

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PREGNENOLON BİLEŞİĞİNİN *ASPERGILLUS GLAUCUS*
KÜFÜ İLE BİYOTRANSFORMASYONU**

YÜKSEK LİSANS

Kübra KARADAŞ

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

OCAK 2023

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PREGNENOLON BİLEŞİĞİNİN *ASPERGILLUS GLAUCUS* KÜFÜ
İLE BİYOTRANSFORMASYONU**

YÜKSEK LİSANS

Kübra KARADAŞ

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Kudret YILDIRIM

OCAK 2023

Kübra KARADAŞ tarafından hazırlanan “Pregnenolon Bileşiminin Aspergillus Glaucus Küfü İle Biyotransformasyonu” adlı tez çalışması 03.01.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Jüri Başkanı : **Doç. Dr. Fatih SÖNMEZ**
Sakarya Üniversitesi

Jüri Üyesi : **Prof. Dr. Kudret YILDIRIM (Danışman)**
Sakarya Üniversitesi

Jüri Üyesi : **Dr. Öğr. Üyesi Semra YILMAZER KESKİN**
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 “PREGNENOLON BİLEŞİĞİNİN ASPERGİLLUS 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.

(06/02/2023).

(imza)

Kübra KARADAŞ





Aileme



TEŞEKKÜR

Laboratuvar olanakları konusunda anlayış ve yardımını esirgemeyen, çalışmayı büyük bir titizlik ve sabırla yöneten, çalışma boyunca desteğini gördüğüm, araştırmanın planlanmasından yazılmasına kadar tüm aşamalarında yardımını esirgemeyen sayın hocamP. 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, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan, yaşamım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve koşulsuz yanımda olan değerli annem Aysu DEMİRCİ,rahmetli babam Metin DEMİRCİ ve kıymetli eşim Süleyman KARADAŞ’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Kübra KARADAŞ



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	v
TEŞEKKÜR	ix
İÇİNDEKİLER	xi
KISALTMALAR	xiii
SİMGELER	xv
TABLO LİSTESİ	xvii
ŞEKİL LİSTESİ	xix
ÖZET	xxi
SUMMARY	xxiii
1. GİRİŞ	1
2. <i>ASPERGILLUS</i> TÜRLERİ İLE PREGNENOLON BİYOTRANSFORMASYONLARI	3
2.1. Biyotransformasyonlar	3
2.2. Mikrobiyal Biyotransformasyonlar	5
2.3. Küfler ile Steroid Biyotransformasyonları	7
2.4. <i>Aspergillus</i> Türleri ile Pregnenolon (2) Biyotransformasyonları	7
2.5. Çalışmanın Amacı	10
3. MATERYAL VE METOT	11
3.1. Genel Bilgiler	11
3.2. Yatık Agar Besiyerlerinin Hazırlanması	11
3.3. Küf Kültürü Hazırlanması ve Tazelenmesi	12
3.4. Küf için Besiyeri Hazırlanması	12
3.5. Biyotransformasyon Deneyi	12
3.6. Metabolitlerin Ayrılması ve Yapı Tayinleri	13
4. DENEYSEL BULGULAR	15
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	17
KAYNAKLAR	21
EKLER	23
ÖZGEÇMİŞ	29



KISALTMALAR

^{13}C NMR	: Karbon 13 Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
DMF	: Dimetilformamit
^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



SİMGELER

Δ	: Kimyasal kayma farkı
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat derece
bs	: Geniş tek (broad singlet) sinyal
cm	: Santimetre
d	: İkili (doublet) sinyal (tripletlerin dubleti)
dt	: Üçlü sinyallerin ikilisi (tripletlerin dubleti)
g	: Gram
Hz	: Hertz
J	: Etkileşme sabiti
lit.	: Literatür
m	: Çoklu (multiplet) sinyal
mg	: Miligram
MHz	: Megahertz
mL	: Mililitre
pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonunun eksi logaritması
s	: Tek (singlet) sinyal
t	: Üçlü (triplet) sinyal
tt	: Üçlü sinyallerin üçlüsü (tripletlerin tripleti)
δC	: ^{13}C NMR spektrumundaki kimyasal kayma
δH	: ^1H NMR spektrumundaki kimyasal kayma



TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 4.1. Steroidlere ait ^{13}C NMR kimyasal kayma değerleri.	16
Tablo 5.1. Steroidler için ^{13}C NMR kimyasal kayma değerleri.	18
Tablo 5.2. Metabolit verimleri.....	18





ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. Steran halkası [4].	1
Şekil 1.2. Kolesterol (1) [4, 5].	2
Şekil 1.3. Bazı önemli steroidlerin yapıları [4-5].	2
Şekil 2.1. İlk mikrobiyal hidroksilasyon reaksiyonu [6].	7
Şekil 2.2. <i>A. oryzae</i> ile substratın inkübasyonu [16].	8
Şekil 2.3. Bazı <i>Aspergillus</i> izolatları ile substratın inkübasyonları [17,18].	8
Şekil 2.4. Bir <i>A. auerogulgens</i> izolatı ile substratın inkübasyonu [19].	8
Şekil 2.5. <i>A. wentii</i> MRC 200316 ile substratın inkübasyonu [20].	9
Şekil 2.6. <i>A. tamarii</i> MRC 72400 ile substratın inkübasyonu [21].	9
Şekil 2.7. <i>A. sydowii</i> MRC 200653 ile substratın inkübasyonu [22].	9
Şekil 4.1. Substratın karbon iskeleti.	15
Şekil 4.2. <i>A. glaucus</i> MRC 200914 ile substratın inkübasyonu.	15
Şekil 5.1. <i>A. glaucus</i> MRC 200914 ile substratın inkübasyonu.	17



PREGNENOLON BİLEŞİĞİNİN *ASPERGILLUS GLAUCUS* KÜFÜ İLE BİYOTRANSFORMASYONU

ÖZET

Doğal ürünler canlılarda bazı faydalar sağlayan ve diğer canlılarda olan etkileri ile dikkat çeken önemli kimyasal maddelerdir. Doğal ürünler genelde terpenoidler, alkaloidler, steroidler, poliketidler, fenilpropanoidler, özelleşmiş peptidler, özelleşmiş karbonhidratlar ve yağ asitleri gibi gruplara ayrılırlar.

Enzimlerin kendi doğal substratları olmayan maddelerde gerçekleştirdikleri kimyasal değişimler biyotransformasyonlar olarak adlandırılır. Biyotransformasyonlarda rol alan enzimler serbest olarak, sabitlenmiş olarak veya çeşitli biyolojik sistemlerin bünyesinde fonksiyonlarını gerçekleştirebilirler. Biyotransformasyonlar gerçekleştirilmesi için daha çok biyolojik sistemler küfler, mayalar ve bakteriler gibi mikroorganizmalar kullanılır. Bahsedilen mikroorganizmalar ile gerçekleştirilen biyotransformasyonlar bilinen kimyasal sentez yöntemlerden çok daha fazla avantajlar sağlar. Küfler, mayalar ve bakteriler mikrobiyal biyotransformasyonları uygulamak gerçekleştirmek için serbest olarak veya belirli yüzeylere sabitlenmiş olarak kullanılabilir.

Küfler ile gerçekleştirilen steroid biyotransformasyonları küf enzimlerinin yüksek regio ve stereoseçicilikleri nedeni ile çok fazla sayıda önemli bileşiğin üretiminde yoğun bir şekilde kullanılmaktadır.

Bu çalışmada pregnenolon (2) bileşiğinin *Aspergillus glaucus* MRC 200914 küflünde nasıl metabolize edildiğinin incelenmesi hedeflenmiştir. Biyotransformasyon deneyi öncesinde *Aspergillus glaucus* MRC 200914 küfü için periyodik olarak taze alt kültürler tazelandı ve sonrasında küf için besiyeri hazırlanıp erlenlere dağıtılıp otoklavda sterilize edildi. Bu erlenlere en taze alt kültürdeki küf steril şartlarda ilave edilerek erlenler 3 gün inkübasyona bırakıldı. Daha sonra bu erlenlere ise pregnenolon (2) steril şartlarda ilave edilerek 5 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında besiyeri filtre edildi. Filtrattaki steroidler etil asetat ile ekstrakte edilerek organik faza çekildi. Ekstraktlarının evaporatörde uçurulması ile elde edilen kalıntıdaki steroidler kolon kromatografisi ile ayrıldı. Steroidlerin yapı tayinleri ise erime noktaları tayini, NMR ve IR spektroskopisi gibi yöntemler ile gerçekleştirildi. *Aspergillus glaucus* ile pregnenolon (2) biyotransformasyonu 3 β ,7 α - dihidroksipregn-5-en-20-on (14) ve 3 β ,7 α ,11 α -trihidroksipregn-5-en-20-on (15) steroidleri ile sonuçlandı.



BIOTRANSFORMATION OF PREGNENOLONE BY *ASPERGILLUS GLAUCUS*

SUMMARY

Natural products are compounds which are not essential for the reproduction and development of living things. These compounds provide benefits to the living things and attract more attention due to their effects on other living things. Natural products are usually classified under groups such as terpenoids, alkaloids, steroids, polyketides, peptides, phenylpropanoids, specialized peptides, specialized carbohydrates and fatty acids and their derivatives.

Biological systems can perform chemical changes on xenobiotics and these reactions are called biotransformations. Biotransformations are carried out by free or immobilised enzymes and biological systems with enzymes. Cell cultures, tissue cultures, organ cultures, microsomes, microorganisms and spores of these microorganisms are usually used as common biological systems for biotransformations.

Enzymes perform almost all reactions in living organisms by lowering the energy of activation (E_A). Although enzymes reduce the time to reach the reaction equilibrium, enzymes are not consumed or changed by the reaction and they do not change the ΔG and the equilibrium position of the reaction. The International Union of Biochemistry identified more than 3200 enzymes and it is considered that nature can offer 25000 enzymes.

