

T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ANDROSTENDİON BİLEŞİĞİNİN *MUCOR*  
*HIEMALIS* İLE BİYOTRANSFORMASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Neslihan BÜKÜM**

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

**Ocak 2017**

T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

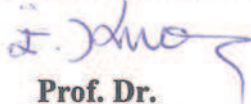
**ANDROSTENDİON BİLEŞİĞİNİN *MUCOR*  
*HIEMALIS* İLE BİYOTRANSFORMASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

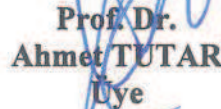
**Neslihan BÜKÜM**

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA  
Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA

Bu tez 11/01/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği / oyçokluğu ile kabul edilmiştir.



Prof. Dr.  
İsmail KIRAN  
Jüri Başkanı



Prof. Dr.  
Ahmet TUTAR  
Üye



Doç. Dr.  
Kudret YILDIRIM  
Üye

## BEYAN

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



Neslihan BÜKÜM  
20.12.2016

## **TEŞEKKÜR**

Çalıőmayı büyük bir titizlik ve sabırla yöneten, çalıőma boyunca desteğini bir an bile esirgemeyen, ilim ve tecrubesinden istifade ettiğim kıymetli hocam Doç. Dr. Kudret YILDIRIM'a sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Laboratuvardaki çalıőmalarım esnasında bana desteğini esirgemeyen Araő. Gör. Ali KURU'ya teőekkürlerimi sunarım.

Lisans öğrenimini gördüğüm Erciyes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyelerine ve araştırma görevlilerine teőekkürlerimi sunarım.

Bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan, yaőamım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve koőulsuz yanımda olan aileme ve dostlarıma sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	v
TABLOLAR LİSTESİ.....	vi
ÖZET.....	vii
SUMMARY.....	xiii
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.	
MUCOR TÜRLERİ İLE ANDROSTENDİON	
BİYOTRANSFORMASYONLARI.....	5
2.1. Biyotransformasyonlar.....	5
2.2. Mikrobiyal Biyotransformasyonlar.....	8
2.3. Küfler ile Steroid Biyotransformasyonları.....	11
2.4. <i>Mucor</i> Türleri ile Androstendion Biyotransformasyonları.....	12
2.5. Çalışmanın Amacı.....	15
BÖLÜM 3.	
MATERYAL VE METOT.....	16
3.1. Kullanılan Yöntemler, Cihazlar ve Sarf Malzemeler.....	16

3.2. <i>M. hiemalis</i> MRC 70325 ile Androstendion (7) İnkübasyonu.....	17
BÖLÜM 4.	
DENEYSEL BULGULAR.....	20
BÖLÜM 5.	
SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	22
KAYNAKLAR.....	25
EKLER.....	28
ÖZGEÇMİŞ.....	34

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

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

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Bazı androjen ve östrojenlerinlerin biyosentezi.....	3
Şekil 1.2. Testosteron (2) bileşiğinin bazı metabolitleri.....	4
Şekil 2.1. <i>R. arrhizus</i> ile progesteron (5) biyotransformasyonu.....	11
Şekil 2.2. <i>M. piriformis</i> ile androstendion (7) biyotransformasyonu.....	13
Şekil 2.3. Bir başka <i>M. piriformis</i> izolatu ile androstendion (7) biyotransformasyonu.....	13
Şekil 2.4. M881 küfü ile androstendion (7) biyotransformasyonu .....	14
Şekil 2.5. <i>M. racemosus</i> ile androstendion (7) biyotransformasyonu.....	14
Şekil 2.6. <i>M. griseo-cyanus</i> ile androstendion (7) biyotransformasyonu.....	15
Şekil 3.1. İnokülasyon, küfün yetiştirilmesi, substrat ilavesi ve inkübasyon aşamaları.....	18
Şekil 3.2. Filtrasyon, ekstraksiyon ve evaporasyon aşamaları.....	18
Şekil 3.3. Sonuçların değerlendirilmesi, saflaştırma ve yapı tayini aşamaları .....	19
Şekil 4.1. Androstendion (7) bileşiğinin karbon iskeleti.....	20
Şekil 4.2. <i>M. hiemalis</i> MRC 70325 ile androstendion (7) biyotransformasyonu.....	20
Şekil 5.1. <i>M. hiemalis</i> MRC 70325 ile androstendion (7) biyotransformasyonu.....	22



## TABLULAR LİSTESİ

Tablo 5.1. Steroidlerin <sup>13</sup> C NMR spektrumu sinyalleri .....	23
--	----

## ÖZET

Anahtar Kelimeler: Biyotransformasyon, *Mucor hiemalis*, Androstendion.

Bu çalışmada, androstendion bileşiminin *Mucor hiemalis* MRC 70325 küfö ile beş gün süren biyotransformasyonları gerçekleştirildi.

Androstendion bileşiminin *M. hiemalis* MRC 70325 ile inkübasyonundan 14 $\alpha$ -hidroksiandrostendion ve 14 $\alpha$ -hidroksitestosteron bileşikleri elde edildi. Metabolitlerin yapı tayinleri, başlangıç maddesi ile metabolitlerin erime noktaları, NMR ve IR spektrumları karşılaştırılarak gerçekleştirildi.

# **BIOTRANSFORMATION OF ANDROSTENEDIONE BY MUCOR HIEMALIS**

## **SUMMARY**

Keywords: Biotransformation, *Mucor hiemalis*, Androstenedione.

In this work, androstenedione was incubated by *Mucor hiemalis* MRC 70325 for 5 days.

Incubation of androstenedione with *M. hiemalis* MRC 70325 afforded 14 $\alpha$ -hydroxyandrostenedione and 14 $\alpha$ -hydroxytestosterone. The structures of the metabolites were elucidated by comparing melting points, NMR and IR spectra of the starting material with those of metabolites.

## BÖLÜM 1. GİRİŞ

Doğal ürünler hayat için esansiyel olmasalar da genellikle diğer canlılar üzerindeki etkileri ve ekseriyetle de canlıların hayatta kalmalarına yardımcı olmaları sebebi ile önemlidirler [1-3]. Hemen her grup canlıda bulunan doğal ürünler özellikle bitkiler, mikroorganizmalar, mantarlar ve böceklerde daha çok gözlenirler [3]. Tabiatta doğal ürünlerin en fazla oranda bulunduğu canlılar bitkiler ve mikroorganizmalardır.

Çok sayıda ve birbirinden farklı yapıda bileşikler olan doğal ürünlerin çoğu genellikle tabiattaki biyosentezlerinden ortaya çıkan bazı özel yapısal karakterleri sebebiyle poliketidler, yağ asitleri, terpenler, steroidler, fenolik bileşikler, alkaloidler, özelleşmiş karbohidratlar ile özelleşmiş amino asitler ve peptidler gibi sınıflardan birine dahil edilirler [1].

Doğal ürünlerin önemli bir sınıfı olan steroidlerin en bilinen temsilcilerinden birisi kolesterol (**1**) bileşiğidir. Kolesterol (**1**) insan ve hayvan membranlarındaki akışkanlığının düzenlenmesinde oldukça önemli bir bileşik olmasının yanında safra asitleri, D<sub>3</sub> vitamini ve steroid hormonlar gibi birçok önemli fonksiyonu bulunan bileşiklerinde çıkış maddesidir [4].

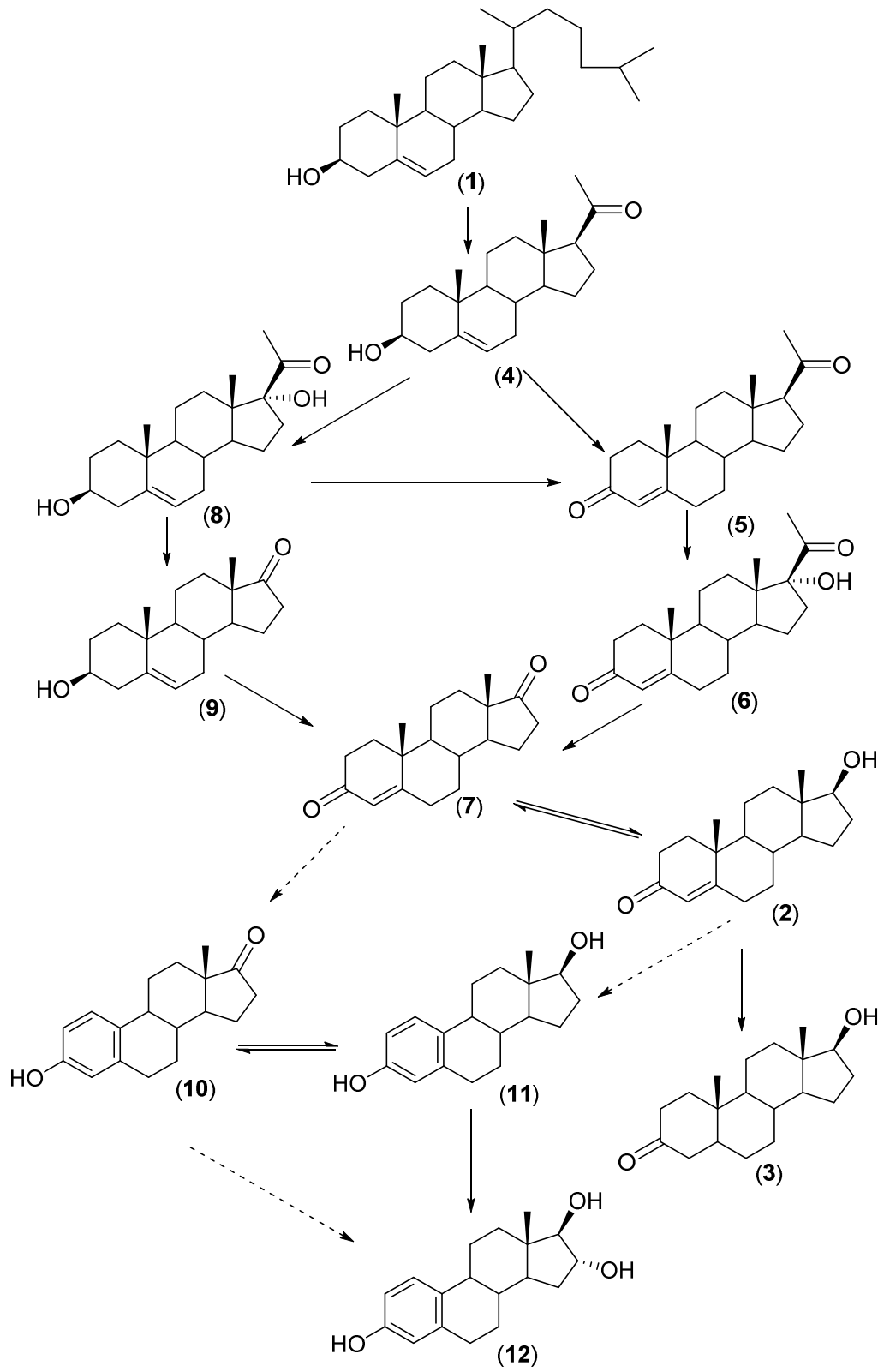
Kolesterol (**1**) bileşiğinden türevlenen steroid hormonlar; glukokortikoidler, mineralokortikoidler, androjenler, östrojenler ve progestagenler (progestinler) olmak üzere beş ana sınıfta incelenmektedir. Eşey hormonları olarak da bilinen androjenler, östrojenler ve progestagenler üreme ile ilgili organların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

Aynı zamanda östrojenlerin çıkış maddeleri de olan androjenler omurgalı erkek bireylerinde etkili olan eşey hormonlarıdır. Androjenlerin en etkin olanları testosteron (2) ve dihidrotestosteron (3) hormonlarıdır. Androjenlerin vücuttaki asıl sentez yeri erbezleri (testis) olsa da bu hormonların bir kısmı adrenal korteksten de salınmaktadır. Adrenal korteks ve testislerde androjenlerin sentezi kolesterol bileşiğinden (1) pregnenolon (4) oluşması ile başlar (Şekil 1.1.). Pregnenolon (4) üzerinden androjenlerin biyosentezi  $\Delta^4$  yolu veya  $\Delta^5$  yolu olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleşmektedir [5].

