

T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**EPIANDROSTERON BİLEŞİĞİNİN *ASPERGILLUS GLAUCUS*  
KÜFÜ İLE BİYOTRANSFORMASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Fatema ALSOUID**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Biyokimya Bilim Dalı**

**TEMMUZ 2023**



T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**EPIANDROSTERON BİLEŞİĞİNİN *ASPERGILLUS GLAUCUS*  
KÜFÜ İLE BİYOTRANSFORMASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Fatema ALSOUID**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Biyokimya Bilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kudret YILDIRIM**

**TEMMUZ 2023**



Fatema Alsoud tarafından hazırlanan “EPIANDROSTERON BİLEŞİĞİNİN *ASPERGILLUS GLAUCUS* KÜFÜ İLE BİYOTRANSFORMASYONU” adlı tez çalışması 03.07.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

### Tez Jürisi

**Jüri Başkanı :**            **Ünvan Adı SOYADI**            .....

Sakarya Üniversitesi

**Jüri Üyesi :**            **Ünvan Adı SOYADI (Danışman)**            . .....

Sakarya Üniversitesi

**Jüri Üyesi :**            **Ünvan Adı SOYADI**            .....

Sakarya Üniversitesi



## ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğine ve Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesine uygun olarak hazırlamış olduğum “EPIANDROSTERON BİLEŞİĞİNİN *ASPERGILLUS GLAUCUS* KÜFÜ İLE BİYOTRANSFORMASYONU” başlıklı tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın tüm aşamalarında yukarıda belirtilen yönetmelik ve yönergeye uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, bu tezi başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve 20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince Sakarya Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Enstitü tarafından belirlenmiş ölçütlere uygun rapor alındığımı, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun ortaya çıkması halinde doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi beyan ederim.

07/07/2023

Fatema ALSOUID





## **TEŞEKKÜR**

Araştırmayı büyük bir titizlik ve sabırla yöneten, çalışma boyunca desteğini bir dakika bile esirgemeyen, bilgi ve birikimlerinden faydalandığım değerli hocam. Prof. Dr. Kudret YILDIRIM en içten teőekkürlerimi hak ediyor.

Lisansüstü çalışmalarım sırasında ihtiyaç duyduğum her konuda bana yardımcı olan Sakarya Üniversitesi Kimya Bölümü öğretim üyeleri ve araştırma görevlilerine, laboratuvar arkadaşlarıma ve Arş. Gör. Ali Kuru'ya teşekkür etmek istiyorum.

Başarımda önemli rol oynayan, hayatım boyunca her zaman yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen aileme, eőime ve kardeşlerime en içten teőekkürlerimi sunarım.

Fatema ALSOUID



## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	v
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
KISALTMALAR .....	xi
SİMGELER .....	xiii
TABLO LİSTESİ .....	xv
ŞEKİL LİSTESİ .....	xvii
ÖZET .....	xix
SUMMARY.....	xxi
1. GİRİŞ .....	1
2. <i>ASPERGILLUS</i> TÜRLERİ İLE EPIANDROSTERON BİYOTRANSFORMASYONLARI .....	3
2.1. Epiandrosteron .....	3
2.2. Küfler ile Steroid Biyotransformasyonları .....	7
2.3. <i>Aspergillus</i> Türleri ile Epiandrosteron (15) Biyotransformasyonları.....	8
2.4. Çalışmanın Amacı .....	11
3. MATERYAL VE METOT .....	13
3.1. Genel Bilgiler .....	13
3.2. Yatık Ağar Besiyerlerinin Hazırlanışı.....	14
3.3. Küf Kültürlerinin Hazırlanışı ve Tazelenmesi .....	14
3.4. Küf Besiyerinin Hazırlanışı.....	14
3.5. Biyotransformasyon Deneyi.....	14
3.6. Metabolitlerin Ayrılması ve Yapı Tayini .....	15
4. DENEYSEL BULGULAR .....	17
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	19
KAYNAKLAR .....	23
EKLER .....	25
ÖZGEÇMİŞ.....	35



## KISALTMALAR

<b><sup>13</sup>C NMR</b>	: Karbon 13 Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
<b>DMF</b>	: Dimetilformamid
<b><sup>1</sup>H NMR</b>	: Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
<b>IR</b>	: Infrared (kızılötesi)
<b>İTK</b>	: İnce Tabaka Kromatografisi
<b>lit.</b>	: Literatür
<b>PDA</b>	: Potato dekstroz agar
<b>ppm</b>	: Milyonda bir birim
<b>rpm</b>	: Dakika başına devir sayısı
<b>UV</b>	: Ultraviyole (morötesi) ışık



## SİMGELER

<b>bs</b>	: Küt tekli (broad singlet) rezonans
<b>°C</b>	: Santigrat derece
<b>cm</b>	: Santimetre
<b>Δ</b>	: Kimyasal kayma farkı
<b>δ<sub>C</sub></b>	: <sup>13</sup> C NMR spektrumundaki kimyasal kayma
<b>δ<sub>H</sub></b>	: <sup>1</sup> H NMR spektrumundaki kimyasal kayma
<b>dt</b>	: Üçlü rezonansların ikilisi (tripletlerin dubleti)
<b>g</b>	: Gram
<b>Hz</b>	: Hertz
<b>J</b>	: Etkileşim sabiti
<b>lit.</b>	: Literatür
<b>mg</b>	: Miligram
<b>MHz</b>	: Megahertz
<b>mL</b>	: Mililitre
<b>pH</b>	: Hidrojen iyonu konsantrasyonunun eksi logaritması
<b>s</b>	: Tekli (singlet) rezonans
<b>tt</b>	: Üçlü rezonansların üçlüsü (tripletlerin tripleti)





## TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Tablo 4.1.</b> Steroidler için $^{13}\text{C}$ NMR kimyasal kayma değerleri. ....	18
<b>Tablo 5.1.</b> Steroidlere ait $^{13}\text{C}$ NMR kimyasal kayma değerleri.....	20
<b>Tablo 5.2.</b> Metabolit verimleri.....	21



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 2.1. Steran halkası.....	4
Şekil 2.2. Bazı östrojen ve androjenlerin biyosentezi.....	6
Şekil 2.3. Testosteron (6) bileşiminin bazı metabolitleri.....	7
Şekil 2.4. <i>A. wentii</i> MRC 200316 ile biyotransformasyon.....	8
Şekil 2.5. <i>A. candidus</i> MRC 200634 ile biyotransformasyon.....	9
Şekil 2.6. <i>A. sydowii</i> MRC 200653 ile biyotransformasyon.....	10
Şekil 2.7. <i>A. tamarisii</i> MRC 72400 biyotransformasyon.....	10
Şekil 2.8. <i>A. tamarisii</i> QM 1223 ile biyotransformasyon.....	11
Şekil 2.9. <i>A. terreus</i> MRC 200365 biyotransformasyon.....	11
Şekil 4.1. Substrata ait karbon iskeleti.....	17
Şekil 4.2. <i>A. glaucus</i> MRC 200914 ile biyotransformasyon.....	17
Şekil 5.1. <i>A. glaucus</i> MRC 200914 ile biyotransformasyon.....	19



## EPIANDROSTERON BİLEŞİĞİNİN *ASPERGILLUS GLAUCUS* KÜFÜ İLE BİYOTRANSFORMASYONU

### ÖZET

Canlıların büyüme ve gelişmesinde doğrudan görev almayan doğal ürünler genellikle buldukları canlılara daha iyi hayat şartları sağlarlar. Bu bileşikler özellikle diğer canlılardaki etkilerinden dolayı çok fazla dikkate alınırlar. Doğal ürünler birbirinden farklı yapıda ve çok sayıda olmalarına rağmen genelde biyosentezlerindeki bazı ortak yapısal karakterleri sebebiyle terpenler, alkaloidler, steroidler, fenolik bileşikler, özelleşmiş karbohidratlar, özelleşmiş peptidler, poliketidler, yağ asitleri ve yağ asitleri türevleri olarak gruplandırılırlar. Steroidler doğal ürünlerin en önemli gruplarından birisini oluştururlar. Kolesterol hayvanlar ve insanların membranlarındaki akışkanlığını düzenleyen çok önemli bir steroiddir. Kolesterol bileşiği steroid hormonlar, safra asitleri ve D<sub>3</sub> vitamini gibi bazı önemli bileşiklerin başlangıç maddesidir. Kolesterol türevleri olan steroid hormonlar progesteronlar (progesteronlar), östrojenler, androjenler glukokortikoidler ve mineralokortikoidler olarak 5 ayrı grupta değerlendirilirler. Androjenler omurgalı erkek bireylerinde etki gösteren steroid hormonlarıdır. Bu hormon grubunun üyelerine testosteron, dihidrotestosteron ve epiandrosteron (**15**) örnek olarak verilebilir. Testosteron ve dihidrotestosteron bileşiklerinin aksine epiandrosteron (**15**) zayıf bir androjendir.

Enzimler yada enzimleri bulduran hücre, doku ve organ kültürleri ile mikroorganizmalar, mikroorganizma sporları, mikrozoimler, gibi biyolojik sistemlerin ksenobiyotikler üzerinde meydana getirdikleri kimyasal değişimler biyotransformasyonlar olarak adlandırılır. Mikroorganizmalar ile gerçekleştirilen mikrobiyal biyotransformasyonlar daha çok küfler, mikrobiyal algler, mayalar ve bakteriler gibi mikroorganizma grupları ile uygulanmaktadır. Günümüzde hormonlar ve ilaçlar gibi birçok önemli kimyasal maddenin üretimi klasik sentez yöntemleri yerine genelde mikrobiyal biyotransformasyonlar ile gerçekleştirilmektedir.

Bu çalışmada epiandrosteron (**15**) bileşiğinin *Aspergillus glaucus* MRC 200914 küfü ile biyotransformasyonu gerçekleştirildi. *A. glaucus* MRC 200914 küfüne özel hazırlanan besiyeri erlenlere dağıtılıp otoklavda sterilize edildi. Bu erlenlere küf steril şartlarda inoküle edildikten sonra erlenler 3 gün inkübasyona bırakıldı. Daha sonra erlenlere epiandrosteron (**15**) steril şartlarda ilave edilerek 5 gün daha inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında filtre edilen besiyeri bünyesindeki steroidler etil asetat ile ekstrakte edildi. Ekstraktların evaporatörde uçurulması ile elde edilen kalıntıdaki steroidler kolon kromatografisi çalışması ile ayrıldı. *Aspergillus glaucus* MRC 200914 ile substratın inkübasyonunun 11 $\alpha$ -hidroksi-5 $\alpha$ -androstan-3,17-dion (**16**), 3 $\beta$ ,11 $\alpha$ -dihidroksi-5 $\alpha$ -androstan-17-on (**17**) ve 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -dihidroksi-5 $\alpha$ -androstan-17-on (**24**) metabolitlerini verdiği anlaşıldı. Metabolitlerin yapı tayinleri substrat ve metabolitlere ait erime noktalarının belirlenmesi, NMR ve IR spektrumlarının karşılaştırılarak gerçekleştirildi.



## **BIOTRANSFORMATION OF EPIANDROSTERONE BY *ASPERGILLUS GLAUCUS***

### **SUMMARY**

During their lives, all living things encounter various chemical substances that are not their natural substrates and these are called xenobiotics. The chemical changes on xenobiotics that enzymes or biological systems with enzymes bring about are called biotransformations.

Biotransformations used with microorganisms are referred to as microbial biotransformations. Microorganisms are mostly used for biotransformations because of their important advantages such as being environmentally friendly, quicker, cheaper and can be carried out in various environments from the flask to the factory fermenter. Microorganisms can be used free or immobilised on suitable surfaces for microbial biotransformations. Microbial biotransformations are mostly applied with molds, microbial algae, yeasts and bacteria. Microorganisms such as molds and bacteria, by using their non-specific enzymes, can produce many different chemical changes in many natural or synthetic substrates. Microbial biotransformations are carried out by cytochrome P-450 enzymes and one of the most important microbial biotransformations is the microbial hydroxylation. The microbial hydroxylation reaction was first observed in 1952. During the synthesis of some corticosteroids as drugs, it was a very long and expensive process to place an oxygen function in a position far away from the functional groups by classical chemical methods. The elimination of this problem by a hydroxylation via the mold *Rhizopus arrhizus* at the mentioned position directed all attention to microbial biotransformations. Following this discovery and understanding of the importance of microbial hydroxylation, biotransformations of many different types of chemicals have been carried out with many different microorganisms.

