

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DEHİDROEPIANDROSTERON BİLEŞİĞİNİN *ASPERGILLUS*
GLAUCUS KÜFÜ İLE BİYOTRANSFORMASYONU



YÜKSEK LİSANS TEZİ

Raghda Mahmood Abdulghafoor AL-ANI

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

OCAK 2023

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DEHİDROEPIANDROSTERON BİLEŞİĞİNİN *ASPERGILLUS*
GLAUCUS KÜFÜ İLE BİYOTRANSFORMASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Raghdha Mahmood Abdulghafoor AL-ANI

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kudret YILDIRIM

OCAK 2023



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 “DEHİDROEPIANDROSTERON BİLEŞİĞİNİN *ASPERGILLUS GLAUCUS* KÜFÜ İLE 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.

06/02/2023

Raghda Mahmood Abdulghafoor AL-ANI



TEŞEKKÜR

Bu çalıŐmayı büyük bir titizlik ve sabırla yöneten, çalışma boyunca desteğini bir an bile esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden istifade ettiğim kıymetli hocam Prof. Dr. Kudret YILDIRIM'a sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

ÇalıŐmalarım esnasında desteklerini esirgemeyen Sakarya Üniversitesi Kimya Bölümü Oğretim yeleri ve Araştırma Görevlilerine teŐekkürlerimi sunarım.

YaŐamım boyunca maddi manevi her türlü desteği esirgemeyen babam ve anneme sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

Raghda Mahmood Abdulghafoor AL-ANI



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. ASPERGILLUS TÜRLERİ İLE DHEA BİYOTRANSFORMASYONLARI	5
2.1. Biyotransformasyonlar.....	5
2.2. Mikrobiyal Biyotransformasyonlar.....	7
2.3. Küfler ile Steroid Biyotransformasyonlar.....	9
2.4. <i>Aspergillus</i> türleri ile dehidroepiandrosteron (9) biyotransformasyonlar.....	10
2.5. Çalışmanın Amacı.....	14
3. MATERYAL VE METOT	15
3.1. Genel Bilgiler.....	15
3.2. Yatık Agar Besiyerlerinin Hazırlanması.....	16
3.3. Küf Kültürü Hazırlanması ve Tazelenmesi	16
3.4. Küf için Besiyeri Hazırlanması	16
3.5. Biyotransformasyon Deneyi.....	16
3.6. Metabolitlerin Ayrılması ve Yapı Tayinleri	17
4. DENEYSEL BULGULAR	19
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	23
KAYNAKLAR	27
EKLER	31
ÖZGEÇMİŞ	39



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
PDA	: Potato dekstroz agar
pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonunun eksi logaritması
ppm	: Milyonda bir kısım
rpm	: Dakika başına dönüş sayısı



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	: ^1H NMR spektrumundaki kimyasal kayma
d	: İkili (dublet) sinyal
dt	: Üçlü sinyallerin ikilisi (tripletlerin dubleti)
g	: Gram
Hz	: Hertz
<i>J</i>	: Etkileşme sabiti
lit.	: Literatür
mg	: Miligram
MHz	: Megahertz
mL	: Mililitre
s	: Tekli (singlet) sinyal
tt	: Üçlü sinyallerin üçlüsü (tripletlerin tripleti)



TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 4.1. Steroidler için ^{13}C NMR kimyasal kayma değerleri.....	20
Tablo 5.1. Steroidlere ait ^{13}C NMR kimyasal kayma değerleri.....	24
Tablo 5.2. Metabolit verimleri.....	25





ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. Siklopentanoperhidrofenantren halkası	1
Şekil1.2. Kolesterol (1) bileşinin yapısı.....	2
Şekil1.3. Androjen ve östrojenlerin biyosentezi	3
Şekil 2.1. İlk mikrobiyal hidroksilasyon	9
Şekil 2.2. Substratın <i>A. candidus</i> MRC 200634 ile biyotransformasyonu.....	10
Şekil 2.3. Substratın <i>A. wentii</i> MRC 200316 ile biyotransformasyonu.....	11
Şekil 2.4. Substratın bir <i>A. parasiticus</i> izolatu ile biyotransformasyonu.....	11
Şekil 2.5. Substratın <i>A. niger</i> NRLL 599 ile biyotransformasyonu.....	12
Şekil 2.6. Substratın <i>A. oryzae</i> ATCC 11601 ile biyotransformasyonu.....	12
Şekil 2.7. Substratın <i>A. terreus</i> IFO 6113 ile biyotransformasyonu.....	13
Şekil 2.8. Substratın <i>A. tamarii</i> QM 1223 ile biyotransformasyonu.....	13
Şekil 2.9. Substratın <i>A. tamarii</i> MRC 72400 ile biyotransformasyonu.....	14
Şekil 2.10. Substratın <i>A. sydowii</i> MRC 200653 ile biyotransformasyonu.....	14
Şekil 4.1. Substratın karbon iskeleti.....	19
Şekil 4.2. Substratın <i>A. glaucus</i> MRC 200914 ile biyotransformasyonu.....	19
Şekil 5.1. Substratın <i>A. glaucus</i> MRC 200914 ile biyotransformasyonu.....	23



DEHİDROEPIANDROSTERON BİLEŞİĞİNİN *ASPERGILLUS GLAUCUS* KÜFÜ İLE BİYOTRANSFORMASYONU

ÖZET

Doğal ürünler buldukları canlılara daha iyi hayat şartları sağlayan ve buna ilaveten günümüzde özellikle diğer canlılar üzerindeki etkileriyle ilgi odağına yerleşen kimyasal maddelerdir. Genelde doğal ürünleri terpenoidler, alkaloidler, steroidler, poliketidler, fenilpropanoidler, yağ asitleri ile yağ asitlerinin türevleri, özelleşmiş peptidler, özelleşmiş karbonhidratlar olarak sınıflandırma eğilimi söz konusudur.

Enzimlerin substratları olmayan kimyasal maddelerde katalizledikleri kimyasal reaksiyonlar biyotransformasyonlar olarak adlandırılır. Biyotransformasyonlarda rol oynayan enzimler sabitlenmiş olarak, serbest olarak ya da çeşitli biyolojik sistemlerin yapısında fonksiyonlarını gerçekleştirebilirler. Biyotransformasyonların uygulanmasında genelde küfler, mayalar ve bakteriler gibi mikroorganizmalar biyolojik sistemler olarak kullanılır. Mikroorganizmalarla gerçekleştirilen biyotransformasyonlar bilinen kimyasal sentez yöntemlerine kıyasla çok sayıda avantajlar sağlamaktadır. Mikrobiyal biyotransformasyonlar mikroorganizmaların serbest olarak veya belirli yüzeylere sabitlenmesiyle uygulanabilir. .

Özellikle son yıllarda küf enzimlerinin yüksek regio ve stereoseçicilikleri nedeniyle küflerle gerçekleştirilen mikrobiyal steroid biyotransformasyonları çok sayıda önemli ilaç ve benzeri maddelerin sentezi için yaygın olarak uygulanmaktadır.

Bu çalışmada DHEA olarak da bilinen dehidroepiandrosteron (9) bileşiğinin *Aspergillus glaucus* MRC 200914 izolatında nasıl metabolize edildiğinin incelenmesi hedeflenmiştir. Bahsedilen hedef doğrultusunda biyotransformasyon deneyi öncesinde *Aspergillus glaucus* MRC 200914 izolatı için belli aralıklarla taze alt kültürler hazırlandı. İzolat için besiyeri hazırlandıktan sonra erlenlere dağıtılıp otoklavda sterilize edildi. Erlenlere en taze alt kültürdeki izolat steril şartlarda inoküle edildikten sonra erlenler 3 gün inkübe edildi. İzolatın geliştiği bu erlenlere DHEA (9) steril şartlarda eklenerek 5 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında besiyeri filtre edildi ve içerisindeki steroidler etil asetat ile ekstrakte edildi. Ekstraktlarının evaporatörde uçurulmasıyla oluşan kalıntıdaki steroidler ise bir kolon kromatografisi çalışması ile ayrıldı. Elde edilen steroidlerin yapı tayinleri ise erime noktaları, NMR ve IR spektrumları alındıktan sonra substratunkiler ile karşılaştırılarak belirlendi ve *Aspergillus glaucus* MRC 200914 ile DHEA (9) biyotransformasyonunun 3 β ,11 α -dihidroksiandrost-5-en-17-on (16) ve 3 β ,7 α -dihidroksiandrost-5-en-17-on (18) metabolitlerini verdiği anlaşıldı.



BIOTRANSFORMATION OF DEHYDROEPIANDROSTERONE BY *ASPERGILLUS GLAUCUS*

SUMMARY

Although natural products are compounds that are not essential for the reproduction and development of living things, they provide benefits to the living things and attract more attention due to their effects on other living things. These compounds are usually divided into some groups such as terpenoids, alkaloids, steroids, polyketides, peptides, phenylpropanoids, specialized peptides, specialized carbohydrates, fatty acids and their derivatives.

Enzymes or enzymes within biological systems can fulfil chemical changes on xenobiotics and these changes are called biotransformations. Enzymes or biological systems are used as free or immobilised apparatus to fulfill biotransformations. Cell cultures, tissue cultures, organ cultures, microsomes, microorganisms and spores of microorganisms are usually used as common biological systems for biotransformations.

By decreasing the energy of activation (E_A), enzymes can fulfill almost every reaction in living things. Although enzymes decrease the time to obtain the reaction equilibrium, enzymes are not vanished or deformed by the reaction and they differentiate the ΔG and the equilibrium position of the reaction. The International Union of Biochemistry has been announced the presence of more than 3200 enzymes and it is estimated that nature can provide 25000 enzymes.

Enzymes give some advantages for their users since they are very potent catalysts, For example, enzymatic reaction rates are expedited by a factor of 10^8 - 10^{10} and this can even reach a value of 10^{12} . Enzymes are environmentally friendly since they are made of amino acids and are completely degradable. Although most other chemical reagents cause environmental problems, enzymes usually work under mild conditions (around pH 7, 30 °C and 1 atm) and this reduces some problems such as, isomerisation, racemisation, rearrangements, decomposition. In a multienzyme system enzymes are compatible with each other and usually function under the same or similar conditions. Therefore, by using multienzyme systems in a one flask several reactions can be fulfilled. Some enzymes are obligated to their natural role although some enzymes have a high substrate tolerance. These enzymes can react with a large variety of natural or unnatural compounds. Enzymes can fulfill a broad spectrum of reactions and there is an enzyme-catalysed reaction alternative to almost every known reaction.

Enzymes are chemoselective, regioselective and enantioselective molecules due to their complex three-dimensional structures. As enzymes are chemoselective, they usually react with just one single type of functional group and other functionalities stay unchanged. That is why enzymatic reactions generally give no by products. Since enzymes are regioselective, they can differentiate between functional groups which are

chemically located in different regions of the same substrate. Enzymes are enantioselective and are chiral catalysts since they are only made from L-amino acids. Therefore, any type of chirality on substrate molecule is sensed by enzymes. A prochiral substrate can be turned into a chiral product and both enantiomers in a racemic substrate generally can react at different rates, resulting in a kinetic resolution.

Unfortunately, there are also some restrictions for using enzymes. Nature limits enzymes to one of enantiomers. When the other type of enantiomeric product is needed, an enzyme with exactly the opposite stereochemical selectivity is required. However, this is usually impossible. Enzymes usually have narrow operation parameters. Fulfilling under mild conditions often result in obstacles as raised up temperatures and extreme pH lead to enzyme inhibition. Although enzymes have their highest catalytic activity in water, water is usually the least suitable solvent for most organic reactions due to its high boiling point and high heat of vaporisation. Moreover, most organic compounds show very low solubilities in aqueous media. That is why shifting enzymatic reaction from an aqueous medium to an organic medium might be highly desired. However, this can result in loss of catalytic activity due to enzyme denaturation. Enzymes are very bound to their natural cofactors. Although enzymes are exceedingly malleable for reacting unnatural substrates they are almost completely bound to their natural cofactors such as NADH and NADPH. However, these molecules are relatively unstable and too expensive to use in stoichiometric amounts and are not changeable by their more economical man-made substitutes. Enzymes are liable to inhibition phenomena. Many enzymatic reactions are responsive to substrate or product inhibition which makes enzymes stop working at higher substrate and / or product concentrations. Enzymes can also disturb their users due to allergies. Although enzymes can cause allergies this can be diminished by considering enzymes as chemicals and using with the same care.

