

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI STEROİDLERİN
CEPHALOSPORIUM APHIDICOLA
KÜFÜ İLE BİYOTRANSFORMASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ülkü BAĞCIOĞLU

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Kudret YILDIRIM

Haziran 2006

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI STEROİDLERİN
CEPHALOSPORIUM APHIDICOLA
KÜFÜ İLE BİYOTRANSFORMASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ülkü BAĞCIOĞLU

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Bu tez 09 / 06 / 2006 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

**Yrd. Doç. Dr. Kudret YILDIRIM
Jüri Başkanı**

**Prof. Dr. Ali Osman AYDIN
Üye**

**Prof. Dr. İ. Ayhan ŞENGİL
Üye**

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı büyük bir titizlikle yöneten, çalışma boyunca desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübesinden istifade ettiğim kıymetli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Kudret YILDIRIM'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında desteklerini esirgemeyen Kimya Bölümü Öğretim Üyelerine, ve Araştırma Görevlilerine teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel Çalışmalarım sırasında yardımcı olan Kocaeli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Cavit Uyanık'a, Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Doç. Dr. İsmail Kıran'a teşekkürlerimi sunarım

Yaşamım boyunca maddi manevi her türlü desteği esirgemeyen aileme teşekkürlerimi sunarım.

Haziran 2006
Ülkü BAĞCIOĞLU

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ÖZET.....	x
SUMMARY.....	xi
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.	
<i>CEPHALOSPORIUM APHIDICOLA</i> KÜFÜ İLE STEROİDLERİN BİYOTRANSFORMASYONLARI.....	3
2.1. Steroidlerin Mikrobiyolojik Hidroksilasyonlarının Modellenmesi	5
2.2. <i>Cephalosporium aphidicola</i> ile Steroid Biyotransformasyonları...	8
2.3. Çalışmanın Amacı	18
BÖLÜM 3.	
MATERYAL VE METOT.....	20
3.1. Materyal.....	20
3.2. Metot.....	21
3.2.1. Taze yatık agar kültürlerin hazırlanması.....	21
3.2.2. <i>Cephalosporium aphidicola</i> besi yerinin hazırlanması.....	21
3.3. Bileşiklerin <i>Cephalosporium aphidicola</i> ile Biyotransformasyonu	22

3.3.1. 3 β , 20-Dihidroksi-3 α , 20-dimetilpregn-4-en bileşığının biyotransformasyonu.....	22
3.3.2. 3 α , 17 β -Dihidroksi-3 β -metilestr-4-en bileşığının biyotransformasyonu.....	24
BÖLÜM 4. DENEYSEL BULGULAR.....	26
BÖLÜM 5. SONUÇLAR.....	49
BÖLÜM 6. TARTIŞMA VE ÖNERİLER.....	51
KAYNAKLAR.....	54
ÖZGEÇMİŞ.....	57

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

APT	: Doğrudan Bağlı Proton Testi
CDCl_3	: Dötorokloroform
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: Kobalt nitrat hekzanitrat
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: Bakır sülfat pentahidrat
$^{13}\text{C-NMR}$: Karbon 13-Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
C-X	: X numaralı karbon atomu
$^{\circ}\text{C}$: Santigrad derece
e^-	: Elektron
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: Demir sülfat heptahidrat
g	: Gram
HCl	: Hidroklorik asit
$^1\text{H-NMR}$: Proton-Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
Hz	: Hertz
IR	: Infrared Spektroskopisi
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
j	: Etkileşme sabiti
KBr	: Potasyum Bromür
KH_2PO_4	: Potasyum dihidrojen fosfat
KOH	: Potasyum hidroksit
L	: Litre
m	: Multiplet
MHz	: Megahertz
mL	: Mililitre
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: Mangan sülfat heptahidrat
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: Amonyum heptamolibdat
PDA	: Potato Dextrose Agar

pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonunun eksi logaritması
ppm	: Milyonda bir (kimyasal kayma birimi)
s	: Singlet
t	: Triplet
<i>T</i>	: Geçirgenlik
UV	: Ultraviyole (Morötesi) ışınları
ν_{\max}	: Maksimum dalga sayısı
$\nu \text{ cm}^{-1}$: Santimetreye düşen dalga boyu sayısı
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: Çinko sülfat heptahidrat
δ_{H}	: ^1H NMR spektrumundaki kimyasal kayma
δ_{C}	: ^{13}C NMR spektrumundaki kimyasal kayma

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil.1.1	Progesteronun <i>R. arrhizus</i> ile biyotransformasyonu.....	2
Şekil 2.1	Substrata bir O atomunun ilave edilmesinin mekanizması.....	4
Şekil 2.2	Oksidant ve substrat arasındaki radikalleri içeren mekanizma.....	5
Şekil 2.3	Enzim-substrat etkileşimi Jones modeli.....	6
Şekil 2.4	Brannon modeline göre bağlanma oryantasyonları.....	7
Şekil 2.5	Enzim-substrat etkileşim McCrindle modeli.....	7
Şekil 2.6	Aphidicolin ve Steroid ana yapısı.....	8
Şekil 2.7	Bazı mono ve diketoandrostanlar ve <i>Cephalosporium aphidicola</i> küfü ile biyotransformasyonu sonucu oluşan metabolitlerinin yapıları.....	9
Şekil 2.8	Bazı pregnanlar ve <i>Cephalosporium aphidicola</i> küfü ile biyotransformasyonu sonucu oluşan metabolitlerinin yapıları.....	11
Şekil 2.9	Bazı Δ^5 -androgen'ler ve <i>Cephalosporium aphidicola</i> küfü ile biyotransformasyonu sonucu oluşan metabolitlerinin yapıları.....	13
Şekil 2.10	Bazı kortikosteroidler ve <i>Cephalosporium aphidicola</i> küfü ile biyotransformasyonu sonucu oluşan metabolitlerinin yapıları.....	14
Şekil 2.11	Bazı 3, 16-disubstitüe androstanlar ve <i>Cephalosporium aphidicola</i> küfü ile biyotransformasyonu sonucu oluşan metabolitlerinin yapıları.....	15
Şekil 4.1	Başlangıç maddelerinin karbon iskeletlerinin numaralandırılması....	26
Şekil 4.2	3 β , 20-Dihidroksi-3 α , 20-dimetilpregn-4-en'in ^1H -NMR spektrumu	30
Şekil 4.3	3 β , 20-Dihidroksi-3 α , 20-dimetilpregn-4-en'in <i>Cephalosporium aphidicola</i> küfü ile biyotransformasyonu sonucu oluşan bileşiğin ^1H -NMR spektrumu.....	31
Şekil 4.4	3 β , 20-Dihidroksi-3 α , 20-dimetilpregn-4-en'in ^{13}C -NMR spektrumu.....	32

Şekil 4.5	3 β , 20-Dihidroksi-3 α , 20-dimetilpregn-4-en'in <i>Cephalosporium aphidicola</i> küfü ile biyotransformasyonu sonucu oluşan bileşiğin ¹³ C-NMR spektrumu.....	33
Şekil 4.6	3 β , 20-Dihidroksi-3 α , 20-dimetilpregn-4-en'in ¹³ C-APT spektrumu	34
Şekil 4.7	3 β , 20-Dihidroksi-3 α , 20-dimetilpregn-4-en'in <i>Cephalosporium aphidicola</i> küfü ile biyotransformasyonu sonucu oluşan bileşiğin ¹³ C- APT spektrumu.....	35
Şekil 4.8	3 β , 20-Dihidroksi-3 α , 20-dimetilpregn-4-en'in IR spektrumu.....	36
Şekil 4.9	3 β , 20-Dihidroksi-3 α , 20-dimetilpregn-4-en'in <i>Cephalosporium aphidicola</i> küfü ile biyotransformasyonu sonucu oluşan bileşiğin IR spektrumu.....	37
Şekil 4.10	3 α , 17 β -Dihidroksi-3 β -metilestr-4-en'in ¹ H-NMR spektrumu.....	41
Şekil 4.11	3 α , 17 β -Dihidroksi-3 β -metilestr-4-en'in <i>Cephalosporium aphidicola</i> küfü ile biyotransformasyonu sonucu oluşan bileşiğin ¹ H-NMR spektrumu.....	42
Şekil 4.12	3 α , 17 β -Dihidroksi-3 β -metilestr-4-en'in ¹³ C-NMR spektrumu.....	43
Şekil 4.13	3 α , 17 β -Dihidroksi-3 β -metilestr-4-en'in <i>Cephalosporium aphidicola</i> küfü ile biyotransformasyonu sonucu oluşan bileşiğin ¹³ C-NMR spektrumu	44
Şekil 4.14	3 α , 17 β -Dihidroksi-3 β -metilestr-4-en'in ¹³ C-APT spektrumu.....	45
Şekil 4.15	3 α , 17 β -Dihidroksi-3 β -metilestr-4-en'in <i>Cephalosporium aphidicola</i> küfü ile biyotransformasyonu sonucu oluşan bileşiğin ¹³ C- APT spektrumu.....	46
Şekil 4.16	3 α , 17 β -Dihidroksi-3 β -metilestr-4-en'in IR spektrumu.....	47
Şekil 4.17	3 α , 17 β -Dihidroksi-3 β -metilestr-4-en'in <i>Cephalosporium aphidicola</i> küfü ile biyotransformasyonu sonucu oluşan bileşiğin IR spektrumu.....	48
Şekil 5.1	3 β , 20-Dihidroksi-3 α , 20-dimetilpregn-4-en bileşiğinin <i>Cephalosporium aphidicola</i> küfü ile biyotransformasyonu.....	49
Şekil 5.2	3 α ,17 β -Dihidroksi-3 β -metilestr-4-en bileşiğinin <i>Cephalosporium aphidicola</i> küfü ile biyotransformasyonu.....	50

TABLolar LİSTESİ

Tablo 3.1	Besi yeri çözeltilisinin bileşenleri.....	22
Tablo 3.2	Eser element çözeltilisi bileşenleri.....	22
Tablo 4.1	3 β , 20-Dihidroksi-3 α , 20-dimetilpregn-4-en ve bileşiğın ¹ H-NMR spektrumlarının karşılaştırılması.....	27
Tablo 4.2	3 β , 20-Dihidroksi-3 α , 20-dimetilpregn-4-en ve bileşiğın ¹³ C-NMR spektrumlarının karşılaştırılması.....	28
Tablo 4.3	3 α , 17 β -Dihidroksi-3 β -metilestr-4-en ve bileşiğın ¹ H-NMR spektrumlarının karşılaştırılması.....	38
Tablo 4.4	3 α , 17 β -Dihidroksi-3 β -metilestr-4-en ve bileşiğın ¹³ C-NMR spektrumlarının karşılaştırılması.....	39

ÖZET

Anahtar Kelimeler: Biyotransformasyon, *Cephalosporium aphidicola*, 3 β , 20-Dihidroksi-3 α , 20-dimetilpregn-4-en, 3 α , 17 β -Dihidroksi-3 β -metilestr-4-en.

Steroidlerin 3-OH grubu bu maddelerin hidroksilaz enzimlerine bağlanmasında önemlidir. Bu çalışmanın amacı aynı karbona (C-3) bağlı olan bir metil grubunun steroidlerin biyotransformasyonuna olabilecek etkilerini incelemektir. Bu amaçla 3 β , 20-dihidroksi-3 α , 20-dimetilpregn-4-en ve 3 α , 17 β -dihidroksi-3 β -metilestr-4-en bileşiklerinin *Cephalosporium aphidicola* küfü ile 10 gün süren inkübasyonları gerçekleştirildi. Her bir inkübasyondan bir bileşik elde edildi.

İnkübasyonlar sonrasında başlangıç maddeleri ve bileşiklerin erime noktaları ile ¹H-NMR, ¹³C-NMR, ¹³C APT NMR ve IR spektrumları alındı. Başlangıç maddeleri ve bileşiklere ait erime noktaları ve spektrumlar karşılaştırıldığında 3 β , 20-dihidroksi-3 α , 20-dimetilpregn-4-en ve 3 α , 17 β -dihidroksi-3 β -metilestr-4-en bileşiklerinin inkübasyonu neticesinde herhangi bir değişim gerçekleşmediği anlaşıldı.

Bu sonuç C-3 atomuna bağlı bir hidroksil grubuna ilaveten aynı karbona bağlı olan bir metil grubunun steroidlerin biyotransformasyonunu inhibe edebileceğini gösterdi.

THE BIOTRANSFORMATION OF SOME STEROIDS BY *CEPHALOSPORIUM APHIDICOLA*

SUMMARY

Keywords : Biotransformations, *Cephalosporium aphidicola* 3 β , 20-Dihydroxy-3 α , 20-dimethylpregn-4-ene, 3 α , 17 β -Dihydroxy-3 β -methylestr-4-ene.

The 3-OH group of steroids is important in the binding of these substances to the hydroxylase enzymes. The aim of this study is to investigate the effects of a methyl group bounded to the same carbon atom (C-3) on the microbial hydroxylations of steroids. 3 β , 20-Dihydroxy-3 α , 20-dimethylpregn-4-ene and 3 α , 17 β -dihydroxy-3 β -methylestr-4-ene were incubated with *Cephalosporium aphidicola* for 10 days in order to investigate the possible effects. Only one compound was captured from each incubation.

The melting points and ^1H - NMR, ^{13}C -NMR, ^{13}C APT NMR and IR spectra were taken from both starting materials and the compounds after the incubations. When the melting points and ^1H - NMR, ^{13}C -NMR, ^{13}C APT NMR and IR spectra of the starting materials and compounds were compared with each other, it followed that 3 β , 20-dihydroxy-3 α , 20-dimethylpregn-4-ene and 3 α , 17 β -dihydroxy-3 β -methylestr-4-ene were not changed during their incubations.

This result showed that a methyl group which is bounded to the same carbon atom (C-3) with a hydroxyl group may inhibit the microbial hydroxylations of steroids.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Canlılar hayatlarının birçok dönemlerinde kendilerine yabancı olan ilaçlar, besin katkı maddeleri, kozmetik ürünleri gibi ksenobiyotikler adı verilen kimyasal maddeler ile karşılaşmaktadır [1]. Bu maddelerin üzerinde enzimler veya enzimleri içeren hücre, doku, organ kültürleri, mikroorganizmalar ya da mikroorganizma sporları yolu ile meydana getirilen kimyasal değişikliklere biyotransformasyon adı verilir [2]. Sirke üretiminde etanol'ün bakteriler tarafından asetik aside oksidasyonu ve şekerin bira mayası tarafından etanol'e fermantasyonu en eski ve en iyi bilinen biyotransformasyonlardandır [3].

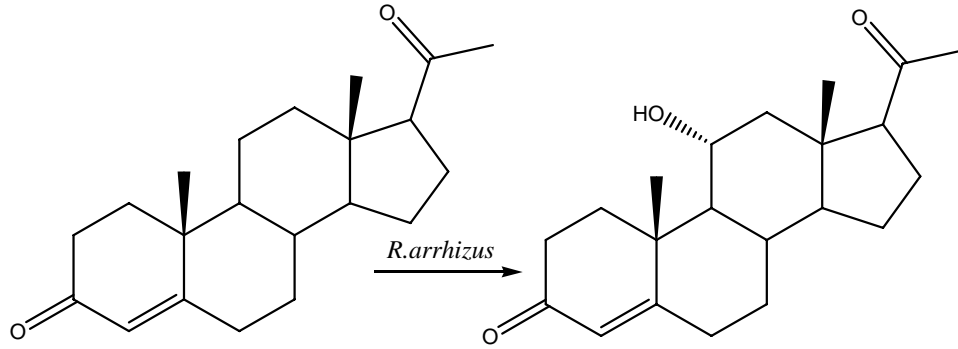
Mikroorganizmalar biyotransformasyonlar için serbest veya uygun yüzeylere sabitlenmiş olarak kullanılabilir ve en yaygın olarak kullanılan mikroorganizma grupları küfler, mayalar, bakteriler ve mikrobiyal alglerdir [4].

Mikroorganizmalar spesifik olmayan enzim sistemleri sayesinde hem doğal hem de sentetik birçok substrat üzerinde çok sayıda farklı kimyasal reaksiyonlar gerçekleştirebilirler [3].

Biyotransformasyon reaksiyonlarının en önemlilerinden birisi mikrobiyal hidroksilasyondur [5]. Mikrobiyal hidroksilasyonlar sitokrom P-450 enzimlerince gerçekleştirilir ve bu enzimler ayrıca hidroksilazlar veya monooksijenazlar olarak da adlandırılırlar [3].

Mikrobiyal hidroksilasyonun önemi ilk olarak kortikal steroidlerin sentezinde ortaya çıkmıştır [5]. Kortikal steroidlerin sentezinde fonksiyonel grupların oldukça uzağında bulunan C-11'e bir oksijen fonksiyonu yerleştirmek klasik kimyasal yöntemlerle oldukça uzun ve masraflı bir işlem olmasına rağmen bu problemin *Rhizopus arrhizus* küfünün yüksek verimli bir mikrobiyal hidroksilasyonu ile çözülmesi dikkatleri

mikrobiyal biyotransformasyonlar üzerine çekmiştir [3,6]. Söz konusu mikrobiyal hidroksilasyon reaksiyonu Şekil 1.1’de gösterilmiştir. Mikrobiyal hidroksilasyonun öneminin anlaşılmasından sonra birçok farklı madde üzerinde çok sayıda değişik mikroorganizma ile yeni biyotransformasyon reaksiyonları gerçekleştirilmiştir [5].



Şekil 1.1 Progesteronun *R. arrhizus* ile biyotransformasyonu

BÖLÜM 2. *CEPHALOSPORIUM APHIDICOLA* KÜFÜ İLE STEROİDLERİN BİYOTRANSFORMASYONLARI

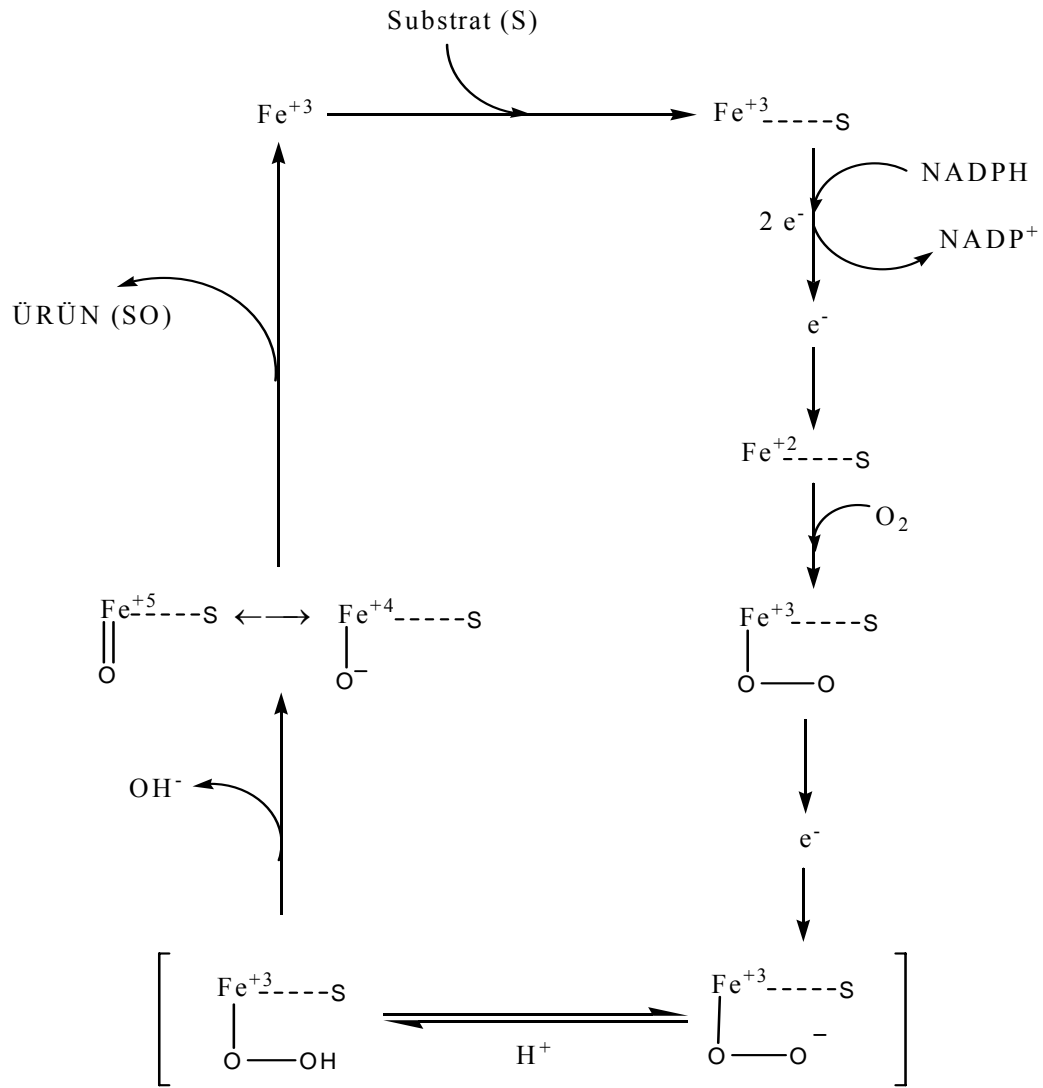
Bakterilerin ve küflerin büyük kısmı steroidlerin hidroksilasyonunu gerçekleştirebilirler [3]. Bu durum hem mikrobiyolojik hidroksilasyonun mekanizması hem de steroidlerin mikrobiyolojik hidroksilasyonunun modellenmesi konusunda bilgi sağlamaktadır [5].

Steroidlerin mikrobiyolojik hidroksilasyonun çoğu canlılarda bulunan sitokrom P-450 enzimlerince katalizlendiği düşünülmektedir [3]. Mikrobiyolojik hidroksilasyon için ayrıca moleküler oksijen, NADPH veya NADH gibi bir hidrojen kaynağı ve 1 molekül su gerektirmektedir [5].

