

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TESTOSTERON BİLEŞİĞİNİN *ASPERGILLUS GLAUCUS* KÜFÜ
İLE BLYOTRAMSFÖRMEYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ali Abdulhussein Ali ALI

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

OCAK 2023

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TESTOSTERON BİLEŞİĞİNİN *ASPERGILLUS GLAUCUS* KÜFÜ
İLE BLYOTRANSFORMASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ali Abdulhussein Ali ALI

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kudret YILDIRIM

OCAK 2023

Ali Abdulhussein Ali Ali tarafından hazırlanan “TESTOSTERON BİLEŞİĞİNİN *ASPERGILLUS GLAUCUS* KÜFÜ İLE BLYOTRAMSFORMASYONU” adlı tez çalışması 30.01.2023 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 :

Ünvan Adı SOYADI

.....

Sakarya Üniversitesi

Jüri Üyesi :

Ünvan Adı SOYADI

.....

Sakarya Üniversitesi

Jüri Üyesi :

Ünvan Adı SOYADI

.....

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 “TESTOSTERON BİLEŞİĞİNİN *ASPERGILLUS GLAUCUS* KÜFÜ İLE BLYOTRAMSFORMASYONU” 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

Ali Abdulhussein Ali ALI

TEŞEKKÜR

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.

Yüksek lisans öğrenimim boyunca ihtiyacım olan her konuda bana destek olan Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyelerine ve araştırma görevlilerine, laboratuvar arkadaşlarıma, Dr. Öğr. Üyesi Ali KURU'ya teőekkürlerimi sunarım.

Bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan, hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve koşulsuz yanımda olan aileme sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Ali Abdulhussein Ali ALI

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 TESTOSTERON BİYOTRANSFORMASYONLARI.....	5
2.1. Biyotransformasyonlar	5
2.2. Mikrobiyal Biyotransformasyonlar	7
2.3. Küfler ile Steroid Biyotransformasyonları	10
2.4. <i>Aspergillus</i> Türleri ile Testosteron (6) Biyotransformasyonları	10
2.5. Çalışmanın amacı	15
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	17
3.1. Cihazlar, Sarf Malzemeler ve Kullanılan Yöntemler	17
3.2. Yatık Agar Besiyerlerinin Hazırlanması	18
3.3. Küf Kültürlerinin Hazırlanması	18
3.4. Küflere Ait Besiyerlerinin Hazırlanması.....	18
3.5. Biyotransformasyon Çalışması	18
3.6. Metabolitlerin Saflaştırılması ve Yapılarının Tayini	19
4. DENEYSEL BULGULAR	21
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
lit.	: Literatür
PDA	: Potato dekstroz agar
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	: ¹ H NMR spektrumundaki kimyasal kayma
g	: Gram
Hz	: Hertz
J	: Etkileşme sabiti
lit.	: Literatür
m	: Çoklu (multiplet) sinyal
mg	: Miligram
MHz	: Megahertz
mL	: Mililitre
pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonunun eksi logaritması
s	: Tekli (singlet) sinyal
t	: Üçlü (triplet) sinyal

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 4.1. Steroidler için ^{13}C NMR kimyasal kayma değerleri.....	22
Tablo 5.1. Steroidlere ait ^{13}C NMR kimyasal kayma değerleri.....	24
Tablo 5.2. Metabolit verimleri.....	25

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. Genel steroid yapısı.....	1
Şekil 1.2. Kolesterol.....	2
Şekil 1.3. Bazı steroid hormonların biosentezi [4, 5]	3
Şekil 2.1. <i>R. arrhizus</i> ile progesteron (3)	10
Şekil 2.2. Substratın <i>A. niger</i> ATCC 9142 ile biyotransformasyonu.	11
Şekil 2.3. Substratın <i>A. niger</i> NRRL 599 biyotransformasyonu	12
Şekil 2.4. Substratın <i>A. niger</i> KCH910 ile biyotransformasyonu.....	12
Şekil 2.5. Substratın <i>A. oryzae</i> ATCC 11601 ile biyotransformasyonu.....	13
Şekil 2.6. Substratın <i>A. fischeri</i> ile biyotransformasyonu	13
Şekil 2.7. Substratın <i>A. fumigatus</i> ile biyotransformasyonu	13
Şekil 2.8. Substratın <i>A. auerogulgens</i> ile biyotransformasyonu	14
Şekil 2.9. Substratın <i>A. wentii</i> MRC 200316 ile biyotransformasyonu.....	14
Şekil 2.10. Substratın <i>A. terreus</i> MRC 200365 ile biyotransformasyonu.....	15
Şekil 2.11. Substratın bazı <i>A. tamaritii</i> izolatları ile biyotransformasyonları.....	15
Şekil 2.12. Substratın <i>A. sydowii</i> MRC 200653 ile biyotransformasyonu.....	15
Şekil 4.1. Substratın karbon iskeleti.....	21
Şekil 4.2. Substratın <i>A. glaucus</i> MRC 200914 ile biyotransformasyonu.....	21
Şekil 5.1. Substratın <i>A. glaucus</i> MRC 200914 ile biyotransformasyonu	23

TESTOSTERON BİLEŞİĞİNİN *ASPERGILLUS GLAUCUS* KÜFÜ İLE BİYOTRANSFORMASYONU

ÖZET

Doğal ürünler canlıların çoğalma ve gelişmesi için elzem olmayan bileşiklerdir. Bu bileşikler buldukları canlılara bazı avantajlar sağladıkları ve daha çok diğer canlılara olan etkileri ile dikkat çeken kimyasal maddelerdir. Doğal ürünler genelde terpenoidler, alkaloidler, steroidler, poliketidler, fenilpropanoidler, özelleşmiş peptidler, özelleşmiş karbonhidratlar ve yağ asitleri ile yağ asitlerinin türevleri olarak gruplandırılırlar.

Enzimlerin substratları olmayan yabancı olan maddelerde gerçekleştirdikleri kimyasal değişimler biyotransformasyonlar olarak adlandırılır. Biyotransformasyonlarda rol oynayan enzimler serbest, sabitlenmiş veya çeşitli biyolojik sistemlerin bünyesinde mevcut olarak etki gösterebilirler. Biyotransformasyonların gerçekleştirildiği biyolojik sistemlerin en çok kullanılanları küfler, mayalar ve bakteriler gibi mikrobiyal hücrelerdir. Küfler, mayalar ve bakteriler gibi mikroorganizmalar ile gerçekleştirilen mikrobiyal biyotransformasyonlar klasik kimyasal sentez yöntemlerine göre daha fazla avantajlar sağlamaktadır. Mikrobiyal biyotransformasyonların uygulanması için genelde çeşitli mikroorganizmalar serbest veya belirli bir yüzeye sabitlenmiş olarak kullanılabilir.

Günümüzde küfler ile gerçekleştirilen steroid biyotransformasyonları küf enzimlerinin yüksek regio ve stereoseçicilikleri olmaları nedeni ile birçok önemli bileşimin elde edilmesinde yaygın olarak uygulanmaktadır.

Bu çalışmada testosteron (**6**) steroidinin *Aspergillus glaucus* MRC 200914 küflünde nasıl metabolize edildiğinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bahsedilen bu amaç doğrultusunda biyotransformasyon çalışmaları öncesinde *Aspergillus glaucus* küfüne ait stok kültürlerinden periyodik olarak taze alt kültürler hazırlandı. Daha sonra biyotransformasyon deneyi için besiyeri hazırlanıp erlenlere dağıtılarak otoklavda sterilizasyonu gerçekleştirildi. Erlenlere en taze alt kültürden steril şartlarda küfün nakli gerçekleştirildikten sonra bu erlenler 3 gün inkübasyona bırakıldı. İçerisinde yeterince küf gelişen bu erlenlere ise testosteron (**6**) steril şartlarda ilave edilip 5 gün daha inkübasyona devam edildi. Inkübasyon sonrasında besiyeri filtrasyona maruz bırakıldıktan sonra steroidler etil asetat ekstraksiyonu ile organik faza geçirildi. Etil asetat ekstraktlarının susuz Na₂SO₄ ile kurutulup evaporatörde uzaklaştırıldı. Elde edilen kalıntı içerisindeki steroidler ise kolon kromatografisi yöntemi ile ayrıldı. Biyotransformasyondan kaynaklanan steroidlerin yapı tayinleri, erime noktaları tayini ve bazı spektroskopik yöntemler kullanılarak gerçekleştirildi. Yapı tayinleri neticesinde *Aspergillus glaucus* ile testosteron (**6**) biyotransformasyonunun 11 α ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (**13**) ve 6 β ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (**14**) metabolitleri ile neticelendiği anlaşıldı.

BIOTRANSFORMATION OF TESTOSTERONE BY *ASPERGILLUS GLAUCUS*

SUMMARY

Compounds that are not essential for the reproduction and development of living things are called natural products. Natural products are chemical substances that provide benefits to the living things and attract more attention due to their effects on other living things. Natural products are generally classified under groups such as terpenoids, alkaloids, steroids, polyketides, peptides, phenylpropanoids, specialized amino acids, specialized carbohydrates and fatty acids and their derivatives.

Biological systems have the ability to perform chemical changes on xenobiotics. The uses of biological systems for this purpose are called biotransformations. Biotransformations are carried out by free or immobilised enzymes and biological systems with enzymes. Some common biological systems widely used for biotransformations are cell cultures, tissue cultures, organ cultures, microsomes, microorganisms and spores of microorganisms.

Enzymes catalyze almost all reactions in living organisms. Enzymes lower an energy of activation (E_A). Enzymes reduce the time to reach the reaction equilibrium. Enzymes are not consumed or changed by the reaction. Enzymes do not change the ΔG and the equilibrium position of the reaction. More than 3200 enzymes have been identified by the International Union of Biochemistry. It is believed that nature may offer 25000 enzymes.

Enzymes provide some advantages for their users. Enzymes are very effective catalysts, For example, the reaction rates of enzymatic reactions are accelerated by a factor of 10^8 - 10^{10} . This can even exceed a value of 10^{12} , that is impossible with other catalysts. Enzymes are environmentally acceptable since they are totally degradable. Most other chemical reagents cause environmental problems. Enzymes usually act under mild conditions (around pH 7, 30 °C and 1 atm). This minimises some problems (isomerisation, racemisation, rearrangements, decomposition). Since enzymes are compatible with each other, enzymes usually function under the same or similar conditions. Therefore, in one flask several reactions can be performed. This is achieved by using multienzyme systems. Some enzymes are bound to their natural role. However some enzymes exhibit a high substrate tolerance. They can accept a large variety of natural or unnatural compounds. Enzymes can catalyse a broad spectrum of reactions. There is an enzyme-catalysed reaction equivalent to almost every organic reaction.

