

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

EPIANDROSTERON BİLEŞİĞİNİN *PENICILLIUM OLSONII*
KÜFÜ İLE BİYOTRANSFORMASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hümeysra YILMAZ

Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı

TEMMUZ 2024

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

EPIANDROSTERON BİLEŞİĞİNİN *PENICILLIUM OLSONII*
KÜFÜ İLE BİYOTRANSFORMASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hümeysra YILMAZ

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Ali KURU

TEMMUZ 2024

Hümeyra YILMAZ tarafından hazırlanan “EPIANDROSTERON BİLEŞİĞİNİN *PENICILLIUM OLSONII* KÜFÜ İLE BİYOTRANSFORMASYONU” adlı tez çalışması 08.07.2024 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 :	Prof. Dr. Fatih SÖNMEZ Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi
Jüri Üyesi:	Dr. Öğr. Üyesi Ali KURU (Danışman) Sakarya Üniversitesi
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Kudret YILDIRIM Sakarya Üniversitesi



ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim yönetmeliğine ve Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesine uygun olarak hazırlamış olduğum “EPIANDROSTERON BİLEŞİĞİNİN *PENICILLIUM OLSONII* KÜFÜ İLE BİYOTRANSFORMASYONU” başlıklı tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmanın 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.

08/07/2024

Hümeysra Yılmaz



TEŞEKKÜR

Çalışmayı büyük bir sabır ve titizlikle yöneten, tüm çalışma boyunca desteğini esirgemeyen, tecrübe ve bilgilerinden yararlandığım değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Ali KURU'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın tüm aşamalarında tavsiye ve rehberliğiyle büyük katkı sağlayan Prof. Dr. Kudret Yıldırım'a da özel teşekkürlerimi sunarım. Sakarya Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü'ndeki öğretim üyeleri ve araştırma görevlilerine ve yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda bana yardımcı olan laboratuvar arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, hayatım boyunca hiçbir zaman maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve şu an bulunduğum yere gelmemde büyük katkıları olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hümeysra Yılmaz



İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
İÇİNDEKİLER	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
KISALTMALAR	xiii
SİMGELER	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
TABLO LİSTESİ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ŞEKİL LİSTESİ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖZET	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
SUMMARY	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
1.	GİRİŞ
2. LİTERATÜR TARAMASI	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.1. Biyotransformasyon	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.2. Enzimler, Avantajları ve Dezavantajları	6
2.3. Biyotransformasyon Teknikleri	8
2.4. Mikrobiyal Biyotransformasyon	9
2.5. Küfler ile Steroid Biyotransformasyonları	11
2.6. <i>Penicillium</i> Türleri ile Epiandrosteron Biyotransformasyonları	12
2.7. Çalışmanın Amacı	13
3. MATERYAL VE METOD	15
3.1. Genel Bilgiler	15
3.2. Deneysel Çalışmalar	15
3.2.1. Yatık agar besiyeri hazırlanışı	15
3.2.2. Küf kültürlerinin hazırlanışı ve tazelenmesi	16
3.2.3. Küf besiyerinin hazırlanışı	16
3.2.4. Biyotransformasyon deneyi	16
3.2.5. Metabolitlerin ayrıştırılması ve yapı tayini	16
4. DENEYSEL BULGULAR	19
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	23
KAYNAKLAR	27
EKLER	31
ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

KISALTMALAR

^{13}C NMR	: Karbon 13 Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
DHEA	: Dehidroepiandrosteron
DMF	: Dimetilformamid
^1H NMR	: Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
IR	: İnfrared (kızılötesi)
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
PDA	: Potato dekstroz agar
ppm	: Milyonda bir kısım
rpm	: Dakika başına dönüş sayısı



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

Sayfa

Tablo 4.1. Steroidlere ait ^{13}C NMR kimyasal kayma bilgileri.....	20
Tablo 5.1. Steroidlerin ^{13}C NMR kimyasal kayma bilgileri.....	24
Tablo 5.2. Metabolit verimleri	25





ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. Genel steroid yapısı.	1
Şekil 1.2. Kolesterol yapısı.	2
Şekil 1.3. Epiandrosteron'un metabolik yolu.	4
Şekil 2.1. İlk mikrobiyal hidroksilasyon.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekil 2.2. <i>P. vinaceum</i> ile inkübasyon.....	12
Şekil 2.3. <i>P. lanosocoeruleum</i> KCH 3012 ile inkübasyon.....	13
Şekil 4.1. Substrata ait karbon iskeleti.....	1Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekil 4.2. Epiandrosteronun <i>P. olsonii</i> MRC 500780 ile inkübasyonu.	19
Şekil 5.1. Epiandrosteronun <i>P. olsonii</i> MRC 500780 ile inkübasyonu.	23



EPIANDROSTERON BİLEŞİĞİNİN *PENICILLIUM OLSONII* İLE BİYOTRANSFORMASYONU

ÖZET

Canlıların büyüme ve gelişmesiyle doğrudan ilişkisi olmayan doğal ürünler, bu canlılara genellikle daha iyi yaşam koşulları sağlar. Doğal ürünler, özellikle diğer organizmalar üzerindeki etkileri nedeniyle dikkat çekerler. Bu bileşikler, yapısal çeşitliliklerinden dolayı ve biyosentezlerindeki benzerlikler göz önüne alınarak terpenler, alkaloidler, steroidler, fenolik bileşikler, özelleşmiş karbohidratlar, özelleşmiş peptitler, poliketitler, yağ asitleri ve yağ asitleri türevleri olarak sınıflandırılır. Steroidler, doğal ürünlerin önemli bir sınıfını oluşturur. Hayvan ve insan hücre zarlarındaki akışkanlığı düzenleyen kolesterol, en önemli ve en çok bilinen steroidlerden biridir. Kolesterol, safra asitleri, D3 vitamini ve steroid hormonlar gibi önem arz eden bileşiklerin öncüsüdür. Kolesterolde elde edilen steroid hormonlar, progestagenler (progestinler), androjenler, östrojenler, mineralokortikoidler, glukokortikoidler olmak üzere beş ayrı gruba ayrılır. Epiandrosteron (8), androjenler sınıfına ait bir steroid hormondur ve vücutta daha güçlü androjenler olan testosteron ve dihidrotestosteronun (DHT) öncüsü olarak görev yapar. Epiandrosteron (8), androjen metabolizmasının önemli bir metabolitidir.

Enzimler veya enzim içeren mikroorganizma sporları, mikroorganizmalar, mikrozomlar, doku, organ, hücre kültürleri dahil olmak üzere biyolojik sistemlerin, kendi doğal substratları olmayan kimyasal maddelerde meydana getirdiği değişimlere biyotransformasyon denir. Mikroorganizmalarla yapılan biyotransformasyonlarda genellikle küfler, mikrobiyal algler, mayalar ve bakteriler kullanılır. Günümüzde hormonlar ve ilaçlar gibi pek çok önemli kimyasal maddenin üretimi, çoğunlukla mikrobiyal biyotransformasyonlar yoluyla gerçekleştirilmektedir.

Bu çalışmada, epiandrosteron (8) bileşiği *Penicillium olsonii* MRC 500780 küfı kullanılarak biyotransformasyona tabii tutuldu. *Penicillium olsonii* için besiyeri hazırlandı, erlenlere bölüştürüldü ve otoklavda sterilizasyon işlemi gerçekleştirildi. Steril koşullar altında *P. olsonii* MRC 500780 küfı erlenlere eklenerek 3 gün inkübe edildi. Epiandrosteron (8) bileşiği de steril koşullarda erlenlere ilave edilip 5 gün daha inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda filtre edilen besiyerindeki maddeler etil asetat ile ekstrakte edildi. Etil asetat evaporatör yardımıyla buharlaştırıldı ve elde edilen kalıntıdaki maddeler kolon kromatografisiyle saflaştırıldı. Yapı belirleme yöntemleri olarak erime noktası tayini, NMR ve IR spektroskopisi kullanıldı ve *P. olsonii* MRC 500780 ile substratın inkübasyonu sonucunda 15 α -hidroksi-5 α -androstan-3,17-dion (18), 3 β ,15 α -dihidroksi-5 α -androstan-17-on (19), 3 β ,11 α -dihidroksi-5 α -androstan-17-on (20) ve 3 β ,7 α -dihidroksi-5 α -androstan-17-on (21) metabolitlerinin oluştuğu belirlendi.



BIOTRANSFORMATION OF EPIANDROSTERONE BY *PENICILLIUM OLSONII*

SUMMARY

Pure products are substances that do not contribute to the growth and reproduction of live creatures. Because of their influence on other organisms, natural goods benefit living organisms and attract more attention. Natural chemicals are typically classified into groups such as alkaloids, terpenoids, polyketides, phenylpropanoids, steroids, peptides, specialized carbohydrates, specific amino acids and fatty acids and derivatives.

Biotransformations are the chemical alterations that biological systems can perform on xenobiotic substances. These transformations are carried out by enzyme-containing biological systems and by free or immobilized enzymes. Cell cultures, tissue cultures, organ cultures, microorganisms, microsomes and microbial spores are some of the standard biological systems utilized for biotransformation.

In organisms, enzymes accelerate nearly every reaction by reducing the activation energy (EA). Enzymes shorten the time required for reactions to reach equilibrium but are neither consumed nor altered by the process; they do not affect the ΔG or equilibrium position of the process. The International Union of Biochemistry has documented about 3200 enzymes, with an estimated 25,000 enzymes in nature.

Due to their highly effective catalytic properties, enzymes offer specific benefits to their users. For instance, the reaction rates of enzymatic reactions can be increased by 10^8 - 10^{10} fold, and in rare cases, this can even exceed 10^{12} .

Due to their highly effective catalytic properties, enzymes offer specific benefits to their users. For instance, the reaction rates of enzymatic reactions can be increased by 10^8 - 10^{10} fold, and in rare cases, this can even exceed 10^{12} . Since enzymes are completely biodegradable and composed of amino acids, they are environmentally acceptable. While most other chemical reactants have a detrimental impact on the environment, enzymes normally work at benign circumstances (pH 7, 30°C, and 1 atm). As a result, specific issues such as isomerization, racemization, rearrangements, and degradation are reduced. Because of their compatibility, enzymes generally act in the same or comparable settings. Consequently, multiple reactions can be carried out in a single vessel using multi-enzyme systems. While most enzymes exhibit high substrate tolerance, some enzymes are not limited to their intended functions. These enzymes can accept a wide range of both natural and synthetic substances. Enzymes can catalyze many different types of reactions, and practically any known reaction can be catalyzed by an enzyme.

Enzymes are molecules with chemoselectivity, regioselectivity, and enantioselectivity properties. Because of their chemoselectivity, enzymes usually alter only one type of a functional category while leaving other functions unaltered. As a result, enzymatic processes often have a cleaner quality. Through their regioselectivity, enzymes can

distinguish between functional groups located at different chemical positions within the same substrate molecule. The complex three-dimensional architecture of enzymes enables them to achieve this. As chiral catalysts derived from L-amino acids, enzymes are enantioselective. Thus, enzymes can recognize any type of chirality on a substrate molecule. Both enantiomers in a racemic substrate can typically undergo a kinetic reaction at different rates, leading to the conversion of a prochiral substrate into a chiral product.

However, there are also disadvantages to using enzymes. One type of enantiomer found in nature is an enzyme. When another type of enantiomeric product is necessary, an enzyme with precisely the opposite stereochemical selectivity is needed. However, this is generally not possible. Enzymes need certain conditions for operation. Working at moderate temperatures and neutral pH can sometimes be problematic as high temperatures and acidic pH can inhibit some enzymes. Although water has the highest catalytic activity for enzymes due to its high boiling point and heat of vaporization, it is not the best solvent for most organic processes since many organic substances are not highly soluble in aqueous solutions. As a result, transferring an enzyme process from an aquatic to an organic environment is extremely desirable. However, due to enzyme denaturation, this can lead to a decrease in catalytic activity. The natural cofactors on which enzymes rely are extremely important. Despite their exceptional ability to absorb synthetic substrates, enzymes rely heavily on pure cofactors like NADH and NADPH. Sadly, these compounds are somewhat volatile, excessively expensive to employ at stoichiometric levels, and cannot be replaced by cheaper synthetic counterparts. Enzymes are sensitive to inhibition events. Inhibition of substances or products, which causes enzymes to stop working at increased concentrations of substrate, product, or both, can have a wide range of effects on enzyme operations. Additionally, some enzymes can trigger allergies. While enzymes have the potential to induce allergic reactions, cautious handling and treating them akin to chemicals can mitigate this risk.

Typically, biotransformations are carried out by whole, intact microorganisms or isolated enzyme systems. It is estimated that approximately 300 isolated enzyme systems are commercially available. Due to the predominantly membrane-bound nature of essential enzyme systems, their extraction proves challenging, thus necessitating biotransformations predominantly utilizing intact microorganisms. Bacteria, yeasts, molds, and microalgae represent the primary categories of microorganisms employed in biotransformation processes.

