T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ASPERGİLLUS TÜRLERİ İLE FARMAKOLOJİK OLARAK AKTİF ÜRÜNLERİN BİYOTRANSFORMASYONU

LEYLA YILMAZ KARA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Doç. Dr. Zerrin ÇALIŞKAN

Ocak, 2024

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ASPERGİLLUS TÜRLERİ İLE FARMAKOLOJİK OLARAK AKTİF ÜRÜNLERİN BİYOTRANSFORMASYONU

Leyla YILMAZ KARA tarafından hazırlanan tez çalışması 17.01.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Zerrin ÇALIŞKAN
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Zerrin ÇALIŞKAN, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin SERVI, Üye
Yeni Yüzyıl Üniversitesi _____

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

Leyla YILMAZ KARA

İmza

Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün FBA-2023-4736 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın en başından en sonuna kadar beni cesaretlendirilip, en iyisini yapabileceğime inandıran, bilgi ve tecrübesi ile bana yol gösteren danışmanım sayın Doç. Dr. Zerrin ÇALIŞKAN'a;

Özellikle biyotransformasyon çalışmalarım esnasında desteklerini esirgemeyen sayın Dr.Öğr.Üyesi Günseli KURT GÜR'e ve sevgili öğrencisi Yaren AYKUT'a;

Laboratuvar tecrübesi kazanmama vesile olan laboratuvar arkadaşlarıma; her an, her türlü destekleri ile yanımda olan Yıldız ALKILIÇ, Rana ALHAKIMI, Merve AYDIN ve Hazal BÜYÜKKAYA'ya,

Eğitim hayatım boyunca bana her zaman destek olan ve her koşulda maddi, manevi olarak yanımda duran canım annem Gülbeyaz YILMAZ ve babam Ekrem YILMAZ'a, diğer aile üyelerime;

Hayat yolundaki maceramda bana dahil olarak yaşamımı güzelleştiren, renklendiren biricik eşim, yol arkadaşım Ömer KARA'ya;

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Leyla YILMAZ KARA

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR iv
SİMGE LİSTESİ viii
KISALTMA LİSTESİ ix
ŞEKİL LİSTESİ x
TABLO LİSTESİ xiii
ÖZET xiv
ABSTRACT xvi
1 GİRİŞ 18
1.1 Literatür Özeti 18
1.2 Tezin Amacı 21
1.3 Hipotez 22
2 ASPERGİLLUS TÜRLERİ 23
2.1 Mantarlar 23
2.1.1 Aspergillus Niger 25
2.1.2 Aspergillus Oryzae 30
3 FARMAKOLOJİK OLARAK AKTİF ÜRÜNLER 39
3.1 Benzofuran 39
3.1.1 Benzofuranların Farmakolojideki Önemi 42
3.2 İndol 48
3.2.1 İndol Halkasının Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri 49
3.2.2 İndol'ün Biyolojik Aktivitesi 52
3.2.3 İndolün Farmakolojideki Önemi 52
3.2.4 İndol Sentez Yöntemleri 58
4 STEREOKİMYA VE KİRAL İLAÇLARIN ÖNEMİ: ENANTİYOMERLERİN BİYOLOJİK ROLÜ 61
4.1 Stereokimyasal Tanımlamalar 61
4.2 Enantiyomerlerin Biyolojik Önemi 64
4.3 Kiral İlaçlar 66
5 BİYOTRANSFORMASYON 70
5.1 Biyotransformasyon ve Kısa Tarihi 70
5.2 Biyotransformasyon Teknikleri, Reaksiyon Tipleri ve Türleri 73
5.2.1 Biyotransformasyon Teknikleri 73
5.2.2 Başlıca Biyotransformasyon Reaksiyonları 76

5.2.3 Enzimatik Biyotransformasyon…… 77
5.2.4 Mikrobiyal Biyotransformasyon……...78
6 MATERYALLER 91
6.1 Deneyde Kullanılan Kimyasallar 92
6.2 Deneyde Kullanılan Cihazlar ve Markaları 94
6.3 Kullanılan Besiyerleri 95
6.4 Mikroorganizmalar 95
7 DENEYSEL ÇALIŞMA VE BULGULAR 96
7.1 6,7-Dihidro-6-Fenilbenzofuran-4(5H)-On (3) Bileşiğinin Sentezi 96
7.2 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-okso-benzofuran-5-il-asetat (3) Sentezi 98
7.3 1-benzil-6-fenil-6,7-dihidro-1*H*-indol-4(*5H*)-on (4) Sentezi- Seal Tüp Reaksiyonu 100
7.4 Potasyum Permanganat Katalizörlüğünde 1-benzil-4-okso-6-fenil-4,5,6,7-tetrahidro-1*H*-indol-5-il asetat (5) Sentezi 101
7.5 Mikrobiyal Biyotransformasyon Reaksiyonları 102
7.5.1 *Aspergillus Niger ATCC 6275* Mikroorganizmasının Biyotransformasyon Reaksiyonuna Hazırlanması……..103
7.5.2 *Aspergillus Oryzae RIB40* Mikroorganizmasının Biyotransformasyon Rekasiyonuna Hazırlanması……104
8 SONUÇ 106
8.1 Benzofuranon Türevi Bileşiklerin Kimyasal Yöntemlerle Sentezi 106
8.2 İndol Türevi Bileşiklerin Kimyasal Yöntemlerle Sentezi 108
8.3 Biyotransformasyon Reaksiyonları 110
8.3.1 *Aspergillus Niger ATCC 6275* Suşu ile Gerçekleştirilen Biyotransformasyon Reaksiyonları…….111
8.3.2 *Aspergillus Oryzae RIB40* Suşu Ile Gerçekleştirilen Biyotransformasyon Reaksiyonları…….113
8.3.3 Biyotransformasyon Sonrası Elde Edilen Maddelerin HPLC Analiz Sonuçları…… 114
KAYNAKÇA 120
A 6,7-DİHİDRO-6-FENİLBENZOFURAN-4(5H)-ON (2) BİLEŞİĞİNİN SPEKTRAL ANALİZ SONUÇLARI (^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, IR) 138
B 4,5,6,7-TETRAHIDRO-6-FENIL-4-OKSOBENZOFURAN-5-IL ASETAT (3) BİLEŞİĞİNİN SPEKTRAL ANALİZ SONUÇLARI (^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, IR) 145
C 1- BENZIL -6- FENIL- 6,7- DIHIDRO -1H -INDOL -4(5H) -ON (4) BİLEŞİĞİNİN SPEKTRAL ANALİZ SONUÇLARI (^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, IR 152

D 1-BENZIL-4-OKSO-6- FENIL- 4,5,6,7- TETRAHIDRO- 1H- INDOL- 5-IL-ASETAT (5) BİLEŞİĞİNİN ^{1}H-NMR VE IR ANALİZ SONUCU 159

E 4,5,6,7- TETRAHIDRO -6 -FENIL -4 -OKSOBENZOFURAN -5 -IL-HIDROKSI (6) BILEŞIĞININ ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, IR VE 1-BENZIL-4-OKSO-6-FENIL-4,5,6,7-TETRAHIDRO-1H-INDOL-5-IL-HIDROKSI (7) BİLEŞİĞİNİN IR ANALİZ SONUÇLARI 163

F 4,5,6,7-TETRAHIDRO-6-FENIL-4-OKSOBENZOFURAN-5-IL-ASETAT (3) VE 1-BENZIL-6-FENIL-6,7-DIHIDRO-1H-INDOL-4(5H)-ON (4) BİLEŞİKLERİ İLE YAPILAN BİYOTRANSFORMASYON SONRASI ELDE EDİLEN YENİ ÜRÜNLERİN HPLC ANALİZ SONUÇLARI 167

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR 172

SİMGE LİSTESİ

α	Alfa
γ	Gama
g	Gram
C	Konsantrasyon
L	Litre
µ	Mikro
µl	Mikrolitre
µmol	Mikromol
mg	Miligram
ml	Mililitre
M	Molar
nm	Nanometre
°C	Santigrat derece

KISALTMA LİSTESİ

CAL B	Candida antarctica Lipaz B
CCL	Candida cyclindracea Lipaz
Cr	Krom
Cu	Bakır
CRL	Candida rugosa Lipaz
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
ee	Enantiyomerik fazlalık
FDA	Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GTPaz	Guanozintrifosfataz
HEWL	Rekombinant tavuk yumurta lizozimi
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
$KMnO_4$	Potasyum permanganant
K_2CO_3	Potasyum karbonat
LSD	Liserjik asit dietilamid
Mb	Megabaz
MJL	Mucor javanicus Lipaz
Pb	Kurşun
PBS	Poli(butilen sukkinat)
PCL	Penicillum camemberti Lipaz
pH	Power of hydrogen
PLL	Pseudomonas lipoprotein Lipaz
PRL	Penicillum roqueforti Lipaz
TCA	Trikarboksilik asit döngüsü
THF	Tetrahidrofuran
UV	Ultraviyole
WGL	Wheat germ Lipaz

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1 Aspergillus niger'in sırasıyla; PDA besiyeri üzerinde 6 günlük inkübasyonu, mikroskop üzerinde 40x ve 100x görüntüsü 25

Şekil 2. 2 Aspergillus oryzae; PDA besiyeri üzerinde 5 günlük inkübasyon sonucu ve mikroskop üzerindeki yapısal görüntüsü (100x)..... 31

Şekil 2. 3 A. oryzae'nin farklı büyüme aşamalarındaki fenotipi (soldan sağa: 24 saat, 48 saat ve 72 saat [59] 31

Şekil 2. 4 A.oryzae'nin birleştirilen genom dizilerinin şematik gösterimi [63] 35

Şekil 2. 5 A.oryzae organellerinin şematik modeli [63]..... 35

Şekil 2. 6 A.oryzae için önerilen hücre içi veziküler trafiği modeli [65] 36

Şekil 3. 1 Benzofuran halkasal yapısı..... 39

Şekil 3. 2 Sırasıyla; benzo(b)furan ve benzo(c)furan 39

Şekil 3. 3 Kumarinin benzofuran-2-karboksilik aside sentezi ile benzofuran eldesi 40

Şekil 3. 4 Sırasıyla; ilk benzofuran türevi Kumarilik asit ve Khellin..... 42

Şekil 3. 5 Anti-kanser benzofuran türevleri..... 43

Şekil 3. 6 Anti-kanser özellik gösteren sentetik benzofuran türevleri..... 43

Şekil 3. 7 Anti-diyabetik benzofuran türevi 44

Şekil 3. 8 Anti-diyabetik özellik gösteren benzofuran türevleri..... 44

Şekil 3. 9 Anti- alzheimer özellikte benzofuran türevleri 45

Şekil 3. 10 Anti-alzheimer özellik gösteren füzyon benzofuran türevi..... 45

Şekil 3. 11 Antibakteriyel ve antifungal özellik gösteren benzofuran bileşikleri . 46

Şekil 3. 12 Antibakteriyel ve antifungal özellik gösteren benzofuran bileşik analogları 46

Şekil 3. 13 Antiinflamantuvar aktivite gösteren benzofuran bileşiği 47

Şekil 3. 14 Antienflamantuvar etkileri açısından in-vitro COX-1/COX-2 inhibe edici aktivite sergileyen benzofuran türevleri..... 47

Şekil 3. 15 Analjezik ve anti-inflamatuar aktivite gösteren benzofuran türevleri...48

Şekil 3. 16 Antioksidan özellikler barındıran benzofuran türevleri 48

Şekil 3. 17 İndigo boyası kullanılarak sırası ile elde edilen; isatin, oksindol, indol 49

Şekil 3. 18 İndol çekirdeği içeren triptofan, serotonin ve melatonin hormonları.. 49

Şekil 3. 19 İndol, benzen ve pirol yapıları..... 50

Şekil 3. 20 İndol izomerleri 50

Şekil 3. 21 Benzo(b)pirol ve benzo(c)pirol numaralandırılması 51

Şekil 3. 22 İndol'ün rezonansı 51
Şekil 4. 1 Alanin molekülünün (enantiyomerler) ayna görüntüleri 62
Şekil 4. 2 Rasemik karışım 64
Şekil 4. 3 Farklı tat ve kokulara sebep olan enantiyomer çiftleri 65
Şekil 4. 4 Rasemik ilaçların insan vücuduna etkileri 66
Şekil 4. 5 Bir kiral ilacın iki enantiyomeri arasındaki varsayımsal etkileşim ve bağlanma bölgesi 67
Şekil 4. 6 Enantiyosaf bileşiklerin sentez yöntemleri 68
Şekil 5. 1 Progesteronun mikrobiyal biyotransformasyonu 72
Şekil 5. 2 Pasteur'ün fermentasyon sonrası elde ettiği (S,S)-tartarik asit 79
Şekil 5. 3 Metalon enantat'ın (A) A.niger tarafından biyotransformasyonu 81
Şekil 5. 4 A.niger tarafından etisteron'un (B) biyotransformasyonu 82
Şekil 5. 5 A.wentii tarafından 19-nortestosteron (C)'nun biyotransformasyonu .. 82
Şekil 5. 6 6-dehidroprogesteronun (D) A.niger tarafından biyotransformasyonu. 83
Şekil 5. 7 Androst-4-ene-3,17-dion (E) bileşiğinin Aspergillus sp. PTCC 5266 tarafından biyotransformasyonu 83
Şekil 5. 8 Diterpen ent-pimaradienoik asit'in (F) A.niger ile biyotransformasyonu 84
Şekil 5. 9 Curdione'nin (G) Aspergillus niger tarafından biyotransformasyonu ... 84
Şekil 5. 10 Etilbenzen'in (H) A.niger tarafından mikrobiyal biyotransformasyonu 85
Şekil 5. 11 Epiandrosteron (I) ve dehidroepiandrosteron (J) bileşiklerinin A.candidus ve A. parasiticus tarafından biyotransformasyonu 85
Şekil 5. 12 Amino asit L -fenilalanin (K), A. niger tarafından biyotransformasyonu 86
Şekil 5. 13 İndol'ün (L) A.niger tarafından biyotransformasyonu 86
Şekil 5. 14 Triptamin'in (M) A. niger tarafından biyotransformasyonu 86
Şekil 5. 15 Trimetoksi izoflavonların (N ve O) A. niger tarafından biyotransformasyonu 87
Şekil 5. 16 Kumarin 7'nin A. brasiliensis tarafından biyotransformasyonu 87
Şekil 5. 17 Kinazolin'in (P) A.niger tarafından biyotransformasyonu 88
Şekil 5. 18 N-benzoilkarbazol (R) ve N-asetilkarbazolün (S) A. flavus tarafından biyotransformasyonu 88
Şekil 5. 19 Klorojenik asit'in (T), A. niger tarafından biyotransformasyonu 88
Şekil 5. 20 (U) bileşiğinin A.niger biyotransformasyonu 89
Şekil 5. 21 Rasemik flurbiprofenin A.oryzae ile rezolüsyonu 89
Şekil 5. 22 Klorojenik asit'in kafeik aside A.oryzae ile biyotransformasyonu 89

Şekil 5. 23 Daidzein'nin 8-hidroksidaidzein bileşiğine A.oryzae BCRC 32288 ile biyotransformasyonu 90

Şekil 7. 1 (2) bileşiği sentez prosedürü..... 96

Şekil 7. 2 (2) bileşiği sentez basamakları 97

Şekil 7. 3 (2) bileşiği sentez optimizasyon İTK sonuçları..... 98

Şekil 7. 4 (3) bileşiği sentez reaksiyonu 98

Şekil 7. 5 (3) bileşiği sentez aşamaları 99

Şekil 7. 6 1-benzil-6-fenil-6,7-dihidro-1H-indol-4(5H)-on (4) sentez prosedürü 100

Şekil 7. 7 1-benzil-6-fenil-6,7-dihidro-1H-indol-4(5H)-on (4) sentez akış şeması 100

Şekil 7. 8 1-benzil-4-okso-6-fenil-4,5,6,7-tetrahidro-1H-indol-5-il asetat (5) sentezi prosedürü 102

Şekil 7. 9 1-benzil-4-okso-6-fenil-4,5,6,7-tetrahidro-1H-indol-5-il asetat (5) sentez ve saflaştırma akış şeması..... 102

Şekil 8. 1 Sentezlenen (2) bileşiğinin kolon kromatografisi ile saflaştırılması sonrası İTK görüntüsü..... 106

Şekil 8. 2 (2) sentez optimizasyon çalışması ve reaksiyon verimleri..... 107

Şekil 8. 3 (3) bileşiğinin kolon kromatografisi ile saflaştırılması sonrası İTK görüntüsü 108

Şekil 8. 4 1-benzil-6-fenil-6,7-dihidro-1H-indol-4(5H)-on (4) bileşiğinin kolon kromatografisi ile saflaştırılması sonrası İTK görüntüsü 108

Şekil 8. 5 1-benzil-4-okso-6-fenil-4,5,6,7-tetrahidro-1H- indol- 5-il- asetat kolon kromatografisi ile saflaştırılması sonrası İTK görüntüsü 110

Şekil 8. 6 (3) bileşiğinin A.niger ATCC 6275 suşu ile gerçekleştirilen biyotransformasyon reaksiyonu..... 112

Şekil 8. 7 (5) bileşiğinin A.niger ATCC 6275 suşu ile gerçekleştirilen biyotransformasyon reaksiyonu..... 112

TABLO LİSTESİ

Tablo 2. 1 Aspergillus niger taksonomisi 25
Tablo 2. 2 Aspergillus niger suşlarından elde edilen sekonder metabolitler 30
Tablo 2. 3 A.oryzae'den izole edilen genler [58]..... 33
Tablo 3. 1 Bazı doğal benzofuran türevleri ve kimyasal yapıları 41
Tablo 3. 2 İndol sentez yöntemleri..... 58
Tablo 6. 1 Deneysel çalışmalar süresince kullanılan kimyasallar..... 92
Tablo 6. 2 Deneyde kullanılan cihazlar ve markaları 94
Tablo 6. 3 Kullanılan besiyerleri ve markaları..... 95
Tablo 6. 4 Deneyde kullanılan mikroorganizmalar ve markaları 95
Tablo 7. 1 (3) bileşiğinin MS Q-TOF spekturum listesi 99
Tablo 7. 2 YS25 besiyeri içeriği 103
Tablo 8. 1 Mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyon sonuç çizelgesi..... 114
Tablo 8. 2 (3) bileşiğine ait biyotransformasyon reaksiyonu sonrası HPLC bulguları 116
Tablo 8. 3 (5) bileşiği biyotransformasyon reaksiyonu HPLC analiz sonuçları . 116
Tablo 8. 4 Grubumuzun yaptığı çalışma [223] ile bu çalışma sonuçlarının ee oran karşılaştırması 117

ÖZET

ASPERGİLLUS TÜRLERİ İLE FARMAKOLOJİK OLARAK AKTİF ÜRÜNLERİN BİYOTRANSFORMASYONU

LEYLA YILMAZ KARA

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç.Dr. Zerrin ÇALIŞKAN

Endüstriyel alanda sıkça kullanılan mikroorganizmalar, kimya ve farmakoloji alanında da özellikle hammadde ve ilaç etken madde sentezlenmesi amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. Klasik kimyasal sentez yöntemleri ile elde edilemeyen enantiyosaf bileşiklerin üretilmesi amacıyla biyolojik katalizörler olarak kullanılan mikroorganizmalarla biyotransformasyon çalışmaları yapılmaktadır. Bu çalışmada geniş bir biyolojik aktivite aralığına sahip olan benzofuranon ve indol türevi bileşikler ile biyotransformasyon reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 5-fenil-1,3-siklohegzadion maddesinden başlanarak 6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on sentezlenmiştir. Ardından regioselektif asetoksilasyon reagent'ı aracılığıyla 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oxo-benzofuran-5-il-asetat rasemik olarak sentezlenmiştir. 6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on bileşiği benzil amin varlığında indol türevi olan 1-benzil-6-fenil-6,7-dihidro-1H-indol-4(5H)-on sentezlenmiş ve bu indol türevi kullanılarak regioselektif asetoksilasyon reagent'ı

aracılığıyla 1-benzil-4-okso-6-fenil-4,5,6,7-tetrahidro-1H-indol-5-il-asetat bileşiği rasemik olarak sentezlenmiştir. Çalışmanın son aşamasında rasemik olarak sentezlenen bu bileşiklere, *A.niger ATCC 6275* ve *A.oryzae Rıb40* suşları ile biyotransformasyon reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Bu mikroorganizmalar aracılığıyla gerçekleştirilen reaksiyon sonunda optikçe saf benzofuran ve indol türevleri literatürde ilk defa sentezlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Benzofuranon, indol, biyotransformasyon, *Aspergillus niger, Aspergillus oryzae.*

ABSTRACT

BIOTRANSFORMATION OF PHARMACOLOGICAL ACTIVE COMPOUNDS WITH ASPERGILLUS SPECIES

LEYLA YILMAZ KARA

Department of Molecular Biology and Genetics

Master of Science Thesis

Advisor: Assoc. Prof. Zerrin ÇALIŞKAN

Microorganisms commonly used in the industrial field have also started to be utilized in the fields of chemistry and pharmacology, particularly for the synthesis of raw materials and active pharmaceutical ingredients. Studies on biotransformation with microorganisms used as biological catalysts are conducted with the aim of producing enantiopure compounds that cannot be obtained through classical chemical synthesis methods. In this study, biotransformation reactions were performed with benzofuranone and indole derivatives, which have a wide range of biological activities. Starting from 5-phenyl-1,3-cyclohexadione, 6,7-dihydro-6-phenylbenzofuran-4(5H)-one was synthesized. Subsequently, 4,5,6,7-tetrahydro-6-phenyl-4-oxo-benzofuran-5-yl-acetate was synthesized racemically through regioselective acetylation using acetylation reagent. The compound 6,7-dihydro-6-phenylbenzofuran-4(5H)-one was synthesized by reacting with benzyl amine, which is an indole derivative, and using this indole derivative, 1-benzyl-4-oxo-6-phenyl-4,5,6,7-tetrahydro-1H-indol-5-yl-acetate was synthesized racemically via regioselective acetylation reagent. In the final stage of the study,

racemic compounds synthesized were subjected to biotransformation reactions with *A.niger ATCC 6275 and A.oryzae Rıb40* strains. Optically pure benzofuran and indole derivatives were synthesized for the first time in the literature through reactions conducted with these microorganisms.

Keywords: Benzofuran, indole, biotransformation, *Aspergillus niger, Aspergillus oryzae.*

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Biyolojik olarak aktif ürünler olan benzofuran ve indol türevlerinin, terapötik özellikler barındırdığı ve bu nedenle yeni ilaç etken maddeleri olarak üretilme potansiyelini taşıdıkları belirtilmiştir. Her iki bileşiğin heterohalkalı yapıda olmaları ve ayrıca indolün barındırdığı elektron bakımından zengin pirol yapısı, içerdiği azot sayesinde kazandığı hidrojen bağı yapabilme kapasitesi aracılığıyla kimyasal reaksiyonlara kolayca dahil olabilirler [1].

Benzo[*b*]furan iskeleti, biyolojik olarak aktif doğal birçok üründe, farmasötik kimyasında ve malzeme kimyasında kullanılmak üzere çeşitli moleküllerde bulunur. Benzofuran çekirdeğine sahip bileşikler doğada geniş bir yelpazede bulunur ve doğal veya sentetik kaynaklardan elde edilebilirler. Bu bileşikler, ekstraktlardan veya uçucu yağların ekstraksiyonu yoluyla elde edilir. Doğada bolca bulunmaları onların ekstraksiyonunu ve purifikasyonunu kolaylaştırdığı için yapılarının ve biyolojik ve fizyolojik özelliklerinin araştırılmasında önemli avantajlar sağlar. Bunları bakteri ve mantarların metabolitleri olarak da elde etmek mümkündür. Elde edilmesi kolay olan benzofuranonlar binlerce çeşit bileşiğin sentezinde bir yapı iskeleti ve yapı taşı olarak kullanılmaktadır [2], [3], [4].

Mustapha ve arkadaşları [5] benzofuran ve kromon iskeletleri taşıyan ve khellin olarak adlandırılan doğal kaynaktan ilk benzofuran bazlı molekülü izole etmeyi başarmış ve bu başarıdan sonra doğal kaynaklardan izole edilen veya sentetik olarak sentezlenen çok fazla benzofuran bileşiği ortaya çıkarak biyolojik özellikleri sayesinde benzofuran çekirdeği ilgi konusu haline gelmiştir. Benzofuran türevleri anti-kanser, anti-alzehimer, anti-fungal ve anti-bakteriyel, antioksidan, anti-diyabetik, anti-mikrobiyal, anti-enflamantuvar vb. ajanlar olarak kullanılmaktadır [6], [7], [8], [9], [10], [11].

Bitkilerde, hayvanlarda ve deniz canlılarında oldukça yaygın olan indol çekirdeği, üretilen birçok ilacın temel yapısını oluşturmakla birlikte triptofan aminoasidi, bitki büyüme hormonu olan oksin, melatonin ve serotonin hormonları da indol türevi biyolojik yapılardır [12], [13], [14], [15]. İndol çekirdeğinin çok geniş bir biyolojik

aktivite aralığına sahip olduğu çeşitli araştırmalar sonucu anlaşılmıştır. Bitkilerden ekstraksiyon ile doğal yollarla elde edilen veya kimyasal yollarla sentezlenen indol türevleri ile yapılan çalışmalar ve moleküler docking analiz verilerine dayanarak reseptörlerle olan etkileşimleri incelenmiştir. İncelemeler sonucu bu ayrıcalıklı moleküller reseptörlere yüksek afinitelerle bağlandıklarından bu durumun indol türevlerini ilaç geliştirme çalışmalarına doğrudan dahil ettiği belirtilebilir [16], [17], [18].

İndol çekirdeğinin elektrofilikliği sayesinde kazandığı avantajlar indol türevlerinin sentez reaksiyonlarının araştırılmasını sağlamış ve böylece sentetik manipülasyonlar için literatür bilgisi ihtiyacını karşılamıştır. Günümüzde yapılan indol araştırmaları çok basit çekirdek indol yapısından, karmaşık indol türevlerine uzanmaktadır [1].

Birçok indol türevi tıbbi kimyanın gelişimine önemli katkıda bulunmuştur. Vazokonstriktör prensibi ile bilinen serotonin, [15] psikotomimitik indol türevlerinden olan **psilosin ve psilosibin**, anti-tümör aktivite için **vincristine, vinblastine, vinorelbine** ve **vindesine**, anti-aritmik aktivite için **ajmaline** ve **glokom** ve Alzheimer hastalığı için **fizostigm** dahil olmak üzere doğal olarak oluşan bazı indol alkaloidleri örnek olarak verilebilir [19]. Doğal bileşiklerden ilham alınarak sentetik olarak sentezlenen ve FDA tarafından onaylanan bazı indol bileşikleri de bulunmaktadır. Anti-enflamatuar aktivite ile ilişkili olarak bilinen **indometasin**, kemoterapinin neden olduğu bulantı ve kusmaya engel **ondansetron**, hiperkolesterol için **fluvastatin** ve lökotrien reseptör antagonisti olarak **zafirlukast** bunlara birkaç örnektir [20].

Sterokimya kavramı farmakolojide önemli bir kavramdır. Farmakopede rasemat ilaçların hakim olduğu yılların sonrasında enatiyosaf ürünlerin öneminin anlaşılması ile birlikte önemli miktarlarda enantiyosaf ürünlerin üretilmesine olanak sağlayan teknolojiler gelişmiştir. Bu sayede ilaç etkisinin stereokimyasına yönelik ilgi artmış ve bu alana yönelik çalışmalar hızlanmıştır. 1992'de yayınlanan FDA politikası ile birlikte rasemat olarak uygulanan ilaçlar yerine tek enantiyomer sentezine ağırlık verilmiştir. Günümüz ilaç piyasasındaki ilaçların %56'sı kiral yapıda olup bu ilaçların %88'i rasemat olarak uygulanmaktadır [21].

Eller gibi enantiyomerler de çiftler halindedir. Bir enantiyomer çiftinin her iki molekülü de aynı kimyasal bileşime sahip olup iki boyutta aynı şekilde çizilebilir. Enantiyomerlerin aynı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olduğu görülür; bu, kaynama noktaları, erime noktaları ve yoğunluk gibi özelliklerin benzerlik gösterdiği anlamına gelir. Bu nedenle bu molekülleri birbirinden kristalizasyon, ekstraksiyon, distilasyon gibi yöntemler ile ayırmak çok zordur [22].

Biyotransformasyon reaksiyonları, hücreler, organlar veya enzimler tarafından katalize edilen kimyasal reaksiyonlardır. Bu reaksiyonlar, canlı sistemlerde metabolik süreçlerin bir parçası olarak gerçekleşir. Biyotransformasyon reaksiyonları, organik veya inorganik bileşenlerin dönüşümünü ve istenmeyen veya toksik ürünlerin sistemden uzaklaştırılmasını sağlar. Bu süreç, biyolojik kaynaklardan elde edilen mikroorganizmalar ve enzimlerin kullanımıyla yeni bileşikler elde etmek amacıyla da kullanılır [23].

Biyotransformasyon reaksiyonları, ilaç ve kimya endüstrisi için birçok avantaj sunar, örneğin stereoselektif kataliz, substrat aktivasyonu ve ılıman rekasiyon koşulları gibi [24] Biyotransformasyon reaksiyonlarının, eski çağlardan beri kullanılan bir teknik olduğu ve günlük hayatta farkında olmadan uygulandığı bilinmektedir. Tarihte bilinen en eski biyotransformasyon örnekleri, sirke üretimi ve alkollü içecek yapımında kullanılan fermantasyon süreçlerine dayanmaktadır. Günümüzde biyotransformasyon, 19. yüzyıldan itibaren mikroorganizmaların kimyasal bileşikleri değiştirme potansiyelinin keşfiyle daha fazla araştırılmış ve geliştirilmiştir [25]

Endüstriyel öneme sahip bileşiklerin elde edilmesi amacıyla biyolojik sistemlerin veya enzim sistemlerinin katalizör olarak kullanılması olarak adlandırılan biyotransformasyon süreçleri, kullanılan biyokatalizörlere göre iki kategoride sınıflandırılır; enzimatik sistemler ve bütün olarak kullanılan hücre sistemleri (mikroorganizmalar, hayvan ve bitkilere ait doku veya hücre kültürleri, canlı bitki, insan metabolizması vb). Bütün hücre sistemleri endüstriyel alanda en çok tercih edilen tekniktir. Bunun nedenleri ise optimum kataliz koşulların varlığı, gerekli kofaktörlerin üretilip rejenere edilme yetenekleri, uygun hücresel koşullar sağlandığı takdirde enzimlerin bu sistemlerde daha düzgün katlanması ve ekonomik proses imkanın yüksek olması olarak verilebilir [26, 27]

Kimyasal reaksiyonlardan farklı olarak katalizör olarak canlı sistemlerini ve enzimleri merkezine alan biyotransformasyon reaksiyonları, daha hassas tepkime koşulları ile kimyasal reaksiyonlardan farklıdır. Bu hassas tepkime koşullarını etkileyen faktörler; pH, ortam sıcaklığı, besiyeri içeriği, eklenen substrat derişimi ve toksisitesi, oksijen miktarı, mikroorganizma suşu kökeni, çalkalama hızı ve zaman'dır [26, 27] [28]

Bu çalışmada biyotransformasyon basamaklarında kullanılan aspergillus türleri, mantarlar aleminin en kalabalık türlerinden olan küf mantarları olarak bilinirler. Çeşitli aspergillus suş kültürlerinin benzen ve naftalin, nitrojen içeren heterosiklik yapılar, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, terpenoidler, steroidler ve diğer alifatik ve aromatik bileşikleri biyotransformasyona uğrattığı belirlenmiştir. İçerdikleri enzim kompleksleriyle farklı bileşiklerden yeni ilaç etken ve/veya hammadde sentezlenmesi için aday mikroorganizmalardır. Çalışkan ve ark.'nın A.niger küfü kullanarak yaptıkları biyotransformasyon çalışmasında indol halkasının azot atoumuna bağlı benzil halkasının koparıldığı keşfedilmiştir. Bu çalışma aynı zamanda gerçekleştirilen çalışmanın temelini oluşturmaktadır [29].

1.2 Tezin Amacı

İlaç sanayide önemli bir yeri bulunan, farmakolojik olarak aktif olan benzofuranon ve indol türevi bileşiklerin sentezlenerek biyoteknolojik yöntemler aracılığıyla mikrobiyal biyotransformasyon gerçekleştirmesi ve rasemik olarak sentezlenen bu ilaç öncü maddelerin enatiyosaf olarak elde edilmesi çalışmamızın amacını oluşturmaktadır. Bu metod ile klasik kimyasal sentez yöntemlerinin çoklu basamaklarda gerçekleştirdiği sentez adımları biyotransformasyon aracılığıyla tek basamağa indirgenmiştir. Böylelikle biyotransformasyon ile çevreye minimum düzeyde kirletici salınmasını sağlanmıştır. Aynı zamanda sentez prosedürleri optimize edilerek verim arttırma çalışmaları da yapılan bu projenin amaçlarından bir diğeridir.

Bu amaç doğrultusunda, yüksek verimlilik ve seçicilikle sentezlenen 6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on bileşiği, başlangıç materyali olarak 5-fenil-1,3-siklohegzadion kullanılarak elde edilmiştir. Ardından 6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on bileşiğinden 4,5,6,7-tatrahidro-6-fenil-4okso-benzofuran-5-il-asetat bileşiği sentezlendi. İndol türevi olan 1-benzil-6-fenil-6,7-

dihidro-1H-indol-4(5H)-on bileşiği ise 6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on bileşiği kullanılarak sentezlendi ve $KMnO_4$ reagent varlığında indol türevi 1-benzil-6-fenil-6,7-dihidro-1H-indol-4(5H)-on bileşiğine regio-selektif asetoksilasyon gerçekleştirilerek rasemik 1-benzil-4-oxo-6-fenil-4,5,6,7-tetrahidro-1H-indol-5-il-asetat bileşiği elde edildi. Sentezlenen benzofuran ve indol türevlerinin, Aspergillus niger ve Aspergillus oryzae küf mantarları kullanılarak enantiyoseçimli sentezleri gerçekleştirildi.

1.3 Hipotez

İlaç sanayinde ve endistriyel uygulamalarda sıklıkla kullanılmaya başlanan biyotransformasyon reaksiyonları, kimyasal sentez yöntemleri ile oldukça zor gerçekleşen reaksiyonları katalizlemesi ve sentez aşamalarının tek bir basamağa indirilmesini sağlar. Bir diğer yandan ise kiral merkezli moleküllerin kimyasal sentezlerle üretilmesi halinde rasemik karışımlar elde edilirken biyotransformasyon reaksiyonları aracılığıyla kinetik resolüsyon gerçekleşmekte ve enantioyomerik saflıkta ürünler elde edilmektedir. Bu çalışmada biyokatalizör olarak mikroorganizmalar kullanılarak benzofuranon ve indol türevi bileşikler üzerinde bir dönüşüm hedeflenmiştir. Bu amaçla önerilen hipotez şu şekildedir:

i. Benzofuranon ve indol türevi bileşiklerin, küf mantarları kullanılarak biyotransformasyon reaksiyonları ile biyodönüşümün gerçekleştirilmesi ve bu şekilde yeni türevler elde edilmesi.
ii. Biyotransformasyon reaksiyonu esnasında substratın mikroorganizma üzerinde herhangi bir değişim yaratıp yaratmayacağının takip edilmesi.
iii. Gerçekleştirilen tüm sentez basamaklarının reaksiyon koşullarının optimizasyonunu içeren sürecin takibi ve spektral analizler ile tüm bileşiklerin yapı tayini.
iv. Sentezlenmesi hedeflenen bileşiklerin doğru ve etkili bir biçimde üretilmesi ile endüstriyel sanayi ve farmasötik kimya için büyük önem gösterecektir.

2
ASPERGİLLUS TÜRLERİ

2.1 Mantarlar

Genellikle botanik ve mikrobiyoloji alanları arasında anlatılan funguslar, yeryüzünde tanımlanan yaklaşık 90.000 türü ile antartika buzullarından kavurucu çöllere, okyanus diplerinden hayvan bağırsaklarına kadar her yerde bulunabilen canlılardır [30, 31]. Karbonun geri dönüşümünde, fosfor ve azot gibi biyo-elementlerin harekete geçirilmesinde roller alırlar. Gıda kaynaklarını ve bitki ve hayvan soylarını tehdit edebilen patojenleri içeren funguslar aynı zamanda insanlar için besin (mantar), beslenme (ekmek, peynir,soya sosu) ve duyularımızı harekete geçirecek fermente edilmiş yiyecek, içecekleri (şarap,bira) sunar. Funguslar son zamanlarda hem ilaç üretiminde (penisilin, griseofulvin, siklosporin) hem de endüstriyel kullanımda (sitrik asit, gallik asit) sıkça yer edinmeyi başarmıştır [30, 31], [32].

Funguslar esasında kamçılı atadan türemiş olsalar da, yeryüzünde geniş yayılımlar göstermelerini sağlayan asıl yapı, bir hücre ipliği (hif) olarak büyümelerini sağlayan miselyum (hif ağı) denilen basit hücreli ve kamçılı olmayan yapıdır [30, 31], [33]. Hifler, sitozol ve organelleri içeren bir dış hücre duvarı ve iç lümenden oluşmaktadır. Çoğu mantar türlerine ait hifler, sitoplazmik akışa izin veren tek gözenekli veya çoklu gözenekli ve çapraz duvarlara sahip yapılar olan septalara (septum) sahiptir. Mantar hücrelerinin hücre duvarı bir polisakkarit olan ve N-asetilglukozamin kalıntıları içeren güçlü ve esnek yapılı kitinden oluşmaktadır [30, 31], [34]

Beslenme biçimi açısından ozmotrof olan mantarlar genellikle dış çevre ile temas halindedir. Mantarların yakın çevresi ile olan ilişkisi salgıladığı bir dizi protein ve metabolitler sayesinde gerçekleşir. Çoğu türü aerobik olan mantar türlerinden bazıları fakültatif olarak anaerobik olup (mayalar gibi) fermantasyon yolu ile glikozdan etil alkol üreterek enerji elde ederler [30, 31], [35].

Mantarlar genel olarak hücre dışına salgılanacak enzimler üretirler ve enzimler aracılığıyla substratlara etki ederek yaşamlarını devam ettirirler. Çevresinde bulunan bazı istilacı türlere veya mikroplara karşı, koruma amaçlı olarak bazı

kimyasal toksik bileşikler üretir ve salgılarlar. Bu şekilde bulundukları ortamın kontrolünü ele geçirirler. Sindirilmesi oldukça zor olan lignin ve selüloz gibi polisakkaritleri parçalayarak içindeki besinleri çıkarmalarını ve sindirmelerini sağlayan iyi gelişmiş salgı (sekretum) sistemlerine sahiptirler. Mantarlar, hifleri aracılığıyla eşeyli veya eşeysiz olarak çoğalmalarını sağlayacak sporları üreterek uzun mesafelere yayılabilirler [34]

Neredeyse tüm mantar alemi aşağıda listenen özellikleri paylaşır [30, 31];

- Sporlarında bir β-glukan veya kitin hücre duvarı
- Tek hücreli olmaları ve miselyum olarak büyümeleri
- Değişken büyüklüklerde olabilen çok çekirdekli ve silindirik hücre yapısı
- Lizin biyosentezi için amono-adipidik yolun varlığı
- Mitokondriyal krista varlığı.

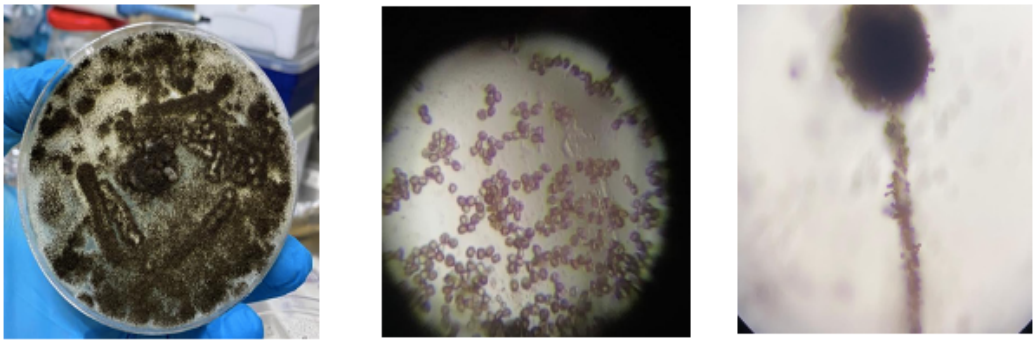
En güncel taksonomi biçimi ile mantarlar 9 ana soya bölünmüştür [30, 31]:

- Opisthosporidia,
- Chytridiomycota,
- Neocallimastigomycota,
- Blastocladiomycota,
- Zoopagomycota,
- Mucoromycota,
- Glomeromycota,
- Basidiomycota
- Ascomycota.

Ascomycota bölümü, kese mantarları olarak da bilinen Ascomycetes adı verilen ve Aspergillus türlerini de barındıran mantar aleminin alt bölümünü oluşturur. Bu bölümde yer alan çoğu mikroorganizma gıda bozulmalarına neden olurken bitkilerde yaprak küllenmeleri ve kestane yanıklığına neden olmaktadır. Kırmızı, kahverengi, mavi-yeşil küflerin çoğunluğu Ascomycetes'tir. Parazit olarak yaşamlarını sürdüren birçok Ascomycetes türü bulundukları yiyecek ve otları parazitleyerek insan ve hayvanlarda ergot hastalığına sebep olurlar. Toksik etkiler yaratan ergotizm kangrene, psikotik sanrılara, sinir spazmlarına ve hatta gebe kadınlarda kürtaja kadar neden olabilmektedir. Tüm bunlara liserjik asit dietilamid (LSD) aktif bileşeni sebep olmaktadır [30, 31].

2.1.1 Aspergillus Niger

Siyah sporlu mitosporik mantar olan Aspergillus niger, yuvarlak hücrelerden meydana gelen mayalardan farklı olarak eşeysiz üremenin özelliklerinden biri olan organizma yapısından tomurcuklanan sporlar içerir. Aspergillus cinsi Nigri seksiyonundan türler olan A.niger (Tablo 2.1), karakteristik bir şekle sahip yuvarlak, siyah konidiyal bir baş ve ince uzun bir sap içerir ve filamentli küfler olarak adlandırılırlar Aspergillus cinsine ait mantarların oluşturduğu grup on beş üyeden oluşmaktadır. Bu grup içerisinde bulunan A.niger'in diğer türlerden ayrılmasını sağlayan en belirgin özelliği ürediği ortamın rengini çok koyu kahverengine veya siyaha döndüren sporlara (Şekil 2.1) sahip olmasıdır [36], [37].



Şekil 2. 1 Aspergillus niger'in sırasıyla; PDA besiyeri üzerinde 6 günlük inkübasyonu, mikroskop üzerinde 40x ve 100x görüntüsü

Tablo 2. 1 Aspergillus niger taksonomisi

Alem	**Fungi**
Bölüm	**Ascomycota**
Sınıf	**Erotiomycetes**
Aile	**Trichocanoceae**
Cins	**Aspergillus**
Tür	**Aspergillus niger**

Aspergillus niger küfünü doğada hemen her yerde görmek mümkündür. Doğadaki bu geniş dağılımı; geniş bir sıcaklık aralığında bulunabilme (6-48 °C), geniş pH aralıklarında (1,4-9,6) etkinlik gösterme, aeorobik ortamlarda eşeysiz olarak çoğalabilme ve en önemlisi habitatında çok çeşitli substrat parçalayıcı enzimleri yüksek seviyelerde salgılayabilmesi sayesinde göstermektedir [37]. Genellikle saprofit (çürükçül) olarak beslenen A.niger, birçok tarım ürününde (örneğin, farklı türde meyveler, soğan, yemişler ve mısır) ksilanlar, pektinler, nişasta ve inülin gibi bitki hücre duvarı ve depolama polisakkaritleri monosakkaritlere dönüştürmede, ekmek ve patates gibi nişastalı yiyeceklerin bozulmasında sıklıkla karşımıza çıkmaktadır [38], [39]

Yaşamlarını sürdürebilmek için karbon kaynaklarına ihtiyaç duydukları düşünülse de, esasında A. niger organizması, diğer canlı organizmaların kullanmadığı besin kaynaklarının dahil olduğu ortamlarda da büyümektedir. Buna verilebilecek en önemli örnek nemli ortamlarda A.niger'in neden olduğu ve duvarlarda oluşan küflerdir. A. niger sporları yaygın olarak bulunur ve genellikle organik maddelerle ve toprakla karışmış bir şekilde sıklıkla görülür [37], [38], [39], [40].

A.niger'ler aslında fırsatçı patojenler olarak adlandırılırlar ancak uygun bir koşulların sağlandığı ortamlarda patojen gibi davranamadıkları için ABD Gıda ve İlaç İdaresi onları 'genel olarak güvenli kabul edilen' sınıflandırmaya dahil etmiştir. Çeşitli meyve, sebze (özellikle patates ve soğan) ve tahıllı gıdalarda çoğalabildikleri için insanlar veya hayvanlar tarafından yenildiğinde bazı hastalıkların ortaya çıkmasına neden olabilirler. Bozulan bu tür yiyecekler üzerinde oluşturdukları aflatoksin, fumanisin B2, okratoksin A gibi toksik maddeler mantar zehirlenmelerine yol açabilir. Bir diğer yandan *A.niger* sporları alerjik reaksiyonlara sebebiyet verebilmekte, ciddi local ve sistemik infeksiyonlara da neden olabilme potansiyeli taşımaktadır [9]. Bunun dışında yiyeceklere ve bazı bitkilerin köklerine de zarar verebildiklerinden ekonomik anlamda kayıplara neden olmaktadırlar [40].

Aspergillus'un anamorf cinsindeki türleri genelde melanize olmayan yapılara sahiptir ancak A.niger bunların dışında olup siyahımsı konidia üretir. Kültürlerde büyütüldüğünde hızlı bir şekilde gelişip koloniler oluşturur. A.niger'de eşeysiz üreme konidiofor denilen özel yapıda meydana gelir ve oluşan yapıya konidyum denir. Bu yapılar esasında miselyumdan dik olarak uzanan, kalın duvarlara sahip ve

apikale doğru genişleyerek uzanan ve bu şekilde vezikül oluşturan yapılar şeklinde ortaya çıkar. A.niger konidyum yüzeyi hidrofobik proteinlerden oluştuğundan konakçı dokulara yapışma kabiliyeti çok yüksektir. Ayrıca bu proteinler A.niger'i aşırı atmosferik ortamlarda bile dirençli hale getirir ve havada dolaşarak sporlarını her yere yaymalarını kolaylaştırır [41]. A.niger'in hücre duvarında bulunan, koyu kahverengi veya siyah bir pigment olan ve fenolik ya da indolik bileşiklerin oksidatif polimerizasyonu ile oluşmuş melanin, hücre içi asitlenmiş bölmelerde konidya göçünü bozarak fagositoza karşı koruma sağlar. Ayrıca bu pigmentin A.niger'i UV ışınlarına ve radyasyona karşı koruduğu bildirilmiştir. Bu özelliği sayesinde uluslararası uzay istasyonunda güçlü bir şekilde büyüyebildiği gözlemlenmiş ve metabolit profilleme çalışmaları ile radyasyona karşı koruma sağlayan 'antioksidan pyranonigrin A'nın' yükselmiş düzeylerde ürettildiği astronotik izolatlarda varlığı keşfedilmiştir [41], [42].

A.niger küfü, biyosorpsiyon olarak adlandırılan ve ağır metallerin (Pb(II), Cr(VI) ve Cu(II) vb.) kirli sulardan arıtılmasını veya geri kazanılmasını sağlayan işlemlerde de kullanılmaktadır [43], [44]

Olağanüstü metabolik çok yönlülüğü ve verimli salgılama mekanizması nedeniyle A.niger suşları biyokteknoloji firmaları tarafından üretim fabrikaları gibi kullanılmaktadır. A.niger tarafından organik asitler, proteinler, enzimler ve farmatösikler gibi çeşitli bileşiklerin üretilmesi ve bu ürünlerin kolayca izole edilerek kültür ortamına salınması sağlanır [38], [45]. Aşırı ortamlarda yetiştirilme koşullarını tolere edebildiklerinden katı hal veya batık fermentasyonlar için kullanılırlar. Büyük ölçekli endüstriyel üretimler ile alakalı özel fermentasyon protokolleri oluşturulmasına vesile olmuşlardır [45].

A.niger'in en önemli uygulama alanlarından birisi enzim üretimidir. 20. Yüzyılın ortalarında kromatografi teknikleri ile saflaştırma teknolojisindeki gelişmeler, üretilen enzim ve proteinlerin saflaştırılarak incelemesine imkan sağlamıştır. Bu enzim ve proteinler; laktoferrin, lipaz, laktaz, arabinaz, kitinaz asparaginaz, kreatinaz, katalaz, selülaz, tanaz, endo- ve ekzopoligalakturonidaz, β-galaktozidaz, liyaz, glucoamylase, pektinaz, pektin estaraz fitaz, peptidaz, pektin esteraz, proteaz, ksilanaz, glikoz oksidaz ve hemiselülozaz olarak belirtilebilir [42], [46]. Bu enzimlerden pektinaz'ın büyük bölümü A.niger tarafından sağlanmaktadır. Ayrıca bu konudaki en başarılı uygulamanın nişastanın glikoza dönüştürülmesinde rol alan

glukoamilaz enziminin üretilmesi olduğu belirtilebilir. Biyoteknoloji şirketleri bu yolla milyarlarca dolar kazanmışlardır [42].

A.niger'de klasik protein salgılama yolu, yüklenmiş kargo taşıyan veziküllerin aktin kabloları ve mikrotübüller boyunca endoplazmik retikulum/Golgi üzerinden alınıp hifal uca taşınmasını içerir. Bu veziküller sub-apikal bölgede bir araya gelir ve ardından çoklu protein kompleksi olarak adlandırılan eksokist aracılığıyla plazma membranı ile kaynaşarak kargo protein hücre dışına salınır. Ekstraselüler enzimler dışında hücre çeperi oluşumunda yer alan proteinler de veziküller aracılığıyla taşınır ve bu şekilde hücrenin büyümesi ve salgısı hifal uçta birleştirilir. A.niger'e ait önemli endüstriyel enzimlerin çoğunun, glukoamilaz'ın salgı veziküllerine lokalize olduğu ve N-terminal salgı sinyallerinin varlığını gösteren çalışmalar ışığında benzer yolları takip ettikleri düşünülmektedir [42], [47]. Hem toplam protein miktarını hem de enzimlerin salgılanmasını arttırmak amacıyla klasik salgılama yolu manipülasyonu devreye sokulmaktadır. Bu stratejiler vezikül taşınmasında rol oynayan GTPaz düzenleyicilerinin titrasyonlu ifadesi veya artmış hifal uç sayısı olan mutant suşların oluşturulması gibi yaklaşımları içermektedir. Bu yaklaşımlar ile glukoamilaz enzim salgılanmasının arttığı gözlemlenmiştir [48], [49].

Rekombinant teknolojinin gelişmeye başlaması ile birlikte, enzim üretim fabrikaları olan A.niger küflerinden heterolog ürün üretmek amacıyla denemeler yapılmıştır. A.niger'in homolog olmayan rekombinasyon sistemi, spesifik morfolojisi ve sınırlı ifade stratejileri nedeniyle genetik manipülasyon kısıtlanmaktadır [38], [50].

Ancak buna rağmen A.niger konakçı olarak kullanılarak rekombinant tavuk yumurta lizozimi (HEWL) enzimi üretmesi sağlanmıştır [51]. Bunun dışında ikincil metabolitlerden olan kojik asit ve itakonik asit gibi organik asitler de rekombinant teknoloji yöntemi ile A.niger tarafından ürettirilmiştir. Doğal olarak kojik asit üreten Aspergillus oryzae *kojA* geninin A.niger'de ifade edilmesiyle ilk başarılı heterolog kojik asit üretimi sağlanmıştır [52]. İtakonik asit Aspergillus terreus tarafından üretilen ikincil metabolitlerdendir ve bu ürüne ait genin A.niger'de ifadesi itakonit asit üretimini sağlamıştır [53].

A.niger, farklı türlerde ucuz substratları kullanarak bunları bizler için değerli olan moleküllere ve maddelere dönüştüren çok amaçlı hücresel fabrikalardır. Bu amaçla Currie [54] şeker solüsyonu kullanarak ve pH'ı düşük seviyelerde tutarak A.niger küfünü kültürlemiş ve ticari değeri oldukça fazla olan sitrik asidin yüksek miktarlarda biyosentezinin gerçekleştiğini keşfetmiştir. Sitrik asit, gıda sanayinde ürün dayanıklılığını arttırmak, kimya sanayide, kozmetik sanayide ve farmasötik kimyada yaygın olarak kullanılan bir organik asittir [40]. Bunun ardından Pfizer tarafından 1920 yılında A.niger kültür ortamına basit şekerler eklenerek sitrik asit fermentasyonu geliştirilmiş ve sitrik asit ticareti bu şekilde başlamıştır [42].

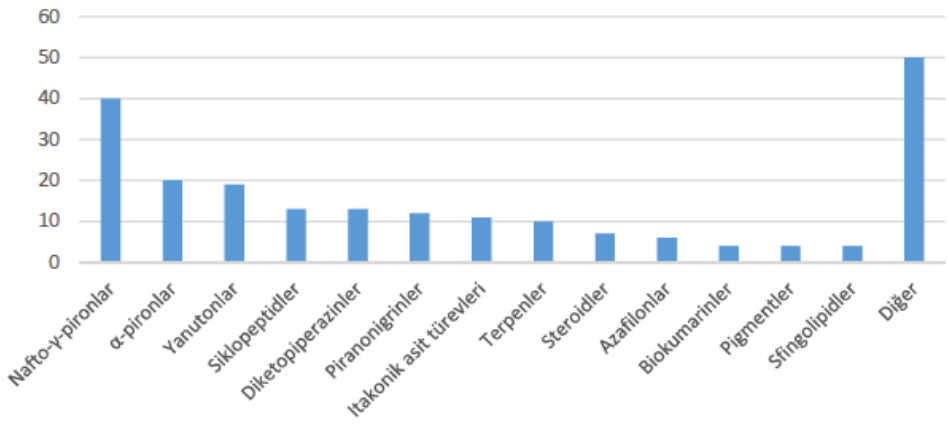
A.niger tarafından üretilen ve endüstriyel anlamda önemli sayılabilecek organik asitler A.niger küfünün TCA (trikarboksilik asit döngüsü) metabolitleridir. Bu metabolitler organizmanın belirli büyüme evrelerinde veya çeşitli çevresel uyaranlara (düşük pH, fosfat kısıtlaması gibi) yanıt olarak üretilirler. Sitrik asit TCA döngüsünde geri dönüşmediğinden mitokondriyal membranda bulunan malat/sitrat taşıcıları aracılığıyla sitoplazmaya taşınır, ordan da hücre dışına salgılanır. Bir diğer TCA döngü metaboliti olan malik asit de sitrik asit ile benzer yollardan geçerek hücre dışına salgılandığı belirlenmiştir. Bir diğer önemli nokta ise sitoplazmik malik asidin artışının mitokondriyal membran aracılığıyla malik asit ve sitrik asidin değişimi nedeniyle A. niger'da sitrik asit fermantasyonunu başlatabileceği hipotez edilmiştir [42]. A.niger tarafından üretilen metabolitlere örnek olarak TCA döngüsünden bağımsız olarak geniş çapta üretilen önemli bir asit olan glukonik asit ve gallik asit gibi yenilebilir organik asitler verilebilir [38], [42].

Metabolomik ve transkriptomik gibi tekniklerin gelişmesiyle birlikte A.niger'in bazı suşlarına ait tam genom dizisi aydınlatılarak yayınlanmış ve ikincil metabolitlere ait genlerin anlaşılmasını sağlayarak doğal ürünlerin biyosentezi hakkında bilgi edinmemiz sağlanmıştır [55].

A.niger küfleri, çok sayıda ve çeşitte yararlı denilebilecek enzim ve organik asit üretmenin dışında ikincil metobolitler de üretirler. Çeşitli biyolojik aktivitelere (anti-tümör, anti-enflamantuar, antioksidan vb.) [40] sahip olan ikincil metabolitler büyümenin durduğu veya yavaşladığı esnada üretilirler. Bu ikincil metabolitler bir veya daha fazla önemli enzim kodlayan genlerden oluşan biyosentetik gen kümesi tarafından üretilirler. Biyosentetik gen kümeleri aynı zamanda ikincil metabolitlerini taşımaya yarayan membran taşıyıcılarını ve Biyosentetik gen

kümeleri ifadesini düzenleyen traskripsiyon faktörlerini de kodlayabilirler [42]. Son dönemlerde A.niger'den çeşitli biyoaktiviteler gösteren steroller, terpen, peptidler, alkaloidler, poliketidler, laktonlar, halojenler gibi yeni sekonder metabolitler izole edilmiştir (Tablo 2.2) [40].

