

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PENICILLIUM HIRSUTUM KÜFÜ İLE PREGNENOLON VE
DEHİDROEPIANDROSTERON BİLEŞİKLERİNİN
BİYOTRANSFORMASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Halil İbrahim YILMAZ

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

TEMMUZ 2024

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PENICILLIUM HIRSUTUM KÜFÜ İLE PREGNENOLON VE
DEHİDROEPIANDROSTERON BİLEŞİKLERİNİN
BİYOTRANSFORMASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Halil İbrahim YILMAZ

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğretim Üyesi Ali KURU

TEMMUZ 2024

Halil İbrahim Yılmaz tarafından hazırlanan “*PENICILLIUM HIRSUTUM* KÜFÜ İLE PREGNENOLON VE DEHİDROEPIANDROSTERON BİLEŞİKLERİNİN BİYOTRANSFORMASYONU” adlı tez çalışması 08.07.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Jüri Başkanı : **Prof. Dr. Fatih SÖNMEZ**
Sakarya Uygulamalı Bilimler

Jüri Üyesi: **Dr. Öğr. Üyesi Ali KURU (Danışman)**
Sakarya Üniversitesi

Jüri Üyesi: **Prof. Dr. Kudret YILDIRIM**
Sakarya Üniversitesi



ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğine ve Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesine uygun olarak hazırlamış olduğum “*PENICILLIUM HIRSUTUM* KÜFÜ İLE PREGNENOLON VE DEHİDROEPIANDROSTERON BİLEŞİKLERİNİN BİYOTRANSFORMASYONU” başlıklı tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın tüm aşamalarında yukarıda belirtilen yönetmelik ve yönergeye uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, bu tezi başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve 20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince Sakarya Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Enstitü tarafından belirlenmiş ölçütlere uygun rapor alındığını, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun ortaya çıkması halinde doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi beyan ederim.

08/07/2024

Halil İbrahim Yılmaz



TEŞEKKÜR

Çalıőmayı büyük bir titizlik ve sabırla yöneten, çalışma boyunca desteğini bir an bile esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım kıymetli hocam Dr. Öğretim Üyesi Ali KURU'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans öğrenimim boyunca ihtiyacım olan her konuda bana destek olan Sakarya Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyelerine ve araştırma görevlilerine, laboratuvar arkadaşlarıma ve Prof. Dr. Kudret YILDIRIM'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu günlere gelmemde büyük payı olan, yaşamım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve koşulsuz yanımda olan anneme, kardeşlerime, dostlarıma, eşime ve minik kızıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Halil İbrahim YILMAZ



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	v
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
KISALTMALAR.....	xi
SİMGELER.....	xiii
TABLO LİSTESİ	xv
ŞEKİL LİSTESİ.....	xvii
ÖZET.....	xix
SUMMARY	xxi
1. GİRİŞ	1
2. <i>PENICILLIUM</i> TÜRLERİ İLE DHEA VE PREGNENOLON BİYOTRANSFORMASYONLARI.....	7
2.1. Biyotransformasyon.....	7
2.2. Mikrobiyal Biyotransformasyon	8
2.3. Enzimler	8
2.4. Biyotransformasyon Teknikleri	10
2.5. Küfler ile Steroid Biyotransformasyonu	10
2.6. Küflerle DHEA (9) ve Pregnenolon (3) Biyotransformasyon Çalışmaları.....	11
3. METARYEL VE METOD	17
3.1. Genel Bilgiler	17
3.2. Yatık Agar Besiyerinin Hazırlanması	17
3.3. Küf Kültürünün Hazırlanması ve Tazelenmesi	18
3.4. Küf Besiyerinin Hazırlanışı	18
3.5. Biyotransformasyon Deneyi	18
3.6. Metabolitlerin Saflaştırılması ve Yapılarının Tayini.....	18
4. DENEYSEL BULGULAR	21
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	25
KAYNAKLAR	27
EKLER.....	31
ÖZGEÇMİŞ	37



KISALTMALAR

¹³C NMR	: Karbon 13 Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
DMF	: Dimetilformamid
¹H NMR	: Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
IR	: Infrared (kızılötesi)
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
lit.	: Literatür
PDA	: Potato dekstroz agar
ppm	: Milyonda bir kısım
rpm	: Dakika başına dönüş sayısı
UV	: Ultraviyole (morötesi)



SİMGELER

bs	: Geniş tekli (broad singlet) sinyal
°C	: Santigrat derece
cm	: Santimetre
Δ	: Kimyasal kayma farkı
δ_C	: ¹³ C NMR spektrumundaki kimyasal kayma
δ_H	: ¹ H NMR spektrumundaki kimyasal kayma
g	: Gram
Hz	: Hertz
<i>J</i>	: Etkileşme sabiti
lit.	: Literatür
m	: Çoklu (multiplet) sinyal
mg	: Miligram
MHz	: Megahertz
mL	: Mililitre
pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonunun eksi logaritması
s	: Tekli (singlet) sinyal



TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 4.1. Steroidlere ait ^{13}C NMR kimyasal kayma bilgileri.....	23
---	-----------





ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. Genel Steroid Yapısı.....	2
Şekil 1.2. Kolesterolün Yapısı	3
Şekil 1.3. Androjenlerin ve östrojenlerin biyosentezi.	5
Şekil 2.1. <i>P. lilacinum</i> AM111 ve <i>P. vinaceum</i> AM110 tarafından DHEA (9) biyotransformasyonu.....	11
Şekil 2.2. <i>P. camemberti</i> AM83 ve <i>P. simplicissimum</i> tarafından DHEA (9)'nın biyotransformasyonları	11
Şekil 2.3. <i>P. lanosocoeruleum</i> KCh 3012 tarafından biyotransformasyonu	12
Şekil 2.4. <i>P. griseopurpureum</i> tarafından DHEA (9)'nın biyotransformasyonları	12
Şekil 2.5. <i>P. glabrum</i> tarafından DHEA (9)'nın biyotransformasyonları.....	13
Şekil 2.6. <i>P. chrysogenum</i> KCh S4 ve <i>P. P. citreo-viride</i> A.C.C.C. 0402 tarafından DHEA (9)'nın biyotransformasyonları	13
Şekil 2.7. <i>P. commune</i> KCh W7 tarafından DHEA (9)'nın biyotransformasyonu.....	13
Şekil 2.8. <i>P. lilacinum</i> AM111 tarafından pregnenolonun (3) biyotransformasyonu .	14
Şekil 2.9. <i>P. camemberti</i> AM83 tarafından pregnenolonun (3) biyotransformasyonu	14
Şekil 2.10. <i>P. vinaceum</i> AM110 tarafından pregnenolonun (3) biyotransformasyonu	15
Şekil 2.11. <i>P. lanosocoeruleum</i> tarafından pregnenolonun (3) biyotransformasyonu	15
Şekil 4.1. Substratlara ait karbon iskeletleri.....	21
Şekil 4.2. DHEA (9) bileşiğinin <i>Penicillium hirsutum</i> MRC 500372 ile inkübasyonu	21
Şekil 4.3. Pregnenolon (3) bileşiğinin <i>Penicillium hirsutum</i> MRC 500372 ile inkübasyonu.....	22
Şekil 5.1. DHEA (9) bileşiğinin <i>P.hirsutum</i> MRC 500372 ile inkübasyonu.....	25
Şekil 5.2. Pregnenolon (3) bileşiğinin <i>P. hirsutum</i> MRC 500372 ile inkübasyonu	26
Şekil A.1. DHEA (9) bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu.....	32
Şekil A.2. Androst-4-en-3,17-dion (5) bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu.....	32
Şekil A.3. DHEA (9) bileşiğinin ¹³ C NMR spektrumu.....	33
Şekil A.4. Androst-4-en-3,17-dion (5) bileşiğinin ¹³ C NMR spektrumu.....	33
Şekil A.5. Pregnenolon (3) bileşiğinin ¹³ C NMR spektrumu.....	34
Şekil A.6. Progesteron (2) bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu.....	34
Şekil A.7. Pregnenolon (3) bileşiğinin ¹³ C NMR spektrumu.....	35
Şekil A.8. Progesteron (2) bileşiğinin ¹³ C NMR spektrumu.....	35



PENICILLIUM HIRSUTUM KÜFÜ İLE PREGNENOLON VE DEHİDROEPIANDROSTERON BİLEŞİKLERİNİN BİYOTRANSFORMASYONU

ÖZET

Canlıların yaratılması ve gelişmesinde içerdikleri organizmalar için aktif olarak rol almayan doğal ürünler genellikle daha iyi yaşam koşulları sağlar. Doğal ürünler, diğer canlılar üzerindeki etkileri nedeniyle giderek daha fazla ilgi görmektedir. Bu bileşiklerin çok sayıda olmasına ve çok farklı yapılara sahip olmasına rağmen, biyosentezlerindeki bazı benzerlikler nedeniyle, genellikle terpenler, alkaloidler, steroidler, fenolik bileşikler, özel karbohidratlar, özel peptitler, poliketitler, yağ asitleri ve yağ asidi türevleri olarak sınıflandırılırlar. Doğal bileşiklerin önemli bir kategorisi steroidlerdir. En önemli ve iyi bilinen steroidlerden biri hem insanlarda hem de hayvanlarda membranların akışkanlığını kontrol eden kolesterol molekülüdür. D3 vitamini, safra asitleri ve steroidler gibi önemli rolleri olan bazı maddeler kolesterol olarak başlar. Kolesterol türevi steroid hormonlar beş grupta sınıflandırılır; progestagenler (progestinler), östrojenler, androjenler, mineralokortikoidler ve glukokortikoidler. Genellikle androjen olarak sınıflandırılan dolaşımdaki ana steroid, dehidroepiandrosteron (DHEA) (9) gibi erkeklerde cinsel özellikleri teşvik eden androjendir.

Biyotransformasyonlar, enzimlerin tipik substratları olmayan maddeler üzerinde çalıştıkları kimyasal reaksiyonlardır. Biyotransformasyonla ilgili enzimler çeşitli biyolojik sistemlerde veya serbest, sabit moleküller olarak işlev görebilir.

Biyotransformasyonlarda kullanılan en sık biyolojik sistemler bakteriler, küfler ve mayalardır. Mikroorganizmalar, mevcut kimyasal sentez tekniklerine göre çok sayıda faydası olan mikrobiyal biyotransformasyonlar için kullanılabilir. Bu mikroorganizmalar uygun yüzeylere immobilize edilebilir veya mikrobiyal biyotransformasyonları gerçekleştirmek için serbestçe kullanılabilir.

Yüksek regioseçiciliği ve stereoseçiciliği sebebiyle küf enzimlerinin, küfler tarafından meydana gelen mikrobiyal steroid biyotransformasyonlarında önemli ve işlevsel bileşiklerin elde edilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışma da DHEA (9) ve pregnenolon (3) bileşiklerinin *Penicillium hirsutum* MRC 500372 küfü ile ayrı ayrı biyotransformasyonu gerçekleştirilmiştir. Küfün gelişmesi için besiyeri hazırlandıktan sonra erlenlere dağıtılmıştır. Steril etmek için otoklav kullanılmıştır. *P. hirsutum* MRC 500372 küfü steril erlenlere uygun şartlarda ekildikten sonra 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. Steril şartlarda erlenlerdeki küflere DHEA (9) ve pregnenolon (3) ayrı ayrı ilave edilip 5 gün daha inkübasyon işlemi yapılmıştır. İnkübasyondan sonra steroidler besiyerinden filtre edilip etil asetat ile ekstrakte edilmiştir. Evaporatörde etil asetatın uçurulması ile elde edilen kalıntıdaki steroidlerin saflaştırılması için kolon kromatografisinden faydalanılmıştır.

NMR, IR spektroskopisi ve erime noktaları tayini gibi yapı tayin yöntemleri kullanılarak *P. hirsutum* MRC 500372 ile DHEA (9) ve pregnenolon (3) substratlarının inkübasyonundan sonra DHEA (9)'den androst-4-en-3,17-dion (5) ve pregnenolon (3)'dan progesteron (2) metabolitleri ile sonuçlandığı tespit edilmiştir.



**BIOTRANSFORMATION OF PREGNENOLONE AND
DEHYDROEPIANDROSTERONE COMPOUNDS BY THE MOLD
*PENICILLIUM HIRSUTUM***

SUMMARY

Natural products are substances that do not contribute to the growth and reproduction of live creatures. Because of their impacts on other organisms, natural substances benefit living things and attract more attention. Groups such as alkaloids, terpenoids, peptides, steroids, polyketides, special amino acids, phenylpropanoids, fatty acids and derivatives and special carbohydrates are commonly used to categorize natural compounds.