Organic compounds found in all living things, which are not directly taken part in their growth and development, are called secondary metabolites or natural products. These chemicals often provide better life conditions for the organisms in which they are found. Natural products are compounds that attract a lot of attention, especially because of their effects on other living things. Although natural products are found all living things, they are more commonly observed in plants, microorganisms, fungi and insects. Although natural products are numerous and have many different structures, they are generally grouped as terpenes, alkaloids, steroids, phenolic compounds, specialized carbohydrates, non-ribosomal peptides, polyketides, fatty acids and fatty acid derivatives due to some common similarities in their biosynthesis.

Steroids are one of the most important groups of natural products. Steroids with a 3 $\beta$ -hydroxyl group and aliphatic side chains with different structures and

lengths in the ring D are called sterols. Ergosterol in fungi, stigmasterol in plants and cholesterol in animals and humans are the most common and best known sterols.

Cholesterol is a very important molecule that regulates the fluidity of membranes in animals and humans. Cholesterol is also the starting material for some very important compounds such as bile acids, vitamin D<sub>3</sub> and steroid hormones.

Steroid hormones are classified into 5 groups such as, glucocorticoids, mineralocorticoids, progestagens (progestins), estrogens and androgens. Glucocorticoids and mineralocorticoids are known as corticosteroids, whilst androgens and estrogens and progestagens, are known as sex hormones.

The main functions of sex hormones are to regulate the growth and development of reproductive organs, secondary sexual characteristics and the reproductive cycle. Some sex hormones also have strong anabolic effects, promoting the development of many tissues such as bone, muscles and skin, and maintaining the metabolism. Progesterone, the most common and active representative of the progestagens, is a natural steroid hormone and is also an intermediate compound from which other steroid hormones in mammals are synthesized. In humans, progesterone plays a role in preparing the endometrium for pregnancy. Once pregnancy begins, the release of progesterone protects the mother and the developing fetus by preventing the start of a new reproductive cycle. Androgens are sex hormones that are active in male vertebrates and estrogens are those in female vertebrates. Estrogens are made from androgens. Although the main site of synthesis of androgens in the body is the testes, some of these hormones are also released from the adrenal cortex. Biosynthesis of androgens in the adrenal cortex and testes takes place in the  $\Delta^4$  pathway and the  $\Delta^5$  pathway.

The main pathway of androgen biosynthesis is the  $\Delta^4$  pathway. In this pathway, the cholesterol side chain is cleaved and it is converted into pregnenolone and then progesterone. Progesterone is then converted to 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone. 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone is converted to androstendione, also known as androst-4-en-3,17-dione. Testosterone is synthesized by the reduction of androstendione at C-17. Testosterone is then converted by a 5 $\alpha$ -reductase activity to dihydrotestosterone, another more active androgen. In the  $\Delta^5$  pathway, which is actually a side pathway, pregnenolone derived from the cholesterol is converted into 17 $\alpha$ -hydroxypregnenolone and then dehydroepiandrosterone is obtained. Dehydroepiandrosterone can be converted to androstendione and then oxidized to testosterone. The common end product of the  $\Delta^4$  pathway and the  $\Delta^5$  pathway in the biosynthesis of androgens is the androstendione. Testosterone, estrone and estriol are made from androstenedione. Estradiol (17 $\beta$ -estradiol) is made from testosterone. After testosterone has completed its biological activity in the body, it is converted into metabolites such as androsterone, ethanolone and epiandrosterone (**15**).

Epiandrosterone (**15**), also named as 3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -androstane-17-one, is a weak androgen that occurs naturally in most mammals. Epiandrosterone (**15**) can also be formed in mammals from dehydroepiandrosterone by a 5 $\alpha$ -reductase activity and from androstendione by a 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity.

*Aspergillus* species are particularly important because of the mycotoxins they secrete, the pathogenicities they cause, their contribution to basic eukaryotic genetics and biotechnology. Most *Aspergillus* species live in soil, water and decaying materials. Some *Aspergillus* species are known as pathogenic to humans and animals.



Biotransformations of different steroids by *Aspergillus* species have generally resulted in reactions such as Baeyer-Villiger oxidations, microbial hydroxylations, removal of side chains, aromatization of the A ring, microbial hydrogenations and microbial dehydrogenations.

In the present work, epiandrosterone (**15**) was incubated with *Aspergillus glaucus* MRC 200914 in order to see how this fungus metabolises the substrate. One liter of the medium was prepared and evenly distributed into 10 erlenmeyer flasks of 250 mL. The medium in flasks was then sterilized by an autoclave. These flasks were inoculated by *A. glaucus*. The flasks were incubated for 3 days at 25 °C on a shaker and the substrate in DMF was then added aseptically into them. All flasks were further incubated for 5 days. After 5 days, the mycellium was separated from the broth by filtration under the vacuum. The mycellium was rinsed with ethyl acetate and the broth was then extracted with ethyl acetate. The extracts were dried over sodium sulfate anhydrous and evaporated *in vacuo* to give a brown gum which was then chromatographed on silica gel 60. 11 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -androstan-3,17-dione (**16**), 3 $\beta$ ,11 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -androstan-17-one (**17**) and 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -androstan-17-one (**24**) were obtained from the chromatography work. The structures of these compounds were determined by comparing melting points, NMR and IR spectra of the substrate with those of steroids.



## 1. GİRİŞ

Canlılar hayatları boyunca kendilerine yabancı olan ve ksenobiyotikler olarak adlandırılan kimyasal maddeler ile etkileşirler. Enzimler yada enzimlerin mevcut olduğu mikroorganizmalar, mikroorganizma sporları, mikrozoimler, hücre, doku ve organ kültürleri gibi biyolojik sistemlerin ksenobiyotiklerin üzerinde meydana getirdikleri kimyasal değişimler biyotransformasyonlar olarak adlandırılır [1]. Sirke üretiminde etanolün bakterilerce asetik aside oksidasyonu ve şekerlerin bira mayası ile etanole çevirilmesi insanlık tarihindeki kayda geçen ilk biyotransformasyon örneklerindedir [1, 2].

Mikroorganizmalar ile uygulanan biotransformasyon çalışmaları mikrobiyal biyotransformasyonlar olarak ifade edilmektedir. Mikrobiyal biyotransformasyonların çevreye dost olmaları, daha ucuza, daha kısa sürede ve erlenlerden fabrika fermentörüne kadar farklı ortamlarda uygulanabilmeleri gibi çok hayati üstünlükleri sebebiyle günümüzdeki biyotransformasyonlarda genelde mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Mikroorganizmalar mikrobiyal biyotransformasyonlarında serbest olarak yada uygun bir yüzeye sabitlenmiş bir şekilde kullanılmaktadır. Mikrobiyal biyotransformasyonlar daha çok küfler, mikrobiyal algler, mayalar ve bakteriler gibi mikroorganizmalar ile uygulanmaktadır [3].

Özellikle küfler gibi mikroorganizmalar, spesifik olmayan enzimleri ile doğal veya sentetik olabilecek birçok substratta çok sayıda farklı kimyasal değişimler meydana getirebilirler. Mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonlarının en önemlilerinden birisi mikrobiyal hidroksilasyondur [1,2].

Mikrobiyal hidroksillenme olarak da bilinen mikrobiyal hidroksilasyon reaksiyonu ilk defa 1952 yılında gözlenmiştir. Bahsedilen yıllarda ilaç olarak kullanılacak bazı bileşiklerin sentezindeki herhangi bir fonksiyonel gruptan uzaktaki bir pozisyonuna bir oksijen fonksiyonunun ilave edilmesi mevcut yöntemlerle çok uzun ve pahalı bir işlemdir. Söz konusu problemin çalışmadaki bir ara bileşiği *Rhizopus arrhizus* küfü

sayesinde bir hidrosillenme ile özölmesi tüm dikkatleri mikrobiyal biyotransformasyonlara yöneltmiştir [1, 4].

Mikrobiyal hidrosillenmenin keşfi ve öneminin anlaşılmasını takiben çok sayıda farklı kimyasal madde gruplarının birçok farklı mikroorganizmalar ile biyotransformasyonları gerçekleştirilmiştir. Günümüzde hormonlar ve ilaçlar gibi önemli kimyasal maddelerin üretimi klasik sentez yöntemleri yerine genelde mikrobiyal biyotransformasyonlar ile gerçekleştirilmektedir [3,5].

## 2. *ASPERGILLUS* TÜRLERİ İLE EPIANDROSTERON BİYOTRANSFORMASYONLARI

### 2.1. Epiandrosteron

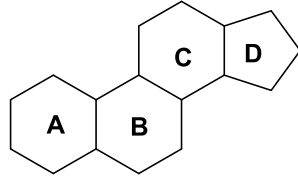
Canlılarda bulunan organik bileşikler üç grup altında incelenebilir. Birinci grupta tüm canlıların büyüme ve gelişmesinde doğrudan görev alan ve primer (asli veya birincil) metabolizmanın elamanları olan ve primer metabolitler olarak bilinen amino asitler ve monosakkaritler gibi bileşikler bulunur. İkinci grupta selüloz, proteinler ve ligninler gibi molekül ağırlıkları çok büyük olan moleküller (biyopolimerler) bulunur. Üçüncü grupta canlıların büyüme ve gelişmesi için doğrudan görev almayan sekonder (ikincil) metabolizmanın elemanları olan sekonder metabolitler bulunur. Sekonder metabolitler ayrıca doğal ürünler olarak da bilinir ve bu bileşikler canlıların gelişme ve büyümelerinde doğrudan görev almasalar da genellikle buldukları canlılara daha iyi hayat şartları sağlarlar. Doğal ürünler özellikle diğer canlılar üzerindeki etkileri sebebi ile çok fazla dikkat çeken bileşiklerdir. Doğal ürünler her canlı grubunda bulunsalar da çoğu zaman mantarlarda, mikroorganizmalarda, bitkilerde ve böceklerde çok daha fazla gözlenirler [6-8].

Doğal ürünler birbirinden farklı yapıda ve çok sayıda olmalarına rağmen genelde biyosentezlerindeki bazı ortak benzrlıklar sebebiyle terpenler, alkaloidler, steroidler, fenolik bileşikler, özelleşmiş karbohidratlar, özelleşmiş peptidler, poliketidler, yağ asitleri ve yağ asitleri türevleri olarak gruplandırılırlar [6-8].

Steroidler doğal ürünlerin en önemli gruplarından birisini oluştururlar. Steroid terimi katı anlamında olan Latince “steros” kelimesinden doğmuştur. Steroidler siklopentanoperhidrofenantren veya steran olarak adlandırılan bir halkaya sahip olan bileşiklerdir. Bahsedilen halka birbirleriyle kaynaşmış A, B ve C olarak bilinen üç adet sikloheksan halkası ve D olarak bilinen bir adet siklopentan halkasından oluşur (Şekil 1.1). Birçok steroid kendi molekül düzleminin üzerinde bulunan iki adet metil

grubu içerir. Steroidler genelde A halkasındaki C-3 pozisyonunda bir oksijen fonksiyonu (bir hidroksil veya karbonil grubu) içerirken D halkasındaki C-17 pozisyonunda ise bir oksijen fonksiyonu veya bir yan zincir içerir. Ayrıca bazı steroidlerde A veya B halkalarında çift bağlar içerir [9].

Yapılarında 3 $\beta$ -hidroksil hidroksil grubu ve D halkalarında farklı yapı ve uzunlukta alifatik yan zincirler içeren steroidler steroller olarak adlandırılır. Mantarlarda bulunan ergosterol, bitkilerde bulunan stigmasterol ile hayvanlar ve insanlarda bulunan kolesterol (**1**) en çok ve en iyi bilinen sterollerdir [9-10].



