

T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PREGNENOLON BİLEŞİĞİNİN BAZI *ASPERGILLUS*  
TÜRLERİ İLE BİYOTRANSFORMASYONLARI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Emine Yasemin GÜLCÜOĞLU**

**Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA**

**Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA**

**Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Kudret Yıldırım**

**HAZİRAN 2010**

T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PREGNENOLON BİLEŞİĞİNİN BAZI ASPERGILLUS  
TÜRLERİ İLE BİYOTRANSFORMASYONLARI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Emine Yasemin GÜLCÜOĞLU**

**Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA**

**Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA**

**Bu tez 10 / 06 / 2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.**

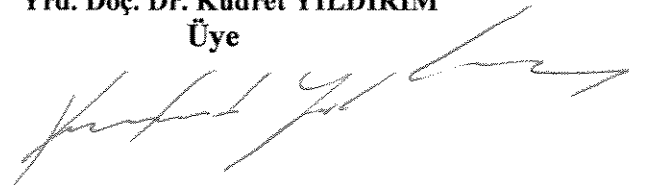
**Prof. Dr. Cavit UYANIK**  
**Jüri Başkanı**



**Prof. Dr. Ahmet TUTAR**  
**Üye**



**Yrd. Doç. Dr. Kudret YILDIRIM**  
**Üye**



## TEŞEKKÜR

Çalışmayı büyük bir titizlik ve sabırla yöneten, çalışma boyunca desteğini bir an bile esirgemeyen, bilgi ve tecrübesinden istifade ettiğim kıymetli hocam Yrd. Doç. Dr. Kudret YILDIRIM'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuardaki meşakkatli çalışmalarım esnasında kendi çalışmasından fedakarlık ederek bana desteğini esirgemeyen Dr. Araş. Gör. Semra YILMAZER'e teşekkürlerimi sunarım.

Lisans öğrenimim boyunca iyi bir kimyager olarak yetişmemde büyük katkıları olan Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyelerine ve araştırma görevlilerine teşekkürlerimi sunarım.

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

Nisan 2010

Emine Yasemin GÜLCÜOĞLU

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ÖZET.....	x
SUMMARY.....	xi
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.	
PREGNENOLON BİLEŞİĞİNİN KÜFLER İLE BİYOTRANSFORMASYONLARI.....	3
2.1. Pregnenolon Bileşiminin Küfler ile Biyotransformasyonları .....	3
2.2. Çalışmanın Amacı.....	11
BÖLÜM 3.	
MATERYAL VE METOT.....	13
3.1. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler.....	13
3.2. Taze Yatık Agar Kültürlerinin Hazırlanması.....	14
3.3. Substratın <i>Aspergillus</i> Türleri ile Biyotransformasyonları .....	14
3.3.1. Substratın <i>Aspergillus terreus</i> ile biyotransformasyonu.....	14
3.3.2. Substratın <i>Aspergillus tamarii</i> ile biyotransformasyonu.....	15

BÖLÜM 4.	
DENEYSEL BULGULAR.....	17
BÖLÜM 5.	
SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	20
KAYNAKLAR.....	24
EKLER.....	28
ÖZGEÇMİŞ.....	35

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

bs	: Broad singlet (küt singlet )
BVMO	: Baeyer-Villiger Monooksijenaz
<sup>0</sup> C	: Santigrat derece
cm	: Santimetre
<sup>13</sup> C NMR	: Karbon 13 Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
Δ	: Kimyasal kayma farkı
δ <sub>C</sub>	: <sup>13</sup> C NMR spektrumundaki kimyasal kayma
δ <sub>H</sub>	: <sup>1</sup> H NMR spektrumundaki kimyasal kayma
DHEA	: Dehidroepiandrosteron
DMF	: Dimetilformamit
d	: Dublet
e. n.	: Erime noktası
<sup>1</sup> H NMR	: Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
Hz	: Hertz
IR	: Infrared Spektroskopisi
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
<i>J</i>	: Etkileşme sabiti
lit.	: Literatür
m	: Multiplet
mg	: Miligram
MHz	: Megahertz
mL	: Mililitre
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
PDA	: Potato Dextrose Agar
pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonunun eksi logaritması
ppm	: Milyonda bir kısım
rpm	: Dakika başına dönüş sayısı

s : Singlet  
t : Triplet  
tt : Tripletin tripleti  
TÜBİTAK : Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Progesteronun <i>R. arrhizus</i> ile biyotransformasyonu .....	2
Şekil 2.1.	Pregnenolonun (3) <i>Botrytis cinerea</i> ile biyotransformasyonu.....	4
Şekil 2.2.	Pregnenolonun (3) <i>C. lunata</i> ve <i>M. plumbeus</i> ile biyotransformasyonları.....	4
Şekil 2.3.	Pregnenolonun (3) <i>P. camemberti</i> ve <i>A. tamarii</i> ile biyotransformasyonları.....	4
Şekil 2.4.	Pregnenolonun (3) <i>P. lilacinum</i> AM111 ile biyotransformasyonu....	5
Şekil 2.5.	Pregnenolonun (3) bazı <i>Mucor</i> türleri ile biyotransformasyonları ...	5
Şekil 2.6.	Pregnenolonun (3) <i>W. sclerotiorum</i> ile biyotransformasyonu.....	6
Şekil 2.7.	Pregnenolonun (3) <i>P. chrysosporium</i> ile biyotransformasyonu.....	6
Şekil 2.8.	Pregnenolonun (3) <i>R. tauricus</i> IMI23312 ile biyotransformasyonu..	6
Şekil 2.9.	Pregnenolonun (3) <i>F. culmorum</i> ile biyotransformasyonu.....	7
Şekil 2.10.	Pregnenolonun (3) <i>P. infestans</i> ile biyotransformasyonu.....	7
Şekil 2.11.	Pregnenolonun (3) <i>C. elegans</i> ile biyotransformasyonu.....	8
Şekil 2.12.	Pregnenolonun (3) <i>G. fujikuroi</i> ile biyotransformasyonu.....	8
Şekil 2.13.	Pregnenolonun (3) bir <i>Circinella</i> türü ile biyotransformasyonu.....	9
Şekil 2.14.	Pregnenolonun (3) <i>C. herbarum</i> ile biyotransformasyonu.....	9
Şekil 2.15.	Pregnenolonun (3) <i>C. decora</i> ile biyotransformasyonu.....	9
Şekil 2.16.	Pregnenolonun (3) <i>A. aureogulgens</i> ile biyotransformasyonu.....	10
Şekil 2.17.	Pregnenolonun (3) <i>F. oxysporum</i> ile biyotransformasyonu.....	10
Şekil 2.18.	Pregnenolonun (3) bir <i>Pycnosporium</i> türü ile biyotransformasyonu.	11
Şekil 4.1.	Substrat karbon iskeletinin numaralandırılması .....	17
Şekil 4.2.	Pregnenolonun (3) <i>A. terreus</i> ile biyotransformasyonu.....	18
Şekil 4.3.	Pregnenolonun (3) <i>A. tamarii</i> ile biyotransformasyonu.....	19



Şekil A.1.	Pregnenolon ( <b>3</b> ) bileşiğinin $^1\text{H}$ NMR spektrumu.....	29
Şekil A.2.	Pregnenolon ( <b>3</b> ) bileşiğinin $^{13}\text{C}$ NMR spektrumu.....	30
Şekil A.3.	$3\beta$ -Hidroksi-17a-okza-D-homo-androst-5-en-17-on ( <b>7</b> ) bileşiğinin $^1\text{H}$ NMR spektrumu.....	31
Şekil A.4.	$3\beta$ -Hidroksi-17a-okza-D-homo-androst-5-en-17-on ( <b>7</b> ) bileşiğinin $^{13}\text{C}$ NMR spektrumu.....	32
Şekil A.5.	17a-Okza-D-homo-androst-4-en-3,17-dion ( <b>8</b> ) bileşiğinin $^1\text{H}$ NMR spektrumu.....	33
Şekil A.6.	17a-Okza-D-homo-androst-4-en-3,17-dion ( <b>8</b> ) bileşiğinin $^{13}\text{C}$ NMR spektrumu.....	34

## TABLULAR LİSTESİ

Tablo 5.1. Bileşiklerin $^1\text{H}$ NMR spektrumu sinyallerinin karşılaştırılması .....	21
Tablo 5.2. Bileşiklerin $^{13}\text{C}$ NMR spektrumu sinyallerinin karşılaştırılması .....	22
Tablo 5.3. Bazı inkübasyon verimlerinin karşılaştırılması.....	23

## ÖZET

Anahtar Kelimeler: Biyotransformasyon, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus tamarii*, Pregnenolon.

Bu çalışmada Pregnenolon bileşğinin *Aspergillus terreus* MRC 200365 ve *Aspergillus tamarii* MRC 72400 küflerinde nasıl metabolize edileceğini incelemek için bileşğın söz konusu küfler ile biyotransformasyonları gerçekleştirildi. Bileşğın *Aspergillus terreus* MRC 200365 ve *Aspergillus tamarii* MRC 72400 ile inkübasyonları iki ayrı metabolit verdi.

Elde edilen metabolitlerin yapıları, erime noktaları, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, ve IR spektrumları ile tayin edildi. Her iki inkübasyondan 3β-hidroksi-17a-okza-D-homo-androst-5-en-17-on ve 17a-okza-D-homo-androst-4-en-3,17-dion bileşikleri elde edildi.

# THE BIOTRANSFORMATION OF PREGNENOLONE BY SOME ASPERGILLUS SPECIES

## SUMMARY

Keywords : Biotransformation, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus tamarii*, Pregnenolone.

In this work, pregnenolone was incubated with *Aspergillus terreus* MRC 200365 and *Aspergillus tamarii* MRC 72400 in order to see how it would be metabolized by these two fungi. Incubation with both *Aspergillus terreus* MRC 200365 and *Aspergillus tamarii* MRC 72400 afforded two metabolites.

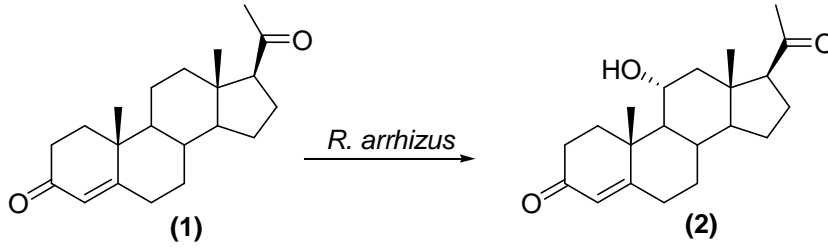
The structures of the metabolites were elucidated by the melting points,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR and IR spectra. Each incubation afforded 3 $\beta$ -hydroxy-17 $\alpha$ -oxa-D-homo-androst-5-en-17-one and 17 $\alpha$ -oxa-D-homo-androst-5-en-3,17-dione.

## BÖLÜM 1. GİRİŞ

Canlıların kendi doğal substratları olmayan maddeler üzerinde enzimleri veya enzimlerini içeren mikrozomlar, hücre kültürleri, doku kültürleri, organ kültürleri, mikroorganizmalar ya da mikroorganizma sporları gibi biyolojik sistemler yolu ile meydana getirdiği kimyasal değişikliklere biyotransformasyonlar adı verilir. En eski ve en iyi bilinen biyotransformasyonlardan ikisi sirke üretiminde etil alkolün bakteriler tarafından asetik aside oksidasyonu ve şekerin bira mayası tarafından etil alkole dönüştürülmesidir [1].

Biyotransformasyonlar için daha çok mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Bunun en önemli sebepleri arasında mikroorganizmalar ile gerçekleştirilen biyotransformasyonların çevre dostu olmaları, daha kısa sürede, daha ucuza ve erlenden fabrika fermentörüne kadar çeşitli ortamlarda gerçekleştirilebilmeleri sayılabilir. Mikroorganizmalar biyotransformasyonlar için serbest veya uygun yüzeylere sabitlenmiş olarak kullanılabilir ve en yaygın olarak kullanılan mikroorganizma grupları: küfler, mayalar, bakteriler ve mikrobiyal alglerdir [2].

Mikroorganizmalar spesifik olmayan enzim sistemleri sayesinde hem doğal hem de sentetik birçok substrat üzerinde çok sayıda farklı kimyasal reaksiyonlar gerçekleştirebilirler. Biyotransformasyon reaksiyonlarının en önemlilerinden birisi mikrobiyal hidroksilasyondur [1]. Mikrobiyal hidroksilasyonun önemi ilk olarak iltahap giderici olarak kullanılan kortikal steroidlerin sentezinde ortaya çıkmıştır [1, 3]. Bu steroidlerin sentezinde fonksiyonel grupların oldukça uzakta bulunan C-11'e bir oksijen fonksiyonu yerleştirmek klasik kimyasal yöntemlerle oldukça uzun ve masraflı bir işlem olmasına rağmen bahsedilen bu sorunun *Rhizopus arrhizus* küfünün progesteronu (1) 11 $\alpha$ -hidroksiprogesteron (2) bileşiğine dönüştürmesi (Şekil 1.1) ile çözülmesi dikkatleri mikrobiyal biyotransformasyonlar üzerine çekmiştir [1, 4].