Microorganisms utilize nonspecific enzyme systems to catalyze diverse reactions on both natural and synthetic substrates. Among these processes, microbial hydroxylations are the most common and preferred. The significance of microbial hydroxylation came to light in 1952, demonstrating its pivotal role in resolving a significant challenge associated with corticosteroid synthesis. The introduction of an oxygen moiety to position C-11, distinct from other functional groups, proved to be a laborious, costly, and arduous undertaking. *Rhizopus arrhizus* effectively addressed this issue through microbial hydroxylation. Following microbial hydroxylation, the microbial biotransformations became prominent. Since, various substrate groups, including steroids, have been widely used for microbial biotransformations. Thanks to their remarkable regio- and stereoselective properties, microbial steroid biotransformations have been extensively employed in the manufacturing of numerous vital steroid hormones and pharmaceuticals.

In recent years, numerous microbial steroid biotransformations have been identified. In addition to increasing the efficiency of microbial biotransformations, tremendous effort is still being made to discover new, beneficial microbes and reactions. Following the discovery of the inaugural microbial hydroxylation in 1952, an extensive array of fungi has consistently remained among the most thoroughly examined whole-cell systems for biotransformation processes. Numerous types of steroids have been subjected to biotransformation by various fungi. The biotransformations undertaken have produced diverse outcomes, encompassing microbial hydroxylations, Baeyer-Villiger oxidations, and 5 α -reductions, demonstrating significant breadth in the scope of reactions.

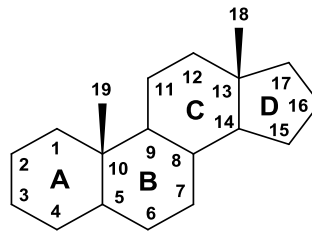
Within this framework investigation, epiandrosterone (**8**) was incubated with *Penicillium olsonii* MRC 500780 for 5 days to see how the fungus metabolized it. A nutritional media for the fungus was created in 1 L of distilled water. The medium was uniformly dispersed into ten 250 mL Erlenmeyer flasks and cleaned in an autoclave. The flasks underwent inoculation with the fungal culture. The flasks were subjected to incubation on a shaker at 25°C for a duration of 3 days, followed by the aseptic addition of the substrate dissolved in DMF. Subsequently, all flasks underwent continued incubation under identical conditions for an additional 5 days period. Following the incubation period, separation of the fungal mycelium from the broth was achieved through vacuum filtration. The mycelium underwent rinsing with ethyl acetate, while the broth was subsequently subjected to extraction using the same solvent, ethyl acetate. The extracts were dehydrated using anhydrous sodium sulfate and subsequently evaporated under vacuum conditions, yielding a brown gum, which underwent chromatographic separation on silica gel 60. From the chromatographic study, 15 α -hydroxy-5 α -androstan-3,17-dione (**18**), 3 β ,15 α -dihydroxy-5 α -androstan-17-one (**19**), 3 β ,11 α -dihydroxy-5 α -androstan-17-one (**20**), and 3 β ,7 α -dihydroxy-5 α -androstan-17-one (**21**) were obtained. The identification of these compounds was accomplished by correlating the melting points, IR, and NMR spectra of the original substrate with those of the resultant metabolites.

1. GİRİŞ

Organizmaların büyümesi ve gelişimi için hayati öneme sahip olan amino asitler, karbohidratlar, yağlar, nükleotidler ve organik asitler gibi bileşiklere temel metabolitler denir. Diğer taraftan, canlıların gelişimi, büyümesi ve üremesi için zorunlu olmayan, ancak çeşitli biyolojik etkileri olan organik bileşiklerin geniş bir yelpazesi olan sekonder metabolitler daha yaygın olarak doğal ürünler olarak bilinir [1, 2].

Doğal ürünler genellikle bitkiler, hayvanlar, mikroorganizmalar, böcekler, bitki patojenleri, endofitler ve deniz organizmaları gibi çeşitli doğal kaynaklardan elde edilir ve izole edilir [3]. Bu doğal ürünler genellikle terpenoidler, alkaloidler, yağ asitleri fenolik bileşikler, poliketidler, amino asitler, spesifik karbohidratlar, spesifik peptitler ve steroidler gibi çeşitli kategorilere ayrılır [2, 4].

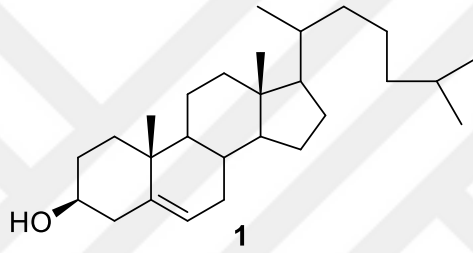
Steroidler, lipofilik ve düşük moleküler ağırlıklı bileşikler olup birçok önemli fizyolojik rol oynarlar. "Steroid" terimi Yunanca "stereos" kelimesinden gelir ve "katı" anlamına gelir. Steroidler, bir siklopentanoperhidrofenantren halkası (steran halkası) içeren bileşiklerdir. Bu halka, A, B, C olarak adlandırılan birbirine bağlı üç sikloheksan halkası ve birbirine bağlı bir siklopentan halkası olan D'den oluşur (Şekil 1.1). Çoğu steroid molekülü, sırasıyla C-18 ve C-19 olarak da bilinen C-10 ve C-13'te metil gruplarını içerir. Steroidler genellikle C-3 ve C-17'de hidroksil veya karbonil gruplarına sahiptir. Ayrıca, bazı steroidler, D halkasındaki karbon 17'ye bağlı zincirleri içerir [5].



Şekil 1.1. Genel steroid yapısı [4].

Steroidler, belirli bir kimyasal yapıya sahip önemli organik bileşiklerin bir grubudur. Bu grup içinde en iyi bilinenler, 17. karbon pozisyonunda 7, 8 veya 9 karbon atomundan oluşan alifatik yan zincirlere sahip olan ve üçüncü karbon atomunda bir hidroksil grubuna sahip sterollerdir. En yaygın üç sterol ise kolesterol, stigmasterol ve ergosteroldür. Kolesterol insanlarda ve diğer hayvanlarda bulunurken, stigmasterol ve ergosterol bitkilerde ve küflerde bulunur [6].

Kolesterol, vücutta en bol bulunan steroiddir ve hem insanlarda hem de hayvanlarda hücre zarlarının akıcılığını düzenlemede kritik bir rol oynar. Buna ek olarak, steroid hormonları, safra asitleri, D3 vitamini gibi gerekli fonksiyonlara sahip birkaç diğer madde biyosentezi için esas bir öncüdür. Aslında, tüm memelilerdeki steroidlerin kolesterol kökenlidir [6, 7].



Şekil 1.2. Kolesterol yapısı [7].

Steroid hormonların fizyolojik ve terapötik rolleri, fizyolojik süreç düzenleyicileri olarak iyi bilinmektedir. Steroid hormonlar ayrıca fetal yaşamdan yetişkinliğe kadar bir dizi fizyolojik ve gelişimsel süreci kontrol eder. Fizyolojik etkilerine göre, mineralokortikoidler, glukokortikoidler, progestagenler, androjenler ve östrojenler gibi beş tür steroid hormon bulunmaktadır. Aldosteron, en önemli fizyolojik mineralokortikoiddir ve sıvı ve elektrolit dengesini kontrol etme yeteneğiyle öne çıkar. Glukokortikoidler, karbohidratları mobilize etme yetenekleri ile bilinir ve aynı zamanda yağ, glukoz ve protein metabolizmasını düzenlemede geniş bir rol oynarlar. Östrojenler, kadın üreme sisteminde rol oynar ve kadınlarda ikincil cinsel özellikleri oluşturmanın yanı sıra immunolojik, dolaşım, iskelet ve nöroendokrin sistemler gibi birçok biyolojik sistemde de yer alır. Progesteron, üreme sisteminde hayati bir rol oynar ve gebeliğin erken aşamasını sürdürmeye yardımcı olur. Androjenler ise erkeklerde ikincil cinsel özelliklere neden olur [8, 13].

Dehidroepiandrosteron (DHEA) (3 β -hidroksi-androst-5en-17-on), adrenal korteks, gonadlar, beyin ve gastrointestinal sistemde sentezlenen endojen bir steroiddir.

Dolaşımdaki en bol steroid olan sülfatlanmış türevi olan DHEAS (10), genç yetişkinlerde yaygın olarak bulunur. Ancak, yaşla birlikte seviyeleri dramatik bir şekilde düşer ve yaşlanma ile ilişkilendirilen dejeneratif değişikliklerle bağlantılıdır. DHEA (3), kemik, kas, deri ve beyin hücrelerini doğrudan koruyabilir, bağışıklık yanıtını, inflamasyonu ve lipid metabolizmasını değiştirebilir ve glukokortikoidlerin zararlı etkilerini hafifletebilir [14].

Klinik ve deneysel çalışmalar, insanlarda ve diğer memelilerde DHEA/DHEAS'ın çok işlevli steroidler olduğunu ve obezite, diyabet, kemik metabolizması, nöroproteksiyon, ateroskleroz ve anti-tümörijenesis gibi geniş bir biyolojik süreç yelpazesinde rol aldığını göstermiştir. DHEA (3) ve sülfatı, gama-aminobütirik asit (GABA) ve N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörleri üzerindeki modülatör etkileriyle güçlü nöroaktif steroidlerdir [14].

DHEA (3), insanlarda ve kemirgenlerde, androst-4-en-3,17-dion (4-adion) yoluyla androjen ve östrojen sentezinde fizyolojik bir öncü olarak görev yapar. Bu etkilerin mekanizmalarını aydınlatmak için birçok çalışma yapılmıştır. Ancak, mevcut veriler, DHEA'nın (3) birleşik bir mekanizma yerine çeşitli yerlerde ve seviyelerde etkili olduğunu göstermektedir. DHEA'nın (3) insanlarda ve kemirgenlerdeki çoklu etkileri tam olarak anlaşılamamıştır, ancak bu etkiler, DHEA'nın (3) biyolojik olarak aktif oksijenli metabolitlere dönüşümünü içerebilir [14].

DHEA (3), kolesterolden bir dizi sitokrom P₄₅₀ reaksiyonu ile türetilen, doğal olarak oluşan bir C-19 adrenal steroididir ve epiandrosteron (3 α -hidroksi-5 α -androstan-17-on, EpiA) (8) metabolitinin öncüsüdür. EpiA'nın (8) oluşumu iki mekanizmayla gerçekleşir: (4) androst-4-en-3,17-dion (4-adion)'un enon halka A'sının tam indirgenmesi ve 4-adionun Δ 4 çift bağının ve 3 α -ketonunun seçici indirgenmesiyle 5 α -androstan-3 α ,17 α -diol (3 α ,17 α -AAD) oluşturulması, ve ardından 17 α -oksidasyonu ile EpiA'nın (8) sentezlenmesi (Şekil 1.3). DHEA (3), steroid üreten dokularda, androjenler ve östrojenlere metabolize edilir. Ayrıca memeli dokularında, özellikle insan karaciğerinde, EpiA (8) ile birlikte oksijenli türevlerine metabolize edilir. Sitokrom P₄₅₀-7B1 (CYP7B1), NADPH kullanarak tüm 3 β -hidroksisteroidlerin (kolesterol (1) hariç) 7 α -hidroksilasyonundan sorumludur. 3 β -hidroksisteroidler, beyin, karaciğer, deri ve eklemler gibi hidroksilazın ifade edildiği dokularda pregnenolon ve 5 α -androstan-3 α ,17 α -diol içerir. Bu dokular, ayrıca, 7 α -hidroksisteroidleri karşılık gelen 7 β -hidroksisteroidlere dönüştüren NADP(H) bağımlı

Das Diagramm zeigt den Syntheseweg der Steroidhormone. Die Strukturen sind wie folgt beschriftet:

- Kolesterol 1**
- Pregnenolon 2**
- Dehydroepiandrosteron 3**
- DHEA-sulfat 10**
- Dihydrotestosteron 6**
- Testosteron 5**
- Androst-4-en-3,17-dion 4**
- Etiokolanon 9**
- 5α-androstan-3β,17β-diol 7**
- Epiandrosteron 8**

4

2. LİTERATÜR TARAMASI

Bir biyolojik sistem için yabancı olan ve çeşitli etkilere sahip olan maddelere veya moleküllere "ksenobiyotik" denir. İlaçlar, gıda katkı maddeleri, pestisitler, hidrokarbonlar, çevresel kirleticiler, kanserojenler ve endüstriyel kimyasallar gibi çeşitli maddeler bu kategoriye girer. Doğaları gereği lipofiliktirler ve genellikle akciğerler, cilt veya gastrointestinal sistem yoluyla emilirler [5]. Biyotransformasyon, ksenobiyotiklerin enzimler veya hücre, doku veya organ kültürleri ile mikroorganizmaların enzim içeren sporları tarafından kimyasal olarak dönüştürülmesini ifade eder [16].