**Şekil 2.1.** Steran halkası.

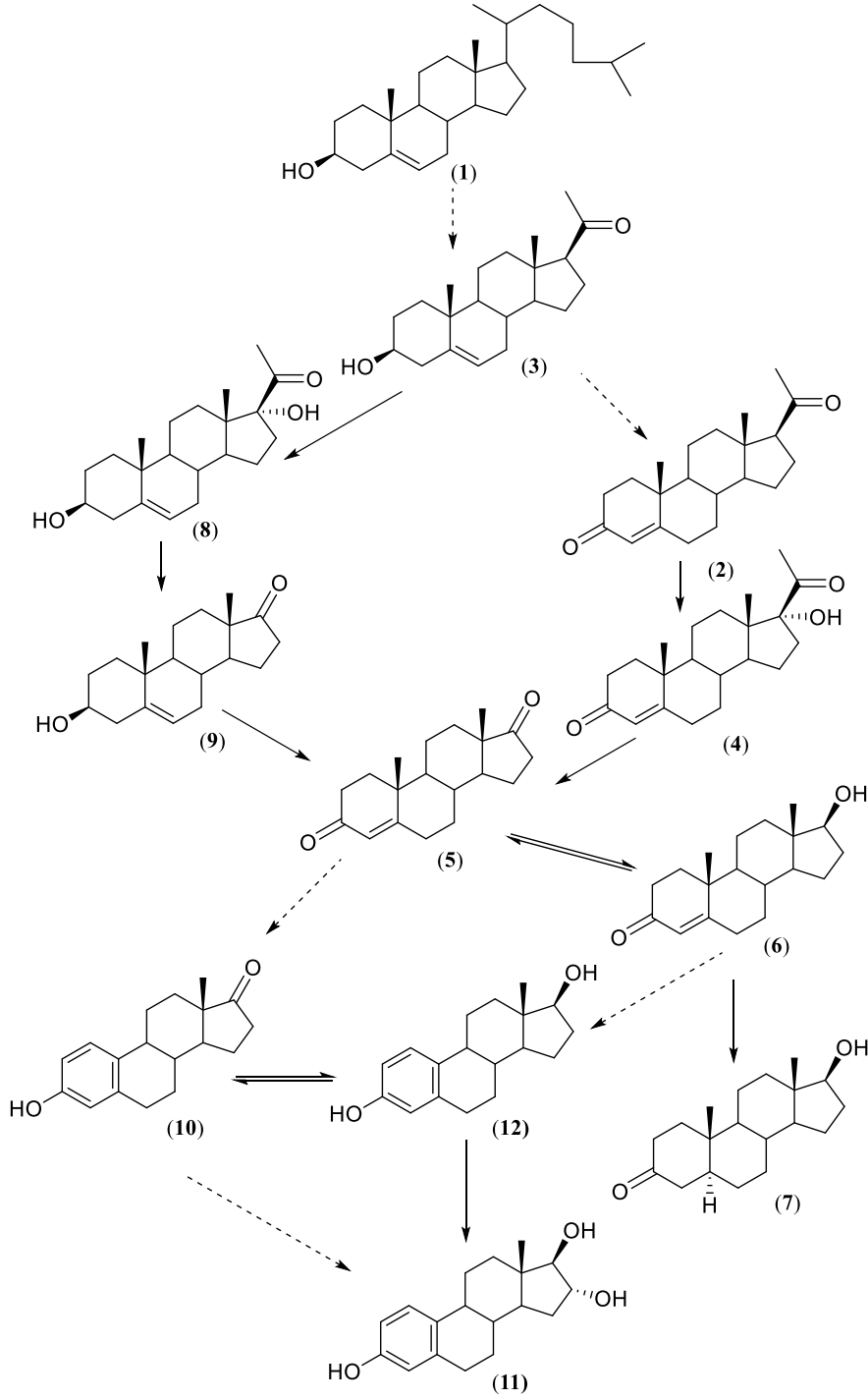
Kolesterol (**1**) hayvanlar ve insanların membranlarındaki akışkanlığını düzenleyen çok önemli bir moleküldür. Kolesterol (**1**) bileşiğinin biyosentezi oldukça uzun ve karmaşıktır. Bu bileşiğin biyosentezi 3 aşamada incelenebilir. İlk aşamada 3 adet asetil koenzim A bileşiğinden mevalonat sentezlendikten sonra bu bileşik izopentenil difosfat olarak da bilinen izopentenil pirofosfata çevrilir. İkinci aşamada izopentenil pirofosfat dimetilallil pirofosfata izomerleşir. Oluşan dimetilallil pirofosfatın bir izopentenil pirofosfat ile kondenzasyonu sonucunda geranil pirofosfat meydana gelir. Geranil pirofosfatın bir diğer izopentenil pirofosfat ile kondenzasyonu sonucunda ise farnesil pirofosfat oluşur. Farnesil pirofosfatın aynı şekilde oluşan bir diğer farnesil pirofosfat ile indirgenme beraberliğinde gerçekleşen kondenzasyonu sonucunda skualen oluşur. Bir triterpen ve diğer triterpenlerin çıkış maddesi olan skualen oluşumu ile kolesterol biyosentezinin ikinci aşaması sona erer. Üçüncü aşamada önce skualenin epoksidasyonu ile skualen epoksit oluşur ve skualen epoksidin daha sonraki halkalaşması neticesinde ilk halkalı bileşik olarak lanosterol oluşur. Lanosterol ise daha sonra gerçekleşen 19 reaksiyon üzerinden kolesterol bileşiğine dönüştürülür [9-10]..

Kolesterol (**1**) bileşiği ayrıca safra asitleri, D<sub>3</sub> vitamini ve steroid hormonlar gibi çok önemli bazı bileşiklerin çıkış maddesidir. Kolesterol bileşiğinden oluşan safra asitleri

deterjanlar gibi hem hidrofobik hemde hidrofiik yapılarından dolayı yapılarından dolayı lipidlerin ince bağırsaktaki sindirim ve emiliminde görev alırlar. Safra asitleri ayrıca safra kesesinde taş oluşumunun engellenmesinde önemli rol oynar ve vücuttaki kolesterol (1) fazlası safra asitleri sayesinde uzaklaştırılır [9-10].

D<sub>3</sub> vitamini aslında kolesterol (1) bileşiğinin bir ön maddesi olan 7-dehidrokolesterol bileşiğinin deri altında güneş kökenli UV ışınları ile B halkasından parçalanmasını takiben izomerleşmesi ile oluşur. Bu vitamin karaciğer ve sonrasında böbrekteki birer hidroksillenme neticesinde kalsitriol hormonuna dönüşür. Bu hormon kalsitonin ve parathormon hormonları ile beraber kalsiyum ve fosfor metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynar [9-10].

Steroid hormonlar glukokortikoidler, mineralokortikoidler, progestagenler (progestinler), östrojenler ve androjenler olarak 5 ayrı grupta değerlendirilirler. En önemli temsilcisi kortizol olan glukokortikoidler karbohidrat, lipid ve protein metabolizması üzerinde etkilidirler. Buna ilaveten glukokortikoidler iltihap gidericilik ve bağışıklık baskılayıcılık gibi önemli özelliklere de sahiptirler. Mineralokortikoidlerin en önemli temsilcisi aldosteron hormonudur ve bu bileşikler su ve mineral metabolizmasının düzenlenmesinde rol alırlar. Progestagenler, androjenler ve östrojenler ise cinsiyet (eşey) hormonları olarak da tanımlanırlar. Cinsiyet hormonlarının temel işlevleri üreme organlarının gelişi ve büyümelerinin, ikincil eşey karakterlerinin ve üreme döngüsünün düzenlenmesidir. Progestagenlerin en yaygın ve etkin temsilcisi olan progesteron (2) doğal bir steroid hormondur ve aynı zamanda memelilerdeki diğer steroid hormonların kendisinden sentezlendiği bir ara bileşiktir. Progesteron (2) insanlarda endometriyumun gebeliğe hazırlanmasında rol oynar. Gebelik başladığında ise progesteron (2) salınması yeni bir üreme döngüsünün başlaması engelleyerek anne ve anne karnında gelişen cenini korur. Androjenler omurgalı erkek bireylerinde etkili cinsiyet hormonlarıyken östrojenler ise omurgalı dişi bireylerinde etkili olan cinsiyet hormonlarıdır. Androjenlerin vücuttaki asıl sentez yeri erbezleri (testis) olmasına rağmen bu hormonlar az miktarlarda da olsa adrenal kortekste sentezlenmektedir. Adrenal korteks ve testislerde steroid hormonlar biyosentezi  $\Delta^4$  yolu ve  $\Delta^5$  yolu gibi iki farklı şekilde (Şekil 2.2.) sentezlenmektedir [9-10].

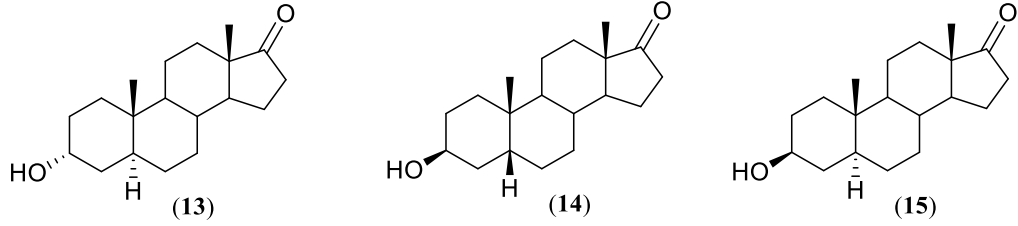


**Şekil 2.2.** Bazı östrojen ve androjenlerin biyosentezi.

Androjen biyosentezinin ana yolu olarak kabul edilen  $\Delta^4$  yolunda önce kolesterol (1) pregnenolon (2) bileşiği üzerinden progesteron (3) bileşiği çevrilir. Daha sonra progesteron (3) 17 $\alpha$ -hidroksiprogesterona (4) dönüştürülür. 17 $\alpha$ -Hidroksiprogesteron (4) ise androst-4-en-3,17-dion olarak da adlandırılan androstendion (5) bileşiğine



çevrilir. Androstendion (5) bileşiği C-17’de indirgenerek testosteron (6) bileşiğine çevrilir. Testosteron (6) bileşiği bünyesindeki çift bağı doyumlanması ile daha etkin bir androjen olan dihidrotestosteron (7) bileşiğine çevrilir. Bir yan yol olan  $\Delta^5$  yolunda ise kolesterol (1) bileşiği önce pregnenolon (3) bileşiği üzerinden  $17\alpha$ -hidroksipregnenolon (8) bileşiğine çevrilir.  $17\alpha$ -Hidroksipregnenolon (8) bileşiği ise daha sonra dehidroepiandrosteron (9) bileşiğine çevrilir. Dehidroepiandrosteron (9) androstendion (5) bileşiğine üzerinden testosteron (6) bileşiğine çevrilebilmektedir. Androstendion (5) bileşiği aslında androjenlerin biyosentezindeki her iki yolun ortak son ürünüdür (Şekil 2.2.). Androstendion (5) bileşiği testosteron (6) gibi bir androjen ile östron (10) ve östriol (11) gibi östrojenlerin başlangıç maddesidir. Önemli bir östrojen olan östradiol (12) ise testosteron (6) bileşiğinden sentezlenir. Dokulardaki fonksiyonları sonrasında testosteron (6) bileşiği androstendion (5) üzerinden Şekil 1.3.’de kimyasal yapıları verilen olan androsteron (13), etikolanon (14) ve epiandrosteron (15) gibi metabolitlere çevrilir. Bahsedilen bu metabolitler düşük aktiviteli veya tamamen inaktif bileşiklerdir [9,10].



**Şekil 2.3.** Testosteron (6) bileşiğinin bazı metabolitleri.

$3\beta$ -Hidroksi- $5\alpha$ -androstan-17-on olarak da bilinen epiandrosteron (15) çoğu memelilerde doğal olarak gözlenen zayıf bir androjendir. Epiandrosteron (15) memelilerde dehidroepiandrosteron (9) bileşiğinden  $5\alpha$ -redüktaz aktivitesi ile androstendion bileşiğinden ise  $3\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaz aktivitesi ile de oluşturulabilir [9].

## 2.2. Küfler ile Steroid Biyotransformasyonları

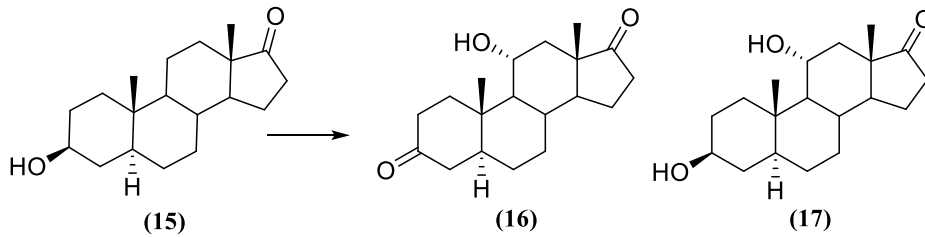
Günümüzdeki küflerle steroid biyotransformasyonları küflerdeki çok geniş spektrumlu enzimlerinin güçlü regio ve stereoseçicilikleri nedeniyle hormonlar ve ilaçlar gibi önemli ve değerli kimyasal maddelerin elde edilmesinde yaygın bir şekilde uygulanmaktadır. Literatürdeki mikrobiyal biyotransformasyonları daha da

etkin hale getirmek, uygulamalarda kullanılacak yeni reaksiyonlar ve mikroorganizmalar elde etme amacıyla çalışmalar sürdürülmektedir [5,11].