Since enzymes are very effective catalysts and provide some advantages for their users, For example, the reaction rate for an enzymatic reactions is accelerated by a factor of 10^8 - 10^{10} and this may even exceed a value of 10^{12} . Enzymes are environmentally acceptable as they are made of amino acids and are completely degradable. Although most other chemical reagents cause environmental problems, enzymes generally act under mild conditions (around pH 7, 30 °C and 1 atm) and this minimises some problems such as, isomerisation, racemisation, rearrangements, decomposition. As enzymes are compatible with each other, enzymes generally work under the same or similar conditions. Therefore, in a one flask several reactions can be carried out by using multienzyme systems. Some enzymes are totally limited to their natural role although some enzymes show a high substrate tolerance. These enzymes can accept a large variety of natural or unnatural compounds. Enzymes can catalyse a broad spectrum of reactions and there is an enzyme-catalysed reaction equivalent to almost every known reaction.

Enzymes are chemoselective, regioselective and enantioselective molecules. Enzymes are chemoselective. As they usually act on just one single type of functional group and other functionalities remain unchanged, enzymatic reactions usually tend to be cleaner. As enzymes are regioselective they can differentiate between functional groups that are chemically located in different regions of the same substrate molecule. Enzymes might perform these advantages due to their complex three-dimensional structures.

Enzymes are enantioselective and are chiral catalysts as they are only made from L-amino acids. Therefore, any type of chirality on substrate molecule is sensed by enzymes. A prochiral substrate can be changed into a chiral

product and both enantiomers in a racemic substrate generally can react at different rates, resulting in a kinetic resolution.

However, there are also some disadvantages for using enzymes. Nature has enzymes as a one type of enantiomers. When the other type of enantiomeric product is needed, an enzyme with exactly the opposite stereochemical selectivity is required. Unfortunately, this is often impossible. Enzymes require narrow operation parameters. Working under mild conditions sometimes causes problems as elevated temperatures and extreme pH cause inhibition of enzymes. Although enzymes show their highest catalytic activity in water, water is generally the least suitable solvent for most organic reactions due to its high boiling point and high heat of vaporisation. In addition to this, most organic compounds are poorly soluble in aqueous media. Therefore, shifting enzymatic reaction from an aqueous medium to an organic medium would be highly desired. Unfortunately, this can cause loss of catalytic activity due to denaturation. Enzymes are very vulnerable to their natural cofactors. Although enzymes are extremely flexible for accepting unnatural substrates, they are almost completely dependent to their natural cofactors such as NADH and NADPH. Unfortunately, these molecules are relatively unstable and too expensive to use in stoichiometric amounts and can not be taken over by their more economical man-made substitutes. Enzymes are sensitive to inhibition phenomena. Many enzymatic reactions are susceptible to substrate or product inhibition which forces enzymes to stop performing at higher substrate and / or product concentrations. Some enzymes might also develop some allergies. Although enzymes can develop allergic reactions this can be minimised by considering enzymes as chemicals and using with the same care.

Biotransformations are generally carried either by isolated enzyme systems or by intact whole microorganisms. It is considered that there are more than 300 commercially available isolated enzyme systems. As many enzyme systems involved are membrane bound and difficult to isolate, intact whole microorganisms are usually used for biotransformations. Main groups of microorganisms usually used for biotransformations are molds, yeasts, bacteria and microalgae.

Microorganisms fulfill a number of reactions on both natural and synthetic substrates via their non-specific enzyme systems. Microbial hydroxylations are the most common and are favourite among microbial biotransformations. The value of microbial hydroxylation was first noticed in 1952 when it helped to overcome a major problem in cortical steroid synthesis. The insertion of an oxygen function at C-11 was a very long difficult and expensive process as this position was remote from other functional groups. This problem was effectively solved by *Rhizopus arrhizus* via microbial hydroxylation. Microbial biotransformations became popular after this achievement. Since then, steroids and a number of other different substrate groups have been usually used for microbial biotransformations. Microbial steroid biotransformations have found worldwide application for the preparation of some important steroid hormones and drugs due to their high regio- and stereoselectivity.

A lot of microbial steroid biotransformations have been reported in recent years. There are still a number of attempts to increase the efficiency of microbial biotransformations and to find new useful microorganisms and reactions. Since first microbial hydroxylation was reported in 1952, lots of different fungi have routinely been one of

the most studied whole-cell systems for biotransformation reactions. Different fungi have been used for the biotransformations of many types of steroids. These biotransformations afforded some interesting results, such as microbial hydroxylations, Baeyer-Villiger oxidations and 5 α -reduction.

In this work, pregnenolone (2) was incubated with *Aspergillus glaucus* MRC 200914 in order to see how this fungus metabolise the substrate. The medium was prepared for the fungus in 1 L of distilled water. The medium was evenly distributed into 10 erlenmeyer flasks of 250 mL and sterilized by an autoclave. These flasks were inoculated by the fungus. The flasks were incubated for 3 days at 25 °C on a shaker and the substrate in DMF was added aseptically into these flasks. All flasks were further incubated for 5 days under the same conditions. After incubation, the fungal mycellium was separated from the broth by filtration under the vacuum. The mycellium was rinsed with ethyl acetate and the broth was then extracted with ethyl acetate. The extracts were dried over sodium sulfate anhydrous and evaporated *in vacuo* to give a brown gum that was then chromatographed on silica gel 60. 3 β ,7 α -dihydroxypregn-5-ene-20-one (14) and 3 β ,7 α ,11 α -trihydroxypregn-5-ene-20-one

(15) were obtained from the chromatography work. The structure determination of these compounds was carried out by contrasting melting points, NMR and IR spectra of the starting material with those of metabolites.

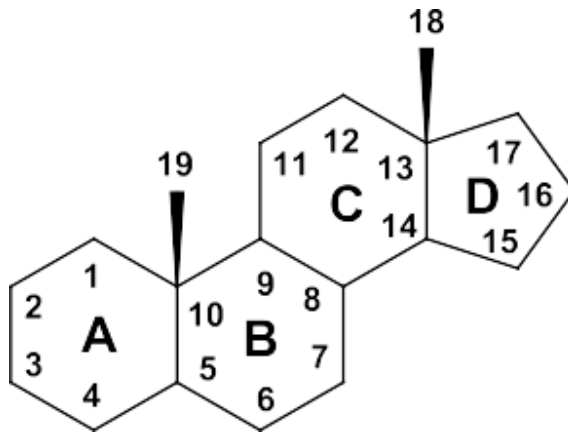


1. GİRİŞ

Doğal ürünler mevcut olduğu canlıların hayatta kalmalarını kolaylaştırmaları ve çevresindeki canlılardaki etkileri sebebi dikkat çeken oldukça önemli kimyasal maddelerdir. Doğal ürünler daha çok mantarlar, bitkiler, böcekler ve mikroorganizmalarda bulunur. Bitkiler ve mikroorganizmalar ise bu bileşiklerin tabiatta en yaygın olduğu canlılardır [1-3].

Tabiattaki doğal ürünler birbirinden farklı yapıda ve çok sayıda olmalarına rağmen genellikle terpenler, alkaloidler, steroidler, poliketidler, yağ asitleri, fenolik bileşikler, özelleşmiş karbohidratlar, özelleşmiş amino asitler ve peptidler olarak gruplara ayrılırlar [1].

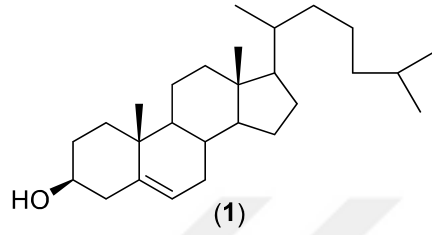
Steroidler önemli bir doğal ürün grubudur. Steroid kelimesi kökenini katı anlamında olan Latince steros kelimesinden almıştır. Steroidlerde ana yapıyı steran (siklopentanoperhidrofenantren) halkası oluşturur. Bir steran halkası (Şekil 2.1.) birbirleri ile kaynaşmış üç adet sikloheksan halkası ile bir adet siklopentan halkasından oluşur. Çoğu steroidler steran halka bünyesinde 18. ve 19. karbonlar olarak adlandırılan ve β -pozisyonuna sahip metil grupları barındırır. Birçok steroid genellikle 3. ve 17. karbonlarında karbonil veya hidroksil gruplarına taşırken bazı diğer steroidler ise siklopentan halkasına bağlı çeşitli uzunluklarda olan yan zincirler taşımaktadır [4].



Şekil 1.1. Steran halkası [4].

Steroller steroidlerin önemli bir grubudur. Bu bileşikler yapılarında 3 β -hidroksil grubu ve D halkalarına bağlı alifatik yan zincirlere sahip steroidlerdir. En tanınmış steroller kolesterol (1), stigmasterol ve ergosterol bileşikleridir [5].

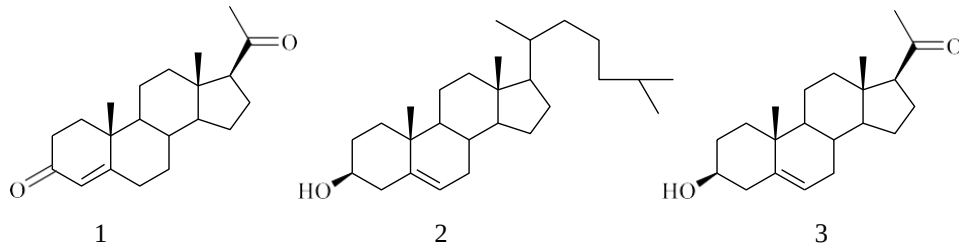
Aynı zamanda bir sterol ve steroidlerin biyosferde en çok bulunan örneklerinden birisi olan kolesterol (1) (Şekil 2.2.) insan ve hayvanlarda membran akışkanlığının düzenlenmesinde görev alır. Ayrıca kolesterol (1) safra asitleri, steroid hormonlar ve D3 vitamini gibi önemli birçok bileşiğin çıkış maddesidir [4, 5].



Şekil 1.2. Kolesterol (1) [4, 5].