Enzymes are chemoselective, regioselective and enantioselective. Enzymes are chemoselective and generally act on just one single type of functional group and other functionalities remain unchanged. Therefore, reactions generally tend to be cleaner. Enzymes are regioselective and can distinguish between functional groups that are chemically located in different regions of the same substrate molecule. Enzymes can

perform this due to their complex three-dimensional structures. Enzymes are enantioselective and are chiral catalysts as they are made from L-amino acids. As a consequence, any type of chirality on substrate molecule is recognised by enzymes. A prochiral substrate can be converted into an optically active product and both enantiomers in a racemic substrate generally react at different rates, yielding a kinetic resolution.

However, there are some disadvantages for using enzymes. Enzymes are provided by nature as a one type of enantiomer. When the other type of enantiomeric product is required, an enzyme with exactly the opposite stereochemical selectivity is needed. Unfortunately, this is often impossible. Enzymes require narrow operation parameters. Working under mild conditions sometimes causes trouble since elevated temperatures and extreme pH lead to inhibition of enzymes. Enzymes display 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 are only poorly soluble in aqueous media. Therefore, shifting enzymatic reaction from an aqueous medium to an organic medium would be highly desired. Unfortunately, this may cause some loss of catalytic activity. Enzymes are bound to their natural cofactors. Although enzymes are extremely flexible for accepting unnatural substrates they are almost exclusively bound to their natural cofactors such as NADH or NADPH. However, these molecules are relatively unstable and too expensive to use in stoichiometric amounts. Unfortunately, they can not be replaced by their more economical man-made substitutes. Enzymes are prone to inhibition phenomena. Many enzymatic reactions are prone to substrate or product inhibition which forces enzymes to stop working at higher substrate and/or product concentrations. Some enzymes may cause allergies. Although enzymes can cause allergic reactions this can be minimised by regarding enzymes as chemicals and using them with care.

Biotransformations are generally performed either by isolated enzyme systems or by intact whole microorganisms. There are more than 300 commercially available isolated enzyme systems. As many enzyme systems that are involved are membrane bound and difficult to isolate, intact whole microorganisms are often used for biotransformations. Main groups of microorganisms widely used for biotransformations are molds, yeasts, bacteria and microalgae.

Microorganisms perform a number of reactions with both natural and synthetic substrates by utilizing their non-specific enzyme systems. Microbial hydroxylations are very common and are favourite among these reactions. The value of microbial hydroxylation was first noticed in 1952 when it helped to overcome a major problem in the cortical steroid synthesis. The insertion of an oxygen function at C-11 was a very difficult and expensive process since that position was remote from other functional groups. This insertion was efficiently performed by *Rhizopus arrhizus* via microbial hydroxylation. Microbial biotransformations became popular with this microbial hydroxylation. Since then, steroids and a number of other different substrate groups have been widely used for microbial biotransformations. Microbial steroid biotransformations have found world wide application for the preparation 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 tremendous attempts to increase the efficiency of microbial biotransformations and to find new useful microorganisms and reactions. Since first microbial hydroxylation was reported in 1952, fungi have routinely been one of the most studied whole cell systems for biotransformation reactions. Different fungi have been used for the biotransformations of many steroids. These biotransformations afforded some interesting results, such as microbial hydroxylations, Baeyer-Villiger oxidations and 5 α -reduction.

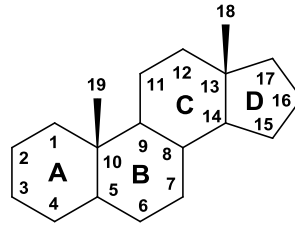
In this work, testosterone (**6**) has been incubated with *Aspergillus glaucus* MRC 200914 in order to see how this fungus metabolise the substrate. The liquid medium was prepared for the fungus in 1 L of distilled water. The medium was evenly distributed into 10 erlenmeyer flasks of 250 mL were and 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. Ethyl acetate extracts were dried over sodium sulfate anhydrous. The solvent evaporated *in vacuo* to give a brown gum that was then chromatographed on silica gel 60. 11 α -hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione (**13**) and 6 β -hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione (**14**) were obtained from the chromatography work. The structure determination of the steroids was carried out 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 peptidler gibi gruplara ayrılırlar [1].

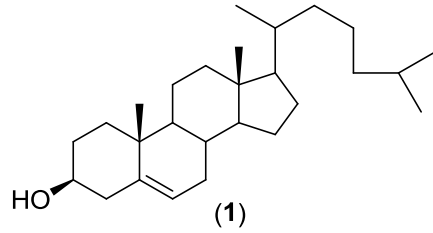
Steroidler önemli bir doğal ürün grubudur. Steroid kelimesi kökenini katı anlamında olan Latince steros kelimesinden almıştır. Steroidlerde ana yapıyı steran (siklopentanoperhidrofenantren) halkası oluşturur. Bir steran halkası (Şekil 2.1.) birbirleri ile kaynaşmış üç adet sikloheksan halkası ile bir 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. Steran halkası [4].

Steroller steroidlerin önemli üyelerindendir 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].

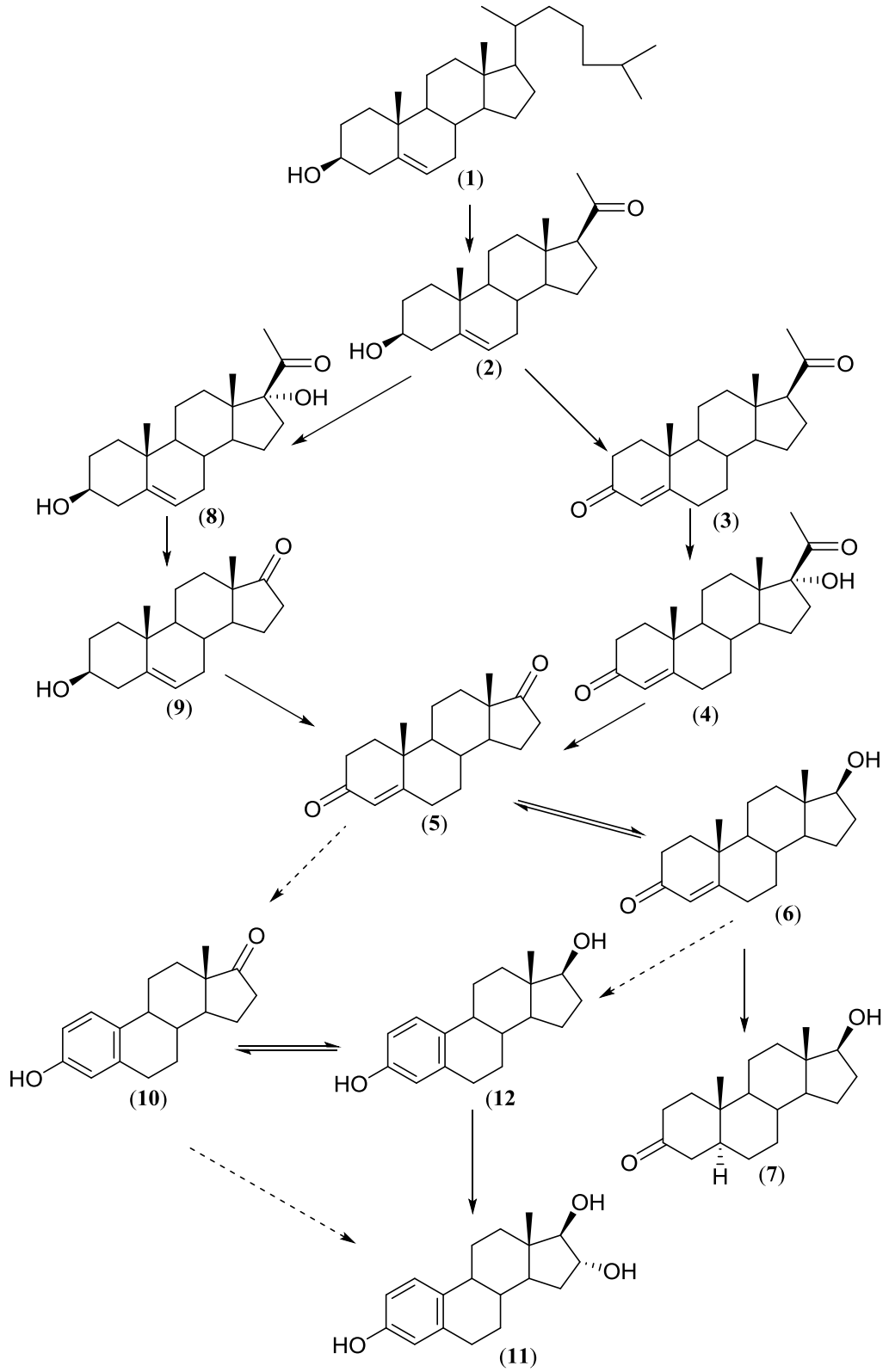
Önemli bir sterol ve steroidlerin biyosferde en çok bulunan örneklerinden birisi kolesterol (1) (Şekil 2.2.) bileşiğidir. Bu bileşik insan ve hayvanlarda membran akışkanlığını düzenlenmesine ilaveten safra asitleri, steroid hormonlar ve D₃ vitamini gibi bileşikler için çıkış maddesidir [4, 5].



Şekil 1.2. Kolesterol (1) bileşinin yapısı.

Progesteragenler (progestinler), östrojenler, androjenler, glukokortikoidler ve mineralokortikoidler olarak gruplara ayrılan steroid hormonlar önemli kolesterol (1) türevleridir. Östrojenler, progesteragenler, 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 biyosentezi [4, 5].

Androjen biyosentezi için ana yol Δ^4 yoludur. Bu yolda kolesterol (1) bileşiğindeki yan zincirinin kısılması ile oluşan pregnenolon (2), progesterona (3) üzerinden 17α -hidroksiprogesterona (4) çevrilir. 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 indirgenildiğinde 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 TESTOSTERON BİYOTRANSFORMASYONLARI

2.1. Biyotransformasyonlar

Enzimlerin ksenocbiyotikler adı verilen ve kendi substratları olmayan kimyasal maddelerde gerçekleştirdikleri kimyasal değişimlere biyotransformasyonlar denilir [6]. Enzimler mikrozoimler, mikroorganizmalar, mikroorganizma sporları hücre, doku ve organ kültürleri gibi çeşitli biyolojik sistemlerin yapılarında bulunabilir veya çeşitli biyolojik materyallerden saflaştırılmalarını takiben sabitlenmiş yada serbest olarak da kullanılabilir [6]. Bu enzimlerin çoğu biyolojik materyallerden saflaştırılırken diğerleri ise halen sadece satın alınarak temin edilmektedir [6, 7].