Mikrobiyolojik hidroksilasyonun mekanizması özellikle *Pseudomonas putida* bakterisinin camphor bileşiğinin hidroksilasyonunu katalizleyen camphor hidroksilaz enzimine ait sitokrom P-450 üzerinde çalışılarak ortaya çıkarılmıştır [3]. Sitokrom P-450'nin yapısı X ışınları kristallografi tekniği ile anlaşılmıştır [5]. Kristal yapı çalışmaları camphor bileşiğinin enzimin aktif merkezine iki etkileşim ile sıkıca bağlı olduğunu göstermiştir. Birinci etkileşim camphor'un karbonil grubu ile aktif merkezindeki bir tirozinin hidroksil grubu arasındaki hidrojen bağı iken ikinci etkileşim ise camphor molekülü ile çevresindeki alifatik ve aromatik amino asitler arasındaki hidrofobik etkileşimlerdir.

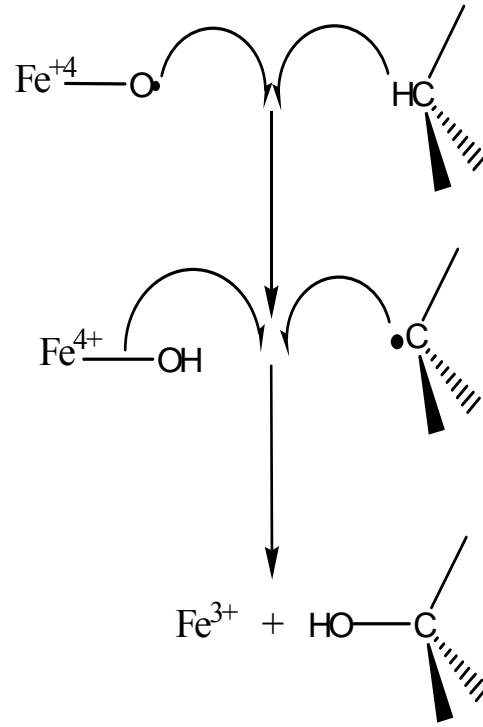
Şekil 2.1'de görüldüğü gibi mikrobiyal hidroksilasyon sırasında diatomik moleküler oksijenin bir atomu organik substrata bağlanmaktadır [3,5,7]. İndirgeyici 2 elektron genellikle NADPH bazen ise NADH'dan sağlanmaktadır. İlk adımda substrat bağlanması gerçekleşir ve bu bağlanma diatomik oksijenin atomlarından birisinin demire bağlanabilmesi için elzemdir. Substrat bağlandıktan sonra bir elektronun

nakli ile Fe^{+3} , Fe^{+2} 'ye indirgenmektedir. Elektronların teker teker nakli mikrobu-
 türüne göre NADPH veya NADH'dan bir flavin nükleotid, Fe-S proteinleri ve/veya
 sitokrom b_5 vasıtası ile gerçekleşmektedir. Moleküler oksijen ilk elektron naklinden
 sonra bağlanır. Moleküler oksijenin bağlanmasını ikinci elektronun O-O bağına
 nakledilmesi izler. Bu nakil sonrasında O-O bağı kopar ve bir oksijen atomu su
 molekülü olarak ayrılırken Fe^{+3} , Fe^{+4} 'e oksitlenmektedir. Bu oksidasyon ile oluşan
 son oksidant artık substratla reaksiyona girebilir.



Şekil 2.1 Substrata bir O atomunun ilave edilmesinin mekanizması

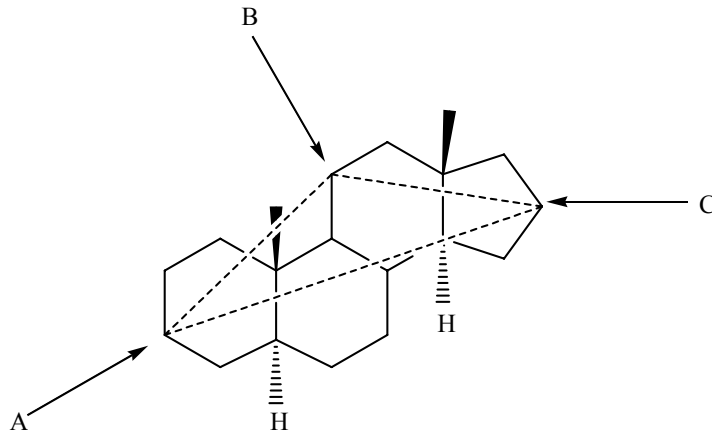
Oksidant ve substrat arasındaki reaksiyonun Şekil 2.2'deki gibi muhtemelen
 radikalleri içeren bir mekanizma ile gerçekleştiği düşünülmektedir [5].



Şekil 2.2 Oksidant ve substrat arasındaki radikalleri içeren mekanizma

2.1. Steroidlerin Mikrobiyolojik Hidroksilasyonlarının Modellenmesi

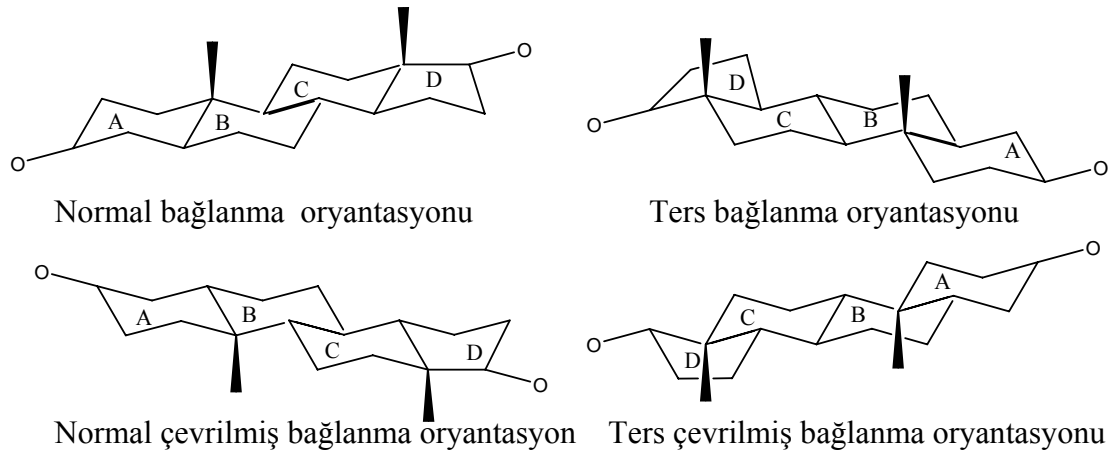
Jones ve grubunun çalışmaları esnasında bir oksijen fonksiyonu ($-\text{CO}$ veya $-\text{COH}$ gibi) içeren $5\alpha\text{-H}$ androstanların küfler ile biyotransformasyonları çoğunlukla dihidroksilasyonlar ile sonuçlanırken iki oksijen fonksiyonu içeren $5\alpha\text{-H}$ androstanların küfler ile biyotransformasyonları çoğunlukla monohidroksilasyonlar ile sonuçlandı [8]. Bu durum Jones modelinin ortaya atılmasına sebep oldu. Bu modele göre hidroksilaz enzimlerinde 3 aktif merkez vardır ve steroidlerin hidroksilasyonu ile substratın enzime bağlanmasında bu 3 aktif merkez rol oynamaktadır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 Enzim-substrat etkileşimin Jones modeli

Enzimlerin üzerindeki bu merkezler steroidlerin C-3, C-11 ve C-16 (normal bağlanma) veya C-3, C-6 (C-7) ve C-16 (ters bağlanma) atomlarına denk gelen hayali bir üçgen olarak verilebilir. Bu modele göre oksijenli merkezler ve bağlanma noktalarındaki oryantasyonları hidroksilasyon pozisyonunu belirlemektedir. Mesala, A halkasındaki bir oksijen fonksiyonu hidroksilasyonu D halkasına yönlendirirken, D halkasındaki bir oksijen fonksiyonu hidroksilasyonu A halkasına yönlendirir. Ayrıca hidroksilasyonu muhtemel bir pozisyon veya civarındaki bir oksijen fonksiyonunun belirtilen pozisyonun civarındaki hidroksilasyonları da engellediği gözlenmiştir. Yapılan çalışmalar neticesinde steroidler üzerindeki oksijen fonksiyonlarının enzime bağlanma ve hidroksilasyonları yönlendirmedeki etkinliklerinin $3\text{-CO}, 3\beta\text{-OH}, 3\beta\text{-OCH}_3 > 17\text{-CO} > 3\alpha\text{-OH}, 3\alpha\text{-OCH}_3$ şeklinde olduğu belirlenmiştir [8].

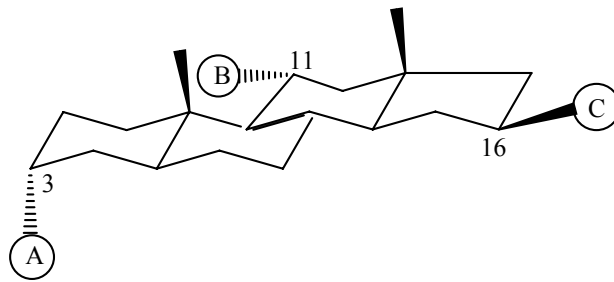
Brannon ve grubu steroid hidroksilasyonu için hidroksilaz bünyesinde dört bağlanma oryantasyonu olduğunu önerdiler [9]. Bunlar normal bağlanma oryantasyonu, ters bağlanma oryantasyonu, normal çevrilmiş bağlanma oryantasyonu ve ters çevrilmiş bağlanma oryantasyonlardır. Normal çevrilmiş ve ters çevrilmiş oryantasyonlar C-3 ve C-17 nolu atomları arasında aksisle 180 derecelik bir dönme ile elde edilirler. Normal ve ters oryantasyonlar daha tercih edilebilirdir ve Jones hidroksilasyon modeli sadece normal ve ters bağlanma oryantasyonlarını içermektedir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Brannon modeline göre bağlanma oryantasyonları

McCrintle ve grubu Jones modelinin biraz daha geliştirmişlerdir [10]. Bu modelde enzimin bünyesinde steroid halka sistemi düzleminin aşağısında ve yukarısında enzimin steroidlere bağlanabilecekleri ve steroidleri hidroksilleyebilecekleri A, B ve C ile adlandırılan özel bölgelerin olduğu düşünülmektedir. A bölgesi steroid halka sistemi düzleminin aşağısında, B bölgesi halka sistemi düzleminin aşağısında veya hizasında C bölgesi ise halka sistemi düzleminin yukarısındadır (Şekil 2.5).

Bağlanmada A bölgesi halka sistemi düzleminin aşağısındaki oksijen atomlarını tercih eder ve hidroksilasyon α -oryantasyonludur. B bölgesi de bağlanma için halka sistemi düzleminin aşağısındaki oksijen atomlarını tercih eder ama hidroksilasyon α -oryantasyonlu (aksiyal veya ekvatoryal) veya β -oryantasyonludur (sadece ekvatoryal). C bölgesi ise bağlanmada halka sistemi düzleminin aşağısındaki oksijen atomlarını tercih eder ve hidroksilasyon β -oryantasyonludur (sadece ekvatoryal).



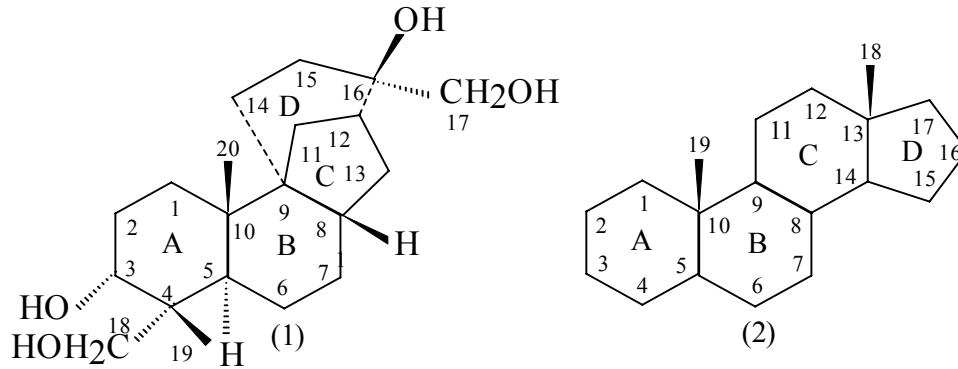
Şekil 2.5 Enzim-substrat etkileşim McCrintle modeli

Steroid hidroksilasyon modelleri nerde ise tamamı küflerin gerçekleştirdiği hidroksilasyonlar neticesinde belirlenmişlerdir [8-10]. Ayrıca küfler ile değişik substratlar kullanarak farklı mikrobiyolojik transformasyonlar da gerçekleştirilebilmektedir [11].

2.2. *Cephalosporium aphidicola* ile Steroid Biotransformasyonları

Cephalosporium aphidicola tetrasiklik bir diterpenoid olan aphidicolin'i (1) üreten bir kültür. Aphidicolin (1) antiviral ve antitümör özellikleri olan bir bileşiktir [12]. Bu küf aphidicolin bileşiğini bir seri hidroksilasyonlar ile sentezlemektedir. *Cephalosporium aphidicola* bünyesindeki aphidicolin biyosentezinin son kısmı aphidicolan-16-ol bileşiğinin önce C-18'de hidroksilasyonu, sonra C-3'de hidroksilasyonu ve en son C-17'de hidroksilasyon ile gerçekleşir [5].

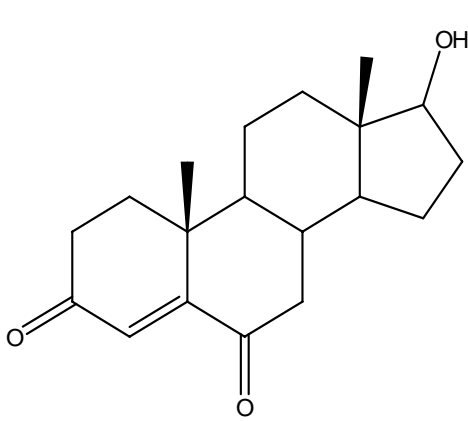
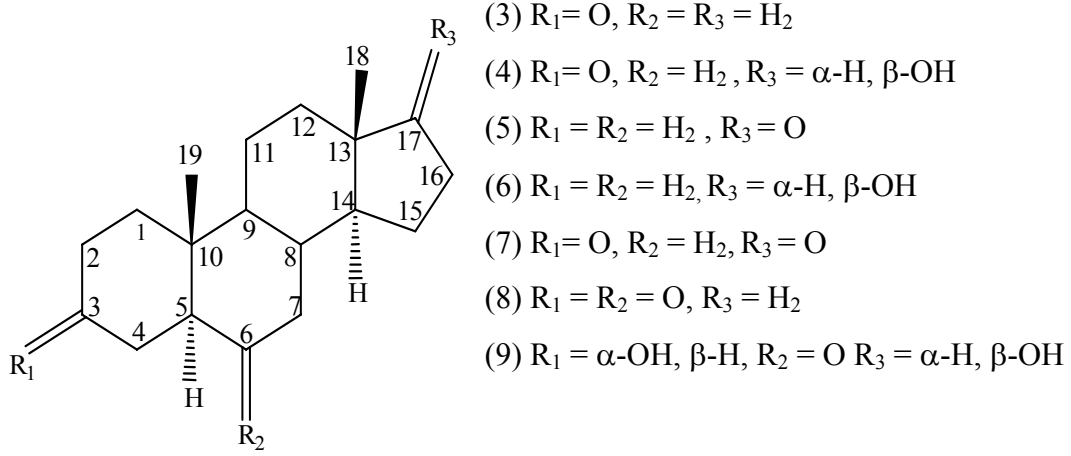
Aphidicolin (1) bileşiğinin *Cephalosporium aphidicola* küfündeki biyosentezinin bir seri hidroksilasyonlar neticesinde gerçekleşmesi sebebi ile bu küfün aphidicoline benzer yapıya sahip steroidleri de (2) hidroksilleyebileceği fikrinden yola çıkılarak çok sayıda steroidin biyotransformasyonu gerçekleştirilmiştir [13-34].



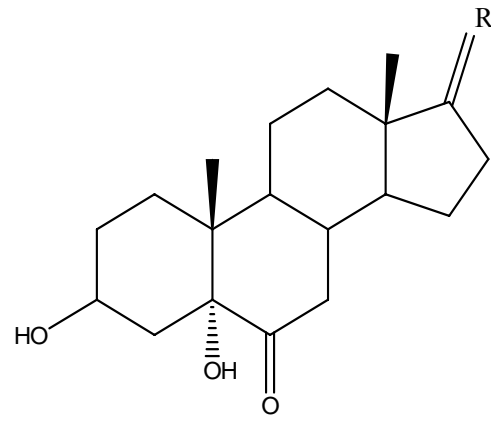
Şekil 2.6 Aphidicolin ve Steroid ana yapısı

Bazı mono ve diketoandrostanlar *Cephalosporium aphidicola* ile biyotransformasyonlara tabi tutuldu [13]. 5α -Androstan-3-on'un (3) biyotransformasyonu sonucunda 17β -hidroksi- 5α -androstan-3-on (4) elde edildi. 5α -Androstan-17-on (5) bileşiğinin biyotransformasyonu 17β -hidroksi- 5α -androstan (6) verdi. 5α -Androstan-3, 17-dion (7) bileşiğinin biyotransformasyon sonucunda 17β -alkol (4)

elde edildi. 5α -Androstan-3, 6-dion (8) inkubasyonu $3\alpha,17\beta$ -dihidroksi- 5α -androstan-6-on (9), 17β -hidroksiandrost-4-en-3, 6-dion (10), $3\beta, 5\alpha$ -dihidroksiandrostan-6, 17-dion (11) ve $3\beta, 5\alpha, 17\beta$ -trihidroksiandrostane-6-on (12) metabolitlerini verdi. Bu sonuçlar küfün substratları genellikle C-17'de hidroksillediğini ve bunun yanında az da olsa C- 5α pozisyonunu da hidroksillediğini gösterdi.

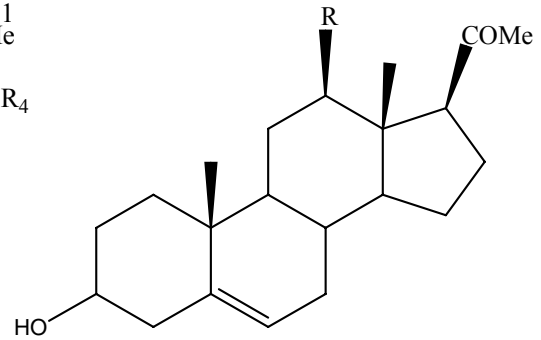
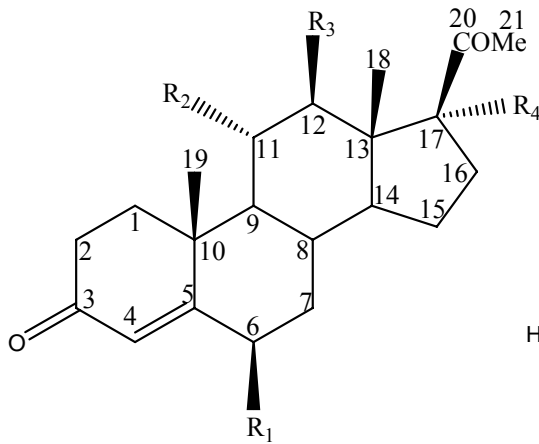


(10)

(11) $R = O$ (12) $R = \alpha-H, \beta-OH$

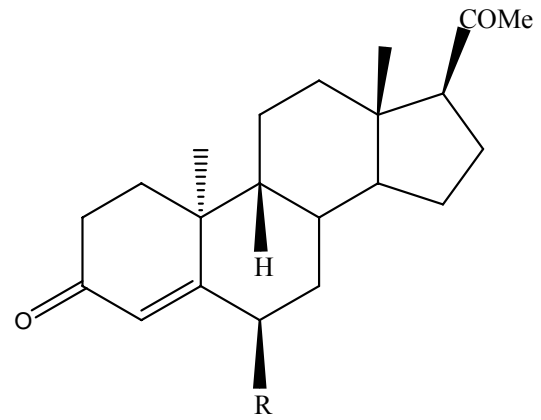
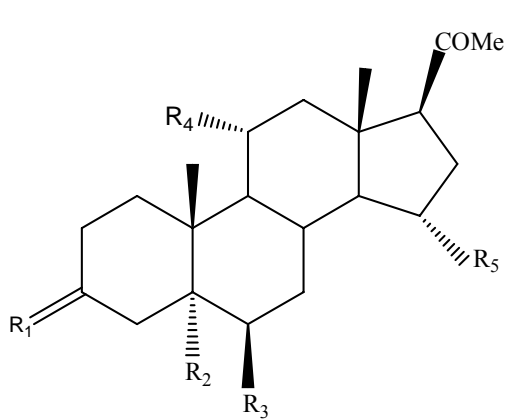
Şekil 2.7 Bazı mono ve diketoandrostanlar ve *Cephalosporium aphidicola* küfü ile biyotransformasyonu sonucu oluşan metabolitlerinin yapıları

Bazı pregnanlarında *Cephalosporium aphidicola* ile biyotransformasyonları gerçekleştirildi [14]. Progesteronun (13) *Cephalosporium aphidicola* ile 7 gün boyunca biyotransformasyonu sonunda ana ürün olarak 6 β , 11 α -dihidroksiprogesteron (14) ve 11 α -hidroksiprogesteronu (15) verdi. Bu sonuçlar progesteronun *Cephalosporium aphidicola* ile hidroksilasyonun önce 11 α ve sonra 6 β pozisyonlarında olduğunu gösterdi. Progesteronun *Cephalosporium aphidicola* ile biyotransformasyonu sonucunda yan ürün olarak 12 β , 17 α -dihidroksiprogesteron'u (16) verdi. 17 α -Hidroksiprogesteron'un (17) *Cephalosporium aphidicola* ile biyotransformasyonu sonucunda ana ürün olarak 12 β pozisyonunda (16), yan ürün olarak 6 β (18) ve 11 α (19) pozisyonlarında hidroksillenmiş metabolitler elde edildi. Buna göre 17 α pozisyonundaki hidroksil grubunun 6 β ve 11 α pozisyonlarındaki hidroksilasyonu azaltarak hidroksilasyonu 12 β pozisyonuna yönlendirdiği sonucuna varıldı. 11 α -Hidroksipreg-4-en-3, 20-dion'un (15) biyotransformasyonunda yalnız 6 β (14) pozisyonunda hidroksilasyon gözlemlendi. 3 β -Hidroksipreg-5-en-20-on'un (20) biyotransformasyonunda hidroksilasyon 12 β (21) pozisyonunda gerçekleşti. 5 α , 17 β -Pregnan-20-on'un (22) *Cephalosporium aphidicola* küfö ile biyotransformasyonu ana ürün olarak 3 β -hidroksi-5 α , 17 β -pregnan-20-on (23) ve 3 β , 6 β , 11 α -trihidroksi-5 α , 17 β -pregnan-20-on (24) verdi. 3 β -Hidroksi-5 α , 17 β -pregnan-20-on'un (23) biyotransformasyonunda hidroksilasyonlar 6 β , 11 α (24) ; 6 β , 15 α (25) ve 5 α , 11 α (26) pozisyonlarında gerçekleşti. 9 β , 10 α -Retroprogesteron (30) 7 gün boyunca küf ile biyotransformasyon sonucunda ana ürün olarak 6 β -hidroksi-9 β , 10 α -retroprogesteron (31) ve hiçbir değişikliğe uğramamış başlangıç maddesi elde edildi. 9 β , 10 α -Retroprogesteron bileşiğinin yapısındaki 10 α -metil grubunun varlığında C-11 karbonunun hidrolazın aktif bölgesine ulaşımının fiziki olarak inhibe olabileceği (sterik engelleme) sonucuna varıldı.