Progestagenler (progestinler), östrojenler, androjenler, glukokortikoidler ve mineralokortikoidler olarak gruplara ayrılan steroid hormonlar önemli kolesterol (1) türevleridir. Progestagenler, östrojenler ve androjenler ayrıca cinsiyet hormonları olarak da adlandırılır. Cinsiyet hormonları insanlardaki üreme organlarının gelişmeleri ve büyümelerini, üreme döngüsü ve sekonder cinsiyet karakterlerini düzenler. Buna ilaveten güçlü anabolik etkilere sahip olan cinsiyet hormonları deri, kaslar ve kemik gibi çoğu dokunun gelişmelerini ve metabolizmanın sürekliliğini sağlarlar [4, 5].

Kolesterol (1) birkaç reaksiyon üzerinden yan zincirindeki kısalma ile pregnenolon (2) bileşiğine dönüştürülür [4-5]. Pregnenolon (2) ise bir steroid hormon ve diğer steroid hormonların çıkış maddesi olan progesteron (3) bileşiği için başlangıç maddesi olan bir steroidtir [4-5]. Kolesterol (1) ve kendisinden türevlenen pregnenolon (2) ile progesteron (3) bileşiklerinin yapıları Şekil 1.2.'de verilmiştir.



Şekil 1.3. Bazı önemli steroidlerin yapıları [4-5].

2. *ASPERGILLUS* T RLER  İLE PREGNENOLON B YOTRANSFORMASYONLARI

2.1. Biyotransformasyonlar

Enzimlerin ksenocbiyotikler adı verilen ve kendi substratları olmayan kimyasal maddelerde gerçekleştirdikleri kimyasal değişimler biyotransformasyonlar olarak adlandırılır [6]. Enzimler mikrozomlar, mikroorganizmalar, mikroorganizma sporları hücre, doku ve organ kültürleri gibi çeşitli biyolojik sistemlerin bünyelerinde kullanılabilecekleri gibi çeşitli biyolojik materyallerden saflaştırılmaları sonrasında sabitlenmiş yada serbest olarak da kullanılabirler [6]. Biyotransformasyon çalışmalarındaki enzimlerin çoğu biyolojik kaynaklardan saflaştırılırken kalan kısmı ise halen sadece ticari olarak temin edilmektedir [6, 7].

Enzimlerin yalnızca kendi substratlarını doğal çevrelerinde etkiledikleri, pahalı ve oldukça hassas oldukları gibi bazı dogmatik önyargılar olmasına rağmen birçok enzim için bu durum geçersizdir [7].

Enzimler fonksiyonlarını çok hızlı gerçekleştirdikleri için kullanıcılarına birçok faydalar sağlarlar. Enzimlerin yer aldığı reaksiyonlar enzimlerin yer almadığı reaksiyonlara kıyasla 10^8 - 10^{10} kat daha hızlı gerçekleşebilmektedir [7].

Protein tabiatında olan enzimler katalizör fonksiyonu gören bazı ağır metaller ve klasik sentez işlemlerindeki birçok reaktifin aksine doğada tamamen par alanabildiklerinden dolayı doğaya dost olarak kabul edilirler [7].

Enzimler çoğu zaman sıcaklığın 20-40  C arası olduğu ve ortam pH değerinin 5-8 aralığında olduğu ılıman şartlarda katalizörlük yaptıkları için bilinen sentez yöntemlerinin uygulanması ile neticelenen rasemizasyon, bozunma, çevrilme ve izomerleşme gibi istenmeyen yan reaksiyonları çok daha nadir olarak verirler [7].

Bazı enzimler geniş bir substrat spektrumları nedeniyle doğal veya sentetik birçok bileşikte kimyasal değişimler gerçekleştirebilirler [7].

Multienzim sistemlerindeki benzer ya da aynı şartlarda etkili enzimler metabolik yollardaki reaksiyonları da aynı ortamlarda gerçekleştirebilmektedir [7].

Enzimler çok fazla sayıda ve farklı tipte reaksiyonu gerçekleştirebildikleri için hemen her bir sentetik reaksiyona karşılık gelen enzimatik bir reaksiyon vardır [7].

Enzimler kompleks üç boyutlu yapılarından kaynaklanan regioseçici ve stereoseçici olmalarına sebebi ile substratlarının farklı kısımlarının fonksiyonel grupları bile birbirlerinden ayırabilirler. Aynı zaman da kemoseçici olan enzimler yalnızca belirli bir fonksiyonel grubu etkilerken diğerlerini etkilemezler. Bu özellik ise yan ürünlerin oluşumu engellemektedir [7].

Enzimler yalnızca L-amino asitleri içerdiklerinden dolayı aynı zamanda enantiyoseçici de olan kiral biyomoleküllerdir. Bu yüzden enzimler prokiral bir substratı etkileyerek yalnızca bir enantiyomere çevirebilir. Enzimlerin rasemik bir karışımındaki enantiyomerlerden yalnızca birini etkileyerek rasemik karışımları da ayırabilirler [7]. Enzimler bu avantajları ile diğer yöntemler ile gerçekleştirilmesi zor yada imkânsız olan reaksiyonları kolayca gerçekleştirebilmektedir [7].

Buna rağmen enzimlerin kullanılması bazı istenilmeyen durumlara da neden olabilir. Örneğin, bir enzimin tek bir enantiyomerik formu olduğundan bu enzim yalnızca belirli bir enantiyomer ile reaksiyon verebilir [7].

Bazı enzimler aktivitelerini etkileyen sıcaklık ve pH gibi parametrelerdeki değişimlere karşı oldukça hassasdırlar. Örneğin, enzimler protein tabiatında olduklarından dolayı bir enzimatik reaksiyonu hızlandırılması için sıcaklık ve pH gibi parametreler enzimin denatürasyonuna sebep olabilecekleri için az bir oranda değiştirilebilirler [7].

Enzimlerin en etkin oldukları ortam su olmasına rağmen birçok organik bileşik suda neredeyse hiç çözünmez. Enzimatik bir reaksiyonun organik çözücüde gerçekleştirilmesi ise protein tabiatında olan enzimlerin denatürasyonu ile sonuçlanabileceği için aktivite kaybına sebep olabilir [7].

Reaksiyon ortamında aşırı miktarlarda substrat veya ürün olduğunda enzimler aktive kaybı ile kendini gösteren inhibisyona maruz kalabilirler [7].

Çoğu enzim reaksiyonlarını katalizleyebilmek için kofaktör adı verilen bazı spesifik moleküllere ihtiyaç duyar ve bu tip enzimlerin fonksiyonel olabilmesi için kofaktörlerinin

reaksiyon ortamda olmaları ve sürekli yenilenmesi gerklidi. Kofaktörlerin kararsız ve pahalı

bileşikler olması ve yerlerine bazı sentetik eşdeğerlerinin kullanılamaması önemli dezavantajlardır [7].

Enzimler alerjik bazı reaksiyonlara sebep olabilmektedir. Enzimleri diğer kimyasal maddeler gibi dikkatli bir şekilde kullanarak bu alerjik reaksiyonlardan kaçınılabilir [7].

2.2. Mikrobiyal Biyotransformasyonlar

Biyotransformasyonlar için genellikle saflaştırılmış enzimler veya bütün hücre sistemleri kullanılır. Bütün hücre sistemleri olarak ise çoğu zaman mikroorganizmalar ile bitki veya hayvan kökenli olan hücre, doku ve organ kültürleri kullanılır [7].

Çoğu enzimin hücre dışında kararsız olması, kofaktörlerinin sağlanması ve sürekli yenilenmesi, saflaştırma işlemlerini oldukça maliyetli ve zor olması ile saflaştırılırken zarar görebilmeleri gibi problemler bilim insanlarının biyotransformasyon çalışmaları için genelde bütün hücre sistemlerini tercih etmelerine sebep olmaktadır [7].

Bütün hücre sistemleri içeren biyotransformasyon çalışmaları çoğu zaman mikrobiyal hücreler ile uygulanmaktadır. Mikrobiyal hücrelerin büyüme ve gelişme hızı diğer hücrelere göre daha yüksek olduğundan mikroorganizmaların kullanıldığı biyotransformasyon çalışmaları daha kısa zamanda gerçekleştirilebilmektedir. Mikrobiyal hücreler daha küçük boyutlu olan ve dayanıklı hücre duvarları içerdikleri için hücrelere göre mekanik açıdan çok daha çok kararlıdır. Mikrobiyal hücrelerin ortamlarına çok daha kolay uyum sağlamaları kullanıcılarına yararına olan bir özelliktir. Ayrıca mikrobiyal hücreler diğer canlıların hücrelerine göre çok daha fazla sayıda ve farklı tipte substratlar üzerinde kimyasal değişimler gerçekleştirebilirler [7].

Mikrobiyal biyotransformasyonlar bilinen sentez yöntemlerine olan birçok üstünlüklerinden dolayı günümüzde biyoteknolojinin önemli öğeleri olmuşlardır [7-9]. Mikrobiyal hücrelerin genetikleri değiştirilebildiği için biyoteknoloji çalışmalarındaki kullanımları giderek artmaktadır [8].

Mikrobiyal hücreler içerdikleri spesifik olmayan enzimleri ile çok fazla sayıda ve farklı tiplerdeki doğal veya sentetik substrat üzerinde çok sayıda farklı kimyasal değişiklikler yapabilmektedir [6].

Genelde 1 atm basınç ve oda sıcaklığı gibi oldukça ılıman şartlarda uygulanabilen mikrobiyal biyotransformasyonların aksine bilinen diğer sentez yöntemlerinde

kullanılan çoğu reaktif çevremize geri dönüşü olmayan önemli zararlar verdikleri için mikrobiyal biyotransformasyonlar doğa dostu olarak değerlendirilir [6, 7].

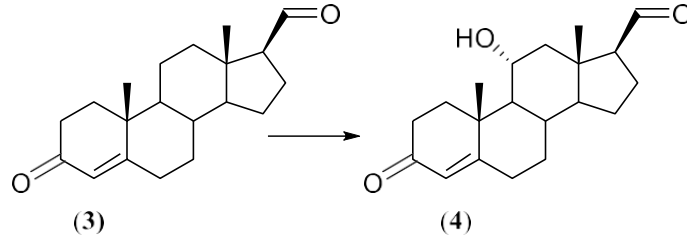
Mikrobiyal biyotransformasyonlar bilinen diğer sentez yöntemlerine göre daha az maliyetler ile ve daha kısa sürelerde gerçekleştirilebilirler [6-9].

