

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

**EPIANDROSTERON BİLEŞİĞİNİN BAZI  
ASPERGILLUS TÜRLERİ İLE  
BİYOTRANSFORMASYONLARI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Kimyager Ahmet UZUNER**

**Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA**

**Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA**

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

**OCAK 2010**

T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

EPIANDROSTERON BİLEŞİĞİNİN BAZI  
ASPERGILLUS TÜRLERİ İLE  
BİYOTRANSFORMASYONLARI

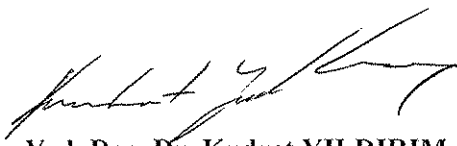
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Ahmet UZUNER

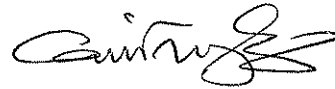
Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA

Bu tez 26 / 01 / 2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.



Yrd. Doç. Dr. Kudret YILDIRIM  
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Cavit UYANIK  
Üye



Doç. Dr. Ahmet TUTAR  
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 Araş. Gör. Semra YILMAZER'e teşekkürlerimi sunarım.

Lisans öğrenimim boyunca iyi bir kimyager olarak yetişmemde büyük katkıları olan başta bölüm başkanım Prof. Dr. Ali Osman AYDIN olmak üzere tüm kimya bölümü öğretim üyelerine ve araştırma görevlilerine teşekkürlerimi sunarım.

Yaşamım boyunca maddi manevi her türlü desteği esirgemeyen aileme ve çok sevdiğim müstakbel eşim Pelin Nehar'a muhabbetle teşekkürlerimi sunarım.

Ocak 2010

Ahmet UZUNER

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ÖZET.....	ix
SUMMARY.....	x
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.	
EPIANDROSTERON BİLEŞİĞİNİN KÜFLER İLE BİYOTRANSFORMASYONLARI.....	3
2.1. Androjenler.....	3
2.2. Epiandrosteron.....	6
2.3. Epiandrosteronun Küfler İle Biyotransformasyonları.....	6
2.4. Çalışmanın Amacı.....	9
BÖLÜM 3.	
MATERYAL VE METOT.....	10
3.1. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler.....	10
3.2. Taze Yatık Agar Kültürlerinin Hazırlanması.....	11
3.3. Epiandrosteronun (12) <i>Aspergillus</i> Türleri ile Biyotransformasyonları.....	11

3.3.1. Epiandrosteronun (12) <i>Aspergillus terreus</i> MRC 200365 ile biyotransformasyonu .....	11
3.3.2. Epiandrosteronun (12) <i>Aspergillus tamarisii</i> MRC 72400 ile biyotransformasyonu .....	12
BÖLÜM 4. DENEYSEL BULGULAR.....	14
BÖLÜM 5. SONUÇLAR.....	17
BÖLÜM 6. TARTIŞMA VE ÖNERİLER.....	19
KAYNAKLAR.....	22
EKLER.....	25
ÖZGEÇMİŞ.....	35

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

bs	: Broad singlet (küt singlet )
BVMO	: Baeyer-Villiger Monooksijenaz
<sup>0</sup> C	: Santigrat derece
CDCl <sub>3</sub>	: Dötorokloroform
cm	: Santimetre
<sup>13</sup> C NMR	: Karbon 13 Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
DHEA	: Dehidroepiandrosteron
DHT	: Dihidrotestosteron
DMF	: Dimetilformamit
DMSO	: Dimetilsülfoksit
<sup>1</sup> H NMR	: Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
Hz	: Hertz
IR	: Infrared Spektroskopisi
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
<i>J</i>	: Etkileşme sabiti
L	: Litre
LH	: Lüteinleştirici Hormon
m	: Multiplet
mg	: Miligram
MHz	: Megahertz
mL	: Mililitre
MRC	: Marmara Research Center (Marmara Araştırma Merkezi)
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	: Geçirgenlik
tt	: Tripletin tripleti
$\delta_H$	: $^1H$ NMR spektrumundaki kimyasal kayma
$\delta_C$	: $^{13}C$ NMR spektrumundaki kimyasal kayma

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Progesteronun <i>R. arrhizus</i> ile biyotransformasyonu .....	2
Şekil 2.1.	Testosteron (2) ve DHT (3) bileşiklerinin biyosentezi .....	4
Şekil 2.2.	Testosteron (2) bileşiğinin bazı metabolitleri .....	5
Şekil 2.3.	Dihidrotestosteron (3) bileşiğinin metabolitleri .....	6
Şekil 2.4.	DHEA (9) bileşiğinden epiandrosteron (12) biyosentezi .....	6
Şekil 2.5.	Epiandrosteronun (12) <i>Aspergillus tamaris</i> QM 1223 ile biyotransformasyonu .....	7
Şekil 2.6.	Epiandrosteronun (12) <i>Rhizopus nigricans</i> ile gerçekleştirilen biyotransformasyonu .....	7
Şekil 2.7.	Epiandrosteronun (12) <i>Cephalosporium aphidicola</i> küföyle biyotransformasyonu .....	8
Şekil 4.1.	Epiandrosteron (12) bileşiğinin karbon iskeletlerinin numaralandırılması .....	14
Şekil 5.1.	Epiandrosteron (12) bileşiğinin <i>Aspergillus terreus</i> MRC 200365 ile biyotransformasyonu .....	17
Şekil 5.2.	Epiandrosteron (12) bileşiğinin <i>Aspergillus tamaris</i> MRC 72400 ile biyotransformasyonu .....	18



## TABLULAR LİSTESİ

Tablo 4.1. Bileşiklerin $^1\text{H}$ NMR spektrumlarındaki önemli sinyallerin karşılaştırılması .....	15
Tablo 4.2. Bileşiklerin $^{13}\text{C}$ NMR spektrumu sinyallerinin karşılaştırılması .....	16

## ÖZET

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

Bu çalışmada epiandrosteronun *Aspergillus terreus* MRC 200365 ve *Aspergillus tamarii* MRC 72400 küflerinde nasıl metabolize edileceğini incelemek için bileşiğin bu küfler ile biyotransformasyonları gerçekleştirildi. *Aspergillus terreus* MRC 200365 ile inkübasyon sadece bir metabolit verirken *Aspergillus tamarii* MRC 72400 ile inkübasyon ise iki ayrı metabolit verdi.

İnkübasyonlar sonrasında başlangıç maddesi ve elde edilen bileşiklerin erime noktaları ile  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, ve IR spektrumları alındı. Başlangıç maddesi ve bileşiklere ait erime noktaları ile spektrumlar karşılaştırıldığında *Aspergillus terreus* MRC 200365 ile inkübasyonun  $3\beta$ -hidroksi-17 $\alpha$ -okza-D-homo-5 $\alpha$ -androstan-17-on bileşiği ile sonuçlanırken *Aspergillus tamarii* MRC 72400 ile inkübasyonunun ise  $3\beta$ -hidroksi-17 $\alpha$ -okza-D-homo-5 $\alpha$ -androstan-17-on ve  $3\beta,11\beta$ -dihidroksi-5 $\alpha$ -androstan-17-on bileşikleriyle sonuçlandığı anlaşıldı.

# THE BIOTRANSFORMATION OF EPIANDROSTERONE BY SOME ASPERGILLUS SPECIES

## SUMMARY

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

In this work, epiandrosterone 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 *Aspergillus terreus* MRC 200365 afforded only one metabolite whereas incubation with *Aspergillus tamarii* MRC 72400 afforded two metabolites.

The melting points and  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR and IR spectra were taken from both starting material and the metabolites from the incubations. When the melting points and  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR and IR spectra of the starting material and metabolites were compared with each other, it followed that incubation with *Aspergillus terreus* MRC 200365 afforded only 3 $\beta$ -hydroxy-17 $\alpha$ -oxa-D-homo-5 $\alpha$ -androstan-17-one while incubation with *Aspergillus tamarii* MRC 72400 afforded 3 $\beta$ ,11 $\beta$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -androstan-17-one and 3 $\beta$ -hydroxy-17 $\alpha$ -oxa-D-homo-5 $\alpha$ -androstan-17-one.

## BÖLÜM 1. GİRİŞ

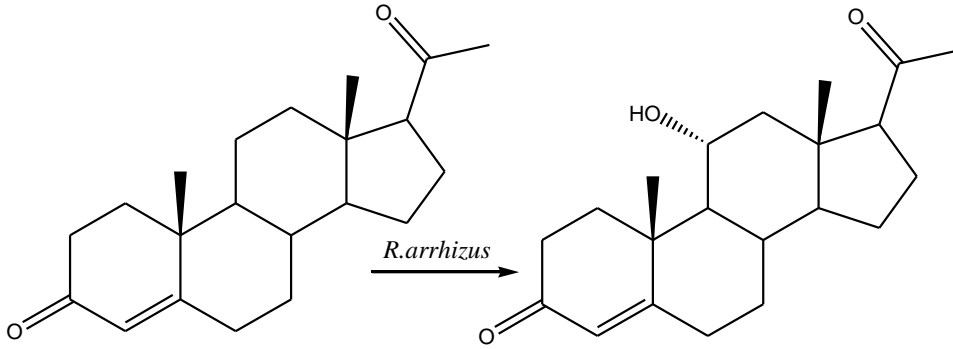
Canlılar hayatları boyunca kendilerine yabancı olan xenobiyotikler adı verilen çeşitli kimyasal maddeler ile karşılaşır. Canlıların bu maddelerin üzerinde enzimler veya enzimleri içeren mikrozomlar, hücre kültürleri, doku kültürleri, organ kültürleri, mikroorganizmalar ya da mikroorganizma sporları yolu ile meydana getirdiği kimyasal değişikliklere biyotransformasyon 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. Mikrobiyal hidroksilasyonlar çoğu biyotransformasyon reaksiyonlarını katalizleyen sitokrom P-450 enzimlerince gerçekleştirilir ve bu enzimler ayrıca hidroksilazlar veya monooksijenazlar olarak da adlandırılırlar [1].

Mikrobiyal hidroksilasyonun önemi ilk olarak romatizmaya karşı kullanılan kortikal steroidlerin sentezinde ortaya çıkmıştır [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. Bahsedilen problemin *Rhizopus arrhizus* küfünün progesteron bileşini C-11 pozisyonunda yüksek verimli mikrobiyal hidrosilasyon (şekil 1.1) ile çözümlenmesi dikkatleri mikrobiyal biyotransformasyonlar üzerine çekmiştir [1,3].



şekil 1.1. Progesteronun *R. arrhizus* ile biyotransformasyonu

Mikrobiyal hidrosilasyonun 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 gerçekteşirilmifitir [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.

