantiyomerlerden biri aktif diğeri inaktif özellik gösterebilir.

Rasemik karışımda bulunan enantiyomerlerden yalnızca bir tanesinin aktif olmasından dolayı optikçe aktif bileşiklerin kullanımı biyokimya, farmasotik, gıda ve parfüm endüstrisi için önem taşımaktadır. **Örneğin,**

- (-)-Tiroksin tiroid bezleri tarafından üretilen ve metabolizmayı hızlandırarak heyecanlanmaya ve kilo kaybına neden olan bir hormondur. Onun enantiyomeri olan (+)-tiroksinde bu özelliklerin hiçbiri yoktur.

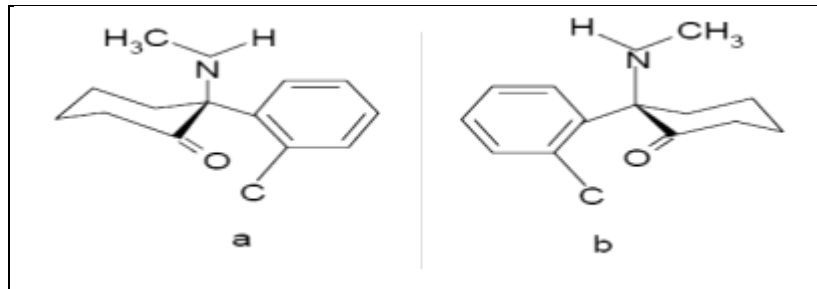


Şekil 2.18 (-)-Tiroksin

iii) Enantiyomerler birbirinin tam tersi bir etki gösterebilirler.

Bazı durumlarda bir kiral ilacın her iki izomeri farklı etkiler göstererek biri tedavi ederken diğeri yan etki gösterebilmektedir. Birçok doğal ürün ve sentetik ilaç bu şekilde bulunmaktadır. **Örneğin,**

- Ketamin, anestezik ve analjezik olarak kullanılan bir madde olarak bilinmektedir. Rasemik karışım şeklinde uygulanmasından dolayı anestezi sonrası hastalarda halüsinasyon ve zihinsel karışıklıklar gözlenmiştir. Ketaminin enantiyomerleri araştırıldığında S-(+)-Ketaminin anestezik olduğu, istenmeyen yan etkilerin büyük çoğunlukla R-(-)-Ketamin ile ilişkili olduğu görülmüştür.



Şekil 2.19 a) S-(+)-Ketamin b) R-(-)-Ketamin

iii) Her iki enantiyomer tedavi için avantaj sağlar

Her iki enantiyomerin istenen tedavi edici etkisinin sağlanmasında farklı yollardan katkıda bulunduğu ilaçlar mevcuttur. Örneğin, indakrinon isimli ilacın R-(+)-enantiyomer aktif bir diüretiktir. Ancak, ürik asit oluşumunu engelleyerek istenmeyen yan etkiler gösterir. S-enantiyomeri ise ürik asit salgısını artırarak R-izomerinin antagonisti (karşıtı) olarak görev yapar [35].

2.8 Rasemik Karışım ve Rezolüsyon

İki enantiyomerin eşit miktarlarda karışımına **“rasemik karışım”** denir, rasemik karışımı oluşturan enantiyomerlerin optik çevirmeleri mutlak derece eşit ve işaret bakımından zıttıdır.

Rasemik karışımların bileşenlerine ayrılmasına **“rezolüsyon”** denir. Rezolüsyon işlemi, enantiyomerlerin çözünürlükleri birbirinin aynı olduğundan, diğer karışımların ayrılması kadar kolay değildir. Genel olarak, kimyasal yöntemlerle enantiyomerler diastomer tuzlarına dönüştürülerek çözünürlük farklılıkları oluşturularak gerçekleştirilir.

2.8.1 Rasemik Bileşiklerin Rezolüsyonunda Kullanılan Yöntemler

Enantiyomerik saf bileşiklerin sentezi ve ayrılması için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır [36].

Rasemik karışımların rezolüsyonu 4 farklı yöntemle gerçekleştirilir:

- i) Direkt tercihli kristalizasyon,
- ii) Diastereomerik tuzların kristalizasyonu,
- iii) Kinetik rezolüsyon,
- iv) Dinamik kinetik rezolüsyon.

i) Tercihli kristalizasyon

Konglomerat, eşit miktarda iki enantiyomerin kristallerinin mekanik karışımından oluşur. Tercihli kristalizasyonun başarısı konglomerat şeklindeki rasemik karışımın enantiyomerlerden herhangi birinden daha çözünür olmasına bağlıdır.

ii) Diastereomerik tuzların kristalizasyonu

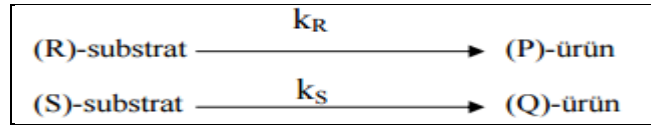
Bu yöntemde, rasemik karışımın enantiyomerleri önce farklı fiziksel özelliklere sahip diastereomer türevlerine dönüştürülür. Diastereomerleri oluşturan ve oluşan diastereomerleri tekrar enantiyomerlerine dönüştüren tepkimeler basit asit-baz tepkimeleridir. Genellikle optikçe aktif bir baz ile rasemik bir asit tepkimeye girer ve diastereomerik tuzlar oluşur. Bu yöntem, kiral amin ve karboksilik asitlerin rezolüsyonunda yaygın olarak kullanılır.

iii) Kinetik rezolüsyon

Kinetik ayrılma, rasemik karışımın enantiyomerlerinden birisini, onun ayna görüntüsünden bir ürüne, dönüştürme aşamasıdır. Bu aşama için temel gereksinim; verilen bileşiğin R ve S enantiyomerlerinin $k_R \neq k_S$ olmasıdır.

Eğer biyolojik orijinli (genellikle enzimler) kiral katalizörler kullanılırsa, bu işlem **enzimatik kinetik ayrılma** ya da **biyokatalitik ayrılma** olarak adlandırılır. Enzimatik kinetik ayrılmada, bir rasemik substrat enantiyomerlerin olduğu, kiral farklılığın içinde enzimatik bir reaksiyona girer.

Enantiyomerlerin reaksiyon oranındaki farklılık çok büyüktür, sonra sadece bir enantiyomere dönüştürülür ve reaksiyon yaklaşık %50 çevirime ulaştığında, her iki enantiyomerin optik olarak saf formları sağlanır. Kinetik rezolüsyon rasemik karışımdaki enantiyomerlerden birinin diğerinden daha hızlı ürüne dönüşmesi olarak tanımlanabilir.



Şekil 2.20 Kinetik rezolüsyon

Enzim katalizli tepkimelerde enantiyomerik aşırılık (ee) ve enantiyomerik oran (E) gibi iki önemli kavram vardır. Herhangi bir bileşiğin enantiyomerik saflığı enantiyomerik aşırılık terimi ile ifade edilir (Eşitlik 2.2). R, (R)-enantiyomerinin, S, (S)-enantiyomerinin derişimini göstermektedir. Rasemik bir karışım için ee değeri “0” iken enantiyomerikçe saf bir bileşik için ee değeri “1”dir.

$$\% ee = \frac{[R] - [S]}{[R] + [S]} \times 100 \quad R > S \quad (2.2)$$

$$E = \frac{\ln [(1 - c) \times (1 - ee(S))]}{\ln [(1 - c) \times (1 + ee(S))]} \quad (2.3)$$

$$\text{Dönüşüm } (c) = 1 - [([R] + [S]) / ([R_0] + [S_0])] \quad (2.4)$$

Enzimler kiraldır ve rasemik bir karışımın iki enantiyomeri arasında ayırım yapma yeteneğine sahiptir. Enzim katalizli tepkimelerin enantiyoseçimliliğini veya stereoseçimliliğini tanımlamak için enantiyomerik oran (E) denilen bir parametre kullanılır (Eşitlik 2.3). Enantiyoseçimli olmayan tepkimelerde E değeri “1” iken, kabul edilebilir bir rezolüsyon için E değeri 20’den büyük olmalıdır [36].

iv) Dinamik kinetik rezolüsyonu

Kinetik ayrılma, yüksek faydasına rağmen en fazla % 50 dönüşümü sağlayan bir iç sınırlamaya sahiptir. Dinamik kinetik rezolüsyonda, kinetik rezolüsyon ile rasemizasyon prosesi birlikte gerçekleştirilir. Hem kinetik rezolüsyon hem de dinamik kinetik rezolüsyonda (R)- enantiyomeri, (S)-enantiyomerinden daha hızlı (R)-ürününe dönüşür ($k_R > k_S$).

Dinamik kinetik rezolüsyonun tek farkı (S)-enantiyomeri rezolüsyon reaksiyonu süresince izomerleşir, başlangıç (R)- substratının tamamı (R)-ürününe dönüşebilir($k_{\text{R}} \geq k_{\text{S}}$). Böylece % 100 verime ulaşılabilir.

ENZİMATİK BİYOTRANSFORMASYON YÖNTEMİ

3.1 Enzimler

Enzimler, canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşturmadan % 100'lük bir verim sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç olmak üzere, bütün enzimler protein yapısındadır. Enzimler proteinlerin en büyük ve en çok özelleşmiş grubunu oluştururlar.

Enzimler, canlı hücreler tarafından biyolojik ortamda sentezlenmektedir ve bu ortamda izole edildikten sonra da aktivite gösterebilmektedirler. Enzimlerin katalizleme güçleri, kimyasal katalizörlere göre $10^6 - 10^{16}$ kez daha fazladır. Enzimlerin mol kütlesi $10^4 - 10^6$ dalton arasında değişmektedir.

Bir çözeltideki enzim aktivitesi "enzim ünitesi" olarak belirtilir. Her enzimi içine alacak bir ünite tanımı olmamasına rağmen, 25 °C'de optimum koşullarda 1 mikromol (10^{-6} mol) substratı bir dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarına "1 enzim ünitesi" denilmektedir. Ancak uluslararası ölçü sistemine göre enzim aktivite birimi katal'dır. **1 katal enzim** ise bir saniyede bir mol madde dönüşümüne yol açan enzim miktarıdır.

Enzimler uzun yıllardır ekmek, bira, peynir üretimi, şarap üretimi ve benzeri konulardaki gıda sektöründe yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca enzimler, tıp, eczacılık, ziraat gibi bilim dallarında çok geniş kullanım alanı bulunmaktadır.

3.1.1 Enzimlerin Sınıflandırılması

Günümüzde var olduğu tahmin edilen 25000 enzimden yaklaşık 4000 tanesi Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından kabul edilmiş ve sınıflandırılmıştır [37]. Enzimlerin adlandırılmasında ismin ilk bölümü substrat veya substratlarıdır. İkinci bölüm ise, katalizlenen reaksiyonun tipinin sonuna -az eki getirilmiş hali, yani grup ya da alt grup adıdır. **Örneğin**, NADP⁺ oksidoredüktaz gibi.

Her enzime bir sistematik kod numarası verilmiştir. Bu numara E.C. (uluslararası enzim komisyonu) harflerinden sonra ardarda gelen dört rakamda ibarettir. Birinci rakam enzimin bağlı olduğu grubu gösterirken, ikincisi alt grubu, üçüncüsü alt alt grubu belirtir. Dördüncü rakam ise, enzimin aynı üç rakama sahip enzimler arasındaki sırasını verir.

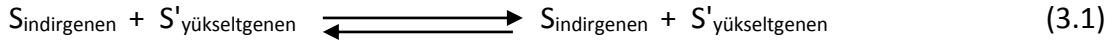
Örneğin, E.C. 2.7.1.1 kod numarasında 2, bu enzimin bir transferaz enzimi olduğunu, 7, bir fosfat grubu transfer edildiğini, 1, fosfat transferinin alkol grubuna yapıldığını ve son rakamda bu enzimin alkol grubuna fosfat transferi sağlayan enzimler arasında ilk sırayı aldığını göstermektedir.

Enzimler 6 sınıf içinde incelenmektedir:

Çizelge 0.1 Enzimlerin sınıflandırılması

No	Sınıf	Katalizlenen reaksiyon türü
1	Oksidoredüktazlar	Elektron transferi
2	Transferazlar	Grup transfer reaksiyonları
3	Hidrolazlar	Hidroliz reaksiyonları
4	Liyazlar	Çift bağa grupların eklenmesi ya da grupların uzaklaşmasıyla çift bağların oluşma reaksiyonları
5	İzomerazlar	Molekül içinde grupların transferi ile izomerik formların oluşum tepkimeleri
6	Ligazlar	Enerji kullanılarak kondenzasyon reaksiyonları ile C-C, C-S, C-O ve C-N bağlarının oluşum tepkimeleri

1. Oksidoredüktazlar (E.C.1.): İki substrat arasındaki redoks reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. **Örnek:** Substratlara S ve S' denilirse,



Bu büyük ve önemli olan grup *dehidronagenazlar* veya *oksidazlar* olarak bilinmektedir.

İlk adı: Alkol dehidrogenaz

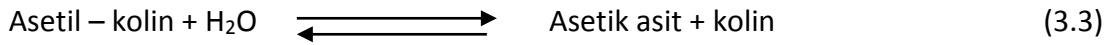
Sistematik adı: Alkol : NADP⁺ oksidoredüktaz

2. Transferazlar (E.C.2.): İki substrat arasında H⁺ dışındaki grupların transferini katalizleyen enzimlerdir. **Örnek:** Taşınan gruba G denilirse,



3. Hidrolazlar (E.C.3.): Ester, eter, peptit, glikozid, asit anhidrit, C-C, C-halojenür veya P-N bağlarının bir su molekülünün katılmasıyla hidrolizini katalizleyen enzimlerdir.

Örnek:



4. Liyazlar (E.C.4.): Hidrolizden farklı bir mekanizma ile grupların substratlarından uzaklaştırılıp, çift bağların oluşturulduğu reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir. **Örnek:**



İlk adı: Karbonik anhidraz

Sistematik adı: Karbonat Hidroliyaz

5. İzomeraz (E.C.5.): Geometrik, optik ya da yapısal izomerlerin birbirlerine dönüşümünü katalizleyen enzimlerdir. **Örnek:**



İlk adı: Trioz fosfat izomeraz

Sistematik adı: D-Gliseraldehit-3-fosfat ketolizomeraz

6. Ligazlar (E.C.6.): ATP veya GTP gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinden fosfat bağının parçalanması sonucu açığa çıkan enerji yardımıyla iki bileşiğin bağlanma reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. **Örnek:**



İlk adı: Glutamin sentetaz

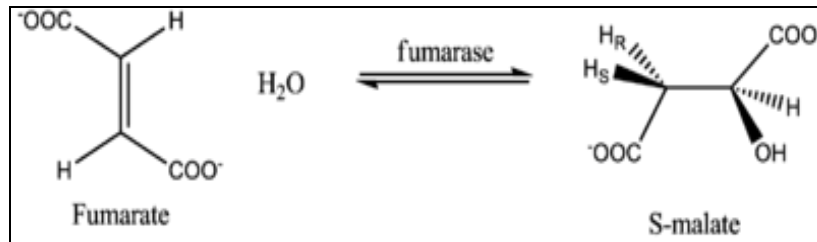
Sistematik adı: L-glutamat NH_4^+ ligaz(ADP)

3.1.2 Enzimlerin Substrat Spesifikliği

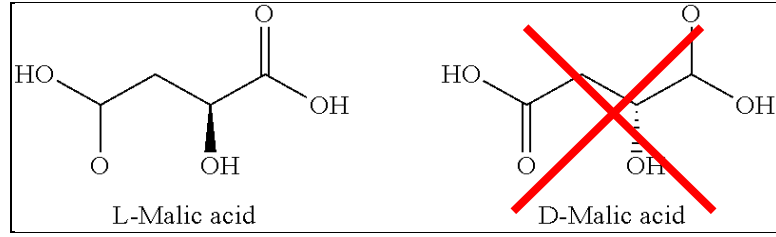
Enzimler aktivitelerini aktif merkez adı verilen bölgeleriyle yaparlar, bununla birlikte bir bütün olarak proteinin üç boyutlu doğal yapısında önemli rol oynamaktadır. Enzimlerin katalizör olarak etki ettikleri maddelere **substrat** adı verilmektedir.

Enzimler oldukça spesifik biyokatalizörlerdir. Bunlar hem reaksiyon tipleri, hem de reaksiyona girecek maddeler için seçicilik gösterirler. Aynı zamanda bazı moleküller için "stereospesifik" özellik gösterirler.

Örneğin, Fumarat molekülüne, L- Malik asit yerine D- Malik asit kullanıldığında fumaraz enzimi etki etmemektedir (Şekil 3.2). Bu durum bazı enzimlerin stereospesifik özellik gösterdiğini açıklamaktadır.



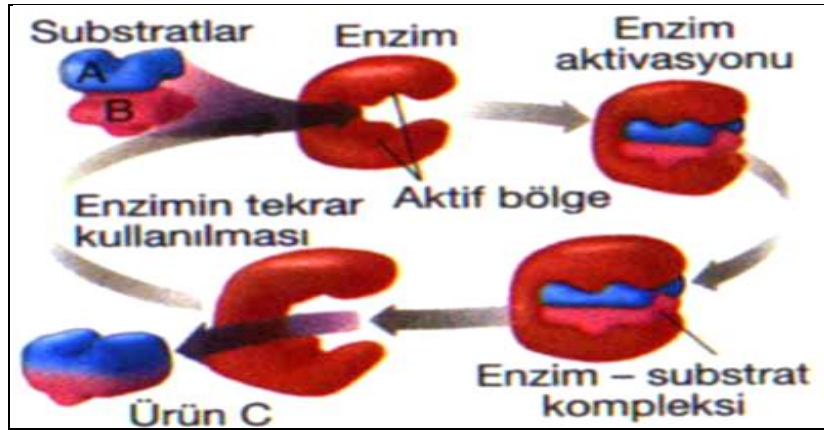
Şekil 0.1 Fumarat molekülünün fumaraz enzimi ile reaksiyonu



Şekil 0.2 L-malik asit ve D-malik asit

Enzimlerin konfigürasyonlarını belirleyen, substrat ve diğer moleküllerin enzimlere bağlanmasını sağlayan kovalent olmayan (non-kovalent) bağlar bulunmaktadır. Bunlar, **van der Waals bağları, elektrostatik bağlar, H bağları ve hidrofobik etkileşimlerdir.**

Genel olarak, enzim yüzeyinde substratın girebileceği şekilde enzimin yapısına uygun bir bağlanma bölgesi bulunmaktadır (geometrik uygunluk). Aktif bölge adı verilen bu bölgede bulunan aminoasitler substratla 5-non-kovalent bağlarla bir arada tutulurlar. Ancak bu yapıya uygun olan substratlar enzim-substrat kompleksini oluşturabilir. Bu kompleks oluşamaz ise ürün meydana gelmez.



Şekil 0.3 Enzim-Substrat kompleksi

3.1.3 Enzimlerin Etki Mekanizmaları

Enzimlerin katalitik mekanizması iki şekilde incelenir:

I. Aktivasyon enerjisi ve denge sabiti:

Enzimler reaksiyona karşı enerji engelini azaltırlar fakat denge sabitini etkilemezler.

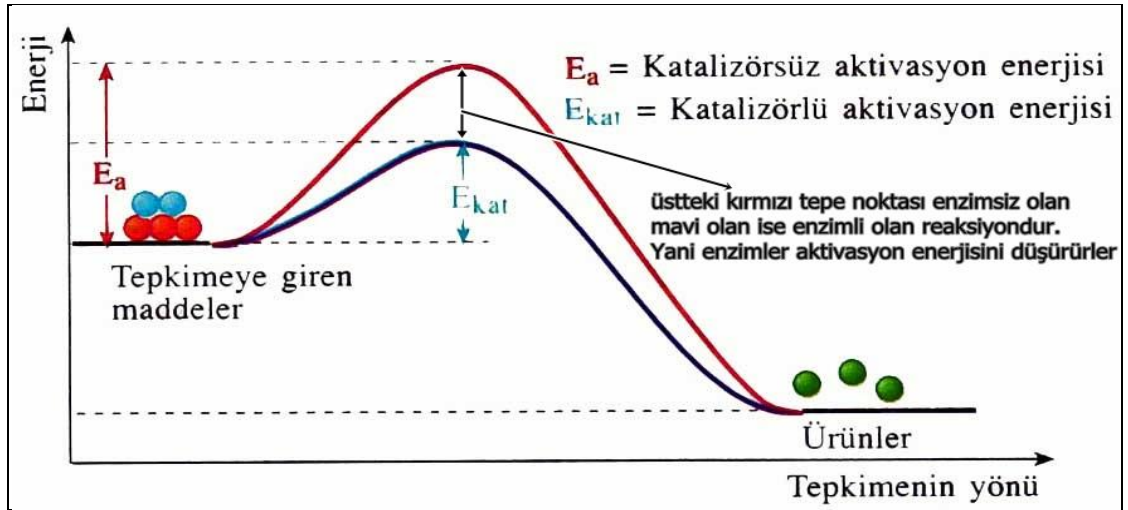
k_1 ve k_2 hız sabitleridir.



Reaksiyon denge sabiti, $K_{eq} =$

$$\frac{k_1}{k_2} = \frac{[P][Q]}{[A][B]} \text{ ile gösterilir.} \quad (3.8)$$

Moleküllerin birbirleri ile reaksiyona girebilmeleri için enerji tüketilmektedir. Bütün kimyasal reaksiyonlarda aktivasyon enerjisi olarak adlandırılan bir enerji aşılması gerekir. Enzimler katalitik etkilerini biyokimyasal reaksiyonun aktivasyon enerji engelini düşürerek yaparlar. Aktivasyon enerjisi düşük olan reaksiyonların hızı yüksek olmaktadır.



Şekil 0.4 Bir reaksiyonun aktivasyon enerjisi üzerinde enzimin etkisi

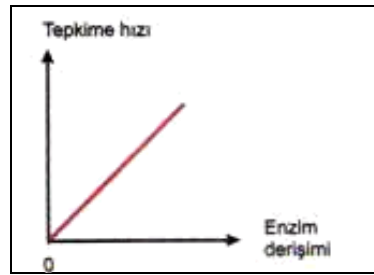
II. Aktif veya katalitik bölgedeki değişiklikler: Enzim molekülleri substrat moleküllerinden daha büyüktür. Aktif bölge ise enzim molekülünün yüzey bölgesinin %5 gibi çok küçük bir kısmını oluşturur.

Enzim spesifitesinin esasını bu aktif bölge oluşturur çünkü bağlayıcı olaylar ve kimyasal dönüşümler burada meydana gelir. Aktif bölgede bazı **aminoasit yan zincirleri, kofaktör ve koenzimler** vardır.

3.1.4 Enzim Reaksiyonlarının Hızına Etki Eden Faktörler

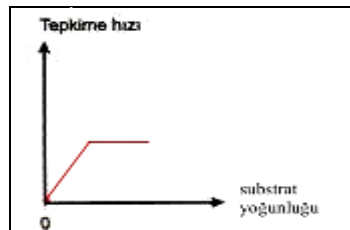
Reaksiyonun hızı bir dakikada ürüne dönüşen substrat miktarı olarak ifade edilir ve birimi $\mu\text{mol} / \text{dk.}$ 'dır.

a) Enzim konsantrasyonu: Enzimler ile katalizlenen bir reaksiyonun başlangıç hızı, her zaman enzim konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Sıcaklık ve pH değerlerinin optimum olduğu ortamda yeterli substrat varsa enzim yoğunluğu arttıkça tepkime hızı da artar. Ortamdaki substrat miktarı sınırlı ise enzim yoğunluğu artsa bile reaksiyon bir süre devam eder daha sonra durur. Bunun nedeni ortamda substratın kalmamasıdır.



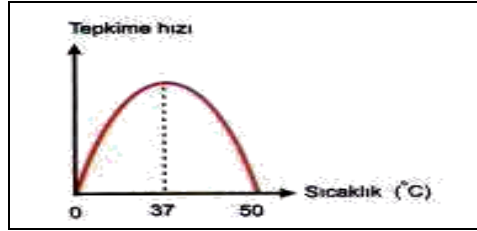
Şekil 0.5 Enzim konsantrasyonunun reaksiyona etkisi

b) Substrat konsantrasyonu: Enzim konsantrasyonu sabit olmak koşuluyla substrat konsantrasyonu arttıkça reaksiyonun hızı da artar. Fakat bir süre sonra substrat konsantrasyonu ne kadar artarsa hız değişmez (V_{max}). Bunun nedeni enzimlerin substrata doymasındır.



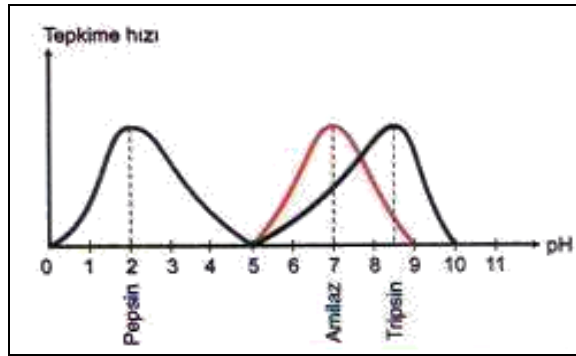
Şekil 0.6 Substrat konsantrasyonunun reaksiyona etkisi

c) Sıcaklık: Bir enzimatik tepkimenin hızı belirli bir noktaya kadar, artan sıcaklığa bağlı olarak artar. Bunun nedeni sıcaklık artışından dolayı, substratların hızlı hareket etmesi ve enzimin aktif bölgesi ile daha sık çarpışmasıdır. Ancak, belirli bir sıcaklığın (45-55 °C) üzerine çıkıldığında enzimler denatüre olduğundan (aktif bölgenin şekli bozulur), enzimatik tepkimenin hızı aniden düşer. Yüksek sıcaklıkta (55-60 °C) enzimlerin yapısı bozulduğundan, sıcaklık normale dönse de enzimler çalışamaz.



Şekil 0.7 Sıcaklığın reaksiyona etkisi

d) pH: Her enzimin optimum bir pH'ı vardır. Birçok enzim 5-9 pH aralığında optimal aktiviteye sahiptir. Genellikle, enzimlerin optimal pH değerleri 7'dir. Bazı enzimler asidik, bazıları ise bazik ortamda optimal aktive gösterebilirler. **Örneğin**, midede protein sindiriminde görev alan pepsin enzimi pH=2'de yani asidik ortamda iyi çalışır. İnce bağırsakta protein sindiriminde görev alan tripsin enzimi ise pH=8,5'te yani bazik ortamda iyi çalışır.



Şekil 0.8 pH'nın reaksiyona etkisi

3.1.5 Enzimatik reaksiyonlarında serbest enerji değişimleri

Kimyasal reaksiyonlarda, reaksiyona katılan maddelerin ürünlere dönüşmesi sırasında ΔG olarak adlandırılan bir serbest enerji değişimi söz konusudur.

a. **Endergonik reaksiyonlar:** ΔG değerinin pozitif olduğu ve reaksiyonun gerçekleşebilmesi için dışarıdan enerji verilmesi gereken reaksiyonlardır.

