

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TESTOSTERONUN *CLADOSPORIUM*
SPHAEROSPERMUM VE *ULACLADIUM*
CHARTARUM İLE BİYOTRANSFORMASYONLARI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şengül YILMAZ

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Kudret YILDIRIM

Şubat 2019

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TESTOSTERONUN CLADOSPORIUM
SPHAEROSPERMUM VE ULOCLADIUM
CHARTARUM İLE BİYOTRANSFORMASYONLARI**

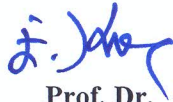
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şengül YILMAZ

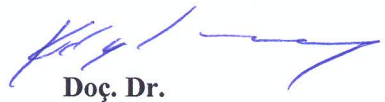
Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA

Bu tez 01 / 02 / 2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği / oyçokluğu ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr.
İsmail KIRAN
Jüri Başkanı


Prof. Dr.
Ahmet TUTAR
Üye


Doç. Dr.
Kudret YILDIRIM
Üye

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Şengül YILMAZ

01.02.2019

TEŞEKKÜR

Çalışmayı büyük bir titizlik ve sabırla yöneten, çalışma boyunca desteğini bir an bile esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden istifade ettiğim kıymetli hocam Doç. 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 Dr. Raşit Fikret YILMAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

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

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
TABLolar LİSTESİ	vii
ÖZET	viii
SUMMARY	ix
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2.	
TESTOSTERON BİLEŞİĞİNİN BAZI KÜFLER İLE BİYOTRANSFORMASYONLARI	3
2.1. Biyotransformasyonların Tarihsel Gelişimi	3
2.2. Enzimler, Avantajları ve Dezavantajları	6
2.3. Biyotransformasyon Teknikleri	10
2.3.1. Sabitlenmiş hücreler ile biyotransformasyon	11
2.3.2. Serbest ve sabitlenmiş enzimler ile biyotransformasyon ...	11
2.3.3. İzole enzimler ile biyotransformasyon	12
2.3.4. Sporlar ile biyotransformasyon	12
2.3.5. Durağan hücreler ile biyotransformasyon	12
2.3.6. Büyüyen hücreler ile biyotransformasyon	13
2.4. Mikrobiyal Biyotransformasyonlar	13
2.5. Steroidler	17
2.6. Küfler ile Steroid Biyotransformasyonlar	21

2.6.1. <i>Cladosporium sphaerospermum</i>	22
2.6.2. <i>Ulocladium chartarum</i>	22
2.7. Çalışmanın Amacı	23
BÖLÜM 3.	
MATERYAL VE METOT	24
3.1. Cihazlar, Sarf Malzemeler ve Kullanılan Yöntemler	24
3.2. Yatık Agar Besiyerlerinin Hazırlanması	25
3.3. Küf Kültürlerinin Hazırlanması	25
3.4. Küflere Ait Besiyerlerinin Hazırlanması	25
3.5. Biyotransformasyon Çalışması	26
3.6. Metabolitlerin Saflaştırılması ve Yapılarının Tayini	26
BÖLÜM 4.	
DENEYSEL BULGULAR	28
BÖLÜM 5.	
SONUÇLAR VE TARTIŞMA	35
KAYNAKLAR	44
EKLER	48
ÖZGEÇMİŞ	78

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

Δ	: Kimyasal kayma farkı
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat derece
^{13}C NMR	: Karbon 13 Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
bs	: Broad singlet (küt singlet)
cm	: Santimetre
d	: Dublet
dd	: Dubletin dubleti
DHEA	: Dehidroepiandrosteron
DMF	: Dimetilformamit
dt	: Tripletlerin dubleti
g	: Gram
^1H NMR	: Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
Hz	: Hertz
IR	: Infrared (kızılötesi) Spektroskopisi
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
J	: Etkileşme sabiti
LH	: Lüteinleştirici hormon
lit.	: Literatür
m	: Multiplet
mg	: Miligram
MHz	: Megahertz
mL	: Mililitre
PDA	: Potato dekstroz agar
pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonunun eksi logaritması
ppm	: Milyonda bir kısım
rpm	: Dakika başına dönüş sayısı

s : Singlet
t : Triplet
 δ_C : ^{13}C NMR spektrumundaki kimyasal kayma
 δ_H : ^1H NMR spektrumundaki kimyasal kayma



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	<i>R. arrhizus</i> ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu ..	5
Şekil 2.2.	Substrata bir O atomunun ilave edilmesinin mekanizması	16
Şekil 2.3.	Oksidant ve substrat arasındaki radikalleri içeren mekanizma	17
Şekil 2.4.	Genel steroid yapısı	18
Şekil 2.5.	Kolesterol	19
Şekil 2.6.	Testosteron (4) ve DHT (5) bileşiklerinin biyosentezi	19
Şekil 2.7.	Testosteron (4) bileşiğinin bazı metabolitleri	21
Şekil 2.8.	Dihidrotestosteron (5) bileşiğinin metabolitleri	21
Şekil 4.1.	Substratın karbon iskeleti	28
Şekil 4.2.	Substratın <i>C. sphaerospermum</i> ile biyotransformasyonu	29
Şekil 4.3.	Substratın <i>U. chartarum</i> ile biyotransformasyonu	32
Şekil 5.1.	Substratın <i>C. sphaerospermum</i> ile biyotransformasyonu	35
Şekil 5.2.	Substratın <i>U. chartarum</i> ile biyotransformasyonu	38

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 2.1. Bütün hücre sistemleri ve izole enzimlerin avantaj ve dezavantajları	10
Tablo 5.1. Testosteron (4) ve bazı metabolitleri için ^{13}C NMR değerleri	36
Tablo 5.2. Testosteron (4) ve diğer bazı metabolitleri için ^{13}C NMR değerleri	40
Tablo 5.3. <i>C. sphaerospermum</i> MRC 70266 küfö ile metabolit verimleri	42
Tablo 5.4. <i>U. chartarum</i> MRC 72584 küfö ile metabolit verimleri	42

ÖZET

Anahtar Kelimeler: Biyotransformasyon, Testosteron, *Cladosporium sphaerospermum*, *Ulocladium chartarum*

Bu çalışmada, *Cladosporium sphaerospermum* MRC 70266 ve *Ulocladium chartarum* MRC 72584 küfleri ile testosteron bileşiğinin beş gün süren biyotransformasyonları gerçekleştirildi.

Testosteronun *Cladosporium sphaerospermum* MRC 70266 ile inkübasyonu 6 β -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (%8), 6 β ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (%40), 7 β ,17 β -dihidroksiandrost-3-on (%7), 15 α ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (%5), 6 β ,16 β ,17 β -trihidroksiandrost-4-en-3-on (%3) ve 6 β ,12 β ,17 β -trihidroksiandrost-4-en-3-on (%2) metabolitlerini verdi. Aynı substratın *Ulocladium chartarum* MRC 72584 ile inkübasyonu androst-4-en-3,17-dion (%3), 5 α -androstan-3,6,17-trion (%4), 17 β -hidroksi-5 α -androstan-3,6-dion (%9), 7 β -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (%3), 7 β ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (%11), 14 α ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (%12) ve 12 β ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (%9) metabolitlerini verdi. 6 β ,16 β ,17 β -Trihidroksiandrost-4-en-3-on ve 6 β ,12 β ,17 β -trihidroksiandrost-4-en-3-on metabolitleri yeni bileşikler olarak tanımlandı.

Metabolitlerin yapı tayinleri, başlangıç maddesi ile metabolitlerin erime noktaları, NMR ve IR spektrumları karşılaştırılarak gerçekleştirildi.

BIOTRANSFORMATIONS OF TESTOSTERONE BY *CLADOSPORIUM SPHAEROSPERMUM* AND *ULOCLADIUM* *CHARTARUM*

SUMMARY

Keywords: Biotransformation, Testosterone, *Cladosporium sphaerospermum*, *Ulocladium chartarum*.

In this study, biotransformations of testosterone by *Cladosporium sphaerospermum* MRC 70266 and *Ulocladium chartarum* MRC 72584 were performed.

Incubation of testosterone with *Cladosporium sphaerospermum* MRC 70266 afforded 6 β -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (8%), 6 β ,17 β -dihydroxyandrost-4-en-3-one (40%), 7 β ,17 β -dihydroxyandrostane-3-one (7%), 15 α ,17 β -dihydroxyandrost-4-en-3-one (5%), 6 β ,16 β ,17 β -trihydroxyandrost-4-en-3-one (3%) and 6 β ,12 β ,17 β -trihydroxyandrost-4-en-3-one (2%). Incubation of testosterone with the same substrate afforded androst-4-en-3,17-dione (3%), 5 α -androstane-3,6,17-trione (4%), 17 β -hydroxy-5 α -androstane-3,6-dione (9%), 7 β -hydroxyandrost-4-en-3,17-dione (3%), 7 β ,17 β -dihydroxyandrost-4-en-3-one (11%), 14 α ,17 β -dihydroxyandrost-4-en-3-one (12%) and 12 β ,17 β -dihydroxyandrost-4-en-3-one (9%). 6 β ,16 β ,17 β -Trihydroxyandrost-4-en-3-one and 6 β ,12 β ,17 β -trihydroxyandrost-4-en-3-one were identified as new compounds.

The structures of the metabolites were revealed by comparing melting points, NMR and IR spectra of the starting material with those of metabolites.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Canlılarda doğal olarak gözlenen organik bileşikler üç ayrı temel grupta toplanabilir. Birinci grupta, bütün hücrelerde ortak olan, hücrelerin büyüme ve üremelerinde merkezi rolü bulunan primer metabolitler yer alır (Hanson, 2003). İkinci grupta selüloz, ligninler ve proteinler gibi hücresel yapıları oluşturan yüksek molekül ağırlığına sahip biyopolimerler yer almaktadır. Üçüncü grupta ise canlıların büyüme ve üremesi için elzem olmayan sekonder metabolizmanın önemli bileşenleri olan, doğal ürünler veya sekonder metabolitler olarak da bilinen ve sadece bir veya belirli birkaç tür için karakteristik olan bileşikler bulunmaktadır (Hanson, 2003; Mann, 1994; Clayden ve ark., 2001).

Doğal ürünler hayat için her ne kadar elzem olarak görünmeseler de genellikle canlıların hayatta kalmalarına yardımcı olurlar (Mann, 1994; Clayden ve ark., 2001) ve daha çok diğer canlılar üzerindeki etkilerinden dolayı dikkat çekerler (Hanson, 2003). Bu ürünler hemen hemen her grup canlıda bulunmalarına rağmen özellikle bitkilerde, mikroorganizmalarda, mantarlarda ve böceklerde daha yaygın olarak gözlenirler (Clayden ve ark., 2001). Doğal ürünlerin en fazla bulunduğu canlılar ise bitkiler ve mikroorganizmalardır. Çoğu doğal ürün olan tıbbi, ticari ve zehirli bitkilerin biyolojik açıdan aktif bileşenleri organik kimyanın gelişimi süresince çalışılmıştır. Günümüzdeki ilaçların %40'ından fazlasının doğal ürünlerden elde edildiği tahmin edilmektedir.

Doğal ürünlerin özellikle bitkiler, mikroorganizmalar, böcekler ve diğer hayvanlar arasındaki etkileşimlerin düzenlenmesinde ekolojik bir rolü vardır. Bunlar genellikle stres şartlarında devreye giren savunma maddeleri, hoş olmayan tatları ile otçullar tarafından tüketilmeyi önleyen bileşikler, diğer canlıları bulundukları canlılara çeken

renkli ve kokulu bileşikler ve özellikle böcekler gibi bazı hayvanlar arasında iletişimi sağlayan feromonlar olarak görev yaparlar (Keskin, 2010).

Doğal ürünler ilk bakışta çok sayıda ve birbirinden yapıca farklı bileşikler olmasına rağmen bu bileşiklerin çoğu genellikle doğadaki biyosentezlerinden kaynaklanan bazı özel yapısal karakterlerinden dolayı poliketidler, yağ asitleri, terpenler, steroidler, fenolik bileşikler, alkaloidler, özelleşmiş karbohidratlar ile özelleşmiş aminoasitler ve peptidler gibi sınıflardan birine dahil edilirler (Hanson, 2003).



BÖLÜM 2. TESTOSTERON BİLEŞİĞİNİN BAZI KÜFLER İLE BİYOTRANSFORMASYONLARI

Bütün canlılar yaşamlarının birçok evresinde ksenobiyotikler olarak bilinen, kendilerine yabancı olan birçok ilaçla, besin katkı maddeleriyle, kozmetik ürünleriyle karşılaşmaktadır (Onat ve ark., 2002). Bu ksenobiyotikler üzerinde enzimler veya enzimleri içeren hücre kültürleri, doku kültürleri, organ kültürleri, mikroorganizmalar, mikroorganizmaların sporları gibi biyolojik sistemler aracılığıyla meydana gelen kimyasal değişimlere biyotransformasyonlar denir (Hanson, 1995; Telefoncu, 1995).

2.1. Biyotransformasyonların Tarihsel Gelişimi

Mikroorganizmalar insanlık tarihi boyunca sosyal ve ekonomik açıdan büyük önem arz etmektedir. İnsanoğlu, yiyecek ve içeceklerin üretiminde varlıklarından habersiz oldukları halde mikroorganizmaları kullanıyordu. Sirke üretiminde etil alkolün bakteriler ile asetik aside oksidasyonu ve şekerin bira mayası ile etil alkole dönüştürülmesi en eski ve en iyi bilinen biyotransformasyonlardan ikisi arasında yer almaktadır (Sheldon, 1993). Sümerliler ve Babilliler milattan önce 6000 yıllarında alkollü içecekler ürettikleri bildirilmiştir. Buna rağmen fermantasyon aracılığıyla alkoller ve organik asitler gibi kimyasalların üretilmesine ilişkin bilgiler nispeten yeni olmakla birlikte literatürdeki ilk veriler 1850'li yıllardan sonra ortaya çıkmıştır. Böylelikle, mikroorganizmalar kullanılarak belirli bileşiklerin basit ve kimyasal olarak net bir şekilde tanımlanmış reaksiyonlarla farklı fonksiyonel bileşiklere dönüştürülebileceği keşfedildi. Günümüzde sıklıkla kullanılan bu süreç “biyotransformasyon” olarak adlandırılmaktadır (Turner, 1998).

Luis Pasteur 1858 yılında tartarik asidin mikrobiyal çözünürlüğünü ortaya koyan ilk kişi oldu. *Penicillium glaucum* küfünün aracılık ettiği rasemik tartarik asidin

amonyum tuzunun fermantasyonunu gerçekleştirerek (-)-tartarik asit oluştuğunu gözlemledi (Pasteur, 1858).

1862'de Luis Pasteur alkolün sirkeye dönüşümü üzerinde çalıştı, sirke üzerinde oluşan ve "sirke çiçeği" olarak adlandırdığı zarın, havadaki oksijen için çok sayıda organik maddeye ulaşım yöntemi olarak kullanılabileceği belirtti (Pasteur, 1858). Luis Pasteur'ün bulguları 1886'da onaylandı ve sirke oluşumuna sebep olan mikroorganizmaya *Bacterium xylinum* adı verildi (Hanson, 1995). Ayrıca bu mikroorganizmanın propanolü propiyonik aside ve mannitolü de fruktoza yükseltgediği de tespit edildi (Buchner, 1897). A. J. Brown etanol oksidasyonunu da gerçekleştirebilen *Bacterium aceti* ile propanolün propiyonik aside yükseltgendiğini rapor etmiştir. Aynı çalışmada ayrıca *Bacterium aceti* ile mannitolün fruktoza ve glikozun glukonik aside dönüşümlerine yönelik çalışmalarda bildirilmiştir (Hanson, 1995).

Bira mayası olarak da bilinen *Saccharomyces cerevisiae*'nin kükürdü hidrojen sülfüre indirgediği 1874'de furfural bileşiğini furfuril alkole indirgediği ise 1898'de rapor edilmiştir (Hanson, 1995).

1897'de kum ile öğütölmüş bira mayasının alkolik fermantasyonu kolaylıkla gerçekleştirebileceğini bildirilmiştir (Buchner, 1897).

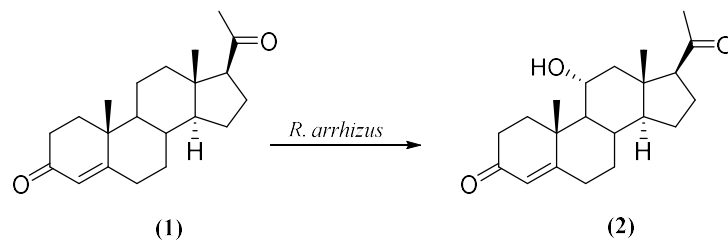
Bira mayası varlığında benzaldehit ve asetaldehitin kondenzasyonu ile 1-hidroksi-1-fenil-2-propanon bileşiğı elde edildiğı 1921'de rapor edilmiştir (Neuberg ve Hirsch, 1921). Optikçe aktif olan bu bileşik 1930'da L-(-)-efedrin alkaloidine dönüştürölmüştür (Hildebrandt ve Klavehn, 1930).

1923'de izole edilen *Acetobacter suboxydans* isimli bakteri D-sorbitolden L-sorbozun yüksek verimle eldesi için kullanılmıştır (Kluyver ve Leeuw, 1924). C vitamini sentezinde kullanılan L-sorboz 1930'lu yıllarda çok önem kazanmıştır (Reichstein ve Grüssner, 1934).

1937 yılında *Saccharomyces cerevisiae* kullanılarak yapılan bir çalışmada dehidroepiandrosteron bileşiğinden testosteron elde edilmiştir (Hanson, 1995).

1948’de *Proactinomyces roseus* bakterisi ile yapılan çalışmalarda kolesterolün C-7 pozisyonunda oksidasyona uğradığı ve ayrıca bu bakterinin sterollerin hem degradasyonlarını hem de oksidasyonlarını da gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Hanson, 1995).

1952’de *Rhizopus arrhizus* küfünün progesteronu (1), Şekil 2.1.’de gösterildiği gibi 11 α -hidroksiprogesteron (2) bileşiğine dönüştürdüğünü bildirmiştir (Peterson ve ark., 1952). Kortizon sentezinde, fonksiyonel gruplardan oldukça uzakta bulunan C-11 pozisyonuna bir oksijen eklenmesi, klasik kimyasal yöntemlerle oldukça uzun ve masraflı bir işlem olmasına rağmen söz konusu sorunun *Rhizopus arrhizus* küfünün yüksek verimli bir 11 α -hidroksilasyonu ile çözülmesi dikkatleri mikrobiyal biyotransformasyonlar üzerine çekmiştir (Sebek ve Perlman, 1979).



Şekil 2.1. *R. arrhizus* ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu (Peterson ve ark., 1952)

1960’lı yılların başlarında her iki enantiyomerini de içeren Thalidomide adlı ilacın teratojenik problemlere sebep olduğu tespit edilmiştir. Bu problemlerin ortaya çıkmasıyla ilaç endüstrisinde etkin tek enantiyomerlerin üretimi önem kazanmış ve daha sonra *Pseudomonas putida* gibi mikroorganizmalar ile bazı enzimlerin enantiyomerlerin ayrılmasında kullanılabileceği ortaya konulmuştur (Hanson, 1995).

Geçmişte birçok spesifik enzimin kullanımı, üretimlerinin yetersizliği nedeniyle kısıtlıyken, gen mühendisliği sayesinde günümüzde bu enzimlerin elde edilmesi kolaylaşmış ve kullanımı yaygınlaşmıştır (Demain, 2000). Modifiye edilmiş enzimler, yarı sentetik enzimler ve antikor yapıdaki enzimler (abzimler) günümüzde

yapılan biyotransformasyonlarda sıklıkla kullanılmaktadır. Enzimlerle yapılan biyotransformasyon çalışmalarındaki en önemli sıkıntılardan biri de metabolitler izole edilirken kullanılan ayırma yöntemlerinin enzimi denatüre etmesi ve tekrar kullanımını sınırlamasıdır. Bu sorun enzimler sabitlenerek çözülmüştür (Faber, 2003). Bu sayede birçok enzim sabitlenerek tekrar tekrar kullanılmaya başlanmıştır. Enzimlerle yapılan biyotransformasyon çalışmalarındaki diğer bir sorun ise organik substratların çoğunun sudaki çözünürlüğünün düşük olmasıdır. 1985’de organik çözücü içerisinde çözünebilen özellikle lipazlar gibi bazı enzimlerin kullanılabileceği gösterilmiştir ve bu tür biyotransformasyonlar giderek yaygınlaşmıştır (Hanson, 1995).

2.2. Enzimler, Avantajları ve Dezavantajları

Biyotransformasyonlar için kullanılan enzimler serbest halde, sabitlenmiş halde veya çeşitli biyolojik sistemlerin yapısında bulunabilir. Biyotransformasyonlar günümüzde ya birçok enzim izole edilerek ya da bazı enzimler ticari olarak elde edilerek yapılmaktadır. Enzimler, Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim Komisyonu tarafından sırasıyla oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlar olmak üzere altı sınıfa ayrılmıştır. Her bir sınıf ise kendi içerisinde 4-13 arası alt sınıflara ayrılmaktadır (Keha ve Küfrevioğlu, 2005).

Oksidoredüktazlar sınıfı, dehidrojenazlar, redüktazlar, oksijenazlar, oksidazlar gibi iki ayrı substrat arasındaki indirgenme-yükseltgenme tepkimelerini katalizleyen enzimleri içerirler. Transferazlar iki ayrı substrat arasındaki belirli atomların ve grupların transferini katalizleyen enzimlerdir. Hidrolazlar ise ester, eter, anhidrit, peptid, glikozid gibi bazı bağların hidrolizini katalizlemektedir. Liyazlar substratlardan belirli grupların ayrılması ile çift bağların oluşumunu ve ayrıca çift bağlara katılmaları katalizleyen enzimlerdir. İzomerazlar; rasemaz, epimeraz, mutaz gibi enzimleri içerirler ve çeşitli izomerlerin birbirine dönüşümünü katalizlerler. Lipazlar iki substratın birbirine bağlanmasını katalizleyen enzimlerdir (Keha ve Küfrevioğlu, 2005).

Enzimler ile ilgili bazı ön yargılar vardır. Enzimlerin pahalı oldukları, oldukça duyarlı oldukları, sadece kendi doğal substratları ve kendi doğal çevreleri üzerinde etkili oldukları düşünülse de pek çok enzim için bu ön yargılar geçerliliğini yitirmiştir (Faber, 2003).

Biyokatalizör olarak kullanılan enzimlerin birçok avantajı vardır. Örneğin enzimler, çok hızlı çalışan biyokatalizörlerdir. Enzimatik bir tepkime enzimatik olmayan bir tepkimeye göre 10^8 - 10^{10} kat daha hızlı gerçekleşir. Enzimatik tepkimelerde katalizör oranı $\%10^{-3}$ - 10^{-4} mol arasında olması istenirken, kimyasal katalizörlü bir tepkimede bu oran $\%0,1$ - 1 mol aralığına kadar çıkabilir (Faber, 2003).

Enzimler doğada tamamen parçalanabilecek karakterdedirler ve bu özellikleri nedeniyle katalizör olarak kullanılan ağır metaller ve sentetik amaçla kullanılan çoğu reaktifin aksine çevreye uyumlu olan biyomoleküllerdir (Faber, 2003).