Tablo 2. 2 Aspergillus niger suşlarından elde edilen sekonder metabolitler



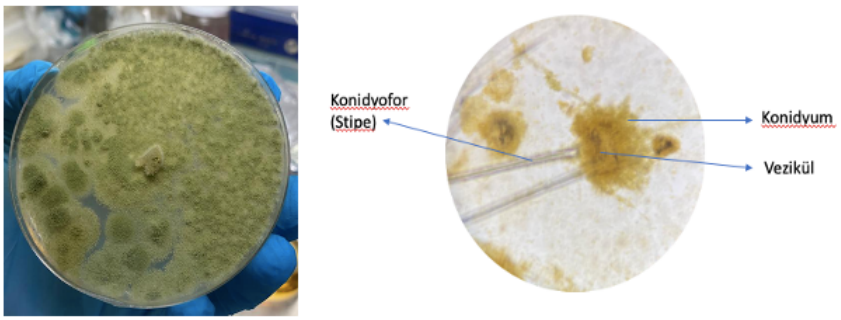
Andersen ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptıkları çalışma neticesinde A.niger küfüne ait stokiyometrik bir metabolik ağ modeli oluşturularak hücre içi enzimatik aktivitelerinin kapsamlı bir kataloğu oluşturulmuştur. Ağ, üç bölmeye dağıtılmış toplam 1045 metabolit içerir; hücre dışı, sitosolik ve mitokondriyal. Bu metabolik ağ boşluksuz olarak 1190 biyokimyasal reaksiyon içerir. Metabolik ağda toplamda 52 enzim kompleksi tanımlanmıştır [56].

2.1.2 Aspergillus Oryzae

Aspergillus oryzae ilk olarak 1876 yılında H.Alburg tarafından sake (Japonlara özgü, pirinç veya tahıl tozundan üretilen içki) üretiminde kullanılan ve bir enzim müstahzarı olan kojiden izole ederek *Eurotium oryzae* ismi ile tanımlamıştır. Ancak keşfedilen bu mikroorganizmanın eşeysiz ürediği anlaşıldıktan sonra F.Cohn tarafından *Aspergillus oryzae* olarak adlandırılma kararı alınmıştır [57], [58].

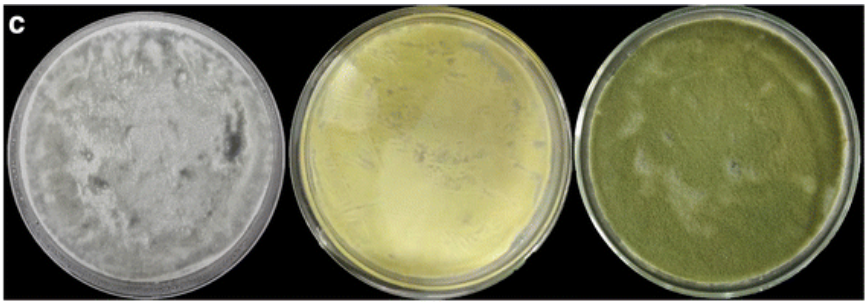
Aspergillus Flavi bölümüne ait olan A.oryzae, morfolojik olarak Aspergillus flavus ile oldukça benzerdir [58]. A.oryzae'yi A.flavus'tan ayıran önemli farklar, A.oryzae konidyalarının 5mm'den büyük olan çapı ve sap (stipe, konidofor) uzunluğunun daha fazla olmasıdır. Ayrıca örnek olarak verilecek bir diğer fark da A.oryzae kolonilerinin uzun bir sürenin ardından renginin kahverengiye dönmesi ve A.flavus kolonilerinin de sarımsı-yeşilimsi renklerini koruması olarak verilebilir

(Şekil 2.2). Bir diğer önemli fark ise detayları ileride verilecek olan mikotoksin üretme özellikleri ile ilgilidir. A.flavus toksik aflatoksin üretirken A.oryzae bu kanserojen mikotoksini üretmez. A. oryzae'nin hem aflatoksin üretememesi hem de uzun yıllardır süregelen fermentasyon endüstrisinde güvenli bir şekilde kullanılması sebebi ile FDA (Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi) tarafından GRAS (genel olarak güvenli kabul edilen) statüsü almaya hak kazanmıştır [57], [58], [59].



Şekil 2. 2 Aspergillus oryzae; PDA besiyeri üzerinde 5 günlük inkübasyon sonucu ve mikroskop üzerindeki yapısal görüntüsü (100x)

Aerobik A.oryzae haploid ve çok çekirdekli (iki veya daha fazla) filamentleri, hifler veya miseller olarak gelişir; hifler apikal uçlara uzanarak dallanır ve agar üzerini birkaç gün içinde kaplar. A.oryzae kolonileri başlangıçta vejetatif hif gelişimi nedeni ile beyaz, daha sonra ise büyük miktarda konidyum oluştuğu için sarımsı-yeşilimsi bir görünüm alır. Daha ileriki zaman dilimlerinde koloni rengi koyu yeşil (zeytin) veya kahverengiye dönüşür (Şekil 2.3). Eşeysiz sporları olan büyük ve pürüzlü konidyalar kolayca oluşur ve havaya salınırlar. Konidyoforları hiyalinden oluşmuş olup kaba duvarlıdırlar [60]. Konidial kafa çapları 100-200 µm çapında ve küreseldir. Bu da yayılmasını kolaylaştıran bir etmendir [57].



Şekil 2. 3 A. oryzae'nin farklı büyüme aşamalarındaki fenotipi (soldan sağa: 24 saat, 48 saat ve 72 saat [59]

A.oryzae, bin yıldan uzun bir süredir, esas olarak Japonya ve Çin'de belirli gıdaların fermente edilmesi sürecinde kullanılması ile ortaya çıkmıştır. Bu aspergillus türleri buğday, arpa ve özellikle pirinç taneleri üzerinde yetiştirilerek koji hazırlığı için başlangıç kültürü olarak kullanıldığı için 'Koji Küfü' olarak da adlandırılırlar. Koji, sake, shoyu ve miso gibi geleneksel uzakdoğu fermente gıdaları, içecekleri yapmak ve bunlara renk, tat, aroma vermek için kullanılan karmaşık enzim preparasyonudur. A.oryzae aslında adını doğada bulunması ve endüstriyel olarak pirinç üzerinde yetiştiğinden Oryzae sativa'dan almıştır [57]. Bunun dışında A.oryzae türüne ait sporları toprakta bulmak ve gelişen A.oryzae yapılarını çürümüş bitki kalıntıları üzerinde görmek mümkündür. Çoğunlukla nemli bölgelerde yetişen A.oryzae'ye ait türlerini Hindistan, İtalya, Peru, Tahiti, Britanya ada hava sahalarında, Rusya ve Suriye gibi bölgelerde görebiliriz [60], [61].

A.oryzae için optimum gelişme ve büyüme sıcaklığı 32-36 °C (±1 °C) olup 45 °C üzeri sıcaklıklarda gelişme gösteremez. Optimum pH aralığı ise 5-6 arası olup pH'ın 2-8 aralıklarında sporlanma görülmektedir. Su aktivtesinin 0.8 üzerinde olduğu ortamlarda büyüyebildiği raporlanmıştır, ancak bazen 0.8'in altındaki değerlerde de büyüyebildiği belirlenmiştir. A.oryzae ayrıca, mısır unu gibi su içeriği çok düşük olan besinlerde de büyüme göstermiştir [57]. A.oryzae'nin gıda endsüstrisindeki en önemli rolü fermantasyon için gerekli hammaddelerin daha kolay sinidirilip parçalanmasını sağlayacak, karbonhidratları, polipeptidleri ve nükleik asitleri hidrolize edecek, bir çok enzim üretmesidir. Dünya genelinde deterjan üretiminde, nişasta işlenmesinde, fırınlama ve mayalama için gerekli olan glokoamilaz ve glutamik asit, a-amilaz, selülaz ve proteaz gibi endüstriyel enzimlerin önemli üreticileridirler [57], [58]. A.oryzae tarafından üretilen hidrolitik enzimlerden en önemlileri sake fermantasyonunda da kullanılan ve nişastanın çözünmesinde değerli rolleri bulunan a-amilaz ve glukoamilazlardır [57].

A.oryzae yakından ilişkili olduğu billinen 3 farklı aspergillus türüne ait bir dizi suş, (A.sojae, A.flavus, A.parasiticus) A.oryzae'ye ait bir dizi başka suş ile karşılaştırılmış ve tüm A.oryzae suşlarının birden fazla (ikiden fazla) amy genine sahip olduğu ve diğer suşların ise tek bir amy genine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu da A.oryzae'yi hiper amilaz üreticisi yapmıştır. [57].

A.oryzae'nin ürettiği amilolitik enzimlere ek olarak selülotik, ksilanolitik ve proteolitik enzimler de çok önemlidir ve bu enzimleri kodlayan genler izole edilerek

dizilenmiştir. Aynı zamanda endüstriyel açıdan önemli olan enzimleri de kapsayan, hücre içi ve hücre dışı proteinleri kodlayan bir dizi gen kodlanarak dizilenmiş ve yapıları, işlevleri incelenmiştir. Bu genler aşağıda verilen Tablo 2.3'de gösterilmektedir [57], [58].

Tablo 2. 3 A.oryzae'den izole edilen genler [58]

Ekstraselüler enzim genleri	İntraselüler protein genleri
α-Amylase (*amyA, amyB, amyC*) Glucoamylase (*glaA, glaB*) α-Glucosidase (*agd4*) Alkaline protease (*alpA*) Aspartic (acid) protease (*pepA (pep0)*) Neutral protease II (*mep20*) Carboxypeptidase 0 Cellulase (β-1,4-glucanase) (*celA, celB, celC*) β-Galactosidase (*lacA*) Ribonuclease T1, T2 (*rntA, rntB*) Nuclease S1 (*nucS*) Polygalacturonase (*pgaA, pgaB, pecA, pecB*) Pectin lyase (*pelA, pelB*) Xylanase (*xynF1, xynG1*) Lipolytic enzyme (*cutL*) Monodiacyl lipase (*mdB*) Tyrosinase (*mel0*) Tannase	Acetamidase (*amdS*) 3-Phosphoglycerate kinase (pgkA) Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase Calmodulin (*cmdA*) Nitrate reductase (*niaD*) Alcohol dehydrogenase Enolase (*enoA*) Protein disulfide isomerase (*pdiA*) RNA polymerase II Nuclease O (*nuc0*) Nuclease O inhibitor Pyruvate decarboxylase (*pdcA*) β-Tubulin (*benA*) Actin-related protein (*arpA*) Translation elongation factor (*tef1*) Orotidine-5'-phosphate decarboxylase (*pyrG*) Ornithine carbamoyltransferase (*argA*) Activator of *amdS* (*amdR*) Catabolite repressor (*creA*) Activator for conidiation (*brlA*) Activator of amylolytic enzymes (*amyR*)

A.oryzae'nin bu denli faydalı enzim üretmesi ve gıda endüstrisindeki kullanımı akıllara ne kadar güvenli olduğu sorusunu getirmektedir. Ancak şimdiye kadar yapılan çalışmaların hiçbirinde herhangi bir patojeniteye rastlanmamıştır. Bu nedenle, patojenik olmayan bir mantar olarak kabul edilir. Kanserojen olduğu bilinen ve bazı aspergillus türleri tarafından üretilen aflatoksini hiçbir suşunun üretmediği belirlenmiş ve diğer mikotoksinlerden bazılarını minumum düzeyde ürettiği bulunmuştur. Ancak bu üretilen minumum düzeydeki mikotoksinlerin de fermentasyon sürecinde mayalar tarafından kolayca ayrıştırıldığı belirlenmiştir [57], [58].

Ayrıca yapılan genomik çalışmaların bir sonucu olarak, A.oryzae'nin biyolojik olarak parçalanabilir plastiklerin geri dönüşümüne ciddi katkılar sunmuştur. Maeda ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada A.oryzae küfünün poli-(bütilen sukkinat)

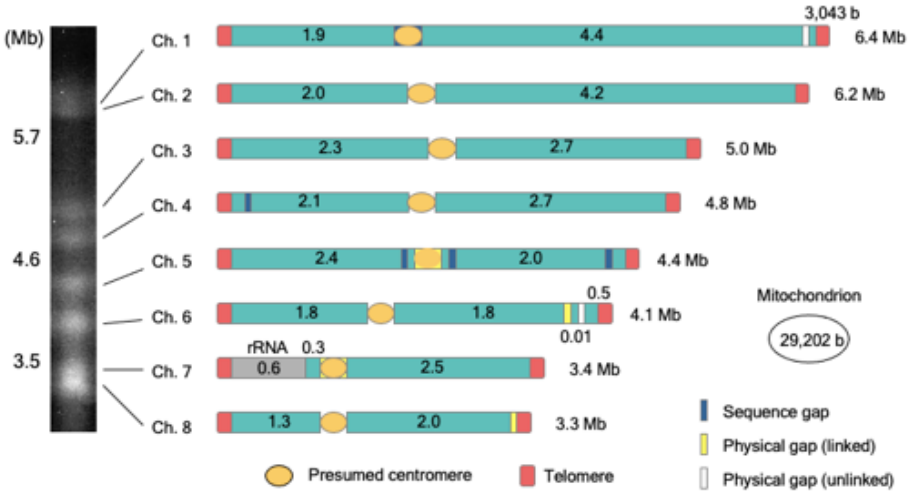
yani PBS gibi tek karbon kaynağı aracılığıyla büyüyebildiği keşfedilmiştir. PBS'in parçalanması CutL1 denilen cutinaz enzimi vasıtasıyla gerçekleşmektedir [62].

A.oryzae'ye ait biyoaktif bileşenlerin ve özellikle enzimlerin üretimi gibi endüstriyel uygulamaların optimizasyonu için gerekli olan genomik araştırmalar neticesinde gen ifadesi profili ve metabolik yolların araştırılmasına odaklanmıştır. Bu türlere ait suşlar üzerinde yapılan çalışmalar, büyüme ve farklılaşmanın moleküler düzeyde incelenmesini ve metabolik yolların her detayı öğrenilerek gerekli olacak manipülasyonların nereye uygulanacağı üzerinedir. Gerçekleştirilecek manipülasyonlar ile iyileştirilmiş özelliklere sahip ve elde edilmek istenen ürünün daha verimli üretilmesi mümkün hale gelir [61].

Yabancı enzimleri de yüksek düzeyde ifade eden A.oryzae bu yeteneğini ilk defa 1988 yılında Novo Nordisk firması tarafından Japonya'da deterjanlara dahil edilmek üzerine rekombinant bir lipaz A.oryzae tarafından üretilmiş ve ticari anlamda bir başarı elde edilmiştir [57]. Farelere belirli dozlarda verilen rekombinant suşlara ait sporlar konakçıda herhangi bir patojenite yaratmamıştır. Yapılan toksikolojik testler neticesinde rekombinant lipazın hem detarjan hem de gıdalarda güvenli bir şekilde kullanılmasını sağlamıştır. Günümüzde A.oryzae'den rekombinant olarak üretilen çeşitli enzimlerin üretimi yapılmakta olup güvenirliliği kanıtlanmıştır. Örneğin *Rhizomucor miehei* lipazına ait geninin immobilize A.oryzae'de ifadesi sonucu katı ve sıvı yağların esterifikasyonu sağlanmış ve insanlara ait gıdalar üzerinde kullanımına onay verilmiştir [60]. Yüksek enzim salgılama kapasitesi A.oryzae suşlarında aspartik proteinaz, aktif insan proteinleri olan laktöferri ve lilozim gibi yapıların ifade edilmesini ve üretilmesini sağlamıştır [63]. 2022 yılında yapılan bir başka çalışmada ise Eurotium cristatum mantarından non-ribozomal peptid sentetaz enzimini kodlayan cirC geni A.oryzae'ye transfer edilmiş ve bu transformant, L-triptofan-L-alanin döngüsel dipeptit omurgası (Cyclo-TA) içeren yeni bir metabolit üretmiştir. Döngüsel dipeptidler antimikrobiyal, antiviral, antikanser ve proanjiyogenik gibi geniş bir biyolojik aktivite aralığına sahiptir [64].

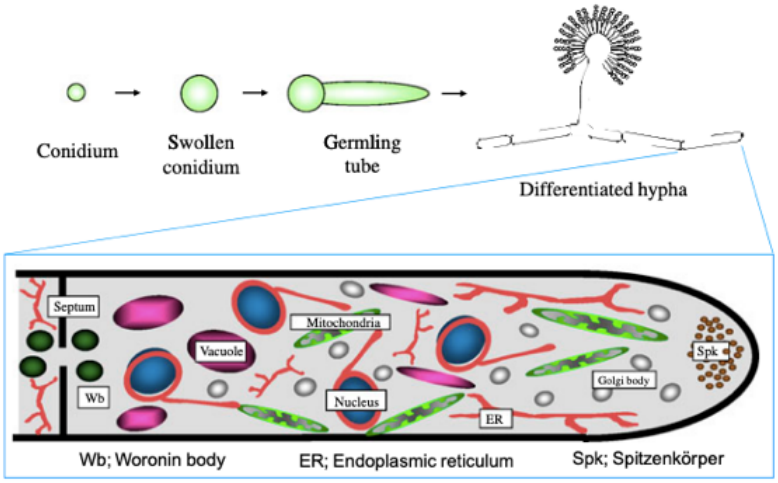
1994 yılında Kitamoto ve ark. tarafından yapılan çalışmada [65] A.oryzae vahşi tip RIB40 suşuna ait genom analizi sonucu yaklaşık 35 Mb büyüklükte bir genoma sahip olduğu bulunmuştur. Daha sonra 2005 yılında Machida ve çalışma arkadaşlarının yaptığı kapsamlı genomik çalışmalar ile A.oryzae, A.fumigatus ve

A.nidulas genleri karşılaştırılmış, A.oryzae'nin 8 kromozomdan oluşan genomunun 37.6 Mb genom büyüklüğüne sahip olduğu, ve toplamda 12.074 gen içerdiği belirlenmiştir (Şekil 2.4). Ayrıca A.oryzae'ye ait metabolik yolakların haritası çıkarılmıştır [66].



Şekil 2. 4 A.oryzae'nin birleştirilen genom dizilerinin şematik gösterimi [63]

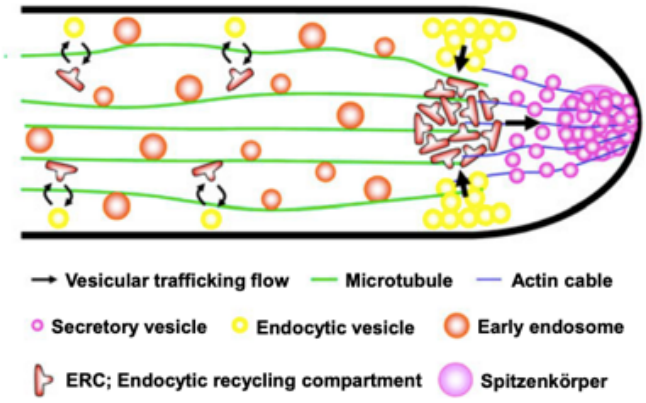
Kitamoto'nun 2015 yılında yayınladığı kapsamlı bir araştırma [65]. A.oryzae hücre biyolojisi ile ilgili önemli bilgiler sunmaktadır. A.oryzae hücre yapısı çeşitli analiz yöntemleri kullanılarak belirlenmiş; veziküler taşıma,endositoz ve otofaji gibi hücresel süreçler aydınlatılmıştır.



Şekil 2. 5 A.oryzae organellerinin şematik modeli [63]

Yapılan analiz sonucu, organel olan Spitzenkörper keşfedilmiştir (Şekil 2.5). Bu yapı filamöntöz mantarlara özgüdür ve salgı enzimlerini içeren veziküllerin

birikmesinde görev alan ve hifal uç kısmında yerleşmiştir. Hifler, metabolik olarak aktif olan uç kısımlarında yer alan hücrelerin uzaması ile büyüyerek gelişirler. *A.oryzae* salgılama yolu endoplazmik retikulumdan başlayarak golgiye ilerler ve ardından Spitzenkörper organeli aracılığıyla hücre zarına doğru ilerler. Salgılama vezikülleri mikrotübüller vasıtası ile apikal uca götürülür. Veziküller içinde taşınan içeriklerin salgılanması amacıyla aktin filamanları vezikülleri hücre zarına taşır. Salgılama vezikülü üzerinde bulunan v-SNARE proteinleri aracılığıyla hücre zarı ile kaynaştırılır. Vezikül içeriği endositozla aktarıldıktan hemen sonra v-SNARE yeni veziküllere aracılık etmek üzere geri dönüştürülür (Şekil 2.6). Bu dönüşüm salgılama yeteneklerinin devamlılığı açısından A.oryzae ve diğer mantarlar için hayati bir görevi yerine getirmektedir [65].



Şekil 2. 6 A.oryzae için önerilen hücre içi veziküler trafiği modeli [65]

Asidik pH'a sahip lizozomal bölmeler olan vakuoller, filamentöz mantarlarda; apikal bölgelerde küçük küresel, subapikal bölgelerde sürekli bir tübüler yapı ve bazal bölgelerde büyük, gelişmiş küresel yapılar olarak bulunur. A. oryzae örneğinde, vakuol ile ilişkili genlerin analizi, tübüler vakuollerin hem havadaki hiflere hem de koloninin merkezi bölgelerindeki hiflere geliştiğini ortaya koymuştur. Bu da tübüler vakuollerin, katı besin ortamından temel besin maddelerini bazal hifelerle temas halindeyken taşıdığını göstermektedir [65].

Otomafi ökaryotlarda korunan bir parçalanma süreci olup ve hücrenin hayatta kalması için sitoplazmik bileşenlerin geri dönüşümünü sağlar. Bu besin geri dönüşümü, çok hücreli mantarların besinleri hifler boyunca taşıma yeteneği sayesinde hayatta kalmasını sağlar. A.oryzae üzerinde yapılan çalışmalar, otomafinin hava hifleri oluşumu, konidyasyon ve konidial çimlenme için gerekli olduğunu göstermektedir [65].

A. oryzae hifleri, septalar tarafından bölünen ince hücrelerden oluşur. Hücreler arasında sitoplazmik akışı sağlayan ve septum merkezinde bir gözenek bulunur. Septum yakınında Woronin cisim adı verilen bir organel bulunur ve hücre hasarına tepki olarak septal gözenekleri tıkar. Woronin cisim ile ilgili yapılan işlevsel analizler, birçok karboksilasyon ve dekarboksilasyon reaksiyonunda yer alan zorunlu kofaktör biyotinin biyosentezinin ilk adımlarının peroksizomda gerçekleştiğini göstermiştir. Bilindiği üzere bitki ve mantarlarda biyotin sentezinin son basamaklarının mitokondride gerçekleştiği, ancak ilk adımların tam olarak nerede gerçekleştiği bilinmiyordu. Bu bulgu, biyosentezin başlangıç aşamaları ve hücre içi konum hakkında bilgi sağlamaktadır [65].

A.oryzae, daha önce de belirtildiği gibi endüstriyel ölçekte enzim üretiminde ve bunun yanı sıra çeşitli biyolojik aktiviteleri olduğu bildirilen ikincil metabolit üretimi için sıklıkla kullanılmaktadır [67]. Ancak bu üretimin yapılabilmesi için Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü/Dünya Sağlık Örgütü Katkı Maddeleri Uzman Komitesi (Joint FAO/WHO expert committee on food additives) tarafından gıda sınıfı enzimlerin güvenli olduğunun tespiti amacıyla bu enzimlerin içermemesi gereken mikotoksinleri şöyle sıralamıştır; aflatoksin B1, okratoksin, sterigmatosistin, T-2 toksini veya zearalenon [57], [58].

Mantar ikincil metabolitleri olarak bilinen mikotoksinler, genetik olarak kodlanmış kümelenmiş genler tarafından üretilen bileşiklerdir. Bu ikincil metabolitler, antimikrobiyel, antioksidan, pigment, hormon ve metal şelatlayıcı gibi çeşitli düşük molekül ağırlıklı bileşiklerden oluşur. Bu bileşikler arasında birçok önemli uygulama potansiyeline sahip olanlar bulunmaktadır. Mantarlar tarafından üretilen mikotoksinlerin insanlar ve diğer omurgalı canlılar tarafından küçük miktarlarda dahi vücuda alınması ciddi toksik etkilere sebep olur ve hatta ölüme bile neden olabilir [67], [68].

Bu mikotoksinler, doğal bir yol (ağız yoluyla, solunum yoluyla veya cilt yoluyla) üzerinden küçük miktarlarda elde edildiğinde insanlar ve diğer omurgalılarda akut veya kronik toksik etkiye sahiptir ve sağlık sorunlarına veya ölüme neden olabilir. En bilinen mikotoksinlerden olan Aflatoksinin hiçbir türünün (B1, B2), hiçbir A.oryzae suşunda üretilmediği belirtilmektedir. Bunun sebebi, aflatoksin biyosentezini redükleyen afIR geninin eksikliği olarak değerlendirilmiştir. A.oryzae suşlarının ürettiği bilinen mikotoksin Siklopiazonik asit (α-siklopiazonik

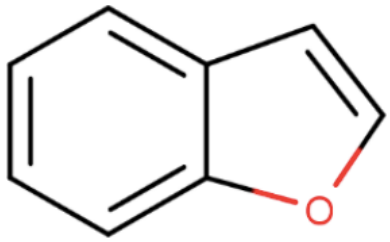
asit) (CPA) ve bununla ilişkili bir çok ikincil metabolit (iso-α-siklopiazonik asit, β-siklopiazonik asit, siklopiamid (A), siklopiamid E ve H vb.) bulunmaktadır. A.oryzae suşlarından izole edilen bir mikotoksin ise β-nitropropionik asit (BNP)'dir [67].

Mantar türlerinin ürettiği bilinen çok çeşitli ve geniş bir spektruma sahip ve birçok uygulamada kendine yer edinmiş (anti-kanser, antibiyotik, immün-baskılayıcı, anti-oksidan) ikincil metabolitler bulunmaktadır. A.oryzae suşlarının ürettiği en önemli ikincil metabolitler şu şekilde sıralanabilir; sklerotyum kökenli indoloterpen olan **Aflavininler**, antifungal aktiviteye sahip dihidronbenzofuran bileşiği olan **Asperfuranlar**, anti-bakteriyel direncin aşılmasında penisiline yardımcı olan ve metallo-beta-laktamazları inhibe edebilen **Aspergillomarasminler,** anti-fungal aktiviteyi sahip olduğu billinen **Flufuran**, antibiyotik ve anti-kanser özellikleri bulunan **Heptelidik asitler** (hidroheptelidik asit, gliokladik asit ve trichoderonik asit), **Kojik asit, Kojistatinler, Oryzaeinler.** Ayrıca A.oryzae'den izole edilen ve **Flavisidin** olarak da bilinen **Penisilinler** de ikincil metabolit olarak üretilmektedir [67].

3
FARMAKOLOJİK OLARAK AKTİF ÜRÜNLER

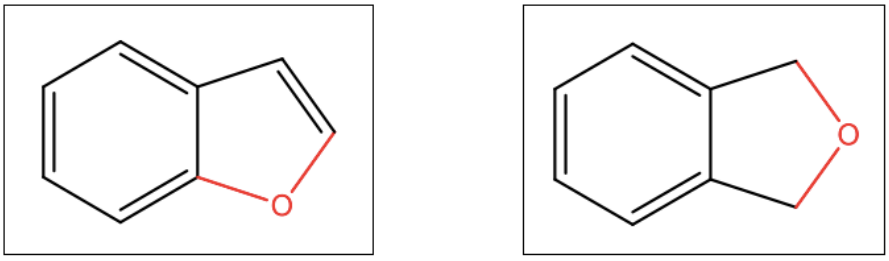
3.1 Benzofuran

Benzofuranlar isminden de anlaşılabileceği üzere bir benzen halkasının furan halkası ile füzyonu sonucu oluşan halkasal yapıyı temsil eder [69]. Moleküllere seçicilik ve güç sağlayan radikallerin bağlanmasını sağlayan ve iskelet görevi gören benzofuranlar (heterosiklik çekirdekler) bu özellikleri sayesinde dünya genelinde yeni ilaç geliştirme projelerinde kullanılmıştır (Şekil 3.1) [70] [71].



Şekil 3. 1 Benzofuran halkasal yapısı

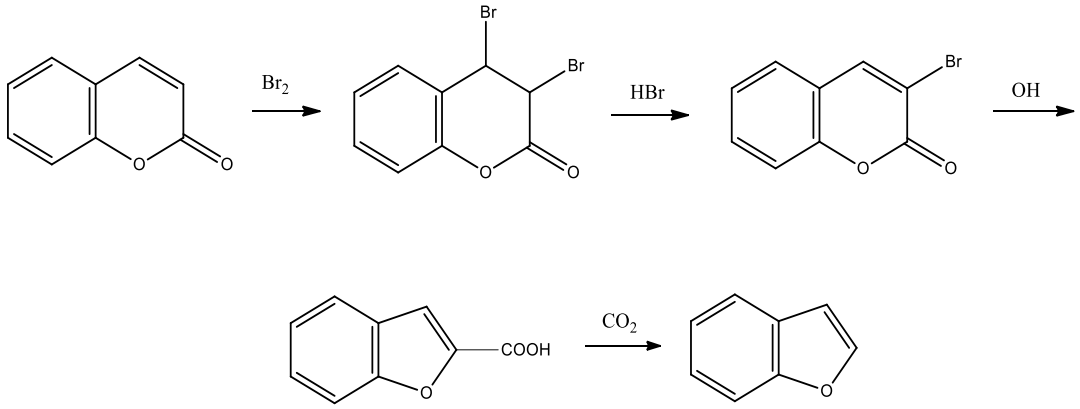
Benzofuranlar renksiz, yağlı bir yapıya sahiptir. Kaynama noktası 170-173 °C olup suda çözünmeyen yapıları vardır [72]. Bu halkasal yapılar benzo(*b*)furan (benzofuran) ve benzo(*c*)furan (izobenzofuran) (Şekil 3.2) olarak literatürde tanımlanmıştır [73].



Şekil 3. 2 Sırasıyla; benzo(b)furan ve benzo(c)furan

Kumaronlar (coumarone) olarak adlandırılan bu yapılar kumarinler (coumarin) ile sıklıkla karıştırılmaktadır. Benzofuranlar, kumarinin benzofuran-2-karboksilik

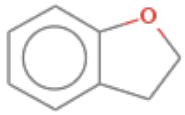
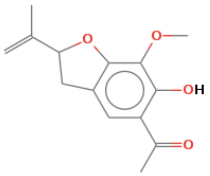
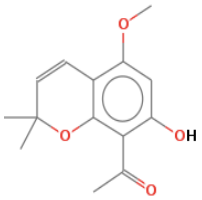
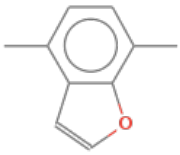
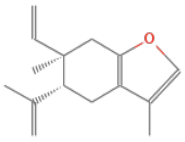
aside erken sentezi ile edilmişlerdir. Daha sonra benzofuran-2-karboksilik asidin dekorboksilasyonu yapılmış ve böylelikle benzofuran çekirdeği elde edilmiştir (Şekil 3.3) [74]:



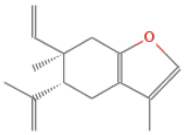
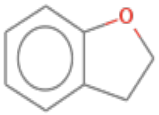
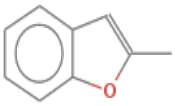
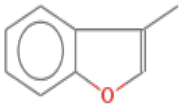
Şekil 3. 3 Kumarinin benzofuran-2-karboksilik aside sentezi ile benzofuran eldesi

Benzo[*b*]furan iskeleti, biyolojik olarak aktif doğal birçok üründe, farmasötikte ve malzeme kimyasında kullanılmak üzere çeşitli moleküllerde bulunur. Benzo(*b*)furanlar, H bağını destekleyen furan ünitesinin **π**-elektronik yapıya ve içerdiği oksijen atomu varlığında kazandığı serbest atomlar sayesinde ilaç endüstrisi dışında, elektronik ve fotoelektronik alanlarda önemlilik kazanmıştır. Ayrıca benzo(*b*)furanların iyi derecede floresans kuantum verimi sergilediği de bulunmuştur [2]. Benzofuran çekirdeğine sahip bileşikler doğada geniş bir yelpazede bulunur ve doğal veya sentetik kaynaklardan elde edilebilirler (Tablo 3.1). Bu bileşikler, ekstraktlardan veya uçucu yağların ekstraksiyonu yoluyla elde edilir. Doğada bolca bulunmaları onların ekstraksiyonunu ve purifikasyonunu kolaylaştırdığı için yapılarının ve biyolojik ve fizyolojik özelliklerinin araştırılmasında önemli avantajlar sağlar. Bunları bakteri ve mantarların metabolitleri olarak da elde etmek mümkündür. Elde edilmesi kolay olan benzofuranonlar binlerce çeşit bileşiğin sentezinde bir yapı iskeleti ve yapı taşı olarak kullanılmaktadır [3], [4].

Tablo 3. 1 Bazı doğal benzofuran türevleri ve kimyasal yapıları

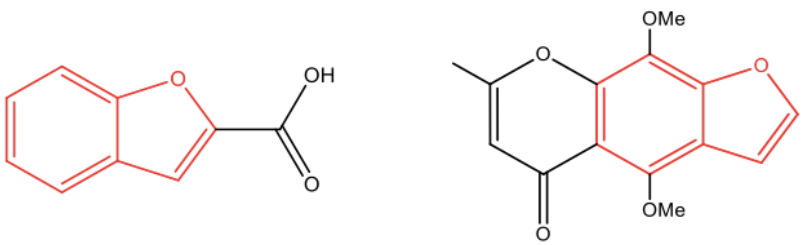
Bulunduğu Tür	**Bitkide bulunduğu bölge**	**Bulunduğu Ülke**	**Bileşenleri**	**Kimyasal yapısı**
Coriandrum Sativum	Çiçekler	Hindistan	2,3-dihidrobenzofuran (% 15.4)	
Mariscus Pedunculatus	Rizomlar ve kökler	Brezilya	%56 Remirol (1-(4-hidroksi-2-izoprenil-6-metoksi-2,3-dihidro-benzofuran-5-il)-etanon ve %7 Evodionol (1-(5-hidroksi-7-metoksi-2,2-dimetil-2H-kromen-6-il)-etanon	 Remirol  Evodionol
Cinnamomum sp.	Yapraklar	Kore	4-7-dimetil-benzofuran (%10.6)	
Commiphora myrrha	Resinler	Sudan	6-etenil-4,5,6,7-tetrahidro-3,6-dimetil-5-izoprofenil-trans-benzofuran (%26.6)	

Tablo 3.1 Bazı doğal benzofuran türevleri ve kimyasal yapıları (devamı)

Curcuma zedoria	Rizomlar	Tayvan	6-etenil-4,5,6,7-tetrahidro-3,6-dimetil-5-izoprofenil-trans-benzofuran (%12)	
Aristolochia longa	Kökler	Tunus	2,3-dihidrobenzofuran (%6-7.8)	
Otostegia michauxii	Toprak üstü yapılar	İran	Benzofuran, 2-metil (% 12.9)	
Cinnamomum zeylanicum	-	-	Benzofuran, 3-metil (% 17.97)	

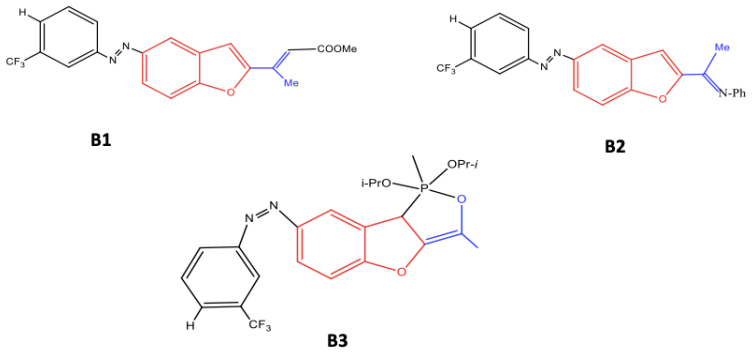
3.1.1 Benzofuranların Farmakolojideki Önemi

Benzofuran-2-karboksilik asit (kumarilik asit) sentezinden birkaç yıl sonra Mustapha ve diğerleri, [5] benzofuran ve kromon iskeletleri taşıyan ve khellin olarak adlandırılan doğal kaynaktan ilk benzofuran bazlı molekülü izole etmeyi başardılar (Şekil 3.4). Bu başarıdan sonra doğal kaynaklardan izole edilen veya sentetik olarak sentezlenen çok fazla benzofuran bileşiği ortaya çıkmış ve biyolojik özellikleri sayesinde ilgi konusu haline gelmişlerdir [20], [75], [76].



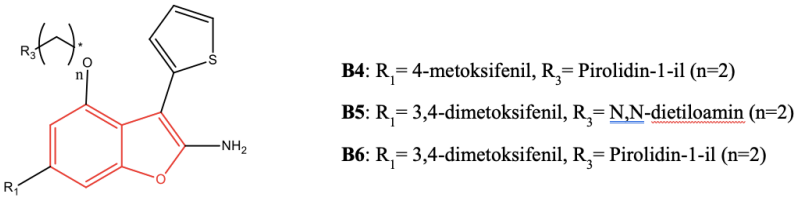
Şekil 3. 4 Sırasıyla; ilk benzofuran türevi Kumarilik asit ve Khellin

El-sayed ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada [6] yeni benzofuril türevleri **B1, B2** (benzofuran-2-ylethylidene aniline derivatives) ve **B3**'ün hem insan karaciğer kanserine hem de meme kanseri hücre hatlarına karşı umut verici antiproliferatif adaylar olduğu bulundu ve bu nedenle tubulin polimerizasyon inhibisyonu açısından ayrıca doğrulandı. **B2**, tübülin polimerizasyonunun güçlü inhibisyonunu gösterdi ve ardından mekanik çalışmalar, bu bileşiğin, HepG2 hücrelerinde G2/M fazında hücre döngüsü durmasını, mitokondri depolarizasyonunu ve apoptozu indükleyebileceğini gösterdi (Şekil 3.5).



Şekil 3. 5 Anti-kanser benzofuran türevleri

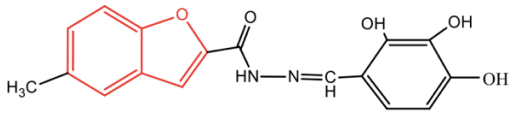
Chen ve arkadaşlarının 2017'de yaptıkları bir başka çalışmada [7] kemotrapötik ilaçlarla tedavi gören hastalarda görülen çoklu ilaç direnci (MDR) tümörlerine karşı yeni benzofuran türevleri test edilmiştir. Bileşik **B4, B5** ve **B6**, dirençli Flp-In™-293/MDR ve KBvin hücrelerinde vinkristin, paklitaksel ve doksorubisin sitotoksisitesini önemli ölçüde arttırdı. Genel olarak en güçlü bileşik, O-alkil bağlayıcıda bir N,N-dietilaminoetil içeren **B5** idi. 2,5 uM'de **B5**, Flp-In™-293/MDR hücrelerini 2,5 uM'de sırasıyla 17,95 kat, 13,68 kat ve 26,43 kat vinkristin, paklitaksel ve doksorubisine karşı önemli ölçüde hassaslaştırdı (Şekil 3.6).



Şekil 3. 6 Anti-kanser özellik gösteren sentetik benzofuran türevleri

α-glukosidaz ve α-amilaz enzimlerinin inhibisyonu, karbonhidrat sindirimini azaltmadaki rolü nedeniyle anti-diyabetik ilaçların tasarlanmasındaki önemli

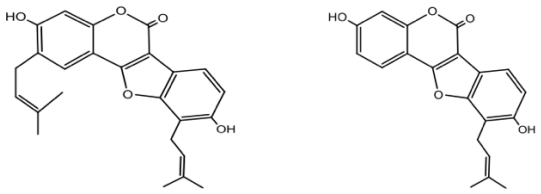
yaklaşımlardan biridir. Adalet B. ve arkadaşları [8] tarafından anti-diyabetik ilaç geliştirme çalışmaları yapıldı ve bu yaklaşımla 22 yeni benzofuran Schiff bazı serisi tasarlanarak α-amilaz ve α-glukosidaz enzimlerine karşı inhibitör potansiyelleri açısından değerlendirildi. Seriler arasında en güçlü analog, a-amilaz için 1.10 ± 0.10 um ve a-glukosidaz için 1.40 ± 0.10 um IC50 değerine sahip olan **B7** (5-methyl-N'-(2,3,4-trihydroxybenzylidene)benzofuran-2-carbohydrazide) idi (Şekil 3.7).



B7

Şekil 3. 7 Anti-diyabetik benzofuran türevi

P.-H. Nguyen ve arkadaşlarının [9] Erythrina abyssinica'nın fitokimyasal incelemesiyle sekiz benzofuran türevi elde edildi ve bunlar AMP ile aktifleştirilmiş protein kinaz (AMPK) aktivasyonu açısından değerlendirildi. AMPK enzim aktivatörleri, anti obezite ve antidiyabetik ajanlar olarak kabul edilir. 8 bileşik arasından **B8** ve **B9**, AMPK enziminin 10 mM'de güçlü aktivasyonunu gösterdi (Şekil 3.8).

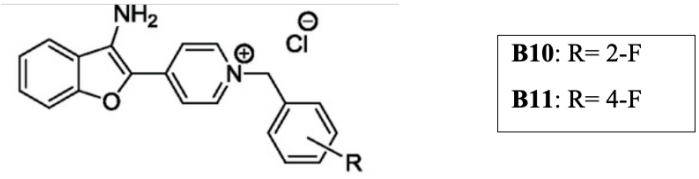


B8 **B9**

Şekil 3. 8 Anti-diyabetik özellik gösteren benzofuran türevleri

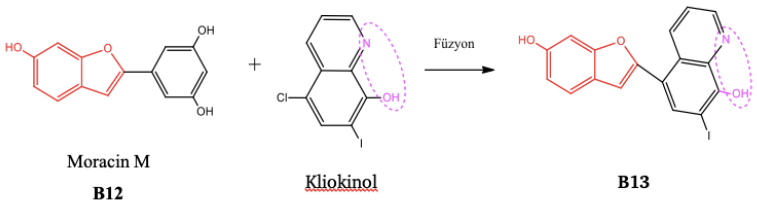
Hasanvand Z. ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada [10] alzheimer tedavisi için yeni ajanlar olarak N-benzilpiridinyum parçasına sahip yeni bir 3-aminobenzofuran türevleri serisi tasarlanarak sentezlendi ve değerlendirildi. İn vitro deneyler, çoğu hedef bileşiğin PC12 hücrelerine karşı hiçbir toksisite olmaksızın orta ila iyi anti-AChE ve -BuChE aktivitesine sahip olduğunu ortaya çıkardı. En iyi sonuç, sırasıyla IC50 = 0.64 ve 0.55 uM ile güçlü AChE ve BuChE inhibe edici aktivite sergileyen 2-florobenzil türevi **B10**'dan elde edildi. Ayrıca, **B10** ve **B11** bileşiklerinin, referans ilaç olarak donepezil ile karşılaştırıldığında dikkate değer bir agregasyon önleyici aktiviteye sahip olduğu belirlendi. Docking'in

çalışması, 3-aminobenzofuran'ın (hidrofobik aromatik fragman) periferik anyonik bölgede konumlandırılabileceğini ve N-benzilpiridinyum fragmanının AChE'nin katalitik anyonik bölgesine bağlı olduğunu gösterdi (Şekil 3.9).



Şekil 3. 9 Anti- alzheimer özellikte benzofuran türevleri

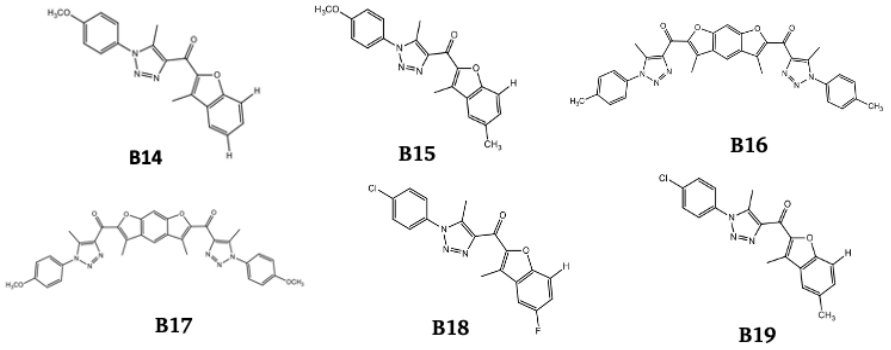
Pravin N. ve Jozwiak K. yaptıkları çalışmada [11] Alzheimer hastalığına karşı füzyon stratejisini kullanarak yeni bir tür benzofuran türevli anti-alzheimer molekülü geliştirdiler. Füzyon stratejisinde, iki farklı farmakofor, çeşitli reaksiyon koşulları kullanılarak kimyasal olarak kaynaştırılır. geliştirilen MTDL'ler (Multitarget Directed Ligands) bağlantılı farmakoforlardan daha küçüktür ve farmakokinetik profile daha iyi erişim sağlar. Bu strateji benimsenerek **B13**, Moracin M'den (**B12**) (Fosfodiesteraz 4D (PDE4D) ve Aβ inhibitörü) benzofuran halkası ve kliokinolden hidroksikinolin halkası kaynaştırılarak geliştirildi. Sentezlenen **B13**, PDE4D'ye (IC50 = 0.32 uM), antioksidan aktiviteye ve kendi kendine ve metal kaynaklı Aβ agregasyon özelliklerine (Şekil 3.10) karşı önemli inhibe edici etki sergiledi. Fenolik hidroksil grubu benzofuran kısmından çıkarılırken, özellikle biyolojik potansiyel azalır.



Şekil 3. 10 Anti-alzheimer özellik gösteren füzyon benzofuran türevi

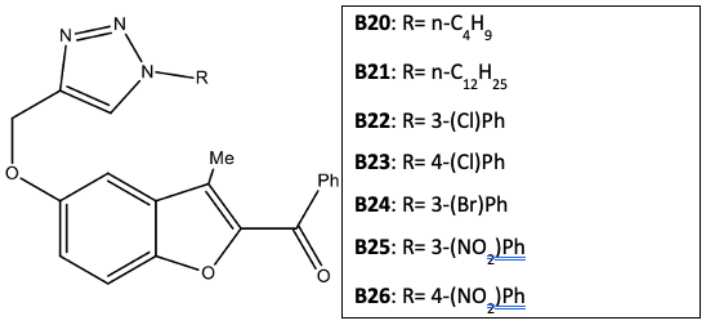
Ashok D. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada [77] sentezlenen benzofuran türevi bileşikler antibakteriyel ve antifungal etkileri açısından değerlendirildi. Sentezlenen tüm bileşikler arasından **B14** ve **B15** sahip oldukları elektron veren sübstitüentlerin varlığı etkisi ile standart ilaca oranla daha iyi bir inhibisyon bölgesi içerdiğinden bakteri suşlarına karşı daha yüksek inhibe etme potansiyeli göstermiştir. **B16** ve **B17** ise standart amplisine eşdeğer inhibe etme yeteneği

göstermiştir. Aynı bileşikler antifungal aktiviteleri açısından *Aspergillus flavus'a* karşı test edilmiş ve bu bileşiklerden sırasıyla **B14, B15, B18** ve **B19** en iyi antifungal ektiviteleri sergilemişlerdir (Şekil 3.11).



Şekil 3. 11 Antibakteriyel ve antifungal özellik gösteren benzofuran bileşikleri

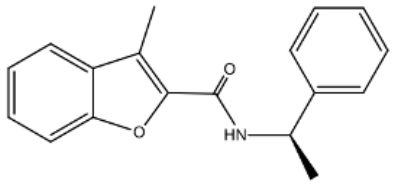
Sunitha V. ve arkadaşları [78] tarafından antibakteriyel aktiviteleri açısından test edilmek üzere sentezlenen 14 adet benzofuran-1,2,3-triazol türevleri standart ilaç olarak kullanılan Gentamisin sülfat ile karşılaştırıldığında, bileşiklerden **B20, B21, B22, B23, B24, B25, B26** ürünlerinin *Bacillus cereus, Bacillus subtilis,* metisiline dirençli *Staphylococcus aureus, Micrococcus luteus, Mycobacterium tuberculosis, Proteus vulgaris, Escherichia coli, Klebsiella pneumonia ve Pseudomonas aeruginosa'*ya karşı oldukça aktif olduğu belirlendi. Sonuçlar karşılaştırıldığında triazole bağlı olan fenil halkasına bağlanan bromo, kloro ve NO_2 gibi atom veya grupların (elektron çekici gruplar) varlığının, antibakteriyel aktiviteyi arttırabildiği gözlemlenmiştir (Şekil 3.12).



Şekil 3. 12 Antibakteriyel ve antifungal özellik gösteren benzofuran bileşik analogları

Xie Y.-S. ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada [79] sentezlenen 20 Benzofuran-2-karboksamid türevi antiinflamantuvar aktiviteleri açısından test

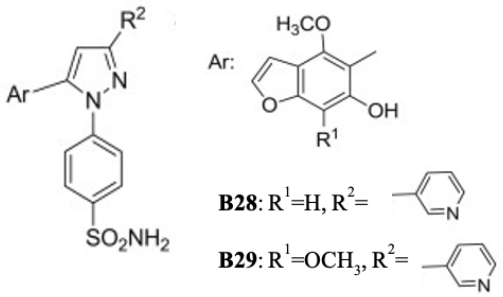
edilmiştir. Bileşiklerin bazıları, standart ilaç Diklofenak ile karşılaştırılabilir ölçüde iyi aktivite göstermiştir. Bileşik **B27'**nin (Şekil 3.13), bileşik serisi içinde en aktif analog olduğu bulunmuştur (4 saat sonra %66).



B27

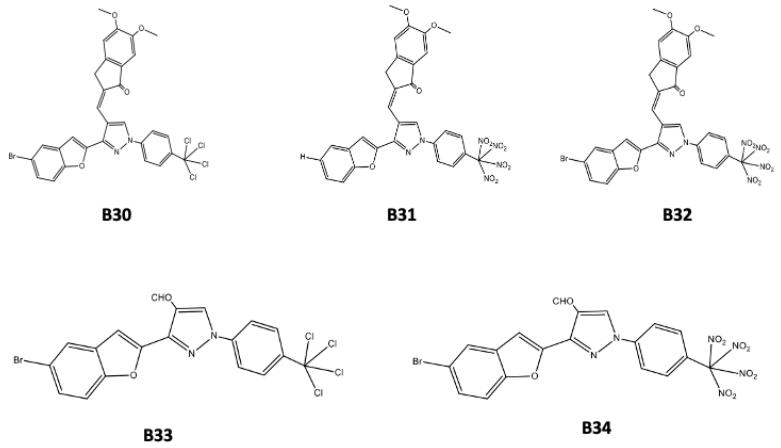
Şekil 3. 13 Anti-inflamantuvar aktivite gösteren benzofuran bileşiği

Hassan G.S. ve arkadaşları [80] tarafından antienflamantuvar etkileri açısından in-vitro COX-1/COX-2 inhibe edici aktiviteleri test edilmek üzere benzofuran halkası içeren selekoksib analogları sentezlendi. Siklooksijenaz (COX-1 ve COX-2) inhibe edici aktiviteleri açısından değerlendirilen bu beş bileşik, Celecoxib ile karşılaştırılabilir seçici COX-2 inhibe edici aktivite gösterdi. Sentezlenen bileşikler arasından **B28** ve **B29** (Şekil 3.14), Selekoksib'e eşdeğer aktivite gösterdi (2 saat sonra %100).



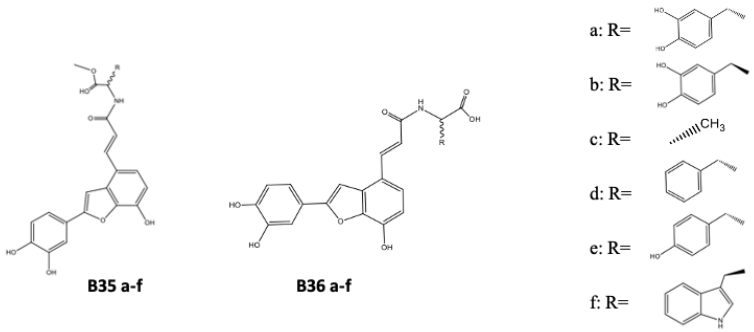
Şekil 3. 14 Anti-inflamantuvar etkileri açısından in-vitro COX-1/COX-2 inhibe edici aktivite sergileyen benzofuran türevleri

Kenchappa R. ve Bodke, Y. D yaptıkları çalışmada [81] bir dizi benzofuran türevleri sentezlediler ve bu bileşikleri analjezik ve anti-inflamatuar aktiviteleri açısından test ettiler. Test edilen bileşikler arasında, **B30**, **B31**ve **B32**'nin, 50.49-60.53 arasında değişen koruma %'si ile daha yüksek analjezik aktiviteye sahip olduğu ve **B30, B33**, **B34** (Şekil 3.15) bileşiklerinin, 66.62-72.23 koruma %'si ile umut verici anti-inflamatuar aktivite sergilediği bulundu.



Şekil 3. 15 Analjezik ve anti-inflamatuar aktivite gösteren benzofuran türevleri

Tang ve arkadaşları [82] 2-arilbenzo[b]furanların yeni türevlerini antioksidan etkinliklerini değerlendirmek üzere sentezledi. Potansiyel ksantin oksidaz inhibe edici aktiviteleri değerlnedirilen bileşiklerden **B35b**, **B36a**, **B36c-f** iyi umut verici sonuçlar verdi. Şekil 3.16'da görüldüğü gibi **B35a**, **B36a**, **B35d**, **B36d**, **B35f**, **B36f** bileşiklerinin barındırdığı serbest karboksil grubunun, antioksidan aktivitenin iyileştirilmesine yardımcı olduğu düşünülmektedir. DPPH radikal süpürücü deneyleri ile hidroksil ikameli benzofuran türevlerinin düşük mikromoleküler seviyede güçlü antioksidan aktivite gösterdiği de belirlenmiştir. **B35b**, **B36a-d** ve **B36f** 3,27–5,61 μM arasında değişen IC50 değerlerine sahiptir ve bu değerler, IC50 değeri 6,0 μM olan pozitif kontrol quercetin'den daha iyidir (Şekil 3.16).

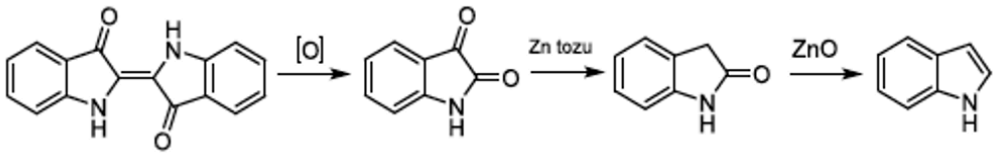


Şekil 3. 16 Antioksidan özellikler barındıran benzofuran türevleri

3.2 İndol

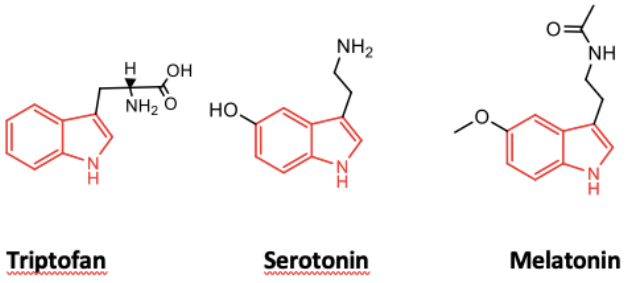
Eski zamanlardan beri çok değerli olan indigo boyasının üzerinde yapılan yoğun araştırmalar sonucu indol kimyasının gelişiminin önü açılmıştır. İndigonun ilk olarak 1841'de izatine oksitlenmesi, ardından 1866'da izatinin dioksindol ve

oksindole'e indirgenmesinin ardından Adolf Von Baeyer 1866 yılında [83] oksindolün çinko tozu pirolizi sonucu ana madde olan indolü hazırlamıştır (Şekil 3.17). 1868 yılında ise Fisher tarafından indol, sentetik olarak ilk defa elde edilmiştir.



Şekil 3. 17 İndigo boyası kullanılarak sırası ile elde edilen; isatin, oksindol, indol

Bir dönem önemini kaybeden indol kimyası araştırmaları, 1930'larda birçok alkaloidin indol çekirdeğini içerdiğinin [12] anlaşılmasından sonra yeniden canlandı ve aynı dönemde esansiyel aminoasit olan triptofanın [13] ve bitki büyüme hormonu olan heteroauxin'in [14] indol türevleri olması indol araştırmalarına hız kattı. Triptofan aminoasidinin biyosentezi sonucu oluşan metabolitlerin doğal olarak indol çekirdeği içermesi, indolü hem bitkilerde alkaloid olarak, hem hayvanlarda hormon [15] (serotonin ve melatonin) olarak, hem de bakteriyel metabolit olarak karşımıza çıkarmaktadır (Şekil 3.18). Bu da indolü bitkilerde, hayvanlarda ve deniz canlılarında oldukça yaygın hale getirmektedir [84]. Bu maddeleri ve analoglarını hazırlamak için birçok önemli indol sentezi yöntemi geliştirilmiştir.

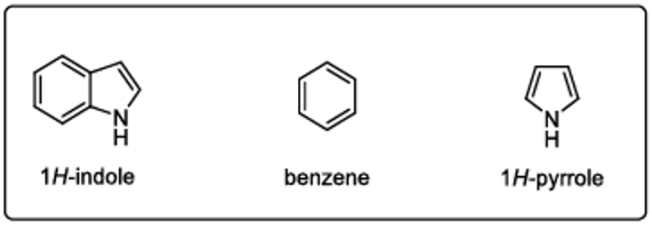


Şekil 3. 18 İndol çekirdeği içeren triptofan, serotonin ve melatonin hormonları

3.2.1 İndol Halkasının Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

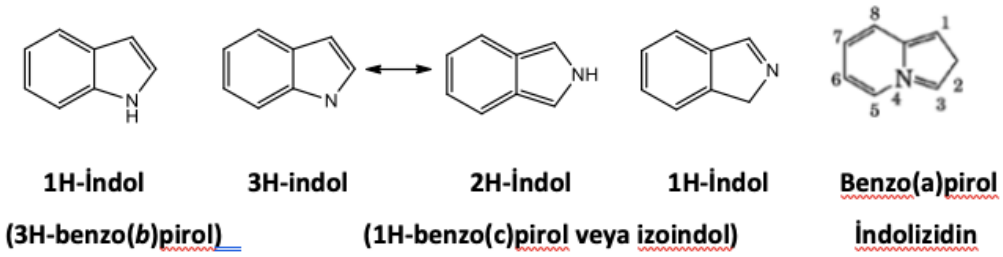
İndol, bir benzen halkasının 5 üyeli pirol grubu ile 2.ve 3. pozisyonlarda kaynaşarak (Şekil 3.19) oluşturduğu, C_8H_7N moleküler förmülüne sahip düzlemsel heteroaromatik yapıyı temsil eder [85]. İndol bileşiği çoklu aromatik yapısı ve barındırdığı elektron bakımından zengin pirol yapısı, içerdiği azot sayesinde

kazandığı hidrojen bağı yapabilme kapasitesi aracılığıyla kimyasal reaksiyonlara kolayca dahil olabilir [1].