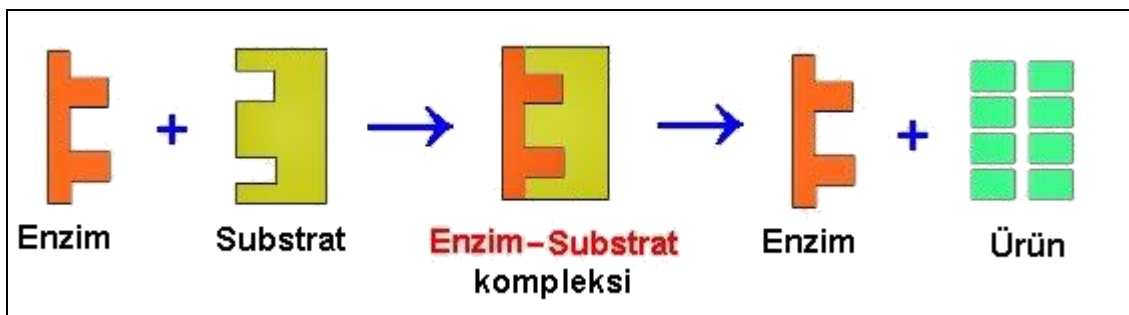
b. **Ekzergonik reaksiyonlar:** ΔG değerinin negatif olduğu ve reaksiyonun gerçekleşebilmesi için sistemin enerjisinin yeterli olduğu reaksiyonlardır. Bu reaksiyonlar kendiliğinden gerçekleşebilir.

3.1.6 Enzim Katalizli Reaksiyonların Kinetiğinin Denklemleri

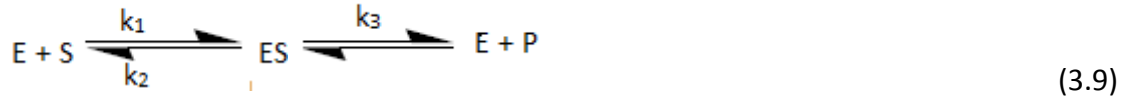
Bir enzim reaksiyon hızının substrat konsantrasyonu ile değişimine bakıldığında, düşük substrat konsantrasyonlarında, reaksiyon hızı substrat konsantrasyonlarıyla doğru orantılı olarak artar. Reaksiyon hızı substrata göre birinci derecedendir.

Substrat konsantrasyonu arttırılmasına rağmen reaksiyon hızının artmaması durumunda tüm enzim molekülleri substratla birleşmiş yani doymuş haldedir.

Doygunluk durumundaki tüm enzimler ES (Enzim-Substrat kompleksi) halindedir. 1913 yılında Leonor Michaelis ve Maud Menten, enzimli reaksiyonların ilk basamağında bir ES kompleksi oluşturmamasından ve enzimlerin doymuluk özelliklerinden yola çıkarak bir model geliştirmişlerdir. Bu model birçok enzimin kinetik özelliklerini açıklamaktadır [38].



Şekil 0.9 Enzim-Substrat kompleksi



$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_3 [ES] \quad (3.10)$$

Burada ES teriminin, enzim ve substrat konsantrasyonları gibi bilinen değerler cinsinden gösterilmesi gerekmektedir. ES'nin oluşma ve parçalanma hızları aşağıdaki gibi yazılabilir,

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 [E] [S] \quad (3.11)$$

$$-\frac{d[ES]}{dt} = k_2 [ES] + k_3 [ES] \quad (3.12)$$

ES kompleksi konsantrasyonunun reaksiyon boyunca sabit kaldığı, yapılan spektroskopik çalışmalarla bulunmuştur. Bu da ES kompleksi oluşma hızının parçalanma hızına eşit olmasıyla mümkündür.

Böylece,

$$-\frac{d[ES]}{dt} = \frac{d[ES]}{dt} \text{ den} \quad (3.13)$$

$$k_1 [E] [S] = (k_2 + k_3) [ES] \quad (3.14)$$

eşitliği çıkar. Bu eşitlikteki sabitler tek bir terimde toplanarak,

$$K_m = (k_2 + k_3) / k_1 \text{ ifadesi yazılır.} \quad (3.15)$$

Bu denklemde, K_m 'ye Michaeli-Menten sabiti adı verilir. Bu sabit yerine konulduğunda,

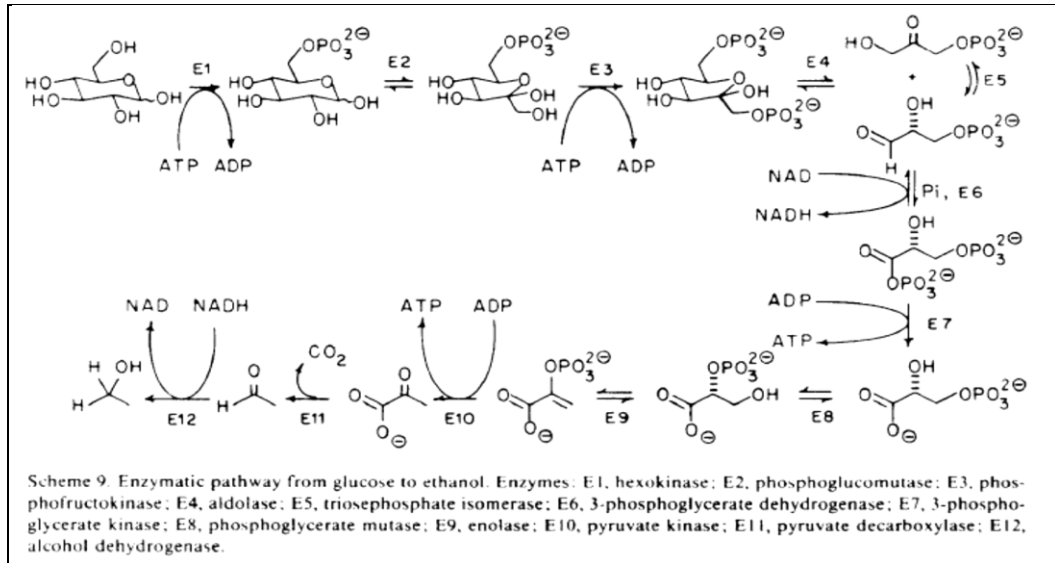
$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_m} \text{ denklemi elde edilir.} \quad (3.16)$$

Düşük substrat konsantrasyonlarında $K_m > [S]$ olacağından, $[S]$ ihmal edilir ve

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m} \quad \text{Michaeli-Menten denklemi bulunur.} \quad (3.17)$$

3.1.7 Enzimatik Reaksiyonların Mekanizması

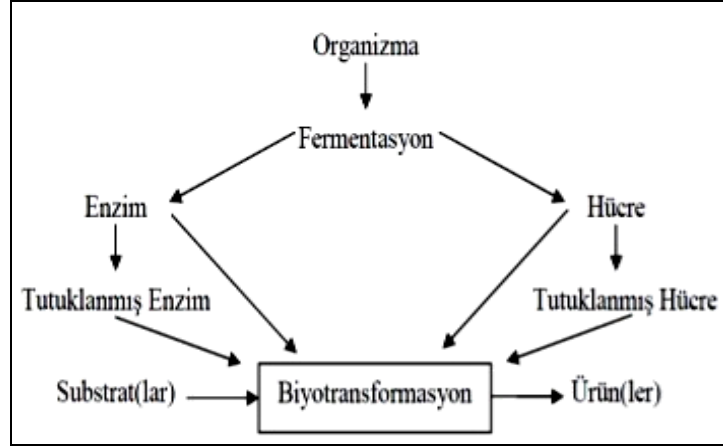
Molekülünde asimetrik bir karbon atomu bulunan bir ketona nükleofilik katılma sonucu yeni bir asimetrik karbon atomu meydana geliyorsa, önceden bulunan asimetrik grubun karbonil grubunun sp^2 düzleminin her iki yüzeyini farklı şekilde engellediği için, karbonile katılma bir yüzeyden diğerine göre daha hızlı olur ve diastereomerlerden biri diğerine göre daha fazla oluşur. Enzimler kimyasal dengenin yerleşmesini hızlandırırlar. Bu hızlandırma kimyasal katalizörlerin kullanılmasından daha avantajlıdır. **Örneğin**, üreaz enzimi üreyi hidrolizleyerek NH_4 ve HCO_3 iyonlarına dönüştürmektedir. pH 8 ve 20 °C suda bu reaksiyonun hız sabiti enzim yokken $3 \cdot 10^{-10}$ iken, enzim varlığında $3 \cdot 10^4$ dir. Böylece, üreaz enzimi bu reaksiyonu 10^{14} kat hızlandırmıştır.



Şekil 0.10 Glikozdan ethanol eldesinin enzimatik yolu

3.2 Biyotransformasyon

Biyotransformasyon, biyolojik sistemlerin veya enzimlerin katalizör olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilen kimyasal dönüşüm reaksiyonlarıyla endüstriyel öneme sahip bileşiklerin elde edilmesi olarak tanımlanır.



Şekil 0.11 Biyotransformasyon reaksiyonlarının genel şeması

Biyotransformasyon reaksiyonlarında biyolojik sistemlerin doğal yaşam alanlarında doğal substratları üzerinde gerçekleştirdikleri biyosentezden farklı olarak, doğal substratları olmayan moleküller üzerinde meydana getirdikleri dönüşümler söz konusudur [39],[40],[41],[42],[43],[44],[45].

3.2.1 Biyotransformasyon Reaksiyon Tipleri

Bu reaksiyon tipleri 7 şekilde gruplandırılabilir [46]:

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

Burada sıralanmış olan reaksiyonlar biyotransformasyon reaksiyonlarının neredeyse tüm sentetik reaksiyonlara eşdeğer reaksiyonları yapabileceğini göstermektedir.

Bu tür reaksiyonları aşağıdaki gibi gruplandırılabilir:

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

Biyotransformasyon Teknikleri

Biyotransformasyon reaksiyonlarında, çeşitli biyokatalizörler aracılığı ile elde edilen kimyasal sentez ürünleri ise tek basamakta kolaylıkla ve ekonomik olarak sentezlenmektedir. Biyotransformasyon çalışmalarında çeşitli teknikler kullanılmaktadır.

Biyotransformasyon teknikleri aşağıda belirtilmiştir:

- a. Büyüyen hücreler ile biyotransformasyon
- b. Stasyonier hücreler ile biyotransformasyon
- c. Sporlar ile biyotransformasyon
- d. İmmobilize hücreler ile biyotransformasyon
- e. Serbest ve immobilize enzimler ile biyotransformasyon

Biyotransformasyon Reaksiyonlarını Etkileyen Faktörler:

Biyotransformasyon reaksiyonlarının katalizörleri mikroorganizmalar ve enzimler olduğundan, reaksiyonların gerçekleşebilmesi için gerekli şartlar kimyasal reaksiyonlara oranla daha farklı ve daha hassas olabilmektedir.

- Substratın derişimi,
- alkalama hızı,
- Zaman,
- Ortamın sıcaklığı ve
- pH biyotransformasyon reaksiyonları için önemli faktörlerdir [47],[48].

3.3 Enzimatik Biyotransformasyon Reaksiyonları

3.3.1 Biyotransformasyon Reaksiyonlarda Enzimlerin Tercih Edilme Nedenleri

Geniş bir çeşitliliğe sahip biyotransformasyon reaksiyonları, sentetik olarak gerçekleştirilemeyecek reaksiyonları gerçekleştirebilme olanağına sahiptir. Enzimlerin sağladığı önemli avantajlar nedeniyle, biyotransformasyon uygulamalarında enzimlerin tercih edilme nedenleri aşağıdaki gibidir [43], [46] :

- a. Enzimler çok hızlı çalışan biyokatalizörlerdir.
- b. Enzimler geniş bir substrat spesifikliğine sahiptir.
- c. Enzimlerin geniş bir reaksiyon spektrumu vardır.
- d. Enzimler ılımlı koşullarda çalışırlar.
- e. Enzimler aynı ortamda birbirlerini etkilemeden kalabilirler.
- f. Enzimler, **kimyasal seçicilik, bölgesel seçicilik ve enantiyomerik seçicilik** olmak üzere üç tip seçicilik gösterirler.
- g. Organik sentez yöntemleriyle gerçekleştirilmesi çok zor reaksiyonlar enzimatik olarak kolayca gerçekleştirilebilir.

3.3.2 Enzimlerin Kiral Seçicilik zellikleri ve Enzimatik Reaksiyon Mekanizması

Kiral tanıma ya da kiral seçicilik, canlı sistemlerdeki kiral alıcıların veya kimyasal bileşiklerin bir kiral molekülün enantiyomerlerinden biri ile seçici olarak etkileşmesidir [49]. Özellikle, biyolojik etkileşimlerde kiral seçicilik baskın şekilde rol oynar.

Canlı sistemlerde bir kiral molekülün enantiyomerlerini ayırt edebilen yapılar enzim ve reseptörlerdir. Canlı sistemlerde dış ve iç ortamda meydana gelen kimyasal, fiziksel, elektriksel vb. gibi tüm değişiklikler serbest sinir uçları veya sinirlerin bağlı oldukları duyu almaçları yani reseptörler tarafından algılanır. Fizyolojik fonksiyonları ne olursa olsun reseptörlerde ortak olan nokta hepsinin kiral moleküller olmasıdır. Bu nedenle reseptörlerin uyarıcı moleküllerine bağlanmalarında enantiyoseçici davranmaları beklenir [36].

Enzimler kiraldir ve tek bir enantiyomer halinde bulunurlar. Üzerlerinde kimyasal reaksiyonların meydana geldiği asimetrik bir bölge (aktif merkez) vardır. Bu şekilde enzimlerin katalizledikleri reaksiyonların çoğunda ürünün yalnızca bir enantiyomerik şekli oluşur [50].

Kimyasal yolla yapılan asimetrik sentezlerde koşul, substrat, reaktif veya çözücünden birinde asimetrik karbon atomu bulunmasıdır. Bu koşullara sahip aktif bir bileşiğin, bir enantiyomeri diğerinden yaklaşık % 10'a kadar fazla oluşabilir. Doğada meydana gelen biyokimyasal reaksiyonların hemen hemen tümü asimetrik sentezlerle gerçekleşir ve tek enantiyomer % 100 verimle meydana gelir. Bunun nedeni, doğal katalizörlerin enzimler olmasıdır ve bunların substrata göre çok daha büyük molekülü ve stereospesifik olmalarıdır.

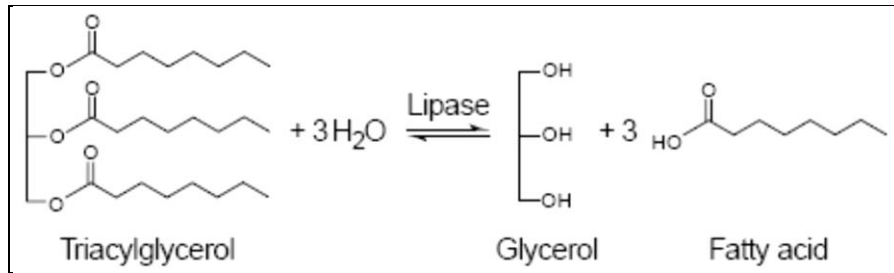
Kimyasal reaksiyonları yüksek tepkime gücünde gerçekleştirmesinde rol oynayan faktörler ve enzimatik reaksiyon mekanizması :

1. Enzim substrat molekülünü bağlayarak, parçalanacak bağın aktif merkezindeki katalitik gruba çok yakın durmasını ve ara ürünün kolayca oluşmasını sağlar.
2. Bazı enzimler, substratla dayanıksız kovalent ara ürünler oluştururlar ve reaksiyonun daha kolay yürümesini sağlarlar.
3. Bir enzim proton verici ve proton alıcı olarak görev yapan bazı fonksiyonel gruplar vasıtasıyla bir asit-baz katalizini yapabilir.
4. Enzim, substrat molekülündeki parçalanacak olan bağın gerilmesi veya deformasyonunu sağlayarak, bağın parçalanmasını kolaylaştırır.

3.4 Biyotransformasyon Reaksiyonlarında Kullanılan Lipaz Enzimlerinin Önemi

Lipazların (triacilgliserol hidrolazlar), bitki ve mikroorganizmaların yağ metabolizmasında önemli görevleri vardır. Lipazlar memeli, bitki ve mikrobiyal kaynaklardan elde edilmektedir. Esterleşme, transesterleşme ve hidroliz tepkimelerini düşük sıcaklıkta katalizlemeleri, susuz ortamda kararlı ve aktif olmaları, kofaktör gerektirmemeleri, yüksek katalitik güçleri, ucuz olmaları, seçimli ve pozisyonel olarak spesifik yağ asidi değiştirmeleri, ester bağına spesifik olmaları, yüksek substrat seçimlilikleri ve yan ürün oluşumunu önlemeleri nedenleriyle yaygın olarak kullanılırlar.

Lipazlar, stereo ve bölgesel spesifik olmaları nedeniyle kimyasal olarak katalizlenemeyen tepkimeleri katalizleyebilirler. Böylece var olan bir ester modifikasyonu ya da fonksiyonel ve fizikokimyasal özellikleri farklı yeni bir ester üretimi yapabilmekte ve bunun sonucunda değerli yeni kimyasal maddeler ya da daha kullanışlı gliserit karışımları elde etmek mümkün olmaktadır.



Şekil 0.12 Lipazların katalitik etkisi

Lipazlar ile gerçekleştirilen optik ayırma metotları tipik olarak, ya bir esterin rasemik karışımının enantiyoseçimli hidrolizi (örneğin iki izomerden sadece bir tanesinin hidrolizinin tercih edilmesi) ya da rasemik bir asit/esterin enantiyoseçimli esterleşmesi/transesterleşmesi ile esterden asidin ayrılması şeklinde gerçekleşir [50],[51].

Lipazların uygulama alanları:

- ❖ Bileşiklerin sentezi,
- ❖ Karbonhidrat ester sentezi,

- ❖ Poli doymamış yağ asitlerinin elde edilmesi,
- ❖ Biyolojik aktif bileşenlerin sentezi,
- ❖ Parfüm,
- ❖ Tat esterlerinin üretimi,
- ❖ Yapısal lipidlerin sentezi ve organik karbonatların sentezi olarak sınıflandırılabilir [52].

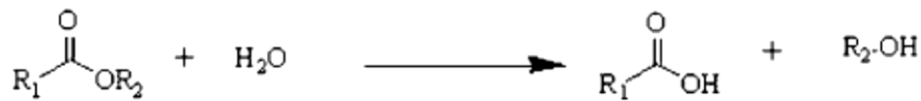
Bu tür çeşitli lipaz katalizli kiral sentez yöntemleri endüstride kullanılır. **Örneğin,**

- ❖ Optikçe saf R-fenoksipropiyonik asit herbisitlerin sentezi için ara ürün vermek üzere bromopropiyonik asitten ayrılması Avusturya'da Chemie Linz isimli bir firma tarafından ticari olarak gerçekleştirilmektedir.
- ❖ Glisidil bütüratın ve pmetoksifenil glisidatın optik olarak ayrılma işlemleri DSM Adeno isimli bir ilaç firması tarafından ticari olarak yapılmaktadır. Bu bileşenler, optikçe aktif - blokerlerin ve tansiyon düşürücü ilaç diltiazem'in hazırlanmasında önemli ara ürünlerdir.

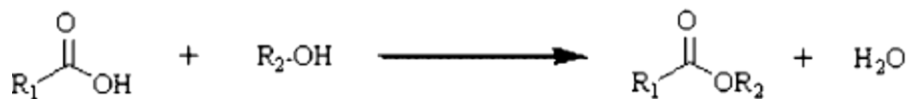
Lipaz Katalizörlüğünde Gerçekleşen Tepkimeler:

Lipazlar çok yönlü katalizörlerdir. Doğal olarak yağların hidrolizini katalizlemeleri yanında esterleşme, transesterleşme, interesterleşme ve aminolizis tepkimelerini de katalizlerler (Şekil 3.14) [53].

1. Hidroliz

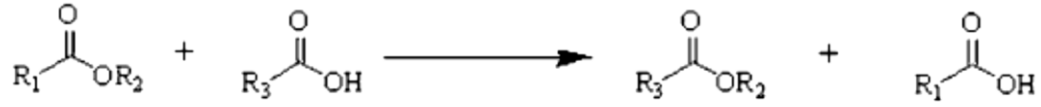


2. Esterleşme

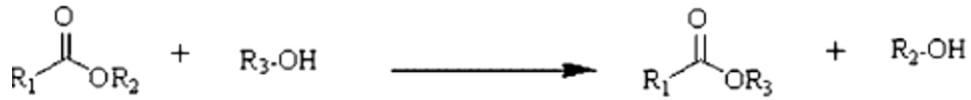


3. Transesterleşme

Asidolizis



Alkolizis



4.İnteresterleşme



5. Aminolizis



Şekil 0.13 Lipaz katalizörlüğünde gerçekleşen tepkimeler

3.5 Biyotransformasyon Çalışmalarında Sıklıkla Tercih Edilen Lipaz Enzimleri

1) Wheat Germ Lipaz (WGL) (Buğday Ruşeym Lipazı): Tokoferollerin (E vitamini) en zengin kaynağı olan ruşeym; aynı zamanda B grubu vitaminlerin, doymamış yağ asitlerinin (özellikle oleik, linoleik ve α -linoleik asit) ve fonksiyonel özellikli fitokimyasalların (flavonoidler ve steroller), esansiyel aminoasitlerin oldukça zengin bir kaynağıdır [54]. Buğday ruşeymi lipazı olan wheat germ lipazının (WGL) optimum çalışma değerleri; pH=7,5'da 30°C sıcaklık aralığındadır.

2) Amano Lipaz: Ticari olarak *Aspergillus niger*, *Pseudomonas fluorescens* ve *Pseudomonas cepacia*'dan izole edilen amano lipazlar; allilik ve alifatik klorohidrinler [55], rasemik α -fenilalanin amidlerin [56], asetamid fenilpropanoik asit ve türevlerinin reaksiyonlarında ve özellikle sekonder alkollerin enzimatik kiral hidrolizinde görev almaktadırlar [57].

3) Candida türü lipazlar: Candida enzimleri, sekonder alkol esterlerinin rezolüsyonunda ve α -substitüye karboksilatların rezolüsyonunda yaygın olarak kullanılmaktadırlar. *Candida cyclindracea*'nın substrat olarak kalabalık grup içeren esterleri tercih etmesinden ötürü halkalı yapıya sahip alkol esterlerinin hidrolizinde *C. cyclindracea* enzimleri yaygın olarak kullanılmaktadır [58]. (*R-S*)-ketoprofen'in enantiyoseçilimi amacıyla *Candida antarctica* lipaz B (CALB)'nin enzimatik mebran reseptörleri üzerindeki etkinliği araştırılmış; yüksek reaksiyon kapasitesi, iyi termal durağanlık ve tekrar kullanılabilirlik gibi avantajlarının olduğu saptanmıştır [58].

4) Hog Pancreatic Lipaz (HPL): "Hog" olarak tanınan ve Türkçe karşılığı "domuz" anlamına gelen domuz pankreasından izole edilen ve ucuz olduğu için yaygın olarak kullanılan bir enzimdir. Saf olarak izole edilmeyen karışımları doğru HPL'in yanında birçok hidrolaz enzimi içerir. HPL enzimi primer alkollerin esterlerinin hidrolizinde kullanılır [58].

5) Mucor türü lipazlar: Mucor lipazları olan *Mucor Miehei* ve *Mucor Javanicus* biyotransformasyon amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Mucor enzimleri, katalizlediği substratın yapısı ve hidrolitik seçicilikleri bakımından *Pseudomonas* türü lipazlara benzerler.

Mucor türü enzimlerin aktif bölgelerinin üç boyutlu yapısının aydınlatılmasıyla aktif bölgelerinin diğer lipaz enzimlerine uygun olarak "Asp-His-Ser" üçlüsünü (triad) içerdikleri bildirilmiştir [58].

6) Pseudomonas türü lipazlar: *Pseudomonas Fluorescens*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Pseudomonas Cepacia* ve *Pseudomonas Glumae*'den izole edilmiş bakteriyal lipazlar etkin seçicilik gösteren biyokatalizörlerdir. Sekonder alkollerin *R*-ester hidrolizi için *Pseudomonas* enzimleri tercih edilmektedir [58].

7) Rhizopus Lipaz: Flamentli funguslardan olan *Rhizopus*'tan elde edilen lipazlar, primer alkollerin 1. ve 3. bölgelerindeki üstün seçicilikleri nedeniyle kimyasal sentezlerde oldukça kullanılmaktadırlar [60]. Genel olarak, triaçilgliserolden bazı özel endüstriyel ürünün hidrolizi, *Rhizopus* lipazlarının 1,3-regioseçicilikleri ile katalizlenmektedir [61]. *Rhizopus* lipazları bu üstün özellikleri nedeniyle enantioselektif kataliz ile kimyasal olarak değerli saf ürün eldesinde tercih edilmektedirler [61]. ***Rhizopus niveus*'tan** elde edilen lipaz enziminin (**RNL**) *sn*-2 pozisyonundaki oleik asite etki ederek doymuş yağların interesterifikasyonunu arttırdığı saptanmıştır [61]. Filamentli bir fungus olan *Rhizopus arrhizus*'dan hücre içi ve hücre dışı elde edilen lipaz enzimleri, doymuş ve doymamış yağların interesterifikasyonundaki üstünleri nedeniyle ilaç sanayinde sıklıkla kullanılmaktadırlar [62]. ***Rhizopus arrhizus* lipazının (RAL)** pH=6,9 ve %95 su ortamında 0,3 mm partikül boyutlu buğday kepeği üzerine 1.10^8 spor/ml konsantrasyonda maksimum enzim aktivitesi gösterdiği saptanmıştır [63].

BÖLÜM 4

BİYOAKTİVİTE ÇALIŞMALARI - MİTOKONDİRİYAL AKTİVİTEYE DAYALI

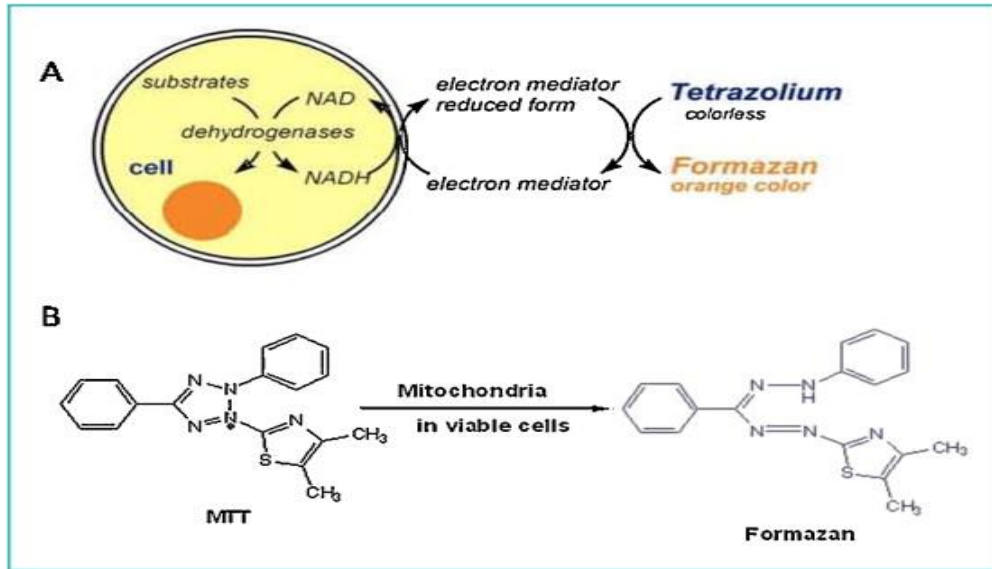
MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyumbromür) DENEYİ Bir maddenin işlevlerini ve aktivitesini belirlemek amacıyla belirli bir hücre serisinden çoğaltılan hücrelerde çalışmalar yapılarak in vitro sonuçlar elde edilebilmektedir. Biyoaktivite çalışmaları hücre kültürü ortamında gerçekleştirilmektedir. Hücre kültürü, hücrelerin belirli bir besi ortamında çoğaltılmasıdır. Canlı hücreler üzerinde kimyasal maddelere bağlı önemli yapı ve fonksiyon değişikliklerinin saptanması ve yorumlanması amacıyla deneysel toksikolojik çalışmalar yapılır. Toksikoloji zehir bilimidir. Zehir ise canlı organizmada zararlı etki gösteren herhangi bir madde olarak tanımlanabilir. Uygun yol ve dozda alınmayan her madde zehir etkisi yapabilir. Bu etki bir yapı değişikliği şeklinde olabileceği gibi biyokimyasal lezyon şeklinde de olabilir. Örneğin, kanser ilaçlarının çoğu etkilerini kanser hücresinin proliferasyon ve bölünme fazlarını etkileyerek gösterirler. Bazı kemoterapötik ajanlar bazı spesifik hücrelerde olumlu sonuç verirken diğer kanser hücrelerinde etkileri sınırlı olabilir. Bu nedenle farklı sitotoksik maddelerin, farklı hücrelerdeki etkilerinin tam olarak aydınlatılması oldukça önemli olmaktadır.