Androjen biyosentezinin ana yolu  $\Delta^4$  yoludur. Bu yolda pregnenolon (4) önce progesterona (5) daha sonra ise  $17\alpha$ -hidroksiprogesterona (6) dönüştürülür. Testosterondan (2) bileşiği  $17\alpha$ -hidroksiprogesteron (6) bünyesindeki yan zincirinin enzimatik olarak parçalanması ile oluşan androstendion (7) bileşiğinin C-17'deki indirgenmesi sonucunda sentezlenir. Testosteron (2) ise daha sonra  $5\alpha$ -redüktaz aktivitesi ile daha etkin bir diğer androjen olan dihidrotestosteron (3) bileşiğine dönüştürülür [5].

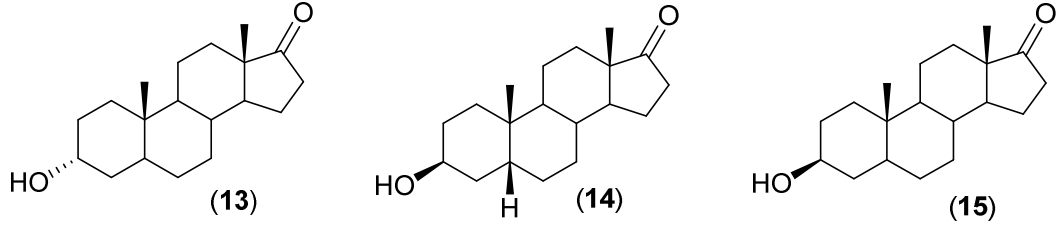
Daha çok bir yan yol olan  $\Delta^5$  yolunda ise pregnenolon (4)  $17\alpha$ -hidroksipregnenolon (8) bileşiğine çevrildikten sonra dehidroepiandrosteron (9) bileşiğine dönüştürülmektedir. Dehidroepiandrosteron (9) ise androstendion (7) bileşiğine çevrildikten sonra testosterona (2) yükseltgenmektedir. Bu yolda oluşan  $17\alpha$ -hidroksipregnenolon (8) ayrıca doğrudan progesterona (5) çevrilebilmektedir.

Aşağıdaki şekilden de (Şekil 1.1.) görülebileceği gibi androjenlerin biyosentezindeki  $\Delta^4$  yolu ve  $\Delta^5$  yolunun ortak son ürünü androstendion (7) bileşiğidir. Testosteronun çıkış maddesi olan androstendion (7) östron (10) ve östriol (11) gibi östrojenlerinde çıkış maddesidir [5]. Kendisinden bir östrojen olan östradiol (12) ( $17\beta$ -östradiol) bileşiğinin de sentezlendiği testosteron (2) biyolojik etkinliğini tamamladıktan sonra birçok dokuda androstendion (7) üzerinden düşük aktiviteli veya tamamen inaktif metabolitler olan androsteron (13), etiolanon (14) ve epiandrosteron (15) gibi metabolitlere dönüştürülür (Şekil 1.2.).



Şekil 1.1. Bazı androjen ve östrojenlerin biyosentezi

Androstendion (7) androjen metabolizmasındaki önemli bir metabolit olmasının yanında farmasötik açıdan önemli androjenler, anabolik ilaçlar ve spironolakton gibi birçok önemli bileşiğin hazırlanmasında da çıkış maddesi olarak kullanılmaktadır [6].



Şekil 1.2. Testosteron (2) bileşiğinin bazı metabolitleri

## **BÖLÜM 2. *MUCOR* TÜRLERİ İLE ANDROSTENDİON BİYOTRANSFORMASYONLARI**

### **2.1. Biyotransformasyonlar**

Enzimler veya enzimleri içeren biyolojik sistemlerin kendilerine yabancı maddeler üzerinde gerçekleştirdikleri kimyasal değişimlere biyotransformasyon adı verilir [7].

Biyotransformasyon çalışmalarında kullanılan enzimler çeşitli biyolojik sistemlerin (hücre, doku ve organ kültürleri, mikroorganizmalar, mikroorganizmalar gibi) bünyesinde, ya da izole olarak sabitlenmiş veya serbest bulunabilir. Günümüzde bu amaçla kullanılan enzimlerin çoğu biyolojik kaynaklardan izole edilirken bir kısmı ise ticari olarak elde edilmektedir. Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim Komisyonu enzimleri oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlar olmak üzere altı ayrı sınıfa ayırmıştır. Bu sınıflar ise kendi içerisinde 4-13 arası alt sınıflara ayrılmaktadır [4,8].

Oksidoredüktazlar iki ayrı substrat arasındaki redoks reaksiyonlarını katalizleyen dehidrojenazlar, redüktazlar, oksijenazlar, oksidazlar gibi enzimleri içerir. Transferazlar iki ayrı substrat arasındaki H atomu haricindeki belirli atom ve grupların transferini katalizleyen enzimlerdir. Hidrolazlar ester, eter, anhidrit, peptid, glikozid, C-halojenür veya P-N bağları gibi bazı bağların su eklenerek parçalanmasını katalizlerler. Liyazlar substratlarındaki çift bağ oluşumunu veya substratlarındaki çift bağlara çeşitli grupların eklenmesini katalizleyen enzimlerdir. İzomerazlar çeşitli izomerlerin birbirlerine dönüşümünü katalizleyen rasemaz, epimeraz, mutaz gibi enzimleri içerir. Ligazlar ise iki substratın birbirlerine bağlanmasını katalizleyen enzimlerdir [4,8].



Enzimler hakkında oldukça hassas, pahalı, sadece kendine özgü substratları ve kendi doğal çevrelerinde etkili olduklarına dair bazı önyargılar olsa da biyotransformasyon çalışmalarında kullanılan çoğu enzim için bu ifadeler doğru değildir [8].

Enzimler oldukça hızlı çalışan biyokatalizörler olduğundan kullanıcılarına birçok avantaj sağlar. Örneğin, enzimatik bir reaksiyon enzim olmaksızın gerçekleşen bir reaksiyona göre  $10^8$ - $10^{10}$  kat daha hızlı gerçekleşir. Ayrıca, enzimatik reaksiyonlarda katalizör oranının %  $10^{-3}$ - $10^{-4}$  mol arasında olması istenirken, kimyasal katalizörlü bir reaksiyonda bu oran % 0,1-1 mol aralığına kadar çıkabilmektedir.

Enzimler, katalizör olarak kullanılan ağır metaller ve sentetik amaçlı kullanılan çoğu reaktifin aksine doğada tamamen parçalanabilir olduklarından doğa dostu biyomoleküller olarak tanımlanırlar.

Enzimler sentetik amaçlı kullanılan çoğu reaktiften farklı olarak genellikle sıcaklığın 20-40 °C arası olduğu ılıman şartlar altında ve pH 5-8 aralığında çalışırlar. Bu sayede enzimler kullanılarak sentetik metotlarda sıklıkla karşılaşılan izomerleşme, rasemizasyon, çevrilme ve bozunma gibi yan reaksiyonlar azaltılabilmektedir.

Enzimler çoğu zaman doğal rolleri dışında fonksiyon gösterebilirler. Örneğin, çoğu enzim geniş bir substrat spektrumuna sahip olmalarından ötürü, sentetik veya doğal birçok bileşik üzerinde etkili olabilir. Ayrıca gerektiğinde bazı enzimler organik çözücülerde de kullanılabilir.

Benzer hatta aynı şartlar altında etkin olduklarından enzimler metabolik yollardaki multienzim sistemleri bir reaksiyon ağındaki birden fazla seri reaksiyonu aynı ortamda gerçekleştirebilir.

Enzimler çok farklı tipte reaksiyonları gerçekleştirebilirler. Neredeyse her bir sentetik reaksiyona benzer enzimatik bir reaksiyon söz konusudur. Enzimler ile ester, eter, lakton, laktam, epoksit, asit anhidrit, amid ve nitrillerin hidroliz veya sentezi, alkan, alken, aromatik bileşikler, alkol, aldehit, keton, sülfürler ve sülfoksitlerin

yükseltgenmesi ya da indirgenmesi, karboksilasyon, dekarboksilasyon, alkilasyon ve dealkilasyon, halojenasyon ve dehalojenasyon, izomerizasyon, su, amonyak ve hidrojen siyanür eklenmesi veya eliminasyonu, açiloin ve aldol reaksiyonları, Michael katılması ve Diels-Alder reaksiyonları gerçekleştirilebilmektedir.

Kompleks bir üç boyutlu yapıya sahip olan enzimler regioseçici ve stereoseçici biyomoleküller oldukları için aynı substrat molekülünde bulunan farklı bölgelerdeki fonksiyonel grupları dahi ayırt edebilir.

Enzimler aynı zamanda kemoseçici biyomeküller de olduklarından sadece spesifik bir fonksiyonel grup üzerinde etkili olurken diğer fonksiyonel grupları etkilemezler ve buda yan ürünlerin oluşumlarına engel olur.

L-Amino asitlerden oluşan kiral biyokatalizörler olan enzimler enantiyoseçici biyomoleküllerdir. Substrat bünyesindeki herhangi bir kiralite, enzim-substrat kompleksi oluşumu esnasında tanımlanır. Prokiral bir substrat enzimler ile sadece yalnızca bir enantiyomere dönüştürken genellikle rasemik karışımlardaki enantiyomerlerden sadece birinin etkilenmesi ile enantiyomerlerin ayrılmaları da gerçekleşebilmektedir.

Enzimlerin yukarıda anlatılan avantajları sayesinde, organik sentez yöntemleriyle gerçekleştirilebilmesi çok zor hatta imkansız olarak nitelenen reaksiyonlar kolaylıkla gerçekleştirilebilmektedir [8].

Enzimlerin biyokatalizörler olarak kullanılması bazı dezavantajlara sebep olabilir. Örneğin, enzimler doğal olarak yalnızca bir enantiyomerik forma sahip oldukları ve diğer enantiyomerik formlarının D-amino asitlerden sentezi için genel bir yol olmaması sebebiyle sadece spesifik bir enantiyomer ile reaksiyona girebilir. Bu durumda, diğer enantiyomerik ürünün elde edilebilmesi için gereken stereokimyasal seçiciliğe sahip bir enzimin kullanılması gereklidir. Bu ise bazen mümkün olabilmektedir [8].

Enzimler aktiviteleri üzerinde etkili olan pH ve sıcaklık gibi parameterelerin değişimine oldukça duyarlıdır. Örneğin, yavaş ilerleyen bir enzimatik reaksiyonu hızlandırmak için pH ve sıcaklık gibi enzim aktivitesi üzerinde etkili parametreler enzimlerin protein yapısında olmaları sebebi ile fazla değiştirilemezler.

Enzimler için en uygun reaksiyon ortamı su olsa da çoğu organik bileşinin sudaki çözünürlükleri oldukça düşüktür. Enzimatik bir reaksiyonun sulu bir ortam yerine organik bir çözücüye alınması çoğu zaman enzimlerin denatürasyonu ile sonuçlandığı için bu aktivite kaybına neden olmaktadır.

Enzimler, çoğu enzimatik reaksiyonda yüksek oranlı substrat ve ürün konsantrasyonlarında inhibe olurlar. Substrat inhibisyonu, düşük miktarlarda substrat düzeyinden başlanarak ortama sürekli substrat ilave edilerek kolaylıkla engellenebilir. Reaksiyon ortamından artan ürünün aşama aşama uzaklaştırılması genellikle ürünün bir sonraki reaksiyon basamağına dahil olması nedeniyle oldukça güçtür.

Enzimler kendi doğal kofaktörlerine bağımlı oldukları için enzimatik reaksiyonlarda etkili olan NAD(P)H gibi kofaktörlerin reaksiyon ortamında olmaları ve sürekli yenilenmeleri gerekir. Kofaktörlerin genelde kararsız moleküller olmaları, sentetik muadilleri ile yer değiştirilmelerinin mümkün olmaması ve oldukça pahalı olmaları enzimatik reaksiyonların önemli dezavantajlarındanır.

Enzimler alerjik reaksiyonlara da sebebiyet verebilir. Bunu engellemek için enzimler diğer kimyasal maddeler gibi değerlendirilip dikkatli kullanılırlarsa alerjik reaksiyonlar engellenebilir.

## **2.2. Mikrobiyal Biyotransformasyonlar**

Biyotransformasyonlar genelde izole enzimler veya bütün hücre sistemleriyle biyotransformasyonlar olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleştirilir. Bütün hücre

sistemleri genelde bitki ve hayvanlara ait hücre, doku ve organ kültürleri ile mikroorganizmaları kapsar.

Çoğu hücre içi enzimin hücre dışında kararsız olabilmesi, izolasyonlarının zorluğu, homojenasyonları sırasında bazı proteolitik enzimlerin etkisi ile hidrolizlenmeleri, kofaktör ihtiyaçlarının temini ve sürekli yenilenme isteği ve yüksek maliyeti gibi sebeplerden dolayı biyotransformasyon çalışmalarında bütün hücre sistemleri tercih edilmektedir.

Bütün hücre sistemleri ile gerçekleştirilen biyotransformasyonlarda en çok tercih edilenler mikrobiyal hücrelerdir. Mikrobiyal hücrelerin büyüme ve gelişme hızı, bitki ve hayvan hücrelerine göre çok daha yüksektir. Bu sayede mikrobiyal hücreler ile biyotransformasyonlar kısa zamanda ve hızlı bir şekilde gerçekleşir. Mikrobiyal hücreler, minimal boyutları ve güçlü hücre duvarı yapıları sayesinde bitki ve hayvan hücrelerine göre mekanik olarak daha kararlıdır ve bu tip hücrelerin bulunduğu ortama daha kolay uyumu avantaj sağlar. Buna ilaveten mikrobiyal hücreler bitki ve hayvan hücrelerine göre çok farklı tipte substratları metabolize edebilir [8].

Mikrobiyal biyotransformasyonlar diğer kimyasal sentez metotlarına karşı olan üstünlükleri sayesinde biyoteknolojinin temel unsurları arasında yer alırlar [7-9].

Mikroorganizmalar genetik olarak değiştirilebildiği için mikroorganizmalar üzerinde gerçekleştirilen genetik değişiklikler sayesinde diğer kimyasal yöntemler ile düşük verimle elde edilen önemli ürünler daha yüksek verimlerde elde edilebilir. Hatta genetik uygulamalar ile ürünler üzerinde spesifik değişikliklerin sağlanması bile mümkün olabilmektedir [9].

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

Mikrobiyal biyotransformasyonlar geleneksel kimyasal yöntemlere göre çok daha ılıman şartlarda gerçekleşir. Mikrobiyal biyotransformasyonların çoğu oda sıcaklığında ve 1 atm basınç altında gerçekleşmektedir [8].

Mikrobiyal biyotransformasyonlar geleneksel kimyasal yöntemlere göre daha ucuza daha kısa sürede gerçekleştirilir. Hedef bileşikler daha kısa süreler içerisinde ve genellikle oldukça yüksek verimlerde, kimyasal reaktiflere göre çok daha ucuza mal edilen besiyeri bileşenleri ve mikroorganizmalar kullanılarak hazırlanmaktadır [7,9].

Mikrobiyal biyotransformasyonlar doğa dostu iken geleneksel kimyasal sentez metotlarında kullanılan çoğu reaktif, çevreye çok büyük zararlar vermektedir [7].

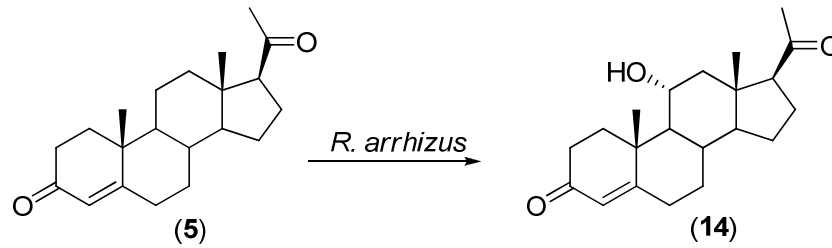
Mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonları enantioseçicidir. Geleneksel kimyasal sentez yöntemleri ile hedeflenen moleküller, genelde ayrışmaları oldukça zor olan rasemik karışımlar ile sonuçlanır. Özellikle ilaç etken maddelerinin sentezinde sadece istenilen enantiyomeri üretebilmek son derece önemlidir. Günümüzde tek enantiyomerin seçimli sentezi için mikroorganizmaların kullanılmaları gittikçe yaygınlaşmıştır [8].

Geleneksel kimyasal sentez yöntemlerinin aksine kullanılan enzimlerin regioseçicilikleri sebebi ile mikrobiyal biyotransformasyonlar esnasında substratlar üzerindeki diğer fonksiyonel grupların korunması gerekmez [7,8].

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

Mikroorganizmalar farklı ortamlara kolaylıkla uyum sağlayabildikleri için erlenden fabrika fermentörlerine kadar birçok değişik ortamda kolayca kullanılabilir [7-9].

Mikroorganizmaları kullanılarak çoğu geleneksel kimyasal sentez yöntemlerine karşılık gelen reaksiyonları gerçekleştirilebilmektedir. İlâveten, mikrobiyal hidroksilasyonlar gibi bazı mikrobiyal biyotransformasyonlar, geleneksel kimyasal sentez yöntemleri ile tek basamakta gerçekleştirilemez. Mikrobiyal hidroksilasyonlar en yaygın ve önemli mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonlarından [4]. Mikrobiyal hidroksilasyonların önemi ilk olarak iltihap giderici olarak kullanılan kortikal steroidlerin sentezinde ortaya çıkmıştır. Kortikal steroidlerin sentezinde, fonksiyonel gruplardan oldukça uzakta bulunan C-11 pozisyonuna bir oksijen yerleştirilmesi, klasik kimyasal sentez yöntemleri ile oldukça uzun ve pahalı bir işlem olmasına rağmen bu işlemin tek basamakta *Rhizopus arrhizus* küfünün yüksek verimli bir 11-hidroksilasyonu sayesinde gerçekleştirilebilmesi tüm dikkatleri mikrobiyal biyotransformasyonlar üzerine çekmiştir. Söz konusu reaksiyonda (Şekil 2.1) progesteron (5) mikrobiyal hidroksilasyon ile 11 $\alpha$ -hidroksiprogesteron (14) bileşiğine dönüştürülmüştür [7].



Şekil 2.1. *R. arrhizus* ile progesteron (5) biyotransformasyonu

Mikrobiyal biyotransformasyonlar esnasında çeşitli mikroorganizmalar serbest veya uygun yüzeylere sabitlenmiş olarak kullanılabilir. Bu amaç doğrultusunda en yaygın olarak kullanılan mikroorganizmalar, protista aleminin üyesi ve prokaryotik canlılar olan bakteriler ile mantarlar aleminin üyesi ve ökaryotik canlılar olan küfler ve mayalardır [9].

### 2.3. Küfler ile Steroid Biyotransformasyonları

Steroidlerin küfler ile biyotransformasyonları, yüksek regio ve stereoseçicilikleri sebebi ile steroid ilaçlar ve hormonlar gibi çok daha önemli ve fonksiyonlu bileşiklerin üretimi için halen yaygın olarak kullanılmaktadır [10-14]. Mevcut

mikrobiyal biyotransformasyonların etkinliklerini artırmak, kullanılabilir yeni mikroorganizmalar ve reaksiyonlar bulmayı amaçlayan çalışmalar yoğun olarak sürdürülmektedir [10].

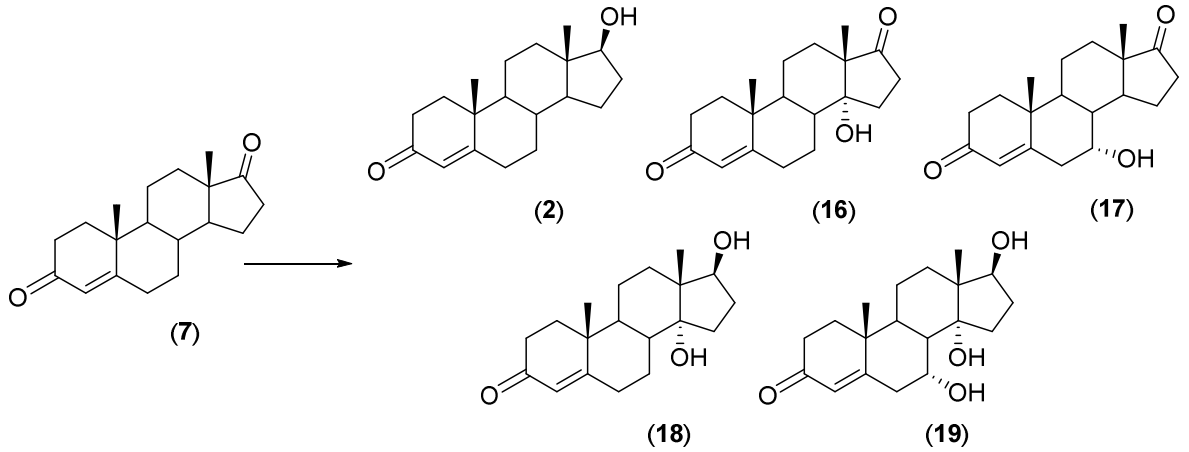
Bugüne kadar farklı küf türleri ile çok sayıda steroidin biyotransformasyonları gerçekleştirilmiş ve bu çalışmalardan Baeyer-Villiger oksidasyonları, 5 $\alpha$ -redüksiyonları ve steroidlerin farklı kısımlarında gerçekleşen mikrobiyal hidroksilasyonlar gibi önemli sonuçlar alınmıştır [10-14].

#### 2.4. *Mucor* Türleri ile Androstendion Biyotransformasyonları

Mantarlar aleminin zigomiçetes sınıfına ait mucorales takımının küfleri yerkürenin her yerinde geniş dağılımlara sahip olup toprak, çürüyen sebzeler, meyveler ve tohumlardan izole edilebilirler. Mucorales takımında *Absidia*, *Rhizopus* ve *Mucor* [15] gibi oldukça iyi bilinen küf cinsleri mevcuttur. *Mucor* cinsi içerdiği çok sayıda tür ile mucorales takımının en çok üyeli cinsidir. Pek çok *Mucor* türü besinlerde bozulmalara yol açarken, bir kısmı da memeliler ve bitkiler için patojeniktir [16].

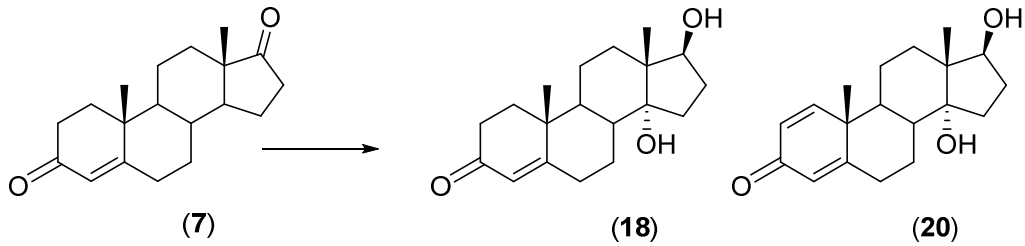
Literatürde *Mucor* türleri ile gerçekleştirilmiş çok sayıda steroid biyotransformasyonu mevcuttur. Söz konusu biyotransformasyonlar genelde steroidlerin farklı kısımlarında mikrobiyal hidroksilasyonlar olarak gerçekleşmiştir [10-14,17-22].

Androstendion (**7**) bileşiğinin farklı *Mucor* türleri ile biyotransformasyonuna yönelik bazı çalışmalar mevcuttur [17-22]. Bu çalışmaların birinde bir *Mucor piriformis* izolatının androstendion (**7**) ile biyotransformasyonu [17,18] testosteron (**2**), 14 $\alpha$ -hidroksiandrostendion (**16**), 7 $\alpha$ -hidroksiandrostendion (**17**), 14 $\alpha$ -hidroksitestosteron (**18**) ve 7 $\alpha$ ,14 $\alpha$ -dihidroksitestosteron (**19**) bileşiklerini vermiştir (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. *M. piriformis* ile androstendion (7) biyotransformasyonu

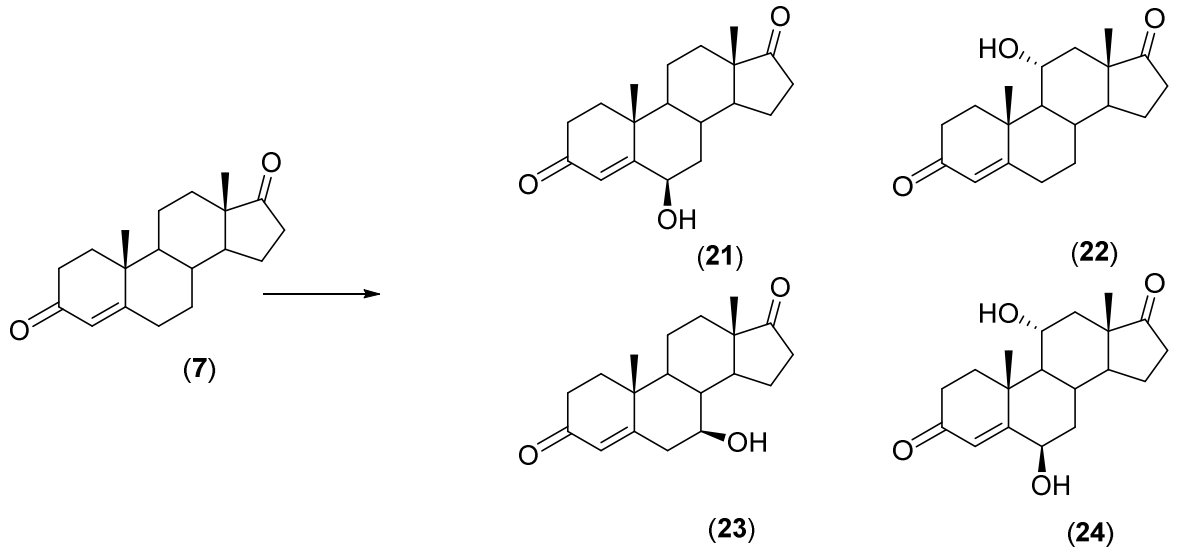
*M. piriformis* küfünün bir diğer izolatu ile androstendion (7) ile biyotransformasyonu [19] ise 14α-hidroksitestosteron (18), 14α-hidroksi-1-en-testosteron (20) ve saflaştırılmayan diğer bazı metabolitler vermiştir (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Bir başka *M. piriformis* izolatu ile androstendion (7) biyotransformasyonu

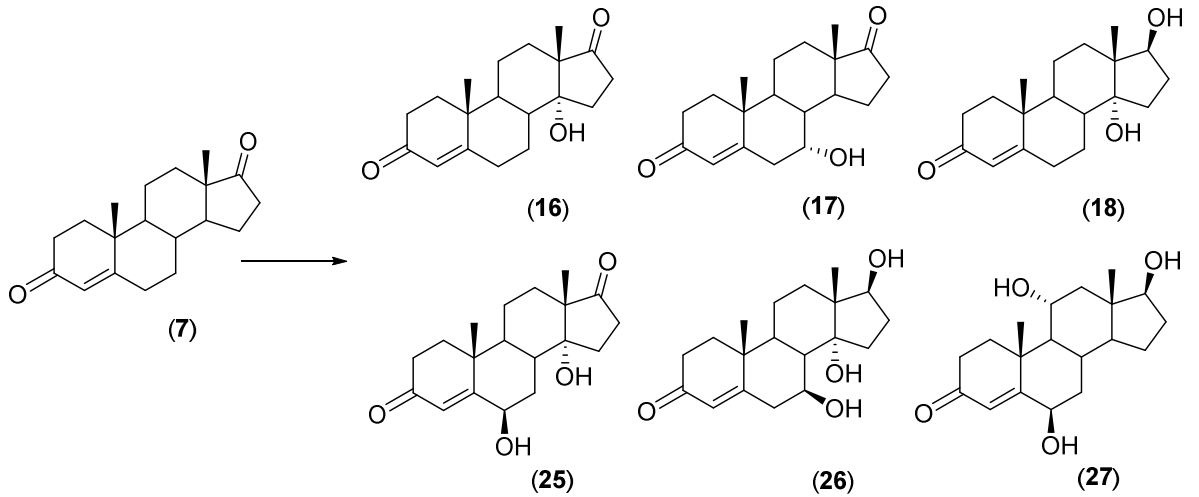
Bir *Mucor* izolatu olan M881 küfö ile androstendion (7) biyotransformasyonu [20] 6β-hidroksiandrostendion (21), 11α-hidroksiandrostendion (22), 7β-hidroksiandrostendion (23) ve 6β,11α-dihidroksiandrostendion (24) bileşikleriyle sonuçlanmıştır (Şekil 2.4.).





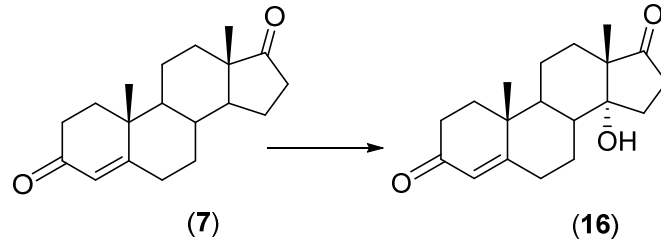
Şekil 2.4. M881 küfü ile androstendion (7) biyotransformasyonu

*Mucor racemosus* ile androstendion (7) biyotransformasyonu [21] ise 14 $\alpha$ -hidroksiandrostendion (16), 7 $\alpha$ -hidroksiandrostendion (17), 14 $\alpha$ -hidroksitestosteron (18), 6 $\beta$ ,14 $\alpha$ -dihidroksiandrostendion (25), 7 $\beta$ ,14 $\alpha$ -dihidroksitestosteron (26) ve 6 $\beta$ ,11 $\alpha$ -dihidroksitestosteron (27) bileşikleriyle sonuçlanmıştır (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. *M. racemosus* ile androstendion (7) biyotransformasyonu

*Mucor griseo-cyanus* ile androstendion (7) biyotransformasyonu [22] sadece 14 $\alpha$ -hidroksiandrostendion (16) bileşiğiyle sonuçlanmıştır (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. *M. Griseo-cyanus* ile androstendion (7) biyotransformasyonu

## 2.5. Çalışmanın Amacı

Mucorales takımının yeryüzünün her yerinde bulunan en yaygın türü olan *Mucor hiemalis* küfü [23] özellikle etanol, çitosan [24] ve bazı enzimlerin [23] elde edilmesinde kullanılmaktadır.

Literatürde *M. hiemalis* ile gerçekleştirilmiş 4 ayrı steroid biyotransformasyonu bulunmaktadır ve bu çalışmalardan çeşitli steroidlerin [25-28] hidroksillenmiş bileşikler elde edilmiştir.

Bu çalışmanın amacı, androstendion (7) bileşiğinin *M. hiemalis* MRC 70325 küfü ile biyotransformasyonunun nasıl gerçekleşeceğini incelenmesiydi. Söz konusu amaç doğrultusunda androstendion (7) bileşiği *Mucor hiemalis* MRC 70325 küfü ile biyotransformasyona maruz bırakıldı.

## BÖLÜM 3. MATERYAL VE METOT

### 3.1. Kullanılan Yöntemler, 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 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 Electrothermal IA 9200 erime noktası tayin cihazı ile tespit edildi.

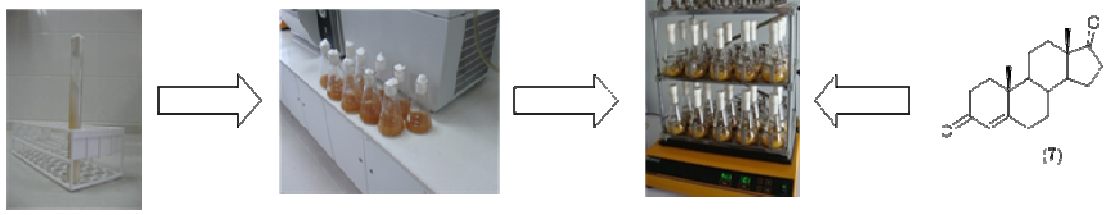
*Mucor hiemalis* MRC 70325 küfü Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu, Marmara Araştırma Merkezi Gıda Teknoloji ve Araştırma Enstitüsü'nden

yatık agar kültürleri olarak temin edildi. Bu kültürler PDA (potato dekstroz agar) içeren yatık agar besiyerlerinde ve 4 °C’de muhafaza edildi. Yatık agar kültürleri PDA (5,85 g) ve agar (1,35 g) karışımı saf su ile 150 mL’ye tamamlandıktan sonra kaynatılarak besiyeri hazırlandı. Hazırlanan besiyeri soğumadan 15 adet 22 mL’lik Universal marka patolojik cam şişelerin yarısına kadar ilave edildi ve otoklav içerisinde 121 °C’de 20 dakika sterilize edildi. Sterilizasyondan sonra şişeler içerisinde erimiş haldeki besiyerleri, donmadan önce 45°’ye yakın bir eğim oluşturacak şekilde soğumaya bırakılmak suretiyle yatık agar besiyerleri 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 ayda bir kez 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.