Enantiyoseçici olan enzimlerin yer aldığı mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonları da enantiyoseçici olduğundan bu reaksiyonlar tek enantiyomerler ile sonuçlanırlar [6, 8]. Bilinen diğer sentez yöntemleri ile hedef moleküllerin sentezi genelde ayrılmaları neredeyse imkansız olan rasemik karışımlar ile sonuçlanır [6]. Özellikle ilaç sanayindeki etken madde sentezlerinde yalnızca hedeflenen enantiyomerin sentezlenmesi oldukça önemlidir. Bundan dolayı son yıllarda tek enantiyomerlerin tek basamakta sentezleri için daha çok mikroorganizmaların kullanılmaları tercih edilmektedir [7].

Mikroorganizmalardaki enzimler regioseçici oldukları için mikrobiyal biyotransformasyonlar esnasında substratlardaki diğer fonksiyonel grupların korunması gerekmemektedir [6, 7].

Mikrobiyal biyotransformasyonların gerçekleşeceği kısmın yakınlarında genelde spesifik bir fonksiyonel grubun bulunması gerekmemektedir [6, 7]. Örneğin, mikrobiyal hidroksilasyonlar fonksiyonel gruplardan uzak kısımlarda gerçekleşir [6].

Mikrobiyal biyotransformasyonlar sayesinde çok değişik tipde ve sayıda reaksiyonlar gerçekleştirilebilmektedir [6, 7]. Buna ilaveten bilinen diğer sentez yöntemleri ile mikrobiyal hidroksilasyonlar gibi reaksiyonlar tek basamakta gerçekleştirilememektedir [6]. Mikrobiyal hidroksilasyonlar en değerli ve yaygın mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonları arasında yer almaktadır [6, 7]. Mikrobiyal hidroksilasyonların önemi ilk olarak 1952 yılında gerçekleştirilen kortikal steroidlerin sentezi esnasında ortaya çıkmıştır [6]. Bir oksijen fonksiyonunun bu steroidlerin yakın çevresinde fonksiyonel grup bulunmayan C-11 pozisyonuna eklenmesi o dönemdeki mevcut yöntemlerle çok maliyetli ve uzun sürede gerçekleştirilebilen bir işlemdi. Bu sorunun tek basamakta *Rhizopus arrhizus* küfö ile çözülmesi mikrobiyal biyotransformasyonları çok kısa sürede oldukça popüler yapmıştır [6]. Bahsedilen reaksiyon ile progesteron (3) 11 α -hidroksiprogesteron (4) bileşiğine dönüştürülmüştür (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. İlk mikrobiyal hidroksilasyon reaksiyonu [6].

Mikrobiyal biyotransformasyonları uygularken serbest olarak yada belirli bir yüzeye sabitlenerek olarak kullanılabilen küfler, bakteriler ve mayalar gibi çeşitli mikroorganizmalardan yararlanılmaktadır [8].

2.3. Küfler ile Steroid Biyotransformasyonları

Küfler ile steroid biyotransformasyonları küf enzimlerinin yüksek regio ve stereoseçicilikleri nedeni ile özellikle önemli birçok ilacın üretiminde uygulanmaktadır [9-13]. Bilinen mikrobiyal biyotransformasyonları daha da etkinleştirmek, kullanılabilecek yeni reaksiyonlar ve mikroorganizmalar belirlemeye yönelik çalışmalar halen devam etmektedir [9].

Bugüne kadar çok sayıda küf ile mikrobiyal steroid biyotransformasyonları gerçekleştirilmiş ve bu biyotransformasyonlar mikrobiyal hidroksilasyonlar, Baeyer-Villiger oksidasyonları, A halkasının aromatikleşmesi, yan zincirlerin uzaklaştırılması, hidroksil gruplarının oksidasyonu, keton gruplarının redüksiyonu, mikrobiyal hidrojenasyonlar ve dehidrojenasyonlar gibi ilginç sonuçlar vermiştir [6, 9-13].

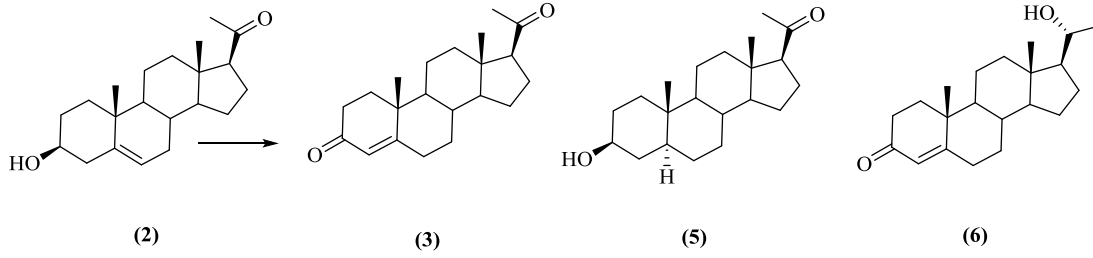
2.4. *Aspergillus* Türleri ile Pregnenolon (2) Biyotransformasyonları

Aspergillus cinsine ait küfler özellikle mikotoksinleri, patojenlikleri, temel ökaryotik genetik ve biyoteknolojide yoğun bir şekilde çalışmaları sebebi ile ilgi odağı olmuştur [14]. Genelde su, toprak ve çüreyen materyallerde gözlenen *Aspergillus* türlerinin bazıları hayvanlar ve insanlar için patojenlik gösterir [15].

Farklı steroidlerin *Aspergillus* türleri ile biyotransformasyonları genelde yan zincir uzaklaştırılması, Baeyer-Villiger oksidasyonları, mikrobiyal hidroksilasyonlar, mikrobiyal hidrojenasyonları ve dehidrojenasyonlar gibi sonuçlar vermiştir [9-13].

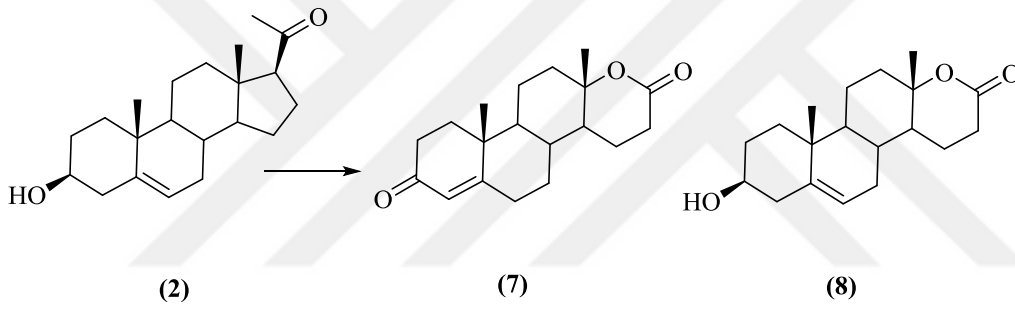
Memelilerdeki progesteron (3) ve diğer steroid hormonların çıkış maddesi olan [4-5] pregnenolon (2) bazı *Aspergillus* türleriyle inkübe edilmiştir [9-13, 16-22]. Örneğin,

A. oryzae izolatu ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.2.) progesteron (3), 3β-hidroksi-5α-pregnan-20-on (5) ve (20R)-20-hidroksi-pregn-4-en-3-on (6) metabolitlerini vermiştir [16].



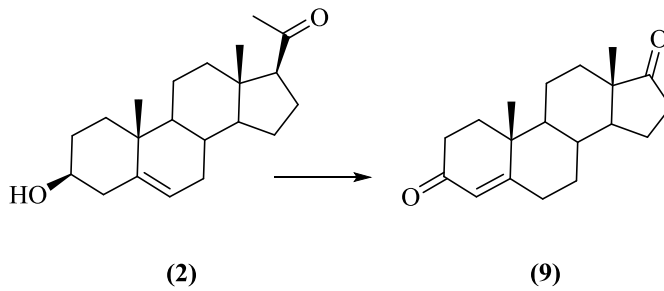
Şekil 2.2. *A. oryzae* ile substratın inkübasyonu [16].

A. tamarii QM 1223 [17] ve *A. terreus* MRC 200365 [18] izolatlarının substratın inkübasyonları (Şekil 2.3.) 17α-okza-D-homo-androst-4-en-3,17-dion (7) ve 3β-hidroksi-17α-okza-D-homo-androst-5-en-17-on (8) metabolitleri ile sonuçlanmıştır



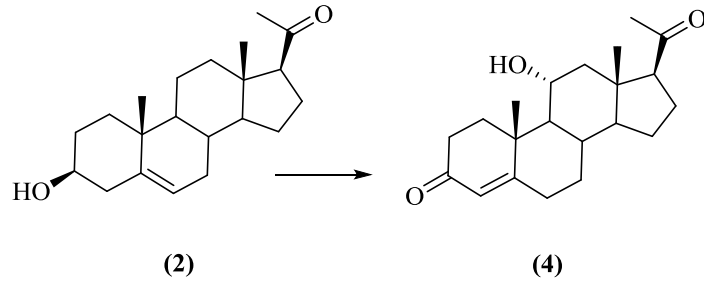
Şekil 2.3. Bazı *Aspergillus* izolatları ile substratın inkübasyonları [17,18].

Bir *A. auerogulgens* izolatu ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.4.) yalnızca androst-4-en-3,17-dion (9) metaboliti ile sonuçlanmıştır [19].



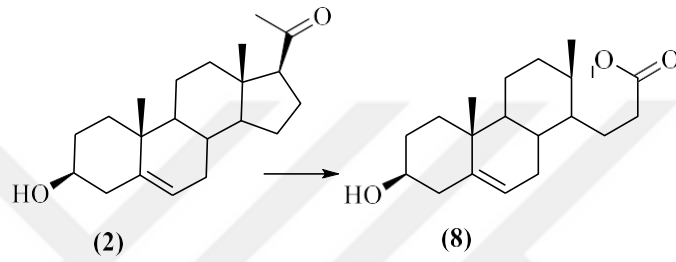
Şekil 2.4. Bir *A. auerogulgens* izolatu ile substratın inkübasyonu [19].

