

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANDROSTENDİON BİLEŞİĞİNİN *ASPERGILLUS GLAUCUS*
KÜFÜ İLE BİYOTRANSFORMASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nur RZAYEVA

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

TEMMUZ 2023

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANDROSTENDİON BİLEŞİĞİNİN *ASPERGILLUS GLAUCUS*
KÜFÜ İLE BİYOTRANSFORMASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nur RZAYEVA

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kudret YILDIRIM

TEMMUZ 2023

Nur Rzayeva tarafından hazırlanan “ANDROSTENDİON 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 “ANDROSTENDİON 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 alındığını, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun ortaya çıkması halinde doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi beyan ederim.

07/07/2023

Nur Rzayeva



TEŞEKKÜR

Çalışmayı büyük bir titizlik ve sabırla yöneten, çalışma boyunca desteğini bir an bile esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım kıymetli hocam Prof. Dr. Kudret YILDIRIM'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans öğrenimim boyunca ihtiyacım olan her konuda bana destek olan Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyelerine ve araştırma görevlilerine, laboratuvar arkadaşlarıma, Arş. Gör. Dr. Ali KURU'ya teşekkürlerimi sunarım.

Bu günlere gelmemde büyük payı olan, yaşamım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve koşulsuz yanımda olan anneme ve kardeşlerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bu çalışmayı maddi olarak destekleyen Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyon Başkanlığına (Proje No: 2022-7-24-154) teşekkürlerimi sunarım.

Nur Rzayeva



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.ASPERGILLUS TÜRLERİ İLE ANDROSTENDİON BİYOTRANSFORMASYONLARI.....	3
2.1. Androstendion	3
2.2. Küfler ile Steroid Biyotransformasyonları	7
2.3. <i>Aspergillus</i> türleri ile androstendion biyotransformasyonları	7
2.4. Çalışmanın Amacı	11
3. MATERYAL VE METOT	13
3.1. Genel Bilgiler	13
3.2. Yatık Ağar Besiyeri Hazırlanışı	14
3.3. Küf Kültürlerinin Hazırlanışı ve Tazelenmesi	14
3.4. Küf Besiyerinin Hazırlanışı	14
3.5. Biyotransformasyon Deneyi	14
3.6. Metabolitlerin Saflaştırılması ve Yapılarının Tayini	15
4. DENEYSEL BULGULAR.....	17
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	19
KAYNAKLAR	23
EKLER.....	27
ÖZGEÇMİŞ	35

KISALTMALAR

^{13}C NMR	: Karbon 13 Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
DMF	: Dimetilformamid
^1H NMR	: Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
IR	: Infrared (kızılötesi)
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
lit.	: Literatür
PDA	: Potato dekstroz agar
ppm	: Milyonda bir kısım
rpm	: Dakika başına dönüş sayısı
UV	: Ultraviyole (morötesi)



SİMGELER

bs	: Geniş tekli (broad singlet) sinyal
°C	: Santigrat derece
cm	: Santimetre
Δ	: Kimyasal kayma farkı
δ_C	: ^{13}C NMR spektrumundaki kimyasal kayma
δ_H	: ^1H NMR spektrumundaki kimyasal kayma
g	: Gram
Hz	: Hertz
<i>J</i>	: Etkileşme sabiti
lit.	: Literatür
m	: Çoklu (multiplet) sinyal
mg	: Miligram
MHz	: Megahertz
mL	: Mililitre
pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonunun eksi logaritması
s	: Tekli (singlet) sinyal



TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 4.1. Steroidlere ait ^{13}C NMR kimyasal kayma bilgileri	18
Tablo 5.1. Steroidlerin ^{13}C NMR kimyasal kayma bilgileri.....	20
Tablo 5.2. Metabolit verimleri.....	20





ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. Siklopentanoperhidrofenantren halkası	4
Şekil 2.2. Bazı androjen ve östrojenlerin biyosentezleri.....	6
Şekil 2.3. <i>A. candidus</i> MRC 200634 ile inkübasyon.....	8
Şekil 2.4. <i>A. wentii</i> MRC 200316 ile inkübasyon.....	8
Şekil 2.5. <i>A. tamarii</i> MRC 72400 ile inkübasyon.....	9
Şekil 2.6. <i>A. tamarii</i> QM 1223 ile inkübasyon	9
Şekil 2.7. <i>A. niger</i> ATCC 9142 ile inkübasyon	9
Şekil 2.8. <i>A. niger</i> NRRL 599 ile inkübasyon	10
Şekil 2.9. <i>A. terreus</i> PTCC 5283 ile inkübasyon	10
Şekil 2.10. <i>A. fumigatus</i> izolatu ile inkübasyon.....	10
Şekil 2.11. <i>A. oryzae</i> ATCC 11601 ile inkübasyon	11
Şekil 4.1. Substrata ait karbon iskeleti	17
Şekil 4.2. <i>A. glaucus</i> MRC 200914 ile inkübasyon	17
Şekil 5.1. <i>A. glaucus</i> MRC 200914 ile inkübasyon	19



ANDROSTENDİON BİLEŞİĞİNİN *ASPERGILLUS GLAUCUS* KÜFÜ İLE BİYOTRANSFORMASYONU

ÖZET

Canlılardaki büyüme ve gelişme ile ilgili doğrudan fonksiyonu olmayan doğal ürünler genelde kendilerini içeren canlılara çok daha iyi hayat şartları sağlarlar. Doğal ürünler özellikle diğer canlılardaki etkileri nedeni ile daha fazla dikkat çekerler. Bu bileşikler çok farklı yapıya sahip ve fazla sayıda olmalarda genellikle biyosentezlerindeki bazı benzerlikler nedeni ile terpenler, alkaloidler, steroidler, fenolik bileşikler, özelleşmiş karbohidratlar, özelleşmiş peptidler, poliketidler, yağ asitleri ve yağ asitleri türevleri olarak sınıflandırılırlar. Steroidler doğal ürünlerin önemli bir sınıfıdır. Hayvan ve insan membranlarındaki akışkanlık düzenleyen kolesterol bileşiği en önemli ve en çok bilinen steroidlerden biridir. Kolesterol bileşiği D₃ vitamini, safra asitleri, ve steroid hormonlar gibi önemli fonksiyonlara sahip bazı bileşiklerin başlangıç maddesidir. Kolesterol türevi olan steroid hormonlar progestagenler (progestinler), östrojenler, androjenler, mineralokortikoidler ve glukokortikoidler olmak üzere 5 ayrı grup altında sınıflandırılır. Omurgalı erkek bireylerinde etkili steroid hormonlar olan androjenlere örnek olarak testosteron, dihidrotestosteron ve androstendion (5) bileşikler verilebilir. Zayıf bir androjen olan androstendion (5) androjen metabolizmasındaki önemli bir metabolittir.

Enzimlerin yada enzimleri içeren mikroorganizmaların, mikroorganizma sporlarının, mikrozomların, hücre, doku ve organ kültürleri gibi biyolojik sistemlerinin kendi substratları olmayan kimyasal maddelerdeki değişimlere biyotransformasyonlar denir. Mikroorganizmalar kullanılarak uygulanan mikrobiyal biyotransformasyonlarda genelde küfler, mikrobiyal algler, mayalar ve bakteriler kullanılır. Günümüzde hormonlar ve ilaçlar gibi çoğu önemli kimyasal maddelerin üretimi genelde mikrobiyal biyotransformasyonlar ile yapılmaktadır.

Bu çalışma androstendion (5) bileşiğinin *Aspergillus glaucus* MRC 200914 küfö ile biyotransformasyonu gerçekleştirildi. Küfe ait besiyeri hazırlandıktan sonra erlenlere dağıtılıp otoklavda sterilize edildi. *A. glaucus* MRC 200914 küfö erlenlere steril şartlarda ilave edildi ve bu erlenler 3 gün inkübasyona bırakıldı. Androstendion (5) bileşiğinin steril şartlarda ilave edildiği erlenler 5 gün daha inkübe edildi. İnkübasyonu takiben filtre edilen besiyerindeki steroidler etil asetat ile ekstrakte edildi. Etil asetat ekstraktların evaporatörde uçurulması ile oluşan kalıntıdaki steroidler bir kolon kromatografisi çalışması ile safalaştırıldı. Erime noktaları tayini, NMR ve IR spektroskopisi gibi yapı yöntemler kullanılarak *A. glaucus* MRC 200914 ile substratın inkübasyonunun 11 α -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (13) ve 6 β -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (18) metabolitleri ile sonuçlandığı tespit edildi.



BIOTRANSFORMATION OF ANDROSTENEDIONE BY *ASPERGILLUS GLAUCUS*

SUMMARY

During their lives, all organisms expose to various chemical substances which are not their natural substrates, and these substances are called xenobiotics. The chemical changes which enzymes or enzymes in biological systems such as microorganisms spores of microorganism, microsomes, cell, tissue and organ cultures take place on xenobiotics are called biotransformations.

Biotransformations by microorganisms are known as microbial biotransformations. Nowadays, microorganisms have generally used for biotransformations due to many important advantages of microbial biotransformations such as being environmentally friendly, shorter time, cheaper and can be carried out in various environments from the flask to the factory fermenter. Microorganisms can be applied free or immobilised on suitable surfaces for microbial biotransformations. Microbial biotransformations are mostly carried out with microorganisms such as molds, microbial algae, yeasts and bacteria. Molds and bacteria, with their non-specific enzymes, can perform many different chemical changes in many natural or synthetic substrates. The microbial hydroxylation reaction is one of the most important microbial biotransformation reactions is the microbial hydroxylation reaction. The microbial hydroxylation reaction was first noticed in the synthesis of some corticosteroids as drugs in 1952. In this work it was a very long and expensive process to add an oxygen function in a position far away from the functional groups via classical chemical methods. This problem was eliminated by a hydroxylation via the mold *Rhizopus arrhizus* at the mentioned position. This achievement directed all attention to microbial biotransformations. After this biotransformations of many different groups of chemicals have been performed by many different types of microorganisms.

Organic compounds in organisms that are not directly involved in their growth and development are called secondary metabolites or natural products. Natural products generally gives better life conditions for the organisms in which they are found. Natural products attract a lot of attention, especially due to their effects on other organisms. Although natural products are found all organisms, they are more commonly observed in plants, microorganisms, fungi and insects. There are a lot of different natural products which have many different structures. Natural products 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 important natural products. Steroids with a 3 β -hydroxyl hydroxyl group and aliphatic side chains in the ring D are known as sterols. Ergosterol, stigmasterol and cholesterol are the most common and best known sterols.