Biotransformations are usually fulfilled either by isolated enzyme systems or by intact whole microorganisms. It is thought that there are more than 300 commercially available isolated enzyme systems. As many enzyme systems which are involved are membrane bound and difficult to obtain, intact whole microorganisms are generally used for biotransformations. Molds, yeasts, bacteria and microalgae are usually used for microbial biotransformations.

Microorganisms have some non-specific enzyme systems. That is why microorganisms fulfill a number of reactions on both natural and synthetic substrates. Microbial hydroxylations are the most common and are favourite among these reactions. The importance of microbial hydroxylation was first observed in 1952 when it solved a major problem in the cortical steroid synthesis. The addition of an oxygen function at C-11 was a very long difficult and expensive work as this position was remote from any other functional groups. This obstacle was effectively terminated by *Rhizopus arrhizus* by microbial hydroxylation. This microbial hydroxylation made microbial biotransformations popular. Since then, different types of steroids have been generally used for microbial biotransformations. Microbial steroid biotransformations have widely applied for the production of some important steroid hormones and drugs due to their high regio- and stereoselectivity.

A number of microbial steroid biotransformations have been reported in recent years. There are still a lot of efforts to increase the effectiveness of known microbial biotransformations and to obtain new handy microorganisms and reactions. Since first

microbial hydroxylation was reported in 1952, a lot of different fungi have consistently been one of the most investigated whole-cell systems for biotransformation reactions. Different fungi have been used for the biotransformations of many types of steroids. These biotransformations gave some interesting results, such as microbial hydroxylations, Baeyer-Villiger oxidations and 5 α -reduction.

In this work, dehydroepiandrosterone (**9**), which is also known as DHEA, was incubated with *Aspergillus glaucus* MRC 200914 in order to see how this fungus metabolises the substrate. The medium was prepared for the fungus in 1 L of distilled water. The medium was evenly distributed into 10 erlenmeyer flasks of 250 mL and sterilized by an autoclave. These flasks were inoculated by the fungus. The flasks were incubated for 3 days at 25 °C on a shaker and the substrate in DMF was added aseptically into these flasks. All flasks were further incubated for 5 days under the same conditions. After incubation, the fungal mycellium was separated from the broth by filtration under the vacuum. The mycellium was rinsed with ethyl acetate and the broth was then extracted with ethyl acetate. The extracts were dried over sodium sulfate anhydrous and evaporated *in vacuo* to give a brown gum that was then chromatographed on silica gel 60. 3 β ,11 α -dihydroxyandrost-5-ene-17-one (**16**) and 3 β ,7 α -dihydroxyandrost-5-ene-17-one (**18**) were obtained from the chromatography work. The structures of these compounds were determined by comparing melting points, NMR and IR spectra of the starting material with those of metabolites.

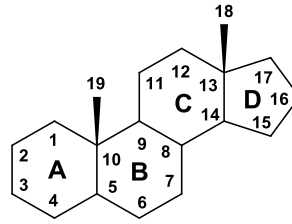


1. GİRİŞ

Doğal ürünler mevcut olduğu canlıların hayatta kalmalarını kolaylaştırmaları ve çevresindeki canlılardaki etkileri sebebi dikkat çeken oldukça önemli kimyasal maddelerdir. Doğal ürünler daha çok mantarlar, bitkiler, böcekler ve mikroorganizmalarda bulunur. Bitkiler ve mikroorganizmalar ise bu bileşiklerin tabiatta en yaygın olduğu canlılardır [1-3].

Tabiattaki doğal ürünler birbirinden farklı yapıda ve çok sayıda olmalarına rağmen genellikle poliketidler, terpenler, alkaloidler, steroidler, yağ asitleri, fenolik bileşikler, özelleşmiş karbohidratlar, özelleşmiş amino asitler ve özelleşmiş peptidler gibi gruplara ayrılırlar [1].

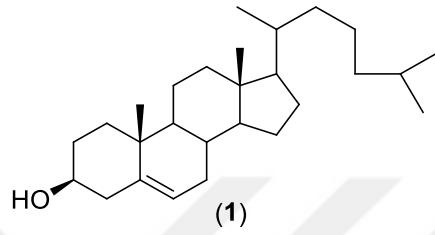
Steroidler önemli bir doğal ürün grubudur. Steroid kelimesi kökenini katı anlamında olan Latince steros kelimesinden almıştır. Steroidlerde ana yapıyı steran siklopentanoperhidrofenantren (steran) halkası oluşturur. Bir steran halkası (Şekil 2.1.) birbirleri ile kaynaşmış üç adet sikloheksan halkası ile bir adet siklopentan halkasından oluşur. Çoğu steroidler steran halka bünyesinde 18. ve 19. karbonlar olarak adlandırılan ve β -pozisyonuna sahip metil grupları barındırır. Birçok steroid genellikle 3. ve 17. karbonlarında karbonil veya hidroksil grupları içerirken bazı diğer steroidler ise D halkasına bağlı çeşitli uzunluklarda olan yan zincirler içerir [4].



Şekil 1.1. Siklopentanoperhidrofenantren halkası [4].

Steroller steroidlerin önemli üyelerindedir ve bu bileşikler yapılarında 3 β -hidroksil grubu ile D halkalarına bağlı alifatik yan zincirlere sahiptirler. Sterollere örnek olarak kolesterol (1), stigmasterol ve ergosterol bileşikleri verilebilir [5].

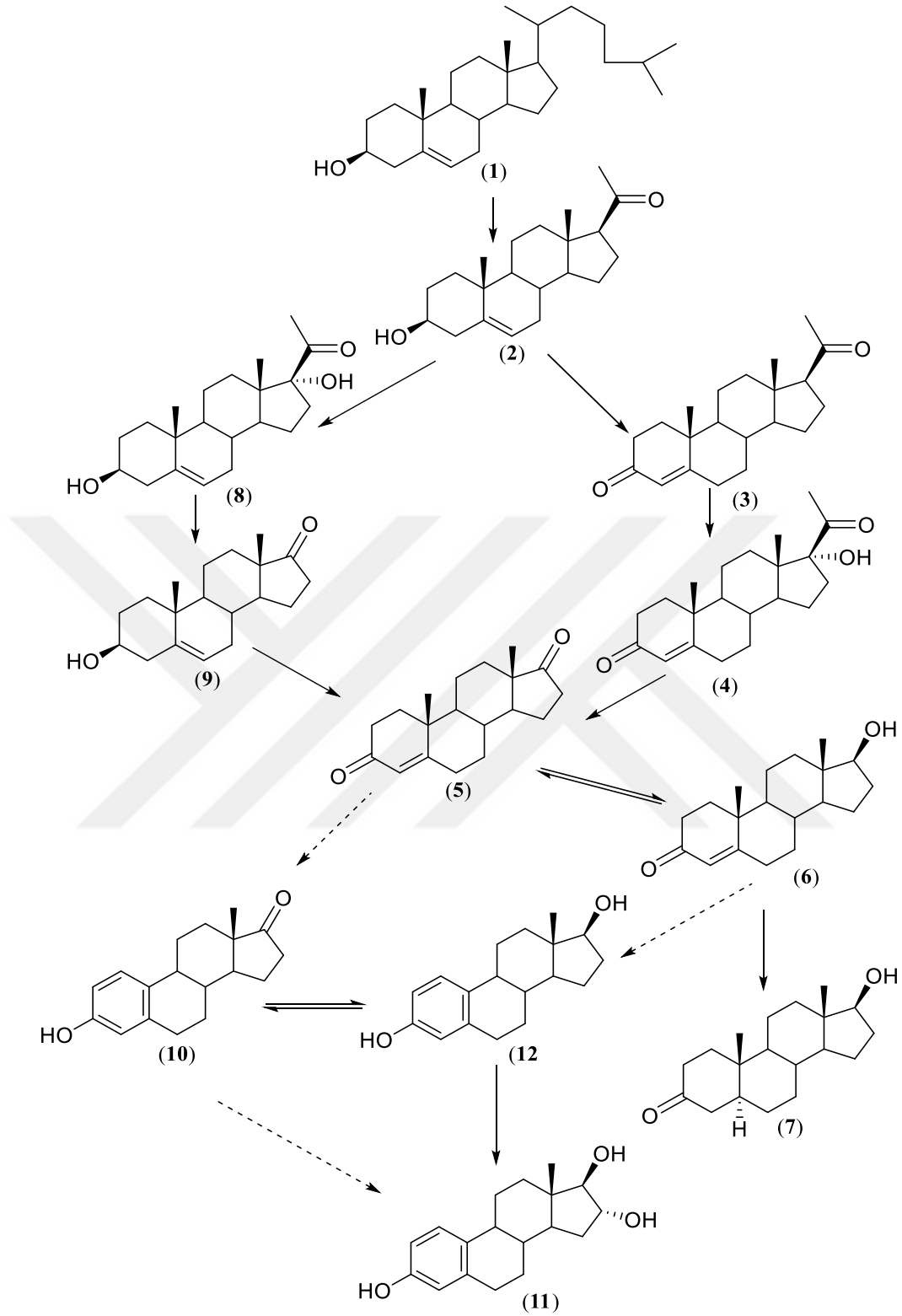
Önemli bir sterol ve steroidlerin biyosferde en çok bulunan örneklerinden birisi kolesterol (1) (Şekil 2.2.) bileşiğidir. Bu bileşik insan ve hayvanlarda membran akışkanlığını düzenlenmesine ilaveten safra asitleri, steroid hormonlar ve D₃ vitamini gibi bileşikler için çıkış maddesidir [4, 5].



Şekil 1.2. Kolesterol (1) bileşinin yapısı.

Progestagenler (progestinler), östrojenler, androjenler, glukokortikoidler ve mineralokortikoidler olarak gruplara ayrılan steroid hormonlar önemli kolesterol (1) türevleridir. Östrojenler, progestagenler, ve androjenler cinsiyet hormonları olarak da adlandırılır. Cinsiyet hormonları insanlardaki üreme organlarının gelişmeleri ve büyümelerini, ikincil eşey karakterlerini ve üreme döngüsünü düzenler. Buna ilaveten güçlü anabolik etkilere sahip olan cinsiyet hormonları kaslar, deri ve kemik dokuların gelişmesini ve metabolizmanın sürekliliğini sağlar [4, 5].

Omurgalı erkek bireylerindeki cinsiyet hormonları olan androjenlerin ana sentez yeri erbezleri olmasına rağmen bu hormonlar adrenal kortekste de azda olsa sentezlenmektedir. Androjenler omurgalı erkek bireylerinde Δ^4 yolu ve /veya Δ^5 yolu üzerinden sentezlenmektedir [4, 5].



Şekil 1.3. Androjen ve östrojenlerin biosentezi [4, 5].

Androjen biyosentezi için ana yol Δ^4 yoludur. Bu yolda kolesterol (1) bileşiğindeki yan zincirinin ksalması ile oluşan pregnenolon (2), progesterona (3) üzerinden 17α -hidroksiprogesterona (4) çevirilir. 17α -Hidroksiprogesteron (4) yan zincirinin uzaklaştırılması neticesinde ise androst-4-en-3,17-dion olarak da adlandırılan androstendion (5) sentezlenir. Androstendion (5) C-17'de indirgendiğinde ise testosteron (6) olarak bilinen etkin bir androjen sentezlenir. Testosteron (6) ise 5α -redüktaz enzimi ile dihidrotestosteron (7) bileşiğine çevrilebilir [4, 5].

Yan yol olarak da bilinen Δ^5 yolunda kolesterolden (1) oluşan pregnenolon (2), 17α -hidroksipregnenolon (8) üzerinden DHEA olarak da bilinen dehidroepiandrosteron (9) bileşiğine çevrilmektedir. Dehidroepiandrosteron (9) ise androstendion (5) üzerinden testosteron (6) bileşiğine de çevrilebilmektedir.