Androstendion (7) bileşiği Sigma-Aldrich şirketinden satın alındı. Tüm solventler, yatık agar besiyerleri için kullanılan PDA ve agar ile küfler için hazırlanan besiyerinde kullanılan tüm kimyasallar Merck şirketinden temin edildi.

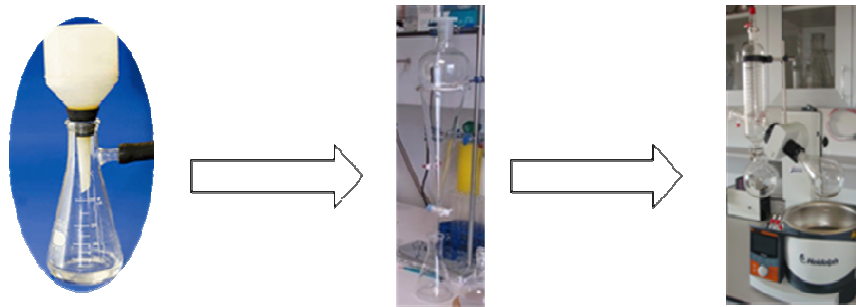
### **3.2. *M. hiemalis* MRC 70325 ile Androstendion (7) İnkübasyonu**

*M. hiemalis* MRC 70325 besiyeri olarak PYG Broth hazırlamak için glukoz (20 g), pepton (10 g) ve maya ekstraktı (10 g) 1 litre distile suda çözüldü [25]. Hazırlanan 1 L besiyeri, 10 adet 250 mL erlene paylaştırıldıktan sonra otoklavda sterilize edildi. Daha önce hazırlanan en taze alt kültürdeki küf, erlenlerden her birine steril şartlar altında aktarıldı (inokülasyon). Bu erlenler yeterli miktarda küf oluşabilmesi için 3 gün boyunca 26°C’de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona (100 rpm) bırakıldı. Androstendion (7) (1 g) DMF (10 mL) içerisinde çözünerek yeterli miktarda küf içeren erlenlere eşit hacimlerde, steril koşullar altında ilave edildikten sonra 5 gün süresince 26 °C’ de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona (100 rpm) bırakıldı (Şekil 3.1.).



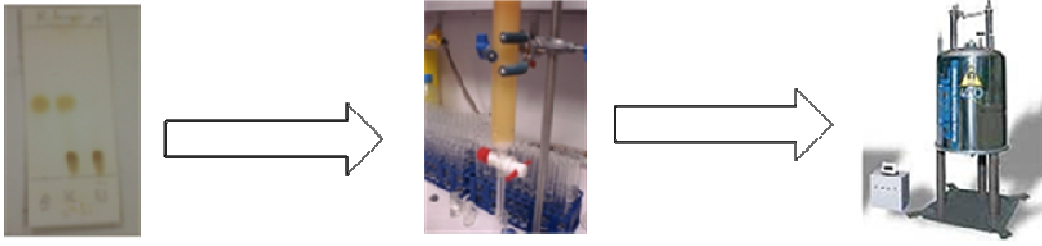
Şekil 3.1. İnküstasyon, küfün yetiştirilmesi, substrat ilavesi ve inküstasyon aşamaları

İnküstasyon işlemi tamamlandıktan sonra, besiyeri bir Buchner hunisi yardımıyla filtrasyon işlemine tabi tutuldu ve besiyeri küf kültürüne ait misellerden süzülerek ayrıldı. Buchner hunisinde kalan miseller etil asetat (500 mL) kullanılarak yıkandı. Filtrat sodyum klorüre doyunlaştırıldıktan sonra her seferinde 1 L etil asetat kullanılarak 3 ayrı ekstraksiyona maruz bırakıldı. Daha sonra toplanan ekstraktlara susuz sodyum sülfat katılarak ortamda bulunabilecek su giderildi. Etil asetat evaporatörde uzaklaştırıldı (Şekil 3.2.) ve yağimsı bir madde (2378 mg) elde edildi.



Şekil 3.2. Filtrasyon, ekstraksiyon ve evaporasyon aşamaları

Evaporasyon sonucunda elde edilen yağimsı bir madde üzerinde biyotransformasyon çalışmasının sonuçları bir İTK çalışması ile değerlendirildi. Daha sonra yağimsı madde silika jel 60 üzerinde kolon kromatografisine tabi tutuldu. Elde edilen bileşiklerin yapılarını tayin edebilmek için androstendion (7) ile biyotransformasyonlardan elde edilen bileşiklerin erime noktaları,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR ve IR spektrumları karşılaştırıldı. (Şekil 3.3.).

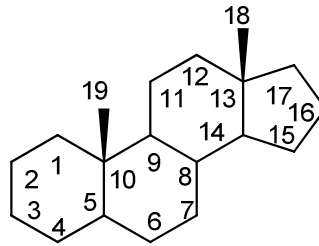


Şekil 3.3. Sonuçların değerlendirilmesi, saflaştırma ve yapı tayini aşamaları

Biyotransformasyon çalışmasının kontrolü için sadece steril besiyeri ve substratı içeren bir erlen aynı şartlarda 5 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonrasındaki İTK ile inceleme kontrol erleninde herhangi bir metabolit olmadığını gösterdi.

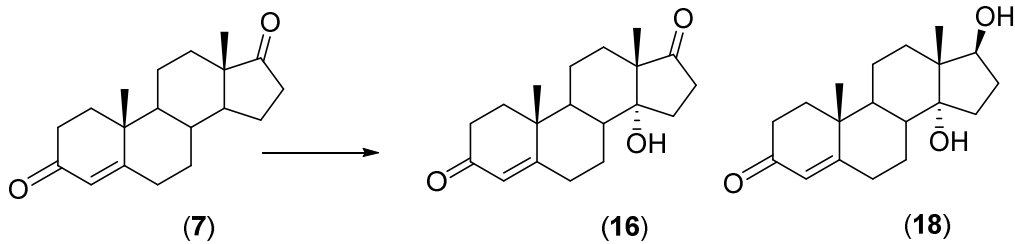
## BÖLÜM 4. DENEYSEL BULGULAR

Androstendion (**7**) bileşiğinin *M. hiemalis* MRC 70325 ile biyotransformasyonundan elde edilen bileşiklerin yapılarını belirlemek için hem başlangıç maddelerinin hem de elde edilen bileşiklerin erime noktaları,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR ve IR spektrumları karşılaştırıldı. Bileşiklere ait  $^1\text{H}$  NMR ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumları Ekler Bölümünde verildi. Biyotransformasyonu gerçekleştirilen androstendion (**7**) bileşiğinin karbon iskeleti numaralandırılması Şekil 4.1.'deki gibidir.



Şekil 4.1. Androstendion (**7**) bileşiğinin karbon iskeleti

Androstendion (**7**) (1 g) bileşiğinin *M. hiemalis* MRC 70325 ile 26 °C'de 5 gün süren inkübasyonu sonrasında gerçekleştirilen kolon kromatografisi çalışması sonrasında kolondan sırası ile sırası ile değişmeyen başlangıç maddesi (%5, 50 mg), 14 $\alpha$ -hidroksiandrostendion (**16**) (%10) ve 14 $\alpha$ -hidroksitestosteron (**18**) (%60) bileşikleri elde edildi (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. *M. hiemalis* MRC 70325 ile androstendion (**7**) biyotransformasyonu

14 $\alpha$ -Hidroksiandrostendion (**16**) (106 mg, %10)

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

Erime noktası: 261-262 °C, (lit. [29] erime noktası: 255-260 °C).

IR ( $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ ): 3420, 1745 ve 1660.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1,03 (3H, s, 18-H); 1,21 (3H, s, 19-H); 5,73 (1H, s, 4-H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 219,01 (C-17); 199,84 (C-3); 170,84 (C-5); 123,71 (C-4); 80,27 (C-14); 52,46 (C-13); 46,48 (C-9); 38,47 (C-10); 37,73 (C-8); 35,38 (C-1); 33,65 (C-16); 32,97 (C-2); 32,21 (C-6); 29,81 (C-15); 25,35 (C-7); 24,27 (C-12); 18,92 (C-11); 17,62 (C-19); 17,09 (C-18).

14 $\alpha$ -Hidroksitestosteron (**18**) (638 mg, %60)

%60'lık çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde etil asetatın prizmalar şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 184-185 °C, (lit. [29] erime noktası: 181-185 °C).

IR ( $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ ): 3450, 1660 ve 1645.

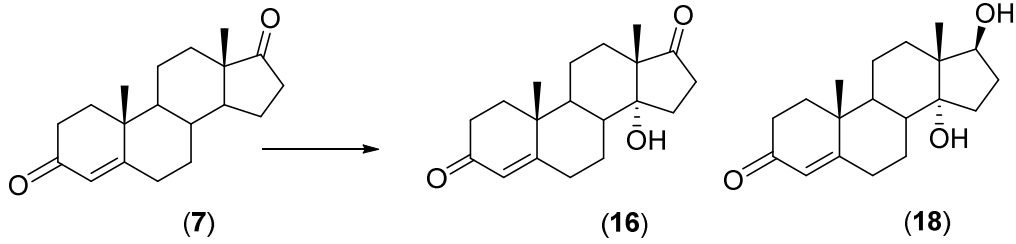
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0,91 (3H, s, 18-H); 1,21 (3H, s, 19-H); 4,30 (1H, t,  $J = 8,2$  Hz, 17 $\alpha$ -H); 5,72 (1H, s, 4-H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 199,92 (C-3); 171,14 (C-5); 123,75 (C-4); 83,33 (C-14); 78,52 (C-17); 46,89 (C-13); 46,69 (C-9); 38,80 (C-8); 38,68 (C-10); 35,63 (C-1); 33,85 (C-2); 32,58 (C-12); 32,49 (C-6); 29,45 (C-16); 28,47 (C-7); 26,04 (C-15); 19,62 (C-11); 17,16 (C-19); 14,87 (C-18).



## BÖLÜM 5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Biyotransformasyon çalışmaları sonucunda elde edilen bileşiklerin yapılarını tayin amacıyla, androstendion (**7**) ile biyotransformasyonlardan elde edilen bileşiklerin erime noktaları,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR ve IR spektrumları karşılaştırıldı. Androstendion (**7**) bileşiğinin *M. hiemalis* MRC 70325 ile beş gün inkübasyonu iki metabolit verdi (Şekil 5.1.).



Şekil 5.1. *M. hiemalis* MRC 70325 ile androstendion (**7**) biyotransformasyonu

Birinci metabolit  $\delta_{\text{C}}$  80,27 ppm'de bir hidroksil grubu varlığına işaret eden yeni bir C atomu rezonansı verdi. Metabolit 18-metil rezonansı için aşağı alana doğru bir kayma ( $\Delta\delta_{\text{H}}$  0,13 ppm) göstereceği yeni bir proton sinyali gözlenmediğinden C-14'de tersiyer bir hidroksil grubunun bulunduğu düşünüldü. Metabolit  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu C-8 ve C-15 rezonansları için aşağı alana doğru kaymalar gösterirken (C-8 için  $\Delta\delta_{\text{C}}$  2,66 ppm ve C-15 için  $\Delta\delta_{\text{C}}$  8,13 ppm) C-7 ve C-16 rezonansları için ise yukarı alana doğru  $\gamma$ -gauche kaymaları (C-7 için  $\Delta\delta_{\text{C}}$  5,85 ppm ve C-16 için  $\Delta\delta_{\text{C}}$  2,04 ppm) gösterdi. Bu kayma değerleri bir 14 $\alpha$ -hidroksil grubunun varlığını kanıtladı. Bütün bu sonuçlar metabolitin 14 $\alpha$ -hidroksiandrostendion (**16**) olduğunu gösterdi.

İkinci metabolit  $\delta_{\text{C}}$  83,33 ppm ve  $\delta_{\text{C}}$  78,52 ppm'de iki yeni hidroksil grubunun varlığını gösteren iki karbon atomu rezonansı verdi. Metabolit  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu çıkış maddesinin  $\delta_{\text{C}}$  220,43 ppm'deki rezonansını içermezken  $\delta_{\text{C}}$  78,52 ppm'de yeni

bir rezonans verdi. Bu yeni rezonans C-17'de indirgenme olduğunu ve yeni bir hidroksil grubu varlığını gösterdi. Metabolit  $^1\text{H}$  NMR spektrumunun  $\delta_{\text{H}}$  4.30 ppm'de verdiği rezonans (1H, t,  $J = 8,2$  Hz) bu hidroksil grubunun  $\beta$  pozisyonunda olduğunu ortaya koydu. Ayrıca metabolit  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu  $\delta_{\text{C}}$  83,33 ppm'de bir hidroksil grubu varlığına işaret eden yeni bir C atomu rezonansı gösterse de  $^1\text{H}$  NMR spektrumunda yeni bir proton sinyali gözlenmediğinden C-14'de tersiyer bir hidroksil grubunun bulunduğu düşünüldü. Metabolitin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu C-8 ve C-15 rezonansları için aşağı alana doğru kaymalar gösterirken (C-8 için  $\Delta\delta_{\text{C}}$  3,73 ppm ve C-15 için  $\Delta\delta_{\text{C}}$  4,36 ppm) C-7 ve C-16 rezonansları için ise yukarı alana doğru  $\gamma$ -gauche kaymaları (C-7 için  $\Delta\delta_{\text{C}}$  2,73 ppm ve C-16 için  $\Delta\delta_{\text{C}}$  6,24 ppm) gösterdi. Bu kayma değerleri bir  $14\alpha$ -hidroksil grubunun varlığını daha da doğruladı ve  $14\alpha$ -hidroksitestosteron (**18**) olduğunu gösterdi.

Tablo 5.1. Steroidlerin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu sinyalleri.

Karbon atomu	7	16	18
1	35,62	35,38	35,63
2	33,84	32,97	33,85
3	199,33	199,84	199,92
4	124,07	123,71	123,75
5	170,35	170,84	171,14
6	32,50	32,21	32,49
7	31,20	25,35	28,47
8	35,07	37,73	38,80
9	53,78	46,48	46,69
10	38,58	38,47	38,68
11	20,24	18,92	19,62
12	30,68	24,27	32,58
13	47,45	52,46	46,89
14	50,76	80,27	83,33
15	21,68	29,81	26,04
16	35,69	33,65	29,45
17	220,43	219,01	78,52
18	13,64	17,09	14,87
19	17,31	17,62	17,16

Androstendion (7) bileşiminin *M. hiemalis* MRC 70325 ile biyotransformasyonu, aynı bileşimin *M. piriformis* [17-19], *M. racemosus* [21] ve *M. griseo-cyanus* [22] küfleri ile biyotransformasyonlarındaki gibi ağırlıklı olarak 14 $\alpha$ -hidroksilasyonları ile sonuçlanmıştır. Buna rağmen M881 küfü ile androstendion (7) biyotransformasyonu ise 14 $\alpha$ -hidroksilasyonu haricindeki diğer hidroksilasyonlarla sonuçlanmıştır [20].

Androstendion (7) gibi bir 4-en-3-keto steroid olan testosteron (2) bileşiminin *M. hiemalis* MRC 70325 ile biyotransformasyonu da yine çoğunlukla C-14 $\alpha$  pozisyonunda hidroksillenmiş metabolitler vermiştir [27]. Bir diğer 4-en-3-keto steroid olan progesteron (5) bileşiminin *M. hiemalis* ile biyotransformasyonu da yine çoğunlukla C-14 $\alpha$  pozisyonunda hidroksillenmiş metabolitler vermiştir [25]. *M. hiemalis* MRC 70325 ile 4-en-3-keto steroidleri olmayan pregnenolon (4) ve dehidroepiandrosteron (9) bileşiklerinin biyotransformasyonları ise daha çok C-7 $\alpha$  pozisyonunda hidroksillenmiş metabolitler vermiştir [27]. Tüm bu sonuçlar androstendion (7), testosteron (2) ve progesteron (5) steroidlerinin A halkalarındaki 4-en-3-keto kısmının bu bileşikleri bir 14 $\alpha$ -hidroksilaz enziminin substratları olarak kabul edebilmesi için gereken muhtemel yapılardan biri olabileceğini düşündürmektedir [27].

Kısaca *M. hiemalis* MRC 70325 diğer çoğu *Mucor* türleri gibi A halkasında bir çift bağ içeren ve bir 4-en-3-keto steroidi olan androstendion (7) bileşimini ağırlıklı olarak 14 $\alpha$ -hidroksilasyonlarına uğrattı. *Mucor* ve diğer cinslere ait küfler ile fungal steroid biyotransformasyon çalışmalarımız sürmektedir.

## KAYNAKLAR

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

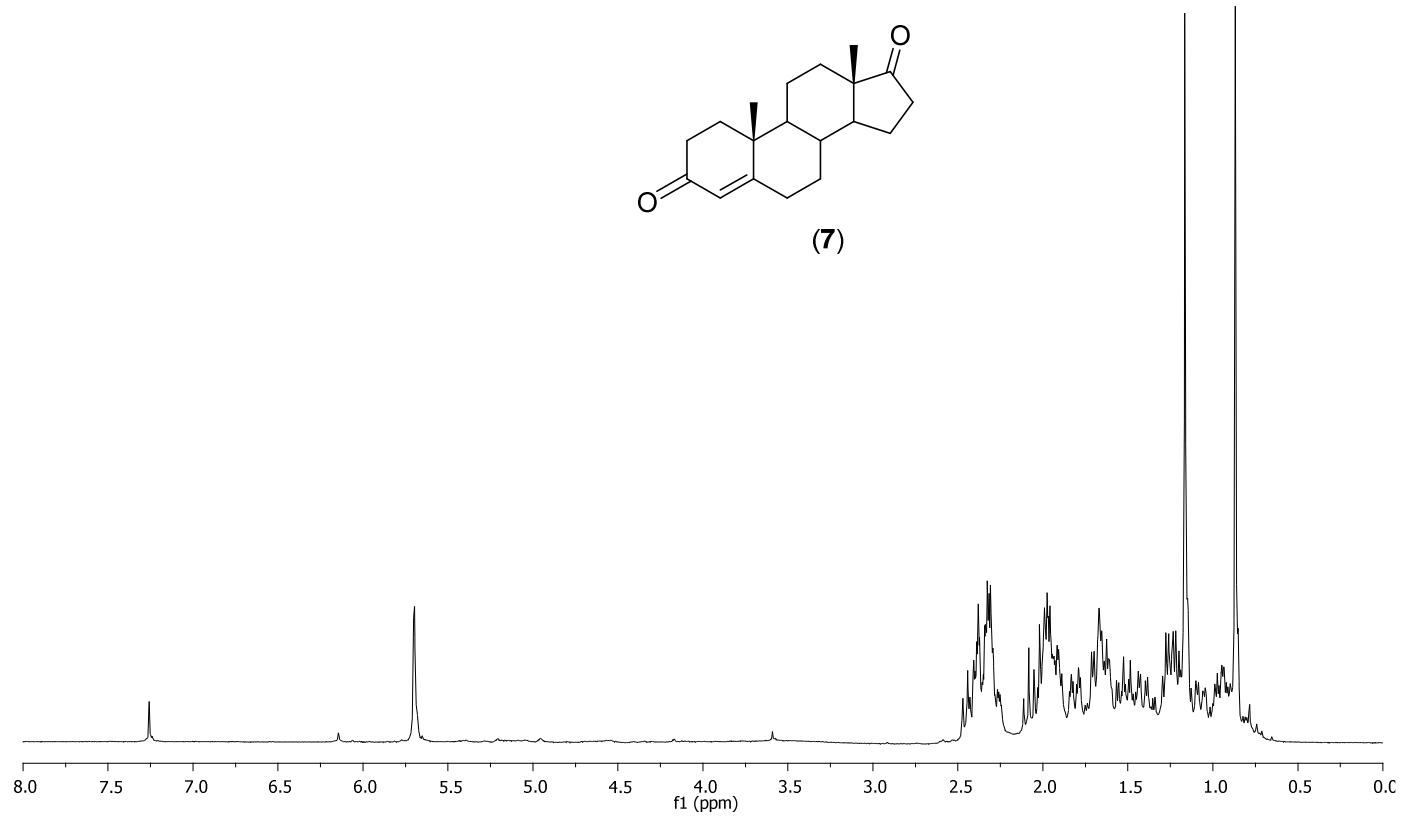
- [13] Mahato, S. B., Majumdar, I., Current Trends in Microbial Steroid Biotransformation, *Phytochemistry*, 34, 883-898, 1993.
- [14] Mahato, S. B., Banerjee, S., Podder, S., Steroid Transformations by Microorganisms-III, *Phytochemistry*, 28, 7-40, 1989.
- [15] Santiago, A. L. C. M., Motta, C. M. S., Isolation of Mucorales from Processed Maize (*Zea Mays* L.) and Screening for Protease Activity, *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 698-700, 2008.
- [16] Connolly, J. H., Stodart, B. J., Ashh, G. J., Genotypic Analysis of *Mucor* from the Platypus in Australia, *Journal of Wildlife Diseases*, 46, 55-69, 2010.
- [17] Madyastha, K. M., Novel Microbial Transformations of Steroids, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 405, 259-270, 1996.
- [18] Madyastha, K. M., Preparatively useful transformations of steroids and morphine alkaloids by *Mucor piriformis*, *Journal of Chemical Sciences*, 106, 1203-1212, 1994.
- [19] Krishnan, R., Madyastha, K. M., Seshadri, T. P., Viswamitra M. A., The identification of 14 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihydroxyandrost-4-en-3-one monohydrate and 14 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihydroxyandrosta-1,4-dien-3-one monohydrate, metabolites of androstenedione in *Mucor piriformis*, *Steroids*, 56, 440-445, 1991.
- [20] Kolet, S. P., Niloferjahan, S., Haldar, S., Gonnade, R., Thulasiram, H. V., Biocatalyst Mediated Production of 6 $\beta$ ,11 $\alpha$ -Dihydroxy Derivatives of 4-ene-3-one Steroids, *Steroids*, 78, 1152-1158, 2013.
- [23] Yazdi, M. T., Zarrini, G., Mohit, E., Faramarzi, M. A., Satayesh, N., Sedighi, N., Mohseni, A. F., *Mucor hiemalis*: a new Source for Uricase Production, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 325-330, 2006.
- [24] Vinche, M. H., Asachi, R., Zamani, A., Karimi, K., Ethanol and Chitosan Production from Wheat Hydrolysate by *Mucor hiemalis*, *J Chem Technol Biotechnol*, 88, 255-260, 2013.
- [25] Antoniou, T. N. H., Curran, B. P. G., Smith, K. E., Is mRNA Sequestration involved in the regulation of Progesterone 14 $\alpha$ -hydroxylase Cytochrome P-450 expression in *Mucor hiemalis*, *Microbiology*, 140, 1633-1640, 1994.
- [26] Lacroix, I., Biton, J., Azerad, R., Microbial Models of Drug Metabolism: Microbial Transformations of Trimegestone® (RU27987), a 3-Keto- $\Delta^{4,9(10)}$ -19-norsteroid Drug, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 7, 2329-2341, 1999.

- [27] Yildirim, K., Saran, H., Dolu, O. F., Kuru, A., Biotransformation of some steroids by *Mucor hiemalis* MRC 70325, *Journal of Chemical Research*, 37, 566–569, 2013.
- [28] Kolet, S. P., Haldar, S., Niloferjahan, S., Thulasiram, H. V., *Mucor hiemalis* mediated 14 $\alpha$ -hydroxylation on steroids: In vivo and in vitro investigations of 14 $\alpha$ -hydroxylase activity, *Steroids*, 85, 6–12, 2014.
- [29] Hanson, J.R., Nasir, H., Parvez, A., The Hydroxylation of Testosterone and Some Relatives by *Cephalosporium aphidicola*, *Phytochemistry*, 42, 411-415, 1996.

## EKLER

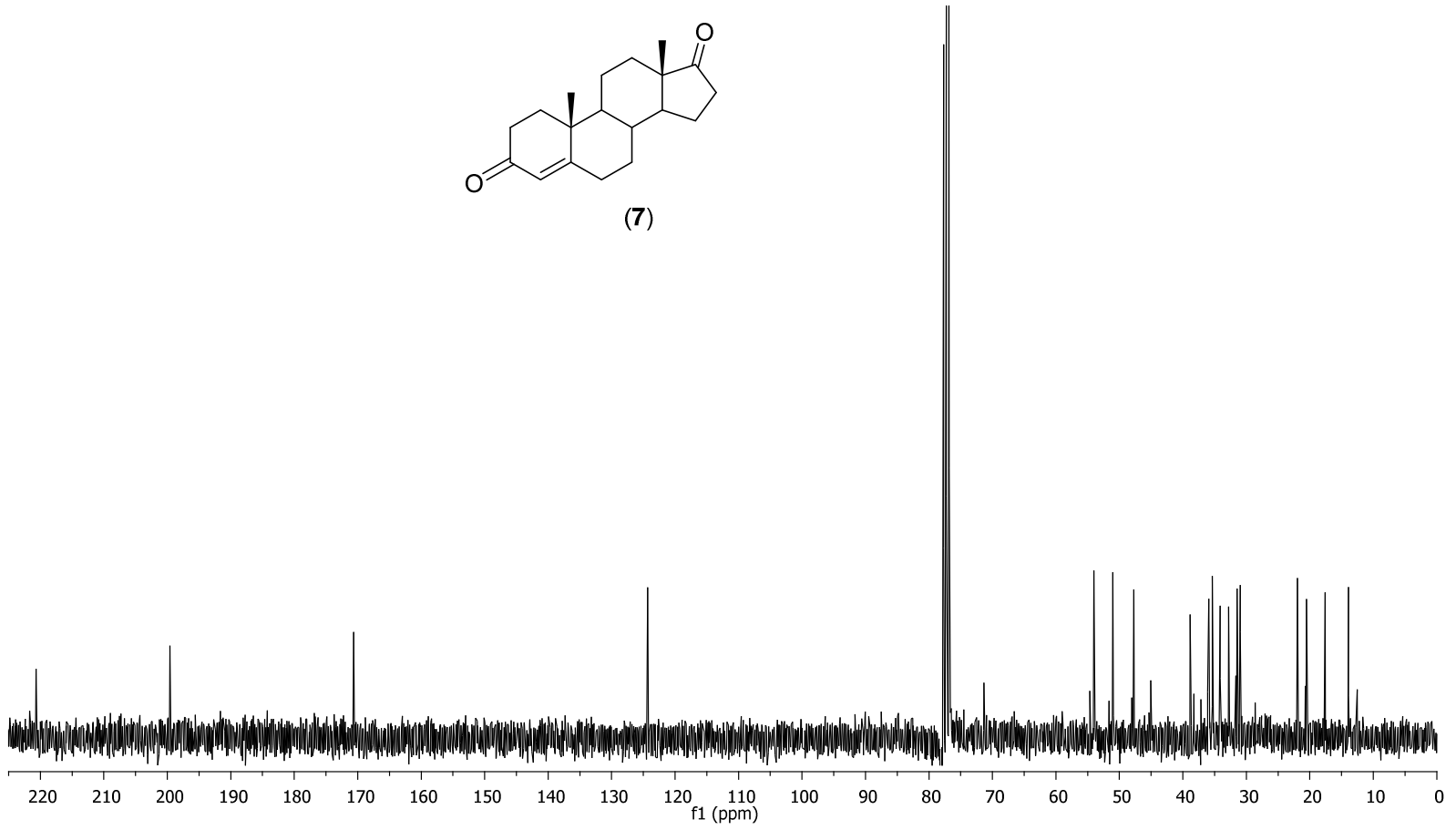
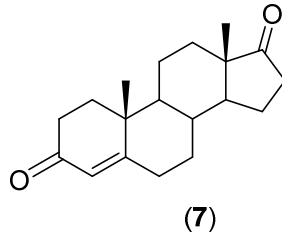
### EK A: Bileşiklerin NMR Spektrumları

PROTON



Şekil A.1. Androstendion (7) için <sup>1</sup>H NMR spektrumu

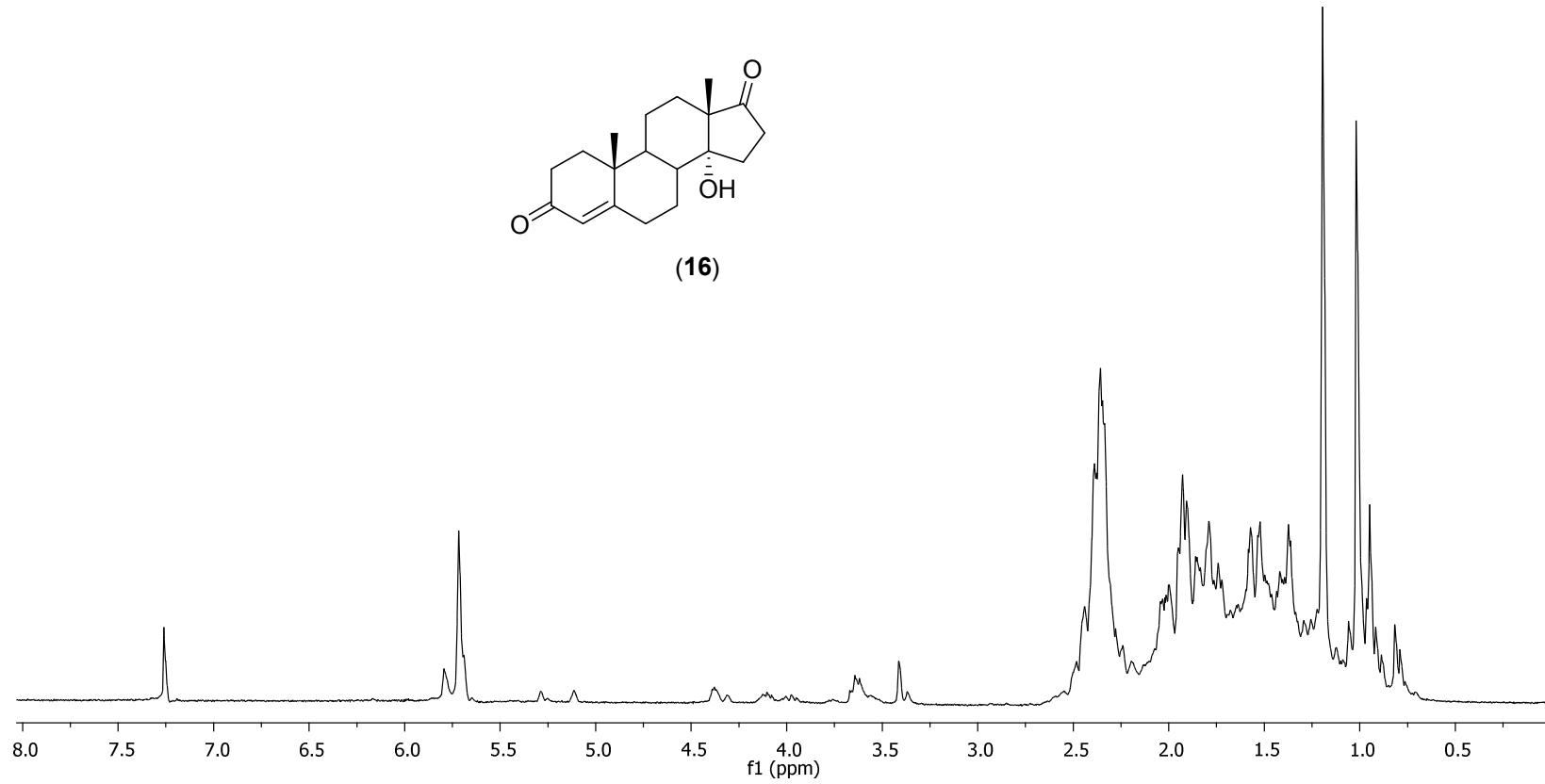
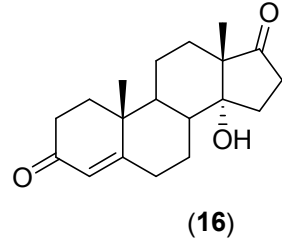
CARBON



Şekil A.2. Androstendion (7) için <sup>13</sup>C NMR spektrumu

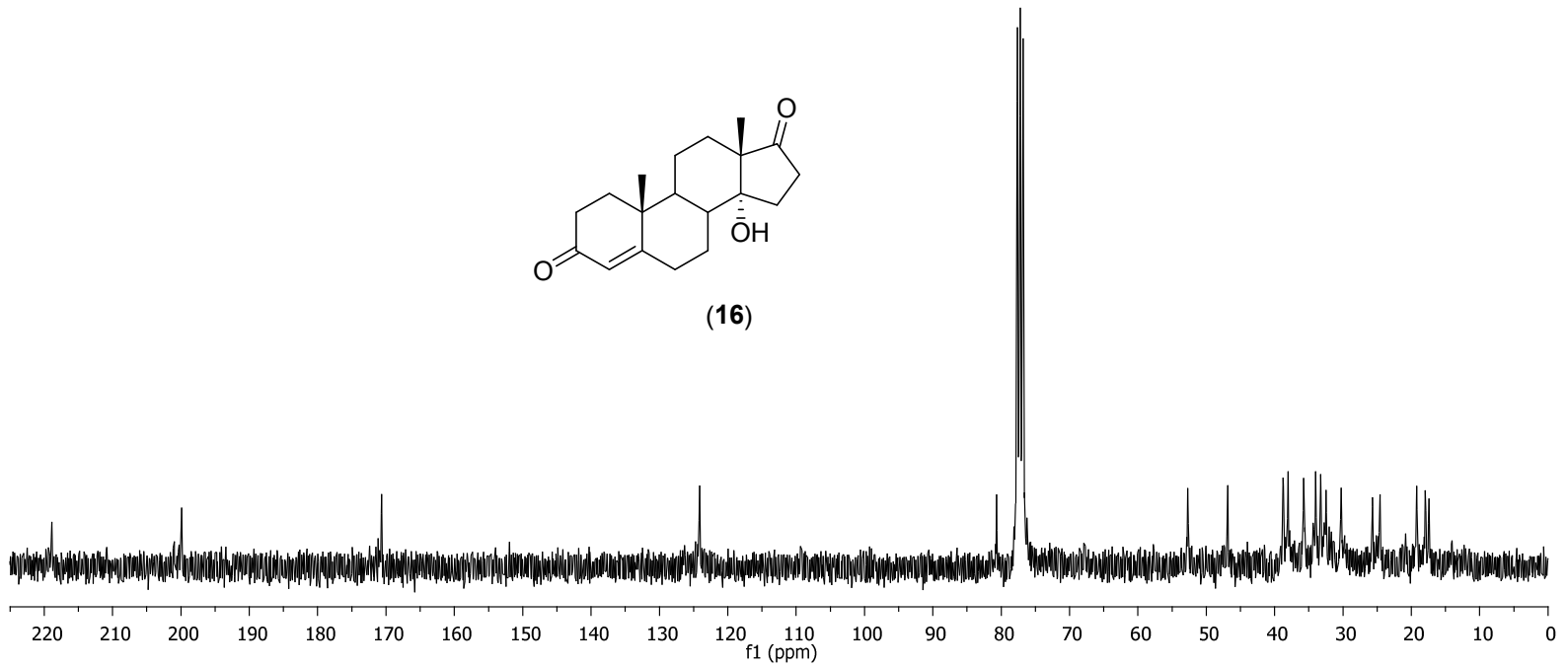


PROTON



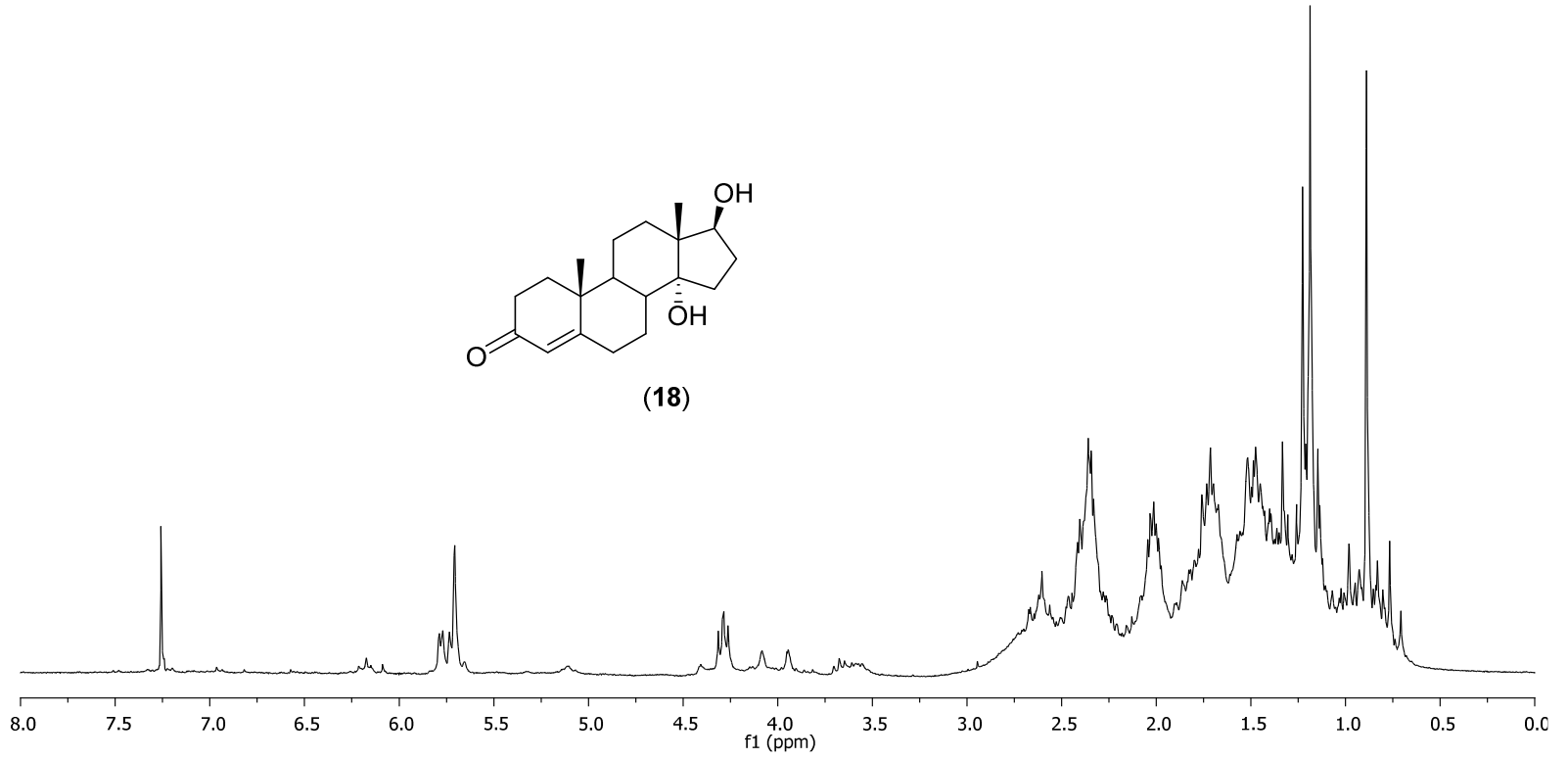
Şekil A.3. 14 $\alpha$ -Hidroksiandrostedion (16) için  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

CARBON



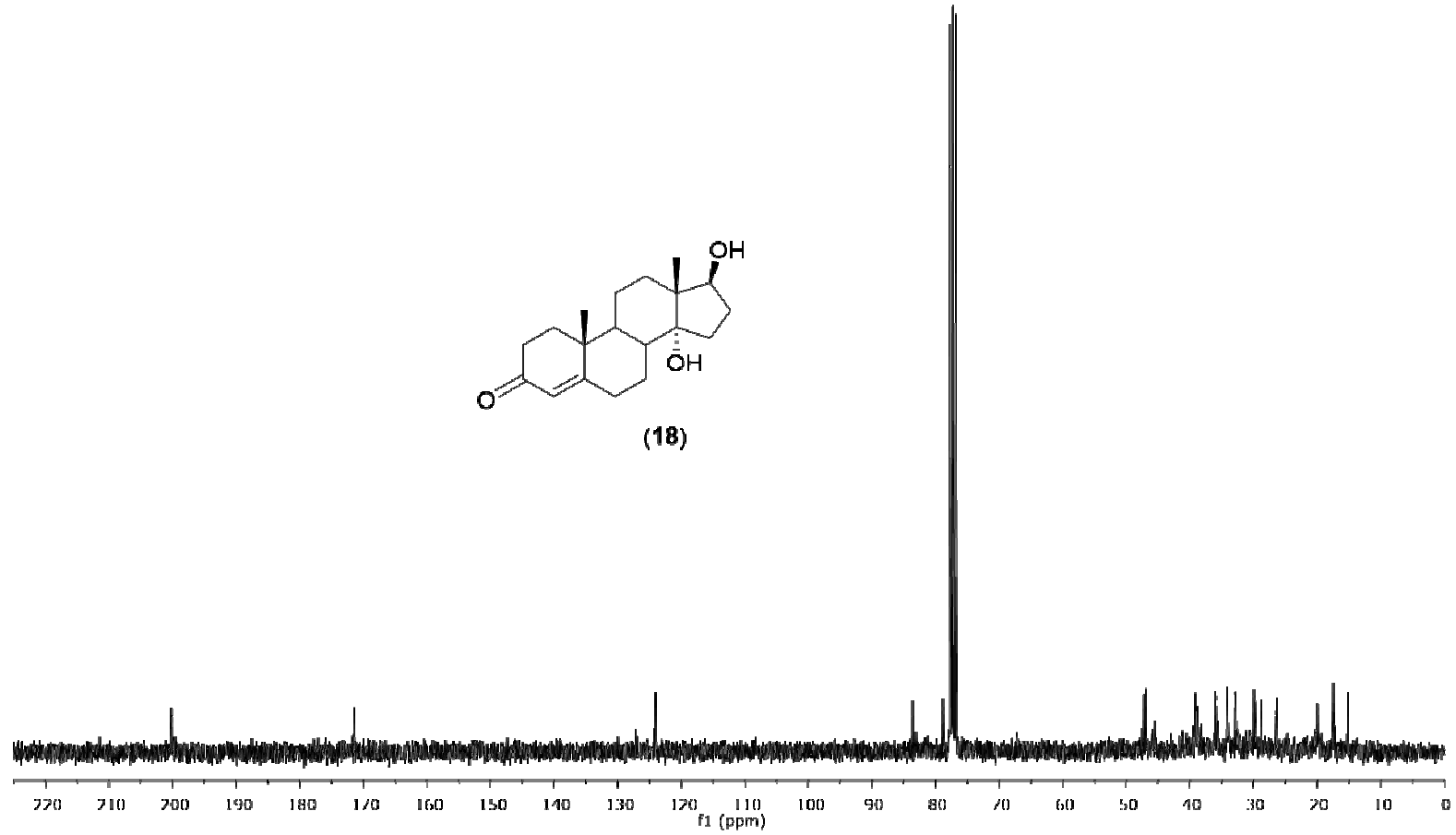
Şekil A.4. 14 $\alpha$ -Hidroksiandrostendion (**16**) için <sup>13</sup>C NMR spektrumu

PROTON



Şekil A.5. 14 $\alpha$ -Hidroksitestosteron (18) için <sup>1</sup>H NMR spektrumu

CARBON



Şekil A.6. 14 $\alpha$ -Hidroksitestosteron (18) için <sup>13</sup>C NMR spektrumu-Dihidroksiandrostan (25) için <sup>13</sup>C NMR spektrumu

## ÖZGEÇMİŞ

Neslihan Büküm, 1990 yılında Sakarya'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Sakarya'da tamamladı. 2008 yılında başladığı Erciyes Üniversitesi Kimya Bölümünü 2013 yılında bitirdi. Yüksek lisans öğrenimine 2013 yılında Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında başladı.

Meslek hayatına 2013 yılı Ocak ayında Sakarya'da Toprak İlaç ve Kimyevi Maddeler San. ve Tic. A.Ş. şirketinde kalite kontrol analisti olarak başladı. Buradaki görevine Dokuz ay kadar devam etti. Daha sonra 2014 yılı Eylül ayında üniversitenin Erasmus programı dahilinde Çek Cumhuriyeti'nde Hradec Králové Üniversite Hastanesi Biyomedikal Araştırma Merkezi'nde Stajyer olarak 10 ayını geçirdi. 2016 yılı Şubat ayında Sırma Grup İçecek San. ve Tic. A.Ş şirketinde Kalite Sorumlusu olarak başladı. İşinden 2016 yılı Aralık ayında ayrıldı. O tarih itibariyle kişisel eğitimine ağırlık vermiş olup halen gelişimine devam etmektedir.