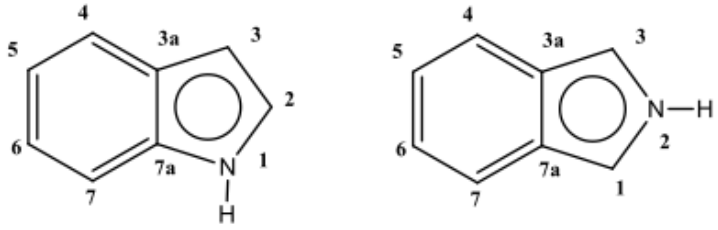
Şekil 3. 19 İndol, benzen ve pirol yapıları

Organik kimyada tanımlanan çok farklı indol izomerleri vardır. Bunları şekil 3.20'de sırası ile 1H-indol (1H-Benzo(b)pirol), 3H-indol (indol tautomeri), 2H-indol (izoindol veya 1H-Benzo(c)indol) ve 1H-izoindol (izoindol tautomeri)'dür. Organik kimyada ve ilaç endüstrisinde yüksek reaktivitesi sebebi ile en çok kullanılan indol izomeri 1H-İndol yani 1H-benzo(b)pirol'dür [86].



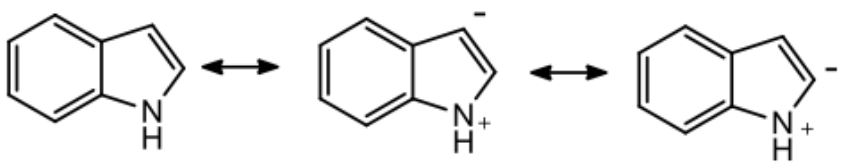
Şekil 3. 20 İndol izomerleri

IUPAC adı 1-H-benzo(b)pirol olan indol numaralandırılması azot atomundan başlanarak saat yönünün tersi istikameti boyunca birleşmiş halka sistemini dolaşır (Şekil 3.21) [87]. Oluşturduğu çifte bağlardan 8π elektron, 1. konumunda yer alan azot atomunun ortaklanmamış elektronlarından gelen 2π elektronla toplamda 10π elektron taşır [88]. Bu nedenle Huckel kuralı bağlamında aromatik bir yapı olarak temsil edilirler. İndol halkası pirol tipi nitrojen atomunun elektron veren karakteri nedeniyle π-aşırı (π-excessive) heteroaromatik yapı olarak sınıflandırılır.



Şekil 3. 21 Benzo(b)pirol ve benzo(c)pirol numaralandırılması

İndol halkası dört farklı pozisyonda reaktiftir. Bu nedenle gerçekleştireceği reaksiyonları karbon atomunun 3. bağından, C2-N sigma bağından ve C2-C3 π-bağından verirler. İndolün rezonansı şekil 3.22'de gösterilmiştir. Özellikle C-3 konumu elektron açısından oldukça zengin olduğundan en reakitf bölge olarak belirtilir [89].



Şekil 3. 22 İndol'ün rezonansı

İndol erime noktası 52-55 ◦C olan renksiz bir katıdır. Organik çözücülerin çoğunda kolayca çözünür. Suda ise idareli bir şekilde çözünmektedir. Kalıcı bir küf kokusuna sahip indol türevlerinin koku formülasyonlarında çeşitli uygulamaları bulunmaktadır [1]. Dışkı kokusu sağlayan insan dışkısında doğal olarak bulunur. Bununla birlikte, daha düşük bir konsantrasyonda, çiçeksi kokuyu ve birçok çiçek kokusu, parfüm ve kömür katranının bileşenini verir [90].

İndol bileşiğinde bulunan nirojen atomunun yalnız çiftinin, indol halkası boyunca π-elektronik sisteminde kolayca dolaşması indolü kimyasal olarak çok zayıf baz yapmaktadır. Bu nedenle nitrojen atomunun yer aldığı bölge protonasyon için uygun bir konum olmayıp indol halkasının aromatikliğinin korunması nedeniyle termodinamik olarak daha kararlı olan C-3 protonlanma için daha uygun bölgedir. Çeşitli kimyasal reaksiyonlar; elektrofilik sübstitüsyon, oksidasyon, siklokatılma, karbon litiasyonu gibi, C-3 pozisyonunda meydana gelmektedir [91], [92].

3.2.2 İndol'ün Biyolojik Aktivitesi

İndol çekirdeğinin çok geniş bir biyolojik aktivite aralığına sahip olduğu çeşitli araştırmalar sonucu anlaşılmıştır. Bitkilerden ekstraksiyon ile doğal yollarla elde edilen veya kimyasal yollarla sentezlenen indol türevleri ile yapılan çalışmalar ve moleküler docking analiz verilerine [16], [17], [18] dayanarak reseptörlerle olan etkileşimleri incelenmiştir. İncelemeler sonucu bu ayrıcalıklı moleküller reseptörlere yüksek afinitelerle bağlandıklarından bu durumun indol türevlerini ilaç geliştirme çalışmalarına doğrudan dahil ettiği belirtilebilir.

İndol çekirdeğinin elektrofilikliği sayesinde kazandığı avantajlar indol türevlerinin sentez reaksiyonlarının araştırılmasını sağlamış ve böylece sentetik manipülasyonlar için literatür bilgisi ihtiyacını karşılamıştır. Günümüzde yapılan indol araştırmaları çok basit çekirdek indol yapısından, karmaşık indol türevlerine uzanmaktadır [19].

Birçok indol türevi tıbbi kimyanın gelişimine önemli katkıda bulunmuştur. Vazokonstriktör prensibi ile bilinen **serotonin** [15], psikotomimitik indoller olan **psilosin ve psilosibin**, anti-tümör aktivite için **vincristine, vinblastine, vinorelbine** ve **vindesine**, anti-aritmik aktivite için **ajmaline** ve **glokom** ve Alzheimer hastalığı için **fizostigm** dahil olmak üzere doğal olarak oluşan bazı indol alkaloidleri örnek olarak verilebilir [19]. Doğal bileşiklerden ilham alınarak sentetik olarak sentezlenen ve FDA tarafından onaylanan bazı indol bileşikleri de bulunmaktadır. Anti-enflamatuar aktivite ile ilişkili olarak bilinen **indometasin**, kemoterapinin neden olduğu bulantı ve kusmaya engel **ondansetron**, hiperkolesterol için **fluvastatin** ve lökotrien reseptör antagonisti olarak **zafirlukast,** bunlara birkaç örnektir [20].

3.2.3 İndolün Farmakolojideki Önemi

Bu bölümde sentetik yollarla türetilmiş ve tanımlanmış doğal indol türevlerinin anti-kanser ve anti-tümör, anti-depresan, anti-migren, anti-hipertansif, anti-mikrobiyal, anti-viral, anti-enflamantuar aktivitelerinden bahsedilecektir.

3.2.3.1 Anti-kanser ve Anti-tümör Aktivite

Farklı mekanizmalarla hareket eden anti-kanser ve anti-tümör ajanları bulunmaktadır. Bu mekanizmalar G2/M hücre döngüsü blokajı, tübülin polimerizasyonunun inhibisyonu, mikrotübül bozulması, anöploidi ve siklin B1

down regülasyonudur. İndol alkaloid kategorisinde yer alan bileşikler izole edilmiş ve sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir.

Aspergillus taichungensis ZHN-7-07 suşundan izole edilen prenilatlanmış indol diketopiperazin (DKP) alkaloidlerinin **'Okaramine S'**, HL-60 ve K-562 hücre hatlarına karşı sitotoksik aktivite sergilediği belirlenmiştir [93]. Bu alkaloidler, prenilatlanmış triptofanın diğer aminoasitlerle birleşmesinden türetilen doğal moleküllerdir.

Tabernaemontana corymbosa'dan izole edilen aspidosperma indol alkaloidi **'Jerantinin A'** vinkristin dirençli nazofaringeal karsinoma hücrelerine karşı sitotoksik aktivite göstermektedir. Bu indol alkaloidi akciğer(A559), kolon (HCT-116, HT-29) ve meme kanseri hücre hatlarında sitotoksik aktivite göstermiştir [94].

Rauwolfia serpentina'dan elde edilen **Reserpin'**in, in-vivo anti-tümör aktivite sergilediği belirlenmiştir. Ayrıca yapılan son çalışmalara dayanarak ilaca dirençli tümör hücre hatlarında da iyi bir aktivite sergilediği rapor edilmiştir [95].

Melodinus cochinchinensis bitkisinden elde edilen **Melosin B ve H** indol alkaloidinin çeşitli insan kanser hücre hatlarında orta derecede sitotoksik aktivite gösterdiği belirlenmiştir [96].

Doğal olarak bulunan indol alkaloidlerine ek olarak sentetik olarak sentezlenen FDA onaylı veya klinik araştırma aşamasında olan bazı önemli anti-tümör indol bileşikleri bulunmaktadır.

Mutasyona uğramış pidermal büyüme faktörü reseptörü (eGFR) inhibitörü olan **Osimertinib** (Tagrisso) [97], multipl miyelom tedavisi için FDA onayı alan ve pan-selektif histon deasetilaz (HDAC) inhibitörü olarak işlev gören **Panobinostat** (Farydak) [98], Krizotinib dirençli küçük hücreli olmayan akciğer kanseri'ne (NSCLC) karşı ALK (anaplastik lenfoma kinaz) inhibitörü olarak çalışan **Alectinib** (Alecensa) [99] FDA onaylı ilaçlara örnek olarak verilebilir.

3.2.3.2 Anti-depresan Aktivite

Majör depresif bozukluğu tedavisinde kullanılan ve çeşitli indol türevi barındıran antidepresan ilaçlar aşağıda belirtilmiştir.

Tabernanthe iboga, Orta Afrika'nın çok yıllık bir yağmur ormanı çalısıdır. İndol halkasından oluşan iboga alkaloidleri **İbogain** ile temsil edilmektedir. Bu bileşik

uyuşturucu bağımlılığını ve diğer bağımlılıkları azaltma konusunda belirgin bir yetenek göstermiştir [100].

Bir deniz süngeri olan Aplysinopsis reticulata'dan izole edilen **Metilaplisinopsin** anksiyete ve depresyonu kontrol etmek için kullanılan deniz kökenli indol türevlerindendir. Bu indol alkaloidi monoamin oksidazı (MAO) inhibe eder ve serotonini reseptörlerinden uzaklaştırarak işlev gösterir [101].

Başka bir tür deniz süngeri canlısı olan Smenospongia aurea'dan izole edilen **6-bromoaplisinopsin ve N-3'-etilaplisinopsin** bileşiklerinin, neokorteksde ve peripheral olarak trombositlerde bulunan, bazı antipsikotiklerin ve antidepresanların terapötik etkilerini ortaya çıkaran 5HT2A ve 5HT2C reseptörleri için yüksek afiniteye sahip oldukları bulunmuştur [102].

Antidepresan ilaç olarak kullanılmak üzere bazı sentetik indol türevleri sentezlendi. Tetrasiklik antideprasanlar sınıfına ait olan üç ilaç, **metralindol (Inkazan), pirlindol (Pyrazidol) ve terindol,** monoamin oksidaz A inhibitörleri olarak sentezlendi. Bu ilaçların başlıca görevi serotonin, nöroepinefrin ve dopamine gibi hormonların oksidatif deaminasyonunu katalize eden monoamine oksidaz (MOA-A) enziminin geri dönüşümlü inhibitörlüğünü yapmaktır. Bu şekilde nörotransmiterlerin parçalanması önlendiği için kullanılabilirlikleri artar [103], [104].

3.2.3.3 Anti-migren Aktivite

Bir nörolojik bozukluk olarak migren, kafada zonklayan ağrı ile karakterizedir. Tedavi için kullanılan ve temel yapı iskelesi olarak indol halkası içeren triptanlar, triptamin bazlı ilaçlar olup genellikle serotonin 5-HT1B ve 5-HT1D reseptörlerine bağlanarak etki gösterirler. FDA onayı alan **sumatriptan** [105]**, rizatriptan** [106]**, naratriptan** [107]**, eletriptan** [108] (Pfizer tarafından kürtaj ilacı olarak üretilmiş), **almotriptan** [109]**, frovatriptan** [110] ve **zolmitriptan** [111] ilaçları triptan sınıfı ilaçlarındandır. Bir başka triptan sınıfı adayı olan **Avitripta** [112] FDA onayı alamamıştır ancak araştırma ilacı olarak kullanılmaktadır.

3.2.3.4 Anti-hipertansif Aktivite

Anti-hipertansif sınıfı ilaçlar yüksek olan kan basıncını düşürmeye yönelik çalışır. Literatürde karşımıza çıkan indol türevli anti-hipertansif moleküllerin etki mekanizması ise sempatik sinir sisteminde adrenerjik reseptörler olan α/β

reseptörlerini bloklayarak görev yapan α/β bloker, ACE inhibitörü, tiyazid benzeri diüretik, AT1 antagonisti şeklindedir.

Yapılarında oktahidro-indol çekirdeği bulunduran **Perindopril** ve **Trandolapril** molekülleri anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörü olarak işlev yapmaktadır. Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörü olan **Trandolapril,** aktif metaboliti trandolaprilat olan estersizleştirilmiş etil ester formu olarak karşımıza çıkmaktadır [113], [114].

Hipertansiyon ve kalp yetmezliği tedavisinde kullanılan **İndapamid** ise dihidro-indol yapılı tiazid benzeri diüretiktir [115].

Karbozol bazlı mimariye sahip **Karvediol** [116] hipertansiyon ve kalp yetmezliği tedavisinde β-bloker olarak kullanılmaktadır. Hipertansiyon tedavisinde kullanılan bir diğer seçici β-bloker olarak etki eden yapı ise 1982 yılında FDA onayı alan **Pindolol**'dür [117].

3.2.3.5 Anti-mikrobiyal Aktivite

Mikrobiyal enfeksiyonlara neden olan bakteri ve mantarlar gibi mikroplara karşı doğal kaynaklardan ekstrakte edilen ve sentezlenen bir dizi indol türevi mevcuttur.

Alstonia scholaris yani Hint şeytan ağacı bitkisinden elde edilen fito bileşenlerden **normavacurine-21-on**, **striktamin** ve **vallesamin-N-oksit**, *Enterococcus faecalis*'e karşı inhibitör aktivite gösterirken **vallesamin** ve **nareline**, *Pseudomonas aeroginosa*'a karşı güçlü anti-mikrobiyal aktivite göstermektedir [118].

Aspidosperma'dan izole edilen **aspidospermin** *Plasmodium, Leishmania* ve *Trypanossoma sp*.'ye karşı anti-parazitik aktivite göstermektedir [119].

Deniz süngeri canlılarından elde edilen Manzamin alkoloidlerinden olan **Manzamin A, manzamin-A-N-oksit** ve **8-hidroksimanzamin A** indol türevlerinin *Plasmodium falciparum*'un çeşitli suşlarına karşı önemli ölçüde antibakteriyel aktivite gösterdiği tespit edildi [120].

Aspidosperma parvifolium bitki kabuğundan elde edilen indol alkaloidi **Ulein**'in sıtma hastalığına neden olduğu bilinen ve klorokin dirençli *Plasmodium falciparum*'a karşı yüksek in-vitro inhibisyon potansiyeli (IC50 < 1 mg/mL) olduğu belirlendi [121].

√ Doğal kaynaklardan izole edilen ve güçlü anti-mikrobiyal aktivite gösteren indol alkaloidleri, bazı indol türevlerinin sentetik olarak elde edilip anti-mikrobiyal aktivitelerinin test edilemesinin önünü açmıştır.

Desai ve arkadaşları antitüberküler ajan olarak sentezledikleri bir dizi indol ve piridin bazlı 1,3,4-oksadiazol türevi bileşiklerin, *Mycobacterium tuberculosis* ve *Mycobacterium bovis* bakterilerini kullanarak anti-tüberküler aktivitelerini test ettiler. En yüksek aktiviteyi (0.94 mg/ml MİK değeri) Mycobacterium bovis'e karşı veren **İ1** bileşiği olmuştur [122].

Choppara ve arkadaşları gram(+) ve gram(-) bakterilere karşı antibakteriyel, *Aspergillus flavus, Aspergillus niger, Candida albicans* mantarlarına karşı antifungal aktivite gösteren bisondol türevleri sentezlediler. Gram negatif ve gram pozitif bakterilere karşı anti-bakteriyel, Aspergillus türlerine karşı anti-mikrobiyal aktivite gösteren bileşik en etkili sonucu veren indol türevi olmuştur [123].

Mielczarek ve arkadaşları, *E.coli* ve *Bacillus subtilis* bakterilerine karşı anti-bakteriyal aktivite değerlendirmesi amacıyla sentezlenen mono-indol ve bis-indol türevlerinden olan bileşik suşlara orta düzeyde etki ettiği belirlenmiştir [124].

3.2.3.6 Anti-viral Aktivite

Ustica Adası'nın (İtalya) güney kıyılarından toplanan *Halicortex* cinsine ait bir deniz süngerinden yeni bir bromoindol alkaloid olan dragmacidin türevlerinin izole edildiği ve bu türevlerin iyi anti-viral aktiviteleri olduğu bildirildi. Bu türev serisinden benzersiz bir karbon iskeletine sahip olduğu belirtilen **Dragmacidin F** bileşiğinin HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus / İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü) ve HSV-1'e (*Herpes Simplex* Virüsü) karşı in-vitro antiviral aktivite sergilediği gösterildi [125].

Paromita Bag ve arkadaşları, geleneksel bir çin bitkisi olan Ophiorrhiza nicobarica'dan **Harmalin** indol alkaloidini izole ettiler. Bu alkaloid, HSV-1 virüsünün hem vahşi tip suşlarında hem de klinik izolatlarında erken transkripsiyonu önleyerek anti-viral aktivite sergilemektedir [126].

Yeşil alg türlerinden deniz üzümü olarak da bilinen Caulerpa racemose yosunundan izole edilen **Caulerpin** indol alkoloidinin sığırlarda ciddi viral enfeksiyonlara sebep olan Bovine viral diyare virüsünün replikasyonunu engelleyerek anti-viral aktivite gösterdiği bildirilmiştir [127].

Ascidiacea familyasının deniz tunikatları olan deniz üzümlerinden *Pseudodistoma aureum*, *Ritterella sigillinoides* ya da *Lissoclinum frajil* gibi türlerden b-karbolin türevli oksatiazepin halkası içeren **Eudistominler**'in izole edildiği bildirilmiş ve bu indol türevlerinden **Eudistomin C, E, F, K ve L** HSV-1'e karşı en önemli antiviral aktiviteyi göstermiştir. Bunun dışında **Eudistomin C, E**'nin (diğerlerinden farklı olarak fenolik grup bulundurmaktalar) Coxsackie A-21 virüsü, at rinovirüsü gibi RNA virüslerine ve DNA virüslerine karşı ciddi anti-viral aktivite gösterdiği bildirilmiştir [128].

3.2.3.7 Anti-enflamantuar Aktivite

Vücut dokularının zararlı patojenler veya tahriş edici uyaranları karşı verdiği biyolojik tepkiye enflamasyon denir. Anti-enflamantuar ajanların kullanıldığı patolojik durumlar gut hastalığı, migren, romatoid ve osteo artrit olabilir. İndol iskeleti içeren ve doğalında bulunan ve ekstrakte edilen sadece birkaç anti-enflamantuar ajan bildirilmiştir.

Penicillium türü mantarların deniz kültürlerinden '**spiroindolinon'** alkaloidleri izole edilmiş ve ant-enflamantuar aktiviteleri test edilmiştir. Bu alkaloidlerden **sikloekspanamin A ve B**, **penisilinolid A**'nın anti-enflamantuar aktiviteye sahip olduğu belirlendi [129].

Maclura Pomifera Bitkisinden izole edilen **İndometasin**, indometasinin bir glikolik asit ester ön ilacı olan **Asemetasin** ve **Etodolac** bileşikleri indol bazlı non-steroidal bir anti-inflamatuar ilaç sınıfına dahil olup çeşitli klinik endikasyonlarda kullanılmaktadırlar. Araşidonik asitten prostanoidlerin sentezi sırasında rol oynayan siklooksigenaz (COX) enzimini bloke ederek işlev gösterirler. İndometasin 1965 yılında FDA tarafından ateş, ağrı, şişme tedavisi için onay almış ve migren, osteoartrit, romatoid artrit, Paget kemik hastalığı, jüvenil artrit gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Asemetazin ve Etodolac (1991 yılı FDA onaylı) ise osteoartrit ve romatoid artrit tedavisinde etkisini göstermiştir [130], [131], [132].

Bunların dışında sentetik olarak sentezlenmiş ve anti-enflamatuar aktivite gösterdiği bildirilen bazı indol türevleri bulunmaktadır. Bhati ve arkadaşları çeşitli indol türevleri sentezlediler. Sentezlenen indol türevleri enflamasyonu engellemeleri konusunda test edildi. Bu bileşiklerden biri kıyaslanan

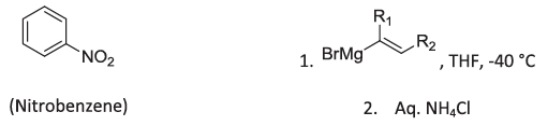
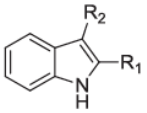
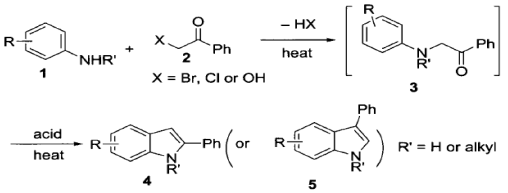
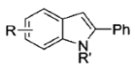
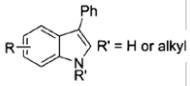
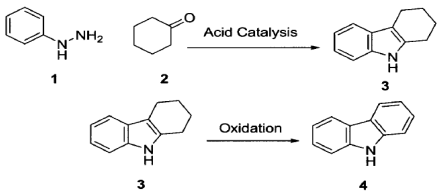
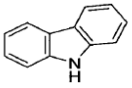
fenilbütazondan daha iyi ancak idometasine kıyasla daha düşük anti-enflamantuar aktivite göstermiştir [133].

Bir dizi bis-indol türevi sentezleyen Singh ve çalışma arkadaşları bu bileşikleri anti-enflamatuar aktiviteleri açısından değerlendirdi. Serinin en iyi sonuç veren bileşiği fenilbütazondan daha yüksek aktivite, daha düşük akut toksisite göstermiştir [134].

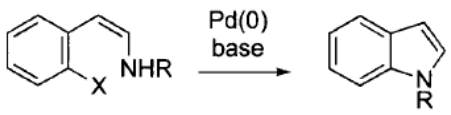
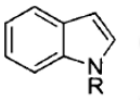
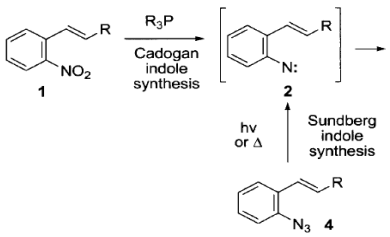
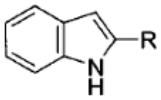
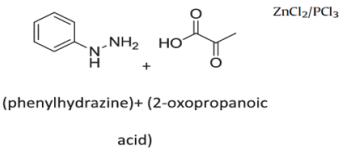
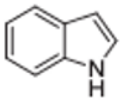
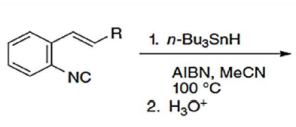
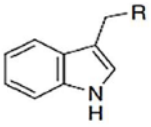
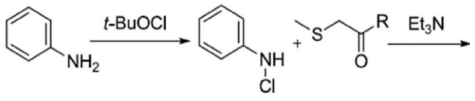
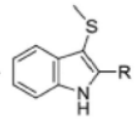
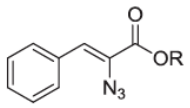
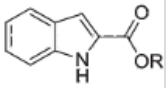
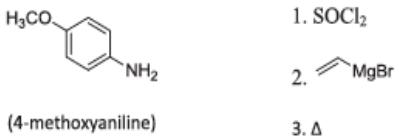
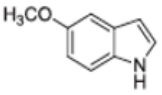
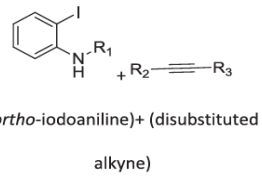
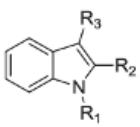
3.2.4 İndol Sentez Yöntemleri

İndol sentezi, organik kimyanın literatür raporlarında çeşitli başlangıç malzemeleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Literatür raporları, aşağıdakileri içeren indol yapımı için farklı stratejilerin araştırıldığını ve yaygın olarak kullanıldığını ortaya koydu:

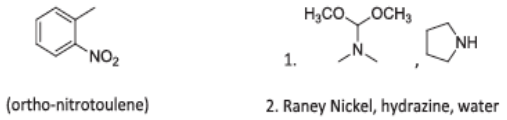
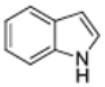
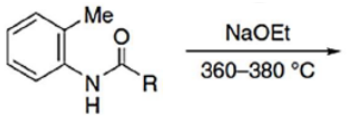
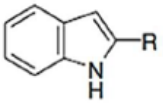
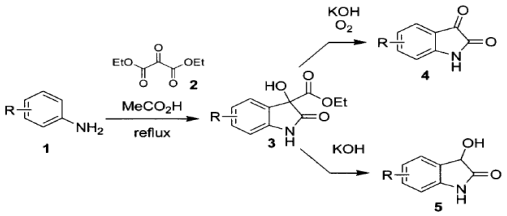
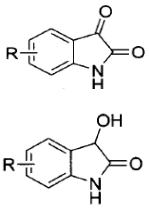
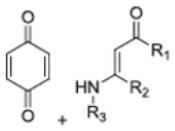
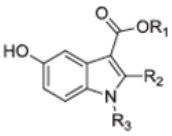
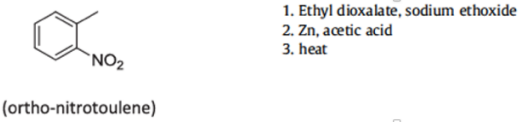
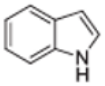
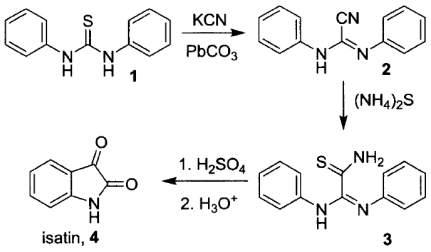
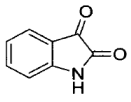
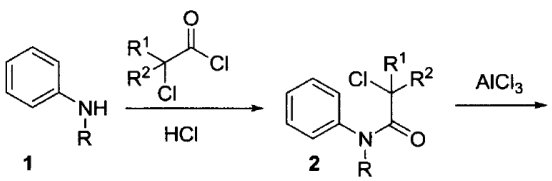
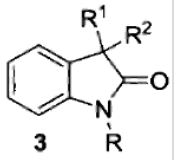
Tablo 3. 2 İndol sentez yöntemleri

Sentez Reaksiyon İsmi	Genel Reaksiyon Şeması	Oluşan Ürün	Kaynak
Bartoli			[135]
Bishler		 veya 	[136]
Borsche-Drechsel			[137], [138]

Tablo 3. 1 İndol sentez yöntemleri (devamı)

Buchwald-Hartwig			[139]
Cadogan-Sundberg			[140], [141]
Fischer			[142]
Fukuyama			[143]
Gassman			[139]
Hemetsberger			[144]
Julia			[145]
Larock			[146]

Tablo 3. 1 İndol sentez yöntemleri (devamı)

Batcho-Leimgruber			[147]
Madelung			[148]
Martinet			[149], [150]
Nenitzescu			[151]
Reissert			[152]
Sandmayer			[153]
Stollé			[154]

4
STEREOKİMYA VE KİRAL İLAÇLARIN ÖNEMİ: ENANTİYOMERLERİN BİYOLOJİK ROLÜ

Sterokimya kavramı farmakolojide önemli bir kavramdır. Farmakopede rasemat ilaçların hakim olduğu yılların sonrasında enatiyosaf ürünlerin öneminin anlaşılması ile birlikte önemli miktarlarda enantiyosaf ürünlerin üretilmesine olanak sağlayan teknolojiler gelişmiştir. Bu sayede ilaç etkisinin stereokimyasına yönelik ilgi artmış ve bu alana yönelik çalışmalar hızlanmıştır. 1992'de yayınlanan FDA politikası ile birlikte rasemat olarak uygulanan ilaçlar yerine tek enantiyomer sentezine ağırlık verilmiştir. Günümüz ilaç piyasasındaki ilaçların %56'sı kiral yapıda olup bu ilaçların %88'i rasemat olarak uygulanmaktadır [21].

4.1 Stereokimyasal Tanımlamalar

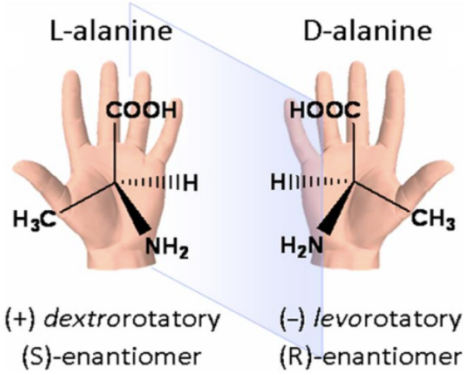
Kimyanın uzaysal yönlerini kapsayan sterokimya iki bölümde incelenir. İlk olarak üç boyutlu moleküllerin şekilleri ve özellikleri ile ilgili bilgiler verirken ikinci olarak reaktivite ile ilgili olup reaktiflerin tercih edilen veya zorunlu yaklaşım yönünü ve ayrıca ürünlerin doğasına ilişkin sonuçları içerir. Başka bir deyişle, bu bölümde, kimyasal reaksiyonlarda kullanılan reaktanların stereokimyasal özellikleri ve bu reaktanların belirli bir şekilde nasıl etkileşime girdiği, sonuçta elde edilen ürünlerin stereokimyasal özellikleri üzerine odaklanılmaktadır. [155].

Kimyasal bileşimleri aynı olan ancak uzayda farklı dizilimler oluşturan moleküller izomer olarak adlandırılır ve ikiye ayrılır;

- Molekül formülleri aynı ancak bağ yapma sıraları veya bağ yapıları farklı olan moleküller **yapısal izomer**lerdir.
- Üç boyutlu yapıları aynı olan izomerlere **stereoizomer**ler denir ve ikiye ayrılır;
  - Enantiyomer
  - Diastereomerler [22]

"Kiral" kelimesi, Yunanca "handedness" anlamına gelen "cheir" kelimesinden türetilmiştir ve üç boyutlu bir nesnenin temel bir özelliği olarak karşımıza çıkmaktadır. Konsept ilk kez Sir L. Thompson, Lord Kelvin (1824-1907) tarafından tanıtılmıştır [22].

Kiralite kavramı sıklıkla sol ve sağ el kullanımı fikriyle açıklanmaya çalışılmaktadır (Şekil 4.1). Sol el ve sağ el birbirinin ayna görüntüleridir ancak örtüşmezler. Kiral bir molekülün iki ayna görüntüsü enantiyomerler olarak tanımlanır [22].



Şekil 4. 1 Alanin molekülünün (enantiyomerler) ayna görüntüleri

Bir stereoizomerin tanımının şartı, molekülde en az bir asimetrik karbon atomunun bulunmasıdır. Bir karbon atomuna dört farklı atom veya grup eklendiğinde kiralite meydana gelir. Asimetrik bir merkez görevi görebilen tek atom karbon değildir. Aslında kükürt, fosfor ve nitrojen bazen sırasıyla omeprazol, siklofosfamid ve metakualon gibi kiral moleküller oluşturabilir. Kiral bir molekül ayna görüntüsüyle üst üste çakışmaz ve dolayısıyla enantiyomer adı verilen iki ayna görüntüsü formunun olasılığı vardır [22], [156].

Eller gibi enantiyomerler de çiftler halindedir. Bir enantiyomer çiftinin her iki molekülü de aynı kimyasal bileşime sahip olup iki boyutta aynı şekilde çizilebilir. Enantiyomer çiftlerinin yoğunluk, kaynama noktası, erime noktası gibi fiziksel özellikleri ve kimyasal özellikleri tamamen aynıdır. Bu nedenle bu molekülleri birbirinden kristalizasyon, ekstraksiyon, distilasyon gibi yöntemler ile ayırmak çok zordur [22].

Aynı zamanda enantiyomer çiftleri vücuttaki reseptörler ve enzimler gibi kiral ortamlarda farklı davranabilirler. Bir kiral bileşiğin enantiyomerleri, akiral bir ortamda benzer fizikokimyasal özellikler sergiler, ancak polarize ışık düzlemini zıt yönlerde döndürürler ve bir kiral bileşik ile farklı hızlarda reaksiyona girerler. Enantiyomer olmayan stereoizomerlere diastereomerler denir. Bunlar aynı yapısal

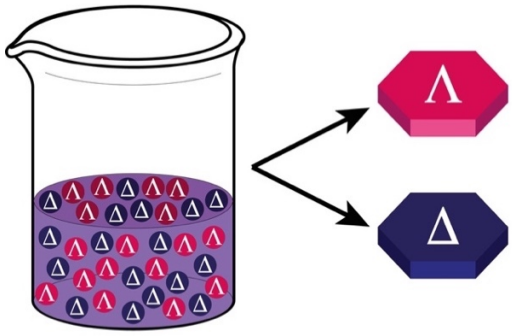
formüle sahiptir ancak birbirlerinin ayna görüntüleri değildirler ve genellikle akiral ortamda bile farklı fiziksel özellikler sergilerler [22].

Farklı stereoizomerlerin tanımlanması biraz karmaşıktır çünkü bunları sınıflandırmak için en az üç farklı sistem kullanılır. Stereoizomer adlandırmasının ilk sistemi, bileşiğin düzlem polarize ışığı döndürme yönüne dayanan (D/L) veya (+/) sistemidir. Düzlem-polarize ışığı sağa döndüren enantiyomerler, bileşiğin adından önce D-veya (+)- ile gösterilen, sağa dönen enantiyomerler olarak adlandırılır. Işığı sola döndüren enantiyomerler, sola dönen olarak adlandırılır ve bir L-veya (-)- ön eki ile gösterilir [22], [157].

Stereoizomerlerin bir diğer mevcut gösterim sistemi, kiral merkezi etrafındaki atomların veya grupların dizisine dayanmaktadır. Cahn-Ingold-Prelog (CIP) sistemi veya (R,S) sistemi olarak bilinir. Yapılandırma, R (Rectus:sağ) ve S (Sinister:sol) ön eklerinin kullanımıyla gösterilir. CIP sistemi kriterleri aşağıdaki gibidir:

1) daha yüksek bir atom numarasına veya daha yüksek bir atom kütlesine daha yüksek öncelik verilir
2) iki veya daha fazla substitue edicinin yakın atomu aynı olduğunda, bir sonraki atomun atom numarası önceliği belirler
3) çift bağlar veya üçlü bağlar, sırasıyla iki veya üç tekli bağa bölünmüş gibi sayılır
4) cis'e trans'tan daha yüksek öncelik verilir
5) yakın gruplar uzak gruplardan daha yüksek önceliğe sahiptir.

Tüm bu kriterler göz önüne alınarak en yüksek öncelikten (en yüksek atom numarası veya en yüksek kütle) en düşük önceliğe doğru dönme yönü saat yelkovanı yönü ise bu enantiyomer (R) olarak gösterilir. Eğer dönme yönü saat yelkovanı yönünün tersi ise bu enantiyomer (S) olarak gösterilir. Bir rasemat RS olarak gösterilir. Düzlem polarize ışığın sağa (+) veya sola (-) doğru yönüne bağlı olarak, her bir R- ve S-enatiomeri, R (+) veya R(-) ve S(+) veya S(-) olarak gösterilir. [22], [157].



Şekil 4. 2 Rasemik karışım

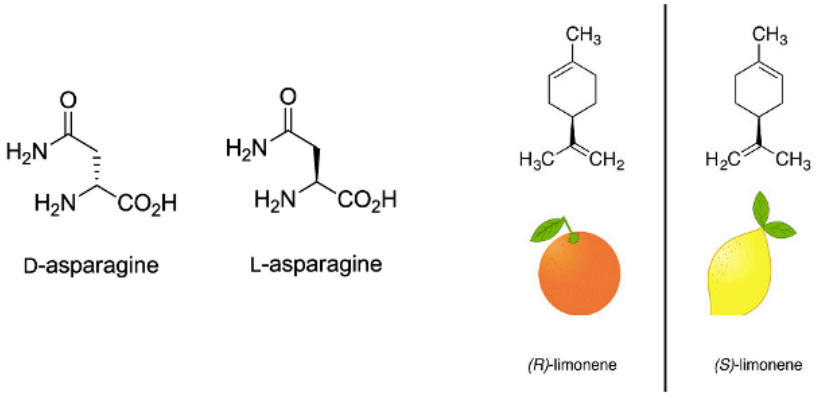
Kiral moleküller tarafından gözlenen düzlem polarize ışığı çevirme yeteneği "optikçe aktiflik" olarak tanımlanır. Optikçe aktif olarak tanımlanan bileşiklerin düzlem polarize ışığı hangi oranda sağa veya sola çevirdiğini ölçen ve bize enantiyomerler hakkında bilgi veren cihaza polarimetre denir. Kiral bir maddenin enantiyomerlerinden sadece birini içeren çözeltinin içerisinden geçirilecek polarize ışın, polarimetrede belirli bir açıda rotasyon sağlar. Kiral bir bileşiğin iki enantiyomerinin eş molar karışımına optik aktivite göstermeyen rasemik karışım denir (Şekil 4.2). Rasemik karışım (+/-) veya (D/L) işaretiyle veya rac ön eki ile gösterilir. Bu sistem kimyada uzun süredir kullanılmaktadır ancak düzlem polarize ışığın dönmesi bir bileşiğin mutlak bir özelliği değildir. Kullanılan solvent gibi birçok faktörden etkilenir [22], [157].

4.2 Enantiyomerlerin Biyolojik Önemi

Doğa genel morfoloji açısından sıklıkla yüksek düzeyde bir simetri sergilese de, moleküler düzeyde oldukça asimetriktir. Bitki ve hayvanların enzimleri, proteinleri, polisakkaritleri, nükleik asitleri ve diğer birçok temel bileşeni kiraldir ve enantiyosaf formda bulunur. Doğal proteinleri oluşturan 20 amino asidin sadece biri hariç (glisin), hepsi kiraldir ve L-aminoasit olarak sınıflandırılırlar. Benzer şekilde, DNA, RNA, karbohidratlar ve biyopolimerlerde de tek bir enantiyomer bulunur. DNA'da bulunan şeker de dahil olmak üzere, doğal şekerlerin çoğu D formundadır. [158].

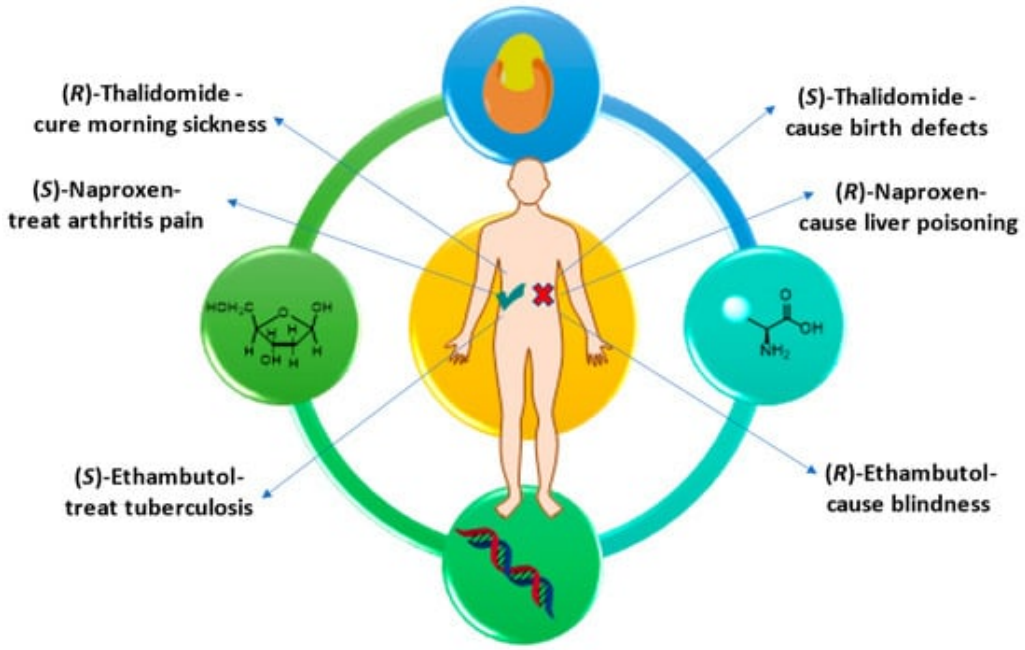
Kiralite biyolojik sistemler için çok önemli bir kavramdır. Örneğin, enzimler veya proteinler, kiral bir ilacın iki enantiyomeri arasında ayrım yaparak farklı etkilere yol açacaktır. Bu, bir enzimin, bir substratı bağlayan eldiven benzeri bir boşluğa sahip olduğu düşünülerek anlaşılabilir. Eldiven sağ elini kullanıyorsa, bir

enantiyomer içeri girecek ve bağlanacak, diğer enantiyomer ise zayıf bir uyum sergileyecek ve bağlanması muhtemel olmayacaktır. Benzer şekilde, tat ve kokuyla ilgili duyu reseptörlerimiz de kiral olduğundan, kiral bileşiklerin enantiyomerlerinin tadı ve kokusu sıklıkla farklı olur. Örneğin, doğal L-asparajin acıdır, yapay D-asparajin ise tatlıdır [159]. Terpen ailesinin bir bileşiği olan limonen narenciye kabuğunun esansiyel yağında bulunur. Limonen yapısı kiral bir merkeze sahiptir ve bu nedenle doğada (R)- ve (S)-limonen olmak üzere iki enantiyomer olarak bulunur. İzomer (R)- portakalın karakteristik kokusuna sahipken, (S)- limon gibi kokar (Şekil 4.3) [158].



Şekil 4. 3 Farklı tat ve kokulara sebep olan enantiyomer çiftleri

Eğer kiral bir molekül biyolojik bir hedefe yönlendirilirse, iki enantiyomer, farklı şekillerde etki gösterebilen farklı bileşikler olarak görülmelidir. İki enantiyomerin gücü, emilimi, taşınması, bozunması ve atılımı vücutta oldukça farklı olabilir. Bu çoğu zaman bir sorun olmasa da, en kötü senaryoda istenmeyen enantiyomer oldukça toksik olabilir (Şekil 4.4). Bu noktada özellikle trajik bir örnek, rasemat olarak satılan ve 1950'lerin sonlarında çocuklarda ciddi malformasyonlara yol açan sakinleştirici Talidomid idi (aynı zamanda Contergan olarak da bilinir). Daha sonra bunun (S)-enantiyomerinin teratojenik doğasından kaynaklandığı bulunmuştur. Bu durum ve diğer gözlemler, rasemizasyonun vücutta kolayca meydana gelmesi nedeniyle Thalidomide için yalnızca (R)-enantiyomerinin uygulanmasının yardımcı olmayacağı bulunmuş olmasına rağmen, enantiyomerik olarak saf bileşikler için artan bir baskıya yol açmıştır [159].



Şekil 4. 4 Rasemik ilaçların insan vücuduna etkileri

4.3 Kiral İlaçlar

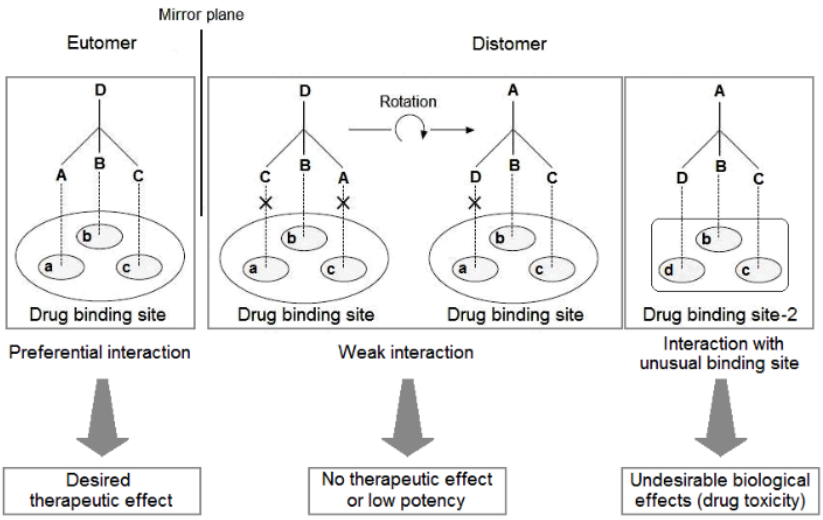
Farmasötikler, insan vücudunun hastalıklarını, sağlık durumlarını veya yapısını/işlevlerini teşhis etmek, tedavi etmek, değiştirmek veya önlemek amacıyla kullanılan kimyasallardır. Enzimler, nükleik asitler veya membrana bağlı proteinler gibi makromoleküller ilaç reseptörünün bağlanma bölgesi ile etkileşime girerek etki gösterirler ve bir ilaç-reseptör kompleksi oluşturarak farmakolojik etkiyi teşvik ederler [160].

Farmakokinetik açısından bakıldığında, bağlanma proteinleri, membran proteinleri, enzimler ve diğer kiral moleküllerin önemli bir role sahip olduğu biyolojik süreçleri temsil ettikleri için her enantiyomer için emilim, dağılım, metabolizma ve atılım (örn. protein bağlanmasının önemli olduğu pasif veya aktif yolla taşıma) farklı olabilir. Stereoizomerizmden kaynaklanan farmakodinamik farklılıklar, farmakolojik aktivite ve potansiyelde olabilir. Kiral farmasötikler normalde farklı farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklere sahip olduğundan, bağlanma bölgesinden farklı ayrışma sabitine ve buraya farklı bağlanmaya sahiptirler ve bu da nitelik veya nicelik açısından farklı biyolojik tepkilere yol açar (Şekil 4.5) [161]. Kiral bir ilacın terapötik etkisi, genellikle bir tek enantiyomere (eutomer) atfedilirken, diğer enantiyomer (distomer) genellikle etkisiz veya istenmeyen etkilere neden olabilir. Aşağıdaki durumlarda rasemat olarak kullanılabilen kiral farmasötiklerin örnekleri verilmiştir:

(a) Her iki enantiyomerin farmakolojik aktivitesi aynıdır (örneğin, prometazin, antihistaminik). Bu etki, eşit farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerden kaynaklanmaktadır;

(b) Bir enantiyomer biyolojik olarak diğerinden daha aktiftir (örn. propranolol, b-bloker). Bu durumda her iki enantiyomer de reseptöre ulaşabilir, bağlanma bölgesine farklı ayrışma sabiti ile bağlanabilir, bu da bir enantiyomerin daha güçlü bir şekilde bağlanmasına yol açar;

(c) Enantiyomerlerden biri diğerinin yan etkilerini antagonize eder (örn. indacrinon) [157].



Şekil 4. 5 Bir kiral ilacın iki enantiyomeri arasındaki varsayımsal etkileşim ve bağlanma bölgesi

Diğer durumlarda, çoğunlukla enantiyomerlerin farklı reseptörlerle etkileşmesinden dolayı yalnızca tek bir enantiyomer olarak ticarileştirilmesi gereken ilaçlar vardır. Bunlar;

(a) Bir enantiyomerin biyolojik olarak aktif olması ve diğerinin aktiviteye sahip olmaması durumunda farklı tepkilere yol açar (örn. a-metildopa, antihipertansif- L isomer aktif)

(b) Bir enantiyomer biyolojik olarak aktif, diğeri ise antagonisttir (örn; picenadol, analjezik- (+)- aktif izomer)

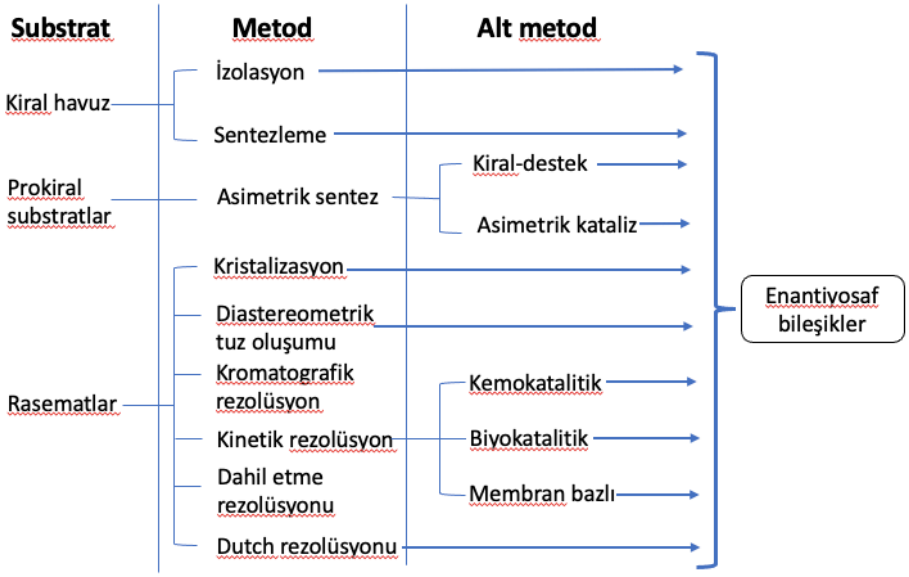
(c) Enantiyomerlerin farmakolojik aktivitesi farklıdır (örn; propoksifen: analjezik ve öksürük önleyici etkiler- Dekstropropoksifen- Levopropoksifen)

(d) Bir enantiyomerin yan etkileri vardır (örn. L-Dopa)

Günümüzde kiral ilaç üretimine yönelik yeni yöntemlerin geliştirilmesine yönelik endüstriyel araştırmalarda artan bir çaba bulunmaktadır (Şekil 4.6). Şu anda geliştirilen yöntemler şunlardır:

1. *Kiral havuz sentezi*: Bu yöntemde, doğal olarak bulunan yüksek enantiyomerik saflıktaki bileşikler kullanılır.
2. *Laboratuvarda icat edilen kiral yapı taşları (yeni kiral havuz)*: Bu yöntemde, Doğal olarak bulunan kiral moleküllerden yüksek enantiomerik saflıktaki bileşiklerin üretilmesi için kullanılır.
3. *Asimetrik sentez:* Bu yöntem, kiral olmayan başlangıç malzemelerinden başlayarak enantiyomerik saflıkta ürünlerin elde edilmesini sağlar.
4. *Rasematların rezolüsyonu: Bu yöntem, rasematik karışımların ayrılması için kullanılır, rezolüsyon süreci ile eutomer elde edilir.*
5. *Biyotransformasyonlar* [157].

Her birinin farklı avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Özellikle Biyotransformasyon yöntemi rasematların organik sentezi için biyokatalizör kullanır. Bu yöntem, yeşil kimya ve enantiyosaf ilaçların sentezi alanında pek çok asil özellik sunmaktadır. Organik sentezde enzim ve mikroorganizmaların uygulanması, geleneksel kimyasal yöntemlere kıyasla ılıman reaksiyon koşulu, yüksek bölgesel-, kemo- ve enantiyo- seçicilik, yüksek katalitik verimlilik ve yüksek ürün saflığı gibi avantajlar sağlar [157], [161].



Şekil 4. 6 Enantiyosaf bileşiklerin sentez yöntemleri

Benjamin List ve David William Cross MacMillan'a 2000'li yıılarda yaptıkları "asimetrik organokatalizin geliştirilmesi' çalışmalar neticesinde 2021 Nobel Kimya Ödülü, ortaklaşa verildi. List, katalitik antikorlarla gerçekleştirdiği çalışmalar sonucunda, amino asitlerin asimetrik katalizini mümkün kılabilen bir yöntem geliştirdi. Bu çalışmasında, proteinleri oluşturan 20 amino asitten biri olan Pirolin'i kullanarak metal ve enzim katalizörlerine göre daha basit, maliyeti düşük ve çevre dostu bir katalizörün kullanılabileceğini gösterdi. MacMillan ise, organik molekülleri asimetrik katalizde kullanarak bu organik katalizörlere "organokataliz" adını verdi. Organokataliz, inorganik bir elementin (yapıda bulunsa bile) aktif katalitik prensibin bir parçası olmadığı küçük organik moleküllerle yapılan katalizi ifade eder. [162].

5
BİYOTRANSFORMASYON

5.1 Biyotransformasyon ve Kısa Tarihi

Biyotransformasyon, hücreler, organlar veya enzimler tarafından katalize edilen kimyasal reaksiyonlardır. Canlı sistemlerinde, hayvanlarda (ilaç metabolizması), bitkilerde (ikincil metabolizma) ve mikroorganizmalardaki birçok metabolik süreç, yaşanan değişim ve dönüşüm mekanizmalarının tümü biyotransformasyon olarak adlandırılır [23]. Bu sistem, organik veya inorganik yapı taşlarına dönüşen ve istenmeyen veya toksik ürünlerin dönüştürülmesi sonucu sistemden uzaklaştırılan bileşenler üzerine kuruludur [26, 27], [163].

Biyoteknoloji uygulamalarının önemli bir basamağını oluşturan biyotransformasyon, geniş uygulama alanlarına sahiptir. Sentetik olarak gerçekleşmesi zor tepkimelerin tek adımda ve çevreye daha az zararla gerçekleşmesini sağlarlar [26, 27]. Biyotransformasyon reaksiyonları sonucu oluşan ürünler sterokimyasal olarak da korunabilmekte ve bu durum onu, reaksiyon sonrası rasemik karışım veren kimyasal sentezden üstün kılmaktadır [164].

Basit substratların birleşmesi ile karmaşık ürünlerin oluşması olarak bilinen biyosentezden farklı olarak biyotransformasyon, yeni ürünler veya var olan ürünlerin daha verimli ve etkinliliği daha yüksek ürünler oluşturma potansiyelini barındırır [165]. Substrat ve katalizörün doğru seçimi biyotransformasyon reaksiyonlarının başarısını arttırır.

Yeni bileşikler elde etmek amacıyla kullanılan ve farklı biyolojik kaynaklardan elde edilen enzimler ve mikrooganizmalar, biyokatalitik metodolojilerin gelişmesinin önünü açmış, bu durum da onların farklı ortamlarda kullanımı kolaylaştırarak metobolik yolların araştırılmasına, genetik açıdan manipüle edilmelerine ve geliştirilmelerine olanak sağlamıştır [166].

Biyolojik olarak aktif bileşenlerin yapılarında gerçekleştirdiği değişiklikler ile yeni metabolitlerin keşfine olanak sağlayan biyotransformasyon reaksiyonları aynı zamanda oluşturduğu bu değerli metabolitler aracılığıyla hayvan ve bitki

patojenlerine karşı zamanla artan ilaç direncinin aşılmasına yardımcı olmuştur [167], [168].

İlaç ve kimya endüstrisi için biyotransformasyonun avantajlarına bakılacak olursa bunlar şu şekilde sıralanabilir [24], [169];

- Stereo-, regio- ve enantiyoselektif reaksiyon katalizi,
- Substratların reaktif olmayan bölge aktivasyonu,
- Ilıman koşullarda işlenebilirlik (optimum pH, atmosferik basınç, toksik olmayan ortam vb.).

Biyotransformasyon reaksiyonları eski çağlardan beri kullanılan ve yeni olmayan bir tekniktir. Literatür incelemelerine dayanarak çok eski zamanlardan beri toplumların bu yöntemi farkında olmadan günlük hayatlarında kullandığı söylenebilir. Bilinen en eski biyotransformasyon reaksiyonlarına verilebilecek iki örnek vardır; etil alkolün asetik aside oksidasyonu ile sirke üretimi ve bira mayası tarafından şekerin etil alkole dönüşümü M.Ö 3000'li yıllara ait bazı örneklerde mayalama yardımı ile ekmek yapımı ve bazı içkilerin üretimi yine biyotransformasyon reaksiyonlarının kullanıldığını göstermektedir [25].

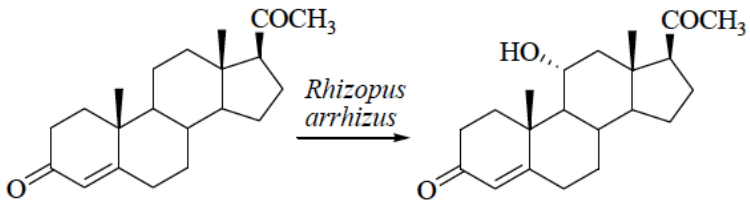
Tüm bunların yanı sıra fermantasyon yoluyla üretilen organik asitler ve alkoller gibi bazı kimyasallar ve önemli bazı bileşenler ile alakalı bilgiler ve litaratür raporları yeni olmakla birlikte yakın geçmiş sayılabilecek 19.yy ortalarına dayanmaktadır. Günümüzde biyotransformasyon olarak adlandırdığımız reaksiyonlar, 19 yy. itibari ile başlayan çalışmalardan elde edilen veriler ışığında bazı mikroorganizmaların belirli bileşikleri kimyasal reaksiyonlar aracılığıyla değiştirebileceğinin keşfi ile tanımlanmıştır [170].