2.1. Biyotransformasyon

Biyolojik sistemlerdeki enzimler, yabancı maddeler üzerinde kimyasal değişikliklere neden olan biyotransformasyonları gerçekleştirirler. Bu süreç, bilinen ürünleri daha verimli bir şekilde üretmek için büyük bir potansiyele sahiptir [17, 19].

Biyotransformasyon, ucuz ve etkili bir şekilde kimyasal veya mikrobiyal yöntemlerle dönüştürülemeyen, kolayca temin edilebilen ön maddelerin daha değerli bir nihai ürüne dönüştürülmesini sağlar ve aynı zamanda gıda metabolitleri, ince kimyasallar ve ilaçların üretimini katalize eder [18].

Biyoteknolojik yaklaşım, farklı işlevleri ve biyolojik aktiviteleri nedeniyle ilaç kullanımında önemli olan ikincil metabolitleri üretmek için kullanılır. Bu tür ikincil bileşikler arasında glikozitler, alkaloidler, flavonoidler, terpenoidler ve uçucu yağlar bulunur [18].

Doğal dönüşüm süreci, biyotransformasyonun aksine düşük verimli, spesifik olmayan ve spesifik reaksiyonlar vermede zayıf bir süreçtir. Biyotransformasyon ise çok adımlı kimyasal reaksiyonları azaltabilir, daha kısa sürede ve daha düşük maliyetle gerçekleşen, spesifik reaksiyonlar verebilen, ve iyi bir verim elde etmek için tek bir adımın yeterli olduğu hızlı ve basit bir süreçtir. Yan reaksiyonlar minimaldir ve substratlar doğal veya sentetik olabilir. Ayrıca, biyotransformasyon nötr pH, ılımlı

sıcaklık (20-40°C) ve atmosferik basınç gibi koşullarda gerçekleştirilebilir ve bir dizi enzim aktivitesini ifade eden hücre kültürleri kullanılarak birden fazla reaksiyon gerçekleştirilebilir, böylece çevresel kirlilik azaltılabilir [18]. Biyotransformasyon, bir substratın mikrobiyal (enzimatik) dönüşümü ile ürün elde etme sürecidir [19].

Günümüzde biyotransformasyonlarda, yarı sentetik enzimler, modifiye edilmiş enzimler, antikör yapısına sahip enzimler veya abzimler kullanır. Metabolitleri izole etmek için kullanılan ayırma tekniklerinin enzimi denatüre etmesi ve yeniden kullanılmasını sınırlaması, enzimleri içeren biyotransformasyon araştırmalarındaki en önemli sorunlardan biridir. Enzim sabitleme bu soruna çözüm sağlamıştır [20]. Sabitlemeden sonra, çok sayıda enzim ve mikroorganizma bu şekilde sürekli olarak kullanılabilir. Enzimleri içeren biyotransformasyon araştırmalarında, çoğu organik substratın suda sınırlı çözünürlüğü başka bir zorluk teşkil eder. 1985 yılında, bazı enzimlerin özellikle lipazların organik çözücülerde kullanılabileceği gösterildiğinden, bu biyotransformasyonlar daha yaygın hale gelmiştir [4].

2.2. Enzimler, Avantajları ve Dezavantajları

Enzimler altı grupta sınıflandırılır: Oksidoredüktazlar, C-H, C-C ve C=C bağlarının oksijenasyonu ve hidrojen atomu eşdeğerlerinin uzaklaştırılması gibi oksidasyon-indirgeme reaksiyonlarıdır. Transferaz, açıl, şeker, fosforil, aldehit ve keton gibi fonksiyonel grupların transfer reaksiyonudur. Hidrolaz reaksiyonları kimyasal bir bağ kırmak için su kullanır; örneğin C-N içeren fonksiyonlarda esterler, anhidritler, peptitler, amidler ve glikozitlerde olduğu gibi. Liyaz reaksiyonları, fonksiyonel grupların hidroliz olmadan eklenmesi veya çıkarılmasıdır; örneğin, C=C, C=N ve C=O bağlarına HX eklenmesi gibi. İzomeraz reaksiyonları, bir bileşiğin izomerine dönüştürüldüğü reaksiyonlardır; cis-trans izomerizasyonu ve C=C bağı göçü gibi. Ligaz reaksiyonları, karbon ve başka bir atom arasında yeni bağların olduğu reaksiyonlardır; örneğin, fosfat ester bağlarının ve C-O, C-S, C-N, C-C bağlarının oluşumu. Organik sentezde gerçekleştirilen yararlı biyotransformasyonların çoğunluğu hidrolaz sınıfına ait enzimlerle yapılır. Oksidoredüktaz ikinci sıradadır ve geri kalanların kullanımı düşüktür [21].

Enzimlerin biyokatalizör olarak birçok avantajı vardır. Örneğin, organik sentezde enzim kullanımı, enzimsiz bir reaksiyona göre 10^8 - 10^{10} kat hızlı şekilde işlevlerini

yerine getirerek birçok fayda sağlar [19]. Ayrıca, etkili olabilmeleri için çok düşük miktarda katalizöre ihtiyaç duyarlar [19, 20].

Enzimler, yeniden düzenleme, bozunma, izomerizasyon, rasemizasyon gibi istenmeyen yan reaksiyonları en aza indiren ılımlı koşullarda (20-40°C) çalışır ve genellikle pH 5-8 aralığında etkili olurlar. Bunun nedeni, enzimlerin protein doğasına sahip biyomoleküller olmaları ve pH ile sıcaklık gibi parametrelerin enzimatik reaksiyonu hızlandırmak için çok az değiştirilebilir olmasıdır [19, 20]. Ek olarak, enzimler geniş bir reaksiyon yelpazesini katalize edebilir ve substratın aktif olmayan tarafında reaksiyonları teşvik edebilirler. Ayrıca, büyük miktarda substratı kabul edebildikleri için çeşitli doğal olmayan maddeleri kabul etmeye tolerans gösterirler [19, 20].

Enzimler, kemo-regio seçicilik sahiptir; bu da demektir ki, son ürün genellikle daha temiz olma eğilimindedir ve safsızlıklar ile istenmeyen yan reaksiyonları gidermek daha kolaydır çünkü enzimler genellikle belirli bir tip fonksiyonel gruba etki ederler. Diğer fonksiyonellikler kemo-seçiciliği nedeniyle değişmeden kalacaktır. Ayrıca, enzimler regio-seçicidir çünkü karmaşık üç boyutlu yapıları sayesinde aynı substrat molekülü içinde farklı pozisyonlarda bulunan, ancak aynı olan fonksiyonel grupları ayırt edebilirler [20].

Birçok organik bileşik, suda çözünmediği için, enzimlerin çalışma ortamı olarak en tipik olanı sudur. Ancak, enzimler su dışındaki ortamlarda da çalışabilirler. Ayrıca, ağır metallerin aksine, tamamen biyolojik olarak parçalanabilir oldukları için çevre açısından kabul edilebilirler [19, 20].

Doğada çoğunlukla protein yapısına sahip olan enzimler, klasik sentez süreçlerinde kullanılan çoğu reaktanın aksine, çevre dostu olarak kabul edilirler çünkü parçalanabilirler [20].

Enzimler, kiral biyomoleküller olarak, enantio-seçicilikleri sayesinde diğer yöntemlerle zor veya imkansız olan reaksiyonları etkin bir şekilde katalizleyebilirler. Yalnızca L-amino asitlerden oluşmaları nedeniyle, prokiral bir maddeye etki ederek onu sadece bir enantiyomere dönüştürürler. Ayrıca, eğer bir enzim rasemik bir karışımda yalnızca bir enantiyomeri etkiliyorsa, bu rasemik karışımların ayrılmasını sağlayabilir [20].

Enzimler, çeşitli reaksiyon türlerini katalize edebilen biyokatalizörlerdir. Sentetik işlemlerin neredeyse her biri için bir enzimatik reaksiyon karşılığı bulunmaktadır. Alkan, alken, aromatik bileşiklerin yanı sıra alkol, aldehit, keton, sülfür ve sülfidlerin oksidasyonu veya indirgenmesi, karboksilasyon, dekarboksilasyon, alkilasyon, lakton, laktam, amid, ester, eter, epoksit, asit anhidriti ve nitrillerin sentezi veya hidrolizi gibi çeşitli reaksiyonlar enzimler aracılığıyla gerçekleştirilebilir. Ayrıca, Michael eklemesi, Diels-Alder reaksiyonları, asilasyon ve aldol süreçleri, dehalojenasyon ve halojenasyon, amonyak, izomerizasyon ve hidrojen siyanürün ilave edilmesi veya çıkarılması gibi reaksiyonlar da enzimler tarafından katalizlenebilir [20].

Yukarıdaki enzim özellikleri, organik sentez metodlarıyla zor veya yapılması güç olan reaksiyonların, enzimler aracılığıyla kolayca gerçekleştirilebileceğini göstermektedir. Ancak, enzimlerin kullanımıyla ilişkilendirilen bazı dezavantajlar da bulunmaktadır. Örneğin, çoğu enzim, reaksiyonlarını gerçekleştirmek için pahalı ve kararsız bileşikler olan kofaktörlere ihtiyaç duyar [20].

Ayrıca, enzimlerin kullanımı bazı istenmeyen şartlara da neden olabilir. Örnek olarak, bir enzimin yalnızca bir enantiyomerik formu vardır ve sadece belirli bir enantiyomerle reaksiyona girebilir, çünkü diğer enantiyomerik formun biyosentezi için ortak bir yöntemi bulunmamaktadır [20].

Bazı enzimlerin doğal kofaktörlere gereksinim duyması önemlidir. Enzimatik reaksiyonlarla ilgili olarak, NADH ve NADPH gibi kofaktörlerin reaksiyon ortamında bulunması ve yenilenmesi gereklidir. Enzimatik reaksiyonların başlıca dezavantajı, kofaktörlerin genellikle çok pahalı ve kararsız olmalarıdır ve sentetik muadilleriyle değiştirilememeleridir [20].

Enzimlerin yalnızca doğal ortamlarında substratlarını etkilediği şeklinde bazı dogmatik varsayımlar olsa da, çoğu enzim pahalı ve son derece hassastır; ayrıca bazı alerjik reaksiyonlara da neden olabilirler [21].

2.3. Biyotransformasyon Teknikleri

Biyotransformasyonlar genellikle iki yöntemle gerçekleştirilir: tam hücre sistemleri veya izole edilmiş enzimler. "Tam hücre sistemleri" terimi, mikroorganizmalarla birlikte bitki ve hayvan hücreleri, dokuları ve organ kültürlerini ifade eder. Biyotransformasyon reaksiyonlarında, tam hücre sistemlerinin tercih edilmesinin ana

nedenleri şunlardır: hücre dışında çoğu enzimin hücre içinde kararsız olması, bazı proteolitik enzimlerin hücre içi enzimleri homojenizasyon sırasında hidrolize etmesi ve hücre içi enzimlerin sürekli olarak kofaktörlere ihtiyaç duyması ve izole edilmesi gerekliliği. Bu durum hem maliyetli hem de karmaşıktır [22].

2.4. Mikrobiyal Biyotransformasyon

Mikrobiyal biyotransformasyonlar mikroorganizmaların katalizörlüğü eşliğinde, bir bileşiğin benzer olan başka bir bileşiğe dönüşmesi olarak ifade edilir [23]. Mikrobiyal hücreler, biyotransformasyon reaksiyonları için en yaygın tercih edilen hücre sistemlerinden biridir. Mikrobiyal hücrelerin, bitki ve hayvan hücrelerine kıyasla daha hızlı büyüme ve gelişme özellikleri vardır. Bu hızlı büyüme özelliği, mikroorganizmalarla yapılan biyotransformasyonların hızlı ve verimli bir şekilde gerçekleşmesini sağlar [20]. Ayrıca, mikrobiyal hücreler bitki ve hayvan hücrelerine kıyasla daha geniş bir yelpazedeki substratları metabolize edebilme yeteneğine sahiptirler [24].

Mikrobiyal hücreler, küçük boyutları ve sağlam hücre duvarı yapıları nedeniyle, mekanik olarak daha stabil olmaları açısından bitki ve hayvan hücrelerine göre avantajlıdır. Bu özellikleri, çeşitli kültür tekniklerinde bu tür hücrelerin ortama daha iyi uyum sağlamasını sağlar [24].

Mikrobiyal biyotransformasyonların günümüzde biyoteknolojide önemli bir alan oluşturmasının nedeni, klasik sentezlere göre daha ılımlı koşullar altında gerçekleşmeleri ve kısa sürede tamamlanmalarıdır. Çoğu mikrobiyal biyotransformasyon, 1 atmosfer basınçta ve oda sıcaklığında gerçekleşir [25].