Cholesterol 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 D₃ and steroid hormones.

Steroid hormones contain glucocorticoids, mineralocorticoids, progestagens (progestins), estrogens and androgens. Glucocorticoids and mineralocorticoids are known as corticosteroids, although androgens, estrogens and progestagens are named as sex hormones.

Sex hormones 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 metabolism. Progesterone is a natural steroid hormone and a precursor for other steroid hormones in mammals. Androgens are sex hormones that are active in male vertebrates whereas estrogens are those that active in female vertebrates. Estrogens are produced from androgens. The main site of synthesis of androgens in the body is the testes and some of these hormones are also released from the adrenal cortex. Biosynthesis of androgens in the adrenal cortex and testes takes place in two different pathways. The Δ^4 pathway is the main pathway for androgen biosynthesis. In this pathway, the cholesterol is converted in to pregnenolone and then progesterone. Progesterone is converted to 17 α -hydroxyprogesterone and the enzymatic cleavage of the side chain of 17 α -hydroxyprogesterone gives androstenedione (5). Testosterone can be synthesized by the reduction of androstenedione (5) at C-17. Testosterone is then converted to dihydrotestosterone by a 5 α -reductase activity. The Δ^5 pathway is a side pathway. In this pathway, pregnenolone derived from the cholesterol compound is converted into 17 α -hydroxypregnenolone and then dehydroepiandrosterone (DHEA) is formed. Dehydroepiandrosterone can be converted to androstenedione (5) and then oxidised to testosterone. Androstenedione (5) is the common end product of for both the Δ^4 pathway and the Δ^5 pathway in the biosynthesis of androgens.

Androstenedione (5) is a weak androgen and a vital metabolite in the metabolism of sex hormones. It is also an important starting material in the production of many important chemicals such as androgens, anabolic drugs and spironolactone.

Aspergillus species are particularly important because of the mycotoxins they secrete, the pathogenicities they cause, their contribution to basic eukaryotic genetics and biotechnology. While most *Aspergillus* species live in water, soil and decaying materials, some *Aspergillus* species are considered 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, androstenedione (5) was incubated with *Aspergillus glaucus* MRC 200914 in order to see how this fungus metabolises the substrate. The medium was prepared for the fungus in 1 L of distilled water and then distributed into 10 erlenmeyer flasks of 250 mL. The medium in flasks was sterilized by an autoclave. These flasks were then inoculated by the fungus and incubated for 3 days at 25 °C on a shaker. The substrate in DMF was added aseptically into these flasks. All flasks were further incubated for 5 days. After incubation, the mycellium was then separated from the broth by filtration. The mycellium was rinsed with ethyl acetate

and the broth was then extracted with ethyl acetate. All extracts were dried over sodium sulfate anhydrous and evaporated *in vacuo* to give a brown gum. This gum was then chromatographed on silica gel 60. 11 α -hydroxyandrost-4-en-3,17-dione (**13**) ve 6 β -hydroxyandrost-4-en-3,17-dione (**18**) 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

Hayatları boyunca canlılar çevrelerinde mevcut olan birçok yabancı madde ile karşılaşır. Enzimler yada enzimleri içeren biyolojik sistemlerin kendilerine yabancı olan farklı kimyasal maddelerde çeşitli kimyasal değişimler gerçekleştirebilirler. Söz konusu bu geçişimlere biyotransformasyonlar adı verilir. Çok eski zamanlardan beri bilinen ve aynı zamanda en iyi tanınan biyotransformasyonlardan iki tanesi etanolün bakteriler ile asetik aside oksidasyonu ve şekerlerin bira mayası ile etanole çevrilmesidir [1, 2].

Mikroorganizmalar ile hayata geçirilen biyotransformasyonların çevre dostu olmaları, daha kısa zamanda ve daha ucuza gerçekleştirilmeleri, erlenlerden fabrika fermentörlerine kadar çeşitli ortamlarda uygulanabilmeleri gibi sebeplerden dolayı normalde biyotransformasyonlar çoğu zaman mikroorganizmalar ile uygulanmaktadır. Mikrobiyal biyotransformasyon çalışmalarında mikroorganizmalar serbest olarak veya belli bir yüzeye sabitlenmiş olarak kullanılabilir. Mikroorganizma olarak genellikle mayalar, küfler, bakteriler ve mikrobiyal algler kullanılır [3].

Bilhassa küfler ve bakteriler gibi mikroorganizmalar, geniş spektrumlu enzimleri ile hem tabii hem de sentetik çok sayıda substrat üzerinde birçok değişik kimyasal reaksiyonları katalizleyebilirler. Mikrobiyal biyotransformasyonlar çok sayıda farklı biyotransformasyon reaksiyonlarını gerçekleştiren sitokrom P-450 enzimlerince katalizlenebilir. Mikrobiyal hidroksilasyon (hidroksillenme) mikrobiyal biyotransformasyonların en yaygın ve bilinenidir [1,2].

Mikrobiyal hidroksillenmenin ehemiyeti ilk olarak 1952 yılında farkedilmiştir. O yıllarda ilaç olarak kullanılacak kortikosteroidlerin sentezinde herhangi bir fonksiyonel grubun uzağındaki C-11 pozisyonuna bir oksijen fonksiyonunu eklemek mevcut yöntemler ile olabildiğince çok zaman alan ve pahalı bir prosedürdü. Bu meselenin *Rhizopus arrhizus* küfünün çalışmada kullanılan steroidi C-11 α

pozisyonundaki bir hidroksillenme ile halledilmesi mikrobiyal biyotransformasyonları bilim insanlarının dikkatinin merkezine getirmiştir [1, 4].

Mikrobiyal hidroksillenmenin ehemmiyetinin anlaşılmasından sonra çok sayıda farklı kimyasal grublara ait substratlar üzerinde farklı mikroorganizmalar ile biyotransformasyon reaksiyonları hayata geçirilmiştir. Günümüzde özellikle hormonlar ve ilaçlar gibi önemli kimyasal maddelerin üretiminde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu hedef doğrultusunda çok fazla sayıda farklı kimyasal substrat özellikle değişik küf türleri ile biyotransformasyonlara maruz kalmaktadır [3,5].



2. *ASPERGILLUS* TÜRLERİ İLE ANDROSTENDİON BİYOTRANSFORMASYONLARI

2.1. Androstendion

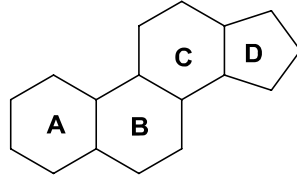
Canlılardaki organik bileşikler genelde üç farklı grupta incelenmektedirler. İlk grupta tüm canlıların büyüme ve gelişmelerine doğrudan etki eden primer (birincil) metabolizmanın elamanları olan ve primer metabolitler olarak adlandırılan amino asitler ve monosakkaritler gibi bileşikler vardır. İkinci grupta ise proteinler , selüloz ve ligninler gibi yüksek molekül ağırlıklı moleküller (biyopolimerler) vardır. Son grupta ise canlıların büyüme ve gelişmeleri açısından doğrudan etki göstermyen sekonder (ikincil) metabolizmanın elemanları olan sekonder metabolitler vardır. Bu son gruptaki bileşikler ayrıca doğal ürünler olarak da bilinir. Doğal ürünler her ne kadar canlıların gelişme ve büyümelerinde doğrudan görev almazsa da genelde kendilerini içeren canlılara bir takım avantajlar sağlarlar. Buna ilaveten doğal ürünler genelde diğer canlılardaki etkileri ile dikkat çeken bileşiklerdir. Doğal ürünler her canlı grubunda bulunsalar da genelde mikroorganizmalarda, mantarlarda, bitkilerde ve böceklerde daha çok gözlenirler [6-8].

Doğal ürünler birbirine göre farklı yapılara sahip ve çok sayıda olsalar da genellikle biyosentezlerindeki bazı benzerlikler nedeni ile terpenler, alkaloidler, steroidler, fenolik bileşikler, özelleşmiş karbohidratlar, özelleşmiş peptidler, poliketidler, yağ asitleri ve yağ asitleri türevleri gruplara ayrılırlar [6-8].

Steroidler doğal ürünlerin en önemli ve bilinen gruplarından birisidir. Steroid terimi Latince katı anlamına gelen “steros” sözcüğünden türemiştir. Steroidler siklopentanoperhidrofenantren veya steran olarak adlandırılan bir halka içerirler. Steroidlerin yapıları birbirleriyle kaynaşmış A, B ve C olarak adlandırılan üç adet sikloheksan halkası ve D olarak adlandırılan bir adet siklopentan halkasından oluşur (Şekil 2.1). Birçok steroidin yapısında molekül düzleminin üzerinde bulunan iki adet metil grubu içerir. Steroidlerin çoğu genellikle A halkasındaki C-3 pozisyonunda bir oksijen fonksiyonu (bir hidroksil veya karbonil grubu) taşıırken D halkasındaki C-17

pozisyonunda ise bir oksijen fonksiyonu veya bir yan zincir taşır. Bazı steroidler ise A veya B halkalarında çift bağlar taşır [9].

Bünyelerinde 3 β -hidroksil hidroksil grubu ve D halkalarına bağlı farklı yapı ve uzunlukta alifatik yan zincirler taşıyan steroidler steroller olarak bilinir. Mantarlarda gözlenen ergosterol, bitkilerde gözlenen stigmasterol ile hayvanlar ve insanlarda gözlenen kolesterol (1) en çok ve en iyi bilinen sterol örnek leridirler [9-10].



