

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ANDROSTENDİON BİLEŞİĞİNİN *ASPERGİLLUS*
WENTII KÜFÜ İLE BİYOTRANSFORMASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ece KESKİN

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA
Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA
Tez Danışmanı : Doç. Dr. Kudret YILDIRIM

Aralık 2017

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ANDROSTENDİON BİLEŞİĞİNİN *ASPERGİLLUS*
WENTII KÜFÜ İLE BİYOTRANSFORMASYONU**

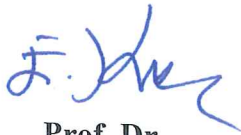
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ece KESKİN

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA

Bu tez 22 / 01 / 2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.



Prof. Dr.
İsmail KIRAN
Jüri Başkanı



Doç. Dr.
Kudret YILDIRIM
Üye



Yrd. Doç. Dr.
Semra YILMAZER KESKİN
Üye

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.



Ece KESKIN

20.12.2017

TEŞEKKÜR

Bu çalıőmayı büyük bir titizlik ve sabırla yöneten, çalıőma boyunca desteğini bir an bile esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden istifade ettiğim kıymetli hocam Doç. Dr. Kudret YILDIRIM'a sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Çalıőmalarım esnasında desteklerini esirgemeyen Sakarya Üniversitesi Kimya Bölümü Oęretim yeleri ve Araştırma Görevlilerine, zellikle Arő. Gör. Dr. Ali KURU'ya teőekkürlerimi sunarım.

Bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan, yaőamım boyunca maddi manevi desteklerini esirgemeyen değerli annem Yasemin ÇETİN ve kardeőim Kaęan KESKİN'e sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	v
TABLOLAR LİSTESİ.....	vi
ÖZET.....	vii
SUMMARY.....	viii
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.	
<i>ASPERGİLLUS</i> TÜRLERİ İLE ANDROSTENDİON	
BİYOTRANSFORMASYONLARI.....	5
2.1. Biyotransformasyonlar.....	5
2.2. Mikrobiyal Biyotransformasyonlar.....	8
2.3. Küfler ile Steroid Biyotransformasyonları.....	11
2.4. <i>Aspergillus</i> Türleri ile Androstendion (5) Biyoyotransformasyonları...	11
2.5. Çalışmanın Amacı.....	15
BÖLÜM 3.	
MATERYAL VE METOT.....	16
3.1. Kullanılan Yöntemler, Cihazlar ve Sarf Malzemeler.....	16
3.2. Yatık agar besiyerlerinin hazırlanması.....	17
3.3. Küf kültürlerinin hazırlanması.....	17
3.4. Küf besiyerinin hazırlanması.....	17

3.5. Biyotransformasyon çalışması.....	18
3.6. Metabolitlerin izole edilmesi	18
3.7. Metabolitlerin saflaştırılması ve yapılarının tayini	18
BÖLÜM 4.	
DENEYSEL BULGULAR.....	20
BÖLÜM 5.	
SONUÇLAR VE TARTIŞMA	22
KAYNAKLAR.....	25
EKLER.....	28
ÖZGEÇMİŞ.....	34

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

$^{\circ}\text{C}$: Santigrat derece
cm	: Santimetre
^{13}C NMR	: Karbon 13 Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
Δ	: Kimyasal kayma farkı
δ_{C}	: ^{13}C NMR spektrumundaki kimyasal kayma
δ_{H}	: ^1H NMR spektrumundaki kimyasal kayma
DMF	: Dimetilformamid
g	: Gram
^1H NMR	: Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
Hz	: Hertz
IR	: Infrared Spektroskopisi
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
J	: Etkileşme sabiti
lit.	: Literatür
mg	: Miligram
MHz	: Megahertz
mL	: Mililitre
MRC	: Marmara Research Center (Marmara Araştırma Merkezi)
PDA	: Patates Dekstroz Agar
pH	: Hidrojen iyonu derişiminin eksi logaritması
ppm	: Milyonda bir kısım
rpm	: Dakika başına dönüş sayısı
s	: Singlet (tekli pik)
t	: Triplet (üçlü pik)

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Genel steroid yapısı.....	2
Şekil 1.2. Kolesterol.....	2
Şekil 1.3. Bazı steroid hormonların biyosentezi	4
Şekil 2.1. <i>R. arrhizus</i> ile progesteron (3) biyotransformasyonu.....	10
Şekil 2.2. Substratın <i>A. tamarii</i> MRC 72400 ile biyotransformasyonu.....	12
Şekil 2.3. Substratın bir <i>A. tamarii</i> izolatu ile biyotransformasyonu.....	12
Şekil 2.4. Substratın <i>A. candidus</i> MRC 200634 ile biyotransformasyonu.....	13
Şekil 2.5. Substratın <i>A. terreus</i> PTCC 5283 ile biyotransformasyonu.....	13
Şekil 4.6. Substratın <i>A. niger</i> ATCC 9142 ile biyotransformasyonu.....	14
Şekil 2.7. Substratın <i>A. niger</i> NRRL 599 ile biyotransformasyonu.....	14
Şekil 2.8. Substratın bir <i>A. fumigatus</i> izolatu ile biyotransformasyonu.....	15
Şekil 4.1. Substratın karbon iskeleti.....	20
Şekil 4.2. Substratın <i>A. wentii</i> MRC 200316 ile biyotransformasyonu.....	20
Şekil 5.1. Substratın <i>A. wentii</i> MRC 200316 ile biyotransformasyonu.....	22

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 3.1.	<i>A. wentii</i> küfüne ait besiyeri çözeltisinin bileşenleri.....	18
Tablo 5.1.	Bileşiklerin ¹³ C NMR spektrumu sinyalleri.....	23

ÖZET

Anahtar Kelimeler: Biyotransformasyon, Androstendion, *Aspergillus wentii*.

Bu çalışmada, *Aspergillus wentii* MRC 200316 küfö ile androstendion bileşiminin beş gün süren biyotransformasyonları gerçekleştirildi.

A. wentii MRC 200316 ile androstendion bileşiminin inkübasyonundan sadece 6 β -hidroksiandrostendion (%68) ve 14 α -hidroksiandrostendion metabolitleri (%8) elde edildi. Metabolitlerin yapı tayinleri, başlangıç maddesi ile metabolitlerin erime noktaları, NMR ve IR spektrumları karşılaştırılarak gerçekleştirildi.

BIOTRANSFORMATION OF ANDROSTENEDIONE BY ASPERGILLUS WENTII

SUMMARY

Keywords: Biotransformation, Androstenedione, *Aspergillus wentii*.

In this work, androstenedione was incubated by *Aspergillus wentii* MRC 200316 for 5 days.

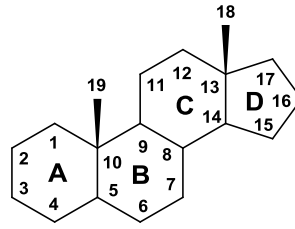
Incubation of androstenedione with *A. wentii* MRC 200316 only afforded 6 β -hydroxyandrostenedione (68%) and 14 α -hydroxyandrostenedione (8%). The structures of the metabolites were revealed by comparing melting points, NMR and IR spectra of the starting material with those of metabolites.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Doğal ürünler buldukları canlıların büyüme ve gelişmeleri için elzem olmasalar da genellikle bu canlıların hayatta kalmalarına yardımcı olmaları ve diğer canlılar üzerindeki etkileri nedeni ile oldukça önemlidirler [1-3]. Bu maddeler çoğu canlı gruplarında bulunmasına rağmen özellikle bitkiler, mikroorganizmalar, mantarlar ve böceklerde daha yaygındırlar [3]. Doğal ürünlerin tabiatta en yaygın olarak bulunduğu canlılar ise bitkiler ve mikroorganizmalardır.

Birbirinden farklı yapıda ve çok sayıda doğal ürün olmasına rağmen bu bileşikler genellikle tabiattaki biyosentezlerinden ortaya çıkan bazı özel yapısal karakterleri sebebiyle poliketidler, yağ asitleri, terpenler, steroidler, fenolik bileşikler, alkaloidler, özelleşmiş karbohidratlar ile özelleşmiş amino asitler ve peptidler gibi sınıflar altında incelenirler [1].

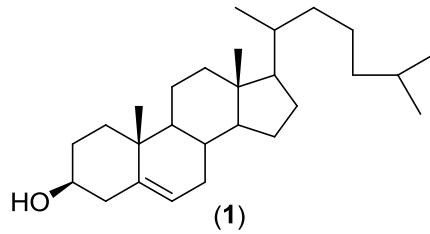
Steroidler doğal ürünlerin önemli bir sınıfıdır. Steroid terimi katı anlamına gelen latincedeki steros kelimesinden ortaya çıkmıştır. Steroidler steran halkası olarak da bilinen siklopentanoperhidrofenantren halkası içeren bileşiklerdir. Bu halka birbirleri ile kaynaşmış ve sırası ile A, B ve C halkaları olarak adlandırılan üç adet sikloheksan halkası ile D halkası olarak adlandırılan bir adet siklopentan halkası içerir (Şekil 2.1.). Steroidlerin çoğu 13. ve 10. karbonlarında, sırası ile 18. ve 19. karbonlar olarak tanımlanan ve molekül düzleminin üstünde yer alan metil grupları içerir. Çoğu steroidler genelde 3. ve 17. karbonlarında hidroksil veya karbonil gruplarına sahiptir. Ayrıca bazı steroidler D halkasındaki 17. karbondan orjinlenen yan zincirlere de sahiptir [4].



Şekil 1.1. Genel steroid yapısı

Steroller 3. karbon atomlarında hidroksil grubu, 17. karbonunda ise 7, 8 veya 9 karbonlu alifatik yan zincirler içeren önemli steroidlerdir. Kolesterol (1), stigmasterol ve ergosterol en iyi bilinen sterollerdir. Kolesterol (1) insan ve hayvanlarda bulunurken stigmasterol bitkilerde ergosterol ise mantarlarda bulunur [5].

Kolesterol (1) steroidlerin en yaygın üyelerinden birisidir (Şekil 2.2.). İnsan ve hayvan membranlarındaki akışkanlığının düzenlenmesinde oldukça önemli bir bileşik olan kolesterol (1) ayrıca safra asitleri, D₃ vitamini (aslında D₃ vitamininin çıkış maddesi 7-dehidrokolesterol bileşiğidir) ve steroid hormonlar gibi önemli fonksiyonlara sahip bileşiklerinin de başlangıç maddesidir [4,5].



Şekil 1.2. Kolesterol

Kolesterol (1) türevi olan steroid hormonlar; glukokortikoidler, mineralokortikoidler, androjenler, östrojenler ve progestagenler (progestinler) olmak üzere beş ana sınıfta incelenmektedir. Androjenler, östrojenler ve progestagenler eşey hormonları olarak da bilinir. Bu hormonlar üreme ile ilgili organların gelişme ve büyümelerini, ikincil eşey karakterlerini ve üreme döngüsünü düzenlerler. Eşey hormonları ayrıca güçlü anabolik etkileri ile kemik, kaslar ve deri gibi birçok dokunun gelişmesini ve metabolizmanın da sürekliliğini sağlarlar [4,5].