Şekil 1.1. Progesteronun (1) *R. arrhizus* ile biyotransformasyonu

Mikrobiyal hidroksilasyonun öneminin anlaşılmasından sonra steroidler ve diğer birçok farklı madde üzerinde çok sayıda değişik mikroorganizma ile hidrolitik reaksiyonlar, mikrobiyal Baeyer-Villiger oksidasyonları, mikrobiyal kondensasyonlar, izomerleşme gibi yeni biyotransformasyon reaksiyonları gerçekleştirilmiştir [1]. Elde edilmeleri klasik sentez yöntemleri ile uzun sürede ve oldukça maliyetli olan steroidal ilaçlar ve hormonlar gibi çok sayıdaki önemli kimyasal maddeler mikrobiyal biyotransformasyonlar ile kolayca ve ucuza üretilebilmektedir. Bu amaç doğrultusunda halen birçok steroid özellikle farklı küf türleri ile biyotransformasyonlara maruz bırakılmaktadır [4].

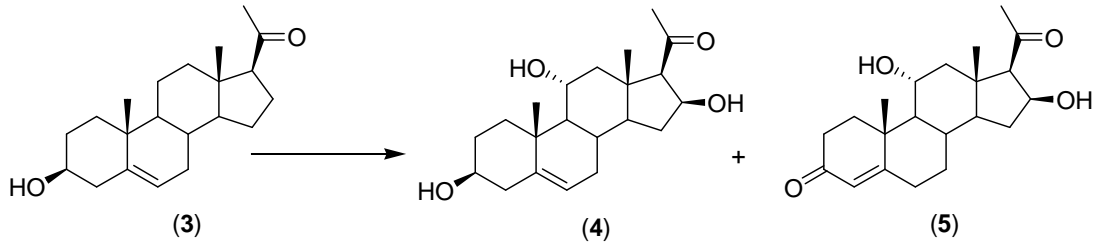
## **BÖLÜM 2. PREGNENOLON BİLEŞİĞİNİN KÜFLER İLE BİYOTRANSFORMASYONLARI**

Kolesterol bileşiği hayvansal membranlardaki akışkanlığının düzenlenmesinde önemli bir lipid olmasına ilaveten, steroid hormonlar, safra asitleri ve D<sub>3</sub> vitamini gibi birçok hayati fonksiyonu bulunan bileşiğin de başlangıç maddesidir [5]. Kolesterolde sentezlenen steroid hormonlar glukokortikoidler, mineralokortikoidler, androjenler, östrojenler ve progestagenler (progestinler) olmak üzere beş ana sınıfta incelenmektedir. Androjenler, östrojenler ve progestagenler ayrıca eşey hormonları olarak da bilinirler [6].

Steroid hormonların biyosentezinde kolesterol önce dezmolaz aktivitesi ile yan zinciri kısmen kısaltılarak pregnenolona (3) çevrilir. Bu bileşik steroid bir hormon olan progesterona (1) çevrildikten sonra bu hormondan diğer steroid hormonlar sentezlenmektedir [6]. Pregnenolon (3), ayrıca 16-en sentetaz enzimi aktivitesi sonucunda bir eşey feromonu ön maddesi olan 3 $\beta$ -hidroksiandrosta-5,16-dien bileşiğine de dönüşebilmektedir [7].

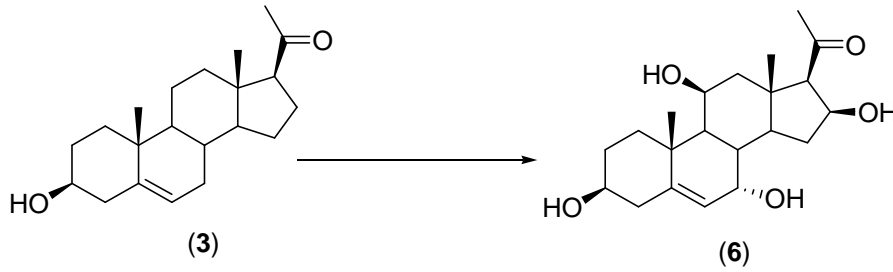
### **2.1. Pregnenolon Bileşiğinin Küfler ile Biyotransformasyonları**

Literatürde pregnenolon (3) bileşiğinin farklı küf türleri ile biyotransformasyonuna yönelik çok sayıda çalışma mevcuttur [8-29]. Söz konusu çalışmalar genellikle mikrobiyal hidroksilasyonlar, Baeyer-Villiger oksidasyonları ve mikrobiyal hidrojenasyonlar ile sonuçlanmıştır. Örneğin, *Botrytis cinerea* [8] ile gerçekleştirilen pregnenolon (3) biyotransformasyonundan 3 $\beta$ ,11 $\alpha$ ,16 $\beta$ -trihidroksipregn-5-en-20-on (4) ve 11 $\alpha$ ,16 $\beta$ -dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (5) bileşikleri elde edilmiştir (Şekil 2.1.).



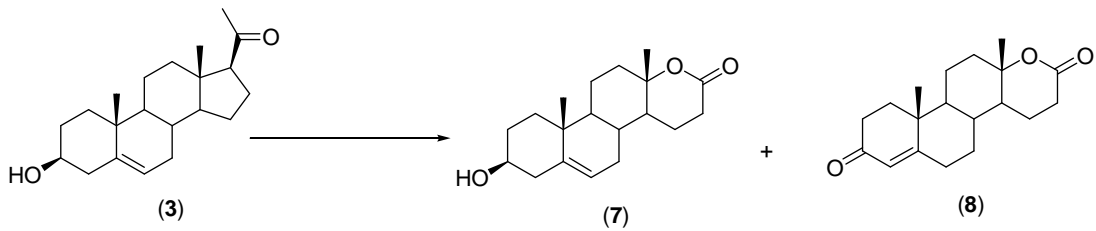
Şekil 2.1. Pregnenolonun (3) *Botrytis cinerea* ile biyotransformasyonu

*Curvularia lunata* VKPM F-981 [9] ve *Mucor plumbeus* küfleri ile pregnenolon (3) bileşiğinin biyotransformasyonları [10] sadece 3β,7α,11β-trihidroksipregn-5-en-20-on (6) ile sonuçlanmıştır (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Pregnenolonun (3) *C. lunata* ve *M. plumbeus* ile biyotransformasyonları

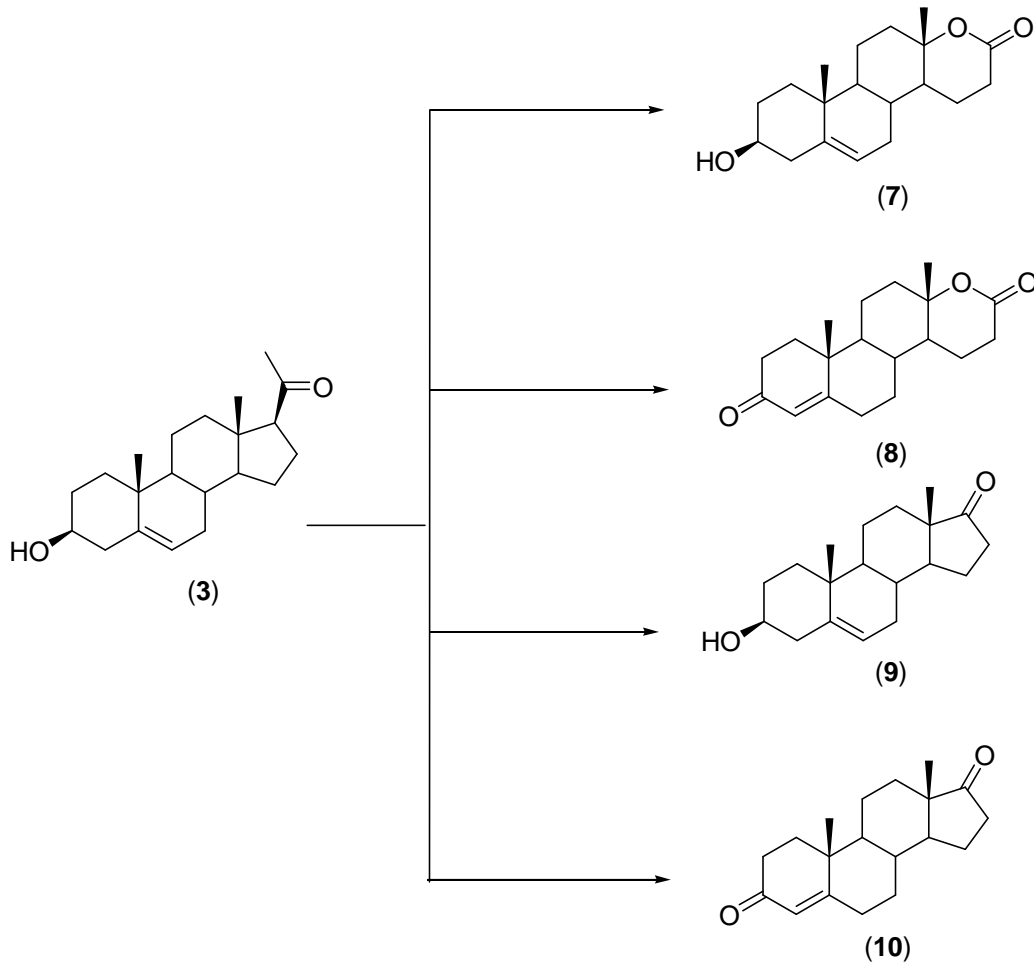
Pregnenolon (3) bileşiğinin *Penicillium camemberti* AM83 [11] ve *Aspergillus tamaris* QM 1223 [12] küfleri ile biyotransformasyonları 3β-hidroksi-17a-okza-D-homo-androst-5-en-17-on (7) ve 17a-okza-D-homo-androst-4-en-3,17-dion (8) bileşikleriyle sonuçlanmıştır (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Pregnenolonun (3) *P. camemberti* ve *A. tamaris* ile biyotransformasyonları

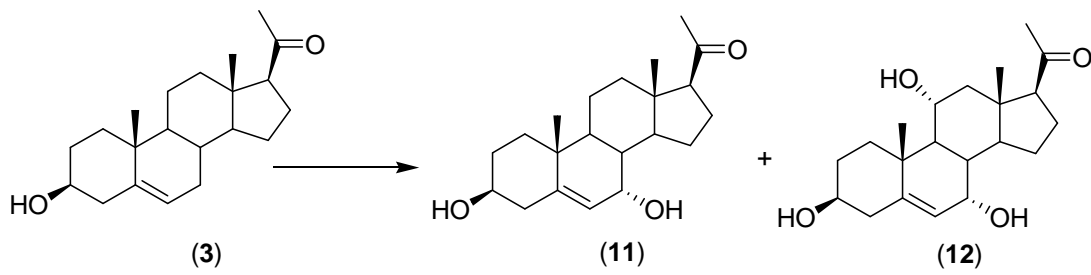
*Penicillium lilacinum* AM111 küfü ile gerçekleştirilen pregnenolon (3) biyotransformasyonu [13] neticesinde 3β-hidroksi-17a-okza-D-homo-androst-5-en-17-on (7), 17a-okza-D-homo-androst-4-en-3,17-dion (8), 3β-hidroksiandrost-5-en-17-on (9) ve androst-4-en-3,17-dion (10) bileşikleriyle elde edilmiştir (Şekil 2.4.).





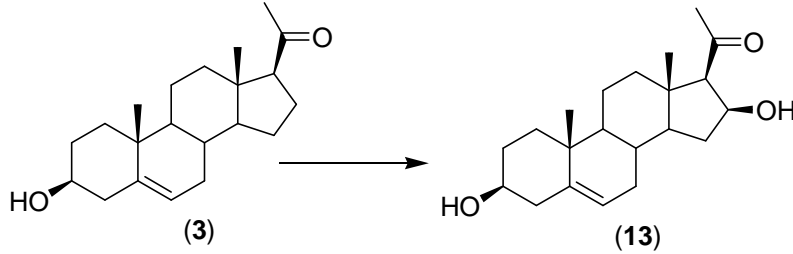
Şekil 2.4. Pregnenolonun (3) *P. lilacinum* AM111 ile biyotransformasyonu

Pregnenolon (3) bileşiğinin *Mucor circinelloides* var. *lusitanicus* [14], *Mucor piriformis* [15] ve *Mucor racemosus* ACCC 0401 [16] küfleri ile biyotransformasyonları 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -dihidroksipregn-5-en-20-on (11) ve 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -trihidroksipregn-5-en-20-on (12) bileşiklerini vermiştir (Şekil 2.5.).



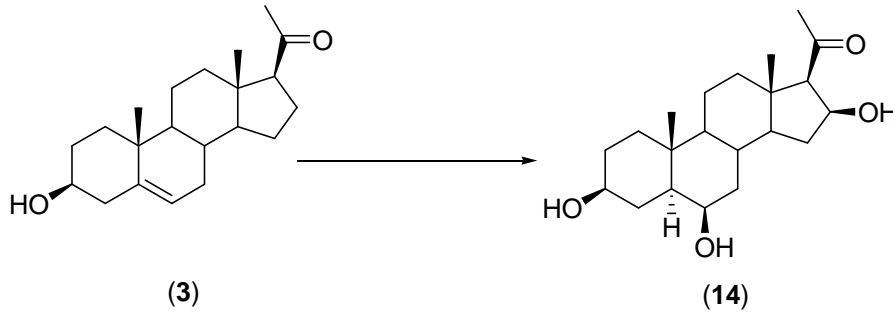
Şekil 2.5. Pregnenolonun (3) bazı *Mucor* türleri ile biyotransformasyonları

*Whetzelinia sclerotiorum* küfü ile gerçekleştirilen pregnenolon (3) biyotransformasyonu [10] sadece 3 $\beta$ ,16 $\beta$ -dihidroksipregn-5-en-7,20-dion (13) ile sonuçlanmıştır (Şekil 2.6.).