- (13) $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$
 (14) $R_1 = R_2 = OH, R_3 = R_4 = H$
 (15) $R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = R_4 = H$
 (16) $R_1 = R_2 = H, R_3 = R_4 = OH$
 (17) $R_1 = R_2 = R_3 = H, R_4 = OH$
 (18) $R_1 = OH, R_2 = R_3 = H, R_4 = OH$
 (19) $R_1 = R_2 = OH, R_3 = H, R_4 = OH$

- (20) $R = H$
 (21) $R = OH$



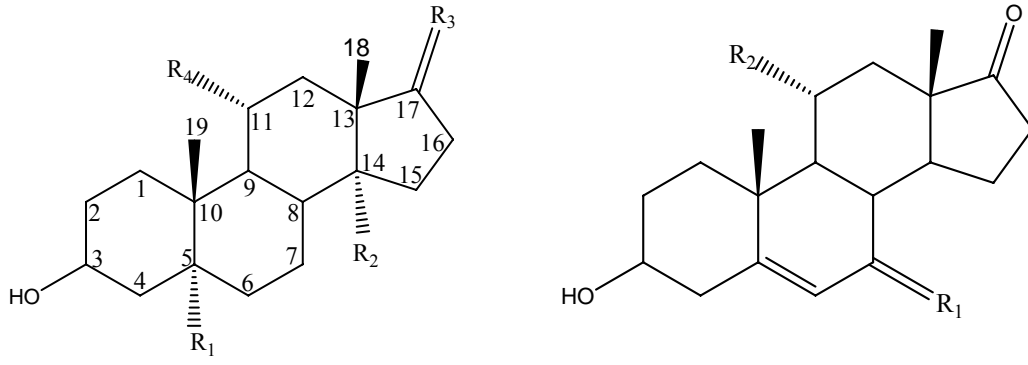
- (22) $R_1 = H_2, R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = H$
 (23) $R_1 = \alpha-H, \beta-OH, R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = H$
 (24) $R_1 = \alpha-H, \beta-OH, R_2 = H, R_3 = R_4 = OH, R_5 = H$
 (25) $R_1 = \alpha-H, \beta-OH, R_2 = H, R_3 = OH, R_4 = H, R_5 = OH$
 (26) $R_1 = \alpha-H, \beta-OH, R_2 = OH, R_3 = H, R_4 = OH, R_5 = H$

- (27) $R = H$
 (28) $R = OH$

Şekil 2.8 Bazı pregnanlar ve *Cephalosporium aphidicola* küfö ile biyotransformasyonu sonucu oluşan metabolitlerinin yapıları

Bazı testosteron türevleri de *Cephalosporium aphidicola* ile inkubasyonlara tabi tutuldu [15]. Testosteron türevlerinin biyotransformasyonlarında androst-4-en-3-on, 19-nortestosteron, 1-dehidrotestosteron, 1 α -metiltestosteron, androst-4-en-3, 17-dion ve 17 α -metiltestosteron'un *Cephalosporium aphidicola* küfö ile biyotransformasyonlarında ana hidroksilasyon 6 β pozisyonunda ve yan hidroksilasyon 14 β pozisyonunda gerçekleşti. Ayrıca 19-nortestosteron bileşiminin biyotransformasyonu neticesinde 10 β pozisyonunda da hidroksilasyonu gerçekleşti. Progesteron biyotransformasyonu esnasında önce C-11 α ve sonra C-6 β pozisyonlarında hidroksilasyon gerçekleştiği halde testosteron serilerinde C-6 β pozisyonunda hidroksilasyon gerçekleşti, C-11 α pozisyonunda hidroksilasyon gerçekleşmedi. Progesteronun tersine testosteron serilerinde birde C-14 α pozisyonunda hidroksilasyon gerçekleşti. Testosteron serilerinde 1 α pozisyonunda metil grubu veya A halkasında ikinci bir çifte bağın bulunması ve hatta 19. karbondaki metil grubunun yokluğu C-6'daki ana hidroksilasyonu engellemediği gözlemlendi.

Δ^5 -Androsten'lerin hidroksilasyonunu araştırmak için *Cephalosporium aphidicola* ile bazı biyotransformasyon çalışmaları da gerçekleştirildi [16]. 3 β -Hidroksi-5 α -androstan-17-on'ın (29) biyotransformasyonu C-11 α (30) pozisyonunda ana hidroksilasyon ile C-14 α (31) ve C-5 α (32) pozisyonlarında yan hidroksilasyon şeklinde sonuçlandı. 3 β -Hidroksiandrosten-5-en-17-on'ın (33) biyotransformasyonu C-7 β (34) ve C-7 α (35) pozisyonlarında ana hidroksilasyon ile C-11 α (36) pozisyonunda yan hidroksilasyon şeklinde gerçekleşti. Buna göre Δ^5 - çift bağı C-11 α pozisyonundaki hidroksilasyonu azaltarak C-14 α pozisyonundaki hidroksilasyonu C-7'ye yönlendirdiği sonucuna varıldı.



(29) $R_1=R_2=H$, $R_3=O$, $R_4=H$

(30) $R_1=R_2=H$, $R_3=O$, $R_4=OH$

(31) $R_1=H$, $R_2=OH$, $R_3=O$, $R_4=H$

(32) $R_1=OH$, $R_2=H$, $R_3=O$, $R_4=H$

(33) $R_1=H_2$, $R_2=H$

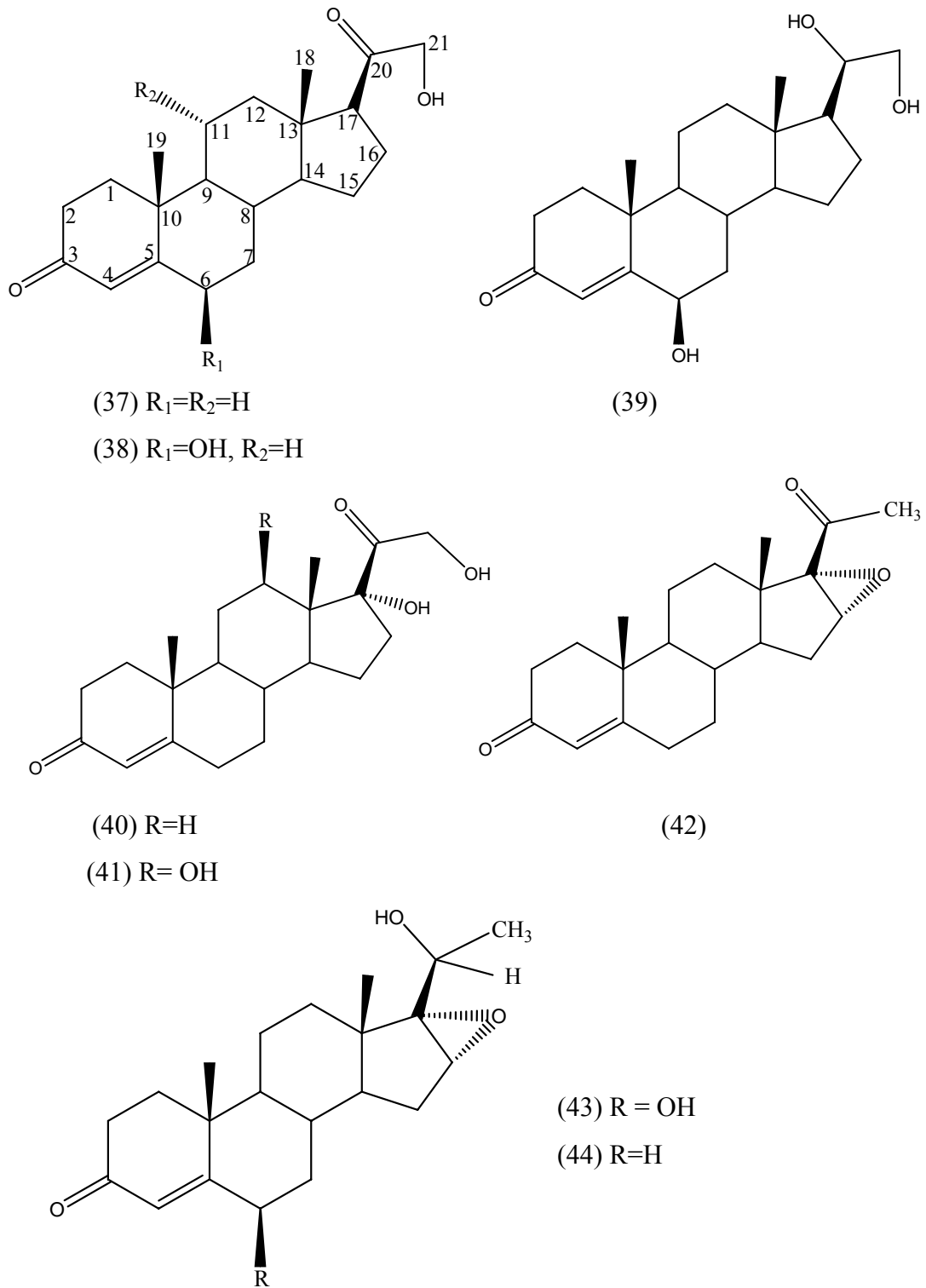
(34) $R_1=\alpha-H$, $\beta-OH$, $R_2=H$

(35) $R_1=\alpha-OH$, $\beta-H$, $R_2=H$

(36) $R_1=H_2$, $R_2=OH$

Şekil 2.9 Bazı Δ^5 -Androsten'ler ve *Cephalosporium aphidicola* küfü ile biyotransformasyonu sonucu oluşan metabolitlerinin yapıları

Bazı kortikosteroidlerde *Cephalosporium aphidicola* ile inkubasyona tabi tutuldu [17]. 21-Hidroksiprogesteron (37) biyotransformasyonunda hidroksilasyon C-6 β 'da (38) gerçekleşirken bununla birlikte C-20'de (39) bazı indirgenmeler oldu. 17 α , 21-Dihidroksiprogesteron'un (40) biyotransformasyonu sadece C-12 β 'da (41) hidroksilasyon ile sonuçlandı. 17 α , 21-Dihidroksiprogesteron'un (40) biyotransformasyonu ile progesteronun biyotransformasyonu karşılaştırıldığında 17 α -hidroksil grubu varlığının 11 α ve 6 β pozisyonlarındaki hidroksilasyonu azalttığı ve hidroksilasyonu 12 β pozisyonuna yönlendirdiği sonucuna ulaşıldı. Bununla birlikte 16 α , 17 α -epoksiprogesteron'un (42) biyotransformasyonu C-6 β 'da (43) hidroksilasyon ve bunun yanında C-20'de (44) indirgenme ile sonuçlandı. Bu sonuçlar C-11 α 'da hidroksilasyonun etkili olmadığı yerlerde C-6 β 'da hidroksilasyonun etkili olduğunu ortaya çıkardı.

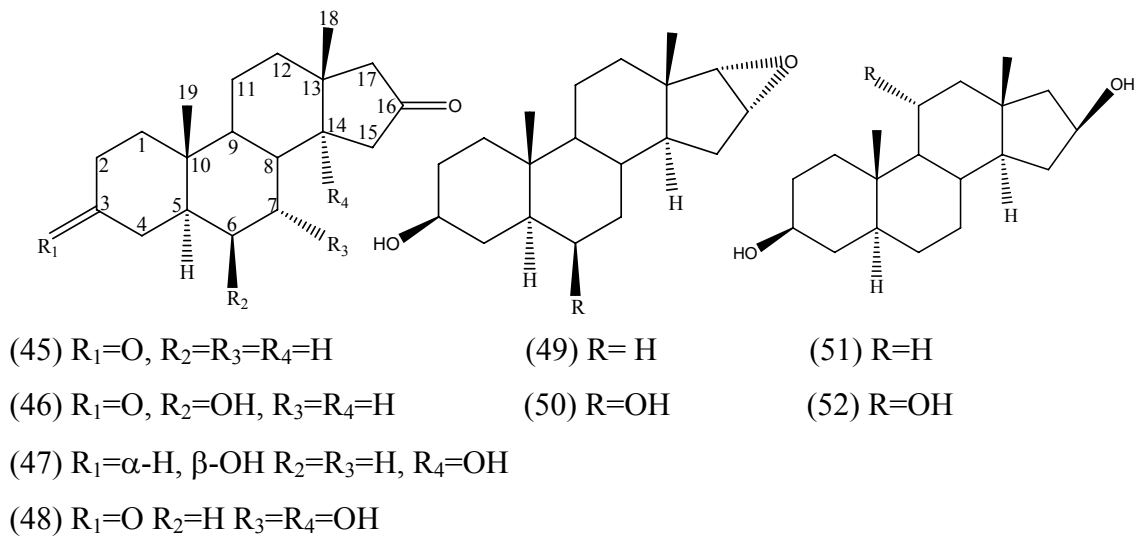


Şekil 2.10 Bazı kortikosteroidler ve *Cephalosporium aphidicola* küfü ile biyotransformasyonu sonucu oluşan metabolitlerinin yapıları

Bazı steroidal D laktonların biyotransformasyonları *Cephalosporium aphidicola* ile gerçekleştirildi [18]. Diğer steroidlerin biyotransformasyonlarında hidroksilasyon

genellikle C-6 β , C-11 α veya C-14 α 'da gerçekleştiği halde bu bileşiklerin hidroksilasyonu C-7'de gerçekleşti ve buna ilaveten C-3'de bazı indirgenmeler gözlemlendi. Bu sonuçlar steroidal D laktonların biyotransformasyonlarının farklı bir şekilde gerçekleştiğini gösterdi.

Cephalosporium aphidicola ile bazı 3,16-disubstitüe androstanlarda biyotransformasyona tabi tutuldu [19]. 5 α -Androstan-3, 16-dion'un (45) biyotransformasyonu sonucunda ana hidroksilasyon C-6 β 'da (46) ve yan hidroksilasyon C-14 α (47) ve C-7 α 'da (48) gözlemlendi. 3 β , 16 β -Dihidroksi-5 α -androstan'ın (49) biyotransformasyonunda hidroksilasyon C-11 α 'da (50) gerçekleşirken 16 α , 17 α -epoksi-5 α -androstan-3 β -ol'ün (51) hidroksilasyonu C-6 β 'da (52) gerçekleşti. Bununla birlikte diol'ün hidroksilasyonu C-11 α 'da gerçekleşirken 3, 16-diketon'ün hidroksilasyonu C-6 β 'da gerçekleşti. Bu sonuçların ışığında ketonun hidroksilasyonu C-6 β 'ya yönlendirdiği alkolün ise hidroksilasyonu C-11 α 'ya yönlendirdiği ve 16, 17-epoksitin ise 16-keton gibi davrandığı anlaşıldı.



Şekil 2.11 Bazı 3,16-disubstitüe androstanlar ve *Cephalosporium aphidicola* küfü ile biyotransformasyonu sonucunda oluşan metabolitlerinin yapıları

Bazı 13 α -metil steroidler ve 13 β izomerleri *Cephalosporium aphidicola* ile biyotransformasyona tabi tutuldu [20]. 13 β -Metil izomerlerinde hidroksilasyon C-11 α ve C-14 α pozisyonlarında gerçekleşirken 13 α -metil izomerlerinde hidroksilasyon C-1 α ve C-7 α pozisyonlarında gerçekleşti.

Cephalosporium aphidicola ile adrenosteron (androst-4-en-3,11,17-trion) bileşiğinin biyotransformasyonu herhangi bir mikrobiyal hidroksilasyon olmaksızın androsta-1,4-dien-3, 11, 17-trion, 17 β -hidroksiandrosta-1, 4-dien-3, 11-dion ve 17 β -hidroksiandrosta-1, 4-dien-3, 11-dion olmak üzere 3 metabolit ile sonuçlandı [21]. Bu bileşik muhtemel hidroksilasyon noktalarında zaten oksijen fonksiyonları içerdiğinden muhtemelen bahsedilen oksijen fonksiyonlarının kendi civarlarındaki hidroksilasyonu inhibe edebilmeleri sebebi ile herhangi bir mikrobiyal hidroksilasyon gözlenmedi.

Androsta-1,4-dien-3, 17-dion bileşiğinin *Cephalosporium aphidicola* ile 8 gün boyunca inkübasyonu androst-4-en-3, 17-dion, 17 β -hidroksiandrosta-1, 4-dien-3-on, 11 α -hidroksiandrosta-1, 4-dien-3, 17-dion, 11 α -hidroksiandrosta-1, 4-dien-3, 17-dion, 11 α , 17 β -dihidroksiandrosta-1, 4-dien-3-on ve 11 α , 17 β -dihidroksiandrosta-1, 4-dien-3-on gibi bazı yükseltgenmiş ve indirgenmiş metabolitler ile sonuçlandı [22]. Normal bağlanma oryantasyonu neticesinde hidroksilasyonun C halkasında (C-11) gerçekleşmiş olabileceği sonucuna varıldı.

Dehidroepiandrosteron (3 β -hidroksiandrosta-5-en-17-on) bileşiğinin *Cephalosporium aphidicola* ile biyotransformasyonu sonucunda 3 β -hidroksiandrosta-4-en-17-on ve 3 β , 4 β -dihidroksiandrosta-5-en-17-on bileşikleri elde edildi [23]. C veya B halkasında hidroksillenme beklenirken hidroksillenme alışılmadık bir şekilde A halkasında gözlemlendi.

17-Kloroandrosta-4,16-dien-3-on bileşiğinin *Cephalosporium aphidicola* ile biyotransformasyonu C-6 β , C-11 α and C-15 β pozisyonlarındaki hidroksilasyonlar ile sonuçlandı [24]. Klor atomunun bir oksijen fonksiyonu gibi hidroksilasyonu yönlendirdiği ve klor atomu civarında ise herhangi bir hidroksilasyon gözlenmediği sonucuna varıldı.

Bazı D halkasız androstanların *Cephalosporium aphidicola* ile biyotransformasyonları gerçekleştirildi [25]. Bu androstanların B halkasında normal steroidler ile benzer hidroksillenmeler gözlenirken C halkasında bu durum

gerçekleşmedi. Bu sonuçlar D halkasının tabiatının C halkasının hidroksillenmesinin belirlenmesinde önemli olduğunu düşündürdü.

Aphidicolin biyosentezi ile karşılaştırmak için A halkalarının yapıları aphidicoline benzeyen bazı 4, 4-dimetilandrost-5-en-3-on bileşikleri [26] ile bazı 4 β -hidroksi-4 α -metil-5 α -androstan bileşikleri [27] *Cephalosporium aphidicola* ile inkübasyona tabi tutuldu. Aphidicolin biyosentezinde hidroksilasyon A halkasında gerçekleşirken bu steroidlerin hidroksilasyonları B halkalarında gerçekleşti (C-7).

Cephalosporium aphidicola ile 3 α , 17 β -dihidroksi-5 α -androstan ve 3 β , 17 α -dihidroksi-5 α -androstan bileşikleri de inkübasyona tabi tutuldu [28]. Her iki bileşik muhtemelen ters bağlanma oryantasyonu neticesinde C-6 β pozisyonunda hidroksilendi. Ayrıca 3 α ,17 β -dihidroksi-5 α -androstan C-7 α pozisyonunda (normal çevrilmiş bağlanma oryantasyonu) hidroksillenirken 3 β ,17 α -dihidroksi-5 α -androstan C-11 β pozisyonunda hidroksillendi (normal bağlanma oryantasyonu).

Üç boyutlu yapıları diğer steroidlerden oldukça farklı olan bazı 5 β -metilestr-9-en bileşikleri [29] ile bazı 5 β -metil-19-norpregn-9-en bileşikleri [30] *Cephalosporium aphidicola* ile inkübasyona tabi tutuldu. Amaç yapıları oldukça farklı olan bu steroidler üzerine hidroksilaz enzimlerinin muhtemel etkilerini incelemektir. Bu steroidler üzerinde düşük verim ile de olsa da normal bağlanma oryantasyonu neticesinde C-11 β pozisyonunda mikrobiyal hidroksillenmeler gözlemlendi.

Metoksil grubunun steroidlerin mikrobiyal hidroksilasyonları üzerine etkilerini incelemek üzere hidroksil gruplarının yerini metoksil grupları almış bazı steroidlerin *Cephalosporium aphidicola* ile biyotransformasyonları gerçekleştirildi [31]. Her ne kadar bazı hidroksillenmeler elde edilse de mikrobiyal hidroksilasyonlar için hidroksil gruplarının metoksil gruplarından daha önemli olduğu anlaşıldı.