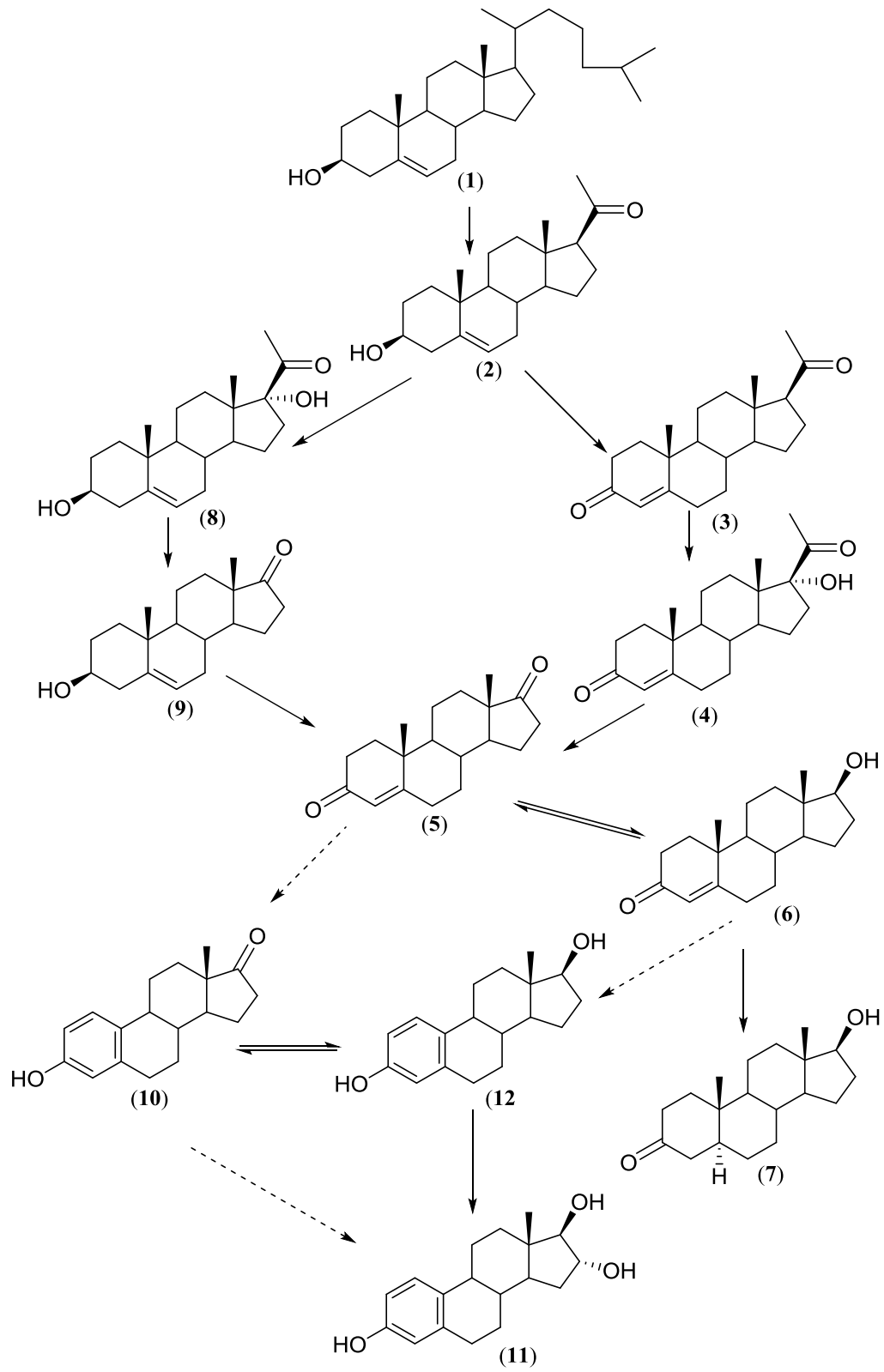
Aynı zamanda östrojenlerin çıkış maddeleri de olan androjenler omurgalı erkek bireylerinde etkili olan eşey hormonlarıdır. Androjenlerin vücuttaki asıl sentez yeri erbezleri (testis) olsa da bu hormonların bir kısmı adrenal korteksten de salınmaktadır. Adrenal korteks ve testislerde androjenlerin biyosentezi Δ^4 yolu veya Δ^5 yolu olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleşmektedir [5].

Androjen biyosentezinin ana yolu Δ^4 yoludur. Bu yolda kolesterol (1) bileşiğinden türevlenen pregnenolon (2) önce progesterona (3) daha sonra ise 17α -hidroksiprogesterona (4) dönüştürülür. 17α -Hidroksiprogesteron (4) bünyesindeki yan zincirinin enzimatik olarak parçalanması sonucunda androst-4-en-3,17-dion olarak da bilinen androstendion (5) bileşiği oluşur. Androstendion (5) bileşiğinin C-17'deki indirgenmesiyle testosteron (6) sentezlenir. Testosteron (6) ise daha sonra 5α -redüktaz aktivitesi ile daha etkin bir diğer androjen olan dihidrotestosteron (7) bileşiğine dönüştürülür.

Aslında bir yan yol olan Δ^5 yolunda ise kolesterol (1) bileşiğinden türevlenen pregnenolon (2) 17α -hidroksipregnenolon (8) bileşiğine dönüştürüldükten sonra dehidroepiandrosteron (9) bileşiği elde edilmektedir. Dehidroepiandrosteron (9) ise androstendion (5) bileşiğine çevrildikten sonra testosterona (6) yükseltgenebilmektedir.

Androjenlerin biyosentezindeki Δ^4 yolu ve Δ^5 yolunun ortak son ürünü androstendion (5) bileşiğidir (Şekil 1.3.). Testosteronun çıkış maddesi olan androstendion (5) östron (10) ve östriol (11) gibi östrojenlerin de çıkış maddesidir [5]. Bir diğer östrojen olan östradiol (12) (17β -östradiol) ise testosteron (6) bileşiğinden sentezlenir.

Androjen metabolizmasındaki önemli bir metabolit olan androstendion (7) ayrıca farmasötik açıdan önemli androjenler, anabolik ilaçlar ve spironolakton gibi birçok önemli bileşiğin hazırlanmasında da çıkış maddesi olarak kullanılmaktadır [6].



Şekil 1.3. Bazı steroid hormonların biyosentezi

BÖLÜM 2. *ASPERGILLUS* TÜRLERİ İLE ANDROSTENDİON BİYOTRANSFORMASYONLARI

2.1. Biyotransformasyonlar

Enzimler veya enzimleri içeren biyolojik sistemlerin kendilerine yabancı maddeler üzerinde gerçekleştirdikleri kimyasal değişimlere biyotransformasyon adı verilir [7]. Biyotransformasyon çalışmalarındaki enzimler çeşitli biyolojik sistemlerin (hücre, doku ve organ kültürleri, mikroozomlar, mikroorganizmalar veya mikroorganizma sporları gibi) yapısında bulunabileceği gibi izole edildikten sonra sabitlenmiş veya serbest olarak kullanılabilir. Günümüzde biyotransformasyonlar için kullanılan enzimlerin çoğusu biyolojik kaynaklardan izole edilirken bir kısmı ticari olarak elde edilmektedir.

Enzimler hakkında oldukça hassas, pahalı, sadece kendi substratları üzerinde ve kendi doğal çevrelerinde etkili olduklarına gibi bazı önyargılar olmasına rağmen biyotransformasyon çalışmalarında kullanılan çoğu enzim için bu ifadeler doğru değildir [8].

Enzimler oldukça hızlı çalıştıkları için kullanıcılarına birçok avantajlar sağlar. Örneğin, enzimler ile gerçekleşen bir reaksiyon enzim olmaksızın gerçekleşen bir reaksiyona göre 10^8 - 10^{10} kat daha hızlı gerçekleşir. Ayrıca, enzim kullanılan reaksiyonlarda katalizör oranı % 10^{-3} - 10^{-4} mol arasındayken diğer katalizörlerden birini içeren bir reaksiyonda bu oran % 0,1-1 mol aralığına kadar çıkabilmektedir.

Enzimler, katalizör olarak kullanılan ağır metaller ve sentez için kullanılan çoğu reaktifin aksine doğada tamamen parçalanabilir olmaları sebebiyle doğa dostu olarak kabul edilirler.

Enzimler, sentez için kullanılan çoğu reaktifin aksine genellikle sıcaklığın 20-40 °C arası olduğu ılıman şartlar altında ve pH 5-8 aralığında çalışırlar. Bu nedenle enzimler kullanıldığında klasik sentez metotlarının kullanılması sonucunda çoğu zaman ortaya çıkan izomerleşme, rasemizasyon, çevrilme ve bozunma gibi yan reaksiyonlar çok daha az gözlenmektedir.

Enzimler çoğu zaman doğal rolleri dışında fonksiyon gösterebilirler. Örneğin, bazı enzimler geniş substrat spektrumlarına sahip olmalarından ötürü, sentetik veya doğal birçok bileşik üzerinde etkili olabilir.

Metabolik yollardaki multienzim sistemleri benzer ya da aynı şartlar altında etkin olabildikleri için bir reaksiyon ağındaki birden fazla seri reaksiyonu aynı ortamda gerçekleştirebilmektedir.

Enzimler çok sayıda farklı tipte reaksiyonları gerçekleştirebilirler. Hemen hemen her bir sentetik reaksiyona eşdeğer enzimatik bir reaksiyon mevcuttur. Enzimler kullanılarak ester, eter, lakton, laktam, epoksit, asit anhidrit, amid ve nitrillerin hidroliz veya sentezi, alkan, alken, aromatik bileşikler, alkol, aldehit, keton, sülfürler ve sülfoksitlerin yükseltgenmesi ya da indirgenmesi, karboksilasyon, dekarboksilasyon, alkilasyon ve dealkilasyon, halojenasyon ve dehalojenasyon, izomerizasyon, su, amonyak ve hidrojen siyanür eklenmesi veya eliminasyonu, açiloin ve aldol reaksiyonları, Michael katılması ve Diels-Alder reaksiyonları gibi reaksiyonlar gerçekleştirilebilmektedir.

Enzimler sahip oldukları kompleks bir üç boyutlu yapıları sayesinde regioseçici ve stereoseçici biyomoleküller oldukları için aynı substratın bünyesinde bulunan farklı bölgelerdeki fonksiyonel grupları dahi ayırt edebilirler. Enzimler ayrıca kemoseçici biyomoleküller olmaları sebebiyle sadece spesifik bir fonksiyonel grup üzerinde etkili olurken diğer fonksiyonel grupları etkilemezler ve bu yan ürünlerin oluşmasına engel olurlar.

Sadece L-amino asitleri içeren kiral biyokatalizörler olan enzimler enantiyoseçici biyomoleküllerdir. Bundan dolayı prokiral bir substrat enzimlerin etkisi sonucunda sadece bir enantiyomere dönüşürken genellikle enzimlerin rasemik karışımlardaki enantiyomerlerden sadece birini etkilemesiyle enantiyomerlerin ayrılmaları da mümkün olmaktadır.

Enzimler yukarıda belirtilen avantajları sebebiyle klasik sentez yöntemleriyle gerçekleştirilebilmesi çok zor hatta imkânsız olan reaksiyonları kolayca gerçekleştirilebilme potansiyeline sahiptir [8].

Enzimlerin biyokatalizörler olarak kullanılmasının bazı dezavantajları da mevcuttur. Örneğin, enzimler yalnızca bir enantiyomerik formda oldukları ve diğer enantiyomerik formlarının D-amino asitlerden sentezi için genel bir yol olmaması sebebiyle sadece spesifik bir enantiyomer ile reaksiyona girebilmektedirler. Böyle bir durumda, diğer enantiyomerik ürünün temini için istenilen stereokimyasal seçiciliğe sahip bir enzimin kullanılması gerekir. Bu ise bazen mümkün olabilmektedir [8].

Enzimler kendi aktiviteleri üzerinde etkili olan pH ve sıcaklık gibi parametrelerdeki değişimlere oldukça hassaslardır. Örneğin, yavaş ilerleyen bir enzimatik reaksiyonu hızlandırmak için pH ve sıcaklık gibi parametreler enzimlerin protein yapısında olmaları sebebi ile fazla değiştirilemezler.

Enzimler için en uygun reaksiyon ortamı su olmasına rağmen çoğu organik bileşiğin sudaki çözünürlükleri oldukça düşüktür. Enzimatik bir reaksiyonun sulu bir ortam yerine organik bir çözücüde gerçekleştirilmesi çoğu zaman enzimlerin protein yapılarında denatürasyonuna sebep olduğundan aktivite kaybına neden olmaktadır.

Çoğu enzimatik reaksiyonda enzimler, yüksek orandaki substrat ve ürün varlığında inhibe olurlar. Substrat inhibisyonu, düşük miktarlarda substrat düzeyinden başlanarak ortama sürekli substrat ilave edilerek kolaylıkla engellenebilir. Artan ürünün reaksiyon ortamından kademeli olarak uzaklaştırılması genelde ürünün bir sonraki reaksiyon basamağına dahil olması nedeniyle oldukça zordur.

Enzimler beraber çalıştıkları kendilerine özgü doğal kofaktörlerine bağımlı olduklarından enzimatik reaksiyonlarda NAD(P)H gibi kofaktörlerin reaksiyon ortamında olmaları ve sürekli yenilenmeleri gerekir. Kofaktörlerin sentetik muadillerinin kendilerinin yerine kullanılamaması, kararsız ve oldukça pahalı moleküller olmaları enzimatik reaksiyonların önemli dezavantajlarından.

Bazı enzimler alerjik reaksiyonlara da neden olabilmektedir. Enzimler diğer kimyasal maddeler gibi değerlendirilip dikkatli kullanıldığında alerjik reaksiyonlar engellenebilir.

2.2. Mikrobiyal Biyotransformasyonlar

Biyotransformasyonlar genellikle ya izole enzimler veya bütün hücre sistemleriyle ile gerçekleştirilir. Bütün hücre sistemleri daha çok bitki ve hayvanlara ait hücre, doku ve organ kültürleri ile mikroorganizmaları kapsar.

Çoğu hücre içi enzimin hücre dışında kararsız olabilmeleri, homojenasyonları sırasında bazı proteolitik enzimlerin etkisi ile hidrolizlenmeleri, kofaktör ihtiyaçlarının temini, kofaktörlerin sürekli yenilenmesi zorunluluğu, yüksek izolasyon maliyeti ve izolasyonlarının zorluğu gibi problemlerden dolayı biyotransformasyon çalışmalarında genellikle bütün hücre sistemleri tercih edilmektedir.

Bütün hücre sistemleri ile gerçekleştirilen biyotransformasyonlarda ise daha çok mikrobiyal hücreler tercih edilmektedir. Mikrobiyal hücrelerin büyüme ve gelişme hızı bitki ve hayvan hücrelerine göre çok daha yüksek olduğundan mikrobiyal hücreler ile biyotransformasyonlar daha kısa zamanda gerçekleşir. Mikrobiyal hücreler, daha küçük boyutları ve sağlam hücre duvarları sayesinde bitki ve hayvan hücrelerine göre mekanik olarak daha kararlıdır. Mikrobiyal hücrelerin buldukları ortama kolayca adapte olmaları kullanıcılara avantaj sağlar. Ayrıca mikrobiyal hücreler bitki ve hayvan hücrelerine göre çok farklı tipte substratları metabolize edebilirler [8].

Mikrobiyal biyotransformasyonlar klasik sentez yöntemlerine karşı olan üstünlükleri nedeniyle biyoteknolojinin temel elemanları arasında yer alırlar [7-9]. Mikroorganizmalar genetik olarak değiştirilebilmeleri biyoteknolojideki kullanımlarını yaygınlaştırmaktadır. Mikroorganizmalar üzerindeki genetik değişiklikler sayesinde klasik sentez yöntemleriyle düşük verimle elde edilen önemli ürünler daha yüksek verimlerde elde edilebilir. Hatta genetik uygulamalar ile ürünler üzerinde spesifik değişikliklerin sağlanması bile mümkün olabilmektedir [9].

Mikroorganizmalar spesifik olmayan enzim sistemleri sayesinde hem doğal hem de sentetik olan çok sayıdaki farklı substratlar üzerinde pek çok farklı kimyasal reaksiyonları gerçekleştirebilmektedir [7].

Çoğu mikrobiyal biyotransformasyonlar klasik sentez yöntemlerine göre oda sıcaklığı ve 1 atm basınç altındaki çok daha ılıman şartlarda gerçekleşir [8].

Mikrobiyal biyotransformasyonlar klasik sentez yöntemlerine göre daha ucuza ve daha kısa sürede gerçekleştirilir. Mikrobiyal biyotransformasyonlar sayesinde hedef bileşikler, genellikle oldukça yüksek verimlerde, daha kısa süreler içerisinde, kimyasal reaktiflere göre çok daha ucuza mal edilen besiyeri bileşenleri ve mikroorganizmalar kullanılarak elde edilmektedir [7,9].

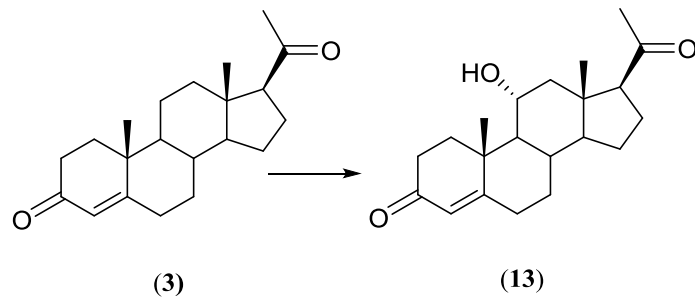
Klasik sentez yöntemlerinde kullanılan çoğu reaktif çevreye büyük zararlar verirken mikrobiyal biyotransformasyonlar doğa dostudur [7].

Mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonları enzimleri içerdikleri için enantioseçicidir. Klasik sentez yöntemleri ile hedeflenen moleküller, çoğu zaman ayrılmaları oldukça zor olan rasemik karışımlar ile sonuçlanır. Özellikle ilaç etken maddelerinin sentezinde yalnızca hedeflenen enantiyomeri elde edilebilmesi son derece önemlidir. Günümüzde tek enantiyomerin seçimli sentezi için mikroorganizmaların kullanılmaları gittikçe yaygınlaşmaktadır [8].

Klasik kimyasal sentez yöntemlerinin aksine kullanılan mikroorganizmalardaki enzimlerin regioseçicilikleri sebebi ile mikrobiyal biyotransformasyonlar esnasında substratlar üzerindeki diğer fonksiyonel grupların korunmasına gerek kalmaz [7,8].

Klasik kimyasal sentez yöntemlerinin aksine substrattaki mikrobiyal biyotransformasyonların gerçekleşeceği yerin civarında çoğu zaman belirli bir fonksiyonel grubun bulunmasına gerek yoktur. Örneğin, mikrobiyal hidroksilasyonlar fonksiyonel grupların uzağında meydana gelir [7].

Mikroorganizmaları kullanılarak çoğu klasik sentez yöntemlerine karşılık gelen reaksiyonları gerçekleştirilebilmektedir. Ayrıca, mikrobiyal hidroksilasyonlar gibi bazı mikrobiyal biyotransformasyonlar, klasik sentez yöntemleri ile tek basamakta gerçekleştirilemez. Mikrobiyal hidroksilasyonlar en yaygın ve önemli mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonlarından [8]. Mikrobiyal hidroksilasyonların önemi ilk olarak iltihap giderici olarak kullanılan kortikal steroidlerin sentezinde ortaya çıkmıştır. Kortikal steroidlerin sentezinde, fonksiyonel gruplardan oldukça uzakta bulunan C-11 pozisyonuna bir oksijen yerleştirilmesi, klasik sentez yöntemleri ile oldukça uzun ve pahalı bir işlem olmasına rağmen bu işlemin tek basamakta *Rhizopus arrhizus* küfünün yüksek verimli bir 11-hidroksilasyonu sayesinde gerçekleştirilebilmesi tüm dikkatleri mikrobiyal biyotransformasyonlar üzerine çekmiştir. Bahsedilen reaksiyonda (Şekil 2.1.) progesteron (**3**) mikrobiyal hidroksilasyon ile 11 α -hidroksiprogesteron (**13**) bileşiğine dönüştürülmüştür [7].



Şekil 2.1. *R. arrhizus* ile progesteron (**3**) biyotransformasyonu

Çeşitli mikroorganizmalar mikrobiyal biyotransformasyonlar için serbest veya uygun yüzeylere sabitlenmiş olarak kullanılabilir. Bu hedef doğrultusunda en yaygın olarak kullanılan mikroorganizmalar, bakteriler, küfler ve mayalardır [9].

2.3. Küfler ile Steroid Biyotransformasyonları

Steroidlerin küfler ile biyotransformasyonları bu reaksiyonların yüksek regio ve stereoseçicilikleri sebebi ile steroid ilaçlar ve hormonlar gibi çok daha önemli ve fonksiyonlu bileşiklerin üretimi için halen yaygın olarak kullanılmaktadır [10-14]. Bilinen mikrobiyal biyotransformasyonların etkinliklerini artırmak, kullanılabilir yeni mikroorganizmalar ve reaksiyonlar tespit etmeye yönelik çalışmalar yoğun olarak sürdürülmektedir [10].

Günümüze kadar farklı küf türleri ile çok sayıda steroidin biyotransformasyonları gerçekleştirilmiştir. Bu biyotransformasyonlardan Baeyer-Villiger oksidasyonları, yan zincirin uzaklaştırılması, hidroksil gruplarının oksidasyonu, keton gruplarının redüksiyonu, A halkasının aromatikleşmesi, steroid halkalarının mikrobiyal hidrojenezasyonları ve dehidrojenezasyonları ile sonuçlanmıştır [10-14].

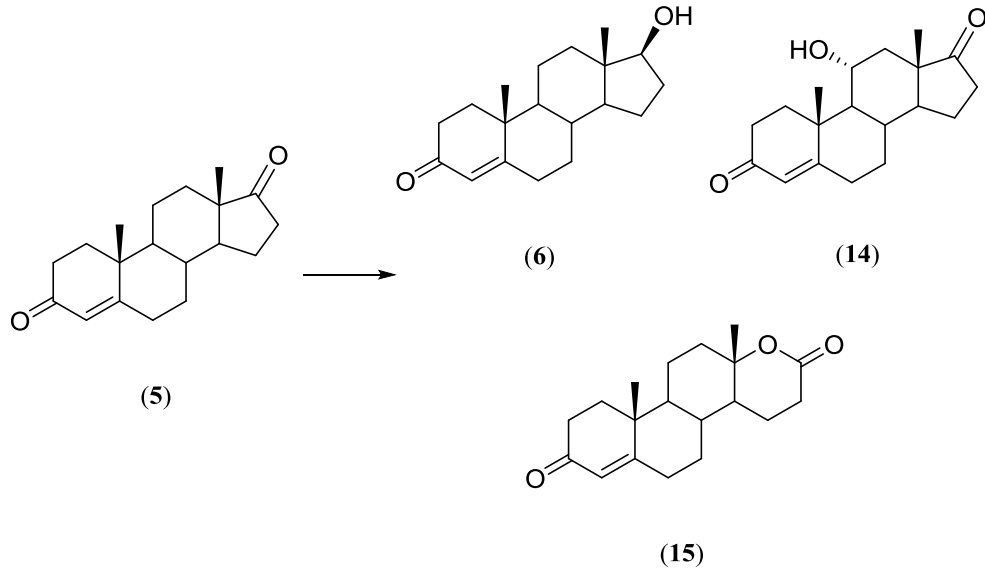
2.4. *Aspergillus* Türleri ile Androstendion (5) Biyotransformasyonları

Aspergillus mikotoksinleri, patojenitesi, temel ökaryotik genetik ve biyoteknolojideki kullanımları sebebiyle oldukça önemli bir küf cinsidir [15]. Bazı türleri insanlar ve hayvanlar için patojen olan *Aspergillus* türleri su, toprak ve çüreyen materyeller üzerinde yaygın olarak yaşar [16].

Aspergillus türleri ile gerçekleştirilmiş steroid biyotransformasyonları genelde steroidlerin farklı kısımlarında gerçekleşen mikrobiyal hidroksilasyonlar ve Baeyer-Villiger oksidasyonları şeklinde gerçekleşmiştir [10-14].

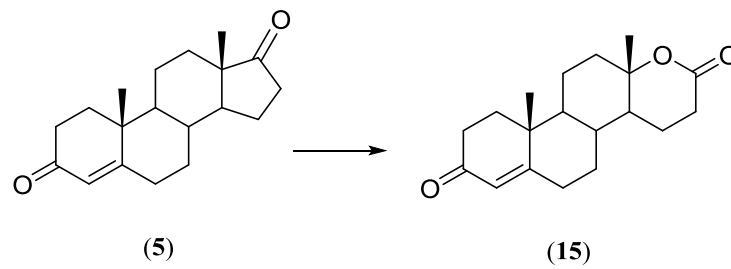
Literatürdeki androstendion (5) biyotransformasyonlarının bazılarında *Aspergillus* türleri ile çalışılmıştır [17-22]. Örneğin, bir *A. tamarii* MRC 72400 ile androstendion

(5) biyotransformasyonu (Şekil 2.2.) testosteron (6), 11 α -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (14) ve 17 α -okza-D-homo-androst-4-en-3,17-dion (15) (testololakton) metabolitleri ile sonuçlanmıştır. [17].



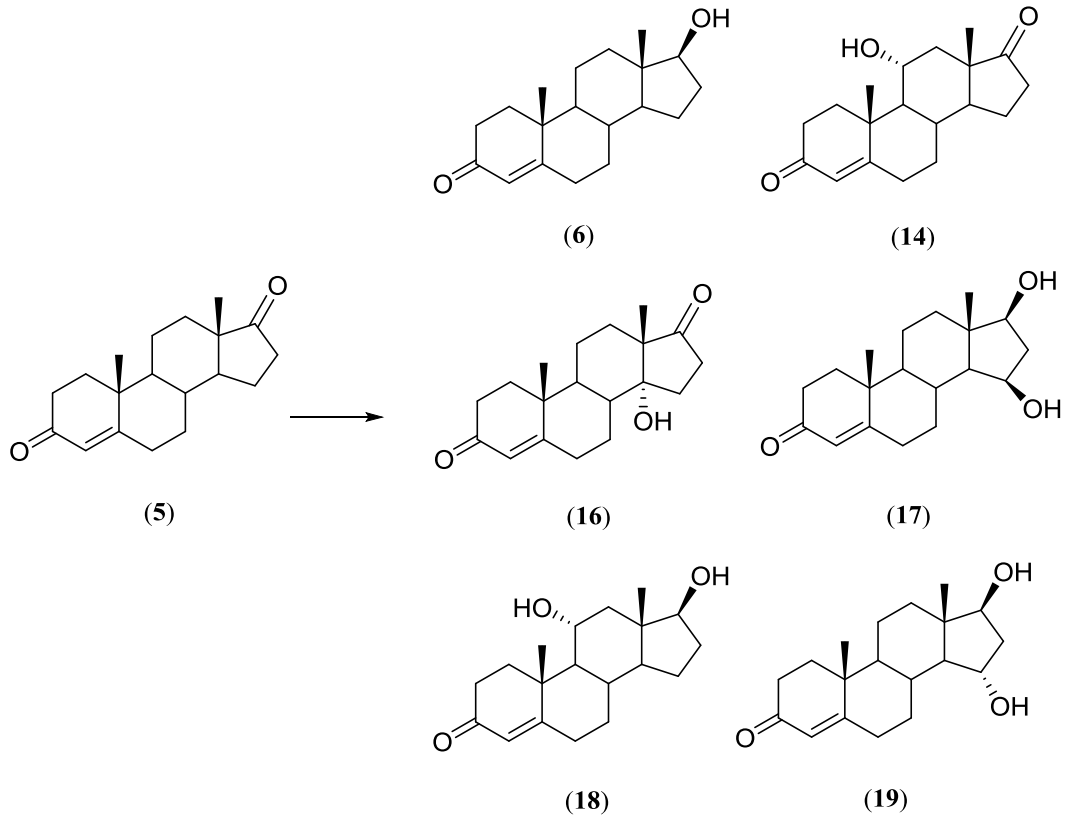
Şekil 2.2. Substratın *A. tamarii* MRC 72400 ile biyotransformasyonu

Başka bir *A. tamarii* izolatının androstendion (5) ile biyotransformasyonu (Şekil 2.3.) sonucunda ise sadece 17 α -okza-D-homo-androst-4-en-3,17-dion (15) metaboliti elde edilmiştir [18].



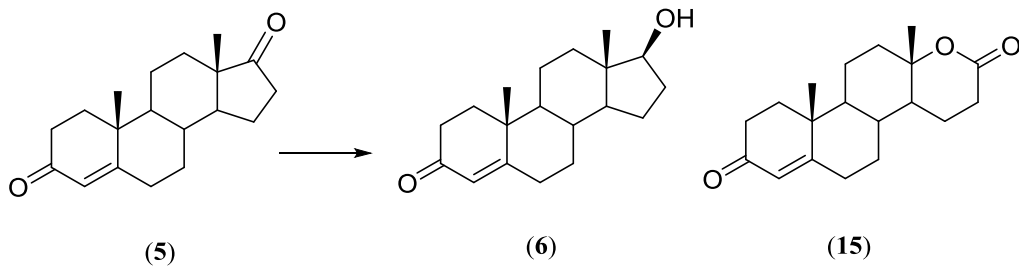
Şekil 2.3. Substratın bir *A. tamarii* izolatı ile biyotransformasyonu

Androstendion (5) bileşiğinin *A.candidus* MRC 200634 ile biyotransformasyonu (Şekil 2.4.) sonucu testosteron (6), 11 α -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (14), 14 α -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (16) 15 β ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (17), 11 α ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (18) ve 15 α ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (19) metabolitleri elde edilmiştir [17].



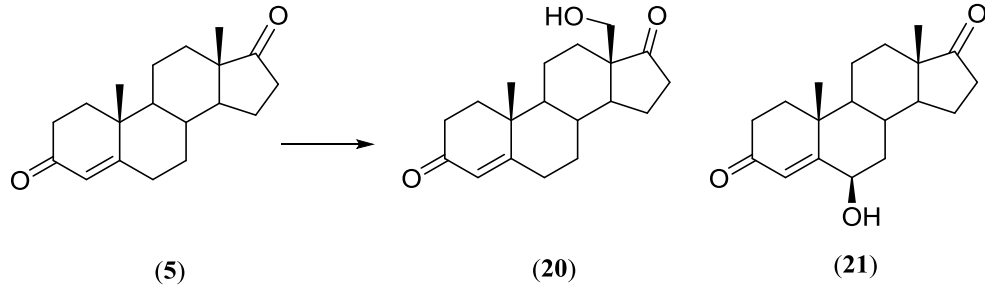
Şekil 2.34. Substratın *A.candidus* MRC 200634 ile biyotransformasyonu

Adrostendion (5) bileşiğinin *A. terreus* PTCC 5283 ile biyotransformasyonu (Şekil 2.5.) sonucu testosteron (6) ve 17a-okza-D-homo-androst-4-en-3,17-dion (15) metabolitleri elde edilmiştir [19].



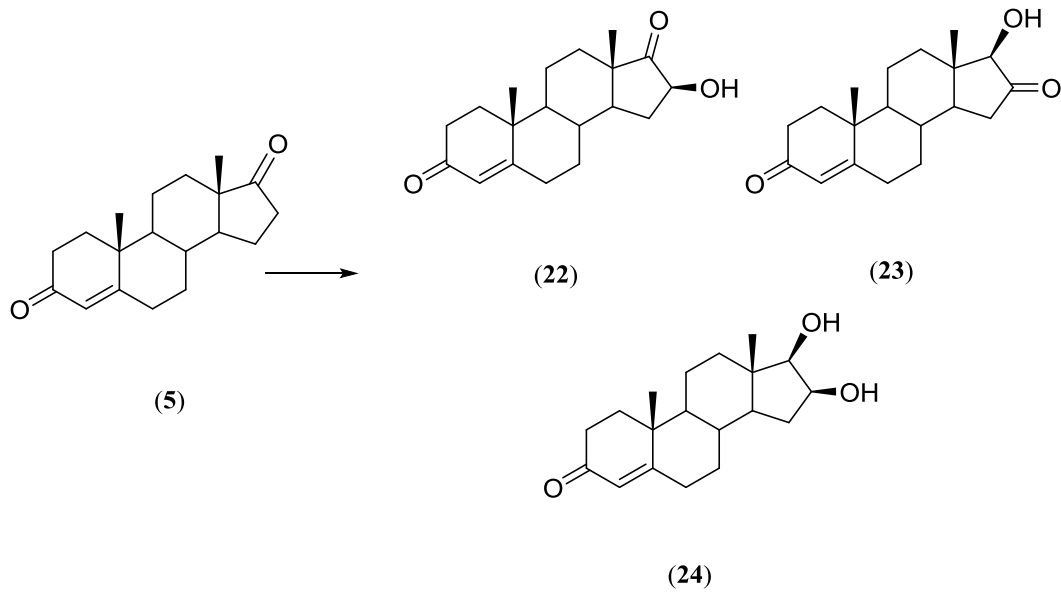
Şekil 2.5. Substratın *A. terreus* PTCC 5283 ile biyotransformasyonu

Adrostendion (**5**) bileşiğinin bir *A. niger* ATCC 9142 ile biyotransformasyonu (Şekil 2.6.) 18-hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**20**) ve 6 β -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**21**) metabolitlerini vermiştir [20].



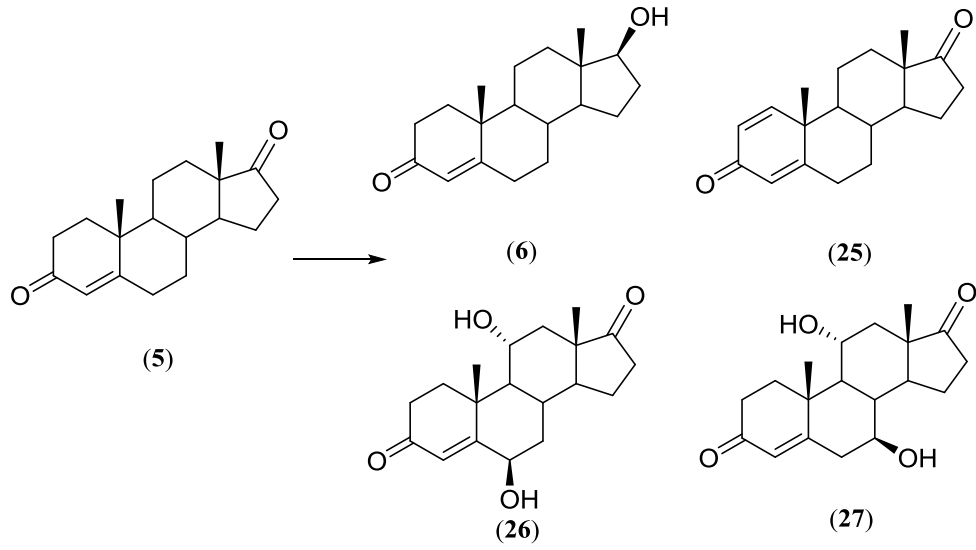
Şekil 2.6. Substratın *A. niger* ATCC 9142 ile biyotransformasyonu

Adrostendion (**5**) bileşiğinin bir diğer *A. niger* NRRL 599 ile biyotransformasyonu (Şekil 2.7.) ise 16 β -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**22**), 17 β -hidroksiandrost-4-en-3,16-dion (**23**) ve 16 β ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (**24**) metabolitlerini vermiştir [21].



Şekil 2.7. Substratın *A. niger* NRRL 599 ile biyotransformasyonu

Adrostendion (**5**) bileşiğinin bir *A. fumigatus* izolatu ile biyotransformasyonu (Şekil 2.8.) testosteron (**6**), androsta-1,4-dien-3,17-dion (**25**), 6 β ,11 α -dihidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**26**) ve 7 β ,11 α -dihidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**27**) metabolitlerini vermiştir [22].



Şekil 2.8. Substratın bir *A. fumigatus* izolatu ile biyotransformasyonu

2.5. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada androstendion (5) bileşiğinin *Aspergillus wentii* MRC 200316 küfö ile biyotransformasyonunun incelenmesi amaçlandı. Söz konusu amaç doğrultusunda androstendion (5) bileşiği *A. wentii* MRC 200316 küfö ile biyotransformasyona maruz bırakıldı.

BÖLÜM 3. MATERYAL VE METOT

3.1. Cihazlar, Sarf Malzemeler ve Kullanılan Yöntemler

Biyotransformasyon çalışmasında kullanılan besiyeri ve cam malzemeler Nüve OT 40L marka otoklav ile 20 dakika boyunca 121°C sıcaklıkta sterilize edildi. Küflerin tazelenmesi ve biyotransformasyon çalışmaları esnasındaki inokülasyonları gerçekleştirilmesi için Nükleon marka Sınıf II Tip Biyolojik Güvenlik Kabini (steril kabin) kullanıldı. Biyotransformasyon çalışması ve küflerin yetiştirilmesi Gerhardt THO 500 Laboshake marka çalkalamalı inkübatör ile gerçekleştirildi. Infrared spektrumları bir Perkin Elmer Spectrum Two spektrometre cihazı ile alındı. ¹H NMR spektrumları iç sinyal olarak tetrametilsilan standardı kullanılarak 300 MHz'de çalışan Varian Mercury 300 NMR spektrometresi ile döterokloroform içerisinde alındı. ¹³C NMR spektrumları ise 75 MHz'de Varian Mercury 300 NMR kullanılarak döterokloroform içerisinde alındı.

Biyotransformasyon çalışmasının ve kolon kromatografi çalışmalarının sonuçları ince tabaka kromatografisi (İTK) ile takip edildi. İTK çalışmaları 0,25 mm kalınlığında silika jel tabakaları (Merck silika jel GF254) ve etil asetat-hekzan (1:1) çözücü sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. İTK tabakalarındaki bileşikler *p*-anisaldehit-sülfürik asit reaktifine daldırılıp 120 °C sıcaklıkta 3 dakika boyunca ısıtıldıktan sonra görünür hale gelmeleri sağlandı. Erime noktalarını tayin etmek için de Elektrothermal IA 9200 erime noktası tayin cihazı kullanıldı.

Aspergillus wentii MRC 200316 küfü kültürü Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu, Marmara Araştırma Merkezi Gıda Teknoloji ve Araştırma Enstitüsü'nden yatık agar kültürü olarak satın alındı. Bu kültür PDA içeren yatık agar besiyerlerinde ve 4 °C'de tazelendi, çoğaltıldı ve korundu.

Androstendion (5) bileşigi Sigma-Aldrich firmasından satın alındı. Küfler için hazırlanan besiyerinde kullanılan tüm kimyasallar, yatık agar besiyerleri için kullanılan PDA ve agar, çalışmada kullanılan tüm solventler ise Merck firmasından temin edildi.

3.2. Yatık Agar Besiyerlerinin Hazırlanması

Yatık agar besiyeri hazırlanmak için PDA (potato dekstroz agar) (5,85 g) ve agar (1,20 g) karışımı saf su ile 150 mL'ye tamamlandı ve kaynatıldı. Hazırlanan bu besiyeri soğumadan Universal marka 15 adet 22 mL'lik patolojik cam şişelerin yarısına kadar dağıtılıp otoklavda 121 °C'de 20 dakika sterilize edildi. Steril edilen şişelerdeki erimiş besiyeri donmadan önce yaklaşık 45 derecelik bir eğimle soğumaya bırakılarak yatık agar besiyerleri hazırlandı.

3.3. Küf Kültürlerinin Hazırlanması

Oda sıcaklığında 15 gün süresince çoğalmaya bırakılmak üzere, stok fungal kültüründeki küflerin bir kısmı yatık agar besiyerlerinin 3 tanesine steril koşullarda aktarıldı. 15 günde bir 3 yeni yatık agar besiyerine steril şartlarda aktarılmak üzere, hazırlanan yeni yatık agar kültürlerinin en gelişmişindeki küfler seçildi. Aktarma işlemi 2 kez tekrarlandıktan sonra elde edilen en taze ve en gelişmiş yatık agar kültüründeki küfler biyotransformasyon çalışmasında kullanıldı.

3.4. Küf Besiyerinin Hazırlanması

Aspergillus wentii MRC 200316 küfüne özel besiyerinin hazırlanması için kullanılan kimyasal maddelerin listesi ve bir litre çözelti içinde bulunan miktarları Tablo 3.1.'de verilmiştir [23]. Hazırlanan besiyerinin pH'sı daha sonra 7,2'ye ayarlanmıştır.

Tablo 3.1. *A. wentii* küfüne ait besiyeri çözeltisinin bileşenleri

Bileşenler	Miktar
Sukroz	15 g
Glukoz	15 g
Polipepton	5 g
KH ₂ PO ₄	1g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	10 mg

3.5. Biyotransformasyon Çalışması

Hazırlanan 1 L besiyeri çözeltisi 10 adet 250 mL erlene paylaştırılarak otoklavda sterilize edildi. Daha önce hazırlanan en taze alt kültürdeki küf, 10 erlene steril şartlar altında aktarıldı ve bu erlenler yeterli miktarda küf oluşabilmesi için 27°C sıcaklıkta, çalkalamalı inkübatörde (150 rpm), 3 gün boyunca büyümeye bırakıldı. Üçüncü günün sonunda androstendion (5) (1 g), DMF (10 mL) içerisinde çözünerek yeterli miktarda küf içeren erlenlere eşit hacimlerde ve steril şartlarda ilave edildikten sonra, 5 gün boyunca 27°C'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı (150 rpm).

3.6. Metabolitlerin İzole Edilmesi

İnkübasyon sonrasında besiyeri bir Buchner hunisi kullanılarak filtrasyon işlemi ile küf kültürüne ait misellerden süzülerek filtrat (süzüntü) olarak ayrıldı. Buchner hunisinde kalan miselleri yıkamak için etil asetat (500 mL) kullanıldı. Filtratlardaki steroidleri su fazından organik faza çekmek için her seferinde etil asetat (1 L) kullanılarak 3 ayrı ekstraksiyon gerçekleştirildi. Ekstraksiyon sonrasında ekstraktlara susuz sodyum sülfat ilave edilerek ortamda bulunabilecek su giderildi. Ekstraktlar evaporatör ile uzaklaştırıldıktan sonra yağimsı bir madde (2299 mg) elde edildi.

3.7. Metabolitlerin Saflaştırılması ve Yapılarının Tayini

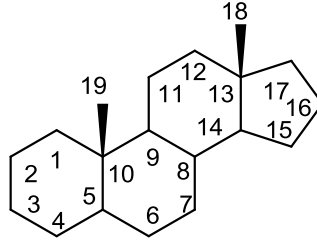
Elde edilen yağimsı madde ile substratı karşılaştırmak suretiyle bir İTK çalışması gerçekleştirildi. Yağimsı madde içerisindeki steroidleri ayırmak için adsorban olarak silika jel 60 (Merck 107734, 230-400 mesh) kullanılarak bir kolon kromatografisi çalışması gerçekleştirildi. Steroidler *n*-hekzan içerisinde artan etil asetat derişimleri elüent olarak kullanılarak kolondan ayrıldı.

Kolondan ayrılan steroidlerin yapılarının tayin edilmesi amacıyla substrat ve elde edilen her bir maddeye ait erime noktası, NMR ve IR spektrumları karşılaştırıldı.

Biyotransformasyon çalışmasının takibi bir kontrol erleni ile sağlandı. Kontrol erleni için sadece inoküle edilmemiş steril besiyeri ve substrat kullanıldı. Biyotransformasyon çalışmalarındaki bütün işlemler kontrol erleni içinde uygulandı. Kontrol erleninden İTK alındığında herhangi bir metabolit gözlemlenmediği için biyotransformasyon çalışmasından elde edilen metabolitlerin gerçek biyotransformasyon ürünleri olduğu sonucuna varıldı. Ayrıca inkübasyonlar boyunca tüm erlenlerdeki besiyeri görünümünde ve küf gelişimlerinde değişimler olup olmadığı da takip edildi ve herhangi bir farklılık gözlenmedi.

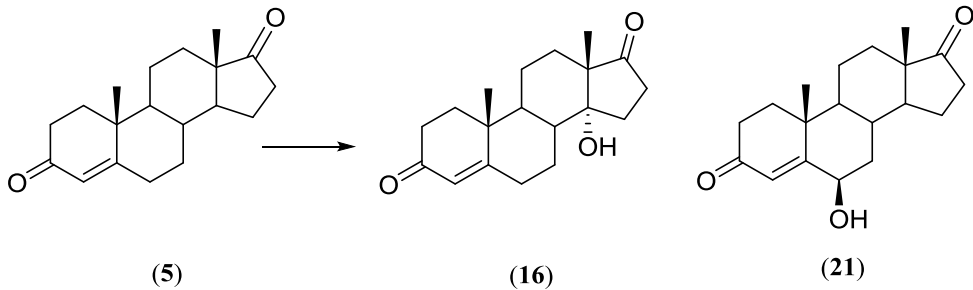
BÖLÜM 4. DENEYSEL BULGULAR

Androstendion (**5**) bileşiğinin *A. wentii* MRC 200316 ile biyotransformasyonundan elde edilen bileşiklerin yapılarını belirlemek için substrat ve elde edilen bileşiklerin erime noktaları, ^1H NMR, ^{13}C NMR ve IR spektrumları karşılaştırıldı. Biyotransformasyonu gerçekleştirilen androstendion (**5**) bileşiğinin karbon iskeleti numaralandırılması Şekil 4.1.'deki gibidir.



Şekil 4.1. Substratın karbon iskeleti

Androstendion (**5**) (1 g) bileşiğinin *A. wentii* MRC 200316 ile 27 °C'de 5 gün süren inkübasyonu sonrasında elde edilen yağimsı madde (2299 mg) ile gerçekleştirilen kolon kromatografisi çalışması sonrasında kolondan sırası ile 6 β -hidroksiandrostendion (**21**) (%68) ve 14 α -hidroksiandrostendion (**16**) (%8) bileşikleri elde edildi (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Substratın *A. wentii* MRC 200316 ile biyotransformasyonu

6 β -Hidroksiandrostendion (**21**) (718 mg, %68) %50'lik çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde asetondan prizmalar şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 195-196 °C, (lit. [24] erime noktası: 190-193 °C).

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3450, 1730 ve 1665.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,92 (3H, s, 18-H); 1,37 (3H, s, 19-H); 4,36 (1H, t, $J = 3$ Hz, 6 α -H); 5,83 (1H, s, 4-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 220,90 (C-17); 200,42 (C-3); 168,40 (C-5); 126,44 (C-4); 72,66 (C-6); 53,51 (C-9); 50,77 (C-14); 47,98 (C-13); 37,99 (C-10); 37,07 (C-1); 37,07 (C-7); 35,84 (C-16); 34,13 (C-2); 31,14 (C-12); 29,31 (C-8); 21,65 (C-15); 20,18 (C-11); 19,51 (C-19); 13,72 (C-18).

14 α -Hidroksiandrostendion (**16**) (84 mg, %8)

%50'lik çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde metanolden yassı pulcuklar şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 260-261 °C, (lit. [24] erime noktası: 255-260 °C).

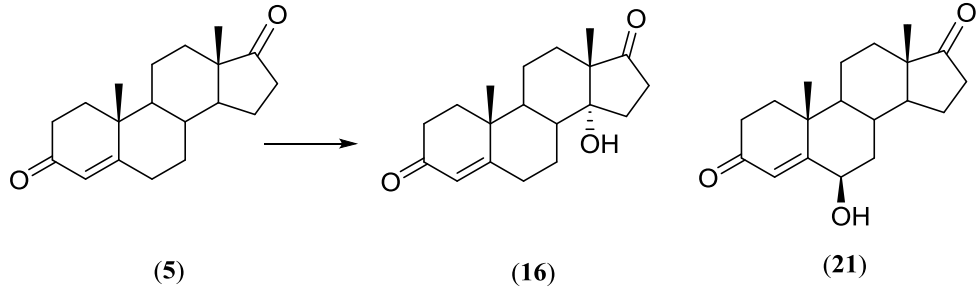
IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3440, 1740 ve 1665.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 1,02 (3H, s, 18-H); 1,22 (3H, s, 19-H); 5,72 (1H, s, 4-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 218,80 (C-17); 199,81 (C-3); 170,62 (C-5); 123,59 (C-4); 80,46 (C-14); 52,49 (C-13); 46,82 (C-9); 38,62 (C-10); 37,77 (C-8); 35,48 (C-1); 33,72 (C-16); 32,99 (C-2); 32,41 (C-6); 29,29 (C-15); 25,42 (C-7); 24,35 (C-12); 18,99 (C-11); 17,70 (C-19); 17,16 (C-18).

BÖLÜM 5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Biyotransformasyon çalışmaları sonucunda elde edilen bileşiklerin yapılarını tayin amacıyla, androstendion (**5**) ile biyotransformasyon çalışmasından elde edilen bileşiklerin erime noktaları, ^1H NMR, ^{13}C NMR ve IR spektrumları karşılaştırıldı. Androstendion (**5**) bileşiğinin *A. wentii* MRC 200316 ile beş gün inkübasyonu iki metabolit verdi (Şekil 5.1.).



Şekil 5.1. Substratın *A. wentii* MRC 200316 ile biyotransformasyonu

Birinci metabolit δ_{H} 4,36 ppm (1H, t, $J = 3$ Hz) ve δ_{C} 72,66 ppm'de 6 β -hidroksil grubu için karakteristik olan yeni rezonanslar verdi [24]. Metabolitin çift bağ ve 19-metil rezonansları ise yakınlarındaki bir 6 β -hidroksil grubunun varlığını doğrulayacak şekilde aşağı alana doğru önemli kaymalar (sırası ile ve $\Delta\delta_{\text{H}}$ 0,09 ppm ve $\Delta\delta_{\text{H}}$ 0,17 ppm) gösterdi. Metabolit ^{13}C NMR spektrumu C-7 rezonansı için aşağı alana doğru bir kayma ($\Delta\delta_{\text{C}}$ 5,87 ppm) gösterirken C-8 rezonansı için ise yukarı alana doğru bir γ -gauche kayması ($\Delta\delta_{\text{C}}$ 5,76 ppm) vermesi bir 6 β -hidroksil grubunun varlığını daha fazla doğruladı. Bütün bu sonuçlar metabolitin 6 β -hidroksiandrostendion (**21**) olduğunu gösterdi.

İkinci metabolitin ^{13}C NMR spektrumunun δ_{C} 80,46 ppm'de bir hidroksil grubu varlığına işaret eden yeni bir C atomu rezonansı vermesine rağmen ^1H NMR spektrumunun 18-metil rezonansı için aşağı alana doğru bir kayma ($\Delta\delta_{\text{H}}$ 0,12 ppm)

göstermesi ve yeni bir proton sinyali gözlenmemesi C-14'de tersiyer bir hidroksil grubunun varlığını düşündürdü. Metabolit ^{13}C NMR spektrumu C-8 ve C-15 rezonansları için aşağı alana doğru kaymalar gösterirken (C-8 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 2,70 ppm ve C-15 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 7,61 ppm) C-7 ve C-16 rezonansları için ise yukarı alana doğru γ -gauche kaymaları (C-7 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 5,78 ppm ve C-16 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 1,97 ppm) gösterdi. Bu kayma değerleri bir 14 α -hidroksil grubunun varlığını kanıtladı. Bu sonuçlar metabolitin 14 α -hidroksiandrostendion (**16**) olduğunu gösterdi. Metabolitin ^1H ve ^{13}C NMR değerleri literatür ile de uyum gösterdi [24].

Tablo 5.1. Bileşikerin ^{13}C NMR spektrumu sinyalleri.

Karbon atomu	5	16	21
1	35,62	35,48	37,07
2	33,84	32,99	34,13
3	199,33	199,81	200,42
4	124,07	123,59	126,44
5	170,35	170,62	168,40
6	32,50	32,41	72,66
7	31,20	25,42	37,07
8	35,07	37,77	29,31
9	53,78	46,82	53,51
10	38,58	38,62	37,99
11	20,24	18,99	20,18
12	30,68	24,35	31,14
13	47,45	52,49	47,98
14	50,76	80,46	50,77
15	21,68	29,29	21,65
16	35,69	33,72	35,84
17	220,43	218,80	220,90
18	13,64	17,16	13,72
19	17,31	17,70	19,51

Daha önce Bölüm 2'de belirtildiği gibi *Aspergillus* türleri ile gerçekleştirilmiş steroid biyotransformasyonları genelde steroidlerin farklı kısımlarında gerçekleşen mikrobiyal hidroksilasyonlar ve Baeyer-Villiger oksidasyonları şeklinde

gerçekleşmiştir [10-14]. Literatürdeki mevcut çalışmalar gözden geçirildiğinde *A. wentii* MRC 200316 küfünün androstendion (5) bileşimini diğer *Aspergillus* türlerine göre daha farklı bir şekilde metabolize ettiği gözlenmiştir. Androstendion (5) bileşiminin *A. wentii* MRC 200316 ile biyotransformasyonu literatürdeki mevcut çalışmaların aksine ilk defa hem 6 β -hidroksiandrostendion (21) hem de 14 α -hidroksiandrostendion (16) bileşikleriyle sonuçlanmıştır. Daha önceki bir çalışmada 14 α -hidroksiandrostendion (16) bileşiği androstendion (5) bileşiminin *A.candidus* MRC 200634 ile biyotransformasyonundan elde edilirken [17] bir diğer çalışmada ise 6 β -hidroksiandrostendion (21) bileşiği substratın *A. niger* ATCC 9142 ile biyotransformasyonundan elde edilmiştir [20]. Bu çalışmalardaki 14 α -hidroksiandrostendion (16) ve 6 β -hidroksiandrostendion (21) bileşiklerinin verimleri androstendion (5) bileşiminin *A. wentii* MRC 200316 ile biyotransformasyonundaki verimlerinden çok daha düşük olarak gerçekleşmiştir [17,20].

Yaygın bir androstendion (5) metaboliti olan 6 β -hidroksiandrostendion (21) bileşiminin tansiyon yükselmesine neden olduğu bilinmektedir [25]. 14 α -hidroksiandrostendion (16) gibi 14 α -hidroksil grubu içeren steroidlerin oldukça yüksek gebelik önleyici, kanser engelleyici ve progesteron benzeri etkileri olduğu bilinmektedir [26].

Kısaca *A. wentii* MRC 200316 küfü androstendion (5) bileşimini diğer *Aspergillus* türlerine göre daha farklı bir şekilde metabolize etmiştir. *Aspergillus* ve diğer cinslere ait küfler ile fungal steroid biyotransformasyonu çalışmalarımız sürmektedir.

KAYNAKLAR

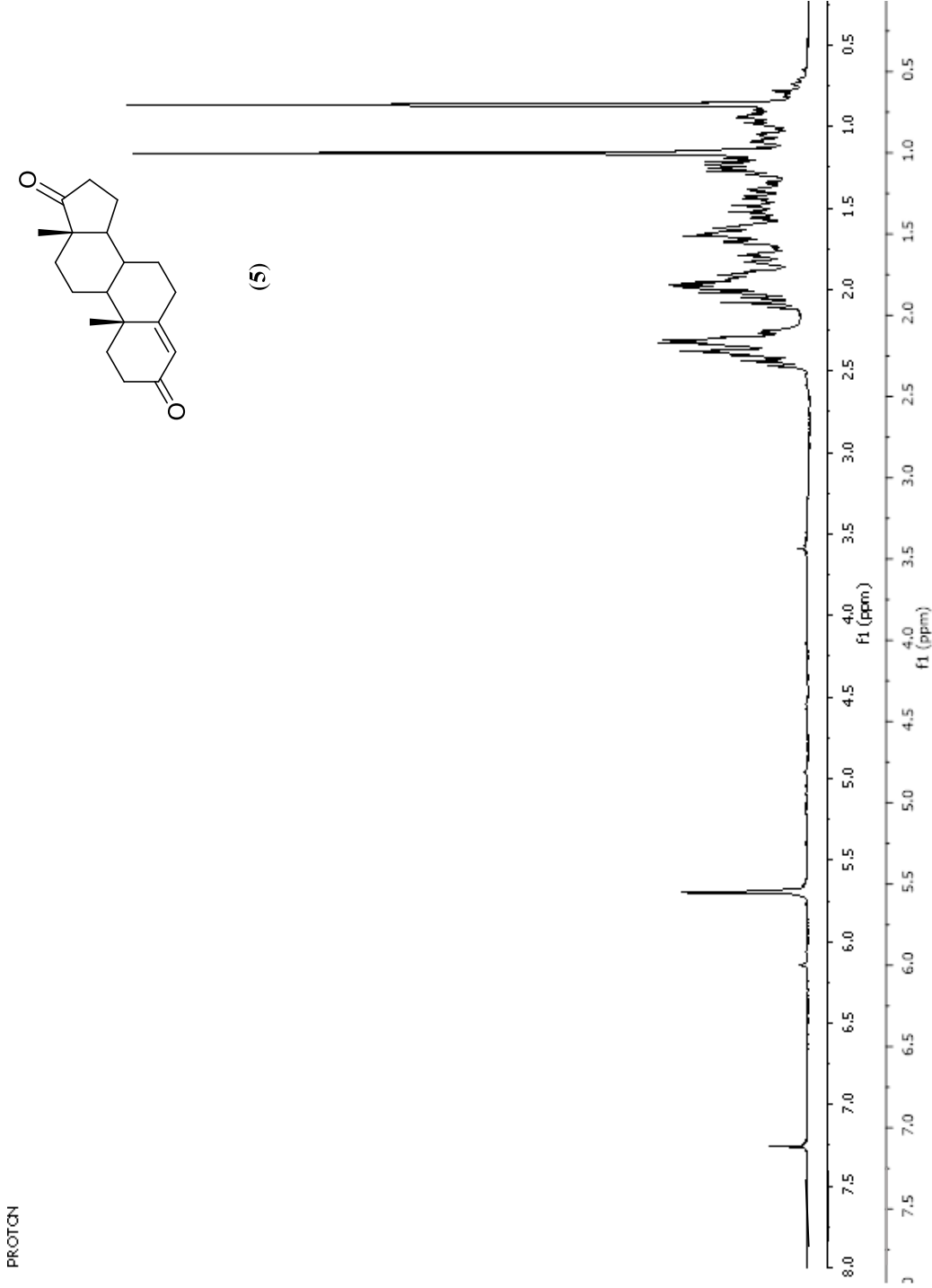
- [1] Hanson, J.R., Natural Products: The Secondary Metabolites, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1-2, 2003.
- [2] Clayden, J., Greeves, N., Warren, S., Wothers, P., Organic Chemistry, First edition, Oxford University Press, Oxford, 1413-1414, 2001.
- [3] Mann, J., Chemical Aspects of Biosynthesis, First edition, Oxford University Press, New York, 2-4, 1994.
- [4] Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E.Y., İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, 481-495, Ankara, 2002.
- [5] Keha, E. E., Küfrelioğlu, Ö. İ., Biyokimya, Dördüncü baskı, Aktif Yayınevi, 93-188, Erzurum, 2005.
- [6] Malaviya, A., Gomes, J., Rapid Screening and Isolation of a Fungus for Sitosterol to Androstenedione Biotransformation, Applied Biochemistry and Biotechnology, 158, 374-386, 2009.
- [7] Hanson, J.R., An Introduction to Biotransformations in Organic Chemistry, W.H. Freeman Spektrum, 1-62, New York, 1995.
- [8] Faber, K., Biotransformations in Organic Chemistry, Fifth Edition, Springer-Verlag, Berlin, 1-407, 2003.
- [9] Demain A.L., Small Bugs, Big Business: The Economic Power of the Microbe, Biotechnology Advances, 18, 499-514, 2000.
- [10] Donova, M.V., Egorova, O.V., Microbial Steroid Transformation: Current State and Prospects, Applied Microbiology and Biotechnology, 94, 1423-1447, 2012.
- [11] Fernandes, P., Cruz, A., Angelov, B., Pinheiro, H. M., Cabral, J. M. S., Microbial Conversion of Steroids Compounds: Recent Developments, Enzyme and Microbial Technology, 32, 688-705, 2003.
- [12] Mahato, S. B., Garai, S., Advances in Microbial Steroid Biotransformation, Steroids, 62, 332-345, 1997.
- [13] Mahato, S. B., Majumdar, I., Current Trends in Microbial Steroid Biotransformation, Phytochemistry, 34, 883-898, 1993.

- [14] Mahato, S. B., Banerjee, S., Podder, S., Steroid Transformations by Microorganisms-III, *Phytochemistry*, 28, 7-40, 1989.
- [15] Samson, R. A., Hong, S-B., Frisvad, J. C., Old and New Concepts of Species Differentiation in *Aspergillus*, *Medical Mycology*, 44, S133-S148, 2006.
- [16] Lee, S. K., Kang, H. G., Na, K. J., Han, J.I., Fungal Dermatitis Caused by *Aspergillus sydowii* in a Thoroughbred Horse. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32, 835-839, 2012.
- [17] Yildirim, K., Kuru, A., Keskin E., Salihoglu, A., Bukum, N., Biotransformation of Androst-4-ene-3,17-dione by Some Fungi, *Journal of Chemical Research*, 41, 594–597, 2017.
- [18] Brannon, D. R., Martin, J., Oehlschlager A. C., Durham, N. N., Zalkow, L. H., Transformation of Progesterone and Related Steroids by *Aspergillus tamaris*. *J. Org. Chem.*, 30, 760-762, 1965.
- [19] Faramarzi, M. A., Yazdi, M. T., Amini, M., Mohseni, F. A., Zarrini, G., Amani, A., Shafiee, A., Microbial Production of Testosterone and Testololactone in the Culture of *Aspergillus terreus*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, 657-660, 2004.
- [20] Auret, B. J., Holland, H. L., Microbiological 18-Hydroxylation of Steroids, *Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications*, 1157, 1971.
- [21] Yamashita, H., Shibata, K., Yamakoshi, N., Kurosawa, Y., Mori, H., Microbial 16 β -hydroxylation of Steroids with *Aspergillus niger*, *Agricultural and Biological Chemistry*, 40, 505–509, 1976.
- [22] Banerjee, S., Mukherjee, E., Mahato S. B., Metabolism of Androst-4-ene-3,17-dione by *Aspergillus fumigatus*, *Journal Chemical Research*, S236-S237, 1993.
- [23] Miyazawa, M., Takahashi, T., Sakata, K., Horibe, I., Biotransformation of Three Aromadendrane-type Sesquiterpenoids by *Aspergillus wentii*, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83,1006-1011, 2008.
- [24] Hanson, J.R., Nasir, H., Parvez, A., The Hydroxylation of Testosterone and Some Relatives by *Cephalosporium aphidicola*, *Phytochemistry*, 42, 411-415, 1996.
- [25] Sekihara, H., 6 β -Hydroxyandrostenedione: Evidence for a New Hypertensinogenic Agent, *Clinical and Experimental Hypertension. Part A*, 5,1-9, 1983.

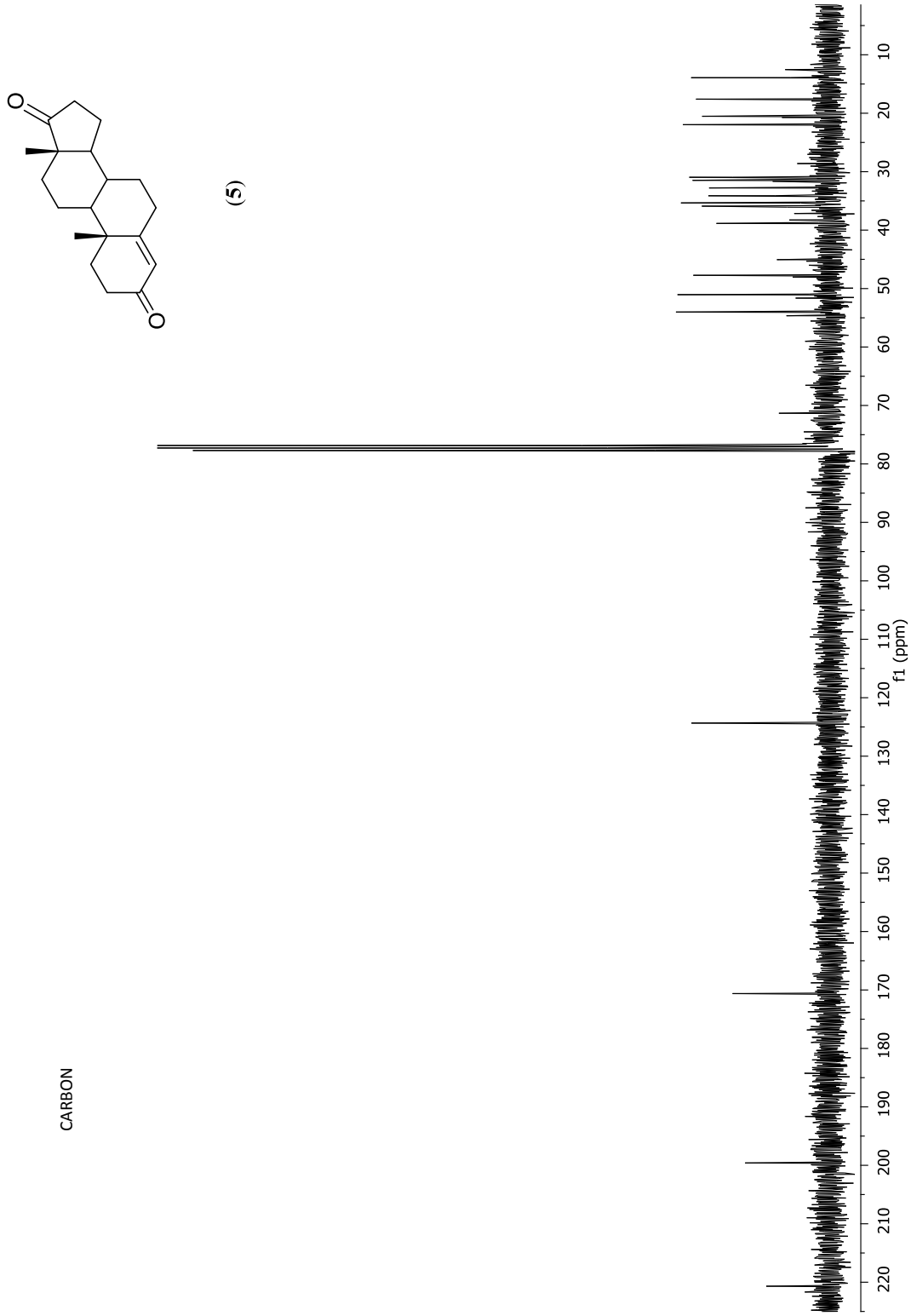
- [26] Yaderets, V.V., Andryushina, V.A., Voishvillo, N.E., Stytsenko, T.S., Studies of Synthesis Routes for Biologically Active 14α -hydroxylated Steroids, *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 43, 55-58, 2009.

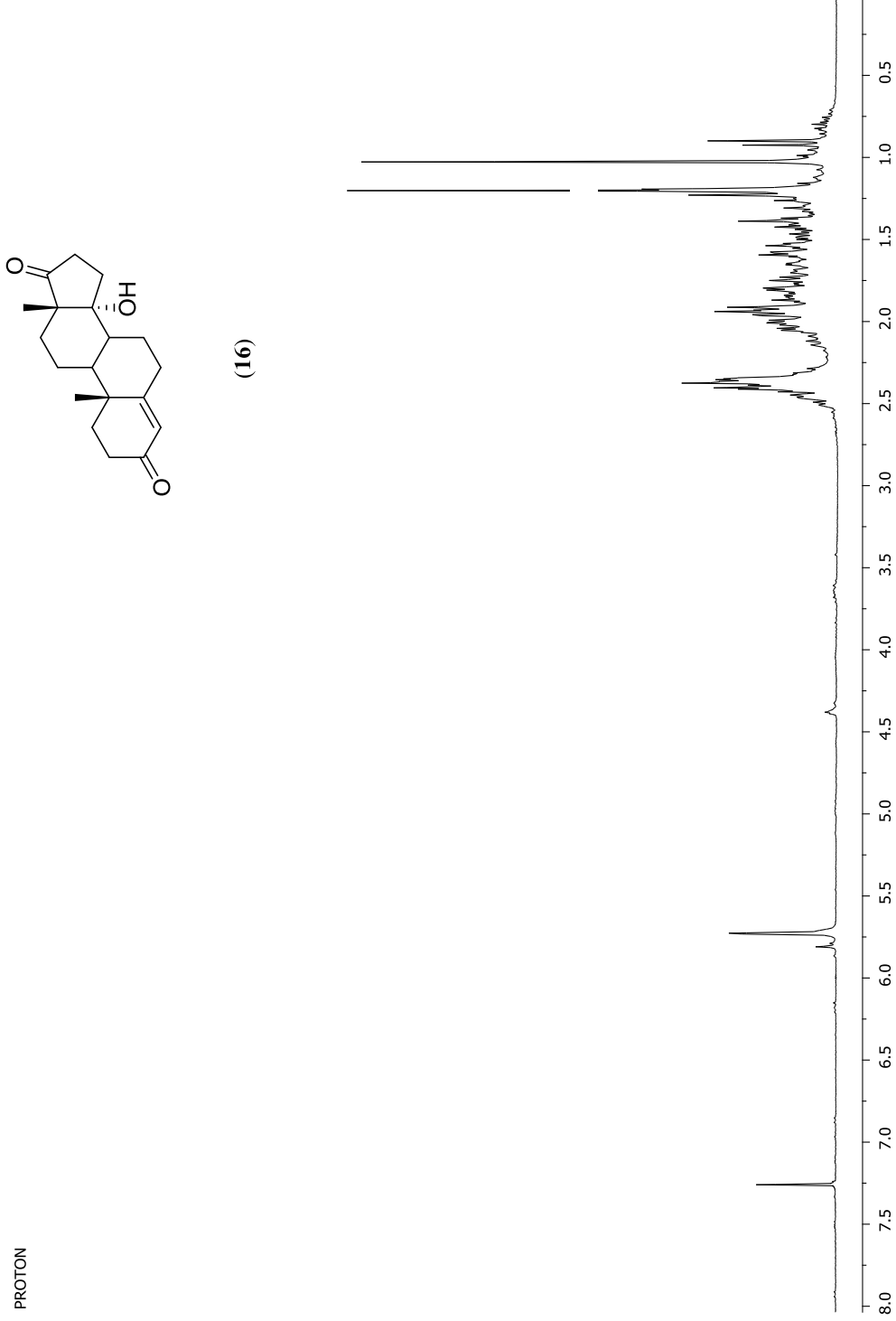
EKLER

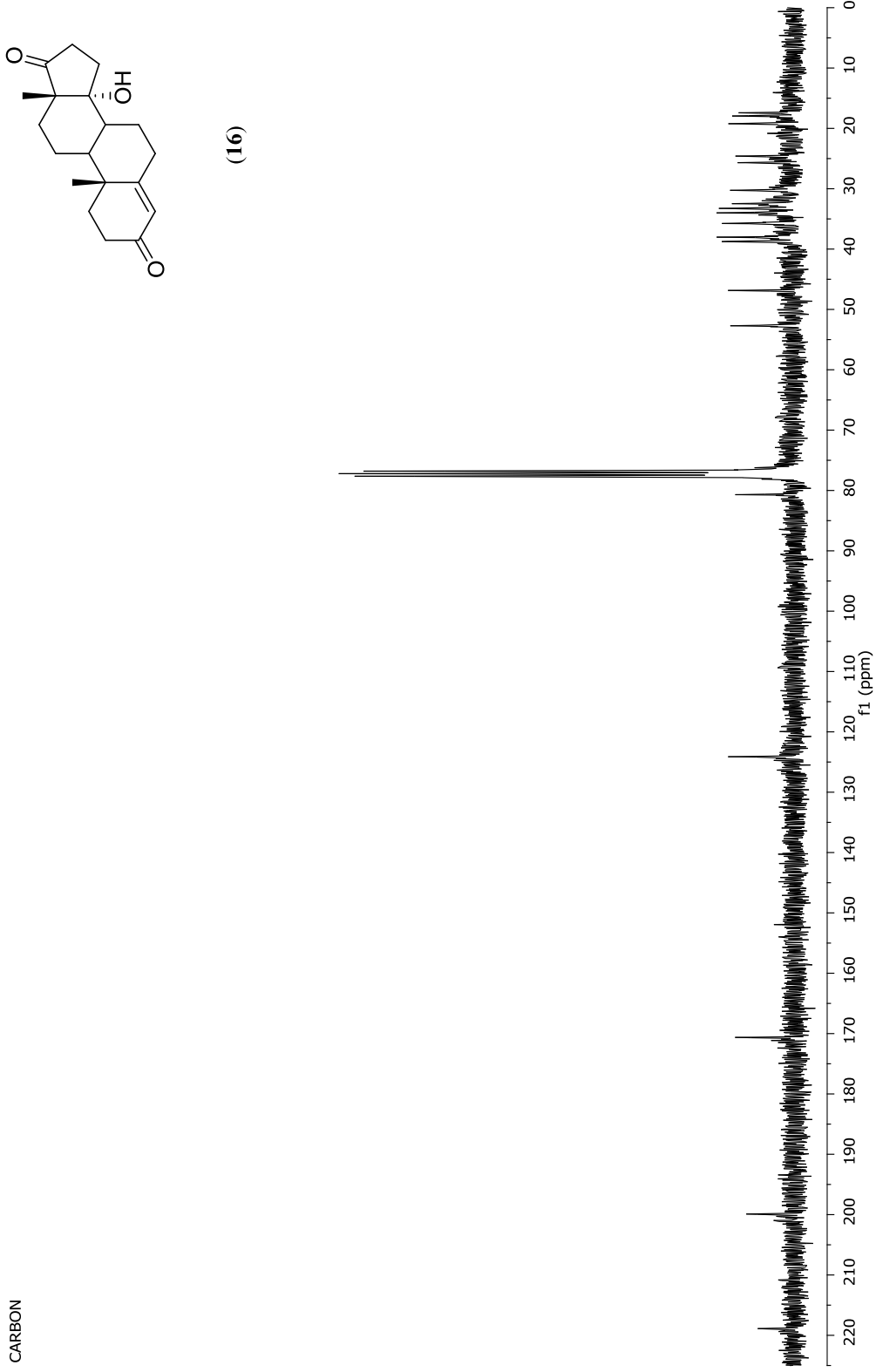
EK A: Androstendion (5) için ^1H NMR spektrumu

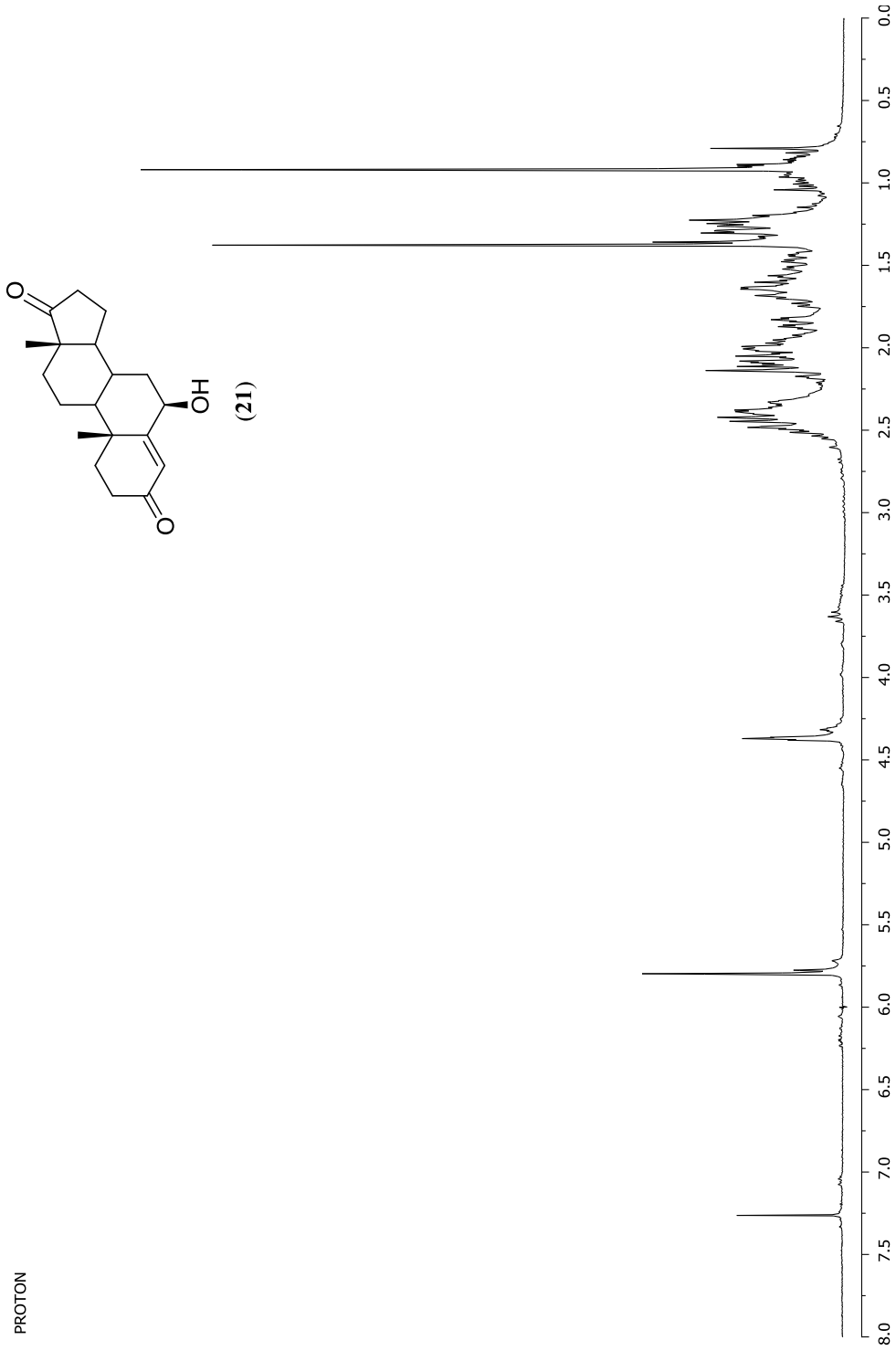


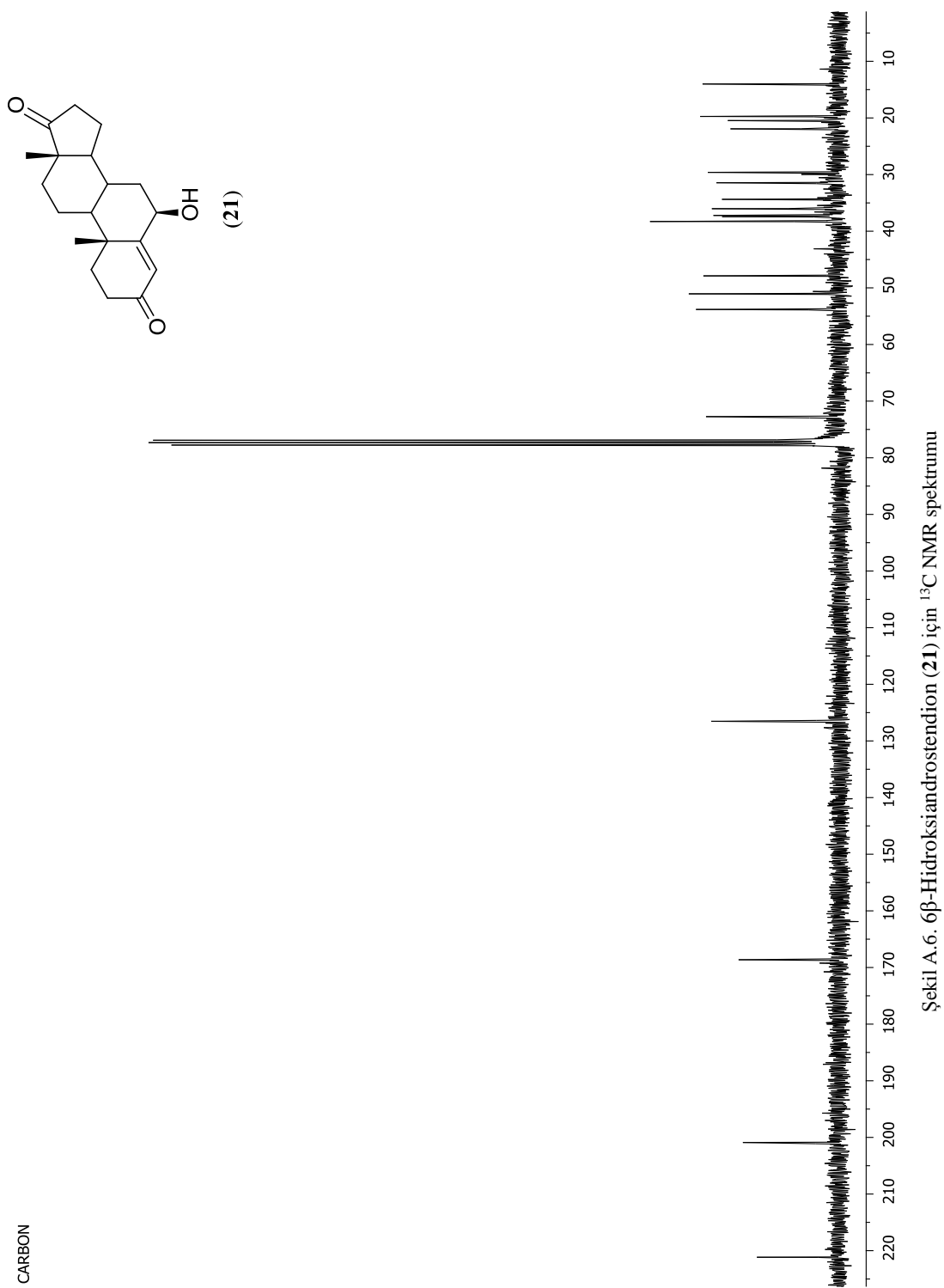
Şekil A.1. Androstendion (5) için ^1H NMR spektrumu

EK B: Androstendion (5) için ^{13}C NMR spektrumuŞekil A.2. Androstendion (5) için ^{13}C NMR spektrumu

EK C: 14 α -Hidroksiandrostandion (**16**) için ^1H NMR spektrumu

EK D: 14 α -Hidroksiandrostendion (16) için ^{13}C NMR spektrumuŞekil A.4. 14 α -Hidroksiandrostendion (16) için ^{13}C NMR spektrumu

EK E: 6 β -Hidroksiandrostendion (**21**) için ^1H NMR spektrumuŞekil A.5. 6 β -Hidroksiandrostendion (**21**) için ^1H NMR spektrumu

EK F: 6 β -Hidroksiandrostandion (21) için ^{13}C NMR spektrumu

ÖZGEÇMİŞ

Ece KESKİN, 1991 yılında Çanakkale’de doğdu. İlk ve orta öğrenimini Çanakkale’de tamamladı. 2009 yılında başladığı Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü 2014 yılında bitirdi. Yüksek lisans öğrenimine 2014 yılında Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında başladı.

Meslek hayatına 2014 yılı mayıs ayında Sakarya’da Toprak İlaç ve Kimyevi Maddeler San. ve Tic. A.Ş. şirketinde kalite kontrol uzmanı olarak başladı. Buradaki görevine iki sene kadar devam etti. Daha sonra, iş hayatına, 2016 yılı mart ayında Çerkezköy Vem İlaç Sanayi A.Ş.’de Ar-Ge Analitik Metod Validasyon Uzmanı olarak devam etti. Bir sene sekiz ay bu görevine devam ettikten sonra, 2017 yılı kasım ayında MS Pharma İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş.’de Ar-Ge Uzmanı olarak iş hayatını sürdürdü. Halen aynı şirkette Ar-Ge Uzmanı olarak görev yapmaktadır.