Androjenlerin biyosentezindeki Δ^4 yolu ve Δ^5 yollarının ortak olan son ürünü Şekil 1.3.'den de anlaşılacağı gibi androstendion (5) bileşiğidir. Androstendion (5) ayrıca östron (10) ve östriol (11) gibi östrojenlerinde başlangıç maddesidir. Bir diğer östrojen olan östradiol (12) ise testosteron (6) bileşiğinden sentezlenir [4, 5].

2. *ASPERGILLUS* TÜRLERİ İLE DHEA BİYOTRANSFORMASYONLARI

2.1. Biyotransformasyonlar

Enzimlerin kendi substratları olmayan ve ksenocbiyotikler adı verilen kimyasal maddelerde uyguladıkları kimyasal değişimlere biyotransformasyonlar adı verilir [6]. Enzimler mikrozomlar, mikroorganizmalar, mikroorganizma sporları hücre, doku ve organ kültürleri gibi çeşitli biyolojik sistemlerin bünyelerinde bulunabilir veya çeşitli biyolojik materyallerden izole edilmelerinden sonra sabitlenmiş ya da serbest olarak da kullanılabilir [6]. Enzimlerin çoğu biyolojik kaynaklardan izole edilirken diğer enzimler ise halen sadece satın alınarak temin edilmektedir [6, 7].

Enzimlerin yalnızca kendi doğal substratlarını doğal çevrelerinde etkiledikleri, pahalı ve oldukça duyarlı oldukları gibi bazı önyargılar söz konusu olsa da birçok enzim için bu önyargılar doğru değildir [7].

Enzimler fonksiyonlarını çok hızlı gerçekleştirirler ve enzimlerin yer aldığı reaksiyonlar enzimlerin yer almadığı reaksiyonlara kıyasla 10^8 - 10^{10} kat daha hızlı gerçekleşebilmektedir [7].

Katalizör olarak kullanılan bazı ağır metaller ve bilinen sentez yöntemlerindeki çoğu reaktifin aksine protein tabiatında olan enzimler doğada tamamen parçalanabildikleri için doğa dostu olarak kabul edilirler [7].

Enzimler genellikle 20-40 °C arası sıcaklıkta ve ortam pH değerinin 5-8 aralığındaki ılıman koşullarda etkin olduklarından diğer bilinen sentez yöntemleriyle ortaya çıkan rasemizasyon, bozunma, çevrilme ve izomerleşme gibi yan reaksiyonlar nadiren gerçekleşir [7].

Bazı enzimler geniş bir substrat spektrumuna sahiptir ve doğal substratları haricindeki sentetik veya doğal birçok bileşikte kimyasal değişimler gerçekleştirebilirler [7].

Multienzim sistemleri yapısındaki enzimler yakın veya aynı şartlarda etkili olabildikleri için bu enzimler metabolik yollardaki bir seri reaksiyonu aynı ortamlarda katalizleyebilmektedir [7].

Enzimler çok fazla sayıda ve farklı tipte reaksiyonu katalizleyebilirler ve neredeyse her bir sentetik reaksiyona karşılık gelen enzimatik bir reaksiyon vardır. [7].

Enzimlerin kompleks üç boyutlu yapıları bu moleküllerin regioseçici ve stereoseçici olmalarına neden olur ve substratlarının farklı kısımlarının fonksiyonel grupları dahi ayırabilirler. Enzimler kemoseçici de oldukları için substratlarındaki yalnızca belirli bir fonksiyonel grubu etkilerler ve bu özellikleri yan ürünlerin oluşumunu engellemektedir [7].

Yalnızca L-amino asitleri içeren enzimler bu yüzden aynı zamanda enantioseçici olan kiral moleküllerdir. Bundan dolayı enzimler prokiral bir substratı etkileyerek yalnızca bir enantiyomere çevirebilirler. Enzimler rasemik bir karışımdaki yalnızca bir enantiyomeri etkileyerek rasemik karışımların ayrılmasını da sağlarlar [7]. Enzimler yukarıda bahsedilen avantajları sayesinde bilinen diğer yöntemlerle gerçekleştirilmesi zor ya da imkânsız olan reaksiyonları kolayca gerçekleştirebilmektedir [7].

Buna rağmen enzimlerin kullanılması bazı istenilmeyen durumlarla da sonuçlanabilir. Örneğin, enzimler tek bir enantiyomerik formda mevcuttur ve diğer enantiyomerik formun biyosentezi için yaygın bir yöntem olmadığından enzimler yalnızca belirli bir enantiyomer ile reaksiyon verebilirler [7].

Enzimler genellikle aktivitelerini etkileyen sıcaklık ve pH gibi parametrelerin değişimlerine oldukça hassasdırlar. Örneğin, enzimler protein tabiatında olduğundan enzimatik bir reaksiyonu hızlandırabilmek için pH ve sıcaklık gibi parametreler çok fazla değiştirilemez [7].

Enzimlerin en ideal çalışma ortamı su olmasına rağmen çoğu organik bileşik suda hiç çözünmezler. Enzimatik bir reaksiyonun organik bir çözücüde gerçekleştirilmesi ise çoğu zaman protein tabiatında olan enzimlerin denatürasyonu ile sonuçlandığından aktivite kaybına sebep olmaktadır [7]. Enzimlerin bulunduğu ortamda yüksek miktarlarda substrat veya ürün bulunduğunda aktivenin kısmen veya tamamen ortadan kalkması ile sonuçlanan inhibisyon gerçekleşir [7].

Çoğu enzimler reaksiyonlarını kofaktör adı verilen bazı spesifik moleküllerin varlığında gerçekleştirirler ve bu enzimlerin etkin olabilmesi için kofaktörlerinin reaksiyon ortamında olmaları ve sürekli yenilenmesi hayati önem arz etmektedir. Kofaktörlerin kararsız ve pahalı bileşikler olması ve yerlerine diğer bazı eşdeğerlerinin kullanılamaması enzimlerin kullanımlarını sınırlamaktadır [7].

Enzimler bazen alerjik reaksiyonlara neden olabilmektedir. Muhtemel alerjik reaksiyonlar, enzimleri de kimyasal maddeler olarak kabul edip dikkatli bir şekilde kullanarak bu alerjik reaksiyonlar engellenebilir [7].

2.2. Mikrobiyal Biyotransformasyonlar

Biyotransformasyonlarda genellikle izole edilmiş bütün hücre sistemleri veya enzimler ile uygulanırlar. Bütün hücre sistemleri olarak ise çoğu zaman mikroorganizmalar ile bitki veya hayvanlardan elde edilen hücre, doku ve organ kültürleri kullanılır [7].

Kullanılan enzimlerinin çoğunun hücre dışında kararsız olması, kofaktörlerinin sağlanması ve sürekli yenilenmesinin zorunluluğu, izolasyon işlemlerini çok maliyetli ve zor olması ile izole edilirken zarar görebilmeleri gibi problemlerden dolayı biyotransformasyonlar genelde bütün hücre sistemleriyle uygulanmaktadır [7].

Mikrobiyal hücrelerin büyüme ve gelişme hızı diğer hücrelere göre daha yüksek olduğundan mikrobiyal biyotransformasyonlar daha kısa zaman almaktadır. Daha küçük boyutlu olan ve dayanıklı hücre duvarları içeren mikrobiyal hücreler diğer hücrelere göre mekanik olarak çok daha kararlıdır. Mikrobiyal hücrelerin ortamlarına çok daha kolay uyum sağlarlar ve bu hücreler diğer canlıların hücrelerine göre çok daha fazla sayıda ve farklı tipte substratlar üzerinde kimyasal değişimler gerçekleştirebilirler [7]. Yukarıda açıklanan sebeplerden dolayı biyotransformasyon çalışmalarında bütün hücre sistemleri olarak daha çok mikrobiyal hücreler kullanılmaktadır.

Mikrobiyal biyotransformasyonlar bilinen sentez yöntemlerine göre birçok üstünlüklerinden dolayı biyoteknolojinin vazgeçilmez elemanlarından olmuşlardır [7-9].

Mikrobiyal hücrelerin genetikleri değiştirilebildiğinden mikrobiyal biyotransformasyonların biyoteknolojideki kullanımları her geçen gün daha da artmaktadır [8].

Mikrobiyal hücreler spesifik olmayan enzim sistemlerine sahip olduklarından dolayı çok fazla sayıda ve farklı tiplerdeki doğal veya sentetik substratlarında birçok farklı kimyasal değişiklikler gerçekleştirebilmektedir [6].

Bilinen diğer sentez yöntemlerindeki çoğu reaktif çevremize geri dönüşü olmayan önemli zararlar verirken nerdeyse tamamı 1 atm basınç ve oda sıcaklığı gibi oldukça ılıman şartlarda gerçekleşebilen mikrobiyal biyotransformasyonlar doğaya dost olarak değerlendirilmektedir [6,7].

Mikrobiyal biyotransformasyonlar bilinen diğer sentez yöntemlerine kıyasla daha az maliyetlerle ve daha kısa sürelerde uygulanabilirler [6-9].

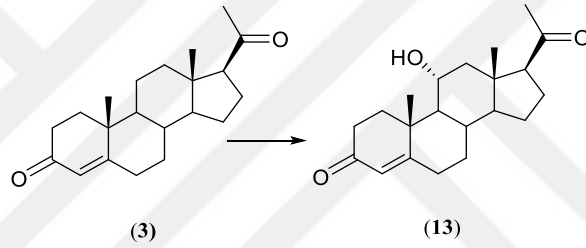
Mevcut diğer sentez yöntemlerinin yerine mikrobiyal biyotransformasyonlar kullanılarak hedef bileşikler genellikle daha kısa sürelerde, daha yüksek verimlerle ve çok ucuza temin edilen besiyeri bileşenleri tüketilerek elde edilebilmektedir [6, 8].

Mikroorganizma enzimleri enantioseçici olduğu için mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonları da enantioseçicidir ve tek enantiyomerler verirler [6, 8]. Mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonlarının aksine bilinen diğer sentez yöntemleri ile üretimleri amaçlanan bileşikler genelde ayrılmaları çok zor olan rasemik karışımlar şeklinde oluşurlar [6]. İlaç sanayindeki etken madde üretimlerinde yalnızca hedeflenen enantiyomerin elde edilmesi son derece önemlidir. Günümüzde tek tip enantiyomerlerin tek basamakta üretimleri için mikroorganizmaların kullanılmaları giderek yaygınlaşmaktadır [7].

Mikroorganizma enzimleri regioseçici oldukları için mikrobiyal biyotransformasyonlara maruz kalan substratlardaki diğer fonksiyonel grupların korunmasına gerek kalmamaktadır [6, 7].

Bilinen sentez yöntemlerinin aksine mikrobiyal biyotransformasyonların gerçekleşeceği kısmın civarında genellikle belirli bir fonksiyonel grubun varlığı gerek duyulmamaktadır [6, 7]. Örneğin, mikrobiyal hidrosilasyonlar fonksiyonel gruplardan uzak kısımlarda gerçekleşir [6].

Mikrobiyal biyotransformasyonlar kullanılarak çok farklı tipte ve sayıda reaksiyonlar gerçekleştirilebilmektedir [6, 7]. Ayrıca mikrobiyal hidroksilasyonlar gibi reaksiyonlar bilinen diğer sentez yöntemleri ile tek basamakta gerçekleştirilememektedir [6]. Mikrobiyal hidroksilasyonlar en değerli ve yaygın mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonlarından [6, 7]. Mikrobiyal hidroksilasyonların önemi ilk olarak 1952 yılında kortikal steroidlerin sentezinde anlaşılmıştır [6]. Kortikal steroidlerin sentezinde bir oksijen fonksiyonunun yakın civarında diğer fonksiyonel grupların bulunmadığı C-11 pozisyonuna eklenmesi o dönemdeki sentez yöntemleriyle çok maliyetli ve uzun süren bir işlemdir. Bu işlemin tek basamakta *Rhizopus arrhizus* küfıyla gerçekleştirilebilmesi mikrobiyal biyotransformasyonları kısa sürede çok popüler yapmıştır [6]. Bu reaksiyon sayesinde progesteron (3) 11 α -hidroksiprogesteron (13) bileşiğine dönüştürülmüştür (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. İlk mikrobiyal hidroksilasyon [6].

