

بررسی زیست تبدیل هیدروکورتیزون و ناندرولون دکانوات با استفاده از سه گونه‌ی قارچی

صبا قاسمی*

استادیار گروه شیمی، واحد ایلام، دانشگاه آزاد اسلامی، ایلام، ایران

زهرا حبیبی*⁺، فاطمه انصاری

گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده: گسترش بیماری‌های جدید نیاز به سنتز مشتقات با خواص داروئی بیشتر را از داروهای فعلی افزایش داده است. یک دسته از ترکیبات با خواص داروئی ارزنده، مشتقات استروئیدی به ویژه کورتیکواستروئیدها می‌باشند که در درمان بیماری‌هایی همچون نارسایی غدد فوق کلیوی، بیماری‌های التهابی، هموروئید، ادم مغزی، آنمی و... نقش بسزائی دارند و انتظار می‌رود بازار آن‌ها به دلیل ظهور و شیوع بیماری‌های جدید و مزمن، رشد مداوم داشته باشد. از آنجائی که نوع، تعداد و مکان قرارگیری گروه‌های عاملی موجود در ساختار استروئیدها، تأثیر بسزائی در خواص و فعالیت فیزیولوژی آنها دارد. تلاش‌های مستمری در راستای سنتز مشتقات استروئیدی به منظور بهبود اثربخشی و کاهش عوارض جانبی آنها انجام شده است. یکی از روش‌های کارآمد و مقرون به صرفه در این راستا زیست تبدیل آنها می‌باشد. با توجه به ویژگی‌های منحصر به فرد کاتالیت‌های زیستی در کنار ماهیت غیرسمی و زیست تخریب پذیر آنها، در این پژوهش زیست تبدیل دو هورمون استروئیدی هیدروکورتیزون (۱) و ناندرولون دکانوات (۲) با استفاده از گونه‌های قارچی *Circinella muscae*، *Coniothyrium fuckelii* و *Fusarium solani* مورد بررسی قرار گرفت. زیست تبدیل هیدروکورتیزون توسط دو گونه‌ی قارچی *C. fuckelii* و *C. muscae* منجر به احیای گروه کربونیل ۲۰ و تولید مشتق ۲۱- β -۲۰- 17α - 11β -تترا هیدروکسی پرگن-۴-ان-۳-ان (۳) به‌عنوان تنها فرآورده واکنش گردید. کاهش آنزیمی این گروه کتونی یکی از روش‌های مهم به منظور غیر فعال کردن کورتیکواستروئیدها می‌باشد. زیست تبدیل ناندرولون دکانوات با گونه‌ی قارچی *C. fuckelii* منجر به هیدرولیز گروه استری و تولید 17β -هیدروکسی-۴-ان-۳-ان (۴) در بازده ۴۳٪ شد. این در حالی است که با گونه‌ی قارچی *F. solani* ترکیب استر-۴-ان-۳، ۱۷-دی اون (۵) در بازدهی ۲۵٪ بدست آمد. شناسائی محصولات توسط روش‌های طیف سنجی ^{13}C NMR و 1H NMR، dFT-IR صورت گرفت. در نهایت از طریق مقایسه داده‌های طیفی آنها با آنچه که در منابع علمی گزارش شده است ساختار آنها تأیید گردید.

واژه‌های کلیدی: استروئید، زیست تبدیل، هیدروکورتیزون، ناندرولون دکانوات، گونه‌ی قارچی.

KEYWORDS: Steroid, Biotransformation, Hydrocortisone, Nandrolone decanoate, Fungal species.

مقدمه

زیست‌شناسان، میکروبیولوژیست‌ها و بیوشیمی‌دانان به دنبال ارزیابی تکامل فرآیندهای متابولیکی بوده‌اند و دانشمندان همواره در پی

بشر از دیرباز به مطالعه در مورد توانائی سیستم‌های طبیعی جهت انجام تبدیلات شیمیائی علاقه‌مند بوده است. سال‌های متمادی

+E- mail: Sb.ghasemi@iau.ac.ir & z_habibi@sbu.ac.ir

* عهده‌دار مکاتبات

توانایی انجام واکنش‌ها در pH و دماهای ملایم، توانایی تبدیل مواد سمی به موادی با سمیت کمتر و سازگاری با محیط زیست^۵ از جمله مزایای دیگری است که می‌توان به آنها اشاره نمود [۱، ۵]. امروزه زیست کاتالسیست و تکنولوژی آنزیمی در بسیاری از صنایع مهم مانند صنعت کشاورزی، دارویی، منسوجات، مواد غذایی، مواد شیمیایی و شوینده، سوخت، انرژی و غیره به طور قابل توجهی استفاده می‌شود. همان‌طور که در بالا نیز اشاره شد کاتالسیست‌های زیستی به شکل سلول‌های کامل^۶ و یا آنزیم‌های خالص در واکنش‌های زیست تبدیل مورد استفاده قرار می‌گیرند و عوامل مختلفی نظیر نوع واکنش، مقیاس زیست تبدیل، پایداری کاتالیزور زیستی، سهولت تطبیق شرایط با راکتورهای صنعتی و استفاده از کوفاکتور تعیین کننده انتخاب نهائی یک زیست کاتالسیست مناسب می‌باشد [۶]. استفاده از زیست کاتالسیست‌ها به شکل آنزیم آزاد مزایایی همچون شرایط واکنش ساده‌تر، بهره‌وری بالاتر به علت غلظت بالای کاتالسیست و خالص‌سازی و جداسازی راحت‌تر محصولات را بدنبال دارد. در مقابل وقتی که جهت انجام یک تبدیل زیستی به چند آنزیم نیاز باشد و یا اینکه جداسازی آنزیم از سلول مشکل باشد یا در مواردی که برای فعالیت آنزیم به کوفاکتور نیاز باشد سلول‌های کامل بیشتر مورد توجه قرار می‌گیرند. زیرا اکثر کوفاکتورها، مولکول‌های ناپایداری بوده و استفاده از آن‌ها در مقادیر استوکیومتری مستلزم هزینه‌ی بالا می‌باشد. یک مزیت قابل توجه در استفاده از سلول‌های کامل به‌عنوان زیست کاتالسیست عدم نیاز به کوفاکتور و بازیافت آن می‌باشد. علاوه بر این با استفاده از سلول‌های کامل می‌توان سنتز مورد نظر را با مواد خام ارزان و در دسترس انجام داد [۷]. در زیست کاتالسیست‌های سلول کامل، از یک میکروارگانیسم جهت تولید محصول استفاده می‌شود که تحقیقات نشان می‌دهد باکتری‌ها و قارچ‌ها در این زمینه بیشترین کاربرد را دارند [۸-۱۰]. زیست تبدیل میکروبی با سلول‌های کامل قارچی به ویژه در زمینه‌ی تولید مشتقات استروئیدی به عنوان پرمصرف‌ترین ترکیبات دارویی از دیر باز بسیار مورد توجه قرار گرفته است [۱۱-۱۳]. این حقیقت که تغییرات جزئی در اسکلت شیمیایی استروئیدها می‌تواند تغییرات وسیعی را در فعالیت زیستی آن‌ها به همراه داشته باشد موجب گردیده تا محققین به منظور یافتن مشتقات جدید بدنبال کشف میکروارگانیسم‌هایی باشند که بتوانند تغییرات مورد نظر را در آنها با صرف هزینه‌ی پایین ایجاد کنند [۱۴، ۱۵]. هیدروکسیل دار کردن، شکست زنجیره‌ی جانبی، کاهش و یا ایجاد پیوند دوگانه و گروه کربونیل از جمله تبدیلات زیستی مهمی می‌باشند

بدست آوردن دانش کافی در مورد آنزیم‌ها و استفاده از آن‌ها در زمینه‌ی کاری خود بوده‌اند. دانشمندان رشته شیمی به ویژه شیمی آلی نیز در این زمینه بسیار فعال و پرتلاش بوده‌اند. همان‌گونه که می‌دانیم سنتز ترکیبات آلی بر پنج اصل استوار می‌باشد که عبارتند از: ۱- گسترش واکنش‌های شیمیایی جدید، ۲- بهبود شیمی گزینی و مکان گزینی واکنش‌ها، ۳- بهبود بازدهی واکنش، ۴- استفاده از شرایط ملایم در واکنش‌ها که با ظهور مفهوم "شیمی سبز" این مورد از اهمیت بسیار زیادی برخوردار گردید و در نهایت توسعه‌ی تبدیلات شیمیایی انانتیو گزین. در این راستا استفاده از سیستم‌های زیستی (سلول‌های کامل میکروبی یا آنزیم‌های ایزوله) به‌عنوان کاتالسیست‌های زیستی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. زیرا همان‌طور که در ادامه به توضیح آن پرداخته می‌شود بعضی از اصول گفته شده در بالا را می‌توان با استفاده از این کاتالسیست‌ها به خوبی پوشش داد [۱]. در حقیقت کاتالیز کردن واکنش‌های شیمیایی با استفاده از سیستم‌های زیستی دوستدار محیط زیست را زیست تبدیل^۱ می‌نامند. در این روش با استفاده از کاتالسیست‌های زیستی امکان اصلاح ساختاری و همین‌طور ایجاد گروه‌های عاملی در موقعیت‌های مختلف و غیر قابل دسترس ترکیبات آلی برای شیمی‌دانان فراهم می‌شود [۱، ۲]. کاتالسیست‌های زیستی آنزیم‌ها یا سلول‌های کامل میکروبی (باکتری‌ها، قارچ‌ها، ریزجلبک‌ها، گیاهان و ...) می‌باشند که واکنش‌دهنده یا سوبسترا را طی یک یا چند مرحله به محصول نهائی تبدیل می‌کنند این کاتالسیست‌ها نیز همانند کاتالسیست‌های شیمیایی سرعت واکنش را افزایش می‌دهند، اما تأثیری بر روی ترمودینامیک واکنش ندارند [۳، ۴]. آنزیم‌ها پروتئین‌هایی با وزن مولکولی بالا هستند که دارای یک سایت فعال با ساختار سه بعدی می‌باشند که همان مرکز فعال کاتالسیستی و مکان برهم‌کنش آنزیم با سوبستراست. در حقیقت ویژه بودن آنزیم‌ها به علت وجود همین سایت فعال در ساختار آنها است. سلول‌های کامل مورد استفاده جهت انجام تبدیلات زیستی نیز شامل محیط کشت و میکروارگانیسم مورد نظر از قبیل قارچ، باکتری، مخمر، ریزجلبک و سیانو باکتری می‌باشند خواص منحصر به فرد کاتالسیست‌های زیستی نسبت به کاتالسیست‌های مرسوم شیمیایی موجب محبوبیت روزافزون آنها در بین شیمی‌دانان شده است یکی از مهم‌ترین این ویژگی‌ها، گزینش‌پذیری بالای آنهاست که شامل فضاگزینی^۲، مکان‌گزینی^۳ و شیمی‌گزینی^۴ می‌شود. این ویژگی با حذف و یا کاهش استفاده از گروه‌های محافظت‌کننده منجر به کاهش واکنش‌های جانبی و جداسازی راحت محصولات می‌شود. علاوه بر این