Şimdiye kadar çok fazla sayıda farklı küflerle mikrobiyal steroid biyotransformasyonları uygulanmıştır. Bu çalışmalardan mikrobiyal hidroksillenmeler, Baeyer-Villiger oksidasyonları, mikrobiyal hidrojensasyonlar, mikrobiyal dehidrojensasyonlar A halkasının aromatikleşmesi, yan zincirlerin uzaklaştırılması, mevcut hidroksil gruplarının oksidasyonu ve mevcut keton gruplarının redüksiyonu gibi ilginç sonuçlar elde edilmiştir [5,11].

### 2.3. *Aspergillus* Türleri ile Epiandrosteron (15) Biyotransformasyonları

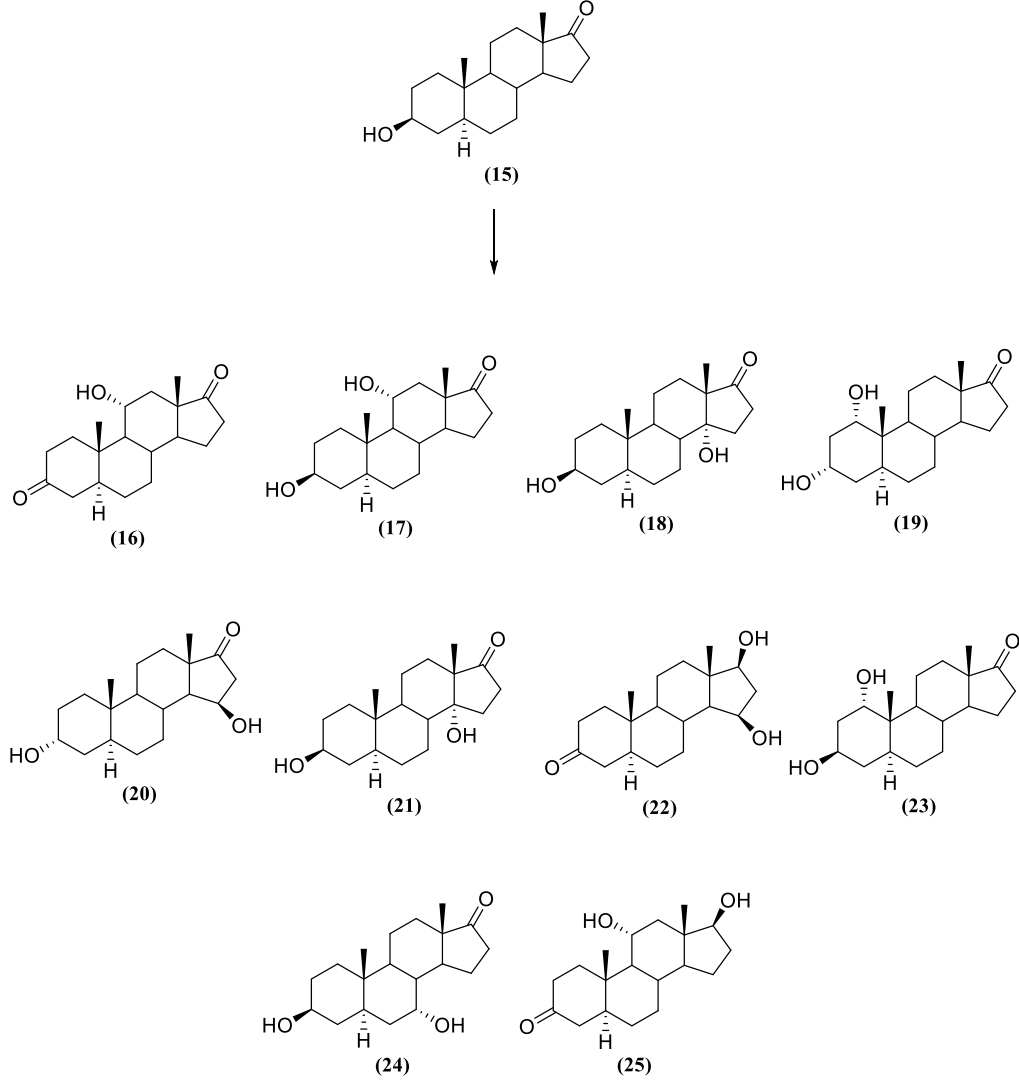
*Aspergillus* cinsine ait olan türler genelde ürettikleri mikotoksinleri, patojenlikleri, temel ökaryotik genetik ve biyoteknoloji ilimlerine katkıları nedeni ile çok hayati öneme sahiptirler [12]. Birçok *Aspergillus* türü su, toprak ve çürüyen materyaller üzerinde yaşarken bazı *Aspergillus* türleri ise insanlar ve hayvanlar için patojendirler [13]. Çok farklı tiplerde steroidlerin *Aspergillus* cinsine ait türlerle biyotransformasyonları genellikle yan zincirlerin uzaklaştırılması, A halkasının aromatikleşmesi, Baeyer-Villiger oksidasyonları, mikrobiyal hidroksillenmeler, mikrobiyal hidrojensasyonlar ve mikrobiyal dehidrojensasyonları gibi reaksiyonları vermiştir [5,11]. Epiandrosteron (15) bileşiğinin literatürde mevcut olan bazı bazı *Aspergillus* türleri ile biyotransformasyonları vardır [14-19]. Örneğin *A. wentii* MRC 200316 izolatu ile epiandrosteron (15) inkübasyonu (Şekil 2.4.) 11 $\alpha$ -hidroksi-5 $\alpha$ -androstan-3,17-dion (16) ve 3 $\beta$ ,11 $\alpha$ -dihidroksi-5 $\alpha$ -androstan-17-on (17) metabolitleri ile sonuçlanmıştır [14].



Şekil 2.4. *A. wentii* MRC 200316 ile biyotransformasyon.

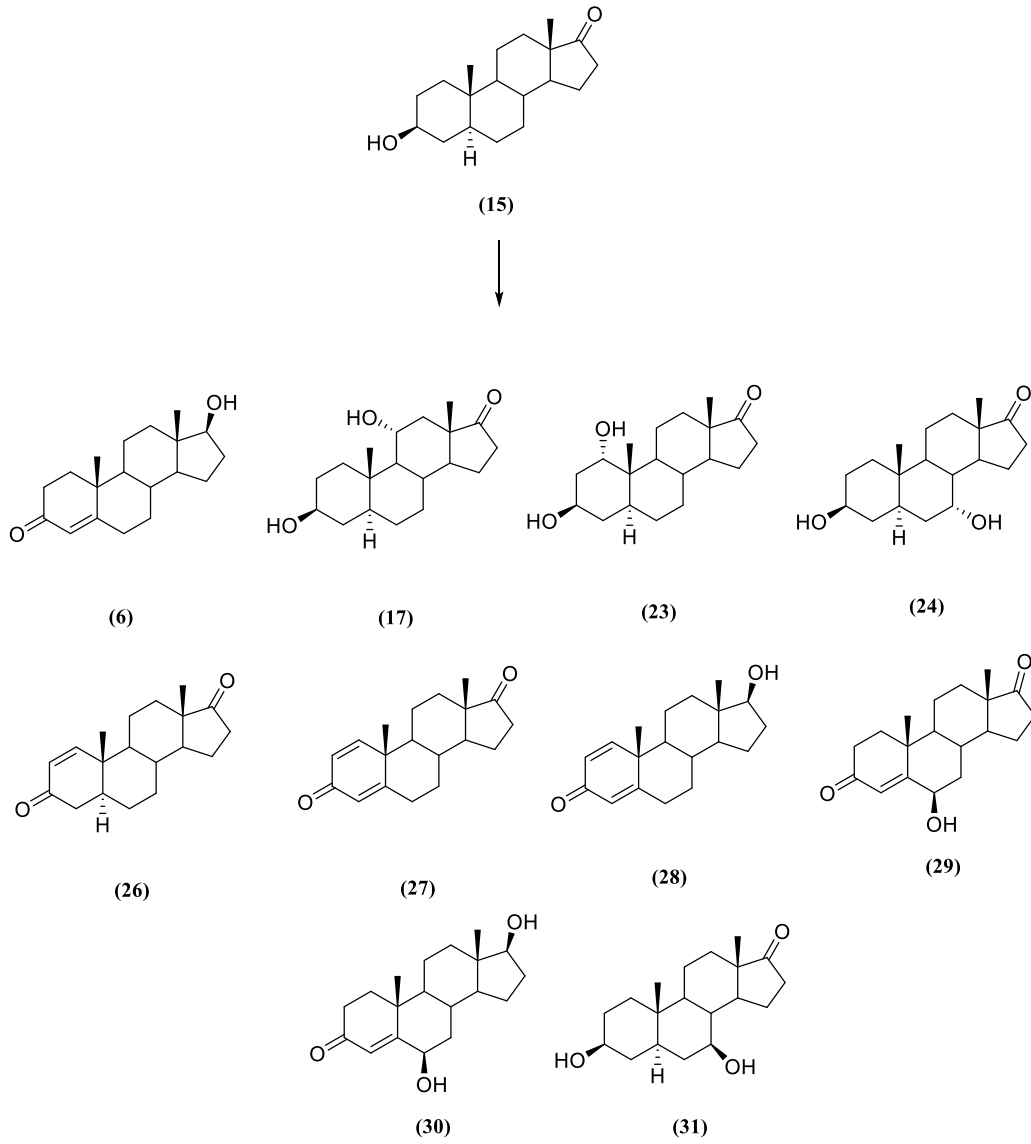
*A. candidus* MRC 200634 izolatu ile gerçekleştirilen epiandrosteron (15) inkübasyonu (Şekil 2.5.) 14 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -androstan-3,17-dion (18), 1 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -dihidroksi-5 $\alpha$ -androstan-17-on (19), 3 $\alpha$ ,15 $\beta$ -dihidroksi-5 $\alpha$ -androstan-17-on (20),

3 $\beta$ ,14 $\alpha$ -dihidroksi-5 $\alpha$ -androstan-17-on (**21**), 15 $\beta$ ,17 $\beta$ - dihidroksi-5 $\alpha$ -androstan-3,17-dion (**22**), 1 $\alpha$ ,3 $\beta$ -dihidroksi-5 $\alpha$ -androstan-17-on (**23**), 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -dihidroksi-5 $\alpha$ -androstan-17-on (**24**), 11 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihidroksi-5 $\alpha$ -androstan-3-on (**25**) metabolitleri ile bir önceki çalışmadan elde edilen (**16** ve **17**) numaralı metabolitleri vermiştir [15].



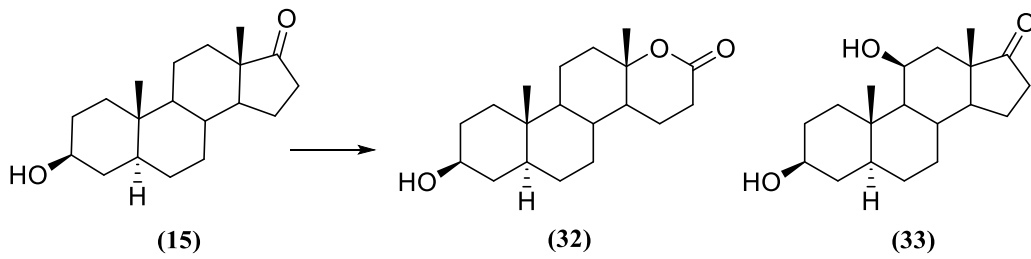
**Şekil 2.5.** *A. candidus* MRC 200634 ile biyotransformasyon.

*A. sydowii* MRC 200653 izolatu ile epiandrosteron (**15**) inkübasyonu (Şekil 2.6.) testosteron (**6**), 5 $\alpha$ -androst-1-en-3,17-dion (**26**), androsta-1,4-dien-3,17-dion (**27**), 17 $\beta$ -hidroksiandrosta-1,4-dien-3-on (**28**), 6 $\beta$ -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**29**), 6 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihidroksiandrost-4-en-3-on (**30**) ve 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -dihidroksi-5 $\alpha$ -androstan-17-on (**31**) metabolitleri ile bir önceki çalışmada elde edilen (**17**, **23** ve **24**) numaralı metabolitleri ni vermiştir [16].



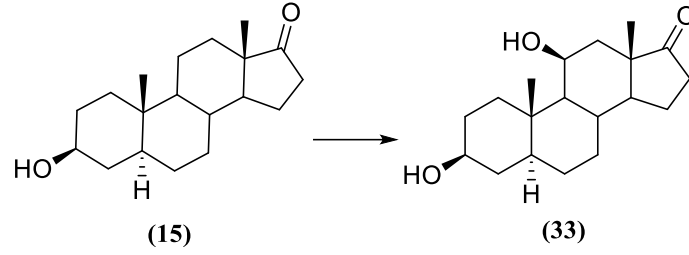
**Şekil 2.6.** *A. sydowii* MRC 200653 ile biyotransformasyon.