Mikroorganizmalar genetiksel olarak değiştirilebilir. Bu mikroorganizmalarda yapılan genetik değişiklikler ve diğer kimyasal metodlar ile elde edilen önemli ürünler, daha yüksek verimlilikle elde edilebilir. Öyle ki genetik değişiklikler sayesinde, ürünlerde istenilen değişikliklerin bile sağlanması mümkündür [26].

Mikroorganizmalar, yapısındaki özgün olmayan enzim sistemleri sayesinde hem sentetik hem de doğal birçok farklı substrat üzerinde çeşitli kimyasal reaksiyonları gerçekleştirebilirler [24].

Mikrobiyal hücreler, bazı nedenlerden dolayı biyotransformasyon için ideal bir seçimdir:

- Mikrobiyal biyotransformasyon yüksek yüzey-hacim oranına sahiptir.
- Mikrobiyal hücrelerin daha yüksek büyüme oranları, biyokütle dönüşümünün süresini azaltır.
- Mikroorganizmalardaki metabolizma oranının yüksek olması, substratın verimli bir şekilde dönüşümüne yol açar.
- Mikroorganizmalar kullanıldığında steril koşulları korumak daha kolaydır [27].

Mikrobiyal biyotransformasyonlar, klasik kimyasal metodlara kıyasla daha düşük maliyetle ve daha kısa süre içerisinde gerçekleştirilebilir. Hedef bileşikler, genellikle daha yüksek verimle ve daha kısa sürede, besiyeri bileşenleri ve mikroorganizmalar kullanılarak elde edilir; bu da kimyasal reaktiflerin maliyetlerine kıyasla daha ekonomik bir yol sunar [26].

Mikrobiyal biyotransformasyonlar doğa dostudur. Genelde yapılan kimyasal sentez yöntemlerinde tercih edilen birçok reaktif, doğaya ciddi zararlar verebilir [20]. Mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonları enantioselektiftir. Klasik kimyasal sentez yöntemleri genellikle hedef molekülleri ayırması zor olan rasemik karışımları üretir. Bilhassa ilaç aktif maddelerinin tayin edilmesinde tek enantiyomer elde etmek son derece elzemdir. Tek enantiyomerin seçici olarak üretilmesi için mikroorganizmaların kullanımı günümüzde giderek yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır [28].

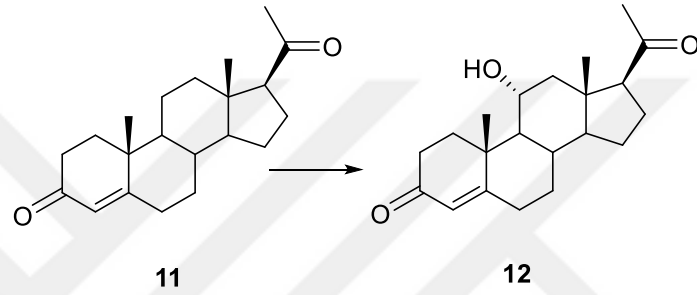
Klasik kimyasal sentez metodlarına farklı olarak mikrobiyal biyotransformasyonlar sırasında maddeler üzerindeki diğer fonksiyonel grupların korunması gerekmemektedir. Bu avantaj enzimlerin regio-seçicilikleri nedeniyle kaynaklanmaktadır [29].

Mikrobiyal biyotransformasyonlar çoğunlukla fonksiyonel gruplara ihtiyaç duymazlar. Örneğin, mikrobiyal hidroksilasyonlar, fonksiyonel gruplardan uzak bölgelerde gerçekleşebilir [20].

Mikroorganizmalar farklı ortamlara rahatça uyum sağlarlar. Bu özelliğinden dolayı erlenden fabrika fermantörlerine kadar birçok ortama kolay bir şekilde uyarlanarak kullanılırlar [26].

Mikrobiyal hidroksilasyonun önemi, kortikal steroidlerin kullanılarak bir anti-enflamatuar maddenin sentezi sırasında 1952'de ortaya çıktı. *Rhizopus arrhizus* küfünün, kortikal steroidlerin sentez sürecini tek bir adımda gerçekleştirebildiği keşfedildikten sonra, mikrobiyal biyotransformasyon büyük ilgi gördü. Bu süreç, oksijen fonksiyonunu C-11 pozisyonuna yerleştirir ve sentez için fonksiyonel grup bulunmadığından, fonksiyonel gruplardan uzak bir noktada gerçekleşir. Ancak, bu sürecin uzun sürdüğü ve yüksek maliyetli olduğu bulundu.

Belirtilen reaksiyonun, keşfi sonucunda, progesteron (**11**) mikrobiyal, hidroksilasyon yoluyla 11 α -hidroksiprogesterona, dönüştürüldü [19, 20, 30, 31].



Şekil 2.1. İlk mikrobiyal hidroksilasyon [20].

Bu nedenle, çeşitli mikroorganizmalar arasında küfler, mayalar ve bakteriler, serbestçe veya belirli yüzeylere sabitlenerek ilaç ve hormon üretimi için mikrobiyal dönüşümde kullanılırlar. Birçok steroid, anti-enflamatuar, idrar söktürücü, anabolik, doğum kontrolü, antiandrojenik, pregestatif ve antikanser gibi çeşitli uygulamalarda kullanılan ilaçlar olarak sıklıkla değerlendirilir [25, 30].

2.5. Küfler ile Steroid Biyotransformasyonları

Steroidlerin biyotransformasyon reaksiyonlarının yüksek bölge ve stereoseçiciliği sayesinde, ilaçlar ve hormonlar gibi önemli fonksiyonel bileşiklerin üretiminde geniş çapta kullanılmaktadır. Bu durum, 1952 yılında *Rhizopus* türü tarafından progesteronun 11 α -hidroksilasyonunu belirlemek için Murray ve Peterson'un çalışmasıyla keşfedilmiştir. O zamandan beri, steroidlerin ilaç ve hormon üretiminde mikrobiyal biyotransformasyonunun önemi giderek daha fazla vurgulanmaktadır [33, 34].

Mevcut mikrobiyal biyotransformasyonun etkinliğini artırmak, yeni reaksiyonları ve kullanılabilecek mikroorganizmaları tanımlamak, istenilen yapısal dönüşümü

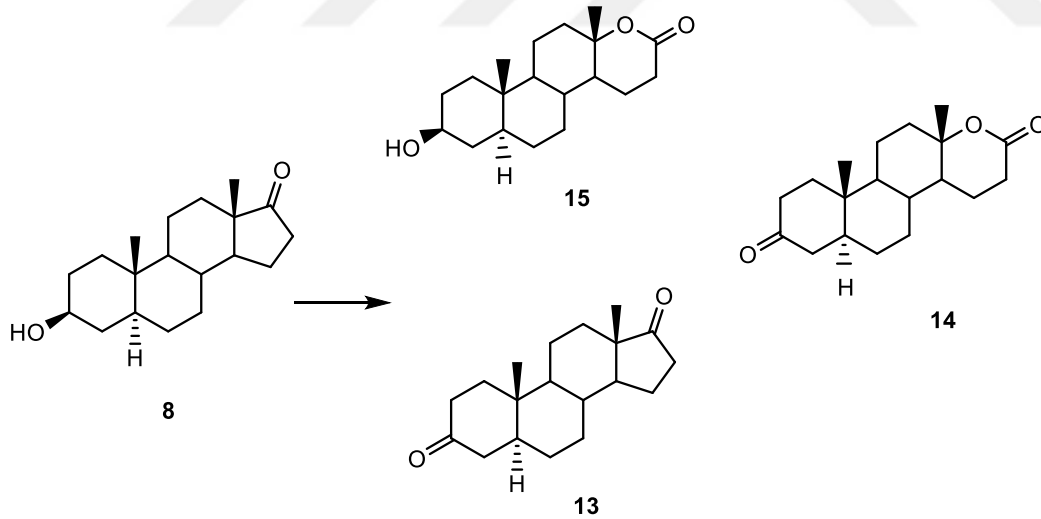
gerçekleştirebilecek mikroorganizmaları izole etmek için çalışmalar devam etmektedir [34, 35].

Mikrobiyal steroid biyotransformasyonu, bir dizi farklı küf türü tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu araştırmalar, mikrobiyal hidroksilasyonlar, Baeyer-Villiger oksidasyonları, aromatisasyon süreçleri, keton gruplarının indirgenmesi, yan zincirlerin çıkarılması, mikrobiyal hidrojenasyonlar, dehidrojenasyonlar, hidroksil gruplarının oksidasyonu gibi çeşitli farklı reaksiyonları içerir [19, 20, 33, 36].

2.6. *Penicillium* Türleri ile Epiandrosteron (8) Biyotransformasyonları

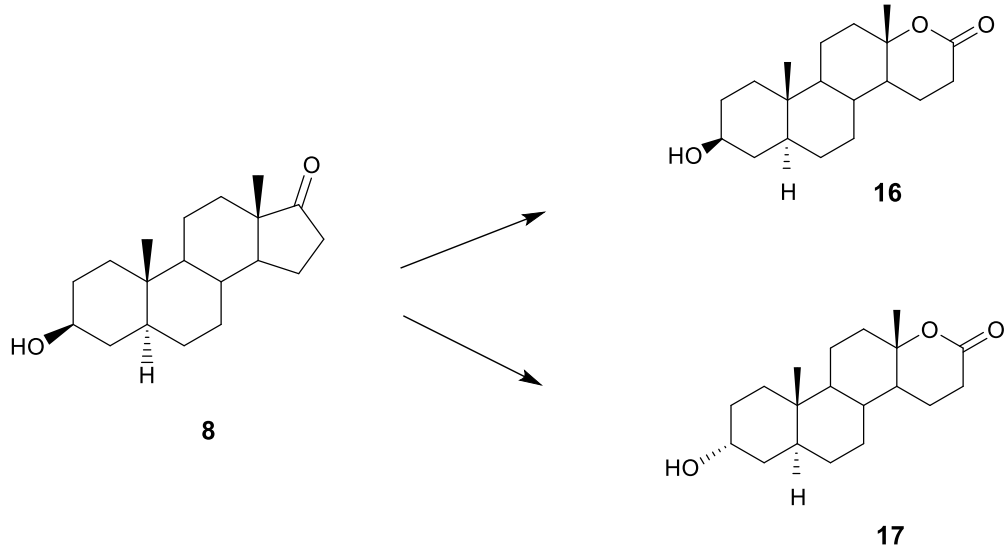
Farklı steroidlerin *Penicillium* türleri ile biyotransformasyonu genellikle Baeyer-Villiger oksidasyonu, mikrobiyal hidroksilasyon, mikrobiyal hidrojenasyon ve dehidrojenasyon gibi süreçlerle sonuçlanmıştır. Literatürde, Epiandrosteron'un (8) *Penicillium* türleriyle inkübasyonu üzerine iki çalışma bulunmaktadır [37,38].

Örneğin, *P. vinaceum* izolatu ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.2.) androstandion (13), 17a-oxa-d-homo-5 α -androstan-3, 17-dion (14), 3 β -hidroksi-17a-oxa-d-homo-5 α -androstan-17-on (15) metabolitlerini vermiştir [37].



Şekil 2.2. *P. vinaceum* ile inkübasyon [37].

P. lanosocoeruleum KCH 3012 ile epiandrosteronun inkübasyonu (şekil 2.3.) 3 α -hidroski-17a-oxa-d-homo-5 α -androstan-17-on (16) ve 3 β -hidroksi-17a-oxa-d-homo-5 α -androstan-17-on (17) metabolitlerini vermiştir [38].



Şekil 2.3. *P. lanosocoeruleum* KCH 3012 ile inkübasyon [38].

2.7. Çalışmanın amacı

Bu çalışmanın amacı epiandrosteron (8) bileşiğinin *Penicillium olsonii* MRC 500780 izolatu ile biyotransformasyonunun incelenmesi ve bu küf tarafından nasıl metabolize edileceğinin araştırılmasıdır.



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Genel Bilgiler

Cam malzemeler ile besiyerleri otoklavda (Nüve OT 40 L) 20 dakika süre ve 121 °C’de sterilize edildi. Yatık agar besiyerine küf nakli, sterilizasyon işlemi yapılmış erlenlere küf ve madde nakli steril kabinde (Nükleon marka cihaz) gerçekleştirildi. İnkübasyonlar çalkalamalı inkübatör (Gerhardt THO 500 Laboshake) ile gerçekleştirildi. Perkin Elmer SpectrumTwo spektrometresi kullanılarak steroidlerin infrared spektrumları alındı. ¹H NMR spektrumları çözücü olarak CDCl₃ (döterokloroform) ve iç sinyali ise C₄H₁₂Si (tetrametilsilan) standardı kullanılarak Variann Mercury 300 NMR spektrometresi ile 300 MHz’de alındı. ¹³C NMR spektrumları solvent olarak döterokloroform kullanılarak Variann Mercury 300 NMR spektrometresi ile 75 MHz’de bakıldı. Steroidlerin erime noktaları Elektrothermal IA 9200 model cihaz ile ölçüldü.