(۱) Biotransformation

(۳) Regioselectivity

(۵) Environmentally friendly

(۲) Stereo- selectivity

(۴) Chemo-selectivity

(۶) Whole cells

جهت زیست تبدیل هورمون ضدالتهابی ملنژسترون استات مورد بررسی قرار گرفت. در نتیجه‌ی واکنش‌های اکسایش و هیدروژن‌زدائی، چهار مشتق جدید استروئیدی با خواص ضدالتهابی بدست آمد [۲۴]. با توجه به مطالب ذکر شده در بالا و توانایی گونه‌های مختلف قارچی در زیست تبدیل ترکیبات استروئیدی به ویژه هیدروکسیل دار کردن آن‌ها [۱۷، ۱۸، ۲۰، ۲۱، ۲۵]، در پژوهش حاضر، به واکنش زیست تبدیل دو ترکیب استروئیدی هیدروکورتیزون و ناندرولون دکانوات با سویه‌های قارچی *Coniothyrium fuckelii*، *Circinella muscae* و *Fusarium solani* پرداخته شده است شایان ذکر است که زیست تبدیل این دو هورمون استروئیدی با این گونه‌های قارچی قبلاً بررسی نشده است.

بخش تجربی

مواد مصرفی

جهت انجام این پژوهش، محیط کشت، حلال‌ها و سایر ترکیبات شیمیایی مورد استفاده از شرکت‌های Sigma و Merck خریداری شده‌اند. هورمون‌های هیدروکورتیزون و ناندرولون دکانوات از شرکت ایران هورمون به صورت هدیه دریافت شدند. میکروارگانیسم‌های مورد استفاده، سویه‌های قارچی *Coniothyrium fuckelii* PTCC 5268، *Fusarium solani* PTCC 5284 و *Circinella muscae* PTCC 5261 می‌باشند که از مجموعه کشت مؤسسه تحقیقات علمی و صنعتی ایران خریداری گردید. گلوکوز و آگار مورد نیاز جهت تهیه‌ی محیط‌های کشت از شارلو (بارسلونا، اسپانیا) تهیه شدند. سیلیکاژل ۶۰ (GF₂₅₄) جهت انجام کروماتوگرافی لایه نازک از شرکت مرک خریداری شد.

میکروارگانیسم‌ها و شرایط رشد

در زیر هود میکروبی، ابتدا با اضافه کردن آب مقطر در شرایط کاملاً استریل به قارچ‌های خریداری شده به صورت لیوفیلیزه یک سوسپانسیون تهیه گردید. برای تهیه‌ی محیط کشت جامد هر سه سویه‌ی قارچی، ۳۰۰ گرم سیب‌زمینی در آب مقطر جوشانده شد. سپس به عصاره‌ی صاف شده‌ی آن، ۲۰ گرم گلوکز و ۱۵ گرم آگار اضافه گردید و به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. محلول بدست آمده به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه اتوکلاو با دمای ۱۲۱/۱ درجه سلسیوس و فشار ۱/۵ بار قرار داده شد تا استریل شود. برای تقسیم محیط کشت در پلیت‌ها، لازم است که محیط کشت استریل تا دمای ۴۵ °C خنک شود. سپس بسته به حجم پلیت‌ها در کنار شعله و زیر هود میکروبی به داخل پلیت‌های استریل اضافه گردد. باید در پلیت‌ها بسته شود تا محیط کشت داخل پلیت‌ها سرد و جامد شود. سپس به کمک

که به واسطه‌ی میکروارگانیسم‌های قارچی بر روی استروئیدها انجام گرفته است. بیشتر پژوهش‌های انجام شده در این زمینه بر روی سیستم‌های ۴-ان-۳-اکسو با یک یا دو گروه عاملی اکسیژن‌دار صورت پذیرفته است [۱۶-۱۹]. به‌عنوان مثال حیدری و همکاران در پژوهشی زیست تبدیل آندروست-۴-ان-۳-۱۷-دی‌اون را با استفاده از گونه‌های مختلفی از دو جنس *Fusarium* و *Aspergillus* مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق سویه‌های مختلف قارچی، محصولات متفاوتی را تولید کردند به‌عنوان مثال گونه‌ی *A. sp* تنها منجر به هیدروکسیلاسیون سوبسترا در موقعیت ۱۱ گردید این در حالی است که در زیست تبدیل همین ماده اولیه با گونه‌ی دیگر از همین جنس یعنی *A. nidulans* علاوه بر محصول بالا، مشتق هیدروکسیله شده‌ی دیگری (محصول حاصل از هیدروکسیلاسیون سوبسترا در موقعیت ۶) نیز در بازده ۱۸٪ بدست آمد. ۱۴α-آندروست-۴-ان-۳-۱۷-دی‌اون و تستوسترون مشتقات بدست آمده از انکوباسیون این ترکیب استروئیدی با گونه‌ی قارچی *F. oxysporum* بود. از زیست تبدیل آن توسط گونه‌ی دیگری از این قارچ یعنی *F. solani* مشتق هیدروکسیله شده‌ی دیگری یعنی ۱۱α-آندروست-۴-ان-۳-۱۷-دی‌اون علاوه بر تستوسترون تولید گردید [۱۷]. در پژوهش دیگری از زیست تبدیل مدروکسی پروژسترون استات با دو جنس *Absidia griseola* و *Acremonium chrysogenum* تنها مشتق ۱۱α-هیدروکسی مدروکسی پروژسترون استات در بازده‌های متفاوت تولید شد [۱۸]. در نتیجه‌ی انکوباسیون داروی ضد سرطان اگزامستان با *Macrophomina phaseolina* و *Fusarium lini*، سه فرآورده‌ی میکروبی^۱ جدید همراه با یک مشتق شناخته شده بدست آمد. فرآورده‌های جدید حاصل واکنش هیدروکسیلاسیون در موقعیت‌های مختلف ماده اولیه بودند [۲۱]. زیست تبدیل هیدروکورتیزون توسط دو گونه‌ی قارچی *Fusarium fujikuroi* و *Rhizomucor pusillus* با شکست شاخه‌ی جانبی هیدروکورتیزون همراه بود و هر دو سویه منجر به تولید دو فرآورده‌ی ۱۱β-هیدروکسی آندروست-۴-ان-۳-۱۷-دی‌اون و ۱۱β-۱۷-۲۰α-۲۱β-تترا هیدروکسی پرگن-۴-ان-۳-اون با درصد متفاوت شدند [۲۲]. یکی دیگر از ترکیبات استروئیدی که زیست تبدیل آن با استفاده از سلول‌های کامل قارچی به منظور یافتن مشتقات جدید با عوارض جانبی کمتر مورد بررسی قرار گرفته است، هورمون زنانه‌ی نورتیسترون می‌باشد. اخیراً در نتیجه‌ی انجام واکنش‌های هیدروکسیلاسیون، دهیدروژناسیون و لاکتیلاسیون بر روی این سوبسترا توسط گونه‌ی قارچی *Rhizopus microsporus* دو مشتق جدید استروئیدی و پنج ترکیب شناخته شده تولید گردید [۲۳]. در پژوهش دیگری توانائی دو گونه‌ی *Glomerella fusarioide* و *Rhizopus stolonifera*

(۱) Metabolite

به محیط کشت مایع بدون حضور میکروارگانیسم اضافه گردید. به منظور بررسی روند واکنش و بازده محصولات تولید شده از هر سوبسترا، طی روزهای مختلف از ظرف‌های واکنش نمونه برداری انجام شد و با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)، بهترین زمان برای استخراج فرآورده‌های حاصل مشخص گردید.

جداسازی و خالص‌سازی متابولیت‌های حاصل از زیست تبدیل مواد اولیه

با توجه به کروماتوگرافی لایه نازک و در روزی که بازدهی فرآورده‌های حاصل از زیست تبدیل هر سوبسترا به بیشترین مقدار خود رسید محتوای ارلن‌های مربوط به هر قارچ به هم اضافه شد و پس از جداسازی قارچ‌ها به وسیله کاغذ صافی، محلول زیر صافی سه بار با کلروفرم استخراج گردید. در مرحله‌ی بعد با اضافه کردن سدیم سولفات بی آب به محلول، آب موجود در آن خشک گردید. حلال آلی نیز توسط دستگاه تقطیر در خلاء تبخیر گردید. به عصاره‌ی حاصل مجدداً کلروفرم اضافه شد تا با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک، متابولیت‌های حاصل تفکیک و خالص‌سازی شوند. ساختار فرآورده‌های میکروبی حاصل از زیست تبدیل هر سوبسترا به وسیله روش‌های طیف‌سنجی مورد بررسی و تعیین گردید و با مقایسه داده‌های طیفی آن‌ها با آنچه که در منابع علمی گزارش شده تأیید شد.