*A. tamarii* MRC 72400 izolatu ile epiandrosteron (15) inkübasyonu (Şekil 2.7.) 3β-hidroksi-17a-okza-D-homo-5α-androstan-17-on (32) ve 3β,11β-dihidroksi-5α-androstan-17-on (33) metabolitleri ile sonuçlanmıştır [17].



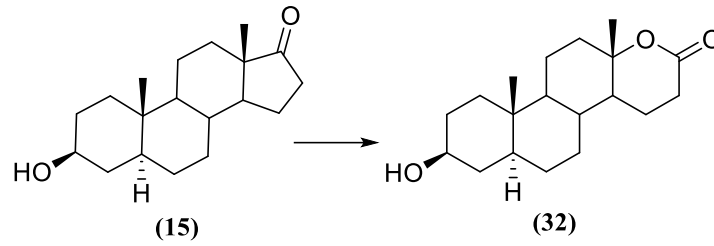
**Şekil 2.7.** *A. tamarii* MRC 72400 biyotransformasyon.

*A. tamarii* QM 1223 izolatu ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.8) ise daha önceki çalışmadan elde edilen (33) numaralı metaboliti vermiştir [18].



Şekil 2.8. Substratın *A. tamarii* QM 1223 ile biyotransformasyonu.

*A. terreus* MRC 200365 izolatu ile epiandrosteron (15) inkübasyonu (Şekil 2.9.) daha önceki bir çalışmadan da elde edilen (32) numaralı metaboliti vermiştir [19].



Şekil 2.9. *A. terreus* MRC 200365 biyotransformasyon.

#### 2.4. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada epiandrosteron (15) bileşiğinin *Aspergillus glaucus* MRC 200914 izolatu ile biyotransformasyonunun incelenmesi amaçlanmıştır. *Aspergillus glaucus* son derece olumsuz koşullar altındaki fizyolojik dayanıklılığı nedeniyle oldukça farklı yerlerde yaşayabilen bir kültür ve insanlar için patojen olabilmektedir [20].



### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Genel Bilgiler

Deneylerde kullanılacak besiyeri ve cam malzemeler otoklavda (Nüve OT 40 L) 121 °C'de ve 20 dakika süre ile sterilize edildi. Yatık agar besiyerlerine küf ilavesi, sterilize edilmiş erlenlere küf ve substrat ilavesi için Nükleon marka Sınıf II Tip steril kabin kullanıldı. İnkübasyonları gerçekleştirmek için çalkalamalı inkübatör (Gerhardt THO 500 Laboshake) kullanıldı. Infrared spektrumları Perkin Elmer SpectrumTwo spektrometre cihazı ile alındı. <sup>1</sup>H NMR spektrumları solvent olarak döterokloroform (CDCl<sub>3</sub>) ve iç sinyal olarak tetrametilsilan standardı kullanılarak Variann Mercury 300 NMR spektrometresi ile 300 MHz'de alındı. <sup>13</sup>C NMR spektrumları solvent olarak döterokloroform kullanılarak Varian Mercury 300 NMR spektrometresi ile 75 MHz'de alındı. Steroidlere ait erime noktaları Elektrothermal IA 9200 erime noktası tayin cihazı ile ölçüldü ve tekrarlanmadı.

Biyotransformasyon çalışması ile kolon kromatografisi işlemi ince tabaka kromatografisi (İTK) işlemleri ile takip edildi.. İTK işlemleri ise 0,25 mm kalınlığında silika jel tabakaları (Merck silika jel GF254) ve etil asetat-hekzan (1:1) çözücü sistemi ile gerçekleştirildi. İTK tabakalarındaki steroidler ise *p*-anisaldehit-sülfürik asit reaktifine daldırılıp 120 °C'de 3 dakika boyunca ısıtılmak sureti ile gözlenebilir hale getirildi.

Çalışmada kullanılan *A. glaucus* MRC 200914 izolatı TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi, Gıda Teknoloji ve Araştırma Enstitüsü, Kültür Koleksiyonundan temin edildi..

Epiandrosteron (**15**) Sigma-Aldrich firmasından temin edildi. Yatık agar besiyerleri hazırlamak için kullanılan PDA ve agar, küf besiyeri için kullanılan tüm kimyasallar ve çalışmalarda kullanılan tüm solventler ise Merck firmasından temin edildi.

### 3.2. Yatık Agar Besiyerlerinin Hazırlanışı

Besiyerinin hazırlanması için 5,85 g PDA (potato dekstroz agar) ve 1,2 g agar karışımı saf su ile 150 mL'ye tamamlanarak kaynatıldı. Söz konusu besiyeri soğumadan deney tüplerine yarılarına kadar ilave edildikten sonra tüp ağzları yeteri miktarda pamuk ile kapatıldı. Ağız kısımları alimünyum folyo ile sarılan tüpler otoklavda 20 dakika boyunca 121 °C'de sterilize edildi. Tüplerdeki sıvılaştırılmış besiyeri katılaştırmadan önce ortalama 45 derecelik bir eğimle soğumaya bırakılarak yatık agar besiyerleri hazırlandı.

### 3.3. Küf Kültürünün Hazırlanışı ve Tazelenmesi

Kültür koleksiyonundan temin edilen küf 3 ayrı yatık agar besiyerlerine steril koşullarda ilave edilip ve oda sıcaklığında gelişmeye bırakıldı. Hazırlanan bu yeni yatık agar kültürlerindeki en iyi gelişmiş olan küf her 2 haftada bir yeni yatık agar besiyerlerine steril koşullarda nakledildi. Aynı işlemin 2 kere tekrarlanması ile mevcut en taze ve en iyi gelişmiş küf biyotransformasyon çalışması için kullanıldı.

### 3.4. Küf Besiyerinin Hazırlanışı

Glukoz (200 g), pepton (5 g), maya ekstraktı (3 g) ve malt ekstraktı (3 g) 1 L distile su içerisinde çözülüp karıştırılarak *A. glaucus* MRC 200914 küfüne özel bir besiyeri hazırlandı [21].

### 3.5. Biyotransformasyon Deneyi

*A. glaucus* için hazırlanan besiyeri 250 mL'lik 10 ayrı erlene paylaştırıldıktan sonra otoklavda sterilize edildi. *A. glaucus* küf bu erlenlere steril şartlarda ilave edildikten sonra çalkalamalı inkübatörde (150 rpm) 25 °C'de 3 gün süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında substrat (1 g) steril şartlarda DMF (10 mL) içerisinde çözülerek erlenlere eşit hacimlerde aktarıldı. Daha sonra erlenler 25°C'de 5 gün daha inkübe edildi (150 rpm).

Biyotransformasyon deneyi bir adet kontrol erleni sayesinde izlendi. Sadece steril besiyeri içeren bir erlene substrat ilave edilerek kontrol erleni hazırlandı. Biyotransformasyon çalışmasındaki tüm işlemler kontrol erleni içinde



gerçekleştirildi. Bu işlemlerin sonrasında kontrol erleninden İTK alındığında hiçbir metabolit gözlenmediği için biyotransformasyon çalışmamasına ait sonuçların kabul edilebilir olduğuna karar verildi. .

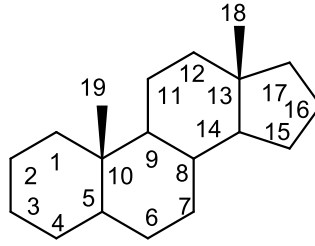
### **3.6. Metabolitlerin Ayrılması ve Yapı Tayinleri**

İnkübasyon sonrasında küf besiyeri filtrasyonla misellerinden filtrat olarak süzüldü ve miseller bir miktar etil asetat (500 mL) ile yıkandı. Filtratta bulunan steroidler etil asetat (1 L) ile 3 kez ekstrakte edildi. Toplanan ekstraktlara susuz sodyum sülfat ekstraktlar susuzlaştırıldı. Daha sonra ekstraktların evaporatörde uçurulması ile yağimsı bir madde elde edildi. Bu yağimsı madde ile substratı karşılaştırarak bir İTK çalışması uygulandı. İTK çalışmasının sonuçları doğrultusunda silika jel 60 (Merck 107734, 230-400 mesh) ile bir kolon kromatografisi uygulaması neticesinde yağimsı maddedeki steroidler ayrıldı. Kolon kromatografisi uygulaması elüent olarak *n*-hekzan bünyesinde artan etil asetat derişimleri ile gerçekleştirildi. Yapı tayinleri ise substrat ile her bir steroidin erime noktası, NMR ve IR spektrumlarının karşılaştırılarak gerçekleştirildi.



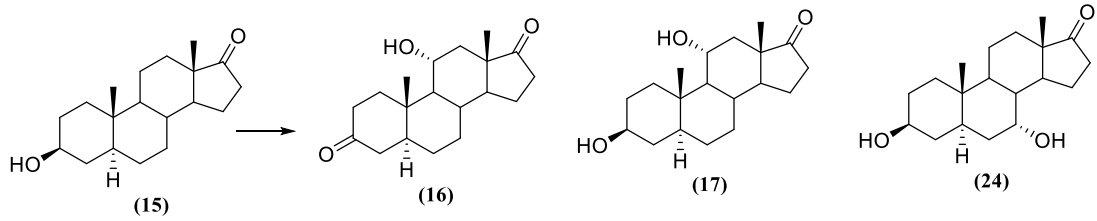
#### 4. DENEYSEL BULGULAR

Bu çalışmada karbon iskeleti Şekil 4.1.'de verilen substratın *A. glaucus* MRC 200914 izolatı ile 5 günlük biyotransformasyonu incelendi.



Şekil 4.1. Substrata ait karbon iskeleti.

*A. glaucus* MRC 200914 ile substratın inkübasyonundan kaynaklanan yağimsı maddenin (2037 mg) kolon kromatografisi değişime uğramayan substratı (142 mg) ile 11 $\alpha$ -hidroksi-5 $\alpha$ -androstan-3,17-dion (**16**), 3 $\beta$ ,11 $\alpha$ -dihidroksi-5 $\alpha$ -androstan-17-on (**17**) ve 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -dihidroksi-5 $\alpha$ -androstan-17-on (**24**) metabolitlerini verdi (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. *A. glaucus* MRC 200914 ile biyotransformasyon.

11 $\alpha$ -Hidroksi-5 $\alpha$ -androstan-3,17-dion (**16**) (52 mg, %5)

Erime noktası: 195-196 °C, lit., 190-193 °C [22].

IR ( $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ ): 3420, 1735 ve 1720.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0,92 (3H, s, 18-H), 1,17 (3H, s, 19-H), 4,02 (1H, dt,  $J = 5$  ve 10 Hz, 11 $\beta$ -H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Bakınız Tablo 4.1.

**Tablo 4.1.** Steroidler için  $^{13}\text{C}$  NMR kimyasal kayma değerleri.

C atomu	(15)	(16)	(17)	(24)
1	36.87	39.88	38.40	36.58
2	31.35	38.25	31.60	31.21
3	71.06	212.06	70.60	70.90
4	37.98	45.03	38.40	37.48
5	44.76	47.24	44.96	37.00
6	28.32	29.05	28.79	35.70
7	30.83	30.24	30.65	66.59
8	34.97	34.04	34.07	39.04
9	54.35	59.87	60.24	45.99
10	35.57	37.33	37.25	35.64
11	20.43	68.63	68.39	20.22
12	31.47	42.95	42.75	31.08
13	47.76	47.93	47.93	47.51
14	51.34	50.17	50.17	45.74
15	21.72	21.76	21.72	21.25
16	35.80	35.78	35.80	36.61
17	221.50	219.31	219.89	221.29
18	13.76	14.55	14.45	13.43
19	12.25	11.76	12.65	11.15

3 $\beta$ ,11 $\alpha$ -Dihidroksi-5 $\alpha$ -androstan-17-on (**17**) (496 mg, %47).

Erime noktası: 107-108 °C, lit., 103-104 °C [23].

IR ( $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ ): 3465 ve 1740.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0,85 (3H, s, 18-H), 0,94 (3H, s, 19-H), 3,62 (1H, tt,  $J = 5$  ve 11 Hz, 3 $\alpha$ -H), 3,95 (1H, dt,  $J = 5$  ve 10 Hz, 11 $\beta$ -H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Bakınız Tablo 4.1.

3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -Dihidroksi-5 $\alpha$ -androstan-17-on (**24**) (127 mg, %12).