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

3.2. Deneysel Çalışmalar

3.2.1. Yatık agar besiyeri hazırlanışı

1,7 g agar ve 11,7 g PDA (potato dekstrozu agar) karışımı distile su ile 300 mL’ye tamamlandıktan sonra kaynatılarak yatık agar besiyeri hazırlandı. Besiyeri soğumadan önce deney tüplerine yarısına kadar ilave edildikten sonra tüp ağzları yeterli miktarda pamuk ile kapatıldı. Ağız kısımları alüminyum folyo ile sarılmış olan tüpler otoklavda 20 dakika 121°C’de sterilize edildi. Tüplerdeki eritilmiş besiyeri

donma noktasına gelmeden takriben 45 derecelik bir açıyla soğumaya bırakıldıktan sonra yatık agar besiyerleri temin edildi.

3.2.2. Küf kültürlerinin hazırlanışı ve tazelenmesi

Kültür koleksiyonundan satın alınan küf sonradan hazırlanan yatık agar besiyerinin 3 tanesine steril şartlarda ilave edilip 25 °C’de gelişmeye bırakıldı. Bu şekilde tazelenmiş yatık agar kültürlerindeki en gelişmiş küf iki hafta aralıklar ile yeni yatık agar besiyerine steril koşullarda aktarma işlemi yapıldı. Aynı işlem iki kez tekrarlandı. Sonrasında mevcut en iyi ve taze gelişmiş küf biyotransformasyon çalışmasında kullanıma alındı.

3.2.3. Küf besiyerinin hazırlanışı

P. olsonii MRC 500780 küfüne ait 1 L besiyeri glukoz (30 g), pepton (10 g), distile su içinde çözdürülüp karıştırılarak hazırlandı.

3.2.4. Biyotransformasyon deneyi

P. olsonii besiyeri 250 mL’lik 10 ayrı erlene bölündükten sonra otoklavda sterilize edildi. *P. olsonii* küf bu erlenlere steril şartlarda ilave edildikten sonra çalkalayıcı inkübatörde 25 °C, 150 rpm’ de 3 gün süre ile inkübasyon işlemi için bırakıldı. İnkübasyon akabinde epiandrosteron (0,5 g) steril şartlarda DMF (5 mL) içinde çözdürülerek erlenlere eşit şekilde aktarıldı ve daha sonra erlenler 5 gün daha 25°C’de inkübasyona bırakıldı.

Biyotransformasyon çalışması bir adet kontrol erleni ile gözlemlendi. 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 çalışmasına ait sonuçların kabul edilebilir ve bilimsel olduğu olduğunu gösterdi.

3.2.5. Metabolitlerin saflaştırılması ve yapılarının tayini

İnkübasyon akabinde küfe ait olan besiyeri filtrasyonla misellerinden süzüntü olarak süzüldü ve miseller bir miktar etil asetat (500 mL) ile yıkamaya tabii tutuldu.

Filtrattaki steroidler etil asetat (1 L) ile 3 defa ekstrakte edildi. Toplanan ekstrakt ürünlerine susuz sodyum sülfat ilave edilerek ekstraktlar susuzlaştırıldı.

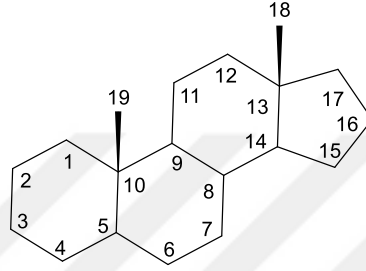
Etil asetat estraktların evaporatörde uçurulması ile yağımsı bir madde temin edildi ve bu yağımsı maddeyi epiandrosteron ile karşılaştırmak için bir İTK çalışması uygulandı. Yağımsı maddedeki steroidler İTK çalışmasının sonuçlarına göre silisyum dioksit jel 60'ın (230-400 mesh , merck 107734) absorban ve *n*- hekzan içerisinde artan etil asetat derişimlerini ise elüent olarak kullanıldığı bir kolon kromatografisi çalışması ile saf hale getirildi. Epiandrosteron ile her steroidin IR, NMR spektrumları ve erime noktası karşılaştırılarak yapı tayinleri gerçekleştirildi.





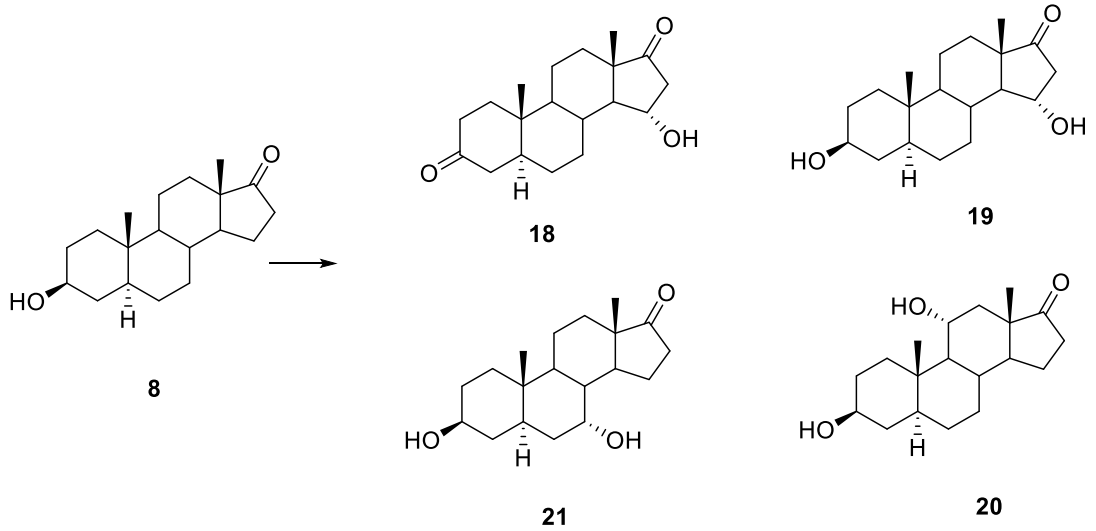
4. DENEYSEL BULGULAR

Bu çalışmada karbon iskeleti Şekil 4.1.'de gösterilen epiandrosteron (**8**) bileşiğinin *P. olsonii* MRC 500780 küfö ile 5 gün süren biyotransformasyonları gerçekleştirildi.



Şekil 4.1. Substrata ait karbon iskeleti [4].

0,5 g epiandrosteron (**8**) bileşiğinin *P. olsonii* MRC 500780 ile inkübasyonundan kahverengi sakızımsı bir karışım (1083 mg) elde edildi. Bu karışım ile yapılan kolon kromatografisi çalışması değişmeyen başlangıç maddesi (123 mg) ile 15 α -hidroksi-5 α -androstan-3,17-dion (**18**), 3 β ,15 α -dihidroksi-5 α -androstan-17-on (**19**), 3 β ,11 α -dihidroksi-5 α -androstan-17-on (**20**) ve 3 β ,7 α -dihidroksi-5 α -androstan-17-on (**21**) ürünlerini verdi (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Epiandrosteronun *P. olsonii* MRC 500780 ile inkübasyonu.

15 α -hidroksi-5 α -androstan-3,17-dion (**18**) (%8, 42 mg).

Erime noktası: 162-163 °C, lit., 159-161 °C [39].

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3380 ve 1730.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,93 (3H, s, 18-H), 1,07 (3H, s, 19-H), 2,11 (1H, d, J = 6,5 Hz, 16-H). 2,97 (1H, d, J = 8,2 Hz, 16-H), 4,40 (1H, td, J = 1,5 ve 6,5 Hz, 15 β -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	(8)	(18)	(19)	(20)	(21)
1	36,87	38,37	36,94	38,43	36,61
2	31,36	37,93	31,46	31,56	31,29
3	71,06	212,21	71,00	70,65	70,97
4	37,98	44,35	37,90	38,36	37,47
5	44,76	46,17	44,44	44,98	37,03
6	28,33	28,45	28,31	28,80	35,68
7	30,83	31,59	35,31	30,66	66,44
8	34,98	35,07	32,17	34,10	39,05
9	54,35	53,35	54,03	60,27	46,02
10	35,58	35,64	35,59	37,26	35,68
11	20,44	20,42	20,34	68,44	20,24
12	31,47	31,25	31,31	42,74	31,29
13	47,76	50,62	50,87	47,94	47,56
14	51,34	57,40	57,92	50,19	45,77
15	21,73	70,04	70,43	21,73	21,30
16	35,80	46,01	45,99	35,81	36,61
17	221,49	216,97	216,86	219,94	221,47
18	13,77	15,29	15,44	14,45	12,89
19	12,26	11,38	12,34	12,65	11,17

3 β ,15 α -Dihidroksi-5 α -androstan-17-on (**19**) (90 mg, %17).

Erime noktası: 75-76 °C, lit., 69-72 °C [39].

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3310 ve 1735.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,86 (3H, s, 19-H), 0,92 (3H, s, 18-H), 2.11 (1H, d, J = 8 Hz, 16-H). 2,99 (1H, d, J = 8,6 Hz, 16-H), 4,40 (1H, td, J = 1,5 ve 6,5 Hz, 15 β -H).

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

3 β ,11 α -Dihidroksi-5 α -androstan-17-on (**20**) (32 mg, %6).

Erime noktası: 106-107 °C, lit., 103-104 °C [40].

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3460 ve 1735.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,86 (3H, s, 18-H), 0,95 (3H, s, 19-H), 3.63 (1H, tt, J = 5 ve 11 Hz, 3 α -H), 3.96 (1H, dt, J = 5 ve 10 Hz, 11 β -H).

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

3 β ,7 α -Dihidroksi-5 α -androstan-17-on (**21**) (21 mg, %4).

Erime noktası: 196-197 °C, lit., 194 °C [40].

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3355 ve 1740.

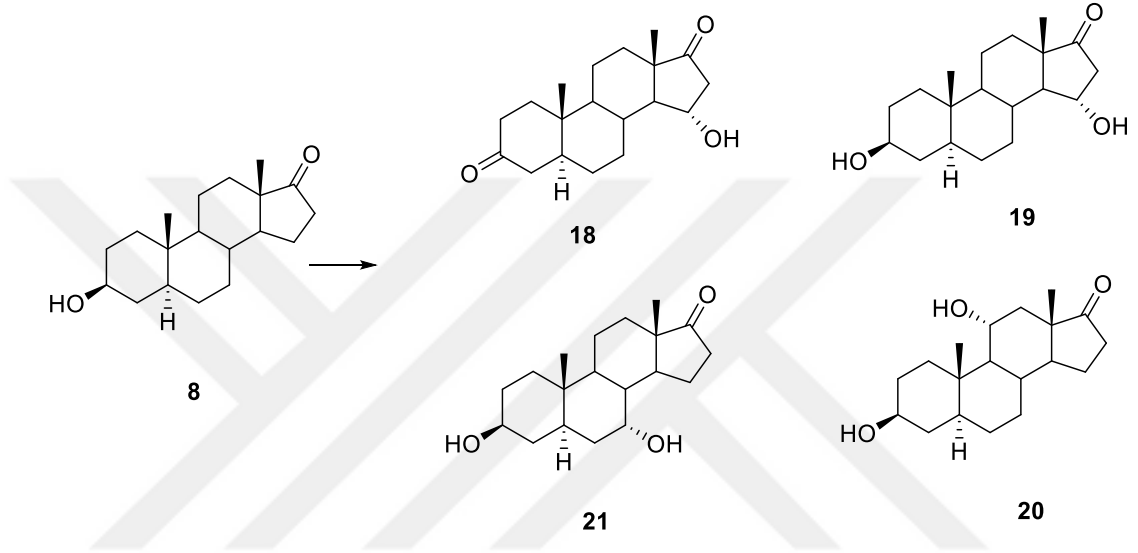
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,84 (3H, s, 19-H), 0,88 (3H, s, 18-H), 3.64 (1H, tt, J = 5 ve 11 Hz, 3 α -H), 3.98 (1H, bs, 7 β -H)

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



5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Epiandrosteron (**8**) bileşiğinin *P. olsonii* MRC 500780 ile 5 gün süren inkübasyonu Şekil 5.1.'de gösterildiği şekilde 4 farklı metabolit ile sonuçlandı.



Şekil 5.1. Epiandrosteronun *P. olsonii* MRC 500780 ile inkübasyonu.