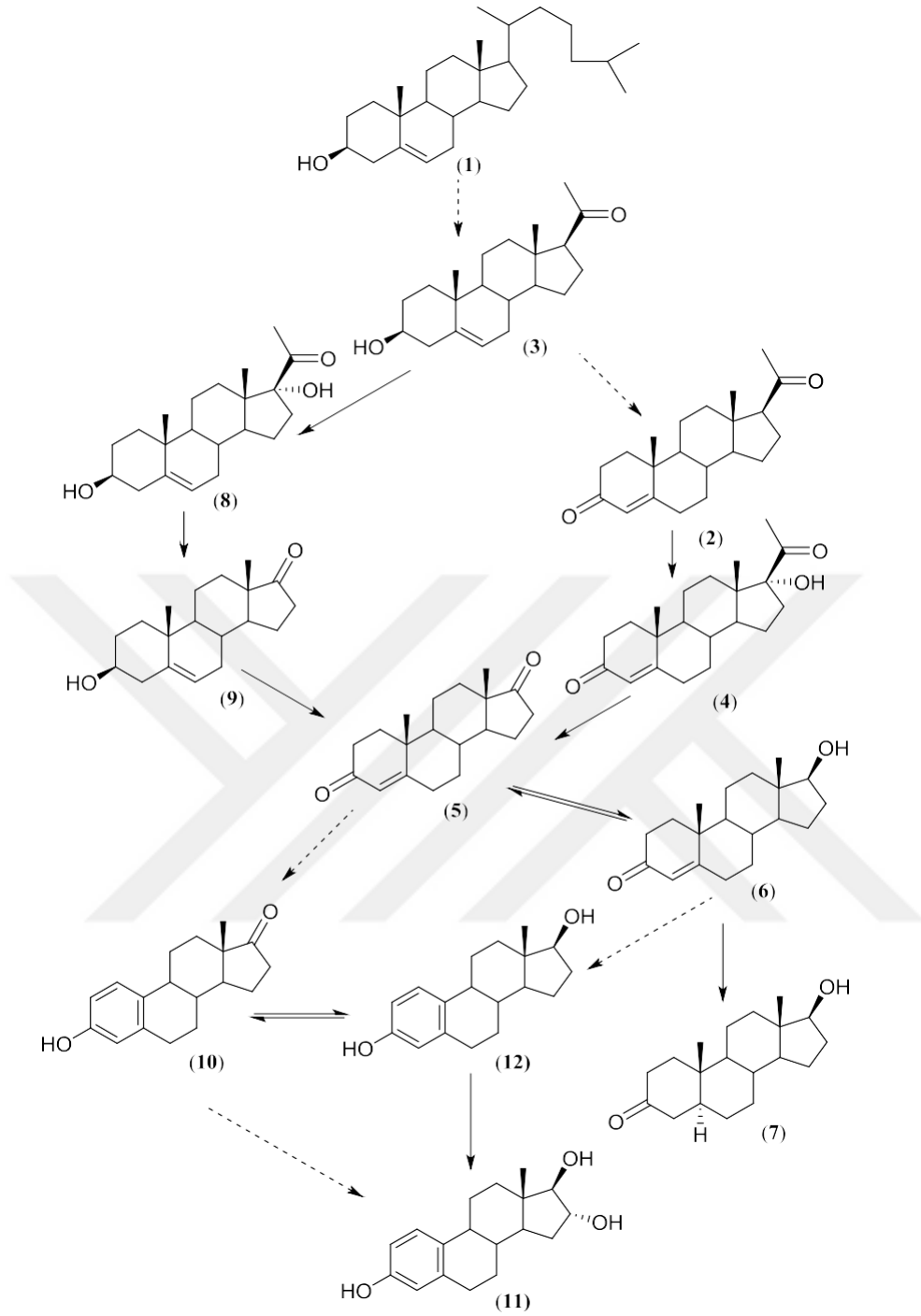
Şekil 2.1. Siklopentanoperhidrofenantren halkası.

Kolesterol (1) hayvan ve insan membranlarındaki akışkanlığını düzenleyici önemli bir moleküldür. Kolesterol (1) bileşiğinin biyosentezi oldukça uzun ve karmaşıktır ve 3 aşamada incelenebilir. Birinci aşamada önce 3 adet asetil koenzim A bileşiğinden mevalonat sentezlenir ve bu bileşik daha sonra izopentenil difosfat olarak da bilinen izopentenil pirofosfata çevrilir. İkinci aşamada ise önce izopentenil pirofosfat bileşiği dimetilallil pirofosfata izomerleşir. Dimetilallil pirofosfatın bir izopentenil pirofosfat ile kondenzasyonu neticesinde bir adet geranil pirofosfat oluşur. Oluşan geranil pirofosfatın bir diğer izopentenil pirofosfat ile kondenzasyonu neticesinde ise bir adet farnesil pirofosfat oluşur. Farnesil pirofosfatın bir indirgenme reaksiyonu gerçekleşen kondenzasyonu neticesinde bir triterpen ve diğer triterpenlerin çıkış maddesi olan skualen oluşur. Son aşamada ise önce skualenin epoksidasyonu ile skualen epoksit oluşur ve bu bileşiğin daha sonraki halkalaşması neticesinde ilk halkalı bileşik olarak lanosterol oluşur. Lanosterol ise 19 reaksiyon üzerinden kolesterol bileşiğine dönüştürülür [9-10].

Kolesterol (1) safra asitleri, D₃ vitamini, ve steroid hormonlar gibi önemli bazı bileşiklerin çıkış maddesidir. Kolesterol (1) bileşiğinden türeyen safra asitleri hem hidrofobik hemde hidrofilik yapılarından dolayı lipidlerin ince bağırsaktaki sindirim ve emiliminde önemli roller oynarlar. Safra asitleri safra kesesinde taş oluşumunun engellenmesinde de önemlidir ve vücuttaki kolesterol (1) fazlası safra asitleri sayesinde uzaklaştırılır [9-10].

D₃ vitamini kolesterol (1) bileşiğinin biyosentezindeki bir önceki ara madde olan 7-dehidrokolesterol bileşiğinin deri altında güneş kökenli UV ışınları ile B halkasından parçalanmasından sonra kendiliğinden izomerleşmesi ile ortaya çıkar. D₃ vitamini karaciğer ve böbrekteki birer hidroksillenme neticesinde kalsitriol hormonuna çevirilir. Kalsitriol hormonu ise kalsitonin ve parathormon hormonları ile beraber kalsiyum ve fosfor metabolizmasının düzenlenmesinde görev alır [9-10].

Steroid hormonlar glukokortikoidler, mineralokortikoidler, progestagenler (progestinler), östrojenler ve androjenler olarak 5 ayrı grupta incelenirler. Glukokortikoidlerin en önemli temsilcisi olan kortizol hormonudur ve glukokortikoidler karbohidrat, lipid ve protein metabolizması üzerinde etkilidirler. Ayrıca glukokortikoidler iltihap gidericilik ve bağışıklık baskılayıcılık gibi önemli özelliklere de sahiptirler. Mineralokortikoidlerin en önemli temsilcisi aldosteron hormonudur ve mineralokortikoidler su ve mineral metabolizmasının düzenlenmesinde görev yaparlar. Progestagenler, androjenler ve östrojenler cinsiyet hormonları olarak da adlandırılır. Cinsiyet hormonlarının asıl fonksiyonları üreme organlarının gelişme ve büyümelerinin, ikincil eşey karakterlerinin ve üreme döngüsünün düzenlenmesidir. Progesteron (2) progestagenlerin en yaygın ve etkin temsilcisidir. Progesteron (2) hem doğal bir steroid hormon hemde memelilerdeki diğer steroid hormonların kendisinden sentezlendiği bir ara bileşiktir. Progesteron (2) insanlarda endometriyumun gebeliğe hazırlanmasında görev alır. Hamilelik başlangıcında progesteron (2) salınması yeni bir üreme döngüsünün başlaması engelleyerek anne ve anne karnında gelişen ceninin korunmasını sağlar. Androjenler omurgalı erkek bireylerinde etkili olurken östrojenler ise omurgalı dişi bireylerinde etkili olurlar. Androjenler kendilerinden östrojenlerin sentezlendiği çıkış maddeleridirler. Androjenlerin vücutta daha çok erbezlerinde (testis) ve olsa da adrenal kortekste sentezlenmektedir. Androjenlerin biyosentezi Δ^4 yolu veya Δ^5 yolu olmak üzere iki ayrı yol ile (Şekil 2.2.) gerçekleşmektedir [9-10].



Şekil 2.2. Bazı androjen ve östrojenlerin biyosentezleri.

Androjen biyosentezi için ana yol Δ^4 yoludur ve bu yolda yan zinciri uzaklaştırılan kolesterol (1) önce pregnenolon (3) bileşiğine dönüştürülür. Daha sonra pregnenolon (3) bileşiğinden progesteron (2) bileşiği oluşturulur. Progesteron (2) önce 17 α -hidroksiprogesteron bileşiğine (4) dönüştürülür ve bu bileşikten daha sonra androst-4-en-3,17-dion olarak da bilinen androstendion (5) bileşiğine oluşturulur. Androstendion (5) bileşiği C-17'deki bir redüksiyon ile testosteron (6) bileşiğine

dönüştürülür. Testosteron (6) bileşiği yapısındaki çift bağın redüksiyonu ile dihidrotestosteron (7) bileşiğine dönüştürülür. Dihidrotestosteron (7) bileşiği testosteron (6) bileşiğinden çok fazla etkin bir androjendir. Tali bir yol olan Δ^5 yolunda kolesterol (1) bileşiği pregnenolon (3) bileşiğine çevrildikten sonra 17 α -hidroksipregnenolon (8) bileşiği sentezlenir. 17 α -Hidroksipregnenolon (8) bileşiği ise DHEA olarak da adlandırılan dehidroepiandrosteron (9) bileşiğine dönüştürülür. Dehidroepiandrosteron (9) androstendion (5) üzerinden testosteron (6) bileşiğine dönüştürülebilmektedir. Şekil 2.2.'dende net bir şekilde anlaşılacağı gibi androjen biyosentezinin her iki yolunun ortak son ürünü androstendion (5) bileşiğidir. Androstendion (5), testosteron (6), östron (10) ve östriol (11) gibi steroid hormonların da sentezlendiği önemli bir steroiddir. Östradiol (12) östrojeni ise testosteron (6) hormonundan oluşturulur.

Androstendion (5) zayıf bir androjen olmasına rağmen androjen metabolizması için hayati bir metabolittir. Bu bileşik tıbbi öneme sahip birçok önemli hormonlar ve ilaçlar ile spironolakton gibi önemli kimyasal maddelerin üretiminde başlangıç maddesidir [11].

2.2. Küfler İle Steroid Biyotransformasyonları

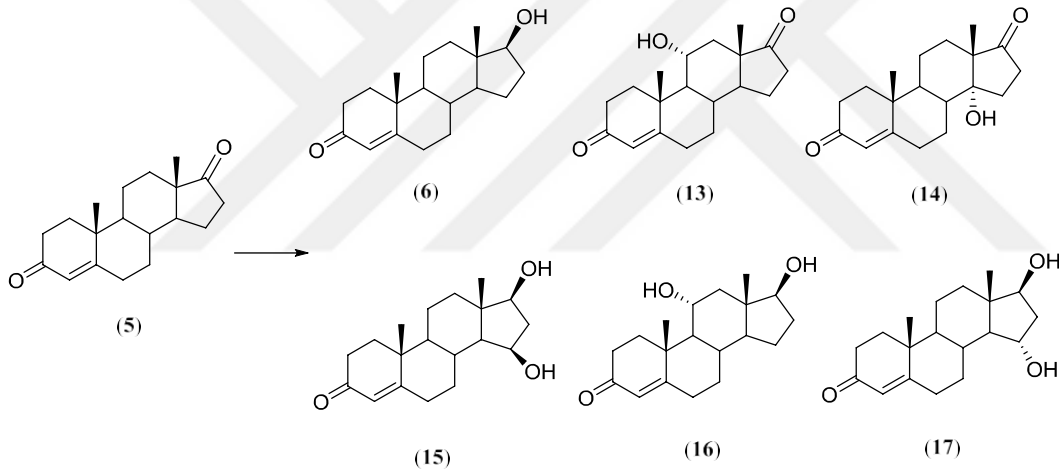
Küf enzimleri yüksek regio ve stereoseçiciliklere sahip oldukları için özellikle ilaçlar gibi önemli bileşiklerin üretimi steroidlerin küfler ile biyotransformasyonları 1952 yılından beri aralıksız kullanılmaktadır. Bilinen mikrobiyal biyotransformasyonları çok daha etkinleştirmek, çeşitli amaçlar doğrultusunda kullanılabilecek yeni reaksiyonlar ve mikroorganizmalar elde etmek için araştırmalar sürmektedir [5,11].

Günümüzde bile çok sayıda farklı küf ile mikrobiyal steroid biyotransformasyonları çalışmaları sürdürülmektedir. Mikrobiyal steroid biyotransformasyonları Baeyer-Villiger oksidasyonları, mikrobiyal hidrosillenmeler, yan zincirlerin uzaklaştırılması, A halkasının aromatikleşmesi, hidroksil gruplarının yükseltgenmesi, keton gruplarının indirgenmesi, mikrobiyal hidrojenasyonlar ve mikrobiyal dehidrojenasyonlar gibi ilginç ve önemli reaksiyonlar ile sonuçlanmaktadır [5,11].

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

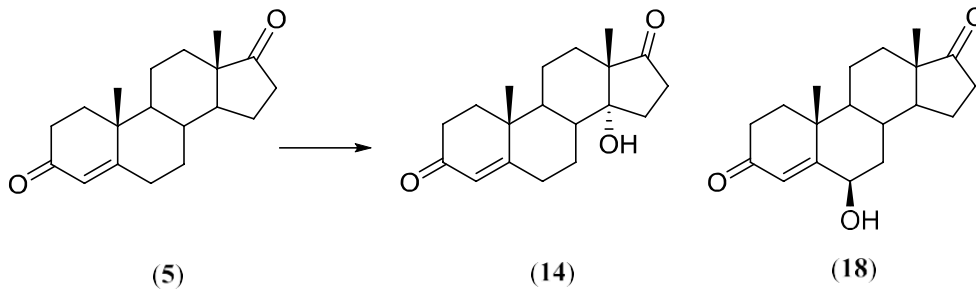
Yeryüzünde geniş bir yayılım gösteren *Aspergillus* türleri özellikle mikotoksinleri, patojenlikleri, temel ökaryotik genetik ilmine ve biyoteknolojiye olan katkıları

nedeni ile dikkat çekmektedir [12]. *Aspergillus* türlerinin çoğu toprak, su ve çürüyen materyaller üzerinde yaşarken bazı *Aspergillus* türleri ise insanlar ve hayvanlar için patojen olarak tanımlanmıştır [13]. Steroidlerin *Aspergillus* cinsine ait türler ile inkübasyonları çoğu zaman Baeyer-Villiger oksidasyonları, mikrobiyal hidroksillenmeler, yan zincirlerin uzaklaştırılması, A halkasının aromatikleşmesi, mikrobiyal hidrojenasyonlar ve mikrobiyal dehidrojenasyonları gibi önemli sonuçlar vermektedir [5,11]. Mevcut literatürdeki bazı androstendion (5) biyotransformasyonlarının *Aspergillus* türleri ile gerçekleştirilmiştir [15-23]. Örneğin, *A. candidus* MRC 200634 izolatu ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.3.) testosteron (6), 11 α -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (13), 14 α -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (14) 15 β ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (15), 11 α ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (16) ve 15 α ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (17) metabolitlerini vermiştir [15].



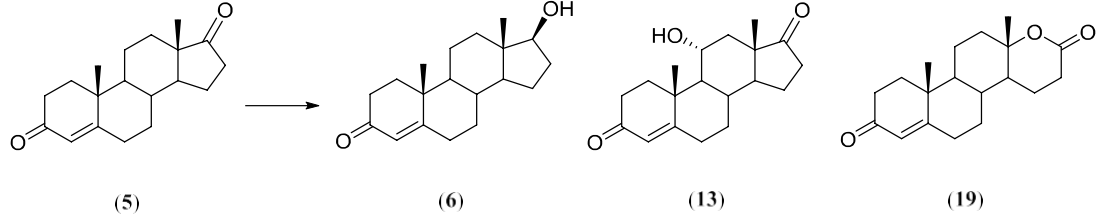
Şekil 2.3. *A. candidus* MRC 200634 ile inkübasyon.

A. wentii MRC 200316 ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.4.) 6 β -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (18) ile bir önceki çalışmadan elde edilen (14) numaralı metaboliti vermiştir [16].



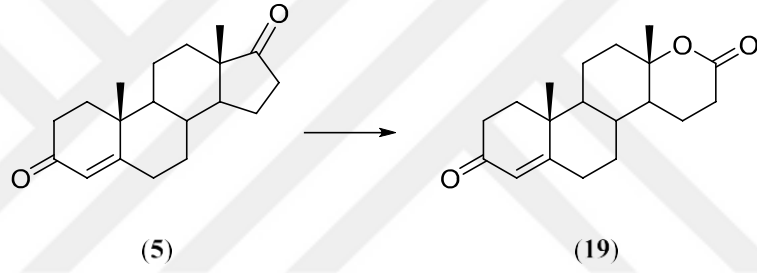
Şekil 2.4. *A. wentii* MRC 200316 ile inkübasyon.

A. tamarii MRC 72400 izolatı ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.5.) 17a-okza-D-homo-androst-4-en-3,17-dion (19) ile daha önceki çalışmalarda elde edilen (6 ve 13) numaralı metabolitlerini vermiştir [17].



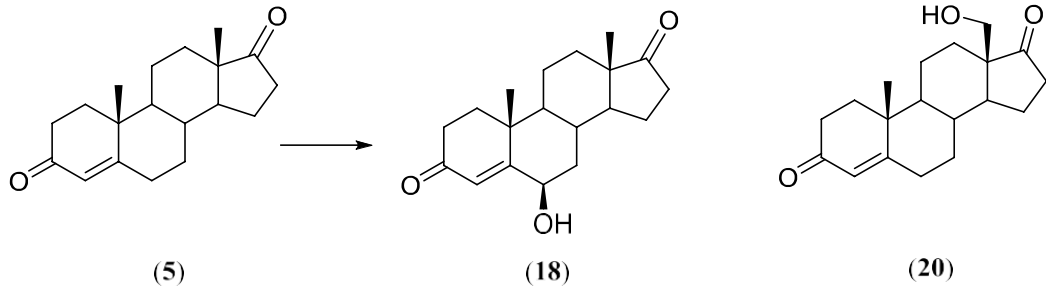
Şekil 2.5. *A. tamarii* MRC 72400 ile inkübasyon.

A. tamarii QM 1223 izolatı ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.6.) ise daha önceki çalışmalarda elde edilen (19) numaralı metaboliti vermiştir [18].



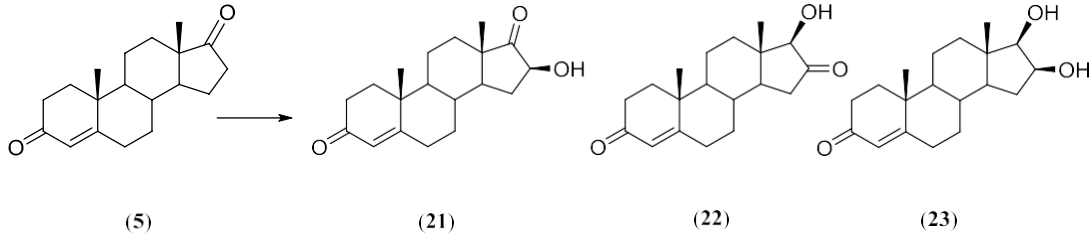
Şekil 2.6. *A. tamarii* QM 1223 ile inkübasyon.

A. niger ATCC 9142 izolatı ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.7.) 18-hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (20) ve daha önceki çalışmalardan elde edilen (18) numaralı metaboliti vermiştir [19].



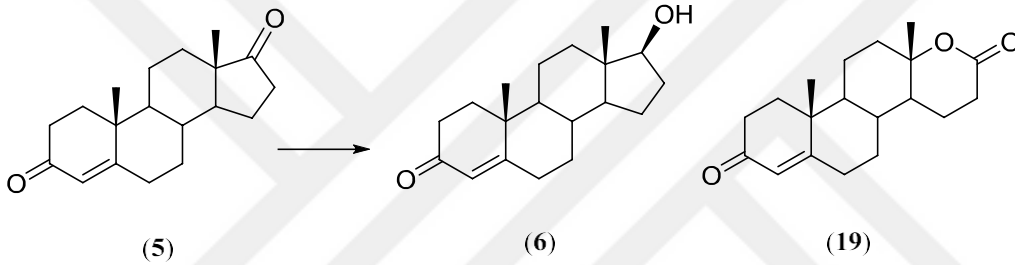
Şekil 2.7. *A. niger* ATCC 9142 ile inkübasyon.

Substratın *A. niger* NRRL 599 izolatu ile inkübasyonu (Şekil 2.8.) 16 β -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (21), 17 β -hidroksiandrost-4-en-3,16-dion (22) ve 16 β ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (23) metabolitlerini vermiştir [20].



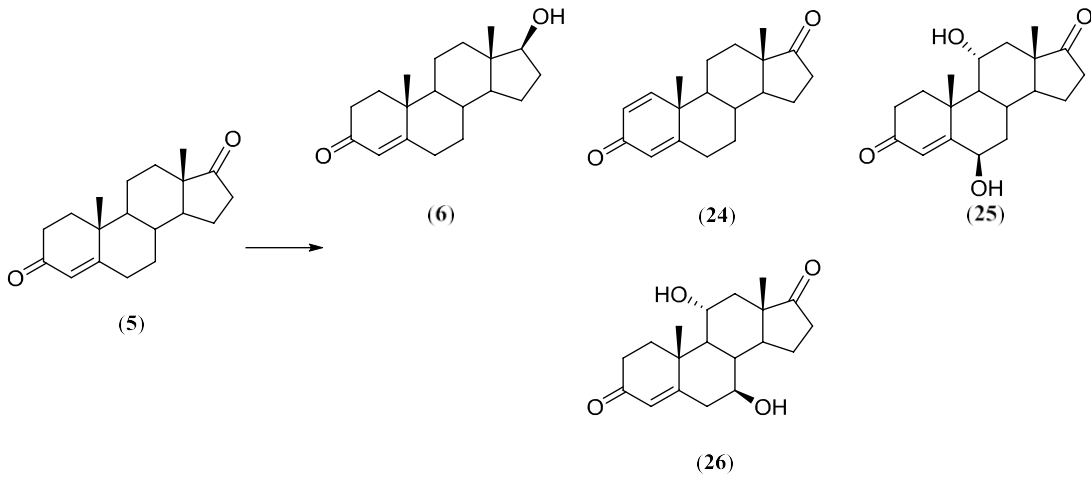
Şekil 2.8. *A. niger* NRRL 599 ile inkübasyon.

A. terreus PTCC 5283 ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.9.) daha önceki çalışmalardan elde edilen (6 ve 19) numaralı metabolitleri vermiştir [21].



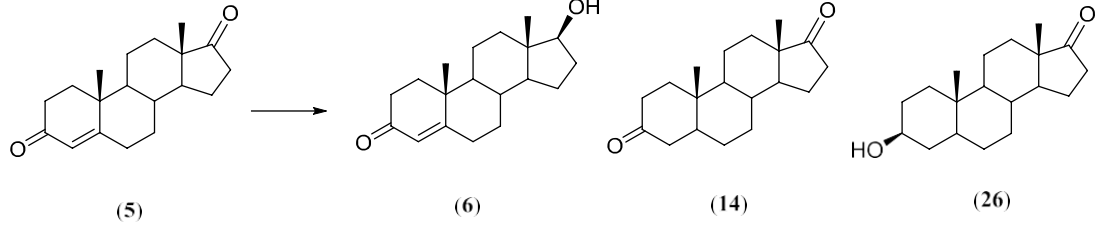
Şekil 2.9. *A. terreus* PTCC 5283 ile inkübasyon.

A. fumigatus izolatu ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.10) androsta-1,4-dien-3,17-dion (24), 6 β ,11 α -dihidroksiandrost-4-en-3,17-dion (25) 7 β ,11 α -dihidroksiandrost-4-en-3,17-dion (26) ve daha önceki çalışmalardan elde edilen (6) numaralı metabolit ile sonuçlanmıştır [22].



Şekil 2.10. *A. fumigatus* izolatu ile inkübasyon.

A. oryzae ATCC 11601 izolatu ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.11.) androstan-3,17-dion (27), 3β-hidroksiandrostan-17-on (28) ile daha önceki çalışmalardan elde edilen (6) numaralı metaboliti vermiştir [23].



Şekil 2.11. *A. oryzae* ATCC 11601 ile inkübasyon.

2.4. Çalışmanın amacı

Bu çalışmanın amacı androstendion (5) bileşiğinin *Aspergillus glaucus* MRC 200914 izolatu ile biyotransformasyonunun incelenmesidir. *Aspergillus glaucus* türü son derece olumsuz şartlara karşı gösterebildiği fizyolojik dayanıklılığı sebebi ile çok farklı yerlerde hayatını sürdürebilen ve insanlar için patojen olabilen bir mikroorganizmadır [24].



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Genel Bilgiler

Cam malzemeler ile besiyerleri otoklavda (Nüve OT 40 L) 121 °C’de ve 20 dakika süre ile sterilize edildi. Yatık agar besiyerlerine küf nakli, sterilize edilmiş erlenlere küf ve substrat nakli steril kabin (Nükleon marka) ile gerçekleştirildi. İnkübasyonlar bir çalkalamalı inkübatör (Gerhardt THO 500 Laboshake) ile gerçekleştirildi. Perkin Elmer SpectrumTwo spektrometresi kullanılarak steroidlerin infrared spektrumları alındı. ¹H NMR spektrumları solvent olarak döterokloroform (CDCl₃) ve iç sinyal olarak tetrametilsilan standardı kullanılarak Variann Mercury 300 NMR spektrometresi ile 300 MHz’de alındı. ¹³C NMR spektrumları solvent olarak döterokloroform kullanılarak Varian Mercury 300 NMR spektrometresi ile 75 MHz’de alındı. Steroidlerin erime noktaları Elektrothermal IA 9200 cihazı ile ölçüldü ve tekrarlanmadı.

Biyotransformasyon ve kolon kromatografisi çalışmaları ince tabaka kromatografisi (İTK) ile izlendi. İTK işlemleri 0,25 mm’lik silika jel levhaları (Merck silika jel GF254) ve etil asetat-hekzan (1:1) çözgen sistemi ile yürütüldü. İTK levhalarındaki steroidler kendilerine özel bir reaktife (*p*-anisaldehit-sülfürik asit reaktifi) daldırıldıktan sonra 3 dakika süre ile 120 °C’de ısıtılarak renkli ve gözlenebilir hale getirildi.

Biyotransformasyon çalışmasında kullanılan *A. glaucus* MRC 200914 izolatu TÜBİTAK, MAM, Gıda Teknoloji ve Araştırma Enstitüsüne ait olan Kültür Koleksiyonundan temin edildi.

Çalışmada biyotransformasyonu gerçekleştirilen androstendion (5) Sigma-Aldrich firmasından satın alındı. Besiyerlerini hazırlamak için kullanılan PDA, agar ve üm kimyasallar ile çalışmada tüketilen tüm solventler ise Merck firmasından satın alındı.

3.2. Yatık Agar Besiyeri Hazırlanışı

5,85 g PDA (potato dekstrozu agar) ve 1,2 g agar karışımı saf su ile 150 mL'ye tamamlanıp kaynatılarak yatık agar besiyeri hazırlandı. Bu besiyeri soğumadan önce deney tüplerine yarılarına kadar ilave edildikten sonra tüp ağzları yeteri miktarda pamuk ile kapatıldı. Ağız kısımları alüminyum folyo ile sarılmış olan tüpler otoklavda 121°C'de 20 dakika sterilize edildi. Tüplerdeki eritilmiş besiyeri donmadan takriben 45 derecelik bir eğimle soğumaya bırakıldıktan sonra yatık agar besiyerleri elde edildi.

3.3. Küf Kültürlerinin Hazırlanışı ve Tazelenmesi

Kültür koleksiyonundan satın alınan küf sonradan hazırlanan yatık agar besiyerlerinin 3 tanesine steril koşullarda ilave edilip 25 °C'de gelişmeye bırakıldı. Bu şekilde tazelenmiş yatık agar kültürlerindeki en gelişmiş küf iki hafta aralıklar ile yeni yatık agar besiyerlerine steril şartlarda nakledildi. Aynı işlemin iki kez tekrarı sonrasında mevcut en taze ve en iyi gelişmiş küf biyotransformasyon çalışmasında kullanıldı.

3.4. Küf Besiyerinin Hazırlanışı

A. glaucus MRC 200914 küfüne ait 1 L besiyeri glukoz (200 g), pepton (5 g), malt ekstraktı (3 g) ve maya ekstraktı (3 g) 1 L distile su da çözülüp karıştırılarak hazırlandı [21].

3.5. Biyotransformasyon Deneyi

A. glaucus besiyeri 250 mL'lik 10 ayrı erlene bölündükten 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 inkübasyona bırakıldı . İnkübasyonu takiben substrat (1 g) steril şartlarda DMF (10 mL) içerisinde çözülerek erlenlere eşit hacimlerde aktarıldı ve daha sonra erlenler 25°C'de 5 gün daha inkübasyona bırakıldı.

Biyotransformasyon çalışması bir adet kontrol erleni ile gözlendi. Önce kullanılacak küf içermeyen ama steril besiyeri içeren bir erlene sadece substrat ilave edilerek

kontrol erleni hazırlandı. Biyotransformasyon çalışmasındaki tüm işlemler kontrol erleni içinde aynı şekillerde gerçekleştirildi. Bu işlemlerin sonrasında söz konusu erlenden İTK alındığında hiç bir metabolit gözlenmemesi biyotransformasyon çalışmamasına ait sonuçların kabul edilebilir ve bilimsel olduğu olduğunu gösterdi.

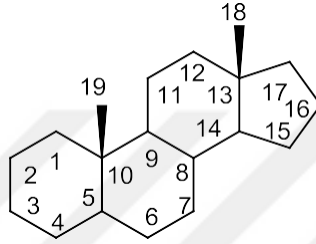
3.6. Metabolitlerin Saflaştırılması ve Yapılarının Tayini

İnkübasyonu takiben küfe ait besiyeri filtrasyonla misellerinden filtrat olarak süzüldü ve miseller bir miktar etil asetat (500 mL) ile yıkandı. Filtrattaki teroidler etil asetat (1 L) ile 3 kez ekstrakte edildi. Toplanan ekstraktlara susuz sodyum sülfat ilave edilerek ekstraktlar susuzlaştırıldı. Etil asetat ekstraktların evaporatörde uçurulması ile yağimsı bir madde elde edildi ve bu yağimsı maddeyi substrat ile karşılaştırarak bir İTK çalışması gerçekleştirildi. Yağimsı maddedeki steroidler İTK çalışmasının sonuçlarına göre silika jel 60'ın (Merck 107734, 230-400 mesh) absorban ve *n*-hekzan içerisinde artan etil asetat derişimlerini ise elüent olarak kullanıldığı bir kolon kromatografisi çalışması ile saflaştırıldı. Substrat ile her steroidin erime noktası, NMR ve IR spektrumlarının karşılaştırılarak yapı tayinlerini gerçekleştirildi.



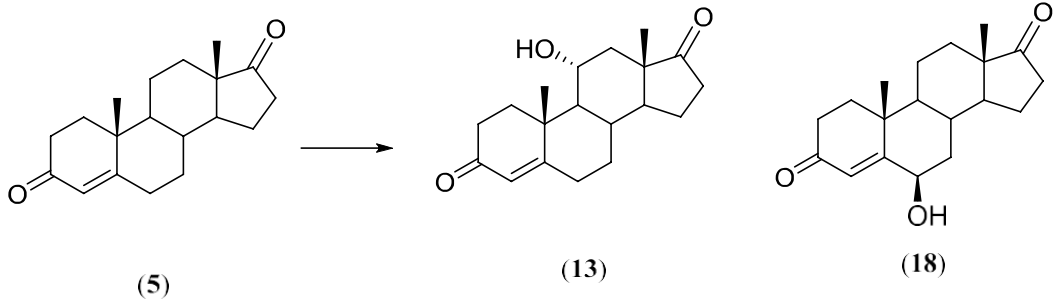
4. DENEYSEL BULGULAR

Bu çalışmada karbon iskeleti Şekil 4.1.'de gösterilen androstendion (5) bileşiğinin *A. glaucus* MRC 200914 izolatı ile 5 gün olarak süren biyotransformasyonu gerçekleştirildi.



Şekil 4.1. Substrata ait karbon iskeleti.

Substratın *A. glaucus* MRC 200914 inkübasyonundan kaynaklanan yağimsı madde (1987 mg) ile yapılan kolon kromatografisi çalışması değişime uğramayan başlangıç maddesi (137 mg) ile 11 α -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (13) ve 6 β -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (18) metabolitlerini verdi (Şekil 4.2.).



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

11 α -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (13) (507 mg, %48)

Erime noktası: Sakızımsı bir madde elde edildiği için erime noktası belirlenemedi.

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3430, 1735 ve 1660.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,95 (3H, s, 18-H), 1,35 (3H, s, 19-H), 4,10 (1H, m, 11 β -H), 5,75 (1H, s, 4-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): Bakınız Tablo 4.1.

Tablo 4.1. Steroidlere ait ^{13}C NMR kimyasal kayma bilgileri.

C atomu	(5)	(13)	(18)
1	35.62	37.06	37.06
2	33.84	33.97	34.16
3	199.33	200.45	200.47
4	124.07	124.39	126.53
5	170.35	171.00	167.68
6	32.50	33.23	72.80
7	31.20	30.05	37.19
8	35.07	34.32	29.39
9	53.74	58.77	53.63
10	38.58	39.87	38.03
11	20.24	68.27	20.25
12	30.68	42.46	31.25
13	47.45	47.87	47.61
14	50.76	49.76	50.88
15	21.68	21.52	21.69
16	35.69	35.65	35.74
17	220.43	219.10	220.47
18	13.64	14.48	13.76
19	17.31	18.14	19.55

6 β -Hidroksiandroster-4-en-3,17-dion (**18**) (264 mg, %25).

Erime noktası: 190-191 $^{\circ}\text{C}$, lit., 190-193 $^{\circ}\text{C}$ [26].

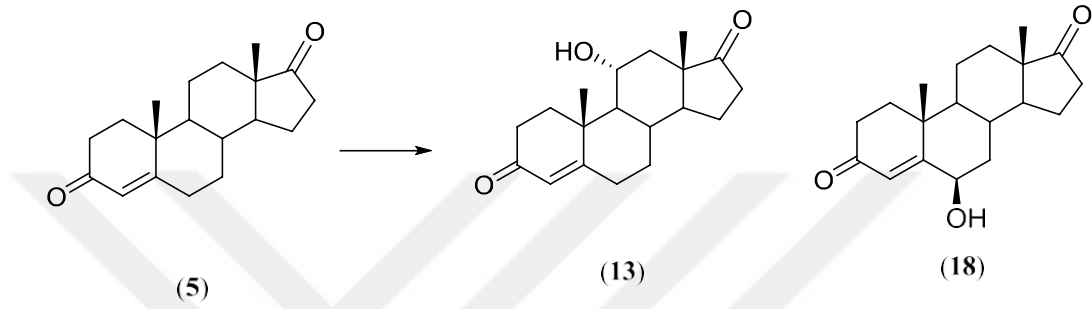
IR ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3445, 1740 ve 1670.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,91 (3H, s, 18-H), 1,37 (3H, s, 19-H), 4,36 (3H, bs, 6 α -H), 5,81 (1H, s, 4-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): Bakınız Tablo 4.1.

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

A. glaucus MRC 200914 izolatu ile androstendion (5) bileşiğinin beş günlük inkübasyonu Sekil 5.1.'de gösterildiği gibi iki metabolit ile sonuçlandı.



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

İlk metabolit 11 α -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (13) olarak belirlendi. Metabolitin ^1H NMR spektrumu δ_{H} 4.10 ppm'de 11 α -hidroksil grubuna özgü olan bir rezonans (1H, m) verdi [27]. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumunun (Tablo 5.1.) C-9 ve C-12 rezonansları için aşağı alana doğru kaymalar (C-9 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 5,03 ppm ve C-12 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 11,78 ppm) gösterirken, C-8 rezonansı için ise yukarı alana doğru bir γ -gauche kayması ($\Delta\delta_{\text{C}}$ 0,75 ppm) göstermesi bir 11 α -hidroksil grubunun varlığını daha da netleştirdi [28]. Substrata ait 5,74 ppm'deki 4-H rezonansının (1H, s) metabolit ^1H NMR spektrumunda δ_{H} 5,75 ppm'de (1H, s) gözlenmesinden dolayı substratın diğer kısımlarında bir değişim olmadığı anlaşıldı.

İkinci metabolit ise 6 β -dihidroksiandrost-4-en-3,17-dion (18) olarak belirlendi. Metabolit ^1H NMR spektrumu δ_{H} 4.36 ppm'de 6 β -hidroksil grubuna özgü bir rezonans (1H, bs) gösterdi [27]. Metabolit ^{13}C NMR spektrumunun C-7 rezonansı için aşağı alana doğru bir kayma ($\Delta\delta_{\text{C}}$ 5,99 ppm) verirken, C-8 rezonansı için ise yukarı alana doğru bir γ -gauche kayması ($\Delta\delta_{\text{C}}$ 5,48 ppm) vermesi bir 6 β -hidroksil grubunun varlığını daha da belirginleştirdi [28]. Substrata ait 5,74 ppm'deki 4-H rezonansının (1H, s) metabolit ^1H NMR spektrumunda δ_{H} 5,81 ppm'de (1H, s) gözlenmesinden dolayı substratın diğer kısımlarında bir değişim olmadığı anlaşıldı.

Tablo 5.1. Steroidlerin ^{13}C NMR kimyasal kayma bilgileri.

C atomu	(5)	(13)	(18)
1	35.62	37.06	37.06
2	33.84	33.97	34.16
3	199.33	200.45	200.47
4	124.07	124.39	126.53
5	170.35	171.00	167.68
6	32.50	33.23	72.80
7	31.20	30.05	37.19
8	35.07	34.32	29.39
9	53.74	58.77	53.63
10	38.58	39.87	38.03
11	20.24	68.27	20.25
12	30.68	42.46	31.25
13	47.45	47.87	47.61
14	50.76	49.76	50.88
15	21.68	21.52	21.69
16	35.69	35.65	35.74
17	220.43	219.10	220.47
18	13.64	14.48	13.76
19	17.31	18.14	19.55

Tablo 5.2.'den de görüleceği gibi *A. glaucus* MRC 200914 izolatının androstendion (5) bileşiğini yüksek bir verim ile C-11 α pozisyonunda hidroksillerken düşük bir verim ile C-6 β pozisyonunda hidroksillediği anlaşıldı.

Tablo 5.2. Metabolit verimleri.

Substrat	Metabolit	% Verim
Androstendion (5)		
	11 α -Hidroksiandro-4-en-3,17-dion (13)	48
	6 β -Hidroksiandro-4-en-3,17-dion (18)	25

Literatürdeki *Aspergillus* izolatları ile steroid biyotransformasyonları incelendiğinde bu küflerin genelde androstendion (5) bileşiğini ya C-6 β veya C-11 α pozisyonlarında hidroksillerken sadece bir *A. fumigatus* izolatının [22] androstendion (5) bileşiğini hem C-6 β hemde C-11 α pozisyonlarında aynı anda hidroksillediği belirlendi. Ayrıca diğer *Aspergillus* izolatlarının aksine bu çalışma da kullanılan *A. glaucus* MRC 200914 izolatının androstendion (5) bileşiğini hem C-6 β hemde C-11 α

pozisyonlarında ayrı ayrı olarak hidroksilleyebilen tek küf olduğu da belirlendi [15-23].

Kısaca bu çalışmada *A. glaucus* MRC 200914 izolatının substratı C-11 α ve C-6 β pozisyonlarında ayrı ayrı olarak hidroksillediği 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] Malaviya, A., Gomes, J., Rapid Screening and Isolation of a Fungus for Sitosterol to Androstenedione Biotransformation, Applied Biochemistry and Biotechnology, 158, 374-386, 2009.
- [12] Bhatti H,N., Khera R.A. 2012. Biological transformations of steroidal compounds: a review. Steroids. 77, 1267-1290.
- [13] Samson, R. A., Hong, S-B., Frisvad, J. C. 2006. Old and New Concepts of Species Differentiation in Aspergillus. Medical Mycology, 44, S133-S148.
- [14] 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.
- [15] Yildirim, K., Kuru, A. 2015. Biotransformation of some steroids by Aspergillus candidus. Journal of Chemical Research, 39, 546-549.

- [16] Yildirim, K. 2010. Microbial Hydroxylation of Some Steroids by *Aspergillus wentii* MRC 200316. Collect. Czech. Chem. Commun., 12,1273-1281.
- [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., Martin, J., Oehlschlager A. C., Durham, N. N., Zalkow, L. H., Transformation of Progesterone and Related Steroids by *Aspergillus tamarii*. J. Org. Chem., 30, 760-762, 1965.
- [19] Auret, B. J., Holland, H. L., Microbiological 18-Hydroxylation of Steroids, Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications, 1157, 1971.
- [20] Yamashita, H., Shibata, K., Yamakoshi, N., Kurosawa, Y., Mori, H., Microbial 16 β -hydroxylation of Steroids with *Aspergillus niger*, Agricultural and Biological Chemistry, 40, 505–509, 1976.
- [21] Faramarzi, M. A., Yazdi, M. T., Amini, M., Mohseni, F. A., Zarrini, G., Amani, A., Shafiee, A., Microbial Production of Testosterone and Testololactone in the Culture of *Aspergillus terreus*, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 20, 657-660, 2004.
- [22] Banerjee, S., Mukherjee, E., Mahato S. B., Metabolism of Androst-4-ene-3,17-dione by *Aspergillus fumigatus*, Journal Chemical Research, S236-S237, 1993.
- [23] Cvelbar, D., Žist, V., Kobal, K., Žigon, D., Žakelj-Mavrič, M., 2013. Steroid toxicity and detoxification in ascomycetous fungi, Chemico-Biological Interactions, 202, 243-258.
- [24] Hubka, V., Kolarík, M., Kubátová, A., & Peterson, S. W. 2013. Taxonomic revision of *Eurotium* and transfer of species to *Aspergillus*, Mycologia, 105, 912–937.
- [25] 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.
- [26] Hanson, J.R., Nasir, H., Parvez, A., The Hydroxylation of Testosterone and Some Relatives by *Cephalosporium aphidicola*, Phytochemistry, 42, 411-415, 1996.
- [27] 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 ¹H NMR spectra of the steroid hormones, their hydroxylated derivatives, and related compounds J. Chem. Soc. Perkin Trans., 2, 1567.

- [28] Blunt, J.W., and Stothers, J.B. 1977. C NMR spectra of steroids a survey and commentary. *Org. Magn. Reson.*, 9, 439.