Mikrobiyal biyotransformasyonlar için serbest olarak ya da belirli bir yüzeye sabitlenmiş çeşitli mikroorganizma türlerinden faydalanılmaktadır. Küfler, bakteriler ve mayalar genelde bu amaç doğrultusunda en yaygın olarak kullanılan mikroorganizmalardır [8].

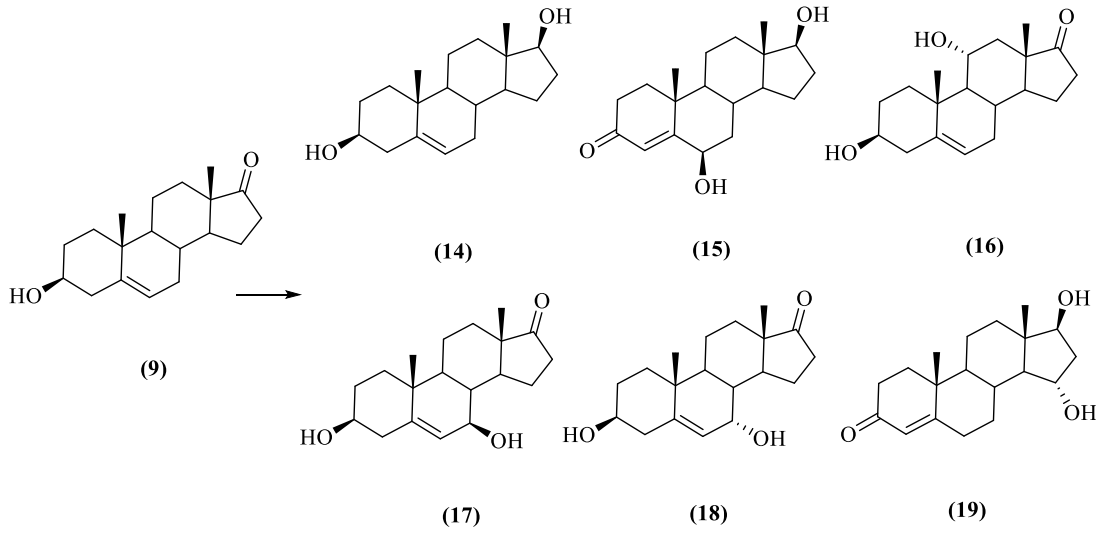
2.3. Küfler ile Steroid Biyotransformasyonları

Küfler ile steroid biyotransformasyonları küf enzimlerinin yüksek regio ve stereoseçici olmaları sebebi ile özellikle birçok ilacın üretimi için yoğun bir şekilde uygulanmaktadır [9-13]. Bilinen mikrobiyal biyotransformasyonları daha da etkinleştirmek, kullanılabilecek yeni reaksiyonlar ve mikroorganizmalar belirlemek amacı ile çalışmalar devam ettirilmektedir [9].

Günümüze kadar farklı ve çok sayıda küf ile mikrobiyal steroid biyotransformasyonları gerçekleştirilmiştir ve biyotransformasyonlardan mikrobiyal hidroksilasyonlar, Baeyer-Villiger oksidasyonları, A halkasının aromatikleşmesi, yan zincirlerin uzaklaştırılması, hidroksil gruplarının oksidasyonu, keton gruplarının redüksiyonu, mikrobiyal hidrojenasyonlar ve dehidrojenasyonlar gibi ilginç sonuçlar elde edilmiştir [6, 9-13].

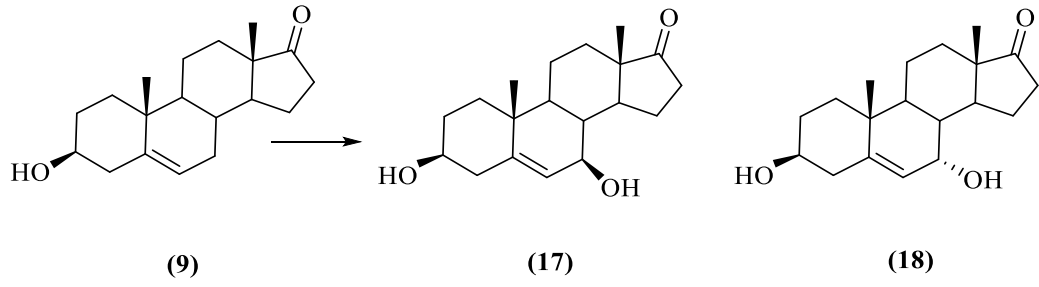
2.4. *Aspergillus* türleri ile DHEA (9) biyotransformasyonları

Çeşitli *Aspergillus* türleri ile DHEA (9) biyotransformasyonları genel olarak Baeyer-Villiger oksidasyonları, mikrobiyal hidroksilasyonlar, mikrobiyal hidrojenasyonları ve dehidrojenasyonları gibi reaksiyonlar ile sonuçlanmıştır [9-13, 16-27]. DHEA (9) bileşiğinin *Aspergillus* türleri ile inkübasyonlarına yönelik literatürde 9 çalışma mevcuttur [16-24]. *A. candidus* MRC 200634 izolatı ile DHEA (9) inkübasyonu (Şekil 2.2.) 3 β ,17 β -dihidroksiandrosta-5-en (14), 6 β ,17 β -dihidroksiandrosta-4-en-3-on (15), 3 β ,11 α -dihidroksiandrosta-5-en-17-on (16), 3 β ,7 β -dihidroksiandrosta-5-en-17-on (17), 3 β ,7 α -dihidroksiandrosta-5-en-17-on (18) ve 15 α ,17 β -dihidroksiandrosta-4-en-3-on (19) metabolitleri ile sonuçlanmıştır [16].



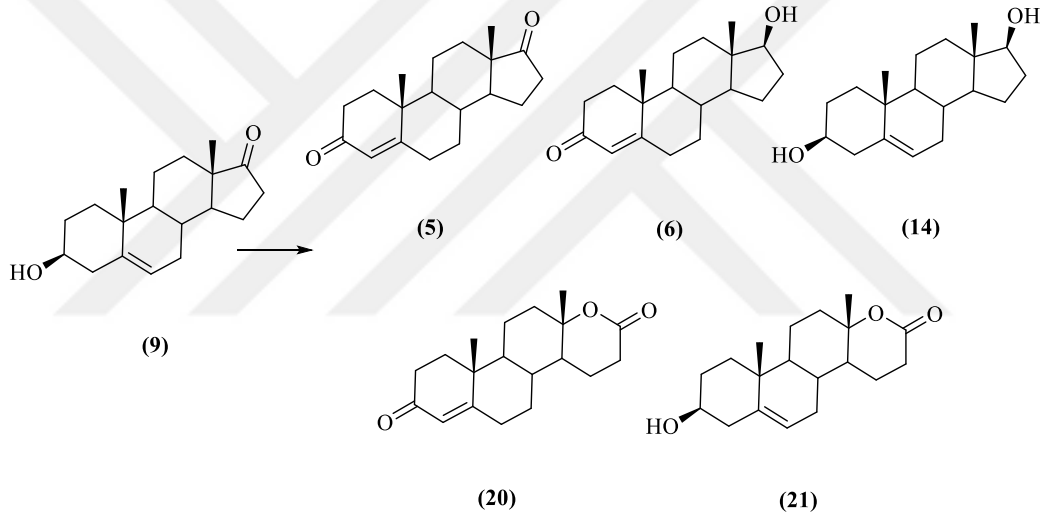
Şekil 2.2. Substratın *A. candidus* MRC 200634 ile biyotransformasyonu [16].

A. wentii MRC 200316 izolatı ile DHEA (9) biyotransformasyonu (Şekil 2.3.) bir önceki çalışmadan da izole edilen (17 ve 18) numaralı metabolitleri vermiştir [17].



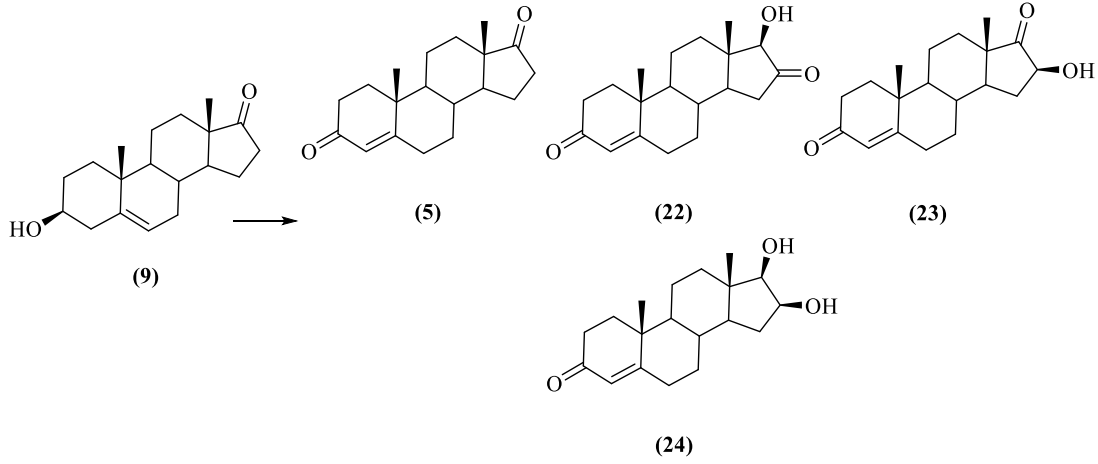
Şekil 2.3. Substratın *A. wentii* MRC 200316 ile biyotransformasyonu [17].

Bir *A. parasiticus* izolatı ile gerçekleştirilen DHEA (9) inkübasyonu (Şekil 2.4.) sonucunda androstendion (5), testosteron (6), 17a-okza-D-homo-androst-4-en-3,17-dion (20) ve 3β-hidroksi-17a-okza-D-homo-5α-androst-5-en-17-on (21) ile daha önceki bir çalışmadan elde edilen (14) numaralı metabolitleri vermiştir [18].



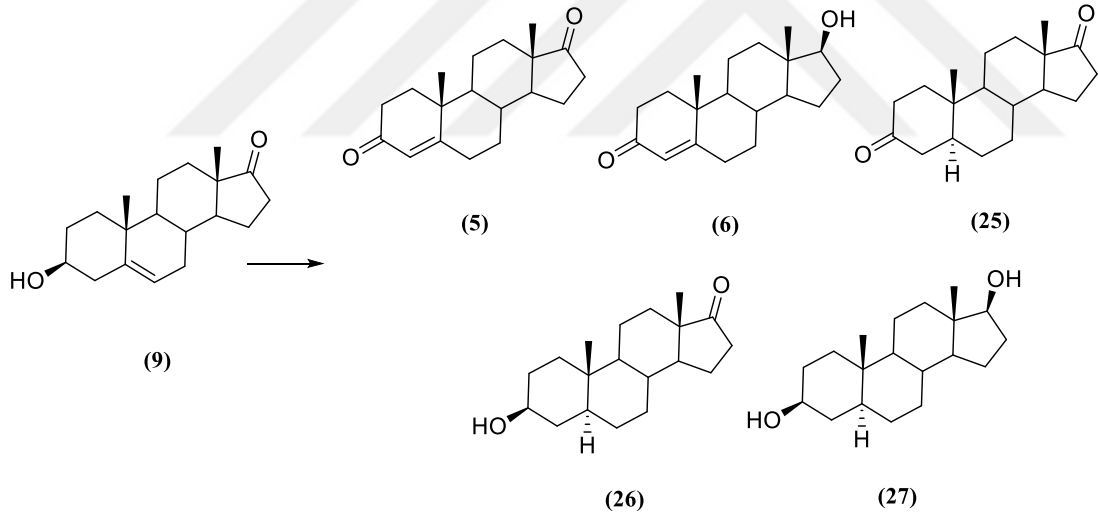
Şekil 2.4. Substratın bir *A. parasiticus* izolatı ile biyotransformasyonu [18].