İlk metabolitin 15 α -hidroksi-5 α -androstane-3,17-dion (**18**) olduğu tespit edildi. Metabolit ^1H NMR spektrumu δ_{H} 4.40 ppm'de 15 α -hidroksil grubunun varlığını gösteren belirgin bir rezonans (1H, td, $J = 1,5$ ve $6,5$ Hz) [41] verdi. Metabolit ^{13}C NMR spektrumunun (Tablo 5.1.) C-14 ve C-16 rezonansları aşağıya yönelmiş kaymalar (C-14 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 6,06 ppm ve C-16 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 10,21 ppm) vermesi bir 15 α -hidroksil grubunun var olduğunu daha da netleştirdi [42]. Metabolite ^1H NMR spektrumu başta olan maddenin δ_{H} 3,54 ppm'deki 3 α -H rezonansını (1H, tt, $J = 5$ ve 12 Hz) vermemesi ve metabolitin ^{13}C NMR spektrumunun δ_{C} 212,21 ppm'de yeni bir kuaterner karbon rezonansını vermesi 3 β -hidroksil grubunun oksidasyona uğradığını gösterdi.

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

C atomu	(8)	(18)	(19)	(20)	(21)
1	36,87	38,37	36,94	38,43	36,61
2	31,36	37,93	31,46	31,56	31,29
3	71,06	212,21	71,00	70,65	70,97
4	37,98	44,35	37,90	38,36	37,47
5	44,76	46,17	44,44	44,98	37,03
6	28,33	28,45	28,31	28,80	35,68
7	30,83	31,59	35,31	30,66	66,44
8	34,98	35,07	32,17	34,10	39,05
9	54,35	53,35	54,03	60,27	46,02
10	35,58	35,64	35,59	37,26	35,68
11	20,44	20,42	20,34	68,44	20,24
12	31,47	31,25	31,31	42,74	31,29
13	47,76	50,62	50,87	47,94	47,56
14	51,34	57,40	57,92	50,19	45,77
15	21,73	70,04	70,43	21,73	21,30
16	35,80	46,01	45,99	35,81	36,61
17	221,49	216,97	216,86	219,94	221,47
18	13,77	15,29	15,44	14,45	12,89
19	12,26	11,38	12,34	12,65	11,17

İkinci ürün $3\beta,15\alpha$ -dihidroksi- 5α -androstan-17-on (**19**) olarak belirlendi. Ürün ^1H NMR spektrumunda δ_{H} 4.40 ppm’de tipik bir 15α -hidroksil grubun varlığını gösteren bir rezonans (1H, td, $J = 1,5$ ve $6,5$ Hz) tespit edildi [41] Metabolit ^{13}C NMR spektrumundaki C-14 ve C-16 rezonansları aşağıya yönelmiş kaymalar (C-14 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 6,58 ppm ve C-16 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 10,19 ppm) verirken C-8 rezonansının yukarı alana yönelmiş bir γ -gauche kayması ($\Delta\delta_{\text{C}}$ 2,81 ppm) vermesi bir 15α -hidroksil grubunun varlığını daha fazla belirginleştirdi [42].

Üçüncü ürünün $3\beta,11\alpha$ -dihidroksi- 5α -androstan-17-on (**20**) olduğu tespit edildi. Ürünün ^1H NMR spektrumu δ_{H} 3.96 ppm’de bir 11α -hidroksil grubunun varlığını belli eden karakteristik bir rezonans (1H, dt, $J = 5$ ve 10 Hz) verdi [41]. Metabolit ^{13}C NMR spektrumundaki C-9 ve C-12 rezonansları aşağıya yönelmiş kaymalar (C-9 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 5,92 ppm ve C-12 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 11,27 ppm) gösterirken C-8 rezonansının yukarı alana yönelmiş bir γ -gauche kayması ($\Delta\delta_{\text{C}}$ 0,88 ppm) gösterdiği için bir 11α -hidroksil grubunun varlığını daha fazla belirgin hale getirdi [42].

Dördüncü ürünün ise $3\beta,7\alpha$ -dihidroksi- 5α -androstan-17-on (**21**) olduğu belirlendi. Ürünün ^1H NMR spektrumu tipik bir 7α -hidroksil grubunun varlığına özgü bir rezonansı (1H, bs) δ_{H} 3.98 ppm’de gösterdi [41]. Ürüne ait ^{13}C NMR spektrumundaki C-6 ve C-8 rezonansları aşağıya yönelmiş kaymalar (C-6 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 7,35 ppm ve C-8 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 4,07 ppm) verirken C-9 rezonansı yukarı alana yönelmiş bir γ -gauche kayması (C-9 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 8,33, ppm) vermesi bir 7α -hidroksil grubunun varlığını daha da belirginleştirdi [42].

Aşağıdaki tablodan da (Tablo 5.2.) görülebileceği gibi *P. olsonii* MRC 500780 izolatının epiandrosteron (**8**) bileşiğini yüksek bir verim ile C-15 α pozisyonunda ve düşük verimler ile C-7 α ve C-11 α pozisyonlarında hidroksillerken C-3 pozisyonunda düşük bir verim ile yükseltgedi.

Tablo 5.2. Metabolit verimleri.

Substrat	Metabolit	% Verim
Epiandrosteron (8)	15 α -Hidroksi- 5α -androstan-3,17-dion (18)	8
	3 β ,15 α -Hidroksi- 5α -androstan-17-on (19)	17
	3 β ,11 α -dihidroksi- 5α -androstan-17-on (20)	6
	3 β ,7 α -dihidroksi- 5α -androstan-17-on (21)	4

Literatürdeki *Penicillium* izolatları ile steroid biyotransformasyonu çalışmaları incelendiğinde ise *P. olsonii* MRC 500780 izolatının epiandrosteron (**8**) bileşiğini çoğu *Penicillium* izolatlarına benzer bir şekilde metabolize ettiği gözlemlendi [37, 38].



KAYNAKLAR

- [1] B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, Eds. (2000). Biochemistry & Molecular Biology of Plants. *American Society of Plant Physiologists*. 1250-1319
- [2] Kabera, J. N., Semana, E., Mussa, A. R., & He, X. (2014). Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. *In Journal of Pharmacy and Pharmacology* (Vol. 2).
- [3] Perveen, S. (2021). Introductory chapter: terpenes and terpenoids. *Terpenes and Terpenoids-Recent Advances*.
- [4] Hanson, J. R. (2003). Natural Products: The Secondary Metabolites, *The Royal Society of Chemistry, Cambridge*, 1-2.
- [5] Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E. Y. (2002). İnsan Biyokimyası, *Palme Yayıncılık*, Ankara, 481-659
- [6] Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. İ. (2005). Biyokimya, Dördüncü Baskı, *Aktif Yayınevi*, Erzurum, 185-188.
- [7] Acconcia, F., & Marino, M. (2018). Steroid hormones: synthesis, secretion, and transport. *Principles of endocrinology and hormone action*, 1-31.
- [8] Miller, W. L. (1988). Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocrine reviews*, 9(3), 295-318.
- [9] Miller, W. L., & Auchus, R. J. (2011). The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine Reviews*, 32(1), 81-151
- [10] Pippal, J. B., & Fuller, P. J. (2008). Structure-function relationships in the mineralocorticoid receptor. *J Mol Endocrinol*, 41(6), 405-413.
- [11] Hamilton, K. J., Hewitt, S. C., Arao, Y., & Korach, K. S. (2017). Estrogen hormone biology. *Current topics in developmental biology*, 125, 109-146
- [12] Tilmann, C., & Capel, B. (2002). Cellular and molecular pathways regulating mammalian sex determination. *Recent progress in hormone research*, 57(1), 1-18.
- [13] Burger, H. G. (2002). Androgen production in women. *Fertility and sterility*, 77, 3-5.

- [14] El Kihel, L. (2012). Dehidroepiandrosteronun (DHEA) oksidatif metabolizması ve DHEA ve epiandrosteronun (EpiA) biyolojik olarak aktif oksijenli metabolitleri - Son raporlar. *Steroidler*, 77 (1-2), 10-26.
- [15] Song, M., Fu, R., Cai, S., Jiang, X., Wang, F., Xu, W., & Xu, W. (2023). 7 α and 7 β Hydroxylation of Dehydroepiandrosterone by *Gibberella sp.* and *Absidia Coerulea* Biotransformation. *Catalysts* 2023, 13, 272. *Microbial Biocatalysis*, 71.
- [16] Lee, B. M., Kacew, S., & Kim, H. S. (2017). *Lu's basic toxicology: fundamentals, target organs, and risk assessment*. CRC press.
- [17] Smitha, M. S., Singh, S., & Singh, R. (2017). Microbial biotransformation: a process for chemical alterations. *J Bacteriol Mycol Open Access*, 4(2), 85.
- [18] Dave, V., Khirwadkar, P., & Dashora, K. (2014). A review on biotransformation. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*, 2(2), 1136.
- [19] Hanson, J. R. (1995). An Introduction to Biotransformations in Organic Chemistry, *W. H. Freeman and Company, New York*, 1-62.
- [20] Faber, K. (2003). Biotransformations in Organic Chemistry, *Fifth Edition, Springer-Verlag, Berlin*, 1-407.
- [21] Loughlin, W. A. (n.d.-a). (2000). Review paper Biotransformations in organic synthesis. *Bioresource Technology* (Vol. 74, Page 49-62). Akar, T. (2005). Furanosteroid yapılı bazı bileşiklerin antifungal etkinliğinin ve *Neurospora crassa* fungal kültürünün biyotransformasyon ve biyosorpsiyon özelliklerinin incelenmesi. *Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Bölümü, Doktora Tezi*.
- [22] Akar, T. (2005). Furanosteroid yapılı bazı bileşiklerin antifungal etkinliğinin ve *Neurospora crassa* fungal kültürünün biyotransformasyon ve biyosorpsiyon özelliklerinin incelenmesi. *Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Bölümü, Doktora Tezi*.
- [23] Lilly M.D. (1994). Advances in biotransformation processes. *Chem. Eng. Sci.*, 49(2), 9-151.
- [24] Keskin, S. Y. (2010). *Bazı Monoterpenoidlerin Fungal Biotransformasyonunun İncelenmesi* (Doctoral dissertation, Sakarya Üniversitesi (Turkey)).
- [25] Demain, A. L. (2000). Small bugs, big business: The economic power of the microbe. In *A.L. Demain / Biotechnology Advances* (Vol. 18, Page 49514).

- [26] Kuru, A. (2017). Progesteron, pregnenolon, testosteron, dehidroepiandrosteron ve epiandrosteron steroidlerinin bazı *aspergillus* türleri ile biyotransformasyonları.
- [27] Hegazy, M. E. F., Mohamed, T. A., ElShamy, A. I., Abou-El-Hamd, H. M., Mahalel, U. A., Reda, E. H., ... & Hammouda, F. M. (2015). Microbial biotransformation as a tool for drug development based on natural products from mevalonic acid pathway: A review. *Journal of Advanced Research*, 6(1), 17-33.
- [28] Bianchini, L.F., Arruda, M.F., Vieira, S.R., Campelo, P., Grégio, A.M., Rosa, E.A. (2015). Microbial biotransformation to obtain new antifungals, *Front. Microbiol.* 6 1433.
- [29] Han, F., & Lee, I. S. (2016). Microbial transformation of bavachin by *Absidia coerulea*. *Phytochemistry Letters*, 18, 136-139.
- [30] Bhatti, H. N., & Khera, R. A. (2012). Biological transformations of steroidal compounds: A review. *In Steroids* (Vol. 77, Issue 12, pp. 1267–1290).
- [31] Mahato, S. B., & Banerjee, S. (1985). Steroid transformations by microorganisms—II. *Phytochemistry*, 24(7), 1403-1421.
- [32] Mahato, S. B., & Garai, S. (1997). Advances in microbial steroid biotransformation. *Steroids*, 62(4), 332-345.
- [33] Mahato, S. B., & Garai, S. (1997). Review Advances in microbial steroid biotransformation. *Indian Institute of chemical biology* (Vol. 62, Page 332-345).
- [34] Fernandes, P., Cruz, A., Angelova, B., Pinheiro, H. M., & Cabral, J. M. S. (2003). Microbial conversion of steroid compounds: Recent developments. *In Enzyme and Microbial Technology* (Vol. 32, Issue 6, pp. 688–705).
- [35] Nassiri-Koopaei, N., & Faramarzi, M. A. (2015). Recent developments in the fungal transformation of steroids. *In Biocatalysis and Biotransformation* (Vol. 33, Issue 1, pp. 1–28).
- [36] Donova, M. V., & Egorova, O. V. (2012). Microbial steroid transformations: current state and prospects. *Applied microbiology and biotechnology*, 94, 1423-1447.
- [37] Panek, A., Łyczko, P., & Świzdor, A. (2020). Microbial modifications of androstane and androstene steroids by *Penicillium vinaceum*. *Molecules*, 25(18), 4226.
- [38] Świzdor, A. (2013). Baeyer-Villiger oxidation of some C19 steroids by *Penicillium lanosocoeruleum*. *Molecules*, 18(11), 13812-13822.