Daha sonraki gelişmeler tarih sırasına göre şu şekilde sıralanabilir;

- 1858 yılında Pasteur, *Penicillium glaucum* küfü aracılığıyla rasemik tartarik asidin amonyum tuzunun fermantasyonunu gerçekleştirdi [171].
- 1862 yılında Pasteur tarafından sirke üretimi sonrası sirke üzerinde oluşan (Pasteur sirke çiçeği olarak adlandırmıştır) zarın havadaki oksijen için çok sayıda organik maddeye ulaşım yöntemi olduğunu belirtmiş ve 1886'da Brown, Pasteur'ün bulgularını onaylamıştır. Sirke oluşumuna sebep olan yapıyı *Bacterium xylinum* olarak adlandırmıştır. Brown aynı zamanda bu

mikroorganizmanın propanolü propiyonik aside ve mannitolü de fruktoza yükseltgediğini bulmuştur [28], [172].

- 1874 yılında bira mayası olarak bilinen *S. Cerevisiae'*nin kükürdü hidrojen sülfüre indirgediği Dumas tarafından bildirildi. 1898'de de Windisch tarafından furfalın furfuril alkole indirgenebildiği duyuruldu [28].
- 1897'de Buchner, kum ile öğütülen ve hücre içermeyen maya hücre lizatlarının alkolik fermantasyon gerçekleştirebileceğini bildirdi [172].
- Neuberg ve Hirsch tarafından 1921 yılında ortamda bulunan maya varlığında benzaldehit ve asetaldehitin kondenzasyonu sonucu 1-hidroksi-1-fenil-2-propanon (optikçe aktif) bileşiğini elde ettiklerini duyurdular [173].
- 1923 yılında Kluvyer ve arkadaşları tarafından izole edilen *Acetobacter suboxydans* bakterisi kullanılarak D-sorbitolden L-sorboz elde edildi. 1930'da L-sorbozun C-vitamini sentezinde kullanılması önemini ciddi biçimde arttırmıştır [174], [175].
- 1937'de *S. cerevisiae* ile yapılan çalışmada Dehidroepiandrosteron (DHEA) bileşiğinden testesteron elde edildi [28].
- 1948 yılında *Proactinomyces roseus* bakterisi kullanılarak, Kolesterol C-7 pozisyonunda okside edildi. Aynı bakterinin sterolleri degrede ve okside ettiği de bildirildi [28].
- 1953 yılında *Rhizopus arrhizus* küfü kullanılarak yapılan çalışmada progesteron, α-hidroksiprogesteron bileşiğine dönüştürüldü (Şekil 5.1) [176], [177]. α-hidroksiprogesteron kortizon sentezi için aracı olan moleküldür. Yaşanan bu gelişmenin ardından kortikosteroid hormonların ve türevlerinin kimyasal sentezi basitleştirilmiş ve üretim maliyeti azaltılmıştır [177].



Şekil 5. 1 Progesteronun mikrobiyal biyotransformasyonu

1960'lı yılların başında yaşanan Thalidomide felaketinin ardından ilaç sanayide, etkin tek enantiyomer sentezi çalışmaları çok önemli hale geldi. Organik sentezdeki

en büyük zorluklardan biri, enantiyomerik olarak saf bileşiklerin verimli bir şekilde hazırlanması için çevresel olarak kabul edilebilir kimyasal süreçlerin geliştirilmesidir. Organik bileşiklerin asimetrik sentezi; organometalik katalizörler, organokatalizörler ve kiral kimyasal reaktifler kullanılarak incelenmiştir [178], [179]. Bazı durumlarda elde edilen ürünler, yeni ilaçların geliştirilmesinde biyolojik olarak anahtar görevi görmektedir. Kiral ana ürünlerin tek bir enantiyomerini elde etmek için kullanılan kimyasal işlem çok sayıda parametre içermektedir (çok sayıda reaktan, organik çözücü, yüksek sıcaklık, multistep vb.) [180].

Modern sentetik organik kimya ve biyokimyasal yöntemler, "biyo-temelli kimya"da güçlü hazırlama araçları sağlamak için tamamlayıcı bir şekilde çalışmaktadır.

5.2 Biyotransformasyon Teknikleri, Reaksiyon Tipleri ve Türleri

Endüstriyel öneme sahip bileşiklerin elde edilmesi amacıyla biyolojik sistemlerin veya enzim sistemlerinin katalizör olarak kullanılması olarak adlandırılan biyotransformasyon süreçleri, kullanılan biyokatalizörlere göre iki kategoride sınıflandırılır; enzimatik sistemler ve bütün hücre sistemleri [26, 27].

Bütün hücre sistemleri endüstriyel alanda en çok tercih edilen tekniktir. Bunun nedenleri ise optimum kataliz koşulların varlığı, gerekli kofaktörlerin üretilip rejenere edilme yetenekleri, uygun hücresel koşullar sağlandığı takdirde enzimlerin bu sistemlerde daha düzgün katlanması ve ekonomik proses imkanın yüksek olması olarak verilebilir. Belirtilen bu sistemlerden çoğunlukla tercih edilen sistem ise mikrobiyal sistemlerdir [23], [181], [182].

5.2.1 Biyotransformasyon Teknikleri

Enzimler veya bütün hücre sistemlerinin kullanıldığı biyotransformasyon teknikleri aşağıda açıklanan altı alt grupta sınıflandırılır.

5.2.1.1 Serbest ve sabitlenmiş enzimler ile biyotransformasyon

Enzimler kullanılarak gerçekleştirilen biyotransformasyon çalışmalarının en önemli sorunu reaksiyon sonrası oluşan metabolitler ve ürünlerin izolasyonu aşamasında kullanılan ayırma metodlarının kullanılan enzime zarar vererek onu denature etmesi ve yeniden kullanımına engel olmasıdır. Bu zorluk immobilizasyon

teknikleri kullanılarak enzimlerin bir yüzeye veya matrix ortamına sabitlenmesi ile çözülmüş ve enzim katalizörlerinin tekrar tekrar kullanılmasını sağlamıştır [26, 27].

Saf olmaları nedeniyle tercih edilen izole enzimler pahalı olmalarına karşın tek tip rekasiyonları katalizlediklerinden sıklıkla tercih edilirdi. Ancak son zamanlarda immobilize tekniklerin gelişmesi ile beraber ucuzlayan ve ekonomik açıdan avantaj sağlayan sabitlenmiş enzim formları, izole enzimlerin yerini almıştır [183], [184].

5.2.1.2 Sabitlenmiş hücreler ile biyotransformasyon

Bu yöntemde biyokatalizör, ayrılamayacağı ancak katalitik olarak aktif kaldığı (katı bir matris veya zarla sınırlandırılmış bir bölmeye hapsedilerek) sınırlı bir alanla sınırlandırılarak işlev gösterir. Ancak bu yöntemde hücreler (genellikle mikroorganizmalar) ürün ve substratın geçişine izin verecek şekilde polimer, matrikse sabitlenmelidir. Hücrelerin matrikse immobilizasyonu adsorpsiyon, iyonik veya kovalent bağ teknikleri kullanılarak gerçekleştirilir. Bu tekniklerinde kullanılan polimerlere örnek olarak jeller (poliakrilamid, aljinat, agaroz) ve polimerler (selüloz, nişasta, kitin), karboksimetil selüloz veya Amberlite IRA gibi katyon değişim reçineleri ve anyon değişim reçineleri (dietil aminoetilselüloz (DEAE-selüloz) veya sephadex gibi) ve dekstran verilebilir. Bu yöntemler kullanılarak biyotransformasyon reaksiyonları sürekli gerçekleştirlebilir [26, 27], [183]**.**

Rhizopus nigricans sporlarının poliakrilamid, agar ve kitosana, *Penicillium raistrickii*'nin sporlarının çapraz bağlı polimerler ve aljinata, *Mortierella isabellinan*'ın aljinata immobilizasyonu hücrelerin polimerler kullanılarak bir matrikse sabitlenmesine örnekler olarak verilebilir [183]**.**

5.2.1.3 İzole enzimler ile biyotransformasyon

Doğal kaynaklardan izole edilerek veya ticari olarak belirli yöntemlerle elde edilen saf veya yarı saf enzimlerin kullanılması ile biyotransformasyonlar gerçekleştirilebilir. İzole enzimler aracılığıyla gerçekleştirilen reaksiyonlar genellikle başarılı sonuçlar vermektedir. Ancak daha önce de belirtildiği gibi izole edilmiş enzimler pahalıdır ve aynı zamanda özel reaksiyon koşulları gerektirir. Kafaktör gerektirmesi de bu tekniğin dezavantajları arasındadır [26, 27], [28].

İzole enzimlerin çoğunluğunu sitokrom P450 monooksigenaz enzimleri oluştururlar. Bu enzimler steroid ve steroid benzeri hormonların hidroksillenme

rekasiyonlarının önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Bir filamentli mantar türü olan *Pycomyces blakesleeanus*'dan izole edilen hidroksilaz enzimleri steroid hormonlarında 7α– ve 15β steroseçicilik gösterirler. Bir diğer yandan bir bitki patojeni olan Mucor pirifermis küf mantarından izole edilen enzimler de 14α–hidroksilazlar olarak bilinmektedirler [26, 27], [183], [184].

5.2.1.4 Sporlar ile biyotransformasyon

Sporlar ile gerçekleştilen biyotransformasyon yönteminde mikroorganizmalara ait sporlar kullanılmaktadır. Mikroorganizmaya ait sporların oluşması için uygun koşullar oluşturulur ve bu sporlar misellerden izole edilerek uygun ortamlarda muhafaza edilir. Bu yöntemin diğer yöntemlere üstünlüğü izole edilen sporların soğuk ortamda depolanabilmesi ve tekrar tekrar kullanılabiliyor olmasıdır [183], [184].

5.2.1.5 Durağan hücreler ile biyotransformasyon

Hücreler veya mikroorganizmalar, bekletildikleri ve kendilerine özgü olan besiyerlerinden çeşitli tekniklerle ayrıştırılıp enzim indüksiyonunun gerekli olmadığı biyotransformasyon ortamına alınır ve üzerine substrat ilavesi yapılır. Stasyoner hücreler kullanılarak gerçekleştirilen bu yöntemin avantajları; kirlenme riskinin az olması, ortamdaki hücre sayısının sabit kalması ve dönüşüm reaksiyonunun gerçekleştiği tampon çözeltiden ürünün geri kazanımının kolay olması şeklinde sıralanabilir [183], [185].

5.2.1.6 Büyüyen hücreler ile biyotransformasyon

Büyüyen kültürler kullanılarak yapılan bu teknikte, kullanılacak tür uygun besi ortamında geliştirilir ve daha sonra ortama biyotransformasyonun gerçekleşmesi için konsantre substrat çözeltisi eklenir [186]. Ortamdaki kültür arttıkça reaksiyonun gerçekleşmesini sağlayacak enzimler de artacaktır. Bu nedenle bu tekniğin avantajı yüksek verimde madde elde edilmesi olarak belirtilebilir. Substrat biyotransformasyon reaksiyonun gerçekleştirildiği ortama aşılama ile birlikte eklenebileceği gibi üremenin durgun olduğu fazda da eklenebilir [183], [184]. Ortama eklenen substratın organizma üremesini inhibe etme durumuna karşılık besi ortamında bulunan organizmalar belli bir hücre derişimine ulaştıktan sonra substrat eklenmesi daha doğru bir yaklaşım olacaktır.

5.2.2 Başlıca Biyotransformasyon Reaksiyonları

Biyotransformasyon reaksiyonları, laboratuvar ortamlarında gerçekleştirilen ve rekabetçi olan kimyasal ve sentetik reaksiyonlara eşdeğer denilebilecek ancak bu tür reaksiyonlara da alternatif bir metodoloji olarak kullanılabilecek sentez araçlarının bir bölümünü temsil eder. Organik sentezde gerçekleştirilen biyotransformasyonların çoğu hidrolaz sınıfı enzimler tarafından gerçekleşir [187].

Başlıca biyotransformasyon rekasiyonları aşağıda belirtildiği gibi 7 şekilde gruplandırılabilir [26, 27], [28].

1) Oksidasyon (hidroksilasyon, epoksidasyon, dehidrojenasyon, kısmi oksidatif degradasyon),
2) Redüksiyon (aldehitlerin, ketonların, karboksilik asitlerin, heteroatomların indirgenmesi, çifte bağların halojenasyonu),
3) Hidrolitik reaksiyonlar (esterlerin, C-N ve epoksitlerin hidrolizi, C=C bağlarına su girişi, N-demetilasyon),
4) Katılım ve kondenzasyon (ester ve amit bağlarının oluşumu, asikloin kondenzasyonu, C=C baglarına amonyak ilavesi, birleşme reaksiyonları),
5) İzomerizasyon,
6) Yeni C-C bağlarının oluşumu,
7) Yeni heteroatomların ilavesi.

Yukarıda sıralanmış ve geniş bir çeşitliliğe sahip bu biyotransformasyon reaksiyonları, kimyasal reaksiyonlara bir alternatif olmakla beraber, sentetik olarak gerçekleştirilmesi zor veya gerçekleşme ihtimali olmayan reaksiyonları katalizleme olanağı sayesinde ön plana çıkmaktadır [26, 27],

Biyotransformasyon reaksiyonları; benzer olan fonksiyonel gruplardan sadece bir grubun reaksiyona sokulması, rasemik karışımların ayrıştırılması, enantiyomer çiftlerinden birinin seçici olarak dönüştürülmesi, kiral merkeze bir grubun eklenmesi ve deaktif bir C-atomunun aktif bir fonsiyonel gruba dönüşümü şeklinde de sınıflandırılabilir. [28]

Kimyasal reaksiyonlardan farklı olarak katalizör olarak canlı sistemlerini ve enzimleri merkezine alan biyotransformasyon reaksiyonları, daha hassas tepkime koşulları ile kimyasal reaksiyonlardan farklıdır. Bu hassas tepkime koşullarını etkileyen faktörler; pH, ortam sıcaklığı, besiyeri içeriği, eklenen substrat derişimi

ve toksisitesi, oksijen miktarı, mikroorganizma suşu kökeni, çalkalama hızı ve zaman'dır [26, 27], [28].

5.2.3 Enzimatik Biyotransformasyon

Tüm yaşam formları, metabolik biyokimyasal reaksiyonların katalizlenmesi için enzimlere ihtiyaç duyar. Bu makromoleküller, reaksiyonların hızlı bir şekilde ve ılıman ortamlarda, hafif bir pH ve sıcaklık aralığında sürmesine yardımcı olur. Ayrıca enzimler, hücre büyümesine uygun olmayan in vitro koşullarda da sürekli olarak görev yapabilmektedir [188].

Biyotransformasyon reaksiyonları için gerekli olan enzimler serbest veya immobilize edilmiş halde olabileceği gibi çeşitli biyolojik sistemlerin bünyesinde de bulunabilmektedir. Günümüz biyotransformasyon reaksiyonlarında kullanılan enzimler ya izole edilerek ya da ticari şekilde elde edilerek kullanılmaktadır. Enzimler, katalize ettikleri reaksiyonlara göre altı ana grupta sınıflandırılır. Bu sınıflar da kendi içinde 4-13 arası alt sınıflara ayrılır [189] ;

- Oksidoredüktazlar,
- Transferazlar,
- Hidrolazlar,
- Liyazlar,
- Izomerazlar,
- Ligazlar.

Biyotransformasyon reaksiyonlarında enzim kullanmanın avantajları şu şekildedir [26, 27], [28];

- Hızlı bir şekilde fonksiyon göstermeleri
- Reaksiyon hızını arttırmaları (108-1010 kat arası)
- Doğaya katalizör olarak kullanılan ağır metaller ve diğer reaktifler gibi zarar vermemeleri
- Optimum sıcaklı koşulları (20-40 °C) ve pH aralığındaki (5-8) ılıman koşullar altında katalizörlük yaptıklarından rasemizasyon, bozunma, çevrilme ve izomerleşme gibi istenmeyen yan reaksiyonları nadiren vermeleri
- Bazı enzim türlerinin geniş substrat spekturumuna sahip olmaları sebebiyle doğal veya sentetik birçok bileşikte kimyasal değişimler yaratmaları

Geniş bir reaksiyon çeşitliliği bulunan enzimler fazla sayıda ve farklı tipte reaksiyonları katalizlediklerinden sentetik reaksiyonlara eş reaksiyonlar verebilirler. Karboksilasyon, dekarboksilasyon, izomerizasyon, ester, amid hidrolizi veya sentezi, aldol reaksiyonları, alkan, alken, aromatik bileşikler, alkol, aldehit, keton gibi reaksiyon türleri örnek olarak verilebilecek enzimatik reaksiyon türlerindendir [26, 27], [28], [190].

Enzimler, protein yapılarında sadece L-aminoasitlerini barındırdıkları için enantiyoseçici, karmaşık 3D yapıları sayesinde regioseçici ve stereoseçici ve aynı zamanda da kemoseçici olan kiral moleküllerdir. Enantiyoseçicilikleri sayesinde rasemik karışımlardan tek bir enantiyomeri etkilerler. Regio- ve stereo- seçicilikleri sayesinde etki ettikleri substratlarının farklı bölgelerinde yer alan fonksiyonel grupları tanıyarak ayırt edebilirler. Bir diğer yandan kemoseçici özelliği sayesinde de belirli bir fonksiyonel grubu etkilediğinden yan ürün oluşumunun önüne geçilmiş olur [26, 27], [28].

Tüm bu özelliklerine rağmen enzimlerin kullanılmasının bazı dezavantajları da bulunmaktadır. L-amino asitler sayesinde kazandığı avantaj, D-amino asit sentezi için genel bir yol olmadığından yalnızca belirli enantiyomer ile reaksiyona girmesine sebep olduğu için dezavantaja da dönüşebilmektedir. Böyle bir durumda diğer enantiyomerin saflaştırılması ve ayrımı için zıt bir stero-seçici enzim kullanılmalıdır. Bir diğer yandan enzimler protein yapıda oldukları için pH ve sıcaklık değişikliklerini minimum düzeyde tolere etmekteler. Bu da yavaş gerçekleşen enzimatik bir tepkimenin verimini arttırmak amacıyla yapılacak parametre değişikliklerini kısıtlar. Reaksiyon ortamında zamanla biriken ürünler veya substratın yüksek derişimleri inhibisyona yol açar ve bu durum aktive kaybına sebep olur. Enzimler sulu ortamlarda yüksek etkinlilik gösterirler. Ancak organik bileşiklerin büyük çoğunluğu suda çözünmez. Sulu ortam yerine organik bir çözücü ortamı kullanılarak yapılacak enzimatik sentez ise denatürasyonla sonuçlanacaktır. Aynı zamanda enzimler kataliz reaksiyonlarını gerçekleştirmek için kofaktöre ihtiyaç duyarlar. Reaksiyon işlemleri esnasında sürekli yenilenmesi gereken kofaktörler hem pahalı hem de kararsız bileşiklerdir [26, 27], [28], [190].

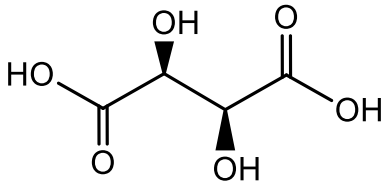
5.2.4 Mikrobiyal Biyotransformasyon

Biyotransformasyon reaksiyonları içinde en çok tercih edilen mikrobiyal biyotransformasyon [26, 27], katalizör olarak mikroorganizmaları kullanarak bir

bileşiği başka bir bileşik veya benzer bir bileşiğe dönüştürerek işlev gösterir [191]. Bütün hücre sistemlerinden mikrobiyal biyotransformasyon sisteminin tercih sebepleri;

- mikrobiyal hücrelerin, bitki ve hayvan hücrelerine kıyasla daha hızlı büyüme ve gelişme göstermesi,
- hücre duvarlarının etkili farklı yapılanma ile çevreye sağladığı uyum ve minik boyutları aracılığı ile mekanik dayanımlarının daha iyi olması,
- mikroorganizmalar spesifik olmayan enzim sistemleri içerdiklerinden farklı türde substratları, diğer hücrelere oranla daha metabolize etmeleri.

Mikroorganizmaların, herhangi bir bileşik yapısını değişime uğratabileceği fikrini ilk olarak Pasteur belirtmiştir [171]. Pasteur yaptığı çalışmada amonyum tartaratın dekstro formunun, levo formunu etkilemeden bırakan *Penicillium glaucum* küf mantarını tarafından özel olarak fermente edildiğini gösterdi [171], [192], [193]. DL-amonyum tartarattan D-enantiyomerinin yıkılması sonucu şekil 5.2'de gösterilen L-amonyum enantiyomeri elde edilmiştir.



Şekil 5. 2 Pasteur'ün fermentasyon sonrası elde ettiği (S,S)-tartarik asit

Klasik sentez reaksiyonları ile karşılaştırıldığında mikrobiyal biyotransformasyonun bazı üstün özelliklere sahip olduğu belirtilebilir. Daha ılıman reaksiyon şartları olan oda sıcaklığı ve atmosferik basınç altında ve daha kısa sürelerde sentezlerin tamamlanması bunlara örnek olarak verilebilir. Mikroorganizmalar genetik olarak manipüle edilebilen canlılar oldukları için gerçekleştirilecek genetik değişiklikler aracılığıyla klasik sentez reaksiyonlarına göre daha yüksek verimlerde ürün elde edilebilir. Bununla birlikte yapılan genetik değişiklikler ile sentezlenecek ürün üzerinde bile istenilen değişimler yaratılabilir [194].

Zararlı kimyasal reaktifler kullanılmadığından çevre dostu bir yöntemdir [28]. Kimyasal metodlara kıyasla daha ucuza mal olan besiyeri bileşenleri kullanılarak daha ucuza mal edilir. Daha kısa sürelerde tamalandığından hem zaman hem de

enerji tasarrufu sağlar [26, 27], [28]. Bir diğer ve önemli noktalardan biri ise kimyasal metodlarla elde edilen ürünlerin rasemik karışımlar halinde elde edilmesi ve bu durumun hedef moleküllerin ayrılmasını zorlaştırdığıdır. Mikrobiyal biyotransformasyon yöntemleri enantiyoseçici oldukları için özellikle ilaç etkin maddelerin üretiminde gerekli ve önemli olan tek enantiyomerin seçilimli üretimi bu yol kullanılarak günümüzde yaygınlaşmıştır [195].

Klasik kimyasal sentezlere kıyasla, biyotransformasyon reaksiyonlarında substrat üzerinde yer alan fonksiyonel grupların korunması gerekmemektedir. Bu da mikrobiyal reaksiyonlarda fonksiyonel grupların varlığına ihtiyaç olmadığı anlamına gelir. Mikroorganizmların içerdikleri enzimler sayesinde bu avantaja sahip oldukları belirtilmelidir. Çünkü enzimler regio-seçici özelliğine sahiptir [26, 27], [28].

İlaç etken maddelerinin üretimi, değişimi veya dönüşümünde, toksik maddelerin ve hidrokarbonların daha az toksisiteye sahip veya tamamen zararsız bileşenlere dönüştürülmesinde, ağır metallerin giderilmesinde mikobiyal biyotransformasyon yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır [196].

Mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonlarında yaygın biçimde kullanılan mikroorganizma grupları mantarlar aleminden mayalar ve küfler, protista alemi üyeleri bakterilerdir [194].

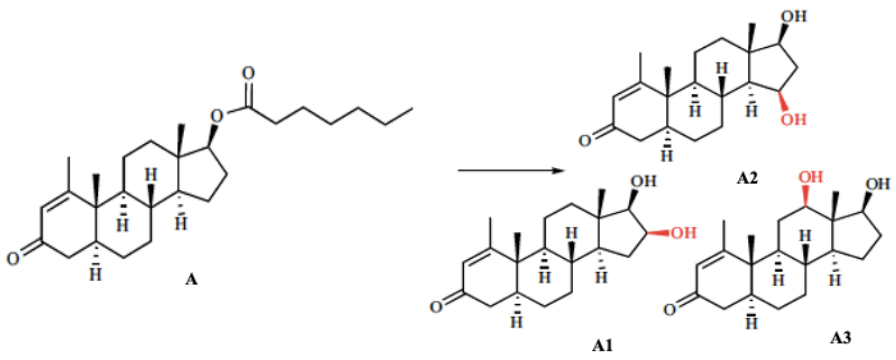
5.2.4.1 Aspergillus Türlerinin Biyotransformasyon Örnekleri

Filamanetli mantarlar olan aspergillus türleri çeşitli enzim türlerinin (fitazlar, glukoamilazlar, ksilanazlar, proteazlar, lipazlar, a-galaktosidazlar ve pektinazlar vb.) üretiminde kullanılmakta ve fermente gıdalar, tatlandırıcılar ve organik asitler üretmek amacıyla biyoteknolojik metodlar kullanılmaktadır [197], [198]. Ayrıca aspergillus kültürleri kullanılarak farklı organik bileşikler, organik kimya ve ilaç sanayi için gerekli olabilecek bileşiklere dönüştürülmektedir [199], [200].

Çeşitli aspergillus suş kültürlerinin alifatik ve aromatik organik bileşikleri biyotransformasyona uğrattığı belirlenmiştir. Substrat olarak görev gören ve biyotransformasyon reaksiyonalarına tâbi tutulmuş bileşikler; benzen ve naftalin, nitrojen içeren heterosiklik yapılar, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, klorlu bileşikler, terpenoidler, eoksitler, steroidler ve diğer alifatik ve aromatik bileşikler şeklinde örneklenebilir [199], [201], [202].

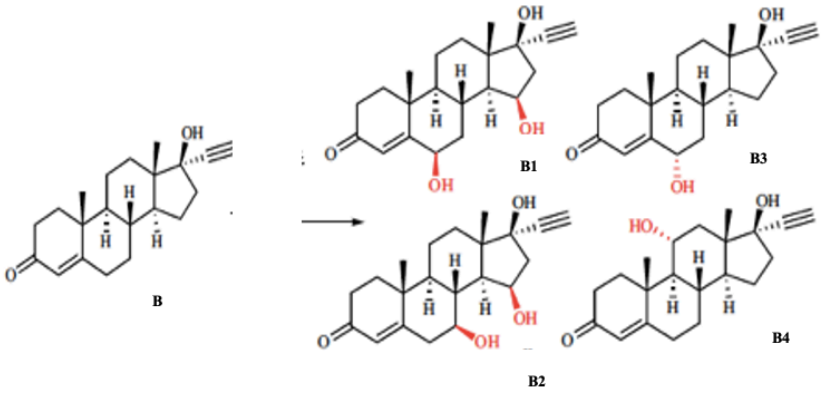
Mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonlarında sıklıkla kullanılan mantar aleminden olan küf mantarlarından aspergillus türleri ile yapılan biyotransformasyon reaksiyonları inclenmiş ve önemli olduğu düşünülen çalışmalardan bahsedilmiştir.

2016 yılında Choudhary ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada **A** bileşiğinin Aspergillus niger ATCC 10549 tarafından biyotransformasyonu, biyoaktif analoglar sağlamak için gerçekleştirildi. Sonuç olarak, üç hidroksillenmiş türev (**A1, A2, A3)** (Şekil 5.3) izole edilmiştir. Anabolik-androjenik ilaç metenolon enanthate (A), postmenopozal kadınlarda ilerlemiş meme kanserinin tedavisinde kullanılmaktadır [203].



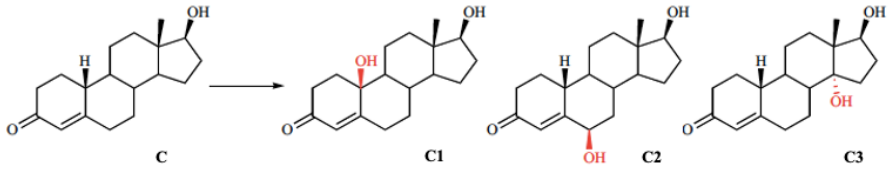
Şekil 5. 3 Metalon enantat'ın (A) A.niger tarafından biyotransformasyonu

Choudhary ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise doğum kontrol ilacı olarak kullanılan etisteron'un (**B) (**Şekil 5.4) biyotransformasyonu Aspergillus niger ATCC 1015 tarafından katalize edildiğinde, **B1, B2, B3, B4** türevleri izole edildi. Stereoselektif dihidroksilasyon ve monohidroksilasyon, substrat B'nin farklı aktif olmayan pozisyonlarında meydana geldi [204].



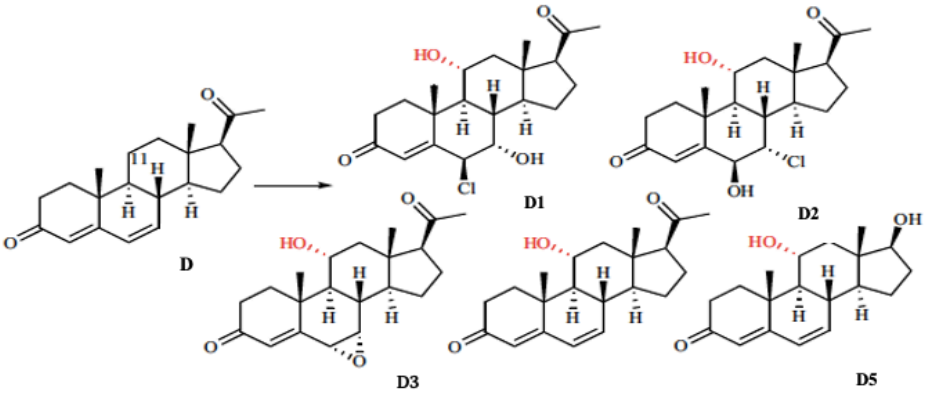
Şekil 5. 4 A.niger tarafından etisteron'un (B) biyotransformasyonu

Yıldırım ve arkadaşları tarafından 2012 yılında yapılan çalışmada Aspergillus goii MRC 200316 mantar suşu tarafından 19-nortestosteronun (nandrolone, **C**) biyotransformasyonu, C-6β'da (**C2**) büyük hidroksilasyonla sonuçlandı. C-14 (**C3**) ve C-10β (**C1**)'da bağımsız hidroksilasyon da tespit edildi (Şekil 5.5) [205].



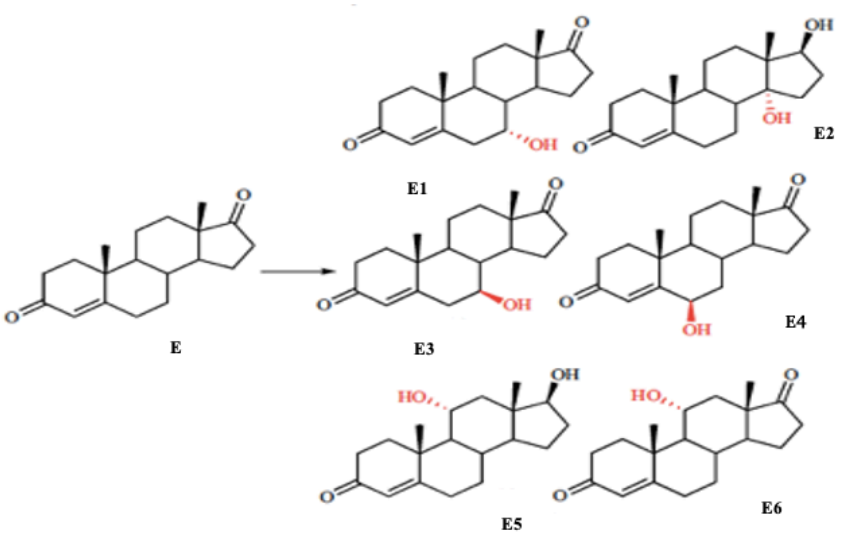
Şekil 5. 5 A.wentii tarafından 19-nortestosteron (C)'nun biyotransformasyonu

Savinova ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, Progesteronun sentetik bir türevi olan 6-dehidroprogesteronun (**D**) (Şekil 5.6) Aspergillus niger ATCC 10549 tarafından biyotransformasyonu, alfa konumunda C-11'i hidroksile ederek **D1-D5** metabolitlerini verdi [206].



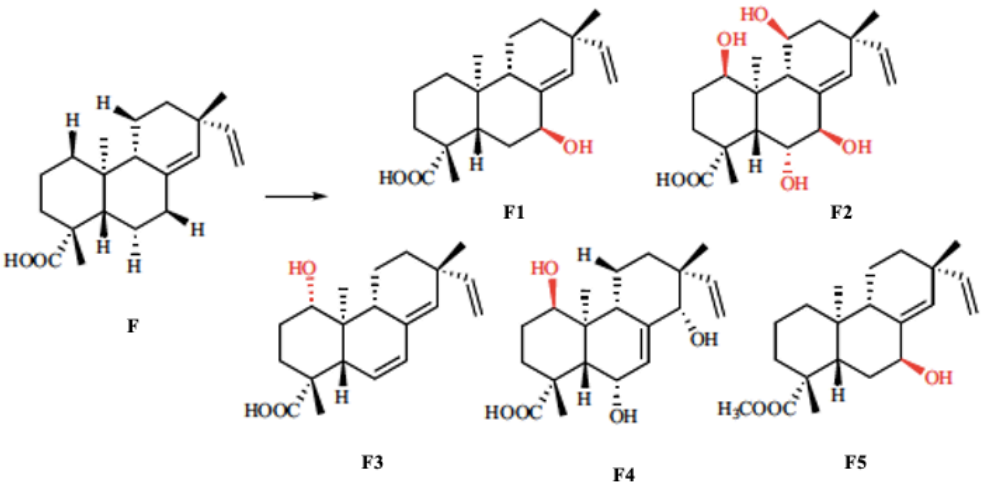
Şekil 5. 6 6-dehidroprogesteronun (D) A.niger tarafından biyotransformasyonu

Heidari ve ark. Tarafından yapılan çalışmada Androst-4-ene-3,17-dion (**E**), C-11'de Aspergillus sp. PTCC 5266 tarafından 3 günlük kültürden sonra %86 verimle hidroksile edildi (Şekil 5.7) [207].



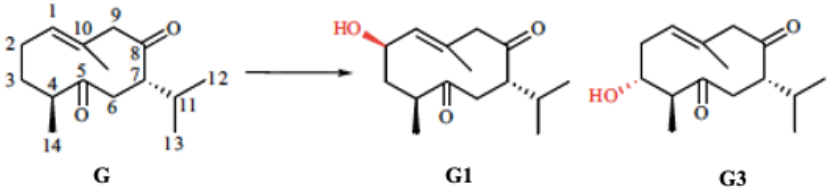
Şekil 5. 7 Androst-4-ene-3,17-dion (E) bileşiğinin Aspergillus sp. PTCC 5266 tarafından biyotransformasyonu

Viguiera arenaria köklerinden izole edilen diterpen ent-pimaradienoik asit (**F**) (Şekil 5.8), Aspergillus niger tarafından hidroksillenmiş türevlere (**F1-F5**) biyotransforme edildi. **F** bileşiğinin biyotransformasyonunun ana amacı, yeni enpimaranların biyoaktivitesini değerlendirmek ve bu doğal bileşikler sınıfı tarafından sergilenen antispazmodik aktivitede yer alan yapısal özellikleri aydınlatmaktır [208].



Şekil 5. 8 Diterpen ent-pimaradienoik asit'in (F) A.niger ile biyotransformasyonu

Doğal seskiterpen curdione (**G**) (Şekil 5.9) bir germakran iskeleti sergiler ve Curcuma wenyujin rizomlarından izole edilebilir. Bileşik **G**, geniş farmakolojik özelliklerinden dolayı dikkat çekmiştir. Curdione'nin (**G**) Aspergillus niger AS 3.739 tarafından biyotransformasyonu, çekirdeğinin regio- ve stereo- seçici hidroksilasyonunu sağladı. Hidroksilasyon, C-2β (**G1**) ve C-3'te (**G2**) gerçekleşti [209].



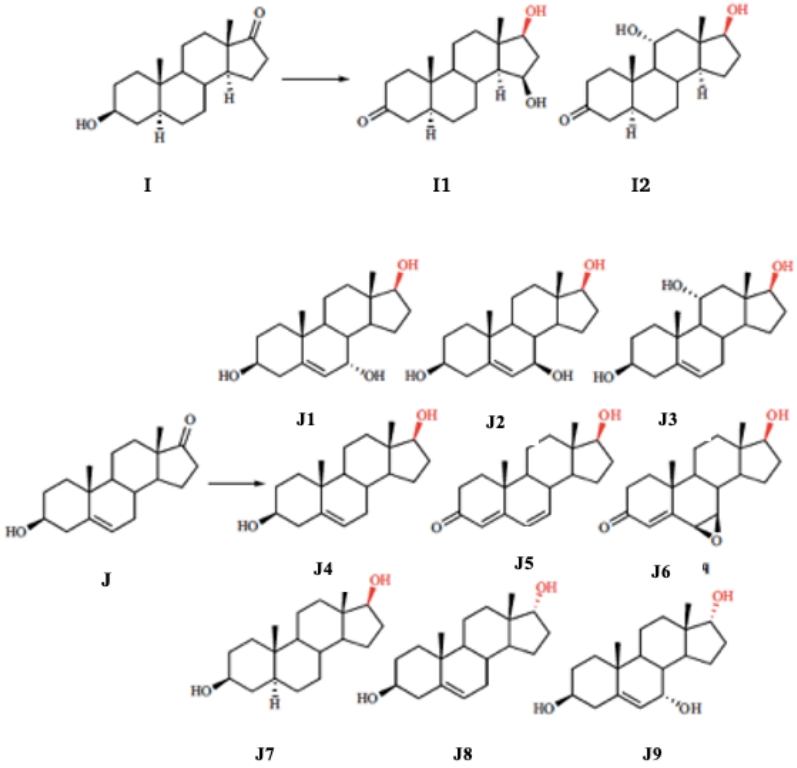
Şekil 5. 9 Curdione'nin (G) Aspergillus niger tarafından biyotransformasyonu

Geleneksel sentetik yöntemlerle kiral alkollerin elde edilmesiyle ilgili yüksek maliyetler, stereoselektif üretimlerine yeni yaklaşımlar geliştirmek için biyoteknoloji çalışmalarının dikkatini çekmiştir. Bu bağlamda Aspergillus niger MTCC-404'ün etilbenzenin (**H**) (R)-1-feniletanole (**H1**) (Şekil 5.10) %99 enantiyomerik fazlalığa dönüşümü için bir biyokatalizör görevi gördüğü başarıyla gösterilmiştir [210].



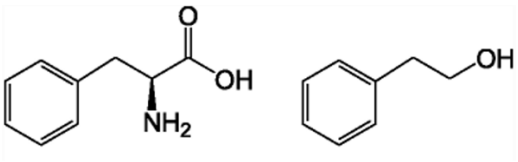
Şekil 5. 10 Etilbenzen'in (H) A.niger tarafından mikrobiyal biyotransformasyonu

Birkaç mantar suşu, C-H bağlarına hidroksil grupları eklemek için verimli biyokatalizörler olarak işlev görür. Benzer şekilde, seçici indirgeme birkaç steroidde denenmiştir. Bu bağlamda, epiandrosteron (**I**, Şekil 4.11) ve dehidroepiandrosteron (**J**) (Şekil 5.11) analogları da Aspergillus candidus MRC 22634, Aspergillus parasiticus tarafından 17β-alkole indirgenmiştir [211].



Şekil 5. 11 Epiandrosteron (I) ve dehidroepiandrosteron (J) bileşiklerinin A.candidus ve A. parasiticus tarafından biyotransformasyonu

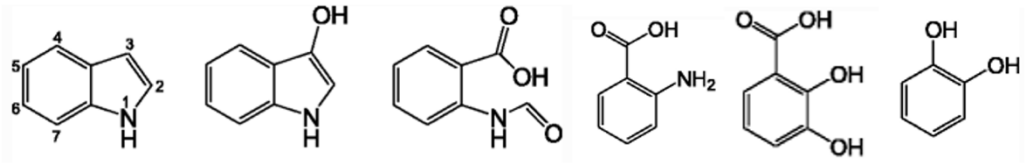
Amino asit L -fenilalanin **(K),** *A. niger* CMICC 298302 tarafından tek bir aromatik ürüne, değerli koku bileşiği 2-feniletanol'e (fenetil alkol, **K1**) (Şekil 5.12) metabolize edildi [212].



K K1

Şekil 5. 12 Amino asit L -fenilalanin (K), A. niger tarafından biyotransformasyonu

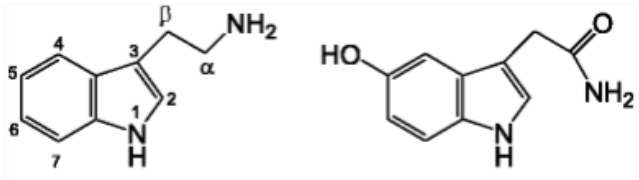
Farmasötiklerin ve kokuların sentezinde kullanılan indol (**L**), bir A. niger suşu tarafından art arda 3-hidroksiindol (indoksil, **L1**), 2-(formilamino)benzoik asit (**L2**), antranilik asit (**L3**), 2,3-dihidroksibenzoik asit (**L4**) ve son olarak katekol'a (**L5**) dönüştürüldü (Şekil 5.13) [213].



L L1 L2 L3 L4 L5

Şekil 5. 13 İndol'ün (L) A.niger tarafından biyotransformasyonu

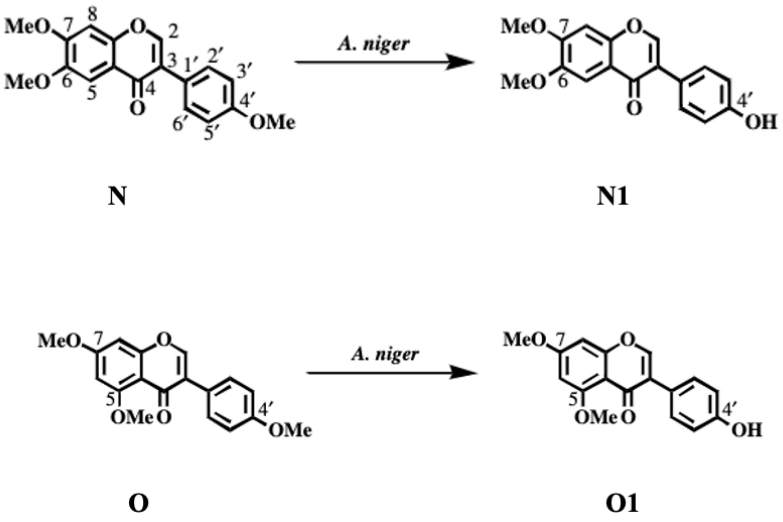
Birçok organizmada fizyolojik rollere sahip bir monoamin alkaloid olan triptamin (**M**), 5-hidroksiindol-3-asetamid'i (**M1**) üretmek için hem benzo halkasının 5-karbonunda hem de yan zincirin α-karbonunda A. niger NRRL 4026 tarafından oksidasyona uğrar (Şekil 5.14) [214].



M M1

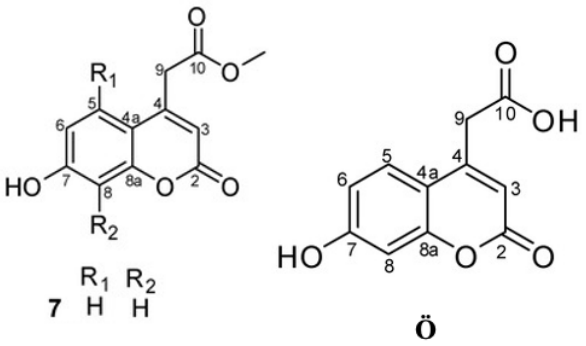
Şekil 5. 14 Triptamin'in (M) A. niger tarafından biyotransformasyonu

Miyazawa ve ark. tarafından yapılan çalışmada, **N** ve **O** bileşiklerinin**,** C-4' konumunda bölgesel seçicilik ile A. niger tarafından demetile edildiği sonucuna varılmıştır (Şekil 5.15). Bu, A. niger tarafından trimetoksi izoflavonların (**N** ve **O**) biyotransformasyonuna ilişkin ilk rapordur [202].



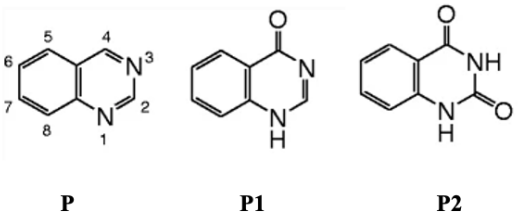
Şekil 5. 15 Trimetoksi izoflavonların (N ve O) A. niger tarafından biyotransformasyonu

Nascimento ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada Kumarin 7, A. *brasiliensis* tarafından %35 verimle **Ö** türevine biyotransforme edildi. Kumarin 7'nin *A. brasiliensis* biyotransformasyonu C-10'da hidrolize yol açtı ve Kumarin 7'nin C-10'daki ester grubu, **Ö'de** bir karboksil asit grubuna dönüştürüldü (Şekil 5.16) [215].



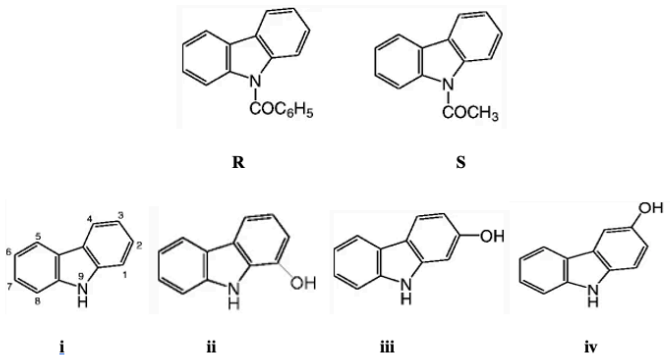
Şekil 5. 16 Kumarin 7'nin A. brasiliensis tarafından biyotransformasyonu

Refaie ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada A.niger, kinazolin'i (**P**) hem 4-kinazolinona (**P1**) hem de 2,4-kinazolindion'a (**P2**) okside etmiştir (Şekil 5.17). 4-kinazolinon sıçanlarda kolesterol seviyesini düşürür [216].



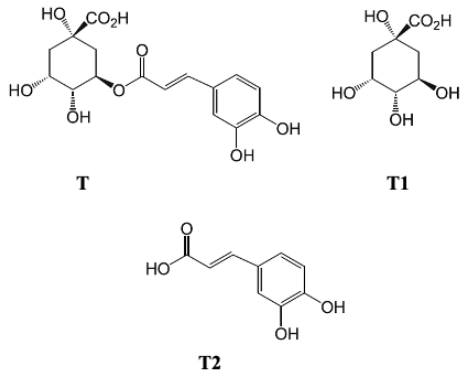
Şekil 5. 17 Kinazolin'in (P) A.niger tarafından biyotransformasyonu

N-benzoilkarbazol (**R**) ve N-asetilkarbazolün (**S**) A. flavus tarafından dönüştürülmesi, ana ürün olarak karbazol (**i**) ve küçük miktarlarda 1-, 2- ve 3-hidroksikarbazolleri (sırasıyla **ii**, **iii, iv**) oluşturur (Şekil 5.18) [217]**.**



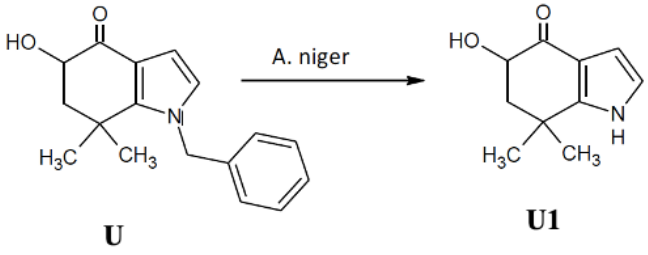
Şekil 5. 18 N-benzoilkarbazol (R) ve N-asetilkarbazolün (S) A. flavus tarafından biyotransformasyonu

Yeşil kahve çekirdeklerinde ve diğer bitkilerde bulunan bir antioksidan ester olan klorojenik asit (**T**), A. niger C23308 suşu tarafından, D-(-)-kinik asit (**T1**) ve kafeik aside (**T2**) hidrolize edilir (Şekil 5.19) [218].



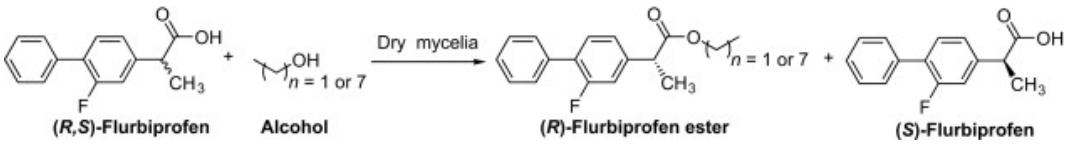
Şekil 5. 19 Klorojenik asit'in (T), A. niger tarafından biyotransformasyonu

Çalışkan ve ark. tarafından yapılan başka bir çalışmada yeni ilaç öncüleri elde etmek için mikrobiyal biyotransformasyon yöntemi kullanılarak indol türevleri sentezlenmesi amaçlanmıştır. Biyotransformasyon reaksiyonunda kullanılan A.niger küfü, N atomu üzerindeki benzil grubunu koparark 1-benzil-6,7-dihidro-5-hidroksi-7,7-dimetil-1H-indol-4(5H)-on (**U**), 5-hidroksi-7,7-dimetil-6,7-dihidro-1H-indol-4-(5H)-on (**U1**) substratını üretti (Şekil 5.20) [29].



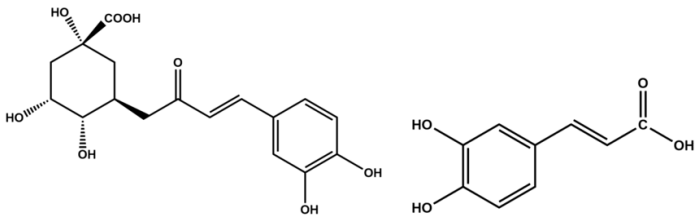
Şekil 5. 20 (U) bileşiğinin A.niger biyotransformasyonu

Spizzo, P. ve arkadaşları *Aspergillus oryzae*'nin misellerinin (R)-flurbiprofen'e karşı yüksek enantiyoseçicilik sergilediğini ve esterleştirme yoluyla rasemik (R, S)-flurbiprofenin rezolüsyonunu sağlamışlardır (Şekil 5.21) [219].



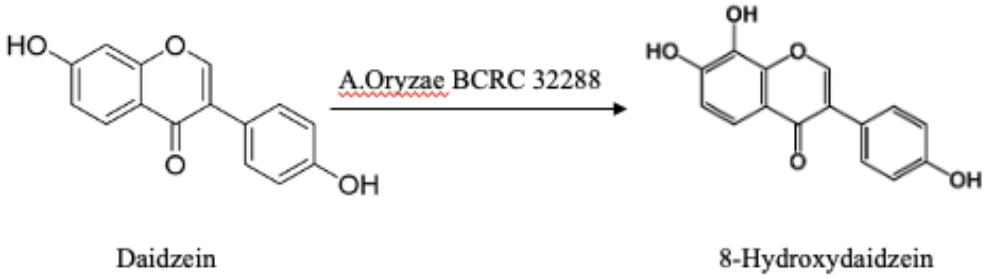
Şekil 5. 21 Rasemik flurbiprofenin A.oryzae ile rezolüsyonu

Hernandez, C. E. ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada genç kahve yapraklarından elde edilen ve bol miktarda klorojenik asit içeren ekstrakta, A.oryzae ile biyotransformasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonucunda A.oryzae klorojenik asidi, hücresel antioksidan, apoptoz etki, sitotoksisite, anti-kanser, anti-mikrobiyal, anti-viral ve nöroprotektif etki gibi özellikler barındıran kafeik aside dönüştürmüştür (Şekil 5.22) [220].



Şekil 5. 22 Klorojenik asit'in kafeik aside A.oryzae ile biyotransformasyonu

Soya fasulyesindeki ana polifenollerden olan daidzein yapısının *A.oryzae BCRC 32288* suşu ile biyotransformasyonu sonrası 8-hidroksidaidzein molekülü hidroksillenerek elde edilmiştir. 8-hidroksidaidzein HL-60, A549 ve B16 melanom 4A5 hücre hatlarına karşı yüksek DPPH radikal temizleme aktivitesine, antimutajenik ve antiproliferatif aktiviteye sahiptir (Şekil 5.23) [221].



Şekil 5. 23 Daidzein'nin 8-hidroksidaidzein bileşiğine A.oryzae BCRC 32288 ile biyotransformasyonu

6
MATERYALLER

Ticari olarak Sigma-Aldrich'den satın alınan 5-fenil-1,3-siklohegzadion bileşiği ile başlanarak belirli prosedürler kullanılarak kimyasal reaksiyonlar tamamlanmıştır. Sentezlenen bileşiklerin saflaştırılması kolon kromatografisi yöntemiyle sağlandı. Kolonda kullanılan dolgu maddesi Merck marka silika gel 60 (por büyüklüğü; 0,063-0.200 mm) olarak seçildi. Saflaştırma için kolon kromatografisinin yeterli verimi vermediği durumlarda preparatif TLC plakaları kullanıldı. Tabakaların hazırlanmasında Merck marka Silika jel 60 GF254 ve Merck Silika jel HF 254+366 kullanıldı.

Reaksiyon sonrası oluşan ürünlerin izlenmesi ve saflaştırma sonuçları ince tabaka koromatografisi (İTK) yöntemiyle izlendi. İTK'de Merck Silika jel 60 F254 alimünyum plakaları kullanıldı ve Camag UV (254nm) ile görüntüleme sağlandı.

Sentezi yapılan maddelerin analizleri ve yapı tayinleri sırasıyla verilen cihazlar ile gerçekleştirilmiştir;

- Yapı tayini için Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (NMR) kullanıldı (Bruker Avance III 500 Mhz) ve uluslararası standart TMS (tetrametilsilan) kullanıldı. Çözücü olarak CDCl3 (dötörokloroform) (1H: δ= 7.27) (13C: δ= 77.0, 96.4) seçildi.
- Fonksiyonel grupların belirlenmesi amacıyla çekilen IR spektrumları Perkin Elmer Spectrum One cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.
- HPLC analizleri Shimadzu Kontrolör CBM-20A cihazıyla gerçekleştirildi.
- Erime noktasının belirlenmesi için Büchi Melting Point B-540 cihazı kullanıldı.

Mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonlarında kullanılan *Aspergillus niger ATCC 6275* kültürü Yıldız Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü Mikrobiyoloji laboratuvarından ve *Aspergillus oryzae RIB40* kültürü Bezmialem Vakıf Üniversitesi Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji Enstitüsü'nden temin edilmiştir.