Biotransformations are chemical changes that biological systems can perform on xenobiotic substances. Biotransformations are carried out by enzyme-containing biological systems and free or immobilized enzymes. Tissue cultures, cell cultures, microsomes, organ cultures, microsomes, microbe spores and microorganisms are often used as standard biological systems for biotransformations.

In living organisms, enzymes carry out nearly every reaction by reducing the activation energy (EA). Enzymes reduce the time required for the reaction to achieve equilibrium, but they are neither consumed nor affected by the processes nor alter the ΔG or the state of equilibrium of the process. The International Union of Biochemistry has reported about 3200 enzymes, with an estimated 25,000 enzymes in nature.

Because they are highly efficient catalysts, enzymes have certain benefits for their users. For example, the reaction rates of enzymatic reactions can be increased 10^8 - 10^{10} times, and in rare cases, this can even exceed 10^{12} .

Because they are highly efficient catalysts, enzymes have certain benefits for their users. For example, the reaction rates of enzymatic reactions can be increased 10⁸-10¹⁰ times, and in rare cases, this can even exceed 10¹². Since enzymes are completely biodegradable and are composed of amino acids, they are acceptable for the environment. While most other chemical reagents harm the environment, enzymes generally work in moderate environments (pH 7, 30 °C and 1 atm). As a result, certain problems such as isomerization, racemization, rearrangements and fragmentation are reduced. Since enzymes are compatible with each other, they typically work in the same or similar environments. As a result, many reactions can be performed in a single flask using multienzyme systems. While most enzymes have a high substrate tolerance, some are not limited to their intended function. These enzymes can accept a wide variety of natural and artificial substances. Enzymes can catalyze many different reactions, and practically any known reaction can be catalyzed by an enzyme.

Enzymes are molecules with chemoselectivity, regioselectivity and enantioselectivity. Because they are chemoselective, enzymes usually only affect a certain type of functional group, leaving other functions unchanged. Enzymatic reactions, therefore, typically have a cleaner quality. Thanks to their regioselectivity, enzymes can discriminate between functional groups that occupy different chemical positions within the same substrate molecule. The complex three-dimensional architecture of enzymes may enable them to achieve this. As chiral catalysts derived from L-amino acids, enzymes are enantioselective. Therefore, enzymes can recognize any chirality on a substrate molecule. Both enantiomers in a racemic substrate can usually react at different rates, resulting in a kinetic reaction, and a prochiral substrate can be transformed into a chiral product.

However, there are also disadvantages to using enzymes. One type of enantiomer found in nature is an enzyme. When the other kind of enantiomeric product is needed, an enzyme with the opposite stereochemical selectivity is required. But this is often not possible. Enzymes require special working conditions. Working in temperate environments can be problematic, as high temperatures and acidic pH can inhibit some enzymes. Water is the least optimal solvent for most organic processes due to its high boiling point and evaporation heat; however, enzymes demonstrate the highest catalytic activity in this solvent. In addition, most organic molecules are hardly soluble in aqueous solutions. Therefore, switching an enzymatic process from an aqueous to an organic medium is highly desirable. However, due to enzyme denaturation, this can lead to a decrease in catalytic activity. The natural cofactors on which enzymes rely are extremely important. Despite their extraordinary flexibility in accepting non-natural substrates, enzymes rely almost entirely on their natural cofactors such as NADH and NADPH. Unfortunately, because these molecules are relatively unstable, too costly to be used at stoichiometric levels, and both are not feasible, they cannot be substituted with more affordable synthetic counterparts. Enzymes are sensitive to inhibition events. Substrate or product inhibition, which causes enzymes to stop operating at increased substrate and/or product concentrations, can impact a wide range of enzyme functions. In addition, some enzymes can trigger allergies. Enzymes can cause allergic reactions, but this danger can be minimized by considering them as chemicals and exercising caution when utilizing them.

Typically, biotransformations are carried out by whole, intact microorganisms or isolated enzyme systems. It is estimated that about 300 isolated enzyme systems are available for sale. Biotransformations often involve entire microorganisms since the majority of the needed enzyme systems are bound to the membrane and hard to remove. Bacteria, yeasts, molds, and microalgae are the four most common microorganisms employed in biotransformations. Microorganisms use non-specific enzyme systems to perform a variety of reactions on both natural and synthetic substrates. Among these reactions, microbial hydroxylations are the most common and preferred. The importance of this process was first recognized in 1952 when microbial hydroxylation helped solve an important problem related to the synthesis of cortical steroids. Due to the isolation of the position from other functional groups, the addition of an oxygen function to C-11 was an extremely time-consuming, expensive and challenging procedure. *Rhizopus arrhizus* effectively solved this problem by microbial hydroxylation. Following microbial hydroxylation, microbial biotransformations became prominent. Since then, various substrate groups, including steroids, have been widely used for microbial biotransformations. Because of their high regioselectivity

and stereoselectivity, microbial steroid biotransformations are widely used to synthesize several key steroid hormones and medicines.

Many microbial steroid biotransformations have been described in recent years. Tons of outstanding efforts are still being made to increase the efficiency of microbial biotransformations and discover new, valuable microbes and reactions. Since the initial description of microbial hydroxylation in 1952, various fungi have consistently been one of the most studied whole-cell systems for biotransformation processes. Various fungi have biotransformed numerous steroid species. Several intriguing results have been obtained from these biotransformations, including microbial hydroxylations, Baeyer-Villiger oxidations and 5 α -reduction.

In this study, DHEA (**9**) and pregnenolone (**3**) compounds were biotransformed separately by *Penicillium hirsutum* MRC 500372 mold. After preparing the medium for the growth of the mold, it was dispensed into flasks. An autoclave was used for sterilization. *P. hirsutum* MRC 500372 mold was inoculated in sterile flasks under appropriate conditions and incubated for 3 days. DHEA (**9**) and pregnenolone (**3**) were added separately to the molds in the sterile flasks and incubated for another 5 days. After incubation, steroids were filtered from the medium and extracted with ethyl acetate. The residue obtained by evaporation of the ethyl acetate in an evaporator was subjected to column chromatography to purify steroids. Using structural methods such as NMR, IR spectroscopy and melting point determination, incubation of DHEA (**9**) and pregnenolone (**3**) substrates with *P. hirsutum* MRC 500372 resulted in metabolites of androst-4-en-3,17-dione (**5**) from DHEA (**9**) and progesterone (**2**) from pregnenolone (**3**).



1. GİRİŞ

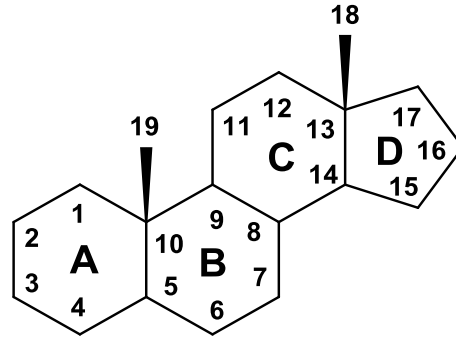
Canlıların büyümesi ve gelişmesi için direkt olarak etkisi olan ve olmayan çok çeşitli organik bileşikler bulunmaktadır. Yaşamsal olarak doğrudan etkisi olan organik bileşikler primer metabolitler, direkt etkisi olmayan organik bileşiklere sekonder metabolitler olarak isimlendirilir. Primer metabolitlere nükleotitler, steroidler, amino asitler ve organik asitler örnek olarak verilebilir [1].

Biyokimya, canlı organizmanın hem biyolojik hem de kimyasal süreçlerinin incelenmesi ile ilgilidir. Biyokimya 3 alana ayrılabilir; yapısal biyoloji, enzimoloji ve metabolizma. Bu üç başlık canlı süreçlerin araştırılmasını ve geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Biyokimya, canlı hücrelerdeki moleküllerin ve hücrelerin birbiri arasında gerçekleşen süreçlerin kimyasal temelini anlamaya ve tespit edilmesine olanak sağlar; bu sebeple dokuların, organ ve organizma yapısını, fonksiyonun incelenmesine ve anlaşılmasına katkı sağlar.

Biyokimyanın büyük bir kısmı, yaşamın ortaya çıkmasını sağlayan ve yaşamla ilgili birçok işlevi yerine getiren proteinler, nükleik asitler, karbohidratlar ve lipitler gibi biyolojik makromoleküllerin yapısı, işleyişi ve çalışmalarıyla ilgilidir. Metabolizma, hücrelerin kimyasal maddeler yoluyla enerji kullanan mekanizmasıdır. Biyokimyanın tıpta, beslenmede ve tarımda önemli uygulamaları vardır. Tıp alanında hastalıkların nedenleri ve tedavileri biyokimyacıların inceleme alanlarındandır. Beslenme alanında tüketicinin nasıl sağlıklı kalacağını ve besin eksikliklerinin olup olmadığını araştırır. Tarımda biyokimyacılar toprak ve gübreler üzerinde çalışır ve bitki mahsulleri, mahsul depolamayı ve haşere kontrol sistemlerinin süreçleri üzerine çalışırlar [2].

Steroidler, doğada çok çeşitli bulunan doğal bileşiklerin oluşturduğu ürün sınıfıdır. Steroidlerin işlevleri biyolojik aktivite çeşitliliği, insanlarda üreme sisteminin kontrolü ve geliştirilmesi, suda yaşamakta olan mantarların üremesinin uyarılması, yarı sentetik östrojen ve progesterin ajanları, androjen (anabolik ajan) gibi çok çeşitli iyileştirme, tedavi etme uygulamalarda destek olmaktadır.

Steroidlerin isimlendirilmesi bitişik yan zincir karbon atom döngüsüne dayanmaktadır. Karbonlar numaralandırılmış olarak ve halkalarda harflerle gösterilmektedir [3].



Şekil 1.1. Genel Steroid Yapısı.

Steroidler hidrokarbon zincirinin ve işlevsel bir grubun olmasıyla karakterize edilmiş organik bileşik sınıfıdır. İnsan vücudunda doğal olarak üretilmekte ve hormon düzenlenmesi, metabolizma ve bağışıklık gibi birçok fizyolojik süreçlerin içinde önemli katkılar sağlamaktadır. Doğal olarak üretilmediği gibi yapay olarak da sentezlenebilmektedir. Yapay olarak tıp, kozmetik, spor performans artırıcı gibi birçok uygulama alanında kullanılabilir. Çeşitli steroidlere örnek vermek gerekirse:

Saç steroidleri: İnsan saçında tespit edilen ve anabolik steroidlerin kullanımının tespiti için biyobelirteç olarak kullanılan steroidlerdir [4].

Yumuşak mercan steroidleri: Bunlar deniz hayvanları olan yumuşak mercanlar tarafından üretilen steroid sınıfıdır. Antitümör, solunum analeptik özellikleri dahil olmak üzere bir dizi farmakolojik aktivite sergiledikleri bulunmuştur [5].

Tüy steroidleri: Kuş tüylerinden tespit edilen beslenme stresleri ve çevresel değişkenlik açısından biyobelirteç olarak kullanılan steroidlerdir. Kortikosteron, beslenme stresinin farklı tüy türlerinde en güvenilir steroid biyobelirteçidir [6].

Anabolik-androjenik steroidler: Bunlar birincil erkek cinsiyet hormonu olan testosteronun sentetik türevleridir. Kas gelişimini arttırmak için kullanılırlar. Kullanımı ile ilgili kardiyovasküler problemler, karaciğer hasarı, davranış değişiklikleri gibi oluşabilecek yan etki risklerinden dolayı tartışmalı durumdadır [7, 8].

Kardiyovasküler steroidler: Lipid metabolizma bozuklukları, hipertansiyon, pıhtılaşma bozuklukları dahil olmak üzere kardiyovasküler sonuçlarla ilişkili

uzaklaştırılması sonucunda androstenedion olarak da bilinen androst-4-en-3,17-dion (5) sentezlenir. C-17'de androst-4-en-3,17-dion (5) indirgendiğinde, aktif bir androjen olarak bilinen testosteron (6) sentezlenir. 5 α -redüktaz enzimi tarafından testosteron (6), dihidrotestosteron (7)'a dönüştürülebilir [10, 13, 14].