Sentezlerde kullanılan çoğu reaktifin aksine, enzimler ılıman şartlarda etkinlik gösteren biyomoleküllerdir. Enzimler genellikle pH 5-8'de ve sıcaklığın 20-40°C olduğu ılıman şartlarda çalışırlar. Bu sayede sentezlerde sıklıkla karşılaşılan izomerleşme, rasemizasyon, çevrilme ve bozunma gibi istenmeyen yan tepkimeler azaltılabilmektedir (Faber, 2003).

Enzimler çoğu zaman kendi doğal işlevlerinden farklı özellik gösterebilirler. Örneğin çoğu enzim, geniş bir substrat spektrumuna sahip olduğundan birçok doğal veya sentetik bileşik üzerinde etkili olabilmektedir. Ayrıca bazı enzimler organik çözücülerde de kullanılabilmektedir (Faber, 2003).

Enzimler genellikle benzer koşullar altında etkilidir. Bu etki sayesinde bir tepkime ağındaki birkaç seri tepkime aynı ortamda gerçekleşebilir. Metabolik yollardaki multienzim sistemleri de bu şekilde çalışmaktadır (Faber, 2003).

Hemen hemen her tepkime için eşdeğer bir enzimatik tepkime söz konusu olduğu için enzimler geniş bir uygulama alanı bulmaktadır. Enzimler ile gerçekleşen

tepkimelere ester, eter, lakton, laktam, epoksit, asit anhidrit, amid ve nitrillerin hidrolizi veya sentezi, alkan, alken, aromatik bileşikler, alkol, aldehit, keton, sülfürlerin ve sülfoksitlerin yükseltgenmesi ya da indirgenmesi, karboksilasyon, dekarboksilasyon, alkilasyon ve dealkilasyon, halojenasyon ve dehalojenasyon, izomerizasyon, amonyak ve hidrojen siyanür ilavesi veya eliminasyonu, açiloin ve aldol tepkimeleri, Michael katılma tepkimesi ve Diels-Alder tepkimeleri örnek olarak verilebilir (Faber, 2003).

Enzimler bölgesel olarak seçici ve diastereoseçici biyomoleküllerdir. Kompleks üç boyutlu yapıya sahip olmaları, aynı substrat molekülünün üzerinde bulunan farklı bölgelerdeki fonksiyonel grupların ayırt edilebilmesini sağlar (Faber, 2003).

Enzimler aynı zamanda kimyasal olarak seçici biyomoleküllerdir. Bu özellikleri belirli bir fonksiyonel grup üzerinde etkili olmalarını sağlar ve duyarlı diğer fonksiyonel grupları etkilemedikleri gibi istenmeyen yan ürünlerin oluşumlarını engellerler (Faber, 2003).

Enzimler ayrıca enantiyoseçiciliği ile dikkat çeken biyomoleküllerdir. L-amino asitlerden oluşan enzimler kiral biyokatalizörlerdir. Substrat bünyesindeki herhangi bir kiralite enzim-substrat kompleksi oluşumu sırasında tanımlanır. Prokiral bir substrat ile sadece bir enantiyomere dönüşüm sağlanırken genellikle rasemik karışımlardaki enantiyomerlerden sadece biri etkilenecek enantiyomerlerin ayrılmaları da sağlanabilmektedir (Faber, 2003).

Enzimlerin bir çok yararı sayesinde klasik sentez yöntemleriyle gerçekleşmesi çok zor veya imkansız olan tepkimeler enzimler aracılığıyla kolaylıkla gerçekleştirilebilmektedirler (Faber, 2003).

Enzimlerin biyokatalizörler olarak kullanılmasında bazı dezavantajlar da bulunmaktadır. Enzimler doğada sadece bir enantiyomerik forma sahiptir ve diğer enantiyomerik formlarının D-amino asitlerden sentezi için genel bir yöntem olmasından dolayı sadece belirli bir enantiyomer ile reaksiyona girebilirler. Diğer

enantiyomerik ürünün elde edilebilmesi için zıt bir stereokimyasal seçiciliğe sahip olan bir enzimin kullanılması gerekmektedir (Faber, 2003).

Enzimlerin aktiviteleri üzerinde etkili olan parametreler belli sınırlara sahiptir. Örneğin, enzimlerin protein yapısında olmaları sebebiyle yavaş gerçekleşen bir enzimatik tepkimeyi hızlandırmak için sıcaklık ve pH gibi parametreler üzerinde genellikle fazla değişiklik yapmak mümkün değildir (Faber, 2003).

Enzimlerin en uygun çalışacağı ortam genellikle sudur, ancak buradaki diğer bir konu çoğu organik bileşiğin sudaki çözünürlüğünün oldukça düşük olmasıdır. Enzimatik bir tepkimenin sulu bir ortam yerine organik bir çözücünde gerçekleştirilmesi hem enzimlerin denatürasyonuna ve hem de buna bağlı olarak aktivite kayıplarına sebep olmaktadır (Faber, 2003).

Enzimler inhibisyona da oldukça duyarlı biyomoleküllerdir. Pek çok enzimatik tepkime çok yüksek substrat ve yüksek ürün konsantrasyonlarında inhibe olurlar. Substrat inhibisyonunu önlemek için, düşük seviyede substrat miktarlarından başlanarak ortama sürekli substrat ilave edilmesi gerekir. Tepkime ortamından artan ürünün kademeli olarak uzaklaştırılması genellikle ürünün bir sonraki tepkime basamağına dahil olması açısından oldukça zordur (Faber, 2003).

Enzimler kendi doğal kofaktörlerine de bağımlılık göstermektedir. Enzimatik tepkimelerde NADH ve NADPH gibi kofaktörler rol alıyorsa bu kofaktörlerin bizzat kendilerinin tepkime ortamında bulunmaları ve yenilenmeleri gerekmektedir. Kofaktörlerin genellikle kararsız moleküller olması, sentetik eşdeğerleri ile yer değiştirmelerinin mümkün olmaması ve oldukça pahalı olmaları enzimatik reaksiyonların önemli dezavantajları arasındadır (Faber, 2003).

Enzimler alerjik reaksiyonlara sebep olabilen biyomoleküllerdir. Bu biyomoleküller kimyasal maddeler olarak değerlendirilmektedir ve dikkatli kullanımı ile bu özelliklerinin en aza indirilebileceği düşünülmektedir (Faber, 2003).

Tablo 2.1. Bütün hücre sistemleri ve izole enzimlerin avantaj ve dezavantajları (Faber, 2003)

Biyokatalizör	Form	Avantaj	Dezavantaj
İzole enzimler	Genel	Basit düzenekler Basit işlemler Yüksek konsantrasyon toleransı nedeniyle iyi verim	Kofaktöre ihtiyaç duyulması
	Sulu ortamda	Yüksek enzim aktivitesi	Yan reaksiyon ihtimali Lipofilik substratların düşük çözünürlüğü Ekstraksiyon gerekliliği
	Organik çözücüde	Çalışma kolaylığı, Lipofilik substrat çözünürlüğü Enzimin geri kazanım kolaylığı	Düşük aktivite
	Sabitlenmiş	Tekrar kullanılabilme	Sabitlenme ile aktivite kaybı
Bütün hücreler	Genel	Kofaktöre ihtiyaç duyulmaz	Pahalı donanım Büyük hacimlerle çalışma zorluğu Düşük konsantrasyon toleransı sebebi ile düşük verim Organik çözücülerle düşük tolerans Yüksek yan ürün verme ihtimali
	Büyüyen kültür	Yüksek aktivite	Çok miktarda biyokütle gelişmesi Yan ürün fazlalığı, Proses kontrol güçlüğü
	Durağan kültür	Çalışma kolaylığı, Daha az yan ürün	Düşük aktivite
	Sabitlenmiş hücreler	Tekrar kullanılabilirlik	Düşük aktivite

2.3. Biyotransformasyon Teknikleri

Biyotransformasyonları gerçekleştirmek için genelde izole enzimler veya bütün hücre sistemleri ile olmak üzere iki farklı metot kullanılmaktadır. Bütün hücre sistemleri genelde mikroorganizmalar, hücre kültürleri, doku kültürleri ve organ kültürlerini içerir. Bütün hücre sistemleri ile izole enzimlerin birbirlerine göre sahip

oldukları avantaj ve dezavantajları Tablo 2.1.'de özetlenmiştir (Faber, 2003; Akar, 2005).

Biyotransformasyon tepkimelerinde genellikle bütün hücre sistemleri tercih edilmektedir. Bunun en önemli sebeplerinden biri çoğu hücre içi enzimlerin hücre dışında kararsız olması, hücre içi enzimlerin homojenasyon sırasında bazı proteolitik enzimlerin etkisi ile hidrolizlenmesi, hücre içi enzimlerin kofaktör ihtiyaçlarının sağlanması ve sürekli yenilenmesi, hücre içi enzimlerin izolasyonunun zorluğu ve yüksek maliyeti sayılabilir (Akar, 2005).

Enzimler veya bütün hücre sistemlerinin kullanıldığı biyotransformasyonları gerçekleştirmek için birçok farklı teknik bulunmaktadır. Bu biyotransformasyon teknikleri aşağıda verilmiştir (Telefoncu, 1995).

2.3.1. Sabitlenmiş hücreler ile biyotransformasyon

Mikroorganizmalar, ürün ve substratın geçişine izin verecek şekilde poliakrilamid, kappa-karragenan, alginat, selüloz, nişasta gibi bir polimer, matrikste sabitlenmiş hale getirilir. Sabitlenmiş hale getirilen hücreler, istenildiği zaman ortamdan uzaklaştırılabilmektedir ve yeniden kullanılma avantajına sahiptirler. Bu yöntem sürekli biyotransformasyon işlemlerinin gerçekleştirilebilmesi için uygundur. Örneğin, *Mortierella isabellinan*'ın alginat ile, *Penicillium raistrickii*'nin sporlarının çapraz bağlı polimerler ve alginatta tutulması ve *Rhizopus nigricans* sporlarının poliakrilamid, agar ve chitosan matrikslerde tutulmasıyla farklı sabitlenmiş hücrelerden elde edilmektedir (Telefoncu, 1995; Rajaguru ve ark., 2000; Armstrong ve Yamazaki, 1986).

2.3.2. Serbest ve sabitlenmiş enzimler ile biyotransformasyon

Sabitlenmiş hücreler biyotransformasyon için kullanıldığında ekonomik olarak avantaj sağlamaktadır. Bu yöntemin en dikkat çekici dezavantajı ise çok basit bir hücrenin bile binlerce enzim sistemini içermesi ve istenmeyen yan reaksiyonlara

neden olmasıdır. Serbest enzimler pahalı maddeler olmasına rağmen saf olduklarından dolayı tek tip tepkimeleri gerçekleştirmeleri nedeniyle tercih edilmektedirler. Son dönemlerde izole enzim sistemleri yerine daha ucuz olan sabitlenmiş enzimler sistemlerinin kullanılması, ekonomik açıdan da büyük avantaj sağladığı için yaygınlaşmıştır (Telefoncu, 1995; Rajaguru ve ark., 2000; Armstrong ve Yamazaki, 1986).

2.3.3. İzole enzimler ile biyotransformasyon

Bu tip enzimlerin çoğunluğu sitokrom P-450'ye bağlı monooksijenaz enzim sistemlerini kapsamaktadır. İzole enzimler steroid hormonlarının hidroksillenmesinde oldukça önemli yer tutarlar. *Pycomyces blakesleanus*'dan izole edilen hidroksilaz enzimleri, steroidlerde 7 α - ve 15 β - seçiciliği gösterirler. Ayrıca *Mucor piriformis*'in izole enzimleri de 14 α - hidroksilazlar olarak bilinir (Hanson, 1995; Telefoncu, 1995; Rajaguru ve ark., 2000; Armstrong ve Yamazaki, 1986).

2.3.4. Sporlar ile biyotransformasyon

Sporlar ile biyotransformasyon yönteminde mikroorganizmaların sporları kullanılmaktadır. Uygun besiyerlerinde üretilen mikroorganizmaların sporları misellerden ayrılmakta ve soğuk ortamda saklanmaktadır. Bu yöntemin en önemli avantajlarından ikisi sporların kolayca depolanması ve defalarca kullanılabilmesidir (Telefoncu, 1995; Rajaguru ve ark., 2000; Armstrong ve Yamazaki, 1986).

2.3.5. Durağan hücreler ile biyotransformasyon

Biyotransformasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi için durağan (stasyonel) hücreler de kullanılabilir. Hücreler ya da mikroorganizmalar geliştirildikleri ve kendilerine özgü besiyerlerinden filtrasyon veya santrifüjleme gibi teknikler kullanılarak ayrılırlar ve biyotransformasyon çalışmasının yapılacağı asıl ortama eklenirler. Bu yeni ortama substrat ilavesi yapılarak biyotransformasyonlar gerçekleştirilir (Telefoncu, 1995). Durağan hücreler ile biyotransformasyonda,

biyotransformasyon süresince ortamdaki hücre sayısının sabit kalması ve ürünün izolasyonunun kolay olması bu yöntemi avantajlı kılmaktadır (Telefoncu, 1995; Rajaguru ve ark., 2000; Armstrong ve Yamazaki, 1986).

2.3.6. Büyüyen hücreler ile biyotransformasyon

Bu yöntemde mikroorganizmalar, belirlenen en ideal besiyerinde geliştirilir ve daha sonra ortama biyotransformasyon için substrat ilave edilir. Bu yöntem yüksek verim elde edilme olasılığından dolayı avantaj sunmaktadır (Telefoncu, 1995; Rajaguru ve ark., 2000; Armstrong ve Yamazaki, 1986).

2.4. Mikrobiyal Biyotransformasyonlar

Mikrobiyal hücreler, biyotransformasyon reaksiyonlarını gerçekleştirmek için kullanılan bütün hücre sistemleri içinde en çok tercih edilenlerden biridir. Mikrobiyal hücrelerin büyüme ve gelişme hızı, bitki ve hayvan hücreleriyle kıyaslandığında çok daha hızlıdır. Bu hızlı büyüme ve gelişme safhası, mikrobiyal hücreler ile biyotransformasyonların hem hızlı bir şekilde gerçekleşmesini sağlarken aynı zamanda çok kısa bir zaman alır. Bitki ve hayvan hücrelerine göre mikrobiyal hücrelerin boyutlarının küçük olması ve etkili hücre duvarı yapıları sayesinde mekanik olarak daha kararlı olmasını sağlamaktadır. Bu sayede değişik kültür tekniklerinde bu tip hücrelerin ortama kolaylıkla uyum sağlayarak bir avantaj sunmaktadırlar. Ayrıca mikrobiyal hücrelerin başka bir avantajı ise bitki ve hayvan hücrelerine göre çok daha farklı tipte substratları metabolize edebilmeleridir (Faber, 2003).

Günümüzde mikrobiyal biyotransformasyonlar, diğer kimyasal sentez yöntemlerine karşı olan avantajları sayesinde, biyoteknolojinin temel öğelerinden biri olmuştur (Faber, 2003).

Mikroorganizmalar genetik olarak değiştirilebilirler. Mikroorganizmalar üzerinde yapılan genetik değişiklikler sayesinde diğer kimyasal yöntemler ile düşük verimle

elde edilen önemli ürünler, daha yüksek verimlerde elde edilebilir. Hatta genetik değişiklikler ile ürünler üzerinde istenilen modifikasyonların yapılması bile mümkün olabilmektedir (Demain, 2000).

Mikroorganizmalar, yapılarındaki spesifik olmayan enzim sistemleri sayesinde, hem doğal hem de sentetik çok sayıdaki farklı substratlar üzerinde farklı kimyasal tepkimeleri gerçekleştirebilirler (Hanson, 1995).

Mikrobiyal biyotransformasyonlar, klasik kimyasal yöntemlere göre, daha ılıman şartlar altında gerçekleşir. Pek çok mikrobiyal biyotransformasyon oda sıcaklığında ve 1 atmosfer basınç altında kolaylıkla gerçekleşmektedir (Faber, 2003).

Mikrobiyal biyotransformasyonlar klasik kimyasal yöntemlere göre düşük maliyetlidir ve daha kısa sürede bu tür biyotransformasyonlar gerçekleştirilebilmektedir. Hedef bileşikler, daha kısa süreler içerisinde ve genellikle daha yüksek verimlerde, kimyasal reaktiflere göre çok ucuza mal edilen besiyeri bileşenleri ve mikroorganizmalar kullanılarak elde edilmektedir (Hanson, 1995; Faber, 2003).

Mikrobiyal biyotransformasyonlar çevre dostudur. Klasik kimyasal sentez yöntemlerinde kullanılan reaktiflerin çoğu çevreye aşırı zararlar verebilmektedir (Hanson, 1995).

Mikrobiyal biyotransformasyon tepkimeleri enantiyoseçici tepkimelerdir. Klasik kimyasal sentez yöntemleri ile genel olarak hedeflenen moleküller, ayrılmaları çok zor olan rasemik karışımlar halinde elde edilmektedir. Özellikle ilaç etkin maddelerinin sentezinde tek enantiyomer olarak ürün sentezi oldukça önemlidir. Tek enantiyomerin seçimli üretimi için mikroorganizmaların kullanılmaları günümüzde gittikçe yaygınlaşmıştır (Faber, 2003).

Klasik kimyasal sentez yöntemlerinin aksine mikrobiyal biyotransformasyonlar gerçekleşirken substratlar üzerindeki diğer fonksiyonel grupların korunmasına gerek

yoktur. Bu üstünlük enzimlerin bölgesel seçiciliklerinden kaynaklanmaktadır (Hanson, 1995; Faber, 2003).

Mikrobiyal biyotransformasyon tepkimeleri genel olarak fonksiyonel grupların varlığına ihtiyaç duymaz. Örneğin, mikrobiyal hidroksilasyonlar fonksiyonel grupların uzağında meydana gelir (Hanson, 1995).

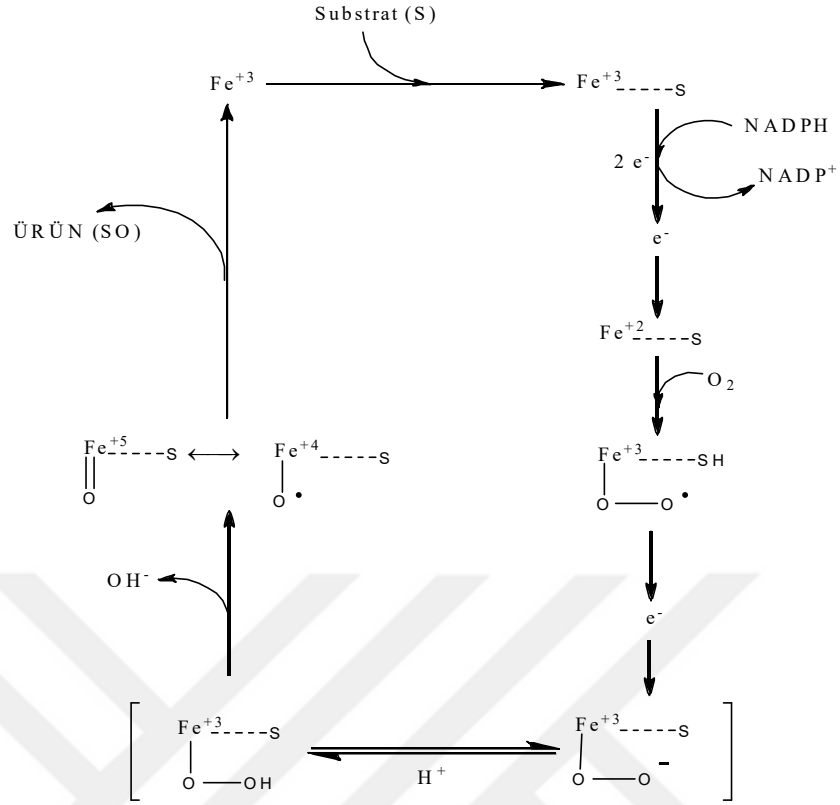
Mikroorganizmalar değişik ortamlara kolayca uyum sağlayabilen yapılardır. Bu özellikleri sayesinde erlenden fabrika fermentörlerine kadar birçok ortama kolayca adapte edilerek kullanılabilirler (Hanson, 1995; Demain, 2000; Faber, 2003).

Mikrobiyal biyotransformasyonların gerçekleştirilebilmesi için çeşitli mikroorganizmalar uygun yüzeylere sabitlenmiş olarak kullanılabilir. Biyotransformasyonlarda en yaygın olarak kullanılan mikroorganizma grupları, protista aleminin üyesi ve prokaryotik canlılar olan bakteriler ile mantarlar aleminin üyesi ve ökaryotik canlılar olan küfler ve mayalardır (Demain, 2000).

Mikroorganizmalar ile birçok sentetik reaksiyona eş değer reaksiyon gerçekleştirilebilmektedir. Bunlardan başka mikrobiyal hidroksilasyonlar gibi bazı mikrobiyal biyotransformasyonlar, sentetik reaksiyonlar ile tek basamakta gerçekleştirilemez.

Mikrobiyal hidroksilasyon en önemli mikrobiyal biyotransformasyon tepkimelerinden birisidir (Hanson, 1995). Mikrobiyal hidroksilasyonun önemi ise daha önce belirtildiği gibi ilk olarak iltihap giderici olarak kullanılan kortikal steroidlerin sentezinde anlaşılmıştır.

Bakterilerin ve küflerin büyük kısmı steroidlerin hidroksilasyonunu gerçekleştirebilirler (Hanson, 1995). Bu durum hem mikrobiyolojik hidroksilasyonun mekanizması hem de steroidlerin mikrobiyolojik hidroksilasyonunun modellenmesi konusunda bilgi sağlamaktadır (Yildirim, 2001).

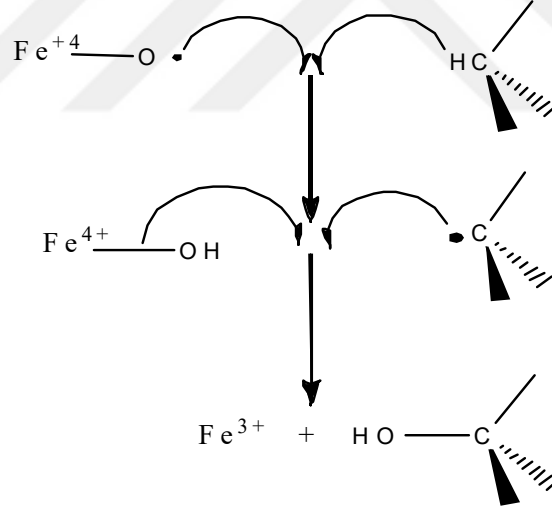


Şekil 2.2. Substrata bir O atomunun ilave edilmesinin mekanizması (Hanson, 1995)

Mikrobiyal hidroksilasyonun çoğu canlılarda bulunan sitokrom P-450 enzimleri tarafından katalizlendiği düşünülmektedir (Hanson, 1995). Mikrobiyal hidroksilasyonun gerçekleşmesi için ayrıca O_2 , NADH veya NADPH gibi bir hidrojen kaynağı ve bir molekül H_2O gerekmektedir (Yildirim, 2001). Mikrobiyal hidroksilasyonun mekanizmasının ortaya çıkarılması için özellikle *Pseudomonas putida* bakterisinin kamfor bileşiğinin hidroksilasyonunu katalizleyen kamfor hidroksilaz enzimine ait sitokrom P-450 üzerinde çalışılmıştır (Hanson, 1995). Sitokrom P-450'nin yapısı X ışınları kristallografi tekniği ile aydınlatılmıştır (Yildirim, 2001). Kristal yapı tayinleri kamfor bileşiğinin, enzimin aktif merkezine iki etkileşim ile sıkıca bağlı olduğunu göstermiştir. Birinci etkileşim kamforun karbonil grubu ile aktif merkezdeki bir tirozinin hidroksil grubu arasındaki hidrojen bağı iken ikinci etkileşimin kamfor molekülü ile çevresindeki alifatik ve aromatik aminoasitler arasındaki hidrofobik etkileşimler olduğu görülmüştür.