Enzimlerin sadece kendi substratlarını doğal çevrelerinde etkiledikleri, pahalı ve oldukça hassas oldukları gibi bazı dogmatik kabuller olmasına rağmen birçok enzim için bu kabuller geçerli değildir [7].

Biyolojik katalizörler olarak da adlandırılan enzimler fonksiyonlarını çok hızlı gerçekleştirmek suretiyle kullanıcılarına birçok faydalar sağlarlar. Bir enzimin yer aldığı reaksiyon bir enzimin yer almadığı bir reaksiyona göre 10^8 - 10^{10} kat daha hızlı gerçekleşebilmektedir [7].

Katalizör fonksiyonu gören bazı ağır metaller ve klasik sentez işlemlerindeki çoğu reaktifin aksine büyük çoğunluğu protein tabiatında olan enzimler doğada parçalanabildikleri için doğaya dost olarak değerlendirilir [7].

Enzimler genelde 20-40 °C arası sıcaklıkta ve ortam pH değerinin 5-8 aralığında olduğu koşullarda fonksiyonlarının gerçekleştirdikleri için alışlagelmiş sentez yöntemlerinin uygulanması ile sonuçlanan rasemizasyon, bozunma, çevrilme ve izomerleşme gibi istenilmeyen reaksiyonları çok daha nadir olarak verirler [7].

Bazı enzimler geniş substrat spektrumları neticesinde doğal rolleri dışında fonksiyon göstererek sentetik veya doğal birçok bileşikte kimyasal değişimler gerçekleştirebilirler [7].

Multienzim sistemleri yapısındaki enzimler yakın veya aynı şartlarda etkili olabildiklerinden metabolik yollardaki seri reaksiyonları aynı ortamlarda katalizleyebilmektedir [7].

Enzimler fazla sayıda ve farklı tipte reaksiyonu katalizleyebildikleri için neredeyse her bir sentetik reaksiyona denk gelen enzimatik bir reaksiyon mevcuttur [7].

Enzimlerin sahip olduğu kompleks üç boyutlu yapılar bu moleküllerin regioseçici ve stereoseçici olmalarına sebep olur ve substratlarının farklı kısımlarının fonksiyonel grupları dahi ayırabilir. Enzimler kemo-seçici özellikleri sebebi ile yalnızca belirli bir fonksiyonel grubu etkilerken diğerlerini etkilemezler ve bu da yan ürünlerin oluşumu engellemektedir [7].

Enzimler yalnızca L-amino asitlerden oluştukları için aynı zamanda enantiyoseçici de olan kiral biyomoleküllerdir. Bunun sonucu olarak enzimler prokiral bir substratı etkileyerek yalnızca bir enantiyomere dönüştürür. Enzimlerin bir rasemik karışımdaki enantiyomerlerden yalnızca birini etkilemesi ise rasemik karışımların ayrılmasını da gerçekleştirir [7]. Enzimler bahsedilen bu avantajları sayesinde diğer yöntemler ile gerçekleştirilmesi zor yada imkânsız olan reaksiyonları kolayca katalizleyebilmektedir [7].

Yinede enzimlerin kullanılması bir takım istenilmeyen durumlara da sebep olabilir. Örneğin, Bir enzimin tek bir enantiyomerik forma vardır ve diğer enantiyomerik formunun biosentezi için yaygın bir yöntem olmadığından bir enzim yalnızca belirli bir enantiyomer ile reaksiyon verebilir [7].

Bazı enzimler aktivitelerini etkileyen sıcaklık ve pH gibi parametrelerdeki değişimlere son derece duyarlıdır. Örneğin, enzimler protein tabiatındaki biyomoleküller olduğundan enzimatik bir reaksiyonu hızlandırabilmek için Ph ve sıcaklık gibi parametreler çok az değiştirilebilir [7].

Enzimlerin en ideal çalışma ortamı su olsa da birçok organik bileşik suda neredeyse hiç çözünmez. Enzimatik bir reaksiyonun organik bir çözücüde gerçekleştirilmesi ise genelde protein tabiatında olan enzimlerin denatürasyonu ile sonuçlandığından aktivite kaybına sebep olmaktadır [7].

Enzimler reaksiyon ortamında aşırı miktarlarda substrat veya ürün olduğunda aktive kaybı veya aktivitenin tamamen ortadan kalkması ile kendini gösteren inhibisyona maruz kalırlar [7].

Birçok enzim reaksiyonlarını gerçekleştirebilmek için kofaktör adı verilen bazı spesifik moleküllere ihtiyaç duyarlar. Bu tip enzimlerin fonksiyonel olabilmesi için kofaktörlerinin reaksiyon ortamda olmaları ve sürekli yenilenmesi elzemdir. Buna rağmen kofaktörler kararsız ve pahalı bileşikler olması ve bunların yerine bazı eşdeğerlerinin kullanılamaması önemli dezavantajlardır [7].

Enzimler alerjik bazı reaksiyonlara sebep olabilmektedir. Enzimleri diğer kimyasal maddeler gibi dikkatli bir şekilde kullanmak suretiyle muhtemel alerjik reaksiyonlardan kaçınılabılır [7].

2.2. Mikrobiyal Biyotransformasyonlar

Biyotransformasyon çalışmaları için genelde saflaştırılmış bütün hücre sistemleri veya enzimler kullanılır. Bütün hücre sistemleri olarak ise genellikle mikroorganizmalar ile bitki veya hayvan kökenli olan hücre, doku ve organ kültürleri kullanılır [7].

Çoğu enzimin hücre dışında kararsız olması, kofaktörlerinin sağlanması ve sürekli yenilenmesi, saflaştırma işlemlerini oldukça maliyetli ve zor olması ile saflaştırılırken zarar görmeleri gibi sorunlar nedeni ile biyotransformasyonlar için genelde bütün hücre sistemleri kullanılmaktadır [7].

Bütün hücre sistemleri içeren biyotransformasyon çalışmalarında çoğu zaman mikrobiyal hücreler kullanılmaktadır. Bu hücrelerin büyüme ve gelişme hızı diğer canlılardaki hücrelere göre daha fazla olduğundan mikroorganizmaların kullanıldığı biyotransformasyon çalışmaları daha kısa zaman almaktadır. Daha küçük boyutlu olan ve dayanıklı hücre duvarları içeren mikrobiyal hücreler diğer canlıların hücreleriyle karşılaştırıldıklarında mekanik açıdan çok daha fazla kararlıdır. Mikrobiyal hücrelerin mevcut oldukları ortamlarına çok daha kolay uyum sağlamaları kullanıcılarına yarar sağlar ve mikrobiyal hücreler diğer canlıların hücrelerine göre çok daha fazla sayıda ve farklı tipte substratlar üzerinde kimyasal değişimler gerçekleştirebilirler [7].

Mikrobiyal biyotransformasyonlar bilinen sentez yöntemlerine göre bir takım üstünlükler sergilediğinden son yıllarda biyoteknolojinin vazgeçilmez öğeleri olmuşlardır [7-9]. Mikrobiyal hücreler genetikleri değiştirilebilen canlılar oldukları için biyoteknoloji çalışmalarındaki kullanımları giderek artmaktadır [8].

Mikrobiyal hücreler sahip oldukları spesifik olmayan enzimleri ile çok fazla sayıda ve farklı tiplerdeki doğal veya sentetik substratlarında birçok farklı kimyasal değişiklikler yapabilmektedir [6].

Bilinen diğer sentez yöntemlerindeki birçok reaktif çevremize geri dönüşü olmayan önemli zararlar verirken çoğu 1 atm basınç ve oda sıcaklığı gibi oldukça ılıman şartlarda uygulanabilen mikrobiyal biyotransformasyonlar doğa dostu olarak kabul edilmektedir [6, 7].

Mikrobiyal biyotransformasyonlar bilinen diğer sentez yöntemlerine göre daha az maliyetler ve daha az sürelerde uygulanabilirler [6-9]. Hedeflenen bileşiklere bilinen diğer sentez yöntemlerinin yerine mikrobiyal biyotransformasyonlar kullanılarak çoğu zaman daha az sürelerde, daha iyi verimlerle ve çok daha az maliyetli besiyeri bileşenleri harcanarak ulaşılabilmektedir [6, 8].

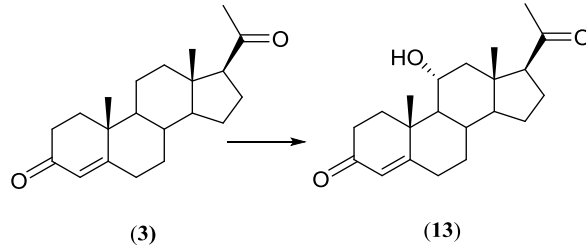
Enantiyoseçici olan enzimlerin yer aldığı mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonları da enantiyoseçicidir ve tek enantiyomerler ile sonuçlanırlar [6, 8]. Bilinen diğer sentez yöntemleri ile sentezleri hedeflenen moleküller genelde ayırılmaları çok zor olan rasemik karışımlar olarak elde edilirler [6]. İlaç sanayindeki etken madde sentezlerinde yalnızca hedeflenen enantiyomerin sentezlenmesi oldukça önemlidir ve

son yıllarda tek enantiyomerlerin tek basamakta sentezleri için mikroorganizmaların kullanılmaları daha fazla tercih edilmektedir [7].

Mikroorganizmalardaki enzimler regioseçici oldukları için mikrobiyal biyotransformasyonlarda substratlar üzerindeki diğer fonksiyonel grupların korunmasına gerek kalmamaktadır [6, 7].

Mikrobiyal biyotransformasyonların gerçekleşeceği kısmın yakınlarında genelde spesifik bir fonksiyonel grubun bulunması gerekmemektedir [6, 7]. Örneğin, mikrobiyal hidroksilasyonlar fonksiyonel gruplardan uzak kısımlarda gerçekleşir [6].