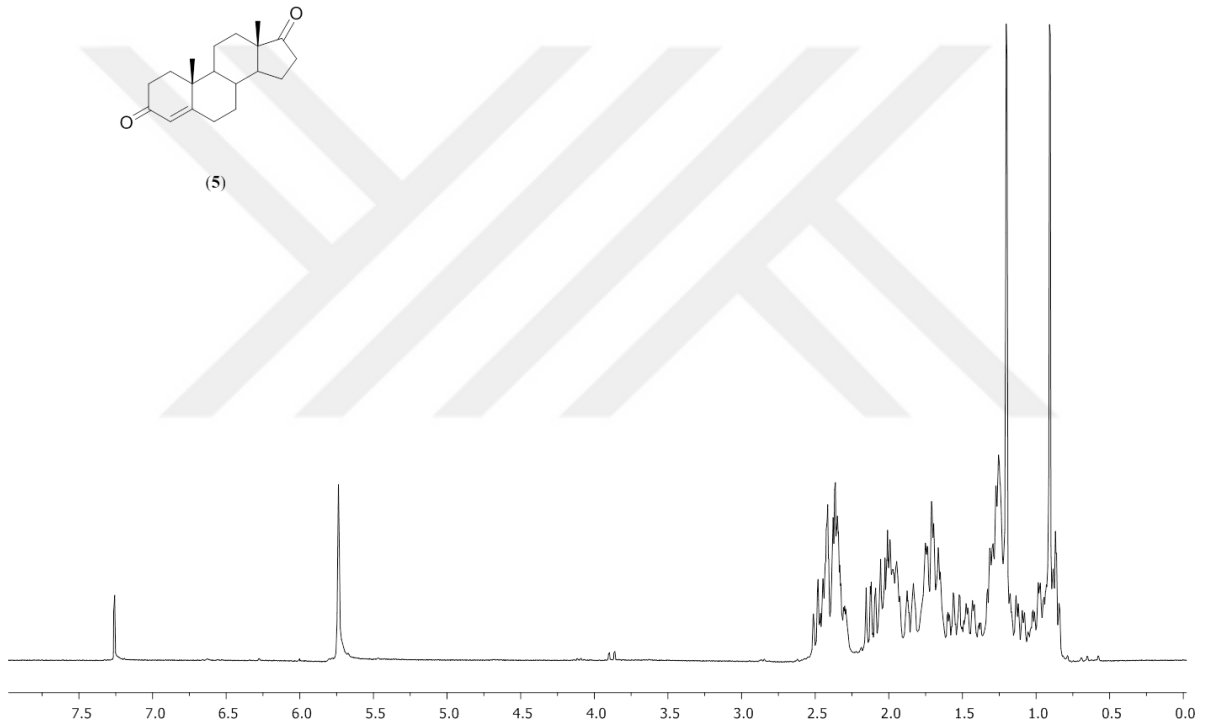


EKLER

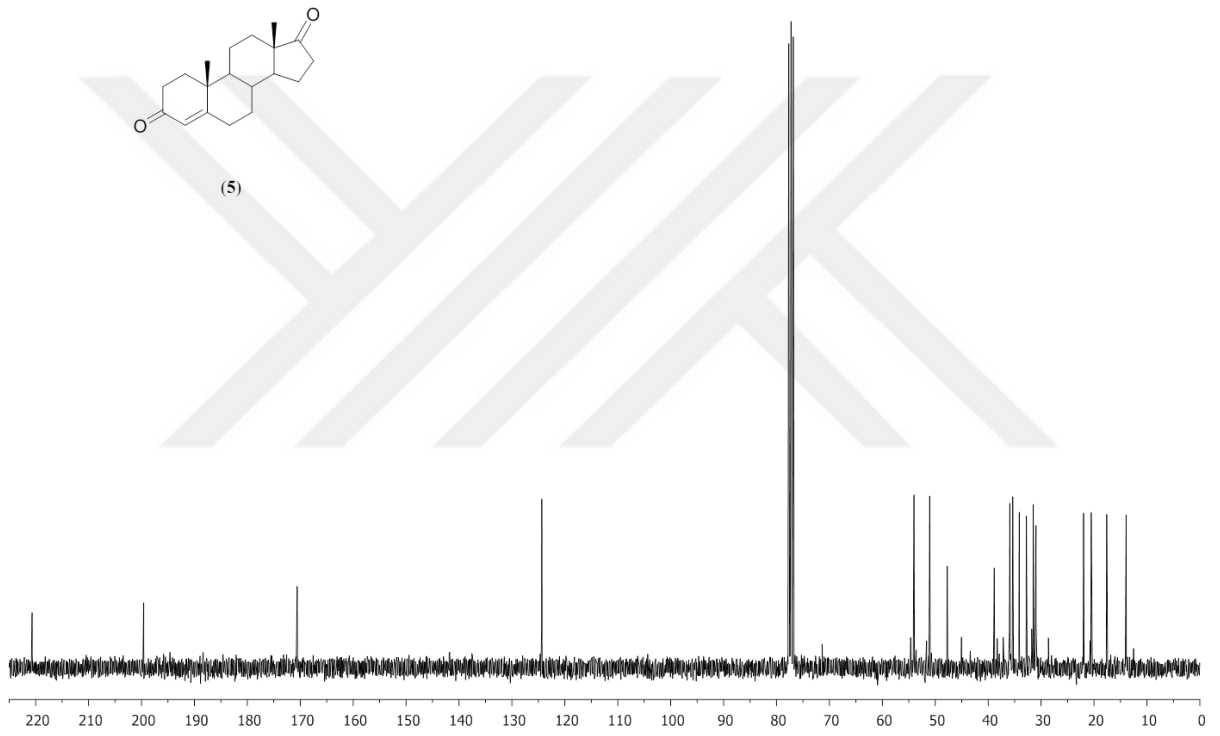
EK A. NMR spektrumları



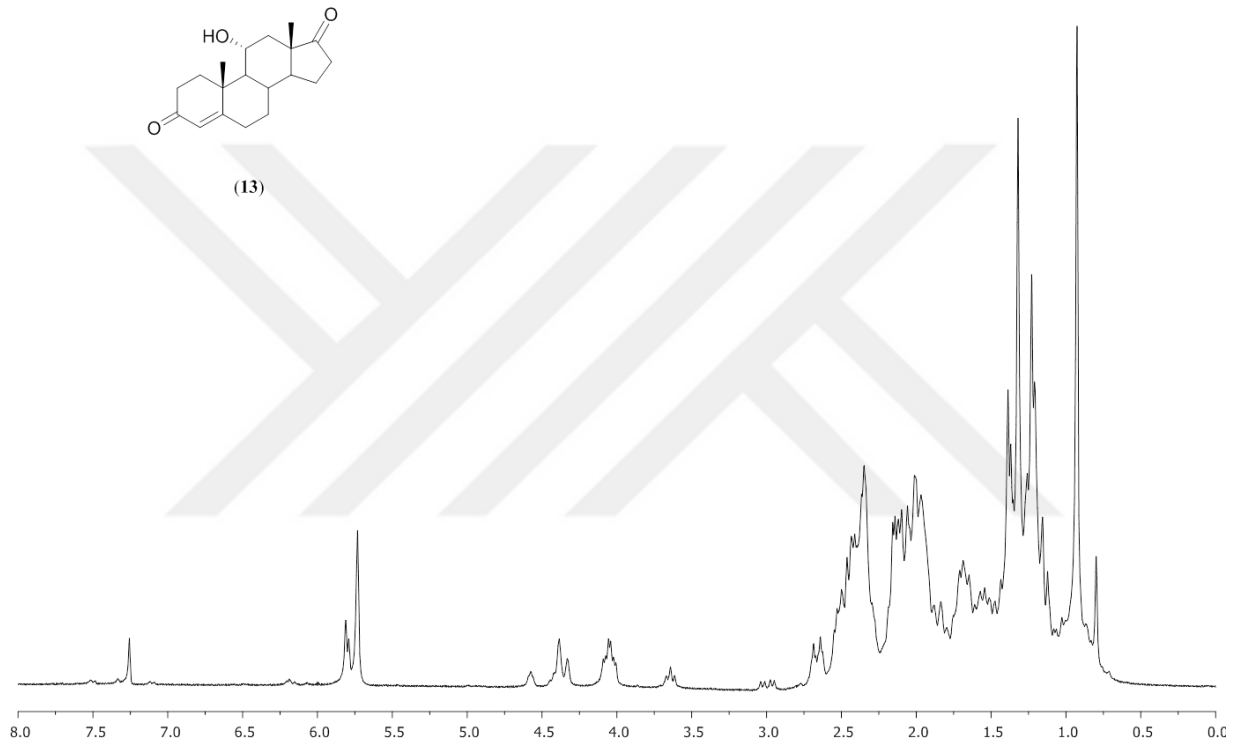
EK A



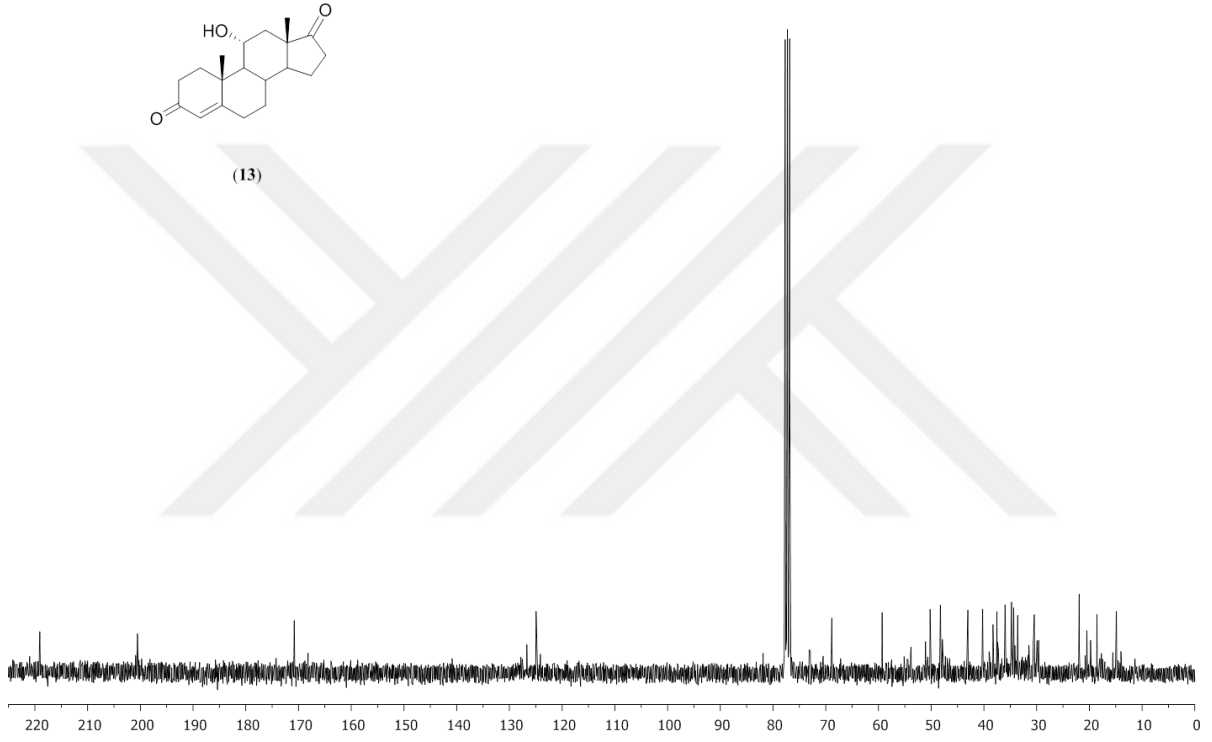
EK A.1. (5) numaralı bileşik için ¹H NMR spektrumu.



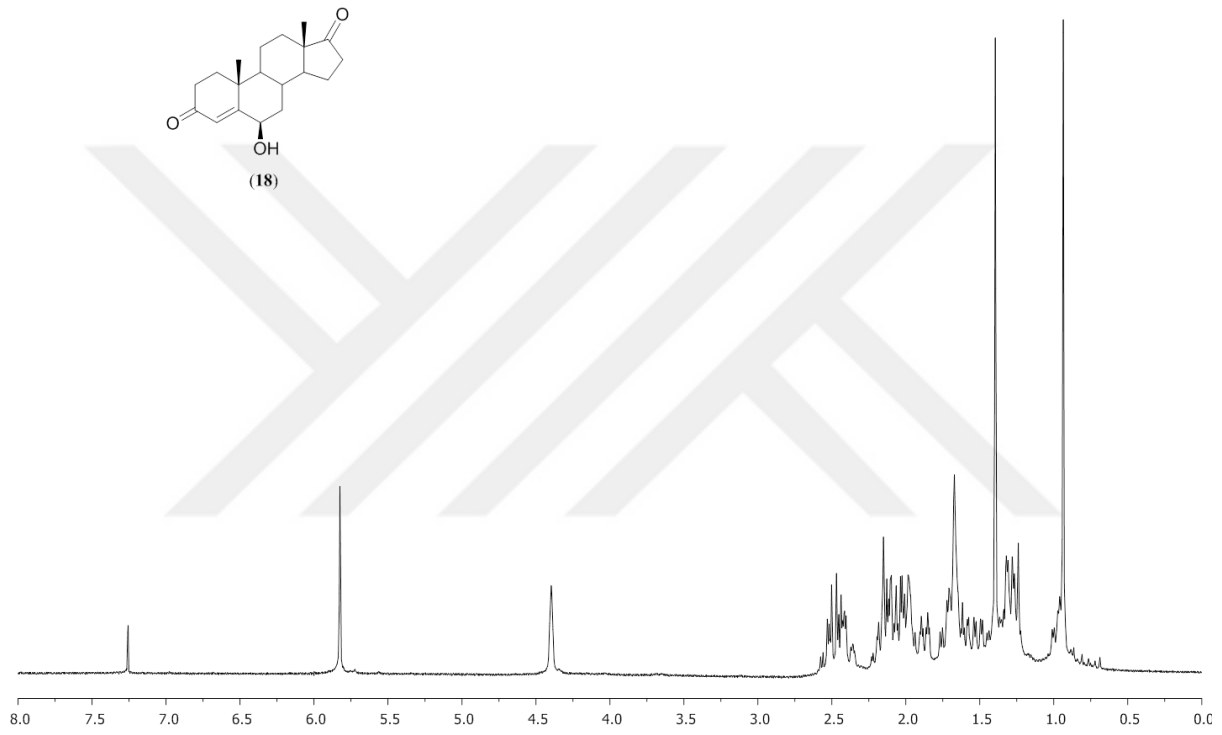
EK A.2. (5) numaralı bileşik için ^{13}C NMR spektrumu.



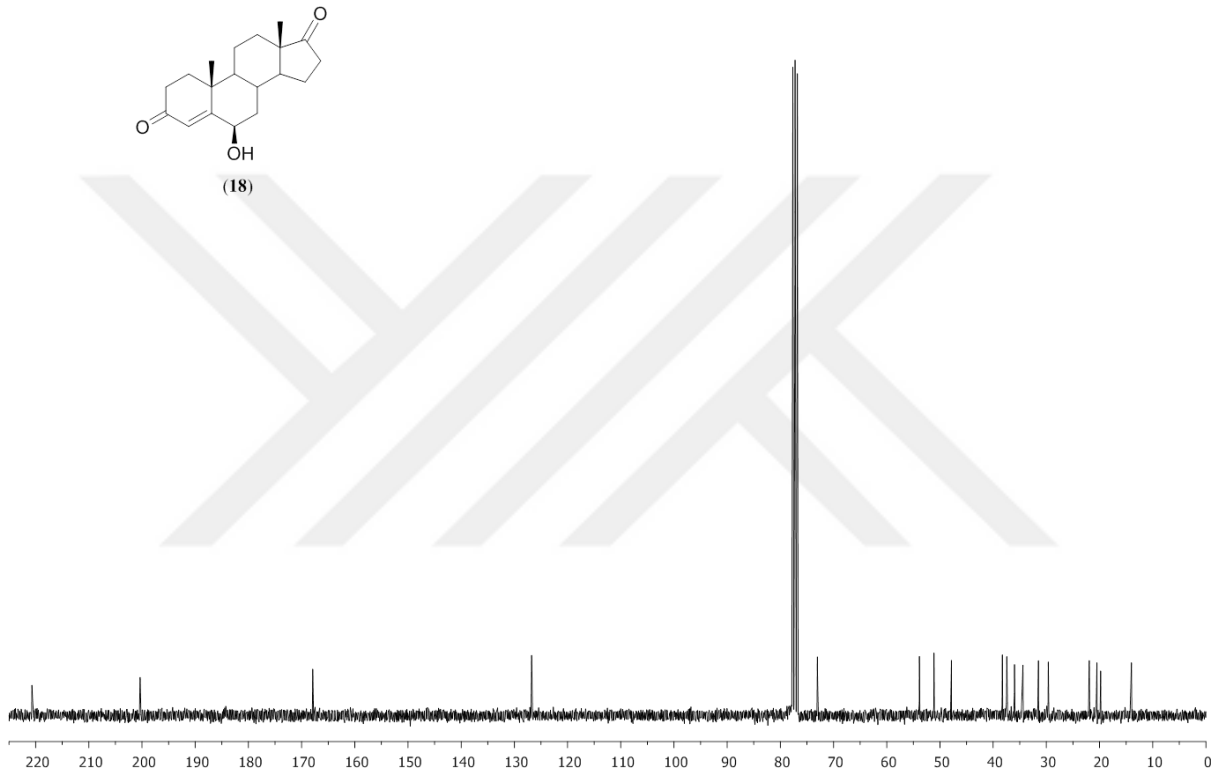
EK A.3. (13) numaralı bileşik için ^1H NMR spektrumu.



EK A.4. (13) numaralı bileşik için ¹³C NMR spektrumu.



EK A.5. (18) numaralı bileşik için ^1H NMR spektrumu.



EK A.6. (18) numaralı bileşik için ^{13}C NMR spektrumu.



ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Nur RZAYEVA

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2016-2020 yılları arasında Bakü Devlet Üniversitesi, Kimya Fakültesi, Kimya Bölümü.
- **Yüksek lisans** : Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalı (devam ediyor).

TEZDEN TÜRETİLEN ESERLER:

- Uluslararası Sözlü Bildiri (Yıldırım, K., Kuru, A. Yılmaz Keskin S., Ali, A.A.A., Al-Ani, R. M. A., Rzayeva, N. (1-3 Eylül 2022). Biotransformation of some androgens by *Aspergillus glaucus*. 1st International Karatekin Science and Technology Conference, 155-156, Çankırı, Türkiye).