Erime noktası: 178-179 °C, lit., 182-183 °C [23]

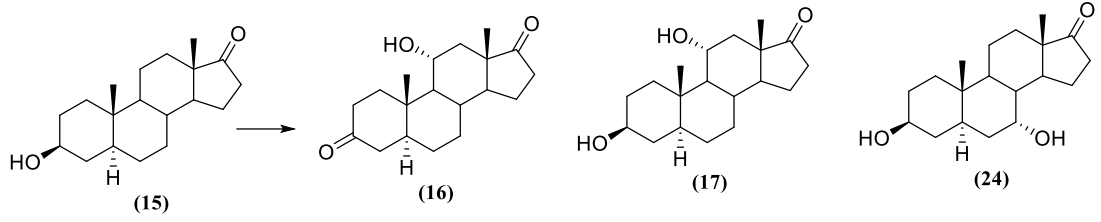
IR ( $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ ): 3360 ve 1735.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0,83 (3H, s, 19-H), 0,87 (3H, s, 18-H), 3,63 (1H, tt,  $J = 5$  ve 11 Hz, 3 $\alpha$ -H), 3,97 (1H, bs, 7 $\beta$ -H)

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Bakınız Tablo 4.1.

## 5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Substratın *A. glaucus* MRC 200914 izolatu ile inkübasyonu üç metabolitin elde edilmesi ile sonuçlandı (Şekil 5.1.).



Şekil 5.1. *A. glaucus* MRC 200914 ile biyotransformasyon.

İlk metabolitin 11 $\alpha$ -hidroksi-5 $\alpha$ -androstan-3,17-dion (16) olduğu anlaşıldı. Metabolit  $^1\text{H}$  NMR spektrumu  $\delta_{\text{H}}$  4.02 ppm'de 11 $\alpha$ -hidroksil grubuna özgü olan bir rezonansı (1H, dt,  $J = 5$  ve 10 Hz verdi [24]. Metabolit  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu (Tablo 5.1.) C-9 ve C-12 rezonansları aşağı alana yönelmiş kaymalar (C-9 için  $\Delta\delta_{\text{C}}$  5,52 ppm ve C-12 için  $\Delta\delta_{\text{C}}$  11,48 ppm) verirken C-8 rezonansının yukarı alana yönelmiş bir  $\gamma$ -gauche kayması ( $\Delta\delta_{\text{C}}$  0,93 ppm) vermesi bir 11 $\alpha$ -hidroksil grubunun varlığını daha da pekiştirdi [25]. Metabolite ait  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu substratın  $\delta_{\text{C}}$  71,06 ppm'deki C-3 rezonansını vermezken aynı spektrumda  $\delta_{\text{C}}$  212,06 ppm'de yeni bir kuaterner karbon rezonansı gözlenmesi substrattaki 3 $\beta$ -hidroksil grubunun yükseltgendiğini gösterdi.

İkinci metabolitin 3 $\beta$ ,11 $\alpha$ -dihidroksi-5 $\alpha$ -androstan-17-on (17) olduğu tespit edildi. Metabolit  $^1\text{H}$  NMR spektrumunda  $\delta_{\text{H}}$  3.95 ppm'de bir 11 $\alpha$ -hidroksil grubuna özgü bir rezonans (1H, dt,  $J = 5$  ve 10 Hz) gözlemlendi [24]. Metabolit  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumundaki C-9 ve C-12 rezonansları aşağı alana yönelmiş kaymalar (C-9 için  $\Delta\delta_{\text{C}}$  5,89 ppm ve C-12 için  $\Delta\delta_{\text{C}}$  11,28 ppm) gösterirken C-8 rezonansının yukarı alana yönelmiş bir  $\gamma$ -gauche kayması ( $\Delta\delta_{\text{C}}$  0,90 ppm) göstermesi bir 11 $\alpha$ -hidroksil grubu varlığını daha da netleştirdi [25]. Substrata ait 3,59 ppm'deki 3 $\alpha$ -H rezonansının (1H, tt,  $J = 5$  ve 11 Hz) metabolit  $^1\text{H}$  NMR spektrumunda  $\delta_{\text{H}}$  3,62 ppm'de (1H, tt,  $J = 5$  ve 11 Hz) gözlenmesi sebebi ile substratın diğer kısımlarında bir değişim olmadığı değerlendirildi.

**Tablo 5.1.** Steroidlere ait  $^{13}\text{C}$  NMR kimyasal kayma değerleri.

C atomu	(15)	(16)	(17)	(24)
1	36.87	39.88	38.40	36.58
2	31.35	38.25	31.60	31.21
3	71.06	212.06	70.60	70.90
4	37.98	45.03	38.40	37.48
5	44.76	47.24	44.96	37.00
6	28.32	29.05	28.79	35.70
7	30.83	30.24	30.65	66.59
8	34.97	34.04	34.07	39.04
9	54.35	59.87	60.24	45.99
10	35.57	37.33	37.25	35.64
11	20.43	68.63	68.39	20.22
12	31.47	42.95	42.75	31.08
13	47.76	47.93	47.93	47.51
14	51.34	50.17	50.17	45.74
15	21.72	21.76	21.72	21.25
16	35.80	35.78	35.80	36.61
17	221.50	219.31	219.89	221.29
18	13.76	14.55	14.45	13.43
19	12.25	11.76	12.65	11.15

Üçüncü metabolitin ise  $3\beta,7\alpha$ -dihidroksi- $5\alpha$ -androstan-17-on (**24**) olduğu anlaşıldı. Metabolit  $^1\text{H}$  NMR spektrumu bir  $7\alpha$ -hidroksil grubunun varlığına özgü rezonansı (1H, bs)  $\delta_{\text{H}}$  3.97 ppm'de verdi [24]. Metabolite ait  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumundaki C-6 ve C-8 rezonansları aşağı alana yönelmiş kaymalar (C-6 için  $\Delta\delta_{\text{C}}$  7,38 ppm ve C-8 için  $\Delta\delta_{\text{C}}$  4,07 ppm) verirken C-5 ve C-9 rezonanslarının yukarı alana yönelmiş  $\gamma$ -gauche kaymaları (C-5 için  $\Delta\delta_{\text{C}}$  7.76 ppm ve C-9 için  $\Delta\delta_{\text{C}}$  8.36, ppm) vermesi bir  $7\alpha$ -hidroksil grubunun varlığını daha da netleştirdi [25]. Substrata ait 3,59 ppm'deki  $3\alpha$ -H rezonansı (1H, tt,  $J = 5$  ve 11 Hz) metabolit  $^1\text{H}$  NMR spektrumunda  $\delta_{\text{H}}$  3,63 ppm'de (1H, tt,  $J = 5$  ve 11 Hz) gözlendiğinden substratın diğer kısımlarında bir değişim olmadığı anlaşıldı.

Aşağıda verilen tabloya (Tablo 5.2.) bakıldığında *A. glaucus* MRC 200914 izolatının epiandrosteron (**15**) bileşiğini yüksek bir verim ile C-11 $\alpha$  pozisyonunda ve düşük bir verim ile C-7 $\alpha$  pozisyonunda hidrosillerken küfün ayrıca aynı bileşiği C-3 pozisyonunda düşük bir verim ile yükseltediği gözlendi.

**Tablo 5.2.** Metabolit verimleri.

Substrat	Metabolit	% Verim
Epiandrosteron ( <b>15</b> )	11 $\alpha$ -Hidroksi-5 $\alpha$ -androstan-3,17-dion ( <b>16</b> )	5
	3 $\beta$ ,11 $\alpha$ -dihidroksi-5 $\alpha$ -androstan-17-on ( <b>17</b> )	47
	3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -dihidroksi-5 $\alpha$ -androstan-17-on ( <b>24</b> )	12

Literatürdeki *Aspergillus* izolatları ile steroid biyotransformasyonu çalışmaları incelendiğinde ise *A. glaucus* MRC 200914 izolatının epiandrosteron (**15**) bileşimini az da olsa *A. candidus* MRC 200634 [15] ve *A. sydowii* MRC 200653 [16] izolatlarına benzer bir şekilde metabolize ettiği gözlemlendi.

Kısaca bu çalışmada da *A. glaucus* MRC 200914 substratı C-7 $\alpha$  ve C-11 $\alpha$  pozisyonlarında hidroksilleştiği ve C-3 pozisyonunda ise yükseltildiği gözlemlendi. *A. glaucus* MRC 200914 ve diğer küfler ile steroid biyotransformasyonları çalışmalarımız sürmektedir.





## KAYNAKLAR

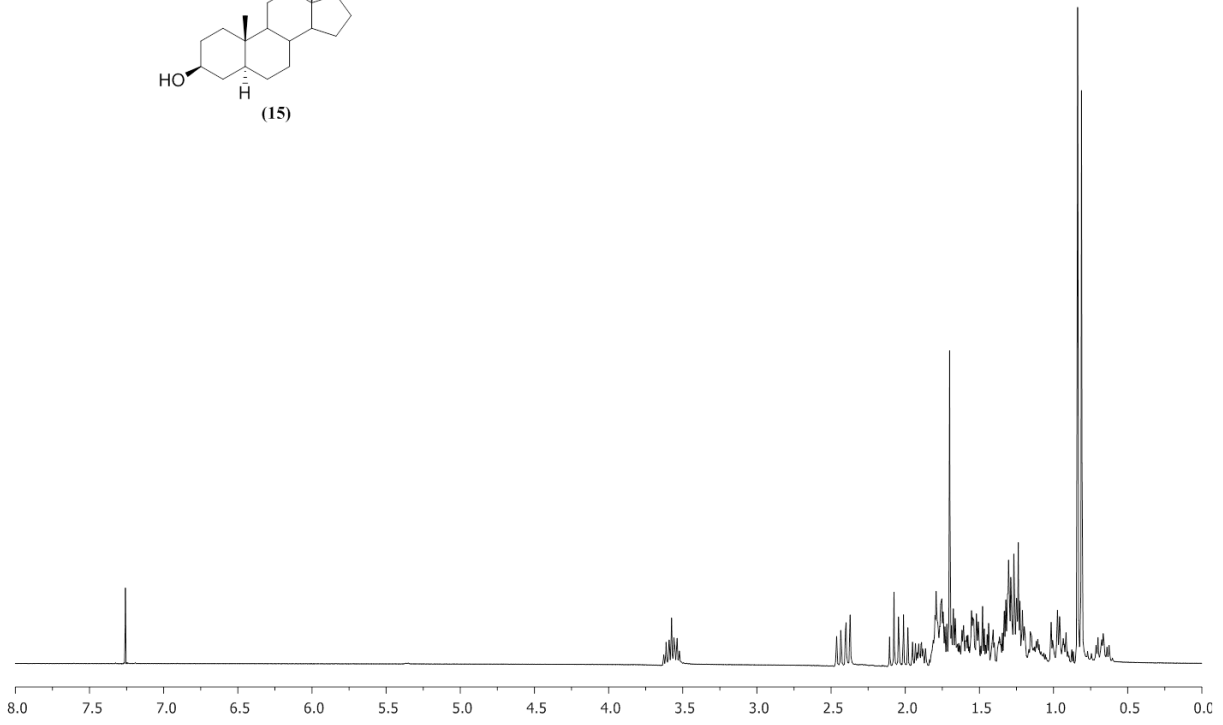
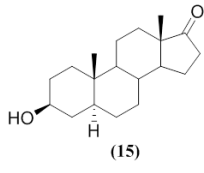
- [1] Hanson, J.R. 1995. An Introduction to Biotransformations in Organic Chemistry. W.H. Freeman Spektrum, 1-62. New York.
- [2] Faber, K. 2003. Biotransformations in Organic Chemistry, Fifth Edition. Springer-Verlag. Berlin. 1-407.
- [3] Demain A.L. 2000. Small Bugs. Big Business: The Economic Power of the Microbe, *Biotechnology Advances*, 18, 499-514.
- [4] Peterson, D.H., Murray, H.C., Epstein, S.H., Reineke, L.M., Weintraub, A., Meister, P.D., Leigh, H.M. 1952. Microbiological Oxygenation of Steroids, I. Introduction of Oxygen at Carbon-11 of Progesterone. *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 5933–5936.
- [5] Nassiri-Koopaei N., Faramarzi M.A. 2015. Recent developments in the fungal transformation of steroids. *Biocatalysis and Biotransformation*, 33,1-28.
- [6] Hanson, J. R. 2003. *Natural Products: The Secondary Metabolites*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge. 1-2.
- [7] Clayden, J., Greeves, N., Warren, S., Wothers, P. 2001. *Organic Chemistry*. First edition. Oxford University Pres. Oxford. 1413-1414.
- [8] Mann, J. 1994. *Chemical Aspects of Biosynthesis*, First edition, Oxford University Pres. New York. 2-4.
- [9] Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E.Y. 2002. *İnsan Biyokimyası*. Palme Yayıncılık. 481-495. Ankara.
- [10] Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. İ. 2005. *Biyokimya*. Dördüncü baskı. Aktif Yayınevi. 93-188. Erzurum.
- [11] Bhatti H,N., Khera R.A. 2012. Biological transformations of steroidal compounds: a review. *Steroids*. 77, 1267-1290.
- [12] Samson, R. A., Hong, S-B., Frisvad, J. C. 2006. Old and New Concepts of Species Differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology*, 44, S133-S148.
- [13] Lee, S. K., Kang, H. G., Na, K. J., Han, J.I. 2012. Fungal Dermatitis Caused by *Aspergillus sydowii* in a Thoroughbred Horse. *Journal of Equine Veterinary Science*. 32, 835-839.