Şekil 2.2. incelediğinde mikrobiyal hidroksilasyon gerçekleşirken diatomik moleküler oksijenin bir atomu organik substrata bağlanmaktadır (Hanson, 1995;

Yildirim, 2001; Holland, 1982). İndirgeyici iki elektron genellikle NADPH bazen ise NADH'dan sağlanmaktadır. İlk adımda substrat bağlanması gerçekleşir. Bu bağlanma diatomik oksijenin atomlarından birisinin demire bağlanabilmesi için elzemdir. Substrat bağlandıktan sonra bir elektronun transferi ile Fe^{+3} , Fe^{+2} 'ye indirgenmektedir. Elektronların teker teker transferi mikrobun türüne göre NADPH veya NADH'dan bir flavin nükleotid, Fe-S proteinleri ve/veya sitokrom b_5 vasıtası ile gerçekleşmektedir. Moleküler oksijen ilk elektron naklinden sonra bağlanır. Moleküler oksijenin bağlanmasını ikinci elektronun O-O bağına transferi izler. Bu transfer sonrasında O-O bağı kopar ve bir oksijen atomu su molekülü olarak ayrılırken Fe^{+3} , Fe^{+4} 'e oksitlenmektedir. Bu oksidasyon ile oluşan son oksidant artık substratla tepkimeye girebilir. Oksidant ve substrat arasındaki tepkimenin mekanizması henüz yeterince anlaşılamamasına rağmen oksidant ve substrat arasındaki tepkimenin Şekil 2.3.'deki gibi muhtemelen radikalleri içeren bir mekanizma ile gerçekleştiği düşünülmektedir (Yildirim, 2001).

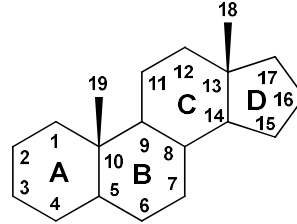


Şekil 2.3. Oksidant ve substrat arasındaki radikalleri içeren mekanizma (Hanson, 1995)

2.5. Steroidler

Steroidler doğal ürünlerin önemli bir sınıfıdır. Steroid terimi katı anlamına gelen Latince'deki steros kelimesinden ortaya çıkmıştır. Steroidler steran halkası olarak da bilinen siklopentanoperhidrofenantren halkası içeren bileşiklerdir. Bu halka birbirleri ile kaynaşmış ve sırası ile A, B ve C halkaları olarak adlandırılan üç adet sikloheksan

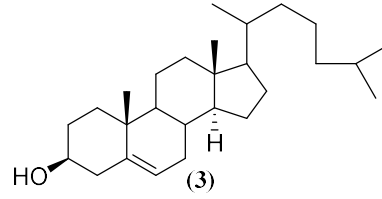
halkası ile D halkası olarak adlandırılan bir adet siklopentan halkası içerir (Şekil 2.4.). Steroidlerin çoğu 13. ve 10. karbonlarında, sırası ile 18. ve 19. karbonlar olarak tanımlanan ve molekül düzleminin üstünde yer alan metil grupları içerir. Çoğu steroidler genelde 3. ve 17. karbonlarında hidroksil veya karbonil gruplarına sahiptir. Ayrıca bazı steroidler D halkasındaki 17. karbondan orjinlenen yan zincirlere de sahiptir (Onat ve ark., 2002).



Şekil 2.4. Genel steroid yapısı

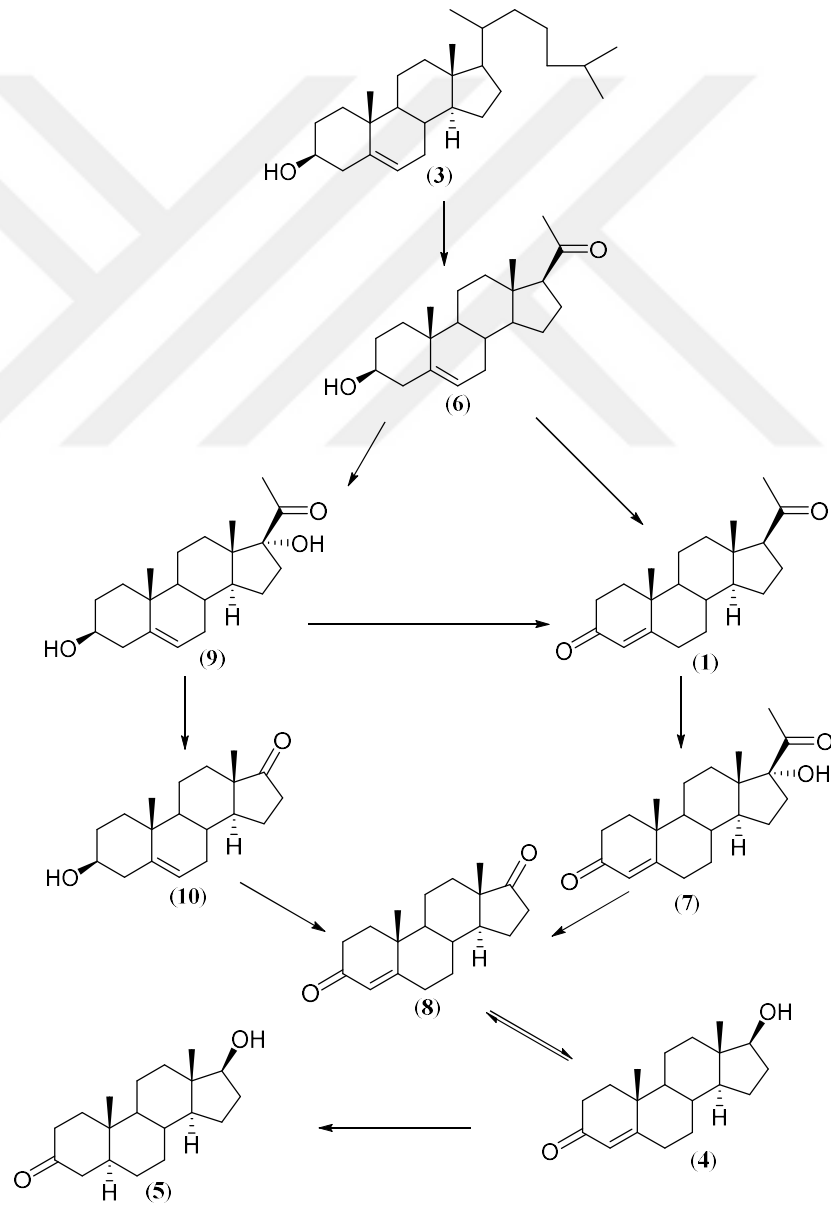
Stereoller 3. karbon atomlarında hidroksil grubu, 17. karbonunda ise 7, 8 veya 9 karbonlu alifatik yan zincirler içeren önemli steroidlerdir. Kolesterol (**3**), stigmasterol ve ergosterol en iyi bilinen sterollerdir. Kolesterol (**3**) insan ve hayvanlarda bulunurken stigmasterol bitkilerde, ergosterol ise mantarlarda bulunur (Keha ve Küfrevioğlu, 2005).

Steroidlerin en yaygın üyelerinden birisi olan kolesterol (**3**) bileşiği hayvansal membranlardaki akışkanlığın düzenlenmesinde önemli bir lipittir (Şekil 2.5.). Ayrıca kolesterol (**3**) bileşiği steroid hormonlar, safra asitleri ve D₃ vitamini gibi hayati fonksiyonu olan birçok bileşiğinde başlangıç maddesidir (Onat ve ark., 2002; Keha ve Küfrevioğlu, 2005). Kolesterol (**3**) kökenli steroid hormonlar glukokortikoidler, mineralokortikoidler, androjenler, östrojenler ve progestagenler (progestinler) olmak üzere beş ana sınıfta incelenmektedir (Onat ve ark., 2002). Androjenler, östrojenler ve progestagenler üreme ile ilgili organların gelişme ve büyümelerini, ikincil eşey karakterlerini ve üreme döngüsünü düzenleyen eşey hormonları olarak da bilinmektedirler. Eşey hormonları ayrıca güçlü anabolik etkileri sayesinde kemik, kaslar ve deri gibi birçok dokunun gelişmesini ve metabolizmanın da sürekliliğini sağlarlar (Onat ve ark., 2002).



Şekil 2.5. Kolesterol

Androjenler erkek bireylerde etkili olan eşey hormonlarıdır. 17 β -Hidroksiandrost-4-en-3-on olarak da bilinen testosteron (4) ve dihidrotestosteron (5) ya da kısaca DHT olarak bilinen 17 β -hidroksi-5 α -androstan-3-on bileşikler en etkin androjenlerdir.

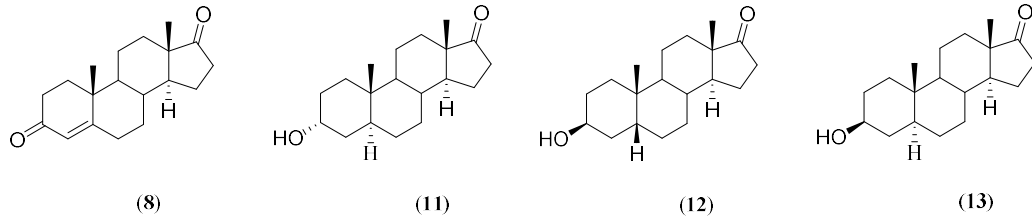


Şekil 2.6. Testosteron (4) ve DHT (5) bileşiklerinin biyosentezi

Androjenlerin vücuttaki asıl sentez yeri erbezleri (testis) olmasına rağmen bu hormonların bir kısmı adrenal korteksten salınmaktadır. Adrenal korteks ve testislerde androjenlerin sentezi önce kolesterolden (3) pregnenolon (6) oluşması ile başlar (Şekil 2.6.). Adenohipofizden salınan LH (lüteinleştirici hormon) kolesterolden (3) pregnenolon (6) sentezini uyarmaktadır. LH saliverilmesi ise kandaki serbest testosteron düzeyi tarafından düzenlenir. Pregnenolon (6) üzerinden androjenlerin biyosentezi Δ^4 yolu ve Δ^5 yolu olmak üzere iki ayrı şekilde gerçekleşmesi mümkündür. Androjen biyosentezinin ana yolu ise Δ^4 yoludur. Androjen biyosentezi için önce pregnenolon (6) önce progesterona (1) dönüştürülür. Progesteron (1) ise daha sonra 17α -hidroksiprogesterona (7) dönüştürülür. 17α -Hidroksiprogesteron (7) bünyesindeki yan zincirin enzimatik olarak parçalanması ile oluşan androst-4-en-3,17-dion (8) bileşiğinin C-17'deki indirgenmesi sonucunda testosteron (4) elde edilir. Testosterondan (4) ise daha sonra 5α -redüktaz aktivitesi ile daha etkin bir diğer androjen olan dihidrotestosteron (5) sentezlenir (Onat ve ark., 2002).

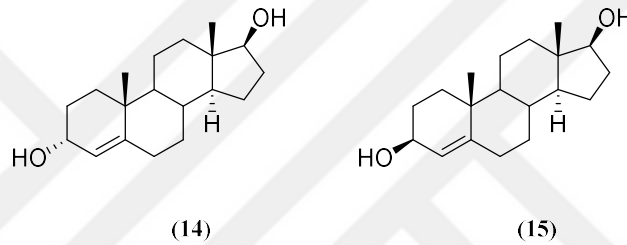
Bir yan yol olan Δ^5 yolunda pregnenolon (6), 17α -hidroksipregnenolon (9) bileşiğine çevrildikten sonra yan zincirin uzaklaştırılması ile dehidroepiandrosteron (DHEA) (10) bileşiğine çevrilmektedir. DHEA ise androst-4-en-3-17-dion (8) bileşiğine çevrildikten sonra testosterona (4) yükseltgenmektedir. Bu yolda oluşan 17α -hidroksipregnenolon (9) ayrıca doğrudan progesterona (1) çevrilebilmektedir (Onat ve ark., 2002).

Testosteron (4) biyolojik etkinliğini tamamladıktan sonra birçok dokuda düşük aktiviteli veya tamamen inaktif metabolitlere dönüştürülmektedir. Testosteron (4) androst-4-en-3-17-dion (8) bileşiğine çevrildikten sonra bu bileşiğin A halkasındaki bir seri tepkimeler ile indirgenmesi sonucunda Şekil 2.7.'de yapıları verilen 3α -hidroksi- 5α -androstan-17-on (11), 3β -hidroksi- 5β -androstan-17-on (12) ve 3β -hidroksi- 5α -androstan-17-on (13) gibi metabolitlerin oluştuğu bildirilmiştir (Onat ve ark., 2002).



Şekil 2.7. Testosteron (4) bileşiğinin bazı metabolitleri

Dihidrottestosteron (5) bileşiğinin ise A halkasındaki dehidrojenasyonu takiben 3 numaralı karbon atomunda gerçekleşen redüksiyonlar sonucu Şekil 2.8.'de verilen 3 α -androstendiol (14) ve 3 β -androstendiol (15) metabolitlerine dönüştüğü bilinmektedir (Onat ve ark., 2002).



Şekil 2.8. Dihidrottestosteron (5) bileşiğinin metabolitleri

2.6. Küfler ile Steroid Biotransformasyonları

Steroidlerin küfler ile biyotransformasyonları bu reaksiyonların yüksek regio ve stereoseçicilikleri sebebi ile steroid ilaçlar ve hormonlar gibi çok daha önemli ve fonksiyonlu bileşiklerin üretimi için halen yaygın olarak kullanılmaktadır (Nassiri-Koopaei ve Faramarzi, 2015; Donova ve Egorova, 2012). Bilinen mikrobiyal biyotransformasyonların etkinliklerini artırmak, kullanılabilir yeni mikroorganizmalar ve reaksiyonlar tespit etmeye yönelik çalışmalar yoğun olarak sürdürülmektedir (Nassiri-Koopaei ve Faramarzi, 2015).

Günümüze kadar testosteron (4) bileşiğinin çok sayıda farklı küf türleri ile biyotransformasyonları gerçekleştirilmiştir. Bu biyotransformasyon çalışmalarından Baeyer-Villiger oksidasyonları, mikrobiyal hidroksilasyonlar ile steran halkasının farklı kısımlarına hidroksil gruplarının eklenmesi, mikrobiyal hidroksilasyonlar ile eklenen bu hidroksil gruplarının oksidasyonları, keton gruplarının redüksiyonu, A

halkasının aromatikleşmesi, steran halkasındaki farklı kısımların mikrobiyal hidrojenasyonları ve dehidrojenasyonları gibi ilginç sonuçlar elde edilmiştir (Nassiri-Koopaei ve Faramarzi, 2015; Donova ve Egorova, 2012; Bhatti ve Khera, 2012; Fernandes ve ark., 2003; Mahato ve Garai, 1997).

2.6.1. *Cladosporium sphaerospermum*

Cladosporiaceae familyasına dahil olan *Cladosporium* askomiset mantarlarının yaygın ve önemli bir cinsidir (Sandoval-Denis ve ark., 2016). Hemen her yerde yayılım gösteren *Cladosporium* türleri genellikle hava, gıda, bitkiler, boya ve elbiselerden izole edilirler (Bensch ve ark., 2012; Sandoval-Denis ve ark., 2016). Yaygın endofitler ve bitki patojenleri olan bu türler diğer mantarların parazitleri bile olabilmektedir (Sandoval-Denis ve ark., 2016). Bazı *Cladosporium* türlerinin insan ve hayvanlar için patojen olduğu bilinmektedir (Sandoval-Denis ve ark., 2015).

Yeryüzünde geniş dağılım gösteren *Cladosporium sphaerospermum* yüksek tuz derişimleri ve ozmotik basınca dayanıklı bir kültür (Zalar ve ark., 2007). Bu küf çoğu zaman iç ve dış mekanlardan (Aihara ve ark., 2001; Park ve ark., 2004), insanlar (Yano ve ark., 2003) ve bitkilerden (Pereira ve ark., 2002) izole edilir. Literatürde *C. sphaerospermum* ile gerçekleştirilmiş bir steroid biyotransformasyonu çalışması bulunmamaktadır.

2.6.2. *Ulocladium chartarum*

Askomiset mantarlarından olan *Ulocladium* türleri farklı dağılımlara ve rollere sahiptirler. Çoğunlukla safrofit olan *Ulocladium* türlerinin bazıları bitki patojenleri iken bazıları ise gıdalarda bozulmalara yol açarlar. Birkaç *Ulocladium* türü ise önemli enzim kaynakları ve biyokontrol ajanları olarak dikkat çekmektedir (Andersen ve Hollensted, 2008).

Ulocladium cinsinin bir üyesi olan *Ulocladium chartarum* küfü daha çok iç mekanlarda rastlanan bir küftür. Literatürde *U. chartarum* ile gerçekleştirilmiş bir steroid biyotransformasyonu çalışması bulunmamaktadır.

2.7. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada daha önce herhangi bir steroid biyotransformasyon çalışması için kullanılmamış olan *Cladosporium sphaerospermum* ve *Ulocladium chartarum* küfleri ile testosteron (4) bileşiğinin biyotransformasyonlarının incelenmesi amaçlanmıştır.



BÖLÜM 3. MATERYAL VE METOT

3.1. Cihazlar, Sarf Malzemeler ve Kullanılan Yöntemler

Biyotransformasyon çalışmasında kullanılan besiyeri ve cam malzemeler Nüve OT 40 L marka otoklav ile 20 dakika boyunca 121°C sıcaklıkta sterilize edildi. Küflerin tazelenmesi ve biyotransformasyon çalışmaları esnasındaki inkübasyonların gerçekleştirilmesi için Nükleon marka Sınıf II Tip Biyolojik Güvenlik Kabini (steril kabin) kullanıldı. Biyotransformasyon çalışması ve küflerin yetiştirilmesi Gerhardt THO 500 Laboshake marka çalkalamalı inkübatör ile gerçekleştirildi. Infrared spektrumları Perkin Elmer Spectrum Two spektrometre cihazı ile alındı. ¹H NMR spektrumları iç sinyal olarak tetrametilsilan standardı kullanılarak 300 MHz’de çalışan Varian Mercury 300 NMR spektrometresi ile döterokloroform içerisinde alındı. ¹³C NMR spektrumları ise 75 MHz’de Varian Mercury 300 NMR kullanılarak döterokloroform içerisinde alındı. Erime noktalarını tayin etmek için de Elektrothermal IA 9200 erime noktası tayin cihazı kullanıldı. Elementel analiz için Thermo Finnigan Flash EA 1112 elementel analiz cihazı kullanıldı.

Biyotransformasyon çalışmasının ve kolon kromatografi çalışmalarının sonuçları ince tabaka kromatografisi (İTK) ile takip edildi. İTK çalışmaları 0,25 mm kalınlığında silika jel tabakaları (Merck silika jel GF254) ve etil asetat-hekzan (1:1) çözücü sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. İTK tabakalarındaki bileşikler *p*-anisaldehit-sülfürik asit reaktifine daldırılıp 120°C sıcaklıkta 3 dakika boyunca ısıtıldıktan sonra görünür hale gelmeleri sağlandı.

C. sphaerospermum MRC 70266 ve *U. chartarum* MRC 72584 küf kültürleri Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu, Marmara Araştırma Merkezi Gıda Teknoloji ve Araştırma Enstitüsü’nden yatık agar kültürü olarak satın alındı. Bu

kültürler PDA (potato dekstroz agar) içeren yatık agar besiyerlerinde ve 4°C’de tazelendi, çoğaltıldı ve korundu.

Testosteron (4) bileşiği Sigma-Aldrich firmasından satın alındı. Küfler için hazırlanan besiyerinde kullanılan tüm kimyasallar, yatık agar besiyerleri için kullanılan PDA ve agar, çalışmada kullanılan tüm solventler ise Merck firmasından satın alındı.

3.2. Yatık Agar Besiyerlerinin Hazırlanması

Yatık agar besiyeri hazırlanmak için PDA (potato dekstroz agar) (5,85 g) ve agar (1,20 g) karışımı saf su ile 150 mL’ye tamamlandı ve kaynatıldı. Hazırlanan bu besiyeri soğumadan Universal marka 15 adet 22 mL’lik patolojik cam şişelerin yarısına kadar dağıtılıp otoklavda 121°C’de 20 dakika sterilize edildi. Steril edilen şişelerdeki erimiş besiyeri donmadan önce yaklaşık 45 derecelik bir eğimle soğumaya bırakılarak yatık agar besiyerleri hazırlandı.

3.3. Küf Kültürlerinin Hazırlanması

Oda sıcaklığında 15 gün süresince çoğalmaya bırakılmak üzere, stok fungal kültüründeki küflerin bir kısmı yatık agar besiyerlerinin 3 tanesine steril koşullarda aktarıldı. 15 günde bir 3 yeni yatık agar besiyerine steril şartlarda aktarılmak üzere, hazırlanan yeni yatık agar kültürlerinin en gelişmişindeki küfler seçildi. Aktarma işlemi 2 kez tekrarlandıktan sonra elde edilen en taze ve en gelişmiş yatık agar kültüründeki küfler biyotransformasyon çalışmasında kullanıldı.

3.4. Küflere Ait Besiyerlerinin Hazırlanması

C. sphaerospermum MRC 70266 ve *U. chartarum* MRC 72584 küflerine ait besiyerlerinin her birini hazırlamak için glukoz (20 g), pepton (5 g) maya ekstraktı (5 g) 1 L distile su içerisinde çözülerek karıştırıldı (Shebany, 2012).

3.5. Biyotransformasyon Çalışması

Hazırlanan 1 L besiyeri çözeltileri her bir küf için 10 adet 250 mL erlene paylaştırılarak otoklavda sterilize edildi. Daha önce hazırlanan en taze alt kültürdeki küflerin her biri 10 erlene steril şartlar altında aktarıldı ve bu erlenler yeterli miktarda küf oluşabilmesi için 28°C sıcaklıkta, çalkalamalı inkübatörde (160 rpm), 3 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. Üçüncü günün sonunda her bir biyotransformasyon çalışması için testosteron (4) (1 g), DMF (10 mL) içerisinde çözülerek yeterli miktarda küf içeren erlenlere eşit hacimlerde ve steril şartlarda ilave edildikten sonra, 5 gün boyunca 28°C'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı (160 rpm).

Biyotransformasyon çalışmalarının takibi birer adet kontrol erleni ile sağlandı. Kontrol erlenleri için sadece inoküle edilmemiş steril besiyeri ve substrat kullanıldı. Biyotransformasyon çalışmalarındaki bütün işlemler kontrol erlenleri içinde uygulandı. Kontrol erlenlerinden İTK alındığında herhangi bir metabolit gözlemlenmediği için biyotransformasyon çalışmalarından elde edilen metabolitlerin gerçek biyotransformasyon ürünleri olduğu sonucuna varıldı. Ayrıca inkübasyonlar boyunca tüm erlenlerdeki besiyeri görünümünde ve küf gelişimlerinde değişimler olup olmadığı da takip edildi ve herhangi bir farklılık gözlenmedi.