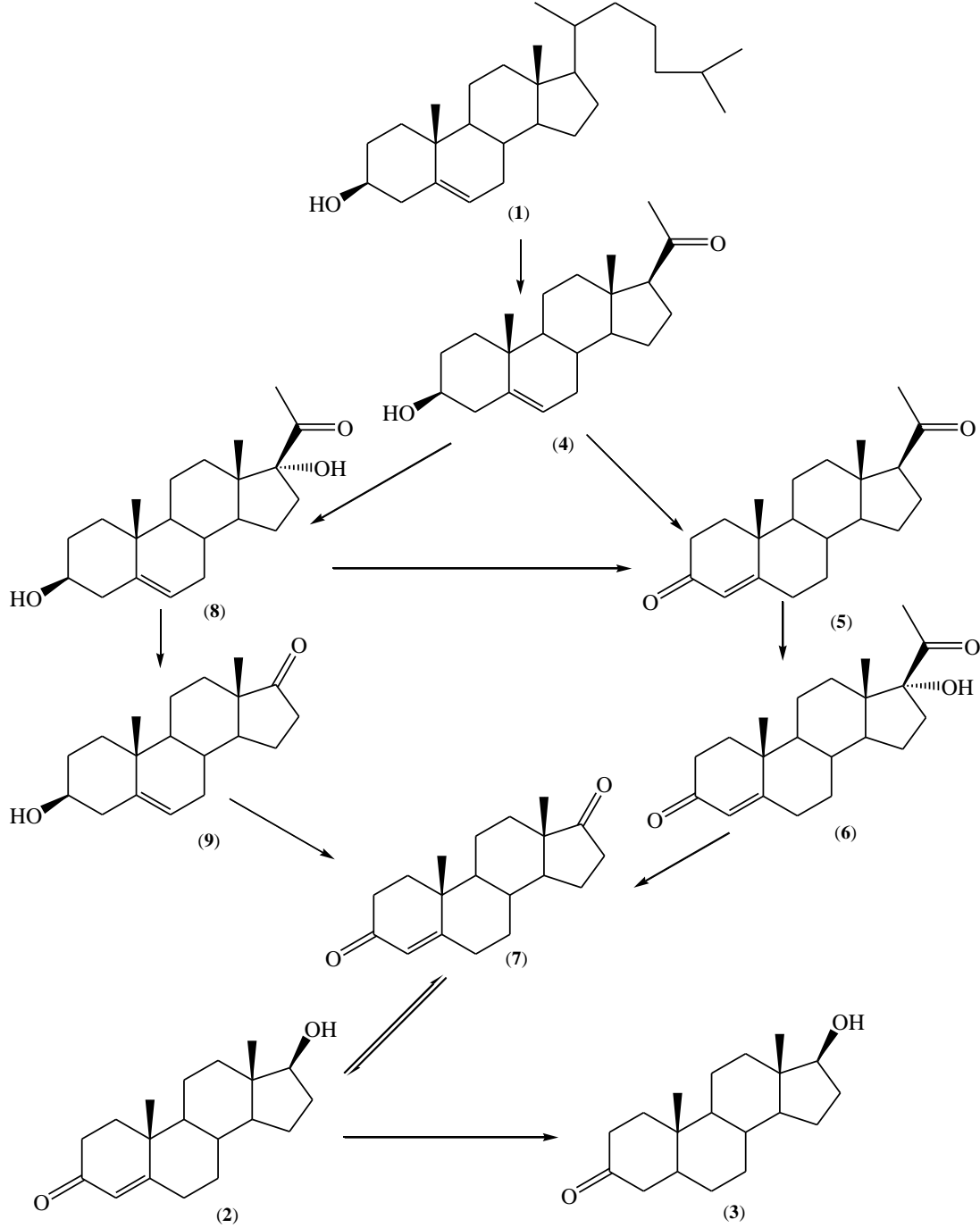
## BÖLÜM 2. EPIANDROSTERON BİLEŞİĞİNİN KÜFLER İLE BİYOTRANSFORMASYONLARI

### 2.1. Androjenler

Önemli bir lipid olan kolesterol (1) hayvansal membranlardaki akışkanlığının düzenlenmesine ek olarak steroid hormonlar, safra asitleri ve D<sub>3</sub> vitamini gibi birçok hayati fonksiyonu bulunan bileşiğin de başlangıç maddesidir [4]. Kolesterolde sentezlenen steroid hormonlar glukokortikoidler, mineralokortikoidler, androjenler, östrojenler ve progestagenler (progestinler) olmak üzere beş ana sınıfta incelenmektedir [5]. Androjenler, östrojenler ve progestagenler ayrıca eşey hormonları olarak da bilinirler. Eşey hormonları üreme ile ilgili organların gelişme ve büyümelerini, ikincil eşey karakterlerini ve üreme döngüsünü düzenlerler. Bu hormonlar güçlü anabolik etkileri sayesinde kemik, kaslar ve deri gibi birçok dokunun gelişmesini ve metabolizmanın da sürekliliğini sağlarlar [4].

Östrojenlerin başlangıç maddeleri de olan androjenler erkek bireylerde etkili olan eşey hormonlarıdır. En etkin androjenler testosteron (2) ve DHT olarak da bilinen dihidrotestosteron (3) bileşikleridir. Bir kısmı adrenal korteksten salınan androjenlerin vücuttaki asıl sentez yeri erbezleri (testis) adı verilen eşey organıdır. Adrenal korteks ve testislerde önce kolesterolde (1) pregnenolon (4) oluşur (Şekil 2.1). Kolesterolde (1) pregnenolon (4) sentezi adenohipofiz kökenli LH (lüteinleştirici hormon) sayesinde uyarılır. LH salınması ise kandaki serbest testosteron düzeyi ile düzenlenir. Pregnenolondan (4) androjenlerin biyosentezi ise  $\Delta^4$  ve  $\Delta^5$  yolları ile gerçekleşir.  $\Delta^4$  yolu androjen biyosentezinin ana yoludur. Bu yolda pregnenolon (4) önce progesterona (5) çevrilir. Progesteron (5) daha sonra hidroksilasyon ile 17 $\alpha$ -hidroksiprogesterona (6) dönüştürülür. 17 $\alpha$ -Hidroksi-progesteronun (6) yan zincirinin uzaklaştırılması ile önce androstendion (7) oluşur ve bu bileşiğin C-17'deki redüksiyonu ile testosteron (2) sentezlenir. Testosterondan (2)

ise  $5\alpha$ -redüktaz aktivitesi ile bir diğer androjen olan dihidrotestosteron (**3**) sentezlenir [4].

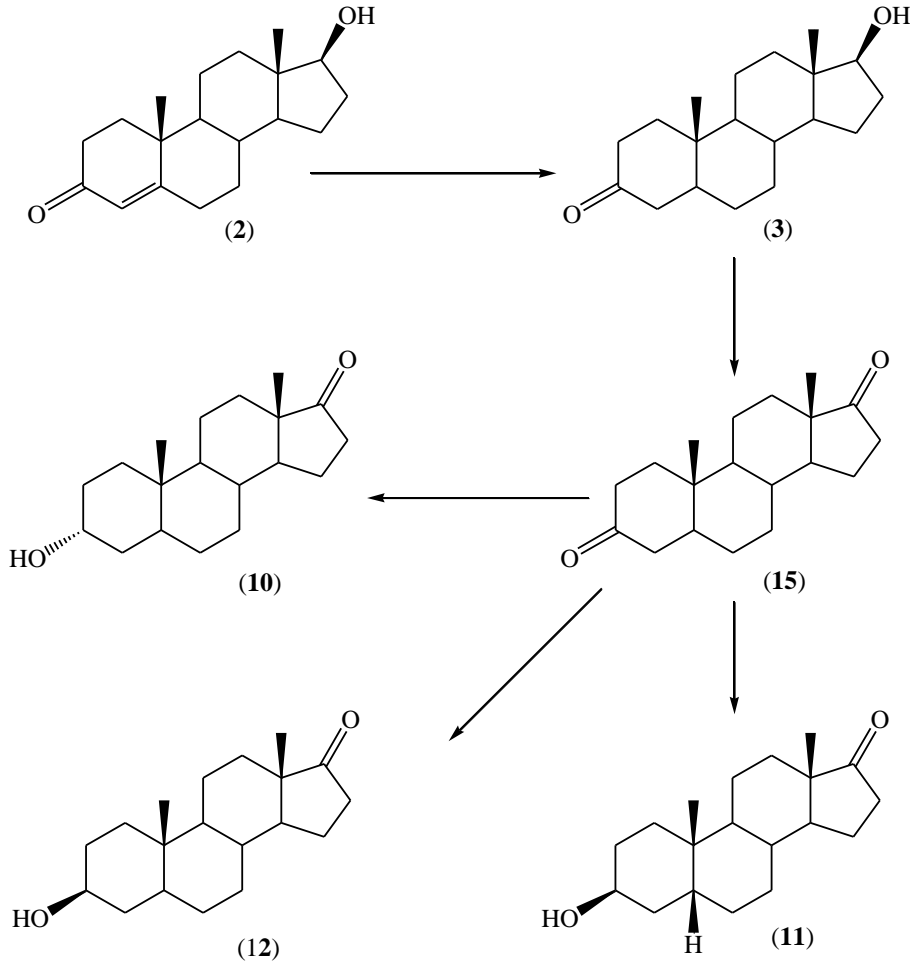


Şekil 2.1. Testosteron (**2**) ve DHT (**3**) bileşiklerinin biyosentezi

Bir yan yol olan  $\Delta^5$  yolunda ise pregnenolon hidroksilasyon ile  $17\alpha$ -hidroksipregnenolona (**8**) çevrildikten sonra yan zincirin ayrılması ile DHEA olarak

da bilinen dehidroepiandrosterona (9) çevrilir. DHEA ise daha sonra testosterona (2) dönüştürülebilen androstendion (7) bileşiğine çevrilir. Bu yolda oluşan 17 $\alpha$ -hidroksipregnenolon (8) ayrıca doğrudan progesterona (5) çevrilebilmektedir [4].

Biyolojik etkinliğini tamamlayan testosteron (2) birçok dokuda düşük aktiviteli veya tamamen inaktif metabolitlere dönüştürülür. Testosteron (2) önce C-17'de gerçekleşen bir oksidasyonla androstendiona (7) çevrilir. Androstendionun (7) da A halkasındaki bir seri tepkimeler ile indirgenmesi sonucunda Şekil 2.2'de verilen androsteron (10), etikolanon (11) ve epiandrosteron (12) gibi metabolitlerin oluştuğu bildirilmiştir[4].

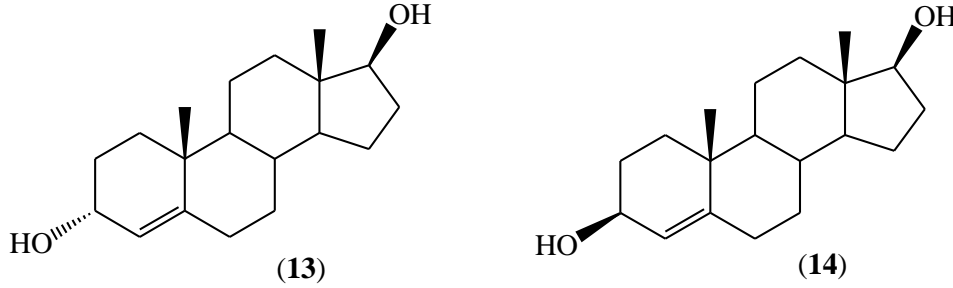


Şekil 2.2. Testosteron (2) bileşiğinin bazı metabolitleri

Testosteronun dokularda etkili formu olan DHT (3) ise A halkasındaki dehidrojenasyonu takiben 3 nolu karbon atomunda gerçekleşen redüksiyonlar sonucu



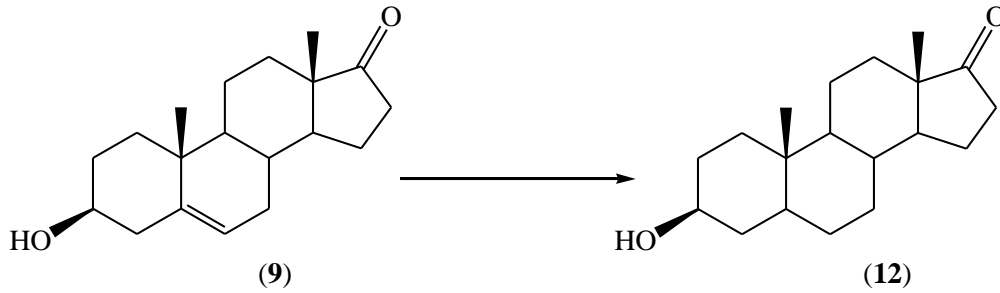
Şekil 2.3’de verilen  $3\alpha$ -androstendiol (**13**) ve  $3\beta$ -androstendiol (**14**) metabolitlerine dönüştüğü anlaşılmıştır [4].



Şekil 2.3. Dihidrotestosteron (**3**) bileşiğinin metabolitleri

## 2.2. Epiandrosteron

Epiandrosteron (**12**) daha öncede belirtildiği gibi zayıf androjenik etkili bir testosteron metabolitidir. Bu metabolit testosteron kökenli androstendion (**7**) üzerindeki  $5\alpha$ -redüktaz aktivitesini takiben oluşan androstandion (**15**) bileşiğindeki 3-keto grubunun  $\beta$ -yüzünden redüksiyonu ile sentezlenmiştir (Şekil 2.2). Aslında epiandrosteron (**12**) bileşiği doğal olarak DHEA (**9**) bileşiğinin  $5\alpha$ -redüktaz aktivitesi ile redüksiyonu [6] sonucunda oluşmaktadır (Şekil 2.4).