Δ^5 yolunda, kolesterol (1)'den meydana gelen pregnenolon (2), 17 α -hidroksipregnenolon (8) aracılığıyla dehidroepiandrosteron (9) olarak da bilinen DHEA (9) dönüştürülür. DHEA (9) ayrıca androst-4-en-3,17-dion (5) aracılığıyla testosterona (6) dönüştürülebilir. Androjenlerin biyosentezinde Δ^4 yolu ve Δ^5 yollarının son ürünü Şekil 1.3'te görüldüğü gibi androst-4-en-3,17-dion (5)'dur. Androst-4-en-3,17-dion (5), aynı zamanda estron (10) ve estriol (11) gibi östrojenlerin de başlangıç maddesidir. Bir diğer östrojen olan estradiol (12) ise testosteron (6)'dan sentezlenir [10, 13, 14]. Bir 3 β -hidroksi-5-en steroid olan DHEA (9), androjenlerin ve östrojenlerin öncüsüdür [15]. Hormon seviyesi erken yetişkinlik döneminde zirve yapar ve ardından 70-80 yaşlarında düşmeye başlar [16]. DHEA (9) çoğu dehidroepiandrosteron sülfata dönüştürülür, depolanır ve plazmadaki uzun yarı ömrü nedeniyle ihtiyaç duyulduğunda belirli hormonlara dönüştürülür. Önemli bir farmasötik steroid türü olarak, çeşitli yerlerdeki hidroksilasyon çeşitli biyolojik eylemler sergiler. Örneğin, C-11 α 'daki hidroksilasyon anti-enflamatuar etkiler için gerekliken, C-9 α ve C-16 α 'daki hidroksilasyonlar glukokortikoid biyoaktiviteleri için gereklidir [17].



2. *PENICILLIUM* TÜRLERİ İLE DHEA VE PREGNENOLON BİYOTRANSFORMASYONLARI

2.1. Biyotransformasyon

Biyotransformasyon, mikroorganizmalar tarafından organik bileşiklerin enzimatik olarak dönüştürülmesi sürecidir. Bu süreçte, mikroorganizmaların ürettiği enzimler, organik bileşiklerin kimyasal yapısını değiştirerek yeni metabolitler oluşturur. Biyotransformasyon, çevre kirliliğinin giderilmesinde, ilaçların metabolizmasında ve çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılır [18].

Biyotransformasyonun nasıl çalıştığına dair detaylı bilgi, farklı mikroorganizmaların farklı koşullar altında organik bileşiklerin biyotransformasyon kinetiğini belirlemek için yapılan çalışmalardan elde edilir. Örneğin, *Pseudomonas* sp. BIOMIG1 adlı bakterinin benzalkonyum klorürlerin biyotransformasyon kinetiğini belirlemek için yapılan bir çalışmada, bu bakterinin benzalkonyum klorürleri 1.4 mg/L saat hızında giderebildiği ve bunları amonyak ve karbon dioksit'e dönüştürdüğü tespit edilmiştir. Ayrıca, bu çalışmada, bakteri yoğunluğu, sıcaklık ve diğer koşulların biyotransformasyon kinetiğine etkisi incelenmiştir [19].

Biyotransformasyon, mikroorganizmaların ürettiği enzimler aracılığıyla gerçekleştirilir. Bu enzimler, organik bileşiklerin kimyasal yapısını değiştirerek yeni metabolitler oluşturur. Örneğin, bir çalışmada, matrin ve oksimatrin bileşiklerinin mikrobiyal transformasyonu ve metabolitlerinin *in vitro* biyolojik aktivitelerinin incelenmesi hedeflenmiştir. Bu çalışmada, farklı mikroorganizmaların bu bileşiklerin biyotransformasyonunu gerçekleştirdiği ve yeni metabolitler oluşturduğu tespit edilmiştir [20].

Sonuç olarak, biyotransformasyon, mikroorganizmaların ürettiği enzimler aracılığıyla organik bileşiklerin kimyasal yapısını değiştirerek yeni metabolitler oluşturan bir süreçtir. Bu süreç, çevre kirliliğinin giderilmesinde, ilaçların metabolizmasında ve çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılır [20].

2.2. Mikrobiyal Biyotransformasyon

Mikrobiyal biyotransformasyon, yani mikroorganizmaların biyolojik maddelerin kimyasal yapısını değiştirmesi, çeşitli biyolojik ve kimyasal sũreçlerin bir sonucudur. Bu dũnũřũm, mikroorganizmaların metabolik aktivitelerinin bir sonucu olarak, substratların kimyasal yapısını değiştirerek yeni maddelerin oluşturulmasına yardımcı olur. Mikrobiyal biyotransformasyon, biyoteknolojik uygulamalarda ve evre kirliliğinin giderilmesinde önemli bir rol oynar [19].

Mikrobiyal biyotransformasyon, farklı mikroorganizmaların farklı biyolojik maddelerin biyotransformasyonunu gerçekleştirmelerine izin verir. Örneğin, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Streptococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, ve *Candida albicans* gibi mikroorganizmalar, antimikrobiyal aktiviteye sahip maddelerin biyotransformasyonunu gerçekleştirebilir. Bu mikroorganizmalar, antimikrobiyal maddelerin biyotransformasyonunu gerçekleştirmek için farklı biyolojik yolları kullanırlar [21].

Mikrobiyal biyotransformasyon, ayrıca biyoteknolojik uygulamalarda da kullanılır. Örneğin, mikroorganizmalar, biyolojik maddelerin biyotransformasyonunu gerçekleştirmek için kullanılır. Bu, biyolojik maddelerin kimyasal yapısını değiştirerek yeni maddelerin oluşturulmasına yardımcı olur. Mikrobiyal biyotransformasyon, biyoteknolojik uygulamalarda önemli bir rol oynar, ũnkũ mikroorganizmalar, biyolojik maddelerin biyotransformasyonunu gerçekleştirmek için farklı biyolojik yolları kullanırlar [22-24].

Sonuç olarak, mikrobiyal biyotransformasyon, mikroorganizmaların biyolojik maddelerin kimyasal yapısını değiştirmesi sũrecidir. Bu sũre, mikroorganizmaların metabolik aktivitelerinin bir sonucudur ve biyoteknolojik uygulamalarda ve evre kirliliğinin giderinde önemli bir rol oynar [25, 26].

2.3. Enzimler

Biyotransformasyon, biyolojik sistemlerin kimyasal reaksiyonlarını kontrol etmek ve optimize etmek için kullanılan bir tekniktir. Enzimler, biyotransformasyon tekniklerinde önemli bir rol oynayan biyolojik molekũllerdir [27]. Enzimler, kimyasal

reaksiyonlarını katalizlemek için kullanılan biyolojik moleküllerdir ve genellikle proteinler olarak sınıflandırılırlar.

Enzimler, biyotransformasyon tekniklerinde kullanıldığında, kimyasal reaksiyonlarını hızlandırmak, seçicilik sağlamak ve reaksiyon ürünlerinin kalitesini artırmak için kullanılır. Enzimler, biyotransformasyon tekniklerinde kullanıldığında, aşağıdaki avantajlar sunar:

Seçicilik: Enzimler, kimyasal reaksiyonlarını seçici bir şekilde katalizlemek için kullanılır. Bu, reaksiyon ürünlerinin kalitesini artırmak ve istenmeyen ürünlerin oluşumunu azaltmak için kullanılır.

Hız: Enzimler, kimyasal reaksiyonlarını hızlandırmak için kullanılır. Bu, reaksiyon sürelerini azaltır ve ürünlerin daha hızlı elde edilmesini sağlar.

Kalite: Enzimler, reaksiyon ürünlerinin kalitesini artırmak için kullanılır. Bu, ürünlerin daha yüksek kalitesini ve daha az istenmeyen ürünlerin oluşumunu sağlar.

Çevre dostu: Enzimler, biyotransformasyon tekniklerinde kullanıldığında, çevre dostu bir alternatif sunar. Enzimler, kimyasal reaksiyonları katalizlemek için kullanılır ve genellikle kimyasal maddelerin kullanılmamasını sağlar [28].

Biyotransformasyon tekniklerinde enzimler, aşağıdaki alanlarda kullanıldığı için önemlidir:

Farmasötik: Enzimler, ilaçların üretiminde kullanıldığı için önemlidir. Enzimler, kimyasal reaksiyonları katalizlemek için kullanılır ve ilaçların kalitesini artırmak için kullanılır.

Gıda: Enzimler, gıda üretiminde kullanıldığı için önemlidir. Enzimler, kimyasal reaksiyonları katalizlemek için kullanılır ve gıda ürünlerinin kalitesini artırmak için kullanılır.

Kozmetik: Enzimler, kozmetik ürünlerinin üretiminde kullanıldığı için önemlidir.

Enzimler, kimyasal reaksiyonları katalizlemek için kullanılır ve kozmetik ürünlerinin kalitesini artırmak için kullanılır [29].

Sonuç olarak, enzimler biyotransformasyon tekniklerinde önemli bir rol oynar ve kimyasal reaksiyonları katalizlemek için kullanılır. Enzimler, biyotransformasyon

tekniklerinde kullanıldığında, seçicilik, hız, kalite ve çevre duyarlılığı avantajları sunar [29, 30].

2.4. Biyotransformasyon Teknikleri

Biyotransformasyon teknikleri, biyolojik sistemlerin kimyasal, fizyolojik veya biyokimyasal süreçlerini değiştirme veya kontrol etme amacıyla kullanılan yöntemlerdir. Bu teknikler, biyolojik sistemlerin işlevlerini değiştirerek, yeni ürünler oluşturmak, hastalık tedavisi veya çevre kirliliğini azaltmak gibi amaçlar için kullanılır.

Biyotransformasyon teknikleri arasında, genetik mühendisliği, biyoteknoloji, biyokimya ve mikrobiyoloji gibi alanlarda geliştirilen yöntemler bulunur. Bazı örnekler şunlardır:

Genetik Mühendisliği: Genetik mühendisliği, biyolojik sistemlerin genetik yapısını değiştirme amacıyla kullanılan bir tekniktir. Bu teknik, genetik olarak değiştirilmiş organizmalar oluşturmak için kullanılır.

Biyoteknoloji: Biyoteknoloji, biyolojik sistemlerin kimyasal, fizyolojik veya biyokimyasal süreçlerini değiştirme amacıyla kullanılan bir tekniktir. Bu teknik, biyolojik sistemlerin işlevlerini değiştirerek, yeni ürünler oluşturmak için kullanılır [31].

Biyokimya: Biyokimya, biyolojik sistemlerin kimyasal süreçlerini değiştirme amacıyla kullanılan bir tekniktir. Bu teknik, biyolojik sistemlerin kimyasal yapısını değiştirerek, yeni ürünler oluşturmak için kullanılır.

Bu teknikler, biyotransformasyon alanına katkıda bulunarak, biyolojik sistemlerin kimyasal, fizyolojik veya biyokimyasal süreçlerini değiştirme amacıyla kullanılır [18].

2.5. Küfler ile Steroid Biyotransformasyonu

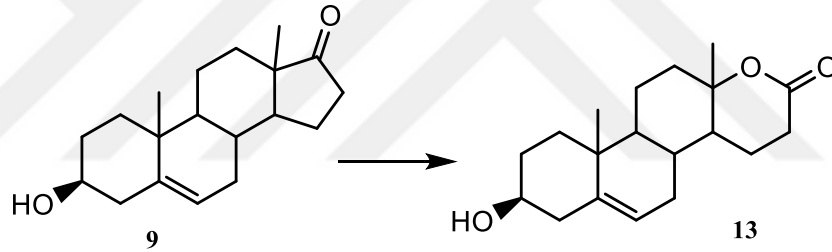
Steroidlerin biyotransformasyon reaksiyonları yüksek regioseçiciliği ve stereoseçiciliği sebebiyle, hormonlar ve ilaçlar gibi fonksiyonel bileşiklerin üretiminde yaygın olarak kullanılırlar. Bu durum, Murray ve Peterson'ın 1952 yılında bir *Rhizopus* türü tarafından progesteronun 11 α -hidroksilasyonunun tanımlanması üzerine yaptıkları çalışmadan sonra keşfedilmiştir. O zamandan beri, steroidlerin mikrobiyal biyotransformasyonunun ilaç ve hormon üretimindeki önemi gösterilmiştir [32, 33].

Hali hazırda mikrobiyal biyotransformasyonun etkinliğini arttırmak, kullanım alanı olarak yeni reaksiyonları ve mikroorganizmaları tanımlamak ve istenen yapısal dönüşümü gerçekleştirebilecek mikroorganizmaları izole etmek için çalışmalar devam etmektedir [33, 34].