3.6. Metabolitlerin Saflaştırılması ve Yapılarının Tayini

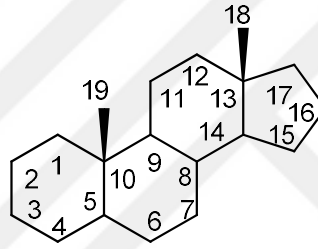
İnkübasyon sonrasında her bir besiyeri bir Buchner hunisi kullanılarak filtrasyon işlemi ile küf kültürlerine ait misellerden süzülerek iki ayrı filtrat (süzüntü) olarak ayrıldı. Buchner hunisinde kalan miselleri yıkamak için etil asetat (500 mL) kullanıldı. Filtratlardaki steroidleri su fazından organik faza çekmek için her seferinde etil asetat (1 L) kullanılarak 3 ayrı ekstraksiyon gerçekleştirildi. Ekstraksiyon sonrasında ekstraktlara susuz sodyum sülfat ilave edilerek ortamda bulunabilecek su giderildi. Ekstraktlar evaporatör ile uzaklaştırıldıktan sonra her bir biyotransformasyon çalışması için farklı bir yağimsı madde elde edildi. Elde edilen yağimsı maddelerin her biri substratı karşılaştırmak suretiyle İTK çalışmaları gerçekleştirildi. Yağimsı maddeler içerisindeki steroidleri ayırmak için adsorban

olarak silika jel 60 (Merck 107734, 230-400 mesh) kullanılarak bir kolon kromatografisi çalışmaları gerçekleştirildi. Steroidler *n*-hekzan içerisinde artan etil asetat derişimleri elüent olarak kullanılarak kolonlardan ayrıldı. Kolonlardan karışık olarak gelen steroidler içerisinde adsorban olarak aktivite derecesi I olan alüminyum oksit 90 aktif nötral (Merck 101077) içeren çok daha küçük kolonlar kullanılarak 2-3 saat içerisinde ayrıldı. Kolonlardan ayrılan steroidlerin yapılarının tayin edilmesi amacıyla substrat ve elde edilen her bir metabolite ait erime noktası, NMR ve IR spektrumları karşılaştırıldı.



BÖLÜM 4. DENEYSEL BULGULAR

Testosteron (4) bileşiğinin *C. sphaerospermum* MRC 70266 ve *U. chartarum* MRC 72584 küfleri ile biyotransformasyonundan elde edilen bileşiklerin yapılarını belirlemek için substrat ve elde edilen bileşiklerin erime noktaları, ^1H NMR, ^{13}C NMR ve IR spektrumları karşılaştırıldı. Biyotransformasyonu gerçekleştirilen testosteron (4) bileşiğinin karbon iskeleti numaralandırılması Şekil 4.1.'deki gibidir.



Şekil 4.1. Substratın karbon iskeleti

Testosteron (4) (1 g) bileşiğinin *C. sphaerospermum* MRC 70266 ile 27°C'de 5 gün süren inkübasyonu sonrasında elde edilen yağimsı madde (1759 mg) ile gerçekleştirilen kolon kromatografisi çalışmasından değişime uğramayan başlangıç maddesi (97 mg) ile 6 β -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (16) (%8), 6 β ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (17) (%40), 7 β ,17 β -dihidroksiandrostan-3-on (18) (%7), 15 α ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (19) (%5), 6 β ,16 β ,17 β -trihidroksiandrost-4-en-3-on (20) (%3) ve 6 β ,12 β ,17 β -trihidroksiandrost-4-en-3-on (21) (%2) bileşikleri elde edildi (Şekil 4.2.).

6 β -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (16), (84 mg, %8)

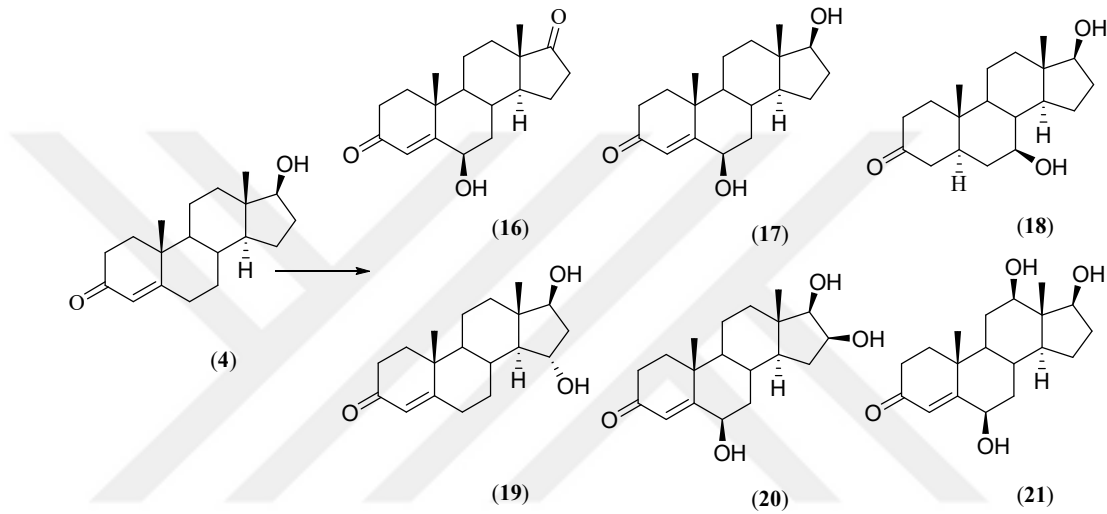
%50'lik çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde asetondan prizmalar şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 189-190°C, lit., 190-191°C (Hanson ve ark., 1996).

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3415, 1740 ve 1670.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,91 (3H, s, 18-H); 1,38 (3H, s, 19-H); 4,36 (1H, bs, 6 α -H); 5,80 (1H, s, 4-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 220,62 (C-17); 200,33 (C-3); 168,06 (C-5); 126,34 (C-4); 72,58 (C-6); 53,57 (C-9); 50,81 (C-14); 47,57 (C-13); 38,00 (C-10); 37,17 (C-7); 36,97 (C-1); 35,71 (C-16); 34,09 (C-2); 31,19 (C-12); 29,34 (C-8); 21,64 (C-15); 20,19 (C-11); 19,46 (C-19); 13,71 (C-18).



Şekil 4.2. Substratın *C. sphaerospermum* ile biyotransformasyonu

6 β ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (**17**), (422 mg, %40)

%60'lık çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde etil asetatın prizmalar şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 212-213°C, lit., 215-220°C (Hanson ve ark., 1996).

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3405, 1650 ve 1620.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,82 (3H, s, 18-H); 1,38 (3H, s, 19-H); 3,65 (1H, t, $J = 8,5$ Hz, 17 α -H); 4,36 (1H, bs, 6 α -H); 5,80 (1H, s, 4-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 200,41 (C-3); 168,32 (C-5); 126,32 (C-4); 81,64 (C-17); 72,96 (C-6); 53,64 (C-9); 50,44 (C-14); 42,88 (C-13); 38,01 (C-10); 38,01 (C-12); 37,09 (C-7); 36,37 (C-1); 34,19 (C-2); 30,42 (C-16); 29,75 (C-8); 23,25 (C-15); 20,56 (C-11); 19,51 (C-19); 11,07 (C-18).

7 β ,17 β -Dihidroksiandrostan-3-on (**18**), (75 mg, %7)

%70'lik çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde etil asetatın iğneler şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 202-203°C, lit., 196-197°C (Farooq ve Tahara, 2000).

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3325 ve 1710.

^1H NMR (CDCl_3): 0,74 (3H, s, 19-H); 0,83 (3H, s, 18-H); 3,65 (2H, m, 7 α -H ve 17 α -H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 214,07 (C-3); 81,12 (C-17); 69,63 (C-7); 59,24 (C-9); 51,29 (C-14); 43,29 (C-13); 42,25 (C-12); 39,91 (C-5); 37,81 (C-8); 36,93 (C-1); 36,50 (C-10); 34,61 (C-4); 34,24 (C-2); 29,96 (C-6); 29,44 (C-16); 23,04 (C-15); 22,98 (C-19); 20,26 (C-11); 10,96 (C-18).

15 α ,17 β -Dihidroksiandrosta-4-en-3-on (**19**), (53 mg, %5)

%90'lik çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde asetondan iğneler şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 96-97°C, lit., 93-94°C (Peart ve ark., 2011).

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3400, 1660 ve 1650.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,80 (3H, s, 18-H); 1,20 (3H, s, 19-H); 3,89 (1H, t, $J = 8,5$ Hz, 17 α -H); 4,11 (1H, m, 15 β -H); 5,73 (1H, s, 4-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 199,61 (C-3); 171,07 (C-5); 123,76 (C-4); 78,70 (C-17); 72,46 (C-15); 58,43 (C-14); 53,81 (C-9); 44,31 (C-13); 42,57 (C-16); 38,63 (C-10); 36,56 (C-12); 35,68 (C-1); 35,29 (C-8); 33,89 (C-2); 32,72 (C-6); 32,14 (C-7); 20,50 (C-11); 17,48 (C-19); 12,56 (C-18).

6 β ,16 β ,17 β -Trihidroksiandrosta-4-en-3-on (**20**), (34 mg, %3)

Etil asetat ile elüsyon neticesinde etil asetatın küpler şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 169-170°C.

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3395 ve 1660.

Elementel analiz: $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_4$ için %71,22 C ve %8,81 H hesaplanırsa da %71,15 C ve %8,70 H gözlemlendi.

^1H NMR (CDCl_3): 0,88 (3H, s, 18-H); 1,39 (3H, s, 19-H); 3,38 (1H, d, $J = 7,3$ Hz, 17 α -H); 4,16 (1H, m, 16 α -H); 4,34 (1H, bs, 6 α -H); 5,81 (1H, s, 4-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 200,47 (C-3); 168,14 (C-5); 126,38 (C-4); 80,62 (C-17); 72,90 (C-6); 69,85 (C-16); 53,81 (C-9); 46,94 (C-14); 42,43 (C-13); 38,15 (C-10); 38,04 (C-7); 37,04 (C-1); 36,98 (C-12); 34,91 (C-15); 34,19 (C-2); 29,17 (C-8); 20,27 (C-11); 19,52 (C-19); 11,88 (C-18).

6 β ,12 β ,17 β -Trihidroksiandrost-4-en-3-on (**21**), (23 mg, %2)

Etil asetat ile elüsyon neticesinde etil asetatтан iğneler şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 200-201°C.

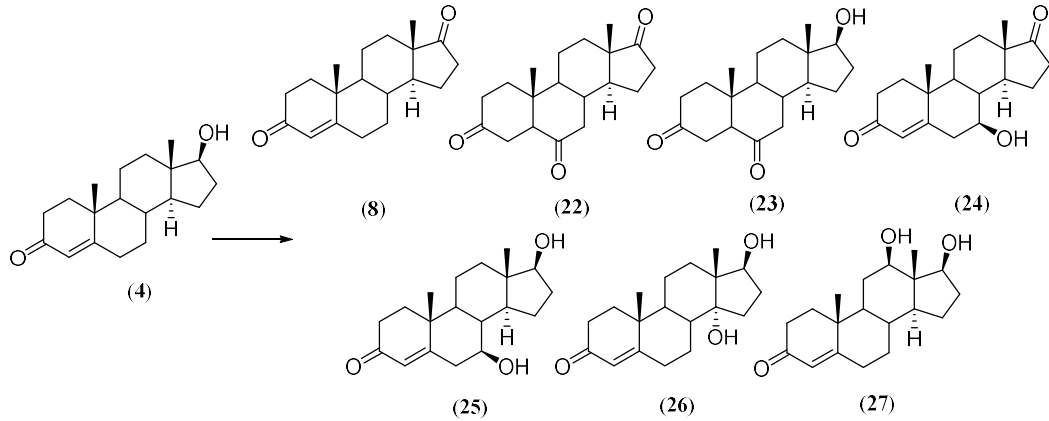
IR ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3445 ve 1680.

Elementel analiz: $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_4$ için %71,22 C ve %8,81 H hesaplanırsa da %71,10 C ve %8,73 H gözlemlendi.

^1H NMR (CDCl_3): 0,87 (3H, s, 18-H); 1,39 (3H, s, 19-H); 3,50 (1H, dd, $J = 5,0$ ve 11,0 Hz, 12 α -H); 3,89 (1H, t, $J = 8,5$ Hz, 17 α -H); 4,35 (1H, bs, 6 α -H); 5,81 (1H, s, 4-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 200,26 (C-3); 167,67 (C-5); 126,53 (C-4); 81,87 (C-17); 78,99 (C-12); 72,81 (C-6); 52,46 (C-9); 48,51 (C-14); 46,98 (C-13); 37,95 (C-10); 37,43 (C-7); 35,02 (C-1); 34,13 (C-2); 30,01 (C-16); 29,33 (C-11); 28,84 (C-8); 23,07 (C-15); 19,44 (C-19); 6,02 (C-18).

Testosteron (**4**) (1 g) bileşiğinin *U. chartarum* MRC 72584 ile 28°C'de 5 gün süren inkübasyonu sonrasında elde edilen yağimsı madde (1343 mg) ile gerçekleştirilen kolon kromatografisi çalışmasından değişmeyen başlangıç maddesi (80 mg) ile androst-4-en-3,17-dion (**8**) (%3), 5 α -androstan-3,6,17-trion (**22**) (%4), 17 β -hidroksi-5 α -androstan-3,6-dion (**23**) (%9), 7 β -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**24**) (%3), 7 β ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (**25**) (%11), 14 α ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (**26**) (%12) ve 12 β ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (**27**) (%9) bileşikleri elde edildi (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. Substratın *U. chartarum* ile biyotransformasyonu

Androst-4-en-3,17-dion (**8**), (30 mg, %3)

%30'luk çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde asetondan prizmalar şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 173-174°C, lit., 170-172 °C, (Şwizdor ve ark., 2017).

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 1736 ve 1440.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 0,91 (3H, s, 18-H); 1,21 (3H, s, 19-H); 5,75 (1H, s, 4-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 220,50 (C-17); 199,40 (C-3); 170,54 (C-5); 123,58 (C-4); 53,57 (C-9); 50,58 (C-14); 47,33 (C-13); 38,48 (C-10); 35,44 (C-1); 35,44 (C-16); 34,89 (C-8); 33,69 (C-2); 32,38 (C-6); 31,04 (C-7); 30,07 (C-12); 21,55 (C-15); 20,44 (C-11); 17,21 (C-19); 13,52 (C-18).

5 α -Androstan-3,6,17-trion (**22**), (44 mg, %4)

%40'luk çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde etil asetatın yassı pulcuklar şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 193-194°C, lit., 196-197°C (Numazawa ve ark., 1988).

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 1740, 1720 ve 1700.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 0,88 (3H, s, 18-H); 0,97 (3H, s, 19-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 219,54 (C-17); 210,78 (C-3); 208,16 (C-6); 57,39 (C-5); 53,34 (C-9); 51,39 (C-14); 48,00 (C-13); 45,22 (C-7); 41,09 (C-4); 37,87 (C-10); 37,35 (C-1); 37,21 (C-8); 36,82 (C-2); 35,54 (C-16); 30,97 (C-12); 21,56 (C-15); 20,84 (C-11); 13,72 (C-18); 12,52 (C-19).

17 β -Hidroksi-5 α -androstan-3,6-dion (**23**), (95 mg, %9)

%50'lik çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde asetondan iğneler şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 233-234°C, lit., 230-231°C (Numazawa ve ark., 1988).

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3550 ve 1710.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 0,80 (3H, s, 18-H); 1,00 (3H, s, 19-H); 3,67 (1H, t, J = 8,5 Hz, 17 α -H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 211,35 (C-3); 208,86 (C-6); 81,07 (C-17); 57,27 (C-5); 53,25 (C-9); 51,02 (C-14); 45,88 (C-7); 43,26 (C-13); 41,07 (C-4); 37,84 (C-1); 37,84 (C-10); 37,16 (C-2); 36,77 (C-12); 35,98 (C-8); 29,98 (C-16); 23,00 (C-15); 21,12 (C-11); 12,42 (C-19); 10,99 (C-18).

7 β -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**24**), (32 mg, %3)

%50'lik çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde asetondan yassı pulcuklar şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 222-223°C, lit., 218-220°C (Holland ve Thomas, 1982).

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3465, 1670 ve 1620.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 0,94 (3H, s, 18-H); 1,23 (3H, s, 19-H); 3,53 (1H, m, 7 α -H); 5,76 (1H, s, 4-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 220,70 (C-17); 199,17 (C-3); 166,75 (C-5); 124,94 (C-4); 74,21 (C-7); 50,71 (C-9); 50,46 (C-14); 48,00 (C-13); 42,66 (C-8); 42,45 (C-6); 38,01 (C-10); 35,90 (C-16); 35,56 (C-1); 33,84 (C-2); 31,15 (C-12); 24,92 (C-15); 20,30 (C-11); 17,32 (C-18); 13,92 (C-19).

7 β ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (**25**), (117 mg, %11)

%60'lık çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde asetondan prizmalar şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 200-201°C, lit., 197.5-199.5°C (Labaree ve ark., 1997).

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3415, 1660 ve 1610.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 0,80 (3H, s, 18-H); 1,21 (3H, s, 19-H); 3,44 (1H, m, 7 α -H); 3,63 (1H, t, J = 8,5 Hz, 17 α -H); 5,75 (1H, s, 4-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 199,36 (C-3); 167,48 (C-5); 124,72 (C-4); 81,09 (C-17); 74,92 (C-7); 50,69 (C-14); 49,88 (C-9); 43,51 (C-13); 43,06 (C-8); 42,24 (C-6); 38,02 (C-10); 36,28 (C-12); 35,65 (C-1); 33,91 (C-2); 30,72 (C-16); 26,33 (C-15); 20,55 (C-11); 17,32 (C-19); 11,10 (C-18).

14 α ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (**26**), (128 mg, %12)

%60'lık çözügen sistemiyle elüsyon neticesinde asetondan iğneler şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 180-181°C, lit., 181-185°C (Hanson ve ark., 1996).

IR ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3450, 1660 ve 1640.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 0,89 (3H, s, 18-H); 1,18 (3H, s, 19-H); 4,28 (1H, t, $J = 7,8$ Hz, 17 α -H); 5,70 (1H, s, 4-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 199,89 (C-3); 171,24 (C-5); 123,67 (C-4); 83,19 (C-14); 78,41 (C-17); 46,85 (C-13); 46,65 (C-9); 38,78 (C-10); 38,64 (C-8); 35,59 (C-1); 33,81 (C-2); 32,53 (C-12); 32,48 (C-6); 29,44 (C-16); 28,44 (C-7); 26,01 (C-15); 19,60 (C-11); 17,12 (C-19); 14,83 (C-18).

12 β ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (**27**), (95 mg, %9)

%70'lik çözügen sistemiyle elüsyon neticesinde asetondan iğneler şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 120-121°C, lit., 121-125°C (Tweit ve ark., 1962).

IR ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3370, 1735 ve 1655.

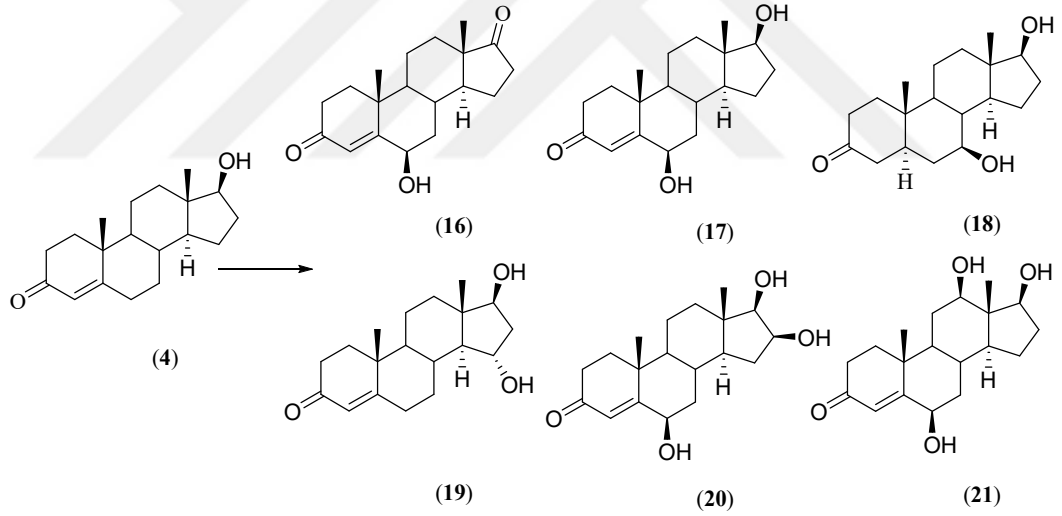
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 0,80 (3H, s, 18-H); 1,16 (3H, s, 19-H); 3,48 (1H, dd, $J = 5,0$ ve 11,0 Hz, 12 α -H); 3,85 (1H, t, $J = 8,5$ Hz, 17 α -H); 5,71 (1H, s, 4-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 199,72 (C-3); 170,86 (C-5); 123,97 (C-4); 81,57 (C-17); 78,75 (C-12); 52,49 (C-9); 48,50 (C-14); 46,88 (C-13); 38,48 (C-10); 35,45 (C-1); 34,57 (C-8); 33,77 (C-2); 32,62 (C-6); 30,83 (C-7); 29,81 (C-16); 29,27 (C-11); 23,01 (C-15); 17,19 (C-19); 6,00 (C-18).

BÖLÜM 5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

C. sphaerospermum MRC 70266 ve *U. chartarum* MRC 72584 küfleri ile gerçekleştirilen biyotransformasyon çalışmaları sonucunda elde edilen bileşiklerin yapılarını tayin amacıyla, testosteron (4) ve söz konusu bileşiklerin erime noktaları, ^1H NMR, ^{13}C NMR ve IR spektrumları karşılaştırıldı.

Testosteron (4) bileşiğinin *C. sphaerospermum* MRC 70266 ile beş gün inkübasyonu altı metabolit verdi (Şekil 5.1.).



Şekil 5.1. Substratın *C. sphaerospermum* ile biyotransformasyonu

İlk metabolit 6β-hidroksiandro-4-en-3,17-dion (16) olarak tanımlandı. Metabolitin ^1H NMR spektrumu δ_{H} 4,36 ppm'de (1H, bs) 6β-hidroksil grubunun varlığını gösteren yeni bir rezonans verdi (Hanson ve ark., 1996). Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu başlangıç maddesinin δ_{C} 81,25 ppm'deki C-17 rezonansını vermezken δ_{C} 220,62 ppm'de yeni bir C atomu rezonansı verdi (Tablo 5.1.). Bu sonuçlar C-17'de bir oksidasyon gerçekleşmiş olduğunu gösterdi.