Mikrobiyal biyotransformasyonlar ile oldukça değişik tipde ve sayıda reaksiyonlar gerçekleştirilebilmektedir [6, 7]. Buna ilaveten bilinen diğer sentez yöntemleri ile mikrobiyal hidroksilasyonlar gibi reaksiyonlar tek basamakta gerçekleştirilememektedir [6]. Mikrobiyal hidroksilasyonlar oldukça değerli ve yaygın mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonları arasında yer almaktadır [6, 7]. Mikrobiyal hidroksilasyonların ne kadar önemli olduğu 1952 yılında kortikal steroidlerin sentezi esnasında anlaşılmıştır [6]. Bu tip steroidlerin sentezinde, bir oksijen fonksiyonunun yakın civarında fonksiyonel grup bulunmayan C-11 pozisyonuna yerleştirilmesi o günlerdeki sentez yöntemleri ile oldukça maliyetli ve uzun sürede gerçekleştirilebilen bir işlemdir. Bahsedilen bu işlemin tek basamakta *Rhizopus arrhizus* küfü ile uygulanabilmesi mikrobiyal biyotransformasyonları çok kısa sürede oldukça popüler yapmıştır [6]. Söz konusu reaksiyon neticesinde progesteron (**3**) 11 α -hidroksiprogesteron (**13**) bileşiğine çevrilmiştir (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. İlk mikrobiyal hidroksilasyon [6].

Mikrobiyal biyotransformasyonları uygulamak için serbest olarak yada belirli bir yüzeye sabitlenerek olarak kullanılabilen çeşitli mikroorganizma türlerinden faydalanılmaktadır. Küfler, bakteriler ve mayalar genelde bu hedef için kullanılan mikroorganizmalardır [8].

2.3. Küfler ile Steroid Biyotransformasyonları

Küfler ile steroid biyotransformasyonları küf enzimlerinin yüksek regio ve stereoseçici olmaları sebebi ile birçok ilacın elde edilmesinde yoğun olarak uygulanmaktadır [9-13]. Mevcut mikrobiyal biyotransformasyonları daha da etkinleştirmek, kullanılabilecek yeni reaksiyonlar ve mikroorganizmalar ve reaksiyonlar belirlemek doğrultusunda çalışmalar devam ettirilmektedir [9].

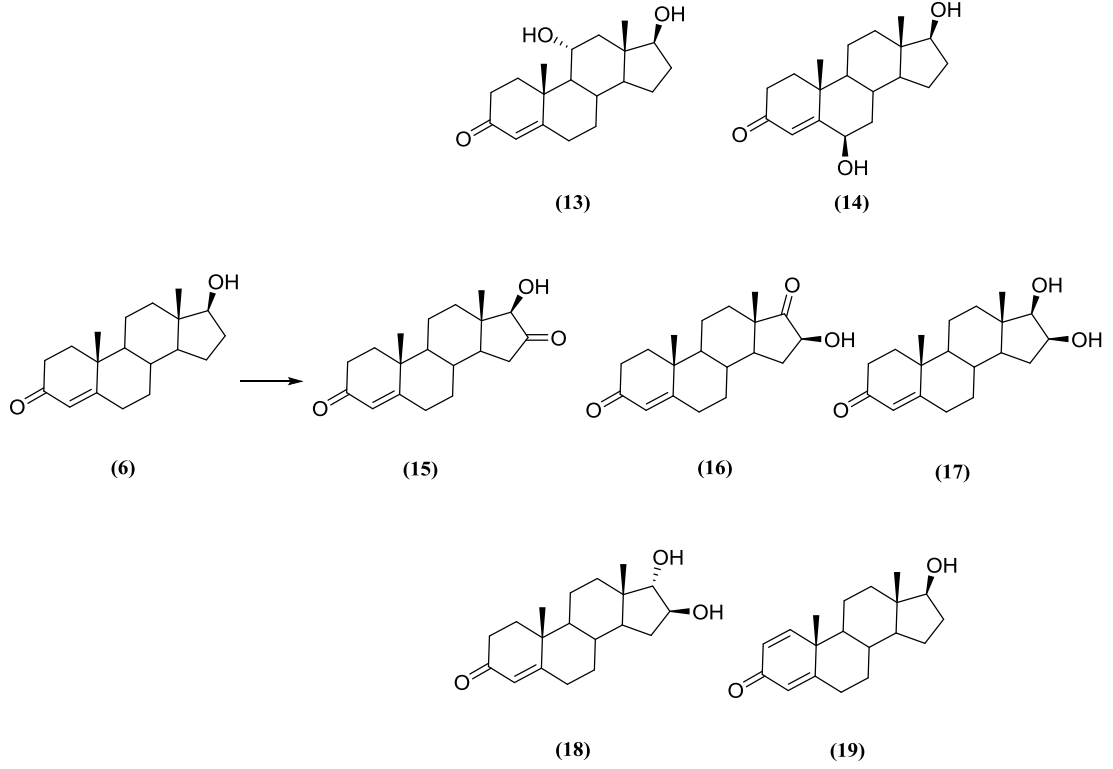
Bugüne kadar farklı ve çok sayıda küf ile mikrobiyal steroid biyotransformasyonları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar mikrobiyal hidroksilasyonlar, Baeyer-Villiger oksidasyonları, A halkasının aromatikleşmesi, yan zincirlerin uzaklaştırılması, hidroksil gruplarının oksidasyonu, keton gruplarının redüksiyonu, mikrobiyal hidrojenasyonlar ve dehidrojenasyonlar gibi ilginç reaksiyonlar ile neticelenmiştir [6, 9-13].

2.4. *Aspergillus* Türleri ile Testosteron (6) Biyotransformasyonları

Aspergillus cinsine ait küfler özellikle mikotoksinleri, patojenlikleri, temel ökaryotik genetik ve biyoteknolojide yoğun bir şekilde çalışılmaları nedeniyle dikkat çekmektedir [14]. Genelde su, toprak ve çüreyen materyellerde gözlenen *Aspergillus* türlerinin bazıları hayvanlar ve insanlar için patojenlik gösterir [15].

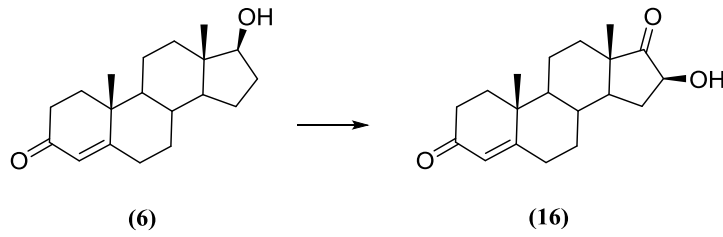
Farklı steroidlerin *Aspergillus* türleri ile testosteron (6) biyotransformasyonları genelde mikrobiyal hidroksilasyonlar, Baeyer-Villiger oksidasyonları, mikrobiyal hidrojenasyonları ve dehidrojenasyonlar ile neticelenmiştir [9-13, 16-27]. *Örneğin A. niger* ATCC 9142 izolatı ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.2.) 11 α ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (13), 6 β ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (14), 17 β -hidroksiandrost-4-en-3,16-dion (15), 16 β -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (16),

16 β ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (**17**), 16 β ,17 α -dihidroksiandrost-4-en-3-on (**18**) ve 17 β -hidroksiandrosta-1,4-dien-3-on (**19**) metabolitlerini vermiştir [16].



Şekil 2.2. *A. niger* ATCC 9142 ile substratın inkübasyonu [16].

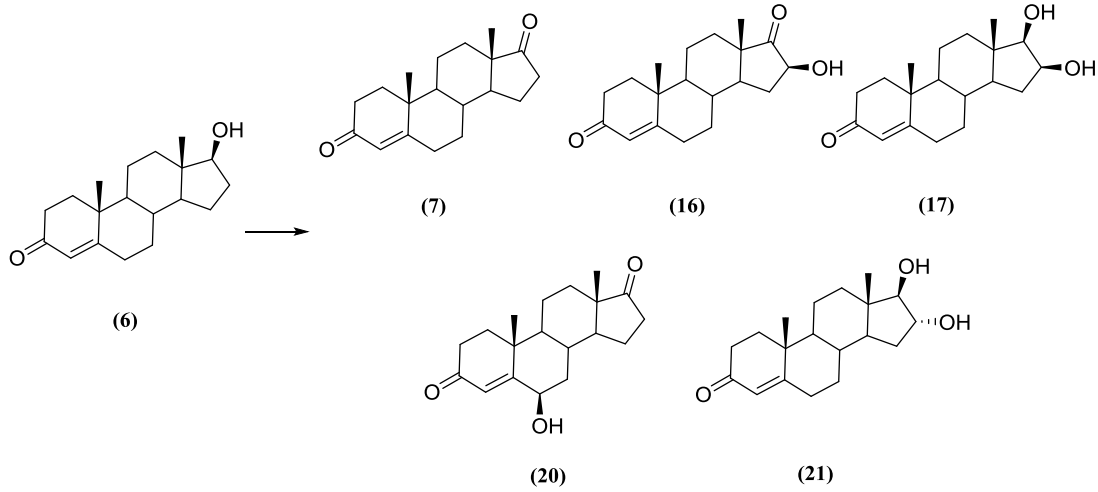
A. niger NRRL 599 izolatu ile substratın biyotransformasyonu (Şekil 2.3.) bir önceki çalışmada da izole edilen (**16**) numaralı metabolit ile sonuçlanmıştır [17].



Şekil 2.3. *A. niger* NRRL 599 ile substratın inkübasyonu [17].

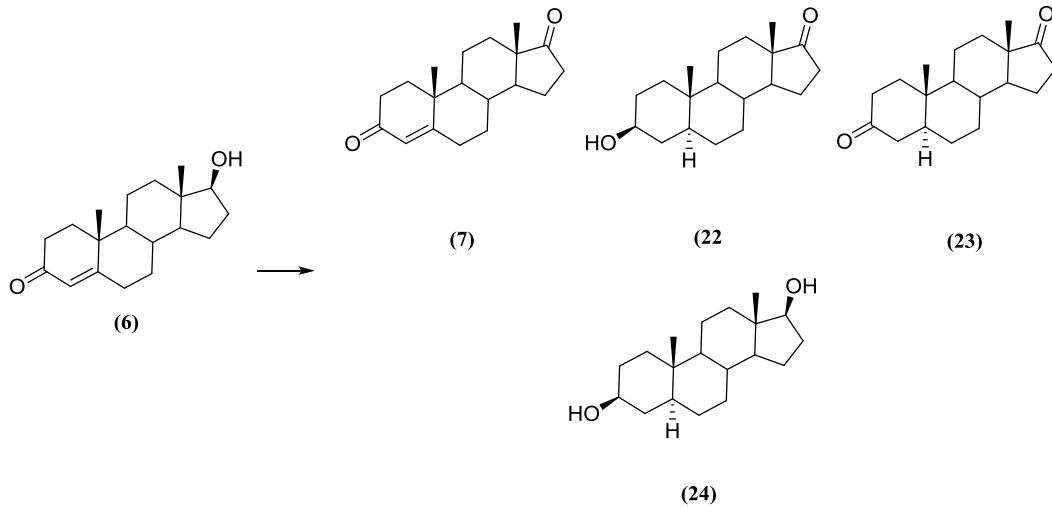
A. niger KCH910 izolatu ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.4.) androst-4-en-3,17-dion (**7**), 6 β -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**20**) ve 16 α -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion

(21) ile önceki çalışmalarda da elde edilen (16 ve 17) numaralı metabolitleri vermiştir [18].