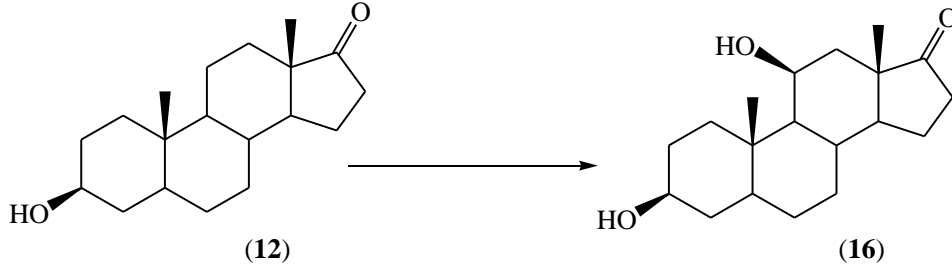


Şekil 2.4. DHEA (**9**) bileşiğinden epiandrosteron (**12**) biyosentezi

## 2.3. Epiandrosteronun Küfler ile Biyotransformasyonları

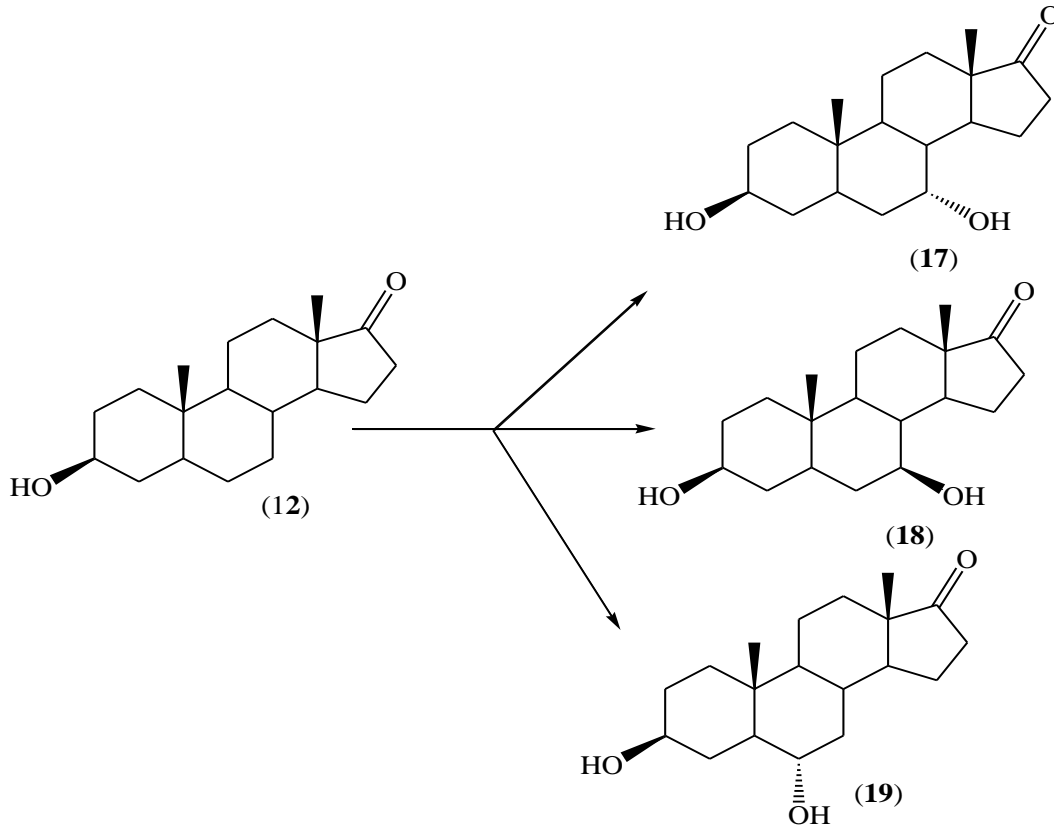
Epiandrosteron (**12**) bileşiğinin 4 farklı küf ile biyotransformasyonu gerçekleştirilmiştir [7-10]. Söz konusu çalışmalardan hidroksillenmiş bileşikler elde

edilmiştir. *Aspergillus tamarii* QM 1223 ile gerçekleşen epiandrosteron bileşiğinin biyotransformasyonu [7] sadece 11 $\beta$ -hidroksiepiandrosteron (**16**) eldesi ile sonuçlanmıştır (Şekil 2.5).



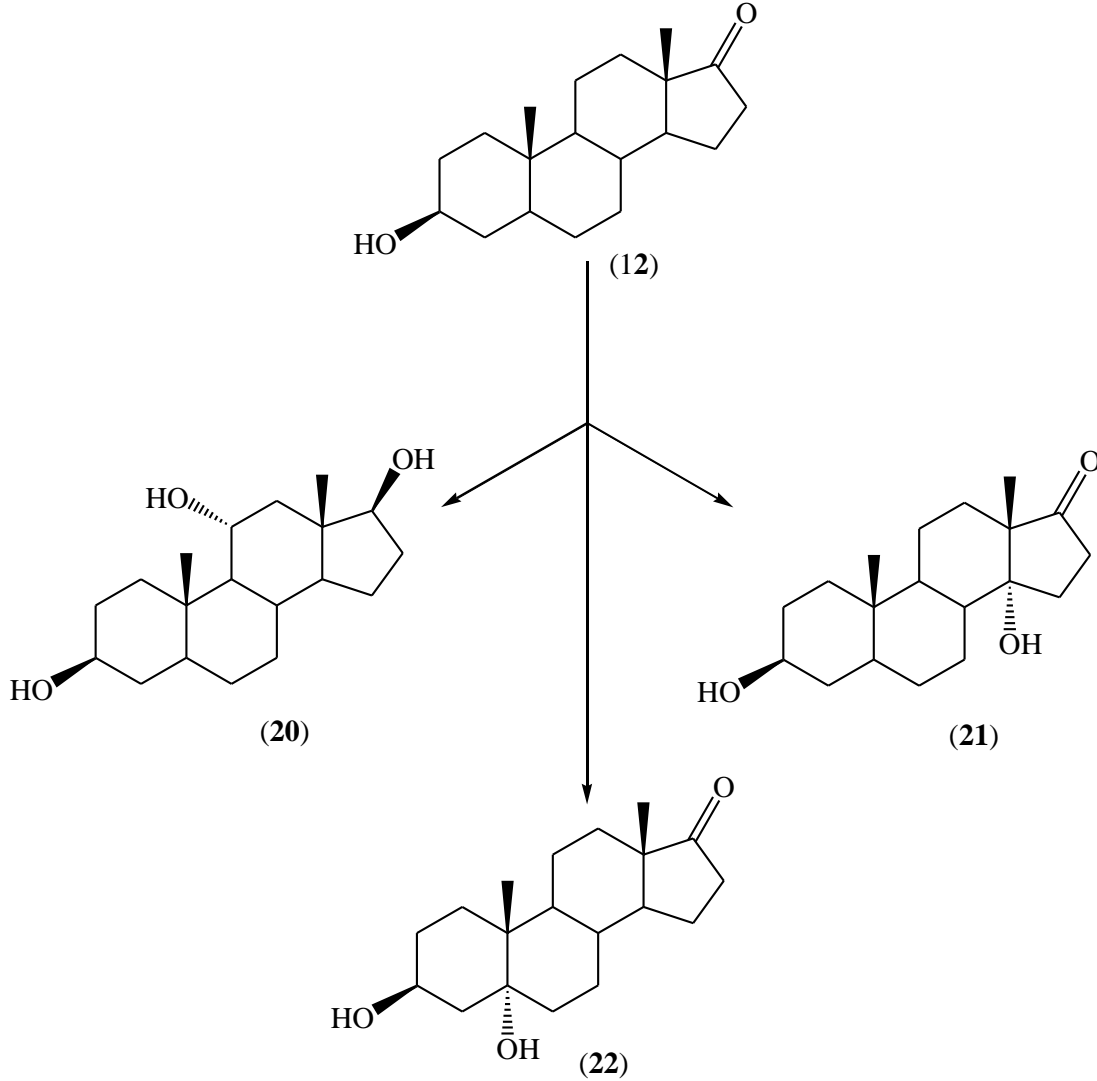
Şekil 2.5. Epiandrosteronun *Aspergillus tamarii* QM 1223 ile biyotransformasyonu

*Rhizopus nigricans* küfö ile epiandrosteron (**12**) bileşiğinin biyotransformasyonu [8] 7 $\alpha$ -hidroksi-5 $\alpha$ -androstan-17-on (**17**), 7 $\beta$ -hidroksi-5 $\alpha$ -androstan-17-on (**18**) ve 6 $\alpha$ -hidroksi-5 $\alpha$ -androstan-17-on (**19**) metabolitleri ile sonuçlanmıştır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Epiandrosteronun (**12**) *Rhizopus nigricans* ile gerçekleştirilen biyotransformasyonu

Epiandrosteron (**12**) bileşiğinin *Cephalosporium aphidicola* IMI 68689 ile gerçekleştirilen biyotransformasyonunun ise [9] 3 $\beta$ ,11 $\alpha$ ,17 $\beta$ -trihidroksi-5 $\alpha$ -androstan (**20**), 3 $\beta$ ,14 $\alpha$ -dihidroksi-5 $\alpha$ -androstan-17-on (**21**) ve 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -dihidroksi-5 $\alpha$ -androstan-17-on (**22**) metabolitleri ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Epiandrosteronun (**12**) *Cephalosporium aphidicola* küföyle biyotransformasyonu

*Fusarium moniliforme* küfö ile gerçekleştirilen epiandrosteron (**12**) biyotransformasyonu çalışması neticesinde 7 $\alpha$ -hidroksi-5 $\alpha$ -androstan-17-on (**17**) bileşiği ile yapıları tanımlanamayan muhtemelen hidroksillenmiş olan iki ayrı polar metabolit elde edildiği bildirilmiştir [10].

## 2.4. Çalışmanın Amacı

Steroidler mikroorganizmalar ile özellikle de küfler tarafından dönüştürülebilen önemli doğal bileşiklerdir [11-13]. Küfler ile steroid biyotransformasyonları için en sık kullanılan türlerin birçoğu *Aspergillus* cinsine aittir. *Aspergillus* ve diğer bazı küf cinslerine ait türler sahip oldukları etkin enzim sistemleri [1,2] sayesinde dünyanın neredeyse her yerinde yaşayabilen canlılardır [14]. Mikrobiyal biyotransformasyonlar aslında ksenobiyotiklerin bu ve diğer cinslere ait mikroorganizmalar tarafından değiştirilmesi esasına dayanmaktadır [1].

Bu çalışmanın amacı epiandrosteron (**12**) bileşiğinin *Aspergillus terreus* MRC 200365 ve *Aspergillus tamarii* MRC 72400 küflerinde nasıl metabolize edileceğini incelemektir. Ayrıca bileşiğin biyotransformasyonları sonucunda tıbbi açıdan önemli ve ilaç sanayinde kullanılacak metabolitler elde edilip edilemeyeceği de incelenecektir.

## 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 kromatografisi 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 Elektrothermal 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. Epiandrosteron bileşiği Fluka şirketinden satın alındı. Tüm solventler Merk şirketinden temin edildi. Yatık agar besiyerleri için kullanılan PDA ve küfler için

hazırlanan besiyerinde kullanılan malt ekstrakt Merck şirketinden temin edildi. *Aspergillus terreus* MRC 200365 için % 2'lik malt ekstrakt besiyeri [15] kullanılırken *Aspergillus tamarii* MRC 72400 için % 3'lük malt ekstrakt besiyeri [16] 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 [2]. 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. Epiandrosteronun (12) *Aspergillus* Türleri ile Biyotransformasyonları**

#### **3.3.1. Epiandrosteronun (12) *Aspergillus terreus* MRC 200365 ile biyotransformasyonu**

Sterilize edilen % 2'lik 1 L malt ekstrakt besiyeri 10 adet 250 mL'lik erlenlere 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.

Epiandrosteron (**12**) (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 (726 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 sistemi ile yapısı orijinal bir numuneye ait <sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR spektrumlarının karşılaştırılması ile tayin edilen başlangıç maddesi (1) (330 mg) elde edildi.

%50’lik çözgen sistemi ile etil asetatından iğneler şeklinde kristaller oluşturan 3β-hidroksi-17a-okza-D-homo-5α-androstan-17-on (**23**) (56 mg, 10.6%) elde edildi. Erime noktası 173-174 °C (Literatür [17] 169 °C). IR: 3440 ve 1720. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.78 (3H, s, 19-H); 1.29 (3H, s, 18-H); 3.53 (1H, tt, *J* = 5 Hz ve *J* = 11 Hz, 3-H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 171.64, 83.40, 71.04, 53.04, 46.24, 44.15, 39.22, 37.87, 37.77, 36.72, 35.47, 31.28, 30.57, 28.61, 28.24, 22.00, 20.11, 19.76, 12.14.

### **3.3.2. Epiandrosteronun (12) *Aspergillus tamarü* MRC 72400 ile biyotransformasyonu**

Sterilize edilen % 3’lik 1 L malt ekstrakt besiyeri 10 adet 250 mL’lik erlenlere 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.

Epiandrosteron (**12**) (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 (716 mg) elde edildi.

Yağimsı madde daha sonra silika jel 60 üzerinde kolon kromatografisine tabi tutuldu. Kolonda çözgen sistemi olarak hekzan içerisinde artan oranlarda etil asetat kullanıldı. %30’luk çözgen sistemi ile elüsyon neticesinde yapısı <sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR spektrumlarının orijinal bir numuneninkilerle karşılaştırılması ile tayin edilen başlangıç maddesi (**1**) (330 mg) elde edildi.

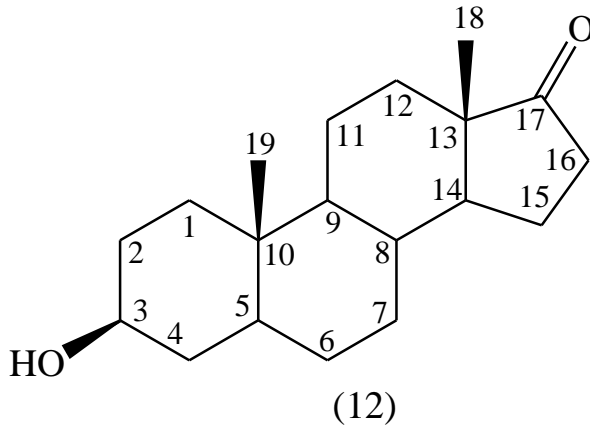
%40’lık çözgen sistemi ile etil asetatın iğneler şeklinde kristaller oluşturan 3β,11β-dihidroksi-5α-androstan-17-on (**16**) (16 mg, 3%) bileşiği elde edildi. Erime noktası: 228-231 °C (Literatür [18] 235-238 °C). IR: 3470 . <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1.06 (3H, s, 19-H); 1.10 (3H, s, 18-H); 3.55 (1H, tt, *J* = 5 Hz ve *J* = 12 Hz, 3-H); 4.39 (1H, bs, 11-H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 219.94, 70.96, 68.06, 58.43, 52.90, 46.92, 45.72, 40.48, 37.57, 36.83, 35.74, 35.33, 31.24, 31.09, 30.81, 27.84, 21.65, 15.86, 15.51.