Mikrobiyal steroid biyotransformasyonu birçok farklı küf ile yapılmıştır. Bu yapılan çalışmalar ile Baeyer-Villiger oksidasyonları, A halkasının aromatisasyonu, mikrobiyal hidroksilasyonlar, hidroksil gruplarının oksidasyonu, yan zincirlerin uzaklaştırılması, mikrobiyal hidrojenasyonlar ve dehidrojenasyonlar, keton gruplarının indirgenmesi gibi farklı reaksiyonlarla sonuçlanmıştır [32-37].

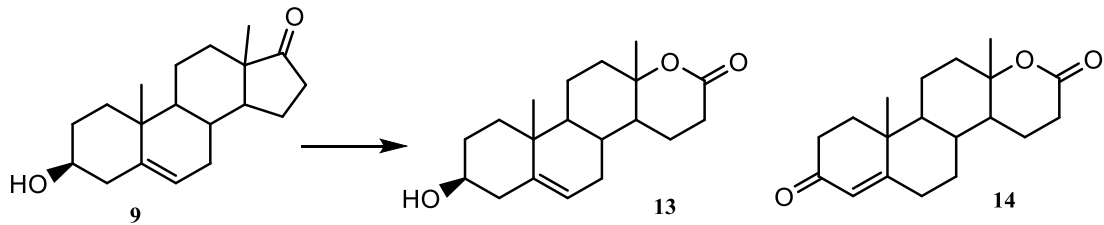
2.6. Küflerle DHEA (9) ve Pregnenolon (3) Biyotransformasyon Çalışmaları

P. lilacinum AM111 [38] ve *P. vinaceum* AM110 [39] kültürlerinin DHEA (9)'nın inkübasyonundan sonra, izole edilen 3 β -hidroksi-17 α -oksa-d-homo-androst-5-en-17-on (13) dönüştüğü tespit edilmiştir (Şekil 2.1.).



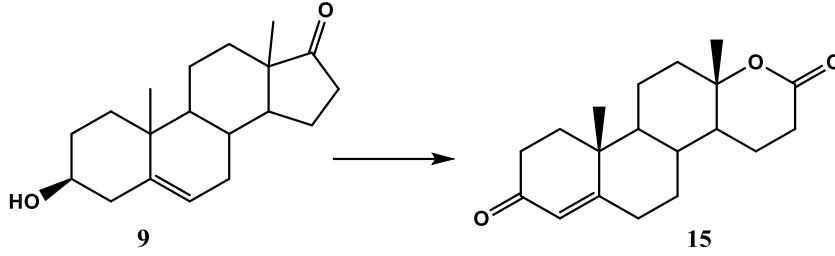
Şekil 2.1. *P. lilacinum* AM111 ve *P. vinaceum* AM110 tarafından DHEA (9) biyotransformasyonu [38, 39].

P. camemberti AM83 [40] ve *P. simplicissimum* WY134-2 [41] kültürlerinin DHEA (9) 'nin inkübasyonundan sonra testololakton (14) ve 3 β -hidroksi17 α -oksa-d-homo-androst-5-en-17-on (13) dönüştüğü tespit edilmiştir (Şekil 2.2.).



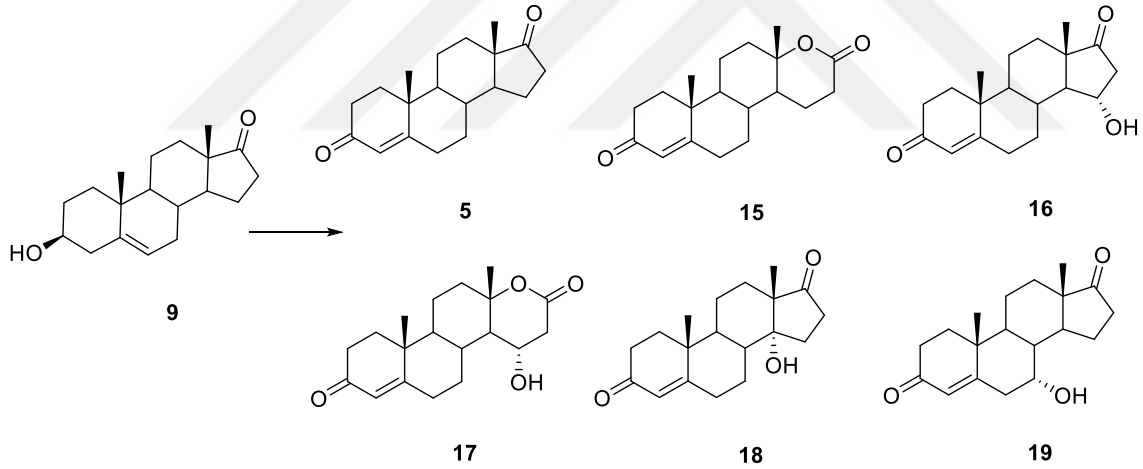
Şekil 2.2. *P. camemberti* AM83 ve *P. simplicissimum* tarafından DHEA (9)'nin biyotransformasyonları [40, 41].

Alina Swizdor, *P. lanosocoeruleum* KCH 3012 ile yaptığı çalışmada substrat DHEA (9)'nin 17 α -oxa-d-homo-androst-4-en-3,17-dion (15)'e dönüştüğünü bulmuştur (Şekil 2.3.) [42].



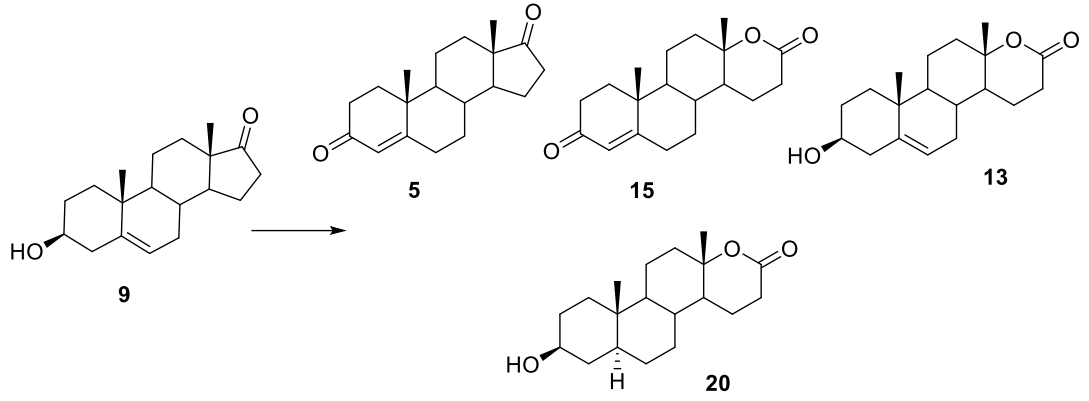
Şekil 2.3. *P. lanosocoeruleum* KCH 3012 tarafından biyotransformasyonu [42].

P. griseopurpureum kültürünün DHEA (9) ile inkübasyonundan 17 α -oxa-d-homo-androst-4-en-3,17-dion (15), androst-4-en-3,17-dion (5), 15 α -hidroksi-17 α -oxa-d-homo-androst-4-en-3,17-dion (17), 14 α -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (18), 15 α -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (16), 7 α -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (19) izole edilmiştir (Şekil 2.4.) [43].



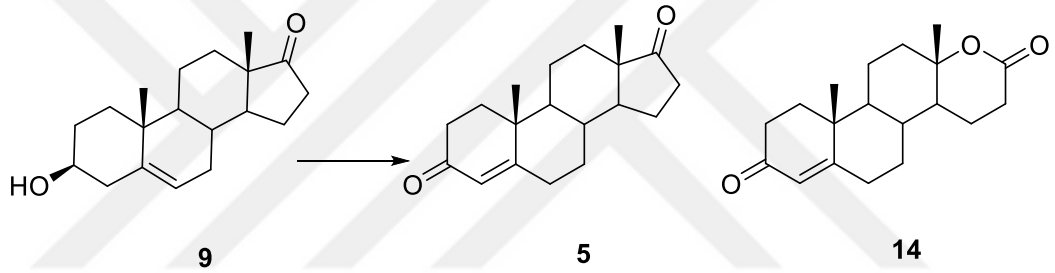
Şekil 2.4. *P. griseopurpureum* tarafından DHEA (9)'nin biyotransformasyonları [43].

P. glabrum kültürünün DHEA (9) ile inkübasyonundan 3 β -hidroksi-17 α -oxa-d-homo-5 α -androstan-17-on (20), androst-4-en-3,17-dion (5), 17 α -oxa-d-homo-androst-4-en-3,17-dion (15) ve 3 β -hidroksi-17 α -oxa-d-homo-androst-5-en-17-on (13) izole edilmiştir (Şekil 2.5.) [43].



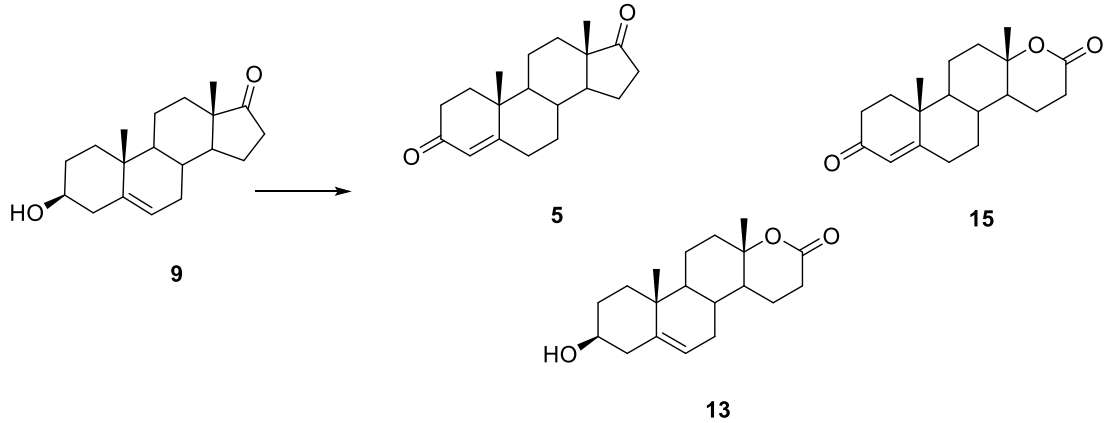
Şekil 2.5. *P. glabrum* tarafından DHEA (9)'nin biyotransformasyonları [43].

P. chrysogenum KCh S4 [44] ve *P. citreo-viride* A.C.C.C. 0402 [45] kültürleri ile DHEA (9) 'nin inkübasyonundan sonra 17α-oxa-d-homo- androst-4-en-3,17-dion (15) ve androst-4-en-3,17-dion (5) izole edilmiştir (Şekil 2.6.).



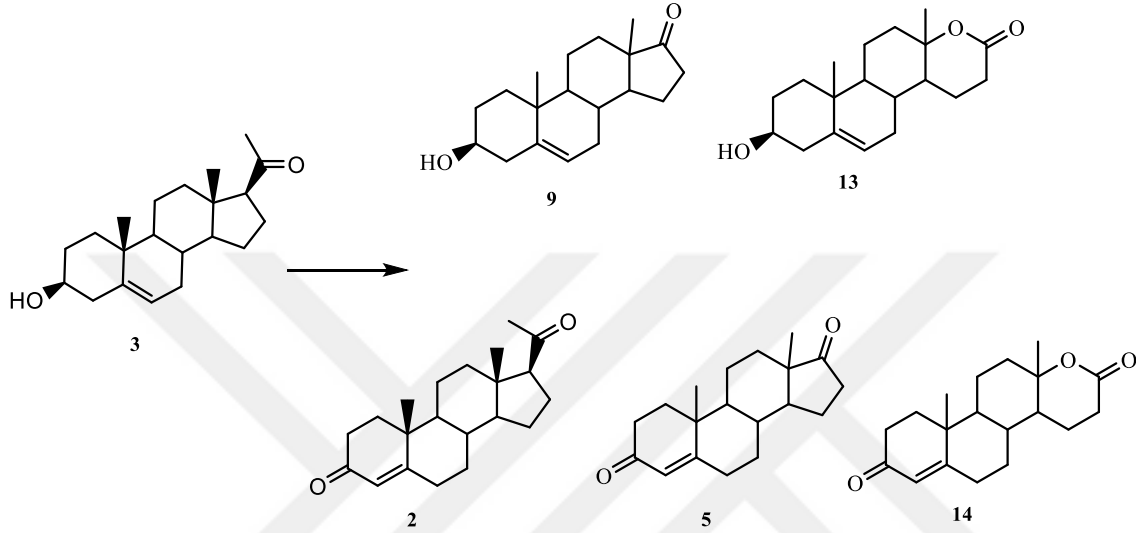
Şekil 2.6. *P. chrysogenum* KCh S4 ve *P. P. citreo-viride* A.C.C.C. 0402 tarafından DHEA (9)'nin biyotransformasyonları [44, 45].