4.1 Biyoaktivite Çalışmaları - Mitokondriyal Aktiviteye Dayalı MTT(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) Testi

MTT ölçümü in vitro koşullarda metabolizmanın canlılığına dayanarak sitotoksisiteyi ölçmek için uygulanan kantitatif kolorimetrik bir yöntemdir.

Bu yöntem, hızlı, kolay ve yüksek oranda doğruluğa sahiptir. Bir tetrazolyum tuzu olan MTT sarı renkli olup, yaşayan hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat-dehidrojenaz enzimine spesifik olarak bağlanmaktadır. Bu bağlanmanın sonunda suda çözünmeyen koyu mavi renkte kristaller oluşmaktadır. Kristaller, DMSO ve izopropanol gibi organik çözücülerde kolayca çözünmektedir.

Çözünmüş olan bu boya, konsantrasyona bağımlı olarak spektrofotometrik yöntemle görünür dalga boylarında ölçülebilen bir absorbans vermektedir. Böylece, indirekt olarak hücrelerin metabolik aktiviteleri ölçülmektedir. Ayrıca ölçülen değer yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilmektedir.



Şekil 4.1 A. MTT ilkesi ve formazan B. Kimyasal yapıları

Mikroplate ölçümü temel farklı parametrelerle birlikte hücre canlılık ve proliferasyonuna dayalı olarak geliştirilmiştir. Mikroplate formatında kullanılan en önemli parametreler metabolik aktivite ve DNA sentezidir. Hücresel tahribat kayıp içerisinde muhafaza kabiliyetinde olan hücreler ve metabolik hücre fonksiyonları ve büyüme için enerji sağlamak kaçınılmaz hale gelmiştir. Metabolik aktivite ölçümünde bu dayanak noktası temeldir. Genellikle bu yöntem, hücrelerin mitokondrial aktivitelerini ölçer. Hücreler bir kolorimetrik substratla birlikte (MTT, XTT, WST-1) inkübe edilir [64]. Kolorimetrik yöntem için kullanılan temel parametre canlı hücrelerin metabolik aktiviteleridir.

MTT tetrazolium tuzu kullanılan bir mikroliter plate testi genellikle hücre proliferasyonu ve sitotoksitesinin kantitasyonunu belirlemede kullanılır. Tetrazolium tuzunun sadece metabolik aktivitesi olan hücreler tarafından renkli formazanlara indirgenmesinden dolayı bu yöntem sadece canlı hücreleri saptar. MTT içerisinde canlı hücreler renkli, suda çözünmez formazan tuzu tarafından indirgenir. Formazan kristalleri çözündükten sonra, çabuk ve kolayca klasik mikropate okuyucusunda (maximum absorbans) 570 nm de miktarı belirlenebilir [66]. Çoğalan hücreler proliferasyon olmayan hücrelerden metabolik olarak daha çok aktivite gösterdiği için, bu yöntemle sadece hücre canlılığı ve sitotoksite değil hücre aktivasyonu ve proliferasyonu da belirlenir. MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) kültür ortamındaki mitokondrial aktivitesi devam eden canlı hücrelerin kantitasyonunu sağlar.

En sık kullanım alanları:

- ❖ Sitokinlerin,
- ❖ Büyüme faktörlerinin medium komponentlerinin hücreler üzerine etkilerinin araştırılması ve
- ❖ Sitotoksik ajanların etkinliğinin test edilmesidir [65].

MTT suda çözünen bir tetrazolium tuzu olup fenol kırmızısı içermeyen medium veya tuz solüsyonlarında hazırlandığında sarımtırak bir solüsyon oluşturur. Tetrazolium halkasının dehidrogenaz enzimlerince parçalanması sonucu MTT mor renkli çözünmez formazana dönüşür. Bu dönüşüm canlı hücrelerin mitokondrileri aracılığı ile olur. Oluşan bu formazan izopropanol veya başka bir çözücü yardımı ile çözünür hale getirilir ve oluşan renk reaksiyonu spektrofotometrik olarak okunup kantite edilir [66].

α - HİDROKSİ KETONLARIN VE MANGAN (III) ASETATIN ÖNEMİ

5.1 Farmakolojide α -Hidroksi Ketonların Önemi

Farmakolojik olarak önemli α -hidroksi ketonlar, biyolojik olarak aktif doğal ürünlerin asimetrik sentezlerinde yapı birimleri olmaları sebebiyle, endüstri ve akademik çalışmalar açısından çok büyük bir önem taşımaktadır. Kiral α -hidroksi ketonlar, çoğu biyolojik aktivite gösteren doğal ürünler için önemli yapı birimleridir. Bu nedenle, birçok çalışma α -hidroksi ketonların stereoselektif sentezleri üzerinde yoğunlaşmıştır. α,β -doymamış ketonların α -asetoksilasyonu, farmakolojik olarak önemli bileşikler ve kiral ligandlar için anahtar rolü oynamaktadır.

Optikçe aktif α -hidroksi karbonil bileşiklerinin, özellikle ketonların sentezi, biyolojik aktiviteye sahip bileşiklerin asimetrik sentezinde yapı taşları olarak, yaygın olarak kullanıldıkları için büyük önem arz etmektedir [67],[68]. Optikçe aktif enolatların stereoseçici oksidasyonu, dikkat çekici bir çalışma olarak literatürde yer almıştır [69]. Söz konusu bileşiklerin sentezi için hem kimyasal, hem de biyoteknolojik metotlar (enzimatik ve mikrobiyal biyotransformasyon) bulunmaktadır.

Davis ve arkadaşları, (kamforsülfonil) oksaziridin kullanılarak ester ve amit lityum enolatların α -hidroksi karbonil bileşiklerine asimetrik oksidasyonunu gerçekleştirmişlerdir [70].

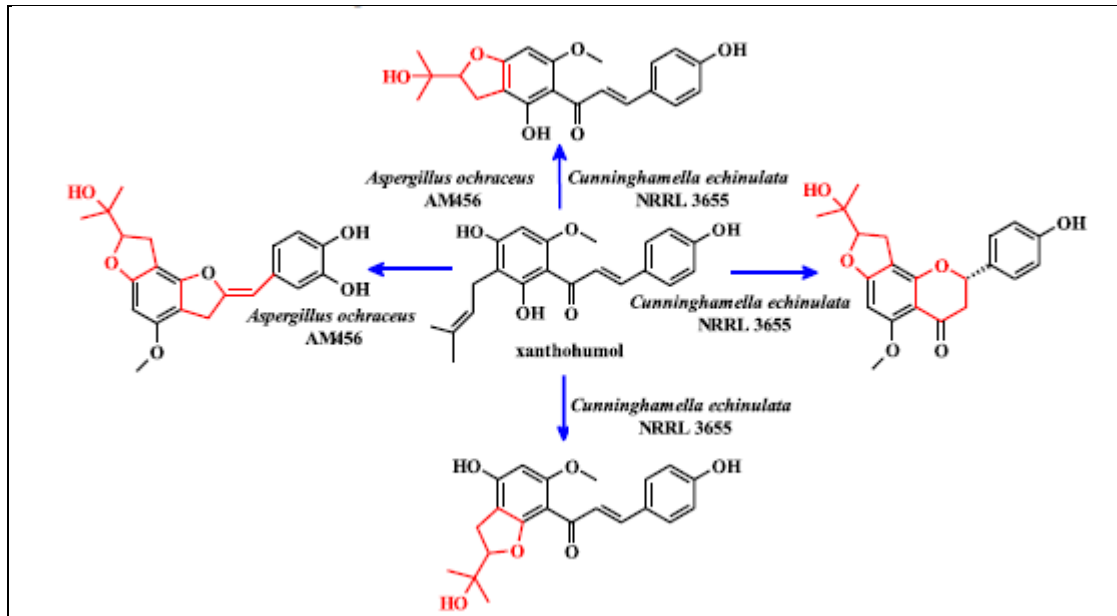
Masui ve arkadaşları, kiral faz transfer katalizörleri kullanılarak, akiral ketonlardan α -hidroksi ketonlar elde etmişlerdir [71].

Gala ve arkadaşları, lipaz enzimi kullanarak asetatların hidrolizi ile α -hidroksi aril ketonların enantiyoseçimli olarak sentezini rapor etmişlerdir [72].

Kimyasal metotlara alternatif olarak, optikçe aktif α' -hidroksi ketonlar enzimatik yollarla da hazırlanabilmektedir. Nakamura ve arkadaşları, α -diketonlar maya ile indirgenerek α' -hidroksi ketonlar elde etmişlerdir [73].

Adam ve çalışma arkadaşları, rasemik α' -hidroksi ketonların lipaz katalizörlüğünde, izopropenil asetat ve *t*-bütil metil eter kullanarak kinetik yarılmasını rapor etmişlerdir [74].

Bir keton türevi bileşik üzerinde farklı mikroorganizmalar kullanılarak gerçekleştirilen enzimatik biyotransformasyon reaksiyonlarında, farklı hidroksi keton türevleri elde edilmiştir [75].

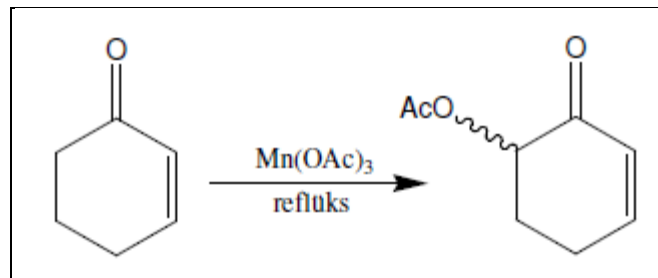


Şekil 5.1 Hidroksi keton türevi bileşiğin biyotransformasyon reaksiyonları ile sentezi

5.2 α,β -Doymamış Ketonların Sentezinde Mangan (III) Asetatın Önemi

Seçici α,β -doymamış ketonların, α' -asetoksillenmesi ilaç sektöründe ve faydalı kiral ligandların hazırlanması için bir anahtardır. Kompleks doğal ürünlerin sentezinde genel fonksiyonel grupların merkez pozisyonlarında bulunan seçicilik oksidasyonu için bazı prosedürler geliştirilmiştir [76].

Günümüzde α' -asetoksi α,β -doymamış ketonların sentezi için sıklıkla kullanılan metotlardan biri $Mn(OAc)_3$ ile asetillemedir (Şekil 5.2).



Şekil 5.2 Seçici α,β -doymamış ketonların, α' -asetoksillenmesi

Mangan çeşitli yükseltgenme basamaklarına sahiptir. Ancak, +3 yükseltgenme basamağındaki bileşikler son derece kararsızdır. Mangan(III) iyonunun kullanılması gereken birçok çalışmada çıkış maddesi olarak bu bileşikten yararlanılmaktadır. Ayrıca, Mangan(III) iyonunun susuz ortamlarda iyi bir yükseltgen olması bu bileşiğin önemini arttırmaktadır[77]. Mangan(III) asetat, tersiyer radikalleri hızla katyonlara yükseltgemekte ve bu katyonlar ya bir proton kaybederek alken, ya da asetik asitle reaksiyona girerek asetat esterlerini vermektedir [78].

Literatürde yer alan α' -asetoksillenmesi hakkındaki metotların hepsi içinde sıklıkla kullanılan iki tanesi kurşun(IV) asetat ve mangan(III) asetat ile oksidasyon metotlarıdır. Bunlardan kurşun(IV) asetat yüksek derecede zehirli olduğundan daha çok mangan (III) asetat ile oksidasyon yapılmaya başlanmıştır. Genel olarak, mangan (III) asetat yüksek kimyasal verime ve α' -asetoksillenmesi için yüksek bölge seçiciliğine sahiptir [79].

Williams ve Hunter, asetoksi enonların $Mn(OAc)_3$ ile oksidasyonunun Kurşun(IV) asetat ile oksidasyonuna kıyaslandığında düşük verim ile gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

Bu düşük verim oranının da reaktantın yararını azalttığını vurgulamışlardır [80]. Watt ve çalışma arkadaşları ise kurutulmuş $\text{Mn}(\text{OAc})_3$ kullanmışlar ve bunun sonucunda verimin büyük oranda arttığını tespit etmişlerdir [81].

Demir ve çalışma arkadaşları Mangan(III) asetatı kullanarak , α,β -doymamış enonların oksidasyonu üzerinde çalışmalar yapmış ve α' -asetoksi enonların sentezinde başarılı sonuçlara ulaşmışlardır [82],[83].

BÖLÜM 6

MATERYALLER

6.1 Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar

Çizelge 6.1 Deneyisel çalışmalarda kullanılan kimyasallar

Kimyasal Adı	Marka	Kod Numarası
5-Phenylcyclohexane-1,3dione %97	Alfa Aesar	A12136
Benzen	Merck	1.01783.2500
Dietil eter	Merck	1.00091.5000
Kloroform	Merck	1.02445.2500
n-Hexane for HPLC	Merck	1.04391.2500
2-Propanole for HPLC	Merck	1.01040.2500
Kloroform	Teknik	-
Hegzan	Teknik	-
Etil asetat	Teknik	-
Aseton	Teknik	-
Asetik asit (AcOH)	Merck	1.00063.2500
Etanol	Merck	1.00983.2500
Sikloheksan	Merck	102832
Fosfor pentoksit	Merck	21-470-1
Asetonitril	Merck	1.00003.1000
Toluen	Merck	1.08323.2500
Tetrahidrofuran	Merck	1.08114.2500
Diklorometan	Merck	1.06050.2500
Dimetilsülfoksit	Merck	1.02952.2500
Sodyum bi karbonat (NaHCO ₃)	Teknik	-
Sodyum hidroksid	Merck	106482
Sülfirik asit	Merck	1.00731.2500

Çizelge 6.1 Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar (devamı)

Magnezyum sülfat (MgSO ₄)	Teknik	-
Potasyum karbonat (K ₂ CO ₃)	Teknik	-
pH 7.00 +/- 0.01 Buffer solüsyonu	Merck	1.09439.1000
pH 4.00 +/- 0.01 Buffer solüsyonu	Merck	1.09435.1000
Hidroklorik asit	Tekkim	TK.080230.01000
Dipotasyum hidrojen fosfat (K ₂ HPO ₄)	Merck	1.05101.1000
Potasyum dihidrojen fosfat (KH ₂ PO ₄)	Merck	1.04873.1000
Mangan II asetat	Fluka	63537
Potasyum permanganat (KMnO ₄)	Merck	1.05082.0250
Mangan (III) asetat	Merck	805929.0100
<i>p</i> -anisaldehit (4-Methoxybenzaldehyde)	Aldrich	88107
	Merck	8.22314.0250
H ₂ O	Ultra saf	-
Kloroasetaldehid	Aldrich	31,727-6
Diklorometan	Merck	106049
Benzilamin	Aldrich	185701
Silica Gel 60 F ₂₅₄ 25 TLC alüminyum sheet 20x20	Merck	1.05554.0001
Silica Gel 60 (0,063-0.200 mm) for coloumn chromatography	Merck	1.07734.2500
Silica Gel 60 GF ₂₅₄ for thin-layer chromatography	Merck	107730.1000
Silica Gel 60 HF ₂₅₄ for thin-layer chromatography	Merck	107739.1000
Silica Gel 60 HF ₂₅₄₊₃₆₆ for thin-layer chromatography	Merck	1.07741.1000
TLC Silica Gel 60 F ₂₅₄ 25 glass plates 20x20 cm	Merck	1.05715.0001
Lipase basic kit	Fluca	62327
CCL (<i>Candida cylindracea</i> Lipaz)	Fluca	62316
CAL B (<i>Candida antarctica</i> Lipaz)	Fluca	62288
HPL (Hog pancreas Lipaz)	Fluca	62300
MJL (<i>Mucor javanicus</i> Lipaz)	Fluca	62304
RAL (<i>Rhizopus arrhizus</i> Lipaz)	Fluca	62305
RNL (<i>Rhizopus niveus</i> Lipaz)	Fluca	62310
PLL (<i>Pseudomonas lipoprotein</i> Lipaz)	Fluca	62335
CRL (<i>Candida rugosa</i> Lipaz)	Fluca	74793
PRL (<i>Penicillium roqueforti</i> Lipaz)	Fluca	62323
PCL (<i>Penicillium camemberti</i> Lipaz)	Fluca	96888
Lipase extencion kit	Fluca	62323
WGL (Wheat germ Lipaz)	Fluca	62306
Amano Lipase PS, from <i>Burkholderia cepacia</i> (<i>Pseudomonas cepacia</i>)	Aldrich	534641

TLC Uygulamasında kullanılan Anisaldehit Ayırıcı

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

6.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

Çizelge 6.2 Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Markası	Modeli
Su Distilasyon Cihazı	Millipore	Milli-Q Akademik A10
Evaporatör	Bucci	Rotavapor R-200
Ultrasonik Su Banyosu	Bandelin	RK-31
Vakum pompası	Welch	2522C-02
Manyetik Isıtıcı Karıştırıcı	IKA	Yellow Line MSC Basic C
Çalkalayıcı Su Banyosu	Gfl Gesellschaft Labortechnik	1083/1086
pH Metre	Hanna Instruments	pH Microprocessor pH Meter- 520518
Zaman ayarlı etüv	WTC binder	1505330000202 #980706
Otomatik pipet	Socorex Acura	Acura Manuel 825- 16061880
Analitik Terazî	Precisa	320-9204-007 XB 220A SCS/ W50124
IR	Perkin Elmer	Spectrum One
UV lamba	CAMAG	022.9120/1305
NMR	Bruker	Avance III 500 Mhz
Polarimetre	ADP-410	Bellingham stanley
Erime noktası tayini	Büchi	Melting Point B-540
MS Q-TOF	Agilent	6530B
HPLC	Shimadzu	Kontrolör- CBM-20A
OJ-H Kiral Analitik Kolon (Cellulose tris(4- methylbenzoate))	Daicel Corporation- Chiral 250x4.6mm, 5µm (Analytical)	17325

Çizelge 6.2 Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar (devamı)

Cihaz Adı	Markası	Modeli
AD Kiral Analitik Kolon (Amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate))	Daicel Corporation- Chiral 250x4.6mm, 10µm (Semi-Prep)	19025
OD-H Kiral Analitik Kolon (Cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate))	Daicel Corporation- Chiral 250x4.6mm, 5µm (Analytical)	14325
IR	Perkin Elmer	Spectrum One
UV lamba	CAMAG	022.9120/1305
NMR	Bruker	Avance III 500 Mhz
Polarimetre	ADP-410	Bellingham stanley

DENEYSEL ÇALIŞMALAR VE BULGULAR

Ticari olarak alınan Alfa Aesar markalı 5-fenil-1,3-sikloheksandion bileşiği üzerinden çeşitli kimyasal reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir.

Saflaştırmalar öncelikle kolon kromatografisi ile Merck silika jel 60 (0,063- 0.200 mm) kullanılarak yapılmıştır. Kolon kromatografisi ile saflaştırılamayan bileşikler preparatif tabaka kromatografisi yöntemiyle saflaştırılmıştır. Reaksiyon ve saflaştırma sonuçları ince tabaka kromatografisi (İTK) ile Merck silika jel 60 F₂₅₄ ve UV lambası camag UV (254nm) kullanılarak belirlenmiştir. TLC (İTK) sonuçları hazırlanan *p*-anisalhehit boyası ile boyandıktan sonra ısıtılarak sabitlenmiştir.

Sentezlenen bileşiklerin yapı tayini, uluslararası standart TMS (tetrametilsilan), standart çözücü olarak CDCl₃ (dötörökloroform) (¹H: δ = 7.27) (¹³C: δ = 77.0, 96.4) kullanılarak Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisiyle (NMR) (Bruker Avance III 500 Mhz) gerçekleştirilmiştir. IR spektrumları Perkin Elmer Spectrum One cihazında belirlenmiştir. HPLC analizleri Shimadzu Kontrolör CBM-20A cihazıyla yapılmıştır. Erime noktası tayini Büchi Melting Point B-540 cihazıyla yapılmıştır. Optik çevirme ölçümleri Bellingham stanley ADP-410 polarimeter cihazıyla yapılmıştır. MS Q-TOF ölçümleri Agilent G6530B cihazıyla gerçekleştirilmiştir.

Enzimatik biyotransformasyon reaksiyonlarında kullanılan lipazlar;

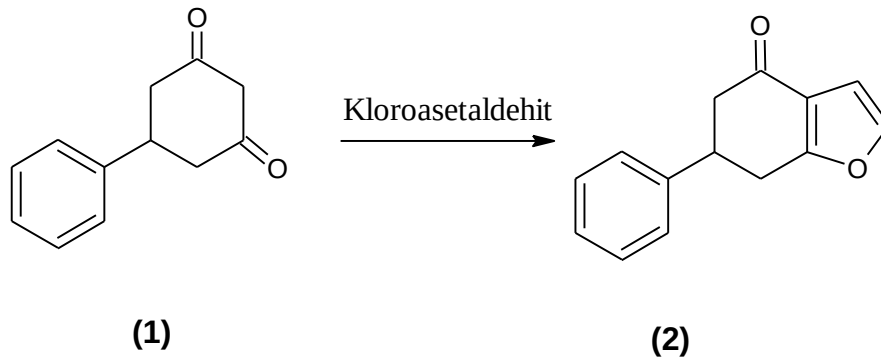
- WGL (Wheat germ Lipaz) BioChemika (62306),

- Amano Lipase PS Aldrich (534641),
- CAL B(*Candida antarctica* Lipaz B) BioChemika (62288),
- CCL (*Candida cyclindracea* Lipaz) BioChemika (62316),
- HPL (Hog pancreas Lipaz) BioChemika (62300),
- MJL (*Mucor javanicus* Lipaz) BioChemika (62304),
- PLL (*Pseudomonas lipoprotein* Lipaz) BioChemika (62335),
- PCL (*Penicillium camemberti* Lipaz) BioChemika (96888),
- PRL (*Penicillium roqueforti* Lipaz) BioChemika (62323),
- CRL (*Candida rugosa* Lipaz) BioChemika (74793).

7.1 Kimyasal Sentez Reaksiyonları

7.1.1 6,7-Dihidro-6-Fenilbenzofuran-4(5H)-On Bileşiğinin Sentezi

8 ml H₂O içersine 1 g NaHCO₃ ve %40'lık 2 ml kloroasetaldehit (ClOC₂H₃) eklenmiştir. Karışım 0-5°C'ye soğutularak 9 ml H₂O içindeki 10 mmol 5-fenil-1,3-siklohekzandion bileşiğine **(1)** dakikada 0,4 ml damlatılarak ilave edilmiştir. Reaksiyon oda sıcaklığında devam etmiştir (Şekil 7.1).



Şekil 7.1 5-fenil-1,3-siklohekzandion bileşiğinden **(1)** 6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran 4(5H)-on **(2)** sentezi

17 saat sonunda karışıma 10 ml etil asetat (EtOAc) eklenmiştir ve reaksiyonun pH'ı ölçülerek ($\sim 8,84$) $\text{pH}=1$ 'e ayarlanmıştır.



Şekil 7.2 5-fenil-1,3-sikloheksandion bileşiğinden başlanan reaksiyon sonucu

1 saat boyunca manyetik karıştırıcıda $\text{pH}=1$ 'de karıştırılan reaksiyonun organik faz ayrımı potasyum karbonat (K_2CO_3) solüsyonu ile gerçekleştirilmiştir.

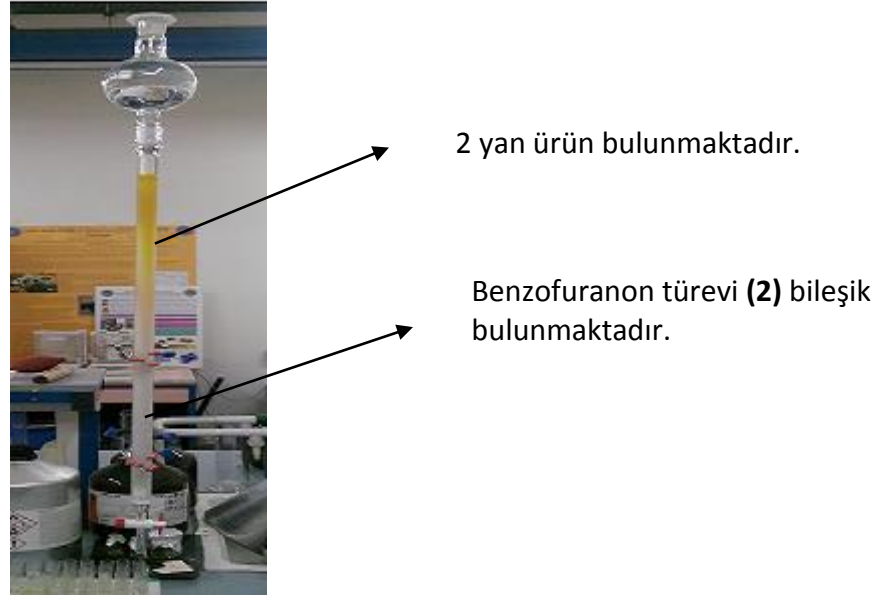


Organik fazın yer aldığı EtOAc solüsyonu

İnorganik fazın yer aldığı K_2CO_3 solüsyonu

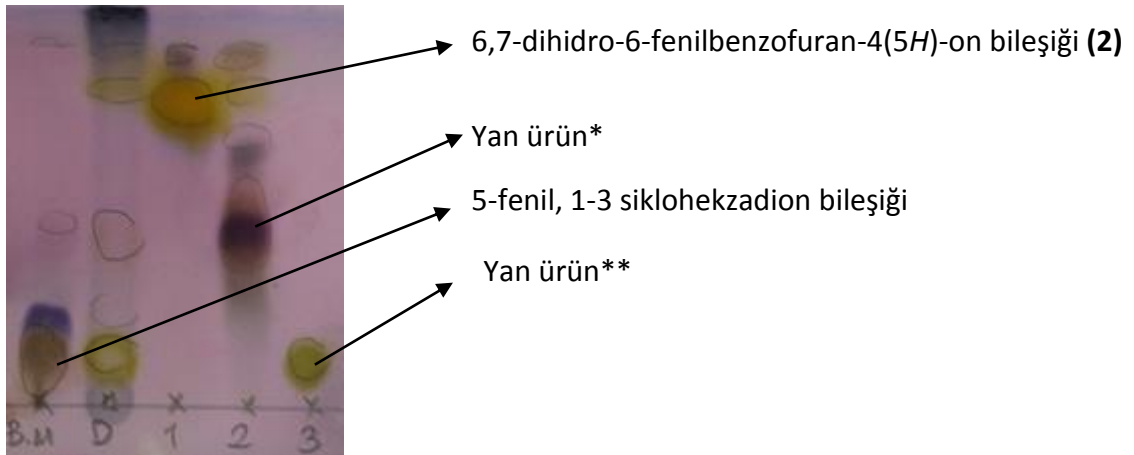
Şekil 7.3 Reaksiyonu sonlandırılması

Ayırma hunisinde reaksiyon ortamından uzaklaştırılan organik faz, magnezyum sülfat (MgSO_4) ile kurutulmuştur. Çözücü ortamdan evaporatör ile uzaklaştırılmıştır ve sentezlenen moleküllerin kolon kromatografisi yöntemi ile 1:1:6 (EtOAc:Hekzan:Kloroform) çözücü sisteminde saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir.