%50’lik çözgen sistemi ile yapısı <sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR spektrumlarının bir önceki çalışma da tespit edilen metabolitin spektrumlarıyla karşılaştırılması sonrasında tanımlanan 3β-hidroksi-17a-okza-D-homo-5α-androstan-17-on (**23**) (50 mg, 9.48%) bileşiği olduğu anlaşıldı.



## BÖLÜM 4. DENEYSEL BULGULAR

Epiandrosteron (**12**) 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 (bakınız Bölüm 3). Bileşiklere ait  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, IR spektrumları Ekler Bölümünde verildi. Biyotransformasyonları gerçekleştirilen başlangıç maddesine ait karbon iskeletinin numaralandırılması Şekil 4.1'deki gibidir.



Şekil 4.1. Epiandrosteron (**12**) bileşiğinin karbon iskeletlerinin numaralandırılması

Epiandrosteron'un (**12**) *A. terreus* MRC 200365 ile 5 gün süren biyotransformasyonu sadece bir tek metabolit ile sonuçlandı. Metabolit  $\delta_{\text{H}}$  3.53 ppm'de başlangıç maddesindeki  $3\beta\text{-OH}$  grubunu koruduğunu gösteren bir rezonans ( $1\text{H}$ , tt,  $J = 5$  ve  $J = 11$  Hz, 3-H) verdi (Tablo 4.1). Başlangıç maddesinin  $\delta_{\text{C}}$  47.76 ppm'deki C-13 rezonansı metabolitte  $\delta_{\text{C}}$  83.40 ppm'e aşağı bölgeye doğru bir kayma ( $\Delta$  35.64) olarak gözlemlendi (Tablo 4.2). Benzer şekilde başlangıç maddesinin  $\delta_{\text{H}}$  0.84 ppm ve  $\delta_{\text{C}}$  13.76 ppm'deki 18-metil rezonansları metabolitte  $\delta_{\text{H}}$  1.29 ppm ve  $\delta_{\text{C}}$  20.11 ppm'e olmak üzere aşağı bölgeye doğru iki kayma (sırasıyla  $\Delta$  0.45 ve  $\Delta$  6.35) gösterdi. Metabolitin  $\delta_{\text{C}}$  221.50 ppm 17-karbonil grubu sinyali yerine  $\delta_{\text{C}}$  171.64 ppm'de yeni

bir rezonans vermesi steroidal bir D lakton oluştuğunu gösterdi. Bütün spektral sonuçlar metabolitin 3 $\beta$ -hidroksi-17 $\alpha$ -okza-D-homo-5 $\alpha$ -androstan-17-on (**23**) olduğunu kanıtladı.

Tablo 4.1. Bileşiklerin <sup>1</sup>H NMR spektrumlarındaki önemli sinyallerin karşılaştırılması

Bileşik	3-H	18-H	19-H	CH-OH
<b>12</b>	3,53 (tt, $J = 5$ Hz ve $J = 11$ Hz)	0,84	0, 81	-
<b>16</b>	3,55 (tt, $J = 5$ Hz ve $J = 12$ Hz)	1,10	1.06	4,39 (bs)
<b>23</b>	3,53 (tt, $J = 5$ Hz ve $J = 11$ Hz)	1,29	0,78	-

Epiandrosteron bileşiğinin *A. tamarii* MRC 72400 ile 7 gün süren biyotransformasyonu ise iki ayrı metabolit oluşması ile sonuçlandı. İlk metabolitin  $\delta_H$  3.55 ppm'deki rezonansı (1H, tt,  $J = 5$  Hz ve  $J = 12$  Hz) başlangıç maddesinin A halkasındaki 3 $\beta$ -OH grubunun korunduğunu gösterdi. Metabolit  $\delta_H$  4.39 ppm ve  $\delta_C$  68.06 ppm'de sırası ile karakteristik 11 $\alpha$ -H [19] ve C-11 [20] rezonanslarına karşılık gelen sinyaller gösterdi. Metabolitin <sup>1</sup>H NMR spektrumunda başlangıç maddesinin 18-metil ve 19-metil grupları için sırası ile  $\Delta$  0.26 ppm ve  $\Delta$  0.25 ppm gibi aşağı bölgeye iki önemli kayma gözlemlendi. Bu sonuçlar 11 $\beta$ -pozisyonundaki bir hidroksilasyonu işaret etti. Metabolitin <sup>13</sup>C NMR spektrumunda başlangıç maddesinin C-18, C-19, C-9 ve C-12 numaralı karbon atomları için aşağı bölgeye kaymalar gözlemlendi (C-18 için  $\Delta$  2.1 ppm, C-19 için  $\Delta$  3.26 ppm, C-9 için  $\Delta$  4.08 ppm ve C-12 için  $\Delta$  9.01 ppm). Bunun aksine metabolitin <sup>13</sup>C NMR spektrumunda başlangıç maddesinin C-8 ve C-13 numaralı karbon atomları için yukarı bölgeye doğru  $\gamma$ -gauche kaymaları gözlemlendi (C-8 için  $\Delta$  4.16 ppm ve C-13 için  $\Delta$  0.84 ppm). Bütün bu karakteristik kayma değerleri C-11 pozisyonunda gerçekleşen bir hidroksilasyonu ve ilk metabolitin 3 $\beta$ ,11 $\beta$ -dihidroksi-5 $\alpha$ -androstan-17-on (**16**) olduğunu doğrular nitelikteydi.

İkinci metabolitin daha önceki biyotransformasyon çalışmasından elde edilen 3 $\beta$ -hidroksi-17 $\alpha$ -okza-D-homo-5 $\alpha$ -androstan-17-on (**23**) olduğu her iki bileşiğin <sup>1</sup>H NMR ve <sup>13</sup>C NMR spektrumlarındaki rezonanslarının karşılaştırılması ile anlaşıldı.

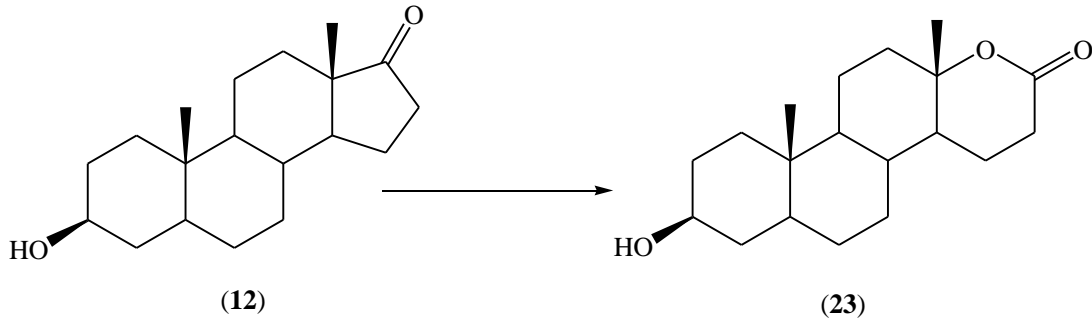
Tablo 4.2. Bileşiklerin <sup>13</sup>C NMR spektrumu sinyallerinin karşılaştırılması

<b>Karbon</b>	<b>12</b>	<b>16</b>	<b>23</b>
1	36,87	36,83	36,72
2	31,35	31,24	31,28
3	71,06	70,96	71,04
4	37,98	37,57	37,77
5	44,76	45,72	44,15
6	28,32	27,84	28,24
7	30,83	31,09	30,57
8	34,97	30,81	37,87
9	54,35	58,43	53,04
10	35,57	35,74	35,47
11	20,43	68,06	22,00
12	31,47	40,48	39,22
13	47,76	46,92	83,40
14	51,34	52,90	46,24
15	21,72	21,65	19,76
16	35,80	35,33	28,61
17	221,50	219,94	171,64
18	13,76	15,86	20,11
19	12,25	15,51	12,14

## BÖLÜM 5. SONUÇLAR

Biyotransformasyon çalışmaları sonucunda elde edilen yeni bileşiklerin yapılarını tayin amacıyla epiandrosteron (**12**) ve biyotransformasyonlardan elde edilen bileşiklerin  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, IR spektrumları alındı ve erime noktalarının tayini yapıldı.

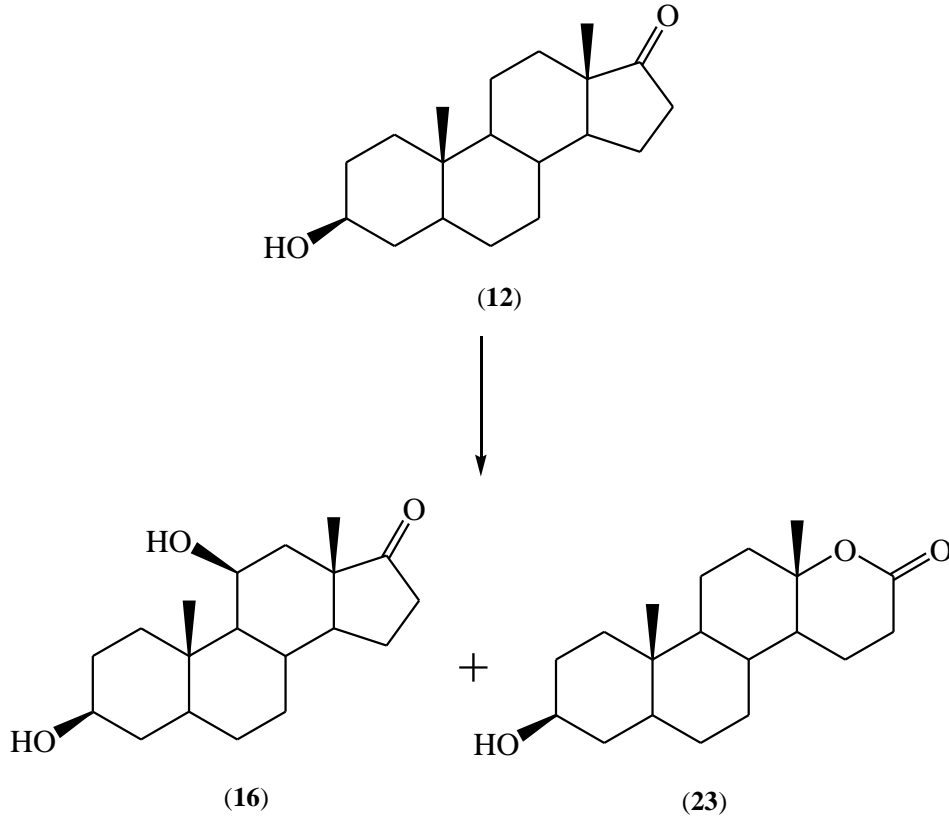
Epiandrosteron (**12**) ve bu bileşiğin *Aspergillus terreus* MRC 200365 ile biyotransformasyonundan elde edilen metabolin  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, ve IR spektrumları karşılaştırıldı. Karşılaştırma sonucunda epiandrosteron (**12**) bileşiğinin *Aspergillus terreus* MRC 200365 küfü ile 5 gün biyotransformasyonu neticesinde elde edilen metabolitin  $3\beta$ -hidroksi-17 $\alpha$ -okza-D-homo-5 $\alpha$ -androstan-17-on (**23**) olduğu anlaşıldı (Şekil 5.1.). Metabolitin erime noktasının literatürdeki bilgiler ile karşılaştırılması da bu sonucu desteklemektedir.



Şekil 5.1. Epiandrosteron (**12**) bileşiğinin *Aspergillus terreus* MRC 200365 ile biyotransformasyonu

Benzer şekilde Epiandrosteron (**12**) ve bu bileşiğin *Aspergillus tamarisii* MRC 72400 ile biyotransformasyonundan elde edilen iki metabolitin  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, ve IR spektrumları karşılaştırıldı. Karşılaştırmaların sonucunda epiandrosteron (**12**) bileşiğinin *Aspergillus tamarisii* MRC 72400 ile 7 gün biyotransformasyonu neticesinde iki ayrı bileşiğin elde edildiği anlaşıldı.

Bu bileşiklerin 3 $\beta$ ,11 $\beta$ -dihidroksi-5 $\alpha$ -androstan-17-on (**16**) ve 3 $\beta$ -hidroksi-17 $\alpha$ -okza-D-homo-5 $\alpha$ -androstan-17-on (**23**) olduğu anlaşıldı (Şekil 5.2.). Metabolitlere ait erime noktalarının literatürdeki bilgiler ile karşılaştırılması da yapı tayininin doğruluğunu desteklemektedir.