6.1 Deneyde Kullanılan Kimyasallar

Tablo 6. 1 Deneysel çalışmalar süresince kullanılan kimyasallar

Kimyasal adı	Marka	Kod numarası
5-fenil-1,3-siklohegzadion	Sigma-Aldrich	346578
Kloroasetaldehit	Sigma-Aldrich	317276-250
Potasyum karbonat (K2CO3)	Tekkim	TK.150430.01000
Sodyum bikarbonat (NaCO3)	Teknik	-
Magnezyum sülfat (MgSO4)	Teknik	-
Hidroklorik asit	Tekkim	TK.080230.01000
Hegzan	Teknik	-
Etil asetat	Teknik	-
Kloroform	Teknik	-
Aseton	Teknik	-
Benzen	Merck	1.01782.2500
Asetik asit	Merck	1.00056.2500
Etanol	İsolab	920.026.2500
Potasyum permanganat (KMnO4)	Merck	1.05082.0250
Silika Gel 60 F254 TLC alüminyum plaka	Merck	1.05554.0001
Silica Gel 60 (0,063-0.200 mm) (Kolon kromatografisi için)	Merck	1.07734.9025

Tablo 6. 1 Deneysel çalışmalar süresince kullanılan kimyasallar (devamı)

H_2O (distile su)	**-**	**-**
n-Hegzan HPLC Grade	Merck	1.04391.2500
2-Propanol HPLC Grade	Merck	1.01040.2500
Asetik asit	Merck	1.00056.2500
pH 7.00 +/- 0.01 Buffer solüsyonu	Merck	1.09435.1000
pH 4.00 +/- 0.01 Buffer solüsyonu	Merck	1.09439.1000
Benzil amin	Sigma-Aldrich	185701-100
Silica Gel 60 GF_{254} preparatif tlc için	Merck	1.07730.2500
Silica Gel 60 $GF_{254+366}$ preparatif tlc için	Merck	1.07748.2500
Dikolorometan	Carlo Erba	412622000
Toluen	Sigma-Aldrich	24529
Dimetilsülfoksit	Merck	1.16743.1000
Sodyum hidroksit	Merck	1.06482.1000
D-(+)-Glukoz	Sigma-aldrich	49159
Dipotasyum hidrojen fosfat	Merck	105101
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck	104873

6.2 Deneyde Kullanılan Cihazlar ve Markaları

Tablo 6. 2 Deneyde kullanılan cihazlar ve markaları

Cihaz Adı	Marka	Model	
Evaporatör	Bucci	Rotavapor R-200	
Ultrasonik su banyosu	Bandelin	Arium Pro	
pH metre	Hanna Instruments	pH Microprocessor pH Meter - 520518	
Zaman ayarlı etüv	WTC binder	1505330000202	
Vakum pompası	Welch	2522C-02	
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	IKA	Yellow Line MSC Basic C	
Analitik terazi	Precisa	230-9204-007 XB 220A SCS/W50124	
Otomatik pipet 1000 µL	Socorex Acura	Acura Manuel 825-16061880	
Otomatik pipet 200 µL	Isolab	011.06.200	
UV lamba	Camag	022.9120/1305	
HPLC	Shimadzu	Kontrolör	CBM-20A
		UV Dedektörü	SPD-M20A 230V
		Pompa	LC-6AD
		Kolon Fırını	CTO-20AC

Tablo 6. 2 Deneyde kullanılan cihazlar ve markaları (devamı)

Erime noktası tayini	**Büchi**	**Melting Point B-540**
Polarimetre	ADP-410	Bellingham stanley
IR	Perkin Elmer	Spectrum One
NMR	Bruker	Avance III 500 Mhz
Çalkalayıcı su banyosu	GFL Gesellschaft Labortechnic	1083/1086

6.3 Kullanılan Besiyerleri

Tablo 6. 3 Kullanılan besiyerleri ve markaları

Besiyerleri	**Marka**	**Kod numarası**
Yeast extract	Fluka	70161
YS25	-	-
Agar	Fluka	05039
Potato Dextrose Agar	Merck	110130
Pepton mycological	Fluka	77199

6.4 Mikroorganizmalar

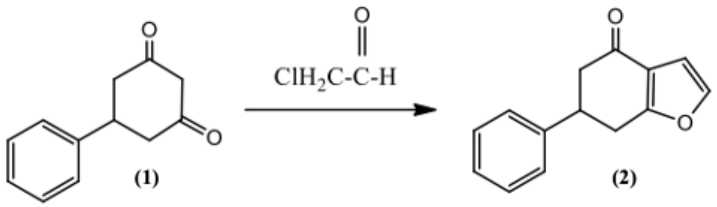
Tablo 6. 4 Deneyde kullanılan mikroorganizmalar ve markaları

Mikroorganizma	**Marka**	**Kod numarası**
Aspergillus niger	-	ATCC 6275
Aspergillus oryzae	-	RIB 40

7
DENEYSEL ÇALIŞMA VE BULGULAR

7.1 6,7-Dihidro-6-Fenilbenzofuran-4(5H)-On (3) Bileşiğinin Sentezi

1 gr $NaHCO_3$ (sodyumbikarbonat) ve %40'lık $ClOC_2H_3$ (kloroasetaldehit) 8 ml ultra saf suya eklenmiştir. 9 ml saf suya eklenen 10 mmol başlangıç maddesi 5-fenil-1,3-siklohegzadion (**1**) karışımından 0 °C' ye soğutulan bu karışıma belirli süre aralıklarında damlalıkla alınan madde damlatılarak ilave edilmiştir. Reaksiyonun gece boyunca 15-25 °C sıcaklık aralığında devam etmesi sağlanmıştır (Şekil 7.1) [222].



Şekil 7. 1 (2) bileşiği sentez prosedürü

17 saatin ardından reaksiyon ortamına 10 ml etil asetat (EtOAc) eklenmiş, pH değeri ölçülmüş (ph~9.02) ve reaksiyonun sonlandırılması amacıyla pH=1'e düşürülmüştür. 1 saat boyunca pH=1'de sabit kalacak şekilde karıştırılmaya devam edilmiş ve 1 saatin ardından organik fazın ayrıştırılması için potasyum karbonat (K_2CO_3) solüsyonu kullanılmıştır. Ayırma hunisi yardımı ile organik faz, inorganik fazdan uzaklaştırılmış ve magnezyum sülfat ($MgSO_4$) ile 1 saat boyunca kurutulmaya bırakılmıştır. Çözücü ortamdan evaporatör yardımı ile uzaklaştırılmıştır. Sentezlenen (**2**) bileşiği kolon kromatografisinde 1:1:6 (EtOAc: Hegzan: Kloroform) çözücü sistemi ile saflaştırılmıştır (Şekil 7.2). Saflaştırma işlemi sonucunda saf (**2**) molekülleri elde edilmiştir.

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

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

IR (CHCl3) γ(max): 1673.14 cm^{-1}

^{1}H-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)

^{13}C 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



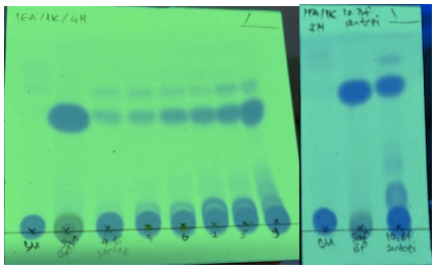
Şekil 7. 2 (2) bileşiği sentez basamakları

6,7-Dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on (2) Sentez Optimizasyon Basamakları

Prosedür adımları takip edilerek sentezi gerçekleştirilen **(2)** bileşiğinden istenen yüksek verim alınmadığından optimizasyon çalışmaları ile reaksiyon verimi arttırılmaya çalışıldı. Bu bağlamda prosedür akışında gerçekleştirilen değişiklikler ve sentez verimleri aşağıda gösterilmektedir.

1) Yapılan ilk prosedür değişikliği ortam medium değişikliğinin reaksiyon verimini arttırdığı örnekler göz önüne alınarak gerçekleştirildi. Reaksiyon ortamında bulunan su miktarının 2 kat arttırılması ile gerçekleştirilen sentez sonucunda verimin arttığı gözlemlendi.
2) Yapılan ikinci prosedür değişikliği iki kat su artışına ek olarak 17 saatlik reaksiyonun süresinin arttırılması oldu. Reaksiyon ortamında bulunan başlangıç maddesi olan 5-fenil-1,3-siklohegzadion **(1)**'nun reaksiyon tamamlandıktan sonra ortamda tamamen tükenmemesi sebebi ile süre 24 saate çıkarılmıştır. Sürenin artması verimi yükseltmiştir.
3) Bir diğer prosedür değişikliği reaksiyon ortam mediumuna eklenen reagentlar olan kloroasetaldehit ve sodyumbikarbonat miktar arttışı ile gerçekleştirilmiştir. 2 katına çıkarılan su miktarı, reaksiyon süresinin 24 saate çıkarılması ve reagent miktarlarının iki katına çıkarılması ile ciddi bir verim arttışı gerçekleşmiştir.

4) Son prosedür değişikliğinde reaksiyon ortam mediumuna eklenen reagentlar olan kloroasetaldehit ve sodyumbikarbonat miktarı 4 kat arttırılarak devam edilmiş ve en yüksek verimin burdan elde edildiği belirlenmiştir.



Şekil 7. 3 (2) bileşiği sentez optimizasyon İTK sonuçları

İTK ile reaksiyon sonucu takibi yapılan tüm sentezlerin saflaştırma işlemleri yapılmıştır. Saflaştırma sonuçlarından elde edilen bilgiler ışığında, itk görüntülerinde gözlemlenen spot artışına benzer sonuçlar elde edildi. Yapılan kolonlar sonrası elde edilen **(2)** bileşiği verim artışı bu durumu desteklemiştir. Bu bağlamda gerçekleştirilen optimizasyon çalışmalarının başarı ile sonuçlandığı belirtilebilir (Şekil 7.3).

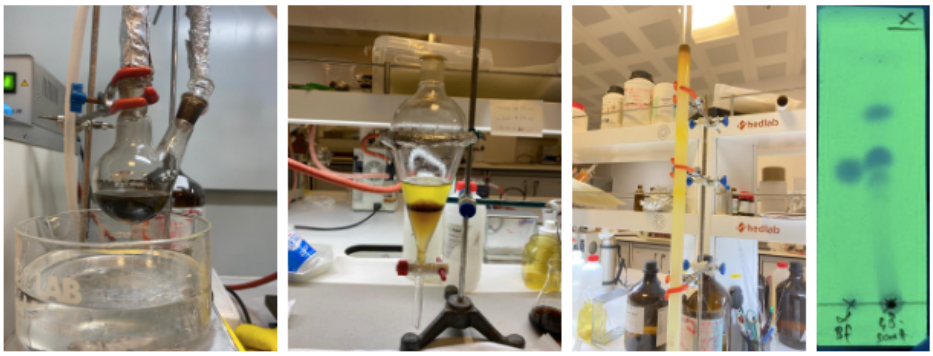
7.2 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-okso-benzofuran-5-il-asetat (3) Sentezi

10:1 oranında 55 ml benzen ve asetik asit karışımı, $Mn(OAc)_3$ (7.2 mmol) katalizörü ile karıştırılarak Dean-Stark tuzağı ile reaksiyon ortamı kahverengi oluncaya kadar reflux edildi. Daha sonra, 6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran 4(5*H*)-on **(2)** bileşiği (1.8 mmol) yan kollu balondan reaksiyon ortamına ilave edildi. Dönüşümün gerçekleşmeye başladığı anın yakalanması amacıyla belirli süre aralıklarında örnekler alındı ve İTK bakıldı. Dönüşüm tamamlanıncaya kadar reaksiyon devam ettirildi (Şekil 7.4).



Şekil 7. 4 (3) bileşiği sentez reaksiyonu

Dönüşüm tamamlandıktan sonra yan kollu balonda bulunan reaksiyon ürünü kloroform ile seyreltilerek doymuş $NaHCO_3$ çözeltisi yardımıyla inorganik safsızlıklardan uzaklaştırılmıştır. Organik faz toplanıp $MgSO_4$ ile kurutulmuş ve evaporatörde çözücü uzaklaştırılmıştır. Sentezlenen ürünün saflaştırılması amacıyla kolon kromatografisi 1,5:10:0,5 (EtOAc: Hekzan: kloroform) çözücü sistemi ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 7.5).



Şekil 7. 5 (3) bileşiği sentez aşamaları

4,5,6,7-Tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (3) (Ek-B);

Erime noktası: 115,3 °C

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

IR (CHCl3) γ(max): 1679.25, 1219.38 cm^{-1}

^{1}H-NMR (500 MHz, CDCl3) δ (ppm): 1.98 (s, 3H), 3.28 (m, 2H), 3.73 (m, H), 5.84 (d, J =12.5 Hz, 1H), 6.74 (d, J= 2.0 Hz, 1H), 7.35 (m,5H)

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

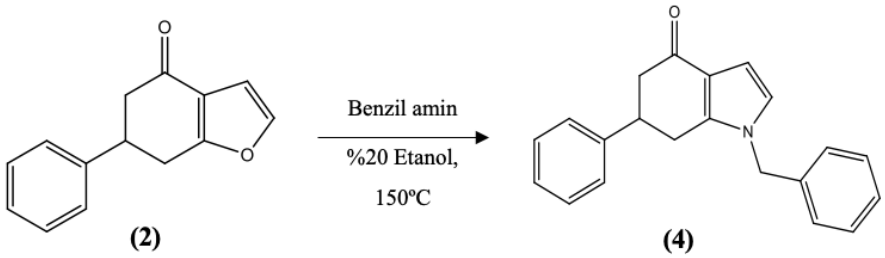
MS Q-TOF analiz verileri :

Tablo 7. 1 (3) bileşiğinin MS Q-TOF spekturum listesi

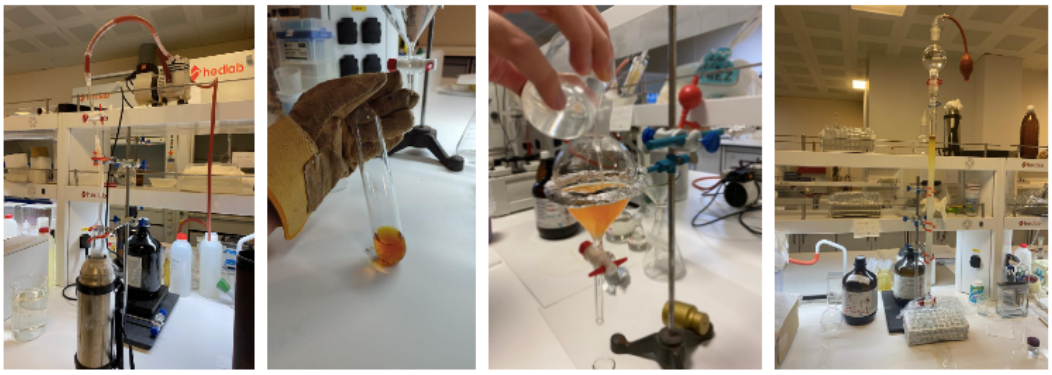
m/z	Z	Abund	Formula	Ion
271,0946	1	271600,19	C16 H14 O4	(M+H)+
272,0981	1	44823,01	C16 H14 O4	(M+H)+
273,1005	1	6392,37	C16 H14 O4	(M+H)+
274,1019	1	1013,58	C16 H14 O4	(M+H)+
309,0501	1	83790,88	C16 H14 O4	(M+K)+
310,0534	1	15448,17	C16 H14 O4	(M+K)+
311,0512	1	8831,7	C16 H14 O4	(M+K)+
312,0539	1	1226,3	C16 H14 O4	(M+K)+

7.3 1-benzil-6-fenil-6,7-dihidro-1*H*-indol-4(*5H*)-on (4) Sentezi-Seal Tüp Reaksiyonu

(2) bileşiği (6,25 mmol), benzil amin (16.8 mmol) ve 5 ml %20'lik etanol karışımı seal tüpe konularak, reaksiyon 12 saatte 145-150ºC'de gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı saf suya dökülerek diklorometan ile ekstrakte edildi ve sonra $MgSO_4$ ile kurutularak çözücü vakum altında uzaklaştırıldı. Saflaştırma kolon kromatografisinde 1:1:2 (EtOAc:Kloroform:Hegzan) çözücü sistemi ile gerçekleştirildi. Saflaştırma sonrası 1-benzil-6-fenil-6,7-dihidro-1*H*-indol-4(*5H*)-on **(4)** molekülleri elde edildi (Şekil 7.6 ve Şekil 7.7).



Şekil 7. 6 1-benzil-6-fenil-6,7-dihidro-1H-indol-4(5H)-on (4) sentez prosedürü



Şekil 7. 7 1-benzil-6-fenil-6,7-dihidro-1H-indol-4(5H)-on (4) sentez akış şeması

1-benzil-6-fenil-6,7-dihidro-1*H*-indol-4(*5H*)-on (4) bileşiğinin (Ek C);

Rf: 0.42 (Silika jel, 1:2 EtOAc:Hekzan)

IR (CHCl3) γ(max): 1651.46 cm^{-1}

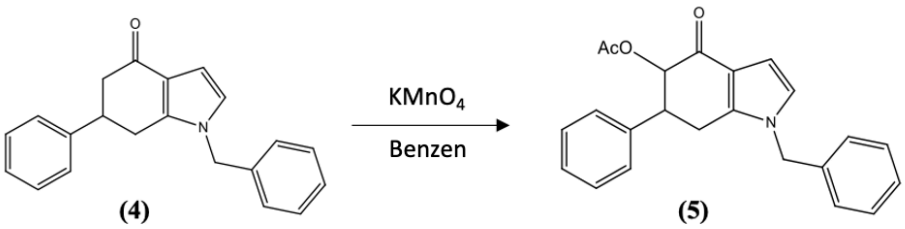
^{1}H-NMR (500 MHz, CDCl3) δ (ppm): 7.38 – 7.30 (m, 5H), 7.30 – 7.25 (m, 3H), 7.05 (dd, J =1.1 , 7.7 Hz, 2H), 6.68 (d, J =3.1 Hz, 1H), 6.66 (d, J = 3.1 Hz, 1H),

5.06 (s, 2H), 3.56 – 3.48 (m, 1H), 3.00 (dd, J = 4.9, 16.1 Hz, 1H), 2.86– 2.80 (m, 1H), 2.81 – 2.76 (m, 1H), 2.75 (d, J = 3.8 Hz, 1H).

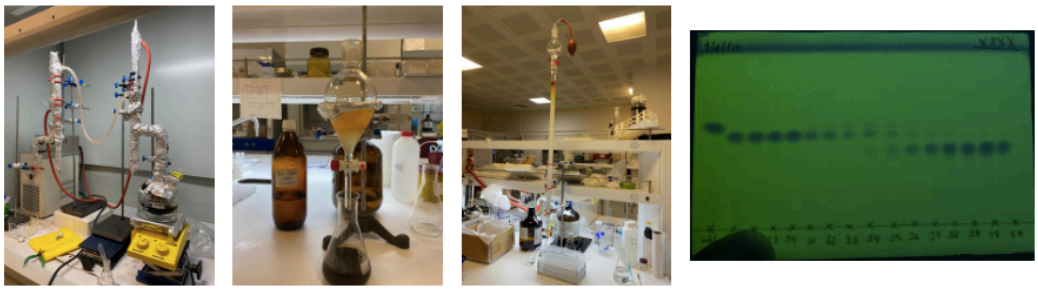
^{13}C-NMR (500 MHz, CDCl3) δ _(ppm): 29.95, 42.67, 44.82, 51.14, 77.34, 106.42, 121.21 124.76, 126.24, 126,98, 128.86, 129.23, 136.55, 142.71, 143.17, 192.74

7.4 Potasyum Permanganat Katalizörlüğünde 1-benzil-4-okso-6-fenil-4,5,6,7-tetrahidro-1*H*-indol-5-il asetat (5) Sentezi

Potasyum permanganat ($KMnO_4$, 1,8 mmol), 10:1 oranında 55 ml benzen ve asetik asit karışımı ile çözdürülerek, Dean-Stark tuzağı ile reaksiyon ortamı kahverengi oluncaya kadar reflux edildi. Daha sonra, 1-benzil-6-fenil-6,7-dihidro-1*H*-indol-4(*5H*)-on **(4)** (0,665 mmol) bileşiği ilave edildi. Dönüşümün gerçekleşmeye başladığı anın yakalanması amacıyla belirli süre aralıklarında örnekler alındı ve İTK bakıldı. Dönüşüm tamamlanıncaya kadar reaksiyon devam ettirildi (Şekil 7.8). Dönüşüm tamamlandıktan sonra yan kollu balonda bulunan reaksiyon ürünü etil asetat ile seyreltilerek doymuş $NaHCO_3$ çözeltisi yardımıyla inorganik safsızlıklardan uzaklaştırıldı. Organik faz toplanıp $MgSO_4$ ile kurutuldu ve evaporatörde çözücü uzaklaştırıldı. Sentezlenen ürünün saflaştırılması amacıyla kolon kromatografisi 1:1:20 (EtOAc: Kloroform:Hegzan) çözücü sistemi ile gerçekleştirildi. Sentez aşamasında katalizör olarak kullandığımız $KMnO_4$ ile yapılan reaksiyonun sonucunda 1-benzil-6-fenil-6,7-dihidro-1*H*-indol-4(*5H*)-on **(4)** bileşiğinin hem alfa hem de gama pozisyonunda asetoksilasyon reaksiyonu gerçekleşmiştir. Reaksiyon sonucunda iki izomerin birlikte elde edilmesi ve bu iki izomerin İTK spotlarının birbirine çok yalkın olması nedeni ile ayırma ve saflaştırma basamağında kullanılan kolon kromatografi ile her iki izomerin de birbirinden ayrılması mümkün olmamıştır (Şekil 7.9). Sonuç olarak istenen saflıkta 1-benzil-4-okso-6-fenil-4,5,6,7-tetrahidro-1H-indol-5-il asetat **(5)** bileşiği elde edilememiştir.



Şekil 7. 8 1-benzil-4-okso-6-fenil-4,5,6,7-tetrahidro-1H-indol-5-il asetat (5) sentezi prosedürü



Şekil 7. 9 1-benzil-4-okso-6-fenil-4,5,6,7-tetrahidro-1H-indol-5-il asetat (5) sentez ve saflaştırma akış şeması

1-benzil-4-okso-6-fenil-4,5,6,7-tetrahidro-1H-indol-5-il asetat (5) bileşiğinin (Ek D);

Rf: 0.44 (Silika jel, 1:2 EtOAc:Hekzan)

IR (CHCl3) γ(max): 1744.83, 1674,10, 1232,65 cm^{-1}

^{1}H-NMR (500 MHz, CDCl3) δ (ppm): 7.42 – 7.30 (m, 8H), 7.30 (d, *J* = 14.0 Hz, 2H), 7.01 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 6.60 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 5.42 (s, 1H), 5.14 (s, 2H), 2.67 (dd, *J* = 16.4 Hz, 2H), 2.28 (s, 3H).

7.5 Mikrobiyal Biyotransformasyon Reaksiyonları

Mikroorganizmanın temini ve saklanması:

Aspergillus niger ATCC 6275 kültürü Yıldız Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü Mikrobiyoloji laboratuvarından ve *Aspergillus oryzae* RIP 40 kültürü Bezmialem Vakıf Üniversitesi Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji Enstitüsü'nden temin edilmiştir. PDA besiyeri üzerinde optimum koşullarda büyütülüp buzdolabına (+4 °C) kaldırılmıştır.

Çalışma besiyerinin içerdiği bileşenler:

Katı besiyeri: Besiyeri olarak PDA besiyeri kullanılmıştır. Besiyeri ortamı öncelikle 1 litre distile suyun 39 gr PDA besiyeri ile karıştırılması ile hazır hale getirildi. Hemen ardından 120 °C'de 20 dakika boyunca ortamın sterilize edilmesi amacıyla otaklavlanlandı. Sterilize edilerek kullanıma hazır hale getirilen besiyeri petrilere boşaltıldı. Böylece mikroorganizmaların petrilere ekilmesi için katı besiyeri hazırlanmış oldu.

Sıvı besiyeri: YS25 isimli besiyeri sıvı besiyeri olarak kullanıldı. Bu besiyerinin hazırlanması için gerekli olan besiyeri bileşenleri Tablo 7. 2'de gösterilmektedir. 1 litre distile suya tabloda verilen içerikler eklenerek pH 6.5 olarak ayarlandı. Ortam sterilizasyonunu sağlamak amacıyla besiyeri 121 °C'de 20 dakika otoklavlandı. Daha önceden hazırlanan 100 ml hacimli erlenlere hazırlanan sıvı besiyerinden 50 ml alınarak erlenlere boşaltıldı. Mikroorganizmaların besiyerlerine ekimi için besiyerleri hazırlanmış oldu.

Tablo 7. 2 YS25 besiyeri içeriği

Yeast extract	10 gr/L
Pepton	10 gr/L
K_2HPO_4	5 gr/L
Glikoz	5 gr/L
$MgSO_4.7H_2O$	1 gr/L

7.5.1 *Aspergillus Niger ATCC 6275* Mikroorganizmasının Biyotransformasyon Reaksiyonuna Hazırlanması

Sıcaklık aralığı 3-5 °C olarak ayarlanan mikroorganizma kültüründen, iğne öze kullanılarak bir miktar alındı ve önceden hazırlanmış PDA besiyerine inokülasyonları gerçekleştirildi. İnkübasyonun tamamlanması için 5-6 gün, 28-30°C'de katı besiyeri bekletildi. İnkübasyon tamamlandıktan sonra bu kültürden öze dolusu mikroorganizma alınarak, 50 ml olarak önceden hazırlanmış ve sıvı

besiyerini içeren erlenlere inoküle edildi. 2 gün boyunca çalkalamalı su banyosu kullanılarak 120 rpm dönüş hızında ve 30°C sıcaklıkla inkübasyon sağlandı.

Substratın hazırlanması: (2), (3), **(4)** ve **(5)** bileşiklerinden alınan 20 mg madde 500 µL DMSO içerisinde çözdürüldü. Hazırlanan maddeler, 2 gün boyunca çalkalamalı su banyosunda inkübe edilen *Aspergillus niger ATCC 6275* mikroorganizma kültürünün bulunduğu 100 ml'lik erlenlere ilave edildi. Biyotransformasyonun gerçekleştirilmesi adına uygun ortam olan 120 rpm dönüş hızı ve 30°C sıcaklık ayarlanarak belirli sürelerde kontroller sağlanarak her bir madde için %50 dönüşümün gerçekleştiği süre belirlendi.

7.5.2 *Aspergillus Oryzae RIB40* Mikroorganizmasının Biyotransformasyon Rekasiyonuna Hazırlanması

Sıcaklık aralığı 3-5 °C olarak ayarlanan mikroorganizma kültüründen, iğne öze kullanılarak bir miktar alındı ve önceden hazırlanmış PDA besiyerine inokülasyonları gerçekleştirildi. İnkübasyonun tamamlanması için 5-6 gün, 28-30°C'de katı besiyeri bekletildi. İnkübasyon tamamlandıktan sonra bu kültürden öze dolusu mikroorganizma alınarak, 50 ml olarak önceden hazırlanmış ve sıvı besiyerini içeren erlenlere inoküle edildi. 2 gün boyunca çalkalamalı su banyousu kullanılarak 120 rpm hızında ve 30°C sıcaklıkla inkübasyona bırakıldı.

Substratın hazırlanması: (2), **(3)**, **(4)** ve **(5)** bileşiklerinden alınan 20 mg madde 500 µL DMSO içerisinde çözdürüldü. Hazırlanan maddeler, 2 gün boyunca çalkalamalı su banyosunda inkübe edilen *Aspergillus oryzae RIB40* mikroorganizma kültürünün bulunduğu 100 ml'lik erlenlere ilave edildi. Biyotransformasyonun gerçekleştirilmesi adına uygun ortam olan 120 rpm dönüş hızı ve 30°C sıcaklık ayarlanarak belirli sürelerde kontroller sağlanarak her bir madde için %50 dönüşümün gerçekleştiği süre belirlendi

Biyotransformasyon sonucu oluşan ürünlerin ortamdan uzaklaştırılması: Reaksiyonu sonlandırmak amacıyla ortama kloroform ilave edildi. Filtre kağıdı kullanılarak mikroorganizmaya ait hif ve sporlar Buchner hunisi yardımı ile vakum altında ortamdan uzaklaştırıldı ve böylece substrat süzdürüldü. Süzdürülen substrat ayırma hunisi yardımı ile faz farkına göre ayrıştırıldı.

Biyotransformasyon ürünlerinin saflaştırılması: Ayırma hunisi kullanılarak faz farkına göre ayrıştırılan organik faz içerinde yer alan maddelerin saflaştırılması için

belirlenen çözücü sistemi yardımı ile preparatif İTK'da saflaştırılma işlemi yapıldı. Elde edilen bileşiklerin enantiyomerik fazlalık değerlerinin ölçülmesi adına HPLC analizleri gerçekleştirildi, yapıları spektral yöntemler ile aydınlatıldı.

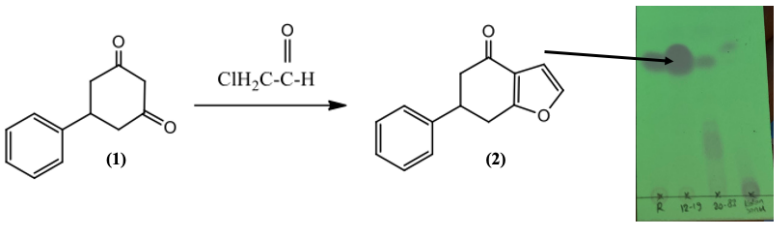
8
SONUÇ

Yapılan çalışma iki aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada kimyasal yöntemlerle benzofuranon, indol ve regio-selektif benzofuranon ve indol türevli bileşikler sentezlendi. İkinci aşamada bu bileşikler aspergillus türleri ile biyotransformasyon reaksiyonlarına tabii tutuldu. Sentezlenen ve saflaştırılan tüm bileşiklere ait sonuçlar detayları ile birlikte aşağıda açıklanmaktadır.

8.1 Benzofuranon Türevi Bileşiklerin Kimyasal Yöntemlerle Sentezi

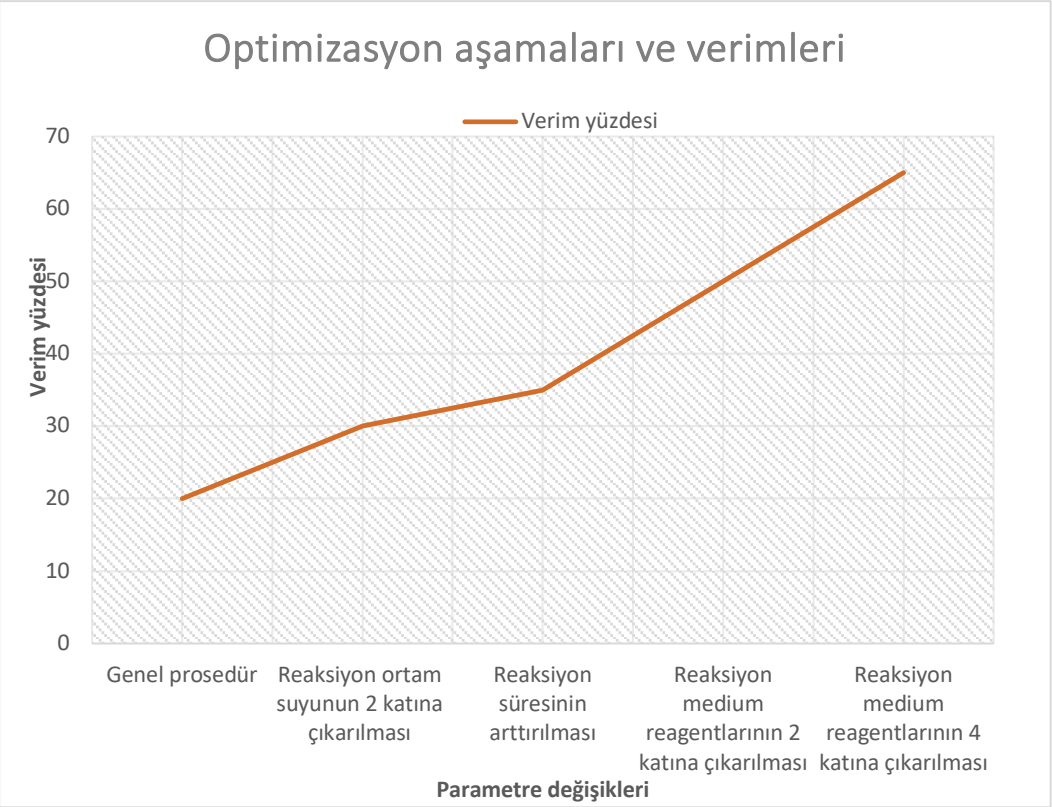
- **(2) Bileşiğinin Kimyasal Sentez Yöntemi ile Sentezi**

Çalışmamızda ilk olarak **(2)** bileşiği sentezlenmiştir. Kolon kromatografisi yöntemi kullanılarak saflaştırma işlemi (1:1:6; EtOAc:Hegzan:Kloroform) gerçekleştirilmiş ve saf benzofuranon molekülleri elde edilmiştir (Şekil 8.1).



Şekil 8. 1 Sentezlenen (2) bileşiğinin kolon kromatografisi ile saflaştırılması sonrası İTK görüntüsü

İstenen verim elde edilemediğinden reaksiyon prosedüründe değişiklikler yapılarak optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon sonrası elde edilen ürünlere kolon kromatografisi gerçekleştirilmiş ve sentez verimleri hesaplanarak Şekil 8.2'de gösterilmiştir.



Şekil 8. 2 (2) sentez optimizasyon çalışması ve reaksiyon verimleri

Sentezlenen ve saflaştırılan bu bileşiğin yapı tayini sırasıyla ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR ve FT-IR ile gerçekleştirilmiştir.

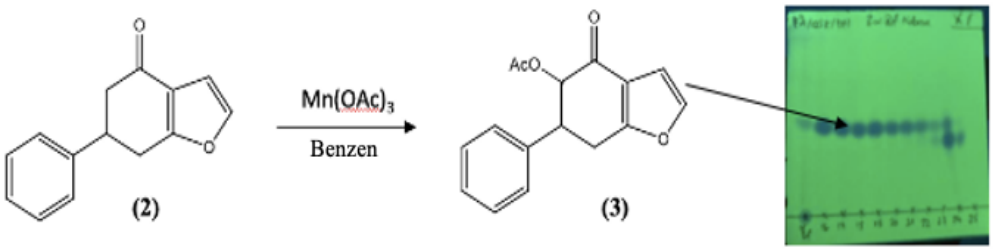
√ **6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on bileşiğinin;**

^{1}H-NMR ve ^{13}C-NMR spektrumu (Şekil A.1, Şekil A.2): Sentezlenen bileşiğe ait ^{1}H-NMR ve ^{13}C-NMR spektrum sonuçları ek olarak verilen şekillerdeki gibidir. Spektrum sonuçları Çalışkan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada [223] verilen sonuçlar ile örtüşmektedir.

IR ($CHCl_3$) γ(max): C-4 konumunda yer alan karbonil grubuna ait karakteristik sinyaller 1673.14 cm^{-1}'de gözlenmiştir (Şekil A.3).

- **(3) Bileşiğinin Kimyasal Sentez Yöntemi ile Sentezi**

Çalışmamızda daha sonra **(2)** bileşiğinden **(3)** bileşiği sentezlenmiş ve kolon kromatografi yöntemi kullanılarak 1,5:10:0,5 (EtOAc: Hekzan: kloroform) çözücü sisteminde saf moleküller elde edilmiştir (Şekil 8.3).



Şekil 8. 3 (3) bileşiğinin kolon kromatografisi ile saflaştırılması sonrası İTK görüntüsü

Sentezlenen bileşiğin yapı tayini, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, FT-IR ve MS Q-TOF analiz yöntemleri ile belirlenmiştir.

√ **(3) bileşiğinin ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, FT-IR ve MS Q-TOF spektrum sonuçları (Sırasıyla Şekil B.1, B.2, B.3, B.4)*;***

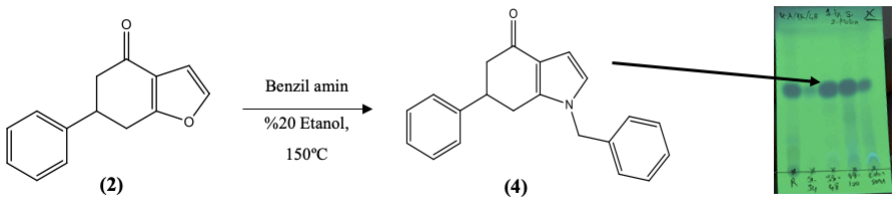
Sentezlenen bileşiğe ait ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, IR spektrum ve LC-MS Q-TOF sonuçları ek olarak verilen şekillerdeki gibidir. Spektrum sonuçları Çalışkan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada [223] belirlenen sonuçlar ile örtüşmektedir.

8.2 İndol Türevi Bileşiklerin Kimyasal Yöntemlerle Sentezi

Çalışmanın bu aşamasında indol türevi bileşikler sentezlenmiştir.

- **(4) Bileşiğinin Kimyasal Sentez Yöntemi ile Sentezi**

6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on **(2)** bileşiğinden 1-benzil-6-fenil-6,7-dihidro-1*H*-indol-4(*5H*)-on **(4)** bileşiği sentezlenmiştir. Kolon kromatografisi yöntemi kullanılarak saflaştırma işlemi (1:1:2; EtOAc: Hegzan: Kloroform) gerçekleştirilmiş ve indol molekülleri elde edilmiştir (Şekil 8.4).



Şekil 8. 4 1-benzil-6-fenil-6,7-dihidro-1H-indol-4(5H)-on (4) bileşiğinin kolon kromatografisi ile saflaştırılması sonrası İTK görüntüsü

Sentezlenen ve saflaştırılan bu bileşiğin yapı tayini sırasıyla ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR ve FT-IR ile gerçekleştirilmiştir.

√ **1-benzil-6-fenil-6,7-dihidro-1*H*-indol-4(*5H*)-on (4) bileşiğinin;**

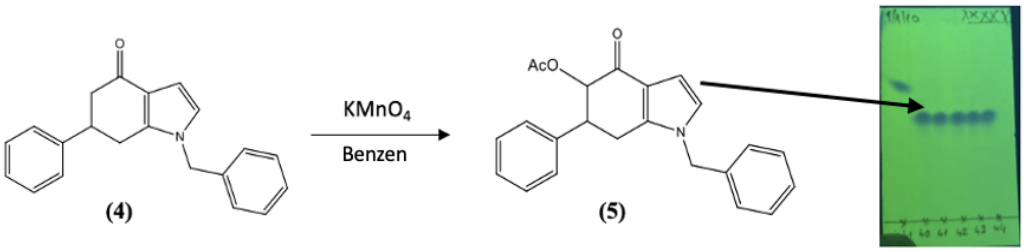
^{1}H-NMR (500 MHz, CDCl3) δ (ppm): 7.38-7.25 ppm aralığında fenil ve benzil halkalarına ait hidrojen atomları multiplet şeklinde rezonans olmuştur. 7.05 ppm aralığında furan halkasının 2. pozisyondaki hidrojen atomu bulunmaktadır. 6.68 ppm'de dublet şeklinde rezonans gösteren sinyal, furan halkasının 3. pozisyonundaki hidrojen atomuna aittir. 5.06 ppm'deki singlet şeklinde görülen sinyal, benzil grubunun -CH_2 protonlarının sinyalidir. 3.56 – 3.48 ppm'de multiplet şeklinde rezonans olmuş sinyal fenil halkasının bağlı olduğu C atomuna bağlı proton sinyalidir. 3.00 ppm'de dubletin dubleti şeklinde rezonans olmuş sinyal, 7 numaralı C atomuna ait olan alililk protonlarının sinyalidir. 2.75 ppm'de dublet şeklinde rezonans olmuş sinyal 5 numaralı C atomuna bağlı proton sinyalidir.

^{13}C-NMR (500 MHz, CDCl3) δ (ppm): 29.95, 42.67, 44.82, 51.14 ppm'deki alifatik bölgede yer alan sinyaller -CH_2 gruplarına ait C atomunun sinyalleriidir. 106.42, 121.21 ppm'de görülen sinyaller -CH gruplarının C atom sinyalleridir. 124.76, 126.24, 126,98, 128.86, 129.23, 136.55, 142.71, 143.17 ppm'de aromatic bölgede gözlenen sinyaller ise benzil halkasına, fenil halkasına ve furan halkasına ait -CH gruplarının C atomu sinyalleridir. 192.74 ppm'de rezonans olan sinyal ise karbonil grubunda bulunan –C atomuna ait sinyaldir.

IR ($CHCl_3$) γ(max): C-4' teki karbonil grubu için 1651.46 cm^{-1}'de karakteristik sinyaller gözlenmiştir

- **(5) Bileşiğinin Kimyasal Sentez Yöntemi ile Sentezi**

1-benzil-6-fenil-6,7-dihidro-1*H*-indol-4(*5H*)-on **(4)** bileşiğinden 1-benzil-4-okso-6-fenil-4,5,6,7-tetrahidro-1*H*-indol-5-il-asetat **(5)** bileşiği, regioselektif asetoksilasyon reagent'ı aracılığıyla regioselektif olarak sentezlenmiştir. Sentezlenen ürünün saflaştırılması amacıyla kolon kromatografisi, 1:1:20 (EtOAc: Kloroform:Hegzan) çözücü sistemi ile yapılmıştır (Şekil 8.5).



Şekil 8. 5 1-benzil-4-okso-6-fenil-4,5,6,7-tetrahidro-1H-indol-5-il-asetat kolon kromatografisi ile saflaştırılması sonrası İTK görüntüsü

√ **1-benzil-4-okso-6-fenil-4,5,6,7-tetrahidro-1*H*-indol-5-il-asetat (5) bileşiğinin;**

^{1}H-NMR (500 MHz, CDCl3) δ (ppm): 7.42 – 7.30 ppm aralığında fenil ve benzil halkalarına ait hidrojen atomları multiplet şeklinde rezonans olmuştur. 7.01 ppm aralığında furan halkasının 2. pozisyondaki hidrojen atomu bulunmaktadır. 6.60 ppm'de dublet şeklinde rezonans olan sinyal furan halkasının 3 pozisyonundaki hidrojen atomudur. 5.42 ppm'deki sinyal 5 numaralı karbon atomuna bağlı protonun sinyalidir. 5.14 ppm'de singlet şeklinde rezonans olan sinyal benzil grubunun -CH_2 protonlarının sinyalidir. 2.67 ppm 'de dubletin dubleti şeklinde rezonans olan sinyal 7 numaralı C atomuna ait olan alililk protonlarının sinyalidir. 2.28 ppm'de singlet şeklinde rezonans olmuş sinyal 5 numaralı karbon atomuna bağlı olan asetoksi yapısının metil grubu protonlarının sinyalidir.

IR (CHCl3) *γ*(max): C-5 karbon atomuna bağlı asetoksi yapısına bağlı karbonil grubu 1744.83'de, C-4 karbon atomuna bağlı karbonil grubu ise 1674,10'de karakteristik sinyaller vermiştir.

8.3 Biyotransformasyon Reaksiyonları

Biyotransformasyon reaksiyonları; benzer olan fonksiyonel gruplardan sadece bir grubun reaksiyona sokulması, rasemik karışımların ayrıştırılması, enantiyomer çiftlerinden birinin seçici olarak dönüştürülmesi, kiral merkeze bir grubun eklenmesi ve deaktif bir C-atomunun aktif bir fonksiyonel gruba dönüşümü gibi işlemler kolaylıkla gerçekleştirilebilir. Kimyasal reaksiyonlardan farklı olarak katalizör olarak canlı sistemlerini ve enzimleri merkezine alan biyotransformasyon reaksiyonları, daha hassas tepkime koşulları ile kimyasal reaksiyonlardan farklıdır [28].

Önemli noktalardan biri kimyasal metodlarla elde edilen ürünlerin rasemik karışımlar halinde elde edilmesi ve bu rasemik karışımların kimyasal metodlarla rezolüsyonunun zorluğudur. Mikrobiyal biyotransformasyon yöntemleri enantiyoseçici oldukları için özellikle ilaç etkin maddelerin üretiminde gerekli ve önemli olan tek enantiyomerin seçilimli üretimi bu yol kullanılarak günümüzde giderek önem taşıyan bir konu haline gelmiştir [195].

Aspergillus kültürleri kullanılarak farklı organik bileşikler, organik kimya ve ilaç sanayi için gerekli olabilecek bileşiklere dönüştürülmektedir. Çeşitli aspergillus suş kültürlerinin alifatik ve aromatik organik bileşikleri biyotransformasyona uğrattığı bilinmektedir [199], [200], [201], [202].

Bu çalışmada kimyasal reaksiyon basamağında regioselektif asetoksilasyon reaksiyonları gerçekleştirilerek rasemik benzofuran türevi 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-okso-benzofuran-5-il-asetat **(3)** ve indol türevi 1-benzil-4-okso-6-fenil-4,5,6,7-tetrahidro-1*H*-indol-5-il-asetat **(5)** bileşikleri sentezlenmiştir. Daha sonra bu bileşiklerden enantiyomerik saf benzofuran ve indol türevleri elde edilmesi için biyotransformasyon reaksiyonlarına gerçekleştirilmiştir. Ayrıca 6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on **(2)** ve 1-benzil-6-fenil-6,7-dihidro-1H-indol-4(5H)-on **(4)** bileşikleri de biyotransformasyon reaksiyonlarına tabii tutulmuş ve bu moleküller üzerinde bir dönüşüm olup olmadığı kontrol edilmiştir.

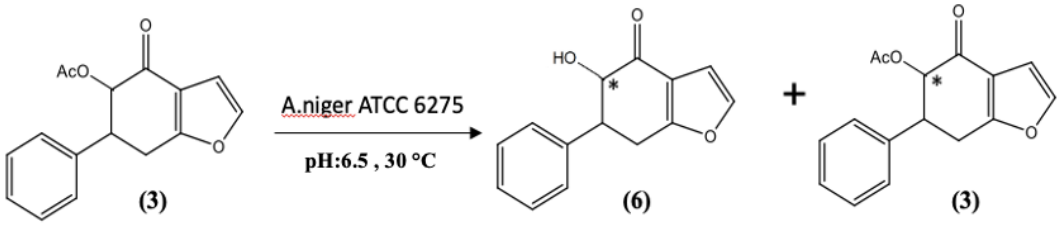
8.3.1 *Aspergillus Niger ATCC 6275* Suşu ile Gerçekleştirilen Biyotransformasyon Reaksiyonları

Aspergillus niger ATCC 6275 suşu kullanılarak gerçekleştirilen biyotransformasyon reaksiyonlarında **(2)**, **(3)**, **(4)** ve **(5)** bileşiklerinden alınan 20 mg madde 500 µL DMSO içerisinde çözdürülmüş ve *A.niger ATCC 6275* besiyeri ortamına inoküle edilerek dönüşüm takip edilmiştir. **(2)** ve **(4)** bileşiklerinin bulunduğu reaksiyon ortamında biyotransformasyon 192 saat devam ettirilmiş ancak bir dönüşüm gözlenmemiştir. Biyotransformasyonun gerçekleşmeme sebebi, *A.niger*'in bu maddeler üzerinde dönüşüm yapmaya olanak sağlayacak bir enziminin bulunmayışı veya bu maddelerin *A.niger*'in biyodönüşüm yapmasına olanak verecek aktif bir bölgelerinin bulunmayışı olabilir.

Sırasıyla $Mn(OAc)_3$ ve $KMnO_4$ regioselektif asetoksilasyon reagentları aracılığıyla benzofuranon türevi **(2)** ve indol türevi **(4)** bileşiklerine regio-selektif

asetoksilasyon gerçekleştirilerek rasemik **(3)** ve **(5)** bileşikleri elde edilmiştir. Daha sonra biyotransformasyon reaksiyonları uygun koşullar altında gerçekleştirilmiştir. **(3)** bileşiğinin bulunduğu ortamda 28. saat itibari ile dönüşüm başlamış ve 120. saatte %50 dönüşüme ulaşılmıştır. **(5)** bileşiğinin bulunduğu ortamda 34. saatte %50 dönüşüme ulaşılmıştır.

Rasemik karışım halinde bulunan **(3)** bileşiği, *A.niger ATCC 6275* ile biyotransformasyon reaksiyonu sonrasında enantiyosaf **(3)** ve 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il-hidroksi **(6)** bileşiğine dönüşmüştür (Şekil 8.6 ve Tablo 8.1).

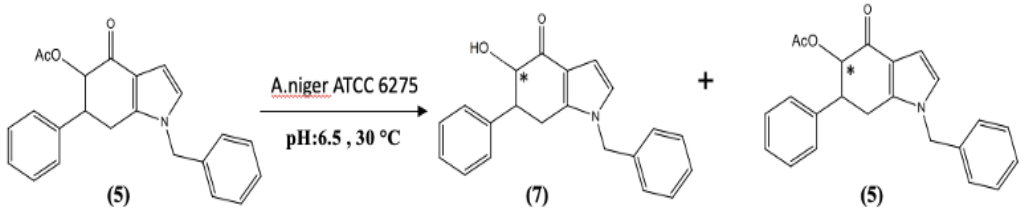


Şekil 8. 6 (3) bileşiğinin A.niger ATCC 6275 suşu ile gerçekleştirilen biyotransformasyon reaksiyonu

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

IR (CHCl3) γ(max): 3461,00 cm^{-1}'de -OH fonksiyonel grubuna ait karakteristik sinyaller gözlenmiştir. 1682 cm^{-1}'de C-4 konumunda bulunan karbonil grubuna ait sinyaller gözlenmiştir.

√ Bir diğer yandan rasemik karışım halinde bulunan **(5)** bileşiği, *A.niger ATCC 6275* ile biyotransformasyon reaksiyonu sonrasında enantiyosaf **(5)** bileşiği ve 1-benzil-4-oxo-6-fenil-4,5,6,7-tetrahidro-1H-indol-5-il- hidroksi **(7)** bileşiğine dönüşmüştür (Şekil 8.7).



Şekil 8. 7 (5) bileşiğinin A.niger ATCC 6275 suşu ile gerçekleştirilen biyotransformasyon reaksiyonu

1-benzil-4-oxo-6-fenil-4,5,6,7-tetrahidro-1H-indol-5-il-hidroksi (7) bileşiğinin;

IR (CHCl3) γ(max): 3451,39 cm^{-1}, 1656,71 cm^{-1}.

3451,39 cm^{-1}'da -OH fonksiyonel grubuna ait karakteristik sinyaller gözlenmiştir. 1674,10 cm^{-1}'de C-4 konumunda bulunan karbonil grubuna ait sinyaller gözlenmiştir.

8.3.2 *Aspergillus Oryzae RIB40* Suşu Ile Gerçekleştirilen Biyotransformasyon Reaksiyonları

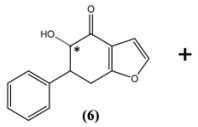
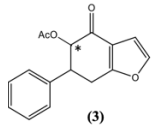
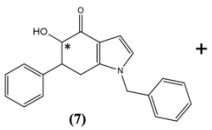
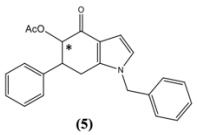
Aspergillus oryzae RIB40 suşu kullanılarak gerçekleştirilen biyotransformasyon reaksiyonlarında **(2)**, **(3)**, **(4)** ve **(5)** bileşiklerinden alınan 20 mg madde 500 µL DMSO içerisinde çözdürülmüş ve *Aspergillus oryzae RIB40* besiyeri ortamına inoküle edilerek dönüşüm takip edilmiştir. **(2)** ve **(4)** bileşiklerinin bulunduğu reaksiyon ortamında biyotransformasyon 192 saat devam ettirilmiş ancak bir dönüşüm gözlenmemiştir. Biyotransformasyonun gerçekleşmeme sebebi, *Aspergillus oryzae*'nin bu maddeler üzerinde dönüşüm yapmaya olanak sağlayacak bir enziminin bulunmayışı veya bu maddelerin *Aspergillus oryzae*'nin biyodönüşüm yapmasına olanak verecek aktif bölgelerinin bulunmayışı olaarak verilebilir. Reaksiyon sonlandırıldıktan sonra A.niger ve A. oryzae küflerinin bulunduğu erlenlerler 121°C'de, 25 dakika boyunca otaklanmış ve bu şekilde patojen etki yaratabilecek sporlar imha edilmiştir. Çevreye yayılabilecek sporların imhası bu bağlamda çok önemli ve gerekli bir adımdır.

(3) bileşiğinin bulunduğu ortamda 22. saatte %50 dönüşüme ulaşılmıştır.

(5) bileşiğinin bulunduğu ortamda 26. saatte %50 dönüşüme ulaşılmıştır.

- √ Rasemik karışım halinde bulunan **(3)** bileşiği, *Aspergillus oryzae RIB40* ile biyotransformasyon reaksiyonu sonrasında enantiyosaf **(3)** ve **(6)** bileşiğine dönüşmüştür (Şekil 8.6).
- √ Bir diğer yandan rasemik karışım halinde bulunan **(5),** *Aspergillus oryzae RIB40* ile biyotransformasyon reaksiyonu sonrasında enantiyosaf **(5)** ve **(7)** bileşiğine dönüşmüştür (Şekil 8.7).

Tablo 8. 1 Mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyon sonuç çizelgesi

Sentez Ürünleri	***Aspergillus niger ATCC 6275***		***Aspergillus oryzae RIB40***		**Biyotransformasyon Ürünleri**
	Dönüşüm	Süre	Dönüşüm	Süre	
6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on **(2)**	X	192 saat	X	192 saat	X
4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-okso-benzofuran-5-il-asetat **(3)**	√	120 saat	√	22 saat	 + 
1-benzil-6-fenil-6,7-dihidro-1H-indol-4(5H)-on **(4)**	X	192 saat	X	192 saat	X
1-benzil-4-okso-6-fenil-4,5,6,7-tetrahidro-1H-indol-5-il-asetat **(5)**	√	34 saat	√	26 saat	 + 

8.3.3 Biyotransformasyon Sonrası Elde Edilen Maddelerin HPLC Analiz Sonuçları

Bu bileşiklerin analizleri HPLC'de kiral kolon kullanılarak yapılmış ve enantiyomerik fazlalık değerleri hesaplanmıştır. Ayrımın gözlenebilmesi adına HPLC analizleri sırasında kiral kolon kullanılmış (OD-H) ve 1 ml/dk olarak

belirlenen akış hızında, 1:9 (2-propanol:hekzan) çözücü sisteminde örnekler sisteme verilmiştir.

Rasemik **(3)** bileşiğinin enantiyomerlerine ait iki farklı pik ~19. ve ~23. dakikalarda gözlemlenmiştir. Rasemik α-asetoksi-indol **(5)** bileşiğine ait enantiyomer çiftine ait pikler ~ 40 dk ve ~44. dk'da gözlenmiştir.

8.3.3.1 *Aspergillus niger ATCC 6275* suşu ile gerçekleştirilen biyotransformasyon reaksiyon HPLC sonuçları

- Rasemik **(3)** bileşiği üzerinde gerçekleştirilen mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonunda elde edilen **(6)** bileşiği için gerçekleştirilen HPLC analiz sonucunda **ee değeri %67** olarak hesaplanmıştır. **Enantiyosaf (3)** bileşiğine ait **ee değeri ise %12** olarak hesaplanmıştır (Tablo 8.2).
- Rasemik **(5)** bileşiği üzerinde gerçekleştirilen mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonunda elde edilen **(7)** bileşiği için gerçekleştirilen HPLC analiz sonucunda **ee değeri % 82** olarak hesaplanmıştır. **Enantiyosaf (5)** bileşiğine ait **ee değeri ise %36** olarak hesaplanmıştır (Tablo 8.3).

8.3.3.2 *Aspergillus oryzae RIB40* suşu ile gerçekleştirilen biyotransformasyon reaksiyon HPLC sonuçları

- Rasemik **(3)** bileşiği üzerinde gerçekleştirilen mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonunda elde edilen **(6)** bileşiği için gerçekleştirilen HPLC analiz sonucunda **ee değeri %86** olarak hesaplanmıştır. Enantiyosaf **(3)** bileşiğine ait **ee değeri ise %99** olarak hesaplanmıştır (Tablo 8.2).
- Rasemik **(5)** bileşiği üzerinde gerçekleştirilen mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonunda elde edilen **(7)** bileşiği için gerçekleştirilen HPLC analiz sonucunda **ee değeri %23** olarak hesaplanmıştır. Enantiyosaf **(5)** bileşiğine ait **ee değeri ise %45** olarak hesaplanmıştır (Tablo 8.3).

Tablo 8. 2 (3) bileşiğine ait biyotransformasyon reaksiyonu sonrası HPLC bulguları

Mikroorganizmalar	Süre	-OH e.e.	α-asetoksi e.e.	Dönüşüm (C %)
Aspergillus niger ATCC 6275	120 saat	%71	%12	14,5
Aspergillus oryzae RIB40	22 saat	%86	%99	54

Tablo 8. 3 (5) bileşiği biyotransformasyon reaksiyonu HPLC analiz sonuçları

Mikroorganizmalar	Süre	-OH e.e. (α izomeri için)	α-asetoksi e.e.	Dönüşüm (C %)	-OH e.e. (γ izomeri için)	γ-asetoksi e.e.	Dönüşüm (C %)
Aspergillus niger ATCC 6275	34 saat	%85	%37	30	%45	%55	55
Aspergillus oryzae RIB40	26 saat	%30	%40	58	%11	%52	83

Grubumuzun yapmış olduğu başka bir çalışmada 12 farklı lipaz enzimi ile **(3)** bileşiğine, farklı pH (6;7;8) ve çözücüler (dmso, asetonitril, thf) kullanılarak biyotransformasyon reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada pH:6.5 ve dmso çözücüsü kullanılmış olup sonuçlar aynı koşullar altında karşılaştırılmıştır (Tablo 8.5). Enzimatik biyotransformasyon reaksiyonunda gerçekleşen %50 dönüşümün ardından elde edilen HPLC sonuçlarına göre **(3)** bileşiğine ait en düşük

ee değeri pH:6'da %0.6 olarak HPL'de (*Hog pankreas Lipaz)* gözlenmiş olup **(6)** bileşiğine ait ee değerinin ise hesaplanamayacak kadar düşük çıktığı belirtilmiştir. **(3)** bileşiğine ait en yüksek ee değeri pH:7'de %25 ile PLL'de (*Pseudomonas lipoprotein Lipaz*) gözlenmiş olup **(6)** bileşiğine ait ee değeri ise %81 olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada mikroorganizmalar kullanılarak gerçekleştirilen mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyon sonuçları grubumuzun yaptığı enzimatik biyotransformasyon sonuçları ile karşılaştırıldığında (pH:6.5 ve DMSO) *Aspergillus oryzae RIB40* suşunun daha etkili bir biyotransformasyon reaksiyonu gerçekleştirdiği belirtilmelidir. Ayrıca biyotransformasyon reaksiyon süreleri de göz önüne alındığında enzimatik biyotransformasyon reaksiyonunda en yüksek ee değerini veren PLL (*Pseudomonas lipoprotein Lipaz*) >36 gün süre ile reaksiyon gerçekleştirirken *Aspergillus oryzae RIB40* ile gerçekleştirilen biyotransformasyon reaksiyonu 22 saat sürmüştür. Bir diğer yandan *Aspergillus niger ATCC 6275* ile gerçekleştirilen biyotransformasyon reaksiyonu enzimatik biyotransformasyon reaksiyonunda kullanılan diğer enzimler ile kıyaslandığında kayda değer ee değerleri vermiştir. 120 saat süren reaksiyon süresi ile enzimlerden daha başarılı sonuç verdiği belirtilebilir.