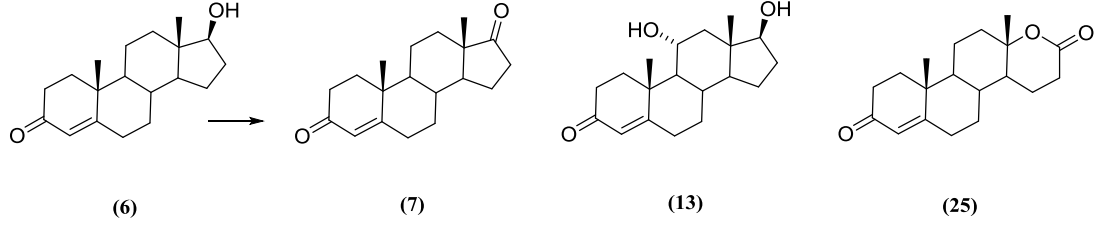
Şekil 2.4. *A. niger* KCH910 ile substratın imkübasyonu [18].

A. oryzae ATCC 11601 izolatu ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.5.) epiandrosteron (22), 5 α -androstan-3,17-dion (23) ve 3 β ,17 β -dihidroksi-5 α -androstan (24) ile bir önceki çalışmadan de elde edilen (7) numaralı metabolitler ile sonuçlanmıştır [19].



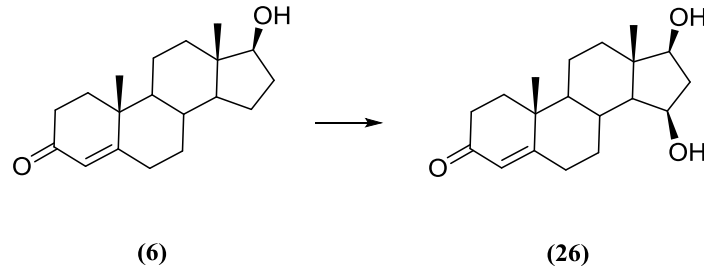
Şekil 2.5. *A. oryzae* ATCC 11601 ile substratın inkübasyonu [19].

Bir *A. fischeri* izolatu ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.6.) 17a-okza-D-homoandrost-4-en-3,17-dion (25) ile önceki çalışmalardan da izole edilen (7 ve 13) numaralı metabolitler ile sonuçlanmıştır [20].



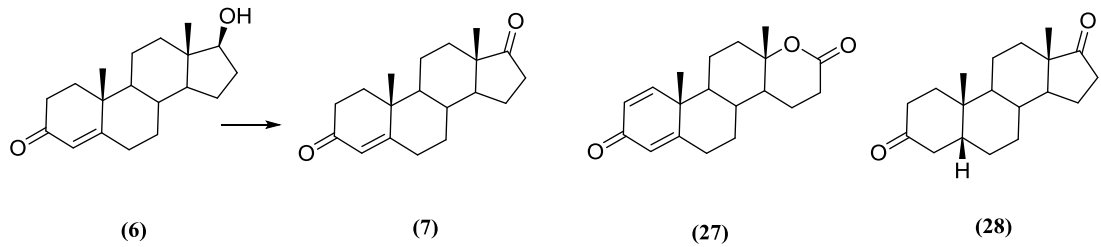
Şekil 2.6. *A. fischeri* ile substratın inkübasyonu [20].

Bir *A. fumigatus* izolatu ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.7.) yalnızca 15 β ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (26) metabolitini vermiştir [21].



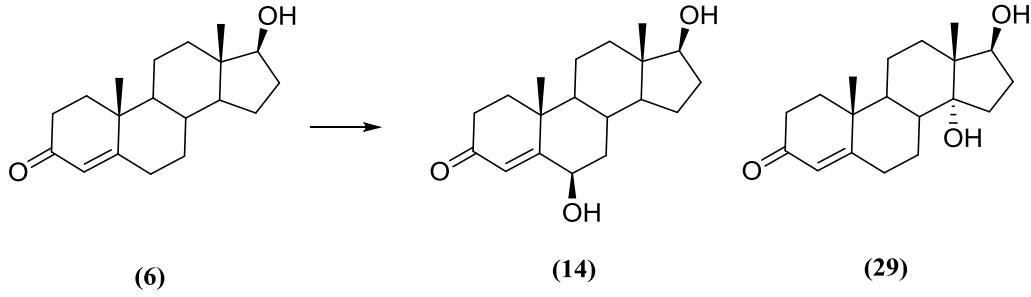
Şekil 2.7. Bir *A. fumigatus* ile substratın inkübasyonu [21].

Bir *A. aurogulgens* izolatu ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.8.) 17a-okza-D-homoandrosta-1,4-dien-3,17-dion (27) ve 5 β -androstan-3,17-dion (28) ile önceki çalışmalardan da izole edilen (7) numaralı metabolitler ile sonuçlanmıştır [22].



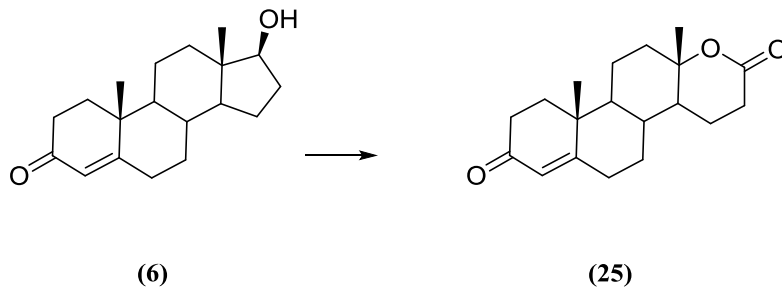
Şekil 2.8. Bir *A. aurogulgens* izolatu ile substratın inkübasyonu [22].

A. wentii MRC 200316 izolatu ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.9.) 14 α ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (**29**) ile daha önceki bir çalışmadan da elde edilen (**14**) numaralı emetabolitler ile sonuçlanmıştır [23].



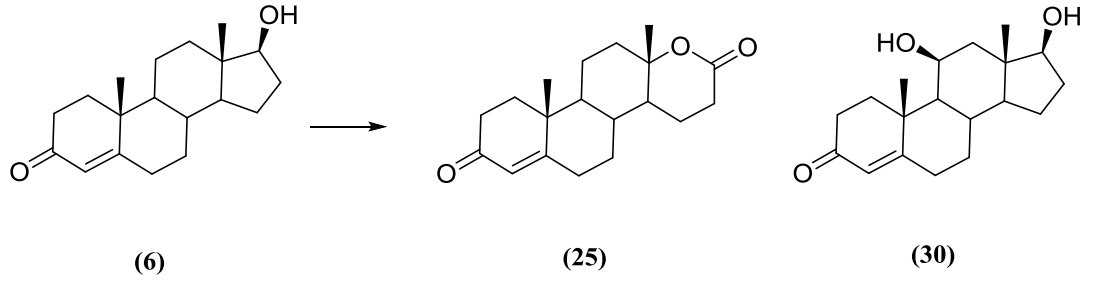
Şekil 2.9. *A. wentii* MRC 200316 ile substratın inkübasyonu [23].

A. terreus MRC 200365 izolatu ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.10.) önceki bir çalışmadan da izole edilen (**25**) numaralı metaboliti vermiştir [24].



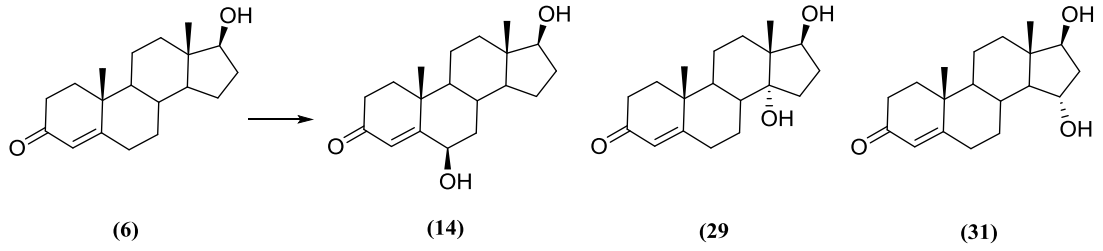
Şekil 2.10. *A. terreus* MRC 200365 ile substratın inkübasyonu [24].

A. tamarisii QM 1223 [25] ve *A. tamarisii* MRC 72400 [26] izolatları ile substratın inkübasyonları (Şekil 2.11.) 11 β ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (**30**) ile önceki çalışmalardan da elde edilen (**25**) numaralı metaboliti vermiştir.



Şekil 2.11. Bazı *A. tamarii* izolatları ile substratın inkübasyonları [25,26].

A. sydowii MRC 200653 izolatu ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.12.) 15 α ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (31) ile önceki çalışmalardan da izole edilen (14 ve 29) numaralı metabolitleri vermiştir [27].



Şekil 2.12. *A. sydowii* MRC 200653 ile substratın inkübasyonu [27].

2.5. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı testosteron (6) bileşiğinin daha önce steroid biyotransformasyonları için kullanılmayan *Aspergillus glaucus* MRC 200914 izolatu ile biyotransformasyonunun incelenmesidir. Son derece zorlu şartlar altındaki fizyolojik dayanıklılığı sayesinde kozmopolit bir küf olan *A. glaucus* küfü insanlar için hafif derecede patojendir [28].

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. Yatık agar besiyerlerine küf eklenmesi, sterilize edilmiş erlenlere küf ve substrat eklenmesi için Nükleon marka Sınıf II Tip steril kabin kullanılırken biyotransformasyon deneyindeki inkübasyonlar için Gerhardt THO 500 Laboshake marka çalkalamalı inkübatör 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 izolatı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu, Marmara Araştırma Merkezi, Gıda Teknoloji ve Araştırma Enstitüsü, Kültür Koleksiyonundan temin edildi.

Testosteron (6) Sigma-Aldrich firmasından satın alındı. Yatık agar besiyerleri için 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 hazırlandı.

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 işlem 2 kez tekrarlanması neticesinde 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 [29].