P. commune KCh W7 kültürünün DHEA (9) ile inkübasyonundan 3β-hidroksi-17α-oksa-d-homo-androst-5-en-17-on (13) ve androst-4-en-3,17-dion (5), 17α-oxa-d-homo- androst-4-en-3,17-dion (15) izole edilmiştir (Şekil 2.7.) [44].



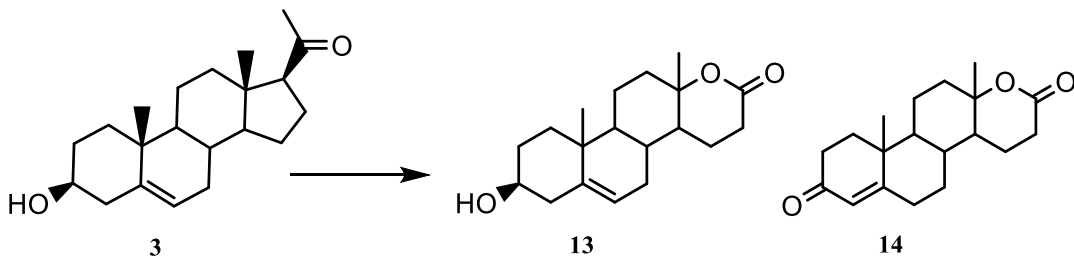
Şekil 2.7. *P. commune* KCh W7 tarafından DHEA (9)'nin biyotransformasyonu [44].

Pregnenolonun (**3**) *P. lilacinum* AM111 kültürü ile üç günlük dönüşümünden sonra aşağıdaki bileşenler izole edilmiştir: DHEA (**9**), progesteron (**2**), 3β-hidroksi-17a-oksa-d-homo-androst-5-en-17-on (**13**), androst-4-en-3,17-dion (**5**) ve testololakton (**14**) (Şekil 2.8). Üç günden daha uzun inkübasyon süresi için dönüşüm oranında artış gözlenmemiştir [38].



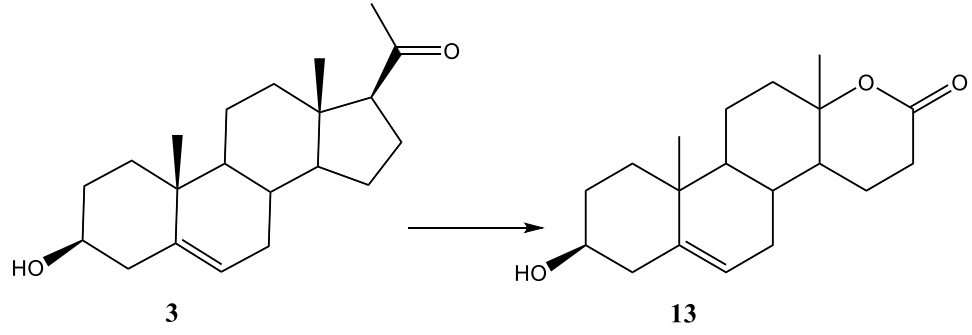
Şekil 2.8. *P. lilacinum* AM111 tarafından pregnenolonun (**3**) biyotransformasyonu [38].

P. camemberti AM83 kültürü ile pregnenolonun (**3**) 24 saatlik dönüşümünden sonra şu bileşikler izole edilmiştir: testololakton (**14**) ve 3β-hidroksi-17a-oksa-d-homo-androst-5-en-17-on (**13**) [40].



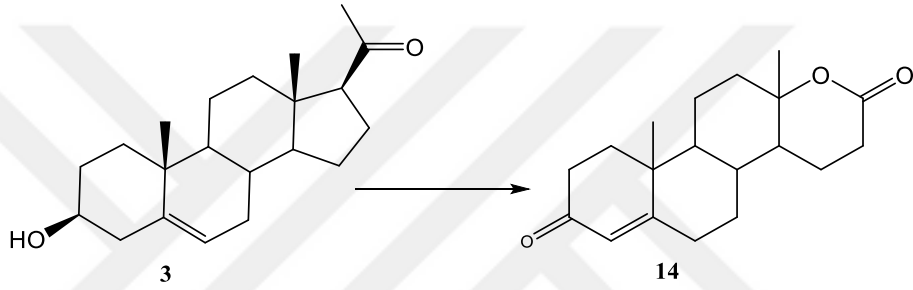
Şekil 2.9. *P. camemberti* AM83 tarafından pregnenolonun (**3**) biyotransformasyonu [40].

P. vinaceum AM110 kültürü ile pregnenolonun (**3**) dönüşümünden sonra aşağıdaki bileşik izole edilmiştir: 3β-hidroksi-17a-oksa-d-homo-androst-5-en-17-on (**13**) [46].



Şekil 2.10. *P. vinaceum* AM110 tarafından pregnenolonun (**3**) biyotransformasyonu [46].

P. lanosocoeruleum kültürü ile pregnenolonun (**3**) dönüşümünden sonra aşağıdaki bileşik izole edilmiştir: testololakton (**14**) [47].



Şekil 2.11. *P. lanosocoeruleum* tarafından pregnenolonun (**3**) biyotransformasyonu [47].



3. METARYEL VE METOD

3.1. Genel Bilgiler

Biyotransformasyon çalışmasında, besiyerini ve sarf malzemeleri sterilize etmek için Nüve marka 40 L model otoklav kullanılmıştır. Otoklav 20 dakika boyunca 121 °C'ye ayarlanmıştır. Biyotransformasyon deneyinin küf tazelemesi ve inkübasyonları için Nucleon (Class II) Tip biyolojik güvenlik kabini kullanılmıştır. Küf gelişimi ve biyotransformasyon çalışmaları Gerhardt 500 thermoshake çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilmiştir. Perkin Elmer SpectrumTwo spektrometresi kullanılarak IR spektrumlar elde edilmiştir. ¹H NMR spektrumları için Varian Mercury 300 NMR spektrometresi 300 MHz'de çalıştırılarak kullanılmıştır. İç sinyal için tetrametilsilan standardı ve çözücü solvent olarak dötorokloroform tercih edilmiştir. ¹³C NMR spektrumları için çözücü solvent olarak dötorokloroform kullanılıp Varian Mercury 300 NMR spektrometresi 75 MHz'de çalıştırılmıştır.

Kolon kromatografisi ve biyotransformasyon deneyi çalışmasının ardından ince tabaka kromatografisi (İTK) testleri gerçekleştirilmiştir. İTK testleri etil asetat-hekzan (1:1) çözücü sistemi ve kalınlığı 0,25 mm olan silika jel kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İTK tabakalarındaki steroidler *p*-anisaldehit-sülfürik asit ayırıcına daldırılarak ve 120°C'de üç dakika ısıtılarak gözlemlenebilir hale getirilmiştir. Erime noktasını belirlemek için Electrothermal IA 9200 erime noktası dedektörü kullanılmıştır.

3.2. Yatık Agar Besiyerinin Hazırlanması

Besiyeri, 1,2 g agar ve 5,85 g patates dekstrozu agarın (PDA) 150 mL distile suda kaynatılmasıyla hazırlanmıştır. On adet ölçüsü 22 mL'lik patolojik cam tüpün yarısına soğutulmadan eklendikten sonra 121°C'de yirmi dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Bu tüplerdeki erimiş besiyeri donmadan hemen önce takriben 45 derece gelecek şekilde soğutmaya bırakıldıktan sonra yatık agar besiyeri hazırlanmıştır.

3.3. Kf Kültürünün Hazırlanması ve Tazelenmesi

Stok kf kültüründeki kf steril koşullar altında yatık agar besiyerinden 3 tanesine aktarılarak oda sıcaklığında 15 gün boyunca çoğalmaya bırakılmıştır. Steril koşullar altında, yeni oluşturulan yatık agar kltrlerinden en gelimi küfler her iki haftada bir taze yatık agar besiyerlerine aktarılmıştır. Biyotransformasyon deneyinde, bu prosedür iki kez tekrarlandıktan sonra üretilen en yeni ve en hızlı büyüyen kf kullanılmıştır.

3.4. Kf Besiyerinin Hazırlanışı

P. hirsutum kfnn besiyeri, glikoz (30 g) ve peptonun (10 g) 1 L distile suda zlp karıştırılmasıyla hazırlanmıştır.

3.5. Biyotransformasyon Deneyi

P. hirsutum besiyeri her biri 100 mL besiyeri içeren on ayrı 250 mL'lik erlene bltrlm ve otoklavda sterilize edilmiştir. Bu erlenler steril koşullar altında *P. hirsutum* kf ile inoküle edilmiş ve daha sonra 25 °C'de 150 rpm'de çalışan çalkalamalı inkübatörde  gün boyunca kltrlenmitir. Inkübasyondan sonra, ilgili substrat (0,5 g) steril koşullar altında DMF (10 mL) içinde zldkten sonra ayrı ayrı on erlene eşit miktarlarda aktarılmıştır. Erlenler daha sonra be gün daha 25°C'de tutulmuştur.

Yapılan biyotransformasyon çalışmasının doğruluğunu belirlemek için bir kontrol erleni kullanılmıştır. Başlangıçta, çalışmada kullanılacak kf içermeyen steril olan besiyeri kontrol erleni kullanılmış; erlene sadece substrat eklenmiştir. Kontrol erleninde, biyotransformasyon çalışmasının her adımı aynı şekilde tamamlanmıştır. Bu adımların ardından kontrol erleninden İTK alındığında hiçbir metabolit görülmediğinden biyotransformasyon çalışmasının meşru ve bilimsel nitelikte olduğunu göstermiştir.

3.6. Metabolitlerin Saflaştırılması ve Yapılarının Tayini

Inkübasyondan sonra, içinde kf kültürü olan besiyerleri filtrasyon işlemiyle misellerinden süzülerek filtrat olarak ayrıtırılmıtır. Daha sonra miselleri yıkamak için 500 mL etil asetat kullanılmıştır. Üç kez, filtrattaki steroidler 1 L etil asetat kullanılarak ekstrakta edilmiştir. Ekstraktlardaki olası su içeriğini ortadan kaldırmak

için susuz sodyum sülfat eklenmiştir. Evaporatörden çözücü uzaklaştırıldıktan sonra kahverengi sakızımsı bir madde ortaya çıkmıştır. Bu kahverengi sakızımsı madde daha sonra İTK incelemesinde substrat ile karşılaştırılmıştır.

Biyotransformasyon çalışmasında substrat ve üretilen kahverengi sakızımsı maddeyi karşılaştırarak İTK incelemesi yapılmıştır. Elde edilen kahverengi sakızımsı maddenin içerisindeki steroidleri ayırtmak için adsorban olan silika jel 60 (Merck 107734, 230-400 mesh) kullanılmıştır.

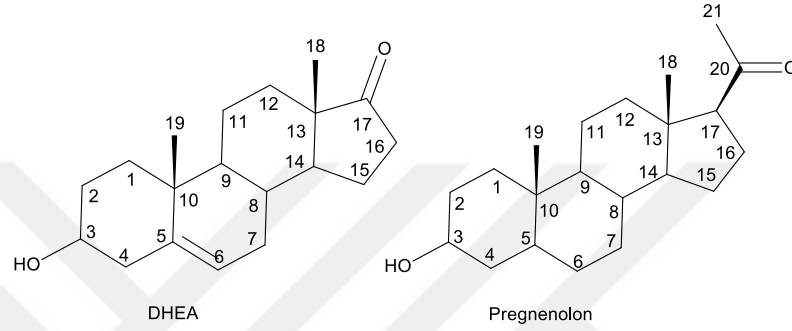
Bu maddeler, *n*-hekzanın artan etil asetat konsantrasyonu ile elüe edilmesiyle kolondan ekstrakte edilmiştir.

Ayrılan steroidlerin yapıları, oluşan her bir metabolitin IR spektrumları, erime noktaları ve NMR başlangıç maddeleri ile karşılaştırılarak belirlenmiştir.