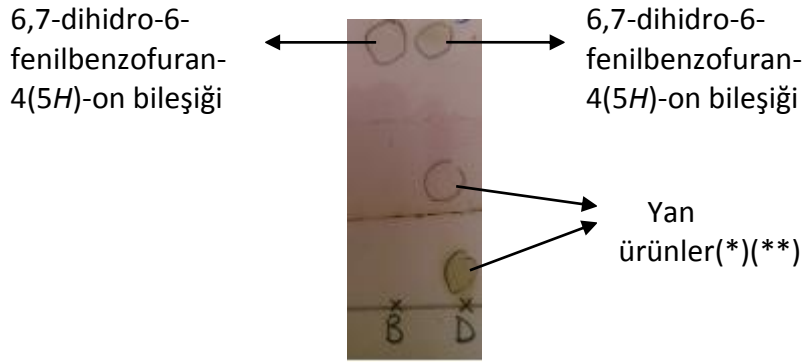
Şekil 7.4 Kolon kromatografisinde saflaştırma işlemi

Saflaştırma işlemi sonucunda 6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on bileşiği **(2)** elde edilmiştir (Şekil 7.4).



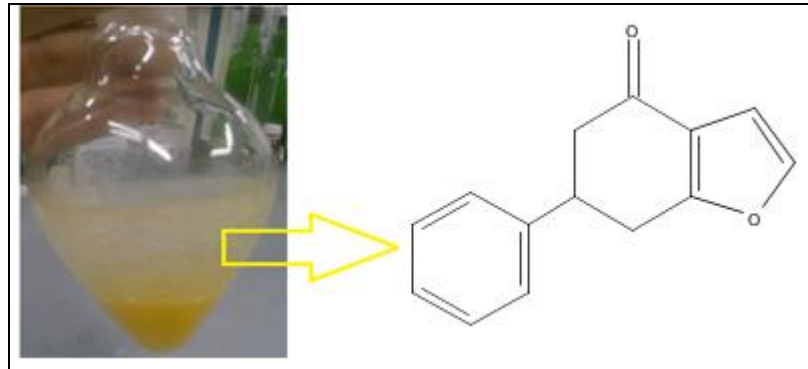
Şekil 7.5 Reaksiyon sonucunun ve kolon kromatografisini TLC sonucu

(D: reaksiyon sonucunda elde edilen bileşikler)



Şekil 7.6 Saf olarak elde edilen benzofuranon molekülünün **(2)** TLC sonucu

(B: Kolon sonrası saf olarak elde edilen benzofuranon bileşigi **(2)**)



Şekil 7.7 6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on **(2)** bileşigi

6,7-Dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on bileşigi (2) için (EK-A);

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

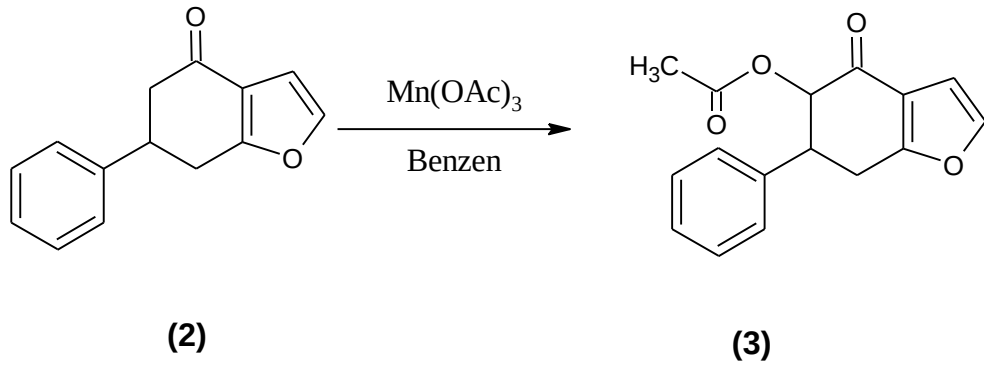
IR (CHCl₃) ν (max): 1673.14 cm⁻¹

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2.79 (m, 2H), 3.14 (m, 2H), 3.57 (m, 1H), 6.74 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.31 (m, 5H)

¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 31.20, 41.37, 45.02, 106.54, 121.04, 126.75, 127.29, 128.92, 142.46, 143.46, 166.34, 193.07

7.1.2 6,7-Dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on (2) Bileşiğine Mangan (III) Asetat Katalizörü ile α -Asetoksi Benzofuranon Sentezi

7,4 mmol $\text{Mn}(\text{OAc})_3$, 55 ml benzen:asetik asit (10:1) karışımı içersinde yan kollu balonda dean-stark-trap düzeneğinde reaksiyon ortamı kahverengi oluncaya kadar reflux edilmiştir. Daha sonra 1,8 mmol 6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on bileşiği (2) yan kollu balona eklenmiş, reaksiyon takibi TLC ile yapılmıştır. Deney 42 saat sonra sonlandırılmıştır (Şekil 7.8).



Şekil 7.8 6,7-Dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on bileşiğinden (2) 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (3)

Eter ile seyreltilen organik fazın ayrımı, doymuş tuz çözeltisi ile ayırma hunisinde gerçekleştirilmiştir. MgSO_4 ile kurutulan organik fazı yoğunlaştırmak amacıyla evaporatör kullanılmıştır.

Saflaştırma işlemi; kolon kromatografisi yapılarak 1,5: 10: 0,5 (EtOAc: Hekzan: CHCl_3) çözücü sisteminde gerçekleştirilmiştir. ~ %60 verimle 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (3) bileşiği sentezlenmiştir.

¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 20.44, 31.40, 46.56, 76.70, 107.01, 120.17, 127.46, 127.74, 128.86, 139.08, 144.01, 164.42, 170.15, 187.32

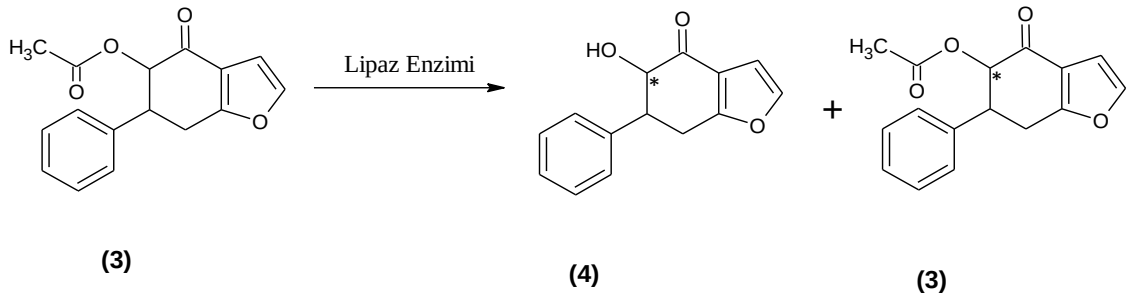
MS Q-TOF analiz verileri :

Çizelge 7.1 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetoksi (**3**) bileşiğinin MS Q-TOF spekturum pik listesi

<i>m/z</i>	<i>Z</i>	Abund	Formula	Ion
271,0946	1	271600,19	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	(M+H) ⁺
272,0981	1	44823,01	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	(M+H) ⁺
273,1005	1	6392,37	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	(M+H) ⁺
274,1019	1	1013,58	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	(M+H) ⁺
309,0501	1	83790,88	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	(M+K) ⁺
310,0534	1	15448,17	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	(M+K) ⁺
311,0512	1	8831,7	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	(M+K) ⁺
312,0539	1	1226,3	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	(M+K) ⁺

7.2 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi (**4**) Bileşiğinin Enzimatik Biyotransformasyon Reaksiyonları ile Sentezi

Saf rasemik 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (**3**) bileşiğine, organik çözücü (1 ml) ve fosfat tamponu (300 µl) eklenerek lipaz enzimi (100 mg) ilave edilmiştir ve 37 °C sıcaklıkta inkübatörde karıştırılmıştır. Katalizör yüzeyi ile substrat difüzyonunun sağlanması amacıyla reaksiyonda çalkalayıcı su banyosu kullanılmıştır. Reaksiyon belirli aralıklarla TLC ile takip edilerek %50 dönüşüme ulaşıldığında sonlandırılmıştır (Şekil 7.11).



Şekil 7.11 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (**3**) bileşiğinin enzimatik biyotransformasyonu ve sentez ürünü 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi bileşiği (**4**)

4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat bileşiğinin biyodönüşümü için, 3 farklı çözücü (DMSO, THF, toluen) ve 12 farklı enzim (WGL (Wheat germ Lipaz), Amano Lipaz PS(*Burkholderia cepacia*'dan elde edilen), CAL (*Candida antarctica* Lipaz), CAL B (*Candida antarctica* Lipaz B), MJL (*Mucor javanicus* Lipaz), HPL (*Hog pankreas* Lipaz), PCL (*Penicillium camemberti* Lipaz), PLL (*Pseudomonas lipoprotein* Lipaz), PRL (*Penicillium roqueforti* Lipaz), RAL (*Rhizopus arrhizus* Lipaz), RNL (*Rhizopus niveus* Lipaz), CRL (*Candida rugosa* Lipaz)) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi (4) (Ek-C);

Erime noktası: 105,5 °C

[α]_D²⁰ = +18.18°

R_f: 0,50 (Silika jel, 1:4 EtOAc:Hekzan)

IR (CHCl₃) ν (max): 3462.36 cm⁻¹ , 2922.17 cm⁻¹

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.15 (m, 2H), 3.35 (m, 1H), 3.73 (s, 1H), 4.51 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H), 6.68 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.3 (m, 5H)

¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 31.44, 49.44, 76.64, 106.80, 118.74, 127.67, 128.96, 140.09, 144.13, 166.34, 193.86

MS Q-TOF analiz verileri :

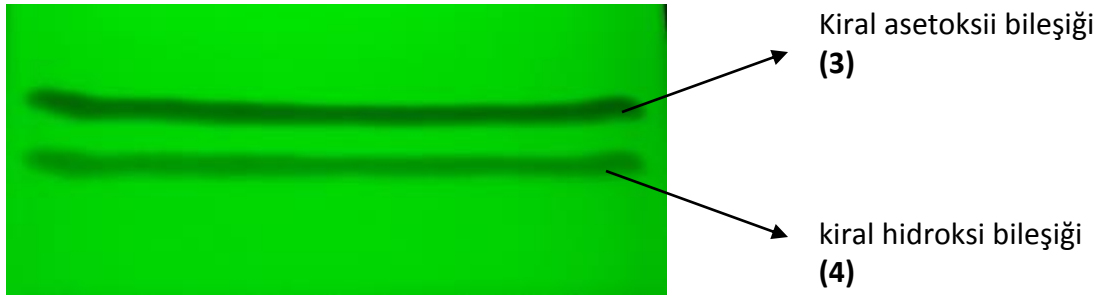
Çizelge 7.2 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi (4) bileşiğinin MS Q-TOF spekturum pik listesi

<i>m/z</i>	<i>z</i>	Abund	Formula	Ion
229,0845	1	743448	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	(M+H) ⁺
230,0883	1	113020,08	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	(M+H) ⁺
231,0907	1	12849,43	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	(M+H) ⁺
251,0664	1	1350712,25	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	(M+Na) ⁺
252,0704	1	196636,98	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	(M+Na) ⁺
253,0728	1	21994,69	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	(M+Na) ⁺

Enzimatik biyotransformasyon reaksiyonları sonucu sentezlenen bileşiğin preparatif TLC metodu ile saflaştırılması :

Çeşitli lipaz enzimleri kullanılarak ve uygun pH aralığındaki enzimatik reaksiyon sonucunda 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi **(4)** bileşiği elde

edilmiştir. Elde edilen bileşik 1:7:1 (EtOAc: Hekzan: CHCl₃) çözücü sisteminde preparatif TLC metoduyla başarı ile saflaştırılmıştır.



Şekil 7.12 UV altında enzimatik reaksiyonların preparatif TLC sonucu

Çözücü ve lipaz enzimlerinin kiral kataliz üzerindeki etkisini incelemek için HPLC kullanılarak, enantiomerik fazlalık (e.e.) değerleri, conversion (%) ve E değerleri saptanmıştır. HPLC analizleri OD-H kiral kolonda, akış hızı 1 ml/dk ve 2-propanol:hekzan (1:9) çözücü sisteminde yapılmıştır. Rasemik α -asetoksi-benzofuranon enantiyomer çiftine ait HPLC piki ~14.5 dk ve ~16. dk'da gözlenmiştir.

4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi **(4)** bileşiğinin enantiyomer çiftine ait HPLC piki ~23.5 dk ve ~24. dk'da gözlenmiştir.

Çizelge 7.3 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat bileşiğinin pH 7’de ve 3 farklı çözücü ortamında farklı lipaz enzimleri ile yapılan enzimatik biyotransformasyon çalışmalarının HPLC analiz bulguları

ENZİM	ÇÖZÜCÜ	ZAMAN (GÜN)	OH e.e.	α.Asetoksi e.e.	C(%)	E
WGL	DMSO	7 gün	% 23	% 6	21	2
	TOLUEN	4 gün	% 45	% 9	19	2
	THF	>26 gün	-	% 1	-	-
AMANO LİPAZ	DMSO	>26 gün	-	% 16	-	-
	TOLUEN	8 gün	-	% 32*	-	-
	THF	>26 gün	-	% 3	-	-
CAL B	DMSO	>26 gün	-	% 16	-	-
	TOLUEN	>26 gün	-	% 2	-	-
	THF	>26 gün	-	% 0,3	-	-
CCL	DMSO	>26 gün	% 8	% 0,1	1	1
	TOLUEN	>26 gün	% 9	% 2	20	1
	THF	>26 gün	% 13	% 0,3	2	1
HPL	DMSO	>26 gün	% 9	% 1	10	1
	TOLUEN	>26 gün	% 81	% 5	6	9
	THF	>26 gün	-	% 0,07	-	-
MJL	DMSO	>26 gün	-	% 7	-	-
	TOLUEN	>26 gün	-	%2	-	-
	THF	>26 gün	%50	%4	7	3
MJL	DMSO	>26 gün	-	% 7	-	-
	TOLUEN	>26 gün	-	%2	-	-
	THF	>26 gün	%50	%4	7	3
PLL	DMSO	>36 gün	% 81	% 25*	24	11
	TOLUEN	>36 gün	% 81	% 21*	21	10
	THF	>36 gün	% 66	% 1	2	3
PCL	DMSO	>36 gün	% 79	% 9	10	10
	TOLUEN	>36 gün	% 47	% 4	8	3
	THF	>36 gün	-	% 1	-	-

Çizelge 7.4 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat bileşiğinin pH 7’de ve 3 farklı çözücü ortamında farklı lipaz enzimleri ile yapılan enzimatik biyotransformasyon çalışmalarının HPLC analiz bulguları(devamı)

ENZİM	PH	ZAMAN	OH e.e.	α .ASETOKSİ e.e.	KONVERSION C (%)	E
PRL	DMSO	>36 gün	% 38	% 7	16	2
	TOLUEN	>36 gün	% 77	% 4	5	8
	THF	>36 gün	-	% 0,5	-	-
RAL	DMSO	>36 gün	% 15	% 23*	61	2
	TOLUEN	>36 gün	-	% 7	-	-
	THF	>36 gün	-	% 0,5	-	-
RNL	DMSO	>36 gün	% 80	%5	6	1
	TOLUEN	>36 gün	% 1	% 10	91	1
	THF	>36 gün	% 38	% 4	10	2
CRL	DMSO	>36 gün	% 2	% 3	60	1
	TOLUEN	>36 gün	% 8	% 0,2	2	1
	THF	>36 gün	-	% 0,5	-	-

Çizelge 7.5 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat bileşiğinin pH 6, pH 7, pH 8 ’de ve DMSO ortamında farklı lipaz enzimleri ile yapılan enzimatik biyotransformasyon çalışmalarının HPLC analiz bulguları

ENZİM	Ph	ZAMAN (GÜN)	OH e.e.	α .ASETOKSİ e.e.	KONVERSION C (%)	E
WG	pH 6	7 gün	% 22	% 8	27	2
	pH 7	7 gün	% 23	% 6	21	2
	pH 8	7 gün	% 10	% 7	41	1
AMANO LİPAZ	pH 6	>26 gün	% 13	% 3	19	1
	pH 7	>26 gün	-	% 16	-	-
	pH 8	>26 gün	-	% 20*	-	-
CAL B	pH 6	>26 gün	% 5	% 3	38	1
	pH 7	>26 gün	-	% 16	-	-
	pH 8	>26 gün	% 7	% 3	30	1

Çizelge 7.4 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat bileşiğinin pH 6, pH 7, pH 8 'de ve DMSO ortamında farklı lipaz enzimleri ile yapılan enzimatik biyotransformasyon çalışmalarının HPLC analiz bulguları (devamı)

ENZİM	PH	ZAMAN	OH e.e.	α .ASETOKSİ e.e.	KONVERSION C (%)	E
CCL	pH 6	>26 gün	% 6	% 1	14	1
	pH 7	>26 gün	% 8	% 0,1	1	1
	pH 8	>26 gün	% 7	% 0,3	4	1
HPL	pH 6	>26 gün	-	% 0,6	-	-
	pH 7	>26 gün	% 9	% 1	10	1
	pH 8	>26 gün	% 2	% 0,3	13	1
MJL	pH 6	>26 gün	% 83	% 5	6	1
	pH 7	>26 gün	-	% 7	-	5
	pH 8	>26 gün	% 59	% 5	8	4
PLL	pH 6	>36 gün	% 59	% 14*	19	5
	pH 7	>36 gün	% 81	% 25*	24	11
	pH 8	>36 gün	% 24	% 5	17	2

7.3 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat ve 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi Bileşiklerinin Biyoaktivite Çalışmaları ve MTT Deneyi

96 kuyucuklu plakta farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (**3**) ve 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi (**4**) bileşiğinden 10'ar µl eklendi. Hücreler 3'er kez tripan blue ile boyama yöntemiyle sayılıp ortalaması alındı. Ml'de 100.000 hücre olacak şekilde %10 FBS (Fetal Bovin Serum) içeren medyumda (IMDM veya DMEM) süspansiyon edildi. 96 kuyucuklu plakta her kuyucuğa 90 µl hücre süspansiyonu eklendi. Total deney hacmi 100 µl oldu. Eklenen 10 µl madde 10 kez seyreltildi. Plate 72 saat 37 °C CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı. Karanlık ya da loş ortamda her kuyucuğa 10 µl MTT eklendikten sonra plate 3 saat 37 °C CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı. 100 µl izopropanil alkol SDS çözeltisi (veya dimetil sülfoksit) eklendi. Temiz bir toplu iğne ile her kuyucuk iyice karıştırılıp homojenize edildi.

Plate'deki hücrelerin optik densiteleri ELİSA cihazında 540 nm'de okutuldu. Örnekler her madde konsantrasyonunda 4 kuyucuk çalışıldı.

Aşağıdaki formüllere göre canlı hücre sayısı (VI) veya sitotoksik indeks (SI) hesaplanır:

$$VI \text{ (Canlı hücre sayısı)} = (\text{Deney Absorbans} \div \text{Kontrol absorbans}) \times 100$$

$$SI \text{ (Sitotoksik indeks)} = 1 - [(\text{Deney Absorbans} \div \text{Kontrol absorbans}) \times 100]$$

Bu çalışmada, 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (**3**) ve 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi (**4**) bileşiklerinin karaciger kanser hücrelerine ait olan HepG2 hücre hattında ve lenfoma hücrelerine ait olan P3HR1 hücre hattında 10 µl, 5 µl, 0,5 µl ve 0,05 µl dozlarında biyoaktivite belirleme çalışması yapılmıştır.

I.Madde : 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (**3**)

II.Madde : 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi (**4**)

Çizelge 7.6 **I. Madde:** 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat, **II. Madde:** 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi bileşiğinin HepG2 hücre hattındaki biyoaktivite değerlerinin ELİSA bulguları

%CANLILIK	10	5	0,5	0,05
I.Madde	95,046	61,97172	63,40455	66,39129
II.Madde	57,50364	54,37105	63,67162	60,46619
KONRTOL	100	100	100	100
%1 DMSO	61,36473			
%2 DMSO	40,60224			

Çizelge 7.7 **I. Madde:** 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat, **II. Madde:** 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi bileşiğinin P3HR1 hücre hattındaki biyoaktivite değerlerinin ELİSA bulguları

%CANLILIK	10	5	0,5	0,05
I.Madde	95,046	61,97172	63,40455	66,39129
II.Madde	57,50364	54,37105	63,67162	60,46619
KONRTOL	100	100	100	100
%1 DMSO	61,36473			
%2 DMSO	40,60224			

BÖLÜM 8

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Biyoteknolojik yöntemlerle üretilmesi hedeflenen ilaç hammaddeleri, dünya piyasasında gittikçe ivme kazanmaktadır. Farmakolojik olarak önemli benzofuranon türevi bileşiklerinin sahip olduğu birçok biyolojik aktivite sebebiyle ilaç sanayinde önemli ilaç etken maddeleri olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, yüksek biyolojik aktivite potansiyeli olan kiral hidroksi benzofuranon türevi bileşikler sentezlenmiştir. Sentezlenen kiral hidroksi benzofuranon bileşiklerinin enzimatik biyotransformasyonu gerçekleştirilerek enantiyomerik fazlalık (e.e.) değerleri belirlenmiştir.

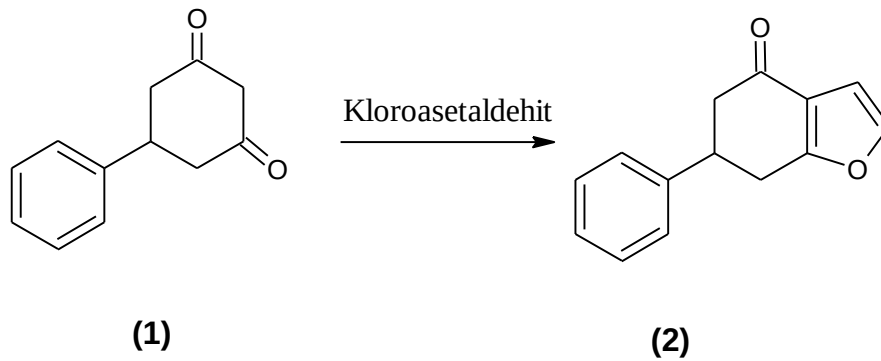
Bu çalışma iki aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada kimyasal sentez reaksiyonları gerçekleştirilerek 6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5*H*)-on bileşiği **(2)** ve 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat bileşiği **(3)** elde edilmiştir. İkinci aşamada ise, enzimlerin katalizörlüğünde biyotransformasyon reaksiyonları gerçekleştirilerek enantiyosaf 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat bileşiği **(3)** ve 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi **(4)** bileşiği elde edilmiştir.

8.1 Benzofuranon Türevi Bileşiklerin Kimyasal Yöntemlerle Sentezi

Kimyasal reaksiyonların birinci basamağında 6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5*H*)-on bileşiği **(2)** sentezlenmiştir. Daha sonra ise, 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat bileşiği **(3)** sentezlenmiştir.

8.1.1 6,7-Dihidro-6-Fenilbenzofuran-4(5H)-On Bileşiğinin Kimyasal Yöntemler İle Eldesi

Ticari olarak alınan 5-fenil-1,3-sikloheksandion bileşiğinden başlanarak kimyasal yöntem ile elde edilen 6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on (**2**) bileşiğine, reaksiyon sonucunda oluşan yan ürünlerden ayırmak için saflaştırma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon şeması şekil 8.1’de gösterilmiştir.



Şekil 8.1 5-fenil-1,3-sikloheksandion bileşiğinden (**1**) 6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on (**2**) sentezi

Sentezlenen bileşiğin yapı tayini için $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ ve IR teknikleri uygulanmıştır.

6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on (**2**) bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda (Şekil A.1);

7.31 ppm aralığında mono substitue fenil halkasına ait 5 adet hidrojen atomu multiplet şeklinde rezonans olmuştur. Ayrıca, burada furan halkasının 2 pozisyonundaki hidrojen atomu da bulunmaktadır ve diğer sinyaller ile iç içe geçmiş şekildedir. Furan halkasının 2. pozisyonundaki H atomunun bu kadar aşağı alanda rezonans olmasının nedeni bu hidrojen atomunun taşıdığı karbon atomunun doğrudan oksijene bağlı olmasıdır. 6.74 ppm’de tam yarılamamış dublet şeklinde rezonans olan sinyal furan halkasının 3 pozisyonundaki hidrojen atomudur. Düzlemdeki hidrojenler birbirlerini tam etkileyemediğinden dolayı sinyal tam olarak dublete bölünmemiştir. 3.57 ppm’de multiplet şeklinde rezonans olmuş sinyal fenil halkasının bağlı olduğu asimetrik merkezdeki metin protonuna ait sinyaldir.

Multiplet olarak rezonans olmasının sebebi ise her iki komşusundaki diastereotopik hidrojen atomlarından kaynaklanmaktadır. Normalde dubletin dubletinin dubletinin dubleti (dddd) şeklinde rezonans olması gerekirdi ancak bu kadar yarılmış sinyal üst üste çakıştığı için multipler şeklinde görünmektedir. 3.14 ppm’de dubletin dubleti olarak rezonans olmuş sinyaller alilik protonlara ait sinyallerdir. Bu protonlar asimetric merkeze komşu oldukları için diastereotopik özellikte ve birbirlerinden farklıdır. Bu protonlardaki büyük etkileşim sabitleri 17 Hz’dir. 2.79 ppm’deki sinyaller karbonil grubuna komşu alfa protonlarıdır. Bunlar da komşu protondan etkilenip dublete yarılmışlardır. Bu protonlarında alilik protonlar gibi dubletin dubleti vermesi gerekirdi ancak tam bir etkileşim olmadığı için sadece dublet sinyallerinin uçlarında bir yarıma görülmektedir.

6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on (2) bileşiğinin ¹³C-NMR spektrumu (Şekil A.2);

¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) :

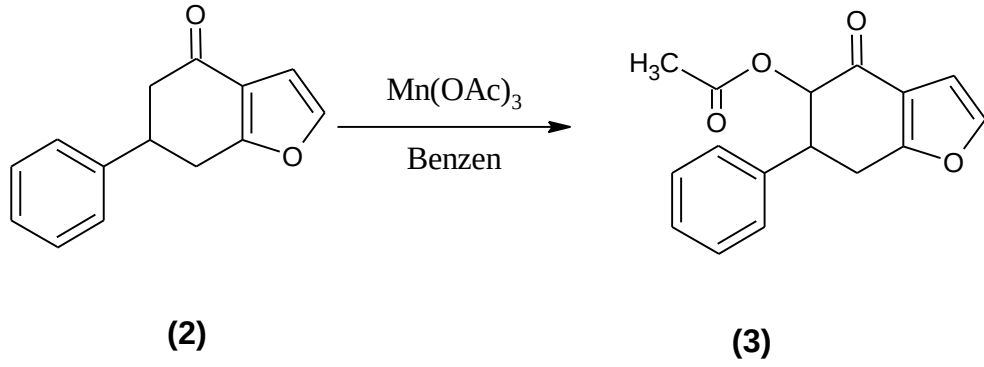
31.52, 41.50 ve 45.34 ppm’deki alifatik bölgede çıkan sinyaller -CH₂ gruplarına ait C atomundan kaynaklanmaktadır. 106.85, 127.46, 128.70, 129.23, 142.46, 143.46 ve 166.34 ppm’deki aromatik bölgede çıkan sinyaller fenil grubunda ve furan halkasında rezonans olan -CH atomlarının sinyalleridir. 193.07 ppm’deki çıkan sinyal ise karbonil grubuna ait C atomunun sinyalidir.