Cephalosporium aphidicola küfö ile bazı sentetik ilaçların da biyotransformasyonları gerçekleştirildi [32-35]. 17 α -Etil-17 β -hidroksiandrost-4-en-3-on (ethisterone) ve 17 α -etil-17 β -hidroksiandrost-4-en-3-on bileşiklerinin *Cephalosporium aphidicola* ile biyotransformasyonu sadece A halkasında yeni bir çift bağ oluşumu ile sonuçlandı

[32]. Norethisterone bileşiğinin *Cephalosporium aphidicola* ile biyotransformasyonu ise sadece yükseltgenme ürünü olan 17 α -etinilestradiol ile sonuçlandı [33]. Bu bileşikler hidroksilaza A halkasındaki karbonil grubu ile bağlansalar bile muhtemelen D halkasındaki etinil veya etil grupları sterik engellemeler ile bahsedilen bileşiklerin enzim bünyesinde hidroksillenmesini sağlayacak bir oryantasyonu kazanmasını önlemiş olabileceği sonucuna varıldı.

Kan lipid seviyesini düşürücü sentetik bir ilaç olan pregna-4, 17(20)-*cis*-dien-3, 16-dion (E-guggulsteron) *Cephalosporium aphidicola* ile 3 gün boyunca biyotransformasyona tabi tutuldu. Hidroksilasyon normal bağlanma oryantasyonuna uygun olacak şekilde C-11 α 'da meydana geldi [34].

Sentetik bir anabolik steroid olan Danazol (17 α -pregna-2, 4-dien-20-ino[2, 3-d]isoksazol-17-ol) bileşiğinin *Fusarium lini*, *Aspergillus niger* ve *Cephalosporium aphidicola* küfleri ile biyotransformasyonları 17 β -hidroksi-2-(hidroksimetil)-17 α -pregn-4-en-20-in-3-on ve 17 β -hidroksi-2-(hidroksimetil)-17 α -pregna-1, 4-dien-20-in-3-on metabolitlerinin oluşumu ile sonuçlandı [35]. Bu bileşiğin yapısındaki ek heterosiklik halkanın hidroksilazlar harici enzim veya enzimlerce parçalanması sonrasında A halkasında hidroksilasyon gerçekleştiği sonucuna varıldı.

2.3. Çalışmanın Amacı

Jones modeline göre steroidlerin enzime bağlanmaları ve mikrobiyal hidroksilasyonu C-3, C-11 ve C-16 (normal bağlanma) veya C-3, C-6 (C-7) ve C-16 (ters bağlanma) atomlarına bağlı oksijen fonksiyonu içeren gruplara bağlıdır. Mesala, bu C atomlarından olan C-3 atomuna bağlı bir hidroksil grubu enzimimin aktif bölgelerindeki amino asitlerin yan grupları ile hidrojen bağı oluşumu veya iyonik etkileşimlere girebilir bu durumda enzim substrata bağlanabilir ve daha sonra mikrobiyal hidroksilasyon gerçekleşebilir. Steroidler A halkasında bulunan bir 3 β -OH veya 3 α -OH grubu ile hidroksilaz enzimlerine bağlanabilirler. Bu durumda steroidlerin D halkasında da bir oksijen fonksiyonu varsa mikrobiyal hidroksilasyon muhtemelen C halkasında (C-11 veya C-12) veya B halkasında (C-6 veya C-7) gerçekleşebilir.

Bu çalışmanın amacı steroidlerin hidroksilaz enzimlerine bağlanmasında önemli olan C-3 atomuna bağlı bir hidroksil grubuna ilaveten aynı karbona bağlı olan metil grubunun steroidlerin biyotransformasyonuna olabilecek etkilerini incelemektir. Bu amaçla 3β , 20-dihidroksi- 3α , 20-dimetilpregn-4-en ve 3α , 17 β -dihidroksi- 3β -metilestr-4-en bileşiklerinin *Cephalosporium aphidicola* küfü ile biyotransformasyonları gerçekleştirildi.

BÖLÜM 3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

Biyotransformasyon çalışmalarında kullanılan besi yeri ve cam malzemelerin sterilizasyonu Nüve OT 020 marka otoklav ile gerçekleştirildi. Küflerin geliştirilmesi ve biyotransformasyon çalışmaları için Gerhardt THO 500 Laboshake Çalkalamalı İnkübatör kullanıldı. Infrared spektrumları, KBr diskleri kullanılarak ATI Mattson Infinity Series FTIR spektrometre cihazı ile alındı. ¹H-NMR spektrumları tetrametilsilan standart iç sinyal olarak kullanılarak, 300 MHz'de döterokloroform içerisinde ve Varian Mercury 300 NMR spektrometresi kullanılarak alındı. ¹³C-NMR spektrumları, aynı cihaz kullanılarak 75 MHz'de döterokloroform içerisinde alındı. Kolon kromatografisi için Merck kalite silika jel 60 (230-400 mesh) kullanıldı. Alumina ile gerçekleştirilen kolon kromatografisi çalışmaları Merck kalite aktif nötral alumina 90 (70-230 mesh) ile gerçekleştirildi. Biyotransformasyon deneyinin sonucu ve kolon kromatografisi çalışmalarının sonuçları ince tabaka kromatografisi (İTK) ile izlendi. İTK 0,25 mm kalınlığında silika jel tabakaları (Merck silika jel GF254) ve etil asetat-hekzan (1:1) çözgen sistemi kullanılarak yapıldı. Bileşikler önce UV lambası altında gözlendi, daha sonra iyot buharına maruz bırakılarak belirgin hale getirildi. Erime noktaları Elektro thermal IA 9200 erime noktası tayin cihazı ile tespit edildi. Besi yeri filtrasyonunun daha etkin olabilmesi için filtre kağıtları arasında uygun miktarlarda Celite kullanıldı.

Mikrobiyal biyotransformasyon çalışmasında kullanılan *Cephalosporium aphidicola* IMI 68689 küfü Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyotransformasyon Araştırma Laboratuvarından yatık agar kültürü şeklinde bir adet stok kültür olarak tedarik edildi.

Çalışmada biyotransformasyonları *Cephalosporium aphidicola* küfü ile gerçekleştirilen 3 β , 20-dihidroksi-3 α , 20-dimetilpregn-4-en ve 3 α , 17 β -dihidroksi-3 β -metilestr-4-en bileşikleri Kocaeli Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümünden tedarik edildi..

3.2. Metot

3.2.1. Taze yatık agar kültürlerin hazırlanması

PDA (potato dekstroz agar) (5,85 g) ve agar (1,35 g) karışımı saf su ile 150 mL'ye tamamlandıktan sonra kaynatılarak besi yeri hazırlandı [2]. Hazırlanan besiyeri soğumadan 15 adet 22 mL'lik Universal marka patolojik cam şişelerin yarısına kadar ilave edildi ve otoklav içerisinde 121 °C'de 20 dakika sterilize edildi. Sterilizasyondan sonra şişeler içerisinde erimiş haldeki besi yerleri, donmadan önce 45°'ye yakın bir eğim oluşturacak şekilde soğumaya bırakılmak suretiyle yatık agar besi yerleri elde edildi.

Stok fungal kültürdeki küflerin bir kısmı yatık agar besiyerlerinin 3 tanesine steril şartlarda aktarıldı ve oda sıcaklığında 15 gün süresince çoğalmaya bırakıldı. Bu şekilde hazırlanan yeni yatık agar kültürlerinin en gelişmişindeki küfler 15 günde bir 3 yeni yatık agar besiyerine steril şartlarda aktarıldı. Bu aktarma işlemi 2 kez tekrarlandıktan sonra elde edilen en taze ve en gelişmiş yatık agar kültüründeki küfler biyotransformasyon çalışmasında kullanıldı.

3.2.2. *Cephalosporium aphidicola* küfünün besi yerinin hazırlanması

Cephalosporium aphidicola besi yerinin hazırlanması için kullanılan kimyasal maddelerin listesi ve bir litre çözeltili içinde bulunan miktarları Tablo 3.1'de verilmiştir [29].

Tablo 3.1 Besi yeri çözeltisinin bileşenleri

Bileşenler	Miktar
Glukoz	50,0 g
KH ₂ PO ₄	5,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,0 g
Glisin	2,0 g
KCl	1,0 g
Eser element çözeltisi	2,0 mL

Besi yerine katılan eser element çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler ve bir litre çözelti içinde bulunan miktarları Tablo 3.2’de verilmiştir [30].

Tablo 3.2 Eser element çözeltisi bileşenleri

Bileşenler	Miktar (g)
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,6
FeSO ₄ .7H ₂ O	1,0
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	1,0
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	1,0
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,1
MnSO ₄ .7H ₂ O	0,1

3.3. Bileşiklerin *Cephalosporium aphidicola* ile Biyotransformasyonu

3.3.1. 3β, 20-Dihidroksi-3α, 20-dimetilpregn-4-en bileşiğinin biyotransformasyonu

Sterilize edilen 1 L besiyeri 10 adet 250 mL erlene paylaştırıldıktan sonra otoklavda sterilize edildi. Daha önce hazırlanan en taze alt kültürdeki küf erlenlerinden birine steril şartlar altında nakledildi. Bu erlen yeterli miktarda küf oluşabilmesi için 3 gün boyunca 30°C’de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

Küf içeren erlenin muhtevassından diğer erlenlere steril şartlar altında yaklaşık 1 mL numune nakledildikten sonra bu erlenler de yeterli miktarda küf oluşabilmesi için 3 gün süresince 30°C’de inkübasyona bırakıldı.

3 β , 20-Dihidroksi-3 α , 20-dimetilpregn-4-en (400 mg) etanol (20 mL) içerisinde çözünerek yeterli miktarda küf içeren erlenlere eşit hacimlerde, steril koşullar altında ilave edildikten sonra 10 gün süresince 30 °C’ de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon işlemi tamamlandıktan sonra, besi yeri bir Buchner hunisi yardımıyla filtre kağıtları arasında Celite kullanılarak filtrasyon işlemine tabi tutuldu ve besi yeri küf kültürüne ait misellerden süzülerek ayrıldı. Buchner hunisinde kalan miseller etil asetat kullanılarak yıkandı. Erlendeki süzütünün pH değeri %10’luk hidroklorik asit çözeltisi yardımıyla 2’ye ayarlandı ve her seferinde 1 L etil asetat kullanılarak 3 ekstraksiyon gerçekleştirildi. Daha sonra ekstraktlara susuz sodyum sülfat katılarak ortamda bulunabilecek su uzaklaştırıldı. Etil asetat evaporatörde uzaklaştırıldıktan sonra 500 mg yağimsı bir madde elde edildi.

Başlangıç maddesi ve elde edilen yağimsı maddeyi karşılaştıracak şekilde bir İTK çalışması geliştirildiğinde başlangıç maddesi ile aynı polariteye sahip tek bir bileşik gözlemlendi. Yağimsı madde daha sonra silika jel 60 üzerinde kolon kromatografisine tabi tutuldu. Kolonda çözgen sistemi olarak hekzan içerisinde artan oranlarda etil asetat kullanıldı. Kolondan % 5’lik çözgen sistemi ile İTK’da gözlenen bileşik yağimsı bir madde (320 mg) olarak elde edildi. Kolon kromatografisi sırasında ve sonrasında yapılan İTK çalışmalarında bileşik ile beraber bazı safsızlıkların bulunduğu gözlemlendi. Küçük bir kolon ile az miktarda aktif nötral alumina üzerinde kısa süreli kolon kromatografisine maruz bırakılarak saflaştırıldığında bileşik (290 mg) etil asetatın iğne şeklinde kristaller olarak elde edildi.

Erime noktası: 146-147 °C (Literatür 145-147 °C [36]), ν_{max} cm⁻¹: 3306, δ_H (CDCl₃) 0.82 (3H, s, 18-H), 1.16 (3H, s, 3-CH₃), 1.23 (3H, s, 19-H), 1.28 ve 1.29 (her biri 3H, s, 21-CH₃ ve 22-CH₃), 0.90-2.20 (1H, m*, 20-H), 5.17 (1H, s, 4-H).

(m* : üst üste çakışan multiplerler)

3.3.2. 3 α , 17 β -Dihidroksi-3 β -metilestr-4-en bileşiğinin biyotransformasyonu

Sterilize edilen 2 L besi yeri 20 adet 250 mL erlene paylaştırıldıktan sonra otoklavda sterilize edildi. Daha önce hazırlanan en taze alt kültürdeki küf erlenlerden birine steril şartlar altında nakledildi. Bu erlen yeterli miktarda küf oluşabilmesi için 3 gün boyunca 30 °C’de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

Küf içeren erlenin muhtevasından diğer erlenlere steril şartlar altında yaklaşık 1 mL numune nakledildikten sonra bu erlenler de yeterli miktarda küf oluşabilmesi için 3 gün süresince 30 °C’de inkübasyona bırakıldı.

3 α ,17 β -Dihidroksi-3 β -metilestr-4-en (900 mg) etanol (20 mL) içerisinde çözünerek yeterli miktarda küf içeren erlenlere eşit hacimlerde, steril koşullar altında ilave edildikten sonra 10 gün süresince 30 °C’de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon işlemi tamamlandıktan sonra, besi yeri bir Buchner hunisi yardımıyla Celite kullanılarak ve vakum altında fungal kültüre ait misellerden süzülerek ayrıldı. Buchner hunisinde kalan miseller etil asetat kullanılarak yıkandı. Erlendeki süzütünün pH’sı %10’luk hidroklorik asit çözeltisi yardımıyla 2’ye ayarlandı ve her seferinde 2 L etil asetat kullanılarak 3 ekstraksiyon gerçekleştirildi. Daha sonra ekstraktlara susuz sodyum sülfat katılarak etil asetatta kalabilecek su ortamdan uzaklaştırıldı. Etil asetat evaporatörde uzaklaştırıldıktan sonra 1 g yağimsı bir madde elde edildi.

Başlangıç maddesi ve elde edilen yağimsı maddeyi karşılaştıracak şekilde bir İTK çalışması geliştirildiğinde başlangıç maddesi ile aynı polariteye sahip tek bir bileşiğin varlığı gözlemlendi. Yağimsı madde daha sonra silika jel 60 üzerinde kolon kromatografisine tabi tutuldu. Kolonda çözgen sistemi olarak hekzan içerisinde artan oranlarda etil asetat kullanıldı. Kolondan % 5’lik çözgen sistemi ile bileşik yağimsı bir madde (800 mg) olarak elde edildi. Kolon kromatografisi sırasında ve sonrasında yapılan İTK çalışmalarında bileşik ile beraber bazı safsızlıkların bulunduğu gözlemlendiğinden küçük bir kolon ile az miktarda aktif nötral alumina üzerinde kısa

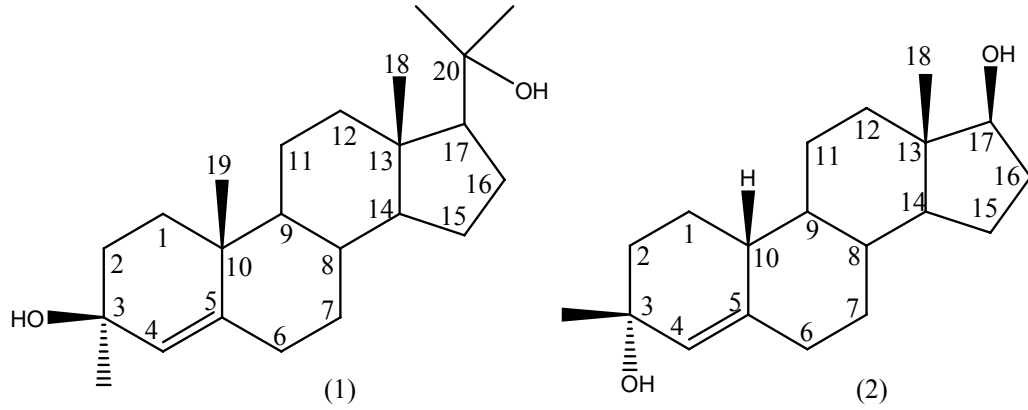
sürelili kolon kromatografisine maruz bırakıldıktan sonra bileşik (700 mg) etil asetatın prizmalar şeklinde kristaller olarak elde edildi.

Erime noktası 146-147 °C (Literatür 144-147 °C [37]), ν_{max} cm^{-1} : 3335, 1652,
 $\delta_H(CDCl_3)$ 0.75 (3H, s, 18-H), 1.24 (3H, s, 3-CH₃), 0.70-2.20 (1H, m*, 20-H), 3.61
(1H, t, J 8.6 Hz, 17 α -H), 5.28 (1H, s, 4-H).
(m* üst üste çakışan multipler)

BÖLÜM 4. DENEYSEL BULGULAR

Biyotransformasyon çalışmalarından elde edilen bileşiklerin yapılarını belirlemek için hem başlangıç maddelerinin hem de elde edilen bileşiklerin $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, ^{13}C APT NMR, IR spektrumları alındı ve erime noktaları tayin edildi.

Biyotransformasyonları gerçekleştirilen 3β , 20-dihidroksi- 3α , 20-dimetilpregn-4-en (1) ve 3α , 17 β -dihidroksi- 3β -metilestr-4-en (2) bileşiklerinin karbon iskeletlerinin numaralandırılması Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1 Başlangıç maddelerinin karbon iskeletlerinin numaralandırılması.

3β , 20-Dihidroksi- 3α , 20-dimetilpregn-4-en (1) ve *Cephalosporium aphidicola* ile biyotransformasyonundan elde edilen bileşiğin $^1\text{H-NMR}$ spektrumlarının değerlendirilebilmesi amacıyla bu spektrumların karşılaştırılması Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1 3 β ,20-Dihidroksi-3 α ,20-dimetilpregn-4-en ve bileşiğın ¹H-NMR spektrumlarının karşılaştırılması

3 β ,20-Dihidroksi-3 α ,20-dimetilpregn-4-en		Bileşik			
Kimyasal kayma (ppm)	J sabitleri (Hz)	Kimyasal kayma (ppm)	J sabitleri (Hz)	Yarılma Tipi	Proton
5,17	-	5,17	-	s	4-H
1,29	-	1,29	-	s	20-CH ₃
1,28	-	1,28	-	s	20-CH ₃
1,23	-	1,23	-	s	19-H
1,16	-	1,16	-	s	3-CH ₃
0,90-2,20	-	0,90-2,20	-	*	**
0,82	-	0,82	-	s	18-H

* Üst üste çakışan multipler
 ** 0,90-2,20 ppm arasında gelen diğer protonlar

Tablo 4.1'den de gözleneceği gibi başlangıç maddesi ile bileşiğın ¹H-NMR spektrumları karşılaştırıldığında bu maddelerin aynı olduğu anlaşıldı. Her iki bileşiğın aynı yerlerde rezonansa gelen bazı protonlara ait belirgin 6 sinyal varken diğer protonlar ise 0,90-2,20 ppm arasında üst üste çakışan multipler olarak rezonansa geldi.

Başlangıç maddesi ile bileşiğın 4-H protonuna ait sinyaller çift bağıın etkisinden dolayı 5,17 ppm'de gözlemlendi. Her iki bileşiğın C-10 atomuna bağılı metil grubu (19-H) ile C-3 atomuna bağılı metil grubuna ait protonlar sırası ile 1,23 ppm ve 1,16 ppm'de gözlemlendi. İki bileşiğın C-20 atomuna bağılı 2 metil grubuna ait protonlarının sinyalleri ise hidroksil grubunun etkisinden dolayı 1,28 ve 1,29 ppm'de rezonansa geldi. Başlangıç maddesi ile metabolitin C-13 atomuna bağılı metil grubu (18-H) protonları ise 0,82 ppm'de gözlemlendi. Başlangıç maddesi ile ilgili bileşiğın ¹H-NMR spektrumları sırası ile Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'de verilmiştir.

3 β , 20-Dihidroksi-3 α , 20-dimetilpregn-4-en (1) ve *Cephalosporium aphidicola* ile biyotransformasyonundan elde edilen bileşiğın ¹³C-NMR spektrumlarının

değerlendirilebilmesi amacıyla bu spektrumların karşılaştırılması Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2. 3 β ,20-Dihidroksi-3 α ,20-dimetilpregn-4-en ve bileşiğin ¹³C-NMR spektrumlarının karşılaştırılması

	3 β ,20-Dihidroksi-3 α ,20-dimetilpregn-4-en	Bileşik
C-1	23,67	23,67
C-2	35,46	35,45
C-3	73,42	73,44
C-4	126,68	126,67
C-5	145,61	145,62
C-6	35,10	35,10
C-7	32,80	32,82
C-8	35,20	35,22
C-9	54,11	54,13
C-10	42,77	42,79
C-11	22,94	22,97
C-12	37,31	37,32
C-13	40,04	40,07
C-14	56,10	56,12
C-15	32,05	32,06
C-16	20,91	20,93
C-17	60,03	60,08
C-18	13,49	13,49
C-19	18,64	18,66
C-20	69,95	69,96
3α-CH₃	29,90	29,90
20-CH₃	32,07	32,08
20-CH₃	32,05	32,06

3 β , 20-Dihidroksi-3 α , 20-dimetilpregn-4-en ile bileşiğin ¹³C-NMR spektrumları karşılaştırıldığında (Tablo 4.2) bu maddelerin aynı olduğu fikri daha da güçlendi. Başlangıç maddesi ile bileşiğin ¹³C-NMR spektrumları (sırası ile Şekil 4.4 ve Şekil 4.5) ile ¹³C APT NMR spektrumları (sırası ile Şekil 4.6 ve Şekil 4.7) karşılaştırıldığında bütün spektrumlarda hemen hemen aynı yerlerde rezonanslara

gelen toplam 23 karbon atomu sinyali gözlemlendi (Tablo 4.2, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6 ve Şekil 4.7).