روش‌های تجزیه‌ای

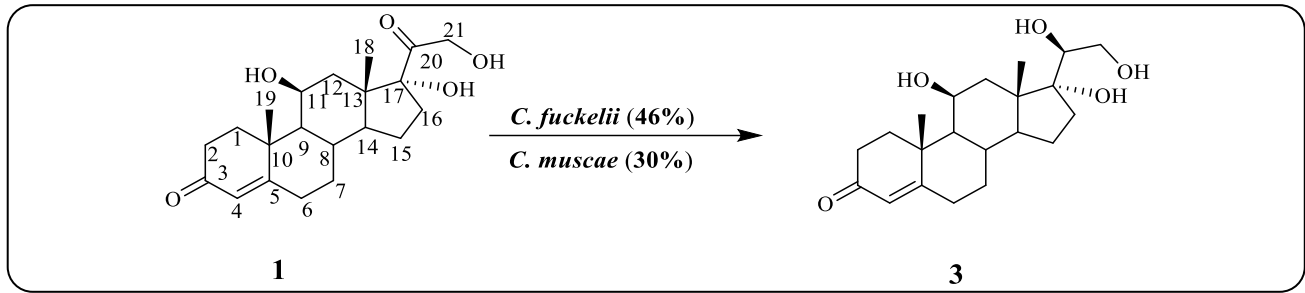
اندازه‌گیری نقطه ذوب ترکیبات توسط دستگاه بارن-استد/الکتروترمال ۹۲۰۰ در لوله موئین انجام شد که تصحیح نشده‌اند. طیف‌های $^1\text{H NMR}$ و $^{13}\text{C NMR}$ با استفاده از طیف سنج Bruker AQS AVANCE به ترتیب در فرکانس‌های ۳۰۰ و ۷۵ مگاهرتز در حلال‌های دوتره‌ی کلروفرم، متانول و دی متیل سولفوکسید ثبت گردید. وجابه‌جایی‌های شیمیایی بر حسب ppm نسبت به استاندارد داخلی تترامتیل سیلان گزارش شد. طیف‌های FT-IR ترکیبات با استفاده از قرص‌های KBr به وسیله دستگاه طیف سنج Magna 550 Nicolet FTIR ثبت گردید. چرخش نوری فرآورده‌های فعال نوری حاصل به وسیله‌ی دستگاه پلاریومتر مدل ۳۴۱ (Perkin Elmer) در طول موج 589 nm لامپ سدیم اندازه‌گیری شد. جهت انجام کروماتوگرافی لایه نازک در آزمایشگاه از صفحات شیشه‌ای 20×20 cm با قطر ۰/۳ میلی‌متر و سیلیکاژل ۶۰ (GF₂₅₄) استفاده گردید.

یک لوپ یا سوآب استریل و در مجاورت شعله از سوپانسیون اولیه قارچ‌های مورد نظر مقداری برداشته و به سطح محیط کشت جامد داخل پلیت‌ها انتقال داده می‌شود. این پلیت‌ها به مدت ۲ تا ۳ روز در دستگاه انکوباتور با دمای ۲۶ درجه سلسیوس قرار گرفتند. پس از اینکه قارچ‌ها رشد کردند پلیت‌های حاوی آنها در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند. در مرحله‌ی بعدی به منظور زیست تبدیل ترکیبات مورد نظر، محیط کشت مایع برای رشد قارچ‌ها تهیه گردید. برای تهیه محیط کشت مایع مثل محیط کشت جامد عمل گردید به جزء اینکه در این مرحله از آگار استفاده نمی‌شود همانند مرحله قبل، محلول فاقد آگار را در ارلن‌های ۲۵۰ ml ریخته و به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو با دمای ۱۲۱/۱ °C قرار داده شدند. استریل کردن محیط کشت میکروارگانیسم مرحله‌ی بسیار مهمی در تهیه محیط کشت می‌باشد. مدت زمان مورد نیاز برای استریل کردن محیط‌های کشت با توجه به حجم محیط تنظیم می‌گردد که برای این حجم از محیط کشت مدت زمان ۲۰ دقیقه کافی می‌باشد. بعد از خنک شدن محلول‌ها، در کنار شعله و تحت شرایط استریل و با استفاده از یک اسپاتول استریل شده، مربع‌هایی به ابعاد ۱/۵×۱/۵ سانتیمتر از قارچ‌های کشت داده شده در پلیت‌های حاوی محیط کشت جامد برداشته شد و به ارلن‌های حاوی ۱۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع^۱ استریل شده منتقل گردید. به هر ارلن یک تکه‌ی مربعی از قارچ‌های کشت داده شده در محیط جامد با ابعاد ذکر شده در بالا اضافه شد. در ارلن‌های حاوی گونه‌های قارچی در محیط کشت مایع را با فویل آلومینیومی پوشانده و در شیکر انکوباتور در دمای ۲۶ درجه سلسیوس و با دور ۱۲۰ rpm انکوبه شدند. بعد از مدت زمان ۴۸ ساعت، قارچ‌ها به شکل کلونی رشد نمودند و در مرحله‌ی بعدی سوبستراها در غلظت مناسبی تهیه و به این محیط‌های کشت اضافه شدند [۱۷، ۲۲].

انجام واکنش‌های زیست تبدیل با استفاده سلول‌های قارچی رشد یافته

برای این منظور به میزان ۱۰۰ میلی گرم از هر ماده اولیه برداشته و در ۲ میلی لیتر اتانول مطلق حل گردید. سپس از محلول مواد اولیه به آرامی و به صورت قطره قطره به محیط‌های کشت مایع اضافه گردید و ارلن‌ها مجدداً روی شیکر قرار داده شدند. دقت شود که غلظت‌های بالاتر سوبسترا، طولانی‌تر شدن زمان واکنش و بهره‌ی پایین‌تر فرآورده‌ها را به دنبال دارد. به منظور اطمینان از اینکه میکروارگانیسم‌ها، عامل انجام واکنش‌های زیست تبدیل صورت گرفته بر روی سوبسترا می‌باشند آزمون شاهد انجام گرفت. بدین صورت که، محلول تهیه شده از سوبسترا

(۱) Nutrient Broth



شکل ۱- زیست تبدیل هیدروکورتیزون با دو گونه‌ی قارچی *C. muscae* و *C. fuckelii*

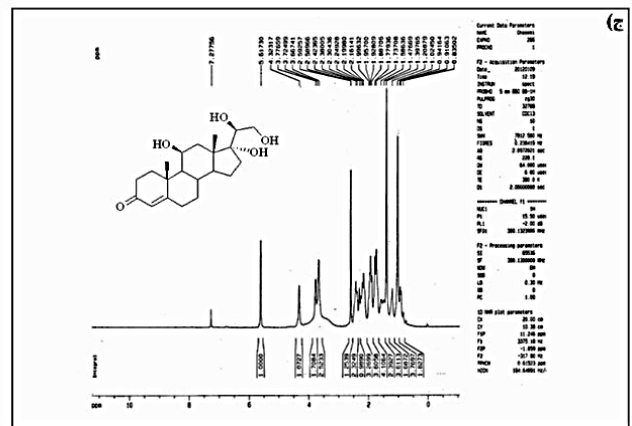
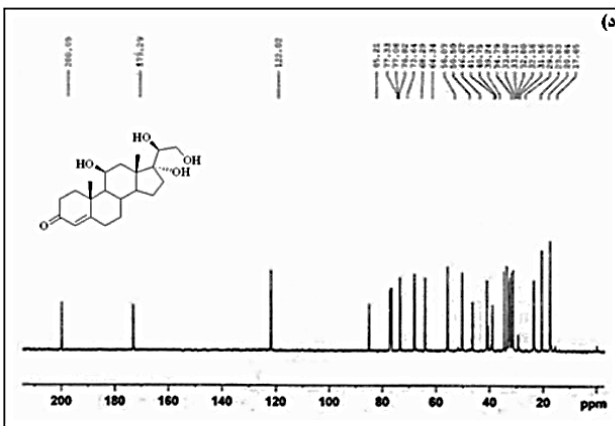
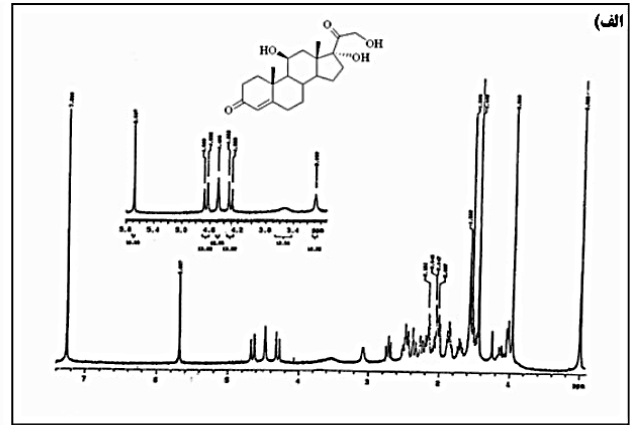
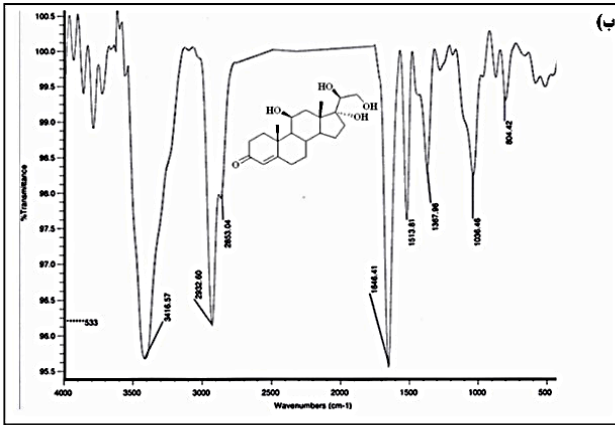
نتیجه‌ها و بحث

نتایج حاصل از زیست تبدیل هیدروکورتیزون (۱)