Şekil 5.2. Epiandrosteron (**12**) bileşiğinin *Aspergillus tamarii* MRC 72400 ile biyotransformasyonu

## BÖLÜM 6. TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Epiandrosteron'un (12) diğer küfler ile biyotransformasyonları sadece çeşitli pozisyonlarda hidrosillenmiş bileşikler verirken *Aspergillus terreus* MRC 200365 ile 5 gün boyunca süren biyotransformasyonu bir steroidal D lakton olan 3 $\beta$ -hidroksi-17 $\alpha$ -okza-D-homo-5 $\alpha$ -androstan-17-on (23) bileşiği ile sonuçlandı. Steroidal laktonlar antikanserojenik [21,22], antiandrojenik [23-24] ve antihiperkolestrolemik [25] ekileri sebebi ile tıbbi açıdan oldukça önemli bileşiklerdir. Bu laktonların kimyasal yöntemler ile sentezi çevre kirliliğine sebep olmaları yüzünden mikrobiyal biyotransformasyonlar daha çok tercih edilirler [26]. Bazı C<sub>21</sub> steroidlerin 17 $\beta$ -asetil yan zincirlerinin mikroorganizmalarca stereospesifik olarak uzaklaştırılması ve bazı androjenlerin mikrobiyal biyotransformasyonları steroidal D laktonların sentezi ile sonuçlanmaktadır [27]. Bahsedilen reaksiyonları katalizleyen ve çoğu bakteri ve küfte bulunan bu enzimler Baeyer-Villiger monooksijenaz enzimleri (BVMO) olarak bilinirler. Özellikle bazı küfler bir keto fonksiyonu yanına oksijen atomu ekleyerek bir çok farklı ketonu ilgili esterlere veya laktonlara çevirirler [28].

Epiandrosteronun (12) *Aspergillus tamarii* MRC 72400 ile 7 gün boyunca biyotransformasyonu ise bir BVMO aktivitesi ile ana metabolit olarak *Aspergillus terreus* MRC 200365 küfünün de verdiği 3 $\beta$ -hidroksi-17 $\alpha$ -okza-D-homo-5 $\alpha$ -androstan-17-on (23) ve bir hidroksilaz enzimi aktivitesi ile yan ürün olarak 3 $\beta$ ,11 $\beta$ -dihidroksi-5 $\alpha$ -androstan-17-on (16) ile sonuçlandı. Epiandrosteronun (12) literatürdeki *A. tamarii* QM 1223 ile 4 gün süren biyotransformasyonu ise sadece 3 $\beta$ ,11 $\beta$ -dihidroksi-5 $\alpha$ -androstan-17-on (16) ile sonuçlanmıştı. *A. tamarii* QM 1223 ile inkübasyon daha farklı bir besiyeri ile ve daha kısa sürede gerçekleştirilmişti. Ayrıca her iki inkübasyon için yardımcı solvent miktarı da farklıydı. Her iki inkübasyon için yardımcı solvent, inkübasyon sıcaklığı ve substrat miktarı aynı alınmıştı [7].

*A. tamarii* QM 1223 ve *A. tamarii* MRC 72400 *A. tamarii* küfünün iki ayrı suşudur. Mikrobiyal suşlar metabolizma ve morfoloji gibi birçok konuda birbirlerinden farklı olabilirler [1]. Hidroksilasyon *A. tamarii* QM 1223 için ana metabolik yol iken D halkasında laktonizasyon *A. tamarii* MRC 72400 için ana metabolik yol olabilir.

Besiyeri içeriği ve inkübasyon süresi biyotransformasyonlar için önemli faktörlerdir [1,29]. Bu faktörler her iki inkübasyon için farklı alınmıştır. *A. tamarii* QM 1223 ile inkübasyon karbon kaynağı olarak glikoz, azot kaynağı olarak ise amonyum nitrat içeren sentetik bir besiyeri kullanılmıştır [7]. Bahsedilen inkübasyonu gerçekleştiren Brannon ve arkadaşlarının kullandıkları sentetik besiyeri ile *A. tamarii* MRC 72400 için kullanılan %3 malt ekstrakt besiyerinin aynı sonuçları verdiğini bildirmeleri bu iki inkübasyondan elde edilen sonuçların farklı besiyerlerinden kaynaklanmadığını düşündürmektedir. İki inkübasyon sürenin aynı olmaması bu inkübasyonlardan farklı sonuçların alınmasın sebeplerinden biri olabilir. Farklı inkübasyon süreleri boyunca değişen besiyeri bileşenlerinin konsantrasyonları, pH, toksik atıkların birikimi ve bazı ürünlerin inhibe edici birikimleri gibi faktörler küf gelişimi ve reaksiyon ürünlerini belirler [1,29]. Bahsedilen faktörler *A. tamarii* QM 1223 ile inkübasyon için sadece bir hidroksilaz enziminin aktive etmişken aynı faktörler *A. tamarii* MRC 72400 ile inkübasyon için öncelikle bir BVMO enzimini aktive etmiş olabilir.

Suda çözünürlükleri oldukça düşük olan steroidlerin çözünürlüğünü arttırmak için DMF ve DMSO gibi yardımcı solventler kullanılmaktadır. Bazen yardımcı solventlerin belli bir düzeyin üzerinde kullanılması mikroorganizmalar üzerinde toksik etki yapabilmektedir [11]. *A. tamarii* QM 1223 ile 1 L besiyeri için 4 ml DMF kullanılırken [24] *A. tamarii* MRC 72400 ile 1 L besiyeri için 10 ml DMF kullanılmıştır. *A. tamarii* QM 1223 ile inkübasyondan sadece 3 $\beta$ ,11 $\beta$ -dihidroksi-5 $\alpha$ -androstan-17-on (**16**) (%28.4) elde edilirken *A. tamarii* MRC 72400 ile inkübasyondan ise başlangıç maddesinin yarıdan çoğu (%60), 3 $\beta$ -hidroksi-17 $\alpha$ -okza-D-homo-5 $\alpha$ -androstan-17-on (**23**) (%9.5) ve 3 $\beta$ ,11 $\beta$ -dihidroksi-5 $\alpha$ -androstan-17-on (**16**) (%3) elde edildi. Bu sonuçlar *A. tamarii* MRC 72400 ile 1 L besiyeri için kullanılan 10 ml DMF'nin küf için toksik olabileceği ve bunun biyotransformasyon etkinliğini düşürebileceğini düşündürmektedir.

Hem mikrobiyal hidroksilasyon [30] hem de D halkası laktonizasyonu [28] için moleküler oksijen kullanıldığından havalandırma her iki inkübasyondan farklı sonuçlar elde edilmesinin bir diğer sebebi olabilir. *A. tamarii* QM 1223 ile inkübasyondaki çalkalama için herhangi rpm değeri verilmediğinden bu konuda net ve bir yorum yapmak oldukça zordur [7].

Bu çalışma sonucunda epiandrosteron bileşiğinden ilk defa mikrobiyal biyotransformasyonlar ile bir steroidal D lakton elde edilmiştir. Tıbbi önemi olabilecek [21-25] olan bu ve benzeri laktonların daha yüksek verimler ile elde edilmesi için steroidlerin daha önce aynı amaç doğrultusunda kullanılmamış diğer bazı küfler ile biyotransformasyonlarına yönelik çalışmalarımız sürecektir.



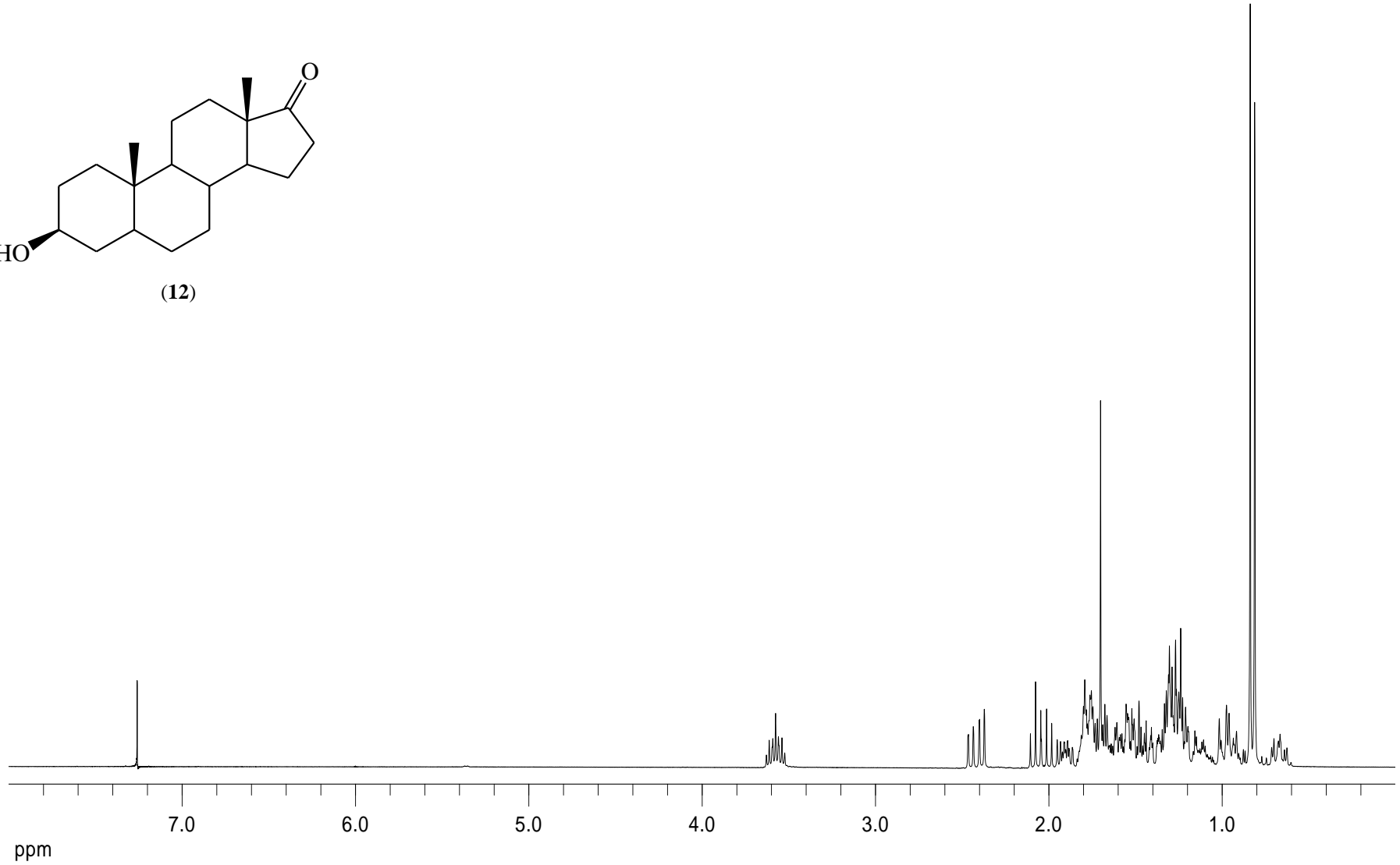
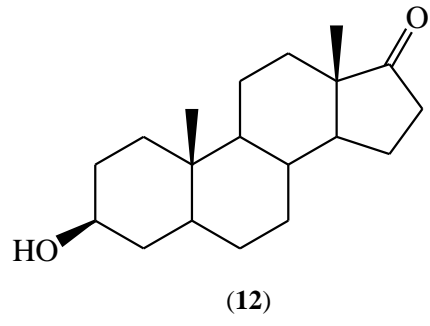
## KAYNAKLAR

- [1] HANSON, J.R., "An Introduction to Biyotransformations in Organic Chemistry", W.H. Freeman Spektrum, 1-62, New York, USA, 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 American. Chemical . Society*, 74, 1871-1872, 1952.
- [4] ONAT, T., EMERK, K., SÖZMEN, E.Y., "İnsan Biyokimyası", Palme Yayıncılık, 481-495, Ankara, 2002.
- [5] KEHA, E., KÜFREVOĞLU, Ö. İ., "Biyokimya", Dördüncü baskı, Aktif Yayınevi, 185-188, Erzurum, 2005.
- [6] CALLIES, F., ARLT, W., SIEKMANN, L., HUBLER, D., BIDLINGMAIER, F., ALLOLIO, B. "Influence of oral dehydroepiandrosterone (DHEA) on urinary steroid metabolites in males and females", *Steroids*, 65(2), 98-102, 2000.
- [7] BRANNON, D. R., PARRISH, F. W., WILEY, B. J., LONG, L., "Microbial transformation of a series of androgens with *Aspergillus tamarii*", *J. Org. Chem.*, 32, 1521-1527, 1967.
- [8] CHALBOT, S., TRAP, C., MONIN, J. P., MORFIN, R., "Use of bioconversion for the preparation of [4-14C]-labeled 7 $\alpha$ - and 7 $\beta$ -hydroxylated derivatives of dehydroepiandrosterone and epiandrosterone", *Steroids*, 67, 1121-1127, 2002.
- [9] BENSASSON, C.M., HANSON, J.R., HUNTER, A.C., "The Hydroxylation of  $\Delta^5$ -Androstenes by *Cephalosporium aphidicola*" *Phytochemistry*, 49, 2355-2358, 1998.
- [10] COTILLON, 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.
- [11] FERNANDES, P., CRUZ, A., ANGELOV, B., PINHEIRO, H. M., CABRAL, J. M. S., "Microbial conversion of steroids compounds: recent developments. *Enzyme*", *Microb. Technol.*, 32, 688-705, 2003.