Tablo 5.1. Testosteron (4) ve bazı metabolitleri için ^{13}C NMR değerleri

C atom	(4)	(16)	(17)	(18)	(19)	(20)	(21)
1	35.48	36.97	36.37	36.93	35.68	37.04	35.02
2	33.74	34.09	34.19	34.24	33.89	34.19	34.13
3	199.64	200.33	200.41	214.07	199.61	200.47	200.26
4	123.87	126.34	126.32	34.61	123.76	126.38	126.53
5	171.52	168.06	168.32	39.91	171.07	168.14	167.67
6	32.63	72.58	72.96	29.96	32.72	72.90	72.81
7	31.33	37.17	37.09	69.63	32.14	38.04	37.43
8	35.58	29.34	29.75	37.81	35.29	29.17	28.84
9	53.69	53.57	53.64	59.24	53.81	53.81	52.46
10	38.45	38.00	38.01	36.50	38.63	38.15	37.95
11	20.10	20.19	20.56	20.26	20.50	20.27	29.33
12	36.21	31.19	38.01	42.25	36.56	36.98	78.99
13	42.61	47.57	42.88	43.29	44.31	42.43	46.98
14	50.24	50.81	50.44	51.29	58.43	46.94	48.51
15	23.14	21.64	23.25	23.04	72.46	34.91	23.07
16	29.51	35.71	30.42	29.44	42.57	69.85	30.01
17	81.25	220.62	81.64	81.12	78.70	80.62	81.87
18	10.93	13.71	11.07	10.96	12.56	11.88	6.02
19	17.17	19.46	19.51	22.98	17.48	19.52	19.44

İkinci metabolit 6 β ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (17) olarak tanımlandı. Metabolitin ^1H NMR spektrumu sırası ile 17 β - ve 6 β -hidroksil gruplarının varlığını gösteren karakteristik rezonansları δ_{H} 3,65 ppm (1H, t, $J = 8,5$ Hz) ve δ_{H} 4,36 ppm'de (1H, bs) verdi (Hanson ve ark., 1996). Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu δ_{C} 72,96 ppm ve δ_{C} 81,64 ppm'de sırası ile 6 β - ve 17 β -hidroksil gruplarının varlığını gösteren karakteristik rezonanslar verdi.

Üçüncü metabolit 7 β ,17 β -dihidroksiandrostan-3-on (18) olarak tanımlandı. Metabolitin ^1H NMR spektrumunun başlangıç maddesinin δ_{H} 5,74 ppm'deki 4-H rezonansını (1H, s) vermemesi A halkasındaki çift bağın hidrojenasyona uğradığını

düşündürdü. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu ise δ_{C} 69,93 ppm ve δ_{C} 81,12 ppm'de sırası ile 7 β - ve 17 β -hidroksil gruplarının varlığını gösteren yeni rezonanslar verdi (Farooq and Tahara, 2000). Metabolitin ^1H NMR spektrumu δ_{H} 3,65 ppm'de 7 β - ve 17 β -hidroksil gruplarının varlığını gösteren ve çakışmış olan iki rezonans verdi (2H, m).

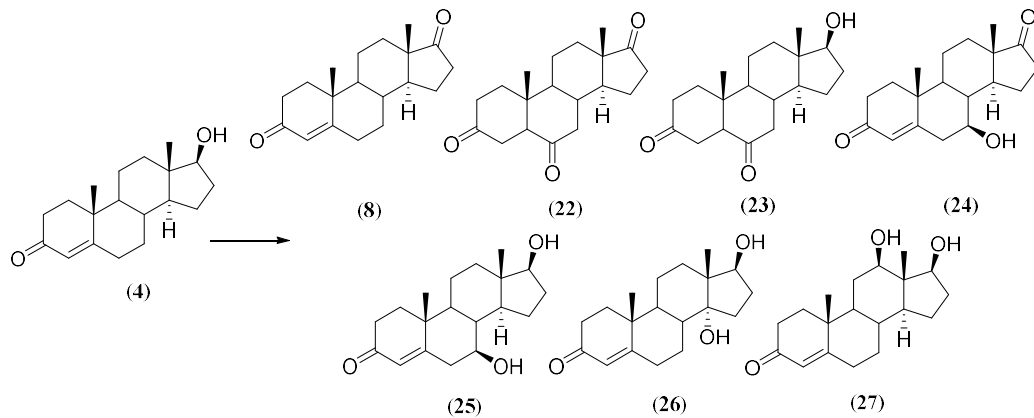
Dördüncü metabolit 15 α ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (**19**) olarak tanımlandı. Metabolitin ^1H NMR spektrumu δ_{H} 3,89 ppm (1H, t, $J = 8,5$ Hz) ve δ_{H} 4,11 ppm'de (1H, m) sırası ile 17 β - ve 15 α -hidroksil gruplarının varlığını gösteren karakteristik rezonanslar verdi (Peart ve ark., 2011). Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu ise δ_{C} 72,46 ppm ve δ_{C} 78,70 ppm'de sırası ile 15 α - ve 17 β -hidroksil gruplarının varlığını gösteren yeni rezonanslar verdi.

Beşinci metabolit 6 β ,16 β ,17 β -trihidroksiandrost-4-en-3-on (**20**) olarak tanımlandı. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu sırası ile 6 β - ve 17 β -hidroksil gruplarının varlığını gösteren karakteristik rezonansları δ_{C} 72,90 ve δ_{C} 80,62 ppm'de verdi (Hanson ve ark., 1996). Metabolitin NMR spektrumları δ_{H} 4,16 ppm (1H, m) ve δ_{C} 69,85 ppm'de yeni bir hidroksil grubunun varlığını gösteren rezonanslar verdi. Karakteristik bir triplet olan 17 α -H rezonansının (Bridgeman ve ark., 1970) C-16'daki bir protondan kaynaklanan yarıma sebebi ile dublet olarak gözlemlendiği düşünüldü. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumunun C-15 için aşağı alana doğru bir kayma (Δ 11,77 ppm) gösterirken C-14 için ise yukarı alana doğru bir kayma (Δ 3,30 ppm) göstermesi C-16'da yeni bir hidroksil grubunun varlığını düşündürdü. Literatür çalışmaları ile kıyaslandığında karakteristik 17 α -H rezonansının yarılmasındaki değişim bir 16 β -hidroksil grubunun varlığını gösterdi (Świzdor ve ark., 2017). Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu 19 karbon rezonansı verirken DEPT spektrumu ise iki metil, altı metilen, yedi metin ve dört kuarterner karbon rezonansları verdi. Bu sonuçlar tanımlanan triolün kimyasal yapısıyla uyum gösterdi. 6 β ,16 β ,17 β -Trihidroksiandrost-4-en-3-on (**20**) yeni bir metabolit olarak tanımlandı.

Altıncı metabolit 6 β ,12 β ,17 β -trihidroksiandrost-4-en-3-on (**21**) olarak tanımlandı. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu sırası ile 6 β - ve 17 β -hidroksil gruplarının varlığını

gösteren karakteristik rezonansları δ_C 72,81 ve δ_C 81,87 ppm'de verdi (Hanson ve ark., 1996). Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu ayrıca bir 12β -hidroksil grubunun varlığını gösteren diğer bir karakteristik rezonansı ise δ_C 78,99 ppm'de verdi (Hunter ve ark., 2008). Metabolitin ^{13}C NMR spektrumunun C-11 için aşağı alana doğru bir kayma (Δ 9,23 ppm) gösterirken C-14 için ise yukarı alana doğru bir kayma (Δ 1,73 ppm) göstermesi 12β -hidroksil grubunun varlığını daha fazla doğruladı. Metabolitin DEPT spektrumunun iki metil, altı metilen, yedi metin ve dört kuarterner karbon rezonansları vermesi tanımlanan triolün kimyasal yapısıyla uyum gösterdi. $6\beta,12\beta,17\beta$ -Trihidroksiandrost-4-en-3-on (**21**) bileşiği yeni bir metabolit olarak tanımlandı.

Testosteron (**4**) bileşiğinin *U. chartarum* MRC 72584 ile 5 gün süren inkübasyonu, yedi metabolit verdi (Şekil 5.2.). İlk metabolit androst-4-en-3,17-dion (**8**) olarak belirlendi. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu başlangıç maddesinin δ_C 81,25 ppm'deki C-17 rezonansını içermezken C-17'de bir oksidasyon gerçekleştiğini işaret eden yeni bir rezonansı δ_C 220,50 ppm'de verdi (Tablo 5.2.). Metabolitin başlangıç maddesinin δ_H 3,65 ppm'deki karakteristik 17α -H rezonansını (1H, t, $J = 8,5$ Hz) göstermemesi C-17'de bir oksidasyonun gerçekleşmiş olduğunu doğruladı.



Şekil 5.2. Substratın *U. chartarum* ile biyotransformasyonu

İkinci metabolit 5α -androst-3,6,17-trion (**22**) olarak tanımlandı. Metabolitin 1H NMR spektrumu başlangıç maddesinin δ_H 5,74 ppm'deki 4-H rezonansını (1H, s) göstermemesi A halkasındaki çift bağın hidrojenasyona uğramış olduğunu düşündürdü. Bu değişim metabolitin ^{13}C NMR spektrumunun başlangıç maddesinin

δ_C 123,87 ppm ve 171,52 ppm'deki çift bağ rezonanslarını içermemesi ile doğrulandı. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu değerlerinin literatürdeki çalışmalar ile karşılaştırılması sonucunda başlangıç maddesindeki α,β -doymamış sistemin α -yüzünden indirgendiğini gösterdi (Al-Awadi ve ark., 2005). Metabolitin ^{13}C NMR spektrumunun başlangıç maddesinin δ_C 32,63 ppm'deki C-6 rezonansı yerine δ_C 208,16 ppm'de yeni bir karbon rezonansı vermesi C-6'daki hidroksilasyonu takiben bir oksidasyonun gerçekleştiğini gösterdi. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumunun başlangıç maddesinin δ_C 81,25 ppm'deki C-17 rezonansını vermeyip δ_C 219,54 ppm'de yeni bir karbon rezonansı vermesi C-17'de bir oksidasyonun gerçekleşmiş olduğunu gösterdi. Metabolitin NMR spektrum değerleri literatür çalışmaları ile karşılaştırılabilir olarak bulundu (Al-Awadi ve ark., 2005).

Üçüncü metabolit 17 β -hidroksi-5 α -androstan-3,6-dion (**23**) olarak tanımlandı. Metabolitin 1H NMR spektrumu başlangıç maddesinin δ_H 5,74 ppm'deki 4-H rezonansını (1H, s) içermemesi A halkasındaki çift bağın doyurulduğunu düşündürdü. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumunda başlangıç maddesinin δ_C 123,87 ppm ve 171,52 ppm'deki çift bağ rezonanslarının yerlerine δ_C 41,07 ppm ve 57,27 ppm'de yeni rezonanslar içermesi çift bağın doyurulduğunu gösterdi. Literatür değerleri ile karşılaştırma sonucunda α,β -doymamış sistemin α -yüzünden indirgendiği anlaşıldı (Al-Awadi ve ark., 2005). Metabolitin ^{13}C NMR spektrumunda başlangıç maddesinin δ_C 32,63 ppm'deki C-6 rezonansını vermeyip δ_C 208,86 ppm'de yeni bir rezonans vermesi C-6'da oluşmuş bir hidroksil grubunun oksidasyona uğradığını gösterdi. Metabolitin başlangıç maddesinin C-17 rezonansını δ_C 81,07 ppm'de verdiği gözlemlendi. Metabolitin NMR değerlerinin literatürdekiler ile uyumlu olduğu belirlendi (Al-Awadi ve ark., 2005).

Tablo 5.2. Testosteron (4) ve diğer bazı metabolitleri için ^{13}C NMR değerleri

C atom	(4)	(8)	(22)	(23)	(24)	(25)	(26)	(27)
1	35.48	35.44	37.35	37.84	35.56	35.65	35.59	35.45
2	33.74	33.69	36.82	37.16	33.84	33.91	33.81	33.77
3	199.64	199.40	210.78	211.35	199.17	199.36	199.89	199.72
4	123.87	123.58	41.09	41.07	124.94	124.72	123.67	123.97
5	171.52	170.54	57.39	57.27	166.75	167.48	171.24	170.86
6	32.63	32.38	208.16	208.86	42.45	42.24	32.48	32.62
7	31.33	31.04	45.22	45.88	74.21	74.92	28.44	30.83
8	35.58	34.89	37.21	35.98	42.66	43.06	38.64	34.57
9	53.69	53.57	53.34	53.25	50.71	49.88	46.65	52.49
10	38.45	38.48	37.87	37.84	38.01	38.02	38.78	38.48
11	20.10	20.44	20.84	21.12	20.30	20.55	19.60	29.27
12	36.21	30.07	30.97	36.77	31.15	36.28	32.53	78.75
13	42.61	47.33	48.00	43.26	48.00	43.51	46.85	46.88
14	50.24	50.58	51.39	51.02	50.46	50.69	83.19	48.50
15	23.14	21.55	21.56	23.00	24.92	26.33	26.01	23.01
16	29.51	35.44	35.54	29.98	35.90	30.72	29.44	29.81
17	81.25	220.50	219.54	81.07	220.70	81.09	78.41	81.57
18	10.93	13.52	13.72	10.99	17.32	11.10	14.83	6.0
19	17.17	17.21	12.52	12.42	13.92	17.32	17.12	17.19

Dördüncü metabolit 7 β -hidroksiandroster-4-en-3,17-dion (24) olarak tanımlandı. Metabolitin NMR spektrumu δ_{H} 3,53 ppm (1H, m) ve δ_{C} 74,21 ppm'de bir 7 β -hidroksil grubunun varlığına işaret eden karakteristik rezonanslar verdi (Holland ve Thomas, 1982). Metabolit ^{13}C NMR spektrumunun C-8 için aşağı alana doğru bir kayma (Δ 7,08 ppm) gösterirken C-9 için ise yukarı alana doğru bir kayma (Δ 2,98 ppm) göstermesi bir 7 β -hidroksil grubunun varlığına daha da netleştirdi. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu başlangıç maddesinin δ_{C} 81,25 ppm'deki C-17 rezonansını vermeyip δ_{C} 220,70 ppm'de yeni bir rezonans vermesi C-17'de bir oksidasyonun gerçekleşmiş olduğunu gösterdi. Metabolitin NMR değerlerinin literatürdeki değerler ile uyumlu olduğu tespit edildi (Holland ve Thomas, 1982).

Beşinci metabolit 7 β ,17 β -dihidroksiandroster-4-en-3-on (25) olarak tanımlandı. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu δ_{C} 74,92 ppm'de bir 7 β -hidroksil grubunun

varlığını gösteren karakteristik bir rezonans verdi (Labaree ve ark., 1997). Metabolit ^{13}C NMR spektrumunun C-8 için aşağı alana doğru bir kayma (Δ 7,48 ppm) verirken C-9 için ise yukarı alana doğru bir kayma (Δ 3,81 ppm) vermesi bir 7β -hidroksil grubunun varlığına daha da belirginleştirdi. Metabolitin başlangıç maddesinin karakteristik 17α -H rezonansını (1H, t, $J = 8,5$ Hz) δ_{H} 3,63 ppm'de vermesi 17β -hidroksil grubunun korunduğunu gösterdi.

Altıncı metabolit $14\alpha,17\beta$ -dihidroksiandroster-4-en-3-on (**26**) olarak tanımlandı. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu δ_{C} 83,19 ppm'de yeni bir rezonans vermesine rağmen ^1H NMR spektrumunun 3-5 ppm aralığında yeni bir rezonans vermemesi tersiyer bir hidroksil grubunun varlığını düşündürdü. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumundaki C-8 ve C-15 için aşağı alana doğru kaymalar (sırası ile Δ 3,06 ppm ve Δ 2,87 ppm) ile C-7 ve C-16 için yukarı alana kaymalar (sırası ile Δ 2,89 ppm ve 0,07 ppm) C-14'de bir hidroksil grubunun varlığını daha da netleştirdi. Metabolit ^1H NMR spektrumunun 17α -H rezonansı için aşağı alana doğru önemli bir kayma (Δ 0,63 ppm) göstermesi mevcut bir 14α -hidroksil grubu ile diaksiyal etkileşimi olduğunu gösterdi (Hanson ve ark., 1996). Metabolitin NMR değerlerinin literatür çalışmaları ile uyumlu olduğu gözlemlendi (Hanson ve ark., 1996).

Yedinci metabolit $12\beta,17\beta$ -dihidroksiandroster-4-en-3-on (**27**) olarak tanımlandı. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu δ_{C} 78,75 ppm'de bir 12β -hidroksil grubunun varlığını gösteren karakteristik bir rezonans verdi (Hunter ve ark., 2008). Metabolitin ^{13}C NMR spektrumundaki C-11 ve C-13 için aşağı alana doğru kaymalar (sırası ile Δ 9,17 ppm ve Δ 4,27 ppm) ve C-9 ve C-14 için yukarı alana doğru olan kaymalar (sırası ile Δ 1,20 ppm ve Δ 1,74 ppm) bir 12β -hidroksil grubunun varlığını daha da doğruladı. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumunun δ_{C} 81,57 ppm'deki rezonansı 17β -hidroksil grubunun korunduğunu gösterdi.

Tablo 5.3.'den de görülebileceği gibi *C. sphaerospermum* MRC 70266 küfü testosteronu (**4**) ağırlıklı olarak C-6 β pozisyonunda hidroksillerken C-7 β , C-12 β , C-15 α ve C-16 β pozisyonlarında da düşük verimler ile hidroksillenmeler gözlemlendi.

Ayrıca C-17’de düşük verimli bir oksidasyon ile yine düşük verimli bir 5 α -indirgenmesi de gözlemlendi (Tablo 5.3.).

Tablo 5.3. *C. sphaerospermum* MRC 70266 küfü ile metabolit verimleri

Substrat	Metabolit	% Verim
Testosteron (4)		
	6 β -Hidroksiandrost androst-4-en-3,17-dion (16)	8
	6 β ,17 β -Dihidroksiandrost androst-4-en-3-on (17)	40
	7 β ,17 β - Dihidroksiandrost androst-3-on (18)	7
	15 α ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (19)	5
	6 β ,16 β ,17 β -Trihidroksiandrost-4-en-3-on (20)	3
	6 β ,12 β ,17 β -Trihidroksiandrost-4-en-3-on (21)	2

Tablo 5.4.’den de görülebileceği gibi *U. chartarum* MRC 72584 küfü testosteron (4) bileşiğini C-6 β , C-7 β , C-12 β ve C-14 α pozisyonlarında hidroksille. İlave olarak C-6 β pozisyonundaki düşük verimli bir hidroksillenmeden sonra C-6’da gerçekleşen bir oksidasyon, bu hidroksillenmeden önce veya sonra gerçekleşen düşük verimli bir 5 α -indirgenmesi ile C-17’de gerçekleşen düşük verimli bir oksidasyonda gözlemlendi (Tablo 5.4.).

Tablo 5.4. *U. chartarum* MRC72584 küfü ile metabolit verimleri

Substrat	Metabolit	% Verim
Testosteron (4)		
	Androst-4-en-3,17-dion (8)	3
	5 α -Androstan-3,6,17-trion (22)	4
	17 β -Hidroksi-5 α -androstan-3,6-dion (23)	9
	7 β -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (24)	3
	7 β ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (25)	11
	14 α ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (26)	12
	12 β ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (27)	9

Literatürdeki küfler ile steroid biyotransformasyon çalışmaları incelendiğinde testosteron (4) bileşiğinin 5 α -indirgenmesi, C-6 ve C-17’de oksidasyonları ile C-6 β , C-14 α , C-15 α ve C-16 β pozisyonlarındaki hidroksillenmelerin yaygın olduğu gözlenmesine rağmen (Nassiri-Koopaei ve Faramarzi, 2015; Donova ve Egorova,

2012; Bhatti ve Khera, 2012; Fernandes ve ark., 2003; Mahato ve Garai, 1997) substratın C-7 β ve C-12 β pozisyonlarındaki hidroksillenmelerinin daha nadir olduğu gözlemlendi (Smith ve ark., 1990; Farooq ve Tahara, 2000; Hunter ve ark., 2008; Tweit ve ark., 1962).

Örneğin, önceki bir çalışmada *Botryosphaeria obtusa* aynı substratı C-7 β , C-11 α , C-12 β ve C-15 α pozisyonlarında hidroksilledi (Smith ve ark., 1990). Bir diğer çalışmada ise *Botrytis cinerea* substratı C-7 β pozisyonunda hidroksilledi ve C4-C5 çift bağını α -yüzünden indirgedi (Farooq ve Tahara, 2000). *Rhizomucor tauricus* (Hunter ve ark., 2008) substratı C-6 β ve C-12 β pozisyonlarında hidroksillerken bir *Penicillium* izolatu (Tweit ve ark., 1962) ise aynı substratı C-1 α , C-6 β , C-12 β ve C-15 β pozisyonlarında hidroksilledi.

Bu çalışmada ise yukarıda da belirtildiği gibi *C. sphaerospermum* MRC 70266 substratı C-6 β , C-7 β , C-12 β , C-15 α ve C-16 β pozisyonlarında hidroksillerken bir 5 α -indirgenmesi ile bir C-17 oksidasyonu da gerçekleştirdi. Yine yukarıda da belirtildiği gibi *Ulocladium chartarum* MRC 72584 substratı C-6 β , C-7 β , C-12 β ve C-14 α pozisyonlarında hidroksillerken 5 α -indirgenmesi ile C-6 ve C-17'de oksidasyonlar gerçekleştirdi. Bu sonuçlar *C. sphaerospermum* MRC 70266 ve *Ulocladium chartarum* MRC 72584 küflerinin substratı farklı şekillerde metabolize ettiğini gösterdi (Yildirim ve ark., 2018). Buna ilaveten çalışma sonucunda elde edilen 6 β ,16 β ,17 β -trihidroksiandrosta-4-en-3-on (**20**) ve 6 β ,12 β ,17 β -trihidroksiandrosta-4-en-3-on (**21**) metabolitleri yeni bileşikler olarak tanımlandı. *C. sphaerospermum* MRC 70266, *Ulocladium chartarum* MRC 72584 ve diğer küfler ile steroid biyotransformasyonlarına yönelik çalışmalarımız sürmektedir.

KAYNAKLAR

- Aihara, M., Tanaka, T., Takatori, K. 2001. *Cladosporium* as the Main Fungal Contaminant of Locations in Dwelling Environments. *Biocontrol Sci.*, 6(1), 49-52.
- Akar, T. 2005. Furano Steroid Yapılı Bazı Bileşiklerin Antifungal Etkinliğinin ve *Neurospora crassa* Fungal Kültürünün Biyotransformasyon ve Biyosorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Al-Awadi, S. Afzal, M. Oommen, S. 2005. Studies on *Bacillus stearothermophilus*: Part IV. Influence of Enhancers on Biotransformation of Testosterone. *Steroids*, 70(4), 327-333.
- Andersen, B., Hollensted, M. 2008. Metabolite Production by Different *Ulocladium* Species. *Int. J. Food Microbiol.*, 126(1-2), 172-179.
- Armstrong, D. W., Yamazaki, H. 1986. Natural Flavours Production. *Trends Biotechnol.*, 4, 264-268.
- Bensch, K., Braun, U., Groenewald, J. Z., Crous, P. W. 2012. The Genus *Cladosporium*. *Stud. Mycol.*, 72, 1-401.
- Bhatti, H. N., Khera, R. A. 2012. Biological Transformations of Steroidal Compounds: A Review. *Steroids* 77(12), 1267-1290.
- Bridgeman, J. E., Cherry, P. C., Clegg, A. S., Evans, J. M., Jones, E. R. H., Kasal, A., Kumar, V., Meakins, G. D., Morisawa, Y., Richards, E. E., Woodgate, P. D. 1970. Microbiological Hydroxylation of Steroids. Part I. Proton Magnetic Resonance Spectra of Ketones, Alcohols and Acetates in the Androstane, Pregnane and Oestrane Series. *J. Chem. Soc. C.*, 2, 250-257.
- Buchner, E. 1897. Alkoholische Gärung ohne Hefezellen. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 30, 1110-1113.
- Clayden, J., Greeves, N., Warren, S., Wothers, P. 2001. *Organic Chemistry*. First Edition, Oxford University Press, Oxford, 1413-1414.
- Demain, A. L. 2000. Small Bugs Big Business: The Economic Power of the Microbe. *Biotechnol. Adv.*, 18(6), 499-514.
- Donova, M. V., Egorova, O. V. 2012. Microbial Steroid Transformations: Current State and Prospects. *Appl. Microbiol. Biot.*, 94(6), 1423-1447.
- Faber, K. 2003. *Biotransformations in Organic Chemistry*, Fifth Edition, Springer-Verlag, Berlin, 1-407.