6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on (2) bileşiğinin IR spektrumu (Şekil A.3);

IR (CHCl₃) ν (max): 1673.14 cm⁻¹

8.2 4,5,6,7-Tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (3) Bileşiğinin Kimyasal Yöntemler ile Eldesi

Kimyasal yöntem ile elde edilen 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (3) bileşiğini, reaksiyon sonucunda oluşan yan ürünlerden ayırmak için saflaştırma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon şeması şekil 8.2’de gösterilmiştir.



Şekil 8.2 6,7-Dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5*H*)-on bileşiğinden **(2)** 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat **(3)**

Sentezlenen bileşiğin yapı tayini için $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, IR ve MS Q-TOF teknikleri uygulanmıştır.

4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (3) bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda (Şekil B.1);

7.35 ppm aralığında mono substitue fenil halkasına ait 5 adet hidrojen atomu multiplet şeklinde rezonans olmuştur. Ayrıca, burada furan halkasının 2. pozisyonundaki hidrojen atomu da bulunmaktadır ve diğer sinyaller ile iç içe geçmiş şekildedir. Furan halkasının 2. pozisyonundaki H atomunun bu kadar aşağı alanda rezonans olmasının nedeni bu hidrojen atomunun taşındığı karbon atomunun doğrudan oksijene bağlı olmasıdır. 6.74 ppm'deki tam yarılamamış dublet şeklinde rezonans olan sinyal furan halkasının 3 pozisyonundaki hidrojen atomudur. 5.84 ppm'deki sinyal 5 numaralı C atomuna ait olan hidrojen karbonile komşu ve asetat grubuna komşu olan hidrojen atomudur. 3.73 ppm'de multiplet şeklinde rezonans olmuş sinyal fenil halkasının bağlı olduğu asimetrik merkezdeki metin protonuna ait sinyaldir. 3.28 ppm'de dubletin dubleti olarak rezonans olmuş sinyaller alilik protonlara ait sinyallerdir. 1.97 ppm'deki singlet olan pik asetoksi grubundaki CH_3 protonlarına ait sinyallerdir.

4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (3) bileşiğinin ¹³C-NMR spektrumu (Şekil B.2);

¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) :

20.44 ppm'deki alifatik bölgede yer alan sinyal asetoksi grubundaki -CH₃ molekülüne ait C atomunun sinylidir. 31.40 ppm'deki alifatik bölgede yer alan sinyal -CH₂ grubuna ait C atomunun sinylidir. 46.56 ppm'deki alifatik bölgede yer alan sinyal -CH grubuna ait C atomunun sinylidir. 76.70 ppm'de yer alan sinyal asetoksi grubunda yer alan oksijenin bağlı C atomunun sinylidir. 107.01, 120.17, 127.46, 127.74, 128.86, 139.08, 144.01, 164.42 ve 170.14 ppm'deki aromatik bölgede yer alan sinyaller fenil halkasına ve furan halkasına ait -CH molekülünün C atomu sinyalleridir. 187.32 ppm'deki rezonans olan sinyal ise karbonil grubunda bulunan -C atomuna ait sinylidir.

4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (3) bileşiğinin IR spektrumu (Şekil B.4);

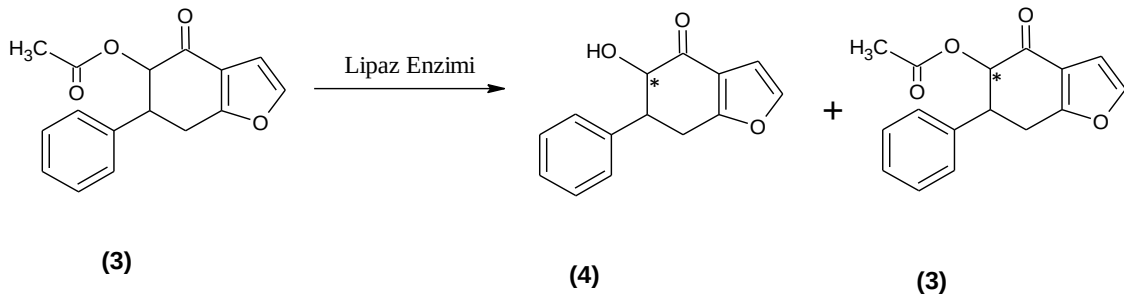
IR (CHCl₃) ν (max): 1679.25, 1219.38 cm⁻¹

4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetoksi (3) bileşiğinin MS Q-TOF spektrumunda (Şekil B.5);

4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetoksi (3) bileşiği 270,0892 (m/z) moleküler ağırlığına sahiptir. Moleküle 1 H katıldıktan sonraki elde edilen veri, (M+H)⁺ ise 271,0946 m/z'dir. Moleküle 2 H katıldıktan sonraki elde edilen veri, (M+H)⁺⁺ ise 272,0981 m/z'dir. Moleküle 1 K katıldıktan sonraki elde edilen veri, (M+K)⁺ ise 309,0501 m/z'dir. 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetoksi (3) bileşiği için elde edilen MS Q-TOF analiz sonuçları, bileşiğin NMR spekturumunu desteklemiştir.

8.3 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi Bileşiğinin Enzimatik Biyotransformasyon Reaksiyonları ile Elde Edilmesi

4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat bileşiği üzerinde enzimatik biyotransformasyon reaksiyonları başarı ile gerçekleştirilmiş ve enantiyosaf 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat bileşiği ve 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi bileşiği sentezlenmiştir. Reaksiyon şeması şekil 8.3’de gösterilmiştir.



Şekil 8.3 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (3) bileşiğinin enzimatik biyotransformasyonu ve sentez ürünü 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi bileşiği (4)

Biyotransformasyon ürünü bileşiğin yapı tayini için $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, IR ve MS Q-TOF teknikleri uygulanmıştır.

4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi(4) bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda (Şekil C.1);

7.3 ppm’de mono substitue fenil halkasına ait 5 adet hidrojen atomu multiplet şeklinde aromatik bölgede rezonans olmuştur. 6.68 ppm’deki sinyal furan halkasının 3 pozisyonundaki hidrojen atomudur. 4.51 ppm aralığında H-C-OH grubunda yer alan H atomuna ait sinyaller dublet şeklinde rezonans olmuştur. 3.73 ppm’deki singlet olan pik –OH molekülünün hidrojen atomudur. 3.35 ppm’de multiplet şeklinde yer alan sinyal fenil halkasının bağlı olduğu asimetrik merkezdeki metin protonuna ait sinyaldir. 3.15 ppm’de multiplet olarak rezonans olmuş sinyaller alilik protonlara ait sinyallerdir.

4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi(4) bileşiğinin ¹³C-NMR spektrumunda (Şekil C.2);

¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) :

31.44 ppm'de alifatik bölgede çıkan sinyal –CH₂ grubuna ait C atomunun sinyalidir. 49.44 ppm'de alifatik bölgede çıkan sinyal –CH grubuna ait C atomunun sinyalidir. 76.64 ppm'de yer alan sinyal hidroksi grubunun bağlı olduğu C atomunun sinyalidir. 106.80, 118.74, 127.57, 128.96, 139.98, 144.13 ve 165.79 ppm'de aromatik bölgede yer alan sinyaller fenil halkasına ve furan halkasına ait –CH molekülünün C atomu sinyalleridir. 193.53 ppm'de yer alan sinyal ise karbonil grubunda bulunan –C atomuna ait sinyaldir.

4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi(4) bileşiğinin IR spektrumunda (Şekil C.3);

IR (CHCl₃) ν (max): 3462.36 cm⁻¹, 2922.17 cm⁻¹

4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi (4) bileşiğinin MS Q-TOF spektrumunda (Şekil C.4);

4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi (4) bileşiği 228,0786 (m/z) moleküler ağırlığına sahiptir. Moleküle 1 H katıldıktan sonraki elde edilen veri, (M+H)+ ise 229,0845 m/z'dir. Moleküle 2 H katıldıktan sonraki elde edilen veri, (M+H)++ ise 230,0883 m/z'dir. Moleküle 1 Na katıldıktan sonraki elde edilen veri, (M+Na)+ ise 251,0664 m/z'dir. 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi (4) bileşiği için elde edilen MS Q-TOF analiz sonuçları, bileşiğin NMR spekturumunu desteklemiştir.

8.3.1 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi (4) Bileşiğinin Enzimatik Biyotransformasyon Reaksiyonları ile Sentezinin HPLC Sonuçlarının değerlendirilmesi

4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat bileşiği üzerinde enzimatik biyotransformasyon reaksiyonları, 3 farklı çözücü (DMSO, Toluen, THF) ve 12 farklı lipaz

enzimi (WGL (Wheat germ Lipaz), Amano Lipase, CAL B (*Candida antarctica* Lipaz B), CCL (*Candida cyclindracea* Lipaz), MJL (*Mucor javanicus* Lipaz), HPL (*Hog pankreas* Lipaz), PCL (*Penicillium camemberti* Lipaz), PLL (*Pseudomonas lipoprotein* Lipaz), PRL (*Penicillium roqueforti* Lipaz), RAL (*Rhizopus arrhizus* Lipaz), RNL (*Rhizopus niveus* Lipaz), CRL (*Candida rugosa* Lipaz)) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Farklı çözücü (DMSO, Toluene, THF) ortamlarında pH 7’de gerçekleştirilen enzimatik biyotransformasyon reaksiyonlarının değerlendirilmesi :

DMSO ortamında pH 7’de, 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (**3**) bileşiği üzerinde gerçekleştirilen enzimatik biyotransformasyonunda, gözlenen en düşük e.e. değeri, *Candida cyclindracea* Lipaz (CCL) enziminde; 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi (**4**) bileşiğinde ise Amano Lipase, *Candida antarctica* Lipaz B ve *Mucor javanicus* Lipaz enzimlerinde en düşük e.e. değerleri saptanmıştır. DMSO ortamındaki çeşitli enzimlerde, 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (**3**) bileşiğinde istenilen düzeyde enzimatik biyotransformasyon gerçekleşmemesi nedeniyle 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi (**4**) bileşiğinde gözlenebilir bir biyotransformasyon meydana gelmemiştir. Bu nedenle, çeşitli enzimlerin kullanıldığı 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (**3**) bileşiğinin biyodönüşüm reaksiyonlarının enantiyomerik değerleri hesaplanamamıştır. Enantiyomerik fazlalık değerleri hesaplanamayan reaksiyonların konversion değerleri ve E değerleri belirlenememiştir (Çizelge 7.3). DMSO ortamında, en yüksek enantiyomerik fazlalık (e.e.) değerinin ise, *Pseudomonas lipoprotein* Lipaz (PLL) enziminde (% 25 e.e. (**3**); %81 e.e. (**4**)) olduğu belirlenmiştir. DMSO ortamında, en yüksek enantiyomerik fazlalık (e.e.) değerine sahip olan PLL enziminin reaksiyon verimi % 20 olarak hesaplanmıştır. (**3**) ve (**4**) bileşiklerinin DMSO ortamındaki en yüksek konversion değeri RAL enziminde %61 iken, en yüksek E değeri PLL enziminde 11’dir (Çizelge 7.3).

Toluene ortamında pH 7’de, 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat bileşiği (**3**) üzerinde gerçekleştirilen enzimatik biyotransformasyonunda, gözlenen en düşük e.e. değeri, *Candida rugosa* Lipaz (CRL) enziminde; Toluene ortamında çeşitli

enzimlerde **(3)** no'lu bileşikten **(4)** no'lu bileşiğin biyosentezi istenen düzeyde oluşmadığı için **(4)** no'lu bileşiğin e.e. değerleri hesaplanamamıştır. **(4)** no'lu bileşiğin hesaplanabilen en düşük e.e. değeri ise, *Rhizopus niveus* Lipaz enziminde olarak saptanmıştır. En yüksek enantiyomerik fazlalık (e.e.) değeri ise, *Pseudomonas lipoprotein Lipaz* (PLL) enziminde (% 21 e.e. **(3)**; %81 e.e. **(4)**) olduğu belirlenmiştir. **(3)** no'lu ve **(4)** no'lu bileşiklerinin toluen ortamındaki en yüksek konversion değeri *Rhizopus niveus* Lipaz enziminde %91 iken, en yüksek E değeri *Pseudomonas lipoprotein Lipaz* enziminde 10'dir (Çizelge 7.3).

THF ortamında pH 7'de, 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat bileşiği **(3)** üzerinde gerçekleştirilen enzimatik biyotransformasyonunda, tespit edilen en düşük e.e. değeri HPL enziminde; 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat **(4)** bileşiğinde gözlenen en düşük e.e. değeri için, THF ortamında çeşitli enzimlerde **(3)** no'lu bileşikten **(4)** no'lu bileşiğin biyosentezi istenen düzeyde oluşmamıştır ve **(4)** no'lu bileşiğin e.e. değerleri hesaplanamamıştır. **(4)** no'lu bileşiğin hesaplanabilen en düşük e.e. değeri ise, *Candida cyclindracea* Lipaz enziminde (%13 e.e.) olarak belirlenmiştir. En yüksek enantiyomerik fazlalık (e.e.) değerinin ise, *Pseudomonas lipoprotein Lipaz* (PLL) enziminde (% 1 e.e. **(3)**; %66 e.e. **(4)**) olduğu saptanmıştır. **(3)** no'lu ve **(4)** no'lu bileşiklerin THF ortamındaki en yüksek konversion değeri *Rhizopus niveus* Lipaz enziminde %10 iken, en yüksek E değeri *Pseudomonas lipoprotein Lipaz* ve *Mucor javanicus* Lipaz enziminde 3'dür (Çizelge 7.3).

Bu veriler ışığında, organik çözücü olarak kullanılan THF çözücüsü, kullanılan lipaz enzimlerinin 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat **(3)** bileşiği ile substrat oluşturduğu kompleks üzerine inhibitör etki gösterdiği belirlenmiştir.

DMSO çözücü ortamında farklı pH'larda (pH 6, pH 7, pH 8) gerçekleştirilen enzimatik biyotransformasyon reaksiyonlarının değerlendirilmesi

Bu çalışmadaki enzimatik reaksiyonlar üzerinde pH'ın etkisini incelemek amacıyla çeşitli lipaz enzimleri 3 farklı pH (pH 6, pH 7, pH 8) değerinde incelenmiştir. Çalışmanın önceki aşamasındaki, pH 7'de gerçekleştirilen reaksiyonun verilerine göre pH 6'daki ve pH 8'deki ortaya çıkan veriler karşılaştırılmıştır.

PH 7'de gerçekleştirilen reaksiyonlara göre, pH 6'da ve pH 8'de gerçekleştirilen reaksiyonların biyodönüşüm zamanlarında farklılık gözlenmemiştir. **WGL enzimi** ile gerçekleştirilen enzimatik biyotransformasyon çalışmasındaki PH 7'deki reaksiyona göre, pH 6'daki ve pH 8'deki enzimatik reaksiyonda α -asetoksi benzofuranon (**3**) bileşiğinin enantiyomerik fazlalık değerleri azalmışken, α -hidroksi benzofuranon (**4**) enantiyomerik fazlalık değerleri artmıştır. PH 7'de gerçekleştirilen reaksiyona göre, konversion değerleri artarken, pH 8'deki reaksiyonun E değeri azalmış ve pH 6'daki reaksiyonun E değeri artmıştır (Çizelge 7.4). **Amano enzimi** ile gerçekleştirilen enzimatik biyotransformasyon çalışmasındaki PH 7'deki reaksiyona göre, α -asetoksi benzofuranon (**3**) bileşiğinin enantiyomerik fazlalık değerleri artmıştır ve (**3**) bileşiğinin enantiyomerlerine karşı negatif seçicilik (reverse selectivity) gösterdiği saptanmıştır. PH 6'da gerçekleştirilen reaksiyonda ise, α -asetoksi benzofuranon (**3**) bileşiğinin ise enantiyomerik fazlalık değeri azalmıştır (Çizelge 7.4). **CCL enzimi** ile pH 6'da ve pH 8'de gerçekleştirilen enzimatik biyotransformasyon reaksiyonunda α -hidroksi benzofuranon (**4**) bileşiğinin enantiyomerik fazlalık değerleri azalırken, α -asetoksi benzofuranon (**3**) bileşiğinin enantiyomerik fazlalık değerleri artmıştır. PH 7'de gerçekleştirilen reaksiyona göre, konversion değerleri artarken, reaksiyonun E değerleri değişmemiştir (Çizelge 7.4). **HPL enzimi** ile pH 6'da ve pH 8'de gerçekleştirilen enzimatik biyotransformasyon reaksiyonunda α -hidroksi benzofuranon (**4**) ve α -asetoksi benzofuranon (**3**) bileşiğinin enantiyomerik fazlalık değerleri azalmıştır. HPL enzimi için PH 7'de gerçekleştirilen reaksiyona göre, pH 8'de gerçekleştirilen enzimatik reaksiyonun konversion değerleri artarken, reaksiyonun E değerleri değişmemiştir (Çizelge 7.4). **MJL enzimi** ile pH 6'da ve pH 8'de gerçekleştirilen enzimatik biyotransformasyon reaksiyonunda α -asetoksi benzofuranon (**3**) bileşiğinin enantiyomerik fazlalık değerleri azalmışken, α -hidroksi benzofuranon (**4**) bileşiğinin enantiyomerik fazlalık değerleri arttığı saptanmıştır (Çizelge 7.4). **CAL B enzimi** ile pH 6'da ve pH 8'de gerçekleştirilen enzimatik biyotransformasyon reaksiyonunda α -asetoksi benzofuranon (**3**) bileşiğinin enantiyomerik fazlalık değerleri azalmışken, α -hidroksi benzofuranon (**4**) bileşiğinin enantiyomerik fazlalık değerleri arttığı belirlenmiştir (Çizelge 7.4).

PLL enzimi ile pH 6'da ve pH 8'de gerçekleştirilen enzimatik biyotransformasyon reaksiyonunda α -hidroksi benzofuranon **(4)** bileşiğinin ve α -asetoksi benzofuranon **(3)** bileşiğinin enantiyomerik fazlalık değerleri azalmıştır. PH 7'de gerçekleştirilen reaksiyona göre, reaksiyonun konversion değerleri ve E değerleri azalmıştır (Çizelge 7.4).

Elde edilen verilere göre, farklı çözücü ortamlarında ve farklı pH'larda aynı enzimlerle reaksiyona tabii tutulan α -asetoksi benzofuranon bileşiğinin, farklı ters seçicilik özellikleri ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, α -asetoksi benzofuranon bileşiğinin ters seçicilik özelliği kullanılan organik çözücüler ve pH ile değiştirilebilir ve geliştirilebilir olduğu tespit edilmiştir.

En kısa süreli biyodönüşümün toluen çözücüsündeki Wheat germ Lipaz (WGL) enzimiyle 4 günde (%45 e.e. **(3)**; %9 e.e. **(4)**); en uzun süreli biyodönüşümlerin ise Amano lipaz enzimiyle toluen çözücü ortamında 8 günde (%32 e.e. **(3)**; - e.e. **(4)**) olduğu hesaplanmıştır. 36 ve 26 gün süre ile devam ettirilen DMSO ortamında *Candida antarctica* Lipaz B enzimi; toluen ortamında *Candida antarctica* Lipaz B, *Hog pankreas Lipaz*, *Mucor javanicus* Lipaz enzimi; THF ortamında *Candida antarctica* Lipaz B, *Hog pankreas Lipaz*, *Mucor javanicus* Lipaz, Wheat germ Lipaz, *Penicillium roqueforti* Lipaz, *Rhizopus arrhizus* Lipaz, *Candida rugosa* Lipaz, *Penicillium camemberti* Lipaz enzimlerinde hiçbir biyodönüşümün meydana gelmemesinde organik çözücülerin enzim-substrat kompleksi üzerinde inhibitör etki gösterdiği düşünülmektedir.

Farklı çözücü ortamlarındaki aynı enzimlerin, farklı biyodönüşüm reaksiyonları vermelerinin nedeni enzim çeşidine kıyasla organik çözücülerin daha etken rol oynadığını göstermiştir. Bu veriler dikkate alındığında, organik çözücülerin, enzim-substrat kompleksine etki ederek enzimlerin çalışmasında farklılık meydana getirdiğini ve rezolüsyonun reaksiyon süreleri üzerinde de etkili olduğu belirlenmiştir.

Farklı çözücü ortamlarındaki çeşitli enzimlerin katalizörlüğünde gerçekleştirilen α -hidroksi benzofuranon **(4)** bileşiğinin enantiyomerik fazlalık değerleri hesaplanamayacak seviyede düşük çıkmıştır (Çizelge 7.3 ve Çizelge 7.4).

α -hidroksi benzofuranon **(4)** bileşiğinin enantiyomerik fazlalık (e.e.) değerlerinin gözlenemeyecek seviyede düşük çıkmasının nedeni ise bu bileşiklerin sentezlenmesinde öncü bileşik olan α -asetoksi benzofuranon **(3)** bileşiğinin biyotransformasyonunun bu koşullarda istenen düzeyde gerçekleşmemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Kullanılan enzimlerin α -asetoksi benzofuranon **(3)** ve α -hidroksi benzofuranon **(4)** bileşiklerindeki enantiyomerik fazlalığın (e.e.) kullanılan organik çözücü ile değiştirilebilir ve geliştirilebilir olduğu saptanmıştır.

Enzimatik rezolüsyon sonucu elde edilen 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat **(3)** bileşiğinde gözlenen en düşük enantiyomerik fazlalık (e.e.) değeri, THF'deki *Hog pankreas Lipaz* enziminde belirlenmiştir. 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi **(4)** bileşiğinde hesaplanan en düşük enantiyomerik fazlalık (e.e.) değeri toluen ortamında *Rhizopus niveus* Lipaz enziminde bulunmuştur (Çizelge 7.3). Enzimatik rezolüsyon sonucu elde edilen bileşiklerin (α -asetoksi benzofuranon ve α -hidroksi benzofuranon) en yüksek enantiyomerik fazlalık (e.e.) değerlerinin, **DMSO ortamındaki *Pseudomonas lipoprotein Lipaz (PLL)* enziminde** (% 21 e.e. **(3)**; %81 e.e. **(4)**) olduğu saptanmıştır.

Çizelge 7.3 ve 7.4 incelendiğinde, Amano Lipase, *Pseudomonas lipoprotein Lipaz (PLL)*, *Rhizopus arrhizus* Lipazın (RAL) 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat bileşiğinin enantiyomerlerine karşı ters seçicilik (reverse selectivity) gösterdiği saptanmıştır.

8.4 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetoksi ve 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi bileşiğinin biyoaktivite çalışmaları

Bu çalışmada, HepG2 (karaciğer karsinoma) ve P3HR1 (Burkit lenfoma) hücre hatlarında ilk kez sentezlenen 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetoksi ve 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi bileşiklerinin sitotoksik etkileri araştırıldı.

MTT ile yaptığımız sitotoksosite çalışmasında 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat bileşiğinin 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi bileşiğine göre viabilitesinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Bileşiklerin sitotoksisitelerinin IC 50 değeri %50'nin altında bulunduğu için sitotoksik açıdan etkisiz kabul edilmiştir ve çalışmanın yapıldığı dozlarda (10 µl, 5 µl, 0,5 µl ve 0,05 µl) bu bileşiklerin antikanser bir kimyasal ajan olamayacağı sonucuna varılmıştır.

Bu bileşikler için, daha farklı konsantrasyonlarda denenerek doza bağımlı etkinin ve sitotoksik dozun belirlenmesi gerektiğini ve bunun için daha ileri ayrıntılı bir çalışma planlanabileceği söylenebilir.

8.5 ÖNERİLER

Enzimatik biyotransformasyon reaksiyonlarında çözücüler, reaksiyon verimi ve seçicilik üzerindeki oldukça fazla etkiye sahiptirler. Enzim çalışmalarında organik çözücülerin kullanımıyla reaksiyon ortamında çeşitli ve farklı veriler elde edilmektedir. Çözücüler, substat özelliklerini ve yüzeyini değiştirerek veya enzim inhibitörü olarak, enzim dinamiklerine etki gösterir ve sonuçta enzim üzerinde konformasyonel değişimlere neden olurlar.

Bu çalışmadaki enzimatik reaksiyonların sonuçları değerlendirildiğinde, enzim-substrat kompleksi, reaksiyon ortamı ve ürünlerin etkileşimi üzerinde çözücü etkisinin ve pH etkisinin olduğu belirlenmiştir.

Kullanılan farklı organik çözücülerin, bazı enzimlerin çalışma hızını ve enantiyomerik fazlalığını (e.e) arttırırken; bazı enzimler üzerinde inhibitör etki gösterdiği gözlemlenmiştir.

Bu tez çalışmasındaki veriler, gelecekteki biyotransformasyon çalışmalarına temel teşkil etmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Khanam, H. ve Shamsuzzaman, (2014). " Bioactive Benzofuran derivatives: A review" *European Journal of Medicinal Chemistry* , 1-22.
- [2] Sanchez-Gonzalez ve Rosazza., (2006)." Biocatalytic Synthesis of Butein and Sulfuretin by *Aspergillus alliaceus*", *J Agric Food Chem.*, 54(13):4646-50.
- [3] Hadj-esfandiaria., (2007). " Synthesis, antibacterial activity, and quantitative structure–activity relationships of new (Z)-2-(nitroimidazolylmethylene)-3(2H)-benzofuranone derivatives ", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17(22): 6354–6363.
- [4] Padaratz,P.,(2009)." Antinociceptive activity of a new benzofuranone derived from a chalcone", *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 105(4):257–261.
- [5] Meng, X., (2006)." Study on the antioxidant activities of benzofuranones in melt processing of polypropylene", *Polymer Degradation and Stability*, 91(12): 2888–2893.
- [6] Aslam, S.N., (2006). " Synthesis of cicerfuran, an antifungal benzofuran, and some related analogues", *Tetrahedron*, 62:4214-4226.
- [7] Souard,F., (2010). " Azaaurones derived from the naturally occurring aurones as potential antimalarial drugs", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18(15): 5724–5731.
- [8] Castaneda, P., (1996). "Phytogrowth-inhibitory and antifungal constituents of *helianthella quinquenervis*", *J. Nat. Prod.* 59,323-326.
- [9] Okombi,S., (2006)."Discovery of Benzylidenebenzofuran-3(2H)-one (Aurones) as Inhibitors of Tyrosinase Derived from Human Melanocytes", *J. Med. Chem.*, 49(1): 329–333.
- [10] Onoa. M., (2007). " Aurones serve as probes of β -amyloid plaques in Alzheimer's disease", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 361(1): 116–121.