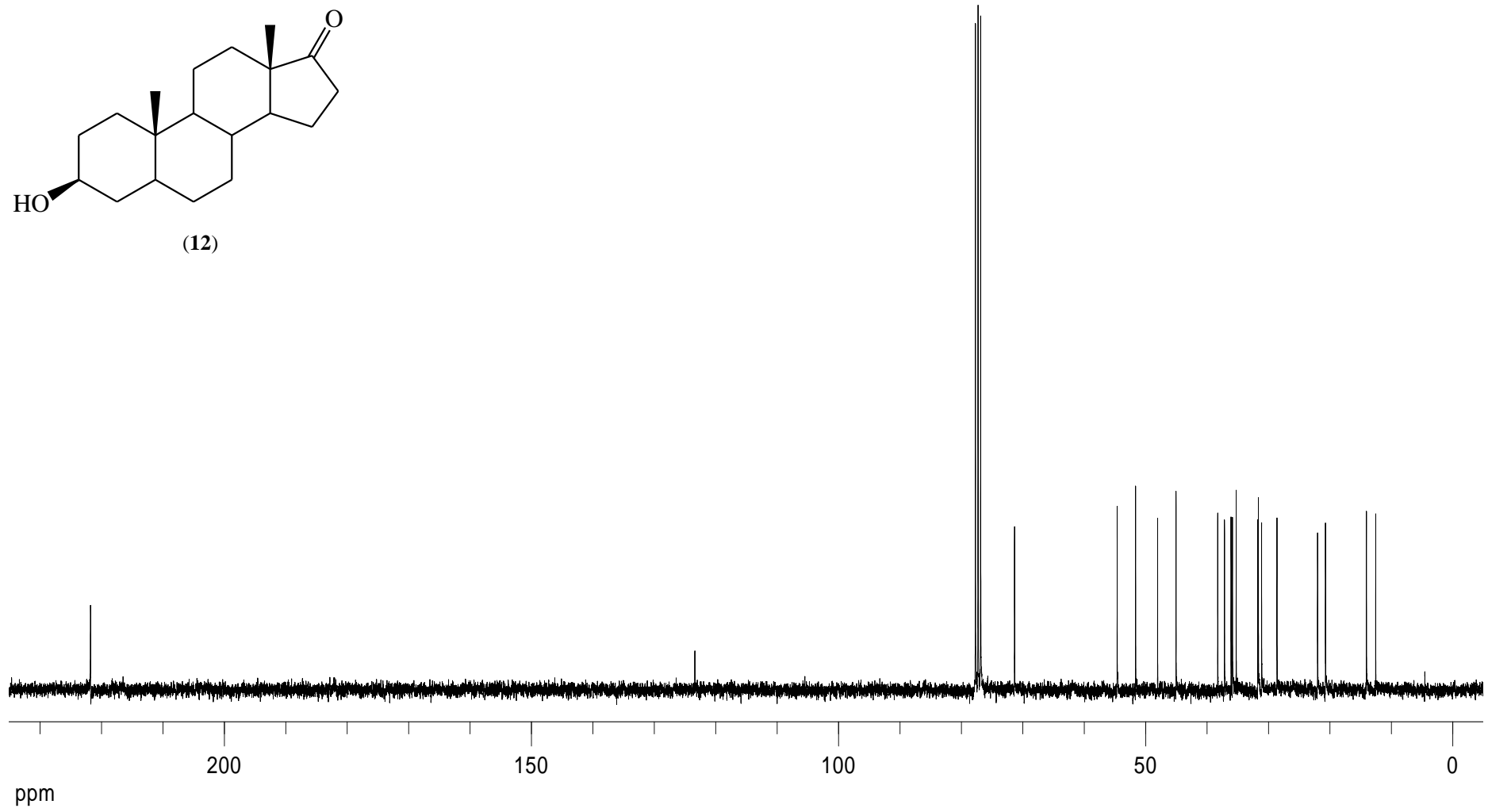
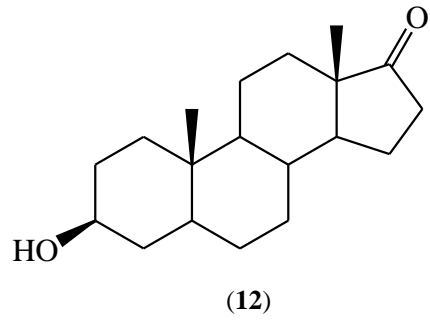
- [12] MAHATO, S. B., GARAI, S., "Advances in microbial steroid biotransformation", *Steroids*, 62, 332–345, 1997.
- [13] HOLLAND, H.L., "Recent advances in applied and mechanistic aspects of the enzymatic hydroxylation of steroids by whole-cell biocatalyst", *Steroids*, 64, 178–186, 1999.
- [14] FARAMARZI, M.A., YAZDI, M.T., AMINI, M., MOHSENI, F.A., ZARRINI, G., AMANI, A., SHAFIEE, A., "Microbial production of testosterone and testolactone in the culture of *Aspergillus terreus*", *World J. Microbiol. Biot.* 20, 657-660, 2004.
- [15] 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 Microb. Tech.*, 36, 967, 2005.
- [16] HUNTER, A. C., CARRAGHER, N. E., "Flexibility of the endogenous progesterone lactonisation pathway in *Aspergillus tamaris* KITA: transformation of a series of cortical steroid analogues", *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 87, 301–308, 2003.
- [17] HANSON, J.R., HUNTER, A.C., "The Hydroxylation of Steroidal Ring D Lactones by *Cephalosporium aphidicola*", *Phytochemistry*, 49, 2349-2353, 1998.
- [18] KUPFER, D., "Altered selectivity of reduction of steroidal carbonyls", *Tetrahedron*, 15, 193-196, 1961.
- [19] KIRK, D. N., TOMS, H. C., DOUGLAS, C., WHITE, K. A., SMITH, K. E., LATIF, S., HUBBARD, R. W. P., "A survey of high field  $^1\text{H}$  NMR spectra of the steroid hormones, their hydroxylated derivatives, and related compounds", *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 2, 9, 1567-1594, 1990.
- [20] BLUNT, J.W., STOTHERS, J.B., " $^{13}\text{C}$  NMR spectra of steroids-A survey and commentary", *Org. Mag. Res.*, 9, 439-464, 1977.
- [21] BRODIE, A.M.H., NJAR, V.C.O., "Aromatase inhibitors in advanced breast cancer: mechanism of action and clinical implications", *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 66, 1–10, 1998.
- [22] LI, S., PARISH, E.J., "Design and action of steroidal aromatase inhibitors", *JAOCS*, 73, 1435–1451, 1996.
- [23] BRAUNSTEIN, G.D., "Aromatase and gynecomastia", *Endocr-Relat Cancer*, 6, 315–324, 1999.

- [24] FEUILLAN, P., MERKE, D., LESCHEK, E.W., CUTLER, G.B., "Use of aromatase inhibitors in precocious puberty", *Endocr-Relat Cancer*, 6, 303–306, 1999.
- [25] BARAN, J.C., "The synthesis, stereochemistry, and biology of 16-hetero and 17-oxa-D-homo steroids", *J. Med. Chem.*, 10, 1039–1047, 1967.
- [26] LIU, H. M., LI, H., SHAN, L., WU, J., "Synthesis of steroidal lactones by *Penicillium citreo-viride*", *Steroids*, 71, 931–934, 2006.
- [27] KOLEK, T., SZPINETER, A., SWIZDOR, A., "Baeyer-Villiger oxidation of DHEA, pregnenolone, and androstenedione by *Penicillium lilacinum* AM111", *Steroids*, 73, 1441-1445, 2008.
- [28] HOLLAND, H. L., "Organic synthesis with oxidative enzymes", VCH Publishers, 241, New York, 1992.
- [29] SMITH, J. E., "Biotechnology", 3rd ed. Cambridge, Cambridge University Pres., 47-67, 1996.
- [30] HOLLAND, H.L., "The Mechanism of the Microbial Hydroxylation of Steroids", *Chemical Society. Reviews*, 11, 371-395, 1982.