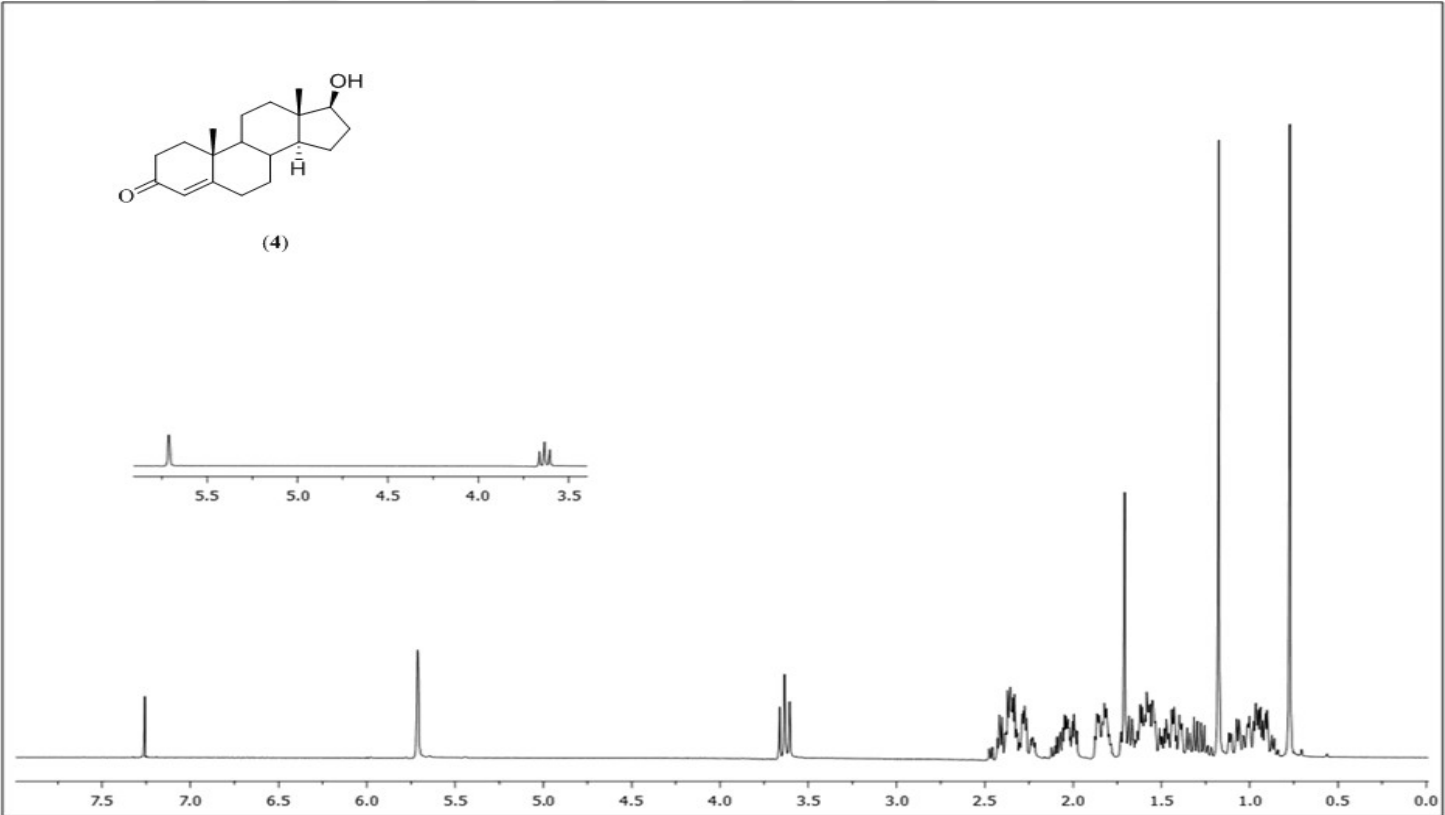
- Farooq, A., Tahara, S. 2000. Biotransformation of Testosterone and Pregnenolone Catalyzed by the Fungus *Botrytis cinerea*. J. Nat. Prod., 63(4), 489-491.
- Fernandes, P., Cruz, A., Angelova, B., Pinheiro, H. M., Cabral, J. M. S. 2003. Microbial Conversion of Steroid Compounds: Recent Developments. Enzyme Microb. Tech., 32(6), 688-705.
- Hanson, J. R. 1995. An Introduction to Biotransformations in Organic Chemistry, W. H. Freeman and Company, New York, 1-62.
- Hanson, J. R. 2003. Natural Products: the Secondary Metabolites. Roy. Soc. Chem., Cambridge, 1-2.
- Hanson, J. R., Nasir, H., Parvez, A. 1996. The Hydroxylation of Testosterone and Some Relatives by *Cephalosporium aphidicola*. Phytochemistry, 42(2), 411-415.
- Hildebrandt, G., Klavehn, W. 1930. Verfahren zur Herstellung von 1-1-Phenyl-2-methylaminopropan-1-ol, Knoll AG Chemische Fabriken in Ludwigshafen, Ger., 548-559.
- Holland, H. L. 1982. The Mechanism of the Microbial Hydroxylation of Steroids. Chem. Soc. Rev., 11, 371-395.
- Holland, H. L., Thomas, E. M. 1982. Microbial Hydroxylation of Steroids. 8. Incubation of Cn Halo- and Other Substituted Steroids with Cn Hydroxylating Fungi. Can. J. Chem., 60(2), 160-164.
- Hunter, A. C., Mills, P. W., Dedi, C., Dodd, H. T. 2008. Predominant Allylic Hydroxylation at Carbons 6 and 7 of 4 and 5-ene Functionalized Steroids by the Thermophilic Fungus *Rhizomucor tauricus* IMI23312. J. Steroid Biochemist. Mol. Biol., 108(1-2), 155-163.
- Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. İ. 2005. Biyokimya, Dördüncü Baskı, Aktif Yayınevi, Erzurum, 185-188.
- Keskin, S. Y. 2010. Bazı Monoterpenoidlerin Fungal Biyotransformasyonun İncelenmesi. Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Kluyver, A. J., de Leeuw, F. J. 1924. *Acetobacter suboxydans*, een merkwaardige aërobacterie, Tijdschr. Geneesk., 10, 170.
- Labaree, D. Hoyte, R. M. Hochberg, R. B. Steroids, 1997. A Direct Stereoselective Synthesis of 7 β -hydroxytestosterone. 62(6), 482-486.
- Mahato, S. B., Garai, S. 1997. Advances in Microbial Steroid Biotransformation. Steroids, 62(4), 332-345.
- Mann, J. 1994. Chemical Aspects of Biosynthesis. First Edition, Oxford University Press, New York, 2-4.
- Nassiri-Koopaei, N., Faramarzi, M. A. 2015. Recent Developments in the Fungal Transformation of Steroids. Biocatal. Biotransform., 33(1), 1-28.
- Neuberg, C., Hirsch, J. 1921. Über ein Kohlenstoffketten Knüpfendes Ferment (Carbolygase). Biochem. Z., 115, 282-310.

- Numazawa, M., Mutsumi, A., Ogata, M. 1988. Reactions of enolizable steroidal 4-en-3-ones and 17-ones with hypervalent iodine. *Chem. Pharm. Bull.*, 36, 3381-3386.
- Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E. Y. 2002. İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, Ankara, 481-659.
- Park, H. G., Managbanag, J. R., Stamenova, E. K., Jong, S. C. 2004. Comparative Analysis of Common Indoor *Cladosporium* Species Based on Molecular Data and Conidial Characters. *Mycotaxon*, 89, 441-451.
- Pasteur, L. 1858. Mémoire sur la fermentation. *C. R. Acad. Sci.*, 46, 615-618.
- Peart, P. C., McCook, K. P., Russell, F. A., Reynolds, W. F., Reese, P. B. 2011. Hydroxylation of Steroids by *Fusarium oxysporum*, *Exophiala jeanselmei* and *Ceratomyces paradoxa*. *Steroids*, 76(12), 1317-1330.
- Pereira, P. T., De Carvalho, M. M., Girio, F. M., Roseiro, J. C., Amaral-Collaco, M. T. 2002. Diversity of Microfungi in the Phylloplane of Plants Growing in a Mediterranean Ecosystem. *J. Basic Microbiol.*, 42(6), 396-407.
- 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.
- Rajaguru, P., Kalaiselvi, K. Subburam, V. 2000. Biodegradation of Azo Dyes in a Sequential Anaerobic-aerobic System. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 54, 268-273.
- Reichstein, T., Grüssner, H. 1934. Eine ergiebige Synthese der l-Ascorbinsäure (C Vitamin). *Helv. Chim. Acta*, 17, 311-328.
- Sandoval-Denis, M., Gene, J., Sutton, D. A., Wiederhold, N. P. 2016. New Species of *Cladosporium* associated with Human and Animal Infections. *Persoonia*, 36, 281-298.
- Sandoval-Denis, M., Sutton, D. A., Martin-Vicente, A., Cano-Lira, J. F., Wiederhold, N., Guarro, J., Gene, J. 2015. *Cladosporium* Species Recovered from Clinical Samples in the United States. *J. Clin. Microbiol.*, 53(9), 2990-3000.
- Sebek, O. K., Perlman, D. 1979. Microbial Transformation of Steroids and Sterols. *Microbial Technology*, Academic Press, Second Edition, New York, 1, 484-488.
- Shebany, Y. M. 2012. Antimicrobial Activity of Endophytic Fungi Isolated From *Avicennia marina* Plant, Red Sea, Egypt. *Egypt J. Microbiol.*, 47, 141-152.
- Sheldon, R. A. 1993. Chirtechnology: Industrial Synthesis of Optically Active Compounds, Marcel Dekker, New York, 105.
- Smith, K. E., Latif, S., Kirk, D. N. 1990. Microbial Transformations of Steroids-VI. Transformation of Testosterone and Androstenedione by *Botryosphaeria obtusa*. *J. Steroid Biochem.*, 35(1), 115-120.
- Świzdor, A., Panek, A., Milecka-Tronina, N. 2017. Hydroxylative Activity of *Aspergillus niger* Towards Androst-4-ene and androst-5-ene Steroids. *Steroids*, 126, 101-106.

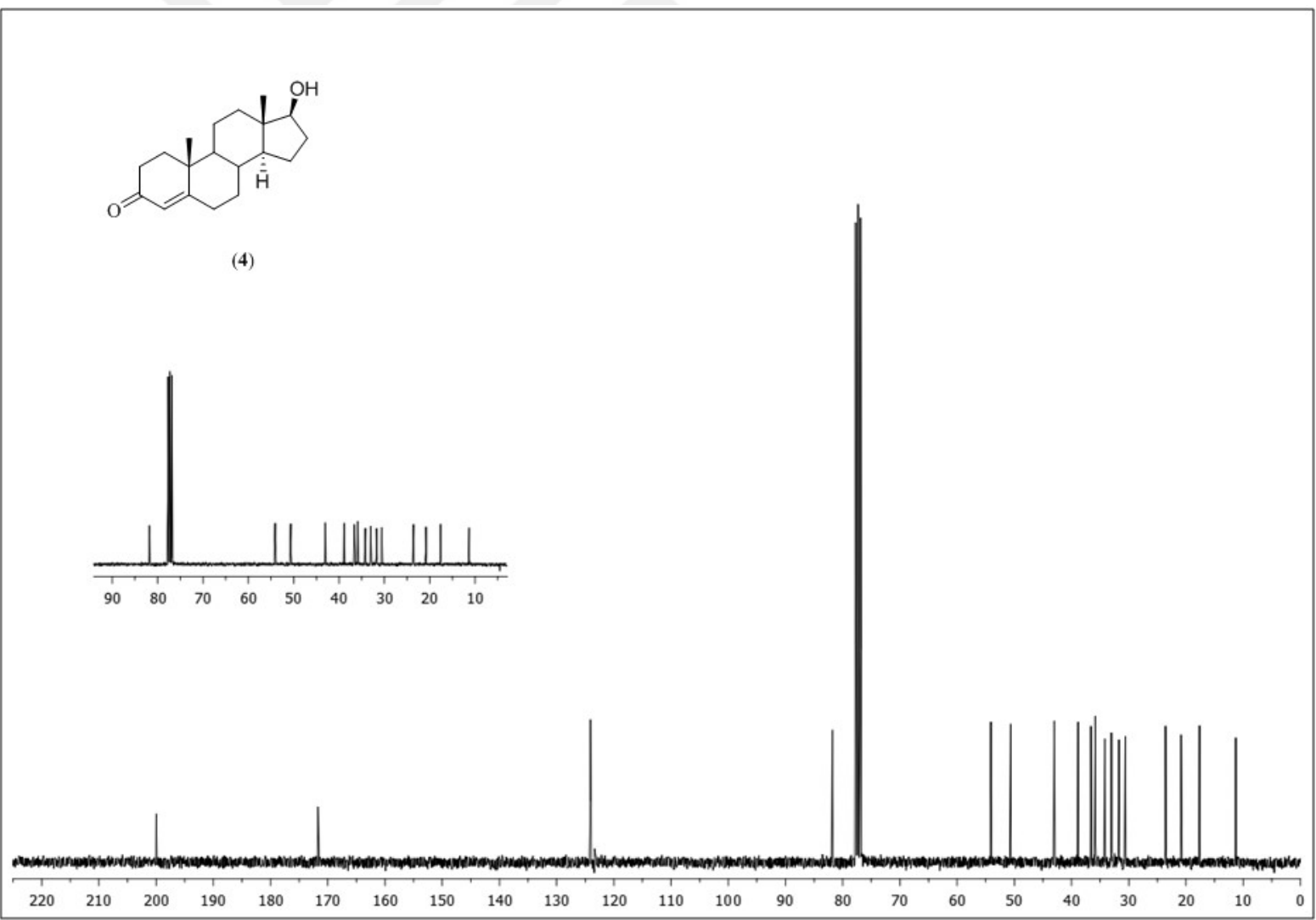
- Telefoncu, A. 1995. Biyoteknoloji, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 116-347.
- Turner, M. K. 1998. Perspectives in Biotransformations: Biotechnology. Wiley-VCH, Weinheim, 9.
- Tweit, R. C., Dodson, R. M., Muir, R. D. 1962. Microbiological Transformations. XII. The Substrate Specificity of Hydroxylations by a *Penicillium sp.*, A.T.C.C. 12,556. J. Org. Chem., 27(10), 3654-3658.
- Yano, S., Koyabashi, K., Kato, K. 2003. Intrabronchial Lesion Due to *Cladosporium shaerospermum* in a Healthy, Non-asthmatic Woman. Mycoses, 46(8), 330-332.
- Yildirim, K. 2001. The Biotransformation and Synthesis of Some Steroids. Sussex University, England, D. Phil. Thesis.
- Yildirim, K., Kuru, A., Yılmaz, Ş. 2018. Biotransformation of Testosterone by *Ulocladium chartarum* MRC 72584. J. Chem. Res., 42, 444-446.
- Zalar, P., De Hoog, G. S., Schroers, H. J., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Gunde-Cimemam, N. 2007. Phylogeny and Ecology of the Ubiquitous Saprobe *Cladosporium shaerospermum*, with Descriptions of Seven New Species from Hypersaline Environments. Stud. Mycol., 58, 157-183.

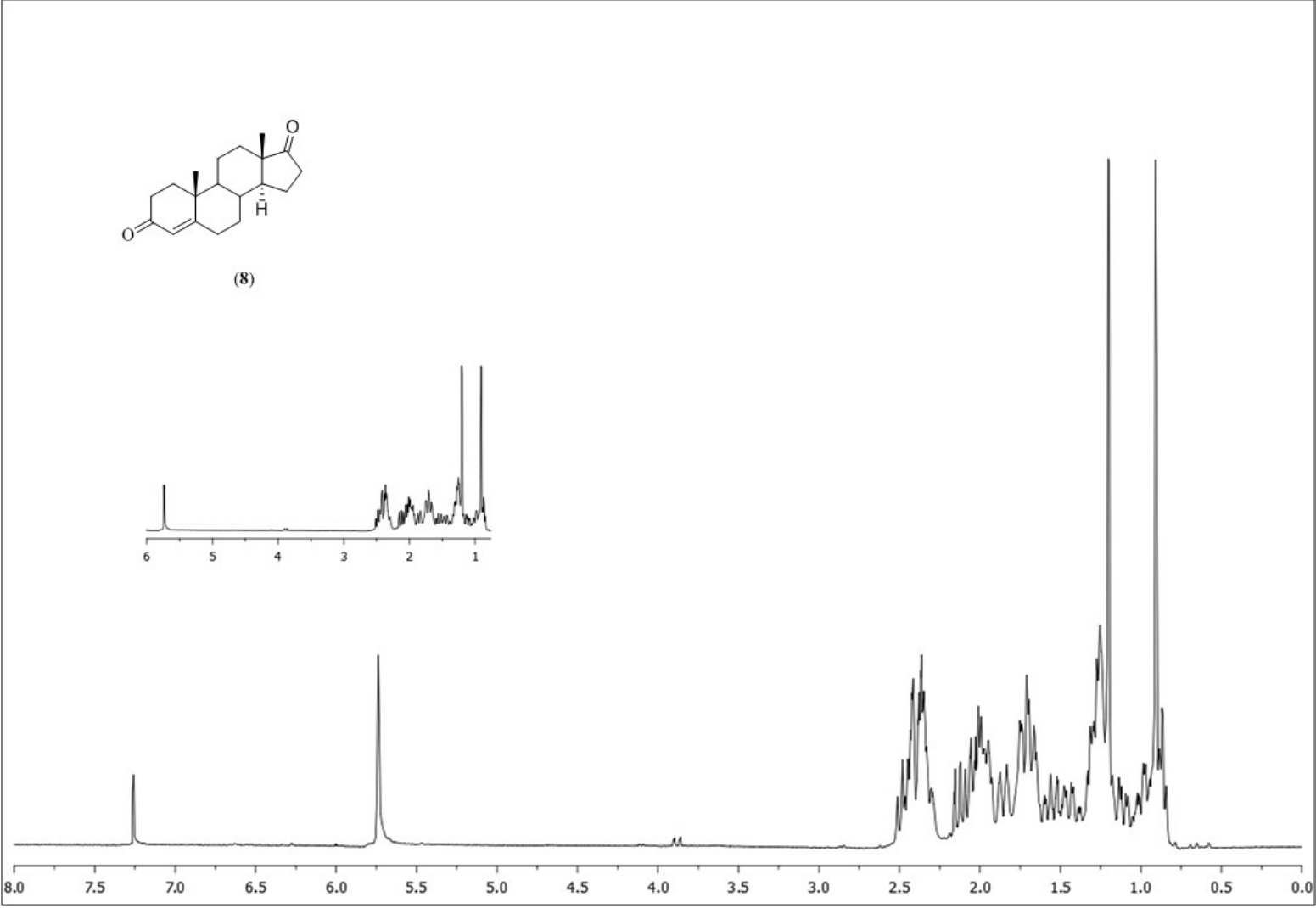
EKLER

EK 1: Testosteron (4) için ^1H NMR spektrumu



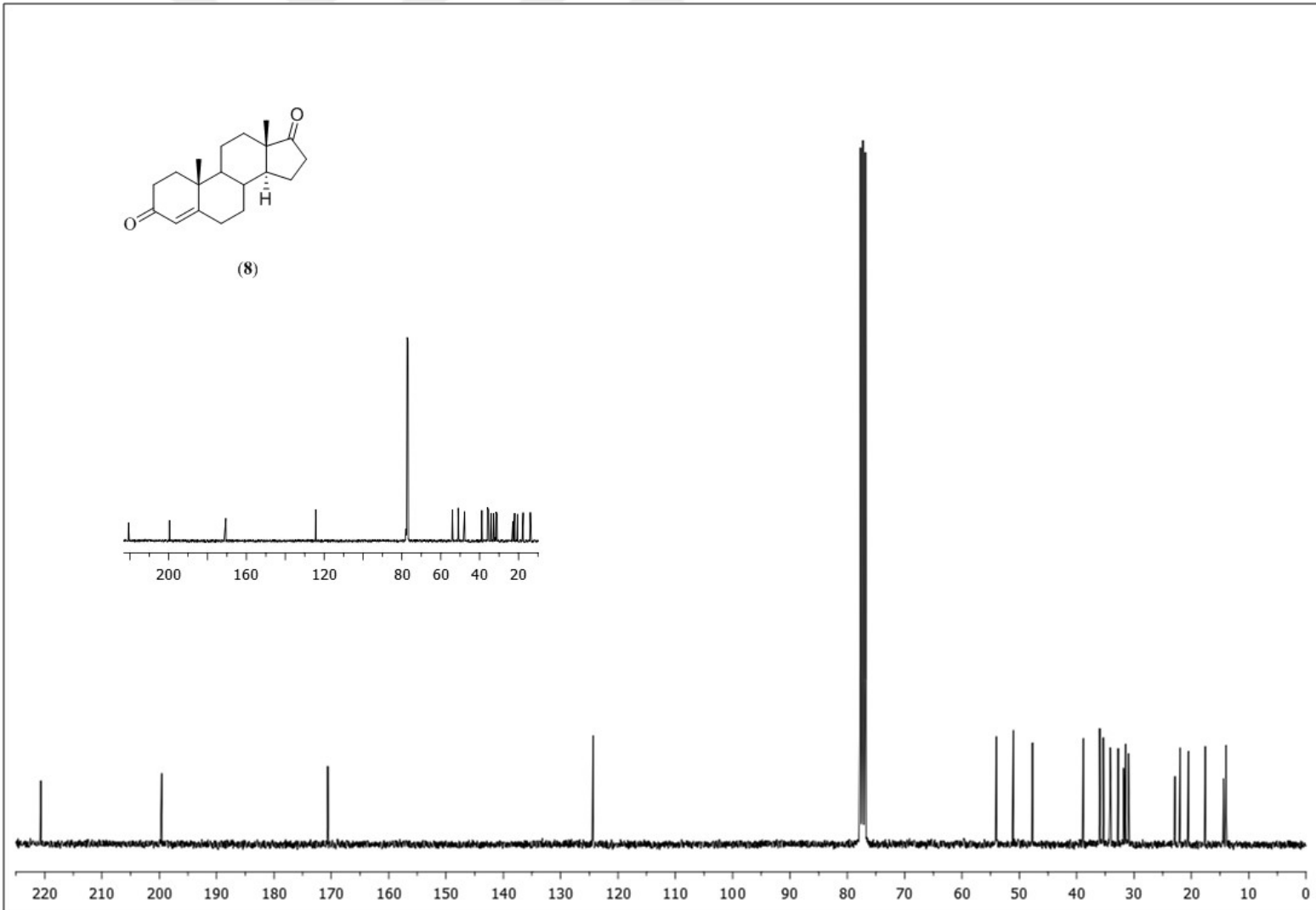
EK 2: Testosteron (4) için ^{13}C NMR spektrumu