- [14] Yildirim, K. 2010. Microbial Hydroxylation of Some Steroids by *Aspergillus wentii* MRC 200316. Collect. Czech. Chem. Commun., 12,1273-1281.
- [15] Yildirim, K., Kuru, A. 2015. Biotransformation of some steroids by *Aspergillus candidus*. Journal of Chemical Research, 39, 546-549.
- [16] Yildirim, K., Kuru, A. 2016. The biotransformation of some steroids by *Aspergillus sydowii* MRC 200653. Journal of Chemical Research, 40, 78-81.
- [17] Yildirim, K., Uzuner, A., Gülcüoğlu E.Y. 2011. Baeyer-Villiger Oxidation Of Some Steroids By *Aspergillus tamarii* MRC 72400. Collect. Czech. Chem. Commun., 76, 743-754.
- [18] Brannon, D. R., Parrish, F. W., Willey, B. J., Long, L., The Microbial Transformations of a Series of Androgens with *Aspergillus tamarii*. J Org. Chem., 32, 1521-1527, 1967.
- [19] Yildirim, K., Uzuner, A., Gülcüoğlu E.Y. 2010. Biotransformation of some steroids by *Aspergillus terreus* MRC 200365. Collect. Czech. Chem. Commun., 75, 665-673.
- [20] Hubka, V., Kolarík, M., Kubátová, A., & Peterson, S. W. 2013. Taxonomic revision of *Eurotium* and transfer of species to *Aspergillus*, Mycologia, 105, 912–937.
- [21] Yamauchi H., Doi M. 1997. O-Methylation of 2,6-Dimethoxy-4-methylphenol by *Aspergillus glaucus* and Their Possible Contribution to Katsuobushi Flavor, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 61, 1386-1387.
- [22] Milecka-Tronina N, Kołek T, Świzdor A, Panek A. 2014. Hydroxylation of DHEA and its analogues by *Absidia coerulea* AM93. Can an inducible microbial hydroxylase catalyze 7 $\alpha$ - and 7 $\beta$ -hydroxylation of 5-ene and 5 $\alpha$ -dihydro C19-steroids?. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 22:883-891.
- [23] Kołek T, Milecka N, Świzdor A, Panek A, Bialońska A. 2011. Hydroxylation of DHEA, androstenediol and epiandrosterone by *Mortierella isabellina* AM212. Evidence indicating that both constitutive and inducible hydroxylases catalyze 7 $\alpha$ - as well as 7 $\beta$ -hydroxylations of 5-ene substrates. Org Biomol Chem. 9:5414-5422.
- [24] Kirk, D.N., Toms, H.C., Douglas, C., White, K.A., Smith, K.E., Latif, S., and Hubbard, R.W.P. 1990. A survey of the high-field <sup>1</sup>H NMR spectra of the steroid hormones, their hydroxylated derivatives, and related compounds J. Chem. Soc. Perkin Trans., 2, 1567.
- [25] Blunt, J.W., and Stothers, J.B. 1977. C NMR spectra of steroids a survey and commentary. Org. Magn. Reson., 9, 439.

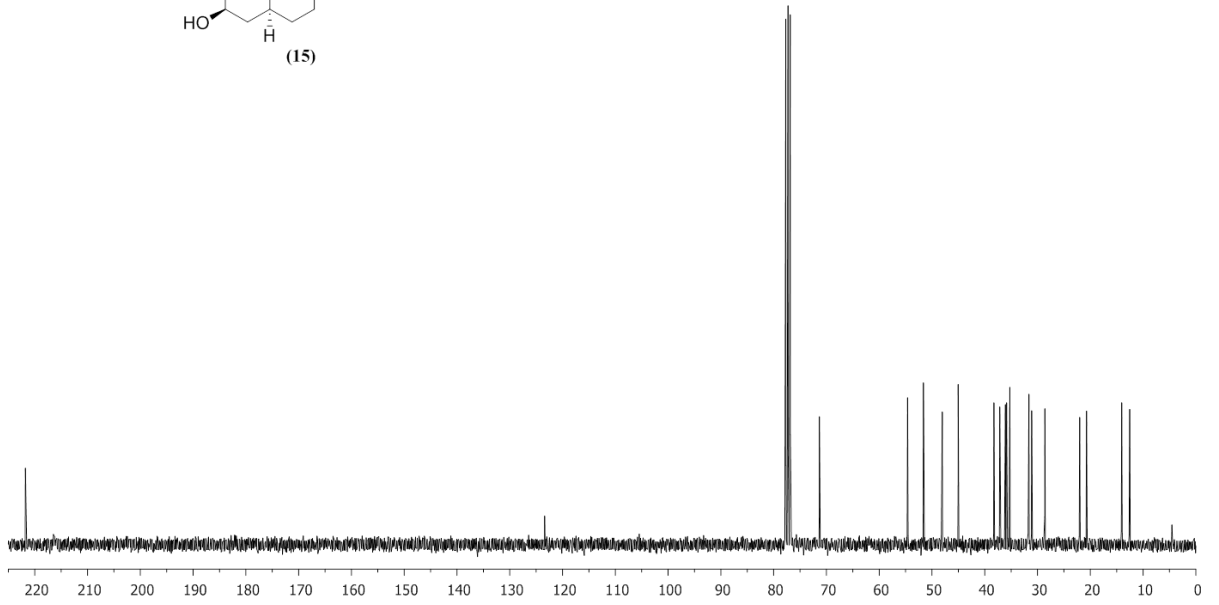
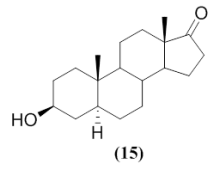
## **EKLER**

### **EK A. NMR spektrumları**

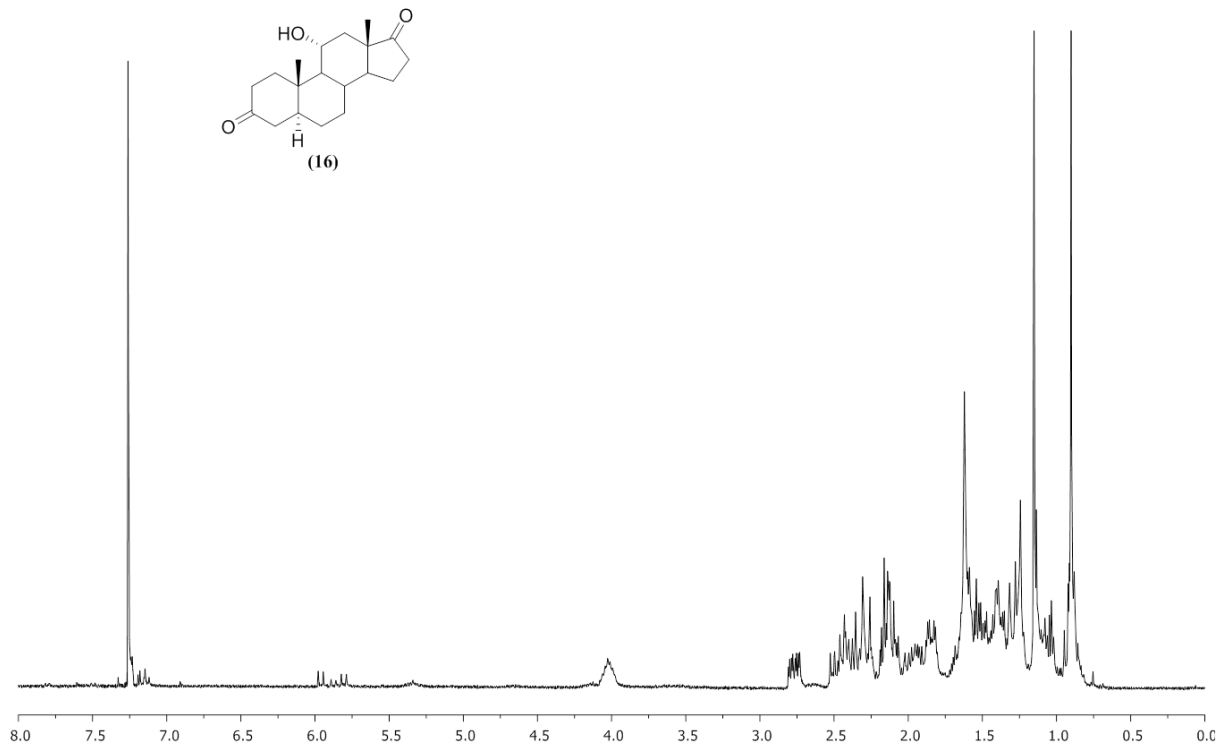
# EK A



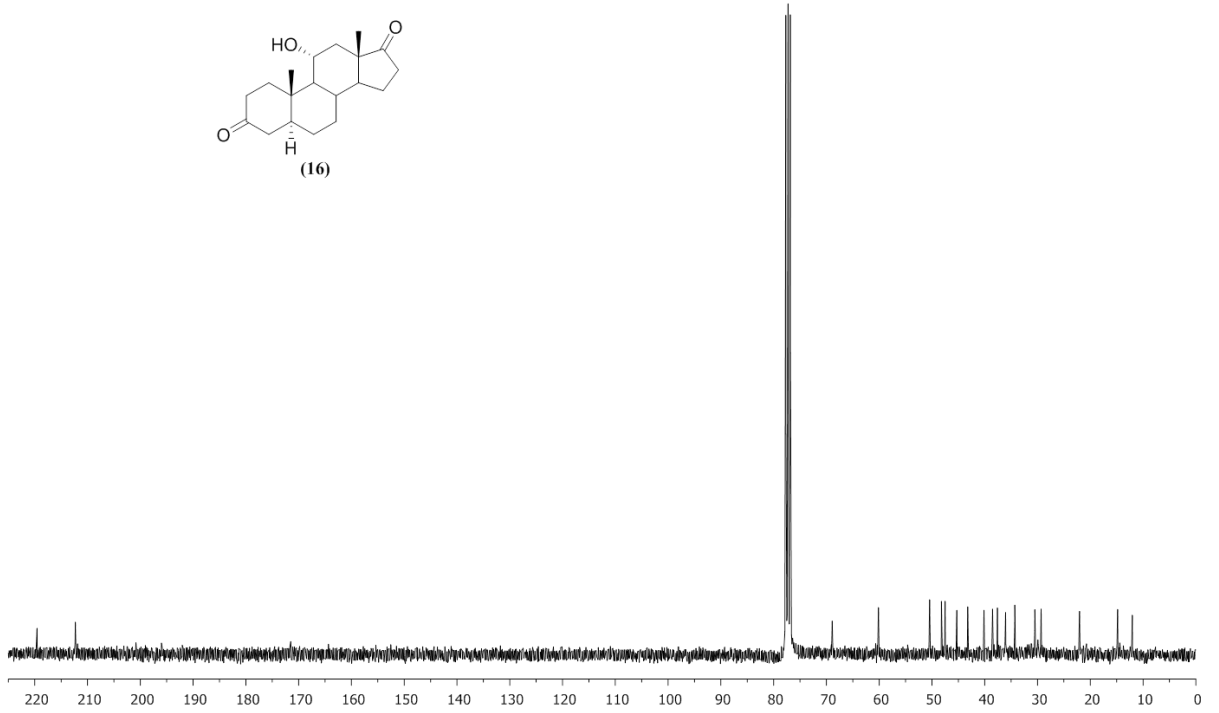
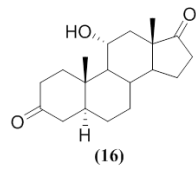
**EK A.1.** (15) numaralı bileşiğin <sup>1</sup>H NMR spektrumu.



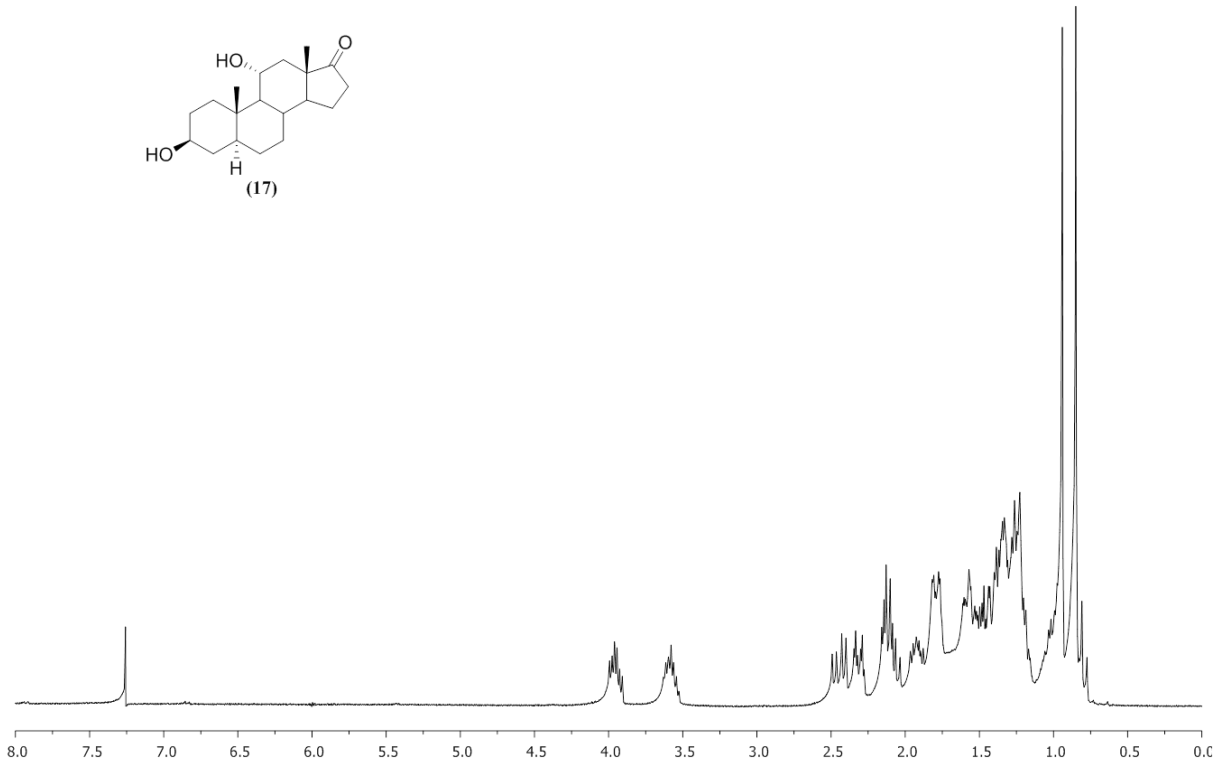
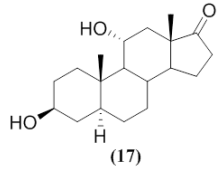
EK A.2. (15) numaralı bileşiğin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu.



**EK A.3.** (16) numaralı bileşiğin <sup>1</sup>H NMR spektrumu.

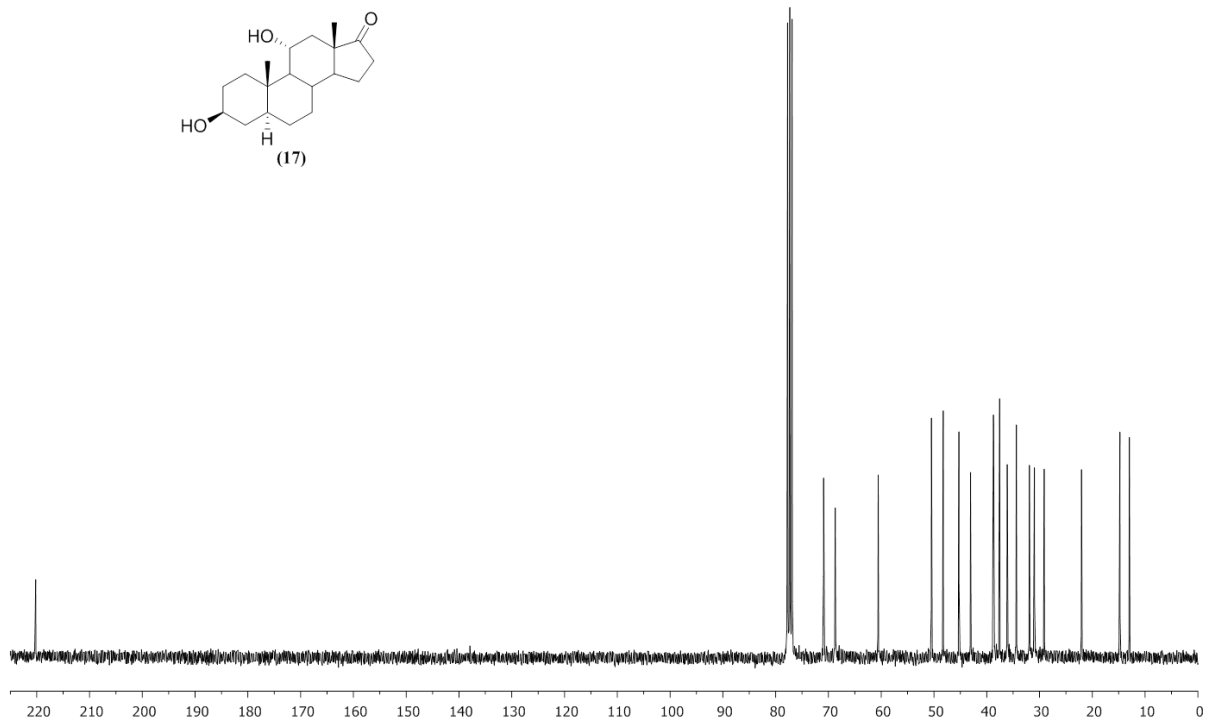


**EK A.4.** (16) numaralı bileşiğin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu.

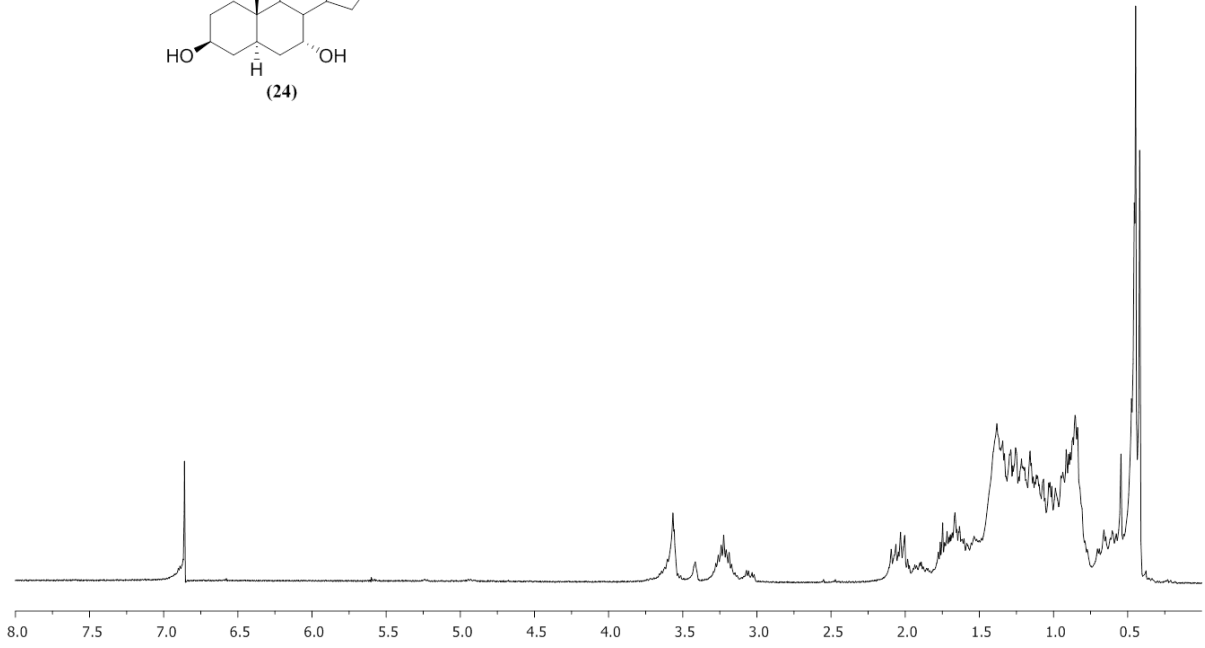
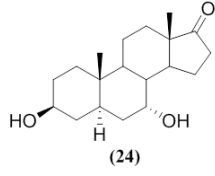


**EK A.5.** (17) numaralı bileşğin <sup>1</sup>H NMR spektrumu.

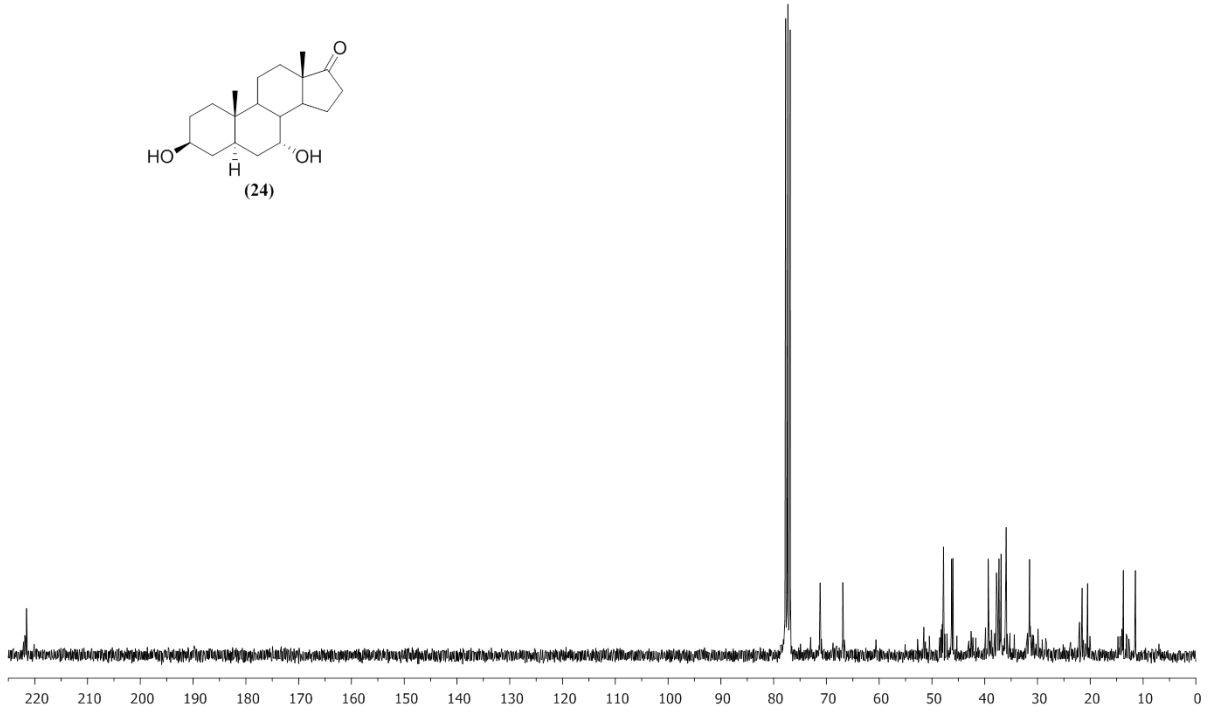
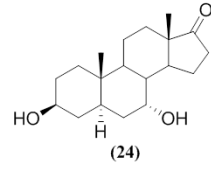




EK A.6. (17) numaralı bileşiğin <sup>13</sup>C NMR spektrumu.



**EK A.7.** (24) numaralı bileşiğin <sup>1</sup>H NMR spektrumu.



EK A.8. (24) numaralı bileşğin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu.



## ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Fatema ALSOUID

### ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2013-2017 yılları arasında Philadelphia Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Bölümü (Ürdün).
- **Yüksek lisans** : Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalı (devam ediyor).

### TEZDEN TÜRETİLEN ESERLER:

- Uluslararası Sözlü Bildiri (Yildirim, K., Kuru, A. Yılmaz Keskin S., Konar, F.H., Demirci, K., Alsoud, F. (1-3 Eylül 2022). Biotransformation of some steroids by *Aspergillus glaucus*. 1st International Karatekin Science and Technology Conference, 111-112, Çankırı, Türkiye).