بهترین زمان خاتمه‌ی واکنش و استخراج محصولات حاصل از زیست تبدیل هیدروکورتیزون با استفاده از دو گونه‌ی قارچی *C. muscae* و *C. fuckelii* ده روز برآورد گردید. زیست تبدیل هیدروکورتیزون (۱) با هر دو گونه‌ی قارچی منجر به کاهش گروه کربونیل شماره ۲۰ و تولید مشتق ۲۱- β - 17α - 11β -تترا هیدروکسی پرگن-۴-ان-۳-ان (۳) در بازده‌های متفاوت گردید (شکل ۱). قطبیت فرآورده نسبت به ماده‌ی اولیه به مراتب بیشتر بود در نتیجه با نسبت ۱:۱ اتیل استات/n-هگزان، به شکل کریستال‌های سوزنی و با بهره ۴۶٪ برای *C. fuckelii* و بهره ۳۰٪ برای قارچ *C. muscae* جداسازی گردید. در محلول کنترل که هیدروکورتیزون به محیط کشت بدون گونه‌ی قارچی اضافه گردید، هیچگونه زیست تبدیلی صورت نگرفت. که تأیید می‌نمود که محیط کشت به تنهایی عامل زیست تبدیل نمی‌باشد. در طیف مادون قرمز این ترکیب نوار جذبی مربوط به گروه کربونیل شماره ۳ که در رزونانس با پیوند دوگانه می‌باشد در 1646 cm^{-1} و نوار جذبی مربوط به گروه هیدروکسیل در 3416 cm^{-1} مشاهده گردید. همچنین حضور نوارهای جذبی در فرکانس‌های 2853 cm^{-1} و 2932 cm^{-1} تأیید کننده‌ی گروه‌های CH آلیفاتیک در ساختار است (شکل ۲، طیف (ب)). با مقایسه طیف پروتون فرآورده‌ی میکروبی با طیف هیدروکورتیزون و بررسی جابه‌جایی شیمیایی پروتون‌ها مشاهده شد که علاوه بر پیام چند تایی با سطح زیر منحنی سه در ناحیه‌ی ۳/۶۷-۳/۷۸ ppm، یک پیام یکتایی پهن در ۴/۳۲ وجود دارد که نشان دهنده‌ی افزایش یک هیدروژن ناپوشیده‌ی متصل به کربن هیدروکسیل دار نسبت به ماده اولیه است. علاوه بر این در مقایسه با ماده اولیه، پروتون‌های متصل به کربن ۲۱ به میدان بالاتری انتقال یافتند که تأییدی بر این ادعاست که گروه کربونیل کاهش یافته و اثر آئیزوتروپی آن بر هیدروژن‌های ۲۱ حذف شده است. پیام ظاهر شده در ناحیه‌ی ۵/۶۱ ppm مربوط به پروتون اولفینی می‌باشد. بعلاوه دو پیک مربوط به دو گروه متیل ۱۸ و ۱۹ به ترتیب در ۱/۰۲ و ۱/۴۰ ظاهر شدند (شکل ۲، طیف (ج)). در طیف کربن فرآورده، (شکل ۲، طیف (د))،

نیز پیام مربوط به گروه کربونیل شماره ۲۰ که در ماده اولیه وجود دارد مشاهده نگردید و به جای آن پیام جدیدی در ناحیه‌ی ۷۳/۴ ppm ظاهر شد که دال بر کاهش این گروه کربونیل می‌باشد. در مقایسه با ماده اولیه، برای سایر پیام‌ها تغییر چندانی در طیف فرآورده‌ی بدست آمده مشاهده نشد. استرئوشیمی کربن کاهش یافته ۲۰ در محصول با اندازه‌گیری نقطه ذوب آن مشخص گردید به این ترتیب که ترکیب دارای گروه هیدروکسی با موقعیت α بر روی کربن شماره ۲۰ دارای نقطه ذوب $253-257\text{ }^\circ\text{C}$ می‌باشد این در حالی است که در منابع علمی برای ترکیب با گروه هیدروکسی در موقعیت β دمای ذوب $135-133\text{ }^\circ\text{C}$ گزارش شده است [۲۲، ۲۶]. اندازه‌گیری چرخش ویژه‌ی ترکیب در متانول به میزان $+90^\circ$ و مقایسه‌ی آن با آنچه که در منابع علمی گزارش شده است خود تأییدی بر ساختار نهایی محصول می‌باشد [۲۷]. مهمترین داده‌های طیفی پروتون و کربن هیدروکورتیزون و فرآورده‌ی میکروبی حاصل از آن به ترتیب در جدول‌های ۱ و ۲ قابل مشاهده می‌باشند.

یکی از هورمون‌های استروئیدی متعلق به گروه داروئی کورتیکواستروئیدها، هیدروکورتیزون می‌باشد. این ترکیب در درمان نارسایی‌های غدد فوق کلیوی و همین‌طور بیماری‌های التهابی روده، هموروئید و واکنش‌های حساسیتی نظیر کهیر، آنافیلاکتیک و ادم مغزی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲۸]. بررسی تبدیلات زیستی بر روی این هورمون با استفاده از سلول‌های کامل به منظور تولید مشتقات جدید با خواص داروئی ارزنده از دیر باز مورد توجه بوده است [۲۷، ۲۹]. یکی از فرآورده‌های حاصل از زیست تبدیل هیدروکورتیزون که در صنعت داروهای استروئیدی اهمیت بسزائی دارد، پردنیزولون می‌باشد که در نتیجه حذف هیدروژن از موقعیت ۱ و ۲ هیدروکورتیزون تولید می‌گردد و به مکمل‌های سدیم و پتاسیم که همراه با هیدروکورتیزون باید مصرف شوند نیازی نیست. بعلاوه این تبدیل باعث می‌شود که از عارضه مربوط به احتساب آب و نمک نیز کاسته شود [۳۰]. علاوه بر تشکیل پیوند دوگانه در موقعیت C_1-C_2 ، از جمله تغییرات دیگری که در نتیجه زیست تبدیل این ترکیب با میکروارگانیسم‌های گوناگون



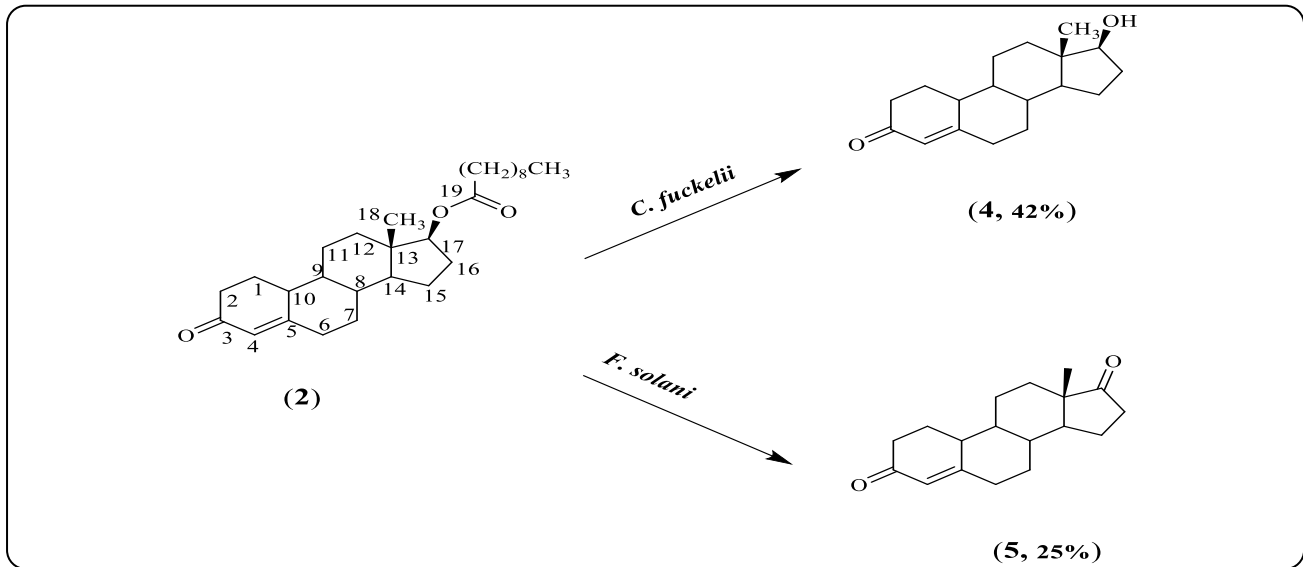
شکل ۲- طیف‌های (الف) پروتون هیدروکورتیزون، (ب) IR، (ج) پروتون و (د) کربن مشتق ۲۱-β-۲۰-۱۷α-۱۱-تترا هیدروکسی پرگن-۴-ان-۳-ان

جدول ۱- مهم‌ترین داده‌های ¹H NMR هیدروکورتیزون (۱) و ترکیب شماره ۳

ترکیب	H-۴	H-۲۱	H-۱۱	H-۱۹	H-۱۸	H-۲۰
۱	۵/۵۸	H _α ۴/۳۰, d, (J= ۱۴Hz) H _β ۴/۶۷, d, (J= ۱۴Hz)	۴/۴۴	۱/۴	۰/۹۸	-
۳	۵/۶۲	۳/۷۵	۴/۳۲ (brs)	۱/۴۰	۱/۰۲	۳/۷۸

جدول ۲- داده‌های ¹³C NMR هیدروکورتیزون (۱) و ترکیب شماره ۳

شماره اتم	۱	۳	شماره اتم	۱	۳
۱	۳۴/۰	۳۳/۸	۱۲	۳۹/۰	۳۹/۲
۲	۳۳/۴	۳۳/۱	۱۳	۴۶/۲	۴۶/۷
۳	۱۹۷/۷	۲۰۰/۰	۱۴	۵۱/۵	۵۰/۵
۴	۱۲۱/۴	۱۲۲/۰	۱۵	۲۳/۳	۲۳/۸
۵	۱۷۲/۰	۱۷۳/۳	۱۶	۳۲/۹	۳۲/۸
۶	۳۲/۷	۳۲/۲	۱۷	۸۸/۳	۸۵/۲
۷	۳۱/۳	۳۱/۶	۱۸	۱۶/۸	۱۷/۶
۸	۳۱/۱	۲۹/۶	۱۹	۲۰/۴	۲۰/۸
۹	۵۵/۵	۵۶/۰	۲۰	۲۱۲/۴	۷۳/۶
۱۰	۳۸/۸	۴۱/۳	۲۱	۶۵/۸	۶۴/۳
۱۱	۶۶/۴	۶۸/۳			



شکل ۳- زیست تبدیل ناندرولون دکانونات با سویه‌های قارچی *F. solani* و *C. fuckelii*

که مربوط به تنها هیدروژن اولفینی ساختار است این پیام در محصول نیز مشاهده گردید که بیانگر عدم تغییر در این ناحیه می‌باشد (شکل ۴، طیف (ب)). در مقایسه با طیف کربن ماده‌ی اولیه، تعداد پیک‌های کربن فرآورده‌ی بدست آمده کاهش پیدا کرد به‌علاوه در محدوده‌ی ۱۸۰-۲۲۰ ppm تنها یک پیک مشاهده گردید که مربوط به گروه کربونیل شماره ۳ می‌باشد و پیام مربوط به کربن ۱۹ در آن مشاهده نگردید که این بیانگر هیدرولیز زنجیر جانبی در محصول می‌باشد (شکل ۴، طیف (د)). مهمترین داده‌های طیفی پروتون و کربن ماده‌ی اولیه و محصول بدست آمده از آن به ترتیب در جدول‌های ۳ و ۴ آورده شده است. با مقایسه داده‌های طیفی محصول بدست آمده با آنچه که در منابع آمده است، ساختار نهائی محصول تایید گردید [۳۲، ۳۳].