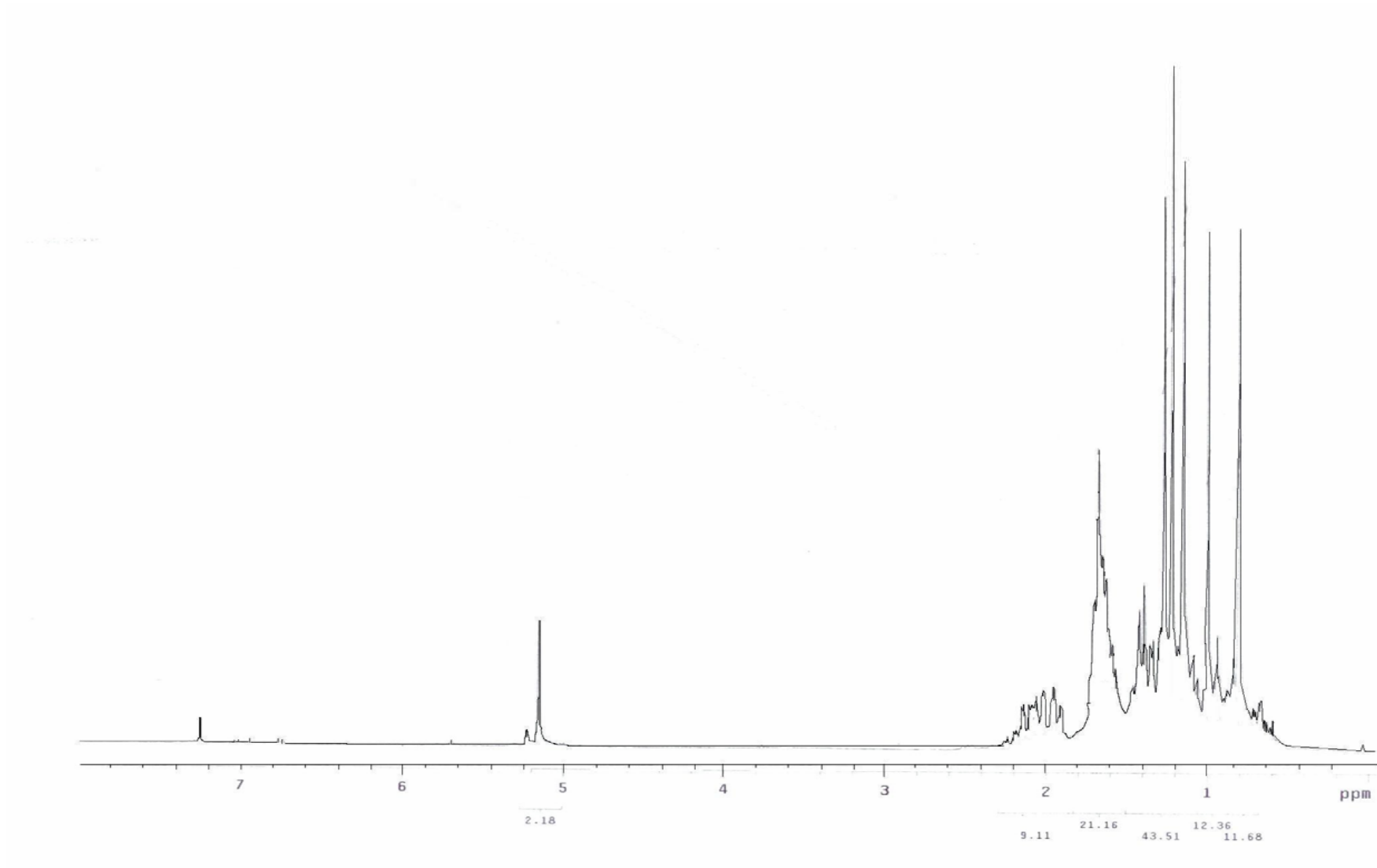
Her iki bileşiğin ^{13}C APT NMR spektrumları detaylı olarak incelendiğinde (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7) yapılarında 5 metil karbonu (C-18, C-19, $3\alpha\text{-CH}_3$, 20-CH_3 ve 20-CH_3), 8 metilen karbonu (C-1, C-2, C-6, C-7, C-11, C-12, C-15 ve C-16), 5 metin karbonu (C-4, C-8, C-9, C-14 ve C-17) ve 5 kuarterner karbon atomu (C-3, C-5, C-10, C-13 ve C-20) olduğu anlaşıldı.

İki bileşiğin ^{13}C APT NMR spektrumlarındaki metil karbonları ile metin karbonları (toplam 10 sinyal) aynı yönlerde gelirken metilen karbonları ile kuarterner karbonlar (toplam 13 sinyal) aynı yönlerde rezonansa geldi (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7).

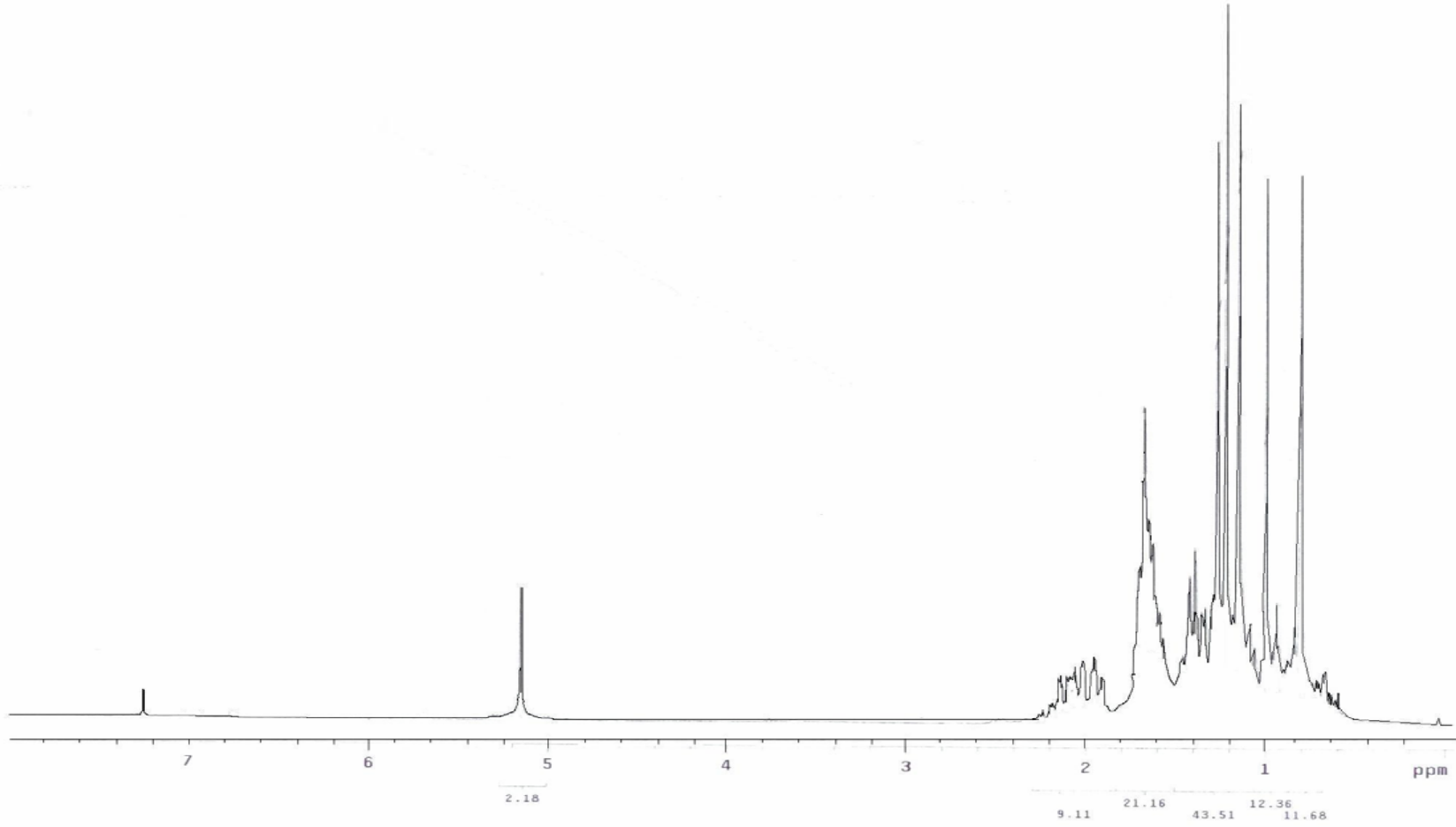
3β , 20-Dihidroksi- 3α , 20-dimetilpregn-4-en ile bileşiğin IR spektrumları (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9) incelendiğinde her iki spektrumda da 3300 cm^{-1} civarında bir hidroksil grubu absorpsiyonu gözlemlendi.

3β , 20-Dihidroksi- 3α , 20-dimetilpregn-4-en ile bileşiğin erime noktalarının da birbirlerine oldukça yakın olduğu tespit edildi. 3β ,20-Dihidroksi- 3α ,20-dimetilpregn-4-en bileşiğinin erime noktası $145\text{-}147\text{ }^\circ\text{C}$ olarak bulunurken bileşiğin erime noktası $146\text{-}147\text{ }^\circ\text{C}$ olarak bulundu.

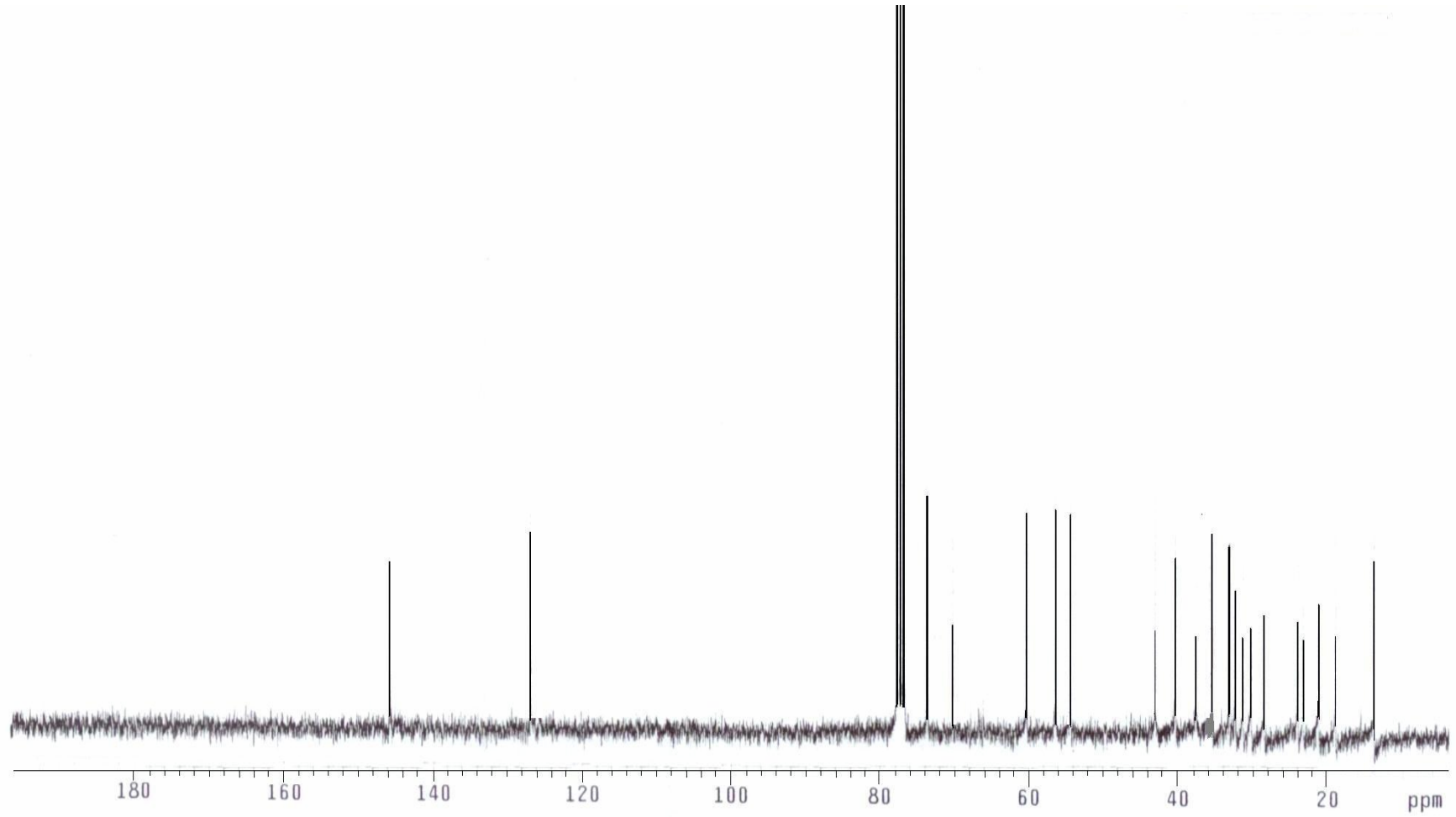
Bütün spektroskopik tekniklerden elde edilen bilgilerin ve erime noktalarının karşılaştırılması neticesinde 3β , 20-dihidroksi- 3α , 20-dimetilpregn-4-en'in *Cephalosporium aphidicola* ile inkübasyonunun sadece başlangıç maddesi ile sonuçlandığı anlaşıldı.



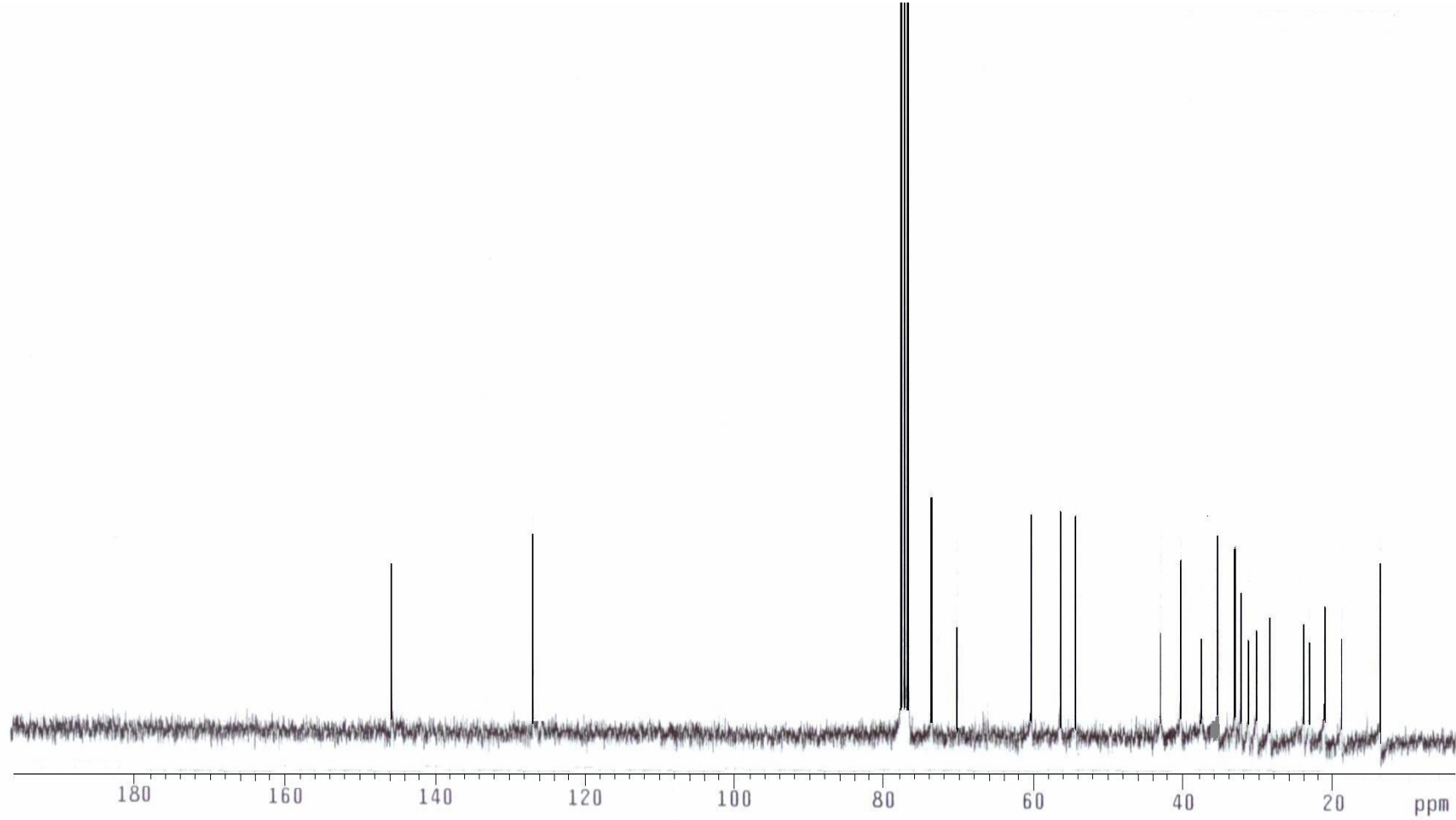
Şekil 4.2 3β,20-Dihidroksi-3α,20-dimetilpregn-4-en'in ¹H-NMR spektrumu



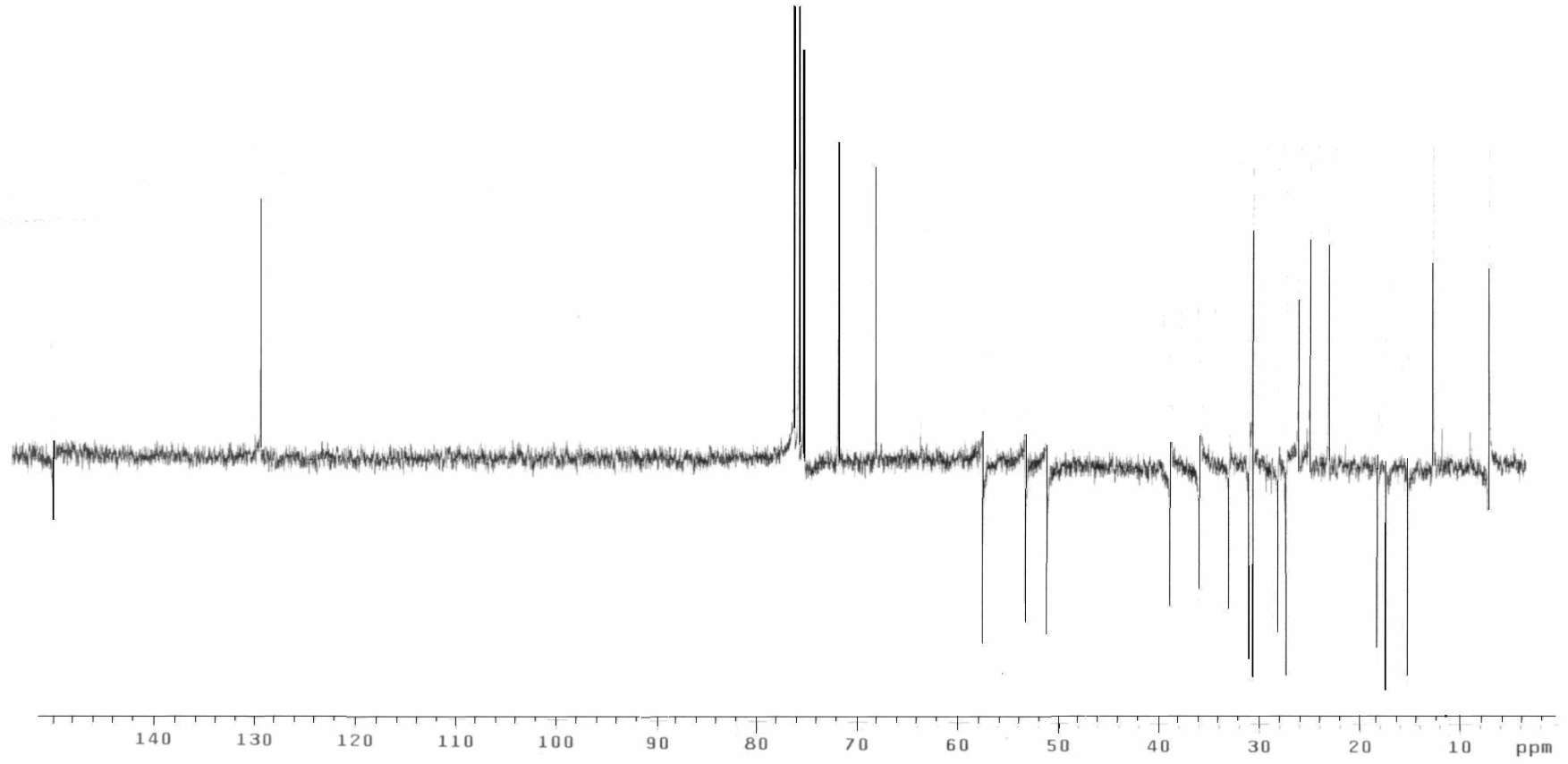
Şekil 4.3 3 β ,20-Dihidroksi-3 α ,20-dimetilpregn-4-en'in *Cephalosporium aphidicola* küfö ile biyotransformasyonu sonucu oluşan bileşigin ¹H-NMR spektrumu