A. niger NRRL 599 izolatının DHEA (9) ile biyotransformasyonu (Şekil 2.5.) 17β-hidroksiandrost-4-en-3,16-dion (22), 16β-hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (23) ve 16β,17β-dihidroksiandrost-4-en-3-on (24) ile bir önceki çalışmadan izole edilen (5) numaralı metabolitler ile sonuçlanmıştır [19].



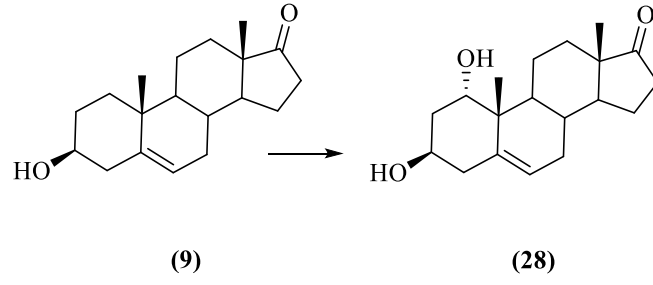
Şekil 2.5. Substratın *A. niger* NRLL 599 ile biyotransformasyonu [19].

A. oryzae ATCC 11601 izolatı ile DHEA (9) biyotransformasyonu (Şekil 2.6.) 5α-androstan-3,17-dion (25), 3β-hidroksi-5α-androstan-17-on (26) ve 3β,17β-dihidroksi-5α-androstan (27) ile önceki çalışmalardan elde edilen (5 ve 6) numaralı metabolitleri vermiştir [20].



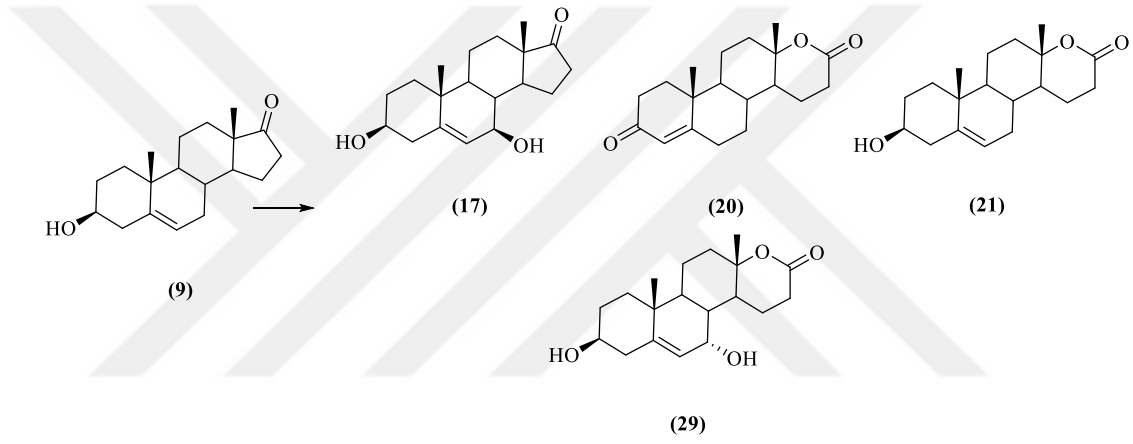
Şekil 2.6. Substratın *A. oryzae* ATCC 11601 ile biyotransformasyonu [20].

A. terreus IFO 6113 izolatı ile gerçekleştirilen DHEA (9) inkübasyonu (Şekil 2.7.) yalnızca 1α,3β-dihidroksiandrost-5-en-17-on (28) metaboliti ile sonuçlanmıştır [21].



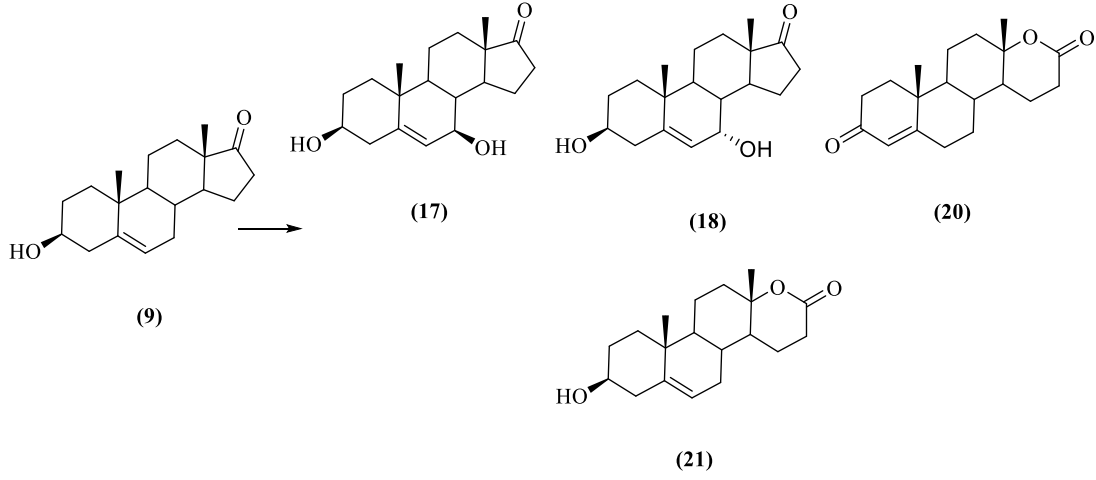
Şekil 2.7. Substratın *A. terreus* IFO 6113 ile biyotransformasyonu [21].

A. tamarii QM 1223 izolatu ile yapılan DHEA (9) biyotransformasyonu (Şekil 2.8) 3 β ,7 α -dihidroksi-17 α -okza-D-homo-androst-5-en-17-on (29) ile daha önceki çalışmalardan izole edilen (17, 20 ve 21) numaralı metabolitlerini vermiştir [22].



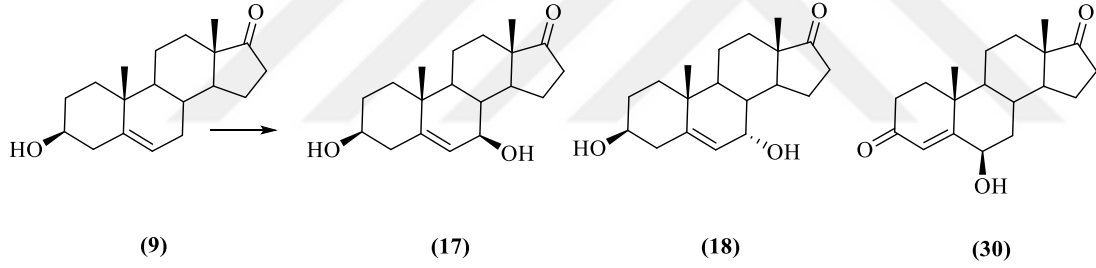
Şekil 2.8. Substratın *A. tamarii* QM 1223 ile biyotransformasyonu [22].

A. tamarii MRC 72400 izolatının DHEA (9) ile inkübasyonu (Şekil 2.9.) önceki çalışmalardan elde edilen (17, 18, 20 ve 21) numaralı metabolitler ile sonuçlanmıştır [23].



Şekil 2.9. Substratın *A. tamarii* MRC 72400 ile biyotransformasyonu [23].

A. sydowii MRC 200653 izolatının DHEA (9) ile inkübasyonu (Şekil 2.10.) 6β-hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (30) ve önceki çalışmalardan izole edilen (17 ve 18) numaralı metabolitlerle sonuçlanmıştır [24].



Şekil 2.10. Substratın *A. sydowii* MRC 200653 ile biyotransformasyonu [24].

2.5. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmanın hedefi DHEA (9) bileşiğinin daha önce steroid biyotransformasyonları için kullanılmayan *Aspergillus glaucus* MRC 200914 izolatı ile biyotransformasyonunun incelenmesidir. *Aspergillus glaucus* çok aşırı koşullar altındaki fizyolojik dayanıklılığı nedeniyle kozmopolit bir küfdür ve insanlar için hafif derecede patojen olabilmektedir [25].

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Genel Bilgiler

Biyotransformasyon deneyinde kullanılacak besiyeri ve cam malzemeler Nüve OT 40 L marka otoklavda 121°C sıcaklıkta ve 20 dakika süresince sterilize edildi. Küflerin tazelenmesi ve biyotransformasyon deneyindeki inkübasyonlar için Nükleon marka Sınıf II Tip steril kabin kullanılırken biyotransformasyon deneyi ve küflerin yetiştirilmesi için Gerhardt THO 500 Laboshake marka çalkalamalı inkübatör ile kullanıldı. Infrared spektrumları Perkin Elmer SpectrumTwo spektrometre cihazı ile alındı. ¹H NMR spektrumları solvent olarak döterokloroform (CDCl₃), iç sinyal olarak tetrametilsilan standardı içeren ve 300 MHz'de çalışan Variann Mercury 300 NMR spektrometresi kullanılarak alındı. ¹³C NMR spektrumları ise solvent olarak döterokloroform kullanılarak 75 MHz'de çalışan Varian Mercury 300 NMR spektrometresi ile alındı. Erime noktaları tayinleri Elektrothermal IA 9200 erime noktası tayin cihazı ile gerçekleştirildi.

Biyotransformasyon deneyi ve kolon kromatografisi çalışması ince tabaka kromatografisi (İTK) çalışmaları ile takip edildi. İTK çalışmaları ise 0,25 mm kalınlığında silika jel tabakaları (Merck silika jel GF254) ve etil asetat-hekzan (1:1) çözücü sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. İTK tabakalarındaki steroidler *p*-anisaldehit-sülfürik asit reaktifine daldırıldıktan sonra 120°C sıcaklıkta 3 dakika süreyle ısıtılarak görünürleştirildi.

A. glaucus MRC 200914 izolatu Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu, Marmara Araştırma Merkezi, Gıda Teknoloji ve Araştırma Enstitüsü, Kültür Koleksiyonundan temin edildi. DHEA (9) Sigma-Aldrich firmasından satın alındı. Yatık agar besiyerleri için kullanılan PDA ve agar, küf besiyeri için kullanılan tüm kimyasallar ve çalışmada kullanılan tüm solventler ise Merck firmasından satın alındı.

3.2. Yatık Agar Besiyerlerinin Hazırlanması

5,85 g PDA (potato dekstroz agar) ve 1,2 g agar karışımı saf su ile 150 mL'ye tamamlanıp kaynatılarak besiyeri hazırlandı ve soğumadan Universal marka 15 adet 22 mL'lik patolojik cam şişelerin yarısına kadar ilave edildikten sonra otoklavda 121°C'de 20 dakika sterilize edildi. Bu şişelerdeki erimiş besiyerinin donmadan önce yaklaşık 45 derecelik bir eğimle soğumaya bırakılması sonrasında yatık agar besiyerleri elde edildi.

3.3. Küf Kültürü Hazırlanması ve Tazelenmesi

Yatık agar besiyerindeki küflerin bir kısmı oda sıcaklığında ve 15 gün süresince çoğalmaya bırakılmak üzere yatık agar besiyerlerinin 3 tanesine steril koşullarda aktarıldı. Hazırlanan yeni yatık agar kültürlerindeki en iyi gelişmiş küf her 2 haftada bir yeni yatık agar besiyerlerine steril şartlarda aktarıldı. Bu işlemin birkaç kez tekrarlanmasından sonra elde edilen en taze ve en iyi gelişme gösteren küf biyotransformasyon deneyinde kullanıldı.

3.4. Küf için Besiyeri Hazırlanması

Glukoz (200 g), pepton (5 g), malt ekstraktı (3 g) ve maya ekstraktı (3 g) 1 L distile su da çözülüp karıştırılarak *A. glaucus* MRC 200914 küfüne ait besiyeri hazırlandı [26].