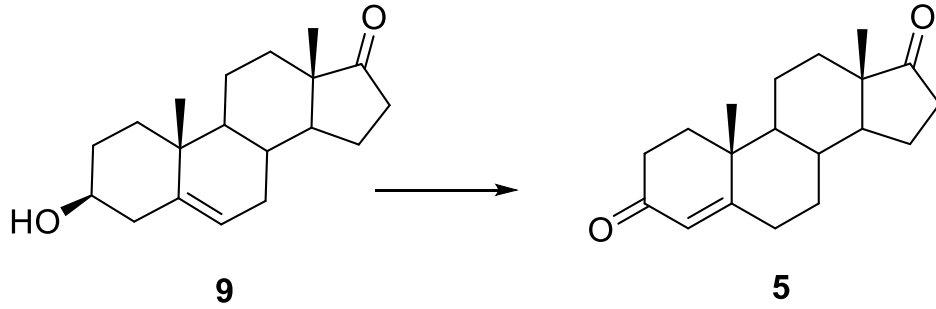
4. DENEYSEL BULGULAR

Bu çalışmada DHEA (**9**) ve pregnenolon (**3**) bileşiklerinin *P. hirsutum* MRC 500372 izolatı ile her biri 5 gün süren biyotransformasyonları ayrı ayrı gerçekleştirildi. DHEA (**9**) ve pregnenolon (**3**) (Şekil 4.1) bileşiklerinin karbon iskeletleri aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.1. Substratlara ait karbon iskeletleri.

Dehidroepiandrosteron (**9**) bileşiğinin *Penicillium hirsutum* MRC 500372 ile inkübasyonundan kahverengi sakızımsı bir karışım (1785 mg) elde edildi. Bu karışım ile yapılan kolon kromatografisi çalışması sonucunda değişime uğramayan başlangıç maddesi (205 mg) ile androst-4-en-3,17-dion (**5**) bileşiği oluştu (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. DHEA (**9**) bileşiğinin *Penicillium hirsutum* MRC 500372 ile inkübasyonu.

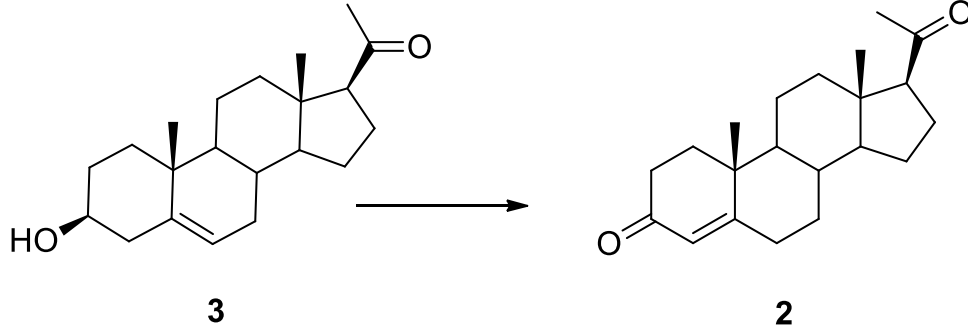
Androst-4-en-3,17-dion (**5**) (44%, 219 mg).

Erime noktası: 168-169 °C, lit., 171-172 °C [48].

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$) : 1735 ve 1670. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0.91 (3H, s, 18-H), 1.21 (3H, s, 19-H), 5.75 (1H, s, 4-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): Bakınız Tablo 4.1.

Pregnenolon (**3**) bileşiğinin *Penicillium hirsutum* MRC 500372 ile inkübasyonundan kahverengi sakızımsı bir karışım (1832 mg) elde edildi. Bu karışım ile yapılan kolon kromatografisi çalışması sonucunda değişime uğramayan başlangıç maddesi (243 mg) ile progesteron (**2**) bileşiği elde edildi (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. Pregnenolon (**3**) bileşiğinin *Penicillium hirsutum* MRC 500372 ile inkübasyonu

Progesteron (**2**) (35%, 174 mg).

Erime noktası: 129-130 °C, lit., 131-133 °C [49].

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 2920, 1700 ve 1665.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0.68 (3H, s, 18-H), 1.21 (3H, s, 19-H), 2.14 (3H, s, 21-H), 2.54 (1H, t, $J = 8.5$ Hz, 17 α -H), 5.75 (1H, s, 4-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): Bakınız Tablo 4.1.

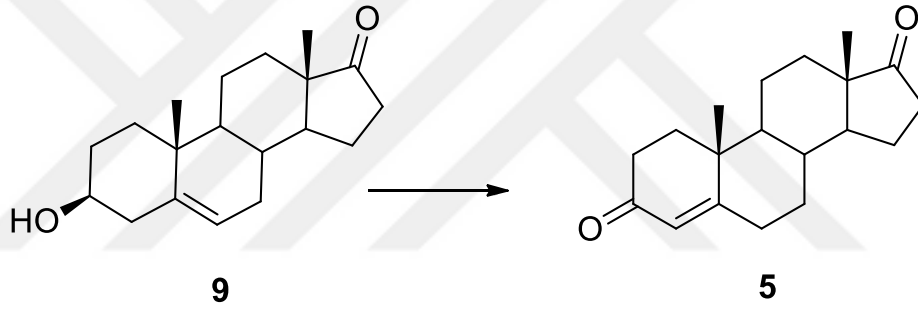
Tablo 4.1. Steroidlere ait ^{13}C NMR kimyasal kayma bilgileri.

C atomu	(9)	(5)	(3)	(2)
1	37.11	35.61	37.22	35.46
2	31.47	33.75	31.54	33.72
3	71.48	199.25	71.67	199.18
4	42.11	123.98	42.20	123.66
5	140.98	170.36	140.72	170.80
6	120.83	32.44	121.38	32.55
7	31.35	31.17	31.73	31.65
8	31.41	35.03	31.81	35.28
9	50.13	53.70	49.93	53.38
10	36.56	38.53	36.48	38.34
11	20.29	20.19	21.05	20.78
12	30.71	30.78	38.80	38.40
13	47.49	47.38	43.98	43.68
14	51.67	50.72	56.88	55.76
15	21.82	21.61	22.77	24.13
16	35.80	35.72	24.46	22.57
17	221.30	220.26	63.68	63.23
18	13.48	13.58	13.21	13.11
19	19.37	17.25	19.36	17.13
20			209.65	209.08
21			31.54	31.29



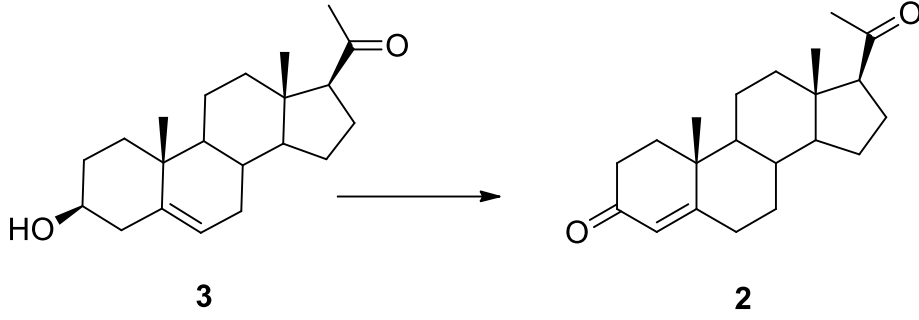
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Dehidroepiandrosteron (**9**) bileşiğinin *P. hirsutum* MRC 500372 ile inkübasyonu 5 gün sürdükten sonra androst-4-en-3,17-dion (**5**) bileşiği tespit edildi (Şekil 5.1.). Androst-4-en-3,17-dion (**5**) bileşiğinin ¹H NMR spektrumu incelendiğinde substrata ait δ_H 3,44 ppm'deki 3 α -H rezonansını içermediği ve ayrıca substratın δ_H 5,33 ppm'deki çift bağ proton rezonansı ile 19-metil grubu rezonanslarının aşağı alana doğru önemli kaymalar (sırası ile ($\Delta\delta_H$ 0.42 ppm ve $\Delta\delta_H$ 0.20 ppm) gösterdiği gözlemlendi. Bu değişiklikler sonucunda substratın 5-en-3 β -hidroksil kısmının 4-en-3-keto kısmına çevrilmesi ile substratın androst-4-en-3,17-dion (**5**) bileşiğine dönüştüğü tespit edildi.



Şekil 5.1. DHEA (**9**) bileşiğinin *P.hirsutum* MRC 500372 ile inkübasyonu

Pregnenolon (**3**) bileşiğinin *P. hirsutum* MRC 500372 ile inkübasyonu 5 gün süren Şekil 5.2.'de gösterildiği şekilde progesteron (**2**) bileşiği ile sonuçlandı. Oluşan metabolitin ¹H NMR spektrumu incelendiğinde substrata ait δ_H 3,50 ppm'deki 3 α -H rezonansının gözlenmediği ve buna ilaveten substratın δ_H 5,34 ppm'deki çift bağ proton rezonansı ile δ_H 1,01 ppm'deki 19-metil grubu rezonanslarının aşağı alana doğru önemli kaymalar (sırası ile $\Delta\delta_H$ 0.41 ppm ve $\Delta\delta_H$ 0.20 ppm) gözlemlendiği anlaşıldı. Bu değişimlerden substratın 5-en-3 β -hidroksil kısmının 4-en-3-keto kısmına dönüştüğünü ve böylece substrat olan pregnenolon (**3**) bileşiğinden progesteron (**2**) bileşiğinin oluştuğu değerlendirildi



Şekil 5.2. Pregnenolon (3) bileşiğinin *P. hirsutum* MRC 500372 ile inkübasyonu

P. hirsutum MRC 500372 ile gerçekleştirilen DHEA (9) ve pregnenolon (3) biyotransformasyonlarında ilgili mikroorganizma tarafından her iki bileşikte de 3β-hidroksisteroid dehidrogenaz/ Δ^5 - Δ^4 izomeraz aktivitesi gösterdiği, ayrıca substratlardaki 5-en-3β-hidroksil kısmının 4-en-3-keto kısmına dönüştüğü ve substratların diğer kısımlarında bir değişim olmadığı anlaşıldı. Sustratlardaki 5-en-3β-hidroksil kısımlarının 4-en-3-keto kısımlarına dönüşümü daha önce bazı *Penicillium* türleri tarafından gerçekleştirilmişti [38-47].

Kısaca *P. hirsutum* MRC 500372 DHEA (9) ve pregnenolon (3) bileşiklerini gösterdiği 3β-hidroksisteroid dehidrogenaz/ Δ^5 - Δ^4 izomeraz aktiviteleri ile sırası ile androst-4-en-3,17-dion (5) ve progesteron (2) bileşiklerine dönüştürdüğü gözlemlendi. *Penicillium hirsutum* MRC 500372 ve diğer küfler ile steroid biyotransformasyonları çalışmalarımız sürmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Journal of Agricultural Faculty of Bursa Uludag University. *Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 35(1), s. 203-215. e-ISSN 2651-4044 <https://dergipark.org.tr/tr/pub/bursauludagziraat>.
- [2] EL-Khateeb, A. (2020). *Pratik Biyokimya Prensipleri ve Teknikleri Yaklaşımı*.
- [3] Sova, J. (1975) *Kardiyak glikozitler*, Vnitri lekarstvi.
- [4] Gheddar, L. Kintz, P. Raul, JS. (2021). Simultaneous testing for anabolic steroids in human hair specimens collected from various anatomic locations has several advantages when compared with the standard head hair analysis. *Drug Testing and Analysis*, 13(7):1445-1451.
- [5] Ermolenko EV, Imbs AB, Glorizova TA, Poroikov VV, Sikorskaya TV, Dembitsky VM. (2020). Chemical Diversity of Soft Coral Steroids and Their Pharmacological Activities. *Mar Drugs*, 18(12), 613.
- [6] Will A, Wynne-Edwards K, Zhou R, Kitaysky A. (2019), Of 11 candidate steroids, corticosterone concentration standardized for mass is the most reliable steroid biomarker of nutritional stress across different feather types. *Ecol Evol*, 9(20), 11930-11943.
- [7] Zbinden, VA. (2020), Anabolik steroidler. *Haftalık Tepkiler*; 30, 1788.
- [8] Christiansen, A. Anders, S. Dimitris, L. (2017), Erkeklerin fitness ve kuvvet antrenmanı ortamlarında anabolik androjenik steroid kullanımına ilişkin tipolojinin ana hatları. *Uyusturucu: Eğitim, Önleme ve Politika*, 24, 295- 305.
- [9] Perry, JC. Schuetz, TM. Memon, MD. Faiz, S. Cancarevic, I. (2020), Anabolic Steroids and Cardiovascular Outcomes. *The Controversy. Cureus*, 12(7), 9333.
- [10] Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. İ. (2005), *Biyokimya* (4. Baskı, ss. 185-188). Aktif Yayınevi.
- [11] Lemke, T. Williams, D. (2012), *Foye's Principles of Medicinal Chemistry* (7th Ed.). Wolters kluwer Health Adis.
- [12] Schenk, C. (2001), *Elevated Cholesterol Levels Present Major Risk for Cardiovascular Disease*, Published.
- [13] Onat, T. Emerk, K. Sözman, E. Y. (2002), *İnsan Biyokimyası* (ss. 481-659) içinde. Palme Yayıncılık.
- [14] Acconcia, F. Marino, M. (2018). *Steroid hormones: synthesis, secretion, and transport* (pp. 1-31). Principles of endocrinology and hormone action.
- [15] Labrie, F. (2010). *DHEA, important source of sex steroids in men and even more in women* (pp. 97-148). Progress in brain research.
- [16] Genazzani, A. D. Lanzoni, C. Genazzani, A. R. (2007). *Might DHEA be considered a beneficial replacement therapy in the elderly* (173-185). *Drugs & aging*.