A. wentii MRC 200316 izolatu ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.5.) yalnızca 11α-hidroksipregn-4-en-3,20-dion (4) metabolitlerini vermiştir [20].



Şekil 2.5. *A. wentii* MRC 200316 ile substratın inkübasyonu [20].

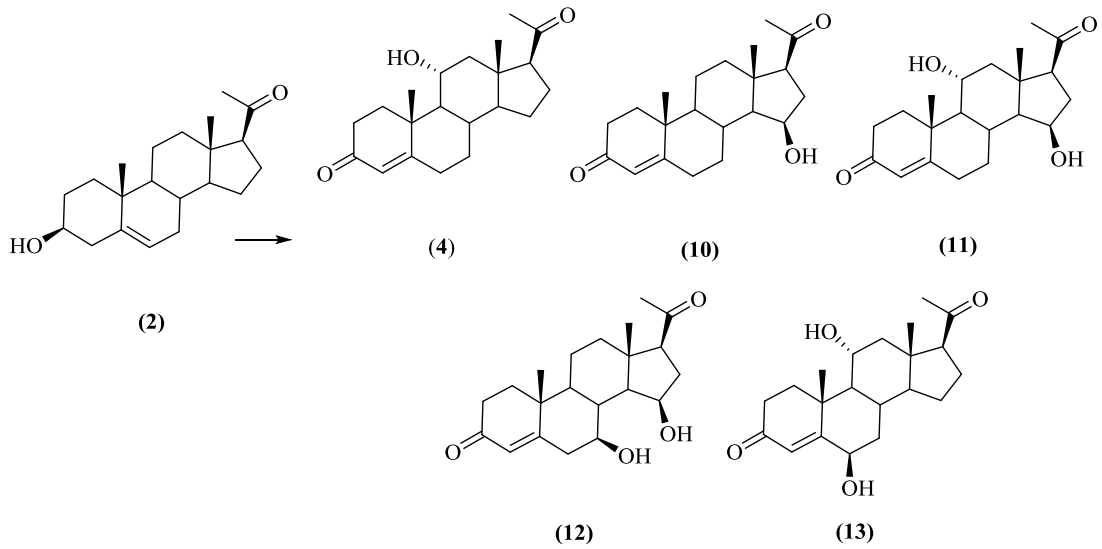
A. tamarii MRC 72400 izolatu ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.6.) önceki bir çalışmadan elde edilen (8) numaralı metaboliti vermiştir [21]



Şekil 2.6. *A. tamarii* MRC 72400 ile substratın inkübasyonu [21].

A. sydowii MRC 200653 izolatu ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.7.) 15 β -hidroksipregn-4-en-3,20-dion (10), 11 α ,15 β -dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (11), 6 β ,11 α -dihidroksipregn-4-

en-3,20-dion (12) ve 7 β ,15 β -dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (13) ile daha önceki bir çalışmadan izole edilen (4) numaralı metabolitler ile sonuçlanmıştır [22].



Şekil 2.7. *A. sydowii* MRC 200653 ile substratın inkübasyonu [22].

2.5. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı pregnenolon (2) bileşiminin daha önce steroid biyotransformasyonları için kullanılmayan *Aspergillus glaucus* MRC 200914 küfö ile biyotransformasyonunun incelemesidir. *Aspergillus glaucus* çok zor şartlar altındaki fizyolojik dayanıklılığı sebebi ile dünya çapında yaygın olarak dağılım gösteren ve insanlar için hafif derecede patojen olabilen bir küftür [23].



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Genel Bilgiler

Biyotransformasyon deneyinde kullanılacak besiyeri ve cam malzemeler Nüve OT 40 L marka otoklavda 121°C sıcaklıkta ve 20 dakika boyunca sterilize edildi. Yatık agar besiyerlerine küf eklenmesi, sterilize edilmiş erlenlere küf ve substrat eklenmesi için Nükleon marka Sınıf II Tip steril kabinle gerçekleştirilirken biyotransformasyon deneyindeki inkübasyonlar için Gerhardt THO 500 Laboshake marka çalkalamalı inkübatörle gerçekleştirildi. Infrared spektrumları Perkin Elmer SpectrumTwo spektrometre cihazı ile alındı. ¹H NMR spektrumlarının alınması için solvent olarak döterokloroform, iç sinyal olarak tetrametilsilan standardı içeren ve 300 MHz'de çalışan Variann Mercury 300 NMR spektrometresi kullanıldı. ¹³C NMR spektrumlarının alınması için solvent olarak döterokloroform kullanılarak 75 MHz'de çalışan Varian Mercury 300 NMR spektrometresi kullanıldı. Steroidlerin erime noktaları Elektrothermal IA 9200 erime noktası tayin cihazı ile belirlendi.

Biyotransformasyon deneyi ve kolon kromatografisi çalışması ince tabaka kromatografisi (İTK) çalışmaları ile izlendi. İTK çalışmaları ise 0,25 mm kalınlığında silika jel tabakaları (Merck silika jel GF254) ve etil asetat-hekzan (1:1) çözücü sistemi ile uygulandı. İTK çalışmalarında steroidler *p*-anisaldehit-sülfürik asit reaktifine daldırıldıktan sonra 120°C sıcaklıkta 3 dakika süreyle ısıtılarak belirginleştirildi.

A. glaucus MRC 200914 izolatu Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu, Marmara Araştırma Merkezi, Gıda Teknoloji ve Araştırma Enstitüsü, Kültür Koleksiyonundan satın alındı.

Pregnelon (2)D Sigma-Aldrich firmasından temin edildi alındı. Yatık agar besiyerleri için kullanılan PDA ve agar, küf besiyeri içeriğindeki kimyasallar ve çalışmadaki tüm solventler ise Merck firmasından temin edildi.

3.2. Yatık Agar Besiyerlerinin Hazırlanması

5,85 g PDA (potato dekstroz agar) ve 1,2 g agar karıştırıldıktan sonra saf su ile 150 mL'ye tamamlanıp kaynatılarak besiyeri hazırlandı. Bu besiyeri soğumadan Universal

marka 15 adet 22 mL'lik patolojik cam şişelerin yarısına kadar ilave edildikten sonra otoklavda 121°C'de 20 dakika sterilize edildi. Şişelerdeki erimiş besiyerinin donmadan önce yaklaşık 45 derecelik bir eğimle soğumaya bırakılması ile yatık agar besiyerleri elde edildi.

3.3. Küf Kültürü Hazırlanması ve Tazelenmesi

Yatık agar besiyerindeki küfün bir kısmı oda sıcaklığında ve 15 gün süresince çoğalmaya bırakılmak üzere yatık agar besiyerlerinin 3 tanesine steril koşullarda ilave edildi. Hazırlanan yeni yatık agar kültürlerindeki en iyi gelişmiş küf her 2 haftada bir yeni yatık agar besiyerlerine steril şartlarda ilave edildi. Bu işlemin 2 kez tekrarlanması neticesinde en taze ve en iyi gelişme gösteren küf biyotransformasyon deneyi için kullanıldı.

3.4. Küf için Besiyeri Hazırlanması

A. glaucus MRC 200914 küfüne ait besiyeri glukoz (200 g), pepton (5 g), malt ekstraktı (3 g) ve maya ekstraktı (3 g) 1 L distile su da çözülüp karıştırılarak hazırlandı [29].

3.5. Biyotransformasyon Deneyi

Küf için hazırlanan besiyeri 10 adet 250 mL erlene eşit miktarlarda bölüştürülerek otoklavda sterilize edildi. Erlenlere en iyi durumdaki tazelenmiş küf steril şartlarda aktarıldıktan sonra çalkalamalı bir inkübatörde (150 rpm) 25 °C'de 3 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu takiben substrat (1 g) DMF (10 mL) içerisinde çözülerek erlenlere eşit hacimlerde ve steril şartlarda aktarıldı. Sonrasında erlenler 25°C'de 5 gün daha inkübe edildi (150 rpm).

Biyotransformasyon deneyi bir adet kontrol erleniyle izlendi. Kontrol erleni hazırlamak için küf nakledilmemiş steril besiyeri içeren bir erlene yalnızca substrat ilave edildi. Biyotransformasyon deneyindeki gerçekleştirilen işlemlerin hepsi kontrol erleni içinde

gerçekleştirildi. Tüm işlemlerin sonunda kontrol erleni ile yapılan İTK çalışmasında substrat haricinde yeni bir bileşik gözlenmediğinden biyotransformasyon deneyi sonuçlarının geçerli olduğu değerlendirildi.

3.6. Metabolitlerin Ayrılması ve Yapı Tayinleri

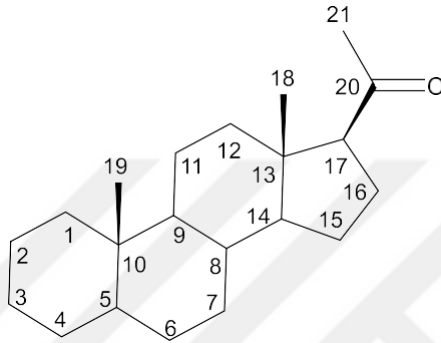
İnkübasyonu takiben küfe ait besiyeri filtrasyonla misellerinden filtrat olarak ayrıldı ve miseller etil asetat (500 mL) ile yıkandı. Filtrattaki steroidler etil asetat (1 L) ile 3 kez ekstrakte edildi. Ekstraktlara susuz sodyum sülfat eklenerek ortamda ekstratlarda mevcut olabilecek su giderildi. Ekstraktların evaporatörde uzaklaştırılması ise kahverengi yağimsı bir madde verdi. Bu yağimsı maddeyi substrat ile karşılaştırmak suretiyle İTK çalışmaları gerçekleştirildikten sonra silika jel 60 (Merck 107734, 230-400 mesh) absorban olarak kullanılarak yağimsı maddedeki steroidleri ayırmak için bir kolon kromatografisi çalışması uygulandı. Steroidler elüent olarak *n*-hekzan içerisinde artan etil asetat derişimleri kullanılarak kolonlardan saflaştırıldı. Substrat ile her bir steroide ait erime noktası, NMR ve IR spektrumlarının karşılaştırılması suretiyle ise yapı tayinleri gerçekleştirildi.