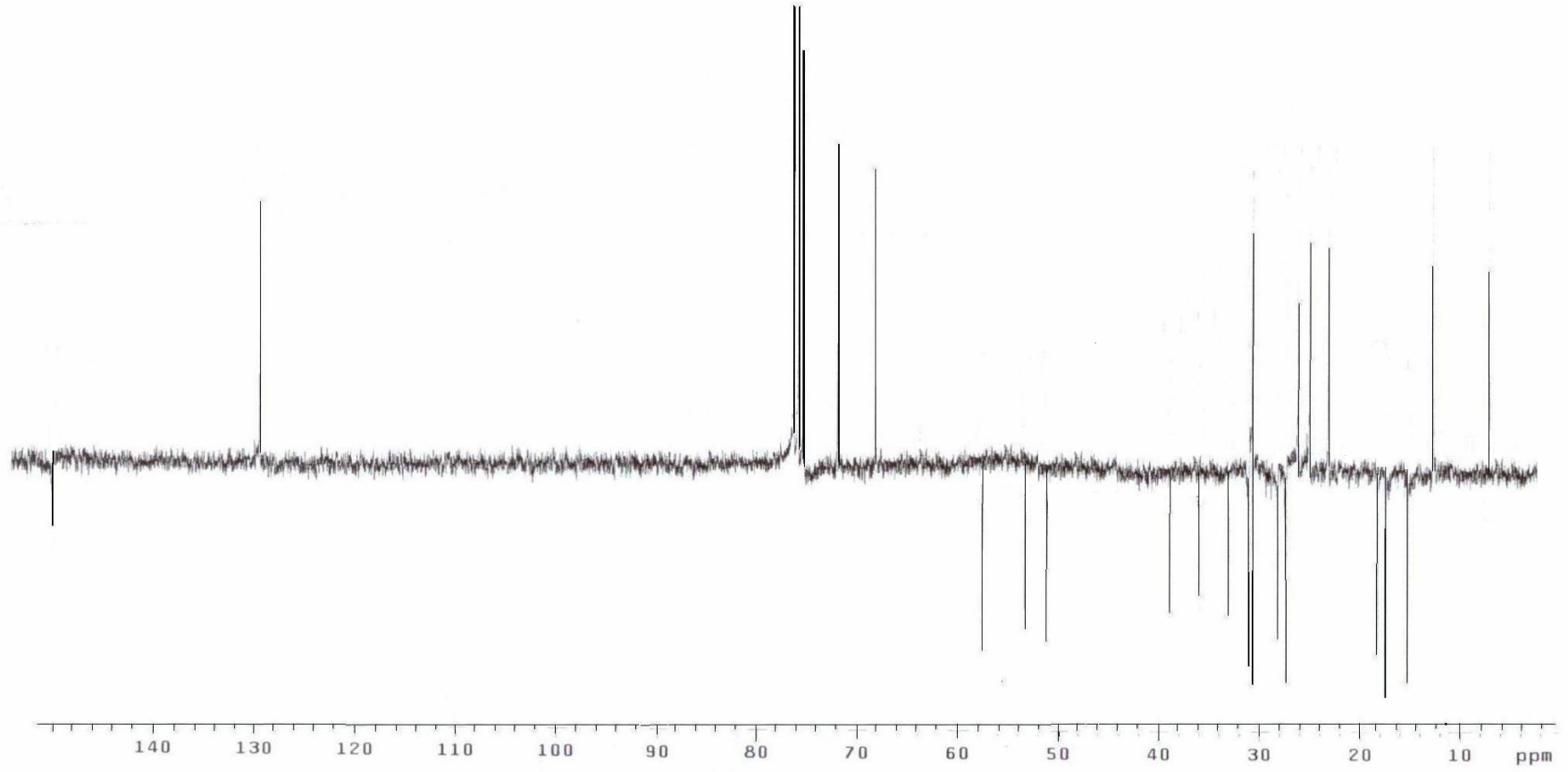
Şekil 4.4 $3\beta,20$ -Dihidroksi- $3\alpha,20$ -dimetilpregn-4-en'in ^{13}C -NMR spektrumu



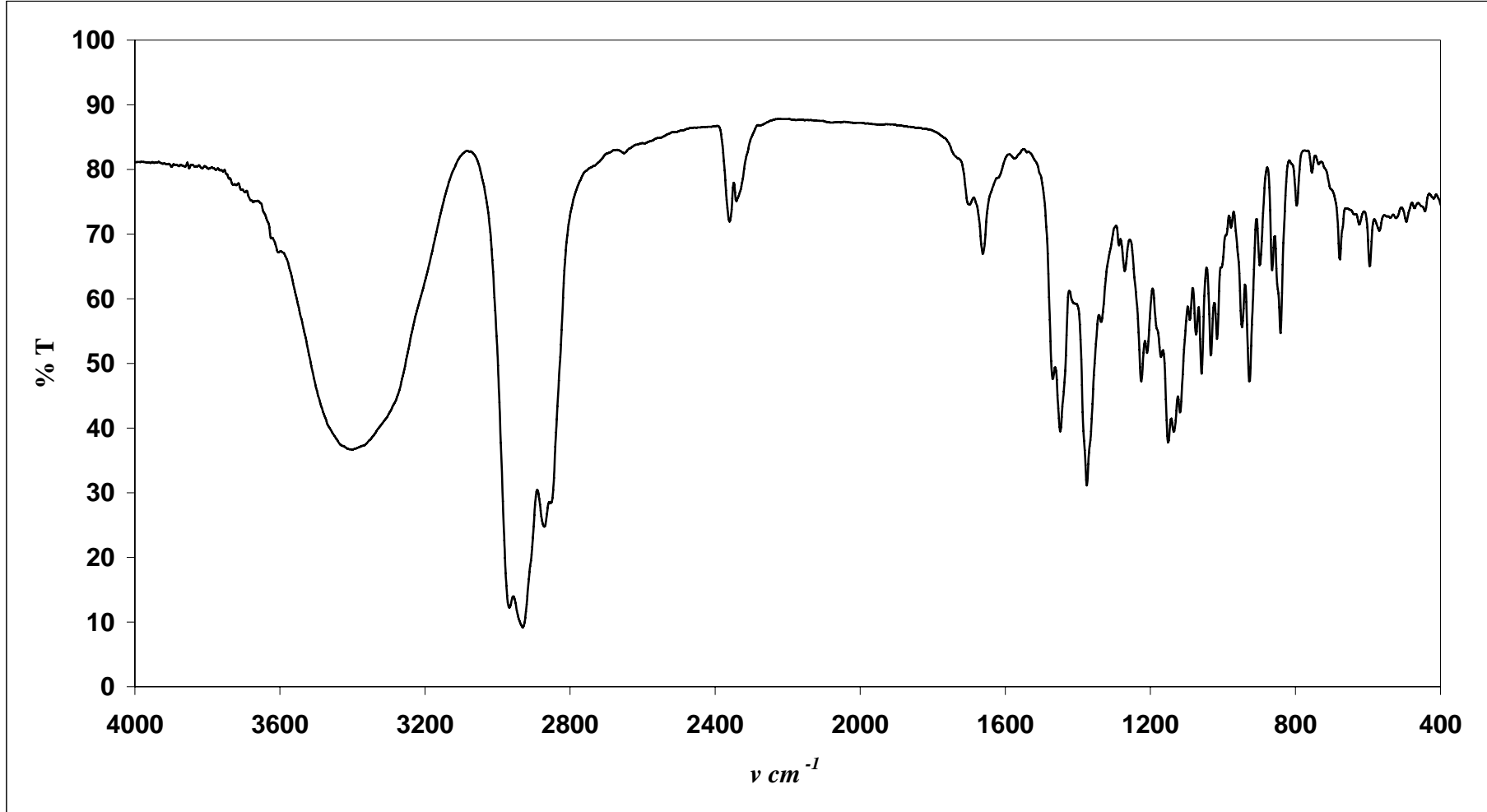
Şekil 4.5 3 β ,20-Dihidroksi-3 α ,20-dimetilpregn-4-en'in *Cephalosporium aphidicola* küfö ile biyotransformasyonu sonucu oluşan bileşigin ¹³C-NMR spektrumu



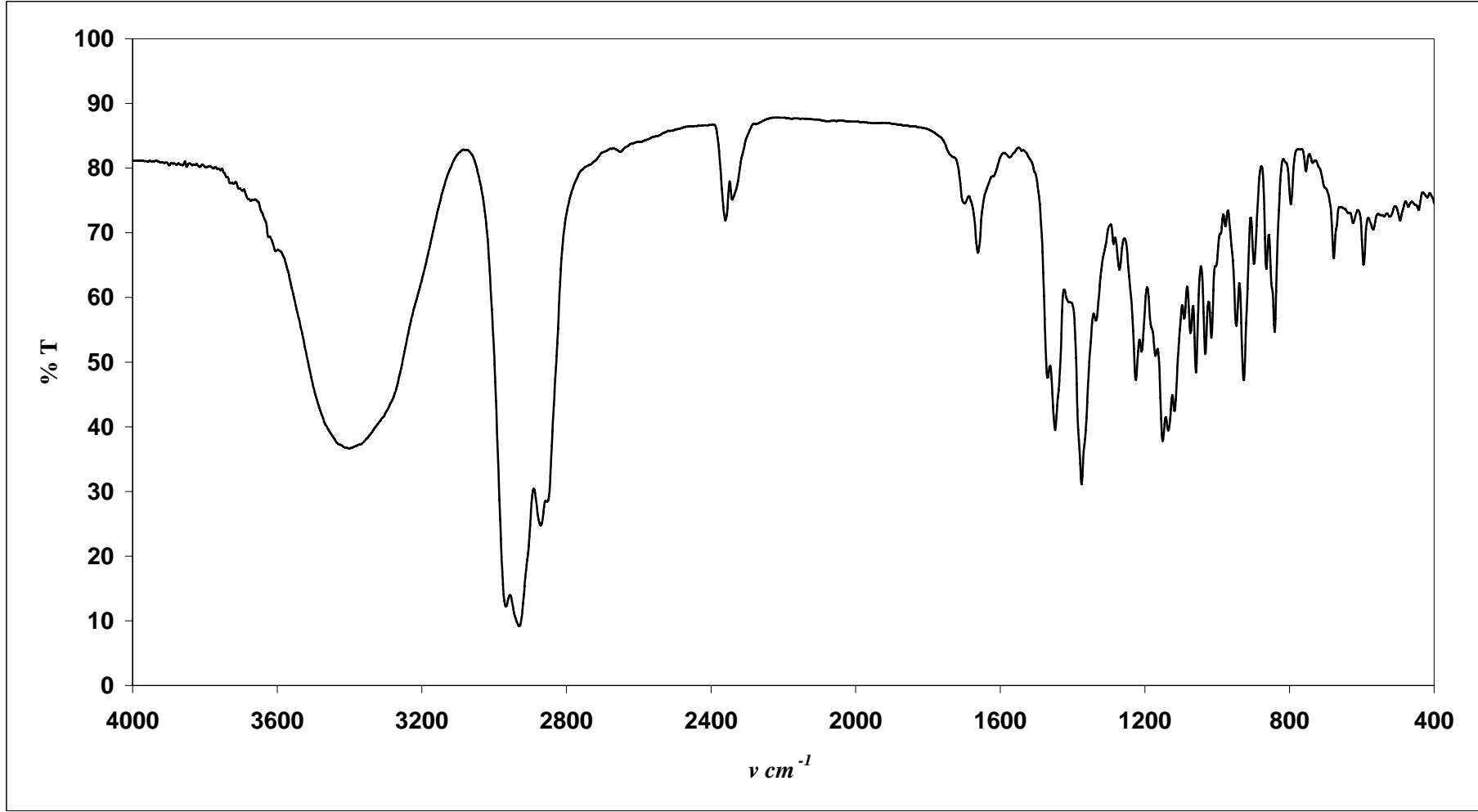
Şekil 4.6 3 β ,20-Dihidroksi-3 α ,20-dimetilpregn-4-en'in ^{13}C -APT NMR spektrumu



Şekil 4.7 3 β ,20-Dihidroksi-3 α ,20-dimetilpregn-4-en'in *Cephalosporium aphidicola* küfö ile biyotransformasyonu sonucu oluşan bileşimin ¹³C- APT NMR spektrumu



Şekil 4.8 3β,20-Dihidroksi-3α,20-dimetilpregn-4-en'in IR spektrumu



Şekil 4.9 3β,20-Dihidroksi-3α,20-dimetilpregn-4-en'in *Cephalosporium aphidicola* küfö ile biyotransformasyonu sonucu oluşan bileşigin IR spektrumu

3 α , 17 β -Dihidroksi-3 β -metilestr-4-en (2) ve *Cephalosporium aphidicola* ile biyotransformasyonundan elde edilen bileşiğe ait ¹H-NMR spektrumlarının karşılaştırılması Tablo 4.3’de verilmiştir.

Tablo 4.3. 3 α ,17 β -Dihidroksi-3 β -metilestr-4-en ve bileşiğin ¹H-NMR spektrumlarının karşılaştırılması

3 α ,17 β -Dihidroksi-3 β -metilestr-4-en		Bileşik			
Kimyasal kayma (ppm)	J sabitleri (Hz)	Kimyasal kayma (ppm)	J sabitleri (Hz)	Yarılma Tipi	Proton
5,28	-	5,28	-	s	4-H
3,61	8,6	3,62	8,6	t	17-H
1,24	-	1,24	-	s	3-CH ₃
0,75	-	0,75	-	s	18-H
0,70-2,20	-	0,70-2,20	-	*	**
* Üst üste çakışan multipletler					
** 0.70-2.20 ppm arasında gelen diğer protonlar					

Yukarıdaki tablodan da gözleneceği gibi başlangıç maddesi ile bileşiğin ¹H-NMR spektrumları karşılaştırıldığında bu iki maddenin aynı olduğu fikrine varıldı. Bileşiklerin spektrumlarında aynı yerlerde rezonansa gelen bazı protonlara ait belirgin 4 sinyal ile diğer protonlar ait 0,70-2,20 ppm arasında üst üste çakışan multipletler olarak rezonansa gelmiş sinyaller gözlemlendi.

Başlangıç maddesi ile bileşiğin 4-H protonuna ait sinyalleri çift bağın varlığından ve muhtemelen C-3 atomuna bağlı hidroksil grubu ile olan etkileşim sebebi ile 5,28 ppm’de gözlemlendi. Her iki bileşiğin C-3 atomuna bağlı metil grubuna ait protonlar 1,24 ppm’de rezonansa geldi. Başlangıç maddesi ile bileşiğin C-13 atomuna bağlı metil grubu (18-H) protonları ise 0,75 ppm’de gözlemlendi. Her iki bileşiğin spektrumlarında 3,61 ppm’de bir sinyal daha gözlemlendi. Bu sinyalin C-16 atomuna bağlı iki proton tarafından triplete (t) yarılan 17-H protonuna ait olduğu sonucuna varıldı. Başlangıç maddesi ile bileşiğin ¹H-NMR spektrumları sırası ile Şekil 4.10 ve Şekil 4.11’de verilmiştir.

3 α , 17 β -Dihidroksi-3 β -metilestr-4-en (2) ve *Cephalosporium aphidicola* ile biyotransformasyonundan elde edilen bileşiğe ait ^{13}C -NMR spektrumlarının karşılaştırılması Tablo 4.4’de verilmiştir.

Tablo 4.4. 3 α ,17 β -Dihidroksi-3 β -metilestr-4-en ve bileşiğin ^{13}C -NMR spektrumlarının karşılaştırılması

	3α,17β-Dihidroksi-3β-metilestr-4-en	Bileşik
C-1	69,54	69,54
C-2	37,33	37,29
C-3	69,54	69,54
C-4	127,30	127,28
C-5	141,25	141,20
C-6	36,47	36,43
C-7	31,40	31,35
C-8	40,90	40,85
C-9	49,80	49,75
C-10	41,73	41,69
C-11	25,78	25,74
C-12	34,95	34,91
C-13	42,98	42,94
C-14	49,87	49,84
C-15	25,61	25,61
C-16	30,27	30,20
C-17	81,71	81,70
C-18	10,94	10,95
C-19	-----	-----
3β-CH3	28,31	28,27

3 α , 17 β -Dihidroksi-3 β -metilestr-4-en ile ilgili bileşiğin ^{13}C -NMR spektrumlarının karşılaştırılması (Tablo 4.4) bu bileşiklerin aynı olduğunu daha da doğruladı. Başlangıç maddesi ile bileşiğin ^{13}C -NMR spektrumları (sırası ile Şekil 4.12 ve Şekil 4.13) ile ^{13}C APT NMR spektrumları (sırası ile Şekil 4.14 ve Şekil 4.15) karşılaştırıldığında bütün spektrumlarda birbirlerine çok yakın yerlerde rezonanslara

gelen toplam 19 karbon atomu sinyali gözlemlendi (Tablo 4.4, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14 ve Şekil 4.15).

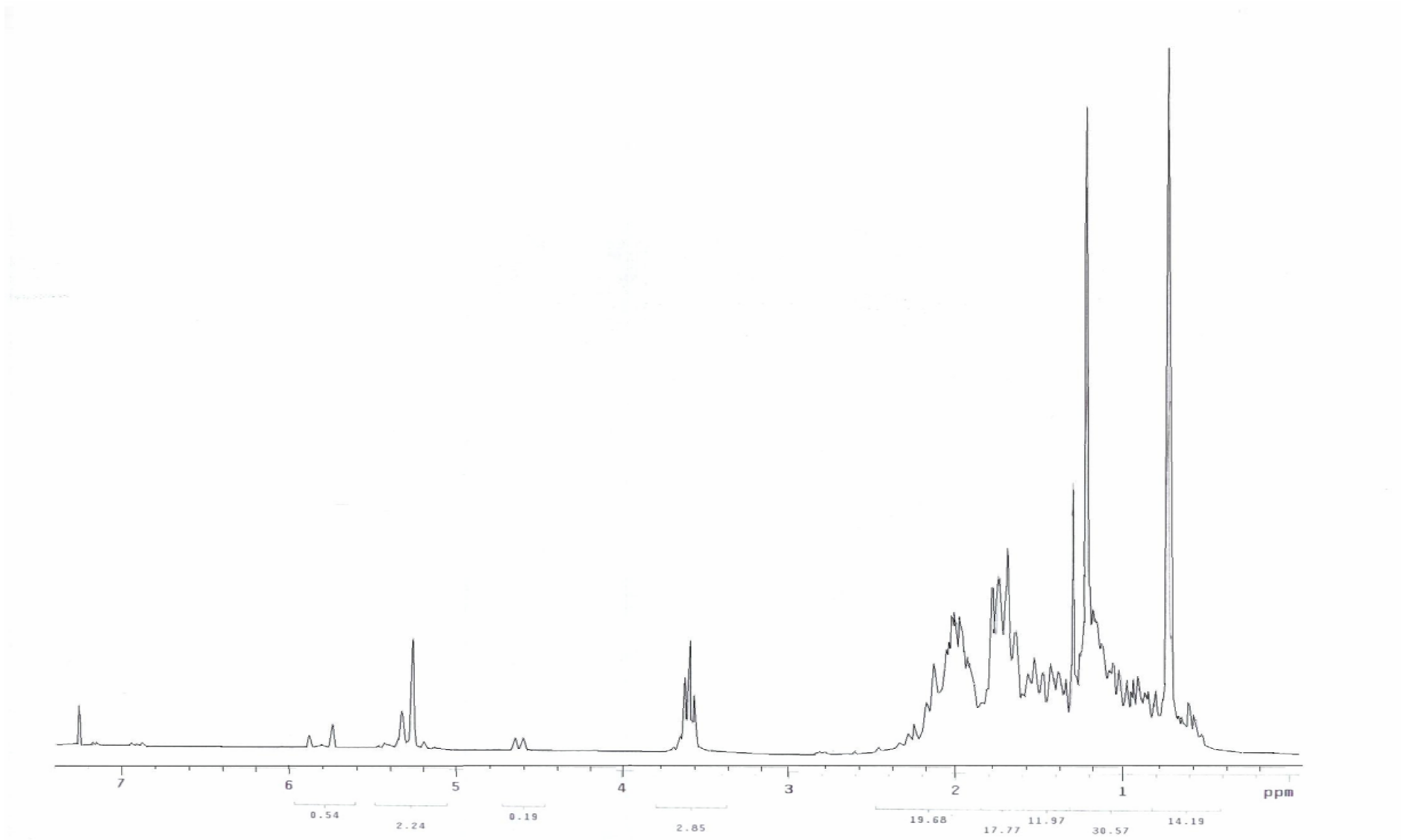
Her iki bileşiğin ^{13}C APT NMR spektrumları detaylı olarak incelendiğinde (Şekil 4.14 ve Şekil 4.15) yapılarında 2 metil karbonu (C-18 ve $3\beta\text{-CH}_3$), 8 metilen karbonu (C-1, C-2, C-6, C-7, C-11, C-12, C-15 ve C-16), 6 metin karbonu (C-4, C-8, C-9, C-10, C-14 ve C-17) ve 3 kuaterner karbon atomu (C-3, C-5 ve C-13) olduğu anlaşıldı.

İki bileşiğin ^{13}C APT NMR spektrumlarındaki metil karbonları ile metin karbonları (toplam 8 sinyal) aynı yönlerde gelirken metilen karbonları ile kuaterner karbonlar (toplam 11 sinyal) aynı yönlerde rezonansa geldi (Şekil 4.14 ve Şekil 4.15).

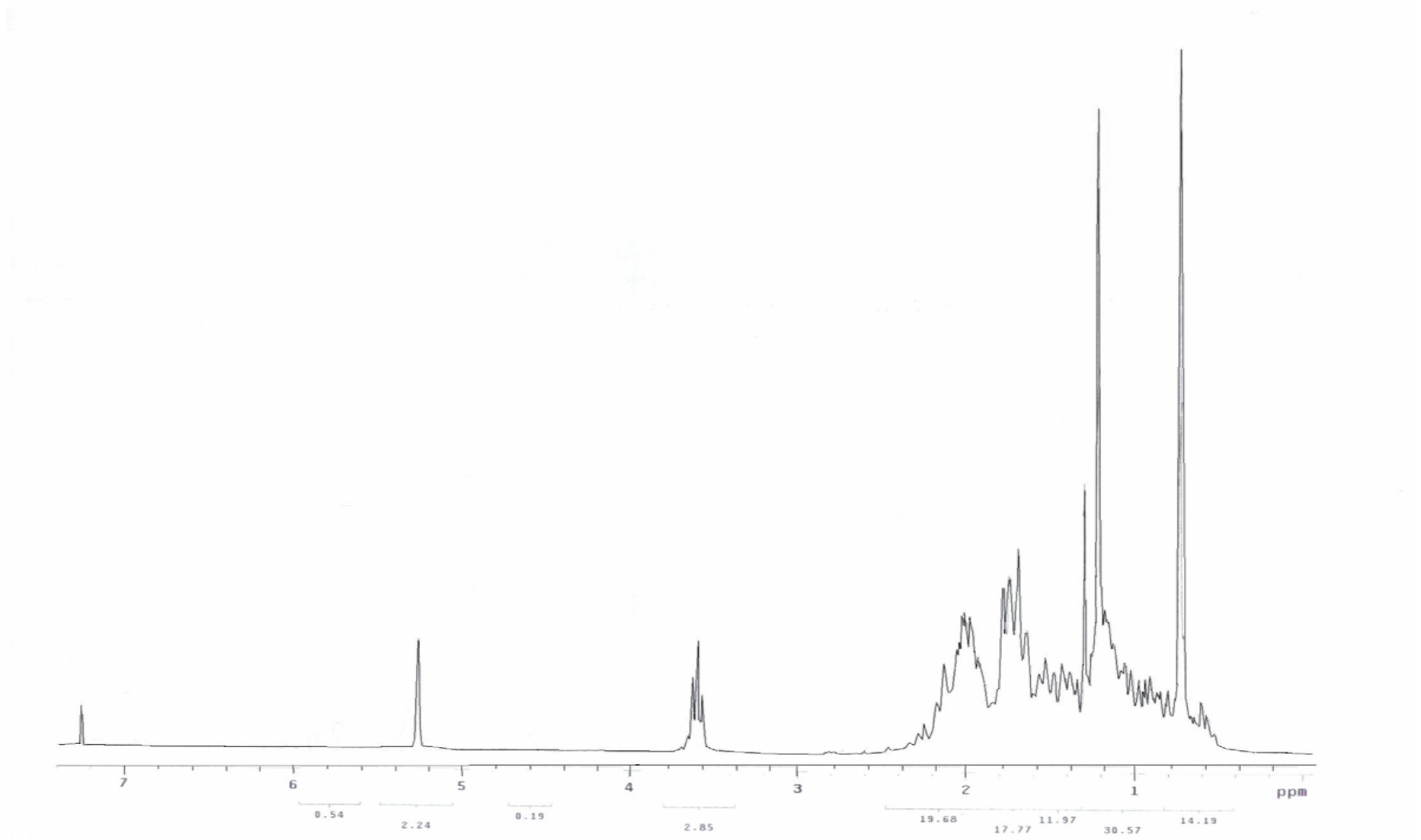
3α , 17β -Dihidroksi- 3β -metilestr-4-en ile bileşiğin IR spektrumlarında (Şekil 4.16 ve Şekil 4.17) 3330 cm^{-1} civarında bir hidroksil grubu absorpsiyonu gözlemlendi.