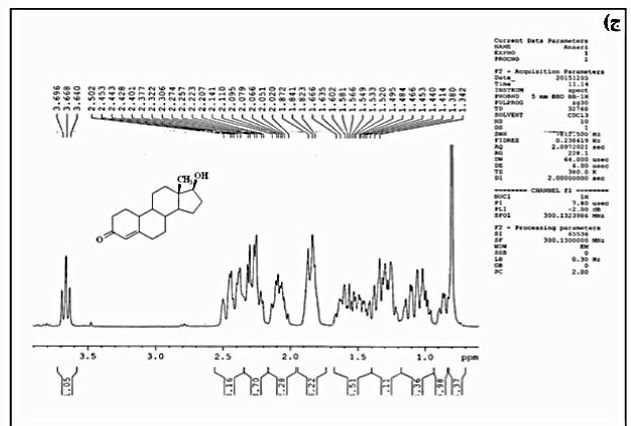
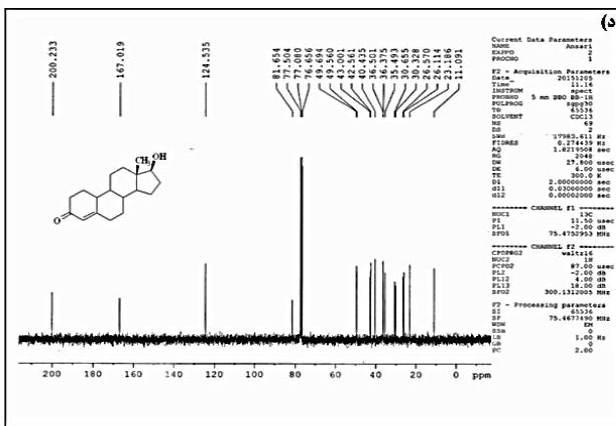
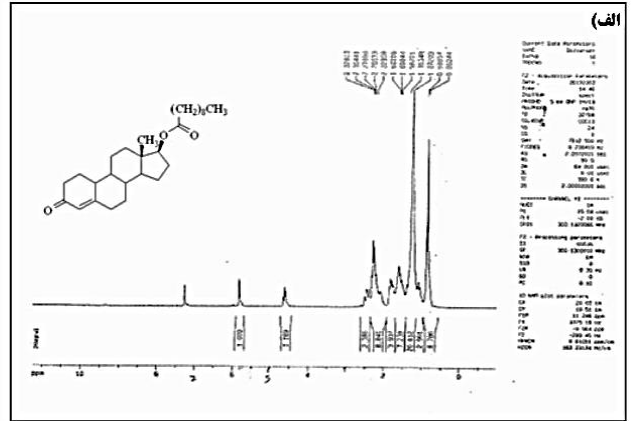
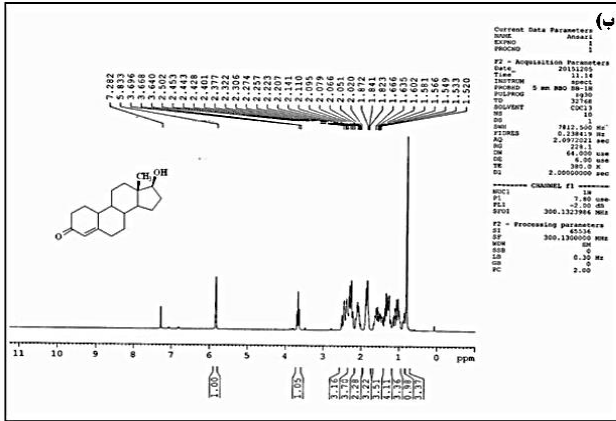
در بررسی طیف پروتون فرآورده‌ی میکروبی حاصل از زیست تبدیل ناندرولون دکانونات (۲) با *F. solani* مشاهده شد که پیام سه تایی مربوط به $H-17$ که در ماده اولیه در ناحیه‌ی ۴/۵ ppm ظاهر می‌شود، حذف شده است (شکل ۵، طیف (ب)). به‌علاوه در طیف ^{13}C NMR آن نیز مشخص گردید که تعداد پیک‌ها کاهش یافته و پیک مربوط به کربن ۱۷ که در ماده‌ی اولیه در ناحیه‌ی ۸۲/۱ ppm ظاهر می‌شود حذف شده است که با ظهور یک پیک جدید در ۲۲۰/۳ ppm می‌توان اثبات نمود که به دنبال هیدرولیز گروه استری و حذف زنجیره‌ی جانبی در ماده اولیه، عامل الکلی شماره ۱۷ به گروه کتونی اکسید و محصول استر-۴-، $17:3$ - دی آن (۵) تولید شده است (شکل ۵، طیف (د)). مشاهده‌ی دو پیک شاخص کربونیلی در طیف FT-IR این ترکیب واقع در 1670 cm^{-1} و 1742 cm^{-1} شاهده‌ی بر این ادعاست که به ترتیب به دو گروهونیلی شماره ۳ و ۱۷ اختصاص دارند.

ایجاد شده و منجر به تولید فرآورده‌های با خواص دارویی شده عبارتند از: احیای C_{20} هیدروکسیل زدایی C_{21} استیله کردن گروه هیدروکسیل در موقعیت کربن C_{21} و شکست زنجیره‌ی جانبی [۲۲، ۲۷، ۲۹، ۳۱].

نتایج حاصل از زیست تبدیل ناندرولون دکانونات (۲)

جداسازی و خالص سازی محصولات حاصل از زیست تبدیل ناندرولون دکانونات (۲) با قارچ‌های *F. solani* و *C. fuckelii* در روز دوازدهم که بازده واکنش به بیشترین مقدار خود رسید انجام گردید. از خالص سازی مخلوط واکنش حاصل از زیست تبدیل با *C. fuckelii* ترکیب 17β -هیدروکسی استر-۴-، 3 -، $17:3$ - دی آن (۴) به‌عنوان تنها محصول با بازدهی ۴۲٪ بدست آمد. این در حالی است که از زیست تبدیل استروئید ذکر شده با *F. solani* استر-۴-، 3 -، $17:3$ - دی آن (۵) با بازدهی ۲۵٪ حاصل شد غیر از این فرآورده، ترکیبات دیگری با درصد جزئی نیز تولید شدند که به دلیل غلظت بسیار پایین آن‌ها، قابل شناسایی به وسیله روش‌های طیف‌سنجی نبودند (شکل ۳). شایان ذکر است که در زیست تبدیل ناندرولون دکانونات با *C. muscae* روند پیشرفت واکنش قابل توجه نبود و بدلیل بازده بسیار پایین زیست تبدیل هیچ فرآورده‌ی میکروبی شناسائی نگردید.

در طیف 1H NMR ناندرولون دکانونات (۲) یک پیام سه تایی در ناحیه‌ی ۴/۵ ppm مشاهده می‌شود که ناشی از شکافتگی $H-17$ با هیدروژن‌های متیلنی ۱۶ می‌باشد، اما در در طیف پروتون فرآورده‌ی بدست آمده (۴)، این پیک به میدان بالاتر (۳/۷ ppm) انتقال یافته است که مؤید هیدرولیز ناندرولون دکانونات و حذف اثر آنیزوتروپی گروه کربونیل می‌باشد. به‌علاوه در طیف پروتون ماده‌ی اولیه یک پیام یکتایی در ناحیه‌ی ۶ ppm را می‌توان مشاهده نمود



شکل ۴- طیف‌های الف) پروتون ناندرولون دکانوات، ب) پروتون، ج) پروتون گسترده و د) کربن مشتق ۱۷β-هیدروکسی استر-۴-ان-۳-اون