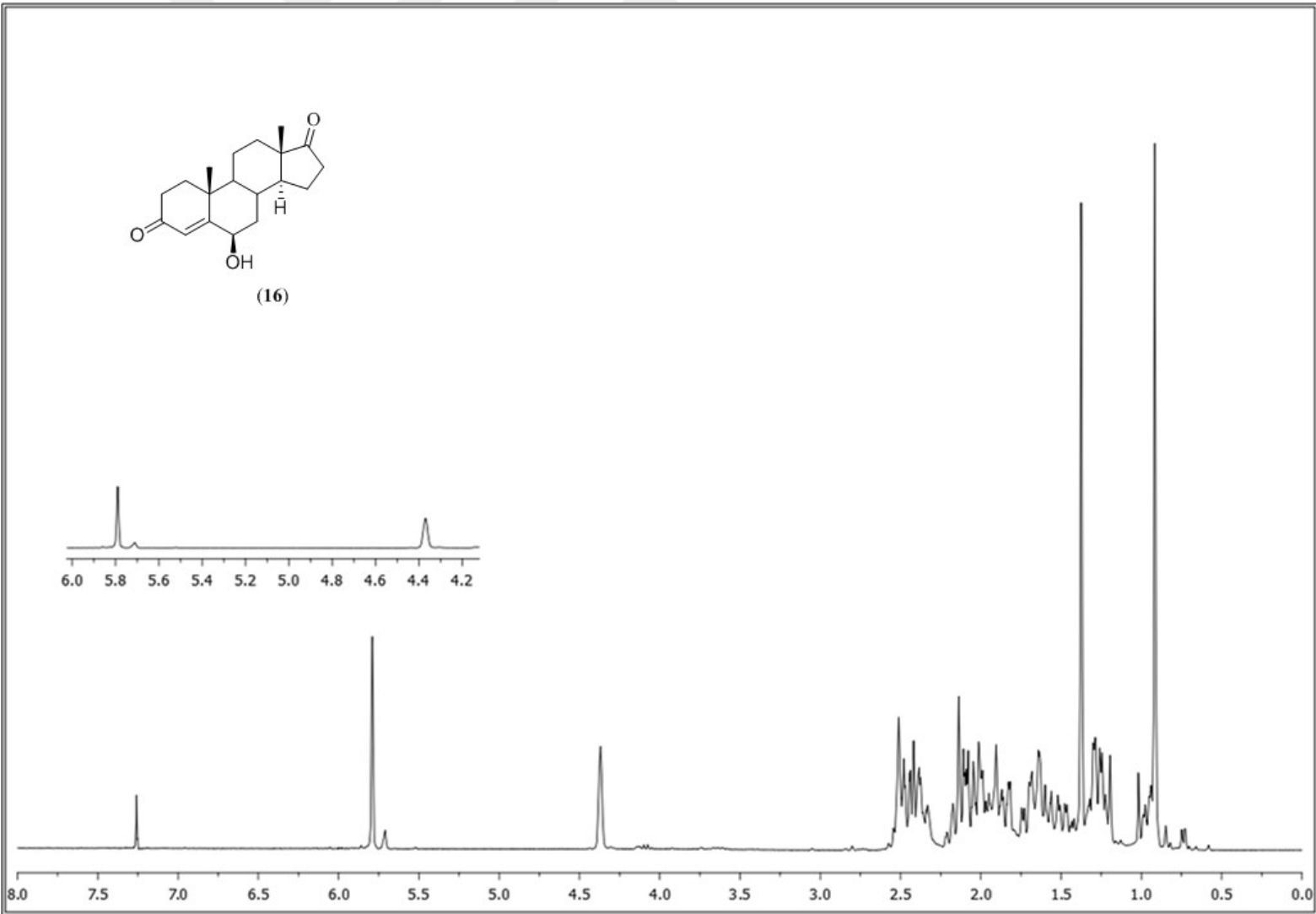


EK 3. Androst-4-en-3,17-dion (8) için ^1H NMR spektrumu

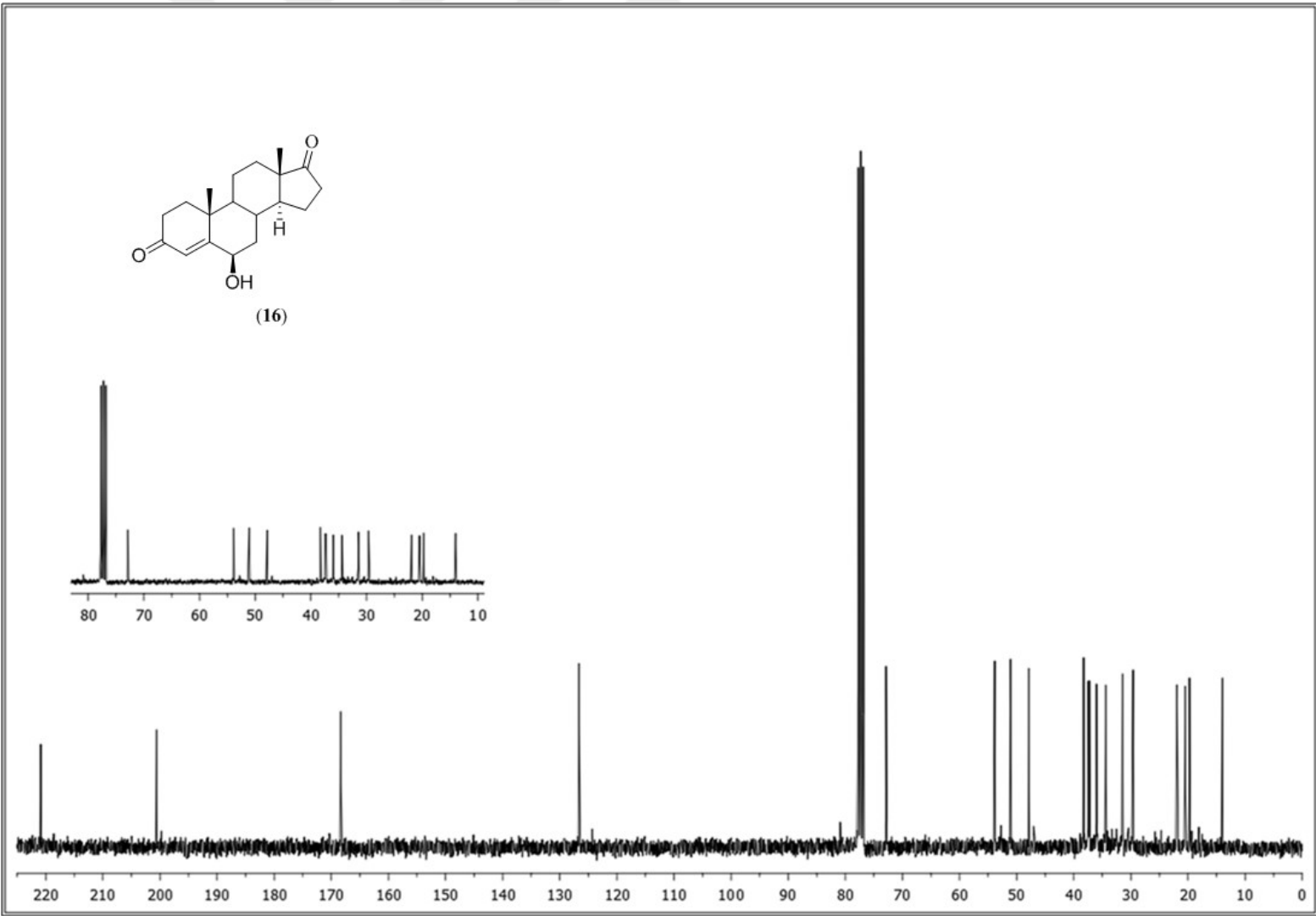
EK 4. Androst-4-en-3,17-dion (8) için ^{13}C NMR spektrumu

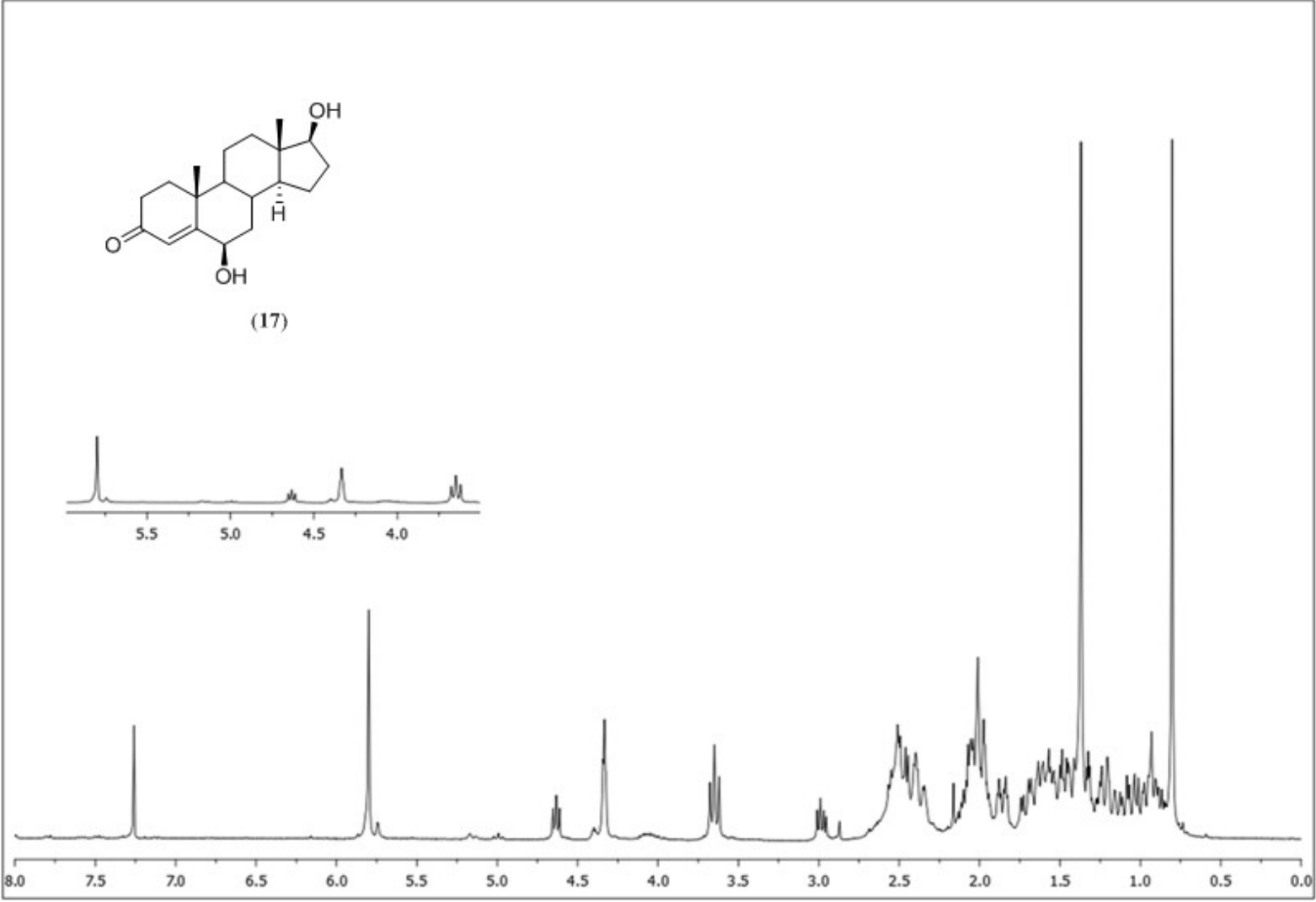


EK 5: 6 β -Hidroksiandrorost androst-4-en-3,17-dion (**16**) için ^1H NMR spektrumu



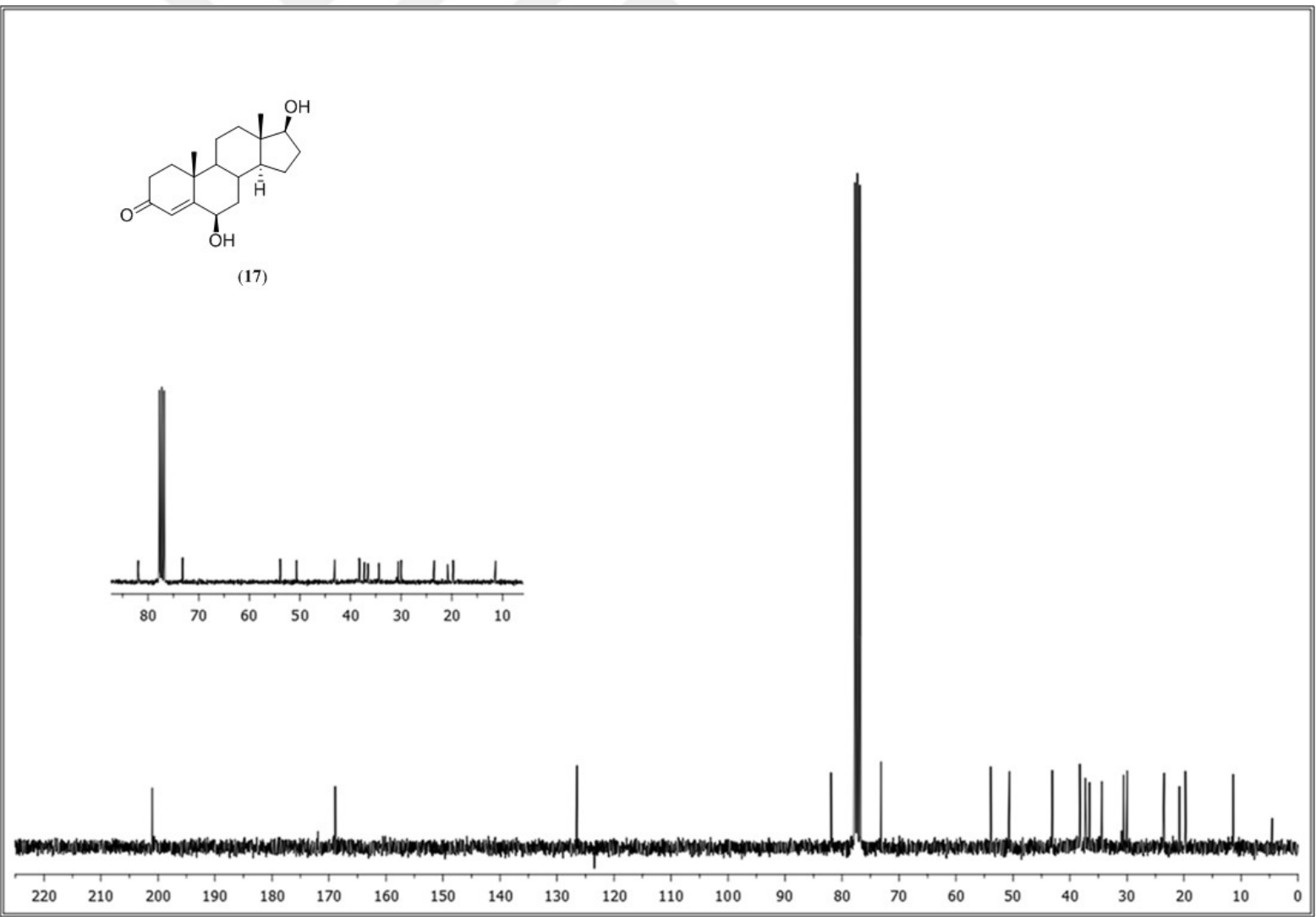
EK 6: 6 β -Hidroksiandrosta-4-en-3,17-dion (**16**) için ^{13}C NMR spektrumu

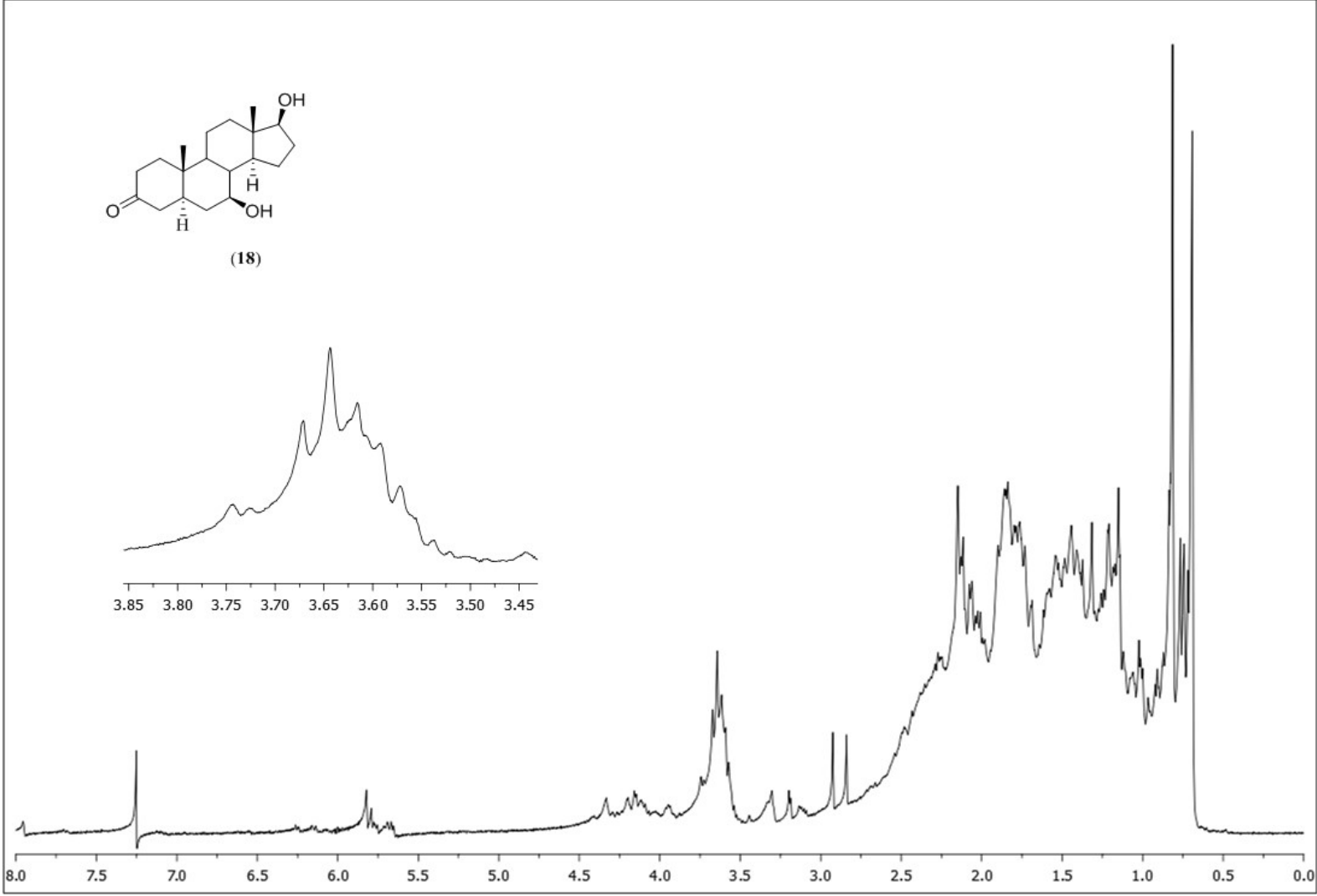




EK 7: 6 β ,17 β -Dihidroksiandrostandrost-4-en-3-on (**17**) için ^1H NMR spektrumu

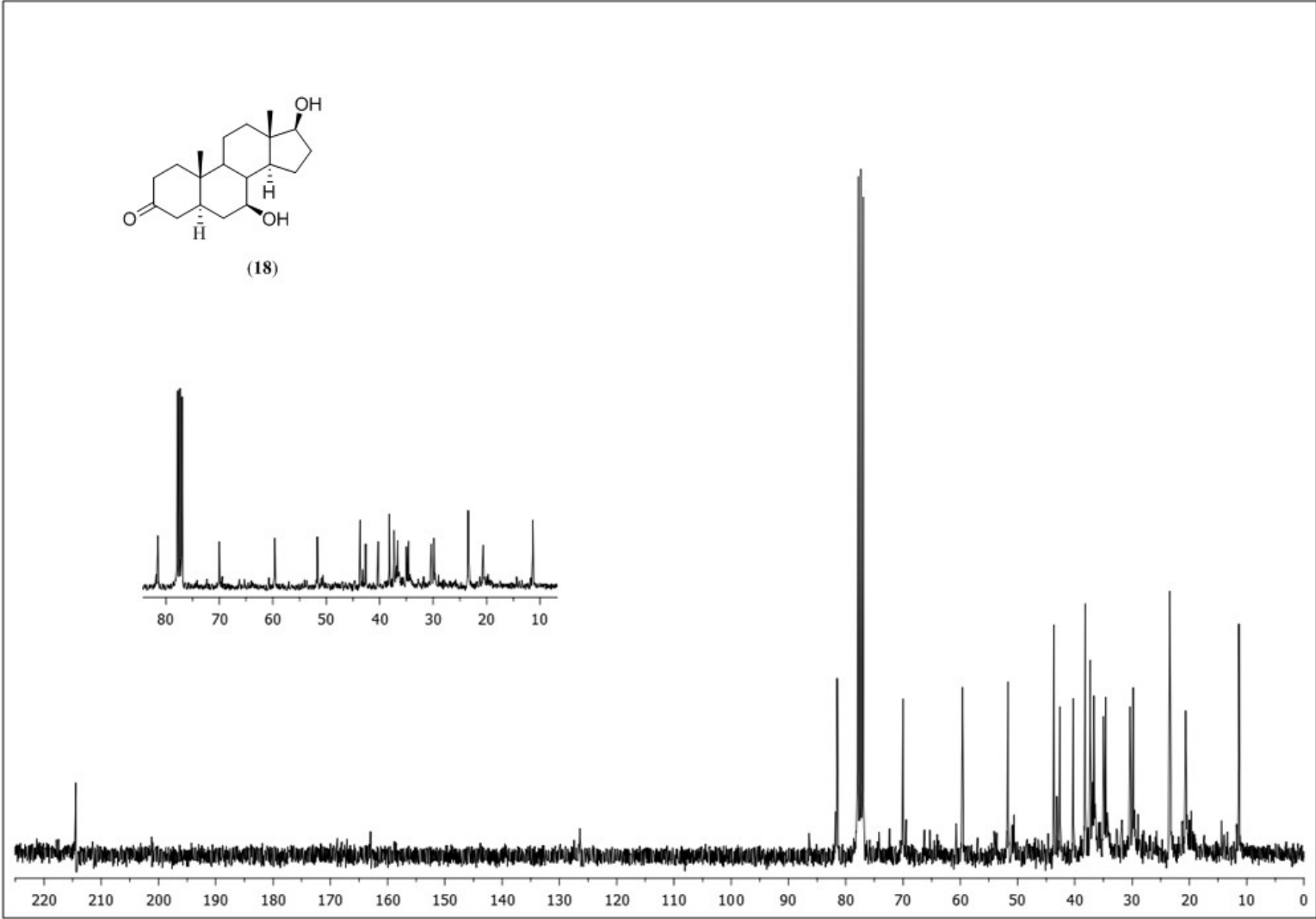
EK 8: 6 β ,17 β -Dihidroksiandrostandrost-4-en-3-on (17) için ^{13}C NMR spektrumu