Erime noktası tayini çalışmaları neticesinde 3α , 17β -dihidroksi- 3β -metilestr-4-en ile bileşiğin erime noktalarının da birbirlerine oldukça yakın olduğu tespit edildi. 3α , 17β -Dihidroksi- 3β -metilestr-4-en bileşiğinin erime noktası $145\text{-}147\text{ }^\circ\text{C}$ olarak bulunurken bileşiğin erime noktası $146\text{-}147\text{ }^\circ\text{C}$ olarak bulundu.

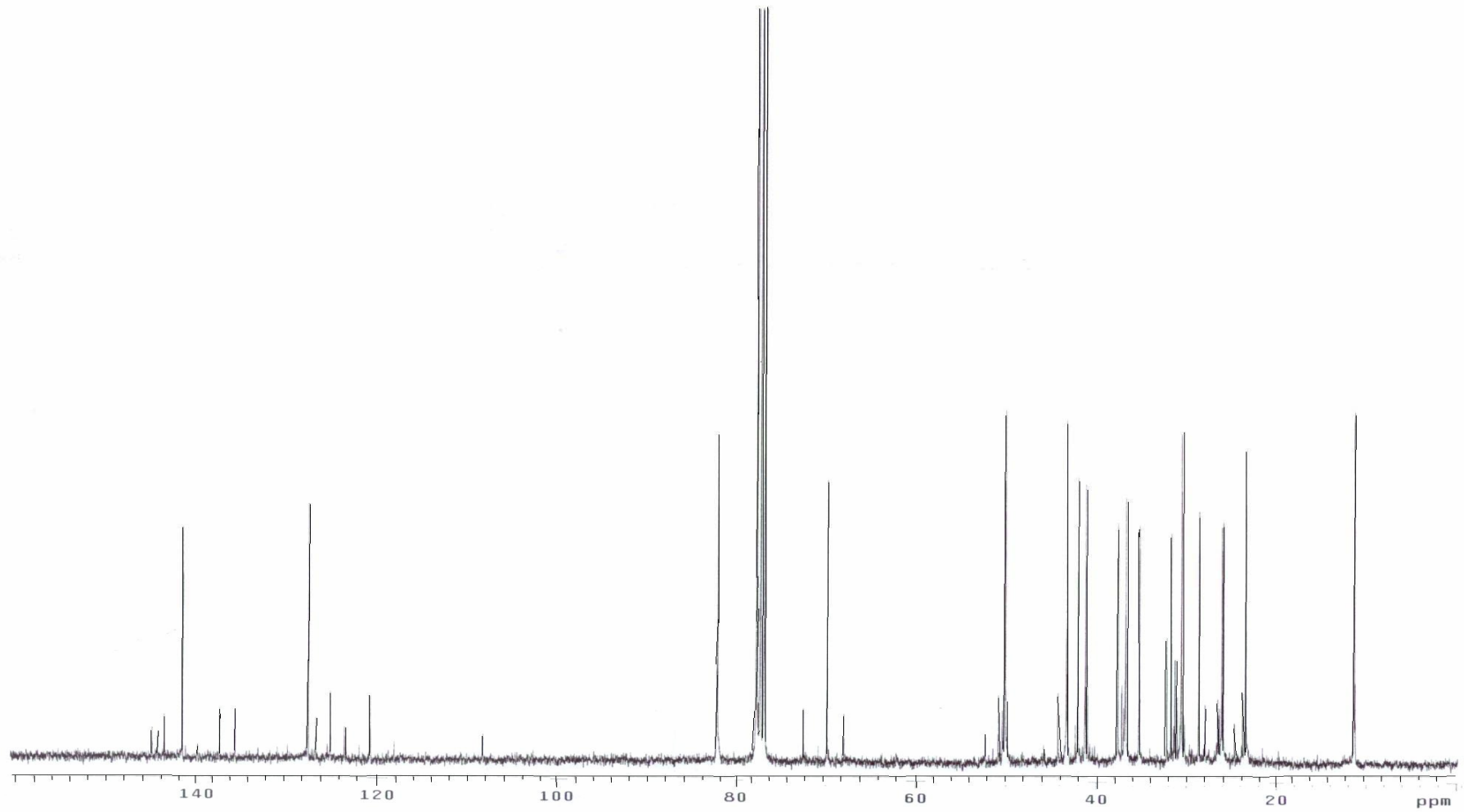
Bütün spektroskopik tekniklerden elde edilen bilgilerin ve erime noktalarının karşılaştırılması neticesinde 3α , 17β -dihidroksi- 3β -metilestr-4-en'in *Cephalosporium aphidicola* ile inkübasyonundan sadece başlangıç maddesi elde edildiği anlaşıldı.



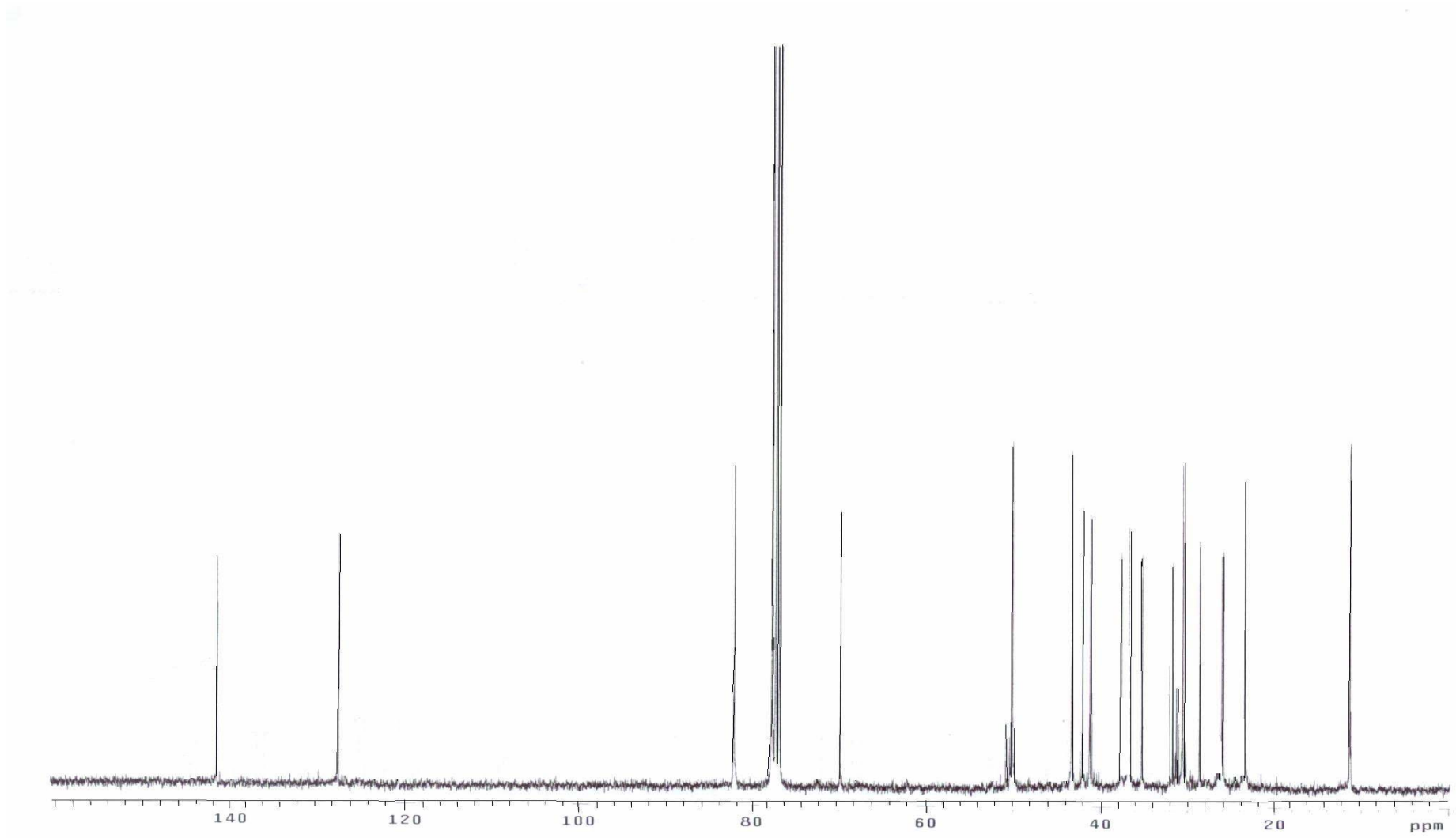
Şekil 4.10 3α,17β-Dihidroksi-3β-metilestr-4-en'in ¹H-NMR spektrumu



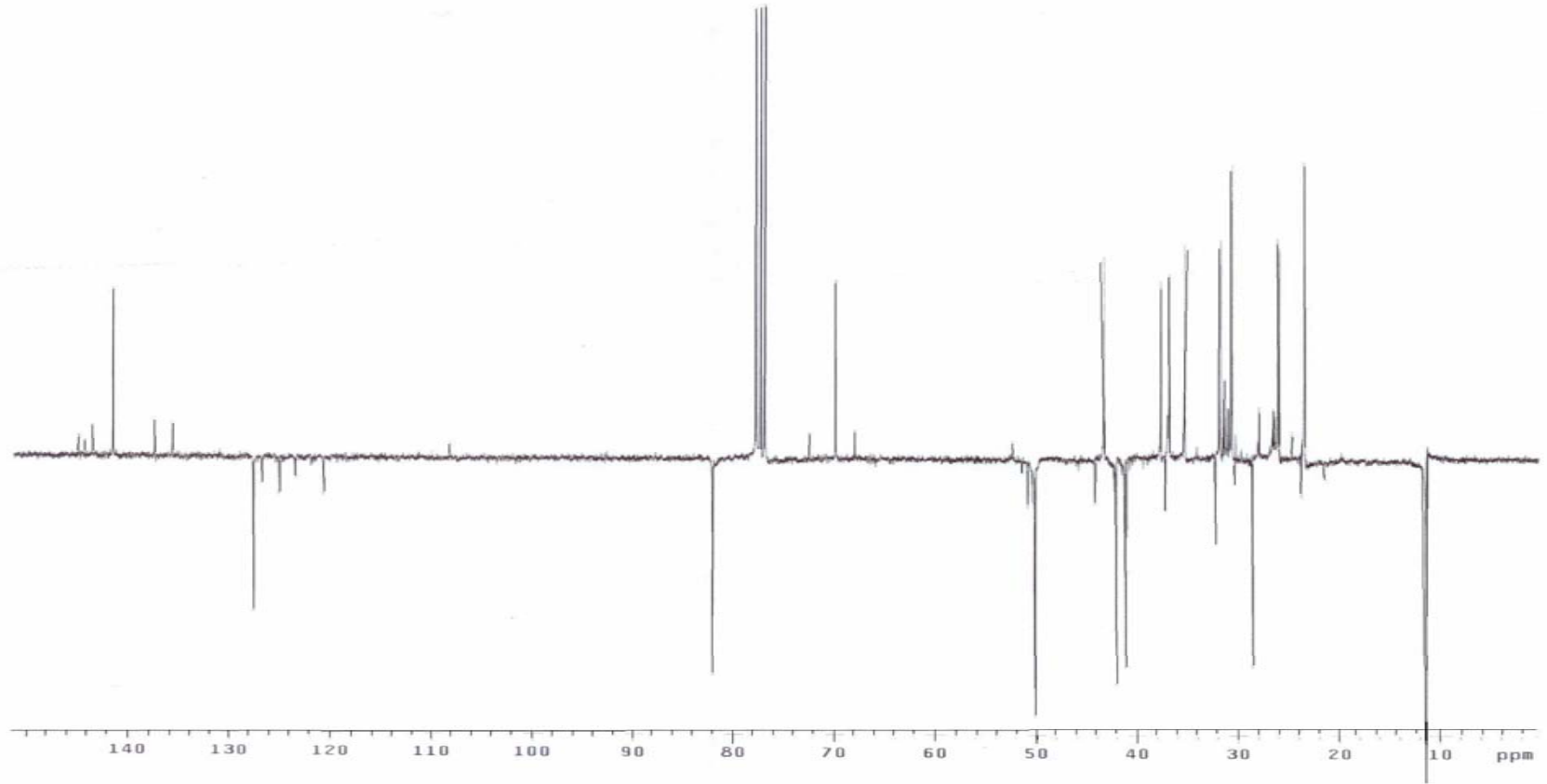
Şekil 4.11 3 α ,17 β -Dihidroksi-3 β -metilestr-4-en'in *Cephalosporium aphidicola* küfö ile biyotransformasyonu sonucu oluşan bileşigin ¹H-NMR spektrumu



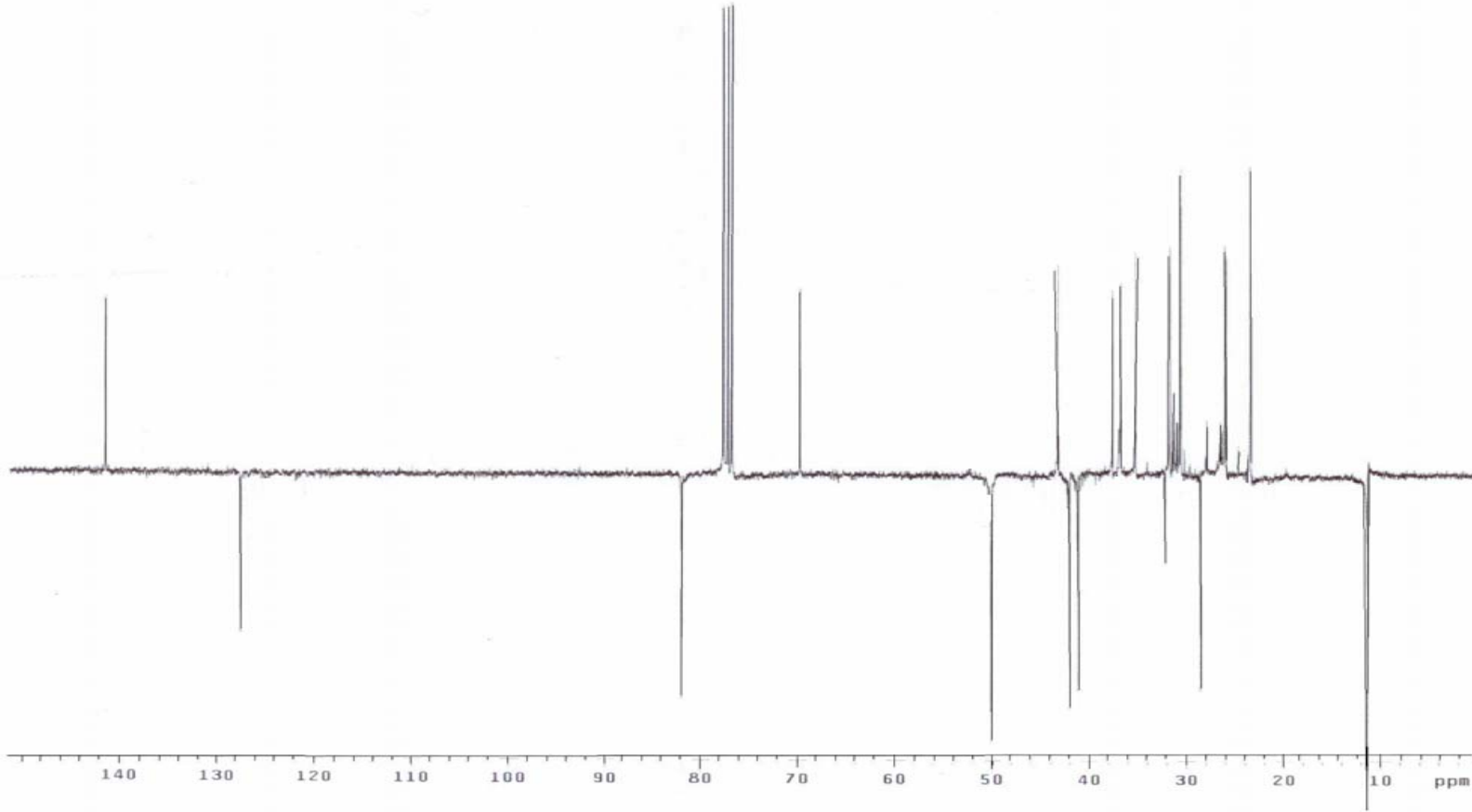
Şekil 4.12 $3\alpha,17\beta$ -Dihidroksi- 3β -metilestr-4-en'in ^{13}C -NMR spektrumu



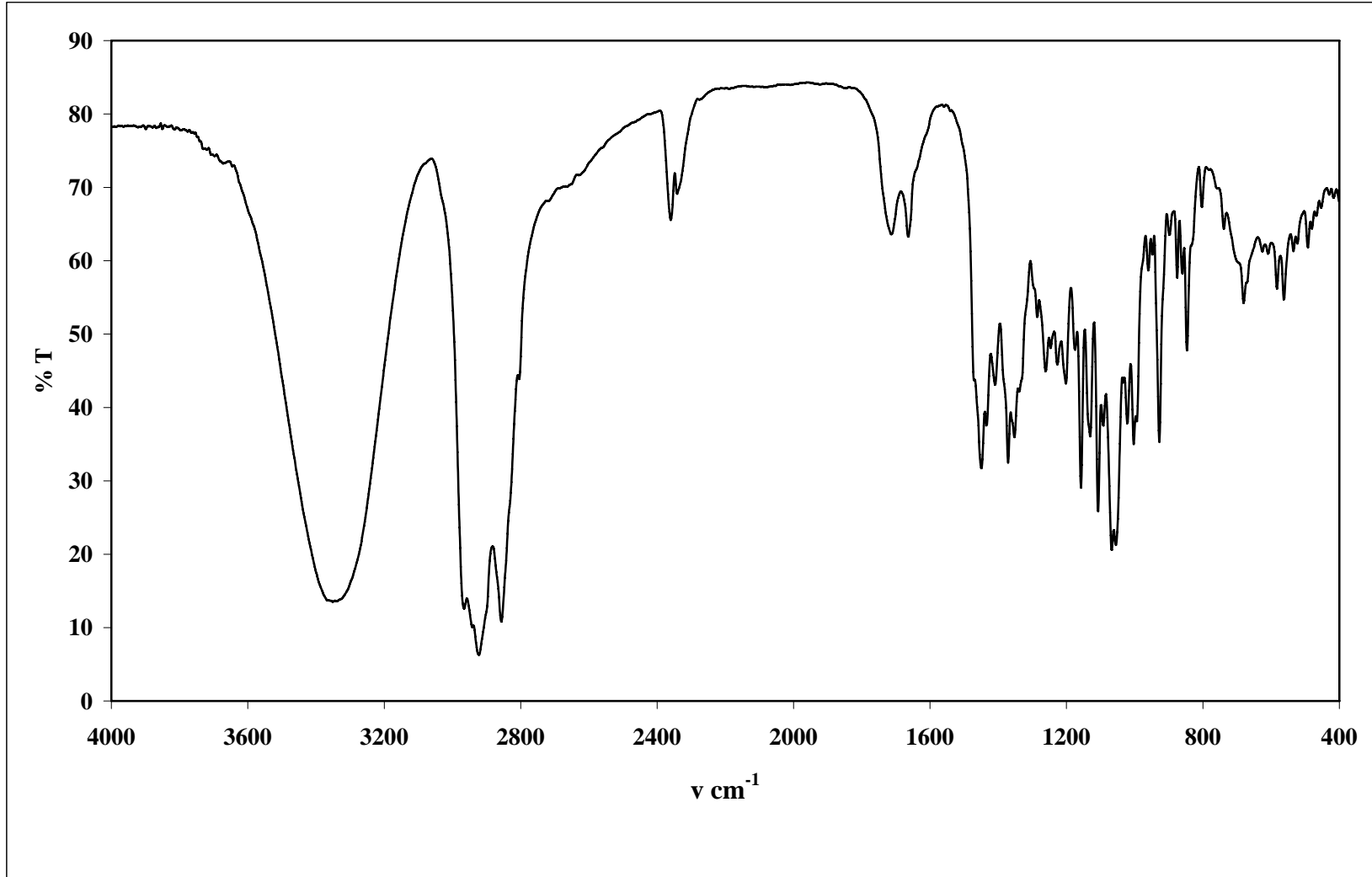
Şekil 4.13 3 α ,17 β -Dihidroksi-3 β -metilestr-4-en'in *Cephalosporium aphidicola* küfö ile biyotransformasyonu sonucu oluşan bileşigin ¹³C-NMR spektrumu