- [11] Miert, S.V., (2005). "Antileishmanial activity, cytotoxicity and QSAR analysis of synthetic dihydrobenzofuran lignans and related benzofurans", Bioorg. Med. Chem. 13: 661-669.
- [12] Zhang, G.N., (2005). "Bi-bicyclic and bi-tricyclic compounds from dendrobium *Thyrsiflorum*", Phytochemistry 66:1113-1120.
- [13] Krawczyk, E., (2004). " α -Hydroxy Ketones in High Enantiomeric Purity from Asymmetric Oxidation of Enol Phosphates with (Salen) Manganese(III) Complex", Tetrahedron: Asymmetry, 15:2599-2602.
- [14] Muthupandi, P. ve Sekar, G., (2011). "Chiral Zn-catalyzed Aerobic Oxidative Kinetic Resolution of α -Hydroxy Ketones", Tetrahedron: Asymmetry, 22:512-517.
- [15] Kösalı, Y.K, (2005). α -Hidroksi Ketonların Enantiyoseçimli Olarak Biyotransformasyonla Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [16] Zhou, X.-J., (2011). "Two Dimeric Lignans with an Unusual α,β -Unsaturated Ketone Motif from *Zanthoxylum podocarpum* and their Inhibitory Effects on Nitric Oxide Production", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 21:373-376.
- [17] Demir, A.S., (2002). "Fungal Deracemization of Benzoin", Tetrahedron Letters, 43:6447-6449.
- [18] Goldberg, K., (2007). "Biocatalytic Ketone Reduction-A Powerful Tool for the Production of Chiral Alcohols-Part I: Processes with Isolated Enzymes", Applied Microbiol Biotechnology, 76:237-248.
- [19] Kösalı, Y.K, (2005). α -Hidroksi Ketonların Enantiyoseçimli Olarak Biyotransformasyonla Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [20] Kırimer,N., (2002). " Monoterpenlerin Mikrobiyal Transformasyonu", 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı Anadolu Üniversitesi, Eskişehir.
- [21] Sanchez-Gonzalez ve Rosazza., (2006). " Biocatalytic Synthesis of Butein and Sulfuretin by *Aspergillus alliaceus*", J Agric Food Chem., 54(13):4646-50.
- [22] Alarcon, J., vd., (2008). " Biotransformation of indole derivatives by mycelial cultures.", pubmedid : 18386493, 63(1-2):82-4.
- [23] Demir, A.S., (2008). " *Fusarium roseum* and *Aspergillus oryzae*-mediated enantioselective reduction of benzils to benzoin", Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 55:164–168.

- [24] Kamath,A.V., ve Vaidyanathan, C.S. (1990).” New pathway for the biodegradation of indole in *Aspergillus niger* ”, *Appl Environ Microbiol.*,56(1):275-80.
- [25] Lubertozzi D. ve Keasling, J.D. (2008). “Developing *Aspergillus* as a Host for Heterologous Expression, *Biotechnology Advances*”, 27:53–75.
- [26] Torshabi,M., (2011).” Biotransformation of Methyltestosterone by the Filamentous Fungus *Mucor racemosus*, *Chemistry of Natural Compounds*”, 47:59-63.
- [27] García-Granados, A., (2000).” Chemical Semisynthesis and Biotransformation with *Rhizopus nigricans* of Several Sesquiterpenes: Obtention of New 1 α - and 2 α -Hydroxyselinane Derivatives”, *Tetrahedron*, 56(35):6517–6526.
- [28] Zaks, A. ve Dodds, D.R. (1997).” Application of biocatalysis and biotransformations to the synthesis of pharmaceuticals”, 2(12).
- [29] Brautigam.S, (2007).” Asymmetric whole cell biotransformations in biphasic ionic liquid/water-systems by use of recombinant *Escherichia coli* with intracellular cofactor regeneration”, *Tetrahedron: Asymmetry*, 18(16): 1883–1887.
- [30] Demir, A.S., (1998). "Synthesis and *Rhizopus oryzae* Mediated Enantioselective Hydrolysis of α -Acetoxy Aryl Alkyl Ketones", *Tetrahedron: Asymmetry*, 9:1673-1677.
- [31] Demir, A.S., (2007). "Enantioselective Synthesis of 4,5,6,7-tetrahydro-4-oxo-benzofuran-5-yl acetate and 1-Benzyl-4,5,6,7-tetrahydro-4-oxo-1(H)-indol-5-yl Acetate Using Chemoenzymatic Methods", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 44:87-92.
- [32] Karadeniz. F., (2007). 1-Fenil 1-Propanolün Enzimatik ve Mikrobiyal Hücre Biyokatalizörlüğünde Enantiyoseçimli Esterleşme Tepkimeleriyle Kinetik Rezolüsyonu, Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Projesi, Proje No: 162, Ankara.
- [33] Atkins, R.C ve Carey, F.A. (1997). *Organic Chemistry*, The McGraw-Hill companies, Inc, 184–212, New York.
- [34] Nejem, R.M., (2004). Enantioselective sensors and biosensors for clinical analysis, Doktora tezi, University of Pretoria, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, Pretoria.
- [35] Sheldon, R.A. (1993). *Chirotechnology*. Marcel Dekker, Inc, 47-83, New York.
- [36] Ghanem, A. ve Aboul-Enein, H.Y. (2004). “Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents”, *Tetrahedron: Asymmetry*, 15; 3331-3351
- [37] Krishna, S.H. ve Karanth, N.G. (2002).” Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in nonaqueous media”, *Catalysis Reviews*, 44(4): 499-591.

- [38] Karakaya, D., (2005). 2-Kloro-1-(Furan-2-il)etanolün Her İki Enantiomerinin Kemoenzimatik Sentezi, Bilim Uzmanlığı Tezi, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Zonguldak.
- [39] Sugimori, D., (2004). "Microbial hydroxylation of indole to 7-hydroxyindole by *Acinetobacter calcoaceticus* strain 4-1-5", Biosci. Biotechnol. Biochem 68:1167-1169.
- [40] Areche, C., (2011). " Biotransformation of Stypotriol triacetate by *Aspergillus niger*", Journal of Molecular Structure, 998:167.
- [41] Parshikov, I.,(2012). " Microbial transformation of azaarenes and potential uses in pharmaceutical synthesis", Appl Microbiol Biotechnol, 95:871–8.
- [42] King, R. R.,(1998)." Unusual production of 5-nitroanthranilic acid by *Streptomyces scabies*", Phytochemistry 49:1265-1267.
- [43] Kieslich, M.,(1976). " Microbial Transformation", John Wiley & Sons, 1262.
- [44] Luo, J.,(2014). " Biotransformation of bavachinin by three fungal cell cultures", Journal of Bioscience and Bioengineering, 117(2): 191-196.
- [45] Zhang, J., (2005). " Novel Biotransformation of Pentacyclic Triterpenoid Acids by *Nocardia* sp. NRRL 5646", Tetrahedron Letters, 46:2337–2340.
- [46] Faber, K.,(2000). Biotransformation in organic chemistry, Sprinder-Verlag, Germany.
- [47] Demir, A.S.,(2008). "Fusarium roseum and *Aspergillus oryzae*-mediated enantioselective reduction of benzils to benzoin", Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 55:164–168.
- [48] Akar T. 2005. Furanosteroid Yapılı Bazı Bileşiklerin Antifungal Etkinliğinin ve *Neurospora crassa* Fungal Kültürünün Biyotransformasyon ve Biyosorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi, Doktora Tezi , Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 10- 25.
- [49] Atkins, R.C. ve Carey, F.A. (1997). Organic Chemistry, The McGraw-Hill companies, Inc, 184–212, New York.
- [50] Gandolfi, R., (2001). "Resolution of (R,S)-2-phenylpropanoic acid by enantioselective esterification with dry microbial cells in organic solvent". Tetrahedron: Asymmetry 12:501-504.
- [51] Sakai, T., (1998)."Low –Temperature method for enhancement of enantioselectivity in the lipase-catalyzed kinetic resolutions of solketal and some chiral alcohols". Tetrahedron Letters, 39:7881–7884.

- [52] Krishna, S.H., ve Karanth, N.G., (2002). "Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in nonaqueous media". *Catalysis Reviews*, 44(4): 499-591.
- [53] Bakış, P., (2007). Enantiyomerik Safılıkta 1-Fenil-1-propanolün Transesterleşme Tepkimesiyle Biyoreaktörde Kinetik Rezolüsyonu, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [54] Demir, K.M. ve Elgün A., (2011). "Buğday Ruşeyminin Beslenmedeki Yeri", 1. Ulusal Helal ve Sağlıklı Gıda Kongresi, 19-20 Kasım 2011, Ankara.
- [55] Ferreira, I.M., (2014). "Highly Enantioselective Acylation of Chlorohydrins Using Amano AK Lipase from *P. fluorescens* Immobilized on Silk Fibroin-Alginate Spheres", *Tetrahedron Letters*, 55:5062-5065.
- [56] Wang, B., (2012). "Efficient Kinetic Resolution of Amino Acids Catalyzed by Lipase AS 'Amano' via Cleavage of an Amide Bond", *Tetrahedron: Asymmetry*, 23:1338-1342.
- [57] Bora, P.P., (2011). "First Example of Hydrolytic Kinetic Resolution of Acrylate of Secondary Alcohols by Lipase Amano AK", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 72:270-275.
- [58] Karakaya, D., (2005). 2-Kloro-1-(Furan-2-il)etanolün Her İki Enantiomerinin Kemoenzimatik Sentezi, Bilim Uzmanlığı Tezi, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Zonguldak.
- [59] Ong, A.L., (2008). "Enantioseparation of (*R,S*)-Ketoprofen Using *Candida antarctica* Lipase B in an Enzymatic Membrane Reactor", *Journal of Separation Science*, 31:2476-2485.
- [60] Dinçer, S., (2010). *Aspergillus niger* as an Expression System for Heterologous Expression of ROL and BTL2, Yüksek Lisans Tezi, Sabancı Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, İstanbul.
- [61] Li, D., (2006). "Production Enhancement of *Rhizopus arrhizus* Lipase by Feeding Oleic Acid", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 43:40-43.
- [62] Rajendran, A. ve Thangavelu, V., (2009). "Statistical Experimental Design for Evaluation of Medium Components for Lipase Production by *Rhizopus arrhizus* MTCC 2233", *LWT-Food Science and Technology*, 42:985-992.
- [63] Orhan, A., (2002). *Rhizopus arrhizus*'dan Katı Hal Fermantasyonu ile Lipaz Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- [64] Methods for studying cell proliferation and viability in cell populations, https://www.roche-appliedscience.com/PROD_INF/MANUALS/CELL_MAN/apoptosis_082_084.pdf, 6 Mayıs 2015.

- [65] Doyle A, Griffiths JB. (1998), "Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology", John Wiley&Sons. 57-61:62-64.
- [66] Mosman, T., (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and cytotoxicity assays". Journal of immunological Methods, 65:55-63.
- [67] J. C. Sheehan, R. C. O'Neill, M. A. White, (1950), J. Am. Chem. Soc. 72, 3376.
- [68] C. L. Bumgardner, J. E. Bunch, M. J. Whangho, (1986), Org. Chem. 51, 4083.
- [69] F. A. Davis, M. S. Haque, (1986), J. Org. Chem. 51, 4083.
- [70] F. A. Davis, M. S. Haque, T. G. Ulatowski, J. C. Towson, (1986), J. Org. Chem. 51, 2402.
- [71] M. Masui, A. Ando, T. Shioiri, (1988), Tetrahedron Lett. 29, 2835.
- [72] D. Gala, D. J. Dibenedetto, J. E. Clark, B. L. Murphy, D. P. Schumacher, M. Steinman, (1996), Tetrahedron Lett. 37, 611.
- [73] K. Nakamura, S. L. Kondo, Y. Kawai, K. Hida, K. Kinato, A. Ohno, (1996) Tetrahedron Asymmetry 7, 409.
- [74] W. Adam, C. R. Saha-Möller, C. Zhao, (1999), J. Org. Chem. 64, 7492.
- [75] Cao, H., (2014). " Microbial biotransformation of bioactive flavonoids", Biotechnology Advances, 33, 214–223.
- [76] A. S. Demir, Ö. Sesenoglu, (2002), Organic Letters, 4, 2021
- [77] Sakıyan, İ., (1992), Mangan(III) Asetatın Yeni Bir Yöntemle Hazırlanması, Saflığının ve Kullanılabilirliğinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- [78] Gümüş, M. K., (2002), Aril-Substitue Heteroçiklik Bileşiklerin Sentezi ve Türevleri, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul.
- [79] Adam, W., Saha-Möller, C. R., Zhao, C., (1999), J. Org. Chem. 64, 7492.
- [80] Williams, G. J., Hunter, N. R., (1976), Can. J. Chem., 54, 3830.
- [81] Dunlop, K. N., Sabol, M. R., Watt, D. S., (1984), Tetrahedron Lett., 25, 5839.
- [82] . Demir, A. S, Hamamcı, H., Tanyeli, C., Doganel, F., Mecidoglu, A., (1996), Tetrahedron : Asymmetry 7, 2207.

[83] . Demir, A. S, Aybey, A., Polat, F.,. Sesenoglu, Ö, (1996),Tetrahedron: Asymmetry, 7,2207.

EK-A

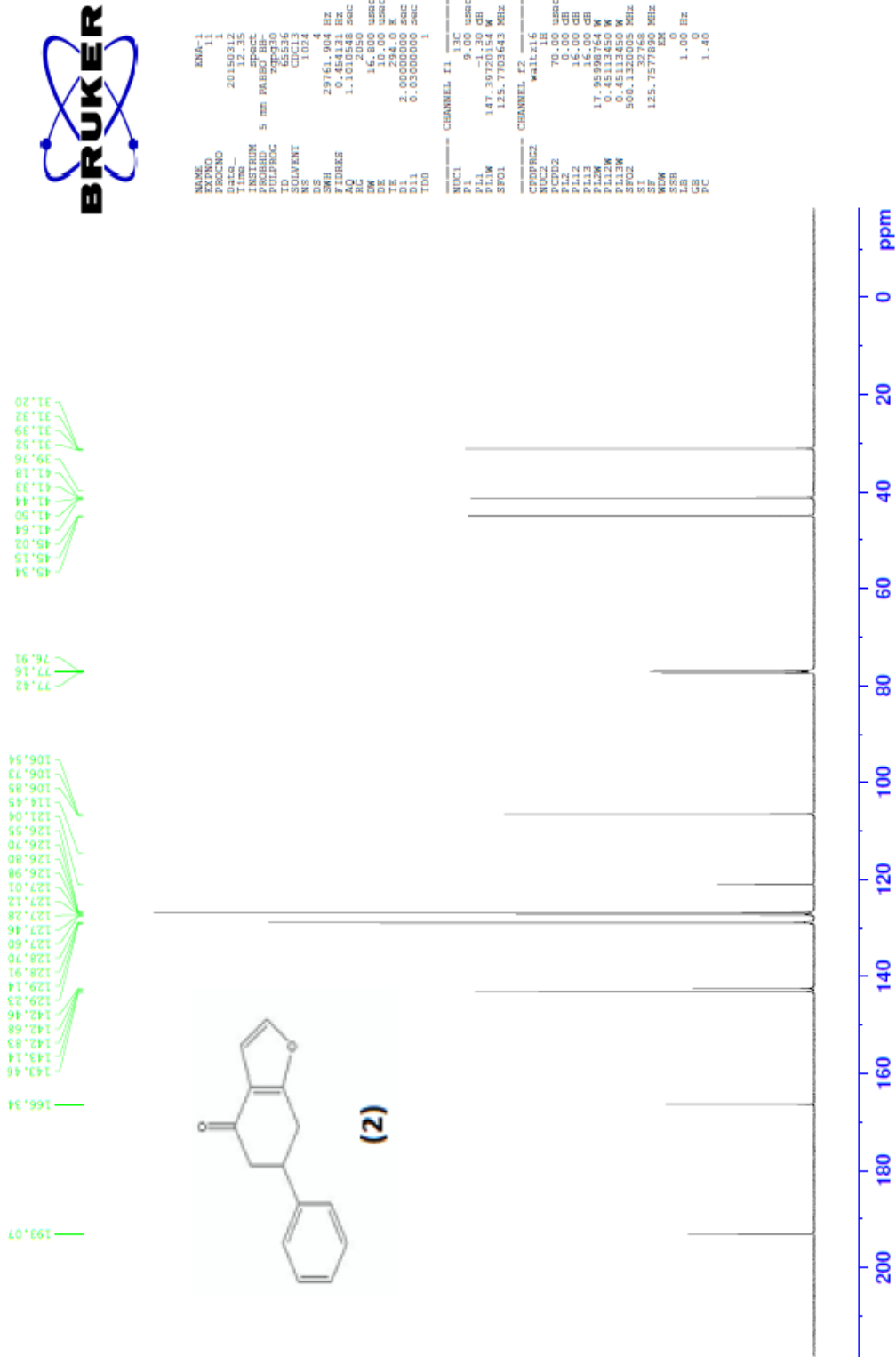
6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on (2)

BİLEŞİĞİNİN SPEKTRAL ANALİZ SONUÇLARI

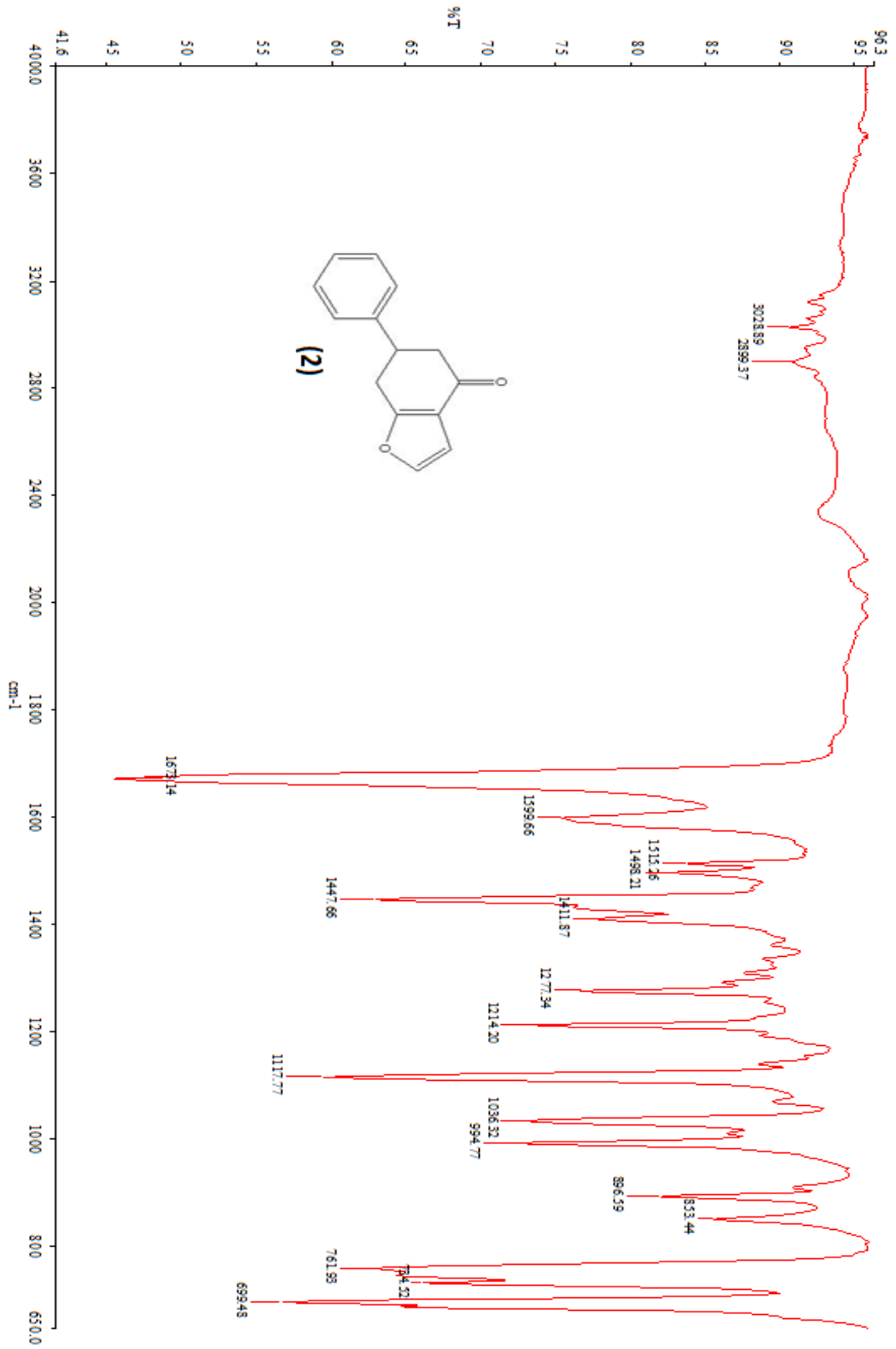
(¹H-NMR, ¹³C-NMR, IR)



Şekil A.1 6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on bileşiğinin **(2)** ¹H-NMR sonucu



Şekil A.2 6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on bileşiğinin **(2)** ¹³C-NMR sonucu

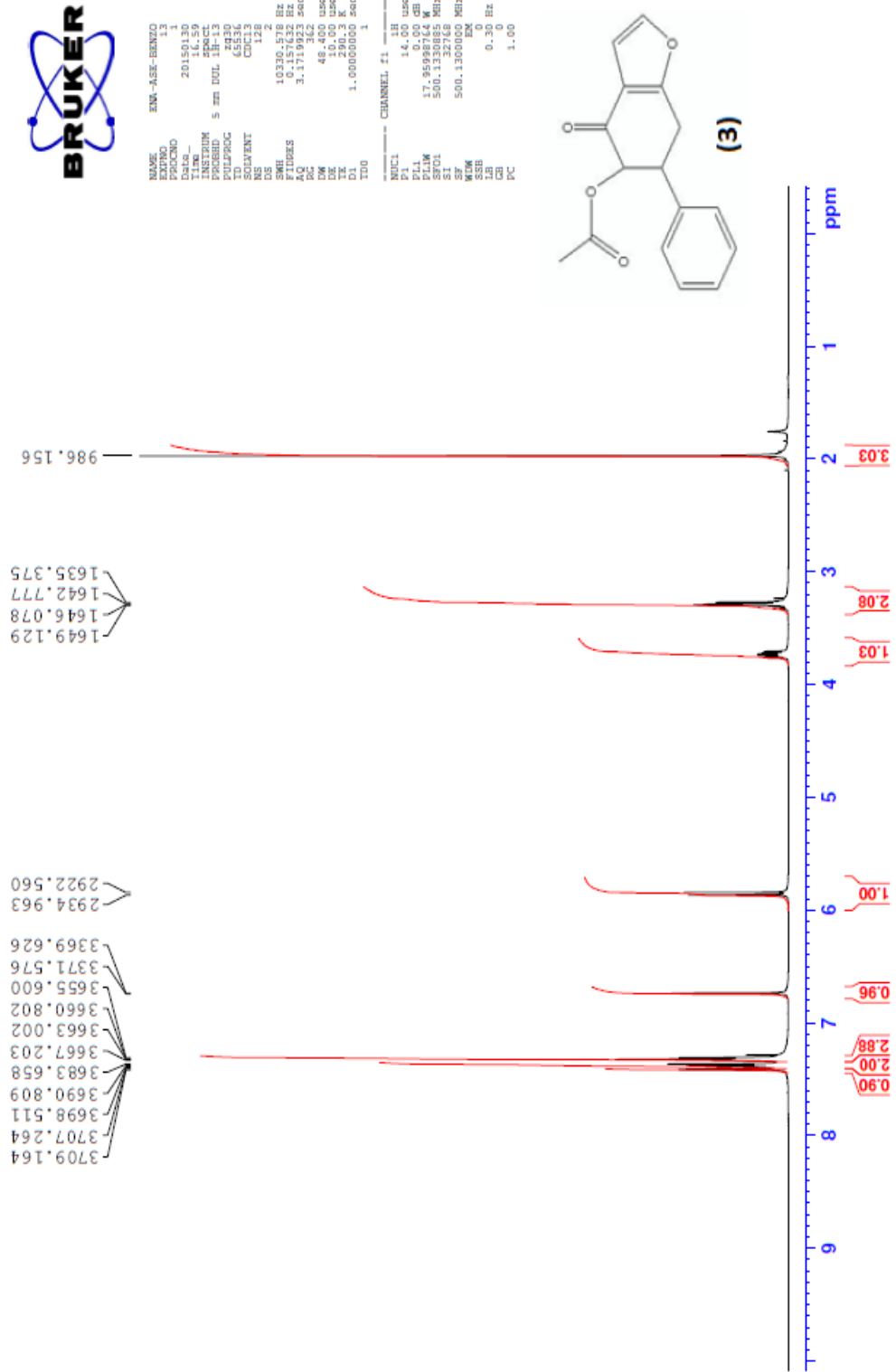


Şekil A.3 6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on bileşiğinin (2) IR sonucu

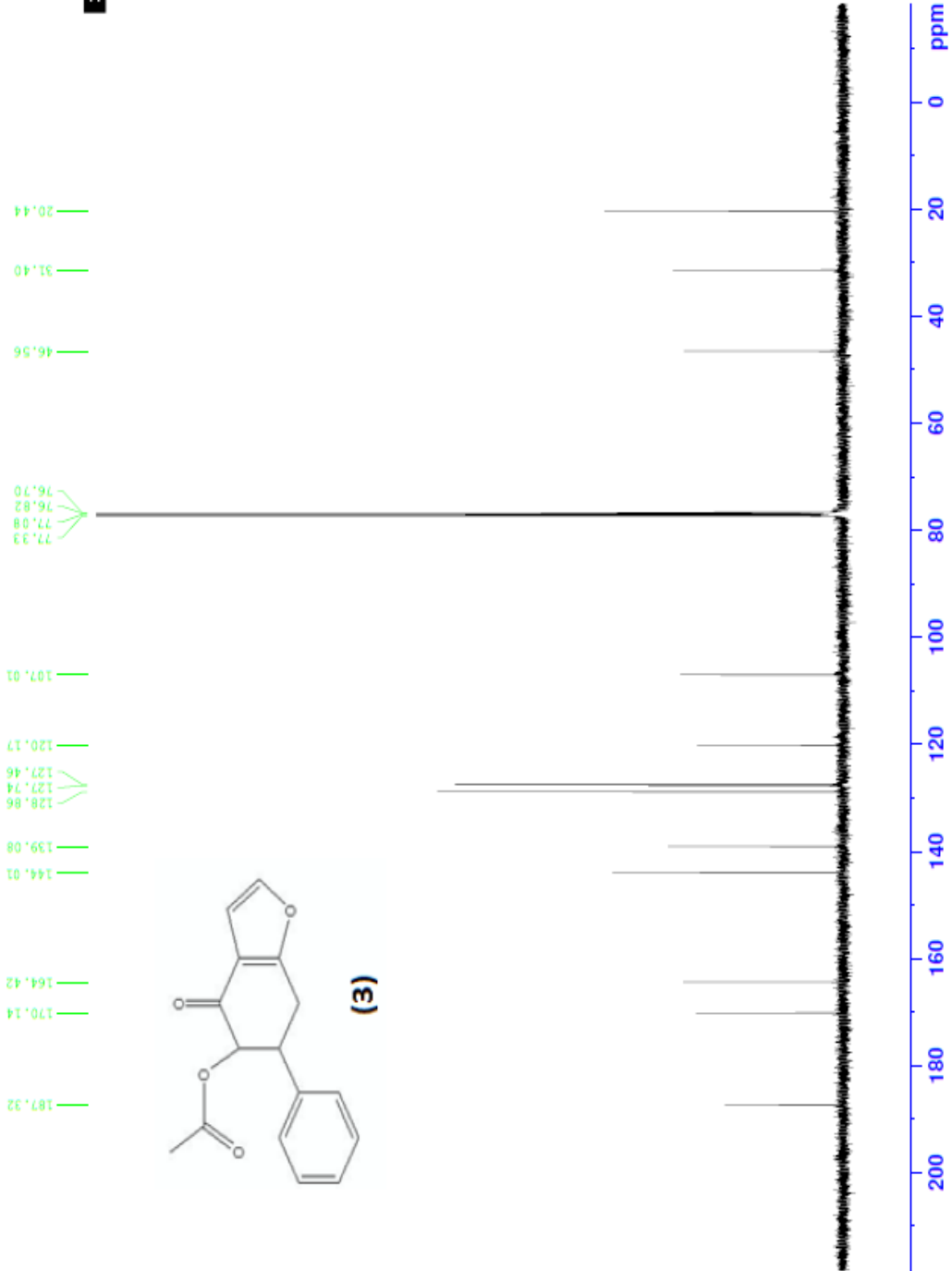
4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (3)