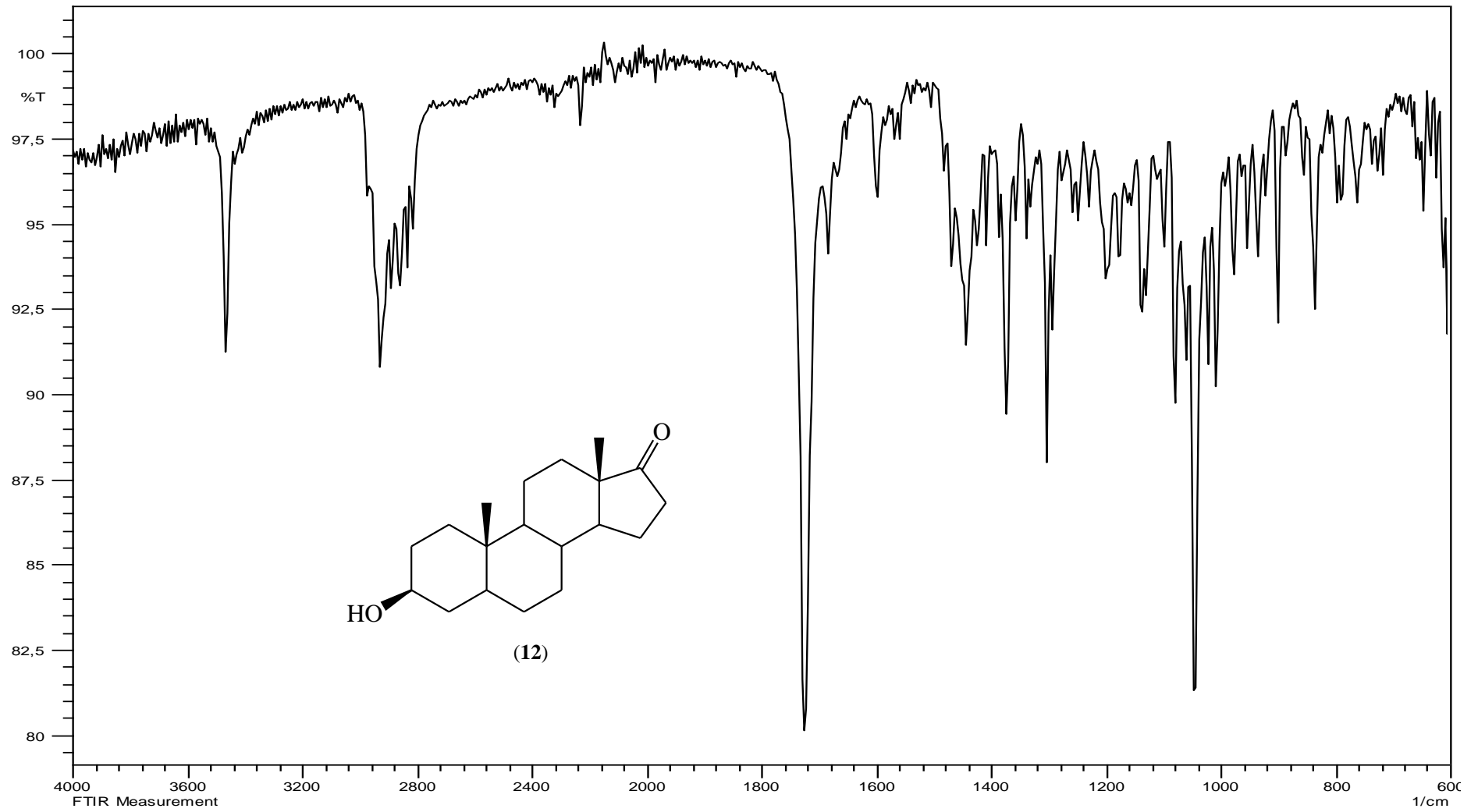
**EKLER**



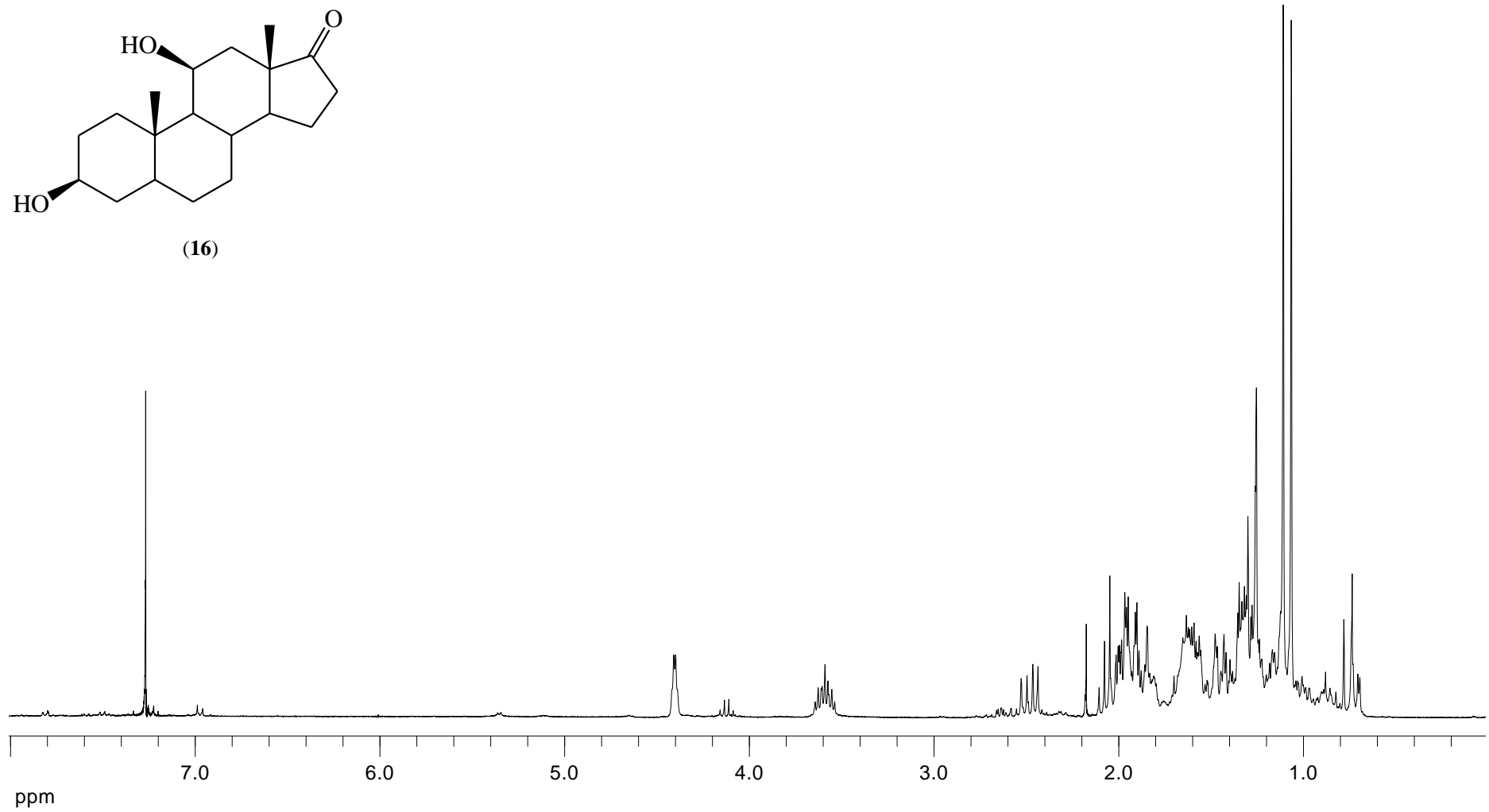
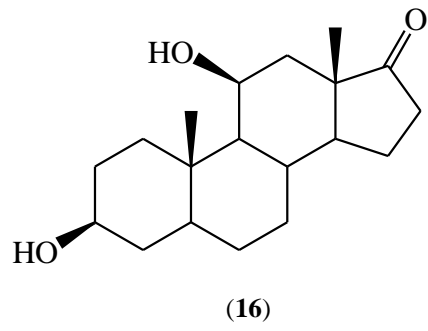
Şekil A.1. Epiandrosteron (12) bileşiğinin <sup>1</sup>H NMR spektrumu



Şekil A.2. Epiandrosteron (12) bileşiğinin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu

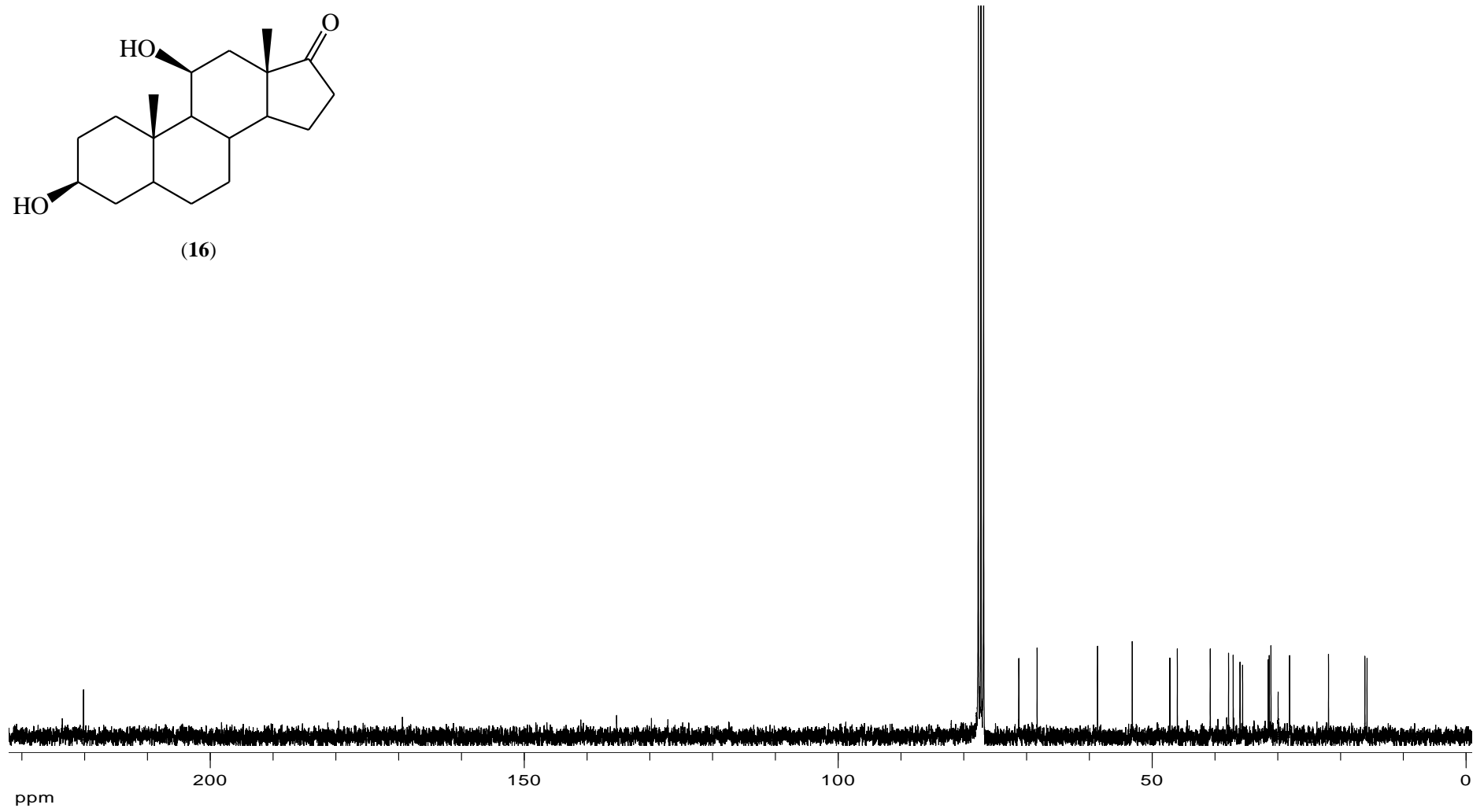
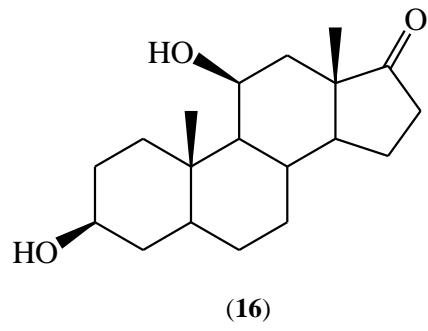


Şekil A.3. Epiandrosteron (12) bileşiğinin IR spektrumu

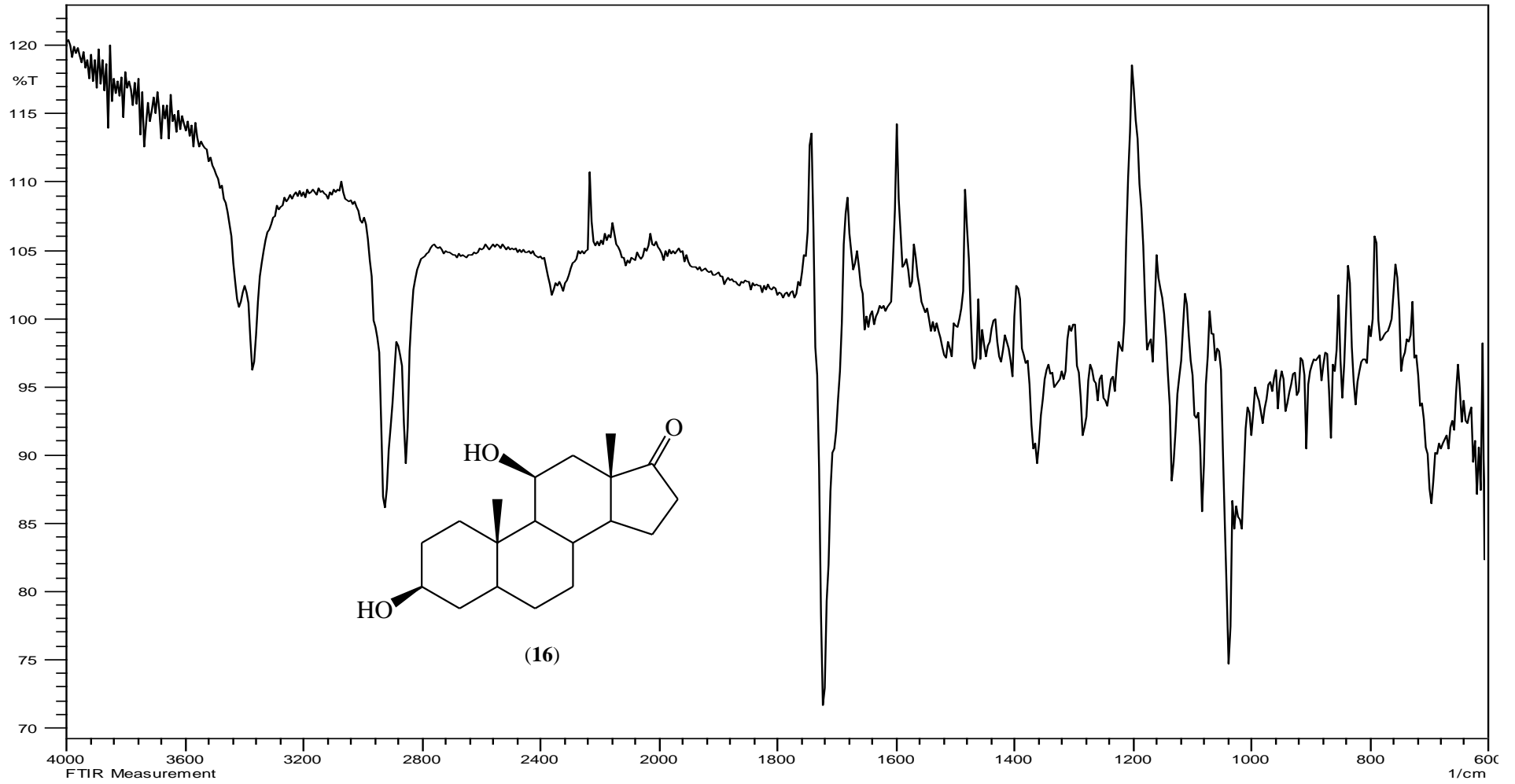


Şekil A.4. 3 $\beta$ ,11 $\beta$ -Dihidroksi-5 $\alpha$ -androstan-17-on (16) bileşiğinin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