- [39] Peart, P. C., McCook, K. P., Russell, F. A., Reynolds, W. F., & Reese, P. B. (2011). Hydroxylation of steroids by *Fusarium oxysporum*, *Exophiala jeanselmei* and *Ceratocystis paradoxa*. *Steroids*, 76(12), 1317-1330.
- [40] Kołek, T., Milecka, N., Świzdor, A., Panek, A., & Białońska, A. (2011). Hydroxylation of DHEA, androstenediol and epiandrosterone by *Mortierella isabellina* AM212. Evidence indicating that both constitutive and inducible hydroxylases catalyze 7 α -as well as 7 β -hydroxylations of 5-ene substrates. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 9(15), 5414-5422.
- [41] 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, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 1567-1594
- [42] Blunt, J.W., and Stothers, J.B. (1977). ^{13}C NMR spectra of steroids a survey and commentary. *Organic Magnetic Resonance*, 9, 439-464

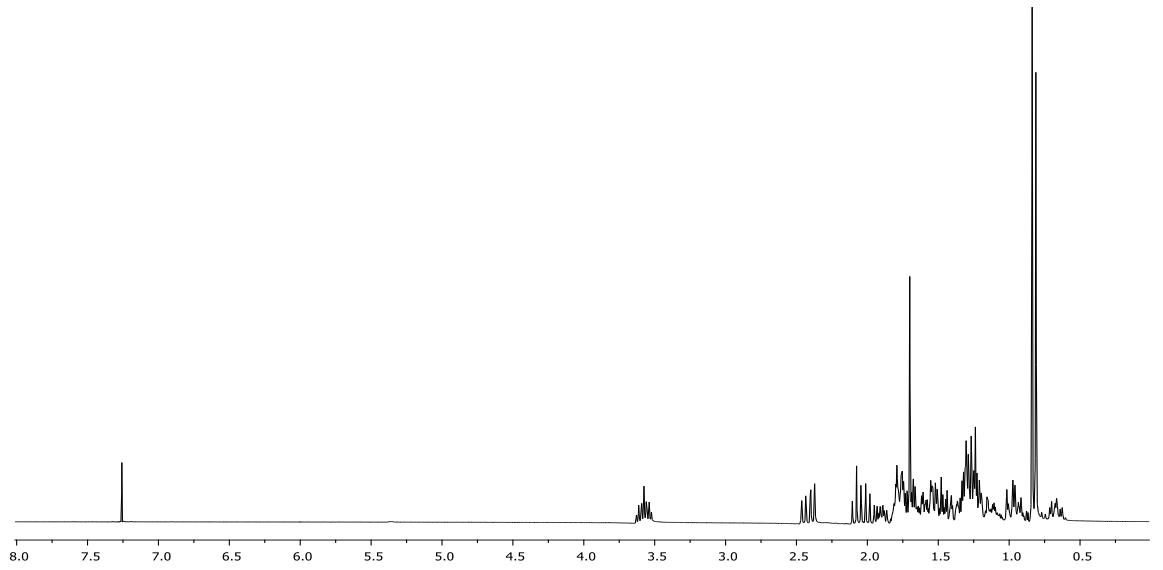
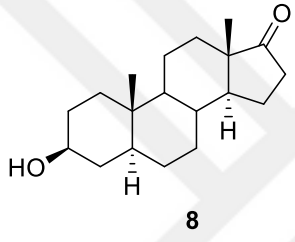


EKLER

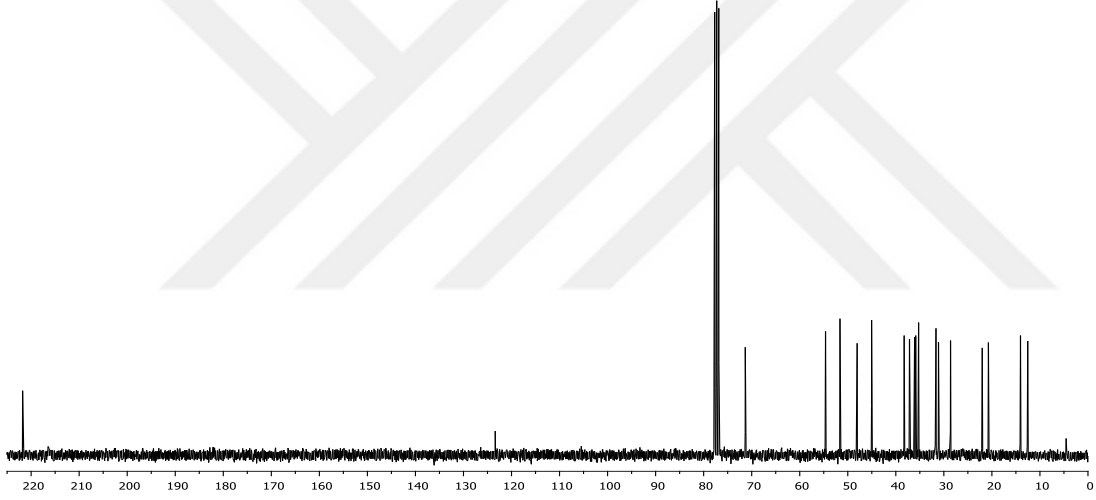
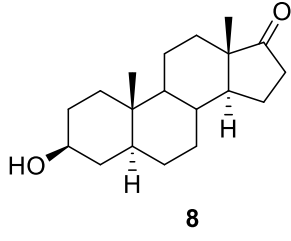
EK A. NMR Spektrumları



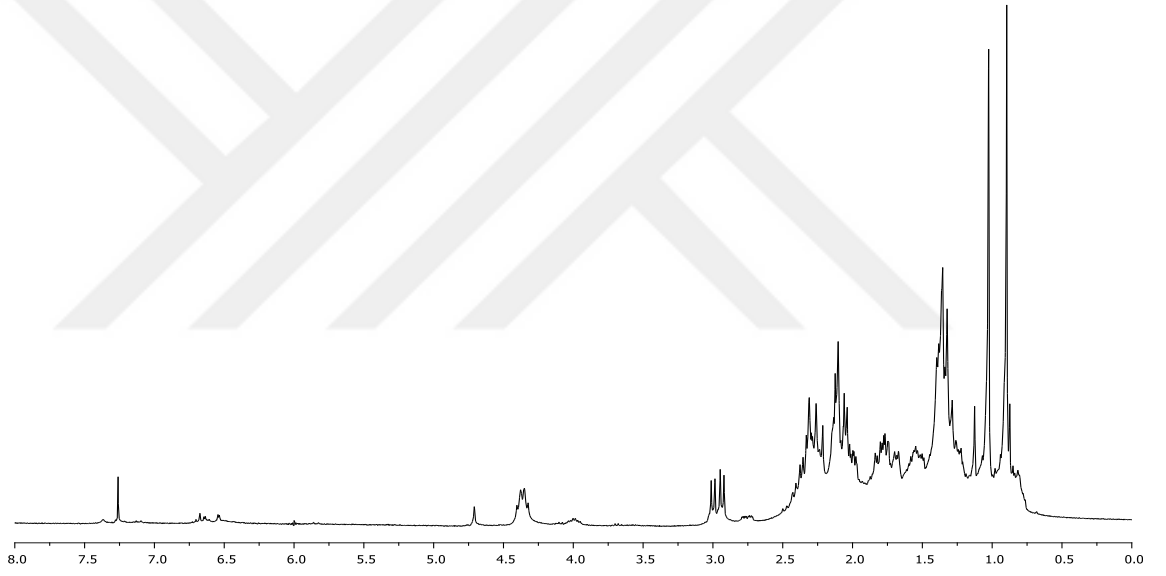
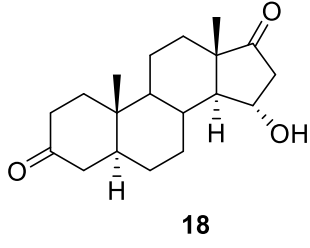
EKA



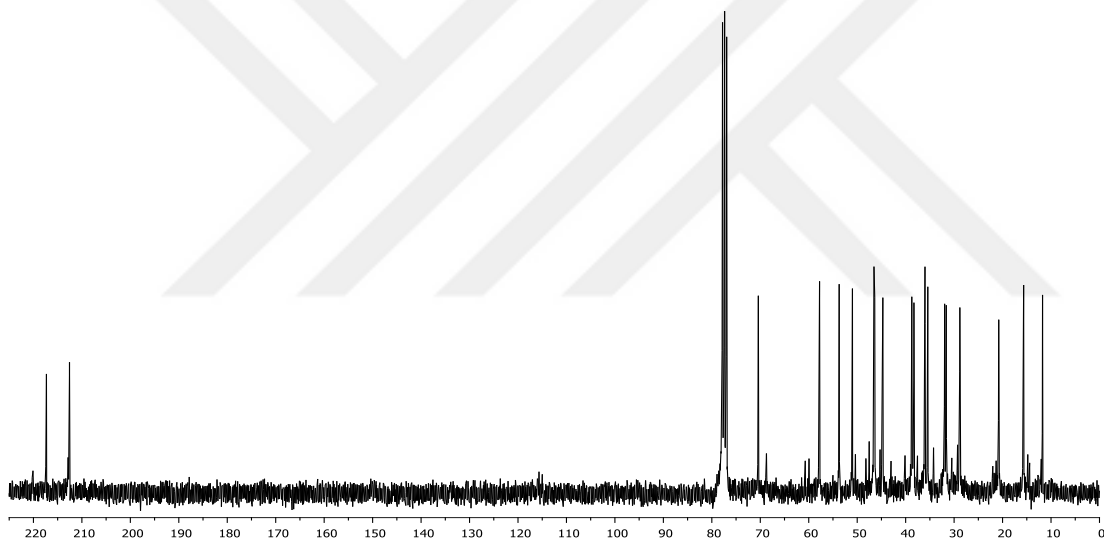
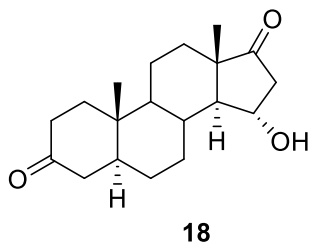
Ek A.1. (8) numaralı bileşik için ^1H NMR spektrumu.



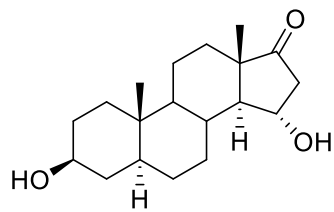
Ek A.2. (8) numaralı bileşik için ^{13}C NMR spektrumu.



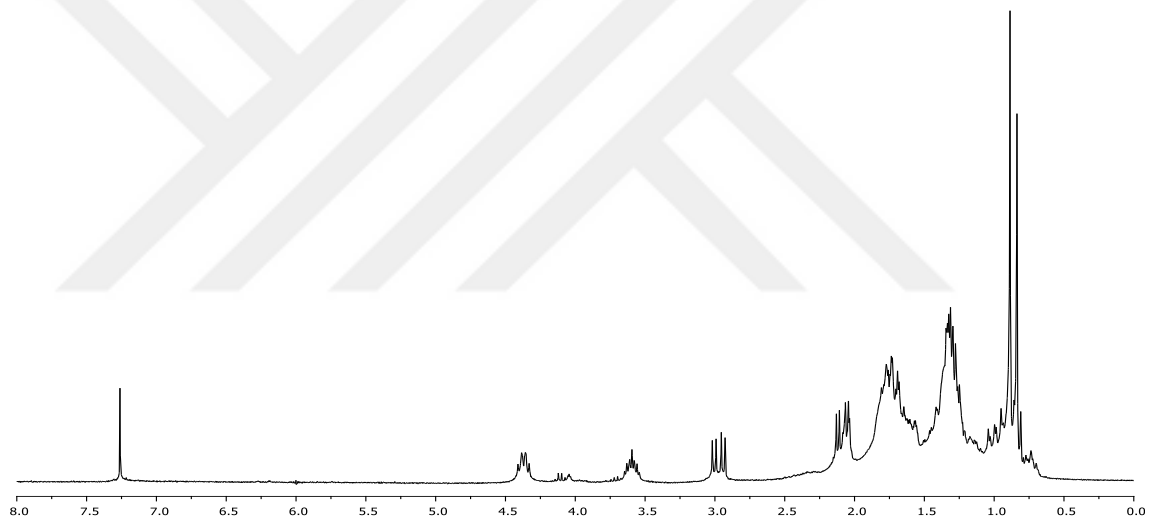
Ek A.3. (18) numaralı bileşik için ¹H NMR spektrumu.



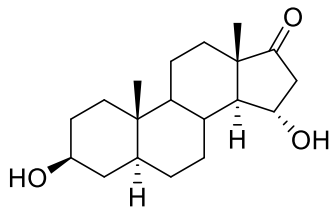
Ek A.4. (18) numaralı bileşik için ^{13}C NMR spektrumu.



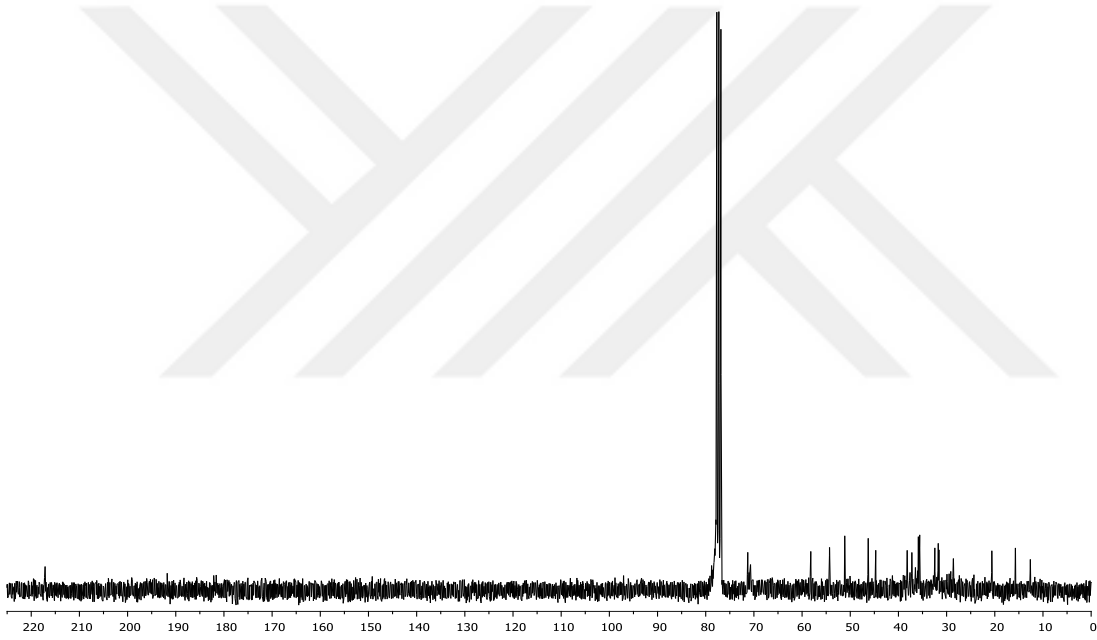
19



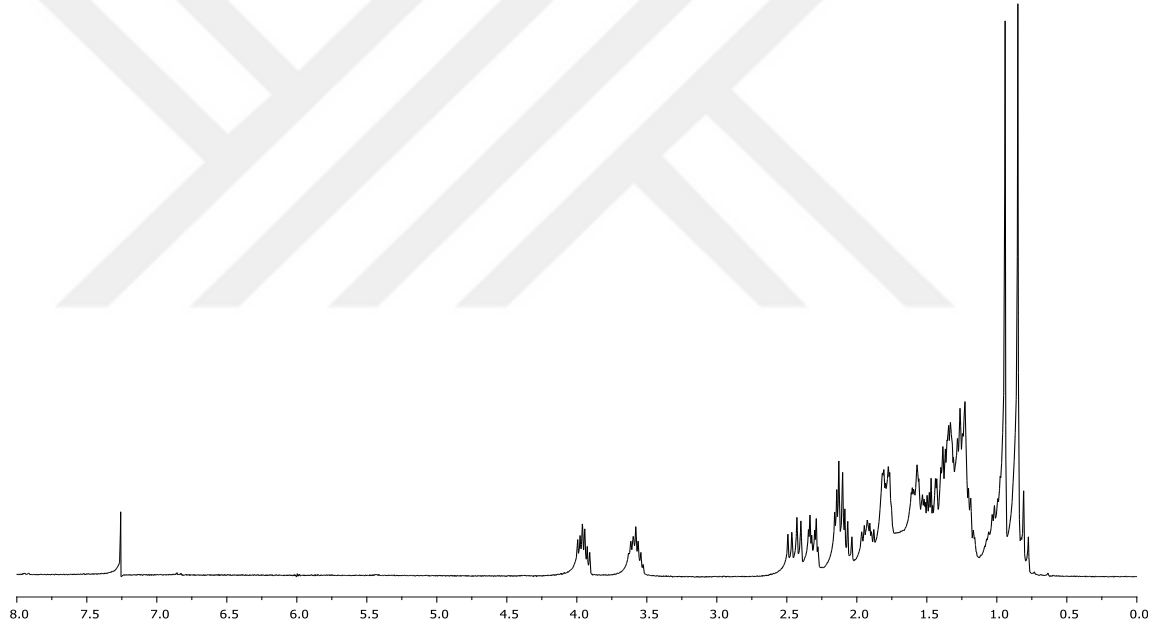
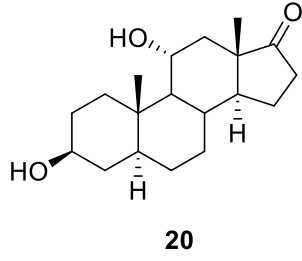
Ek A.5. (19) numaralı bileşik için ¹H NMR spektrumu.



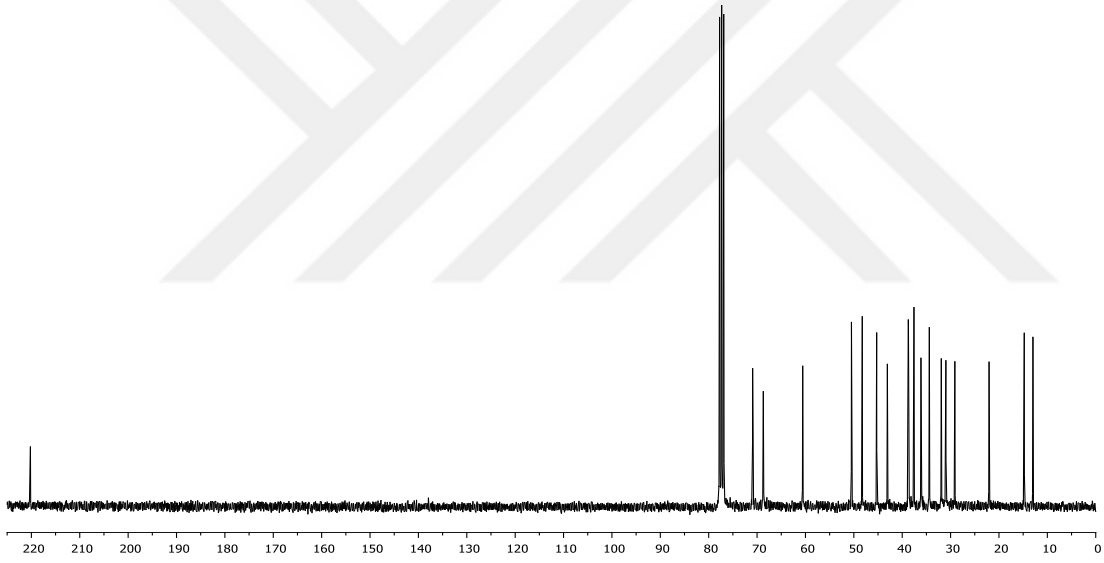
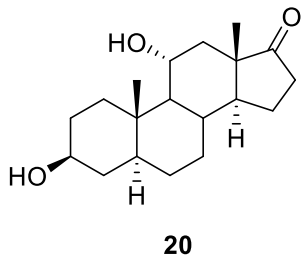
19



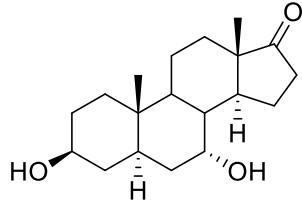
Ek A.6. (19) numaralı bileşik için ^{13}C NMR spektrumu.



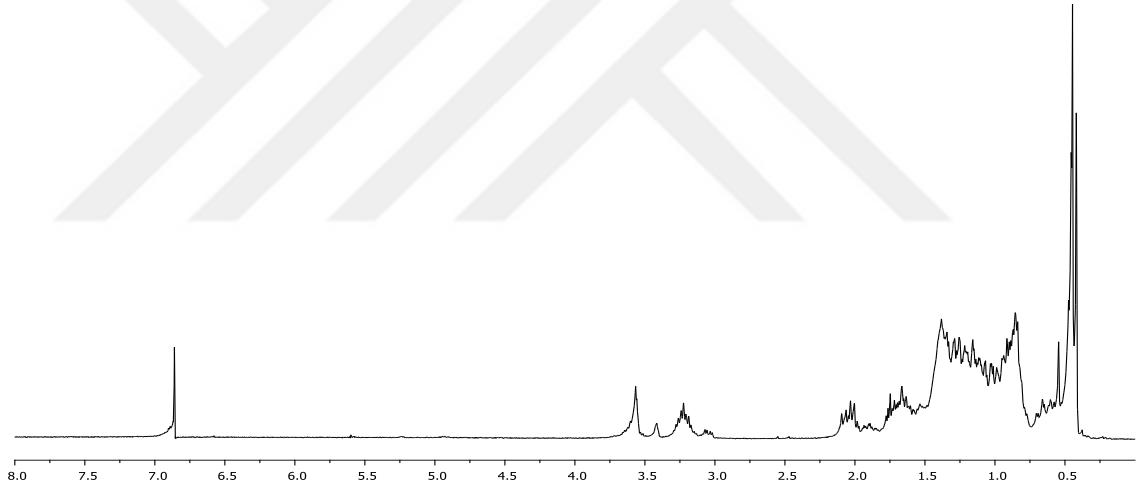
Ek A.7. (20) numaralı bileşik için ^1H NMR spektrumu.



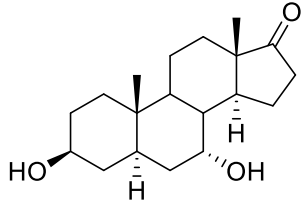
Ek A.8. (20) numaralı bileşik için ^{13}C NMR spektrumu.



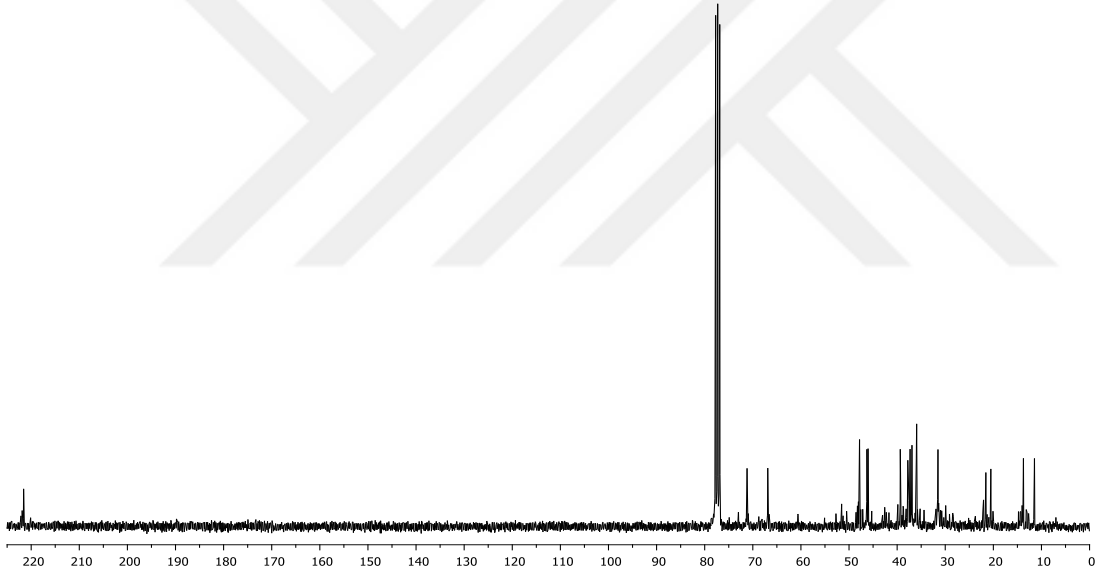
21



Ek A.9. (21) numaralı bileşik için ^1H NMR spektrumu.



21



Ek A.10. (21) numaralı bileşik için ^{13}C NMR spektrumu.



ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Hümeýra YILMAZ

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2018-2022 yılları arasında Sakarya Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü.
- **Yüksek Lisans** : Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalı (devam ediyor).

TEZDE ÜRETİLEN ESERLER

- Uluslararası Poster Bildiri (Yılmaz, H., Kuru, A. (31 Mayıs-1 Haziran 2024). Biotransformation of epiandrosterone by *Penicillium olsonii*. Zonguldak Bülent Ecevit University 17th National Spectroscopy Congress , Zonguldak, Türkiye).