BİLEŞİĞİNİN SPEKTRAL ANALİZ SONUÇLARI

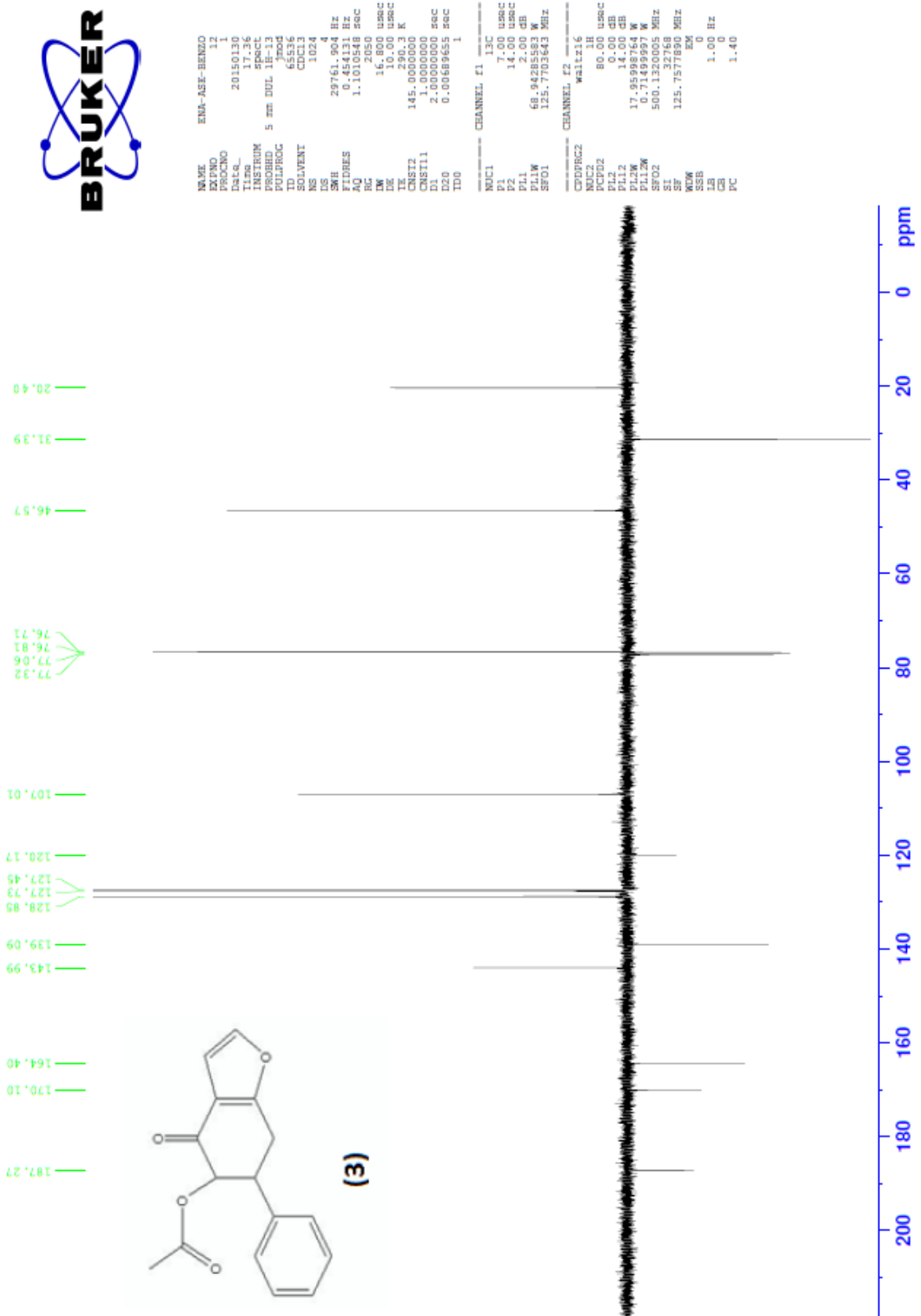
(¹H-NMR, ¹³C-NMR, IR ve MS Q-TOF)



Şekil B.1 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (**3**) bileşiğinin ^1H -NMR sonucu

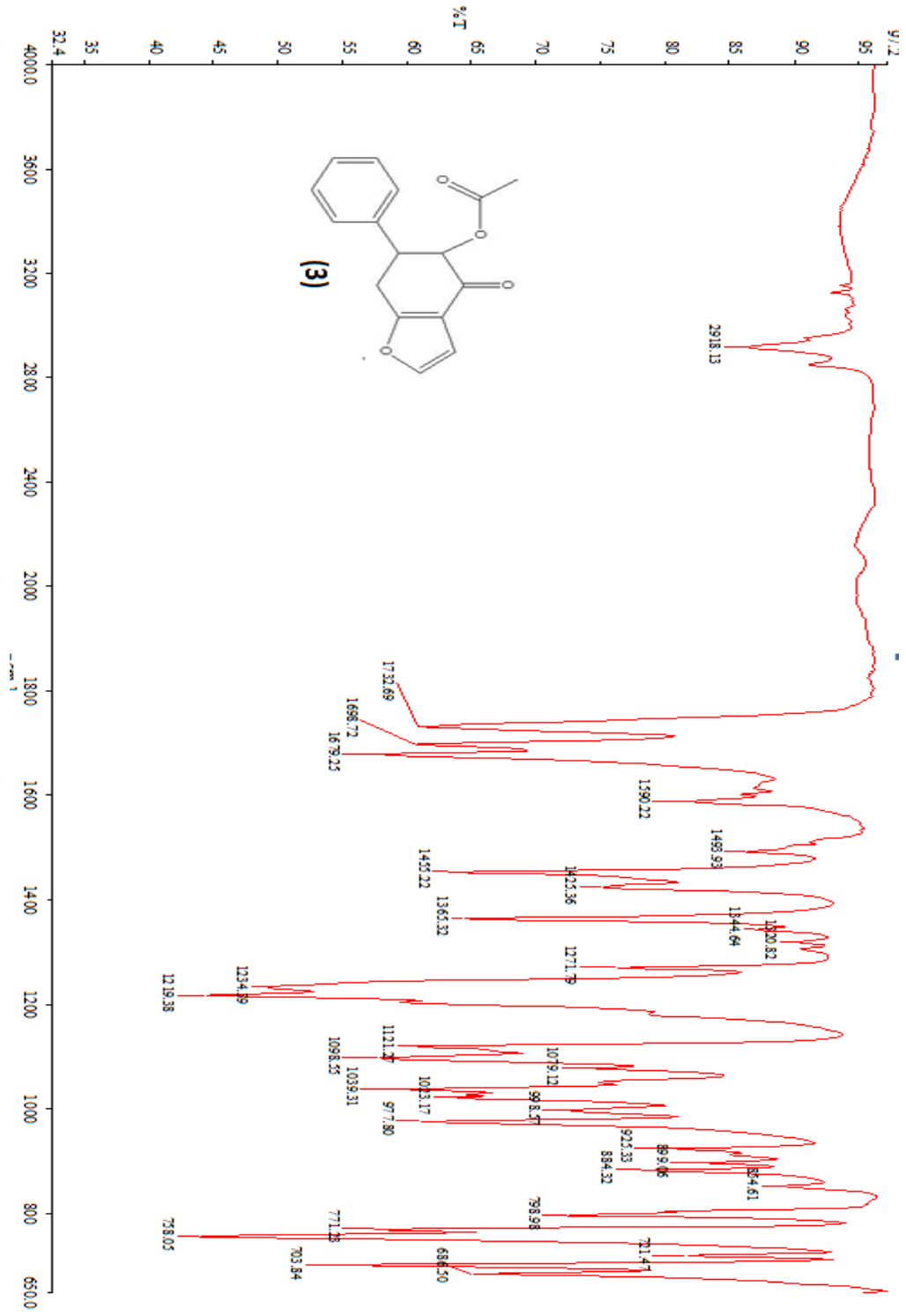


Şekil B.2 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (3) bileşiğinin ¹³C-NMR sonucu

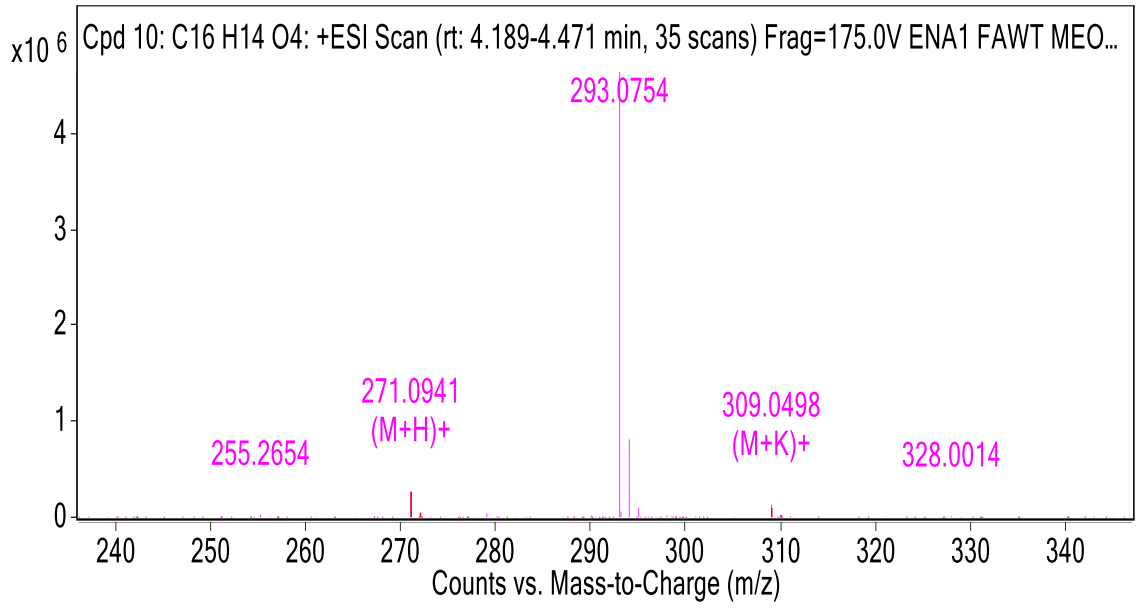


Şekil B.3 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (3) bileşiğinin APT

sonucu



Şekil B.4 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (**3**) bileşiğinin IR sonucu

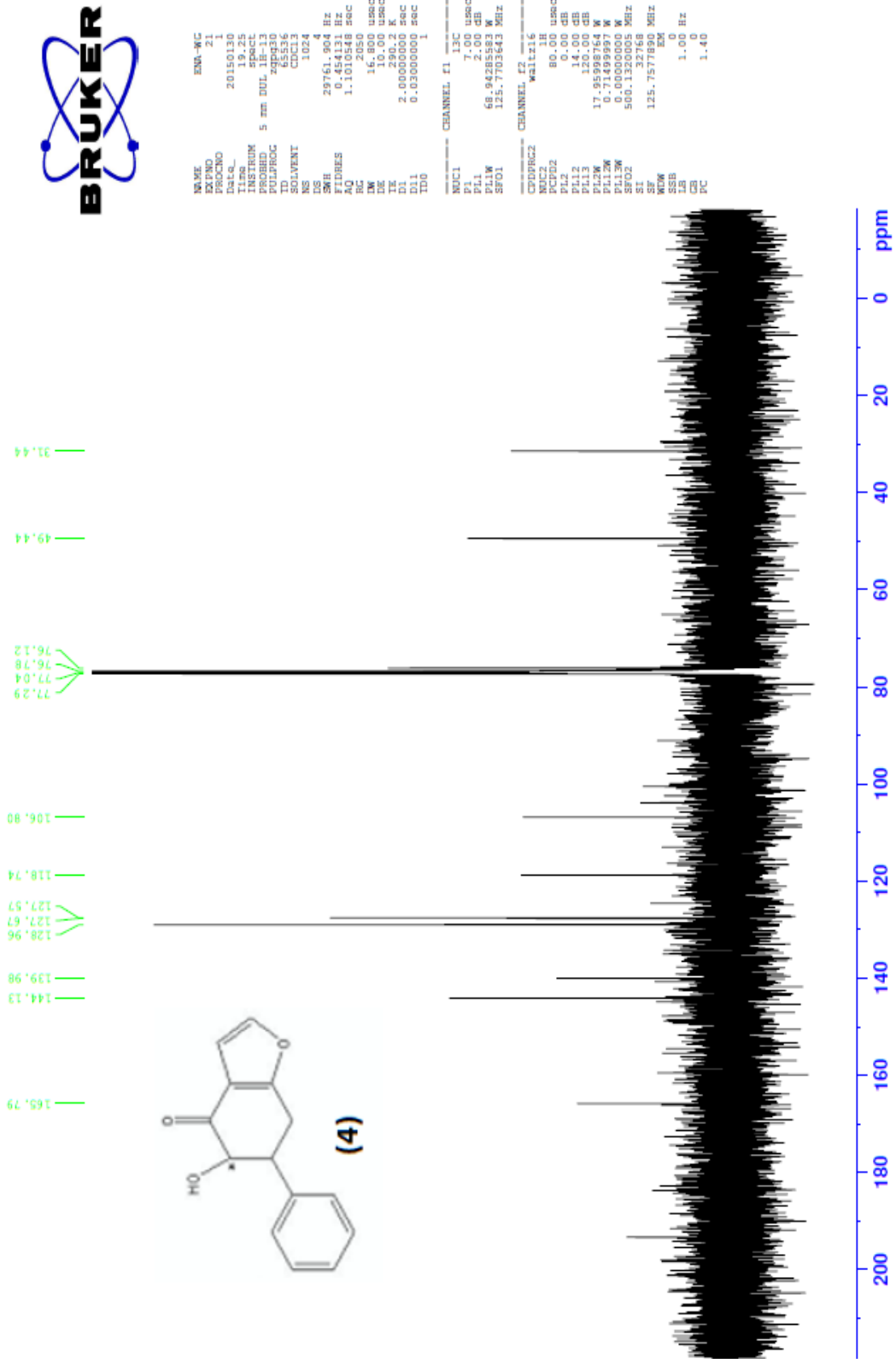


Şekil B.5 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il aetoksi (**3**) bileşiğinin MS-QTOF sonucu

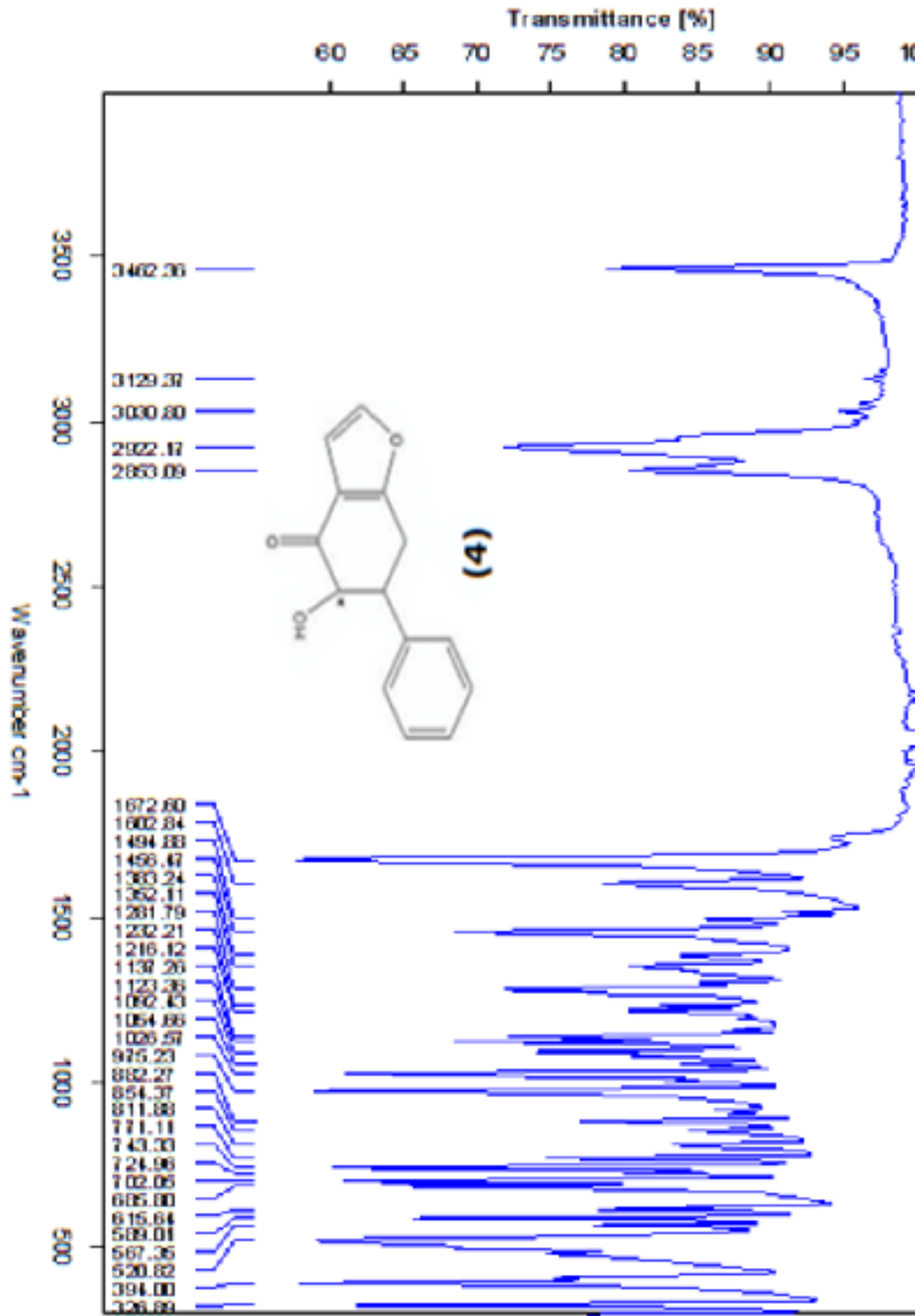
4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi (4)

BİLEŞİĞİNİN SPEKTRAL ANALİZ SONUÇLARI

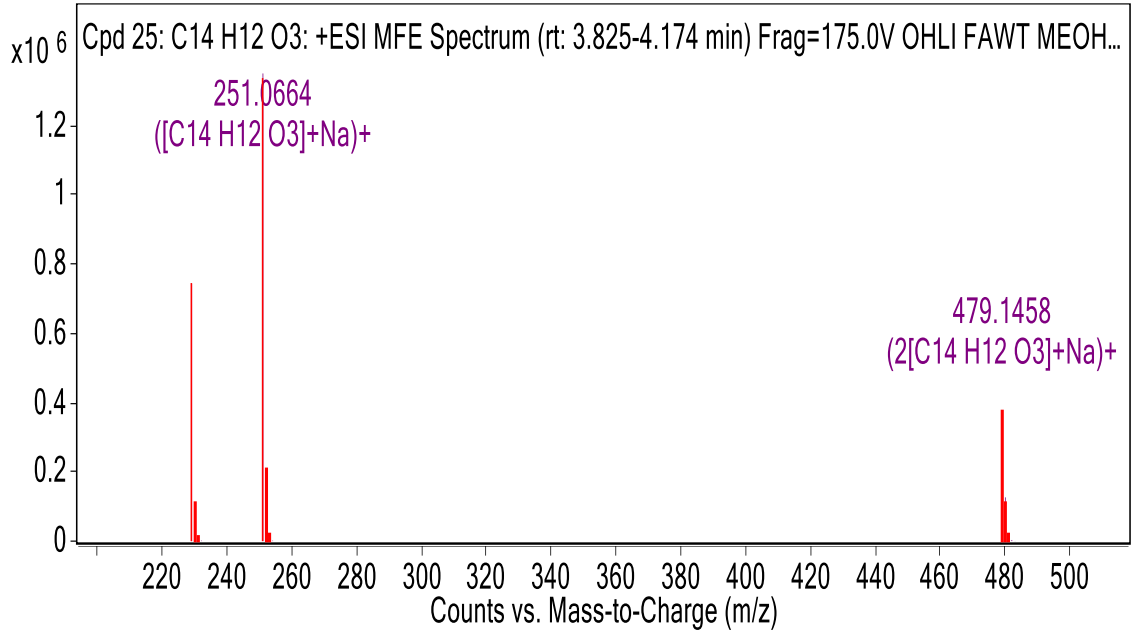
(¹H-NMR, ¹³C-NMR, IR ve MS Q-TOF)



Şekil C.2 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi **(4)** bileşiğinin ^{13}C -NMR sonucu



Şekil C.3 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi (**4**) bileşiğinin IR sonucu

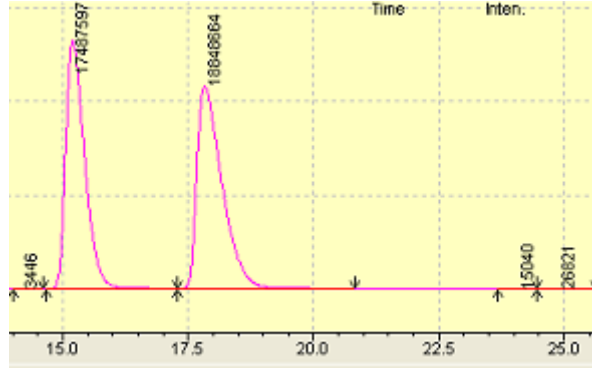


Şekil C.4 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi (**4**) bileşiğinin

MS-QTOF sonucu

**4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (3) BİLEŞİĞİ
ÜZERİNDE GERÇEKLEŞTİRİLEN ENZİMATİK BİYOTRANSFORMASYON
REAKSİYONLARININ HPLC SONUÇLARI**

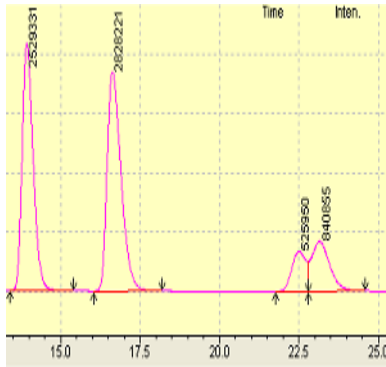
HPLC ANALİZLERİ



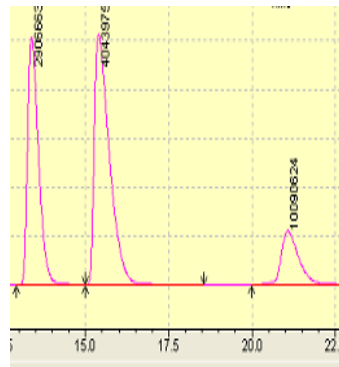
Şekil D.1 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat bileşiği



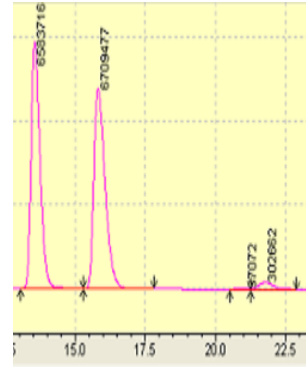
Şekil D.2 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi bileşiği



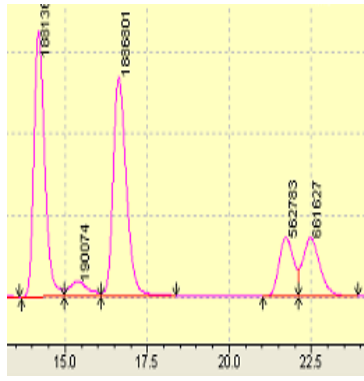
DMSO-WGL



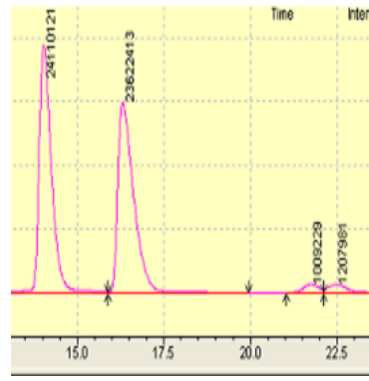
DMSO-AMANO LİPAZ



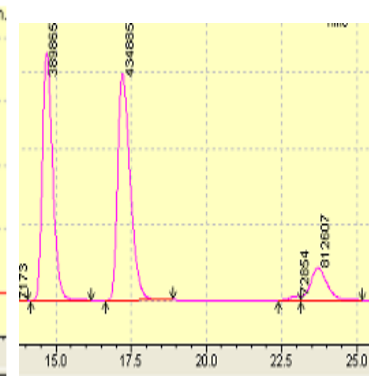
DMSO-CAL



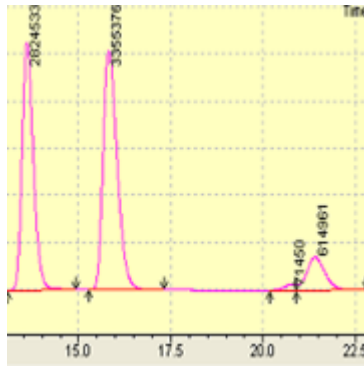
DMSO-CCL



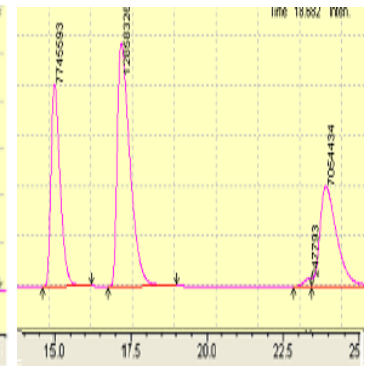
DMSO-HPL



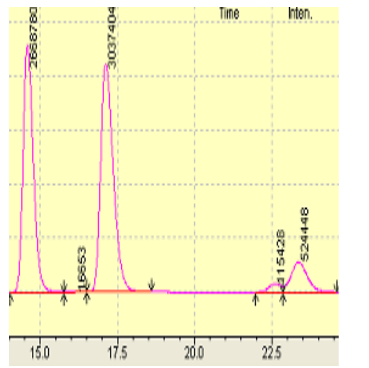
DMSO-MJL



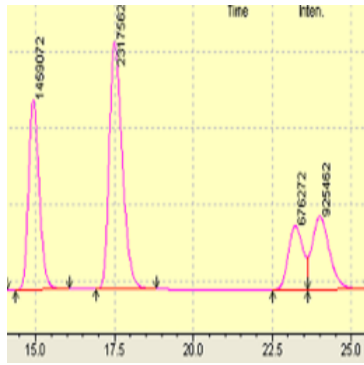
DMSO-PCL



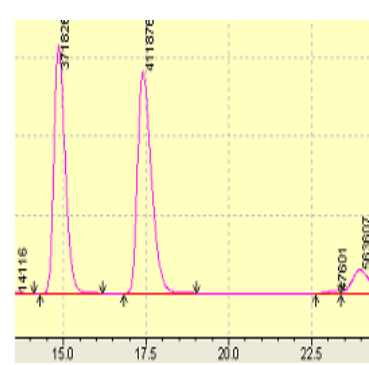
DMSO-PLL



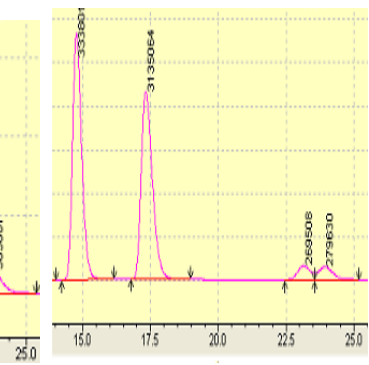
DMSO-PRL



DMSO-RAL

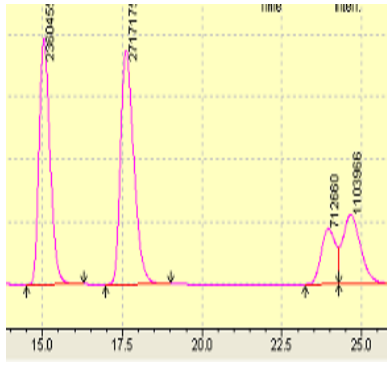


DMSO-RNL

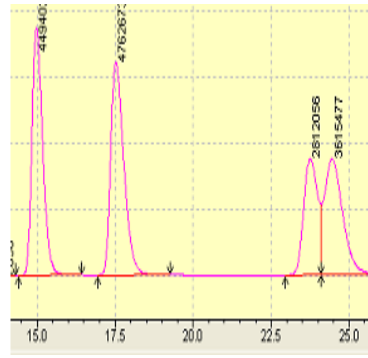


DMSO-CRL

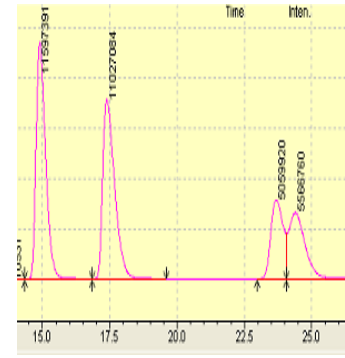
Şekil D.3 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (**3**) bileşiğinin DMSO ortamında **PH 7'deki** enzimatik biyotransformasyonun HPLC analiz sonucu