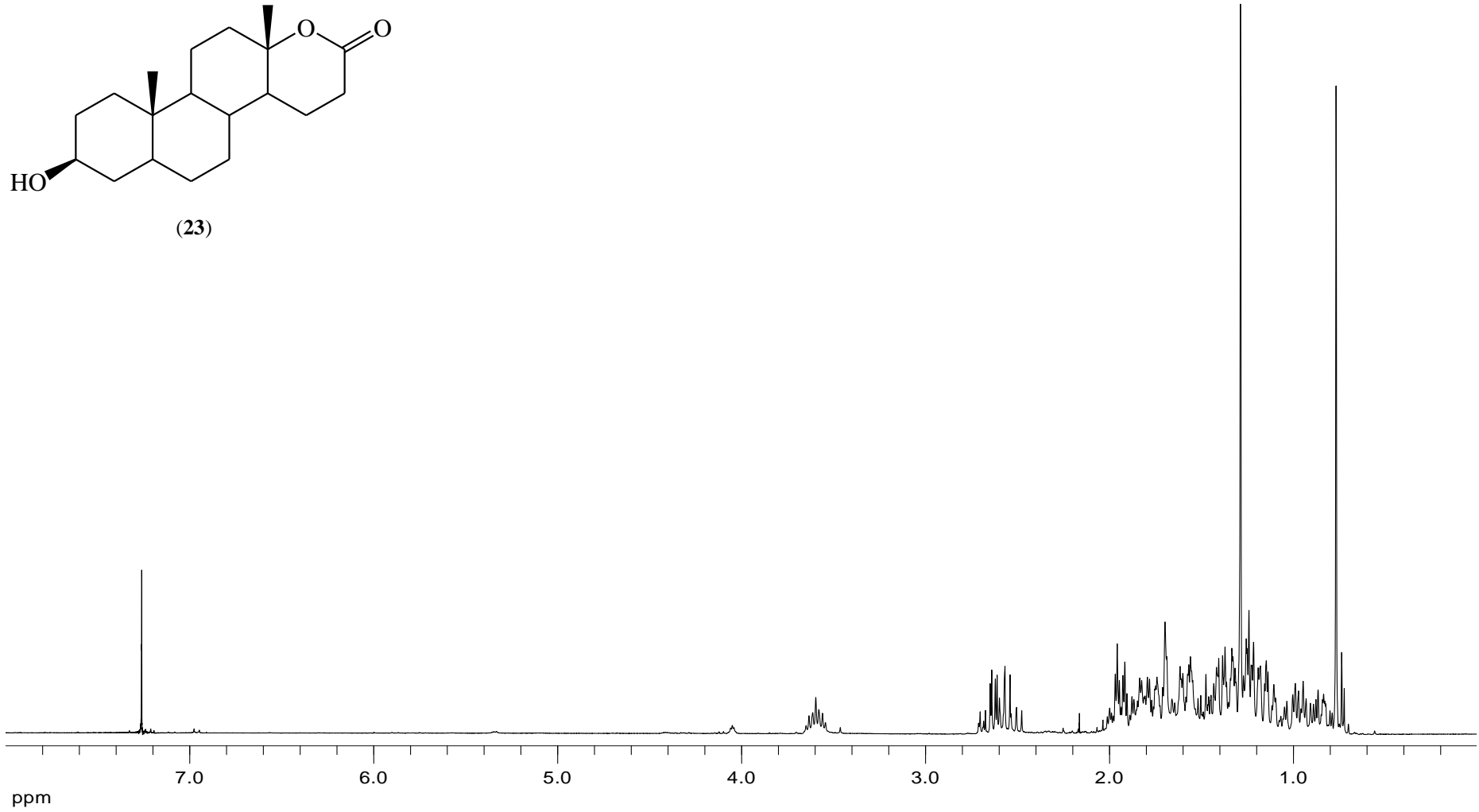
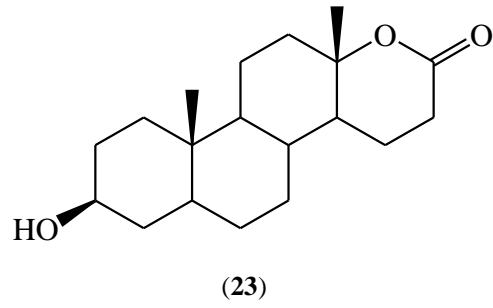




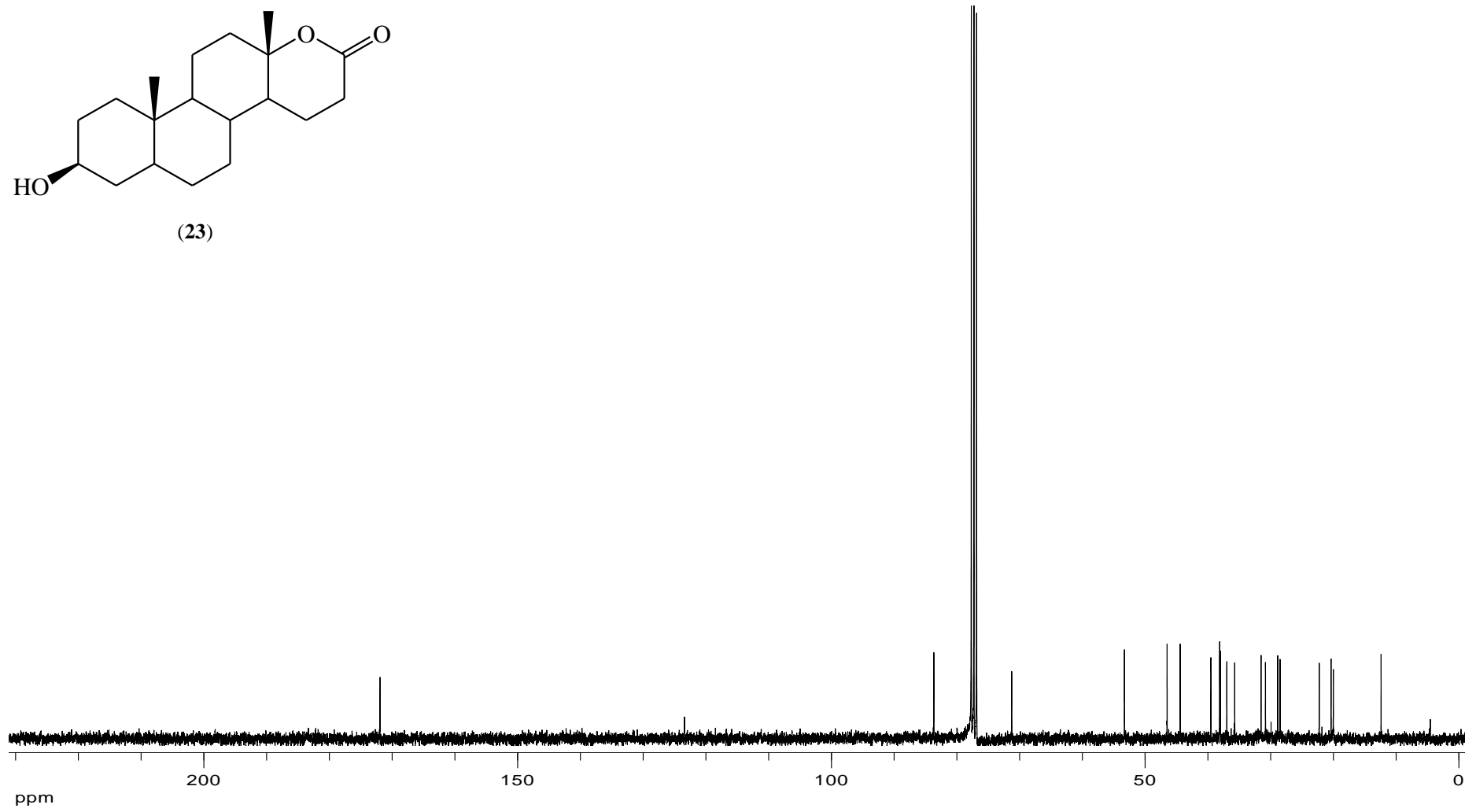
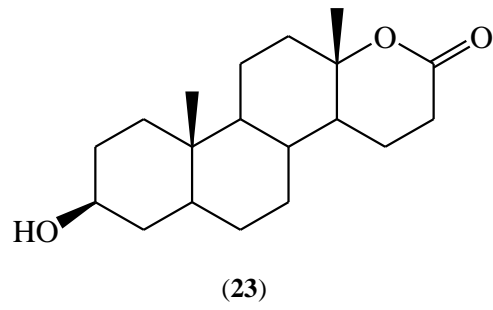
Şekil A.5. 3β,11β-Dihidroksi-5α-androstan-17-on (16) bileşiğinin <sup>13</sup>C NMR spektrumu



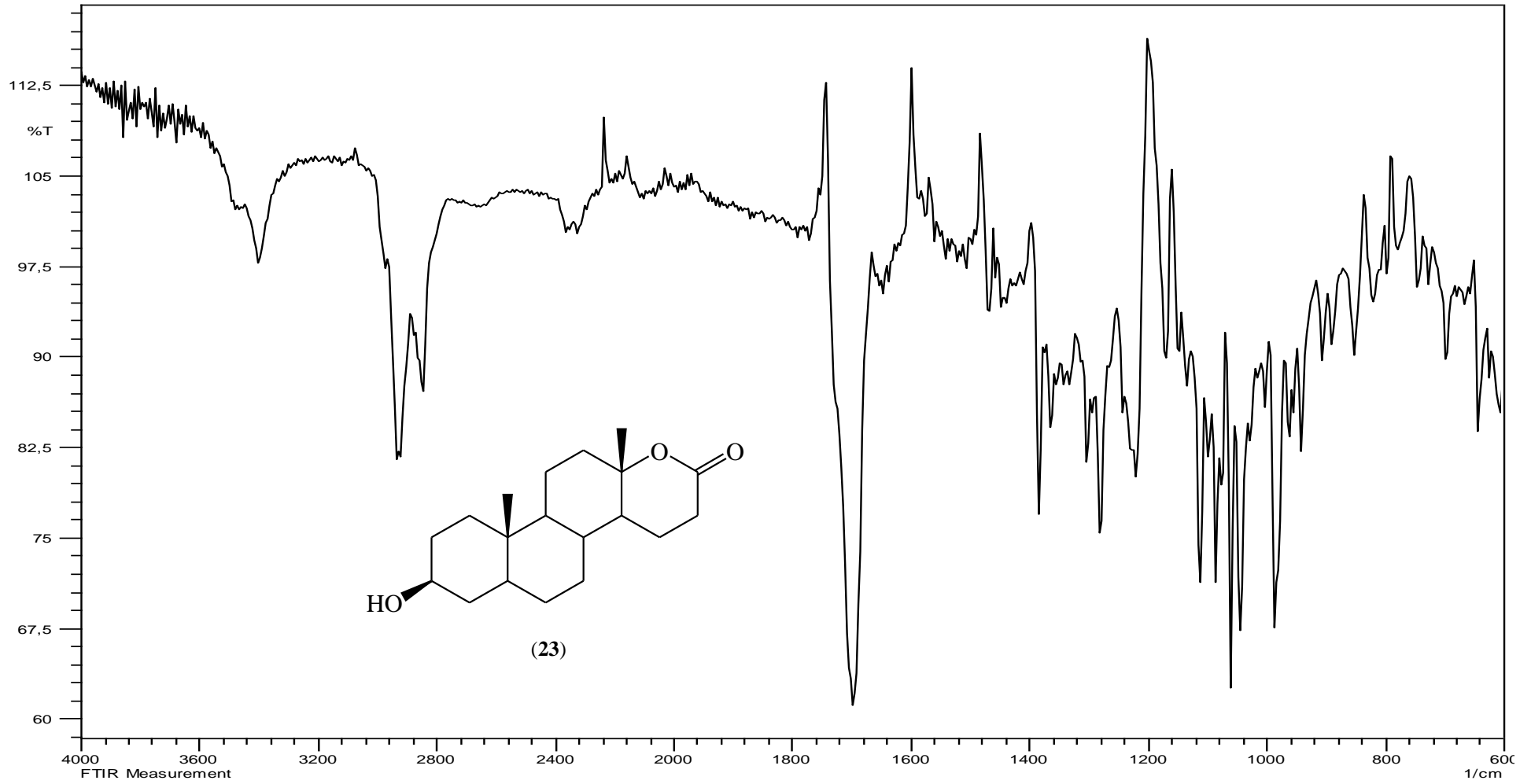
Şekil A.6. 3β,11β-Dihidroksi-5α-androstan-17-on (16) bileşğinin IR spektrumu



Şekil A.7. 3β-Hidroksi-17α-okza-D-homo-5α-androstan-17-on (23) bileşiğinin <sup>1</sup>H NMR spektrumu



Şekil A.8. 3 $\beta$ -Hidroksi-17 $\alpha$ -okza-D-homo-5 $\alpha$ -androstan-17-on (**23**) bileşiğinin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu



Şekil A.9. 3β-Hidroksi-17α-okza-D-homo-5α-androstan-17-on (23) bileşiğinin IR spektrumu

## ÖZGEÇMİŞ

Ahmet Uzuner 1981 yılında Sakarya'da doğdu. İlk öğrenimini Mithatpaşa İlkokulu'nda, orta öğrenimini ise Mithatpaşa Lisesi'nde tamamladı. Lisans eğrenimi 2003 yılında Sakarya Üniversitesi Kimya bölümünde tamamladı. Yüksek lisans eğrenimine 2007 yılında Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında başladı.

Meslek hayatına 2004 yılı temmuz ayında İstanbul Pharma-Vision İlaç fabrikasında yönetici adayı olarak başladı. 2005 – 2006 yılları arası Sakarya Aydın Örne tekstil fabrikasında vardiya mühendisliği yaptı. 2006 yılı içerisinde Muğla Mopak kağıt fabrikasında kağıt imal vardiya mühendisliği yaptı. Yine 2006 yılı haziran ayında Sakarya Atamis İlaç fabrikasında 2,5 yıl üretim şefliği yaptı. 2008 yılında fabrikayı Toprak İlaç'ın devralmasıyla 1 yıl daha görevine burada devam etti. 2009 ekim ayında ise İzmit Yıldız Sunta MDF fabrikasında kağıt emprenye bölümünde vardiya mühendisi olarak görevine başladı ve bu görevine halen devam etmektedir.