- [17] Song, M., Fu, R., Cai, S., Jiang, X., Wang, F., Xu, W., & Xu, W. (2023). 7 α and 7 β Hydroxylation of Dehydroepiandrosterone by *Gibberella* sp. and *Absidia Coerulea* Biotransformation. *Catalysts* 2023, 13, 272. *Microbial Biocatalysis*, 71.
- [18] Singh, R. (2017). Microbial Biotransformation: A Process for Chemical Alterations. *J Bacteriol Mycol Open Access*. 4(2), 47-51.
- [19] Yılmaz, F. Ertekin, E. Tezel, U. (2019). Benzalkonyum klorürlerin *Pseudomonas* sp. BIOMIG1 tarafından farklı koşullar altında biyotransformasyon kinetiği. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 25(3), 286-291.
- [20] Karadağ, A. Demirci, F. (2020). Matrin ve oksimatrinin mikrobiyal transformasyonu ve metabolitlerinin in vitro biyolojik aktivitelerinin incelenmesi. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilim Dergisi*, 13(1), 24-34.
- [21] Anjos, C. (2021). An overview of neonicotinoids: biotransformation and biodegradation by microbiological processes. *Environ Sci Pollut Res*, 28, 37082–37109.
- [22] Prakash, A. (2023). A Review on Bioremediation Using Nanobiotechnology and Microbial Heavy Metal Resistance Mechanisms. *Current Materials Science* 17(4), 289-303.
- [23] Xiang, L. Zheng, Y. (2020). Biotransformation of lignin: Mechanisms, applications and future work. *Biotechnol Prog*. 36(1), e2922.
- [24] Lai, Y. (2013). *Biotransformation of artonin E by locally isolated microorganisms*. Universiti Teknologi Malaysia.
- [25] Rossmassler, K. Kim, S. (2019). Impact of primary carbon sources on microbiome shaping and biotransformation of pharmaceuticals and personal care products. *Biodegradation*. 30(2-3), 127-145.
- [26] Tong, H. Chen, M. (2018). Effects of humic acid on pentachlorophenol biodegrading microorganisms elucidated by stable isotope probing and high-throughput sequencing approaches. *European Journal of Soil Science*, 69(2).
- [27] Loraine, J. Smith, M. Genetic Techniques for Manipulation of the Phytosterol Biotransformation Strain *Mycobacterium neoaurum* NRRL B-3805. *Microbial Steroids: Methods and Protocols*, 93-108.
- [28] Qin, D. Dong, J. Multi-Level Optimization and Strategies in Microbial Biotransformation of Nature Products. *Molecules*, 28(6), 2619.
- [29] Adegoke, T. (2023). Microbial Enzymes Involved in the Biotransformation of Major Mycotoxins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(1), 35-51.
- [30] Zizic, M. (2022). Biotransformation of selenium in the mycelium of the fungus *Phycomyces blakesleeanus*. *Anal Bioanal Chem*. 414(20), 6213-6222.
- [31] Özer, G. (2019). Mercimekte (*Lens culinaris* M.) Hızlı Islah Teknikleri Kullanılarak Generasyon Süresinin Kısaltılması. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*. 28(2), 103-111.
- [32] Mahato, S. B. Garai, S. (1997). Review Advances in microbial steroid biotransformation. *Indian Institute of chemical biology*. 62, 332-345

- [33] Fernandes, P. Cruz, A. Angelova, B. Pinheiro, H. M. Cabral, J. M. S. (2003). Microbial conversion of steroid compounds: Recent developments. *In Enzyme and Microbial Technology*. 32(6), 688–705.
- [34] Nassiri-Koopaei, N. Faramarzi, M. A. (2015). Recent developments in the fungal transformation of steroids. *In Biocatalysis and Biotransformation*. 33(1), 1–28.
- [35] Donova, M. V. Egorova, O. V. (2012). Microbial steroid transformations: current state and prospects. *Applied microbiology and biotechnology*. 94, 1423-1447.
- [36] Hanson, J. R. (1995). An Introduction to Biotransformations in Organic Chemistry, *W. H. Freeman and Company*. 1-62.
- [37] Faber, K. (2003). Biotransformations in Organic Chemistry (5th ed., pp 1-407) *Springer-Verlag*.
- [38] Kołek, T. Szpineter, A. Swizdor, A. (2008). DHEA, pregnenolon ve androstenedion'un *Penicillium lilacinum* AM111 ile Baeyer-Villiger Oksidasyonu, *Steroids*. 73, 1441–1445
- [39] Panek, A. Łyczko, P. Świzdor, A. (2020). Microbial modifications of androstane and androstene steroids by *Penicillium vinaceum*. *Molecules*. 25(18), 4226.
- [40] Kołek, T. Szpineter, A. Swizdor, A. Steroidlerin Baeyer-Villiger oksidasyonu üzerine çalışmalar: *Penicillium camemberti* AM83'te DHEA ve pregnenolon d-laktonizasyon yolları. *Steroidler*. 74, 859-862.
- [41] Yang, B. Wang, Y. Chen, X. Feng, J. Wu, Q., Zhu, D. Ma, Y. (2014). Biotransformations of steroids to testololactone by a multifunctional strain *Penicillium simplicissimum* WY134-2. *Tetrahedron*, 70(1), 41-46.
- [42] Swizdor, A. (2013). Baeyer-villiger oxidation of some C19 steroids by *penicillium lanosocoeruleum*. *Molecules*. 18(11), 13812–13822.
- [43] Huang, L. H. Li, J. Xu, G. Zhang, X. H. Wang, Y. G. Yin, Y. L. Liu, H. M. (2010). Biotransformation of dehydroepiandrosterone (DHEA) with *Penicillium griseopurpureum* Smith and *Penicillium glabrum* (Wehmer) Westling. *Steroids*. 75(13-14), 1039-1046.
- [44] Kozłowska, E. Urbaniak, M. Kancelista, A. Dymarska, M. Kostrzewa-Susłow, E. Stępień, Ł. Janeczko, T. (2017). Biotransformation of dehydroepiandrosterone (DHEA) by environmental strains of filamentous fungi. *RSC advances*. 7(50), 31493-31501.
- [45] Liu, H. M. Li, H. Shan, L. Wu, J. (2006). Synthesis of steroidal lactone by *penicillium citreo-viride*. *Steroids*. 71(11-12), 931-934.
- [46] Panek, A. Łyczko, P. Swizdor, A. (2020). Microbial modifications of androstane and androstene steroids by *penicillium vinaceum*. *Molecules*. 25, 4226.
- [47] Swizdor, A. Panek, A. Ostrowska, P. (2018). Metabolic fate of pregnene-based steroids in the lactonization pathway of multifunctional strain *penicillium lanosocoeruleum*, *Microbial Cell Factories*. 17, 100.

- [48] Lone, S. H. Bhat, K. A. (2015). Phytosterols as precursors for the synthesis of aromatase inhibitors: Hemisynthesis of testololactone and testolactone, *Steroids*. 96, 164-168.
- [49] Tait, A. D. (1972). Characterisation of the products from the oxidation of progesterone with osmium tetroxide, *Steroids*. 20, 531-542.

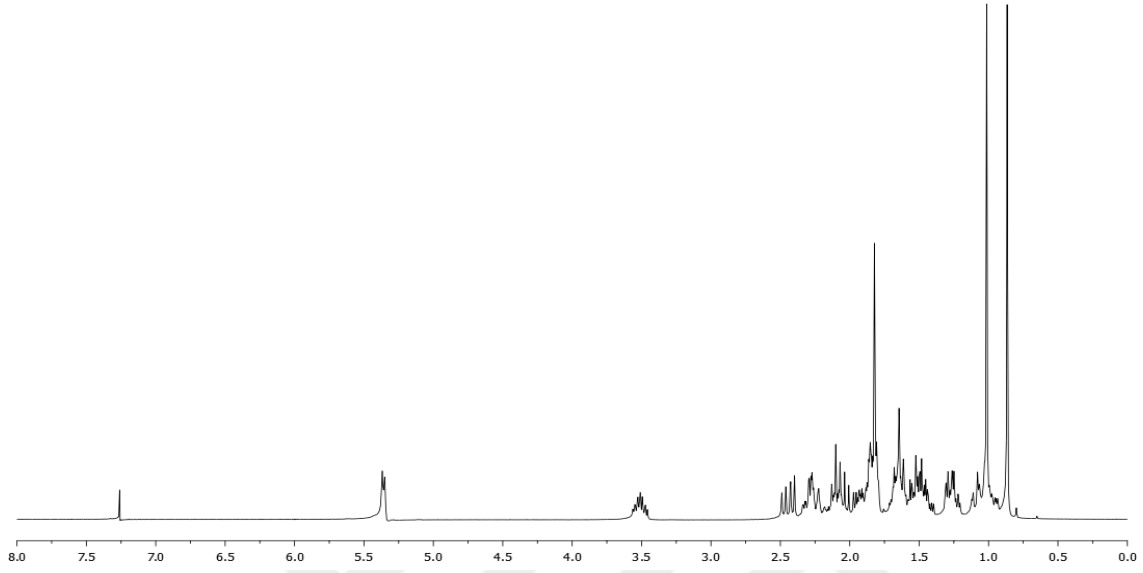


EKLER

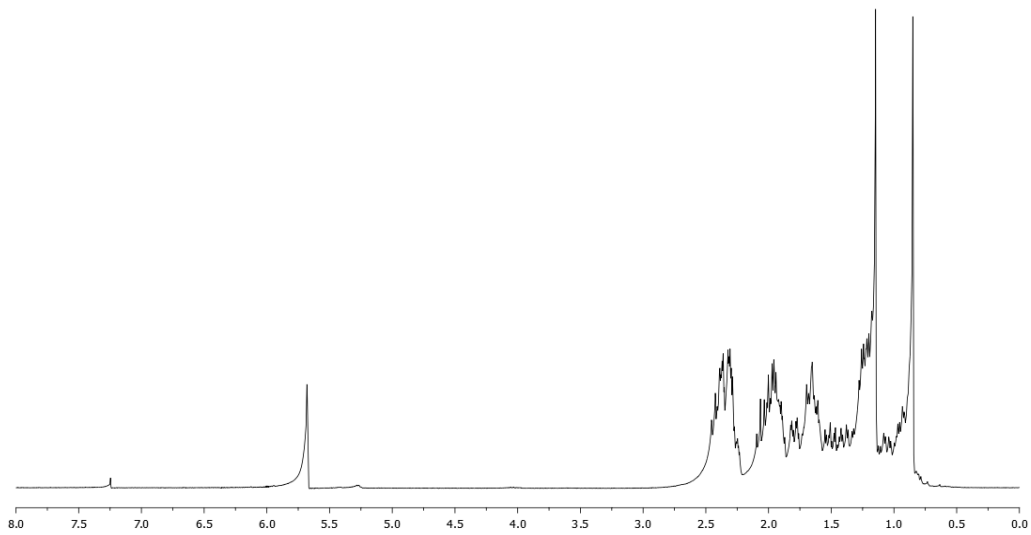
EK A. NMR spektrumları



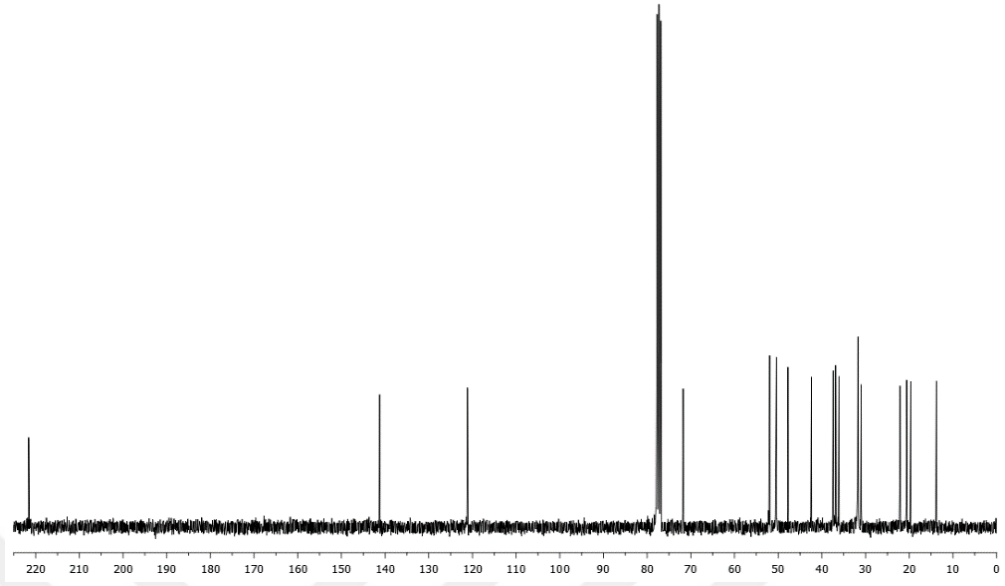
EK A.