4. DENEYSEL BULGULAR

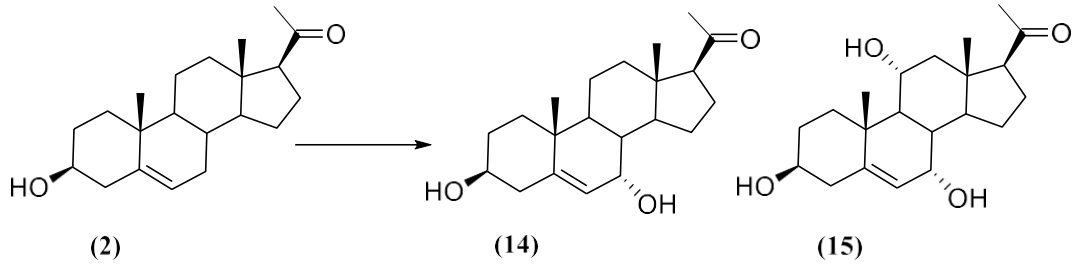
Bu çalışmada karbon iskeleti Şekil 4.1.'de verilen pregnenolon (2) bileşiğinin *A. glaucus*

MRC 200914 izolatu ile 5 gün süren biyotransformasyonunu gerçekleştirildi.



Şekil 4.1. Substratın karbon iskeleti.

Substratın *A. glaucus* MRC 200914 ile inkübasyonundan elde edilen yağimsı maddenin (1959 mg) kolon kromatografisi çalışması başlangıç maddesi (134 mg) ile 3 β ,7 α -dihidroksipregn-5-en-20-on (14) ve 3 β ,7 α ,11 α -trihidroksipregn-5-en-20-on (15) metabolitlerini verdi (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. *A. glaucus* MRC 200914 ile substratın inkübasyonu.

3 β ,7 α -Dihidroksipregn-5-en-20-on (14) (546 mg, %52)

Erime noktası: 189-190 °C, lit., 185-187 °C [25].

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3425, 1735, 1660 ve 1610.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,60 (3H, s, 18-H), 0,95 (3H, s, 19-H), 2,10 (3H, s, 21-H), 2,54

(1H, t, $J = 8,5$ Hz, 17α -H), 3,53 (1H, tt, $J = 5$ ve 11 Hz, 3α -H), 3,83 (1H, bs, 7β -H), 5,56 (1H, d, $J = 5$ Hz, 6-H).

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

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

C atomu	(2)	(14)	(15)
1	37.22	36.94	38.00
2	31.54	31.62	30.94
3	71.67	71.17	70.14
4	42.20	42.10	42.00
5	140.72	146.24	145.53
6	121.38	123.65	123.05
7	31.73	65.13	63.98
8	31.81	37.36	36.73
9	49.93	41.88	47.87
10	36.48	37.36	38.27
11	21.05	20.66	67.54
12	38.80	38.18	48.71
13	43.98	43.78	43.43
14	56.88	49.60	48.91
15	22.77	24.38	23.40
16	24.46	22.86	22.39
17	63.68	63.45	62.60
18	13.21	12.96	13.43
19	19.36	18.20	17.29
20	209.65	209.74	208.75
21	31.54	31.23	30.94

$3\beta,7\alpha,11\alpha$ -Trihidroksipregn-5-en-20-on (15) (187 mg, %17).

Erime noktası: 273-274 °C, lit., 264-264 °C [25]. IR ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3425, 1735, 1660 ve 1610.

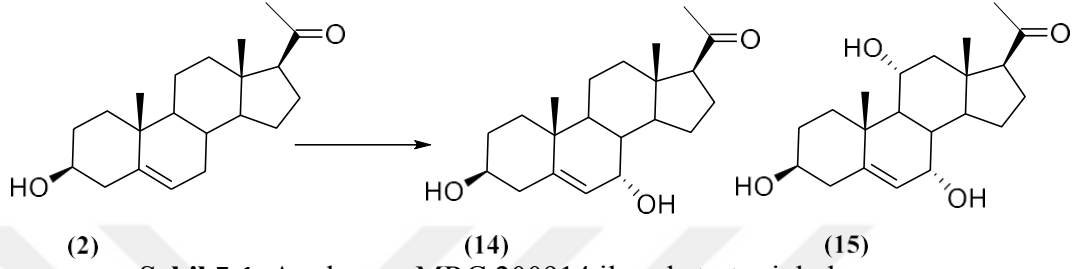
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,40 (3H, s, 18-H), 0,91 (3H, s, 19-H), 1,93 (3H, s, 21-H), 2,40

(1H, t, $J = 8,5$ Hz, 17α -H), 3,30 (1H, tt, $J = 5$ ve 11 Hz, 3α -H), 3,57 (1H, bs, 7β -H), 3,80 (1H, dt, $J = 5$ ve 10 Hz, 11β -H), 5,40 (1H, d, $J = 5$ Hz, 6-H).

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

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

A. glaucus MRC 200914 izolatu ile pregnenolon (2) bileşiğinin inkübasyonu iki metabolit ile sonuçlanmıştır (Şekil 5.1.).



Şekil 5.1. *A. glaucus* MRC 200914 ile substratın inkübasyonu.

İlk metabolit 3β,7α-dihidroksipregn-5-en-20-on (14) olarak tanımlandı. Metabolite ait ¹H NMR spektrumu 7α-hidroksil grubu için karakteristik olan bir sinyali (1H, dt, *J* = 5 ve 10 Hz) 4.02 ppm’de verdi [26]. Metabolitin ¹³C NMR spektrumunda C-8 sinyali aşağı alana doğru bir kayma ($\Delta\delta_C$ 0,88 ppm) gösterirken C-9 sinyali için ise yukarı alana doğru bir γ -gauche kayması ($\Delta\delta_C$ 8,05 ppm) gösterdi [27]. Bu sonuçlar bir 7α-hidroksil grubu varlığını daha da belirginleştirdi [27]. Metabolite ait ¹H NMR spektrumunda substratta da bulunan 3α-H, 6-H ve 17α-H sinyalleri sırasıyla δ_H 3,53 (1H, dt, *J* = 5 ve 11 Hz), 5,56 ppm (1H, d, *J* = 5 Hz) ve δ_H 2,50 ppm (1H, t, *J* = 8,5 Hz) bulunduğu için substratın diğer kısımlarında değişimin gerçekleşmediği anlaşıldı.

İkinci metabolit ise 3β,7α,11α-trihidroksipregn-5-en-20-on (15) olarak belirlendi. Metabolite ait ¹H NMR spektrumu 7α-hidroksil grubu için tipik olan sinyali (1H, bs) δ_H 3,57 ppm’de verdi [26]. Metabolite ait ¹³C NMR spektrumunda C-8 sinyali aşağı alana doğru bir kayma ($\Delta\delta_C$ 4,92 ppm) verirken C-9 sinyali yukarı alana doğru bir γ -gauche kayması ($\Delta\delta_C$ 2,06 ppm) verdi [27]. Bu sonuçlar metabolitteki bir 7α-hidroksil grubu varlığını daha da netleştirdi [27]. Metabolit ¹H NMR spektrumu 11α-hidroksil grubunun varlığını gösteren karakteristik bir sinyali (1H, dt, *J* = 5 ve 10 Hz) δ_H 3.80 ppm’de verdi [26]. Metabolitin ¹³C NMR spektrumunda C-12 sinyali aşağı alana doğru kayma ($\Delta\delta_C$ 9,91 ppm) verdi. Bu kimyasal kayma değeri bir 11α-hidroksil grubunu varlığını daha da belirginleştirdi [27]. Metabolite ait

^1H NMR spektrumu substrat molekülünde de mevcut olan $3\alpha\text{-H}$, 6-H ve $17\alpha\text{-H}$ sinyallerini sırasıyla δ_{H} 3,30 (1H, tt, $J = 5$ ve 11 Hz), 5,40 ppm (1H, d, $J = 5$ Hz) ve δ_{H} 2,40 ppm (1H, t, $J = 8,5$ Hz) bulundurduğu için substratın diğer kısımlarında değişim olmadığı değerlendirildi.

Tablo 5.1. Steroidler için ^{13}C NMR kimyasal kayma değerleri.

C atomu	(2)	(14)	(15)
1	37.22	36.94	38.00
2	31.54	31.62	30.94
3	71.67	71.17	70.14
4	42.20	42.10	42.00
5	140.72	146.24	145.53
6	121.38	123.65	123.05
7	31.73	65.13	63.98
8	31.81	37.36	36.73
9	49.93	41.88	47.87
10	36.48	37.36	38.27
11	21.05	20.66	67.54
12	38.80	38.18	48.71
13	43.98	43.78	43.43
14	56.88	49.60	48.91
15	22.77	24.38	23.40
16	24.46	22.86	22.39
17	63.68	63.45	62.60
18	13.21	12.96	13.43
19	19.36	18.20	17.29
20	209.65	209.74	208.75
21	31.54	31.23	30.94

Tablo 5.2.'den de görüleceği gibi *A. glaucus* MRC 200914 küfү pregnenolonu (2) yüksek bir verim ile C-7 α pozisyonunda hidroksillerken C-11 α pozisyonunda da ise düşükbir verim ile hidroksilledi.

Tablo 5.2. Metabolit verimleri.