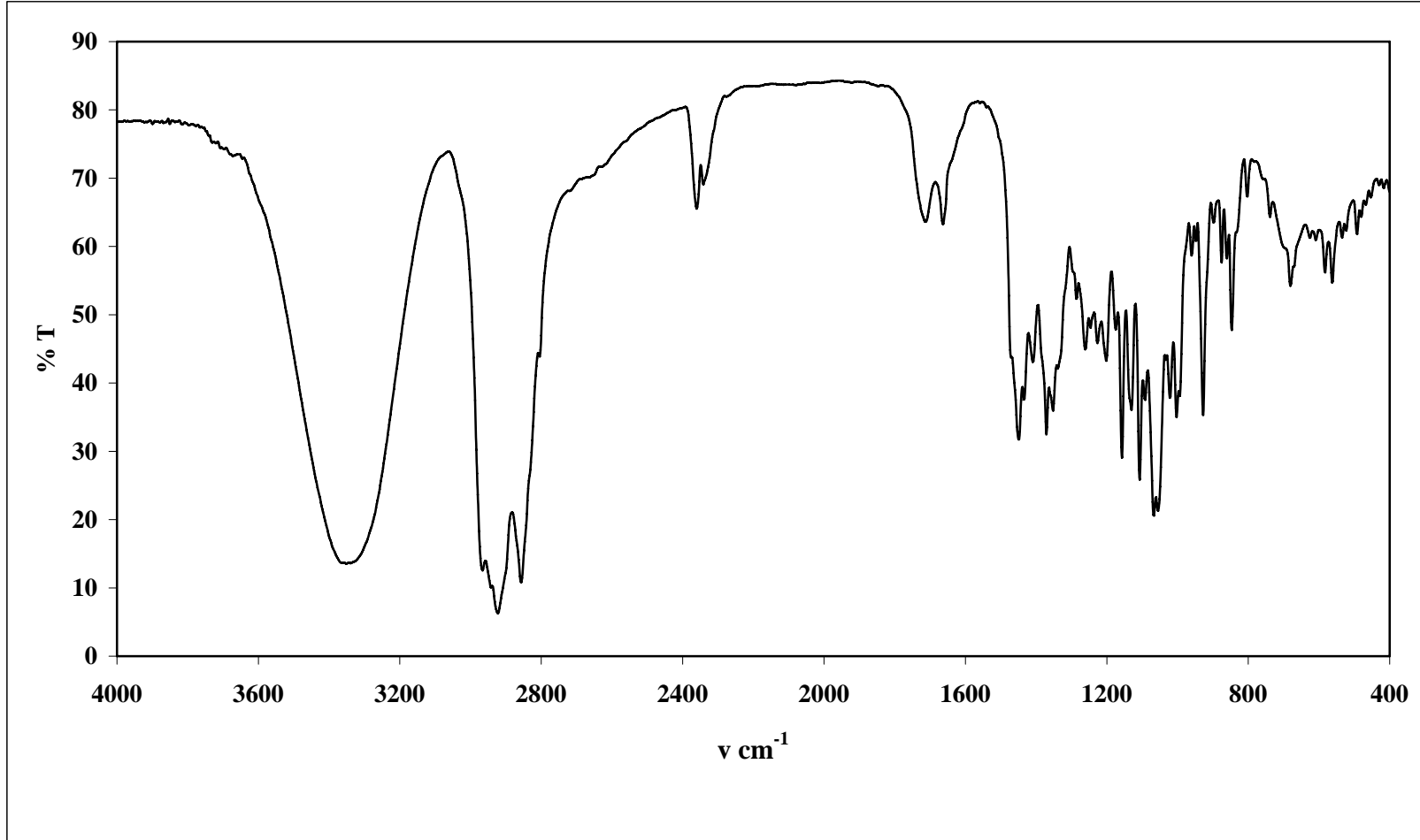
Şekil 4.14 3 α ,17 β -Dihidroksi-3 β -metilestr-4-en'in ¹³C-APT NMR spektrumu



Şekil 4.15 3 α ,17 β -Dihidroksi-3 β -metilestr-4-en'in *Cephalosporium aphidicola* küfö ile biyotransformasyonu sonucu oluşan bileşimin ¹³C-APT NMR spektrumu



Şekil 4.16 3α,17β-Dihidroksi-3β-metilestr-4-en'in IR spektrumu

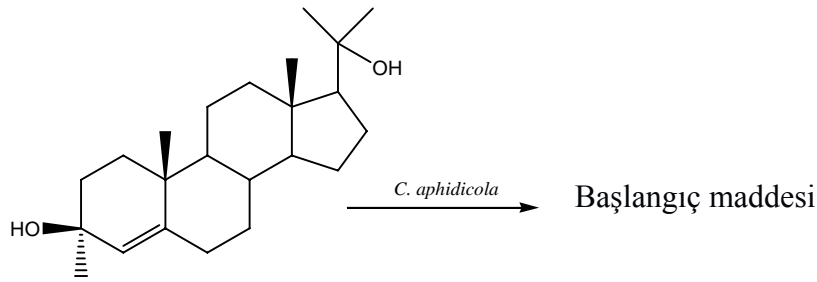


Şekil 4.17 3 α ,17 β -Dihidroksi-3 β -metilestr-4-en'in *Cephalosporium aphidicola* küfö ile biyotransformasyonu sonucu oluşan bileşigin IR spektrumu

BÖLÜM 5. SONUÇLAR

Biyotransformasyon çalışmaları sonucunda elde edilen yeni bileşiklerin yapılarını tayin amacıyla 3 β , 20-dihidroksi-3 α , 20-dimetilpregn-4-en, 3 α , 17 β -dihidroksi-3 β -metilestr-4-en ve yeni bileşiklerin ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, ^{13}C APT NMR, IR spektrumları alındı ve erime noktalarının tayini yapıldı.

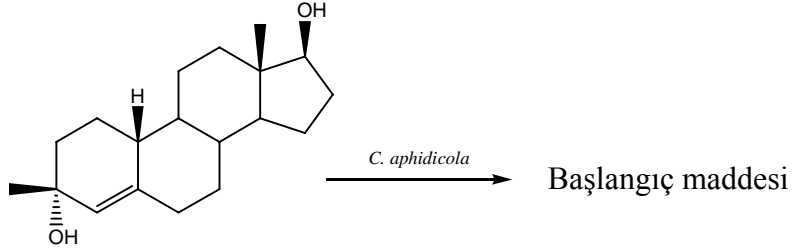
3 β , 20-Dihidroksi-3 α , 20-dimetilpregn-4-en ve bu bileşiğin biyotransformasyonu sonucunda elde edilen bileşiğin ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, ^{13}C APT NMR ve IR spektrumları karşılaştırıldığında 3 β , 20-dihidroksi-3 α , 20-dimetilpregn-4-en bileşiğinin *Cephalosporium aphidicola* küfü ile 10 gün biyotransformasyonu neticesinde herhangi bir değişim gerçekleşmediği anlaşıldı. Başlangıç maddesi ve bileşiğin erime noktalarının hemen hemen aynı olmaları da bu sonucu desteklemektedir.



Şekil 5.1 3 β , 20-Dihidroksi-3 α , 20-dimetilpregn-4-en bileşiğinin *Cephalosporium aphidicola* küfü ile biyotransformasyonu

Benzer şekilde 3 α , 17 β -dihidroksi-3 β -metilestr-4-en ve yeni bileşiğin ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, ^{13}C APT NMR ve IR spektrumları karşılaştırıldığında 3 α , 17 β -dihidroksi-3 β -metilestr-4-en bileşiğinin *Cephalosporium aphidicola* küfü ile 10 gün biyotransformasyonu neticesinde herhangi bir değişim gerçekleşmediği anlaşıldı. Başlangıç maddesi ve metabolitin erime noktalarının birbirine çok yakın olmaları

biyotransformasyonu neticesinde herhangi bir değişim gerçekleşmediğini daha da desteklemektedir.



Şekil 5.2 $3\alpha, 17\beta$ -Dihidroksi- 3β -metilestr-4-en bileşiminin *Cephalosporium aphidicola* küfö ile biyotransformasyonu

BÖLÜM 6. TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Bir enzimin kendine özgü reaksiyonunu gerçekleştirebilmesi için önce enzimle substratın uygun bir oryantasyonla birbirlerine bağlanmaları gerekir [5]. Bu bağlanma da iyonik etkileşimler ile hidrojen bağı oluşumu oldukça etkindir [8]. Substrat üzerindeki hidroksil grupları iyonik etkileşimler ve hidrojen bağı oluşumuna dahil olarak substrat ve enzimin birbirlerine bağlanmasını sağlayabilirler [5,8].

3 β , 20-Dihidroksi-3 α , 20-dimetilpregn-4-en bileşiğinin *Cephalosporium aphidicola* küfü ile 10 gün biyotransformasyonu neticesinde herhangi bir değişim gerçekleşmemesinin sebebi 3 α -metil grubunun enzime bağlanmada etkin olabilecek 3 β -hidroksil grubunun aktif merkez bünyelerindeki amino asit yan grupları ile etkileşimlerini fiziki olarak ortadan kaldırması (sterik engelleme) olabilir. Eğer bağlanma gerçekleşemezse enzim-substrat kompleksi oluşumu ve de mikrobiyal hidroksilasyonda gerçekleşemez. Ayrıca 17 β -yan zincirindeki normal pregnan serilerinde bulunmayan ilave metil grubunun da sebep olabileceği sterik engelleme ile steroidin hidroksilaz içerisinde uygun bağlanma oryantasyonları kazanamaması neticesinde enzim-substrat kompleksi oluşumu ve hali ile mikrobiyal hidroksilasyon gerçekleşmemiş olabilir.

Daha öncede belirtildiği gibi bazı pregnanların [14] ve kortikosteroidlerin [17] *Cephalosporium aphidicola* ile inkubasyonu neticesinde ana hidroksilasyonlar B halkasında (C-6) ve C halkasında (C-11 ve C-12) gerçekleşmiştir. Bu bileşiklerin A halkasındaki oksijen fonksiyonu (C-3) komşuluğunda herhangi bir sterik engellemeye sebebiyet verebilecek bir grup bulunmadığı için enzime bağlanabilmiş ve hidroksilasyonlar gerçekleşmiştir. Biyotransformasyonu gerçekleştirilen 3 β 20-dihidroksi-3 α , 20-dimetilpregn-4-en bileşiğinin yapısındaki her iki oksijen fonksiyonu metil gruplarının komşuluğunda olduğundan bu grupların muhtemel

sterik engellemeleri neticesinde herhangi bir mikrobiyal hidroksilasyon gerçekleşmemiş olabilir.

3α , 17β -Dihidroksi- 3β -metilestr-4-en bileşiğinin *Cephalosporium aphidicola* küfö ile 10 gün biyotransformasyonu neticesinde herhangi bir değişim gerçekleşmemesinin sebebi 3β -metil grubunun normalde enzime bağlanmada ve hidroksilasyonu yönlendirmede fazla etkin olmayan 3α -hidroksil grubunun [8] aktif merkez bünyelerindeki amino asit yan grupları ile etkileşimlerini sterik olarak engellemesi ve bileşiğin hidroksilasyonu ile sonuçlanacak uygun bir oryantasyonun kazanılamaması olabilir. Bu bileşik 17β -hidroksil grubu vesilesi ile hidroksilaza bir aktif merkezden bağlansa bile 3β -metil grubunun sebep olabileceği sterik engelleme ile steroidin hidroksilaz içerisinde diğer 2 aktif merkez ile uygun bağlanma oryantasyonları kazanamaması neticesinde enzim-substrat kompleksi oluşumu ve hali ile mikrobiyal hidroksilasyon gerçekleşmemiş olabilir.

Testosteron ve bazı türevlerinin [15] *Cephalosporium aphidicola* ile inkubasyonu neticesinde ana hidroksilasyonlar B halkasında (C-6) gerçekleşmiştir. *Cephalosporium aphidicola* ile inkubasyonu gerçekleştirilen pregnanlar [14] ve kortikosteroidler [17] gibi bu bileşiklerin A halkasındaki oksijen fonksiyonu (C-3) komşuluğunda herhangi bir sterik engellemeye sebebiyet verebilecek bir grup bulunmamaktadır. Bu sebepten dolayı bahsedilen bileşikler enzime bağlanabilmiş ve hidroksilasyonlar gerçekleşmiştir. Biyotransformasyonu gerçekleştirilen 3α , 17β -dihidroksi- 3β -metilestr-4-en bileşiği için enzime bağlanma ve hidroksilasyonu yönlendirme açısından daha önemli olan D halkasındaki (C-17) oksijen fonksiyonudur [8]. 3α , 17β -Dihidroksi- 3β -metilestr-4-en, D halkasındaki oksijen fonksiyonu vasıtası ile enzime bağlanabilse bile diğer oksijen fonksiyonu metil grubu komşuluğunda olduğundan bu grubun muhtemel sterik engellemeleri neticesinde bileşik hidroksilaz içerisinde uygun oryantasyonu kazanamadığından herhangi bir mikrobiyal hidroksilasyon gerçekleşmemiş olabilir.

Literatürde steroidlerin hidroksilaz enzimlerine bağlanmasında önemli olan C-3 atomuna bağlı bir hidroksil grubuna ilaveten aynı karbona bağlı olan metil grubunun steroidlerin biyotransformasyonuna olabilecek etkilerini incelemeye yönelik bir

Çalışma bulunmamaktadır. Bu alışma konu ile ilgili yapılan ilk çalışmadır. Bahsedilen konuda daha kapsamlı bilgi edinebilmek için farklı birkaç mikroorganizma ile aynı veya benzer bileşiklerin biyotransformasyonlarının çalışılması daha uygun olacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] ONAT, T., EMERK, K., SÖZMEN, E.Y., “İnsan Biyokimyası”, Palme Yayıncılık, 659, Ankara, 2002.
- [2] YILMAZER, S., “ Triclosan antibiyotiğinin *Cephalosporium aphidicola* Küfö ile Biyotransformasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, 3-25, Sakarya, 2005.
- [3] HANSON, J.R., “An Introduction to Biyotransformations in Organic Chemistry”, W.H. Freeman Spektrum, 1-58, New York, USA, 1995.
- [4] ARNOLD, L., “Small Bugs, Big Business: The Economic Power of the Microbe”, Biotechnology Advances, 18, 499-514, 2000.
- [5] YILDIRIM, K., “ The Biotransformation and Synthesis of Some Steroids”, D. Phil. Thesis, Sussex University, 8-81, England, 2001.
- [6] PETERSON, D. H., MURRAY, H. C., “Microbial Oxygenation of Steroids at Carbon 11”, Journal of American. Chemical . Society, 74, 1871-1872, 1952.
- [7] HOLLAND, H.L., “The Mechanism of the Microbial Hydroxylation of Steroids”, Chemical Society. Reviews, 11, 371-395, 1982.
- [8] JONES, E.R.H., “The Microbiological Hydroxylation of Steroids and Related Compounds”, Pure and Applied Chemistry, 33, 39-52, 1973.
- [9] BRANNON, D. R., PARRISH, F. W., WILLEY, B. J., LONG, L., “The Microbial Transformations of a Series of Androgens with *Aspergillus tamarii*”, Journal of. Organic Chemistry, 32, 1521-1527, 1967.
- [10] McCRINDLE, R., TURNBULL, J. K., ANDERSON, A. B., “Microbiological Hydroxylation of 17-Norkauran-16-one and *ent*-17-Norkauran-16-one with the Fungus *Rhizopus nigricans*” , Journal of Chemical Society, Perkin Transactions I, 1202-1208, 1975.
- [11] MAHATO,S. B., BANERJEE, S., PODDER, S., “Steroid Transformations by Microorganisms III” , Phytochemistry, 28, 7-40, 1998.
- [12] MATHEWS, C.K.,VAN HOLDE, K.E., Biochemisrty, Second Edition. Benjamin/Cummings, 880, USA, 1996.

- [13] HANSON, J.R., NASIR, H., "The Biotransformation of Some Steroids by *Cephalosporium aphidicola*", *Phytochemistry*, 33, 831-837, 1993
- [14] FAROOQ, A., HANSON, J.R., IQBAL, Z., "Hydroxylation of Progesterone by *Cephalosporium aphidicola*" *Phytochemistry*, 37, 723-726, 1994
- [15] HANSON, J.R., NASIR, H., PARVEZ, A., "The Hydroxylation of Testosterone and Some Relatives by *Cephalosporium aphidicola*" *Phytochemistry*, 42, 411-415, 1996
- [16] BENSASSON, C.M., HANSON, J.R., HUNTER, A.C., "The Hydroxylation of Δ^5 -Androstanes by *Cephalosporium aphidicola*" *Phytochemistry*, 49, 2355-2358, 1998
- [17] HANSON, J.R., HUNTER, A.C., "The Microbiological Hydroxylation of Some Steroids with a Cortical Side Chain by *Cephalosporium aphidicola*" *Phytochemistry*, 49, 2359-2362, 1998
- [18] HANSON, J.R., HUNTER, A.C., "The Hydroxylation of Steroidal Ring D Lactones by *Cephalosporium aphidicola*" *Phytochemistry*, 49, 2349-2353, 1998
- [19] HANSON, J.R., HITCHCOCK, P.B., HUNTER, A.C., "The Microbiological Hydroxylation of 3,16-disubstituted Androstanes by *Cephalosporium aphidicola*" *Phytochemistry*, 49, 1287-1292, 1998
- [20] BOYNTON, J., HANSON, J.R., HUNTER, A.C., "The Hydroxylation of Some 13α -methylsteroids by *Cephalosporium aphidicola*" *Phytochemistry*, 45, 951-956, 1997
- [21] MUSHARRAF, S.G., RAHMAN, A.U., CHOUDHARY, M.I., SULTAN, S., "Microbial Transformation of (+)-adrenosterone" *Natural Product Letters*, 16, 345-349, 2002
- [22] CHOUDHARY, M.I., MUSHARRAF, S.G., SHAHEEN, F., RAHMAN, A.U., "Microbial Transformation of (+)-androsta-1,4-diene-3,17-dione by *Cephalosporium aphidicola*" *Natural Product Letters* 16, 377-382, 2002
- [23] RAHMAN, A.U., CHOUDHARY, M.I., ASIF, F., FAROOQ, A., YAQOOB, M., "Fungal Transformations of Steroids by *Cephalosporium aphidicola* and *Trichothecium Roseum*" *Natural Product Letters* 14, 217-224, 2000
- [24] HANSON, J.R., KIRAN, I., "The Microbiological Hydroxylation of 17-chloroandrosta-4,16-dien-3-one by *Cephalosporium aphidicola*" *Journal of Chemical Research-S* 3, 130-131 2003
- [25] BENSASSON, C.M., HANSON, J.R., "The Microbiological Hydroxylation of Desring D androstanes by *Cephalosporium aphidicola*" *Journal of Chemical Research-S*, 3, 124-125, 2003

- [26] BENSASSON, C.M., HANSON, J.R., PARVEZ, A., "The Microbiological Hydroxylation of 4,4-dimethylandro-5-enes by *Cephalosporium aphidicola*" Journal of Chemical Research-S, 4, 218-219, 2003
- [27] BENSASSON, C.S., CHEVOLOT, Y., HANSON, J.R., QUINTON, J., "The Microbiological hydroxylation of 4 β -hidroksi-4 α -methyl-5 α -androstanes by *Cephalosporium aphidicola*" Phytochemistry, 50, 25-30, 1999
- [28] HANSON, J.R., HUNTER, A.C., "The Microbiological Hydroxylation of 3 α ,17 β - and 3 β ,17 α -dihydroxy-5 α -androstanes by *Cephalosporium aphidicola*" Journal of Chemical Research-S, 4, 216-217, 2003
- [29] HANSON, J.R., HITCHCOCK, P.B., YILDIRIM, K., " The biotransformation of 5 β -methyl-9-enes by *Cephalosporium aphidicola*", Journal of Chemical Research-S, 4, 2003, 214-215.
- [30] HANSON, J.R., HITCHCOCK, P.B., YILDIRIM, K., "The biotransformation of 5 β -methyl-19-norpregn-9-enes by *Cephalosporium aphidicola*", Journal of Chemical Research-S, 8, 519-521, 2004.
- [31] KIRAN, I., HANSON, J.R., HUNTER, A.C., "The Microbiological Hydroxylation of Some Methoxysteroids by *Cephalosporium aphidicola*" Journal of Chemical Research-S, 5, 362-363, 2004
- [32] CHOUDHARY, A.L., SULTAN, S., KHAN, M.T.H., RAHMAN, A.U., "Microbial Transformation of 17 α -ethynyl- and 17 α -ethylsteroids and Tyrosinase Inhibitory Activity of Transformed Products" Steroids 70, 12, 798-802, 2005
- [33] CHOUDHARY, M.I., MUSHARRAF, S.G., ALI, R.A., "Microbial Transformation of Antifertility Agents, Norethisterone and 17 α -ethynylestradiol" Zeitschrift Fur Naturforschung Section B-A Journal of Chemical Sciences, 59, 3, 319-323, 2004
- [34] RAHMAN, A.U., CHOUDHARY, M.I., SHAHEEN, F., ASHRAF, M., JAHAN, S., "Microbial Transformations of Hypolipemic E-guggulsterone" Journal of Natural Products, 61, 428-431, 1998
- [35] CHOUDHARY, M.I., AZUZIDDIN., RAHMAN, A.U., " Microbial transformation of Danazol ", Natural Products Letters, 16, 101-106, 2002.
- [36] UYANIK, C., HANSON, J.R., HITCHCOCK, P.B., "The oxidation of 3-hidroxy-3-methyl- Δ^4 -steroids by chromium trioxide", Journal of Chemical Research-S, 795-797, 2003.
- [37] UYANIK, C., HANSON, J.R., HITCHCOCK, P.B., "The stereochemistry of the 1,2-addition of Grignard reagents to some steroidal unsaturated ketones", Journal of Chemical Research-S, 474-476, 2003.

ÖZGEÇMİŞ

Ülkü BAĞCIOĞLU, 1980 yılında Sakarya'da doğdu. İlk öğrenimini Sakarya Mithatpaşa İlkokulunda, orta öğrenimini Sakarya Mithatpaşa Ortaokulunda ve lise öğrenimini de Sakarya Mithatpaşa Lisesinde tamamladı. 2002 yılında Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde lisans öğrenimini tamamladı. 2002-2003 öğretim yılında Sakarya Üniversitesinde Tezsiz Yüksek Lisans yaptı. 2003-2004 döneminde Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.