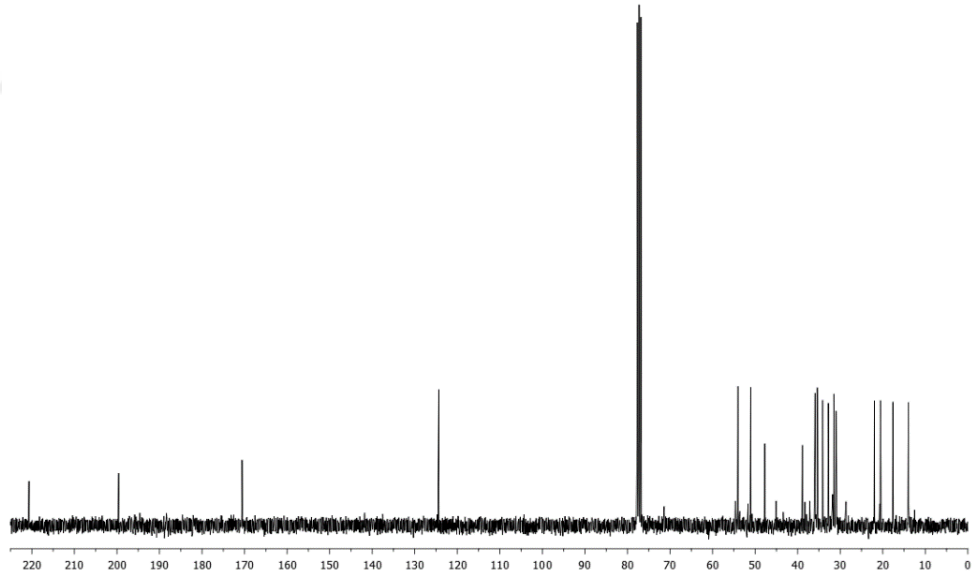
Şekil A.1. DHEA (9) bileşiğinin ¹H NMR spektrumu



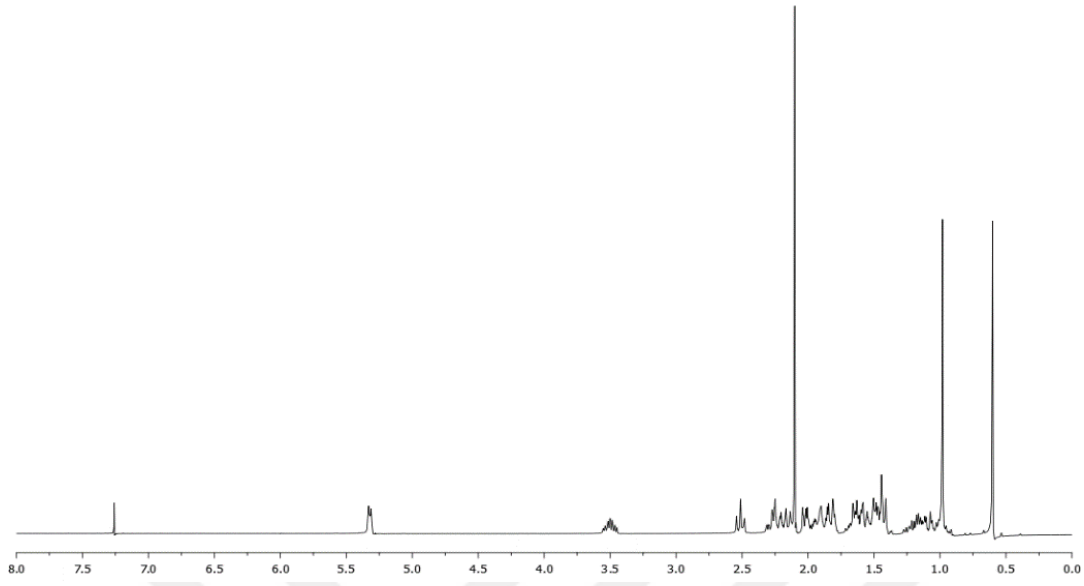
Şekil A.2. Androst-4-en-3,17-dion (5) bileşiğinin ¹H NMR spektrumu



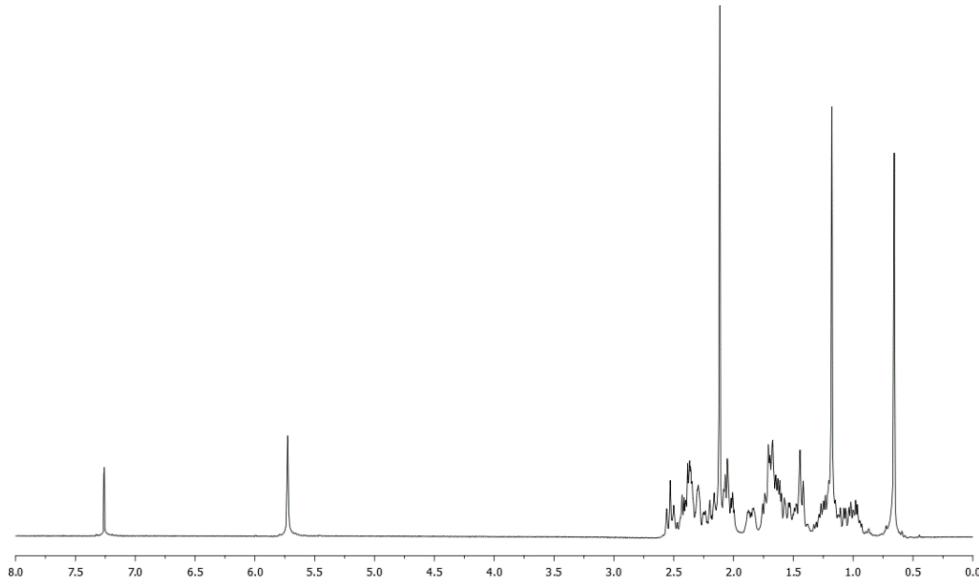
Şekil A.3. DHEA (9) bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu



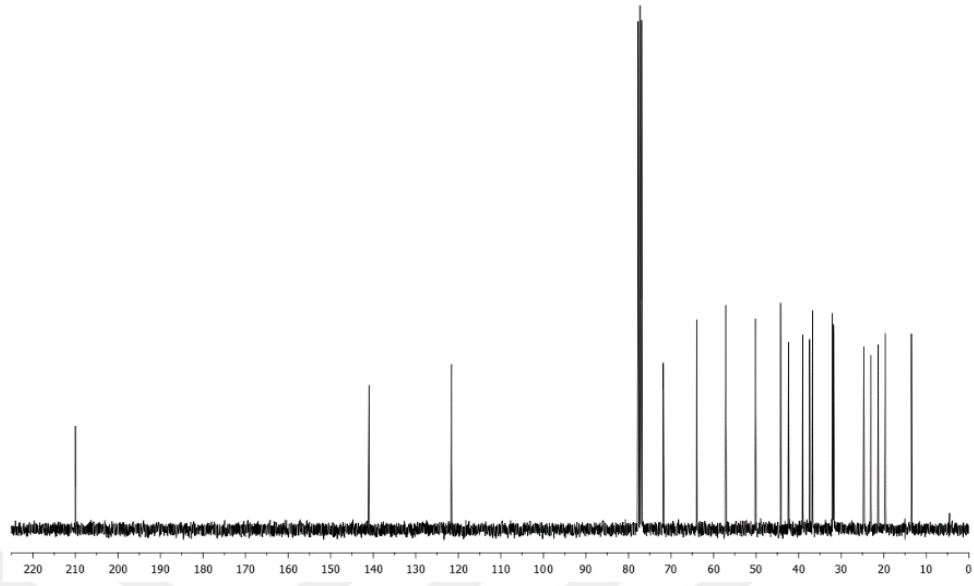
Şekil A.4. Androst-4-en-3,17-dion (5) bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu



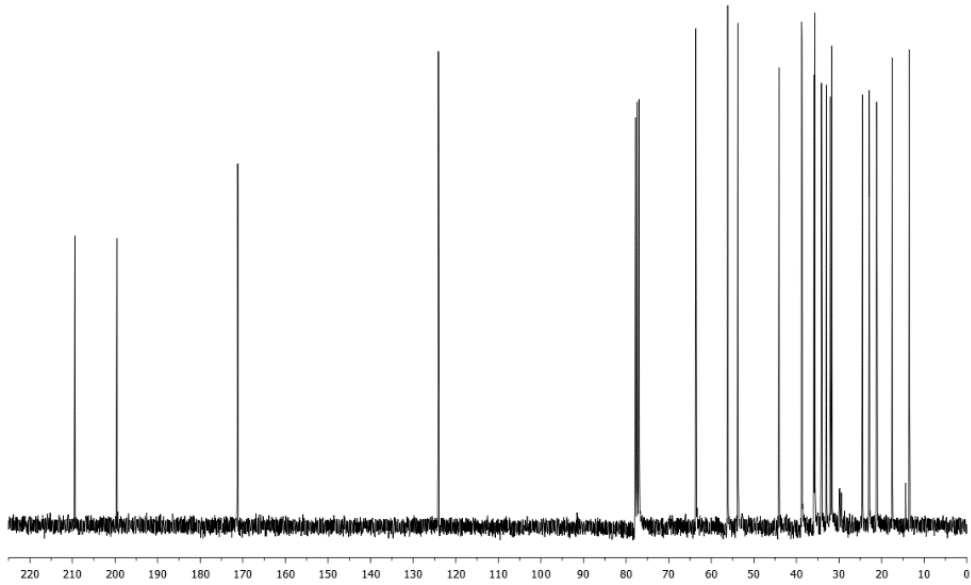
Şekil A.5. Pregnenolone (3) bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu



Şekil A.6. Progesteron (2) bileşiğinin ^1H NMR spektrumu



Şekil A.7. Pregnenolone (3) bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu



Şekil A.8. Progesteron (2) bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu



ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Halil İbrahim YILMAZ

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2018, Sakarya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği
- **Yükseklisans** : (Devam Ediyor), Sakarya Üniversitesi, Kimya, Biyokimya

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2020-2021 yılları arasında Dermansüt Gıda firmasında gıda mühendisi olarak çalıştı.
- 2021-2024 yılları arasında Garanti Gıda firmasında proses ve girdi kontrol sorumlusu olarak çalıştı.
- 2024 yılından beri Güneşoğlu Süt Gıda firmasında gıda mühendisi olarak çalışmaktadır.

TEZDEN TÜRETİLEN ESERLER:

- Yıldırım, K. Kuru, A. Yılmaz, H. İ. Albayaty, M. Al-samarrai, A. (2023, 11-13, Ekim). Microbial conversion of dehydroepiandrosterone and pregnenolone by two *Penicillium* species. *6th International EURASIAN Biological and Chemical Science Conference*, Ankara, Turkey.
- Yılmaz, H. İ. Dulkadiroğlu, N. Uluköylü, R. Ergin, M. Muhtarkuliyeva, U. (2016). Bal Kabaklı Labne Peyniri, *Sakarya Üniversitesi*