Substrat	Metabolit	% Verim
Pregnenolon (2)		
	3 β ,7 α -Dihidroksipregn-5-en-20-on (14)	52
	3 β ,7 α ,11 α -Trihidroksipregn-5-en-20-on (15)	17

Literatürdeki küf türleri ile steroid biyotransformasyon çalışmaları incelendiğinde ise pregnenolon (2) bileşiğinin hem C-7 α hemde C-11 α pozisyonlarında hidroksillenmesinin yaygın olduğu [9-13] gözlenmesine rağmen *Aspergillus* türlerinin substratı C-11 α pozisyonunda hidroksillerken C-7 α pozisyonunda hidroksillemediği gözlemlendi. Buna rağmen *A. glaucus* MRC 200914 izolatu diğer *Aspergillus* türlerinin

aksine substratı yüksek verimli olarak C-7 α pozisyonunda düşük verimli olarak ise C-11 α pozisyonlarında hidroksilledi [9- 13,16-22]. *A. glaucus* MRC 200914 ve diğerküfler ile steroid biyotransformasyonları çalışmamız sürmektedir.





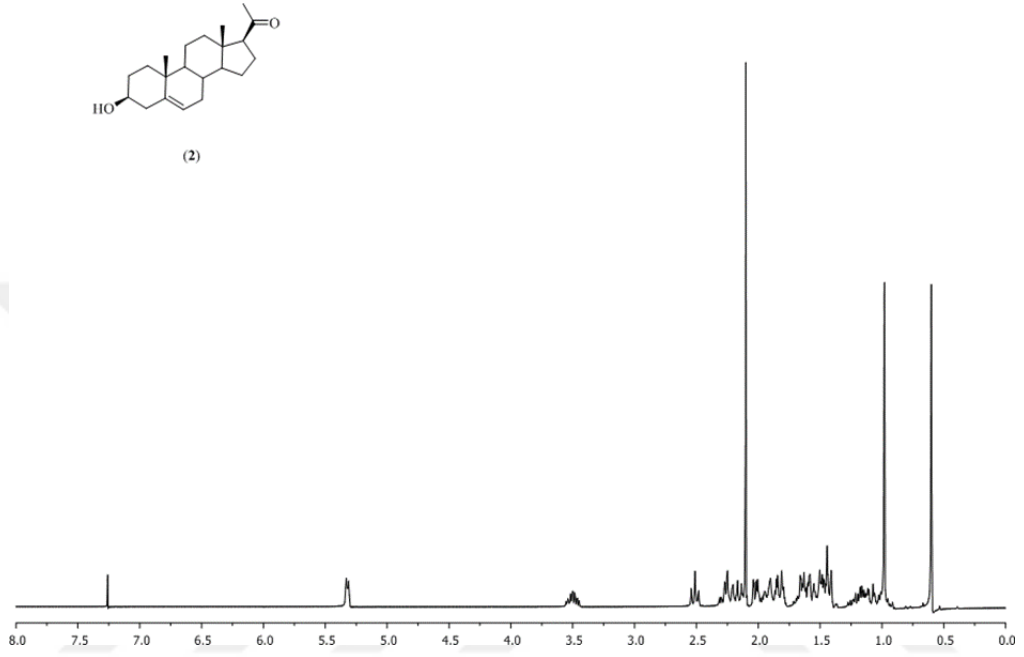
KAYNAKLAR

- [1] Hanson, J.R., Natural Products: The Secondary Metabolites, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1-2, 2003.
- [2] Clayden, J., Greeves, N., Warren, S., Wothers, P., Organic Chemistry, First edition, Oxford University Press, Oxford, 1413-1414, 2001.
- [3] Mann, J., Chemical Aspects of Biosynthesis, First edition, Oxford University Press, New York, 2-4, 1994.
- [4] Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E.Y., İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, 481-495, Ankara, 2002.
- [5] Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. İ., Biyokimya, Dördüncü baskı, Aktif Yayınevi, 93-188, Erzurum, 2005.
- [6] Hanson, J.R., An Introduction to Biotransformations in Organic Chemistry, W.H. Freeman Spektrum, 1-62, New York, 1995.
- [7] Faber, K., Biotransformations in Organic Chemistry, Fifth Edition, Springer-Verlag, Berlin, 1-407, 2003.
- [8] Demain A.L., Small Bugs, Big Business: The Economic Power of the Microbe, Biotechnology Advances, 18, 499-514, 2000.
- [9] Donova, M.V., Egorova, O.V., Microbial Steroid Transformation: Current State and Prospects, Applied Microbiology and Biotechnology, 94, 1423–1447, 2012.
- [10] Fernandes, P., Cruz, A., Angelov, B., Pinheiro, H. M., Cabral, J. M. S., Microbial Conversion of Steroids Compounds: Recent Developments, Enzyme and Microbial Technology, 32, 688–705, 2003.
- [11] Mahato, S. B., Garai, S., Advances in Microbial Steroid Biotransformation, Steroids, 62, 332–345, 1997.
- [12] Nassiri-Koopaei N., Faramarzi M.A., Recent developments in the fungal transformation of steroids. Biocatalysis and Biotransformation, 33,1-28, 2015.
- [13] Bhatti H,N., Khera R.A., Biological transformations of steroidal compounds: a review, Steroids. 77, 1267-1290, 2012.
- [14] Samson, R. A., Hong, S-B., Frisvad, J. C., Old and New Concepts of Species Differentiation in Aspergillus, Medical Mycology, 44, S133-S148, 2006.
- [15] Lee, S. K., Kang, H. G., Na, K. J., Han, J.I., Fungal Dermatitis Caused by Aspergillus sydowii in a Thoroughbred Horse. Journal of Equine Veterinary Science, 32, 835-839, 2012.
- [16] Cvelbar, D., Zist, V., Kobal, K., Zigon, D., Zakelj-Mavrič, M., Steroid toxicity and detoxification in ascomycetous fungi. Chemico-Biological Interactions, 202, 243-258, 2012.

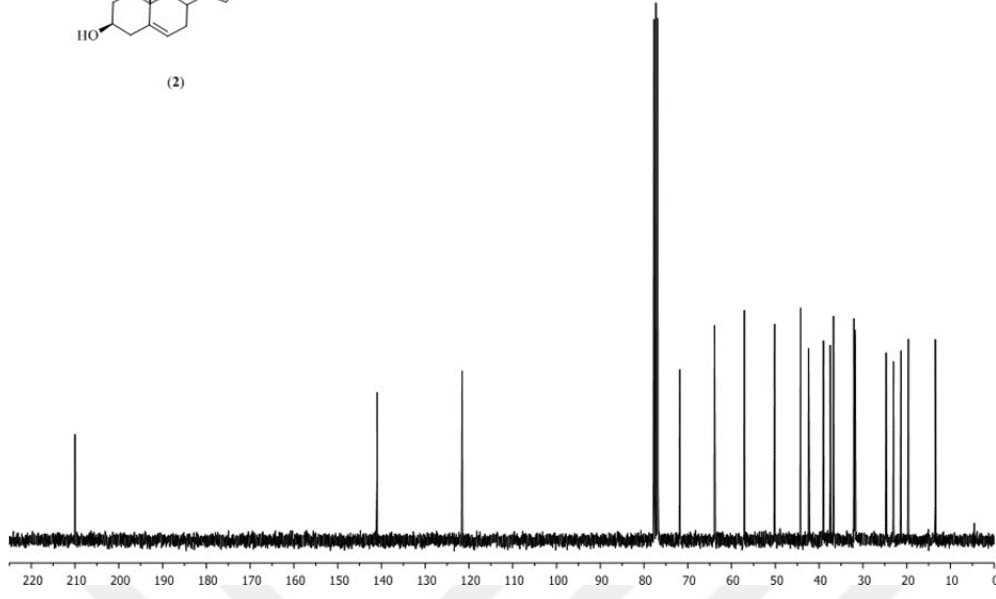
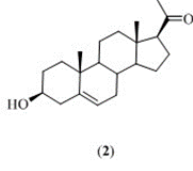
- [17] Brannon, D. R., Parrish, F. W., Willey, B. J., Long, L., The Microbial Transformations of a Series of Androgens with *Aspergillus tamarii*. *J Org. Chem.*, 32, 1521-1527, 1967.
- [18] Yildirim, K., Uzuner, A., Gülcüoğlu E.Y., Biotransformation of some steroids by *Aspergillus terreus* MRC 200365. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 75, 665-673, 2010.
- [19] Viola, F., Caputo, O., Balliano, G., Delprino, L., Cattel, L., Side Chain Degradation and Microbial Reduction of Different Steroids by *Aspergillus aureogulgens*. *J. Steroid Biochem.*, 19, 1451-1458, 1983.
- [20] Yildirim, K., Microbial Hydroxylation of Some Steroids by *Aspergillus wentii* MRC 200316. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 12, 1273-1281, 2010.
- [21] Yildirim, K., Uzuner, A., Gülcüoğlu E.Y., Baeyer-Villiger Oxidation Of Some Steroids By *Aspergillus tamarii* Mrc 72400. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 76, 743-754, 2011.
- [22] Yildirim K., Kuru, A., The Biotransformation of Some Steroids by *Aspergillus sydowii* MRC 200653, *Journal of Chemical Research*, 40, 78-81, 2016.
- [23] Hubka, V., Kolarík, M., Kubátová, A., & Peterson, S. W., Taxonomic revision of *Eurotium* and transfer of species to *Aspergillus*, *Mycologia*, 105, 912–937, 2013.
- [24] 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.
- [25] Yildirim, K., Kuru, A., The biotransformation of some steroids by *Aspergillus sydowii* MRC 200653, *Journal of Chemical Research*, 40, 78-81, 2016.
- [26] Kirk, D.N., Toms, H.C., Douglas, C., White, K.A., Smith, K.E., Latif, S., and Hubbard, R.W.P., 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*, 1990, 1567.
- [27] Blunt, J.W., and Stothers, J.B., C NMR spectra of steroids a survey and commentary. *Org. Magn. Reson.*, 9, 439, 1977.