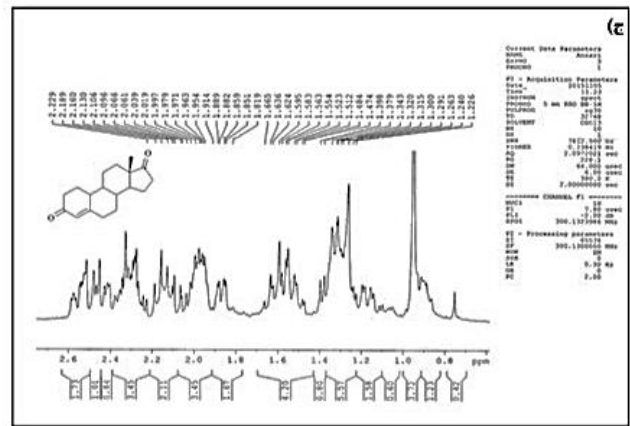
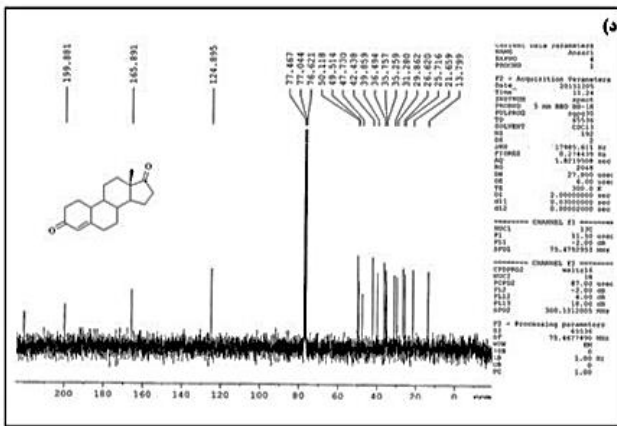
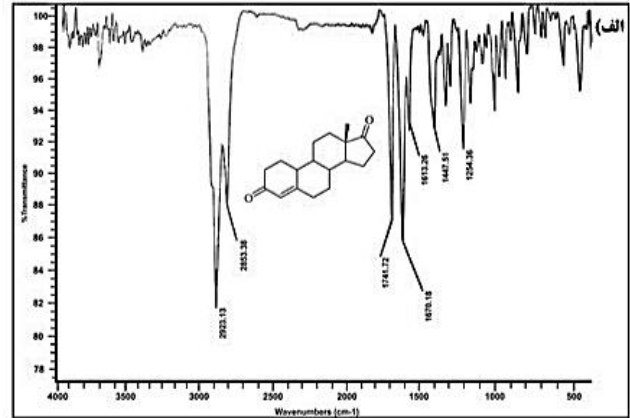
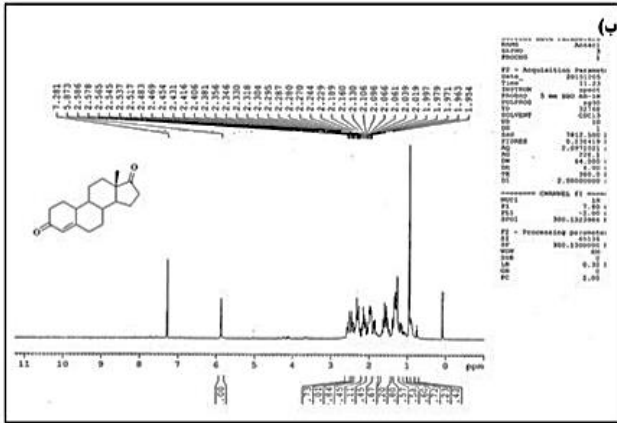
جدول ۴-مهم‌ترین داده‌های ¹³C NMR ناندرولون دکانوات (۲) و فرآورده‌های میکروبی (۴) و (۵) حاصل از آن

شماره اتم	ترکیب		
	۲	۴	۵
۱	۲۷/۴	۲۶/۱	۲۵/۷
۲	۳۶/۴	۳۶/۳	۳۶/۵
۳	۱۹۹/۷	۲۰۰/۲	۱۹۹/۹
۴	۱۲۴/۵	۱۲۴/۵	۱۲۴/۹
۵	۱۶۶/۲	۱۶۷/۰	۱۶۵/۹
۶	۳۵/۳	۳۵/۵	۳۵/۳
۷	۳۱/۷	۳۰/۷	۳۱/۳
۸	۴۰/۱	۴۰/۴	۳۹/۹
۹	۴۹/۴	۴۹/۷	۴۹/۵
۱۰	۴۲/۴	۴۲/۶	۴۲/۴
۱۱	۲۶/۵	۲۶/۶	۲۶/۶
۱۲	۳۶/۵	۳۶/۵	۲۹/۹
۱۳	۴۲/۶	۴۳/۰	۴۷/۷
۱۴	۴۹/۳	۴۹/۶	۵۰/۱
۱۵	۲۳/۲	۲۳/۲	۲۱/۷
۱۶	۳۰/۵	۳۰/۳	۳۵/۸
۱۷	۸۱/۱	۸۱/۶	۲۲۰/۴
۱۸	۱۲/۰	۱۱/۱	۱۲/۸

جدول ۳-مهم‌ترین داده‌های ¹H NMR ناندرولون دکانوات (۲) و فرآورده‌های میکروبی (۴) و (۵) حاصل از آن

ترکیب	H-۴	H-۱۷	H-۱۸
۲	۵/۹	۴/۵, t (J=۸/۴ Hz)	۰/۸
۴	۵/۸۳	۳/۷, t, (J=۸/۴ Hz)	۰/۸۲
۵	۵/۸۷	-	۰/۹۳

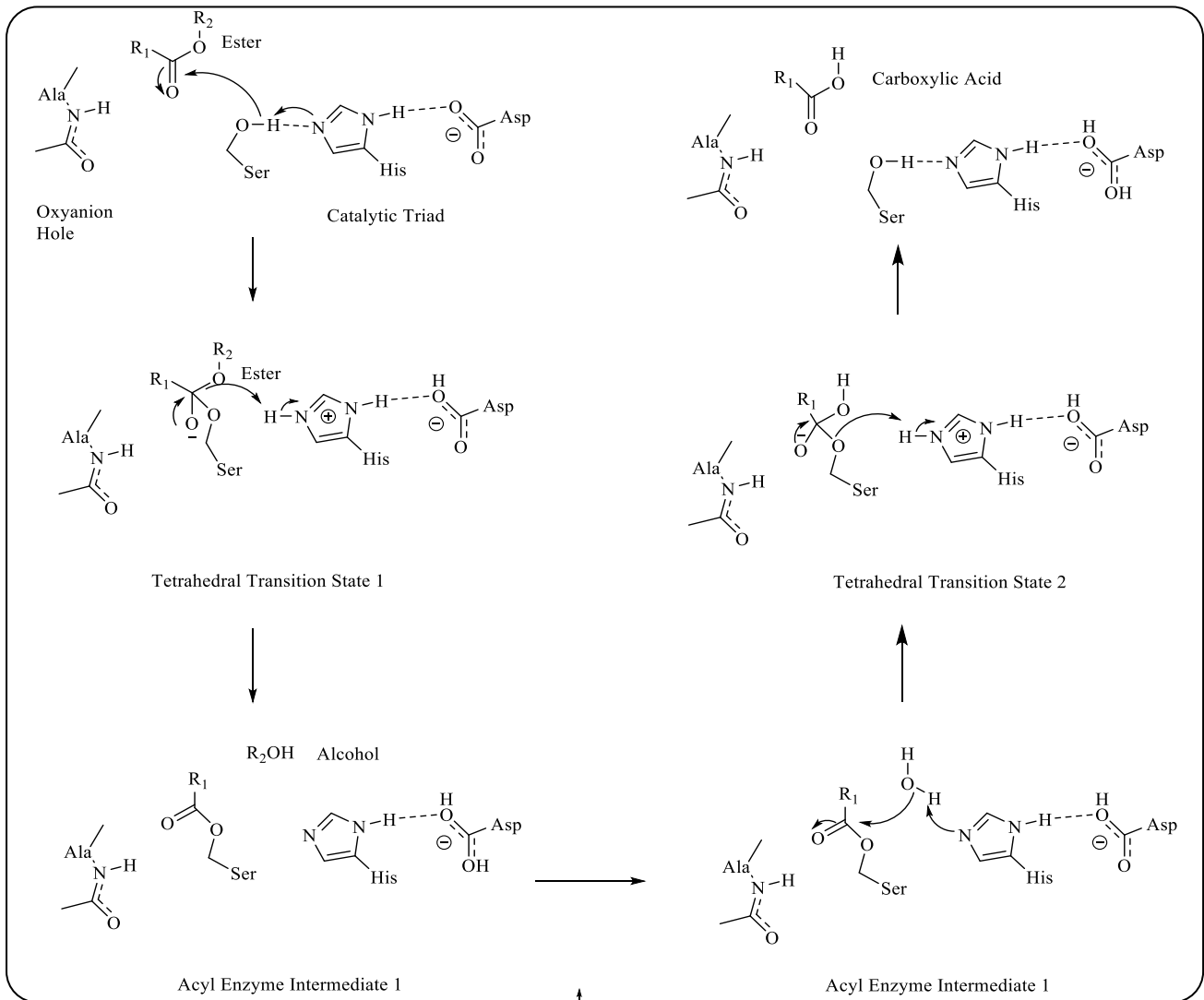
همان‌طور که در ساختار نیز مشاهده می‌گردد گروه کربونیل شماره ۳ در رزونانس با پیوند دوگانه می‌باشد. همچنین برای این ماده‌ی جامد سفید رنگ، نقطه‌ی ذوب °C ۱۶۸-۱۷۱ و چرخش نوری ۱۳۸ درجه در متانول ثبت گردید که با آنچه در مراجع ذکر گردیده است همخوانی دارد [۳۳]. مهم‌ترین داده‌های طیفی حاصل از ¹H NMR و ¹³C NMR ماده‌ی اولیه و فرآورده‌های ۴ و ۵ حاصل از زیست تبدیل آن به ترتیب در جدول‌های ۳ و ۴ آمده است.



شکل ۵- طیف‌های IR (الف)، پروتون، (ب) پروتون، (ج) پروتون گسترده و (د) کربن استر-۴-ان-۱۷،۳-دی‌ان

چهار مشتق با ارزش داروئی تولید گردید [۳۳]. در این پژوهش نیز دو مشتق ۴ و ۵ به‌عنوان فرآورده‌های اصلی در بازده‌های به ترتیب ۱۶٪/۶ و ۲۰٪/۴ تولید شدند. دو مشتق دیگر در نتیجه‌ی هیدروکسیلاسیون این دو ترکیب در موقعیت کربن ۱۵ و در بازده‌ی بسیار پایین تولید شدند. در پژوهشی دیگر توسط همین گروه، از *Neurospora crassa* برای تهیه‌ی مشتقات دیگری از ناندرولون دکانوات استفاده شد [۳۲]. این گونه‌ی قارچی که به کپک قرمز رنگ نان معروف است باعث هیدورلیز ناندرولون دکانوات و تولید مشتق ۴، یعنی ۱۷β-هیدروکسی استر-۴-ان-۳-اون در بازده‌ی ۲۲/۳٪ گردید. در این زیست تبدیل نیز فرآورده‌ی ۵، اما در بازده‌ی بسیار پایین (کمتر از ۲٪) تولید شد. دو مشتق دیگر حاصل از این زیست تبدیل نتیجه هیدروکسیلاسیون فرآورده‌ی ۵ در موقعیت‌های ۶ و ۹ می‌باشند. بازده‌ی این دو محصول نیز بسیار پایین و حدود ۵٪ گزارش شده است. این در حالی است که در پژوهش حاضر دو فرآورده‌ی ۴ و ۵ بصورت تک محصول در نتیجه زیست تبدیل ناندرولون دکانوات با دو گونه‌ی قارچی به ترتیب *C. fuckelii* و *F. solani* به دست آمدند.

ناندرولون از دسته‌ی استروئیدهای آنابولیک است دارای فعالیت آندروژنیک است و در درمان اضطراب و اختلال حافظه مورد استفاده قرار می‌گیرد. این ترکیب از عمده داروهایی است که از محبوبیت بسیاری در بین ورزشکاران و بدنسازان برخوردار است. به‌علاوه این دارو در درمان پوکی استخوان، سرطان سینه، تجدید ساختمان بافت‌ها پس از بیماری‌های مزمن، درمان ضایعات عروقی پیشرفته، کم‌خونی‌های همراه با از بین رفتن و یا کم شدن مغز استخوان و ... مورد استفاده قرار می‌گیرد. ناندرولون به صورت مشتقات استری دکانوات (دکا-دورابولین) و استر فنیل پروپیونات (دورابولین) به بازار عرضه می‌شود. بنابراین مشتقات حاصل از آن نیز از اهمیت فراوانی برخوردار می‌باشند. علیرغم محبوبیت بالای این ترکیب و فرآورده‌های حاصل از آن در بین ورزشکاران و بدنسازان مطالعات محدودی در زمینه‌ی زیست تبدیل و شناسایی فرآورده‌های میکروبی حاصل از آن صورت گرفته است [۳۴]. در پژوهشی که در سال ۲۰۰۶ توسط یزدی و همکاران بر روی زیست تبدیل نادرولون دکانوات با استفاده از گونه‌ی قارچی *Acremonium strictum* انجام گردید. در نتیجه‌ی واکنش‌هایی نظیر هیدورلیز بخش استری، اکسایش و هیدروکسیلاسیون



شکل ۶- مکانیزم هیدرولیز آنزیماتیک ترکیبات استری

که نزدیک به گروه هیدروکسیل سرین می‌باشند با تشکیل پیوند هیدروژنی باعث پایدار شدن یک حالت گذار چهاروجهی می‌گردند. در مرحله‌ی بعدی گروه الکی استر به کمک هیستیدین آزاد شده و حدواسط آسیل-آنزیم تولید می‌شود (در هیدرولیز استری ناندرولون دکانونات، بخش الکی سوپسترا همان فرآورده‌ی ۴ می‌باشد). به دنبال آن هیستیدین باز با جدا کردن یک اتم هیدروژن از مولکول آب، باعث تولید آنیون هیدروکسید برای حمله هسته دوستی به حدواسط آسیل-آنزیم می‌گردد که در ادامه با مکانیزم مشابهی گروه سرینی خارج و اسید تولید می‌شود (شکل ۶) [۳۵، ۳۶]. در اکثر زیست تبدیل‌های انجام شده بر روی ناندرولون دکانونات، گروه الکی فرآورده‌ی ۴ متحمل اکسایش شده و به ترکیب ۵ تبدیل می‌گردد. این واکنش نیز

مکانیزم احتمالی پیشنهاد شده برای هیدرولیز آنزیماتیک بخش استری ناندرولون دکانونات و تبدیل آن به فرآورده‌ی میکروبی ۴ حین زیست تبدیل آن توسط کاتالیزوهای زیستی بدین گونه است که ابتدا سوپسترا در سایت فعال آنزیم‌های دسته‌ی هیدرولاز قرار می‌گیرد. سپس، سه‌گانه‌ی ۱ کاتالستی سرین ۲-هیستیدین ۳-گلوتامیک اسید ۴ (Ser-His-Glu (Asp)) که با پیوند هیدروژنی کنار هم قرار گرفته‌اند واکنش هیدرولیز بخش استر سوپسترا را کاتالیز می‌کنند. بدین ترتیب که ابتدا هیستیدین توسط گلوتامیک اسید (آسپارتیک اسید) قطبیده شده و اتم هیدروژن سرین را از آن جدا می‌کند. این عمل باعث افزایش قدرت هسته دوستی (نوکلئوفیلی) اتم اکسیژن سرین برای حمله به کربن گروه کربونیل استری می‌گردد. اتم‌های هیدروژن حفره‌ی اکسی آنیونی

(۱) Triad
(۳) Histidine

(۲) Serine
(۴) Glutamic acid

مورد توجه می‌باشد. در پژوهش حاضر، برای اولین بار توانائی سه سویه‌ی قارچی *C. muscae*، *C. fuckelii* و *F. solani* جهت زیست تبدیل هیدروکورتیزون و ناندرولون دکانونات مورد بررسی قرار گرفته است. از زیست تبدیل هیدروکورتیزون با دو گونه‌ی قارچی *C. muscae* و *C. fuckelii*، مشتق ۲۱- β -۲۰- α -۱۷- β -تترا هیدروکسی پرگن-۴-ان-۳-ان (۳) به‌عنوان تنها محصول واکنش تولید و با استفاده از روش‌های طیف سنجی تعیین ساختار گردید. گونه‌ی قارچی *C. fuckelii* منجر به هیدرولیز گروه استری ترکیب استروئیدی ناندرولون دکانونات و تولید فرآورده‌ی میکروبی ۱۷ β -هیدروکسی-۴-ان-۳-ان (۴) در بازه ۴۳٪ شد. این در حالی است که در زیست تبدیل همین ترکیب با گونه‌ی قارچی *F. solani*، هیدرولیز گره استری و به دنبال آن اکسایش گروه هیدروکسی در موقعیت کرین شماره ۱۷ منجر به تولید استر-۴-ان-۱۷ α -دی‌اون (۵) به‌عنوان تنها محصول واکنش گردید. این فرآورده حدواسطی کلیدی در تهیه بسیاری از داروهای استروئیدی می‌باشد. مطالعه و معرفی میکروارگانسیم‌های جدید و ارزان قیمت به‌عنوان زیست کاتالست‌های کارآمد و دوستدار محیط زیست جهت انجام واکنش‌های اکسید، احیا، هیدرولیز و ... بر روی ترکیبات حجیم استروئیدی با خواص داروئی، موضوعی جذاب جهت تحقق شیمی سبز می‌باشد.

قدردانی

با تشکر از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید بهشتی که حمایت مالی پروژه را عهده دار بودند.

معمولاً توسط دهیدروژنازها که جزو آنزیم‌های دسته‌ی اکسید و ردوکتاز می‌باشند کاتالیز می‌گردد. واکنش‌های اکسیداسیون-احیاء انجام شده توسط این آنزیم‌ها در نتیجه‌ی انتقال دواکی والان عامل کاهنده (الکترون و متعاقب آن جذب پروتون یا مولکول هیدروژن) از یک سوبسترا به دیگری صورت می‌گیرد. فعالیت این آنزیم‌ها به کوفاکتورهای اکسایش-کاهش^۱ (FAD, NADP, NAD) وابسته می‌باشد. بنابراین زمانی که از این آنزیم‌ها به شکل خالص استفاده می‌شوند بازیافت و تامین کوفاکتور یکی از عوامل مهم در طراحی واکنش می‌باشد. برای غلبه بر این مشکل اغلب از سیستم‌های سلول کامل استفاده می‌شود که به بازیافت کوفاکتور نیازی ندارند [۳۷]. به‌طور کلی آنزیم‌ها کاتالیزورهای بسیار کارآمدی هستند. اغلب باعث تسریع واکنش‌ها با فاکتور ۱۰^۸-۱۰^{۱۰} می‌شوند. این افزایش سرعت حتی ممکن است به ۱۰^{۱۲} برابر نیز برسد که خیلی بالاتر از افزایش سرعتی است که با استفاده از یک کاتالست شیمیایی می‌تواند حاصل شود. برخلاف کاتالست‌های شیمیایی، آنزیم‌ها برای محیط زیست بی‌خطر و تجزیه پذیر می‌باشند. اکثر زیست کاتالست‌ها واکنش‌های شیمیایی را در تعداد مراحل کمتر و در شرایط ملایم و نزدیک به شرایط محیط یعنی دما، pH و محیط آبی انجام می‌دهند و به همین دلیل در واکنش‌های کاتالیز شده با آن‌ها نسبت به کاتالست‌های شیمیایی، واکنش‌های جانبی چون تجزیه، ایزومریزه شدن، راسمیزه شدن و نوآرایی کمتر رخ می‌دهد. در نهایت گزینش پذیری که شامل مکان‌گزینی، شیمی‌گزینی، دیاستریو گزینی و انانتیو گزینی می‌باشد، زیست کاتالست‌ها را بر کاتالست‌های شیمیایی برتری می‌بخشد [۳۸، ۳۹].

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی امروزه زیست تبدیل ترکیبات استروئیدی با استفاده از کاتالست‌های زیستی و به‌ویژه سلول‌های کامل قارچی به‌منظور ایجاد دستیابی به ترکیبات با خواص دارویی و زیستی بالاتر بسیار

منابع

- [1] Garzón-Posse F., Becerra-Figueroa L., Hernández-Arias J., Gamba-Sánchez D., [Whole Cells as Biocatalysts in Organic Transformations](#), *Molecules*, **23(6)**: 1265 (2018).
- [2] Kozłowska E., Hoc N., Sycz J., Urbaniak M., Dymarska M., Grzeszczuk J., Kostrzewa-Susłowa E., Stępień Ł., Płaskowska E., Janeczko T., [Biotransformation of Steroids by Entomopathogenic Strains of *Isaria farinosa*](#), *Microb. cell fact.*, **17(1)**: 71 (2018).

(۱) Redox

- [3] Bezborodov A.M., Zagustina N.A., [Enzymatic Biocatalysis in Chemical Synthesis of Pharmaceuticals](#), *Appl. Biochem. Microbiol.*, **52**: 237–249 (2016).
- [4] Ward T.R., Köhler V., [Editorial overview: Biocatalysis and Biotransformation: Bio-Inspired, Bio-Based and Bio-Linked Catalysis](#), *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **25**: 5–6 (2015).
- [5] Chen H., Simoska O., Lim K., Grattieri M., Yuan M., Dong F., Lee Y.S., Beaver K., Weliwatte S., Gaffney E.M., Minter S.D., [Fundamentals, Applications, and Future Directions of Bioelectrocatalysis](#), *Chem. Rev.*, **120(23)**: 12903–12993 (2020).
- [6] de Carvalho C.C.C.R., [Enzymatic and Whole Cell Catalysis: Finding New Strategies for Old Processes](#), *Biotechnol. Adv.*, **29(1)**: 75–83 (2011).
- [7] Staebler A., Cruz A., van der Goot W., Pinheiro H.M., Cabral J.M.S., Fernandes P., [Optimization of Androstenedione Production in an Organic–Aqueous Two-Liquid Phase System](#). *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **29**: 19–23 (2004).
- [8] Ghasemi S., Habibi Z., Mohajeri M., [Biotransformation of Two Furanocoumarins by Fungal Species *Aspergillus sp.* PTCC 5266 and *Aspergillus niger* PTCC 5010](#), *Nat. Prod. Res.*, **33(6)**: 835–842 (2019).
- [9] Zhao M., Li X., Xiong L., Liu K., Liu Y., Xue Z., Han R., [Green Manufacturing of Steroids via *Mycobacteria*: Current Status and Development Trends](#), *Ferment.* **9(10)**: 890 (2023).
- [10] Costa S., Zappaterra F., Summa D., Semeraro B., Fantin G., [\$\Delta\$ 1-Dehydrogenation and C₂₀ Reduction of Cortisone and Hydrocortisone Catalyzed by *Rhodococcus* Strains](#), *Molecules*, **25(9)**: 2192 (2020).
- [11] Basso A.V., Nicotra V.E., Parra A.s., Mart[~]Áñez A., Fernandez-Vivas A., [Biotransformation of Salpichrolides A, C, and G by Three Filamentous Fungi](#), *J. Nat. Prod.*, **79**: 1658–1667 (2016).
- [12] El Menoufy H.A., Elkhateeb W.A., Daba G.M., “[Biotransformation of Steroids: History, Current Status, and Future Prospects](#). In *Fungi Bioactive Metabolites: Integration of Pharmaceutical Applications*”, Deshmukh, S.K., Takahashi, J.A., Saxena S., eds., Springer Nature Singapore, Singapore, 743–762 (2024).
- [13] Abdul Karim A., Atiatul W., Aziz A., Shaikh N.N., Choudhary M.I., [Biotransformation of Metenolone Acetate and Epiandrosterone by Fungi and Evaluation of Resulting Metabolites for Aromatase Inhibition](#), *Steroids*, **202**: 109345 (2024).
- [14] Sultana N., [Microbial Biotransformation of Bioactive and Clinically Useful Steroids and Some Salient Features of Steroids and Biotransformation](#), *Steroids*, **136**: 76–92 (2018).
- [15] Zappaterra F., Costa S., Summa D., Bertolasi V., Semeraro B., Pedrini P., Buzzzi R., Vertuani S., [Biotransformation of Cortisone with *Rhodococcus rhodnii*: Synthesis of New Steroids](#), *Molecules*, **26(5)**: 1352 (2021).
- [16] Åšwizdor A., [Baeyer-Villiger Oxidation of Some C₁₉ Steroids by *Penicillium lanosocoeruleum*](#), *Molecules*, **18**: 13812–22 (2013).

- [17] Heidary M., Ghasemi S., Habibi Z., Ansari F., [Biotransformation of Androst-4-ene-3,17-dione and Nandrolone Decanoate by Genera of *Aspergillus* and *Fusarium*](#), *Biotechnol. Lett.*, **42(9)**: 1767–1775 (2020).
- [18] Ghasemi S., Heidary M., Habibi Z., [The 11 \$\alpha\$ -Hydroxylation of Medroxyprogesterone Acetate by *Absidia griseolla* var. *igachii* and *Acremonium Chrysogenum*](#), *Steroids*, **149**: 108427 (2019).
- [19] Choudhary M.I., Erum S., Atif M., Malik R., Khan N.T., Atta-ur R., [Biotransformation of \(20S\)-20-Hydroxymethylpregna-1,4-dien-3-one by Four Filamentous Fungi](#), *Steroids*, **76**: 1288–1296 (2011).
- [20] Abas H., Blencowe P., Brookfield J.L., Harwood L.A., [Selective Hydroxylation of C\(sp³\)-H Bonds in Steroids](#), *Chem. Eur. J.*, **29(44)**: e202301066 (2023).
- [21] Baydoun E., Bibi M., Iqbal M.A., Wahab A.T., Farran D., Smith C., Sattar S.A., Rahman A.U., Choudhary M.I., [Microbial Transformation of Anti-cancer Steroid Exemestane and Cytotoxicity of its Metabolites Against Cancer Cell Lines](#), *Chem. Cent. J.*, **7(1)**: 57 (2013).
- [22] Ghasemi S., Kheyraadi R., Habibi Z., [Microbial Transformation of Hydrocortisone by Two Fungal Species *Fusarium fujikuroi* PTCC 5144 and *Rhizomucor pusillus* PTCC 5134](#), *Biocatal. Biotransformation*, **32(3)**: 168–172 (2014).
- [23] Xin X., Liu J., Luan S., Zhou M., Wang W., Wu Y., Ma X., Wang C., Guo P., Li D., [Biotransformation of Norethisterone by *Rhizopus microsporus* PT2906](#), *Phytochem. Lett.* **58**: 76–80 (2023).
- [24] Javed S., Atia tul W., Jabeen A., Zhumagaliyeva S., Abilov Z.A., Attaur R., Choudhary M.I., [Fungal Mediated Biotransformation of Melengestrol Acetate, and T-Cell Proliferation Inhibitory Activity of Biotransformed Compounds](#), *Bioorg. Chem.*, **104**: 104313 (2020).
- [25] Mehmannaavaz M., Nickavar B., [Biotransformation of Testosterone by the Filamentous Fungus *Penicillium pinophilum*](#), *Arch. Microbiol.*, **204(9)**: 570 (2022).
- [26] Carvajal F., Vitale O.F., Gentles M.J., Herzog H.L., Hershberg E.B., [Microbiological Transformation of Steroids. VI. Stereospecific Reductions of the 20-Carbonyl Group](#), *J. Org. Chem.*, **24**: 695–98 (1959).
- [27] Yazdi M.T., Ghasemi Y., Ghasemian A., Shokravi S., Niknahad H., Amini M., Dehshahri A., Faramarzi M.A., [Bioconversion of Hydrocortisone by Cyanobacterium *Fischerella ambigua* PTCC 1635](#), *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **21(6)**: 811–814 (2005).
- [28] Pan H., Chang S., Qu Y., Liu M., Tian W., Chang Z., [Hydrocortisone Production using Whole-Cell Biocatalysts in Recombinant *Escherichia coli*](#), *Biochem. Eng. J.*, **198**: 109023(2023).
- [29] Ghasemi Y., Faramarzi M.A., Arjmand-Inalou M., Mohagheghzadeh A., Shokravi S., Morowvati M.H., [Side-Chain Cleavage and C-20 Ketone Reduction of Hydrocortisone by a Natural Isolate of *Chroococcus Disperses*](#), *Ann. Microbiol.*, **57**: 577–81 (2007).

- [30] Adham N.Z., El-Hady A.A., Naim N., [Biochemical Studies on the Microbial \$\Delta\$ 1-Dehydrogenation of Cortisol by *Pseudomonas Fluorescens*](#), *Process Biochem.*, **38**: 897–902 (2003).
- [31] Restaino O.F., Barbuto Ferraiuolo S., Perna A., Cammarota M., Borzacchiello M.G., Fiorentino A., Schiraldi C., [Biotechnological Transformation of Hydrocortisone into 16 \$\alpha\$ -Hydroxyprednisolone by Coupling *Arthrobacter Simplex* and *Streptomyces Roseochromogenes*](#), *Molecules*, **25**(21): 4912 (2020).
- [32] Yazdi M.T., Amani A., Faramarzi M.A., Amini M., Shafiee A., Fathabad E.G., [Nandrolone Decanoate Transformation by *Neurospora Crassa*](#), *Pharm. Biol.*, **43**(7): 630–635 (2005).
- [33] Yazdi M.T., Zanjani S.M., Faramarzi M.A., Amini M., Amani A., Abdi K., [Microbial Transformation of Nandrolone Decanoate by *Acremonium Strictum*](#), *Arch. Pharm.*, **339**(8): 473–476 (2006).
- [34] Baydoun E., Karam M., Atia-Tul W., Khan M.S.A., Ahmad M.S., Samreen, Smith, C., Abdel-Massih R., Choudhary M.I., [Microbial Transformation of Nandrolone with *Cunninghamella echinulata* and *Cunninghamella Blakesleeana* and Evaluation of Leishmaniacidal Activity of Transformed Products](#), *Steroids*, **88**: 95–100 (2014).
- [35] Lai J., Huang H., Lin M., Xu Y., Li X., Sun B., [Enzyme Catalyzes Ester Bond Synthesis and Hydrolysis: The Key Step for Sustainable Usage Of Plastics](#), *Front. Microbiol.*, **13**: 1113705 (2022).
- [36] Rauwerdink A., Lunzer M., Devamani T., Jones B., Mooney J., Zhang Z.-J., Xu J.-H., Kazlauskas R.J., Dean A.M., [Evolution of a Catalytic Mechanism](#), *Mol. Biol. Evol.*, **33**(4): 971–979 (2015).
- [37] Martínez A.T., Ruiz-Dueñas F.J., Camarero S., Serrano A., Linde D., Lund H., Vind J., Tovborg M., Herold-Majumdar O.M., Hofrichter M., Liers C., Ullrich R., Scheibner K., Sannia G., Piscitelli A., Pezzella C., Sener M.E., Kılıç S., van Berkel W.J.H., Guallar V., Lucas M.F., Zuhse R., Ludwig R., Hollmann F., Fernández-Fueyo E., Record E., Faulds C.B., Tortajada M., Winckelmann I., Rasmussen J.A, Gelo-Pujic M., Gutiérrez A., del Río J.C., Rencoret J., Alcalde M., [Oxidoreductases on Their Way to Industrial Biotransformations](#), *Biotechnol. Adv.*, **35**(6): 815–831 (2017).
- [38] Winkler C.K., Schrittwieser J.H., Kroutil W., [Power of Biocatalysis for Organic Synthesis](#), *ACS Cent. Sci.*, **7**(1): 55–71 (2021).