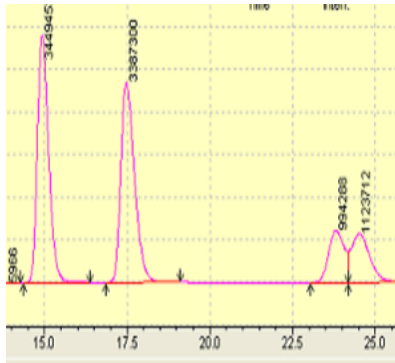
DMSO-WGL



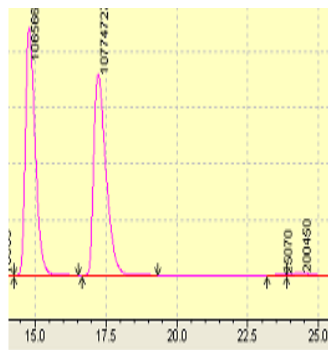
DMSO-AMANO LİPAZ



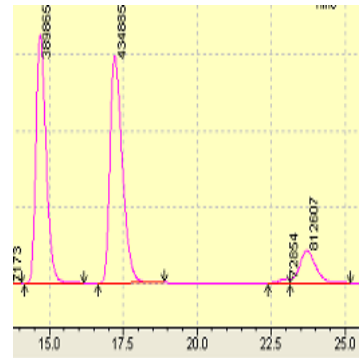
DMSO-CAL



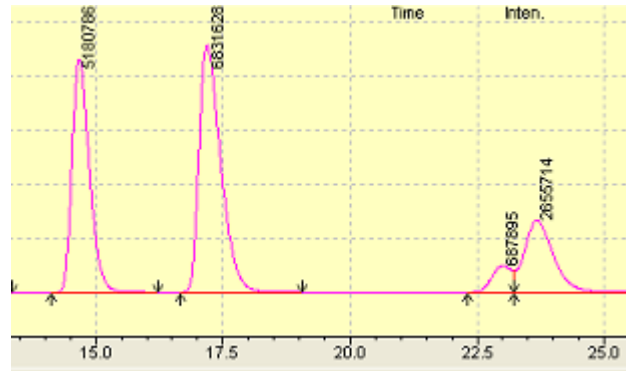
DMSO-CCL



DMSO-HPL

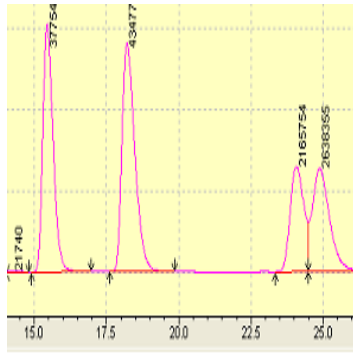


DMSO-MJL

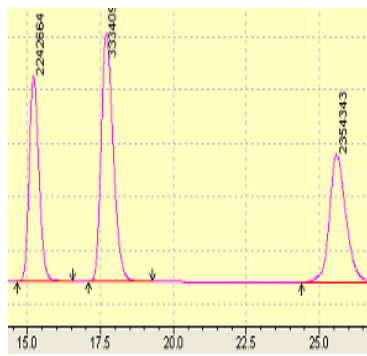


DMSO-PLL

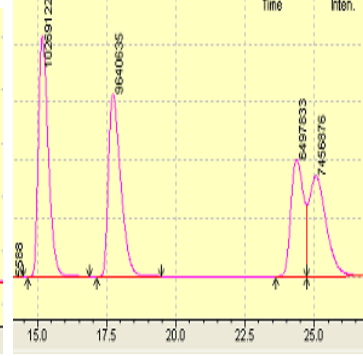
Şekil D.4 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (**3**) bileşiğinin DMSO ortamında **PH 6'deki** enzimatik biyotransformasyonun HPLC analiz sonucu



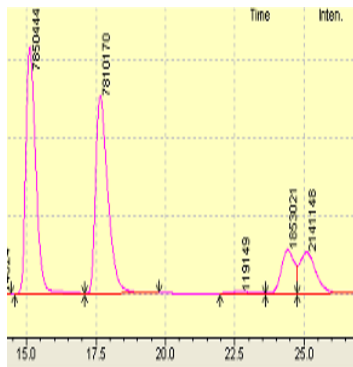
DMSO-WGL



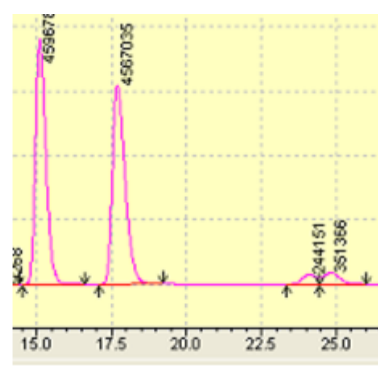
DMSO-AMANO LİPAZ



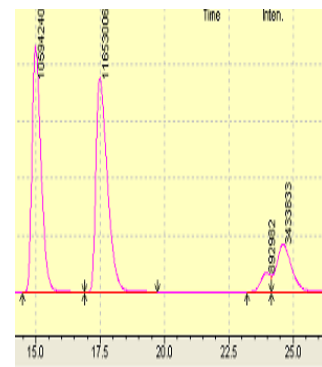
DMSO-CAL



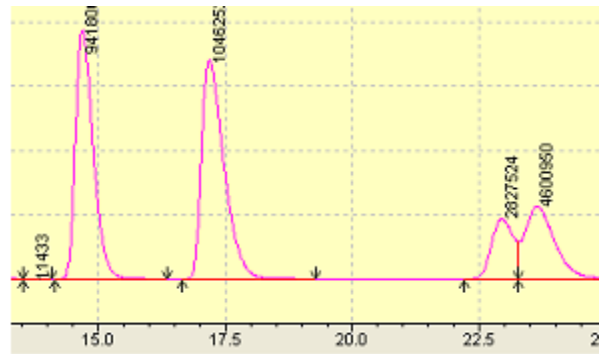
DMSO-CCL



DMSO-HPL

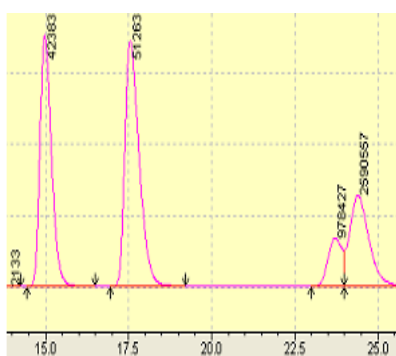


DMSO-MJL

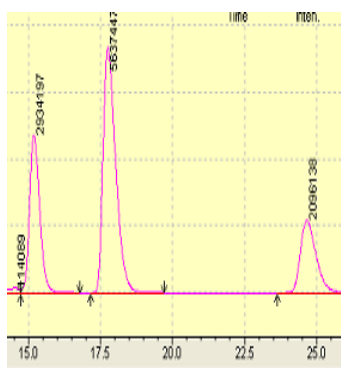


DMSO-PLL

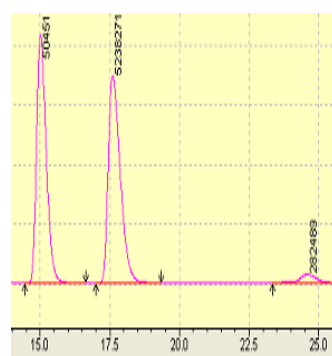
Şekil D.5 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (**3**) bileşiğinin DMSO ortamında **PH 8'deki** enzimatik biyotransformasyonun HPLC analiz sonucu



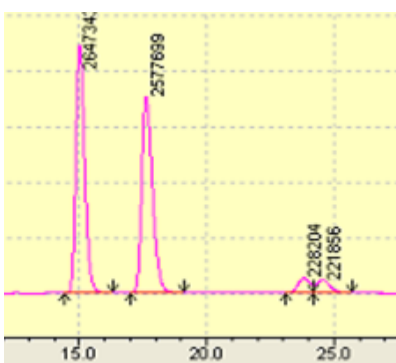
TOLUEN-WGL



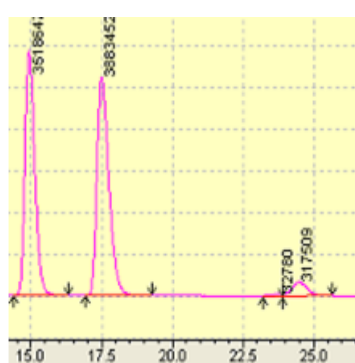
TOLUEN-AMANO LIPAZ



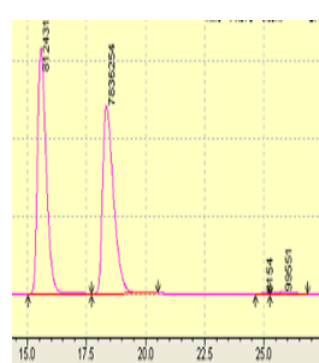
TOLUEN-CAL



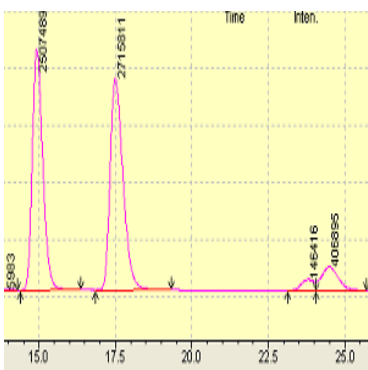
TOLUEN-CCL



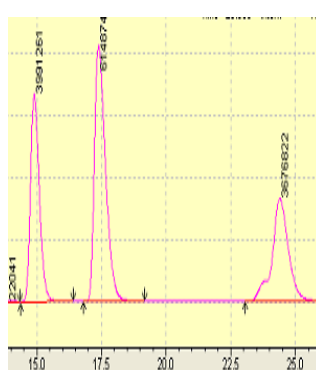
TOLUEN-HPL



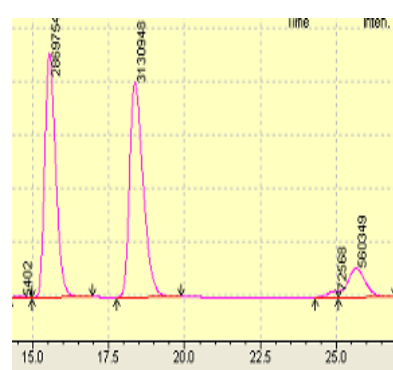
TOLUEN-MJL



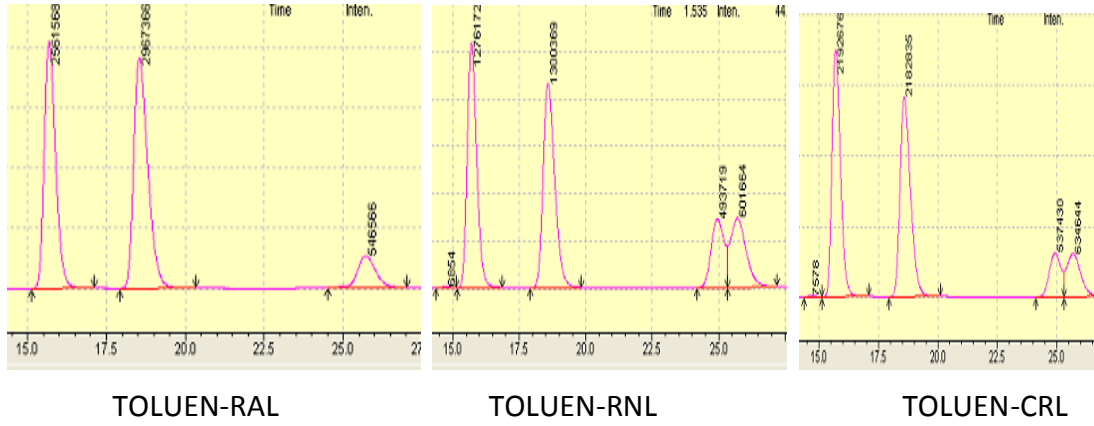
TOLUEN-PCL



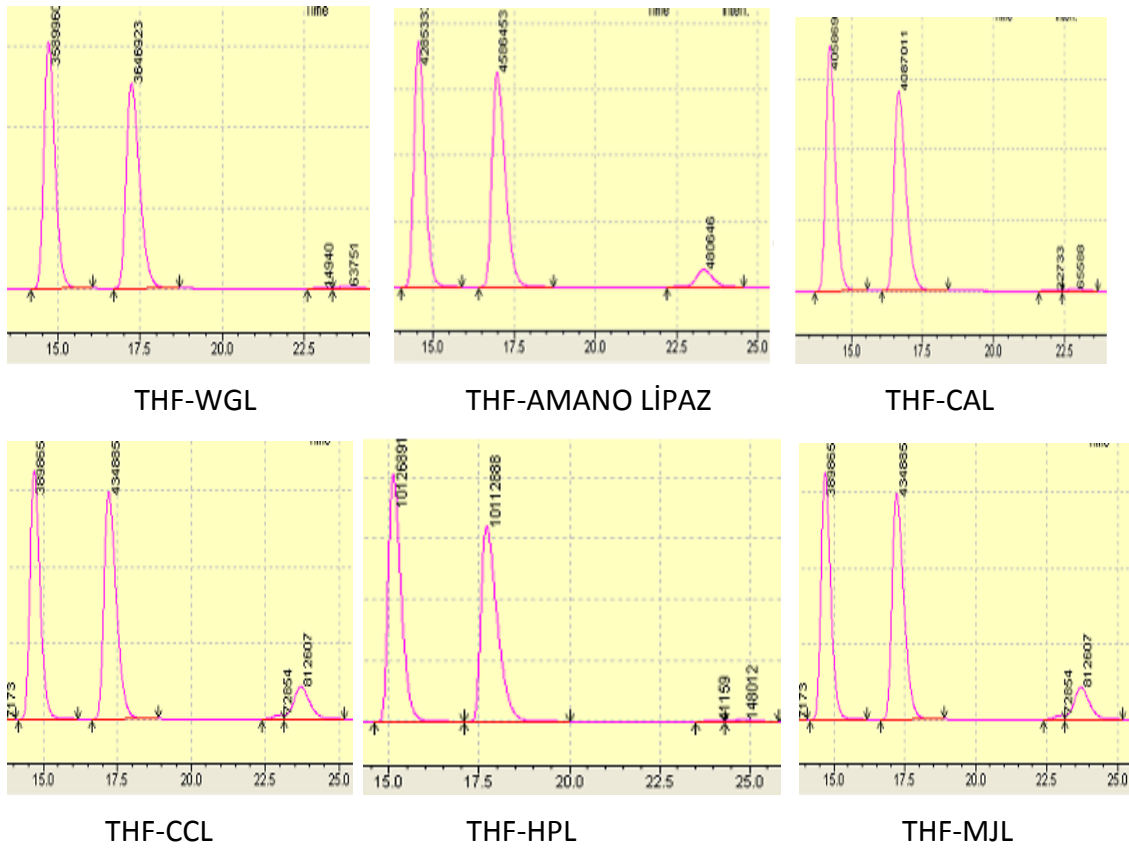
TOLUEN-PLL

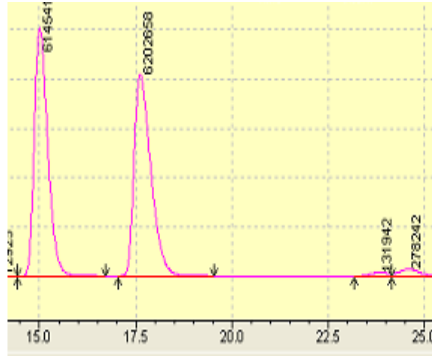


TOLUEN-PRL

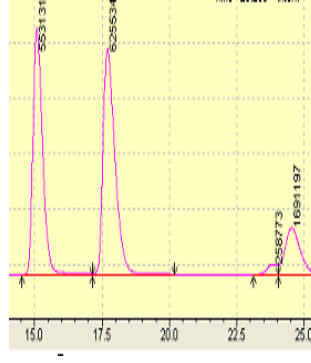


Şekil D.6 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (**3**) bileşiğinin TOLUEN ortamında **PH 7'deki** enzimatik biyotransformasyonun HPLC analiz sonucu

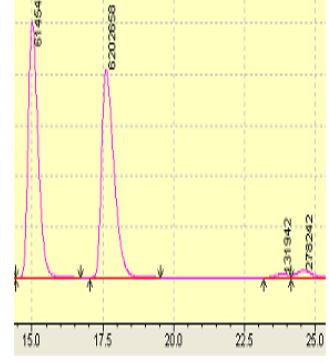




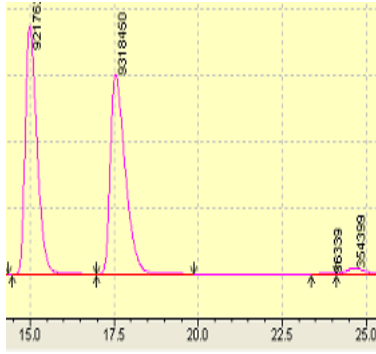
THF-PCL



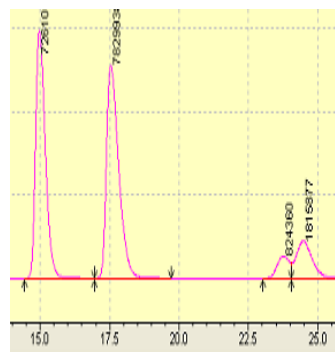
THF-PLL



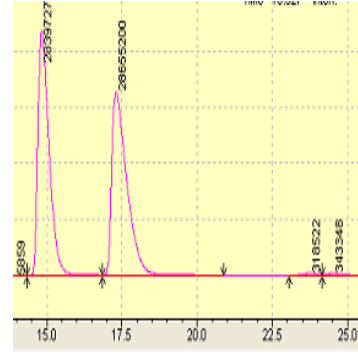
THF-PRL



THF-RAL



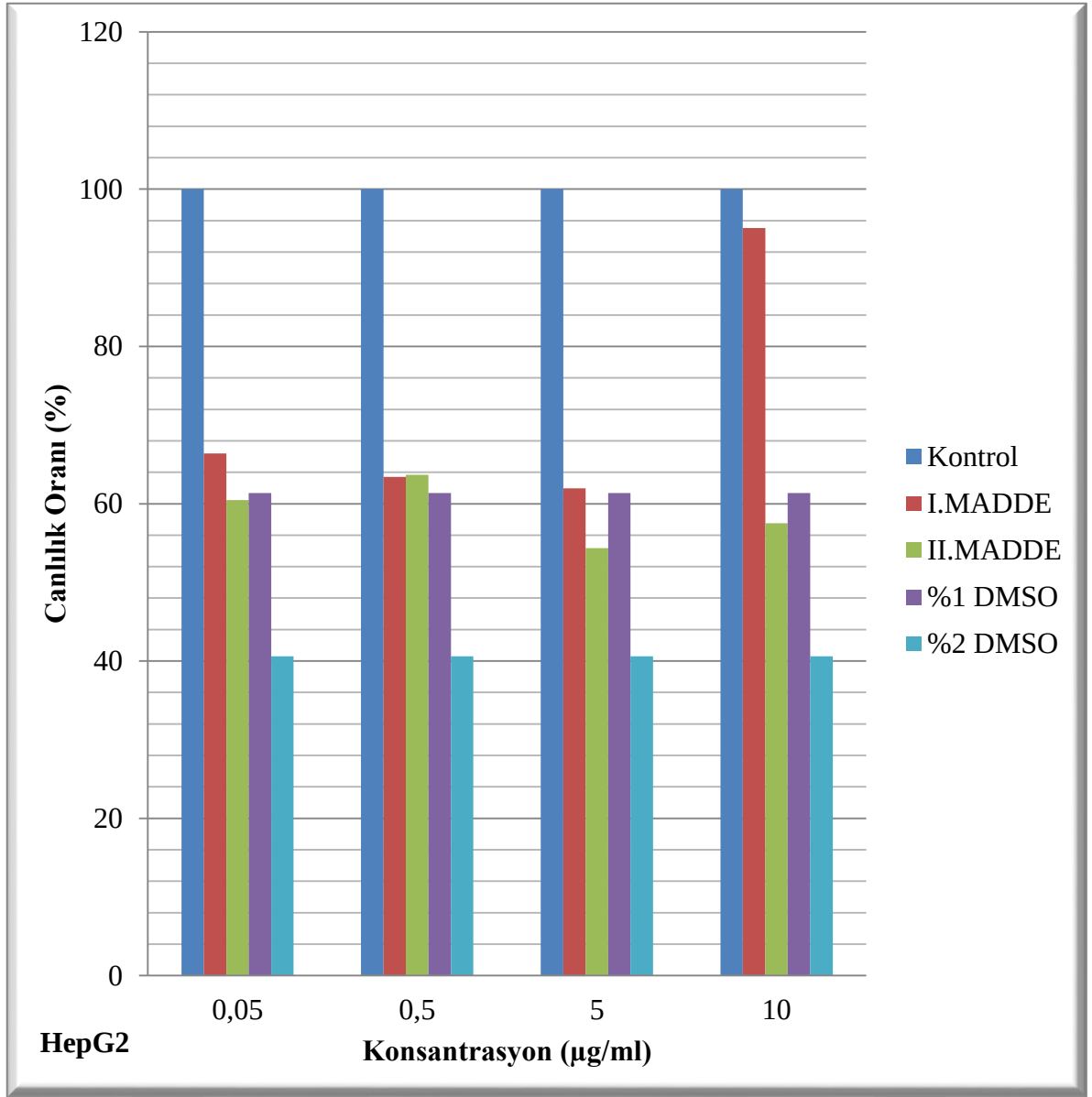
THF-RNL



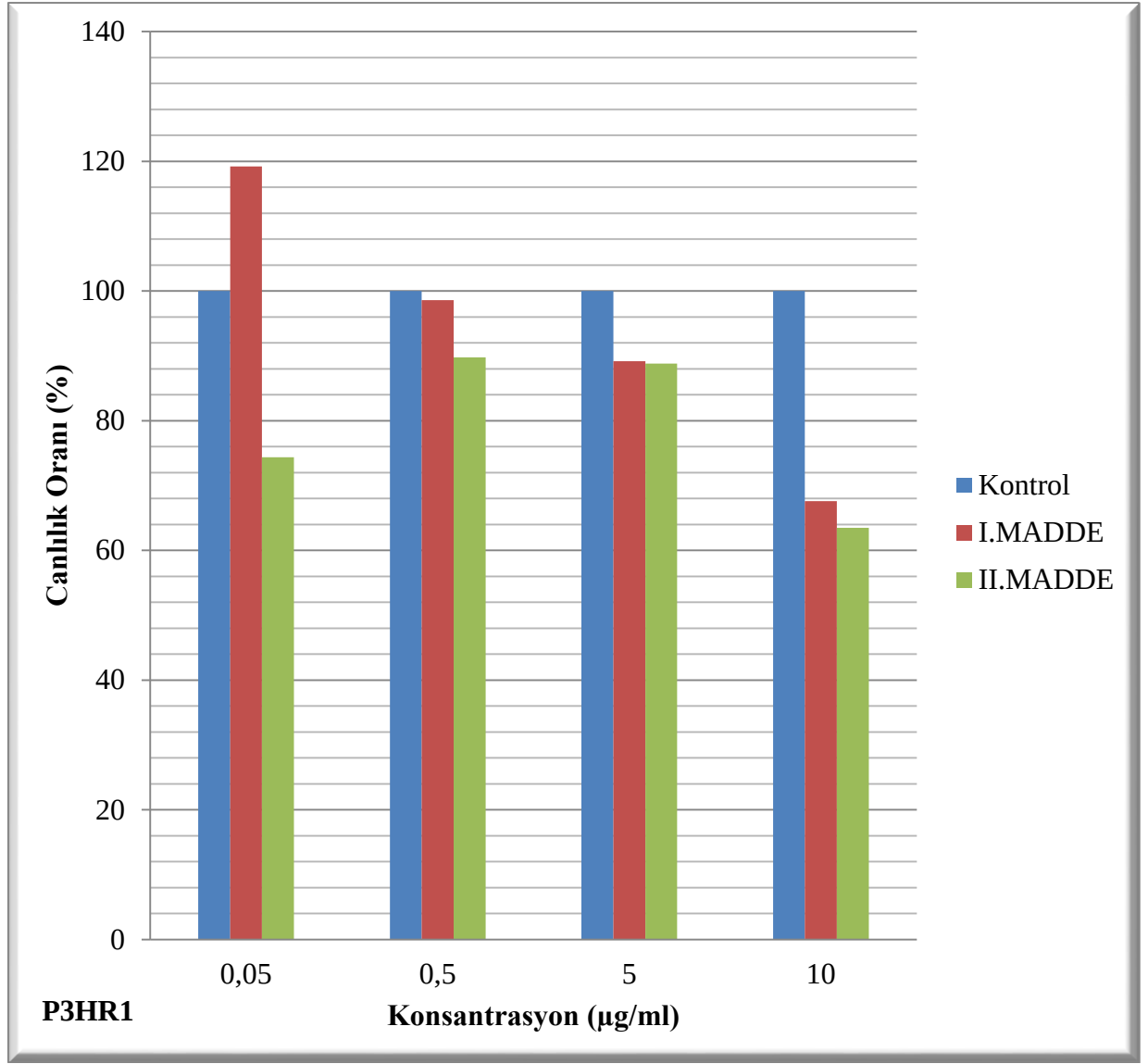
THF-CRL

Şekil D.7 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (**3**) bileşiğinin THF ortamında **PH 7'deki** enzimatik biyotransformasyonun HPLC analiz sonucu

**4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-okso-benzofuran-5-il asetat (3) ve 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-okso-benzofuran-5-il hidroksi (4) BİLEŞİKLERİNİN
HEPG2 VE P3HR1 HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK ANALİZLERİ**



Şekil E.1 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (**3**) (I. madde) ve 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi (**4**) (II. madde) bileşiklerinin HepG2 hücre hattındaki sitotoksik aktivite grafiği



Şekil E.2 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (**3**) (I. madde) ve 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi (**4**) (II. madde) bileşiklerinin P3HR1 hücre hattındaki sitotoksik aktivite grafiği

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ebru Nur AY
Doğum Tarihi ve Yeri : 18/04/1987 – İSTANBUL
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : eburunur_ay@hotmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans	Biyoloji	Abant İzzet Baysal Üniversitesi	2011
Ön Lisans	Tıbbi Laboratuvar	Fatih Üniversitesi	2007