EKLER

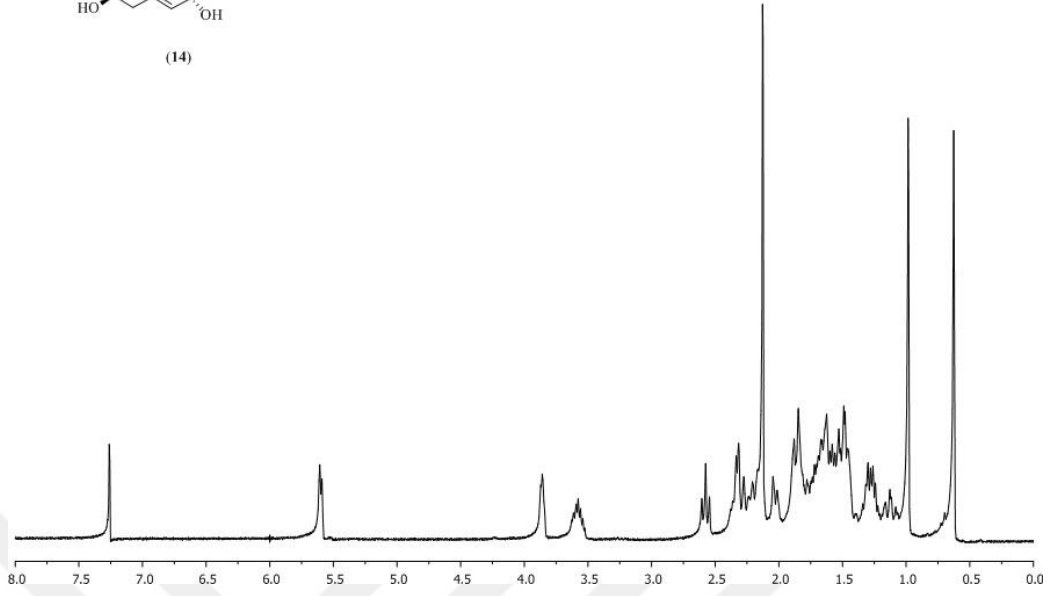
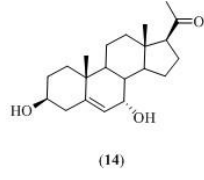
EK A. NMR spektrumları



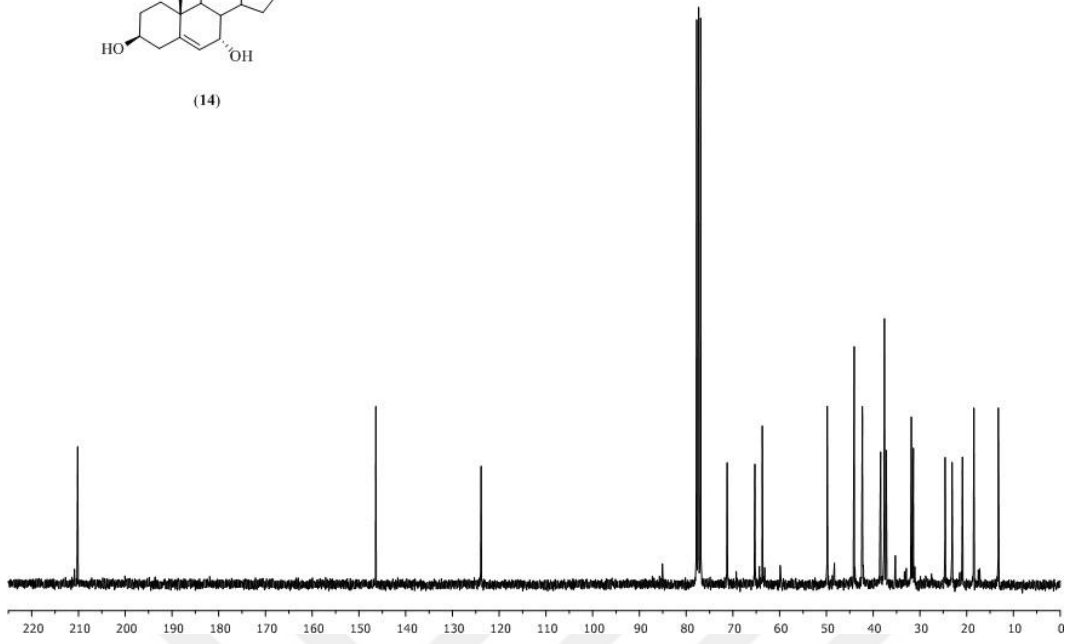
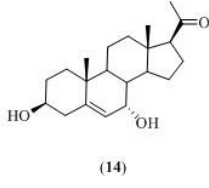
EK A.1. Pregnenolon (2) için ¹H NMR spektrumu



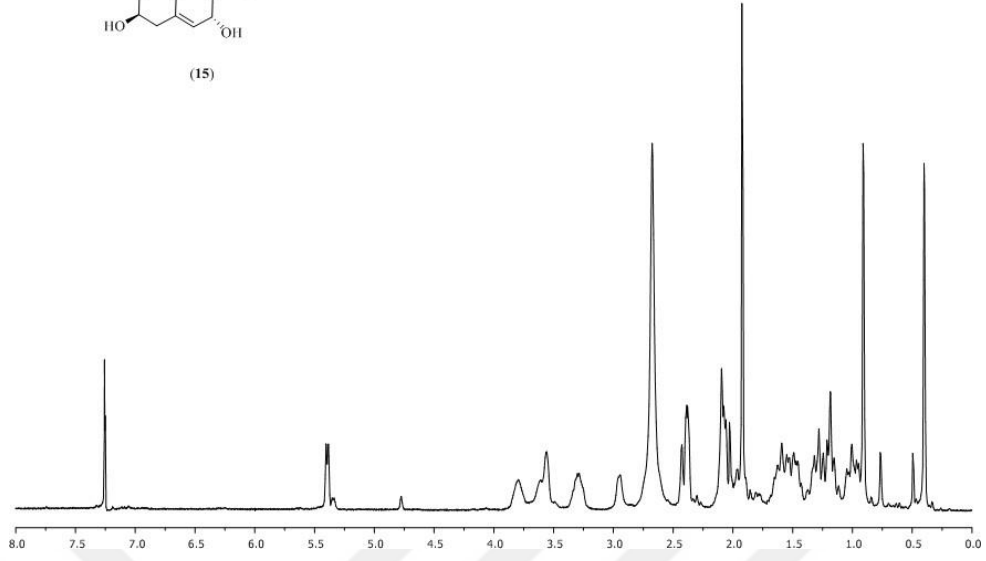
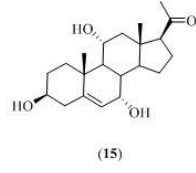
EK A.2. Pregnenolon (2) için ^{13}C NMR spektrumu



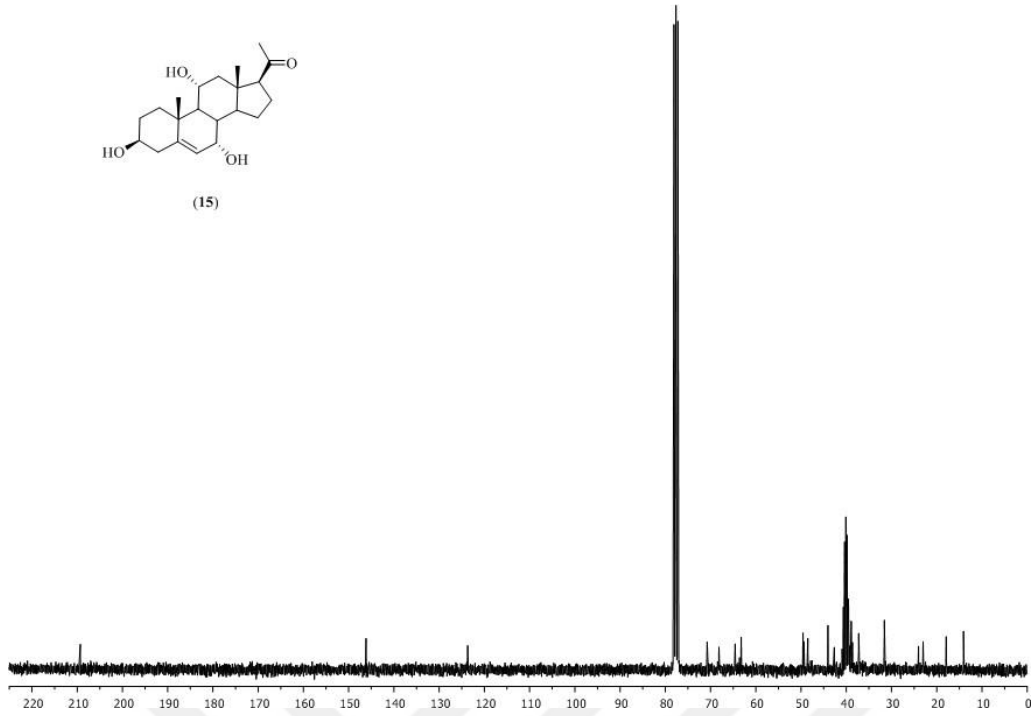
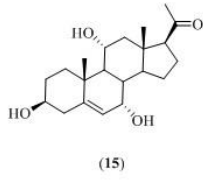
EK A.3. 3 β ,7 α -Dihidroksipregn-5-en-20-on (14) için ^1H NMRspektrumu



EK A.4. 3 β ,7 α -Dihidroksipregn-5-en-20-on (14) için ¹³CNMRspektrumu



EK A.5. 3 β ,7 α ,11 α -Trihidroksipregn-5-en-20-on (15) için ^1H NMR spektrumu



EK A.6. 3 β ,7 α ,11 α -Trihidroksipregn-5-en-20-on (15) için ^{13}C NMR spektrumu

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad :Kübra KARADAŞ

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2018, , Kocaeli Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü
- **Yükseklisans** : Devam eden 2022 yılı, Sakarya Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı, Biokimya Programı

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2018-2021 yılları arasında farklı kurum ve kuruluşlarda Kimya,Matematik ve İngilizce öğretmeniği yaptı.
- Şubat 2022 tarihinden itibaren Üsküdar Gençlik Akademisi'nde Kimya öğretmenliği yapmaktadır.

TEZDEN TÜRETİLEN ESERLER:

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

DİĞER ESERLER: