

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PROGESTERON BİLEŞİĞİNİN *ASPERGILLUS GLAUCUS* KÜFÜ
İLE BİYOTRANSFORMASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fatma Handan KONAR

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

OCAK 2023

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PROGESTERON BİLEŞİĞİNİN *ASPERGILLUS GLAUCUS* KÜFÜ
İLE BİYOTRANSFORMASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fatma Handan KONAR

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kudret YILDIRIM

OCAK 2023

Fatma Handan Konar tarafından hazırlanan “PROGESTERON BİLEŞİĞİNİN *ASPERGILLUS GLAUCUS* KÜFÜ İLE BİYOTRANSFORMASYONU” adlı tez çalışması 30.01.2023 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 :

Ünvan ADI SOYADI
Sakarya Üniversitesi

.....

Jüri Üyesi :

Ünvan ADI SOYADI
Sakarya Üniversitesi

.....

Jüri Üyesi :

Ünvan ADI SOYADI
Sakarya Üniversitesi

.....



ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

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

06/02/2023

Fatma Handan KONAR



TEŞEKKÜR

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

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

Bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan, yaşamım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve koşulsuz yanımda olan aileme ve kardeşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Fatma Handan KONAR



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	v
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
KISALTMALAR	xi
SİMGELER	xiii
TABLO LİSTESİ	xv
ŞEKİL LİSTESİ	xvii
ÖZET	xix
SUMMARY.....	xxi
1. GİRİŞ	1
2. <i>ASPERGILLUS</i> TÜRLERİ İLE PROGESTERON BİYOTRANSFORMASYONLARI	3
2.1. Biyotransformasyon	3
2.2. Mikrobiyal Biyotransformasyonlar	5
2.3. Küfler ile Steroid Biyotransformasyonları	7
2.3.1. <i>Aspergillus</i> türleri ile progesteron biyotransformasyonları	7
2.4. Çalışmanın Amacı	20
3. MATERYAL VE METOT	21
3.1. Genel Bilgiler	21
3.2. Yatık Ağar Besiyerlerinin Hazırlanması	22
3.3. Küf Kültürlerinin Hazırlanması ve Tazelenmesi	22
3.4. Küfe için Besiyerinin Hazırlanması	22
3.5. Biyotransformasyon Deneyi.....	22
3.6. Metabolitlerin Ayrılması ve Yapı Tayini	23
4. DENEYSEL BULGULAR	25
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	27
KAYNAKLAR	31
EKLER	37
ÖZGEÇMİŞ	45



KISALTMALAR

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



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
dt	: Üçlü sinyallerin ikilisi (tripletlerin dubleti)
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
t	: Üçlü (triplet) sinyal



TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 4.1. Steroidlere ait ^{13}C NMR kimyasal kayma değerleri.	25
Tablo 5.1. Steroidlerin ^{13}C NMR kimyasal kayma değerleri.	28
Tablo 5.2. <i>A. glaucus</i> MRC 200914 küfû ile metabolit verimleri.....	29





ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. Siklopentanoperhidrofenantren halkası.	1
Şekil 1.2. Kolesterol (1) ve progesteron (2) bileşiklerinin yapıları.	2
Şekil 2.1. <i>A. phoenicis</i> ile substratın biyotransformasyonu.	8
Şekil 2.2. Sabitlenmiş <i>A. ochraceus</i> TS ile substratın biyotransformasyonu.	8
Şekil 2.3. <i>A. ochraceus</i> NRRL 405 ile substratın biyotransformasyonu.	9
Şekil 2.4. Sabitlenmiş bir <i>A. ochraceus</i> izolatu ile substratın biyotransformasyonu.	9
Şekil 2.5. Bir <i>A. ochraceus</i> izolatu ile substratın biyotransformasyonu.	9
Şekil 2.6. <i>A. niger</i> 100 ile substratın biyotransformasyonu.	10
Şekil 2.7. <i>A. niger</i> 567 ile substratın biyotransformasyonu.	10
Şekil 2.8. <i>A. niger</i> NRRL 599 ile substratın biyotransformasyonu.	11
Şekil 2.9. <i>A. niger</i> 37 ile substratın biyotransformasyonu.	11
Şekil 2.10. <i>A. niger</i> N402 ile substratın biyotransformasyonu.	11
Şekil 2.11. Bazı <i>Aspergillus</i> izolatları ile substratın biyotransformasyonu.	12
Şekil 2.12. Bir <i>A. fumigatus</i> izolatu ile substratın biyotransformasyonu.	12
Şekil 2.13. Bir diğer <i>A. fumigatus</i> izolatu ile substratın biyotransformasyonu.	13
Şekil 2.14. <i>A. tamarii</i> QM1223 ile substratın biyotransformasyonu.	13
Şekil 2.15. Bazı <i>Aspergillus</i> izolatları ile substratın biyotransformasyonları.	13
Şekil 2.16. Sabitlenmiş bir <i>A. terreus</i> izolatu ile substratın biyotransformasyonu.	14
Şekil 2.17. Bir <i>A. oryzae</i> ile substratın biyotransformasyonu.	14
Şekil 2.18. Bir diğer <i>A. oryzae</i> izolatu ile substratın biyotransformasyonu.	14
Şekil 2.19. <i>A. fischeri</i> izolatu ile bi substratın yotransformasyonu.	15
Şekil 2.20. Bir <i>A. aureogulgens</i> izolatu ile substratın biyotransformasyonu.	15
Şekil 2.21. Bir <i>A. subolivaceus</i> izolatu ile substratın biyotransformasyonu.	16
Şekil 2.22. Bir <i>A. nidulans</i> izolatu ile substratın biyotransformasyonu.	16
Şekil 2.23. <i>A. nidulans</i> VKPM F-1069 ile substratın biyotransformasyonu.	16
Şekil 2.24. Bir <i>A. versicolor</i> izolatu ile substratın biyotransformasyonu.	17
Şekil 2.25. Bir <i>A. brasiliensis</i> izolatu ile substratın biyotransformasyonu.	17
Şekil 2.26. Bir <i>A. giganteus</i> izolatu ile substratın biyotransformasyonu.	17
Şekil 2.27. Bir <i>A. sydowii</i> izolatu ile substratın biyotransformasyonu.	18
Şekil 2.28. Bir diğer <i>A. sydowii</i> izolatu ile substratın biyotransformasyonu.	18
Şekil 2.29. Bir <i>A. Sojae</i> izolatu ile substratın biyotransformasyonu.	18
Şekil 2.30. İki ayrı <i>Aspergillus</i> izolatu ile substratın biyotransformasyonları.	19
Şekil 2.31. Bazı <i>Aspergillus</i> izolatlarının substrat biyotransformasyonları.	19
Şekil 2.32. Diğer <i>Aspergillus</i> izolatları ile substratın biyotransformasyonları.	20
Şekil 4.1. Substratın karbon iskeleti.	24
Şekil 4.2. Substratın <i>A. glaucus</i> MRC 200914 ile biyotransformasyonu.	24
Şekil 5.1. Substratın <i>A. glaucus</i> MRC 200914 ile biyotransformasyonu.	27



PROGESTERON BİLEŞİĞİNİN *ASPERGILLUS GLAUCUS* KÜFÜ İLE BİYOTRANSFORMASYONU

ÖZET

Doğal ürünler bulundukları canlılara bazı avantajlar sağlayan ve daha çok diğer canlılara olan etkileri ile dikkat çeken kimyasal maddelerdir. Doğal ürünler genelde terpenoidler, alkaloidler, steroidler, poliketidler, peptidler, fenilpropanoidler, özelleşmiş peptidler, özelleşmiş karbonhidratlar ve yağ asitleri ile yağ asitlerinin türevleri olarak gruplandırılırlar.

Enzimlerin doğal substratları olmayan maddeler üzerinde gerçekleştirdikleri kimyasal değişimler biyotransformasyonlar olarak bilinir. Biyotransformasyonlarda yer alan enzimler serbest olarak, sabitlenmiş olarak veya çeşitli biyolojik sistemlerin bünyelerinde etkilerini gösterebilirler. Biyotransformasyonların gerçekleştirilmesi için en çok kullanılan biyolojik sistemler küfler, mayalar ve bakteriler gibi mikroorganizmalardır. Bu mikroorganizmalar ile gerçekleştirilen mikrobiyal biyotransformasyonlar mevcut kimyasal sentez yöntemlerine göre birçok avantajlara sahiptir.

Günümüzde küfler ile gerçekleştirilen mikrobiyal steroid biyotransformasyonları küf enzimlerinin yüksek regio ve stereoseçici olmaları nedeni ile ilaçlar gibi çok sayıda bileşiklerin elde edilmesi için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Bu çalışma progesteron (**2**) bileşiğinin *Aspergillus glaucus* MRC 200914 küflünde nasıl metabolize edildiğinin incelenmesini amaçlamıştır. Biyotransformasyon deneyi öncesinde *Aspergillus glaucus* MRC 200914 için periyodik olarak taze alt kültürler hazırlandı. Sonrasında küf için besiyeri hazırlanıp erlenlere dağıtıldı ve otoklavda sterilize edildi. Bu erlenlere en taze alt kültürdeki küf steril şartlarda inoküle edildikten sonra erlenler 3 gün inkübasyona bırakıldı. Üçüncü günün sonunda erlenlere progesteron (**2**) steril şartlarda eklenerek 5 gün inkübe edildi. İnkübasyonu takiben besiyeri filtre edildikten sonra besiyerindeki steroidler etil asetat ekstraksiyonu ile organik faza çekildi. Etil asetat ekstraktlarının evaporatörde uçurulması ile elde edilen kalıntıdaki steroidler bir kolon kromatografisi çalışması ile ayrıldı. Steroidlerin yapı tayinleri ise erime noktaları tayini, NMR ve IR spektroskopisi gibi yöntemler ile gerçekleştirildi. Yapı tayinleri sonucunda *Aspergillus glaucus* MRC 200914 ile progesteron (**2**) biyotransformasyonunun 11 α -hidroksipregn-4-en-3,20-dion (**4**) ve 11 α ,15 β -dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (**5**) metabolitlerini verdiği anlaşıldı.



BIOTRANSFORMATION OF PROGESTERONE BY *ASPERGILLUS GLAUCUS*

SUMMARY

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

Biological systems may perform chemical changes on xenobiotics and these changes 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 microorganisms are generally 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 reported more than 3200 enzymes and it is thought that nature might offer 25000 enzymes.

Enzymes provide some advantages for their users as they are very effective catalysts. For example, the reaction rates of enzymatic reactions are accelerated by a factor of 10^8 - 10^{10} and this may even exceed a value of 10^{12} . Enzymes are environmentally acceptable since they are made of amino acids and are totally degradable. Although most other chemical reagents cause environmental problems, enzymes generally act under mild conditions (around pH 7, 30 °C and 1 atm). This minimises some problems such as, isomerisation, racemisation, rearrangements, decomposition. As enzymes are compatible with each other enzymes usually function under the same or similar conditions. Therefore, by using multienzyme systems in a one flask several reactions can be carried out. Some enzymes are liable to their natural role although some enzymes exhibit a high substrate tolerance. These enzymes might accept a large variety of natural or unnatural compounds. Enzymes might 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. As enzymes are chemoselective, they usually act on just one single type of functional group and other functionalities remain unchanged. Therefore, enzymatic reactions usually tend to be cleaner. As enzymes are regioselective they can distinguish between functional groups that are chemically located in different regions of the same substrate molecule. Enzymes might carry out this due to their complex three-dimensional

structures. Enzymes are enantioselective and are chiral catalysts as they are made from L-amino acids. Therefore, any type of chirality on substrate molecule is recognised by enzymes. A prochiral substrate can be converted into a chiral product and both enantiomers in a racemic substrate usually can react at different rates, giving a kinetic resolution.

However, there are also some disadvantages for using enzymes. Nature provides enzymes as a one type of enantiomer. When the other type of enantiomeric product is required, an enzyme with exactly the opposite stereochemical selectivity is needed. However, this is often impossible. Enzymes need narrow operation parameters. Working under mild conditions sometimes causes problems as elevated temperatures and extreme pH lead to 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. Furthermore, most organic compounds are hardly soluble in aqueous media. Therefore, shifting enzymatic reaction from an aqueous medium to an organic medium would be highly desired. However, this may cause loss of catalytic activity due to enzyme denaturation. Enzymes are very dependent on their natural cofactors. Although enzymes are extremely flexible for accepting unnatural substrates they are almost exclusively 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 replaced by their more economical man-made substitutes. Enzymes are sensitive to inhibition phenomena. Many enzymatic reactions are sensitive to substrate or product inhibition which forces enzymes to stop performing at higher substrate and/or product concentrations. Some enzymes might also cause allergies. Although enzymes can cause allergic reactions this might be minimised by considering enzymes as chemicals and using with the same care.

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

Microorganisms carry out 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 these reactions. The value of microbial hydroxylation was first noticed in 1952 when it helped to overcome a major problem in the synthesis of cortical steroids. The insertion of an oxygen function at C-11 was a very long difficult and expensive process as the mentioned position was remote from other functional groups. This problem was efficiently solved by *Rhizopus arrhizus* via microbial hydroxylation. Microbial biotransformations became popular after this microbial hydroxylation. Since then, steroids and a number of other different substrate groups have been generally 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 described in recent years. There are still tremendous attempts to rise the effectiveness of microbial biotransformations. Since first microbial hydroxylation was reported in 1952, A number 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 gave some interesting results, such as microbial hydroxylations, Baeyer-Villiger oxidations and 5α -reduction.

In the present study, progesterone (**2**) has been incubated with *Aspergillus glaucus* MRC 200914 in order to see how this fungus metabolises the substrate. The medium was prepared for the fungus in 1 L of distilled water. 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. After incubation, the mycellium was separated from the broth by filtration under the vacuum. The mycellium was rinsed with ethyl acetate and the broth was then extracted with ethyl acetate. The extracts were dried over sodium sulfate anhydrous and evaporated *in vacuo* to give a brown gum that was then chromatographed on silica gel 60. 11α -hydroxypregn-4-ene-3,20-dione (**4**) and $11\alpha,15\beta$ -dihydroxypregn-4-ene-3,20-dione (**5**) were obtained from the chromatography work. The structures of these compounds were determined by comparing melting points, NMR and IR spectra of the substrate with those of steroids.

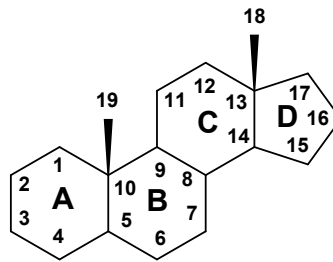


1. GİRİŞ

Doğal ürünler canlıların gelişme ve büyümeleri her ne kadar elzem değilseler de genellikle bulundukları canlılara daha iyi hayat şartları sağlar ve daha çok diğer canlılar üzerindeki etkileri sebebi ile dikkat çekerler. Bu ürünler nerdeyse her grup canlıda bulunmasına rağmen özellikle bitkilerde, mikroorganizmalarda, mantarlarda ve böceklerde daha sıklıkla görülmektedir. Doğal ürünlerin en çok yer aldığı canlılar ise bitkiler ve mikroorganizmalardır [1-3].

Doğal ürünler genellikle terpenler, poliketidler, alkaloidler, yağ asitleri, steroidler, fenolik bileşikler, özelleşmiş karbohidratlar, özelleşmiş aminoasitler ve özelleşmiş peptidler şeklinde gruplandırılırlar [1].

Steroidler önemli doğal ürün gruplarından birisidir. Steroid kelimesinin kökeni katı anlamına gelen ve latince olan “steros” kelimesinden gelmektedir. Steroidler siklopentanoperhidrofenantren (steran) halkasına sahiptirler. Bu halka birbirleriyle bütünlüşmüş A, B ve C olarak bilinen üç adet sikloheksan halkası ve D olarak bilinen bir adet siklopentan halkası içerir (Şekil 1.1). Çoğu steroid molekül düzleminin yukarısında bulunan iki adet metil grubu taşır. Steroidlerin çoğu A ve D halkalarında genellikle karbonil ya da hidroksil grupları taşırlar. Bazı steroidler D halkasına bağlı farklı uzunluklardaki zincirler bulundurur [4].



Şekil 1.1. Siklopentanoperhidrofenantren halkası [4].

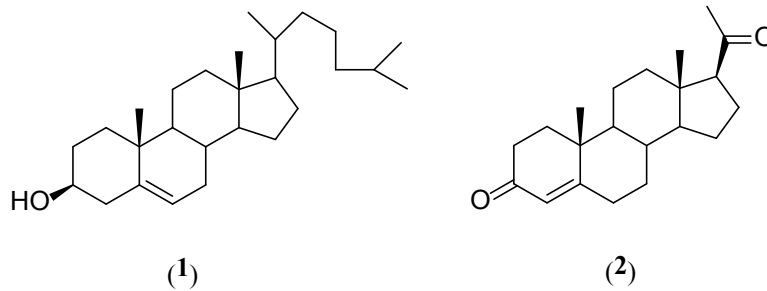
Steroller yapılarında 3 β -hidroksil hidroksil grubu ve D halkalarında alifatik yan zincirler taşıyan steroidlerdir. Ergosterol, stigmasterol ve kolesterol (1) en çok bilinen sterollerdir [4-5].

Kolesterol (1) hayvanlar ve insanların membranlarındaki akışkanlığını düzenleyen bir moleküldür. Bu bileşik safra asitleri, D₃ vitamini ve steroid hormonların çıkış maddesidir [4-5].

Başlangıç maddesi kolesterol (1) olan steroid hormonlar glukokortikoidler, mineralokortikoidler, progestagenler (progestinler), östrojenler ve androjenler olarak 5 ayrı grupta değerlendirilirler. Progestagenler, androjenler ve östrojenler cinsiyet (eşey) hormonları olarak da tanımlanırlar. Cinsiyet hormonlarının temel işlevleri üreme organlarının gelişme ve büyümelerini, ikincil eşey karakterlerini ve üreme döngüsünü düzenlemektir [4-5].

Progestagenlerin tek doğal temsilcisi olan progesteron (2) dişi memeliler tarafından üretilen doğal bir steroid hormondur ve aynı zamanda memelilerdeki diğer steroid hormonların kendisinden sentezlendiği bir ara bileşiktir [4-5].

Kolesterol (1) birkaç reaksiyon üzerinden progesteron (2) bileşiğine çevrilmektedir (Şekil 1.2). Progesteron (2), A halkasında bir karbonil grubu, B halkasında bir çift bağ ve D halkasında bir yan zincir içeren 21 karbonlu bir hormondur [4-5].



Şekil 1.2. Kolesterol (1) ve progesteron (2) bileşiklerinin yapıları [4-5].

Progesteron (2) insanlarda endometriyumun gebeliğe hazırlanmasında rol oynar. Gebelik başladığında ise progesteron (2) salınması yeni bir üreme döngüsünün başlaması engelleyerek anne ve anne karnında gelişen cenini korur [4-5].

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

2.1. Biyotransformasyonlar

Enzimlerin doğal substratları olmayan kimyasal maddelerde gerçekleştirdikleri kimyasal değişimler biyotransformasyonlar olarak adlandırılır [6]. Biyotransformasyonlarda yer alan enzimler mikrozomlar, mikroorganizmalar, mikroorganizma sporları, hücre, doku ve organ kültürleri gibi çeşitli biyolojik sistemlerde bulunabilir veya farklı biyolojik materyallerden izolasyonlarından sonra belirli bir yüzeye sabitlenmiş ya da serbest olarak da kullanılabilir [6]. Biyotransformasyonlarda yer alan enzimlerin çoğu belirli biyolojik materyallerden izole edilirken bazı enzimler ise satın alınarak temin edilir [6, 7].

Enzimlerin pahalı ve oldukça hassas oldukları, sadece kendi substratlarını doğal çevrelerinde etkiledikleri gibi bazı önyargılar mevcut olsa da çoğu enzim için bu önyargılar bir anlam ifade etmemektedir [7].

Reaksiyonlarını çok hızlı bir şekilde gerçekleştiren enzimler kullanıcılarına birçok faydalar sağlarlar. Bir enzimin reaksiyonu enzim olmaksızın gerçekleşen bir reaksiyona göre 10^8 - 10^{10} kat daha hızlı gerçekleşebilmektedir [7].

Çoğu protein tabiatında olan biyokatalizörler olan enzimler katalizör fonksiyonu gören bazı ağır metaller ve diğer sentez işlemlerindeki birçok reaktifin aksine doğada tamamen paralanabildikleri için doğaya dost olarak değerlendirilirler [7].

Enzimler reaksiyonlarını genelde 20-40  C sıcaklık aralığında ve ortam pH değerinin 5-8 aralığında değiştiği ılıman koşullarda gerçekleştirdikleri için diğer sentez yöntemlerinin uygulanması ile sonuçlanan rasemizasyon, bozunma, çevrilme ve izomerleşme gibi istenilmeyen reaksiyonları nadir olarak gerçekleşirler [7].

Geniş substrat spektrumlu bazı enzimler birçok doğal ya da sentetik bileşikte kimyasal değişimler gerçekleştirebilirler [7].

Multienzim sistemlerindeki enzimler benzer ya da aynı şartlar altında etkili olabildiklerinden metabolik bir yoldaki reaksiyonları aynı çevrede katalizlenebilmektedir [7].

Enzimler çok fazla tipte ve sayıda reaksiyonu katalizleyebildiklerinden hemen her bir sentetik reaksiyona denk gelen enzimatik bir reaksiyon vardır [7].

Sahip oldukları üç boyutlu kompleks yapıları nedeniyle enzimler regioseçici, stereoseçici ve kemoseçicidir. Enzimler bu sayede substratlarının yalnızca belirli bir fonksiyonel grubunu etkileyebilir, farklı kısımlarını ve fonksiyonel gruplarını bile birbirlerinden ayırabilirler ve reaksiyonları sonucunda yan ürünler oluşmaz [7].

Enzimler yapılarında yalnızca L-amino asitleri içerdikleri için enantiyoseçici biyomoleküllerdir. Enantiyoseçici olan enzimler prokiral bir substratı etkileyerek yalnızca bir enantiyomere dönüştürebilir. Enzimler bir rasemik karışımındaki enantiyomerlerden yalnızca birini etkileyerek rasemik karışımların ayrılmasına sebep olurlar [7]. Enzimler yukarıda açıklanan özellikleri sebebi diğer yöntemler ile gerçekleştirilemeyen reaksiyonları kolayca gerçekleştirebilmektedirler [7].

Buna rağmen enzimlerin kullanılması bazı istenilmeyen durumlara da sebep olabilir. Örneğin, her enzimin tek bir enantiyomerik forma sahiptir. Enzimin diğer enantiyomerik formunun biyosentezi için yaygın bir yöntem olmadığından bir enzim yalnızca belirli bir enantiyomer ile reaksiyon verebilir [7].

Bazı enzimler aktivitelerini etkileyen sıcaklık ve pH gibi parametrelerdeki değişimlere son derece duyarlı oldukları için bu enzimlerin reaksiyonlarını hızlandırmak için sıcaklık ve pH gibi parametreler çok az değiştirilebilir [7].

Su enzim aktivitesi için en ideal ortam olsa da birçok organik bileşik suda neredeyse hiç çözünmez [7]. Enzimatik bir reaksiyonun organik bir çözücüde gerçekleştirilmesi ise genelde protein tabiatında olan enzimlerin denatürasyonu ile sonuçlanabileceği için aktivite kaybı gerçekleşebilir [7].

Reaksiyon ortamında gereğinden fazla substrat veya ürün olduğunda enzimler aktivelerinin kısmen veya tamamen kaybı ile kendini gösteren inhibisyona maruz kalırlar [7].

Çoğu enzim reaksiyonlarını yalnızca kofaktör adı verilen bazı spesifik moleküllerin varlığında gerçekleştirebilirler. Bu enzimlerin fonksiyonlarını gerçekleştirebilmeleri

için kofaktörlerinin reaksiyon ortamda olmaları ve sürekli yenilenmeleri gereklidir. Buna rağmen kofaktörlerin kararsız ve pahalı bileşikler olması ve bunların yerine bazı eşdeğerlerinin kullanılamaması önemli problemlerdir [7].

Bazı enzimler alerjik reaksiyonlara sebep olabileceği için bu molekülleri diğer kimyasal maddeler gibi dikkatli bir şekilde kullanıldığında sorun çözülebilir [7].

2.2. Mikrobiyal Biyotransformasyonlar

Biyotransformasyonlar genelde saflaştırılmış enzimler ya da bütün hücre sistemleri ile uygulanır [7]. Bütün hücre sistemleri olarak çoğu zaman mikroorganizmalar ile bitki veya hayvan kökenli olan hücre, doku ve organ kültürleri kullanılır [7].

Çoğu enzimin hücre dışında kararsız olması, kofaktörlerinin sağlanma zorunluluğu, kofaktörlerinin sürekli yenilenmesi, saflaştırma işlemlerini oldukça maliyetli ve zor olması ile saflaştırılırken zarar görmeleri gibi sebeplerden dolayı biyotransformasyonlar için genelde bütün hücre sistemleri kullanılmaktadır [7].

Bütün hücre sistemleri içeren biyotransformasyonlarda çoğu zaman mikrobiyal hücreler kullanılmaktadır [7]. Mikrobiyal hücrelerin büyüme ve gelişme hızı diğer canlılardaki hücrelere göre daha fazla olduğundan bu tip biyotransformasyonlar çok kısa sürede gerçekleştirilebilmektedir [7]. Daha küçük boyutlu olan mikrobiyal hücreler hücre duvarları da içerdikleri için mekanik açıdan çok daha kararlıdır [7]. Mikrobiyal hücrelerin ortamlarına çok daha kolay uyum sağladıkları içinde tercih edilmektedirler. Buna ilaveten mikrobiyal hücreler sahip oldukları spesifik olmayan enzimleri sayesinde diğer canlıların hücrelerine göre çok daha fazla sayıda ve farklı tipte substratlar üzerinde kimyasal değişimler gerçekleştirebilirler [6, 7].

Mikrobiyal biyotransformasyonlar bilinen sentez yöntemlerine olan birçok üstünlükleri sayesinde özellikle son yıllarda biyoteknolojinin vazgeçilmez öğeleri olmuşlardır [7-9]. Mikrobiyal hücreler genetikleri değiştirilebilen canlılar oldukları için biyoteknoloji çalışmalarındaki kullanımları her geçen gün giderek artmaktadır [8].

Bilinen diğer sentez yöntemlerindeki birçok reaktif çevremize geri dönüşü olmayan önemli zararlar verirken çoğu 1 atm basınç ve oda sıcaklığı gibi oldukça ılıman şartlarda uygulanabilen mikrobiyal biyotransformasyonlar doğa dostu olarak kabul edilmektedir [6, 7].

Mikrobiyal biyotransformasyonlar bilinen diğer sentez yöntemlerine göre daha az maliyetler ile ve daha kısa sürelerde gerçekleştirilebilirler [6-9]. Hedeflenen bileşiklere bilinen diğer sentez yöntemlerinin yerine mikrobiyal biyotransformasyonlar kullanılarak çoğu zaman daha kısa sürelerde, daha yüksek verimlerle ve çok daha ucuz besiyeri bileşenleri tüketilerek erişilebilmektedir [6, 8].

Enantiyoseçici olan enzimlerin yer aldığı mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonları da enantiyoseçicidir ve tek enantiyomerler ile sonuçlanırlar [6, 8]. Bilinen diğer sentez yöntemleriyle sentezleri hedeflenen moleküller genelde ayrılmaları imkansız olan rasemik karışımlar şeklinde elde edilirler [6]. İlaç sanayindeki etken madde sentezlerinde yalnızca hedeflenen enantiyomerin sentezlenmesi oldukça önemlidir ve son yıllarda yalnızca istenilen enantiyomerlerin tek basamakta sentezi için mikroorganizmaların kullanılmaları giderek yaygınlaşmaktadır [7].

Mikroorganizmalardaki enzimler regioseçici oldukları için mikrobiyal biyotransformasyonlarda substratlarındaki başka fonksiyonel grupların korunmasına gerek kalmamaktadır [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].

Mikroorganizmalar sayesinde birçok bilinen sentez yöntemlerine karşılık gelen reaksiyonlar gerçekleştirilebilmektedir [6-7]. Mikroorganizmalarla gerçekleştirilen mikrobiyal hidroksilasyonlar gibi bazı reaksiyonlar ise bilinen diğer sentez yöntemleriyle tek basamakta gerçekleştirilememektedir [6]. Mikrobiyal hidroksilasyonlar önemli ve yaygın olan mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonlarından [6-7]. Bu reaksiyonların önemi ilk olarak kortikal steroid sentezinde anlaşılmıştır [6]. Kortikal steroidler sentezlenirken, fonksiyonel grupların uzağında bulunan C-11 pozisyonuna bir oksijen fonksiyonu ilave edilmesi, o dönem mevcut sentez yöntemleriyle çok uzun, zahmetli ve pahalı bir işlem olsa da bu sorun *Rhizopus arrhizus* küfünün ara bileşiği tek basamakta yüksek verimli bir 11-hidroksilasyonu sayesinde aşıldı [6]. Bahsedilen reaksiyon neticesinde da progesteron (**2**) mikrobiyal hidroksilasyon ile 11 α -pozisyonunda hidroksillenmiş ve C-11 pozisyonuna bir oksijen fonksiyonu yerleştirilmiştir [6].

Mikrobiyal biyotransformasyonları uygulamak için serbest olarak ya da belirli bir yüzeye sabitlenerek olarak kullanılabilen çeşitli mikroorganizma türlerinden faydalanılmaktadır [6-9]. Küfler, bakteriler ve mayalar genelde bu amaç doğrultusunda en yaygın olarak kullanılan mikroorganizmalardır [8].

2.3. Küfler İle Steroid Biyotransformasyonları

Steroidlerin küflerle biyotransformasyonları küf enzimlerinin yüksek regio ve stereoseçicilikleri nedeniyle ilaçlar gibi çok önemli bileşiklerin üretimi için halen yoğun bir şekilde uygulanmaktadır [9-13]. Mevcut mikrobiyal biyotransformasyonları daha da etkinleştirmek, kullanılabilecek yeni reaksiyonlar ve mikroorganizmalar ve reaksiyonlar belirlemek doğrultusunda çalışmalar devam ettirilmektedir [9].

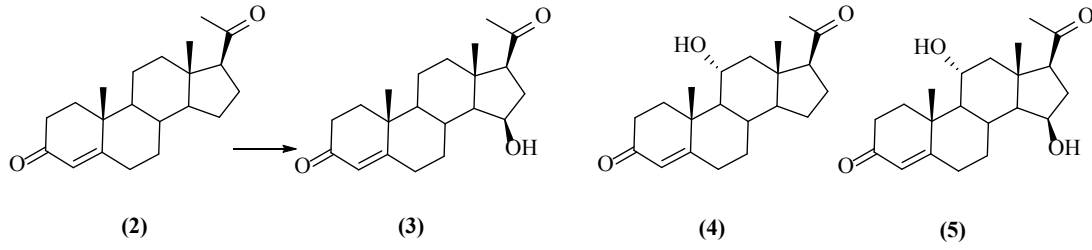
Bugüne kadar farklı ve çok sayıda küf ile mikrobiyal steroid biyotransformasyonları gerçekleştirilmiş ve bu çalışmalar mikrobiyal hidroksilasyonlar, Baeyer-Villiger oksidasyonları, A halkasının aromatikleşmesi, yan zincirlerin uzaklaştırılması, hidroksil gruplarının oksidasyonu, keton gruplarının redüksiyonu,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

2.3.1. *Aspergillus* türleri ile progesteron (2) biyotransformasyonları

Aspergillus cinsine ait küfler özellikle ürettikleri mikotoksinleri, sebep oldukları hastalıklar, temel ökaryotik genetik ve biyoteknolojiye katkıları nedeniyle dikkat çekmektedir [14]. Genelde su, toprak ve çürüyen materyaller üzerinde yaşayan *Aspergillus* türlerinin bazıları hayvanlar ve insanlar için patojendir [15].

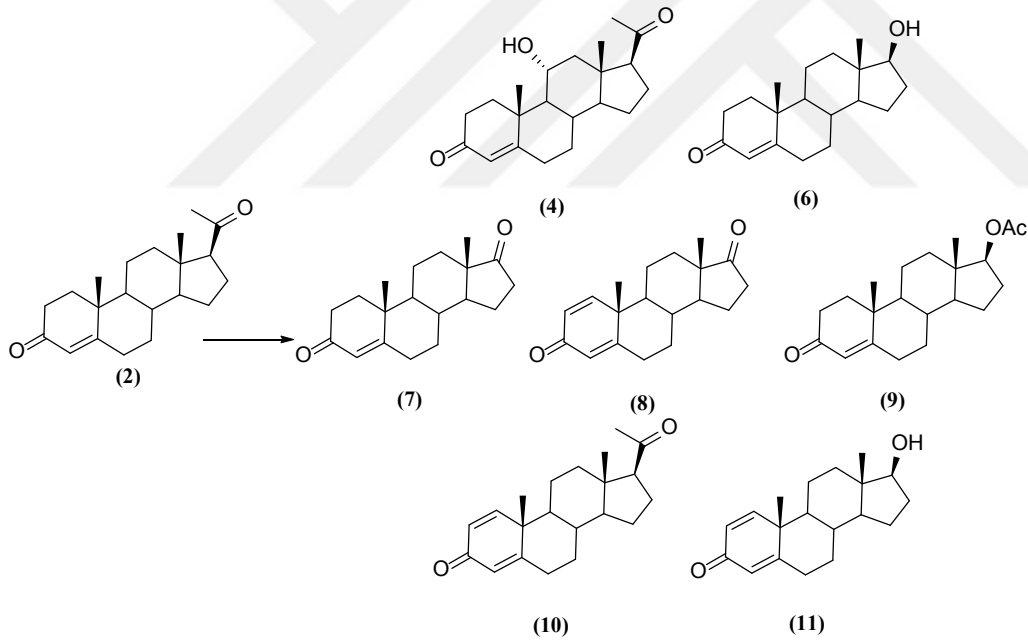
Farklı steroidlerin *Aspergillus* türleri ile biyotransformasyonları genelde Baeyer-Villiger oksidasyonları, mikrobiyal hidroksilasyonlar, yan zincirlerin uzaklaştırılması, mikrobiyal hidrojenasyonlar ve dehidrojenasyonlarla sonuçlanmıştır [9-13]. Bir eşey hormonu olan ve memelilerdeki steroid hormonların kendisinden türediği progesteron (2) *Aspergillus* türleri ile biyotransformasyonları en çok çalışılmış olan steroidlerdendir [9-13, 16-56]. Bir *A. phoenicis* izolatu ile gerçekleştirilen substratın inkübasyonu (Şekil 2.1) 15 β -hidroksipregn-4-en-3,20-dion

(3), 11 α -hidroksipregn-4-en-3,20-dion (4) ve 11 α ,15 β -dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (5) metabolitlerini vermiştir [16].



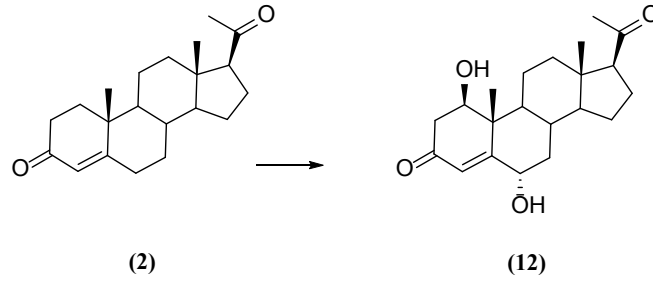
Şekil 2.1. *A. phoenicis* ile substratın biyotransformasyonu [16].

Sabitlenmiş *A. ochraceus* TS izolatının sporları ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.2.) testosteron (6), androst-4-en-3,17-dion (7), androsta-1,4-dien-3,17-dion (8), 17 β -asetoksiandrost-4-en-3-on (9), pregna-1,4-dien-3,20-dion (10) ve 17 β -hidroksiandrosta-1,4-dien-3-on (11) ile daha önceki bir çalışmadan da izole edilen (4) numaralı metaboliti vermiştir [17].



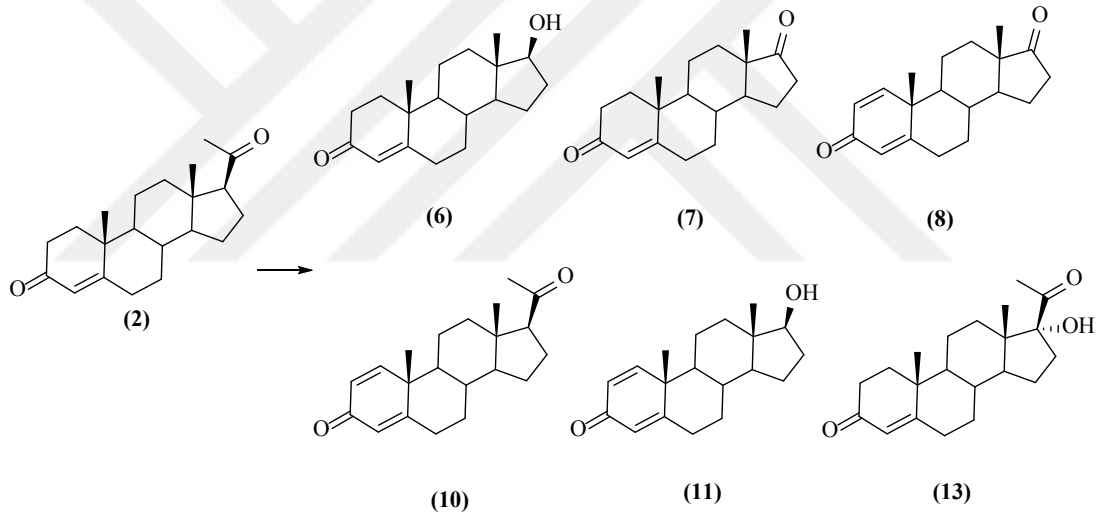
Şekil 2.2. Sabitlenmiş *A. ochraceus* TS ile substratın biyotransformasyonu [17].

A. ochraceus NRRL 405 izolatının substrat ile inkübasyonu (Şekil 2.3.) yalnızca 1 β ,6 α -dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (**12**) metabolitini vermiştir [18].



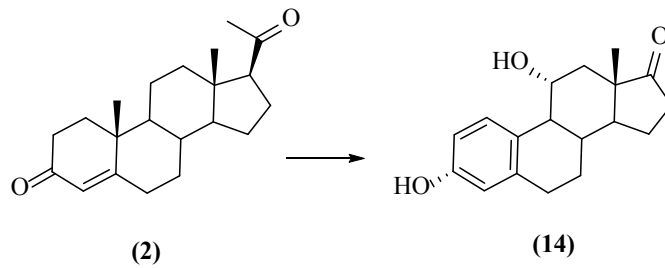
Şekil 2.3. *A. ochraceus* NRRL 405 ile substratın biyotransformasyonu [18].

Sabitlenmiş bir *A. ochraceus* izolatının sporları ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.4) ise 17 α -hidroksipregn-4-en-3,20-dion (**13**) ile daha önce yapılmış bir çalışmadan da elde edilen (**6**, **7**, **8**, **10** ve **11**) numaralı metabolitleri vermiştir [19].



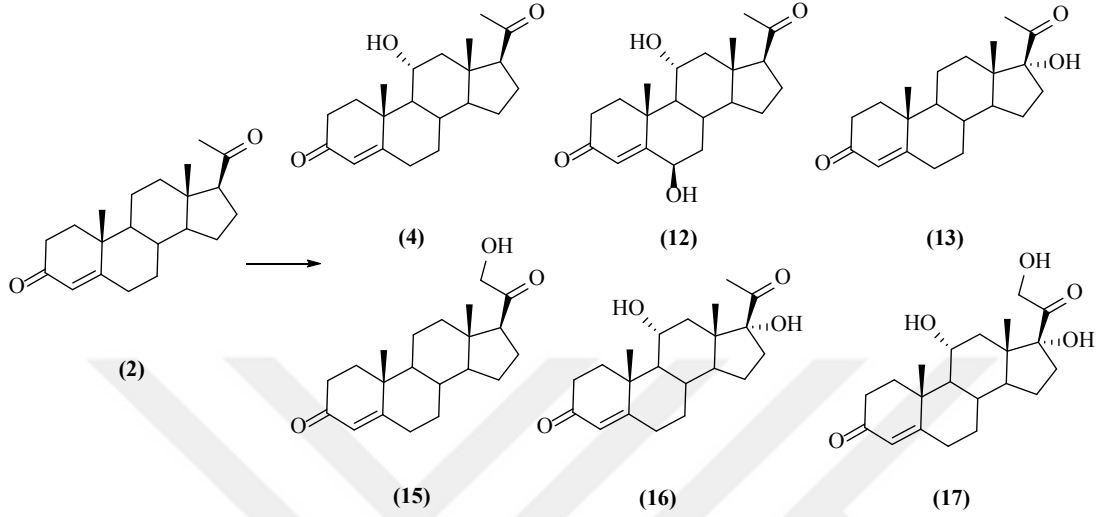
Şekil 2.4. Sabitlenmiş *A. ochraceus* izolatı ile substratın biyotransformasyonu [19].

Bir diğer *A. ochraceus* izolatı ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.5.) ise yalnızca 3,11 α -dihidroksiestra-1,3,5-trien-17-on (**14**) metaboliti ile sonuçlanmıştır [20].



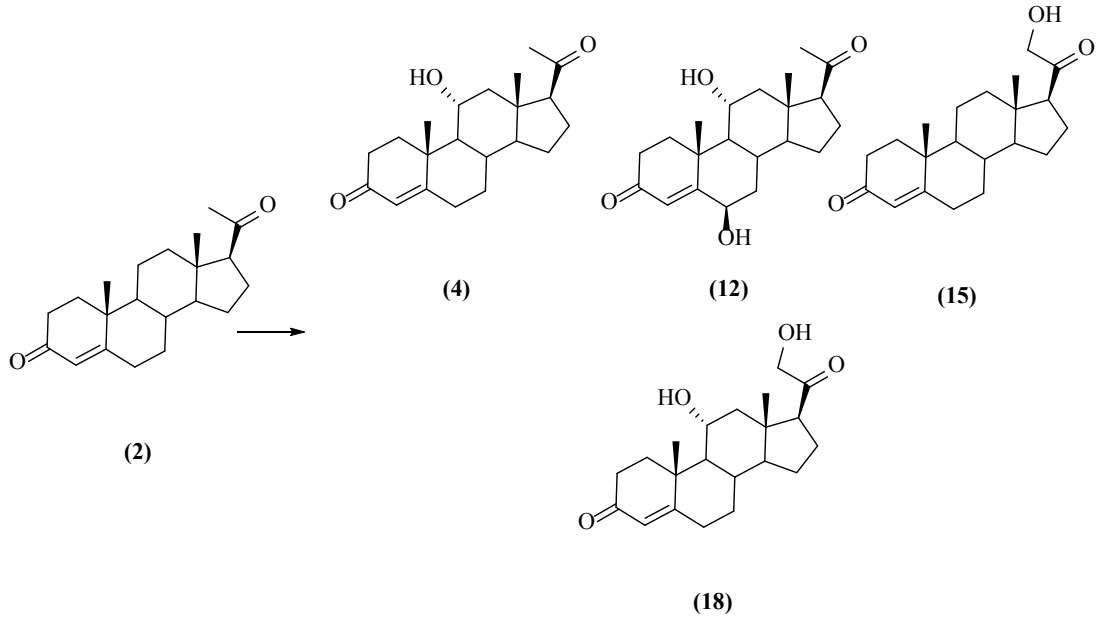
Şekil 2.5. Bir *A. ochraceus* izolatı ile substratın biyotransformasyonu [20].

A. niger 100 izolatu ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.6.) 21-hidroksipregn-4-en-3,20-dion (15), 11 α ,17 α -dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (16) ve 11 α ,17 α ,21-trihidroksipregn-4-en-3,20-dion (17) ve daha önceki çalışmalardan da izole edilen (4, 12 ve 13) numaralı metabolitler ile sonuçlanmıştır [21, 22].



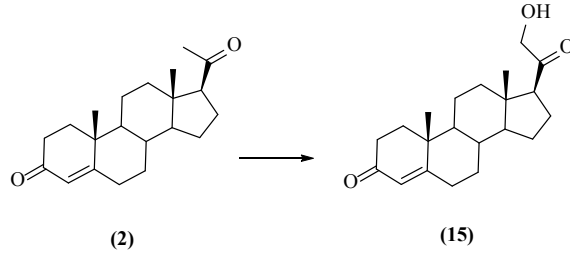
Şekil 2.6. *A. niger* 100 ile substratın biyotransformasyonu [21, 22].

A. niger 567 izolatu ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.7.) 11 α ,21-dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (18) ile daha önce yapılan çalışmalardan izole edilen (4, 12 ve 15) numaralı metabolitleri vermiştir [21,22].



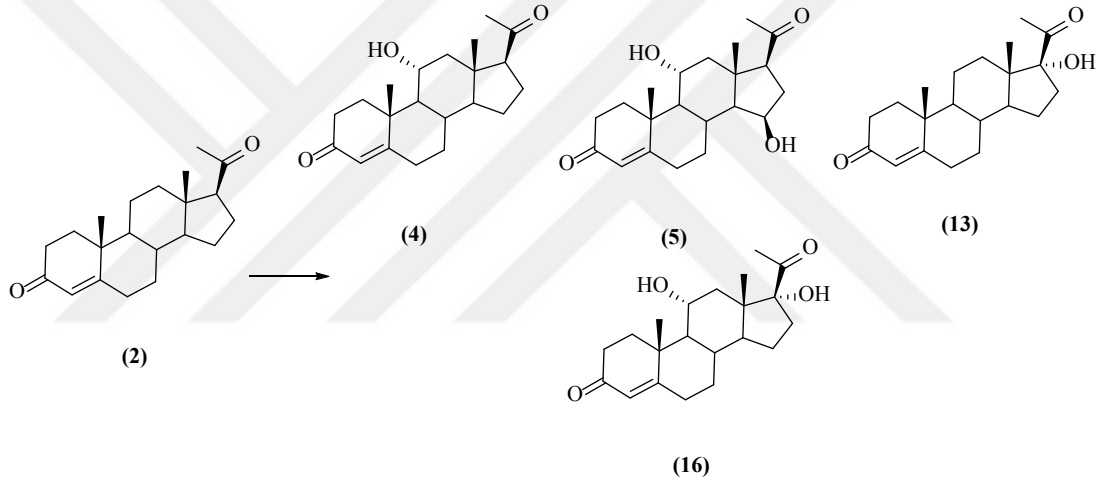
Şekil 2.7. *A. niger* 567 ile substratın biyotransformasyonu [21, 22].

A. niger NRRL 599 izolatu ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.8.) önceki çalışmalardan da elde edilen (15) numaralı metaboliti vermiştir [23].



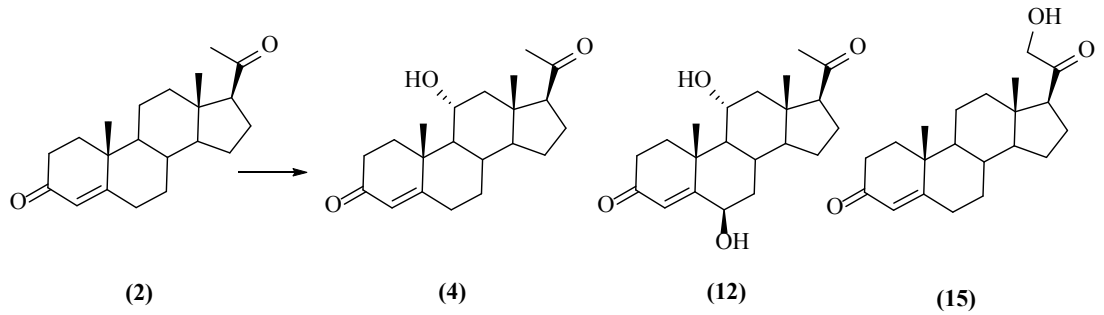
Şekil 2.8. *A. niger* NRRL 599 ile substratın biyotransformasyonu [23].

A. niger 37 izolatu ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.9) daha önce gerçekleştirilen çalışmalardan izole edilen (4, 5, 13 ve 16) numaralı metabolitleri vermiştir [24].



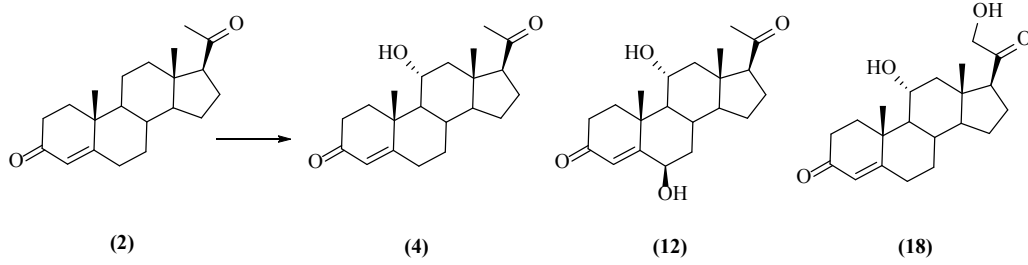
Şekil 2.9. *A. niger* 37 ile substratın biyotransformasyonu [24].

A. niger N402 izolatu ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.10.) önceki çalışmalarda elde edilen (4, 12, ve 15) numaralı metabolitler ile sonuçlanmıştır [25].



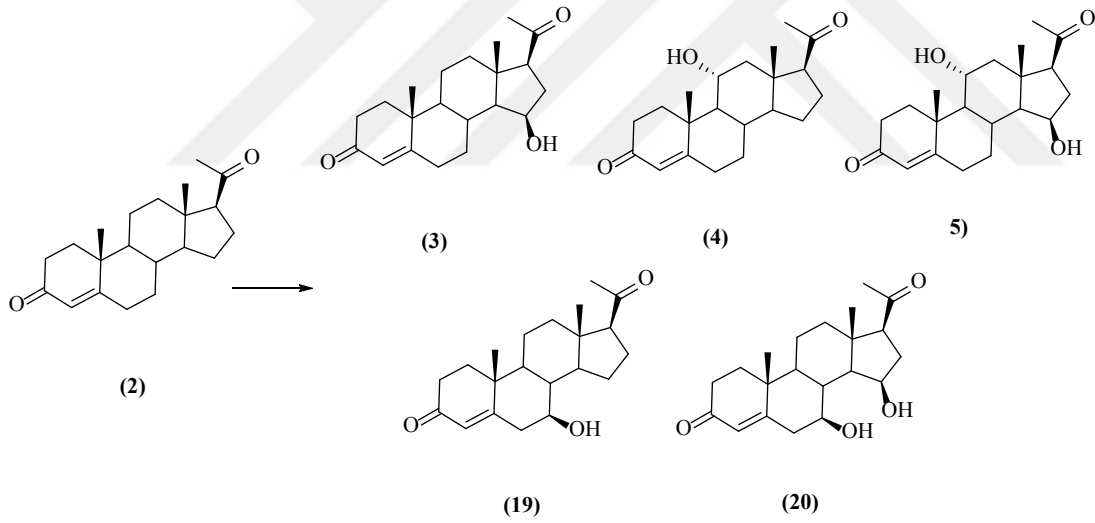
Şekil 2.10. *A. niger* N402 ile substratın biyotransformasyonu [25].

A. niger 100 [21,22] *A. niger* 3N [22] ve *A. niger* 1R [21,22] izolatları ile substratın inkübasyonları (Şekil 2.11.) daha önce yapılan çalışmalardan da elde edilen (4, 12 ve 18) numaralı metabolitleri vermiştir.



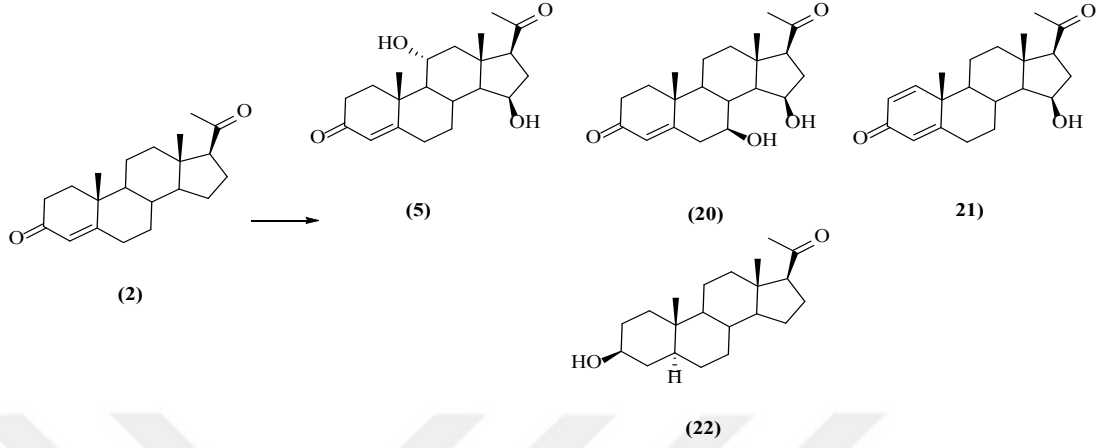
Şekil 2.11. Bazı *Aspergillus* izolatları ile substratın biyotransformasyonu [21,22].

Bir *A. fumigatus* izolatı ile substratın inkübasyonundan (Şekil 2.12.) 7 β -hidroksipregn-4-en-3,20-dion (19) ve 7 β ,15 β -dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (20) ile önceki çalışmalardan da izole edilen (3, 4, ve 5) numaralı metabolitleri vermiştir [26].



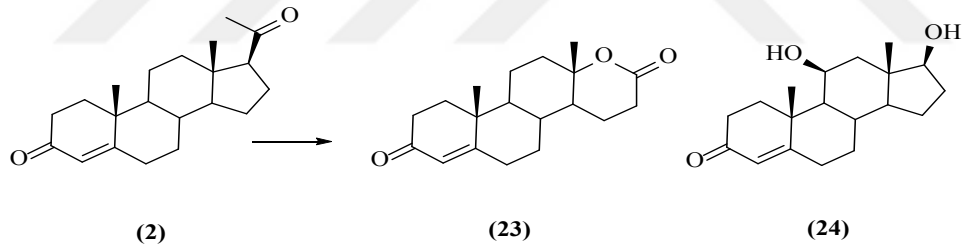
Şekil 2.12. Bir *A. fumigatus* izolatı ile substratın biyotransformasyonu [26].

Bir diğ er *A. fumigatus* izolatı ile substratın ink ubasyonu ( ekil 2.13.) ise 15 -hidroksipregna-1,4-dien-3,20-dion (21) ve 3 -hidroksi-5 -pregnan-20-on (22) ile  onceli  alıřmалardan da elde edilen (5 ve 20) numaralı metabolitleri vermiştir [27].



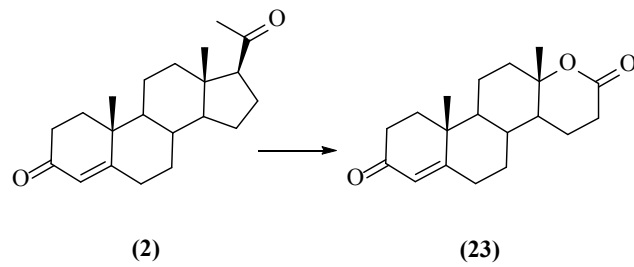
Şekil 2.13. Bir diğ er *A. fumigatus* izolatı ile substratın biyotransformasyonu [27].

A. tamarii QM1223 izolatı ile substratın ink ubasyonu ( ekil 2.14.) 17a-okza-D-homo-androst-4-en-3,17-dion (23) ve 11 ,17 -dihidroksiandrost-4-en-3-on (24) metabolitlerini vermiştir [28].



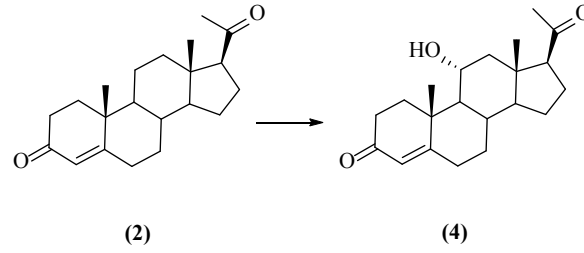
Şekil 2.14. *A. tamarii* QM1223 ile substratın biyotransformasyonu [28].

A. tamarii MRC 72400 [29] ve *A. terreus* MRC 200365 [30] izolatları ile substratın ink ubasyonları ( ekil 2.15.) bir  onceli çalışmadan elde edilen (23) numaralı metabolit ile sonuçlanmıştır.



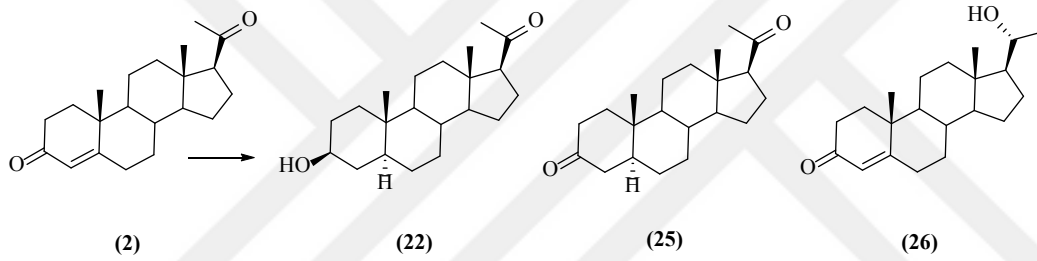
Şekil 2.15. Bazı *Aspergillus* izolatları ile substratın biyotransformasyonları [29,30].

Sabitlenmiş bir *A. terreus* izolatu ile substratın inkübasyonu ise (Şekil 2.16.) yalnızca daha önceki çalışmalardan izole edilen (4) numaralı metaboliti vermiştir [31].



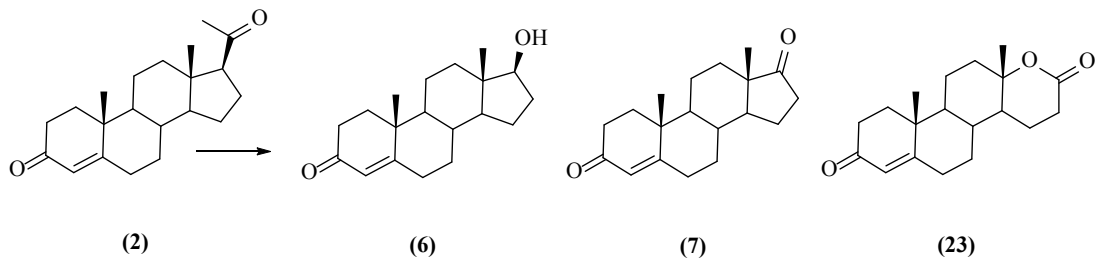
Şekil 2.16. Sabitlenmiş bir *A. terreus* izolatu ile substratın biyotransformasyonu [31].

Bir *A. oryzae* izolatu ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.17.) 5 α -pregnan-3,20-dion (25) ve (20R)-20-hidroksipregn-4-en-3-on (26) ile önceki çalışmalardan da elde edilen (22) numaralı metaboliti vermiştir [32].



Şekil 2.17. Bir *A. oryzae* izolatu ile substratın biyotransformasyonu [32].

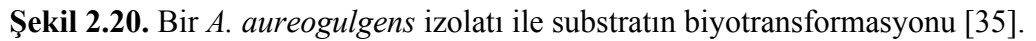
Bir diğer *A. oryzae* izolatu ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.18.) ise daha önceki çalışmalardan da izole edilen (6, 7 ve 23) numaralı metabolitler ile sonuçlanmıştır [33].



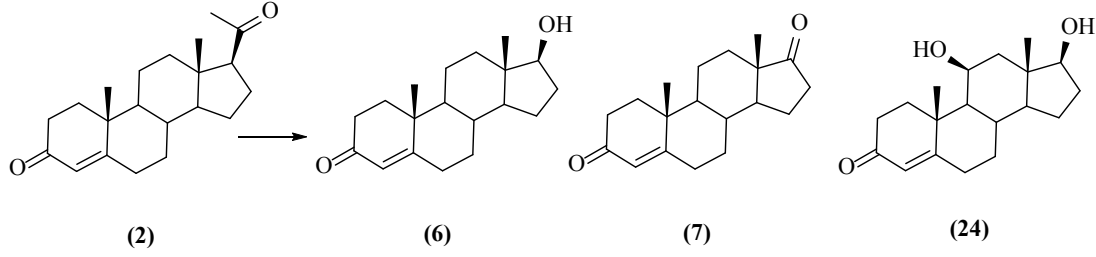
Şekil 2.18. Bir diğer *A. oryzae* izolatu ile substratın biyotransformasyonu [33].

The reaction scheme illustrates the conversion of compound (2) into five other steroid derivatives. Compound (2) is a steroid with a ketone at C-3, a double bond at C-4, and an acetyl group at C-17. An arrow points from (2) to a set of five products: (4), (6), (7), (12), and (27). Compound (4) has a ketone at C-3, a double bond at C-4, a hydroxyl group at C-14, and an acetyl group at C-17. Compound (6) has a ketone at C-3, a double bond at C-4, and a hydroxyl group at C-13. Compound (7) has a ketone at C-3, a double bond at C-4, and a ketone at C-13. Compound (12) has a ketone at C-3, a double bond at C-4, a hydroxyl group at C-14, and an acetyl group at C-17. Compound (27) has a ketone at C-3, a double bond at C-4, and an ether bridge between C-13 and C-14.

A. aureogulgens izolatu ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.20.) 5 β -androstan-3,17-dion (**28**) ve 3 α -hidroksi-5 β -androstan-17-on (**29**) ile önceki çalışmalarda da izole edilen (**6**, **7**, **9** ve **23**) numaralı metabolitleri vermiştir [35].

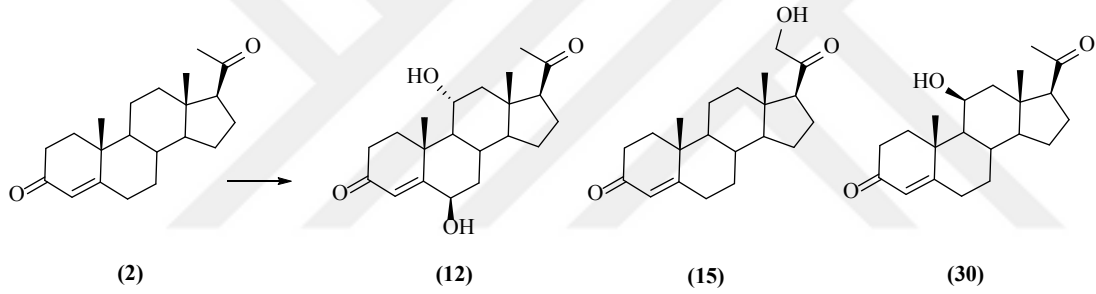


Bir *A. subolivaceus* izolatu ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.21.) testosteron (6), androst-4-en-3,17-dion (7) ve 11 β ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (24) ile önceki çalışmalarda da elde edilen (6, 7 ve 24) numaralı metabolitleri vermiştir [33].



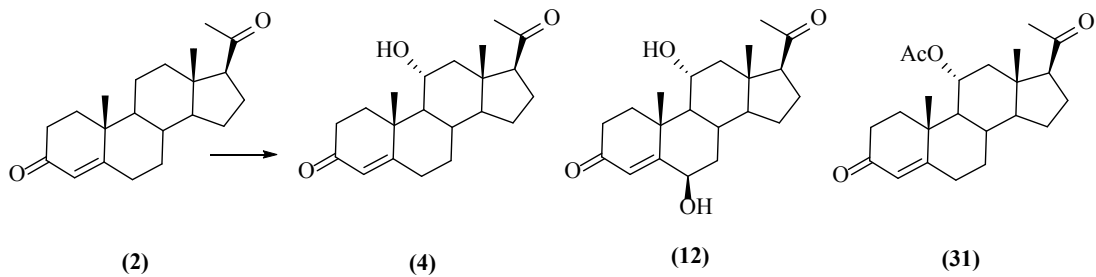
Şekil 2.21. Bir *A. subolivaceus* izolatu ile substratın biyotransformasyonu [33].

Bir *A. nidulans* izolatu ile substratın inkübasyonu ise (Şekil 2.22.) 11 β -hidroksipregn-4-en-3,20-dion (30) ile daha önceki çalışmalarda da izole edilen (12 ve 15) numaralı metabolitleri vermiştir [36].



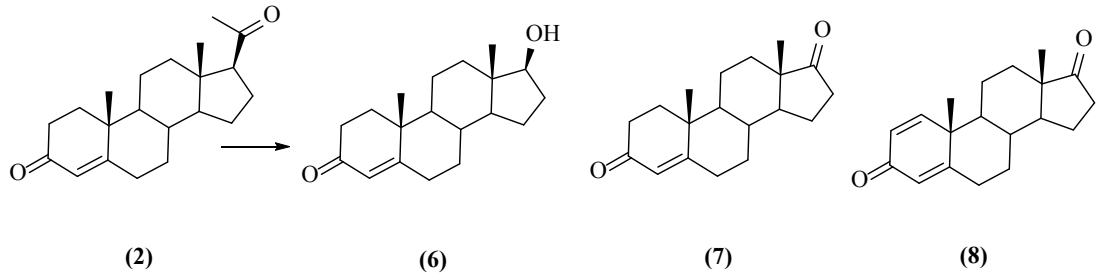
Şekil 2.22. Bir *A. nidulans* izolatu ile substratın biyotransformasyonu [36].

A. nidulans VKPM F-1069 izolatu ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.23.) 11 α -asetoksipregn-4-en-3,20-dion (31) ile önceki çalışmalarda da elde edilen (4 ve 12) numaralı metabolitler ile sonuçlanmıştır [37].



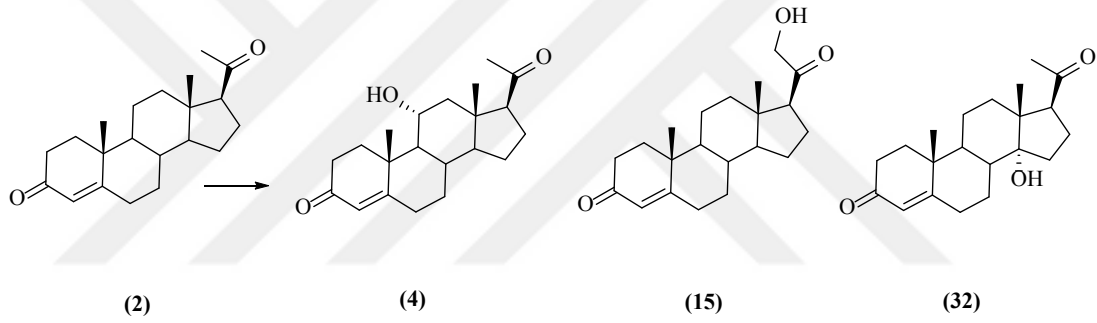
Şekil 2.23. *A. nidulans* VKPM F-1069 ile substratın biyotransformasyonu [37].

Bir *A. versicolor* izolatu ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.24.) önceki çalışmalarda da izole edilen (6, 7 ve 8) numaralı metabolitleri vermiştir [38].



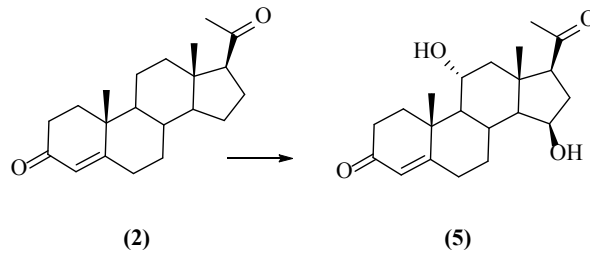
Şekil 2.24. Bir *A. versicolor* izolatu ile substratın biyotransformasyonu [38].

Bir *A. brasiliensis* izolatının substratın inkübasyonu (Şekil 2.25) 14 α -hidroksipregn-4-en-3,20-dion (32) ile önceki çalışmalarda da elde edilen (4 ve 15) numaralı metabolitler ile sonuçlanmıştır [39].



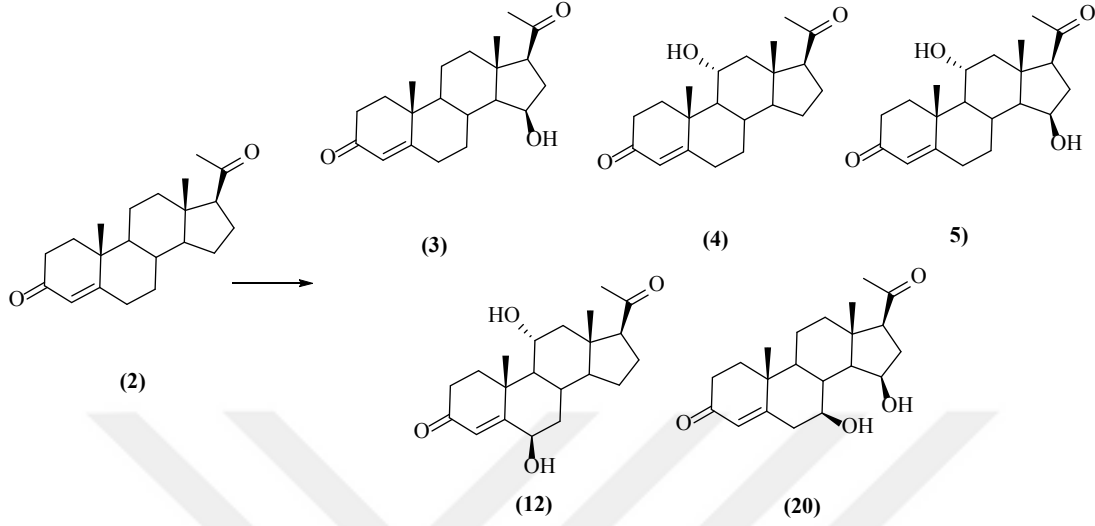
Şekil 2.25. Bir *A. brasiliensis* izolatı ile substratın biyotransformasyonu [39].

A. giganteus ATCC 10059 izolatu ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.26.) önceki çalışmalardan da izole edilen (5) numaralı metabolit ile sonuçlanmıştır [40].



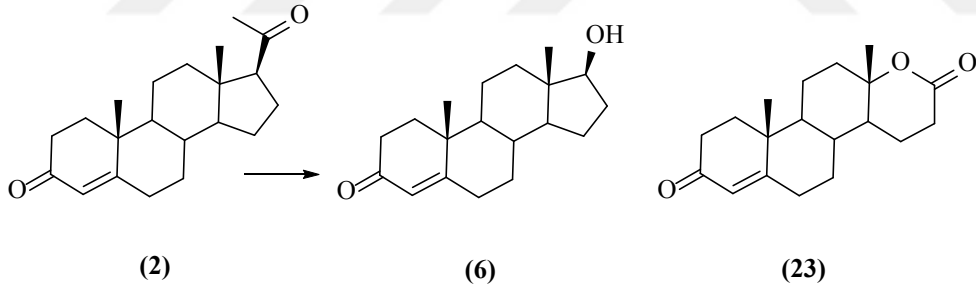
Şekil 2.26. Bir *A. giganteus* izolatu ile substratın biyotransformasyonu [40].

A. sydowii MRC 200653 izolatu ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.27.) daha önceki çalışmalardanda elde edilen (3, 4, 5, 12 ve 20) numaralı metabolitler ile sonuçlanmıştır [41].



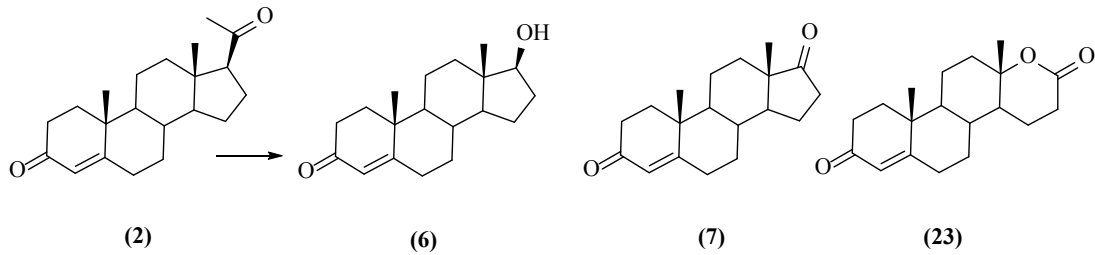
Şekil 2.27. Bir *A. sydowii* izolatu ile substratın biyotransformasyonu [41].

A. sydowii CBMAI 935 izolatu ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.28.) önceki çalışmalarda da izole edilen (6 ve 23) numaralı metabolitleri vermiştir [42].



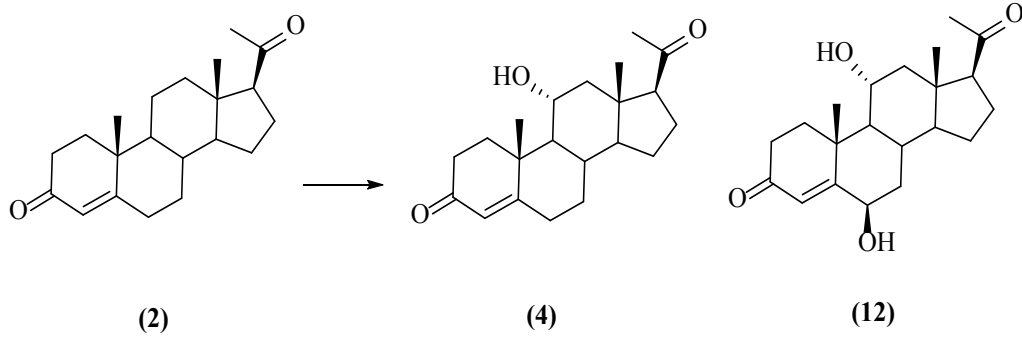
Şekil 2.28. Bir diğer *A. sydowii* izolatu ile substratın biyotransformasyonu [42].

A. sojae PTCC 5196 izolatu ile substratın inkübasyonundan (Şekil 2.29.) önceki çalışmalarda da elde edilen (6, 7 ve 23) numaralı metabolitler ile sonuçlanmıştır [43].



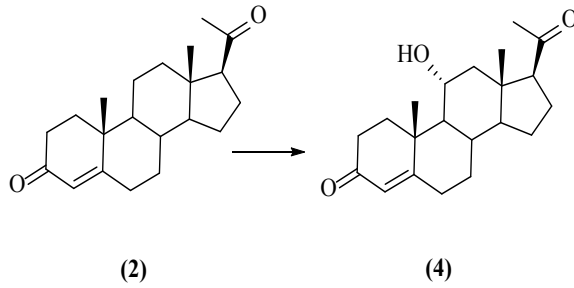
Şekil 2.29. Bir *A. Sojae* izolatu ile substratın biyotransformasyonu [43].

Bir *A. phoenicis* izolatu [20], *A. niger* 58F izolatu, [22], bir *A. niger* 73 izolatu [22], iki ayrı *A. ochraceus* izolatu [44, 55, 56] ve iki ayrı *A. niger* izolatu [23, 45] ile substratın inkübasyonu (Şekil 2.30.) önceki çalışmalarda izole edilen (4 ve 12) numaralı metabolitleri vermiştir.



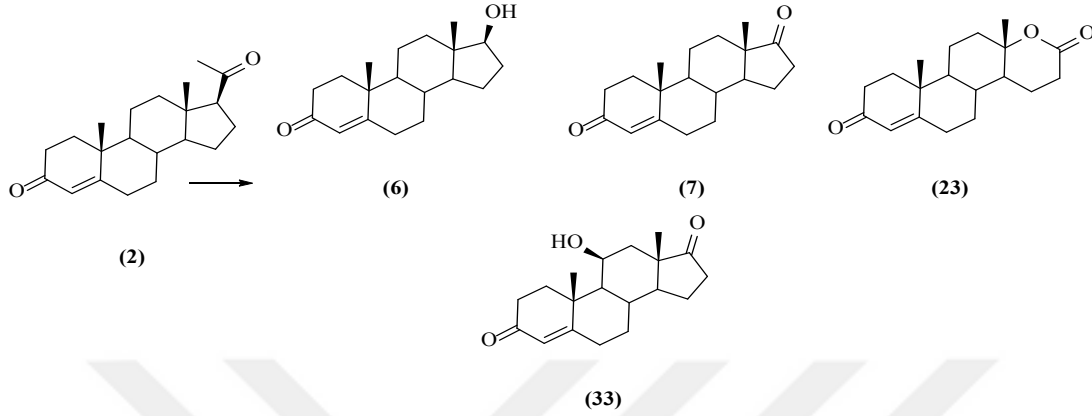
Şekil 2.30. İki ayrı *Aspergillus* izolatu ile substratın biyotransformasyonları [44,45].

A. ochraceus TS izolatu [46,47], sabitlenmiş *A. ochraceus* G-8 izolatu [48], farklı *A. ochraceus* izolatları [18, 36, 49-52], sabitlenmiş *A. niger* NCIM 589 izolatu [53], bir *A. niger* izolatu [54], sabitlenmiş bir *A. phoenicis* [20, 36] izolatu ve bir *A. egyptiacus* [55] izolatu ile substratın inkübasyonları (Şekil 2.31.) önceki çalışmalardan elde edilen (4) numaralı metabolit ile sonuçlanmıştır.



Şekil 2.31. Bazı *Aspergillus* izolatlarının [18,36,46-55] substrat biyotransformasyonu.

A. flavus, *A. flavo-furcatis*, *A. parasiticus* ve *A. tamaris* türlerine ait birer izolatları ile substratın inkübasyonları (Şekil 2.32.) 11 β -hidroksiandroster-4-en-3,17-dion (33) ile önceki çalışmalarda da izole edilen (6, 7 ve 23) numaralı metabolitler ile sonuçlanmıştır [33].



Şekil 2.32. Diğer *Aspergillus* izolatları ile substratın biyotransformasyonları [33].

2.4. Çalışmanın amacı

Bu çalışmada progesteron (2) bileşiğinin *Aspergillus glaucus* MRC 200914 izolatı ile biyotransformasyonunun incelenmesi amaçlanmıştır. *Aspergillus glaucus* son derece olumsuz koşullar altındaki fizyolojik dayanıklılığı nedeniyle oldukça farklı yerlerde yaşayabilen bir kültür ve insanlar için patojen olabilmektedir [57].

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 kabin kullanılırken biyotransformasyon deneyindeki inkübasyonlar için Gerhardt THO 500 Laboshake marka çalkalamalı inkübatör kullanıldı. Infrared spektrumlarının alınması için Perkin Elmer SpectrumTwo spektrometre cihazı kullanıldı. ¹H NMR spektrumlarının alınması için solvent olarak döterokloroform (CDCl₃), 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 kullanılarak uygulandı. İTK tabakalarındaki 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.

Progesteron (**2**) Sigma-Aldrich firmasından satın alındı. Yatık agar besiyerleri için kullanılan PDA ve agar, küf besiyeri için kullanılan tüm kimyasallar ve çalışmada kullanılan tüm solventler ise Merck firmasından satın alındı.

3.2. Yatık Agar Besiyerlerinin Hazırlanması

5,85 g PDA (potato dekstrozu agar) ve 1,2 g agar karışımı saf su ile 150 mL'ye tamamlanıp kaynatılarak besiyeri hazırlandı ve 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 aktarıldı. Bu işlem 2 kez tekrarlandıktan sonra elde edilen en taze ve en iyi gelişme gösteren küf biyotransformasyon deneyi için kullanıldı.

3.4. Küf İçin Besiyeri Hazırlanması

A. glaucus MRC 200914 küfüne ait besiyeri hazırlamak için glukoz (200 g), pepton (5 g), malt ekstraktı (3 g) ve maya ekstraktı (3 g) 1 L distile su da çözülüp karıştırıldı [58].

3.5. Biyotransformasyon Deneyi

Küf için hazırlanan besiyeri 10 adet 250 mL erlene paylaştırılarak otoklavda sterilize edildi. Erlenlere en taze alt kültürdeki küf steril şartlar altında 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 erleni ile 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 erleninden İTK alındığında herhangi bir metabolit gözlenmediğinden biyotransformasyon deneyinden elde edilen sonuçların geçerli olduğu değerlendirildi.

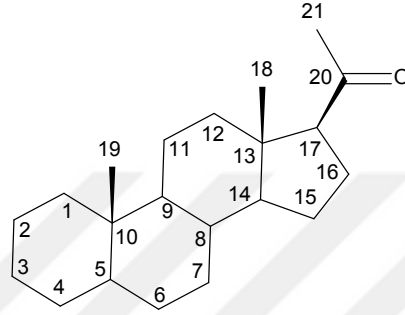
3.6. Metabolitlerin Ayrılması Ve Yapı Tayinleri

İnkübasyonu takiben küfe ait besiyeri filtrasyonla misellerinden filtrat olarak ayrıldı ve miseller etil asetat (500 mL) ile yıkandı. Filtradaki steroidler etil asetat (1 L) ile 3 kez ekstrakte edildi. Ekstraktlara susuz sodyum sülfat eklenerek ortamda bulunabilecek su giderildi. Ekstraktlar evaporatörde uzaklaştırıldığında ise yağimsı bir madde elde edildi. Bu yağimsı maddeyi substrat ile karşılaştırmak suretiyle İTK çalışmaları gerçekleştirildikten sonra silika jel 60 (Merck 107734, 230-400 mesh) absorban olarak kullanılarak yağimsı maddede gözlenen steroidleri ayırmak için kolon kromatografisi uygulaması gerçekleştirildi. 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.



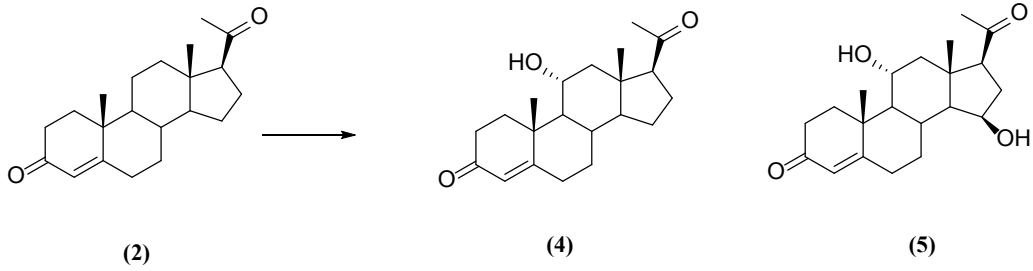
4. DENEYSEL BULGULAR

Bu çalışmada karbon iskeleti Şekil 4.1.'de açıklanan progesteronun (2) *A. glaucus* MRC 200914 izolatu ile 5 gün olarak süren biyotransformasyonu gerçekleştirildi.



Şekil 4.1. Substratın karbon iskeleti.

A. glaucus MRC 200914 ile substratın inkübasyonu sonrasında elde edilen yağimsı madde (1959 mg) ile gerçekleştirilen kolon kromatografisi çalışmasından değişime uğramayan başlangıç maddesi (152 mg) ile 11 α -hidroksipregn-4-en-3,20-dion (4) ve 11 α ,15 β -dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (5) metabolitleri elde edildi (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Substratın *A. glaucus* MRC 200914 ile biyotransformasyonu.

11 α -Hidroksipregn-4-en-3,20-dion (4) (505 mg, %48)

Erime noktası: 170-171 °C, lit., 166-167°C [59].

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3375, 1655 ve 1610.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,67 (3H, s, 18-H), 1,32 (3H, s, 19-H), 2,13 (3H, s, 21-H), 2,50 (1H, t, $J = 8,5$ Hz, 17 α -H), 4,02 (1H, dt, $J = 5$ ve 10 Hz, 11 β -H), 5,73 (1H, s, 4-H).

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

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

C atomu	(2)	(4)	(5)
1	35.56	37.15	36.15
2	33.81	33.96	34.06
3	199.35	200.45	200.60
4	123.77	124.12	124.27
5	170.91	171.59	171.69
6	32.64	33.42	33.47
7	31.74	31.32	30.56
8	35.38	34.69	31.23
9	53.48	58.54	58.89
10	38.43	39.75	40.05
11	20.87	68.36	68.30
12	38.50	49.95	51.52
13	43.78	43.92	43.67
14	55.86	55.08	59.33
15	24.22	24.00	69.63
16	22.66	22.66	37.30
17	63.34	62.90	63.20
18	13.20	14.27	16.97
19	19.23	18.04	18.08
20	209.22	209.06	208.13
21	31.39	31.18	31.10

11 α ,15 β -Dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (**5**) (165 mg, %15).

Erime noktası: 178-179 $^{\circ}\text{C}$, lit., 182-183 $^{\circ}\text{C}$ [60].

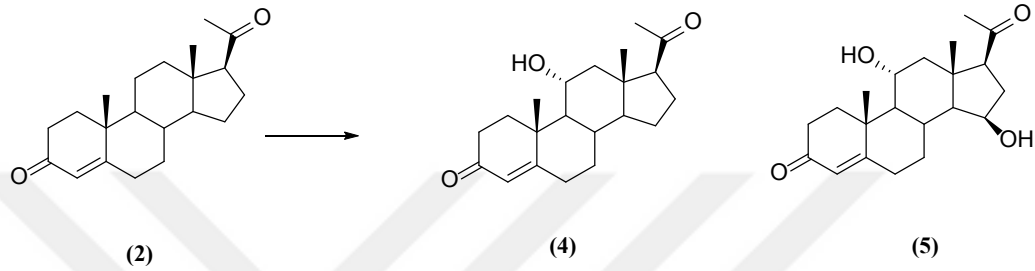
IR ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3530, 1725, 1675 ve 1615.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,95 (3H, s, 18-H), 1,33 (3H, s, 19-H), 2,49 (3H, s, 21-H), 2,49 (1H, t, $J = 8,5$ Hz, 17 α -H), 4,04 (1H, dt, $J = 5$ ve 10 Hz, 11 β -H), 4,34 (1H, m, 15 α -H), 5,73 (1H, bs, 4-H).

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

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

A. glaucus MRC 200914 izolatu ile progesteron (2) inkübasyonu Sekil 5.1.'de gösterildiği gibi iki metabolit verdi.



Şekil 5.1. Substratın *A. glaucus* MRC 200914 ile biyotransformasyonu.

İlk metabolit 11 α -hidroksipregn-4-en-3,20-dion (4) olarak tanımlandı. Metabolitin ^1H NMR spektrumu 11 α -hidroksil grubu için karakteristik olan bir sinyali (1H, dt, $J = 5$ ve 10 Hz) δ_{H} 4.02 ppm'de verdi [61]. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumunda (Tablo 5.1.) C-9 sinyali için aşağı alana doğru bir kayma ($\Delta\delta_{\text{C}}$ 5,06 ppm) gözlenirken C-8 sinyali için ise yukarı alana doğru bir γ -gauche kayması ($\Delta\delta_{\text{C}}$ 0,69 ppm) gözlenmesi bir 11 α -hidroksil grubu varlığını daha da pekiştirdi [62]. Metabolite ait ^1H NMR spektrumunda substratta da mevcut olan 17 α -H ve 4-H sinyallerinin sırasıyla δ_{H} 2,50 ppm (1H, t, $J = 8,5$ Hz) ve 5,73 ppm'de (1H, s) gözlenmesi substratın diğer kısımlarında herhangi bir değişim olmadığını gösterdi.

İkinci metabolit ise 11 α ,15 β -dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (5) olarak tanımlandı. Metabolit ^1H NMR spektrumu 11 α -hidroksil grubu varlığını gösteren tipik bir sinyali (1H, dt, $J = 5$ ve 10 Hz) δ_{H} 4.04 ppm'de verdi [61]. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu C-9 sinyali için aşağı alana doğru bir kayma ($\Delta\delta_{\text{C}}$ 5,41 ppm) verirken C-8 sinyali için ise yukarı alana doğru bir γ -gauche kayması ($\Delta\delta_{\text{C}}$ 4,15 ppm) vermesi bir 11 α -hidroksil grubu varlığını daha da netleştirdi [62]. Metabolit ^1H NMR spektrumu ayrıca 15 β -hidroksil grubunun varlığını gösteren karakteristik bir sinyali (1H, m) δ_{H} 4.34 ppm'de verdi [61]. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu C-14 ve C-16 sinyalleri için aşağı alana doğru kaymalar (C-14 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 3,47 ppm ve C-16 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 14,64 ppm) verirken C-8 rezonansı için ise yukarı alana doğru bir γ -gauche kayması ($\Delta\delta_{\text{C}}$

4,15 ppm) verdi [62]. Bu kimyasal kayma değerleri bir 15 β -hidroksil grubunu varlığını daha da doğruladı. Metabolite ait ^1H NMR spektrumunda substratta da bulunan 17 α -H ve 4-H sinyalleri sırasıyla δ_{H} 2,49 ppm (1H, t, $J = 8,5$ Hz) ve 5,73 ppm'de (1H, bs) gözlemlendiği için substratın diğer kısımlarında bir değişim olmadığı değerlendirildi.

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

C atomu	(2)	(4)	(5)
1	35.56	37.15	36.15
2	33.81	33.96	34.06
3	199.35	200.45	200.60
4	123.77	124.12	124.27
5	170.91	171.59	171.69
6	32.64	33.42	33.47
7	31.74	31.32	30.56
8	35.38	34.69	31.23
9	53.48	58.54	58.89
10	38.43	39.75	40.05
11	20.87	68.36	68.30
12	38.50	49.95	51.52
13	43.78	43.92	43.67
14	55.86	55.08	59.33
15	24.22	24.00	69.63
16	22.66	22.66	37.30
17	63.34	62.90	63.20
18	13.20	14.27	16.97
19	19.23	18.04	18.08
20	209.22	209.06	208.13
21	31.39	31.18	31.10

Tablo 5.2.'den *A. glaucus* MRC 200914 izolatının progesteronu (2) yüksek bir verimle C-11 α pozisyonunda hidroksillerken C-15 β pozisyonunda ise düşük verimli bir hidroksilleyerek metabolize ettiği anlaşıldı.

Tablo 5.2. *A. glaucus* MRC 200914 küfü ile metabolit verimleri.

Substrat	Metabolit	% Verim
Progesteron(2)		
	11 α -Hidroksipregn-4-en-3,20-dion (4)	48
	11 α ,15 β -dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (5)	15

Literatürdeki *Aspergillus* türleri ile steroid biyotransformasyon çalışmaları incelendiğinde ise progesteronun (2) hem C-11 α hemde C-15 β pozisyonlarında hidroksillenmesinin yaygın olduğu gözlemlendi [9-13,16-56]. Bu çalışmada da *A. glaucus* MRC 200914 substratı C-11 α ve C-15 β pozisyonlarında hidroksilledi. *A. glaucus* MRC 200914 ve diğer küfler ile steroid biyotransformasyonları çalışmalarımız sürmektedir.



KAYNAKLAR

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

- [15] Lee, S. K., Kang, H. G., Na, K. J., Han, J.I. 2012. Fungal Dermatitis Caused by *Aspergillus sydowii* in a Thoroughbred Horse. Journal of Equine Veterinary Science. 32, 835-839.
- [16] Kim, M.N., Ergan, F., Dhulster, P., Atrat, P., Gellf, G., Thomas, D. 1982. Steroid Modification with Immobilized Mycelium of *Aspergillus phoenicis*. Biotechnol. Lett.. 4, 233-238.
- [17] Dutta, T. K., Datta, J., Samanta, T. B. 1993. Onset of New Catalytic Activity in Immobilized Spores of *Aspergillus ochraceus* TS in situ Germination C17-C20 Lysis Accompanies 11 α -Hydroxylation of Steroid. Biochem. Biophys. Res. Commun., 192, 119-123.
- [18] Mahato, S. B., Banarjee, S. 1985. Steroid Transformations by Microorganisms-II. Phytochemistry. 24, 1403-1421.
- [19] Dutta, T. K., Samanta, T. B. 1997. Novel Catalytic Activity of Immobilized Spores Under Reduced Water Activity. Bioorg. Med. Chem. Lett., 7, 629-632.
- [20] Mahato, S. B., Banarjee, S., Podder, S. 1989. Steroid Transformations by Microorganisms-III. Phytochemistry, 28, 7-40.
- [21] El-Refai, A. M. H., Sallam, L. A. R., El-Kady, I. 1969. Microbiological Transformations of Progesterone. J. Gen. and Appl. Microbiol., 15, 301–307.
- [22] El-Refai, A. M. H., Sallam, L. A. R., El-Kady, I. 1970. Transformation of Progesterone by *Aspergillus niger* 100 and *Rhizopus nigricans* REF, 129. Bull. Chem. Soc. Jpn., 43, 1239–1242.
- [23] Holland, H.L. 1982. The Mechanism of the Microbial Hydroxylation of Steroids. Chem. Soc. Rev., 11, 371-395.
- [24] El-Kady, I. A. 1982. 6 β -Hydroxylation of Steroids by Extracts of *Aspergillus niger*. J. Gen. Microbiol. 128, 2511-2514.
- [25] Savinova, O.S., Solyev, P.N., Vasina, D.V., Tyazhelova, T.V., Fedorova, T.V., Savinova, T.S. 2018. Biotransformation of Progesterone by the Ascomycete *Aspergillus niger* N402. Biochemistry (Moscow) 83, 26-31.
- [26] Smith, K. E., Ahmed, F., Williams, R. A. D., Kelly, L. K. 1994. Microbial Transformations of Steroids-VIII. Transformation of Progesterone by Whole Cells and Microsomes of *Aspergillus fumigatus*. J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 49, 93-100.
- [27] Mukherjee, A., Banarjee, S., Mahato, S. B. 1982. Metabolism of Progesterone by *Aspergillus fumigatus*. J. Steroid Biochem., 17, 443- 446.
- [28] Brannon, D. R., Martin J., Oehlschlager A. C., Durham, N. N., Zalkow, L. H. 1965. Transformation of Progesterone and Related Steroids by *Aspergillus tamarii*. J. Org. Chem., 30, 760-762.

- [29] Yildirim, K., Uzuner, A., Gülcüoğlu E.Y. 2011. Baeyer-Villiger Oxidation Of Some Steroids By *Aspergillus Tamaris* Mrc 72400. Collect. Czech. Chem. Commun., 76, 743-754.
- [30] Yildirim, K., Uzuner, A., Gülcüoğlu E.Y. 2010. Biotransformation of some steroids by *Aspergillus terreus* MRC 200365. Collect. Czech. Chem. Commun., 75, 665-673.
- [31] Ahmed, E.M. 2007. Production of 11 α -hydroxyprogesterone Using *Aspergillus terreus* Immobilized on Polytetrafluoroethylene. Braz. J. Microbiol., 38, 224-229.
- [32] Cvelbar, D., Zist, V., Kobal, K., Zigon, D., Zakelj-Mavrič, M., 2012. Steroid toxicity and detoxification in ascomycetous fungi. Chem.-Biol. Interact., 202, 243-258.
- [33] Mostafa, M. E., Zohri, A. A. 2000. Progesterone Side-Chain Degradation by Some Species of *Aspergillus flavus* Group. Folia Microbiol., 45, 243-247.
- [34] Sallam, L.A.R., El Refai, A.M.H., Nada, S. and Abdel Fattah A.F. 1973. Enzymic hydroxylation and side chain degradation of progesterone by *Aspergillus fischeri*. J. Gen. Appl. Microbiol., 19, 155-160.
- [35] Viola, F., Caputo, O., Balliano, G., Delprino, L., Cattel, L. 1983. Side Chain Degradation and Microbial Reduction of Different Steroids by *Aspergillus aureogulgens*. J. Steroid Biochem., 19, 1451-1458.
- [36] Mahato, S.B., Majumdar, I. 1993. Current Trends in Microbial Steroid Biotransformation. Phytochemistry, 34, 883-898.
- [37] Savinova, O.S., Soltyev, P.N., Vasina, D.V., Tyazhelova, T.V., Fedorova, T.V., Savinova, T.S. 2019. Biotransformation of progesterone by *Aspergillus nidulans* VKPM F-1069 (wild type), 149, 108421.
- [38] Haiying, Y., Hailing S., Gang D., Guangjian S., Jingxian S., Haiyun C. 2013. Progesterone side-chain cleavage by *Aspergillus versicolor*. Adv. Mater. Res., 781-784, 1164-167.
- [39] Hosseinabadi, T., Vahidi, H., Nickavar, B., Kobarfard, F. 2015. Biotransformation of Progesterone by Whole Cells of Filamentous. Iran J. Pharm. Res. 14(3), 919-924.
- [40] McMorris, TC., Le, P.H., Preus, M.W., Schow, S.R., Weihe, G.R. 1989. Synthesis of dehydro-oogoniol, a female-activating hormone of Achlya: the progesterone route. Steroids, 53, (3-5), 345-361.
- [41] Yildirim, K., Kuru, A. 2016. The biotransformation of some steroids by *Aspergillus sydowii* MRC 200653. Journal of Chemical Research, 40, 78-81.

- [42] Cardoso de Paula, S.F., Porto, A.L.M., 2020. Cascade reactions of progesterone by mycelia and culture broth from marine-derived fungus *Aspergillus sydowii* CBMAI 935. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 25, 101546.
- [43] Javid, M., Nickavar, B., Vahidi, H., Faramarzi, M.A. 2018. Baeyer-Villiger oxidation of progesterone by *Aspergillus sojae* PTCC 5196. *Steroids*. 140, 52-57.
- [44] Marilyn, C. 1962. The Hydroxylation of Progesterone by Conidia from *Aspergillus ochraceus*. *Mycologia*, 54, 317-319.
- [45] Walaa, A. F., Abbas, I.H., Elwan, K.M, Swellum, M.A and El-DougDoug, Kh. A. 2009. Biotransformation of Progesterone by Microbial Steroids. *J. Appl. Sci. Res.*,5, 137-143.
- [46] Samanta, T. B., Roy, N., Chattopadhyay, S. 1978. An Improved 11 α -Hydroxylation of Progesterone by *Aspergillus ochraceus* TS. *Biochem. J.*, 176, 593-594.
- [47] Ghosh, D., Samanta, T. B. 1981. 11 α -Hydroxylation of Progesterone by Cell Free Preparation of *Aspergillus ochraceus* TS. *J. Steroid Biochem.*, 14, 1063-1067.
- [48] Bihari, V., Goswami, P. P., Rivzi, S. H. M., Khan, A. W., Basu, S. K., Vora, V. C. 1984. Studies on Immobilized Fungal Spores for Microbial Transformation of Steroids: 11 α -Hydroxylation of Progesterone with Immobilized Spores of *Aspergillus ochraceus* G8 on Polyacrylamide Gel and Other Matrices. *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 1403-1408.
- [49] Weaver, E. A., Kenney, H. E., Wall, M. E. 1960. Effect of Concentration on the Microbiological Hydroxylation of Progesterone. *Appl. Microbiol.*, 8, 345-348.
- [50] Bihari, V., Joshi, A. K., Khan, A. W., Basu, S. K. 1988. Biochemical Engineering Studies for Steroid Transformations- 11 α -Hydroxylation of Progesterone Using *Aspergillus ochraceus*. *J. Microb. Biotechnol.*, 3, 45-50.
- [51] Broad, D. F. , Foulkes, J., Dunnill, P. 1984. The Uptake of *Aspergillus ochraceus* Spores on Diatomaceous Particles and Their Use in the 11 α -Hydroxylation of Progesterone. *Biotechnol. Lett.*, 6, 357-362.
- [52] Tapan, K. D., Timir, B.S. 1999. Bioconversion of Progesterone by the Activated Immobilized Conidia of *Aspergillus ochraceus* TS. *Curr. Microbiol.*, 39, 309–312.
- [53] Kulkarni, A. G., Lele, S. S., Kulkarni, P. R. 1998. Improved Adsorption of *Aspergillus niger* 589 Spores on High-Density Polyethylene for Progesterone Biotransformation. *J. Ferment. Bioeng.*, 86, 510-512.

- [54] Mahato, S. B., Mukherjee, A. 1984. Steroid Transformations by Microorganisms. *Phytochemistry*, 23, 2131–2154.
- [55] Ismail, M. A., Zohri, A. A. 1994. Confirmation of the Relationships of *Aspergillus egyptiacus* and *Emericella nidulans* Using Progesterone Transformation. *Lett. Appl. Microbiol.*, 18, 130–131.
- [56] Somal, P., Chopra, C. L. 1985. Microbial Conversion of Steroids III: 11 α -Hydroxylation by Fungal Mycelium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 21, 267-269.
- [57] Hubka, V., Kolarík, M., Kubátová, A., & Peterson, S. W. 2013. Taxonomic revision of *Eurotium* and transfer of species to *Aspergillus*, *Mycologia*, 105, 912–937.
- [58] 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.
- [59] Peterson, D.H., Murray, H.C., Epstein, S.H., Reineke, L.M., Weintraub, A., Meister, P.D., Leigh, H.M. 1952. Microbiological Oxygenation of Steroids, I. Introduction of Oxygen at Carbon-11 of Progesterone. *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 5933–5936.
- [60] Schubert, A., Langbein, G. and Siebert, R. 1957. Mikrobielle Hydroxylierung von Steroiden in 12- und 15-Stellung. *Chem. Ber.*, 90, 2576.
- [61] Kirk, D.N., Toms, H.C., Douglas, C., White, K.A., Smith, K.E., Latif, S., and Hubbard, R.W.P. 1990. A survey of the high-field ¹H NMR spectra of the steroid hormones, their hydroxylated derivatives, and related compounds *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 2, 1567.
- [62] Blunt, J.W., and Stothers, J.B. 1977. C NMR spectra of steroids a survey and commentary. *Org. Magn. Reson.*, 9, 439.

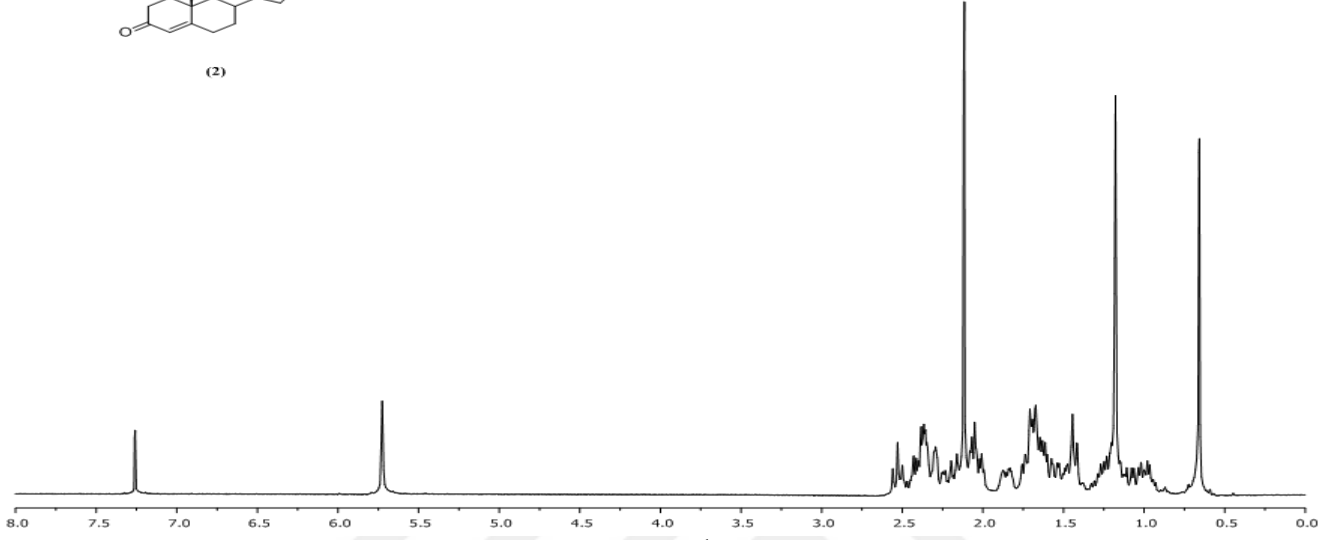
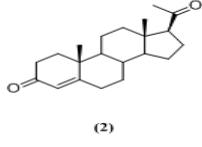


EKLER

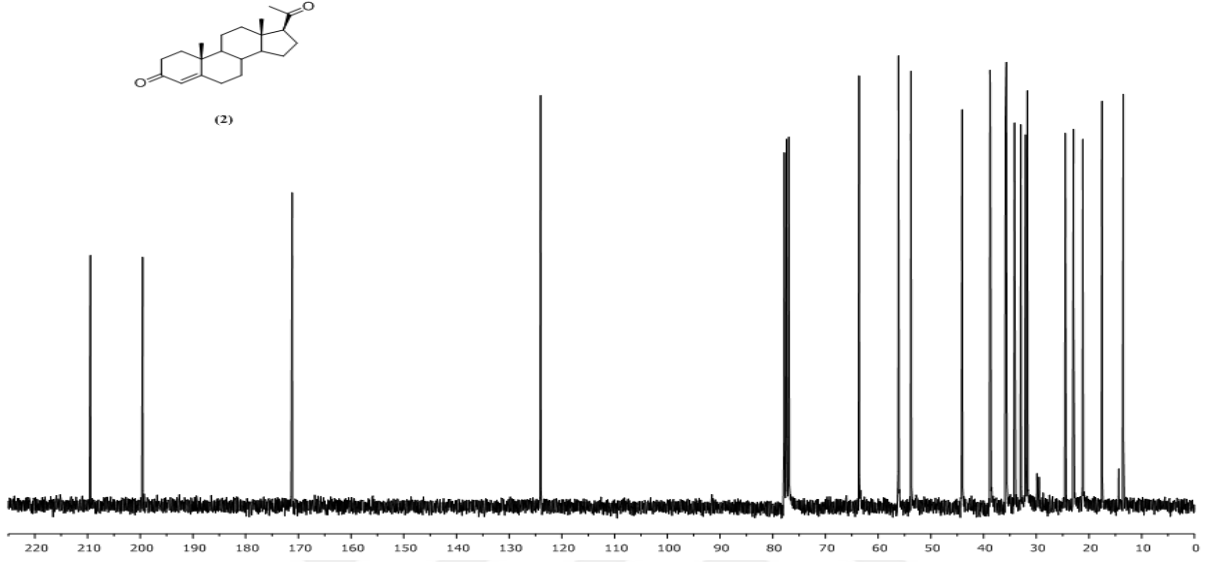
EK A. NMR spektrumları



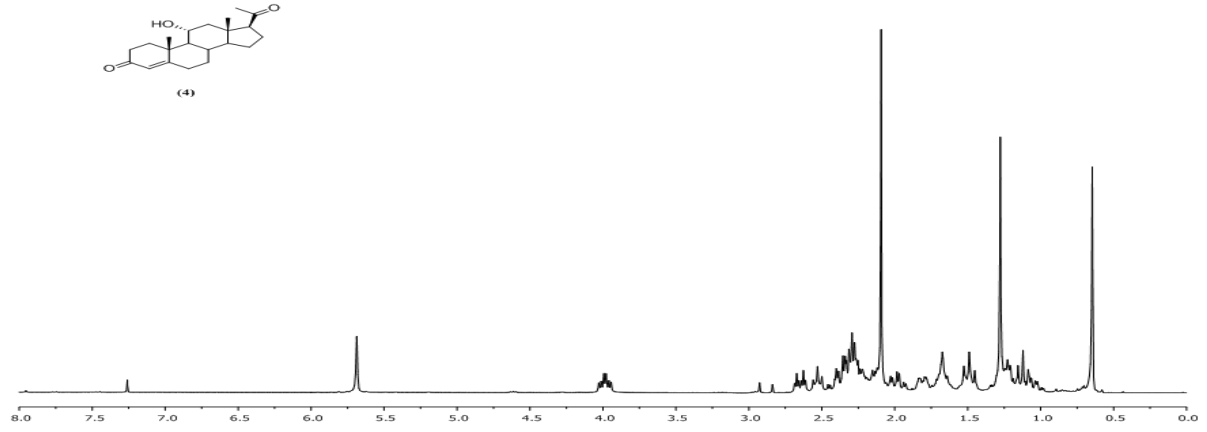
EK A



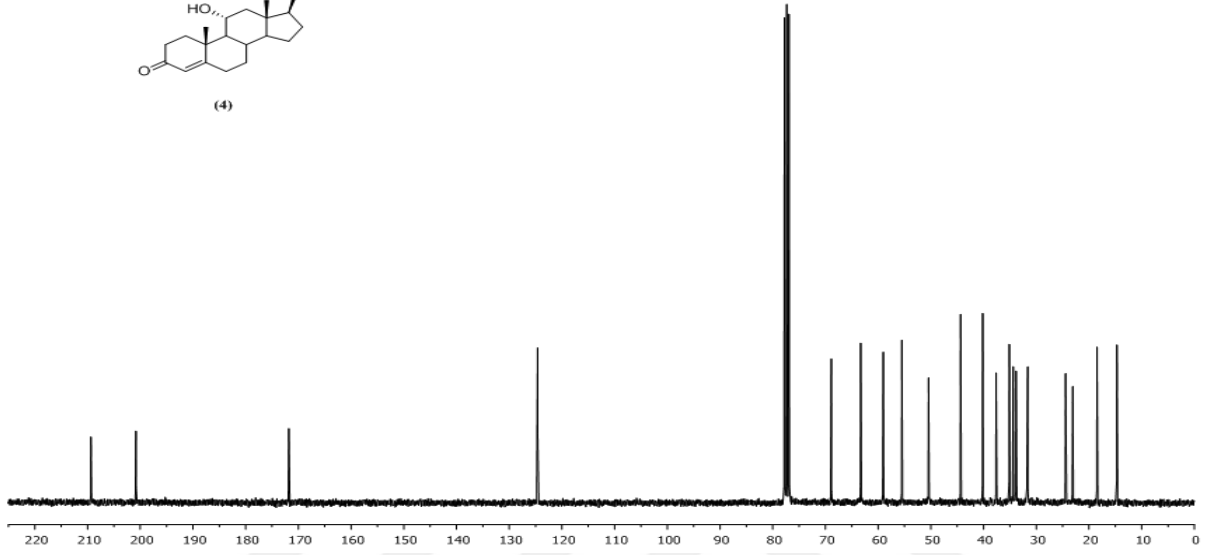
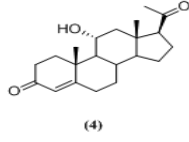
EK A.1. Progesteron (2) için ¹H NMR spektrumu



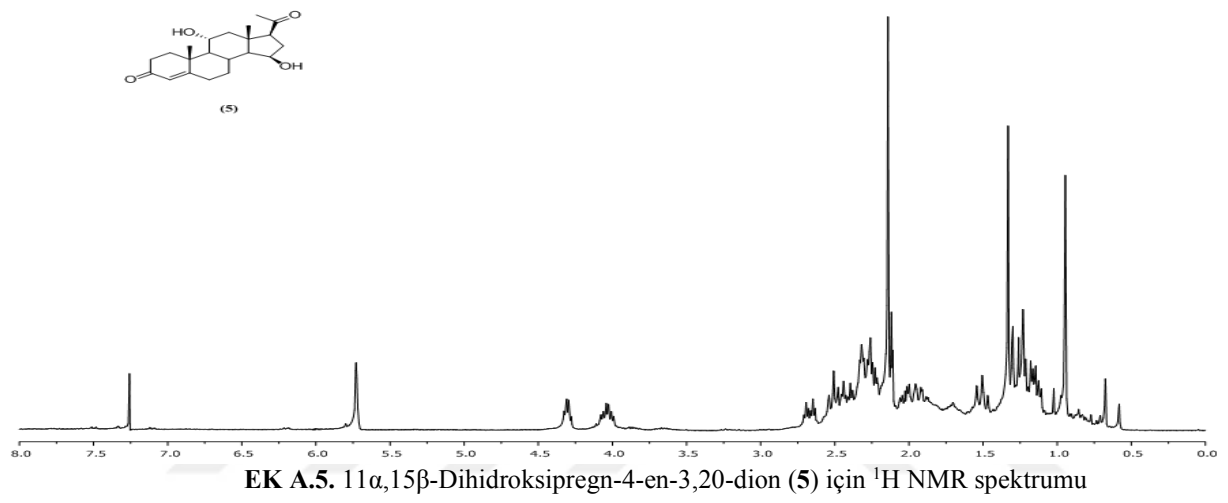
EK A.2. Progesteron (2) için ¹³C NMR spektrumu

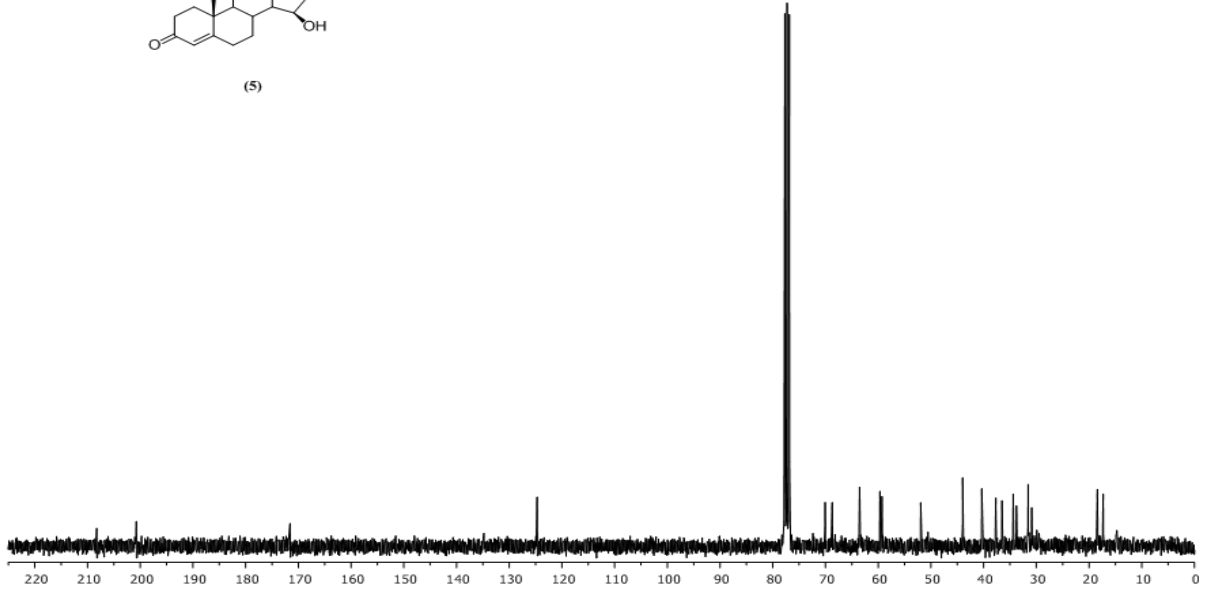
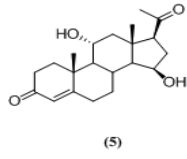


EK A.3. 11 α -Hidroksipregn-4-en-3,20-dion (4) için ^1H NMR spektrumu



EK A.4. 11 α -Hidroksipregn-4-en-3,20-dion (4) için ^{13}C NMR spektrumu





EK A.6. $11\alpha,15\beta$ -Dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (5) için ^{13}C NMR spektrumu



ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Fatma Handan KONAR

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2006-2011 yılları arasında Sakarya Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü.
- **Yüksek lisans** : Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalı (devam ediyor).

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2011-2018 yılları arasında ilaç sektöründe kalite kontrol laboratuvar lideri olarak çalıştım.

TEZDEN TÜRETİLEN ESERLER:

- Uluslararası Sözlü Bildiri (Yildirim, K., Kuru, A. Yilmazer 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).