3.5. Biyotransformasyon Deneyi

Hazırlanan 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. İnkübasyonu takiben 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 izlendi. Kontrol erleni hazırlamak için küf nakledilmemiş steril besiyeri içeren bir erlene yalnızca substrat

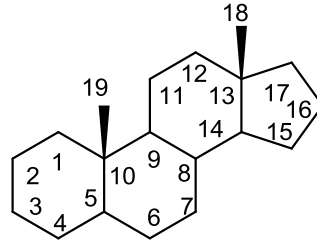
ilave edildi. Biyotransformasyon deneyindeki gerçekleştirilen işlemlerin hepsi kontrol erleni içinde gerçekleştirildi. Tüm işlemlerin sonunda kontrol erleninden İTK alındığında herhangi bir metabolit gözlenmediğinden biyotransformasyon deneyinden elde edilen sonuçların geçerli olduğu anlaşıldı.

3.6. Metabolitlerin Ayrılması ve Yapı Tayinleri

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

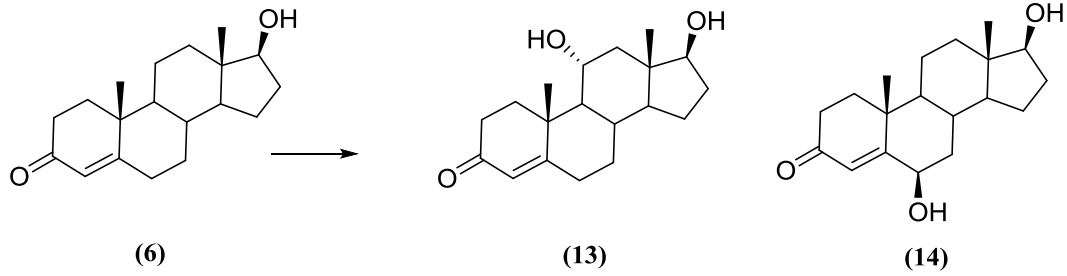
4. DENEYSEL BULGULAR

Bu çalışmada karbon iskeleti Şekil 4.1.'de verilen testosteronun (6) *A. glaucus* MRC 200914 izolatu ile 5 gün süren inkübasyonu gerçekleştirildi.



Şekil 4.1. Testosteronun (6) karbon iskeleti

A. glaucus MRC 200914 ile substratın inkübasyonundan elde edilen yağimsı maddenin (1959 mg) kolon kromatografisi çalışması başlangıç maddesi (145 mg) ile 11 α ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (13) ve 6 β ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (14) metabolitlerini verdi (Şekil 4.2.).



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

11 α ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (13) (560 mg, %53)

Erime noktası: 225-226 °C, lit., 221°C [30].

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3400, 1660 ve 1610.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,81 (3H, s, 18-H), 1,30 (3H, s, 19-H), 3,80 (1H, t, $J = 8,5$ Hz, 17 α -H), 4,10 (1H, m, 11 β -H), 5,70 (1H, s, 4-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	(6)	(13)	(14)
1	35.18	37.25	36.37
2	33.46	34.06	34.19
3	199.57	200.78	200.41
4	123.24	124.19	126.32
5	171.66	171.93	168.32
6	32.42	33.54	72.96
7	31.13	31.03	37.09
8	35.18	35.17	29.75
9	53.50	58.94	53.64
10	38.25	39.93	38.01
11	20.21	68.55	20.56
12	36.00	43.40	38.01
13	42.36	48.16	42.88
14	50.02	49.62	50.44
15	22.91	23.13	23.25
16	29.65	30.17	30.42
17	80.75	80.73	81.64
18	10.76	12.21	11.07
19	16.96	18.25	19.51

6 β ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (**14**) (158 mg, %15).

Erime noktası: 217-218 °C, lit., 215-220°C [31].

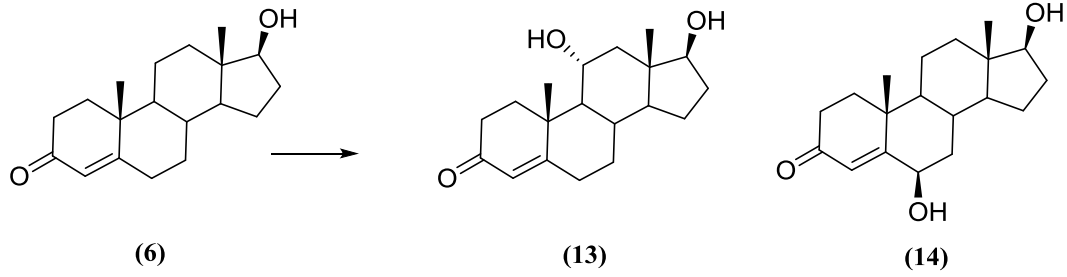
IR ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3495 1660 ve 1630.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,83 (3H, s, 18-H), 1,37 (3H, s, 19-H), 3,64 (1H, t, $J = 8,5$ Hz, 17 α -H), 4,35 (1H, bs, 6 α -H), 5,81 (1H, bs, 4-H).

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

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

A. glaucus MRC 200914 ile testosteronun (6) 5 gün süren inkübasyonu iki metabolit ile sonuçlandı (Şekil 5.1.).



Şekil 5.1. *A. glaucus* MRC 200914 ile testosteron (6) inkübasyonu

İlk metabolitin 11 α ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (13) olduğu belirlendi. Metabolit ^1H NMR spektrumu yapısında 11 α -hidroksil grubu bulunduğunu gösteren karakteristik bir sinyali (1H, m) δ_{H} 4.10 ppm'de verdi [32]. Metabolit ^{13}C NMR spektrumu (Tablo 5.1.) C-9 sinyali için aşağı alana doğru bir kayma ($\Delta\delta_{\text{C}}$ 5,44 ppm) gösterirken C-8 sinyali için ise yukarı alana doğru γ -gauche bir kayma (δ_{C} 0,01 ppm) gösterdi. Bu bulgular yeni bir 11 α -hidroksil grubunun varlığını destekledi [33]. Metabolitin ^1H NMR spektrumunun substratda da bulunan 17 α -H ve 4-H ve sinyallerini sırasıyla δ_{H} 3,80 ppm (1H, t, $J = 8,5$ Hz) ve 5,70 ppm'de (1H, s) içerdiği tespit edildiği için substratın diğer kısımlarında bir değişim olmadığı anlaşıldı.

Diğer metabolitin 6 β ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (14) olduğu belirlendi. Metabolite ait ^1H NMR spektrumu 6 β -hidroksil grubu varlığı için tipik olan yeni bir sinyali (1H, bs) δ_{H} 4,35 ppm'de verdi [32]. Metabolit ^{13}C NMR spektrumunda C-7 sinyali aşağı alana doğru bir kayma ($\Delta\delta_{\text{C}}$ 5,96 ppm) verirken C-8 sinyali ise yukarı alana doğru bir γ -gauche kayması ($\Delta\delta_{\text{C}}$ 5,43 ppm) verdi. Bu sonuçlar metabolitin bir 6 β -hidroksil grubu taşıdığını daha netleştirdi [33]. Metabolite ait ^1H NMR spektrumu substratta da mevcut olan 17 α -H ve 4-H sinyallerini sırasıyla δ_{H} 3,64 ppm (1H, t, $J = 8,5$ Hz) ve 5,81 ppm'de (1H, bs) muhafaza ettiği için substratın diğer kısımlarında değişim olmadığı değerlendirildi.

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

C atomu	(6)	(13)	(14)
1	35.18	37.25	36.37
2	33.46	34.06	34.19
3	199.57	200.78	200.41
4	123.24	124.19	126.32
5	171.66	171.93	168.32
6	32.42	33.54	72.96
7	31.13	31.03	37.09
8	35.18	35.17	29.75
9	53.50	58.94	53.64
10	38.25	39.93	38.01
11	20.21	68.55	20.56
12	36.00	43.40	38.01
13	42.36	48.16	42.88
14	50.02	49.62	50.44
15	22.91	23.13	23.25
16	29.65	30.17	30.42
17	80.75	80.73	81.64
18	10.76	12.21	11.07
19	16.96	18.25	19.51

Tablo 5.2.'den de anlaşılacağı gibi *A. glaucus* MRC 200914 izolatının substratı C-11 α pozisyonunda yüksek bir verimle hidroksillerken C-6 β pozisyonunda ise düşük verimli bir hidroksillediği gözlemlendi.

Tablo 5.2. Metabolit verimleri.

Substrat	Metabolit	% Verim
Testosteron (6)	11 α ,17 β -Dihydroxyandrost-4-en-3-on (13)	53
	6 β ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (14)	15

Literatürde mevcut *Aspergillus* türleri ile steroid biyotransformasyon çalışmaları değerlendirildiğinde substratın C-6 β pozisyonundaki hidroksillenmesinin yaygın olduğu gözlenmesine rağmen substratın C-11 α pozisyonundaki hidroksillenmenin daha nadir olduğu gözlemlendi [9-13,16-27]. *A. glaucus* MRC 200914 ise diğer *Aspergillus* türlerinin aksine testosteron (**9**) bileşimini C-6 β pozisyonunda düşük bir verimle hidroksillerken C-11 α pozisyonunda ise daha yüksek bir verimle hidroksilledi. Kısaca bu çalışmada yukarıda da belirtildiği gibi *A. glaucus* MRC 200914 testosteron (**6**) bileşimini C-11 α ve C-6 β 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 Pres. Oxford. 1413-1414.
- [3] Mann, J. 1994. Chemical Aspects of Biosynthesis, First edition, Oxford University Pres. New York. 2-4.
- [4] Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E.Y. 2002. İnsan Biyokimyası. Palme Yayıncılık. 481-495. Ankara.
- [5] Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. İ. 2005. Biyokimya. Dördüncü baskı. Aktif Yayınevi. 93-188. Erzurum.
- [6] Hanson, J.R. 1995. An Introduction to Biotransformations in Organic Chemistry. W.H. Freeman Spektrum, 1-62. New York.
- [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, Biotechnology Advances, 18, 499-514.
- [9] Donova, M.V., Egorova, O.V. 2012. Microbial Steroid Transformation: Current State and Prospects. Applied Microbiology and Biotechnology. 94, 1423–1447.
- [10] Fernandes, P., Cruz, A., Angelov, B., Pinheiro, H. M., Cabral, J. M. S. 2003. Microbial Conversion of Steroids Compounds: Recent Developments. Enzyme and Microbial Technology, 32, 688–705.
- [11] Mahato, S. B., Garai, S. 1997. Advances in Microbial Steroid Biotransformation, Steroids, 62, 332–345.
- [12] Mahato, S. B., & Majumdar, I. 1993. Current trends in microbial steroid biotransformation. Phytochemistry, 34(4), 883–898.
- [13] Mahato, S. B., Banerjee, S., Podder, S. 1989. Steroid Transformations by Microorganisms-III, Phytochemistry, 28, 7-40.

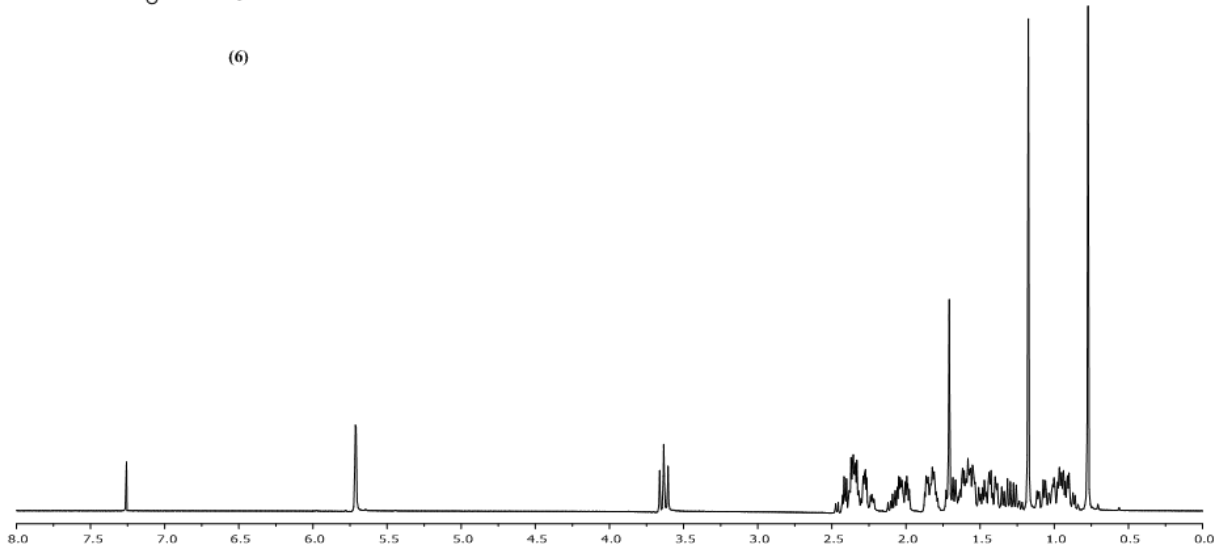
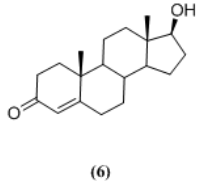
- [14] Samson, R. A., Hong, S-B., Frisvad, J. C. 2006. Old and New Concepts of Species Differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology*, 44, S133-S148.
- [15] Lee, S. K., Kang, H. G., Na, K. J., Han, J.I. 2012. Fungal Dermatitis Caused by *Aspergillus sydowii* in a Thoroughbred Horse. *Journal of Equine Veterinary Science*. 32, 835-839.
- [16] Peart P.C., Reynolds W.F., Reese, P.B. 2013. The facile bioconversion of testosterone by alginate-immobilised filamentous fungi. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 95, 70– 81.
- [17] 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.
- [18] Świzdor, A., Panek, A., & Milecka-Tronina, N. 2017. Hydroxylative activity of *Aspergillus niger* towards androst-4-ene and androst-5-ene steroids. *Steroids*, 126, 101-106.
- [19] Cvelbar, D., Zist, V., Kobal, K., Žigon, D., & Žakelj–Mavrič, M. 2013. Steroid toxicity and detoxification in ascomycetous fungi. *Chemico-biological interactions*, 202 1-3, 243-58.
- [20] Sallam, L.A.R., El Refai, A.M.H., Nada, S. and Abdel Fattah A.F. 1973. Enzymic hydroxylation and side chain degradation of progesterone by *Aspergillus fischeri*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 19, 155-160.
- [21] Mahato, S. B., & Mukherjee, A. 1984. Microbial transformation of testosterone by *Aspergillus fumigatus*. *Journal of steroid biochemistry*, 21(3), 341–342.
[https://doi.org/10.1016/0022-4731\(84\)90289-9](https://doi.org/10.1016/0022-4731(84)90289-9)
- [22] Viola, F., Caputo, O., Balliano, G., Delprino, L., Cattel, L. 1983. Side Chain Degradation and Microbial Reduction of Different Steroids by *Aspergillus aureogulgens*. *J. Steroid Biochem.*, 19, 1451-1458.
- [23] Yildirim, K. 2010. Microbial Hydroxylation of Some Steroids by *Aspergillus wentii* MRC 200316. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 12, 1273-1281.
- [24] Yildirim, K., Uzuner, A., Gülcüoğlu E.Y. 2010. Biotransformation of some steroids by *Aspergillus terreus* MRC 200365. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 75, 665-673.
- [25] Brannon, D. R., Martin, J., Oehlschlager, A. C., Durham, N. N., & Zalkow, L. H. (1965). Transformation of Progesterone and Related Steroides by *Aspergillus tamarii*. *The Journal of organic chemistry*, 30, 760–762.
- [26] 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.

- [27] Yildirim, K., Uzuner, A., Gülcüoğlu E.Y. 2010. Biotransformation of some steroids by *Aspergillus terreus* MRC 200365. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 75, 665-673.
- [28] Hubka, V., Kolarík, M., Kubátová, A., & Peterson, S. W. 2013. Taxonomic revision of *Eurotium* and transfer of species to *Aspergillus*. *Mycologia*, 105(4), 912–937.
- [29] 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.
- [30] Swizdor, A., Kołek, T., Panek, A., & Białońska, A. 2011. Microbial Baeyer-Villiger oxidation of steroidal ketones using *Beauveria bassiana*: Presence of an 11 α -hydroxyl group essential to generation of D-homo lactones. *Biochimica et biophysica acta*, 1811(4), 253–262.
- [31] Hanson, J.R., Nasir, H., & Parvez, A. 1996. The hydroxylation of testosterone and some relatives by *Cephalosporium aphidicola*. *Phytochemistry*, 42, 411-415.
- [32] Kirk, D.N., Toms, H.C., Douglas, C., White, K.A., Smith, K.E., Latif, S., & Hubbard, R.W. 1990. A survey of the high-field ¹H NMR spectra of the steroid hormones, their hydroxylated derivatives, and related compounds. *Journal of The Chemical Society-perkin Transactions 1*, 1567-1594.
- [33] Blunt, J.W., Stothers, J.B. 1977. ¹³C NMR spectra of steroids a survey and commentary†. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 9, 439-464.

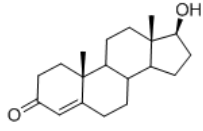
EKLER

EK A. NMR Spektrumları

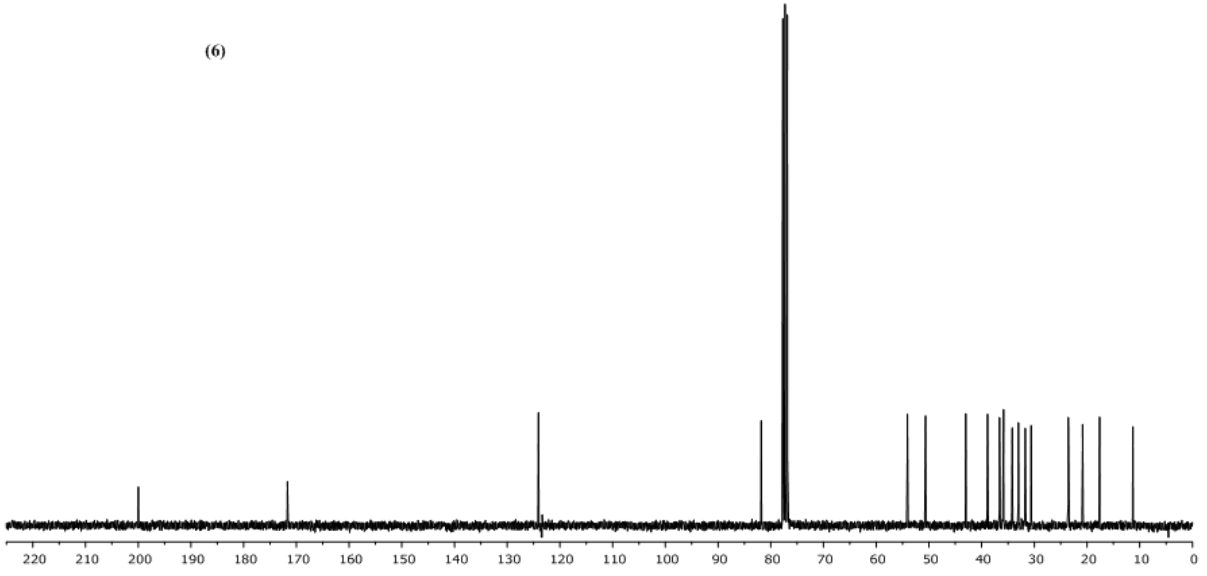
EK A



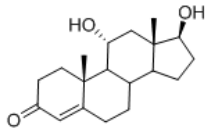
EK A.1. Testosteron (6) için ^1H NMR spektrumu



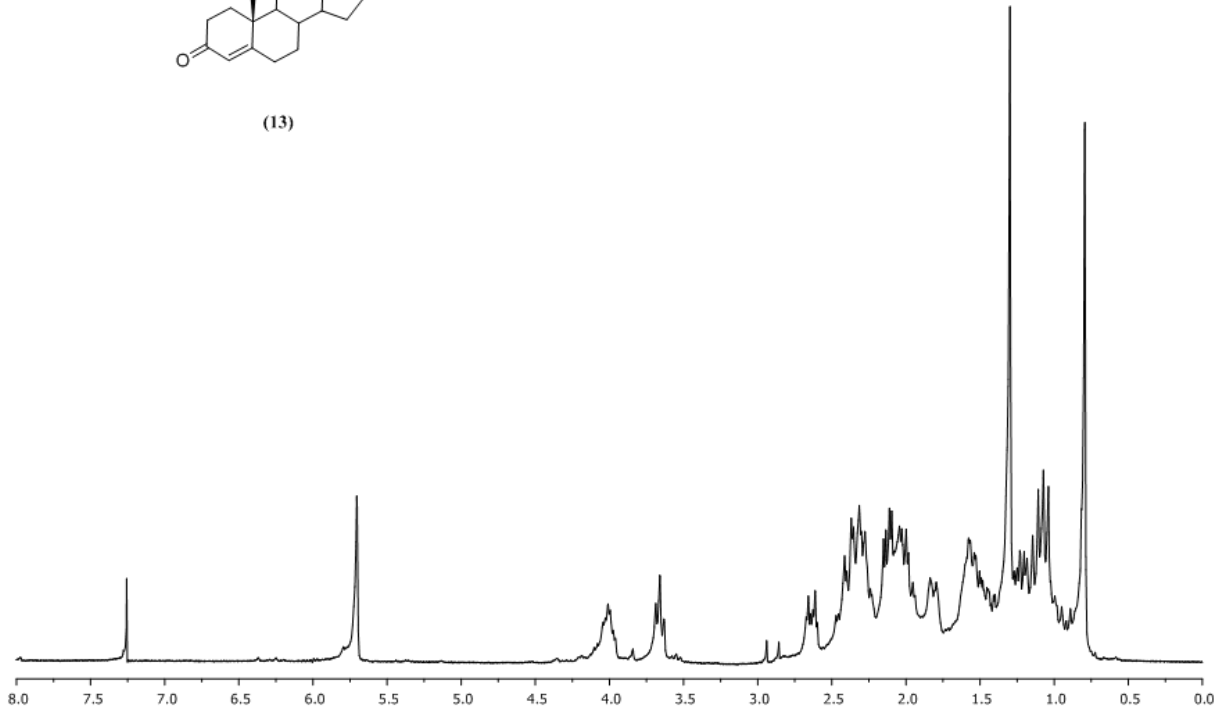
(6)



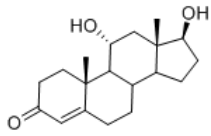
EK A.2. Testosteron (6) için ^{13}C NMR spektrumu



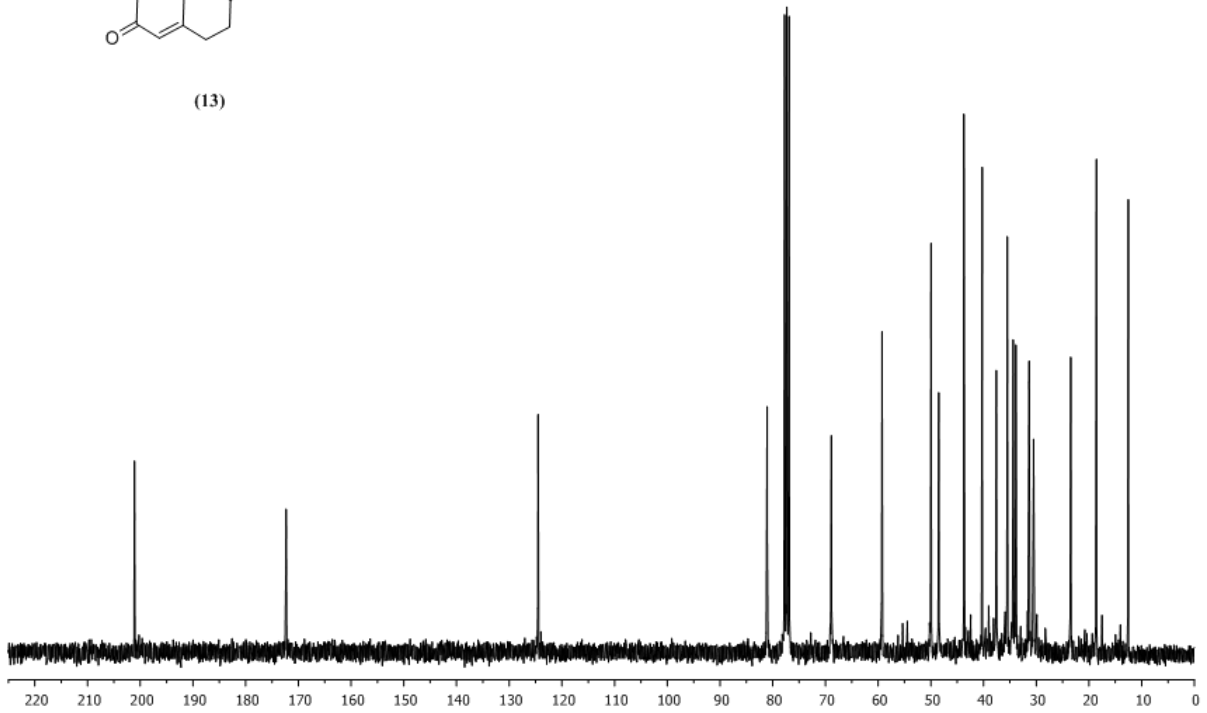
(13)



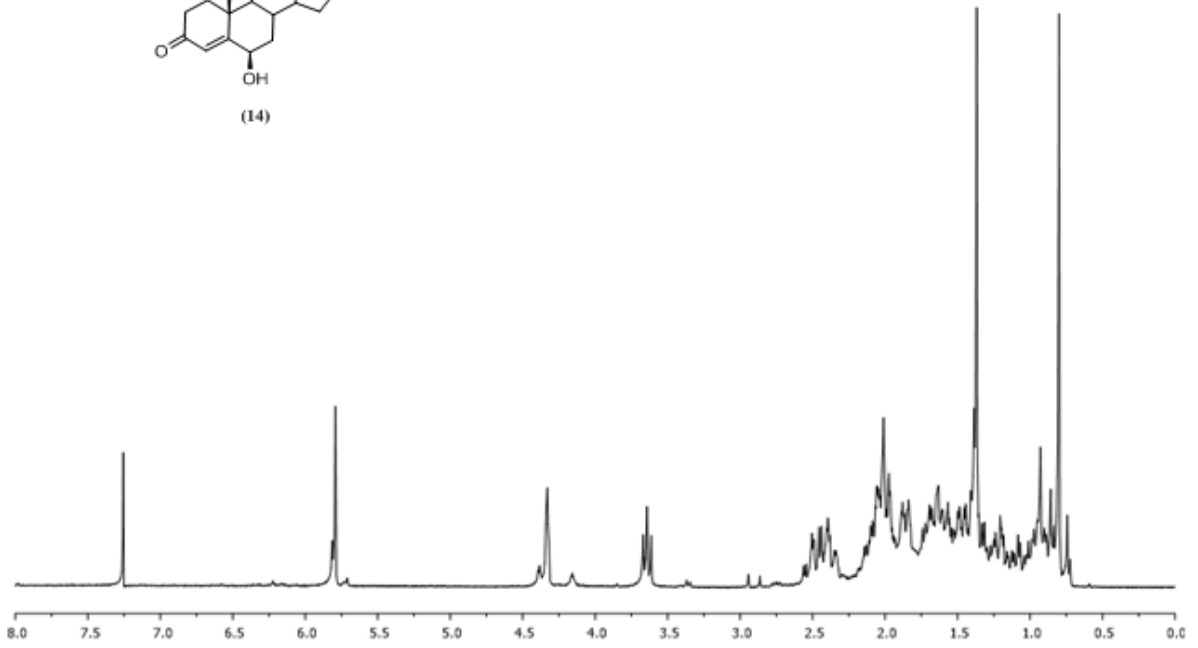
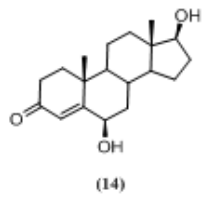
EK A.3. 11 α ,17 β -Dihidroksiandrosta-4-en-3-on (13) için ^1H NMR spektrumu



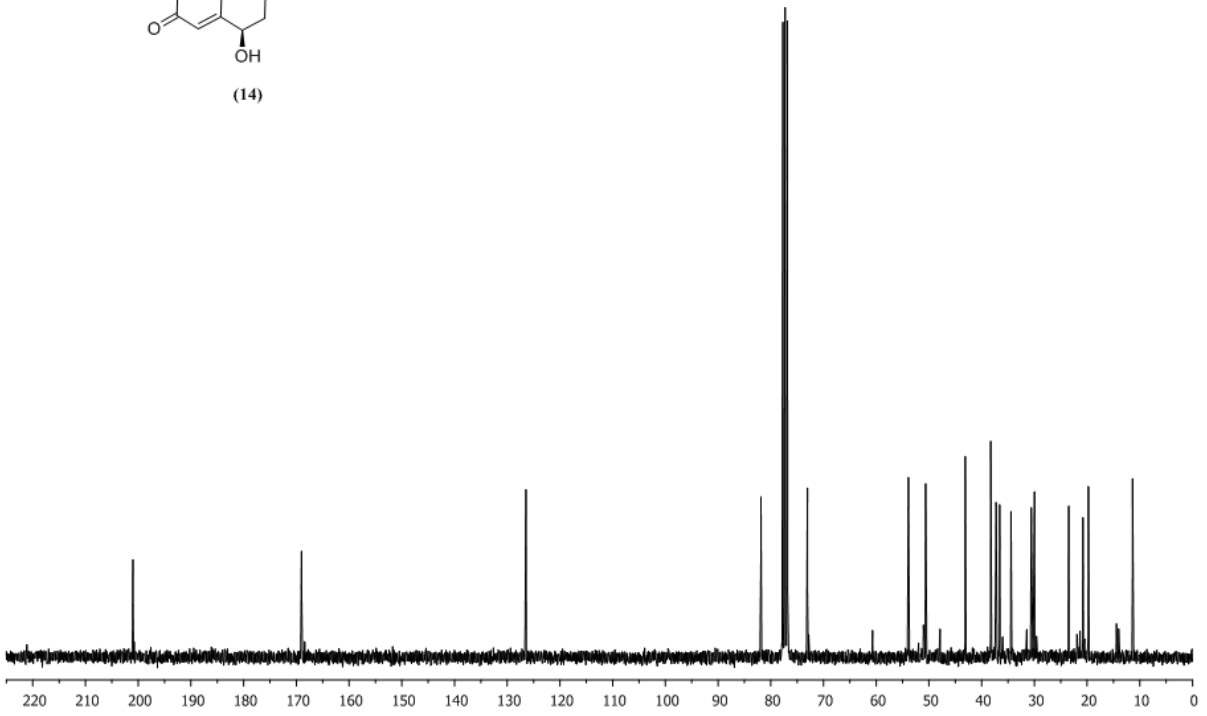
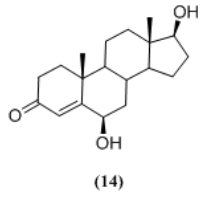
(13)



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



EK A.5. 6β,17β-Dihidroksiandrosta-4-en-3-on (14) için ¹H NMR spektrumu



EK A.6. 6 β ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (14) için ^{13}C NMR spektrumu

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Ali Abdulhussein Ali ALI

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2015 yılı mezun, Tikrit Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü.
- **Yüksek lisans** : Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalı (devam ediyor).

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2013-2014 Özel kimyasal madde ve boya şirketinde kimyager olarak çalıştı .
- 2015-2016 Kerkük'te özel okulda kimya öğretmeni olarak çalıştı .

TEZDEN TÜRETİLEN ESERLER:

- Uluslararası Sözlü Bildiri (Yildirim, K., Kuru, A. Yilmazer 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).