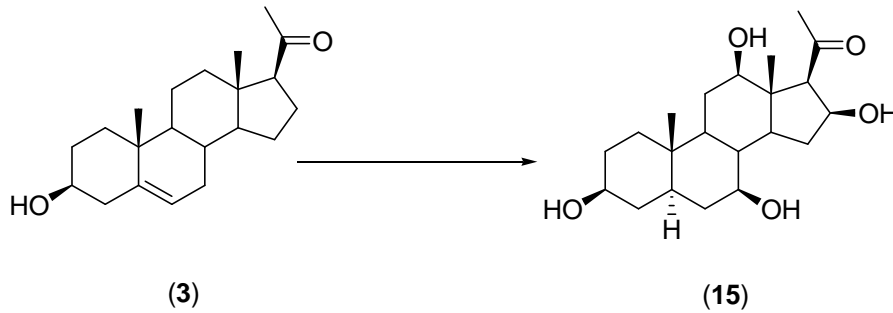
Şekil 2.6. Pregnenolonun (3) *W. sclerotiorum* ile biyotransformasyonu

Pregnenolon (3) bileşiğinin *Phanerochaete chrysosporium* ile biyotransformasyonu [10] sonucunda sadece 3 $\beta$ ,6 $\beta$ -Dihidroksi-5 $\alpha$ -pregnan-20-on (14) elde edilmiştir (Şekil 2.7).



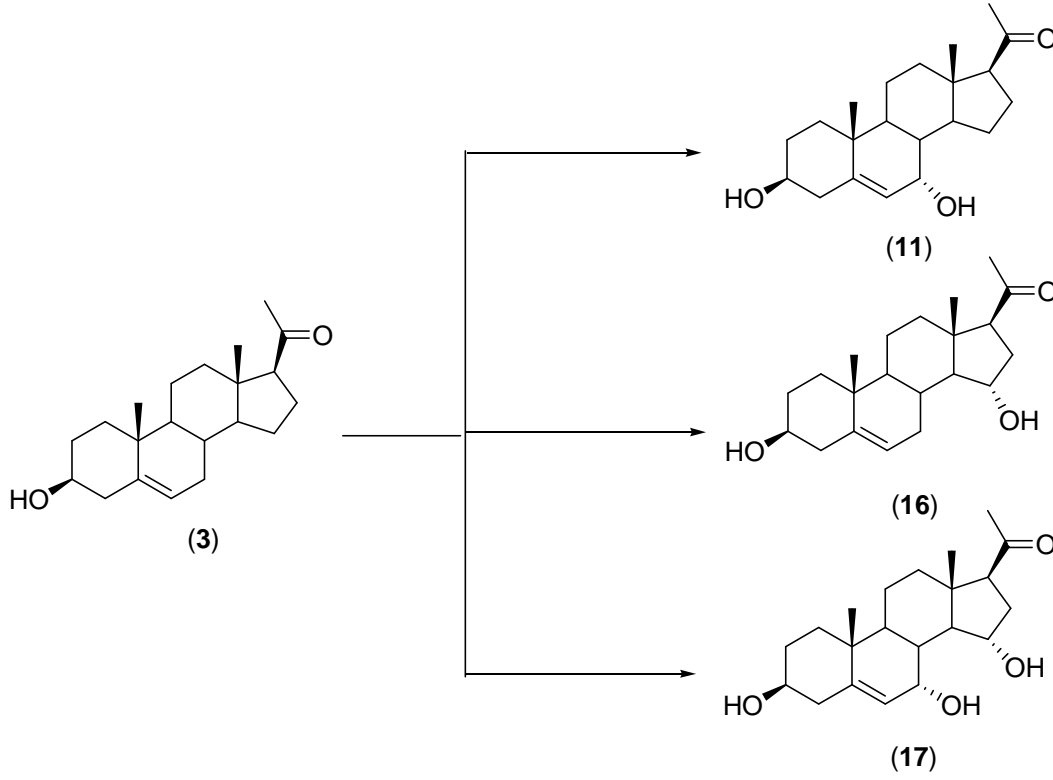
Şekil 2.7. Pregnenolonun (3) *P. chrysosporium* ile biyotransformasyonu

*Rhizomucor tauricus* IMI23312 küfü ile gerçekleştirilen pregnenolon (3) biyotransformasyonu [17] sadece 3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,12 $\beta$ -trihidroksipregn-4-en-20-on (15) ile sonuçlanmıştır (Şekil 2.8.).



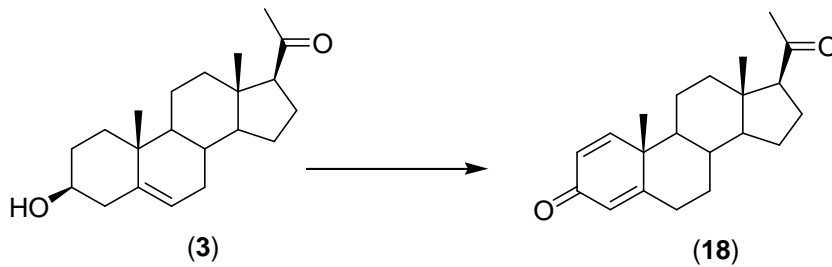
Şekil 2.8. Pregnenolonun (3) *R. tauricus* IMI23312 ile biyotransformasyonu

Pregnenolon (**3**) bileşiminin *Fusarium culmorum* küfü ile gerçekleştirilen biyotransformasyonu [18] 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -dihidroksipregn-5-en-20-on (**11**), 3 $\beta$ ,15 $\alpha$ -dihidroksipregn-5-en-20-on (**16**) ve 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,15 $\alpha$ -trihidroksipregn-5-en-20-on (**17**) bileşiklerini vermiştir (Şekil 2.9.).



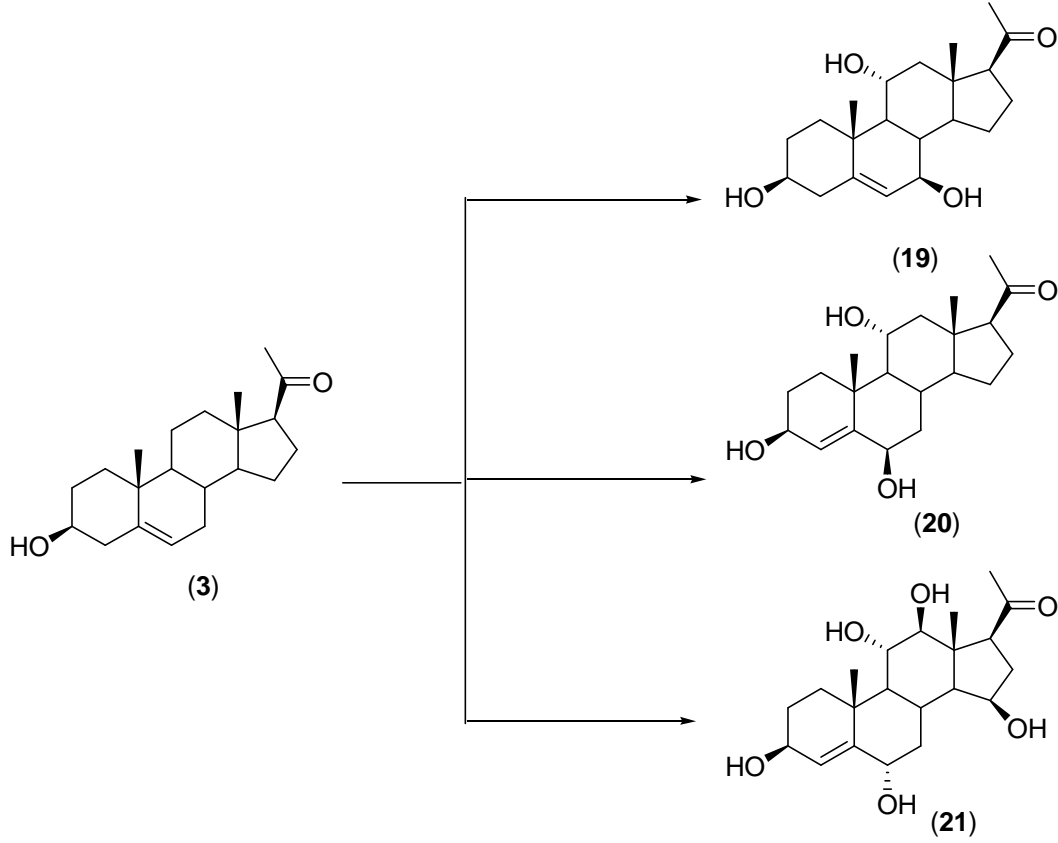
Şekil 2.9. Pregnenolonun (**3**) *F. culmorum* ile biyotransformasyonu

Pregnenolon (**3**) bileşiminin *Phytophthora infestans* küfü ile gerçekleştirilen biyotransformasyonu [19] sadece pregna-1,4-dien-3,20-dion (**18**) bileşimini vermiştir (Şekil 2.10.).



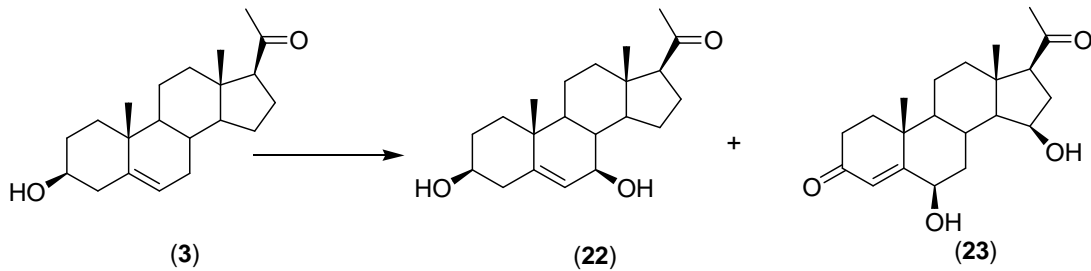
Şekil 2.10. Pregnenolonun (**3**) *P. infestans* ile biyotransformasyonu

*Cunninghamella elegans* TSY 0865 küfü ile gerçekleştirilen pregnenolon (**3**) biyotransformasyonu [20]  $3\beta,7\beta,11\alpha$ -trihidroksipregn-5-en-20-on (**19**),  $3\beta,6\beta,11\alpha$ -trihidroksipregn-5-en-20-on (**20**) ve  $3\beta,6\alpha,11\alpha,12\beta,15\beta$ -pentahidroksipregn-4-en-20-on (**21**) bileşikleri ile sonuçlanmıştır (Şekil 2.11.).



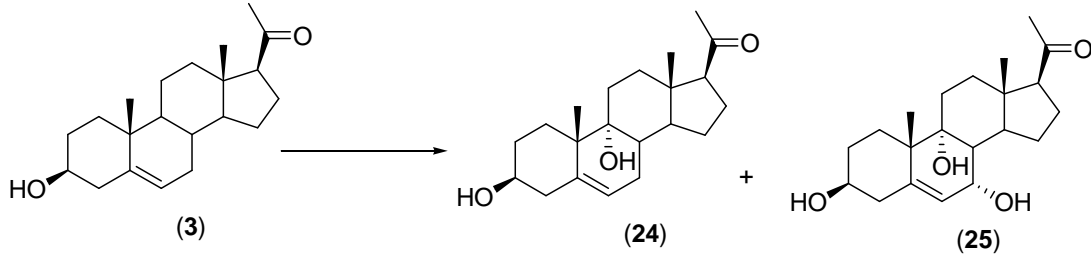
Şekil 2.11. Pregnenolonun (**3**) *C. elegans* ile biyotransformasyonu

Pregnenolon (**3**) bileşiğinin *Gibberella fujikuroi* ATCC 10704 ile biyotransformasyonu [20]  $3\beta,7\beta$ -dihidroksipregn-5-en-20-on (**22**) ve  $6\beta,15\beta$ -dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (**23**) bileşikleri ile sonuçlanmıştır (Şekil 2.12.).



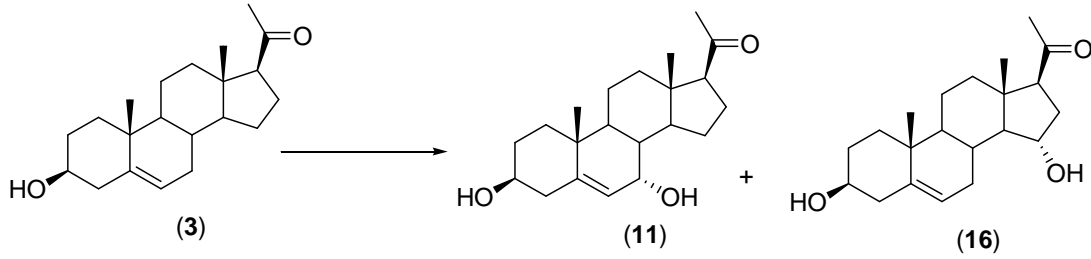
Şekil 2.12. Pregnenolonun (**3**) *G. fujikuroi* ile biyotransformasyonu

Bir *Circinella türü* ile gerçekleştirilen pregnenolon (3) biyotransformasyonu [21]  $3\beta,9\alpha$ -dihidroksipregn-5-en-20-on (24) ve  $3\beta,7\alpha,9\alpha$ -trihidroksipregn-5-en-20-on (25) bileşikleri ile sonuçlanmıştır (Şekil 2.13.).



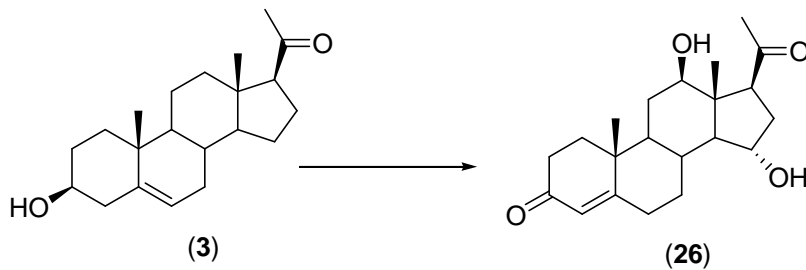
Şekil 2.13. Pregnenolonun (3) bir *Circinella türü* ile biyotransformasyonu

Pregnenolon (3) bileşiğinin *Cladosporium herbarum* ile biyotransformasyonu [22]  $3\beta,7\alpha$ -dihidroksipregn-5-en-20-on (11) ve  $3\beta,15\alpha$ -dihidroksipregn-5-en-20-on (16) bileşikleri ile sonuçlanmıştır (Şekil 2.14.).



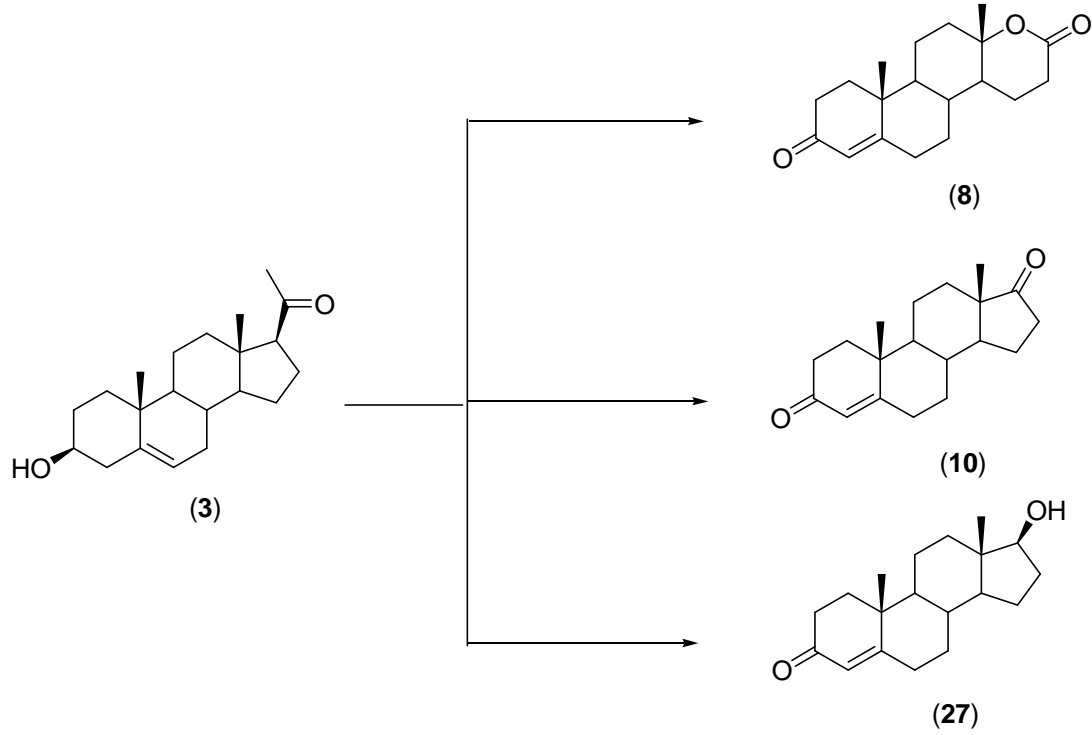
Şekil 2.14. Pregnenolonun (3) *C. herbarum* ile biyotransformasyonu

*Calonectria decora* ile gerçekleştirilen pregnenolon (3) biyotransformasyonu [23]  $12\beta,15\alpha$ -dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (26) bileşiğini vermiştir (Şekil 2.15.).



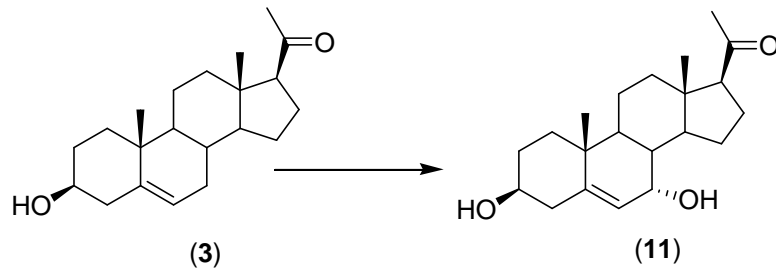
Şekil 2.15. Pregnenolonun (3) *C. decora* ile biyotransformasyonu

*Aspergillus aureogulgens* küfö ile gerçekleştirilen pregnenolon (3) biyotransformasyonu [24] 17a-okza-D-homo-androst-4-en-3,17-dion (8), androst-4-en-3,17-dion (10) ve 17β-hidroksiandrost-4-en-3-on (27) bileşikleri ile sonuçlanmıştır (şekil 2.16.).



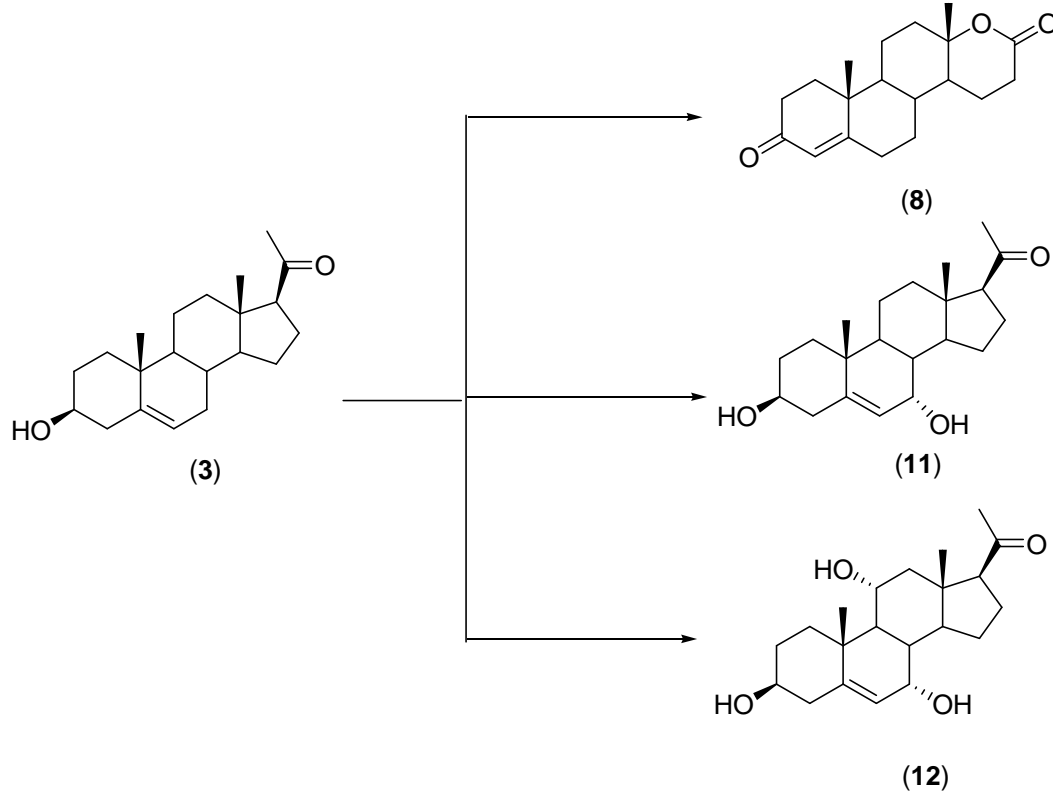
şekil 2.16. Pregnenolonun (3) *A. aureogulgens* ile biyotransformasyonu

Pregnenolon (3) bileşiğinin *Fusarium oxysporum* IMI 326069 ile biyotransformasyonu [25] sadece 3β,7α-dihidroksipregn-5-en-20-on (11) bileşiğini vermiştir (şekil 2.17.).



şekil 2.17. Pregnenolonun (3) *F. oxysporum* ile biyotransformasyonu

Pregnenolon (**3**) bileşiğinin bir *Pycnosporium* türü ile biyotransformasyonundan [26] 17 $\alpha$ -okza-D-homo-androst-4-en-3,17-dion (**8**), 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -dihidroksipregn-5-en-20-on (**11**) ve 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -trihidroksipregn-5-en-20-on (**12**) bileşikleri elde edilmiştir (Şekil 2.18.).



Şekil 2.18. Pregnenolonun (**3**) bir *Pycnosporium* türü ile biyotransformasyonu

*Fusarium moliniforme* küfü ile gerçekleştirilen pregnenolon (**3**) biyotransformasyonu [27] 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -dihidroksipregn-5-en-20-on (**11**) ile yapıları tayin edilemeyen diğer bazı bileşikler vermiştir. Bir *Chaetomium* türü ile gerçekleştirilen pregnenolon (**3**) biyotransformasyonu [28] izolasyonları ve yapı tayinleri gerçekleştirilemeyen birçok bileşik vermiştir. *Penicillium citroeviride* [29] ile gerçekleştirilen pregnenolon (**3**) biyotransformasyonu ise sadece değişmeyen başlangıç maddesini vermiştir.

#### 2.4. Çalışmanın Amacı

Steroidler, mikroorganizmalar ile özellikle de küfler tarafından dönüştürülebilen önemli doğal bileşiklerdir [1, 4]. Küfler ile steroid biyotransformasyonları için en sık

kullanılan türlerin birçoğu *Aspergillus* cinsine aittir [4]. *Aspergillus* ve diğer bazı küf cinslerine ait türler sahip oldukları etkin enzim sistemleri sayesinde dünyanın neredeyse her yerinde yaşayabilen canlılardır [1,4].

Bu çalışmanın amacı pregnenolon (**3**) bileşiğinin *Aspergillus terreus* MRC 200365 ve *Aspergillus tamaris* MRC 72400 küflerinde nasıl metabolize edileceğinin incelenmesidir.



## BÖLÜM 3. MATERYAL VE METOT

### 3.1. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler

Biyotransformasyon çalışmalarında kullanılan besiyeri ve cam malzemelerin sterilizasyonu 121 °C'de 20 dakika süre ile Nüve OT 020 marka otoklav ile gerçekleştirildi. Küflerin geliştirilmesi ve biyotransformasyon çalışmaları için Gerhardt THO 500 Laboshake Çalkalamalı İnkübatör kullanıldı. Infrared spektrumları, Shimadzu IR Prestige-21 spektrometre cihazı ile alındı. <sup>1</sup>H NMR spektrumları tetrametilsilan standart iç sinyal olarak kullanılarak, 300 MHz'de döterokloroform içerisinde ve Varian Mercury 300 NMR spektrometresi kullanılarak alındı. <sup>13</sup>C NMR spektrumları, aynı cihaz kullanılarak 75 MHz'de döterokloroform içerisinde alındı. Steroidleri ayırmak için adsorban olarak Merck kalite silika jel 60 (230-400 mesh) içeren Kolon kromatografisi gerçekleştirildi ve bu bileşikler hekzan içerisinde artan etil asetat konsantrasyonları elüent olarak kullanılarak kolondan ayrıldı. Biyotransformasyon deneyinin sonucu ve kolon kromatografi çalışmalarının sonuçları ince tabaka kromatografisi (İTK) ile izlendi. İTK 0,25 mm kalınlığında silika jel tabakaları (Merck silika jel GF254) ve etil asetat-hekzan (1:1) çözgen sistemi kullanılarak yapıldı. İTK tabakalarındaki bileşikler *p*-anisaldehit-sülfürik asit reaktifine daldırıldıktan sonra 120 °C'de 3 dakika ısıtıldıktan sonra görünür hale getirildi. Erime noktaları Elektro thermal IA 9200 erime noktası tayin cihazı ile tespit edildi.

*Aspergillus terreus* MRC 200365 ve *Aspergillus tamarisii* MRC 72400 küfleri TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi Gıda Teknoloji ve Araştırma Enstitüsü'nden yatık agar besiyerilerindeki stok kültürleri olarak temin edildi. Stok kültürler PDA içeren yatık agar besiyerlerinde ve 4 °C'de muhafaza edildi. Pregnenolon (3) bileşiği Fluka şirketinden satın alındı. Tüm solventler, yatık agar besiyerleri için kullanılan PDA ve agar ile küfler için hazırlanan besiyerinde

kullanılan malt ekstrakt Merck şirketinden temin edildi. *Aspergillus terreus* MRC 200365 için % 2'lik malt ekstrakt besiyeri [30] kullanılırken *Aspergillus tamarii* MRC 72400 için % 3'lük malt ekstrakt besiyeri [31] kullanıldı.

### **3.2. Taze Yatık Agar Kültürlerin Hazırlanması**

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

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

### **3.3. Substratın *Aspergillus* Türleri ile Biyotransformasyonları**

#### **3.3.1. Substratın *Aspergillus terreus* ile biyotransformasyonu**

% 2'lik 1 L malt ekstrakt besiyeri 10 adet 250 mL erlene paylaştırıldıktan sonra otoklavda sterilize edildi. Daha önce hazırlanan en taze alt kültürdeki küf erlenlerden her birine steril şartlar altında nakledildi. Bu erlenler yeterli miktarda küf oluşabilmesi için 3 gün boyunca 32°C'de çalkalamalı inkübatörde (160 rpm) inkübasyona bırakıldı.

Pregnenolon (**3**) (500 mg) DMF (10 mL) içerisinde çözünerek yeterli miktarda küf içeren erlenlere eşit hacimlerde, steril koşullar altında ilave edildikten sonra 5 gün süresince 32 °C' de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon işlemi tamamlandıktan sonra, besiyeri bir Buchner hunisi yardımıyla filtrasyon işlemine tabi tutuldu ve besi yeri küf kültürüne ait misellerden süzülerek ayrıldı. Buchner hunisinde kalan miseller etil asetat (500 mL) kullanılarak yıkandı. Filtrat her seferinde 1 L etil asetat kullanılarak 3 ayrı ekstraksiyona maruz bırakıldı. Daha sonra toplanan ekstraktlara susuz sodyum sülfat katılarak ortamda bulunabilecek su uzaklaştırıldı. Etil asetat evaporatörde uzaklaştırıldıktan sonra yağimsı bir madde (747 mg) elde edildi.

Yağimsı madde daha sonra silika jel 60 üzerinde kolon kromatografisine tabi tutuldu. Kolon kromatografisi kolonunda çözgen sistemi olarak hekzan içerisinde artan oranlarda etil asetat kullanıldı. %30'luk çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde başlangıç maddesi ile aynı polariteye sahip bir bileşik elde edildi. %50 ve %60'luk çözgen sistemleriyle elüsyonlar neticesinde ise farklı polaritelere sahip iki ayrı bileşik elde edildi.

### **3.3.2. Substratın *Aspergillus tamarii* ile biyotransformasyonu**

% 3'lük 1 L malt ekstrakt besiyeri 10 adet 250 mL erlene paylaştırıldıktan sonra otoklavda sterilize edildi. Daha önce hazırlanan en taze alt kültürdeki küf erlenlerden her birine steril şartlar altında nakledildi. Bu erlenler yeterli miktarda küf oluşabilmesi için 3 gün boyunca 25°C'de çalkalamalı inkübatörde (180 rpm) inkübasyona bırakıldı.

Pregnenolon (**3**) (500 mg) DMF (10 mL) içerisinde çözünerek yeterli miktarda küf içeren erlenlere eşit hacimlerde, steril koşullar altında ilave edildikten sonra 7 gün süresince 25 °C' de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

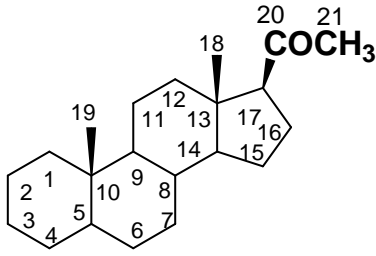
İnkübasyon işlemi tamamlandıktan sonra, besiyeri bir Buchner hunisi yardımıyla filtrasyon işlemine tabi tutuldu ve besi yeri küf kültürüne ait misellerden süzülerek

ayrıldı. Buchner hunisinde kalan miseller etil asetat (500 mL) kullanılarak yıkandı. Filtrat her seferinde 1 L etil asetat kullanılarak 3 ayrı ekstraksiyona maruz bırakıldı. Daha sonra toplanan ekstraktlara susuz sodyum sülfat katılarak ortamda bulunabilecek su uzaklaştırıldı. Etil asetat evaporatörde uzaklaştırıldıktan sonra yağimsı bir madde (730 mg) elde edildi.

Yağimsı madde daha sonra silika jel 60 üzerinde kolon kromatografisine tabi tutuldu. %30'luk çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde başlangıç maddesi ile aynı polariteye sahip bir bileşik elde edildi. %50 ve %60'luk çözgen sistemleriyle elüsyonlar neticesinde ise farklı polaritelere sahip iki ayrı bileşik elde edildi.

## BÖLÜM 4. DENEYSEL BULGULAR

Pregnenolon (**3**) bileşiğinin *Aspergillus* türleri ile biyotransformasyonlarından elde edilen bileşiklerin yapılarını belirlemek için hem başlangıç maddesinin hem de elde edilen bileşiklerin  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, IR spektrumları alındı ve erime noktaları tayin edildi. Bileşiklere ait  $^1\text{H}$  NMR ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumları Ekler Bölümünde verildi. Biyotransformasyonları gerçekleştirilen başlangıç maddesine ait karbon iskeletinin numaralandırılması Şekil 4.1'deki gibidir.



Şekil 4.1. Substrat karbon iskeletinin numaralandırılması

Pregnenolon (**3**) bileşiğinin *A. terreus* küfü ile 32 °C'de 5 gün süren inkübasyonu neticesinde başlangıç maddesi (200 mg), 3 $\beta$ -hidroksi-17a-okza-D-homo-androst-5-en-17-on (**7**) (100 mg, %20.8) ve 17a-okza-D-homo-androst-4-en-3,17-dion (**8**) (110 mg, %23) bileşikleri elde edildi. Elde edilen başlangıç maddesinin yapısı  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumlarının pregnenolon (**3**) bileşiğinin  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumlarının karşılaştırılmasıyla anlaşıldı.

3 $\beta$ -Hidroksi-17a-okza-D-homo-androst-5-en-17-on (**7**)

Etil asetatın iğneler şeklinde kristaller.

e. n.: 234-235 °C, (lit. [13] e.n.: 227-230 °C).

IR: 3440, 1720, 1650.

$^1\text{H}$  NMR: 0,98 (3H, s, 19-H); 1,34 (3H, s, 18-H); 3,54 (1H, tt,  $J = 5$  ve 11 Hz, 3 $\alpha$ -H); 5,35 (1H, d,  $J = 5$  Hz, 6-H).

$^{13}\text{C}$  NMR: 171,76; 140,53; 120,52; 83,26; 71,41; 48,86; 46,60; 41,70; 38,80; 36,81; 36,50; 34,35; 31,28; 30,98; 28,71; 21,88; 20,01; 19,78; 19,23.

17a-Okza-D-homo-androst-4-en-3,17-dion (**8**)

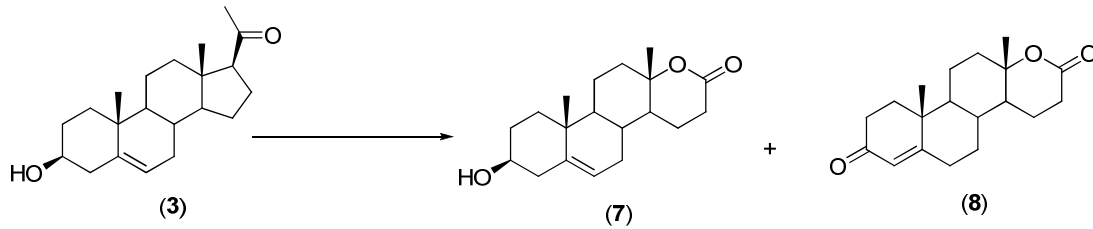
Metanolden iğneler şeklinde kristaller

e. n.: 206-207 °C, (lit. [32] e. n.: 210-212 °C).

IR: 1740, 1640.

$^1\text{H}$  NMR: 1,17 (3H, s, 19-H); 1,37 (3H, s, 18-H); 5,78 (1H, bs, 4-H).

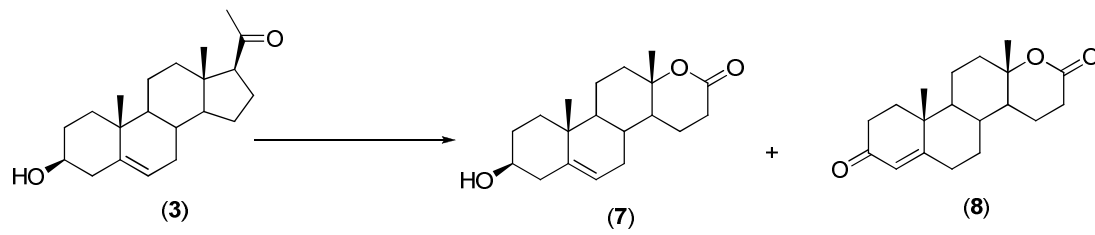
$^{13}\text{C}$  NMR: 198,98; 171,01; 169,32; 123,82; 82,58; 52,24; 45,43; 38,75; 38,24; 37,70; 35,26; 33,62; 32,13; 30,17; 28,31; 21,60; 19,87; 19,61; 17,18.



Şekil 4.2. Pregnenolonun (3) *A. terreus* ile biyotransformasyonu

Pregnenolon (**3**) bileşiğinin *A. tamarii* küfü ile 25 °C’de 5 gün süren inkübasyonu neticesinde başlangıç maddesi (205 mg), 3β-hidroksi-17a-okza-D-homo-androst-5-en-17-on (**7**) (120 mg, % 25) ve 17a-okza-D-homo-androst-4-en-3,17-dion (**8**) (129 mg, % 27) bileşikleri elde edildi. Elde edilen başlangıç maddesinin yapısı  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumlarının pregnenolon (**3**) bileşiğinin  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumlarının karşılaştırılmasıyla anlaşıldı.

Elde edilen 3β-hidroksi-17a-okza-D-homo-androst-5-en-17-on (**7**) ve 17a-okza-D-homo-androst-4-en-3,17-dion (**8**) bileşiklerinin yapıları ise  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumlarının pregnenolon (**3**) bileşiğinin *A. terreus* ile biyotransformasyonundan elde edilen metabolitlerin  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumlarının karşılaştırılmasıyla tespit edildi.



Şekil 4.3. Pregnenolonun (3) *A. tamarii* ile biyotransformasyonu

## BÖLÜM 5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Biyotransformasyon çalışmaları sonucunda elde edilen yeni bileşiklerin yapılarını tayin amacıyla pregnenolon (**3**) ile biyotransformasyonlardan elde edilen bileşiklerin  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, IR spektrumları alındı ve erime noktalarının tayini yapıldı.

Pregnenolonun (**3**) *A. terreus* ile inkübasyonu sonucunda farklı polaritelere sahip iki metabolit elde edildi. İlk metabolitin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu başlangıç maddesinin yapısındaki  $3\beta$ -hidroksil grubu ile C-5'deki çift bağın korunduğunu gösteren sırası ile  $\delta_{\text{H}}$  3,54 (1H, tt,  $J = 5$  ve  $J = 11$  Hz) ve  $\delta_{\text{H}}$  5,35 (1H, d,  $J = 5$  Hz) rezonanslarını gösterdi (Tablo 5.1.). Pregnenolonun (**3**)  $\delta_{\text{C}}$  43,94 ppm'deki C-13 rezonansı aşağı alana doğru  $\delta_{\text{C}}$  83,26 ppm'e bir kayma gösterdi ( $\Delta$  39,32). Pregnenolonun (**3**)  $\delta_{\text{H}}$  0,60 ve  $\delta_{\text{C}}$  13,16 ppm değerlerinde gözlenen 18-metil grubu rezonansları aşağı alana doğru sırası ile  $\delta_{\text{H}}$  1,34 ppm ( $\Delta$  0,74) ve  $\delta_{\text{C}}$  20,01 ppm ( $\Delta$  6,85) değerlerine kaymalar şeklinde gözlemlendi. Aşağı alana doğru gözlenen bu kaymalar D halkasına bir oksijen atomunun yerleştirildiğini düşündürdü. Metabolit  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumunun başlangıç maddesinin  $\delta_{\text{C}}$  209,72 ppm'deki karbonil karbonuna ait rezonansı içermemesi ve  $\delta_{\text{C}}$  171,76 ppm'de yeni bir karbon atomu rezonansı göstermesi steroidal bir D lakton oluşumuyla uyuyordu (Tablo 5.2.). Bütün bu sonuçlar elde edilen ilk metabolitin  $3\beta$ -hidroksi-17 $\alpha$ -okza-D-homo-androst-5-en-17-on (**7**) olduğunu ispatladı.

İkinci metabolitin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu, başlangıç maddesindeki  $3\beta$ -hidroksil grubunun varlığını gösteren  $\delta_{\text{H}}$  3,54 ppm'deki rezonansını (1H, tt,  $J = 5$  ve  $J = 11$  Hz) içermeyişi gözlemlendi. Metabolitin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu başlangıç maddesi  $^1\text{H}$  NMR spektrumu  $\delta_{\text{H}}$  5,31 ppm'deki olefinik protonun rezonansının (1H, d,  $J = 5$  Hz) yerine  $\delta_{\text{H}}$  5,78 ppm'de yeni bir olefinik proton rezonansı (1H, bs) gösterdi (Tablo 5.1.). Pregnenolon (**3**) bileşiğinin  $\delta_{\text{H}}$  0,98 ppm'de gözlenen 19-metil grubu rezonansı yukarı alana doğru  $\delta_{\text{H}}$  1,17 ppm'e ( $\Delta$  0,19) bir kayma gösterdi. Bütün bu



sonuçlardan başlangıç maddesi yapısındaki 3-hidroksi grubunun 3-karbonil grubuna çevrilirken C-5'deki çift bağın ise C-4'e kaydığı anlaşıldı. Pregnenolon (**3**) bileşiğinin  $\delta_C$  43,94 ppm'deki C-13 rezonansı aşağı alana doğru  $\delta_C$  82,58 ppm'e bir kayma gösterdi ( $\Delta$  38,64). Pregnenolonun (**3**)  $\delta_H$  0,60 ve  $\delta_C$  13,16 ppm değerlerinde gözlenen 18-metil grubu rezonansları aşağı alana doğru sırası ile  $\delta_H$  1,37 ppm ( $\Delta$  0,77) ve  $\delta_C$  19,87 ppm ( $\Delta$  6,71) değerlerine kaymalar gösterdi. Aşağı alana doğru gözlenen bu kaymalar D halkasına bir oksijen atomunun yerleştirildiğini düşündürdü. Metabolit  $^{13}C$  NMR spektrumunun başlangıç maddesinin  $\delta_C$  209,72 ppm'deki karbonil karbonuna ait rezonansı içermemesi ve  $\delta_C$  171,01 ppm'de yeni bir karbon atomu rezonansı göstermesi steroidal bir D lakton oluşumuyla uyuyordu (Tablo 5.2.). Bütün bu sonuçlar elde edilen bileşiğin 17a-okza-D-homo-androst-4-en-3,17-dion (**8**) olduğunu gösterdi.

Pregnenolonun (**3**) *A. tamarisii* ile inkübasyonu sonucunda yine farklı polaritelere sahip iki metabolit elde edildi. İlk metabolitin 3 $\beta$ -hidroksi-17a-okza-D-homo-androst-5-en-17-on (**7**) olduğu  $^1H$  ve  $^{13}C$  NMR spektrumlarının pregnenolon (**3**) bileşiğinin *A. terreus* ile biyotransformasyonundan elde edilen ilk metabolitin  $^1H$  ve  $^{13}C$  NMR spektrumlarının karşılaştırılmasıyla anlaşıldı. İkinci metabolitin 17a-okza-D-homo-androst-4-en-3,17-dion (**8**) olduğu ise pregnenolon (**3**) bileşiğinin *A. terreus* ile biyotransformasyonundan elde edilen ikinci metabolitin  $^1H$  ve  $^{13}C$  NMR spektrumlarının karşılaştırılmasıyla tespit edildi.

Tablo 5.1. Bileşiklerin  $^1H$  NMR spektrumu sinyallerin karşılaştırılması

Bileşik	3-H	4-H	6-H	18-CH <sub>3</sub>	19-CH <sub>3</sub>	21-CH <sub>3</sub>
<b>3</b>	3,45 (tt, $J=5$ ve 11 Hz)	*	5,31 (d, $J=5$ Hz)	0,60	0,98	2,10
<b>7</b>	3,54 (tt, $J=5$ ve 11 Hz)	*	3,35 (d, $J=5$ Hz)	1,34	0,98	-
<b>8</b>	-	5,78 (bs)	*	1,37	1,17	-

\* 2 geminal proton mevcuttur

Pregnenolonun (**3**) hem *Aspergillus terreus* MRC 200365 hem de *Aspergillus tamarisii* MRC 72400 ile biyotransformasyonları aynı substratın literatürdeki *Aspergillus tamarisii* QM 1223 [12] ile inkübasyonunda olduğu gibi 3 $\beta$ -hidroksi-17a-okza-D-homo-androst-5-en-17-on (**7**) ve 17a-okza-D-homo-androst-4-en-3,17-dion (**8**)

bileşikleri ile sonuçlandı. Elde edilen bu bileşikler steroidal D laktonlar olarak bilinirler. Steroidal laktonlar antikanserojenik [33,34], antiandrojenik [35-36] ve antihiperkolesterolemik [37] etkileri sebebi ile tıbbi açıdan önemli bileşiklerdir.

Table 5.2. Bileşiklerin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu sinyallerinin karşılaştırılması

Karbon atomu numarası	Bileşik		
	3	7	8
1	37,16	36,81	35,26
2	31,52	31,28	33,62
3	71,54	71,41	198,98
4	42,11	41,70	123,82
5	140,71	140,53	169,32
6	121,30	120,52	32,13
7	31,68	30,98	30,17
8	31,75	34,35	37,70
9	49,85	48,86	52,24
10	36,42	36,50	38,24
11	20,99	21,88	21,60
12	38,73	38,80	38,75
13	43,94	83,26	82,58
14	56,80	46,60	45,43
15	24,41	19,78	19,61
16	22,70	28,71	28,31
17	63,60	171,76	171,01
18	13,16	20,01	19,87
19	19,32	19,23	17,18
20	209,72		
21	31,46		

Steroidal D laktonların sentetik olarak elde edilmesi esnasında özellikle kullanılan reaktiflerin çevre kirliliğine sebep olmaları yüzünden günümüzde mikrobiyal biyotransformasyonlar bu amaç için daha çok tercih edilmektedir [38]. Çeşitli mikroorganizmalar bazı  $\text{C}_{21}$  steroidlerin  $17\beta$ -asetil yan zincirlerini stereospesifik olarak uzaklaştırarak yada doğrudan bazı androjenleri steroidal D laktonlara dönüştürebilmektedir. Bu reaksiyonlar çoğu bakteri ve küfte bulunan Baeyer-Villiger monooksijenaz enzimleri (BVMO) tarafından gerçekleştirilirler. Özellikle bazı küfler

bir keto fonksiyonu yanına oksijen atomu ekleyerek birçok farklı ketonu ilgili esterlere veya laktonlara çevirebilirler [13].

Tablo 5.2.'den de görülebileceği gibi pregnenolonun (3) literatürdeki *Aspergillus tamarii* QM 1223 [12] ile inkübasyonlarından elde edilen verimler *Aspergillus terreus* MRC 200365 ile elde edilen verimlerden daha yüksek olmasına rağmen *Aspergillus tamarii* MRC 72400 ile elde edilenlerden daha düşüktür. Kısaca *Aspergillus tamarii* MRC 72400 küfü diğerlerine göre daha etkin bir inkübasyon sağlamıştır.

Tablo 5.3. Bazı inkübasyon verimlerinin karşılaştırılması

Küf	Bileşik	Verim (%)
<i>Aspergillus terreus</i> MRC 200365	(7)	20,8
	(8)	23
<i>Aspergillus tamarii</i> QM 1223	(7)	21
	(8)	25,6
<i>Aspergillus tamarii</i> MRC 72400	(7)	25
	(8)	27

Bu çalışma sonucunda pregnenolon (3) bileşiğinden elde edilen ve tıbbi önemi olabilecek [33-37] steroidal laktonların daha yüksek verimler ile elde edilmesi için steroidlerin daha önce aynı amaç doğrultusunda kullanılmamış diğer bazı küfler ile biyotransformasyonlarına yönelik çalışmalarımız sürecektir.

## KAYNAKLAR

- [1] HANSON, J.R., An Introduction to Biotransformations in Organic Chemistry, W.H. Freeman Spektrum, 1-62, New York, 1995.
- [2] ARNOLD, L., Small Bugs, Big Business: The Economic Power of the Microbe, Biotechnology Advances, 18, 499-514, 2000.
- [3] PETERSON, D. H., MURRAY, H. C., Microbial Oxygenation of Steroids at Carbon 11, Journal of the American. Chemical Society, 74, 1871-1872, 1952.
- [4] 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.
- [5] KEHA, E., KÜFREVİOĞLU, Ö. İ., Biyokimya, Dördüncü baskı, Aktif Yayınevi, 185-188, Erzurum, 2005.
- [6] ONAT, T., EMERK, K., SÖZMEN, E.Y., İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, 481-495, Ankara, 2002.
- [7] OEI, S. G., DERKSEN, J., WEUSTEN, J. J. A. M., LENTJES, E. G. W. M., HELMERHORST, F. M., A Case of 16-ene-synthetase Deficiency in Male Pseudohermaphroditism due to Combined 17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20-lyase deficiency, European Journal of Endocrinology, 132, 281-285, 1995.
- [8] FAROOQ, A., TAHARA, S., Biotransformation of Testosterone and Pregnenolone Catalyzed by the Fungus *Botrytis cinerea*, Journal of Natural Products, 63, 489-491, 2000.
- [9] ANDRYUSHINA, V. A., DRUZHININA, A. V., YADERETS, V. V., STYTSENKO, T. S., VOISHVILLO. N. E., 7 $\alpha$  -Hydroxylation of Steroid 5-olefins by Mold Fungi, Applied Biochemistry and Microbiology, 46, 69-74, 2010.
- [10] LAMM, A. S., CHEN, A. R. M., REYNOLDS, W. F., REESE, P. B., Steroid Hydroxylation by *Whetzelinia sclerotiorum*, *Phanerochaete chrysosporium* and *Mucor plumbeus*, Steroids, 72, 713-722, 2007.
- [11] KOŁEK, T., SZPINETER, A., ŚWIZDOR, A., Studies on Baeyer-Villiger Oxidation of Steroids DHEA and Pregnenolone D-lactonization Pathways in *Penicillium camembertii* AM83, Steroids, 74, 859-862, 2009.

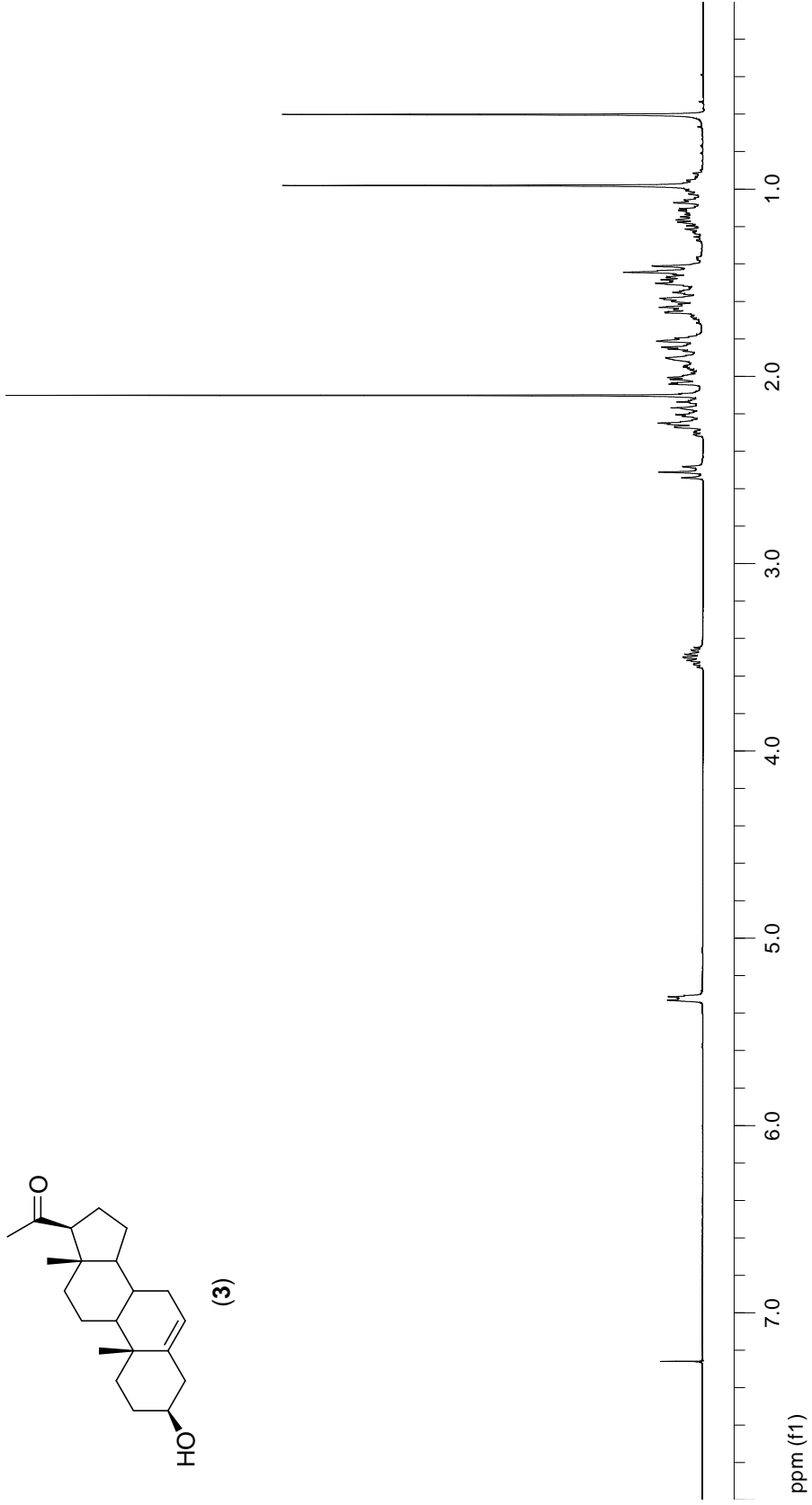
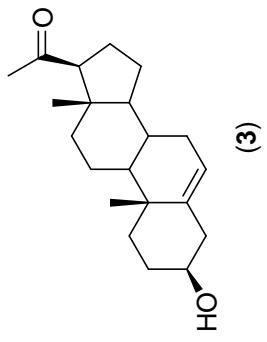
- [12] HUNTER, A. C., COYLE, E., MORSE, F., DEDI, C., DODD, H. T., KOUSSOROPLIS, S. J., Transformation of 5-ene Steroids by the Fungus *Aspergillus tamarii* KITA: Mixed Molecular Fate in Lactonization and Hydroxylation Pathways with Identification of a Putative 3 $\beta$ -hydroxy-Steroid Dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  Isomerase Pathway, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1791, 110-117, 2009.
- [13] KOŁEK, T., SZPINETER, A., ŚWIZDOR, A., Baeyer-Villiger Oxidation of DHEA, Pregnenolone, and Androstenedione by *Penicillium lilacinum* AM111, *Steroids*, 73, 1441-1445, 2008.
- [14] SHAN, L. H., LIU, H. M., HUANG, K. X., DAI, G. F., CAO, C., DONG, R. J., Synthesis of 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -trihydroxy-pregn-21-benzylidene-5-20-one Derivatives and their Cytotoxic Activities, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 19, 6637-6639, 2009.
- [15] MADYASTHA, K. M., JOSEPH, T., Transformation of Dehydroepiandrosterone and Pregnenolone by *Mucor piriformis*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44, 339-343, 1995.
- [16] GE, W. Z., WANG, S. M., SHAN, L. H., LI, N., LIU, H. M., Transformation of 3 $\beta$ -hydroxy-5-ene-Steroids by *Mucor racemosus*, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 55, 37-42, 2008.
- [17] HUNTER, A. C., MILLS, P. W., DEDI, C., DODD, H. T., Predominant Allylic Hydroxylation at Carbons 6 and 7 of 4 and 5-ene Functionalized Steroids by Thermophilic Fungus *Rhizomucor tauricus* IMI23312, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 108, 155-163, 2008.
- [18] KOŁEK, T., Biotransformation XLVII: Transformations of 5-ene Steroids in *Fusarium culmorum* Culture, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 71, 83-89, 1999.
- [19] HOLLAND, H. L., TAYLOR, G. J., Transformations of Steroids and Steroidal Alkaloid, Sollanine, by *Phytophthora infestans*, *Phytochemistry*, 18, 437-440, 1979.
- [20] CHOUDHARY, M. I., BATOOL, I., SHAH, S. A., NAWAZ, S. A., RAHMAN, A-U., Microbial Hydroxylation of Pregnenolone Derivatives, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 53, 1455-1459, 2005.
- [21] VOISHVILLO, N. E., TURUTA, A. M., KAMERNITSKY, A. V., Microorganisms as Reagents for Transformations of 5 $\alpha$ -Steroids, *Russian Chemical Bulletin*, 43, 515-537, 1994.
- [22] NAMBOORI, K., PEREIRA, L., MERCHANT, J. R., Fungal Transformation of Pregnenolone and Progesterone with The Marine Fungus *Cladosporium herbarum*, *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 17, 149-152, 1980.

- [23] TURUTA, A. M., VOISHVILLO, N. E., KAMERNITSKY, A. V., Microbiological Hydroxylations of 5 $\alpha$ -Steroids, *Russian Chemical Reviews*, 61, 1033-1057, 1992.
- [24] VIOLA, F., DELPRINO, G. B. L., CATTEI, L., Side Chan Degradation and Microbial Reduction of Different Steroids by *Aspergillus aureogulgens*, *Journal of Steroid Biochemistry*, 19, 1451-1458, 1983.
- [25] WILSON, M. R., GALLIMORE, W. A., REESE, P. B., Steroid Transformations with *Fusarium oxysporum* var. *ubense* and *Colletotrichum musae*, *Steroids*, 64, 834-843, 1999.
- [26] MAHATO, S. B., GARAI, S., Advances in Microbial Steroid Biotransformation, *Steroids*, 62, 332-345, 1997.
- [27] COTILLION, A-C., MORFIN, R., Transformation of 3-hydroxy-Steroids by *Fusarium moniliforme* 7 $\alpha$ -hydroxylase, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 68, 229-237, 1999.
- [28] JANECZKO, T., DMOCHOWSKA-GŁADYSZ, J., KOSTRZEWA-SUSŁOW, E., BIAŁOŃSKA, A., CIUNIK, Z., Biotransformations of Steroid Compounds by *Chaetomium* sp KCH 6651, *Steroids*, 74, 657-661, 2009.
- [29] LIU, H. M., SHAN, H. L. L., JIAN, W., Synthesis of Steroidal Lactone by *Penicillium citreo-viride*, *Steroids*, 71, 931-934, 2006.
- [30] KEPPLER, A. F., PORTO, A. L. M., SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H., COMASSETO, J. V., ANDRADE, L. H., Enzymatic Evaluation of Different *Aspergillus* Strains by Biotransformation of Cyclic Ketones, *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 967, 2005.
- [31] HUNTER, A. C., CARRAGHER, N. E., Flexibility of the Endogenous Progesterone Lactonisation Pathway in *Aspergillus tamarii* KITA: Transformation of a Series of Cortical Steroid Analogues, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 87, 301–308, 2003.
- [32] PETERSON, D. H., EPPSTEIN S. H., MEISTER, P. D., MURRAY, H. C., LEIGH, H. M., WEINTRAUB, A., REINEKE, L. M., Microbiological Transformations of Steroids. IX. Degradation of C<sub>21</sub> Steroids to C<sub>19</sub> Ketones and to Testololactone, *Journal of the American Chemical Society*, 75, 5768-5769, 1953.
- [33] BRODIE, A. M. H., NJAR, V. C. O., Aromatase Inhibitors in Advanced Breast Cancer: Mechanism of Action and Clinical Implications, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 66, 1–10, 1998.
- [34] LI, S., PARISH, E. J., Design and action of steroidal aromatase inhibitors, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73, 1435–1451, 1996.

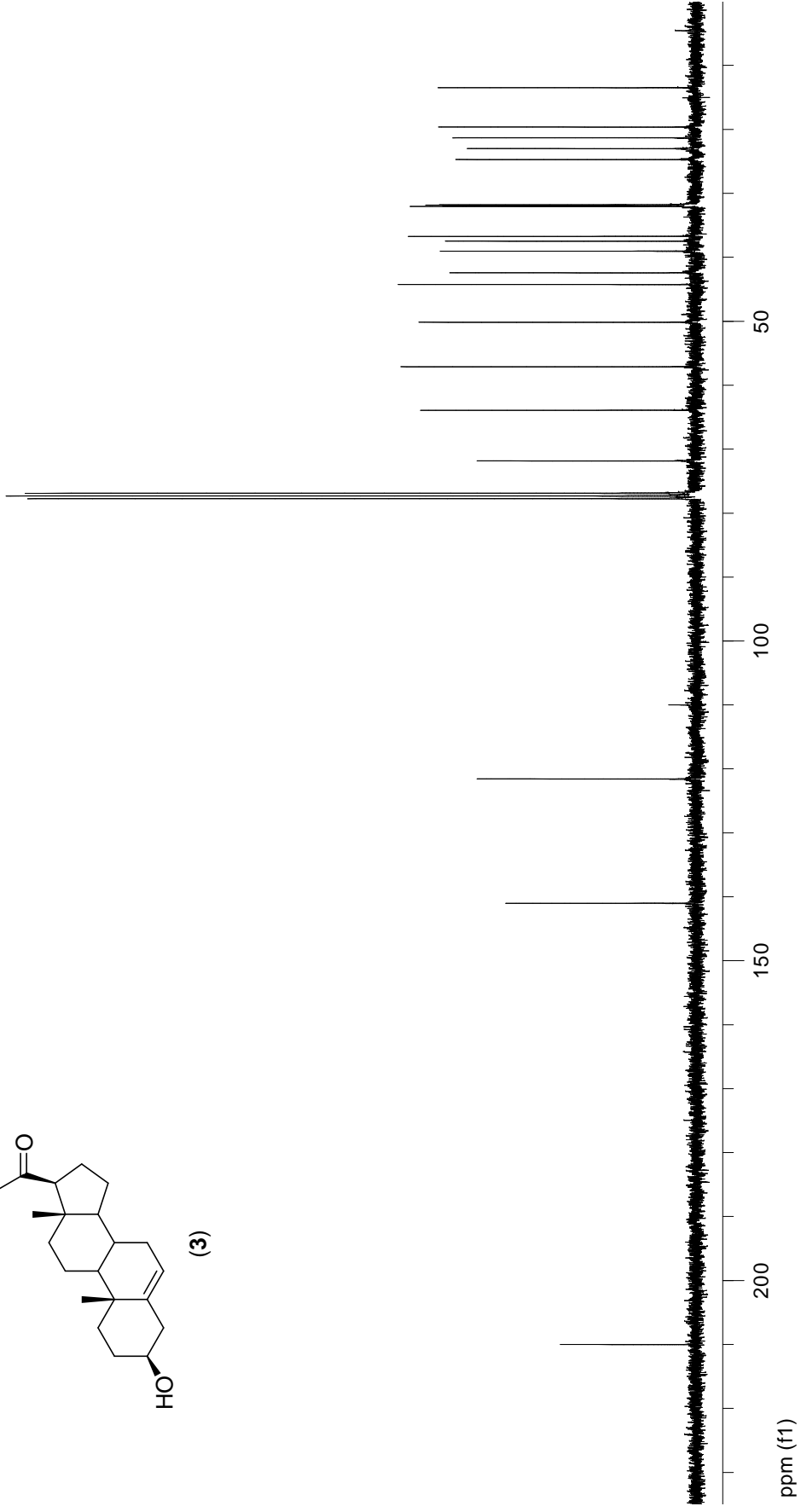
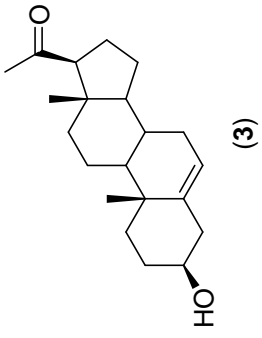
- [35] BRAUNSTEIN, G. D., Aromatase and Gynecomastia, *Endocrine-Related Cancer*, 6, 315–324, 1999.
- [36] FEUILLAN, P., MERKE, D., LESCHEK, E. W., CUTLER, G. B., Use of Aromatase Inhibitors in Precocious Puberty, *Endocrine-Related Cancer*, 6, 303–306, 1999.
- [37] BARAN, J. C., The Synthesis, Stereochemistry, and Biology of 16-hetero and 17-oxa-D-homo Steroids, *Journal of Medicinal Chemistry*, 10, 1039–1047, 1967.
- [38] BARTMAŃSKA, A., DMOCHOWSKA-GŁADYSZ, J., HUSZCZA, E., Steroids' Transformation in *Penicillium notatum* culture, *Steroids*, 70, 193–198, 2005.

## **EKLER**

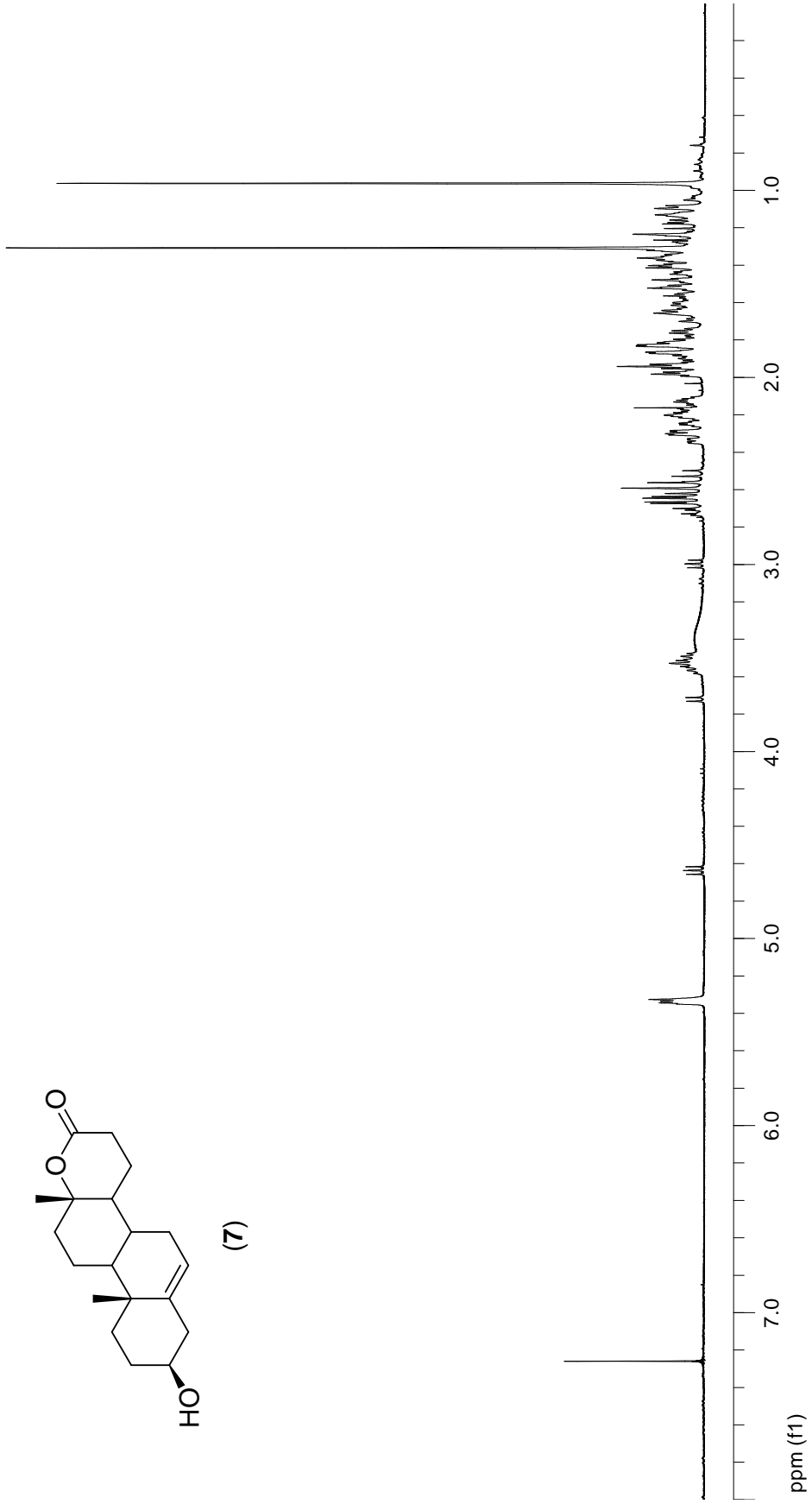




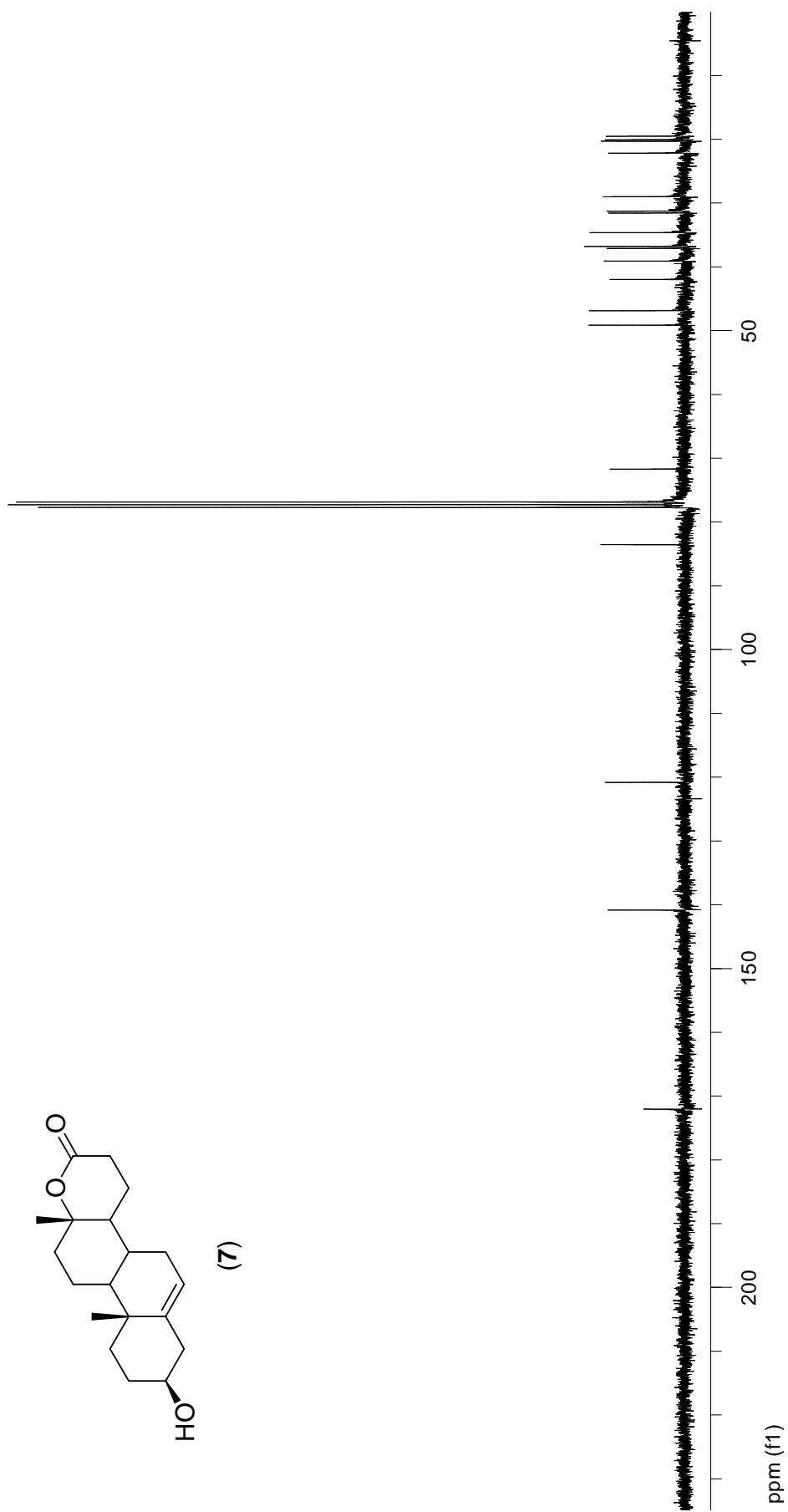
Şekil A.1. Pregnenolon (3) bileşiğinin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu



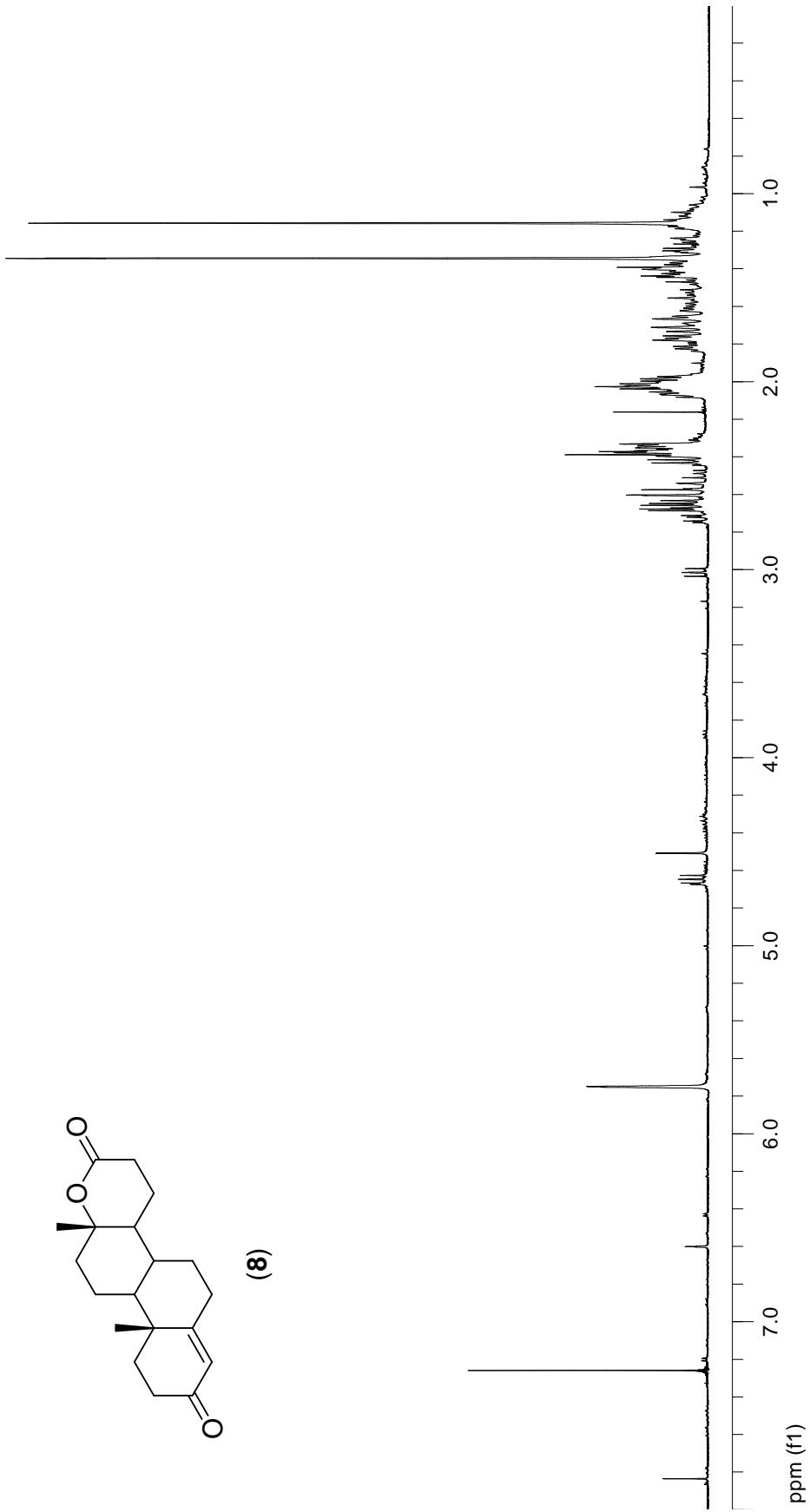
Şekil A.2. Pregnenolon (3) bileşiğinin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu



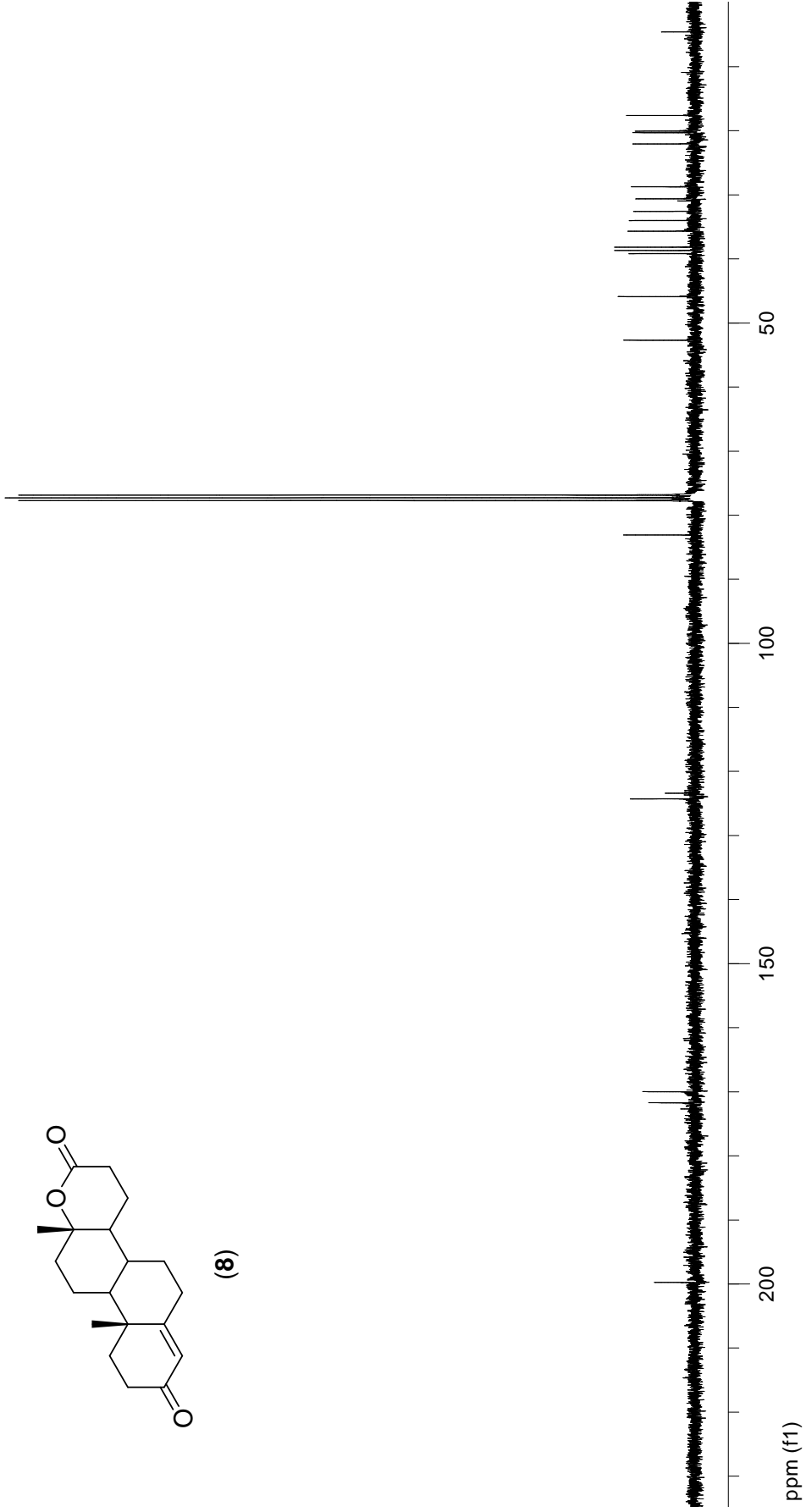
Şekil A.3. 3β-Hidroksi-17α-okza-D-homo-androst-5-en-17-on (7) bileşiğinin <sup>1</sup>H NMR spektrumu



Şekil A.4. 3 $\beta$ -Hidroksi-17 $\alpha$ -okza-D-homo-androst-5-en-17-on (7) bileşiğinin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu



Şekil A.5. 17a-Okza-D-homo-androst-4-en-3,17-dion (8) bileşiğinin <sup>1</sup>H NMR spektrumu



Şekil A.6. 17a-Okza-D-homo-androst-4-en-3,17-dion (8) bileşiğinin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu

## ÖZGEÇMİŞ

Emine Yasemin Gülcüoğlu 1984 yılında Sakarya'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Sakarya'da tamamladı. Lisans öğrenimi 2007 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Kimya bölümünde tamamladı. Yüksek lisans öğrenimine 2007 yılında Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında başladı.

Meslek hayatına 2006 yılı haziran ayında Sakarya Bayramlar Yapı Tic. Ltd Şti. fabrikasında yönetici adayı olarak başladı. Aynı firmada Temmuz 2007 – Ağustos 2008 tarihleri arası Kalite Kontrol ve Ar-Ge Sorumlusu olarak görev aldı. 2009 Ocak ayında Sakarya Ottoman tekstil fabrikasında Kalite Yönetim Temsilciliđi ve Laboratuar Sorumluluđu görevine başladı. Kariyerine bir yıl burada devam etti. 2010 Nisan ayında ise Sakarya Venüs Çoşkunlar firmasında yönetici adayı olarak başladı ve bu görevine halen devam etmektedir.