Tablo 8. 4 Grubumuzun yaptığı çalışma [223] ile bu çalışma sonuçlarının ee oran karşılaştırması

pH / **Enzim ve mikroorganizmalar**	**6**		**6,5**		**7**	
	α- asetoksi e.e.	-OH e.e.	α- asetoksi e.e.	-OH e.e.	α- asetoksi e.e.	-OH e.e.
WGL	% 8	-	-	-	% 6	%23
AMANO LİPAZ	% 3	-	-	-	% 16	-
CAL B	**% 3**	**-**	**-**	**-**	**% 16**	**-**

Tablo 8. 5 Grubumuzun yaptığı çalışma [223] ile bu çalışma sonuçlarının ee oran karşılaştırması (devamı)

CCL	% 1	-	-	-	% 0,1	-
HPL	% 0,6	-	-	-	% 1	%8
MJL	% 5	-	-	-	% 7	-
PLL	% 14	-	-	-	% 25	%81
PCL	-	-	-	-	%9	%79
PRL	-	-	-	-	-	-
RAL	-	-	-	-	-	-
RNL	-	-	-	-	-	-
CRL	-	-	-	-	-	-
Aspergillus niger ATCC 6275	-	-	**%12**	**%67**	-	-
Aspergillus oryzae RIB40	-	-	**%99**	**%82**	-	-

SONUÇ

√ Bu çalışma, farmakolojik olarak öncü bileşikler için önemli olan 6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on **(2)**, 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-okso-benzofuran-5-

il-asetat **(3)**, 1-benzil-6-fenil-6,7-dihidro-1H-indol-4(5H)-on **(4)** ve 1-benzil-4-okso-6-fenil-4,5,6,7-tetrahidro-1*H*-indol-5-il-asetat **(5)** ve türevlerinin **sentezine basit ve yeni bir yöntem** sağlamaktadır.

√ Bu çalışma, mikrobiyal biyotransformasyon yoluyla ilaç endüstrisinde önemli hedefler olan 1-benzil-4-okso-6-fenil-4,5,6,7-tetrahidro-1*H*-indol-5-il asetat ve türevlerinin **literatürde ilk sentezini** sunmaktadır.

√ Çalışmamızda sentezlenen 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-okso-benzofuran-5-il-asetat **(3)**, ve 1-benzil-4-okso-6-fenil-4,5,6,7-tetrahidro-1*H*-indol-5-il-asetat **(5)** bileşiklerinin biyotransformasyon basamağında **Aspergillus türlerinden ilk defa faydalanılmıştır.**

√ 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-okso-benzofuran-5-il-asetat **(3)**, ve 1-benzil-4-okso-6-fenil-4,5,6,7-tetrahidro-1*H*-indol-5-il-asetat **(5)** bileşiklerinin biyotransformasyonu sonrası elde edilen **4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il hidroksi (6)** ve **1-benzil-4-oxo-6-fenil-4,5,6,7-tetrahidro-1H-indol-5-il- hidroksi (7)** bileşikleri ***Aspergillus Niger ATCC 6275* ve *Aspergillus Oryzae RIB40* suşları kullanılarak literatürde ilk defa elde edilmiştir.**

√ Bu çalışmada, Aspergillus türlerinden olan *Aspergillus Niger ATCC 6275* ve *Aspergillus Oryzae RIB40* suşları kullanılmıştır. Reaksiyonda gösterdikleri farklılıklar ve benzerlikler saptanmıştır.

√ Bu çalışmada biyotransformasyon basamağında kullanılan mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonları sonuç ürün bileşimi açısından tamamlayıcı olarak kabul edilebilir.

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

ÖNERİLER

- Deneyin farklı aspergillus türleri ile tekrarlanması ile aspergillus türlerinin benzofuran ve indol türevleri üzerindeki etkisinin genel bir sonucu ortaya çıkarılabilir.
- Farklı; pH, besiyeri bileşenleri, substrat derişimleri, sıcaklık değerlerinde ve organik çözücülerde (asetonitril, THF, siklohegzan vb.) deneyler tekrar edilerek *Aspergillus niger* ve *Aspergillus oryzae* mikroorganizmalarının biyotransformasyon davranışları farklı ortamlarda test edilebilir.

KAYNAKÇA

[1] Biswal, S., Sahoo, u., Sethy, S., Kumar, H. K. S., Banerjee, M., (2012), " Indole: the molecule of diverse biological activities.," *Asian J Pharm Clin Res, 5(1): 1-6..*

[2] Kwiecień, H., & Wodnicka, A. (2020)., " Five-Membered Ring Systems: Furans and Benzofurans.," *Progress in Heterocyclic Chemistry, 281–323..*

[3] Rajeshwari C. K., Hiremathad A., Singh M., Santos A., M. & Rangappa, S. Keri., (2017)., "A Review on Antioxidant Potential of Bioactive Heterocycle Benzofuran: Natural and Synthetic Derivatives.," *Pharmacological Reports. Elsevier B.V.*

[4] Cruz J.N., Silva G.S., et al. (2020), " Origins and Biological Applications of Benzofurans , Editor: Murilo Souza Barros,," *Nova Science Publishers, Inc, New York..*

[5] I. C.R. Mstapha. (1879) , "Modern methods of plant analysis/modern methoden der pflanzenanalyse,," *Acad Sci Paris 89, 442.*

[6] El-Sayed, N. F., El-Hussieny, M., Ewies, E. F., El Shehry, M. F., Awad, H. M., & Fouad, M. A. (2021), " Design, synthesis, biological evaluation, and molecular docking of new benzofuran and indole derivatives as tubulin polymerization inhibitors.,," *Drug Development Research..*

[7] Chen, C.-Y., Lin, C.-M., Lin, H.-C., Huang, C.-F., Lee, C.-Y., Si Tou, T.-C., … Chang, C.-S. (2017). , "Structure−activity relationship study of novel 2-aminobenzofuran derivatives as P-glycoprotein inhibitors.,," *European Journal of Medicinal Chemistry, 125, 1023-1035.*

[8] Adalat B., Rahim F., Taha M., Hayat S., Zarshad Ali N.I., Shah S.A.A., Ashfaq A.W., Rehman U., Khan K.M., (2022). , "Synthesis of Benzofuran–based Schiff bases as anti-diabetic compounds and their molecular docking studies," *Journal of Molecular Structure, V1265.*

[9] P.-H. Nguyen, T.-N.-A. Nguyen, T.-T. Dao, H.-W. Kang, D.-T. Ndinteh, J.-T. Mbafor, W.-K. Oh, (2010)., " AMP-activated protein kinase (AMPK) activation by benzofurans and coumestans isolated from Erythrina abyssinica," *J. Nat. Prod.73.*

[10] Hasanvand Z., Motahari R., Nadri H., Moghimi S., Foroumadi R., Ayati A., Akbarzadeh T., Bukhari S.N.A, Foroumadi A., (2022). , "Novel 3-aminobenzofuran derivatives as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease.," *Frontiers in chemistry, 10..*

[11] Pravin N, Jozwiak K. (2022) , "Effects of Linkers and Substitutions on Multitarget Directed Ligands for Alzheimer's Diseases: Emerging Paradigms and Strategies.," *International Journal of Molecular Sciences. 23(11):6085.*

[12] Manske Von R. H. F. (1965), "The Alkaloids, Bd. VIII: The Indole Alkaloids.," in *Chemistry and Physiology.*.

[13] Rose, W. C. (1938)., " The nutritive significance of the amino acids.," *Physiological Reviews, 18(1), 109-136.*

[14] Kögl, Fritz, Haagen-Smit, A. J. and Erxleben, Hanni. Kögl, Fritz, Haagen-Smit, A., (1993), " Über ein Phytohormon der Zellstreckung. Reindarstellung des Auxins aus menschlichem Harn.,," *4. Mitteilung über pflanzliche Wachstumsstoffe." , vol. 214, no. 5-6, pp. 241-261..*

[15] M. E. Speeter, R. V. Heinzleman, and D. I. Weisblat, (1951)., "The Synthesis Of The Blood Serum Vasoconstrictor Principle Serotonın Creatinine Sulfate.," *Journal Of The American Chemical Society, 73 (11), 5514-5515.*

[16] Ejeh, S., Uzairu, A., Shallangwa, G. A., Abechi, S. E., Ibrahim, M. T., & Ramu, R., (2023), "Cheminformatics study of some indole compounds through QSAR modeling, ADME prediction,, molecular docking, and molecular dynamic simulation to identify novel inhibitors of HCV NS5B protease.," *Journal of the Indian Chemical Society, 100(3).*

[17] Mahmoud, E., Hayallah, A. M., Kovacic, S., Abdelhamid, D., & Abdel-Aziz, M., (2022)., " Recent progress in biologically active indole hybrids: a mini review.," *Pharmacological Reports, 74(4), 570-582..*

[18] Niri, D. R., Sayahi, M. H., Behrouz, S., Moazzam, A., Mojtabavi, S., Faramarzi, M. A., ... & Mahdavi, M. (2022)., " Design, synthesis, in vitro, and in silico biological evaluations of new coumarin-indole hybrids as anti-α-glucosidase agents.".

[19] Chavan W.P., Hanamshetty C.P., Nagabhushana M. M., Thippeswamy A. (2022), "Bıologıcal Importance Of The Indole Nucleus In Recent Years: A Comprehensıve Revıew,," in *International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research, 14(3); 46-63*.

[20] Chadha, N., & Silakari, O. (2017), "Indoles as therapeutics of interest in medicinal chemistry: Bird's eye view.," in *European Journal of Medicinal Chemistry, 134, 159–184*.

[21] Singh, M., Sethi, S., & Bhushan, R. (2020)., "Liquid chromatographic methods for separation, determination, and bioassay of enantiomers of etodolac: A review.," *Journal of separation science, 43(1), 18-30.*

[22] Clayden, J., Greeves, N., & Warren, S. (2012). , Organic chemistry. Stereochemistry, pp:302-327., Oxford University Press, USA.

[23] M. Doble, A. K. Kruthiventi and V. G. Gaikar, (2004), "Biotransformations and bioprocesses,," in *Marcel Dekker New York, USA*.

[24] J. E. Leresche and H.-P. Meyer, (2006), "Chemocatalysis and Biocatalysis (Biotransformation): Some Thoughts of a Chemist and of a Biotechnologist," *Organic process research & development, 10, 572-580.*

[25] Sheldon, R.A.,(1993), "Chirotechnology: Industrial Synthesis of Optically Active Compounds,," in *Marcel Dekker, New York, 105*.

[26] Faber, K., (2003), in *Biotransformations in Organic Chemistry, Fifth Edition* , Springer- Verlag, Berlin,, pp. 1-407.

[27] Davies, H.G., Green, R.H., Kelly, D.R., Roberts, S.M., (1989), "Biotransformations in preparative organic chemistry: The use of isolated and whole cell systems in synthesis,," *Academic Press, 268..*

[28] Hanson, J.R., (1995), "An Introduction to Biotransformations in Organic Chemistry," in *W. H. Freeman Spektrum, New York, 1-62*.

[29] Caliskan Z., Soydan E., Kurt Gur G., Ordu E., (2019), "Synthesis of New 4-Oxo-Tetrahydroindol Derivatives by Using Chemical and Microbial Biotransformation Methods," *Polycyclic Aromatic Compounds, vol.39, pp.1-7..*

[30] Naranjo-Ortiz, M. A., & Gabaldón, T. (2019), "Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi.," *Biological Reviews, 94(6), 2101–2137..*

[31] Lansing M. Prescott, John P. Harley, Donald A. Klein, (2002), "The Fungi (Eumycota), Slime Molds, and Water Molds," *Microbiology 5th edition. McGraw-Hill Science/Engineering/Math pp:456-501. ISBN: 978-0072320411.*

[32] Naranjo-Ortiz, M. A., & Gabaldón, T. (2020), "Fungal evolution: cellular, genomic and metabolic complexity.," *Biological Reviews, 95(5), 1198-1232..*

[33] Cees j. Bos, (1996), "Fungal Biology and Genetics-Principle and Practise,," in *Biology of fungi, Marcel Dekker Inc., New York, Usa., pp: 1-12*.

[34] Naranjo-Ortiz, M. A., & Gabaldón, T. (2019), "Fungal evolution: major ecological adaptations and evolutionary transitions".*Biological Reviews, 94(4), 1443-1476..*

[35] Gerard J. Tortora, Berdell R. Funke, Christine L. Case. (2000), "The Eukaryotes: Fungi, Algae, Protozoa, and Helminths, Microbiology: An Introduction,," in *7th Edition. Benjamin Cummings,USA. pp: 349-387. ISBN 13: 9780805375541*.

[36] Boynukara, B., İlhan, Z. ve Gülhan, T., (2002), " İthal kozmetik bir kremden Aspergillus niger izolasyonu," *Y.Y.Ü. Veterinerlik Fakültesi Dergisi 13:(1-2).*

[37] Bennett, J.W., (1985), "Molds, manufacturing and molecular genetics, Molecular Genetics of Filamentous Fungi," in *W. and Alan, R., Liss Inc., New York, pp.152-160*.

[38] Li, C., Zhou, J., Du, G., Chen, J., Takahashi, S., & Liu, S. (2020), in *Developing Aspergillus niger as a cell factory for food enzyme production.* , Biotechnology Advances, 107630. doi:10.1016/j.biotechadv.2020.107630.

[39] Jørgensen, T. R., Goosen, T., van den Hondel, C. A., Ram, A. F., & Iversen, J. J. (2009), "Transcriptomic comparison of Aspergillus niger growing on two different sugars reveals coordinated regulation of the secretory pathway.," *BMC Genomics, 10(1), 44. doi:10.1186/1471-2164-10-44.*

[40] Torun Z., (2021), *Aspergıllus Nıger ve Trıchoderma Vırılente Mantarları Üzerine Farmakognozik Araştırmalar. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara..*

[41] Guarro J., Xavier M. O., & Severo L. C. (2009), "Differences and Similarities Amongst Pathogenic Aspergillus Species. Aspergillosis: From Diagnosis to Prevention," *7–32. doi:10.1007/978-90-481-2408-4_2..*

[42] Timothy C. Cairns, Lars Barthel and Vera Meyer (2021), "Something old, something new: challenges and developments in Aspergillus niger biotechnology.," *Essays in Biochemistry 65, pp:213–224..*

[43] Dursun, A.Y., Uslu, G., Cuci, Y. and Aksu, Z., (2003), "Bioaccumulation of copper(II), lead(II) and chromium(VI) by growing Aspergillus niger,," *Process Biochemistry 38(12): 1647-1651..*

[44] Volke-Sepulveda, T.L., Gutierrez-Rojas, M. and Favela-Torres, E., (2003), "Biodegradation of hexadecane in liquid and solid-state fermentations by Aspergillus niger,," *Bioresource Technology 87: 81-86..*

[45] Meyer, V., Wu, B., & Ram, A. F. J. (2010), " Aspergillus as a multi-purpose cell factory: current status and perspectives.," *Biotechnology Letters, 33(3), 469–476. doi:10.1007/s10529-010-0473-8.*

[46] Bilgi M., (2017), *Aspergıllus Nıger'de Fenol Hidroksilaz İndüksiyonu Ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul..*

[47] Pel, H. J., de Winde, J. H., Archer, D. B., Dyer, P. S., Hofmann, G., Schaap, P. J., … Albermann, K. (2007), "Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory Aspergillus niger CBS 513.88.," *Nature Biotechnology, 25(2), 221–231. doi:10.1038/nbt1282.*

[48] Fiedler, M. R. M., Barthel, L., Kubisch, C., Nai, C., & Meyer, V. (2018), "Construction of an improved Aspergillus niger platform for enhanced

glucoamylase secretion.," *Microbial cell factories, 17(1), 95. https://doi.org/10.1186/s12934-018-0941-8..*

[49] Kwon, M.J., Arentshorst, M., Roos, E.D., Van Den Hondel, C.A., Meyer, V. and Ram, A.F. (2011), "Functional characterization of Rho GTPases in Aspergillus niger uncovers conserved and diverged roles of Rho proteins within filamentous fungi.," *Mol. Microbiol. 79, 1151–1167..*

[50] Davıd J. Jeenes, Donald A. Mackenzıe, Ian N. Roberts And Davıd B. Archer, (1991), "Heterologous Protein Production by Filamentous Fungi.," *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews - Vol. 9. Pp: 327-367..*

[51] MacKenzie, D. A., Gendron, L. C. G., Jeenes, D. J., & Archer, D. B. (1994), "Physiological optimization of secreted protein production by Aspergillus niger.," *Enzyme and Microbial Technology, 16(4), 276–280. doi:10.1016/0141-0229(94)90166-x.*

[52] Wu, L., Zhang, L., Li, X. et al.(2023), "Effective production of kojic acid in engineered Aspergillus niger.," *Microb Cell Fact 22, 40..*

[53] Van der Straat, L., Vernooij, M., Lammers, M. et al.(2014), "Expression of the Aspergillus terreus itaconic acid biosynthesis cluster in Aspergillus niger.," *Microb Cell Fact 13, 11..*

[54] Currie J.N., (1917), "The citric acid fermentation of Aspergillus niger.," *J Biol Chem, 31(1): 15-37..*

[55] Mary Anne S. Lima, Maria da Conceição F. de Oliveira and Antônia T. Á. Pimenta et al. (2019), "Aspergillus niger: A Hundred Years of Contribution to the Natural Products Chemistry.," *Journal of the Brazilian Chemical Society, Vol. 30(10):2029-2059. DOI: 10.21577/0103-5053.20190080.*

[56] Andersen M.R., Michael Lynge Nielsen M.L., Nielsen J., (2008), "Metabolic model integration of the bibliome, genome, metabolome and reactome of Aspergillus niger.," *Molecular Systems Biology 4; Article number 178; doi:10.1038/msb.2008.12.*

[57] Tortorello M.L., Batt C.A. (2014), "Aspergillus- Aspergillus oryzae," in *Encyclopedia of Food Microbiology, second edition. Elsevier, NY, Usa. pp:71-98..*

[58] Chang, P.-K., & Ehrlich, K. C. (2010), "What does genetic diversity of Aspergillus flavus tell us about Aspergillus oryzae?," *International Journal of Food Microbiology, 138(3), 189–199..*

[59] Yasui, M., Oda, K., Masuo, S. et al. (2020)., "Invasive growth of Aspergillus oryzae in rice koji and increase of nuclear number.," *Fungal Biol Biotechnol 7 (8)..*

[60] Barbesgaard, P., Heldt-Hansen, H., & Diderichsen, B. (1992), "On the safety of Aspergillus oryzae: a review.," *Applied Microbiology and Biotechnology, 36(5) pp:569-572..*

[61] He, B., Hu, Z., Ma, L. et al. (2018), "Transcriptome analysis of different growth stages of Aspergillus oryzae reveals dynamic changes of distinct classes of genes during growth.," *BMC Microbiol 18, 12. https://doi.org/10.1186/s12866-018-1158-z.*

[62] Maeda, H., Yamagata, Y., Abe, K., Hasegawa, F., Machida, M., Ishioka, R., Gomi, K. and Nakajima, T., (2005), "Purification and characterization of a biodegradable plastic-degrading enzyme from Aspergillus oryzae," *Appl. Microbiol. Biotechnol., 67, 778–788..*

[63] Carlsen, M., Spohr, A.B., Nielsen, J. and Villadsen, J. (1996), "Morphology and physiology of an α-amylase producing strain of Aspergillus oryzae during batch cultivations," *Biotechnol. Bioeng., 49: 266-276..*

[64] Qi, J., Han, H., Sui, D. et al.(2022), "Efficient production of a cyclic dipeptide (cyclo-TA) using heterologous expression system of filamentous fungus Aspergillus oryzae," *Microb Cell Fact 21, 146..*

[65] Kitamoto K., Kimura K., Gomi K., Kumagai C., (1994), "Electrophoretic karyoptype and gene assignment to chromosome of Aspergillus oryzae.," *Biochemistry. 58: 1467–1470.*

[66] Machida, M., Asai, K., Sano, M. et al. (2005)., "Genome sequencing and analysis of Aspergillus oryzae," *Nature 438, 1157–1161..*

[67] Frisvad, J. C., Møller, L. L. H., Larsen, T. O., Kumar, R. & Arnau, J.,(2018), "Safety of the fungal workhorses of industrial biotechnology: update on the mycotoxin and secondary metabolite potential of Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, and Trichoderma reesei.," *Appl. Microbiol. Biotechnol. 102, 9481–9515..*

[68] Jørgensen R.T., (2007), " Identification and Toxigenic Potential of the Industrially Important Fungi, Aspergillus oryzae and Aspergillus sojae.," *Journal of Food Protection, Vol. 70(12), Pages 2916–2934.*

[69] K.-S. Yeung (2012), "Furans and benzofurans," *Heterocycl. Chem., 29, pp. 47-76.*

[70] Masubuchi, Miyako., Hirosato, Ebiike., Ken, Ichi Kawasaki., Satoshi, Sogabe., Kenji, Morikami., Yasuhiko, Shiratori., Shinji, Tsujii., et al. (2003), "Synthesis and Biological Activities of Benzofuran Antifungal Agents Targeting Fungal N-Myristoyltransfer," *Bioorganic & medicinal chemistry, 11(20), 4463-4478.*

[71] Hayakawa, Ichiro., Rieko, Shioya., Toshinori, Agatsuma., Hidehiko, Furukawa. & Yuichi, Sugano. (2004), "Thienopyridine and Benzofuran Derivatives as Potent

Anti-Tumor Agents Possessing Different Structure-Activity Relationships.," *Bioorganic and Medicinal.*

[72] Eicher, T., Hauptmann, S., Speicher, A. (2003)., "Five-Membered Heterocycles. T. Eicher, and S. Hauptmann (editors)," in *The Chemistry of Heterocycles: Structures, Reactions, Synthesis, and Applications (p. 52–221). Grünstadt: John Wiley & Sons.*.

[73] Joule, J.A., Mills, K. (2010)., "Typical Reactivity of Indoles, Benzo[b] thiophenes, Benzo[b]furans, Isoindoles, Benzo[c]thiophenes and Isobenzofurans.," in *Heterocyclic Chemistry (p. 369–372). West Sussex: Wiley.*.

[74] Ahmed Mustafa, Benzofurans. (2008). , "Chemistry of Heterocyclic Compounds, 1–77.".

[75] Miao, Y., Hu, Y., Yang, J., Liu, T., Sun, J., & Wang, X. (2019), "Natural source, bioactivity and synthesis of benzofuran derivatives.," *RSC Advances, 9(47), 27510–27540.*.

[76] Proksch P., Rodriguez E. (1983), "Chromenes and benzofurans of the asteraceae, their chemistry and biological significance.," *Phytochemistry, Volume 22, Issue 11, 2335-2348.*.

[77] Ashok D., Reddy R.M., Thara G., Dharavath R., Ramakrishna K., Nagaraju N., Gundu S., Sarasija M. (2022), "A new library of 1,2,3-triazole based benzofuran scaffolds: Synthesis and biological evaluation as potential antimicrobial agents.," *Journal of Heterocyclic Chemistry, Volume 59; Issue 8, 1376-1384.*.

[78] Sunitha V., Kumar A.K., Saikrishna, B. (2022). , "Synthesis of Novel Benzofuran Based 1,2,3-Triazoles, Their Antimicrobial and Cytotoxic Activities, and Molecular Docking Studies.," *Russ J Gen Chem 92, 1348–1359.*.

[79] Y.-S. Xie, D. Kumar, V.D.V. Bodduri, P.S. Tarani, B.-X. Zhao, J. Y. Miao, K. Jang, D.-S. Shin. (2014), "Microwave-assisted parallel synthesis of benzofuran-2-carboxamide derivatives bearing anti-inflammatory, analgesic and antipyretic agents.," *ChemInform, 45(41),pp. 2796-2800.*.

[80] G.S. Hassan, S.M. Abou-Seri, G. Kamel, M.M. Ali (2014)., "Celecoxib analogs bearing benzofuran moiety as cyclooxygenase-2 inhibitors: design, synthesis and evaluation as potential anti-inflammatory agents," *Eur. J. Med. Chem., 76; pp. 482-493.*

[81] Kenchappa R. & Bodke, Y. D. (2020)., "Synthesis, Analgesic and Anti-inflammatory activity of Benzofuran pyrazole Heterocycles.," *Chemical Data Collections, 100453.*.

[82] Tang, H.-J., Zhang, X.-W., Yang, L., Li, W., Li, J.-H., Wang, J.-X., & Chen, J. (2016)., "Synthesis and evaluation of xanthine oxidase inhibitory and antioxidant activities of 2-arylbenzo[b]furan derivatives based on salvianolic acid.," *C. European Journal of Medicinal Chemistry, 124, 637–648.*.

[83] Baeyer A (1866)., "Ueber die Reduction aromatischer Verbindungen mittelst Zinkstaub [On the reduction of aromatic compounds by means of zinc dust].," *Annalen der Chemie und Pharmacie, 140(3): 295–296..*

[84] Hopkins F.G., Sydney W.C., (1901)., " On the proteid reaction of Adamkiewicz, with contributions to the chemistry of glyoxylic acid.," *Royal Society 68: 442-450.*

[85] A. Baeyer and A. Emmerling, (1869) Chem. Ber., 2, 679..

[86] Sundberg, R. J. (2000), Indole., Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology..

[87] Bansal R.K. (2005), "Bicyclic Ring System Derived from Pyrolle, Furan and Thophene.," *In Heterocyclic Chemistry 4:299-331..*

[88] Remers, W. A. (2008)., "Properties and Reactions of Indoles, Isoindoles, and Their Hydrogenated Derivatives.," *Chemistry of Heterocyclic Compounds, 1–226..*

[89] Zhang, LS., Davies, SS., (2016)., "Microbial metabolism of dietary components to bioactive metabolites: opportunities for new therapeutic interventions," *Genome Med. 8(1): 46..*

[90] V. Sharma, P. Kumar, D. Pathak, (2010), "Biological importance of the indole nucleus in recent years: A comprehensive review.," *J. Heterocyclic Chem. 47, 491–502..*

[91] Barluenga J, Valdes C (2011), "Five-Membered Heterocycles: İndole And Related Systems.," *Mod. Heterocycl. Chem. 377-531.*

[92] Dewick P.M., (2006), Essentials Of Organic Chemistry: For Students Of Pharmacy, Medicinal Chemistry And Biological Chemistry., John Wiley & Sons, Ltd., West Sussex, England.

[93] Cai, S., Sun, S., Peng, J., Kong, X., Zhou, H., Zhu, T., ... & Li, D. (2015)., "Okaramines S–U, three new indole diketopiperazine alkaloids from Aspergillus taichungensis ZHN-7-07.," *Tetrahedron, 71(22), 3715-3719.*

[94] Raja, V. J., Lim, K. H., Leong, C. O., Kam, T. S., & Bradshaw, T. D. (2014), "Novel antitumour indole alkaloid, Jerantinine A, evokes potent G2/M cell cycle arrest targeting microtubules.," *Investigational new drugs, 32, 838-850..*

[95] Abdelfatah, S. A., & Efferth, T. (2015), "Cytotoxicity of the indole alkaloid reserpine from Rauwolfia serpentina against drug-resistant tumor cells.," *Phytomedicine, 22(2), 308-318.*

[96] Shao, S., Zhang, H., Yuan, C. M., Zhang, Y., Cao, M. M., Zhang, H. Y., ... & Hao, X. J. (2015). , "Cytotoxic indole alkaloids from the fruits of Melodinus cochinchinensis.," *Phytochemistry, 116, 367-373..*

[97] Greig, S. L. (2016)., "Osimertinib: first global approval.," *Drugs, 76, 263-273.*

[98] Atadja, P. (2009), "Development of the pan-DAC inhibitor panobinostat (LBH589): successes and challenges.," *Cancer letters, 280(2), 233-241.*

[99] McKeage, K. (2015)., "Alectinib: a review of its use in advanced ALK-rearranged non-small cell lung cancer.," *Drugs, 75, 75-82..*

[100] Bulling, S., Schicker, K., Zhang, Y. W., Steinkellner, T., Stockner, T., Gruber, C. W., ... & Sandtner, W. (2012), "The mechanistic basis for noncompetitive ibogaine inhibition of serotonin and dopamine transporters.," *Journal of Biological Chemistry,287(22): 18524–18534..*

[101] Baird-Lambert, J., Davis, P. A., & Taylor, K. M. (1982)., "Methylaplysinopsin: a natural product of marine origin with effects on serotonergic neurotransmission.," *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology, 9(2), 203-212.*

[102] Hu, J. F., Schetz, J. A., Kelly, M., Peng, J. N., Ang, K. K., Flotow, H., ... & Hamann, M. T. (2002), "New antiinfective and human 5-HT2 receptor binding natural and semisynthetic compounds from the Jamaican sponge Smenospongia a urea.," *J Nat Prod., 65(4):476-80. doi: 10.1021/np010471e. PMID: 11975483..*

[103] Medvedev, A. E., Shvedov, V. I., Chulkova, T. M., Fedotova, O. A., Saederup, E., & Squires, R. F. (1996), Effects of the antidepressant pirlindole and its dehydro-derivative on the activity of monoamine oxidase-A and on GABA A receptors., Neurochem Res.;21(12):1521-6. doi: 10.1007/BF02533100. .

[104] Andreeva, N. I., Golovina, S. M., Faermark, M. F., GIa, S., & Mashkovskiĭ, M. D. (1991)., "The comparative influence of pyrazidol, inkazan and other antidepressant monoamine oxidase inhibitors on the pressor effect of tyramine.," *Farmakol Toksikol.;54(2):38-40. Russian. PMID: 1884793..*

[105] Subcutaneous Sumatriptan International Study Group*. (1991), "Treatment of migraine attacks with sumatriptan.," *New England Journal of Medicine, 325(5), 316-321..*

[106] isser, W. H., Terwindt, G. M., Reines, S. A., Jiang, K., Lines, C. R., & Ferrari, M. D. (1996), "Rizatriptan vs sumatriptan in the acute treatment of migraine: a placebo-controlled, dose-ranging study.," *Archives of neurology, 53(11), 1132-1137.*

[107] Havanka, H., Dahlöf, C., Pop, P. H., Diener, H. C., Winter, P., Whitehouse, H., ... & Naratriptan S2WB2004 Study Group. (2000)., "Efficacy of naratriptan tablets in the acute treatment of migraine: a dose-ranging study.," *Clinical therapeutics, 22(8), 970-980.*

[108] Brandes, J. L., Kudrow, D., Cady, R., Tiseo, P. J., Sun, W., & Sikes, C. R. (2005)., "Eletriptan in the early treatment of acute migraine: influence of pain intensity and time of dosing.," *Cephalalgia, 25(9), 735-742.*

[109] Dahlöf, C., Tfelt–Hansen, P., Massiou, H., & Fazekas, A. (2001)., "Dose finding, placebo-controlled study of oral almotriptan in the acute treatment of migraine.," *Neurology, 57(10), 1811-1817.*

[110] Silberstein, S. D., Elkind, A. H., Schreiber, C., & Keywood, C. (2004)., "A randomized trial of frovatriptan for the intermittent prevention of menstrual migraine.," *Neurology, 63(2), 261-269.*

[111] Linder, S. L., & Dowson, A. J. (2000)., "Zolmitriptan provides effective migraine relief in adolescents.," *International journal of clinical practice, 54(7), 466-469.*

[112] Brodfuehrer, P. R., Chen, B. C., Sattelberg, T. R., Smith, P. R., Reddy, J. P., Stark, D. R., ... & Wang, S. (1997)., "An efficient Fischer indole synthesis of avitriptan, a potent 5-HT1D receptor agonist.," *The Journal of Organic Chemistry, 62(26), 9192-9202.*

[113] Progress Collaborative Group. (2001)., "Randomised trial of a perindopril-based blood-pressure-lowering regimen among 6105 individuals with previous stroke or transient ischaemic attack.," *The Lancet, 358(9287), 1033-1041.*

[114] Køber, L., Torp-Pedersen, C., Carlsen, J. E., Bagger, H., Eliasen, P., Lyngborg, K., ... & Camm, A. J. (1995). , "A clinical trial of the angiotensin-converting–enzyme inhibitor trandolapril in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infa," *The New England Journal of Medicine (Massachusetts Medical Society)-Vol. 333, Iss: 25, pp 1670-1676.*

[115] London, G. M., Asmar, R. G., O'Rourke, M. F., Safar, M. E., & REASON Project Investigators. (2004). , "Mechanism (s) of selective systolic blood pressure reduction after a low-dose combination of perindopril/indapamide in hypertensive subjects: comparison with atenolol.," *Journal of the American College of Cardiology, 43(1), 92-99.*

[116] Packer, M., Coats, A. J., Fowler, M. B., Katus, H. A., Krum, H., Mohacsi, P., ... & DeMets, D. L. (2001)., "Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure.," *New England Journal of Medicine, 344(22), 1651-1658.*

[117] Atterhög, J. H., Duner, H., & Pernow, B. (1976). , "Experience with pindolol, a betareceptor blocker, in the treatment of hypertension.," *The American Journal of Medicine, 60(6), 872-876.*

[118] Liu, L., Chen, Y. Y., Qin, X. J., Wang, B., Jin, Q., Liu, Y. P., & Luo, X. D. (2015)., "Antibacterial monoterpenoid indole alkaloids from Alstonia scholaris cultivated in temperate zone.," *Fitoterapia, 105, 160-164.*

[119] Coatti, G. C., Marcarini, J. C., Sartori, D., Fidelis, Q. C., Ferreira, D. T., & Mantovani, M. S. (2016)., "Cytotoxicity, genotoxicity and mechanism of action (via gene expression analysis) of the indole alkaloid aspidospermine (antiparasitic)

extracted from Aspidosperma polyneuron in HepG2 cells.," *Cytotechnology, 68, 1161-1170.*

[120] Ashok, P., Ganguly, S., & Murugesan, S. (2014)., "Manzamine alkaloids: isolation, cytotoxicity, antimalarial activity and SAR studies.," *Drug Discovery Today, 19(11), 1781-1791.*

[121] Dolabela, M. F., Póvoa, M. M., Brandão, G. C., Rocha, F. D., Soares, L. F., de Paula, R. C., & de Oliveira, A. B. (2015)., "Aspidosperma species as sources of anti-malarials: uleine is the major anti-malarial indole alkaloid from Aspidosperma parvifolium(Apocynaceae).," *Malaria journal, 14(1), 1-12.*

[122] Desai, N. C., Somani, H., Trivedi, A., Bhatt, K., Nawale, L., Khedkar, V. M., ... & Sarkar, D. (2016)., "Synthesis, biological evaluation and molecular docking study of some novel indole and pyridine based 1, 3, 4-oxadiazole derivatives as potential antitubercular agents.," *Bioorganic & medicinal chemistry letters, 26(7), 1776-1783.*

[123] Choppara, P., Bethu, M. S., Prasad, Y. V., Rao, J. V., Ranjan, T. U., Prasad, G. S., ... & Murthy, Y. L. N. (2019)., "Synthesis, characterization and cytotoxic investigations of novel bis (indole) analogues besides antimicrobial study.," *Arabian Journal of Chemistry, 12(8), 2721-2731.*

[124] Mielczarek, M., Thomas, R. V., Ma, C., Kandemir, H., Yang, X., Bhadbhade, M., ... & Kumar, N. (2015)., "Synthesis and biological activity of novel mono-indole and mono-benzofuran inhibitors of bacterial transcription initiation complex formation.," *Bioorganic & medicinal chemistry, 23(8), 1763-1775.*

[125] Cutignano, A., Bifulco, G., Bruno, I., Casapullo, A., Gomez-Paloma, L., & Riccio, R. (2000)., "Dragmacidin F: a new antiviral bromoindole alkaloid from the Mediterranean sponge Halicortex sp.," *Tetrahedron, 56(23), 3743-3748.*

[126] Bag, P., Ojha, D., Mukherjee, H., Halder, U. C., Mondal, S., Biswas, A., ... & Chattopadhyay, D. (2014)., "A dihydro-pyrido-indole potently inhibits HSV-1 infection by interfering the viral immediate early transcriptional events.," *Antiviral Res.;105:126-34. doi: 10.1016/j.antiviral.2014.02.007.* .

[127] Macedo, N. R. P. V., Ribeiro, M. S., Villaça, R. C., Ferreira, W., Pinto, A. M., Teixeira, V. L., ... & Giongo, V. (2012)., "Caulerpin as a potential antiviral drug against herpes simplex virus type 1.," *Revista Brasileira de Farmacognosia, 22, 861-867.*

[128] Rinehart, K. L., Kobayashi, J., Harbour, G. C., Hughes Jr, R. G., Mizsak, S. A., & Scahill, T. A. (1984)., "Eudistomins C, E, K, and L, potent antiviral compounds containing a novel oxathiazepine ring from the Caribbean tunicate Eudistoma olivaceum.," *Journal of the American Chemical Society, 106(5), 1524-1526.*

[129] C. Lee, J.H. Sohn, J.-H. Jang, J.S. Ahn, H. Oh, J. Baltrusaitis, I.H. Hwang, J.B. Gloer, (2015)., "Cycloexpansamines A and B: spiroindolinone alkaloids from a marine isolate of Penicillium sp. (SF-5292).," *J. Antibiot. 68, 715-718.*

[130] .D. Hart, P. Boardman, (1963)., "Indomethacin: a new non-steroid anti-inflammatory agent.," *Br Med J.;2(5363):965-70. doi: 10.1136/bmj.2.5363.965.* .

[131] H. Jacobi, H. Dell, (1979)., "On the pharmacodynamics of acemetacin (author's transl).," *Arzneimittelforschung. 1980;30(8A):1348-62.* .

[132] Y.-F. Chen, P. Jobanputra, P. Barton, S. Bryan, A. Fry-Smith, G. Harris, R. Taylor, (2008)., "Cyclooxygenase-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs (etodolac, meloxicam, celecoxib, rofecoxib, etoricoxib, valdecoxib and lumiracoxib) for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: a systematic review and economic evaluation.," *Health. Technol. Assess. 12, 1-278.*

[133] S.K. Bhati, A. Kumar, (2008)., "Synthesis of new substituted azetidinoyl and thiazolidinoyl-1, 3, 4-thiadiazino (6, 5-b) indoles as promising antiinflammatory agents," *Eur. J. Med. Chem. 43, 2323-2330.*

[134] N. Singh, S.K. Bhati, A. Kumar, (2008)., "Thiazolyl/oxazolyl formazanyl indoles as potent anti-inflammatory agents.," *Eur. J. Med. Chem. 43, 2597-2609.*

[135] R. Dalpozzo, G. Bartoli, (2005)., "Bartoli indole synthesis.," *Curr. Org. Chem. 9 , 163-178.*

[136] A. Bischler, (1892)., "Ueber die entstehung einiger substituirter indole.," *Berichte Dtsch. Chem. Ges. 25, 2860-2879.*

[137] Drechsel, E. J. (1858) Prakt. Chem. 38, 69.

[138] Borsche, W.; Feise, M. (1907). , Ber. Dtsch. Chem. Ges.40, 378-386..

[139] Janey, J. M. (2007). , Name Reactions for Functional Group Transformations., Wiley, Hoboken, NJ, 564-609.

[140] Sundberg R. J., Russell, H. F., Ligon W. V., Lin L.-S. J. (1972)., Org. Chem. 37, 719-724..

[141] Cadogan, J. I. G.; Cameron-Wood, M. (1962). Proc. Chem. Soc., 361..

[142] E. Fischer, F. Jourdan, (1883). Ueber die hydrazine der brenztraubensaure, Berichte Dtsch. Chem. Ges. 16 2241-2245..

[143] Fukuyama T., Chen X., Peng G. J. (1994) Am. Chem. Soc.,116, 3127-3128..

[144] H. Hemetsberger, D. Knittel. (1972) Synthese und Thermolyse von a-Azidoacrylestern, Monatsh. für Chemie/Chemical Mon.103, 194-204..

[145] Gribble, G.W. (2016). Julia Indole Synthesis, Indole ring synthesis: from natural products to drug discovery.137-138. UK, John Wiley & Sons, Ltd. ISBN 9781118683859.

[146] R.C. Larock, E.K. Yum, (1991). Synthesis of indoles via palladium-catalyzed heteroannulation of internal alkynes, J. Am. Chem. Soc. 113, 6689-6690..

[147] A. Batcho, W. Leimgruber, (1973). US patent 3,732,245, in: Chem. Abstr 8, p. 29624..

[148] W. Madelung, (1912). Über eine neue darstellungsweise für substituierte indole. Berichte Dtsch. Chem. Ges. 45,1128-1134..

[149] Wang, Z., (2009). in Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents, vol. 2; Wiley: Hoboken, NJ, pp. 1838-1840..

[150] Guyot, A., Martinet, J. (1913). Compt. Rend. 166, 1625-1628..

[151] C. Nenitzescu, (1929). Derivatives of 2-methyl-5-hydroxyindole, Bull. Soc. Chim. Rom. 11, 37-43..

[152] Gribble, G.W. (2016). Reissert Indole Synthesis, Indole ring synthesis: from natural products to drug discovery. pp. 332-337. UK, John Wiley & Sons, Ltd. ISBN 9781118683859.

[153] Da Silva, J. F. ML., Garden, S. J., Pinto, A. C. J. (2001). Braz. Chem. Soc.12, 273-324..

[154] Stollé, R., Bergdoll, M., Luther, M., Auerhahn, A., Wacker, W. J. (1930), "Prakt. Chem. 128, 1-43.".

[155] Morris, D. G. (2001)., Stereochemistry (Vol. 1). Chapter1; Simple molecules; hybridization, confirmation and configuration, pp:1-18, Royal Society of chemistry.

[156] (. Crossley J.R., Chirality and Biological Activity of Drugs, Chirality- Basic Considerations pp: 4-6, 7. cilt/ CRC Press, , ISBN 0849391407, 9780849391408 .

[157] Verri Francesca, (2013), *Preparation and characterization of hybrid nanospheres containing lipase for chiral drug biotransformation,* Doktora tezi, Della Calabria Üniversitesi.

[158] Solomons, T.W.G. ve Fryhle, C.B., (2002), Organik Kimya, Literatür Yayınları, İstanbul..

[159] Blaser, H.U., (2013), "Chirality and its implications for the pharmaceutical industry.," *Rend. Fis. Acc. Lincei 24, 213–216 . https://doi.org/10.1007/s12210-012-0220-2.*

[160] Coelho, M. M., Fernandes, C., Remião, F., & Tiritan, M. E. (2021). , "Enantioselectivity in drug pharmacokinetics and toxicity: Pharmacological relevance and analytical methods.," *Molecules, 26(11), 3113.*

[161] Ribeiro, A. R., Castro, P. M., & Tiritan, M. E. (2012), "Environmental fate of chiral pharmaceuticals: determination, degradation and toxicity.," *Environmental Chemistry for a Sustainable World: Volume 2: Remediation of Air and Water Pollution, 3-45..*

[162] List, B., & MacMillan, D. (2021), "The 2021 Nobel Prize in Chemistry: asymmetric catalysis with small organic molecules.," *Current Science, 121(9), 1148.*

[163] M. H. Yashavarddhan, S. Bajaj, S. K. Shukla, A. Vibhuti (2020), "Biotransformation: Basics and Applied Perspectives.," *Environmental Microbiology and Biotechnology pp 337-357.*

[164] Demirci, F., (2000), Biyoaktif monoterpenlerin mikrobiyal biyotransformasyonu., Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.,137s..

[165] Giri A, Dhingra V, Giri C.C, Singh A, Ward P. O, Narasu M. L, (2001), "Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects.," *Biotechnology Advances 19, 175 – 199.*

[166] Dordick JS, Khmelnitsky YL, Sergeeva MV, (1998)., "The evolution of biotransformation technologies.," *Curent opinion in Microbiology, 1: 311-318.*

[167] Copping LG, Martin R, Pickett JA, Bucke C, Bunch AW (eds) (1990), Opportunities in Biotransformations., Elsevier, London..

[168] Bhattia H., Khan S., Khan A., Ranib M., Ahmad V., Choudhary M., (2014)., "Biotransformation of monoterpenoids and their antimicrobial activities.," *Phytomedicine, 21, 1597-1626.*

[169] A. Illanes, A. Cauerhff, L. Wilson and G. R. Castro, (2012)., "Recent trends in biocatalysis engineering.," *Bioresour Technol.; 115:48-57. doi: 10.1016/j.biortech.2011.12.050. .*

[170] Turner, M.K., (1998)., Perspectives in Biotransformations. Inside: Biotechnology., Wiley-VCH, Weinheim, 9..

[171] Pasteur, L., (1858). , Mémoire sur la fermentation., C. R. Acad. Sci., 46, 615-618.

[172] Buchner, E., (1897)., "Alkoholische Garung ohne Hefezellen.," *Ber. Dtsch. Chem. Ges., 30, 1110-1113.*

[173] Neuberg, C., Hirsch, J., (1921)., "Über ein Kohlenstoffketten Knüpfendes Ferment (Carboligase).," *Biochem. Z., 115, 282-310.*.

[174] Kluyver, A.J., de Leeuw, F.J., (1924)., "Acetobacter suboxydans, een merkwaardige azijnbacterie.," *Tijdschr. Geneeskd., 10, 170.*.

[175] Reichstein, T., Grüssner, H., (1934)., "Eine ergiebige Synthese der l-Ascorbinsäure (C Vitamin).," *Helv. Chim. Acta, 17, 311–328.*

[176] Peterson, D.H., Murray, H.C., Epstein, S.H., Reineke, L.M., Weintraub, A., Meister, P.D., Leigh, H.M., (1952)., "Microbiological Oxygenation of Steroids, I. Introduction of Oxygen at Carbon-11 of Progesterone.," *J. Am. Chem. Soc., 74, 5933–5936.*

[177] Sebek, O.K., Perlman D., (1979)., "Microbial Transformation of Steroids and Sterols.," *Microbial Technology, Academic press, Second edition, New York, 1, 484- 488.*

[178] Kanbayashi, N.; Onitsuka, K. (2010)., "Enantioselective synthesis of allylic esters via asymmetric allylic substitution with metal carboxylates using planar-chiral cyclopentadienyl ruthenium catalysts.," *J. Am. Chem. Soc., 132(4), 1206- 1207.*

[179] Zhan, G., Du, W., Chen, Y-C., (2017), "Switchable divergent asymmetric synthesis via organocatalysis.," *Chem. Soc. Rev., 46(6), 1675-1692.*

[180] Lin, G-Q., Sun, X-W., (2011) , Chiral drugs through asymmetric synthesis. Chiral Drugs; pp. 29-76., John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken.

[181] P. Fernandes, A. Cruz, B. Angelova, H. Pinheiro and J. Cabral, (2003)., "Microbial conversion of steroid compounds: recent developments.," *Enzyme and Microbial Technology, 32, 688-705.*

[182] Longo, M. A., & Sanromán, M. A. (2006). , "Production of food aroma compounds: microbial and enzymatic methodologies.," *Food Technology and Biotechnology, 44(3), 335-353.*

[183] Telefoncu, A., (1995), Biyoteknoloji, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, No: 152, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir. 356s..

[184] Armstrong, D. W. and Yamazaki, H., (1986)., "Natural Flavours Production.," *Trends Biotechnol., 4, 264-268.*

[185] Singh R., (2017)., "Microbial Biotransformation: A Process for Chemical Alterations.," *J Bacteriol Mycol Open Access, 4(2): 00085.*

[186] Foody P (1984), *Method for increasing the accessibility of cellulose in lignocellulosic materials.,* Particularly Hardwoods Agricultural Residues And The Like. USA..

[187] Loughlin, W. A. (2000)., "Biotransformations in organic synthesis.," *Bioresource Technology, 74(1), 49–62.*

[188] Carvalho C. C. (2011)., "Enzymatic and whole cell catalysis: finding new strategies for old processes.," *Biotechnology advances, 29(1), 75–83.*

[189] Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. İ., (2005)., Biyokimya., Dördüncü baskı, Aktif Yayınevi, Erzurum, 185-188.

[190] S. Sanchez and A. L. Demain, (2011)., "Enzymes and Bioconversions of Industrial, Pharmaceutical, and Biotechnological Significance.," *Organic Process Research & Development, 15, 224-230.*

[191] Lilly M.D., (1994), "Advances in biotransformation processes.," *Chem. Eng. Sci., 49(2), 9-151.*

[192] Federsei, H.-J. (1994)., "The impact of chirality on drug manufacturing on the industrial scale.," *Endeavour, 18(4), 163–172.*

[193] Gal, J. (2008), "The discovery of biological enantioselectivity: Louis Pasteur and the fermentation of tartaric acid, 1857—A review and analysis 150 yr later.," *Chirality, 20: 5-19.*

[194] Demain, A.L., (2000), "Small Bugs Big Business: The Economic Power of the Microbe.," *Biotecnol. Adv., 18, 499-514.*

[195] Kebamo S, Tesema S, Geleta B (2015), "The role of biotransformation in drug discovery and development.," *J Drug Metab Toxicol 6: 188-196.*

[196] Karigar C.S., Rao S.S., (2011), "Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review.," *Enzyme research, 2011, 805187. https://doi.org/10.4061/2011/805187.*

[197] Couto S.R., Sanromán M.Á., (2006)., "Application of solid-state fermentation to food industry—a review.," *J Food Eng 76:291–302.*

[198] Krishna C., (2005), "Solid-state fermentation systems—an overview.," *Crit Rev Biotechnol 25:1–30.*

[199] Parshikov, I. A., Woodling, K. A., & Sutherland, J. B. (2015), "Biotransformations of organic compounds mediated by cultures of Aspergillus niger.," *Applied Microbiology and Biotechnology, 99(17), 6971–6986.*

[200] Aranda E., (2016), "Promising approaches towards biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons with Ascomycota fungi.," *Current Opinion in Biotechnology, Vol 38, pp: 1-8.*

[201] Çorbacı, C., (2020)., "Biotransformation of terpene and terpenoid derivatives by Aspergillus niger NRRL 326.," *Biologia 75, 1473–1481.*

[202] Miyazawa, M., Takahashi, K. and Araki, H. (2006), "Biotransformation of isoflavones by Aspergillus niger as biocatalyst.," *J. Chem. Technol. Biotechnol., 81: 674-678.*

[203] Hussain, Z.; Dastagir, N.; Hussain, S.; Jabeen, A.; Zafar, S.; Malik, R.; Bano, S.; Wajid, A.; Choudhary, M.I., (2016)., "Aspergillus niger-mediated biotransformation of methenolone enanthate, and immunomodulatory activity of its transformed products.," *Steroids, 112, 68-73.*

[204] Aziz, A.; Bano, S.; Atia-tul-Wahab; Choudhary, M.I., (2020), "Microbial transformation of oral contraceptive ethisterone by Aspergillus niger and Cunninghamella blakesleeana.," *Steroids, 154, 108467.*

[205] Yildirim, K.; Ayhan, C., (2012), "Biotransformation of 19-nortestosterone by Aspergillus wentii MRC 200316.," *J. Chem. Res.,36, 541-542.*

[206] Savinova, O.S.; Solyev, P.N.; Vasina, D.V.; Tyazhelova, T.V.; Fedorova, T.V.; Savinova, T.S.,(2019), "Biotransformation of progesterone by Aspergillus nidulans VKPM F-1069 (wild type).," *Steroids, 149, 108421.*

[207] Heidary, M.; Ghasemi, S.; Habibi, Z.; Ansari, F., (2020)., "Biotransformation of androst-4-ene-3,17-dione and nandrolone decanoate by genera of Aspergillus and Fusarium.," *Biotechnol. Lett.,42(9), 1767-1775.*

[208] Severiano, M. E., Simão, M. R., Ramos, H. P., Parreira, R. L., Arakawa, N. S., Said, S., ... & Ambrósio, S. R. (2013), "Biotransformation of ent-pimaradienoic acid by cell cultures of Aspergillus niger.," *Bioorganic & medicinal chemistry, 21(18), 5870-5875.*

[209] Chen, Y.; Zhang, L.; Qin, B.; Zhang, X.; Jia, X.; Wang, X.; Jin, D.; You, S. (2014), "An insight into the curdione biotransformation pathway by Aspergillus niger.," *Nat. Prod. Res., 28(7), 454-460.*

[210] Yadav, S.; Yadav, R.S.S.; Yadava, S.; Yadav, K.D.S., (2011), "Stereoselective hydroxylation of ethylbenzene to (R)-1-phenylethanol using mycelia of Aspergillus niger as catalyst.," *Catal. Commun., 12, 781-784.*

[211] Mascotti, M.L.; Palazzolo, M.A.; Bisogno, F.R.; Kurina-Sanz, M., (2016)., "Biotransformation of dehydro-epi-androsterone by Aspergillus parasiticus: Metabolic evidences of BVMO activity.," *Steroids, 109, 44-49.*

[212] Lomascolo A, Lesage-Meessen L, Haon M, Navarro D, Antona C, Faulds C, Marcel A (2001), "Evaluation of the potential of Aspergillus niger species for the bioconversion of L-phenylalanine into 2-phenylethanol.," *World J Microbiol Biotechnol 17:99–102.*

[213] Kamath AV, Vaidyanathan CS (1990), "New pathway for the biodegradation of indole in Aspergillus niger.," *Appl Environ Microbiol 56:275–280.*

[214] Boaventura M.A.D., Lopes R.F.A.P., Takahashi J.A., (2004), "Microorganisms as tools in modern chemistry: the biotransformation of 3-indolylacetonitrile and tryptamine by fungi.," *Braz J Microbiol 35:345–347.*

[215] Nascimento, J. S. do, Núñez, W. E. R., Santos, V. H. P. dos, Aleu, J., Cunha, S., & Silva, E. de O. (2019), "Mapping the Biotransformation of Coumarins through Filamentous Fungi.," *Molecules, 24(19), 3531.*

[216] Refaie FM, Esmat AY, Gawad SMA, Ibrahim AM, Mohamed MA (2005), "The antihyperlipidemic activities of 4(3H)-quinazolinone and two halogenated derivatives in rats.," *Lipids Health Dis 4(22):1–11.*

[217] Lobastova TG, Sukhodolskaya GV, Nikolayeva VM, Baskunov BP, Turchin KF, Donova MV (2004), "Hydroxylation of carbazoles by Aspergillus flavus VKM F-1024.," *FEMS Microbiol Lett 235:51–56.*

[218] Torres-Mancera MT, Baqueiro-Peña I, Figueroa-Montero A,.... (2013), "Biotransformation and improved enzymatic extraction of chlorogenic acid from coffee pulp by filamentous fungi.," *Biotechnol Prog 29:337–345.*

[219] Spizzo, P., Basso, A., Ebert, C., Gardossi, L., Ferrario, V., Romano, D., & Molinari, F. (2007), "Resolution of (R,S)-flurbiprofen catalysed by dry mycelia in organic solvent.," *Tetrahedron, 63(45), 11005–11010. doi:10.1016/j.tet.2007.08.051.*

[220] Hernandez, C. E.; Mencía-Guevara, A.; Rojas-Rojas, K. (2021), "Young coffee leaves biotransformed by aspergillus oryzae in enriched source of caffeic acid.," *Coffee Science - ISSN 1984-3909, [S. l.], v. 16, p. e161863, DOI: 10.25186/cs.v16i.1863..*

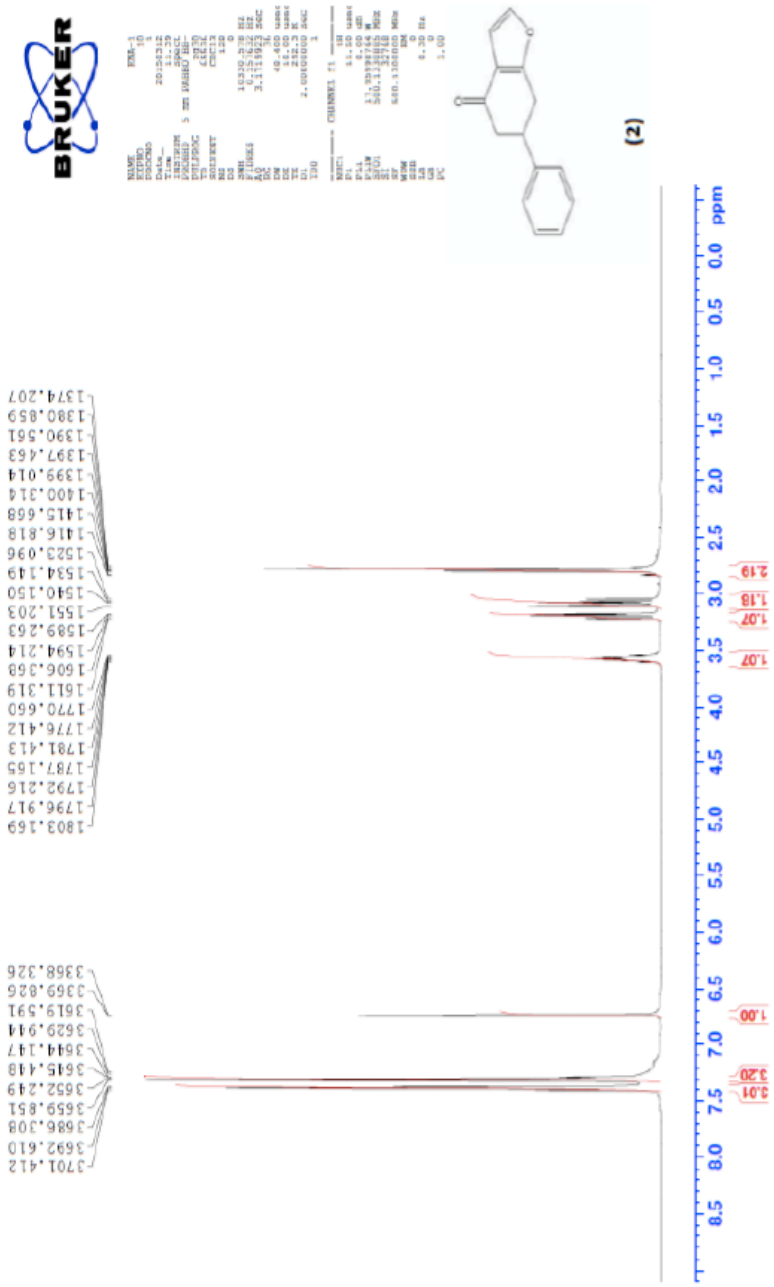
[221] Wu, S.-C., Chang, C.-W., Lin, C.-W., & Hsu, Y.-C. (2015), "Production of 8-hydroxydaidzein Polyphenol Using Biotransformation by Aspergillus oryzae.," *Food Science and Technology Research, 21(4), 557–562. doi:10.3136/fstr.21.557 .*

[222] Matsumoto, M., & Watanabe, N. (1984), "A facile synthesis of 4-oxo-4, 5, 6, 7-tetrahydroindoles.," *Heterocycles (Sendai), 22(10), 2313-2316.*

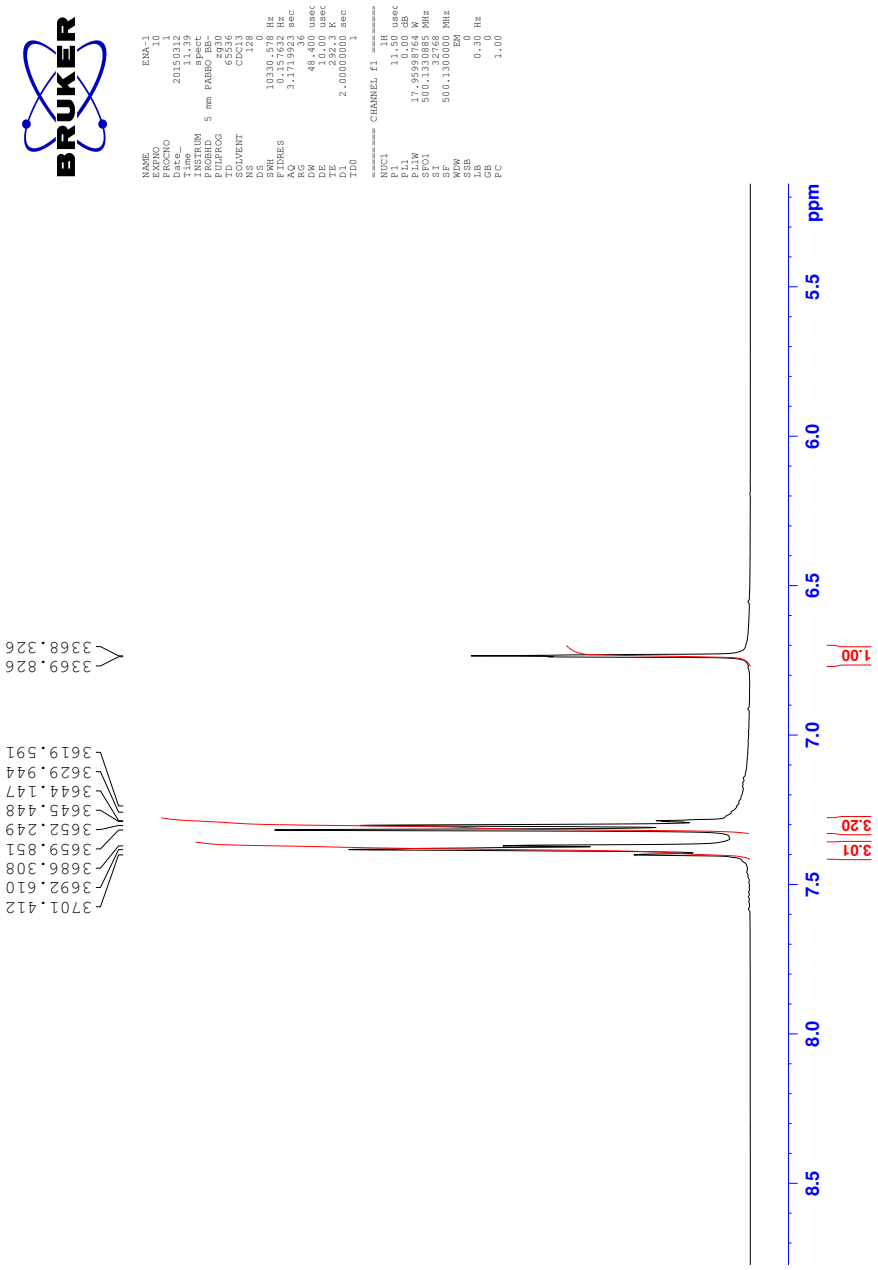
[223] Çalışkan Z., Ay E. N. (2018), "Synthesis of Dihydrobenzofuranone Derivatives with Biotechnological Methods.," *Annales De Chimie-Science Des Materiaux, sa.5, ss.1221-1232.*

A

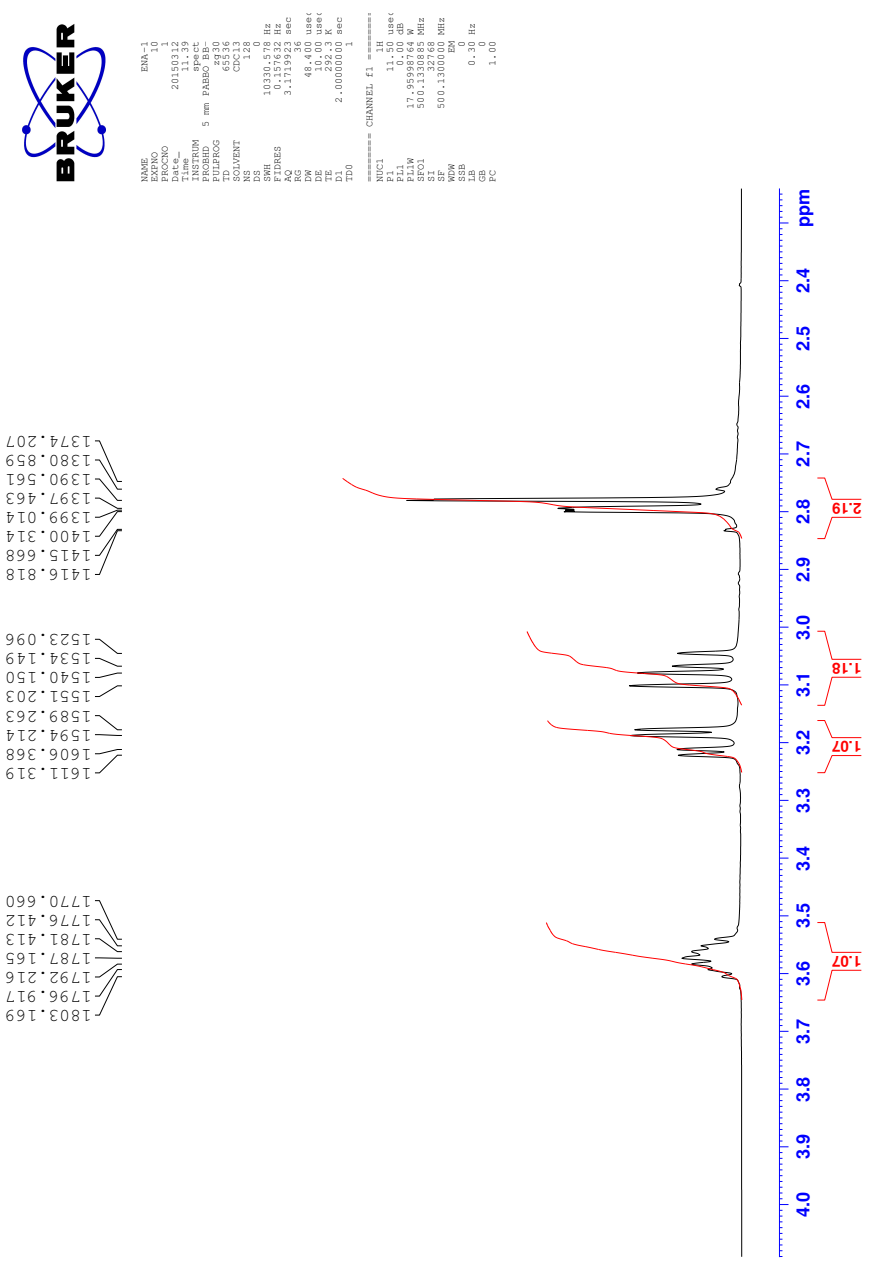
6,7-DİHİDRO-6-FENİLBENZOFURAN-4(5H)-ON (2) BİLEŞİĞİNİN SPEKTRAL ANALİZ SONUÇLARI (^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, IR)



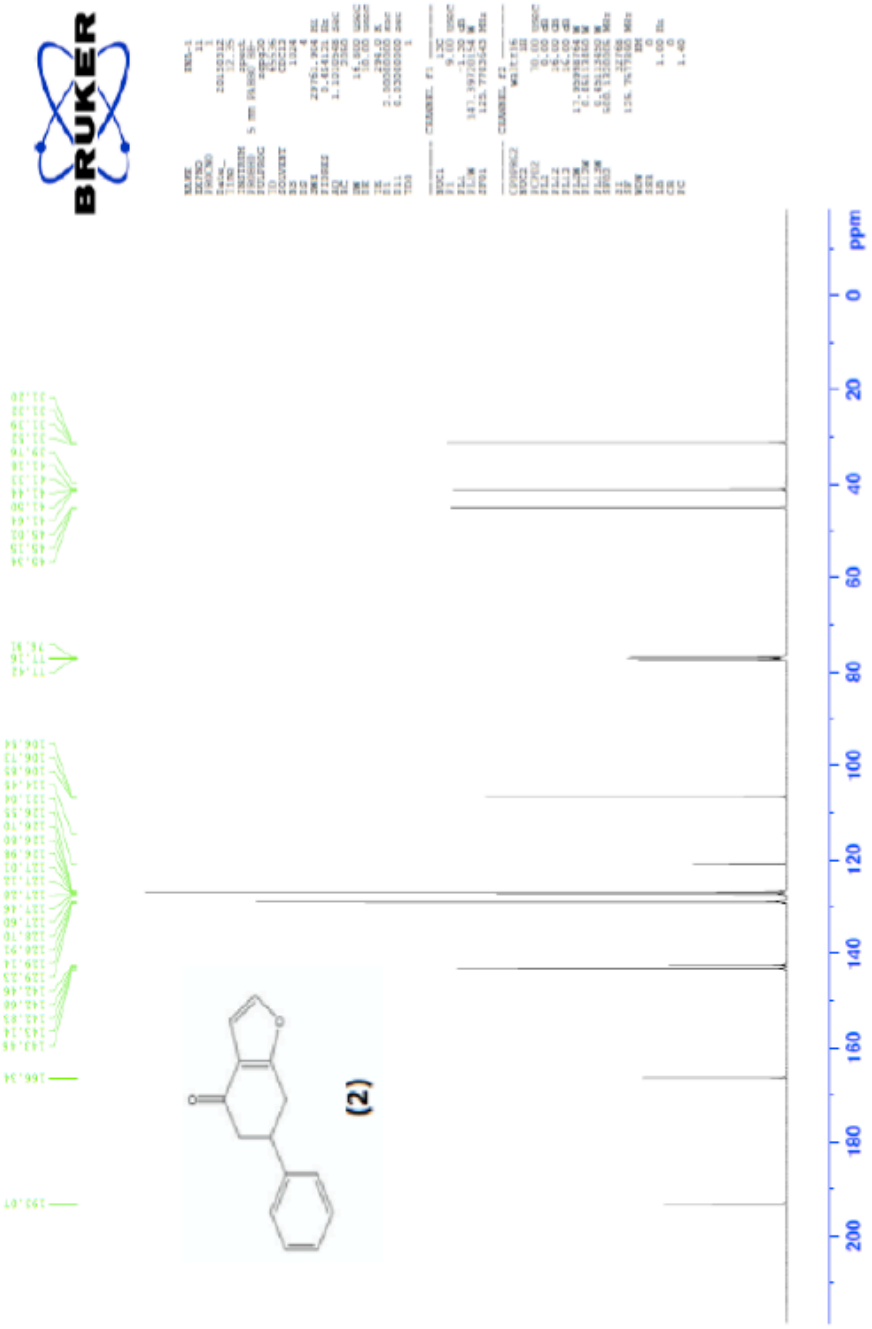
Şekil A.1 6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on bileşiğinin (2) ^{1}H-NMR sonucu



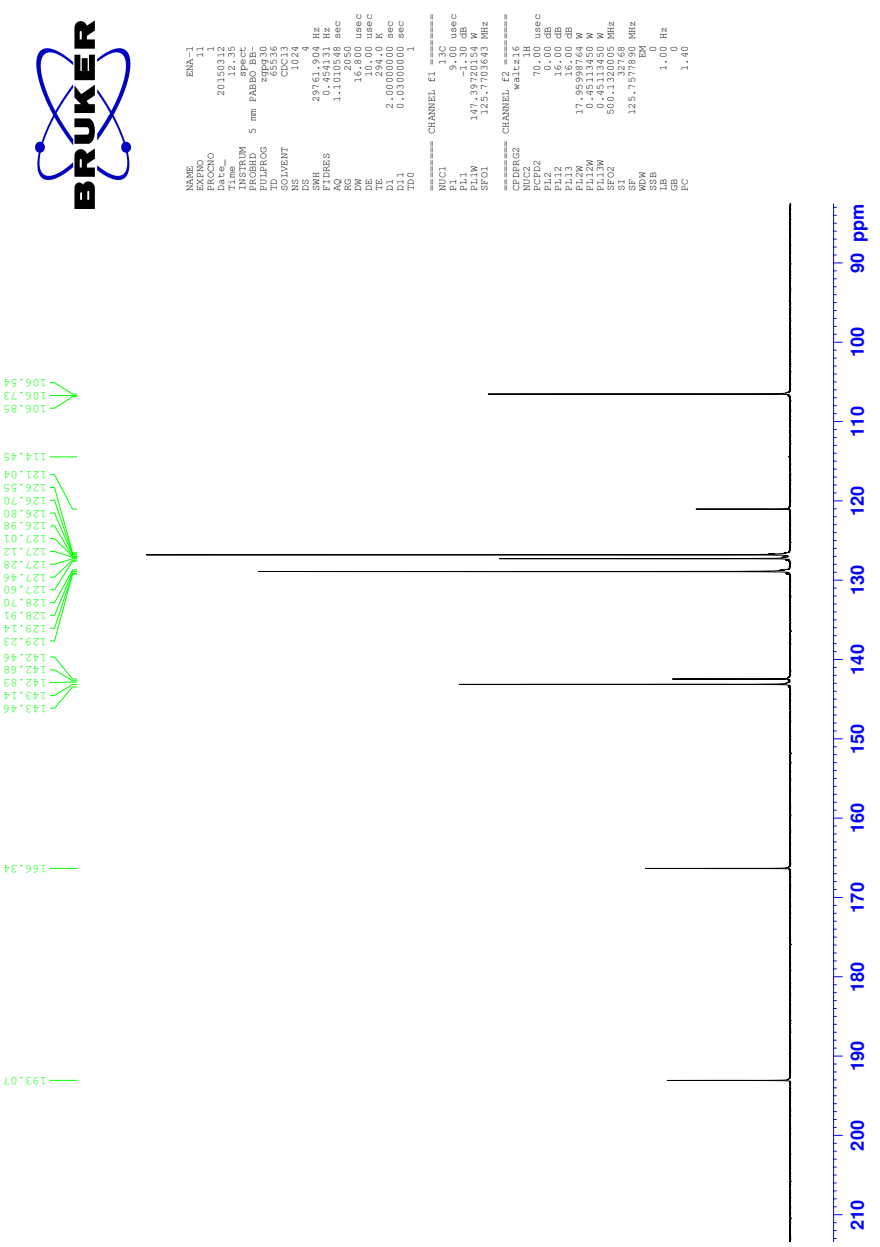
Şekil A.1-1 6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on bileşiğinin (2) ^{1}H-NMR sonucu (yakınlaştırılmış görüntü)



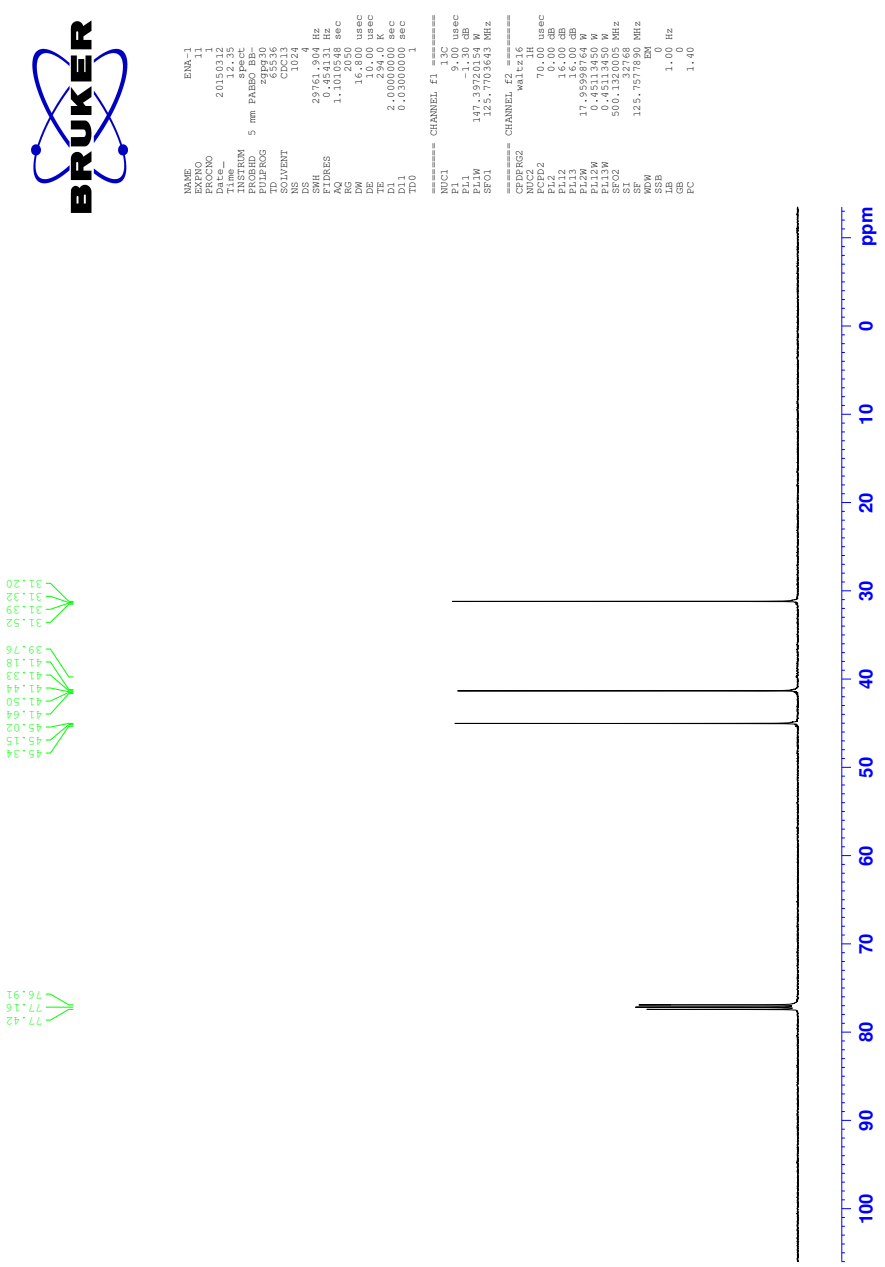
Şekil A.1-2 6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on bileşiğinin (2) ^{1}H-NMR sonucu (yakınlaştırılmış görüntü)



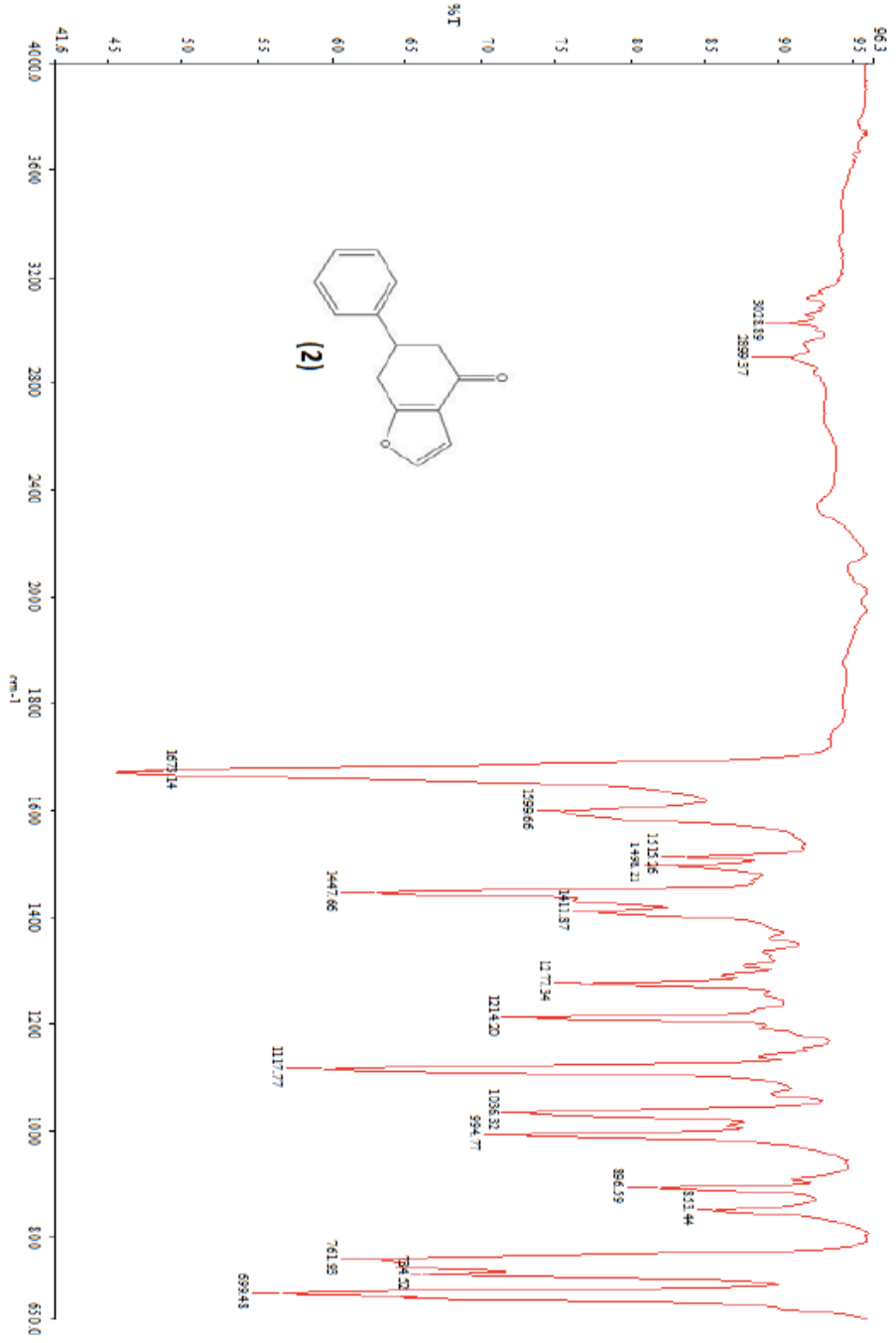
Şekil A.2 6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on bileşiğinin (2) ^{13}C-NMR sonucu



Şekil A.2-1 6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on bileşiğinin (2) ^{13}C-NMR sonucu (yakınlaştırılmış görüntü)



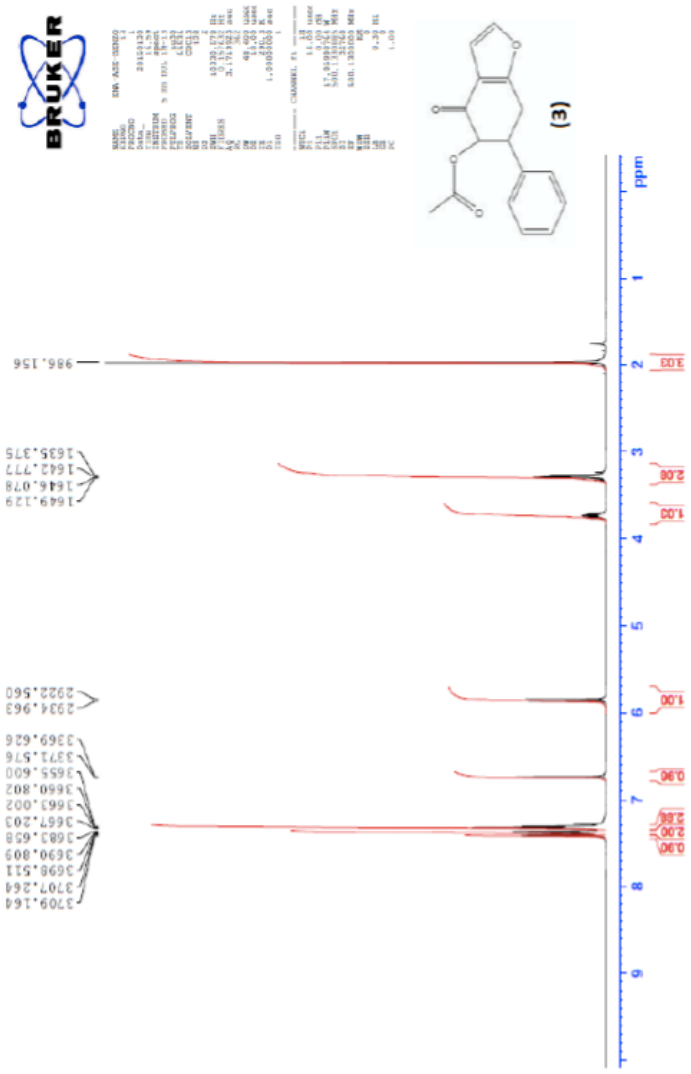
Şekil A.2-2 6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on bileşiğinin (2) ^{13}C-NMR sonucu (yakınlaştırılmış görüntü)



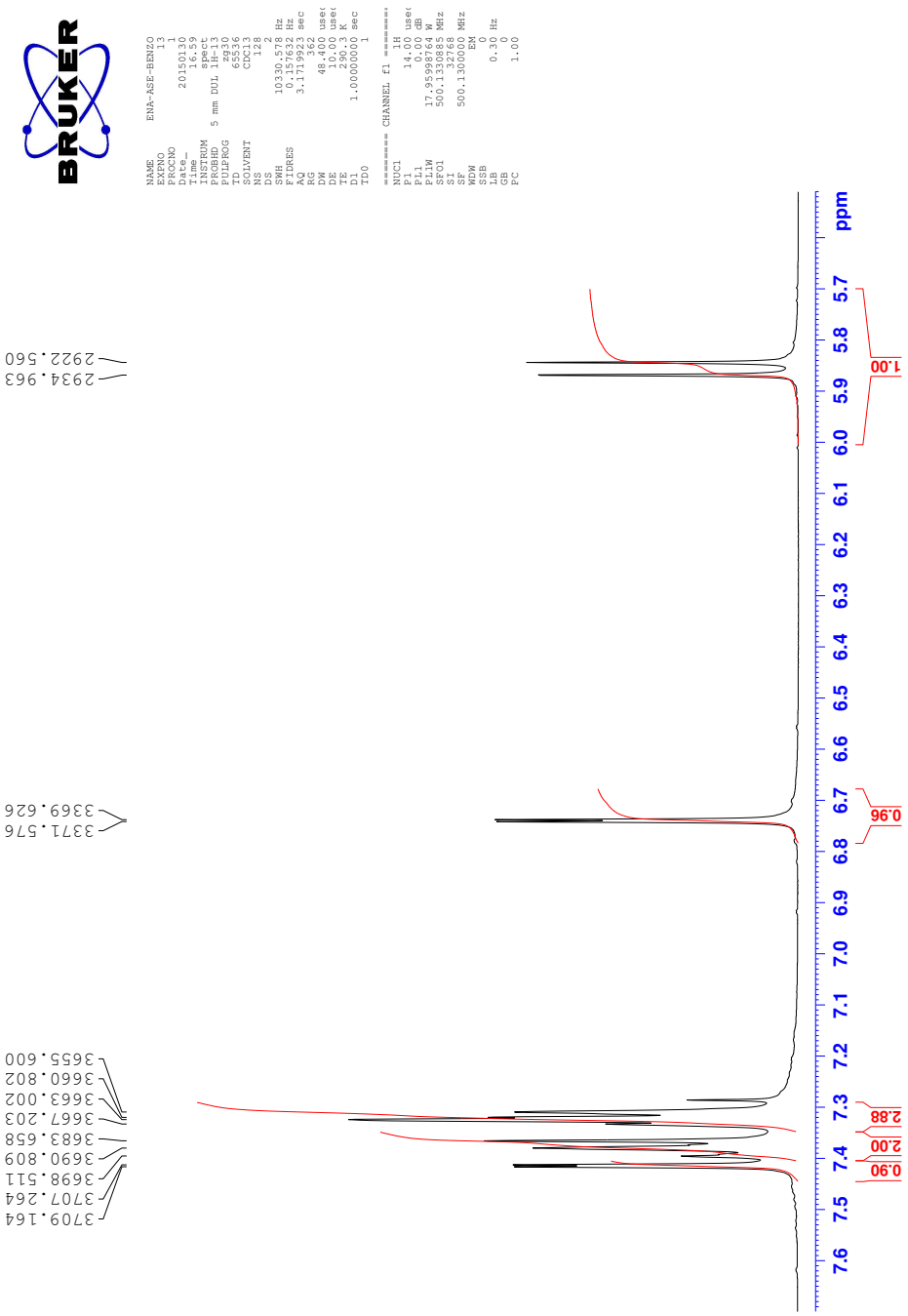
Şekil A.3 6,7-dihidro-6-fenilbenzofuran-4(5H)-on bileşiğinin (2) IR sonucu

B

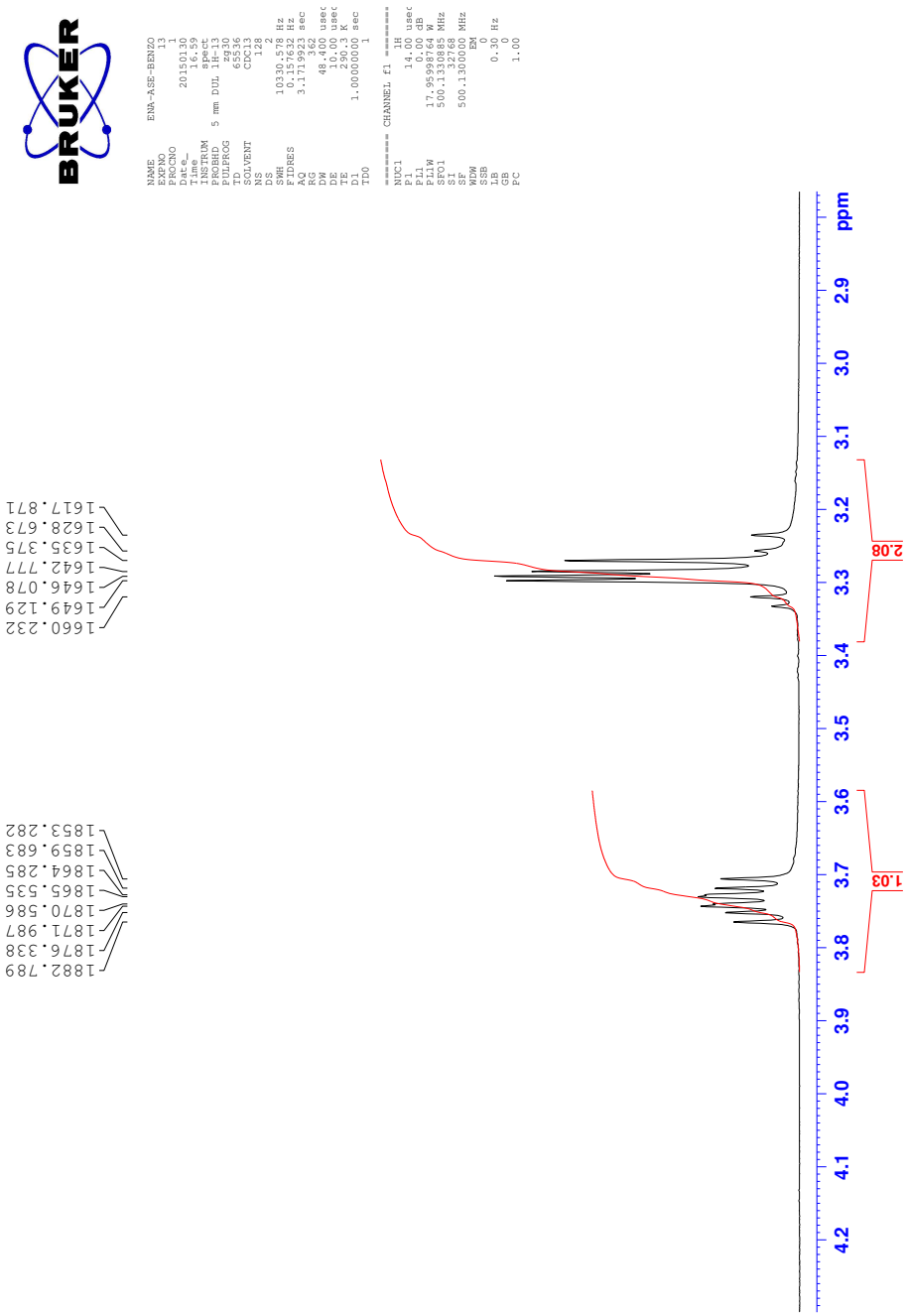
4,5,6,7-TETRAHIDRO-6-FENIL-4-OKSOBENZOFURAN-5-IL ASETAT (3) BİLEŞİĞİNİN SPEKTRAL ANALİZ SONUÇLARI (^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, IR)



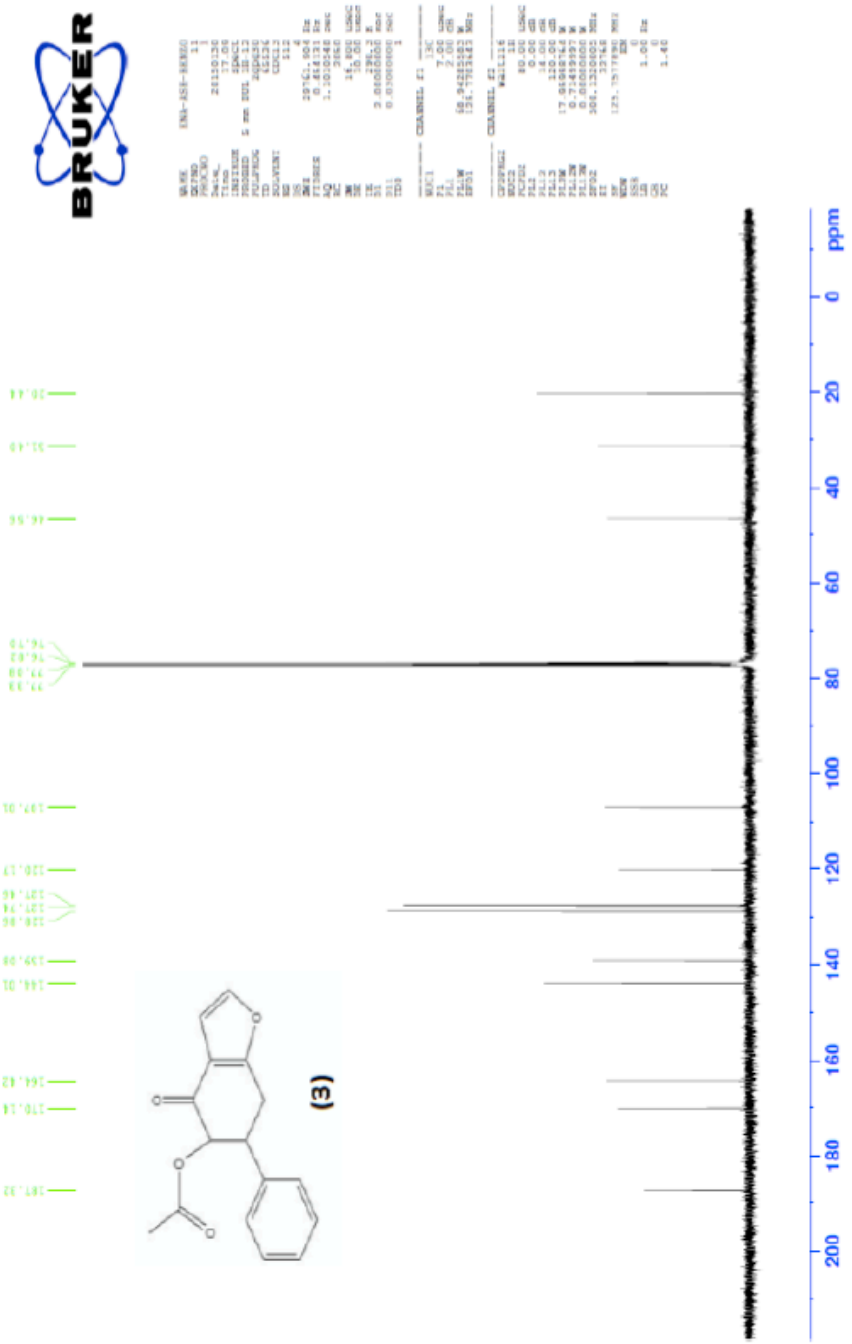
Şekil B.1 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat **(3)** bileşiğinin ^{1}H-NMR sonucu



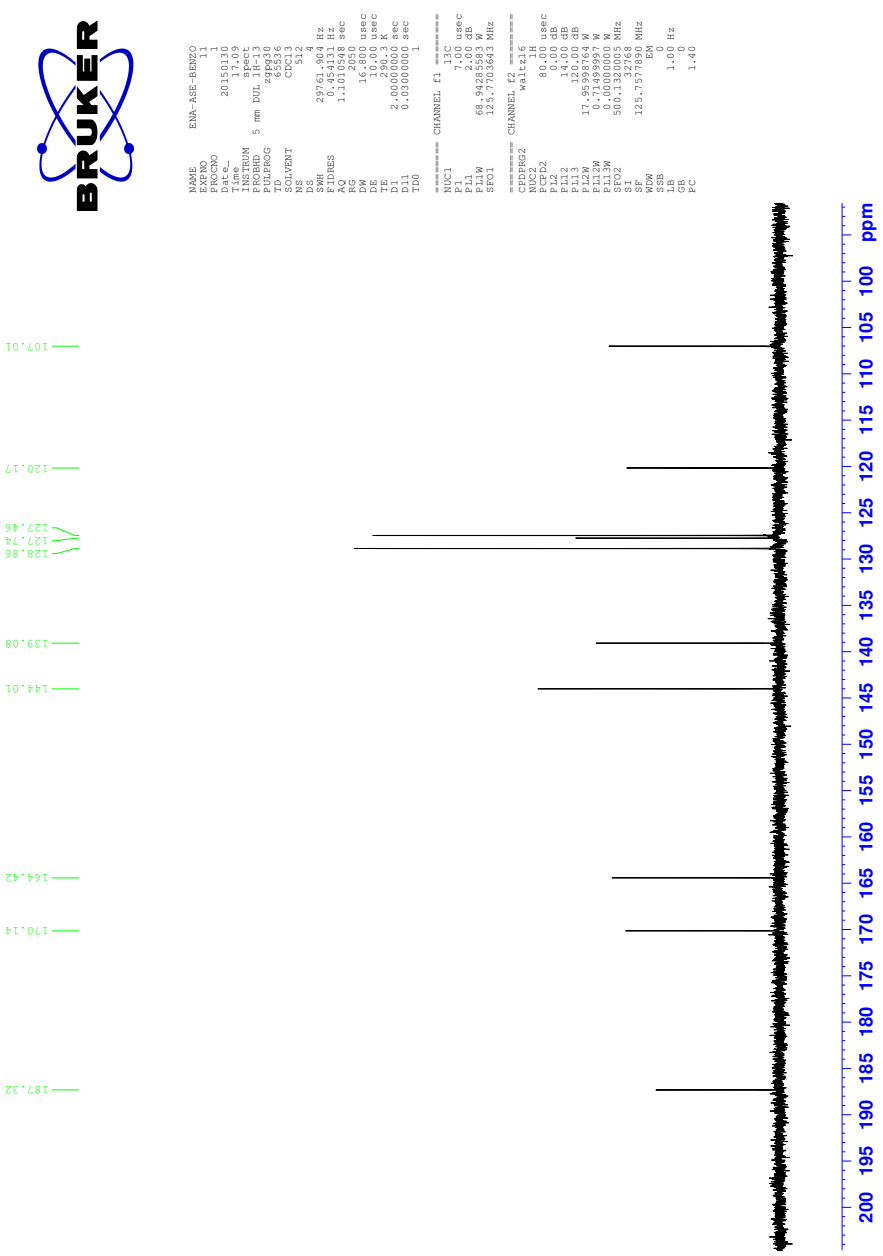
Şekil B.1-1 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat **(3)** bileşiğinin ^{1}H-NMR sonucu (yakınlaştırılmış görüntü)



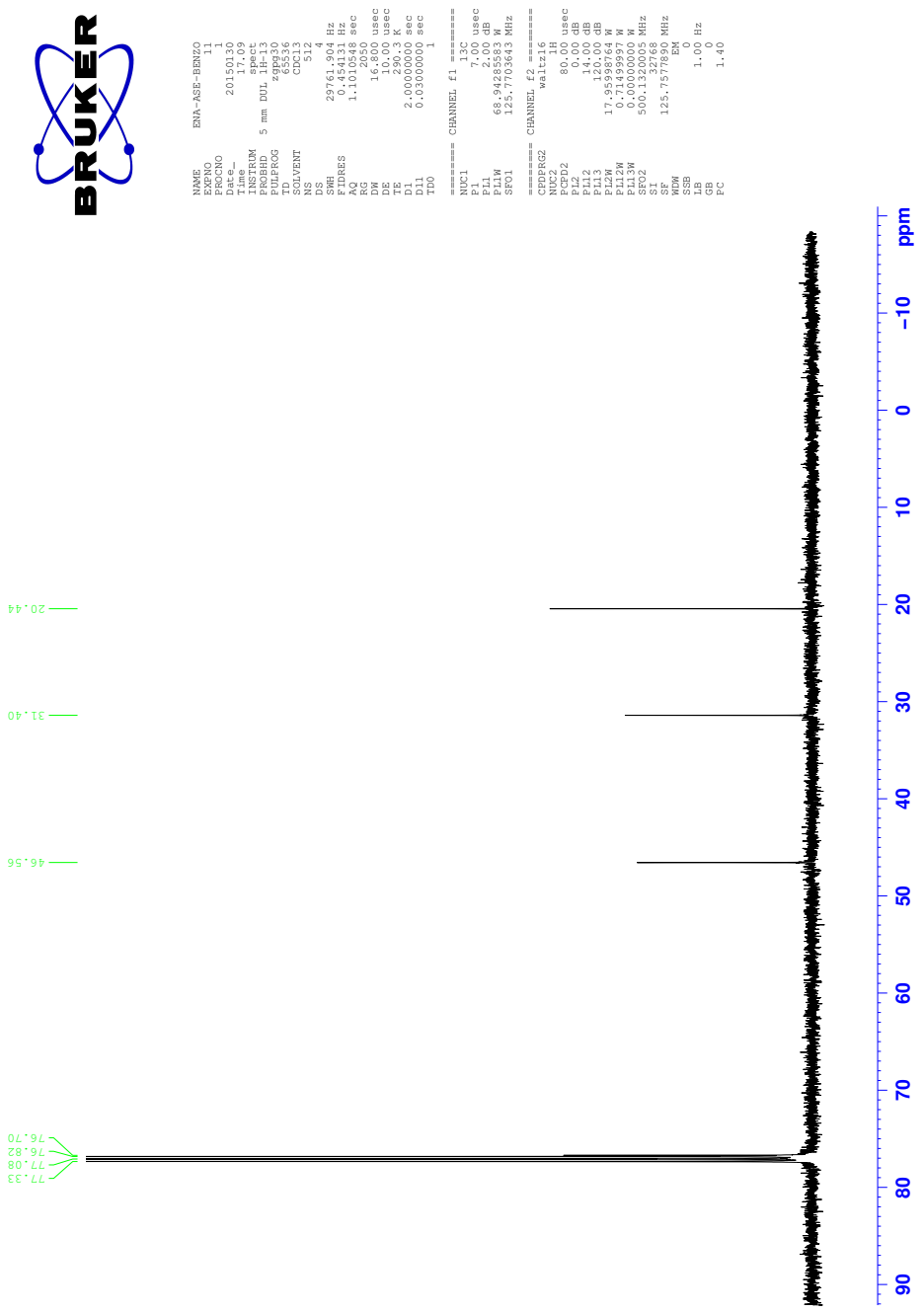
Şekil B.1-2 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat **(3)** bileşiğinin ^{1}H-NMR sonucu (yakınlaştırılmış görüntü)



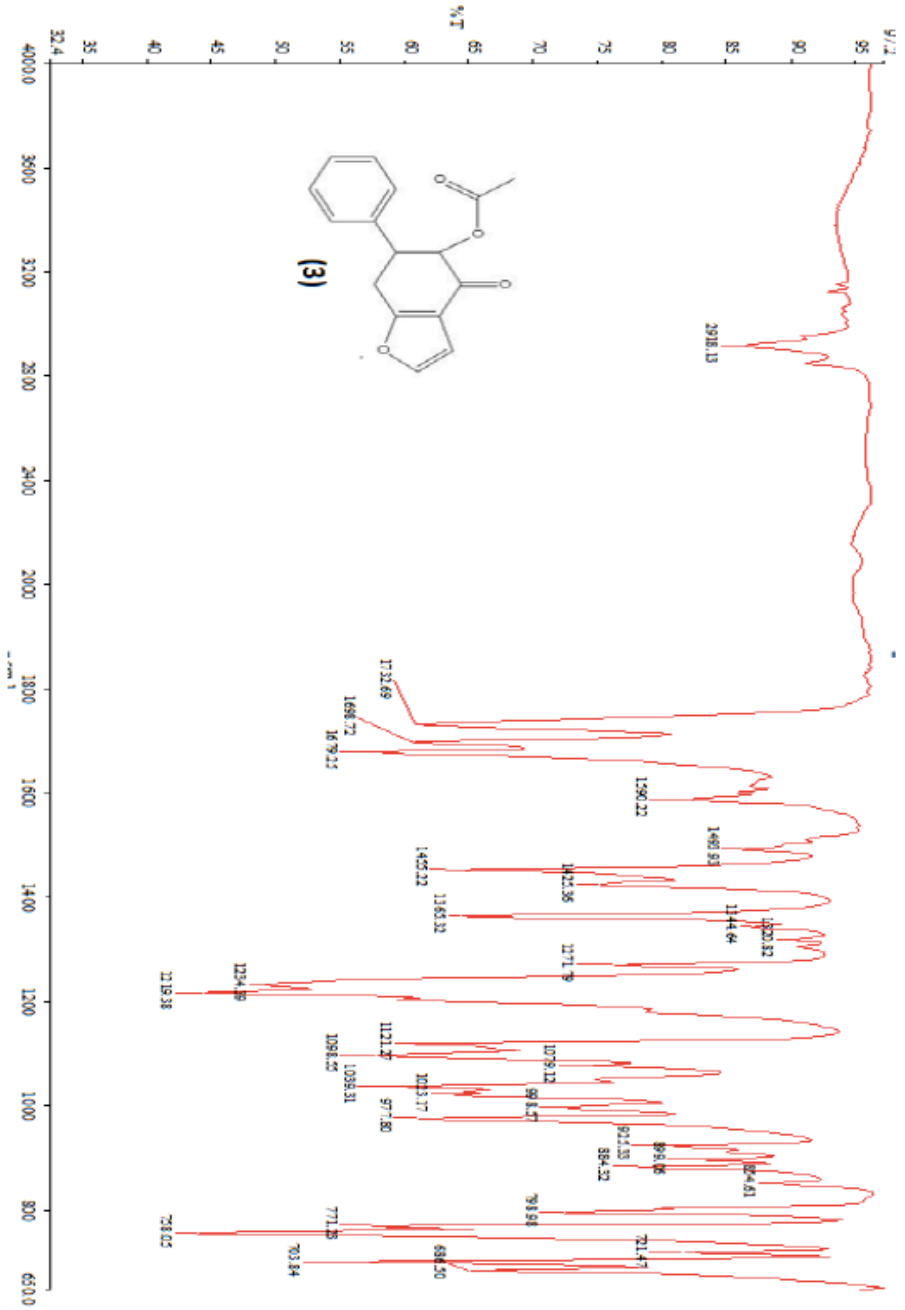
Şekil B.2 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (3) bileşiğinin ^{13}C-NMR sonucu



Şekil B.2-1 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (3) bileşiğinin ^{13}C-NMR sonucu (yakınlaştırılmış görüntü)



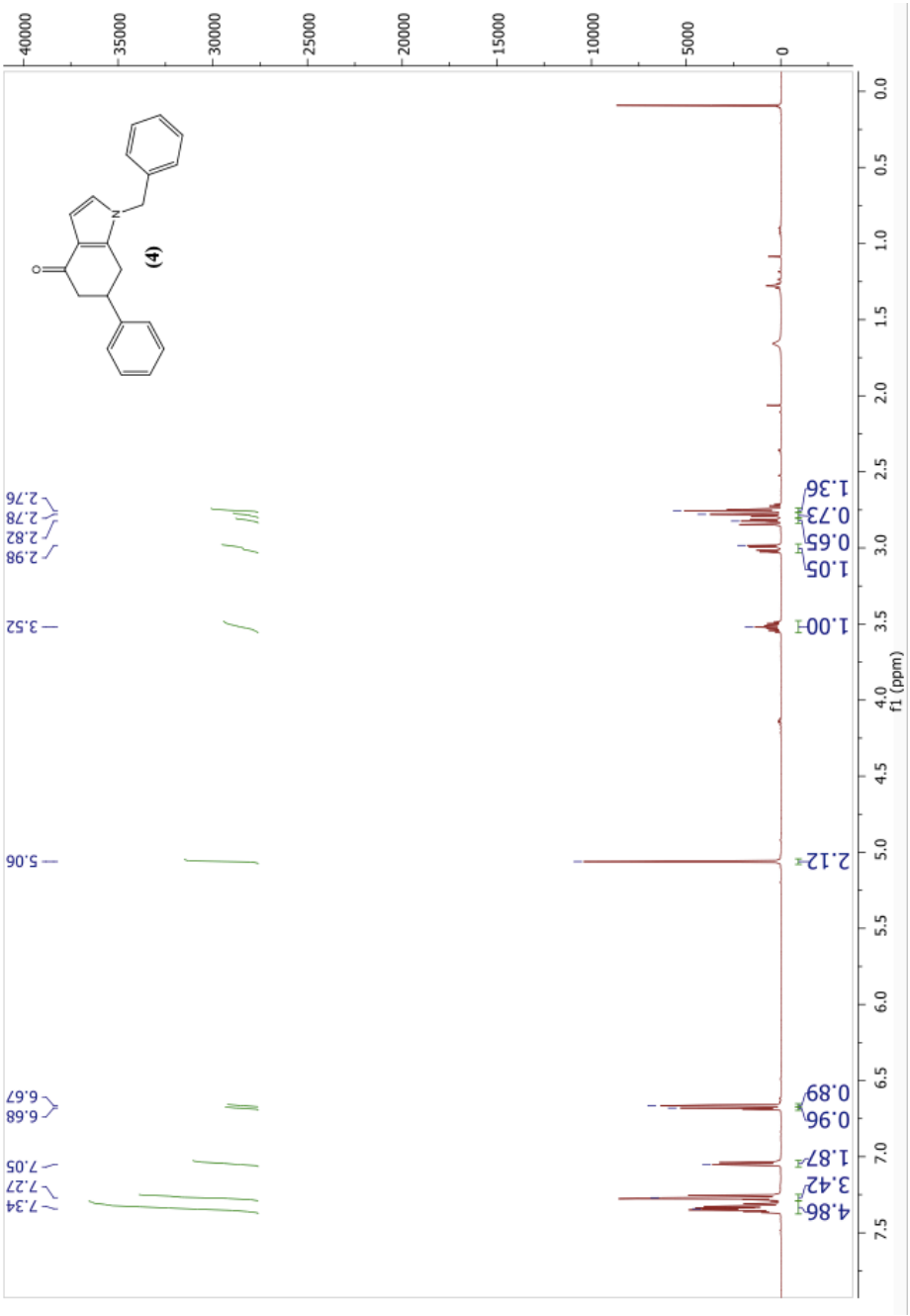
Şekil B.2-2 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat (3) bileşiğinin ^{13}C-NMR sonucu (yakınlaştırılmış görüntü)



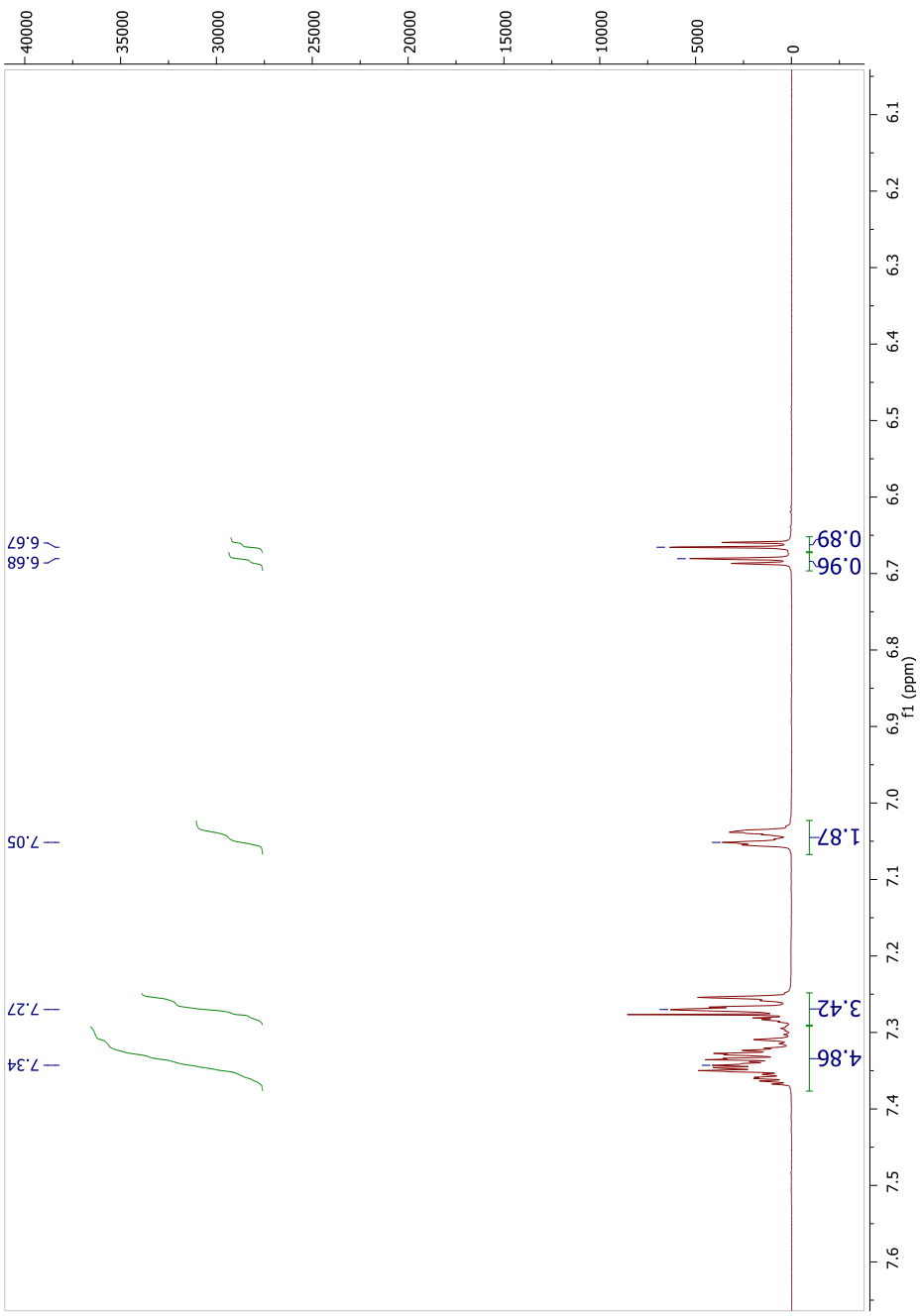
Şekil B.3 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il asetat **(3)** bileşiğinin IR sonucu

C

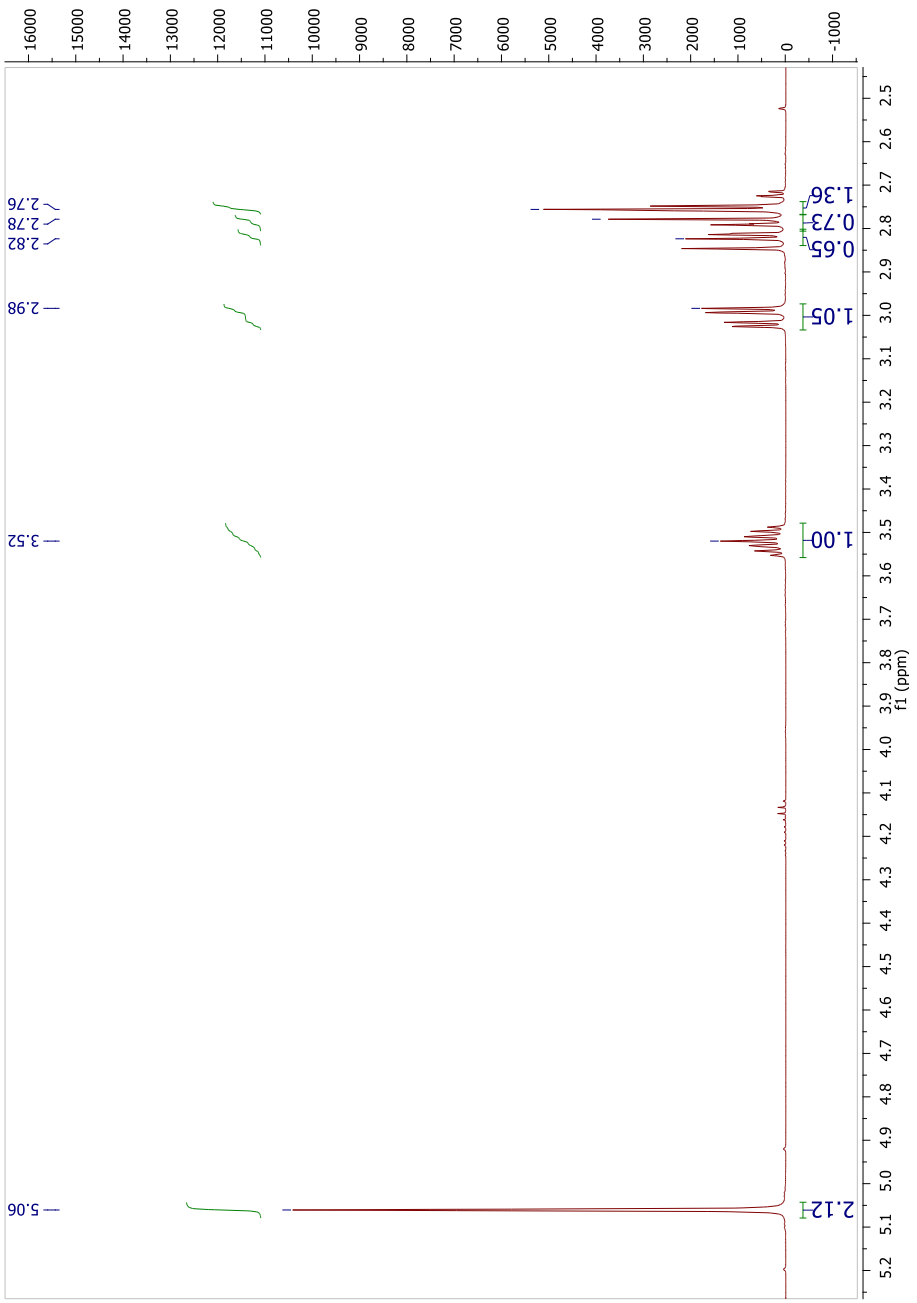
1-BENZIL-6-FENIL-6,7-DIHIDRO-1H-INDOL-4(5H)-ON (4) BİLEŞİĞİNİN SPEKTRAL ANALİZ SONUÇLARI (^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, IR



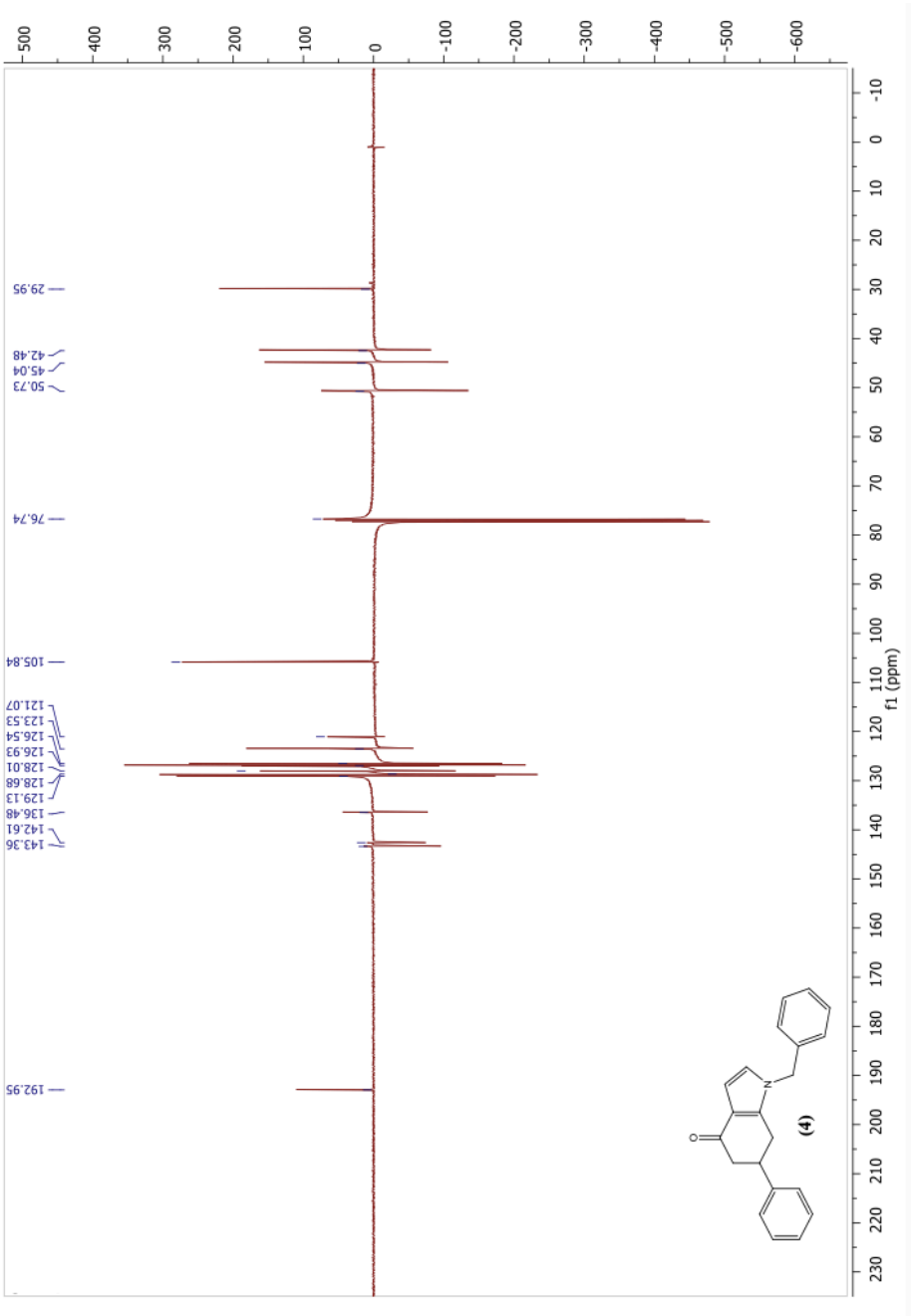
Şekil C.1 1-benzil-6-fenil-6,7-dihidro-1H-indol-4(5H)-on **(4)** bileşiğinin ^{1}H NMR sonucu



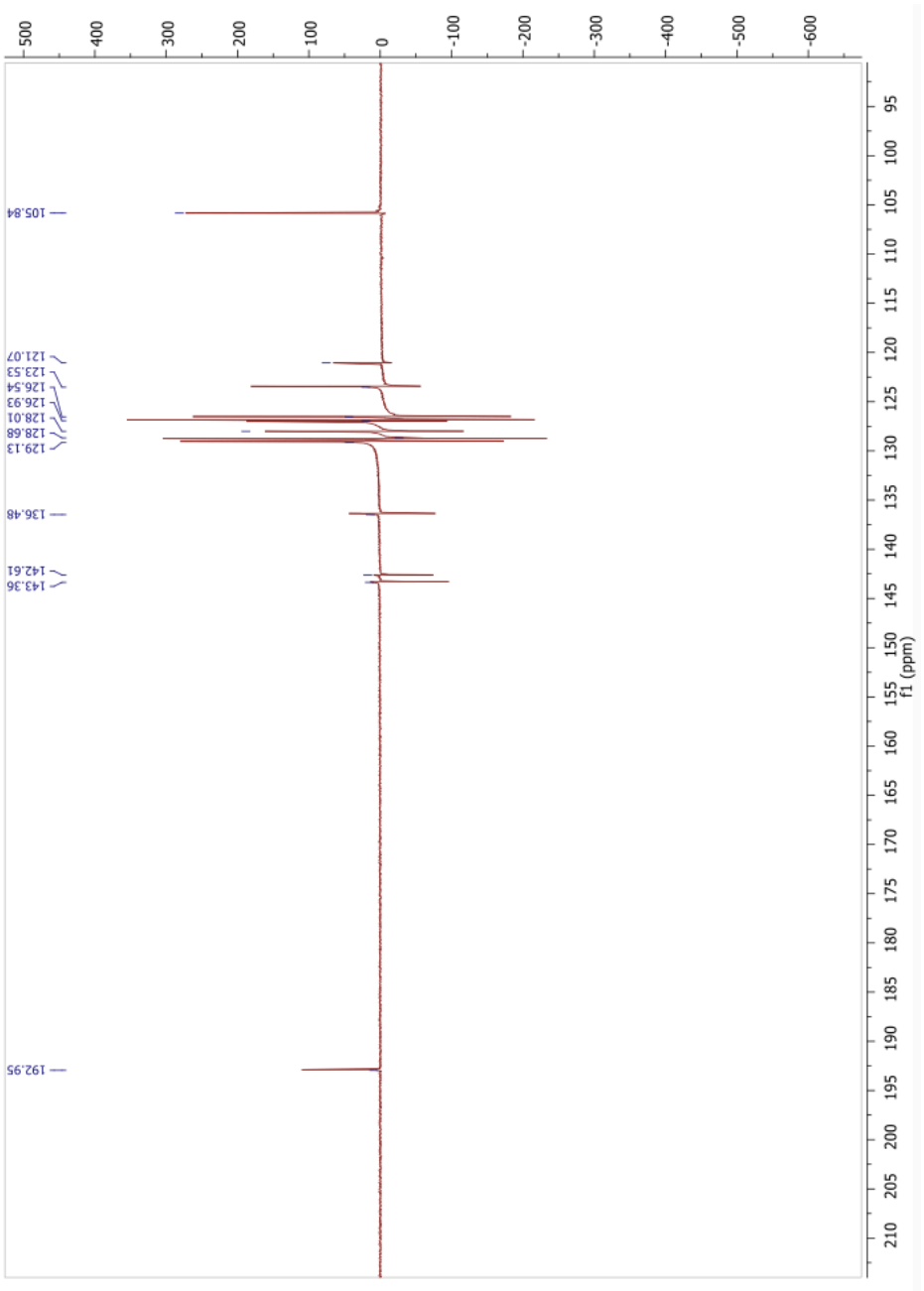
Şekil C.1-1 1-benzil-6-fenil-6,7-dihidro-1H-indol-4(5H)-on **(4)** bileşiğinin ^{1}H NMR sonucu (yakınlaştırılmış görüntü)



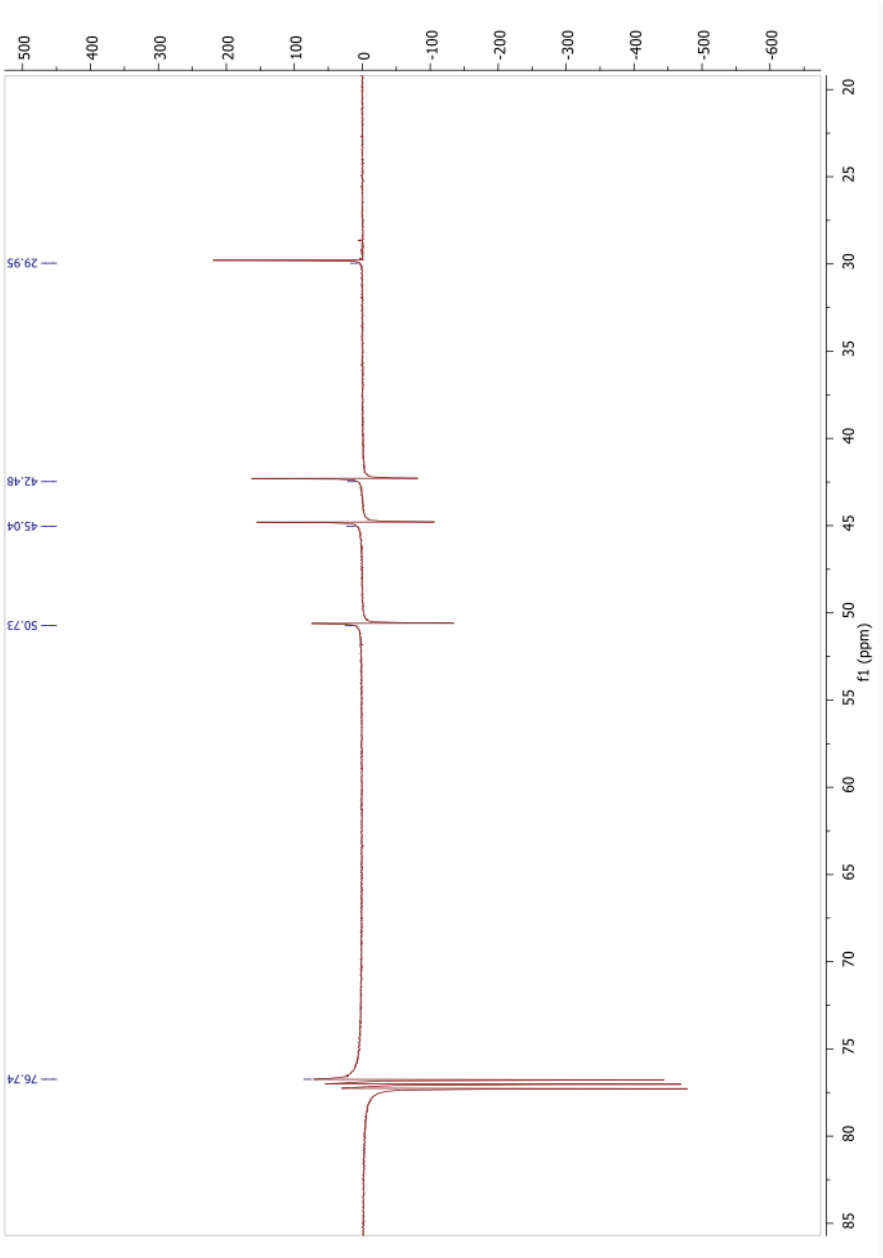
Şekil C.1-2 1-benzil-6-fenil-6,7-dihidro-1H-indol-4(5H)-on **(4)** bileşiğinin ^{1}H NMR sonucu



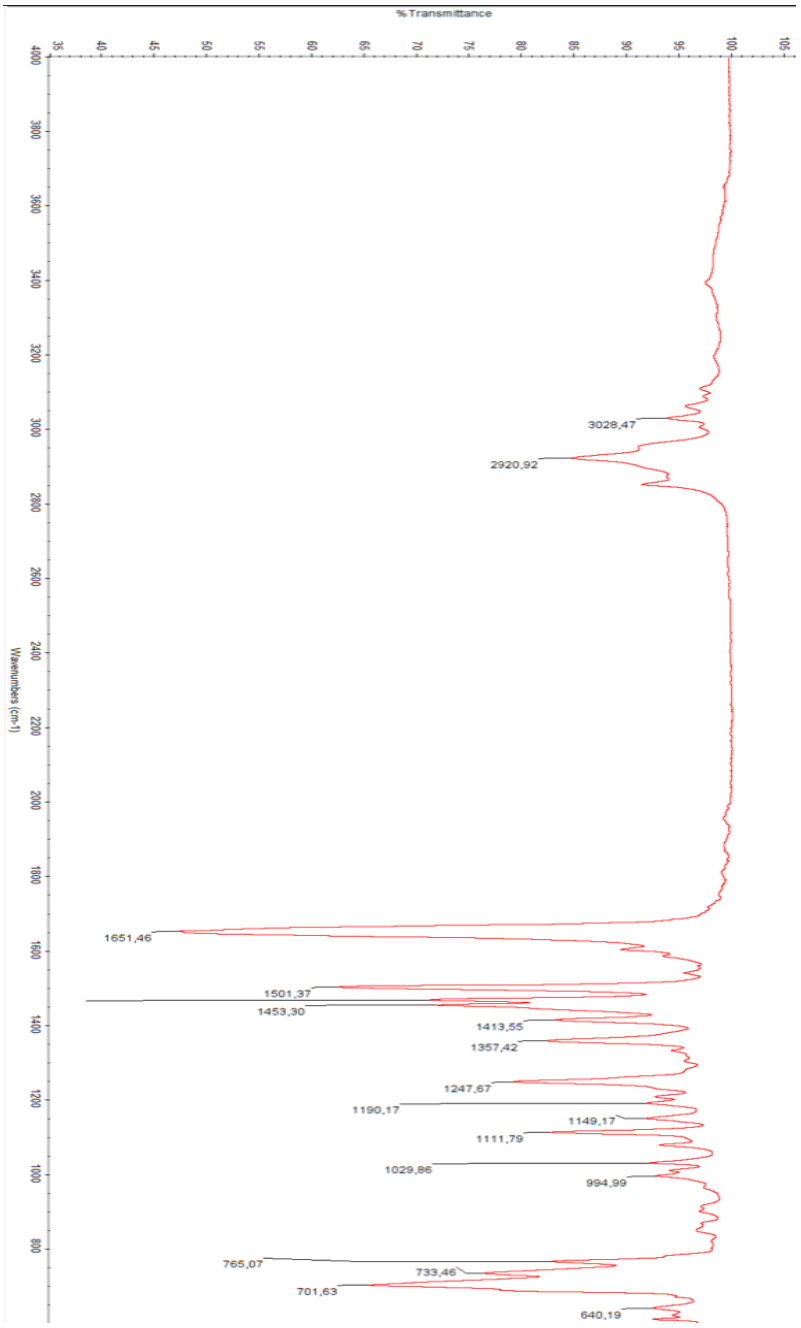
Şekil C.2 1-benzil-6-fenil-6,7-dihidro-1H-indol-4(5H)-on **(4)** bileşiğinin ^{13}C NMR sonucu (yakınlaştırılmış görüntü)



Şekil C.2-1 1-benzil-6-fenil-6,7-dihidro-1H-indol-4(5H)-on **(4)** bileşiğinin ^{13}C NMR sonucu (yakınlaştırılmış görüntü)



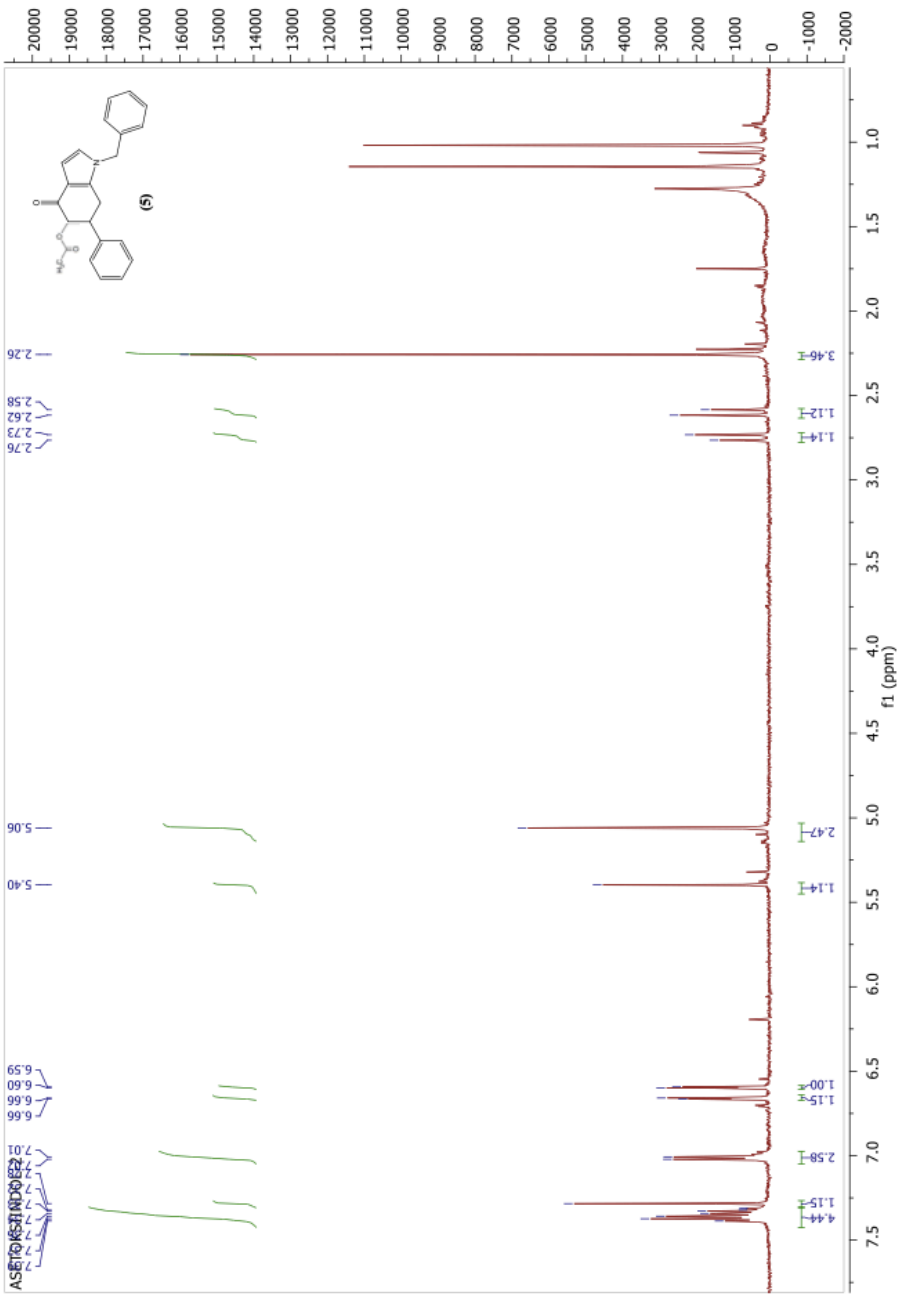
Şekil C.2-2 1-benzil-6-fenil-6,7-dihidro-1H-indol-4(5H)-on **(4)** bileşiğinin ^{13}C NMR sonucu (yakınlaştırılmış görüntü)



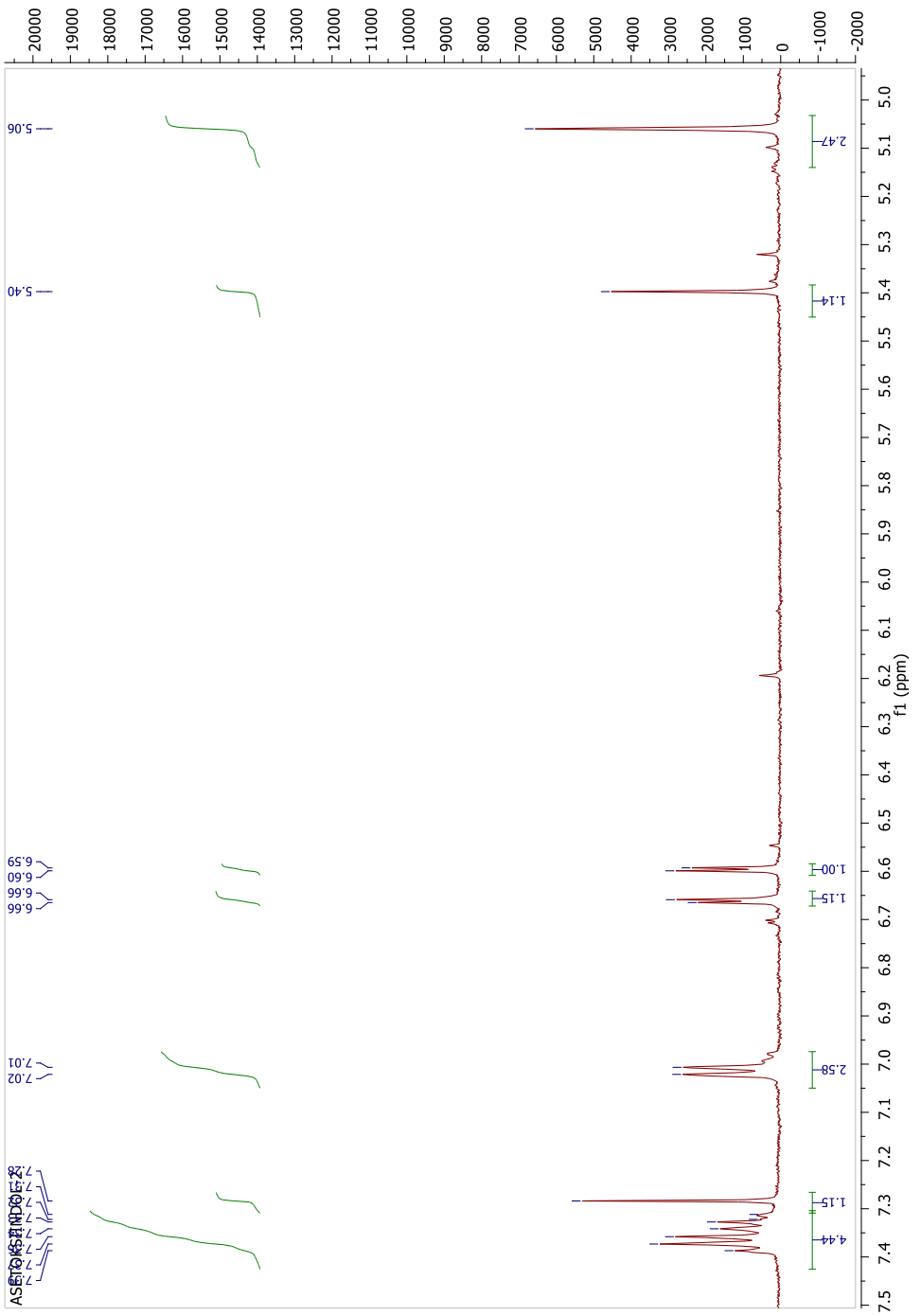
Şekil C-3. 1-benzil-6-fenil-6,7-dihidro-1H-indol-4(5H)-on **(4)** bileşiğinin IR sonucu

D

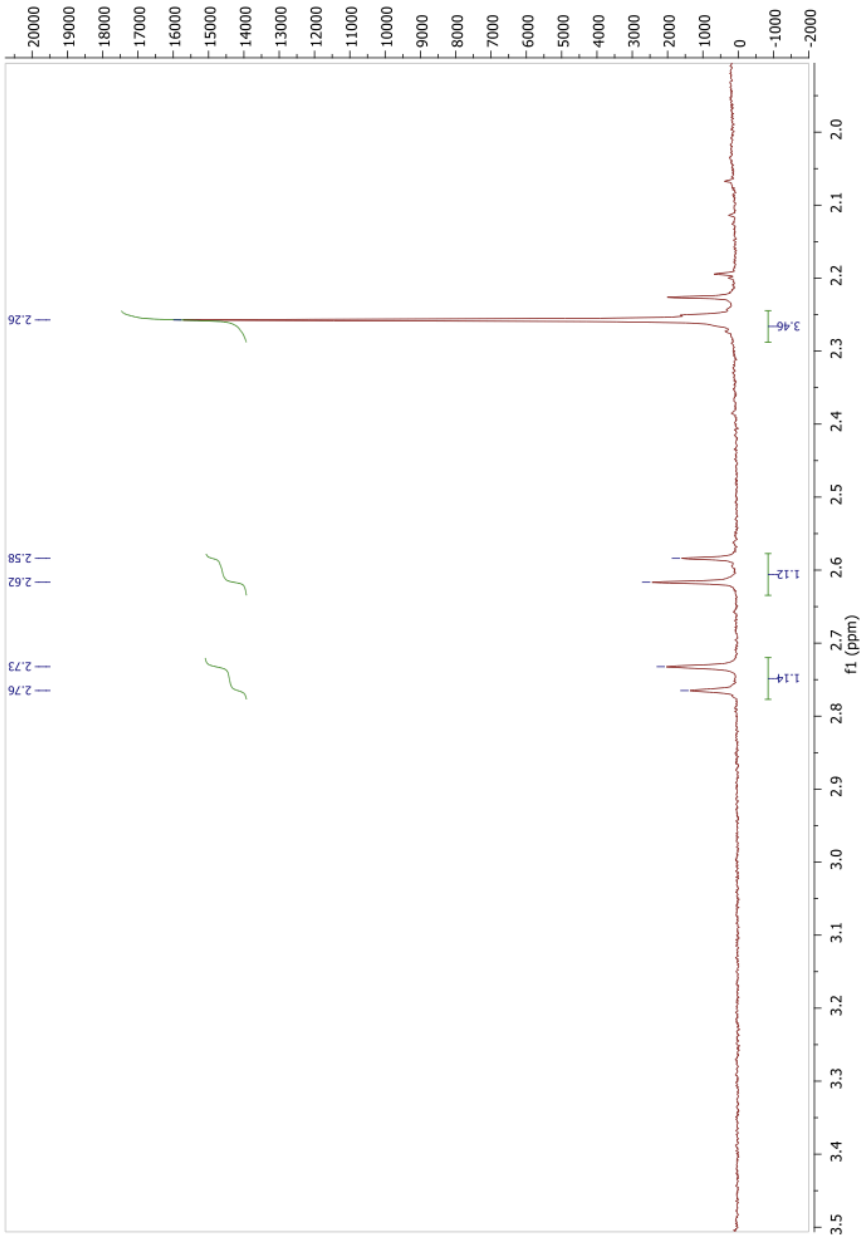
1-BENZIL-4-OKSO-6-FENIL-4,5,6,7-TETRAHIDRO-1H-INDOL-5-IL-ASETAT (5) BİLEŞİĞİNİN ^{1}H-NMR VE IR ANALİZ SONUCU



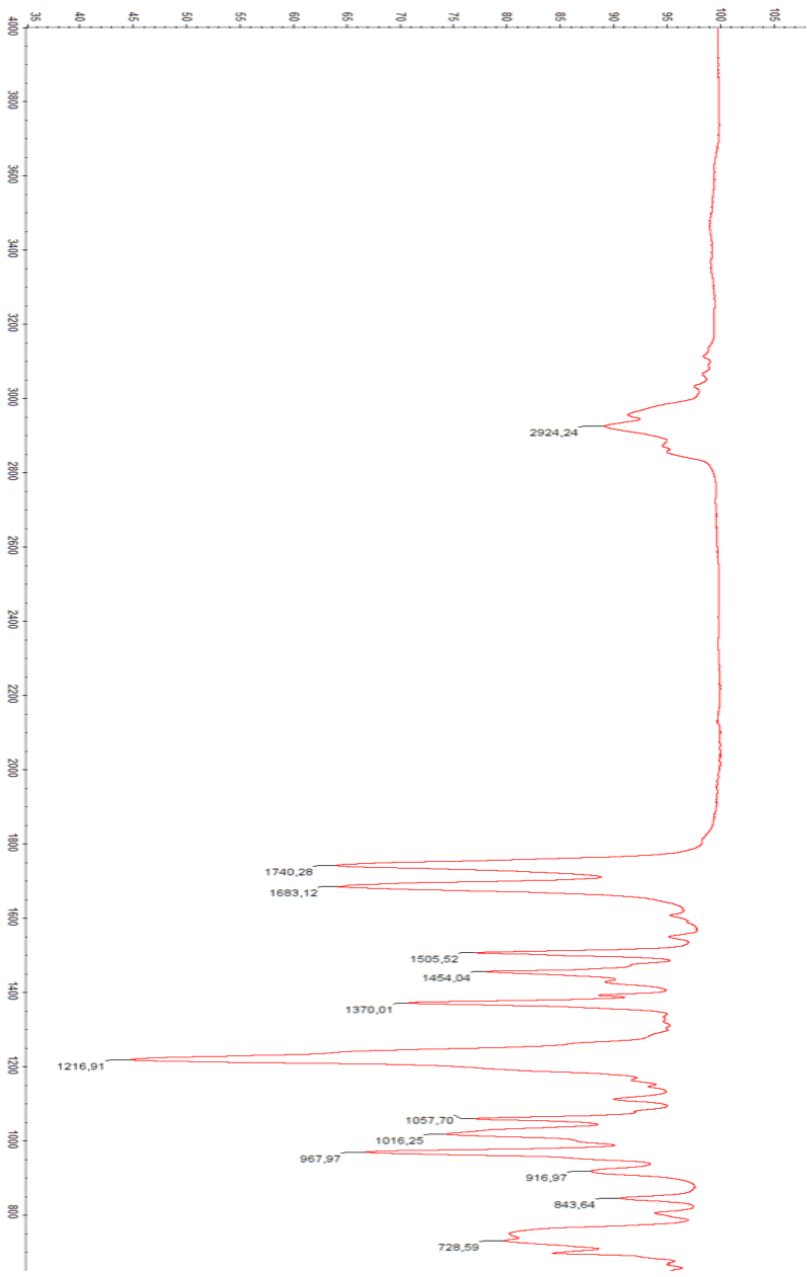
Şekil D-1 1-benzil-4-okso-6-fenil-4,5,6,7-tetrahidro-1H-indol-5-il-asetat **(5)** bileşiğinin ^{1}H-NMR sonucu



Şekil D-1-1 1-benzil-4-okso-6-fenil-4,5,6,7-tetrahidro-1H-indol-5-il-asetat **(5)** bileşiğinin ^{1}H-NMR sonucu (yakınlaştırılmış görüntü)



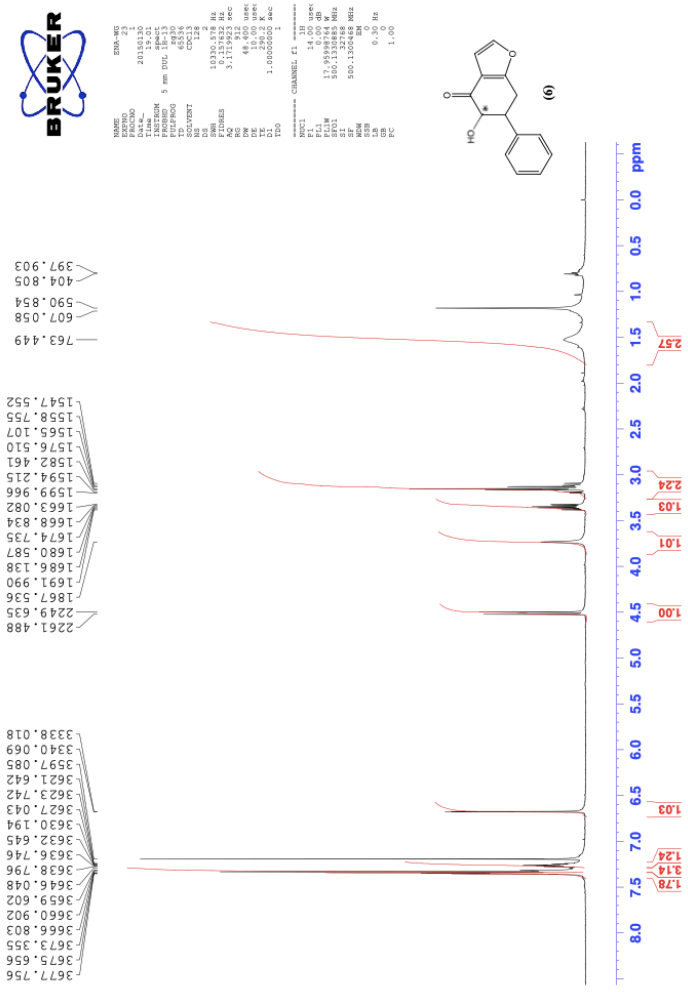
Şekil D-1-2 1-benzil-4-okso-6-fenil-4,5,6,7-tetrahidro-1H-indol-5-il-asetat **(5)** bileşiğinin ^{1}H-NMR sonucu (yakınlaştırılmış görüntü)



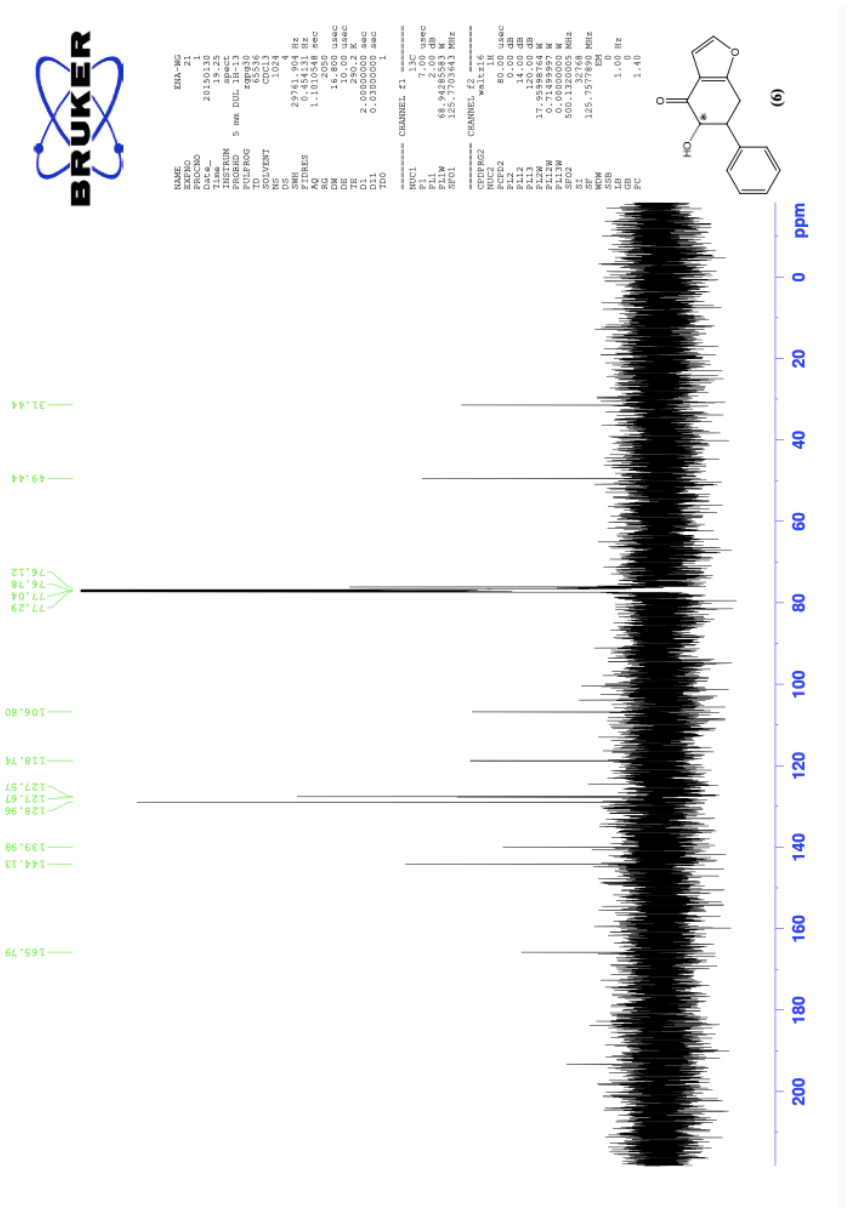
Şekil D-2. 1-benzil-4-okso-6-fenil-4,5,6,7-tetrahidro-1H-indol-5-il-asetat **(5)** bileşiğinin IR sonucu

E

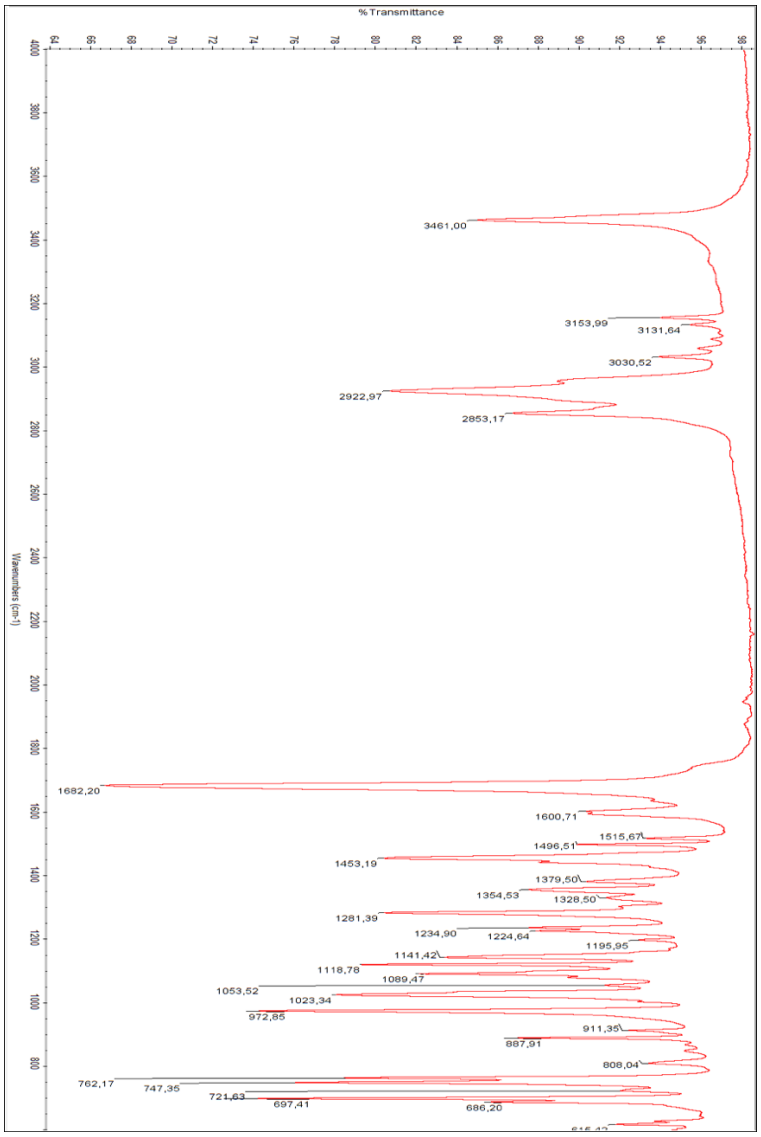
4,5,6,7-TETRAHIDRO-6-FENIL-4-OKSOBENZOFURAN-5-IL-HIDROKSI (6) BILEŞIĞININ ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, IR VE 1-BENZIL-4-OKSO-6-FENIL-4,5,6,7-TETRAHIDRO-1H-INDOL-5-IL-HIDROKSI (7) BİLEŞİĞİNİN IR ANALİZ SONUÇLARI



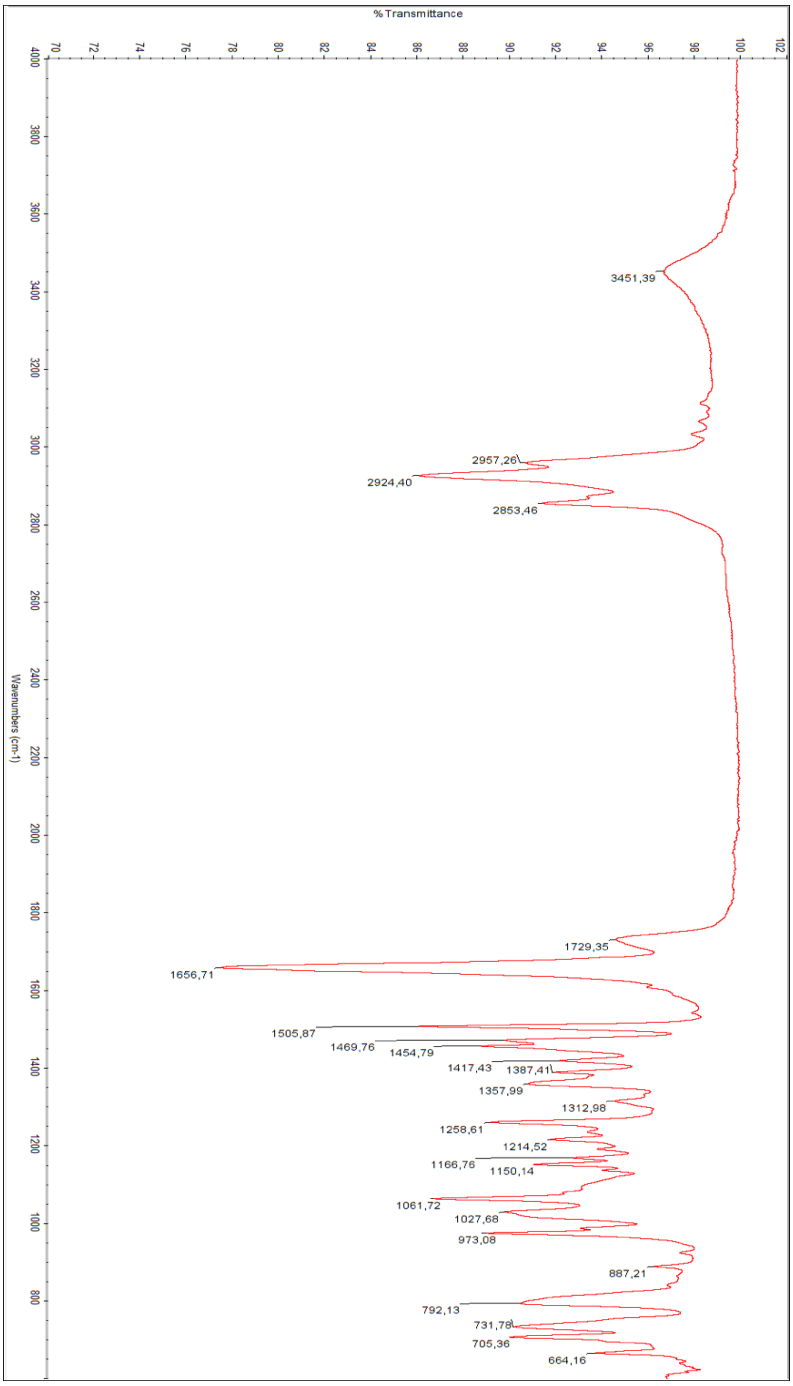
Şekil E.1 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il-hidroksi **(6)** bileşiğinin ^{1}H-NMR sonucu



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



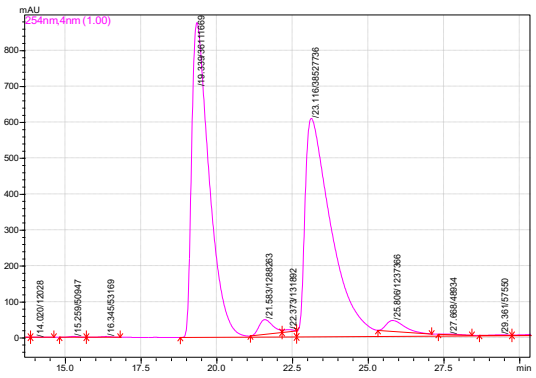
Şekil E.3. 4,5,6,7-tetrahidro-6-fenil-4-oksobenzofuran-5-il-hidroksi **(6)** bileşiğinin IR sonucu



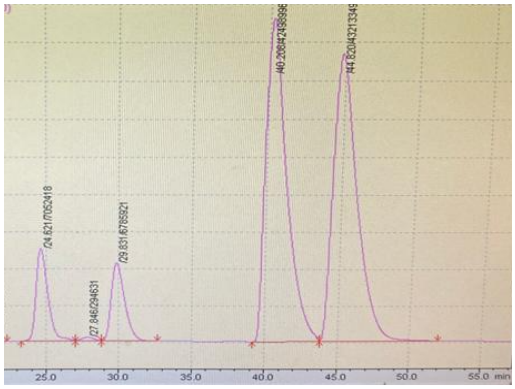
Şekil E.4 1-benzil-4-okso-6-fenil-4,5,6,7-tetrahidro-1H-indol-5-il-hidroksi **(7)** bileşiğinin IR sonucu

F

4,5,6,7-TETRAHIDRO-6-FENIL-4-OKSOBENZOFURAN-5-IL-ASETAT (3) VE 1-BENZIL-6-FENIL-6,7-DIHIDRO-1H-INDOL-4(5H)-ON (4) BİLEŞİKLERİ İLE YAPILAN BİYOTRANSFORMASYON SONRASI ELDE EDİLEN YENİ ÜRÜNLERİN HPLC ANALİZ SONUÇLARI

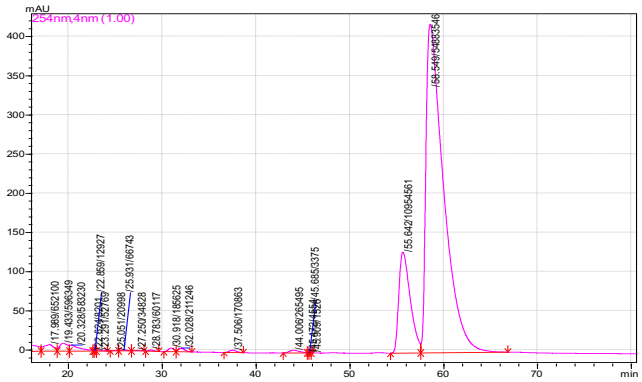


Şekil F.1 4,5,6,7-terahidro-6-fenil-4oksobenzofuran-5-il-asetat **(3)** bileşiği

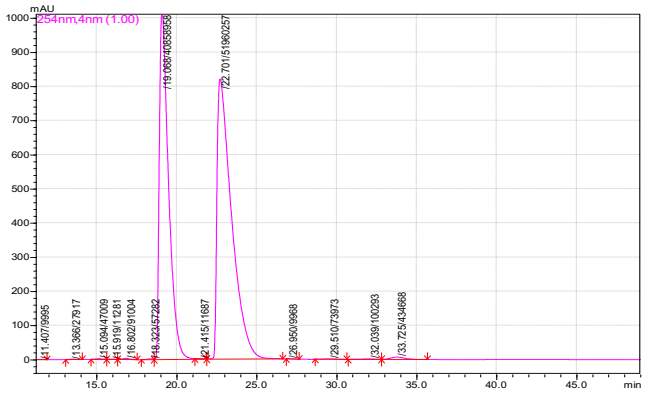


Şekil F.2 1-benzil-4-okso-6-fenil-4,5,6,7-tetrahidro-1H-indol-5-il-asetat **(5)** bileşiği

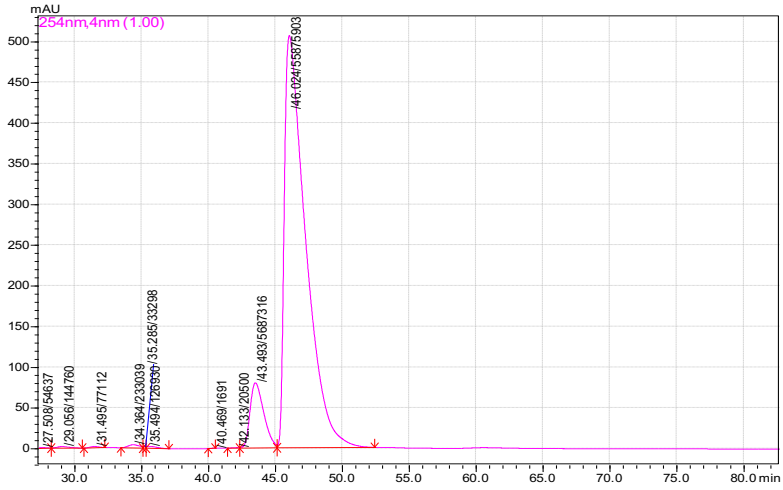
Aspergillus Niger ATCC 6275 İle Gerçekleştirilen Biyotransformasyon Sonrası HPLC Analiz Sonuçları



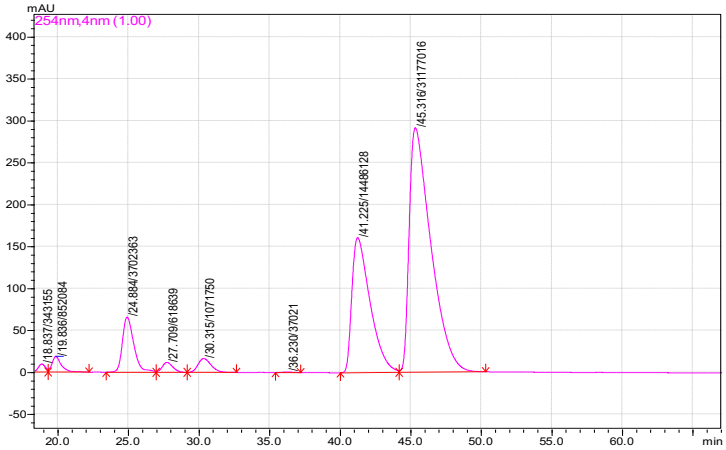
Şekil F.3 4,5,6,7-terahidro-6-fenil-4oksobenzofuran-5-il-hidroksi **(6)** bileşiği



Şekil F.4 Dönüşüm sonrası 4,5,6,7-terahidro-6-fenil-4oksobenzofuran-5-il-asetat **(3)** bileşiği

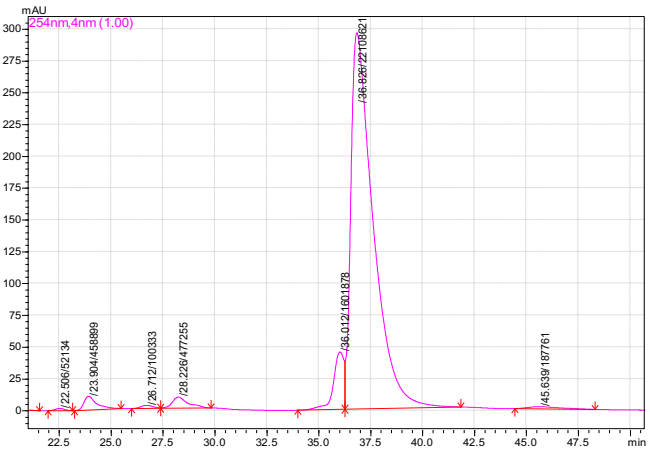


Şekil F.5 1-benzil-4-okso-6-fenil-4,5,6,7-tetrahidro-1H-indol-5-il-hidroksi **(7)** bileşiği

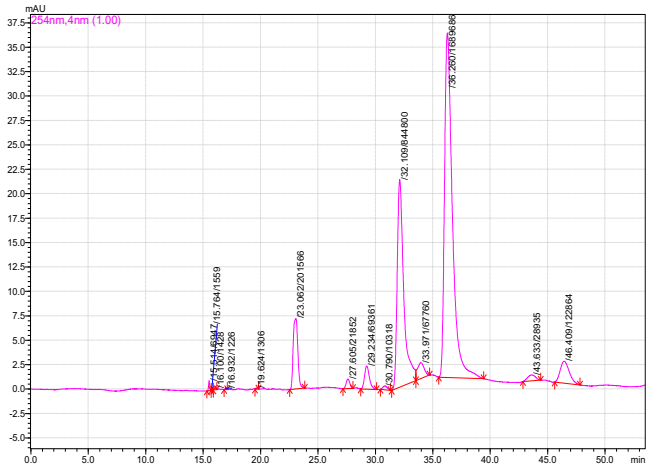


Şekil F.6 Dönüşüm sonrası 1-benzil-4-okso-6-fenil-4,5,6,7-tetrahidro-1H-indol-5-il-asetat **(5)** bileşiği

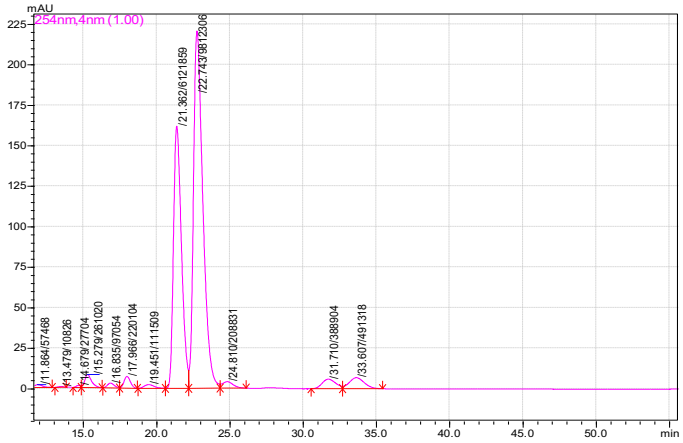
Aspergillus Oryzae RIB40 İle Gerçekleştirilen Biyotransformasyon Sonrası HPLC Analiz Sonuçları



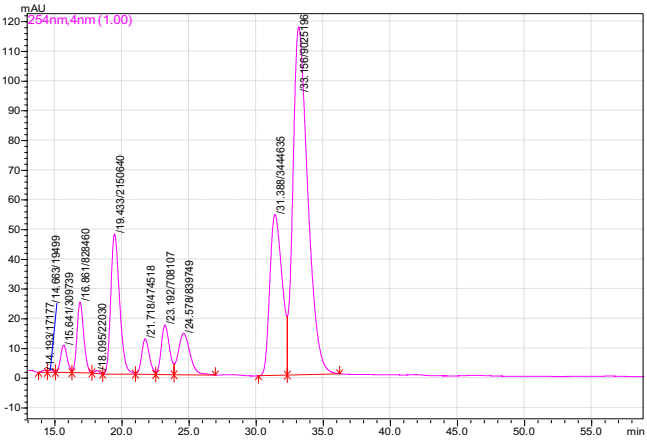
Şekil F.7 4,5,6,7-terahidro-6-fenil-4oksobenzofuran-5-il-hidroksi **(6)** bileşiği



Şekil F.8 Dönüşüm sonrası 4,5,6,7-terahidro-6-fenil-4oksobenzofuran-5-il-asetat **(3)** bileşiği



Şekil F.9 1-benzil-4-okso-6-fenil-4,5,6,7-tetrahidro-1H-indol-5-il-hidroksi **(7)** bileşiği



Şekil F.10 Dönüşüm sonrası 1-benzil-4-okso-6-fenil-4,5,6,7-tetrahidro-1H-indol-5-il-asetat **(5)** bileşiği

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Yılmaz Kara L., Çalışkan Z., "Bıotransformatıon Of Pharmacologıcally Actıve Products Wıth Aspergıllus specıes" 9th Internatıonal "Başkent" Congress On Physıcal, Engıneerıng, And applied Sciences on May 20-23, İstanbul. Turkey. Pp: 255-256.

Projeler

1. Aspergillus Türleri ile İndol Türevlerinin Biyotransformasyonu, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü –Genel Araştırma Projesi (GAP), FBA-2023-4736, İstanbul/TÜRKİYE.