3.5. Biyotransformasyon Deneyi

Besiyeri 10 adet 250 mL erlene paylaştırılarak otoklavda sterilize edildi. Bu 10 erlene en taze alt kültürdeki küf steril şartlar altında aktarıldıktan sonra çalkalamalı bir inkübatörde (150 rpm) 25 °C'de 3 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında substrat (1 g), DMF (10 mL) içerisinde çözülerek erlenlere eşit hacimlerde ve steril şartlarda aktarıldı. Erlenler 25°C'de 5 gün daha inkübe edildi (150 rpm).

Biyotransformasyon deneyi bir adet kontrol erleni ile takip edildi. Bu kontrol erleni yalnızca substrat ve küf nakledilmemiş steril besiyeri içermekteydi. Biyotransformasyon deneyindeki gerçekleştirilen işlemlerin hepsi kontrol erleni içinde aynı şekillerde gerçekleştirildi. Kontrol erleninden İTK alındığında herhangi bir

metabolit tespit edilmediğinden biyotransformasyon deney sonuçların geçerli olduğu değerlendirildi.

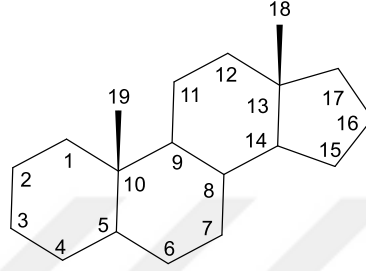
3.6. Metabolitlerin Ayrılması ve Yapı Tayinleri

İnkübasyon sonrasında küf besiyeri filtrasyonla misellerinden filtrat olarak ayrıldı ve miseller etil asetat (500 mL) ile yıkandı. Filtrattaki steroidler etil asetat (1 L) ile 3 kez ekstrakte edildi. Ekstraktlara susuz sodyum sülfat katılarak ortamda bulunabilecek su uzaklaştırıldı. Ekstraktlar evaporatörde uzaklaştırıldığında yağmsı bir madde elde edildi. Bu yağmsı maddeyi substrat ile karşılaştırmak suretiyle İTK çalışmaları gerçekleştirildi. Silika jel 60 (Merck 107734, 230-400 mesh) absorban olarak kullanılarak yağmsı maddedeki steroidleri ayırmak için kolon kromatografisi uygulaması gerçekleştirildi. Steroidler elüent olarak *n*-hekzan içerisinde artan etil asetat derişimleri kullanılarak kolonlardan ayrıldı. Daha sonra substrat ile her bir steroide ait erime noktası, NMR ve IR spektrumlarının karşılaştırılarak yapı tayinleri gerçekleştirildi.



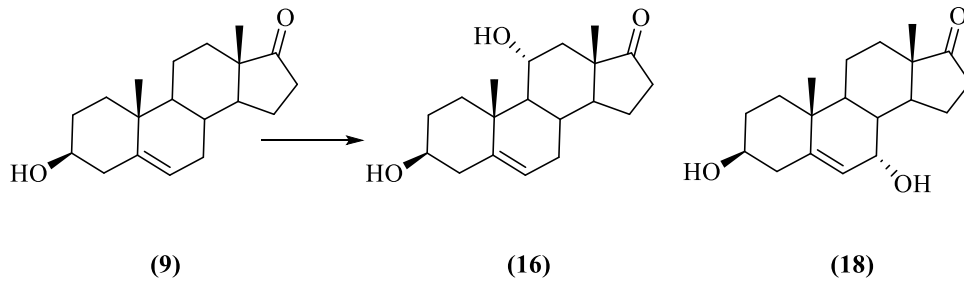
4. DENEYSEL BULGULAR

A. *glaucus* MRC 200914 izolatu ile biyotransformasyonu gerçekleştirilen DHEA (9) bileşinin karbon iskeleti Şekil 4.1.'de verilmiştir.



Şekil 4.1. Substratın karbon iskeleti.

A. *glaucus* MRC 200914 izolatu ile 5 gün süren DHEA (9) inkübasyonu sonrasında elde edilen yağımsı madde (2017 mg) ile gerçekleştirilen kolon kromatografisi çalışmasından başlangıç maddesi (122 mg) ile 3 β ,11 α -dihidroksiandrost-5-en-17-on (16) ve 3 β ,7 α -dihidroksiandrost-5-en-17-on (18) metabolitleri elde edildi (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Substratın A. *glaucus* MRC 200914 ile biyotransformasyonu.

3 β ,11 α -Dihidroksiandrost-5-en-17-on (16) (338 mg, %32)

Erime noktası: 213-214 $^{\circ}$ C, lit., 205-206 $^{\circ}$ C [27].

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3450, 1740 ve 1650.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,87 (3H, s, 18-H), 1,20 (3H, s, 19-H), 3,54 (1H, tt, $J = 5$ ve 10 Hz, $3\alpha\text{-H}$), 4,08 (1H, dt, $J = 5$ ve 10 Hz, $11\beta\text{-H}$), 5,42 (1H, d, $J = 5$ Hz, 6-H).

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

Tablo 4.1. Steroidler için ^{13}C NMR kimyasal kayma değerleri.

C atomu	(9)	(16)	(18)
1	37.11	38.93	36.85
2	31.47	31.68	30.94
3	71.48	71.67	71.00
4	42.11	42.54	42.46
5	140.98	141.49	146.38
6	120.83	120.71	123.45
7	31.35	31.33	64.16
8	31.41	30.70	37.41
9	50.13	56.87	41.82
10	36.56	38.28	37.08
11	20.29	68.65	19.97
12	30.71	42.64	31.14
13	47.49	47.96	47.06
14	51.67	50.63	44.82
15	21.82	21.76	21.83
16	35.80	35.90	35.74
17	221.30	219.29	221.41
18	13.48	14.27	13.21
19	19.37	19.09	18.20

3 β ,7 α -Dihidroksiandrost-5-en-17-on (**18**) (317 mg, %30).

Erime noktası: 181-182 °C, lit., 181-182°C [27].

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3420, 1735 ve 1655.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 0,90 (3H, s, 18-H), 1,03 (3H, s, 19-H), 3,54 (1H, tt, *J* = 5 ve 10 Hz, 3 α -H), 3,97 (1H, bs, 7 β -H), 5,60 (1H, d, *J* = 5 Hz, 6-H).

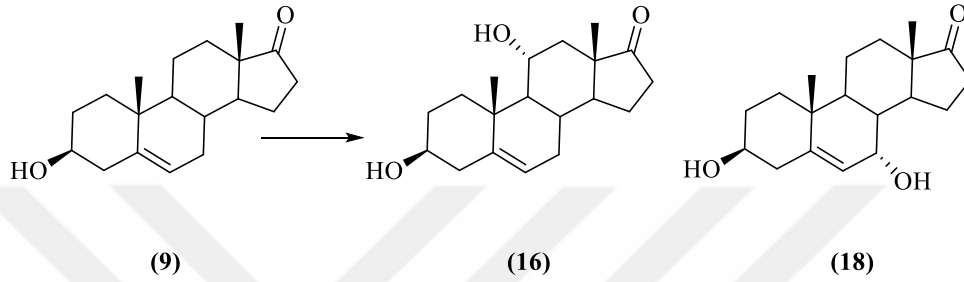
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): Bakınız Tablo 4.1.





5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

A. *glaucus* MRC 200914 izolatu ile DHEA (**9**) bileşiminin 5 gün süren inkübasyonu iki metabolit verdi (Şekil 5.1.).



Şekil 5.1. Substratın *A. glaucus* MRC 200914 ile biyotransformasyonu.

İlk metabolit 3β,11α-dihidroksiandrost-5-en-17-on (**16**) olarak tanımlandı. Metabolitin ¹H NMR spektrumu 11α-hidroksil grubu için karakteristik olan bir sinyali (1H, dt, $J = 5$ ve 10 Hz) δ_H 4.08 ppm'de verdi [28]. Metabolitin ¹³C NMR spektrumu (Tablo 5.1.) C-9 sinyali için aşağı alana doğru bir kayma ($\Delta\delta_C$ 6,74 ppm) verirken, C-8 sinyali ise yukarı alana doğru bir γ -gauche kayması ($\Delta\delta_C$ 0,71 ppm) verdi. Bu kimyasal kayma değerleri bir 11α-hidroksil grubu varlığını daha da belirginleştirdi [29]. Metabolite ait ¹H NMR spektrumunda substratında içerdiği 3α-H ve 6-H sinyalleri sırasıyla δ_H 3,54 ppm (1H, tt, $J = 5$ ve 10 Hz) ve 5,42 ppm'de (1H, d, $J = 5$ Hz,) gözleendiği için substratın diğer kısımlarında bir değişim gerçekleşmediği değerlendirildi.

İkinci metabolit 3β,7α-Dihidroksiandrost-5-en-17-on (**18**) olarak belirlendi. Metabolit ¹H NMR spektrumu 7α-hidroksil grubu varlığını gösteren tipik bir sinyali (1H, bs) δ_H 3.97 ppm'de gösterdi [28]. Metabolitin ¹³C NMR spektrumundaki C-8 sinyali aşağı alana doğru bir kayma ($\Delta\delta_C$ 6,00 ppm) verirken, C-9 sinyali yukarı alana doğru bir γ -gauche kayması ($\Delta\delta_C$ 8,31 ppm) verdi. Bu bulgular 7α-hidroksil grubu varlığını daha da netleştirdi [29]. Metabolite ait ¹H NMR spektrumunda substratın yapısında da gözlenen 3α-H ve 6-H ve sinyalleri sırasıyla δ_H 3,54 ppm (1H, tt, $J = 5$ ve 10 Hz) ve

5,60 ppm'de (1H, d, $J = 5$ Hz,) gözleendiğinden substratın diğerkisimlerinde değişim olmadığına karar verildi.

Tablo 5.1. Steroidlere ait ^{13}C NMR kimyasal kayma değerleri.

C atomu	(9)	(16)	(18)
1	37.11	38.93	36.85
2	31.47	31.68	30.94
3	71.48	71.67	71.00
4	42.11	42.54	42.46
5	140.98	141.49	146.38
6	120.83	120.71	123.45
7	31.35	31.33	64.16
8	31.41	30.70	37.41
9	50.13	56.87	41.82
10	36.56	38.28	37.08
11	20.29	68.65	19.97
12	30.71	42.64	31.14
13	47.49	47.96	47.06
14	51.67	50.63	44.82
15	21.82	21.76	21.83
16	35.80	35.90	35.74
17	221.30	219.29	221.41
18	13.48	14.27	13.21
19	19.37	19.09	18.20

Tablo 5.2.'den de görülebileceği gibi *A. glaucus* MRC 200914 izolatu DHEA (9) bileşini hem C-7 α pozisyonunda hemde C-11 α pozisyonunda hidroksilledi.

Tablo 5.2. Metabolit verimleri.

Substrat	Metabolit	% Verim
DHEA (9)		
	3 β ,11 α -Dihidroksiandrost-5-en-17-on (16)	32
	3 β ,7 α -Dihidroksiandrost-5-en-17-on (18)	30

Literatürdeki *Aspergillus* türleri ile steroid biyotransformasyon çalışmaları incelendiğinde DHEA (**9**) bileşiğinin C-7 α pozisyonunda hidroksilenmesinin C-11 α pozisyonunda hidroksillenmesinden daha yaygın olduğu gözlemlendi [16-24]. *A. glaucus* MRC 200914 izolatı *A. candidus* MRC 200634 izolatı gibi substratı hem C-11 α hemde C-15 β pozisyonlarında hidroksilledi [16]. Kısaca bu çalışmada yukarıda da belirtildiği gibi *A. glaucus* MRC 200914 substratı C-7 α ve C-11 α pozisyonlarında hidroksilledi.



KAYNAKLAR

- [1] Hanson, J. R. 2003. Natural Products: The Secondary Metabolites, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1-2.
- [2] Clayden, J., Greeves, N., Warren, S., Wothers, P. 2001. Organic Chemistry, First edition, Oxford University Press, Oxford, 1413-1414.
- [3] Mann, J. 1994. Chemical Aspects of Biosynthesis. First Edition, Oxford University Press, New York, 2-4.
- [4] Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E. Y. 2002. İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, Ankara, 481-659.
- [5] Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. İ. 2005. Biyokimya, Dördüncü Baskı, Aktif Yayınevi, Erzurum, 185-188.
- [6] Hanson, J. R. 1995. An Introduction to Biyotransformations in Organic Chemistry, W. H. Freeman and Company, New York, 1-62.
- [7] Faber, K. 2003. Biotransformations in Organic Chemistry, Fifth Edition, Springer-Verlag, Berlin, 1-407.
- [8] Demain, A. L. 2000. Small Bugs Big Business: The Economic Power of the Microbe. Biotechnol. Adv., 18(6), 499-514.
- [9] Donova, M. V., Egorova, O. V. 2012. Microbial Steroid Transformations: Current State and Prospects. Appl. Microbiol. Biot., 94(6), 1423-1447.
- [10] Fernandes, P., Cruz, A., Angelova, B., Pinheiro, H. M., Cabral, J. M. S. 2003. Microbial Conversion of Steroid Compounds: Recent Developments. Enzyme Microb. Tech., 32(6), 688-705.
- [11] Mahato, S. B., Garai, S. 1997. Advances in Microbial Steroid Biotransformation. Steroids, 62(4), 332-345.
- [12] Nassiri-Koopaei, N., Faramarzi, M. A. 2015. Recent Developments in the Fungal Transformation of Steroids. Biocatal. Biotransform., 33(1), 1-28.

- [13] Bhatti, H. N., Khera, R. A. 2012. Biological Transformations of Steroidal Compounds: A Review. *Steroids* 77(12), 1267-1290.
- [14] Samson, R. A., Hong, S-B., Frisvad, J. C. 2006. Old and New Concepts of Species Differentiation in *Aspergillus*, *Medical Mycology*, 44, S133-S148.
- [15] Lee, S. K., Kang, H. G., Na, K. J., Han, J.I. 2012. Fungal Dermatitis Caused by *Aspergillus sydowii* in a Thoroughbred Horse. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32, 835-839.
- [16] Yildirim, K., Kuru, A. 2016. The biotransformation of some steroids by *Aspergillus sydowii* MRC 200653, *Journal of Chemical Research*, 40, 78-81.
- [17] Yildirim, K. 2010. Microbial Hydroxylation of Some Steroids by *Aspergillus wentii* MRC 200316. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 12,1273-1281.
- [18] Mascotti, M.L., Palazzolo, M.A., Bisogno, F.R., Kurina-Sanz, M. 2016. Biotransformation of dehydro-epi-androsterone by *Aspergillus parasiticus*: Metabolic evidences of BVMO activity. *Steroids*, 109, 44-49.
- [19] Haruo, Y., Kenyu, S., Nobuaki, Y., Yuichiro, K., Hiromu, M. 1976. Microbial 16 β -Hydroxylation of Steroids with *Aspergillus niger*. *Agr. Biol. Chem.*, 40, 505-509.
- [20] Cvelbar, D., Zist, V., Kobal, K., Zigon, D., Zakelj-Mavrič, M. 2012. Steroid toxicity and detoxification in ascomycetous fungi. *Chemico-Biological Interactions*, 202, 243-258.
- [21] Fujiwara, A., Miyamoto, C.O.T. 1980. 1-Hydroxydehydroepiandrosterone is produced from dehydroepiandrosterone by fermentation with *Aspergillus terreus* and *Penicillium oxalicum*. *EP*, 14971, A1.
- [22] Hunter, A.C., Coyle, E., Morse, F., Dedi, C., Dodd, H.T., Koussoroplis, S.J. 2009. Transformation of 5-ene steroids by the fungus *Aspergillus tamarii* KITA: Mixed molecular fate in lactonization and hydroxylation pathways with identification of a putative 3 β -hydroxy-steroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 isomerase pathway. *Biochim. Biophys. Acta*, 1791, 110-117.
- [23] Yildirim, K., Uzuner, A., Gülcüoğlu E.Y. 2011. Baeyer-Villiger Oxidation Of Some Steroids By *Aspergillus tamarii* Mrc 72400. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 76, 743-754.
- [24] Yildirim K., Kuru, A. 2016. The Biotransformation of Some Steroids by *Aspergillus sydowii* MRC 200653, *Journal of Chemical Research*, 40, 78-81.
- [25] Hubka, V., Kolarík, M., Kubátová, A., & Peterson, S. W. 2013. Taxonomic revision of *Eurotium* and transfer of species to *Aspergillus*, *Mycologia*, 105, 912-937.

- [26] Yamauchi H., Doi M. 1997. O-Methylation of 2,6-Dimethoxy-4-methylphenol by *Aspergillus glaucus* and Their Possible Contribution to Katsuobushi Flavor, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61, 1386-1387.
- [27] Yildirim K., Kuru, A. 2015. Biotransformation of Some Steroids by *Aspergillus candidus* MRC 200653, *Journal of Chemical Research*, 39, 346-549.
- [28] Kirk, D.N., Toms, H.C., Douglas, C., White, K.A., Smith, K.E., Latif, S., and Hubbard, R.W.P. 1990. A survey of the high-field ¹H NMR spectra of the steroid hormones, their hydroxylated derivatives, and related compounds *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1567.
- [29] Blunt, J.W., and Stothers, J.B. 1977. C NMR spectra of steroids a survey and commentary. *Org. Magn. Reson.*, 9, 439.

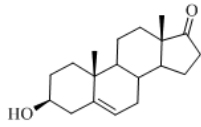


EKLER

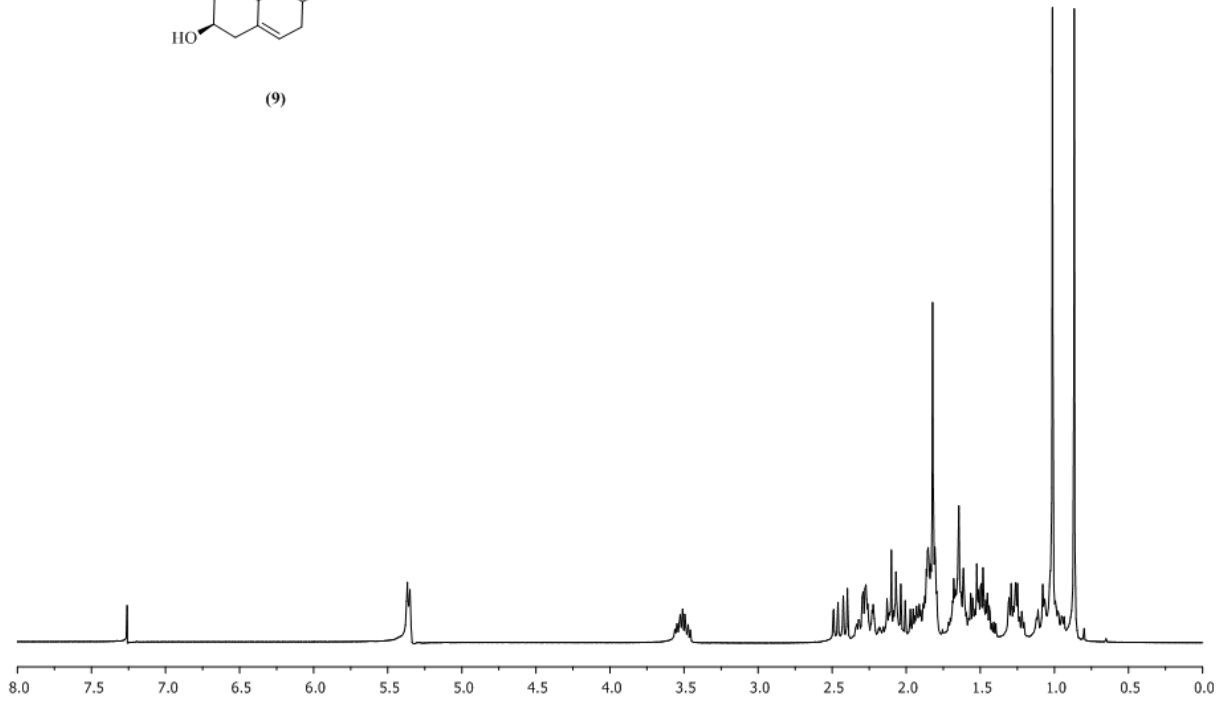
EK A. NMR spektrumları



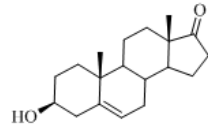
EK A



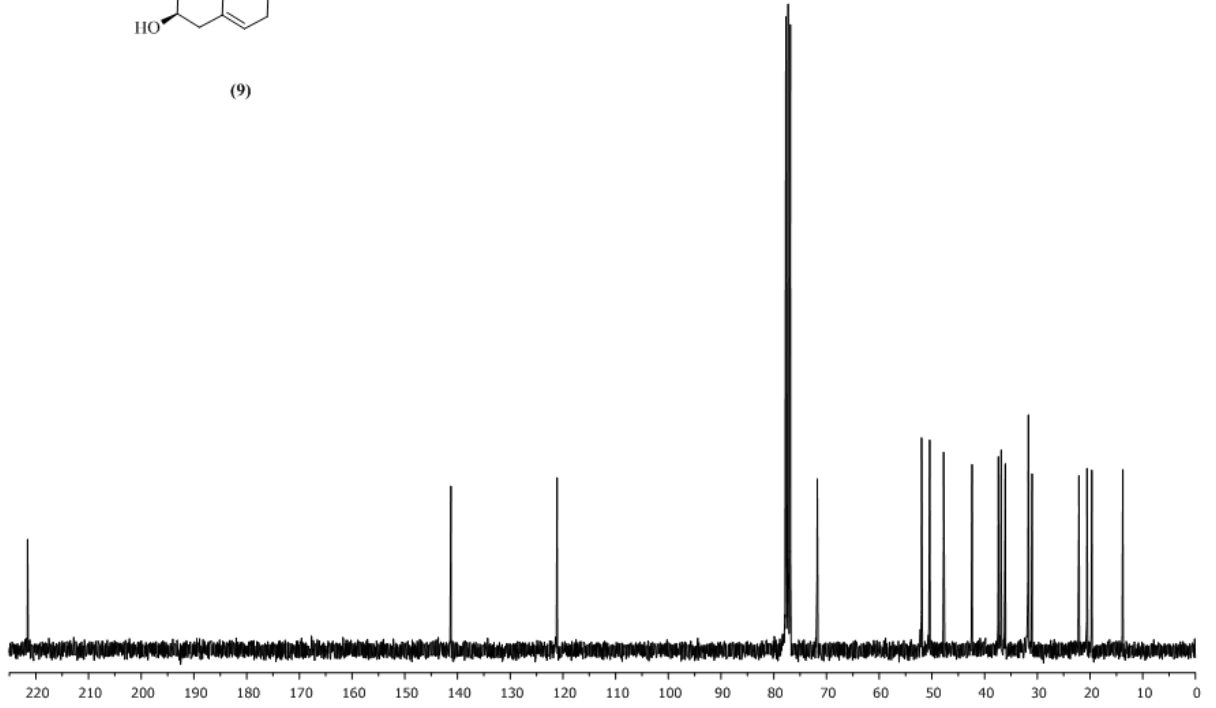
(9)



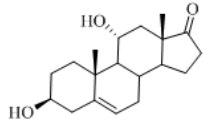
EK A.1. DHEA (9) için ¹H NMR spektrumu



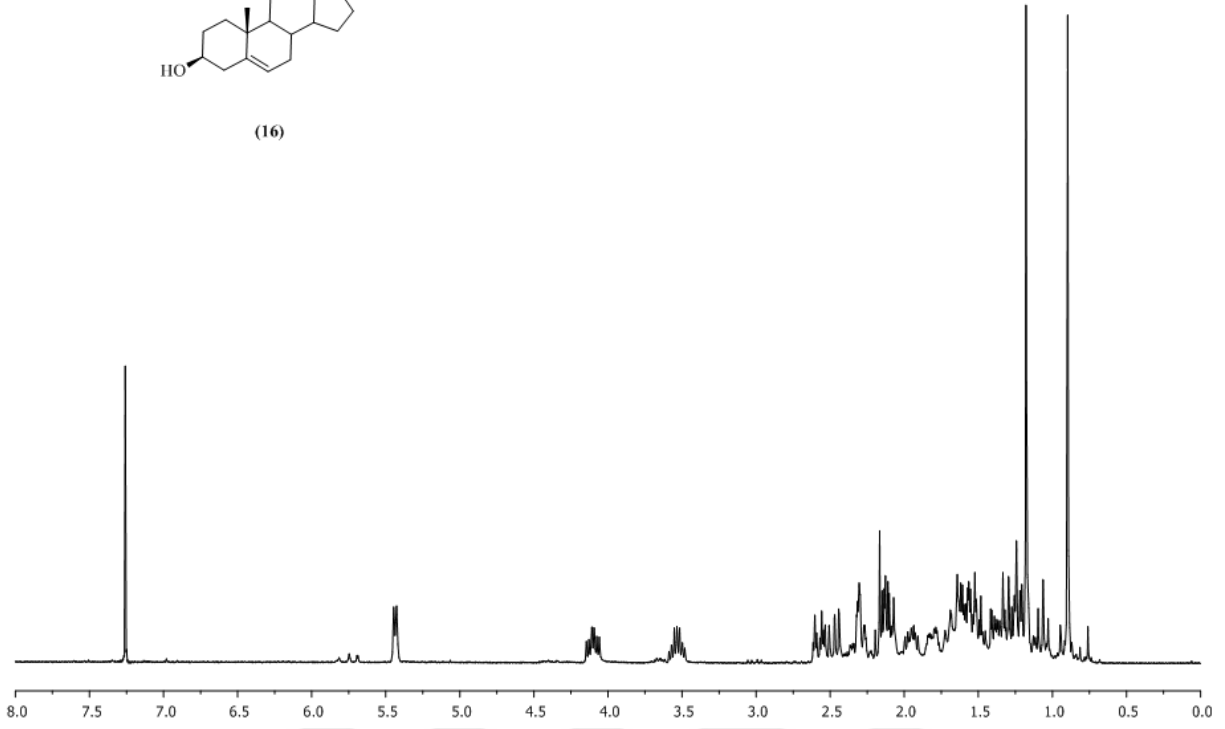
(9)



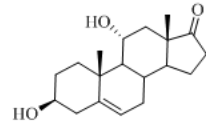
EK A.2. DHEA (9) için ^{13}C NMR spektrumu



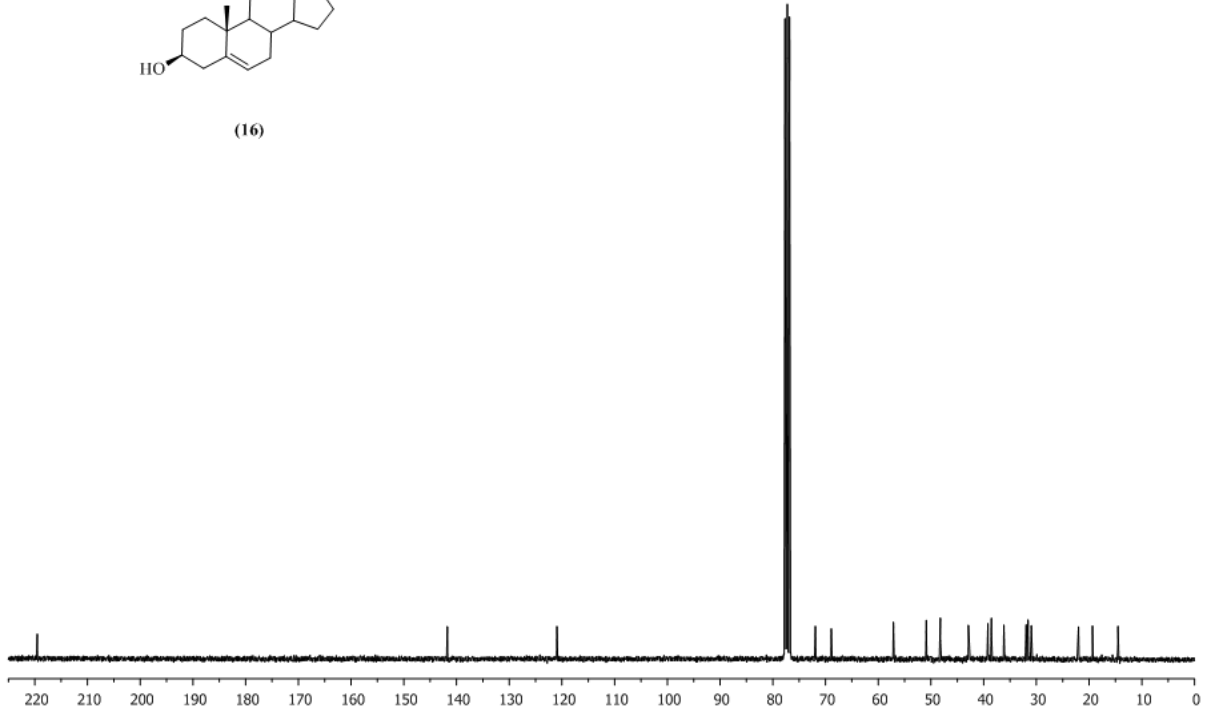
(16)



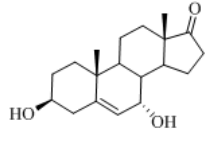
EK A.3. 3 β ,11 α -Dihidroksiandrost-5-en-17-on (16) için ^1H NMR spektrumu



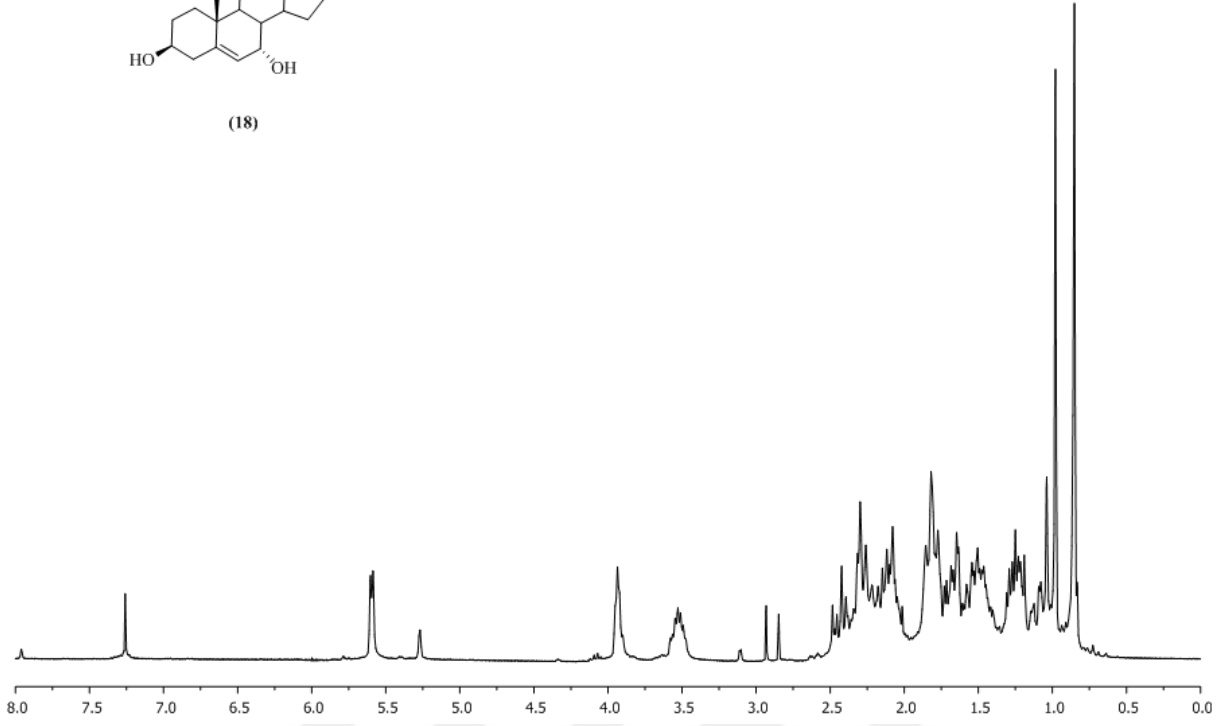
(16)



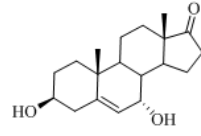
EK A.4. 3 β ,11 α -Dihidroksiandrost-5-en-17-on (16) için ^{13}C NMR spektrumu



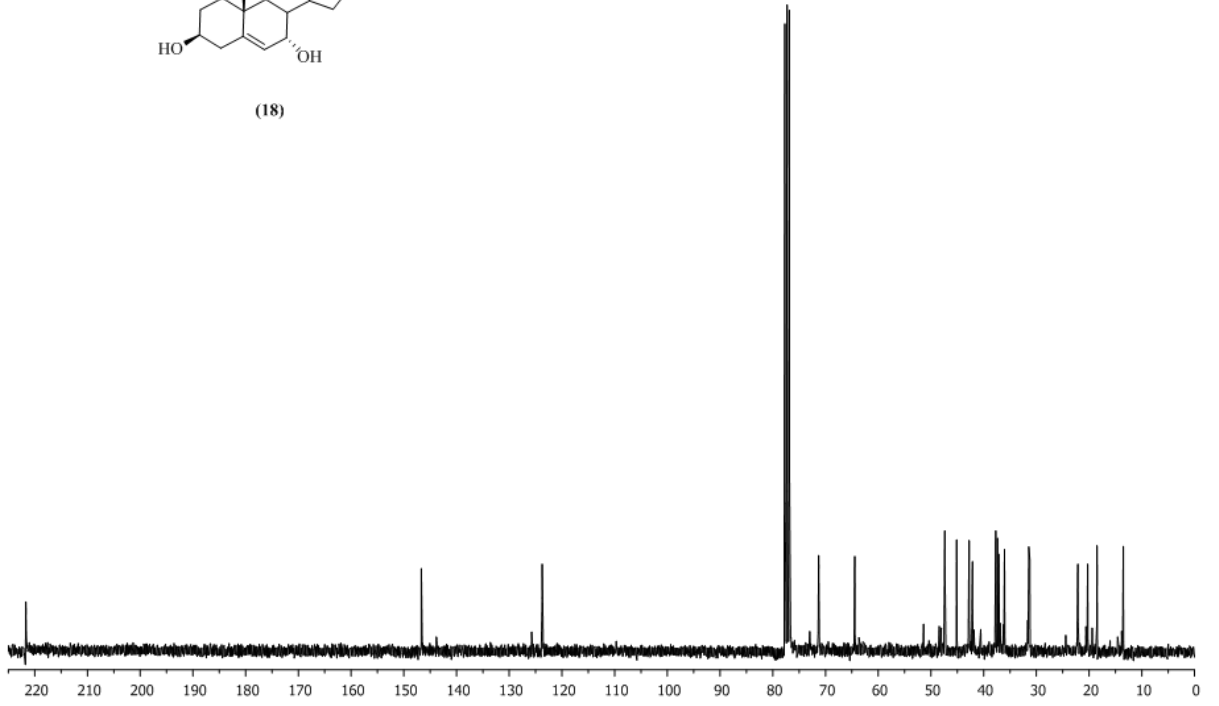
(18)



EK A.5. 3 β ,7 α -Dihidroksiandrost-5-en-17-on (18) için ^1H NMR spektrumu



(18)



EK A.6. 3 β ,7 α -Dihidroksiandrost-5-en-17-on (18) için ^{13}C NMR spektrumu



ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Raghda Mahmood Abdulghafoor AL-ANI

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : Al-mustansiriya Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Irak, 2017.
- **Yüksek lisans** : Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalı (devam ediyor).

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

TEZDEN TÜRETİLEN ESERLER:

- Uluslararası Sözlü Bildiri (Yildirim, K., Kuru, A. Yılmaz Keskin S., Ali, A.A.A., Al-Ani, R. M. A., Rzayeva, N. (1-3 Eylül 2022). Biotransformation of some androgens by *Aspergillus glaucus*. 1st International Karatekin Science and Technology Conference, 155-156, Çankırı, Türkiye).