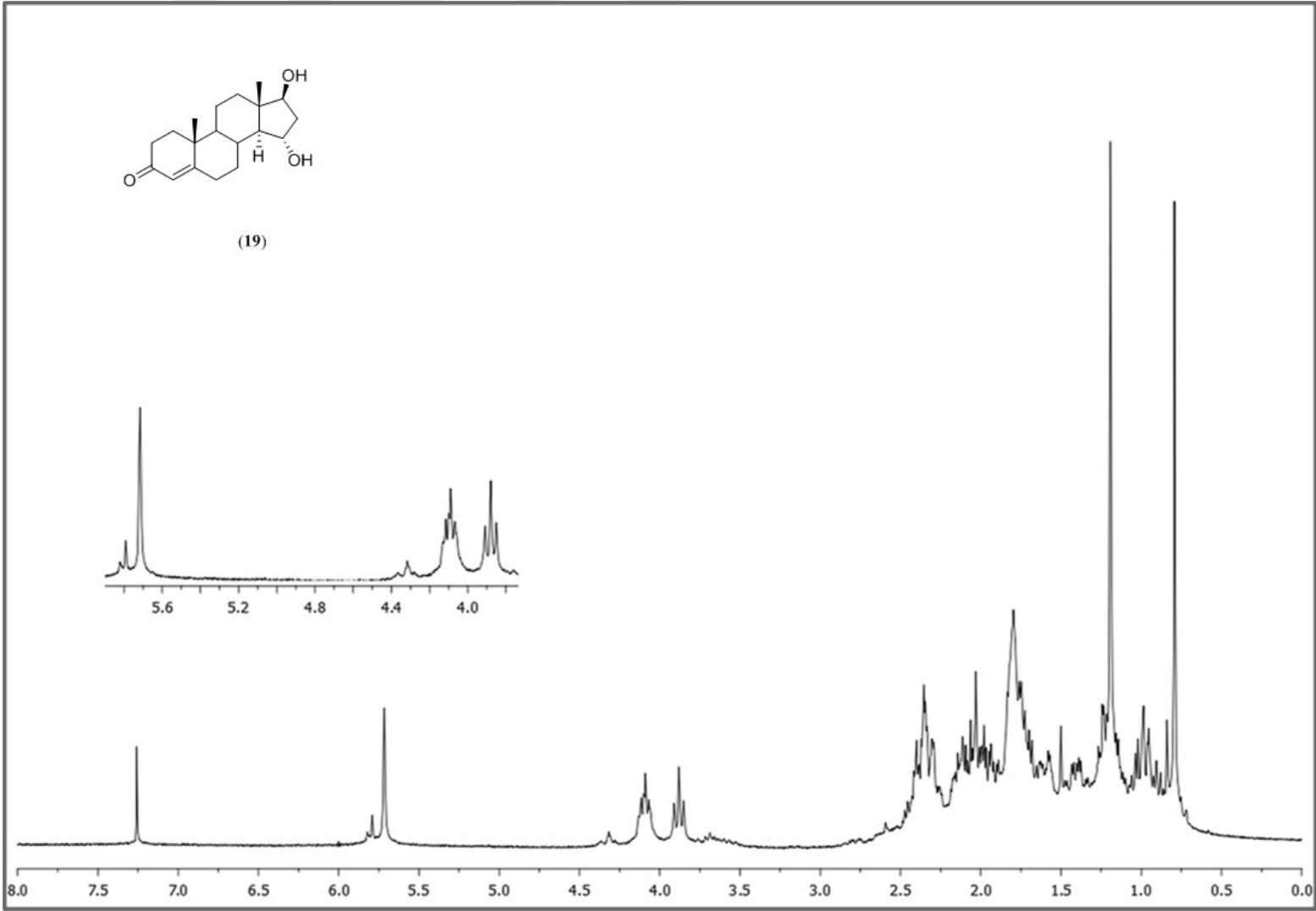


EK 9: 7β,17β-Dihidroksianandrostan-3-on (18) için ¹H NMR spektrumu

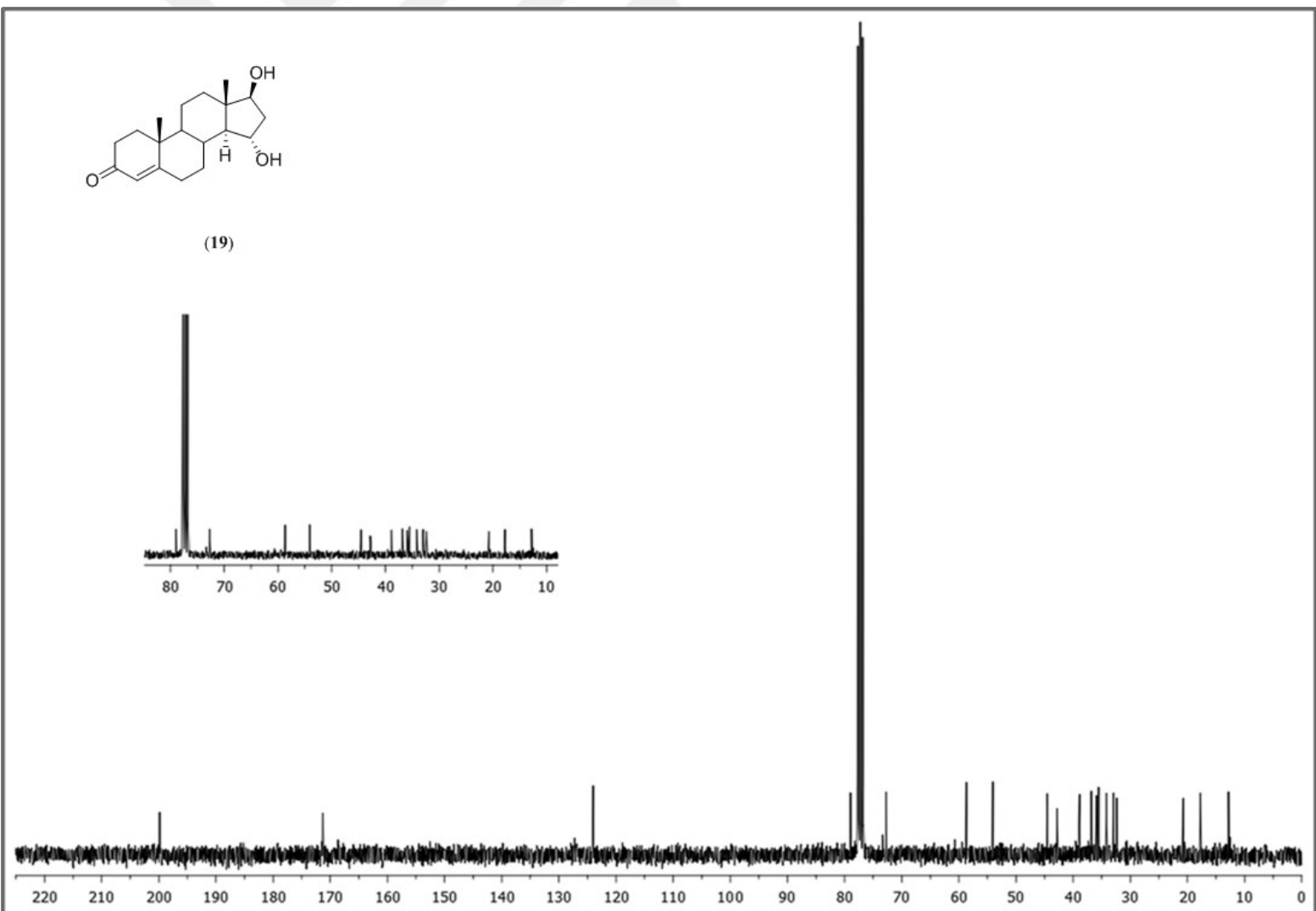
EK 10: 7 β ,17 β - Dihidroksianandrostan-3-on (18) için ^{13}C NMR spektrumu

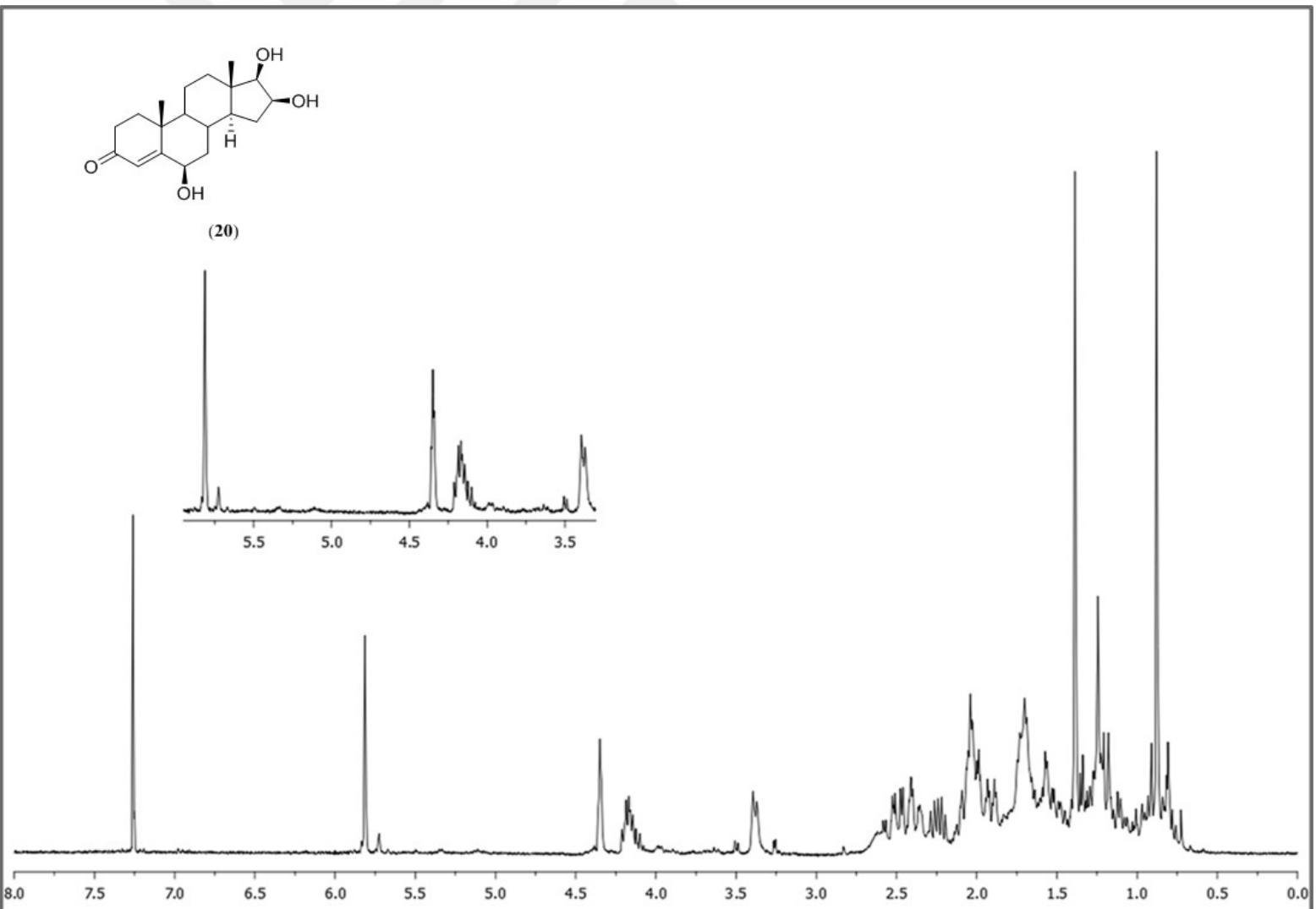


EK 11: 15 α ,17 β -Dihydroxyandrost-4-en-3-on (19) için ^1H NMR spektrumu



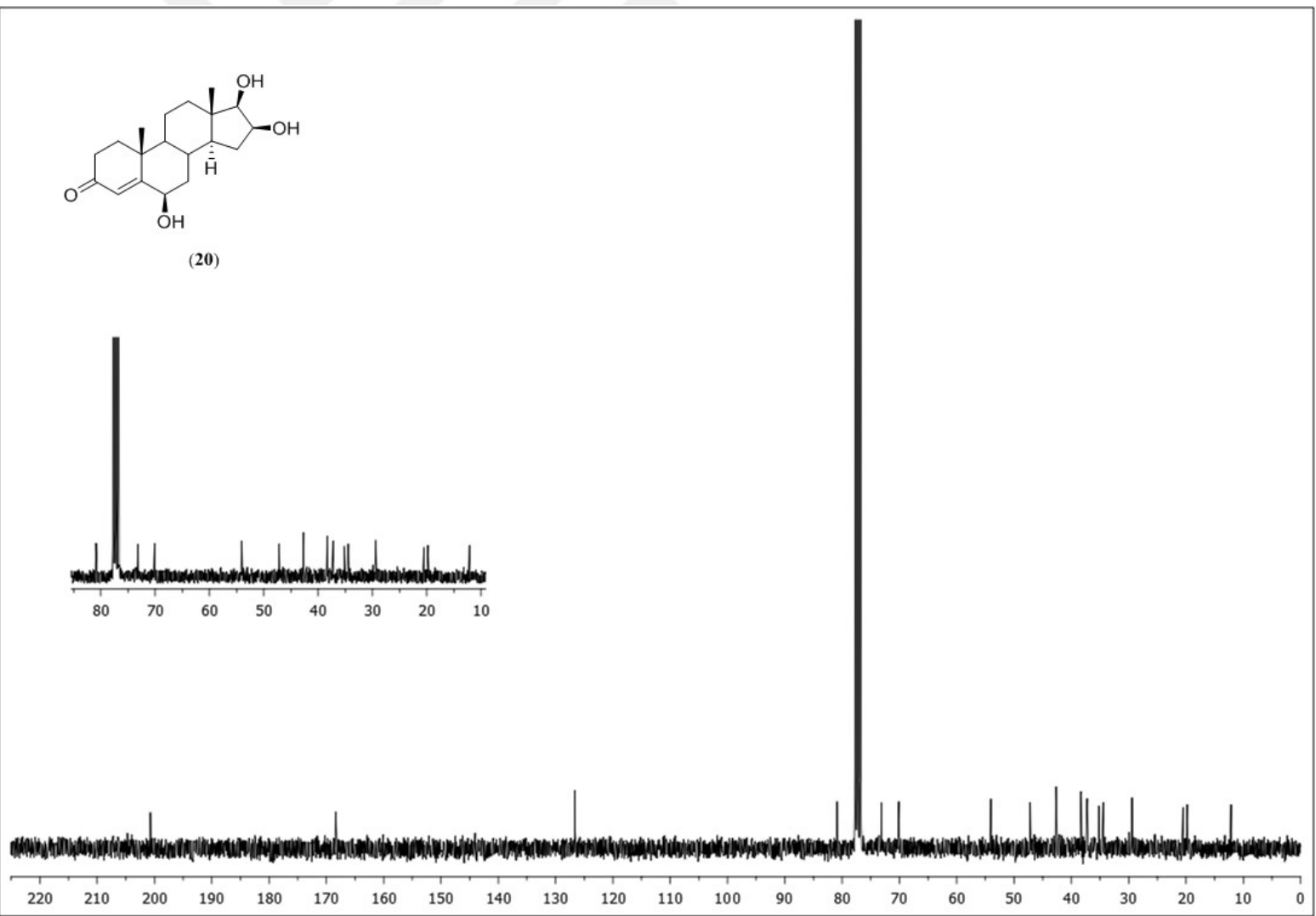
EK 12. 15 α ,17 β -Dihydroxyandrost-4-en-3-on (19) için ^{13}C NMR spektrumu

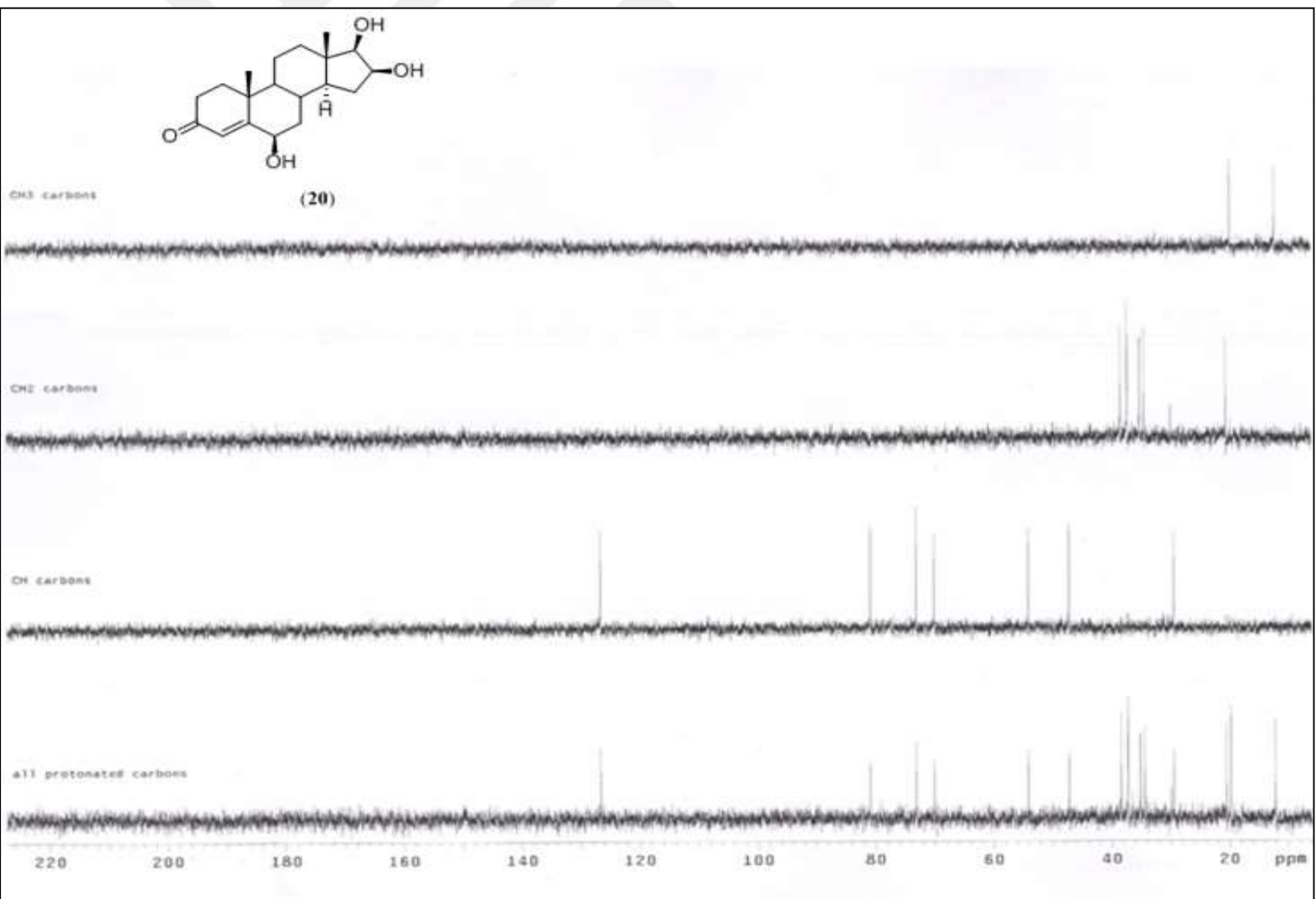




EK 13: 6 β ,16 β ,17 β -Trihidroksiandrosta-4-en-3-on (20) için ^1H NMR spektrumu

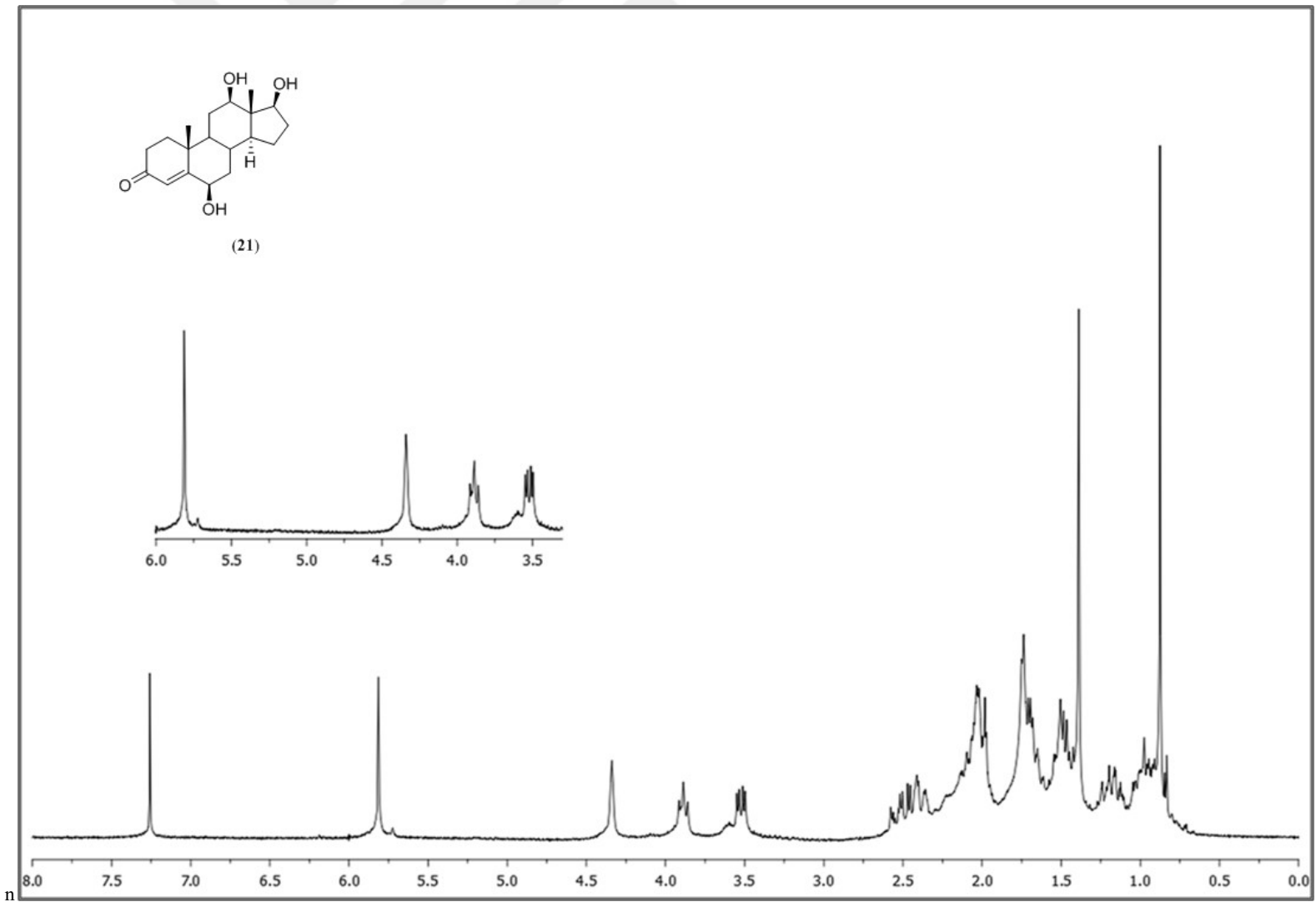
EK 14: 6 β ,16 β ,17 β -Trihidroksiandrosta-4-en-3-on (**20**) için ^{13}C NMR spektrumu



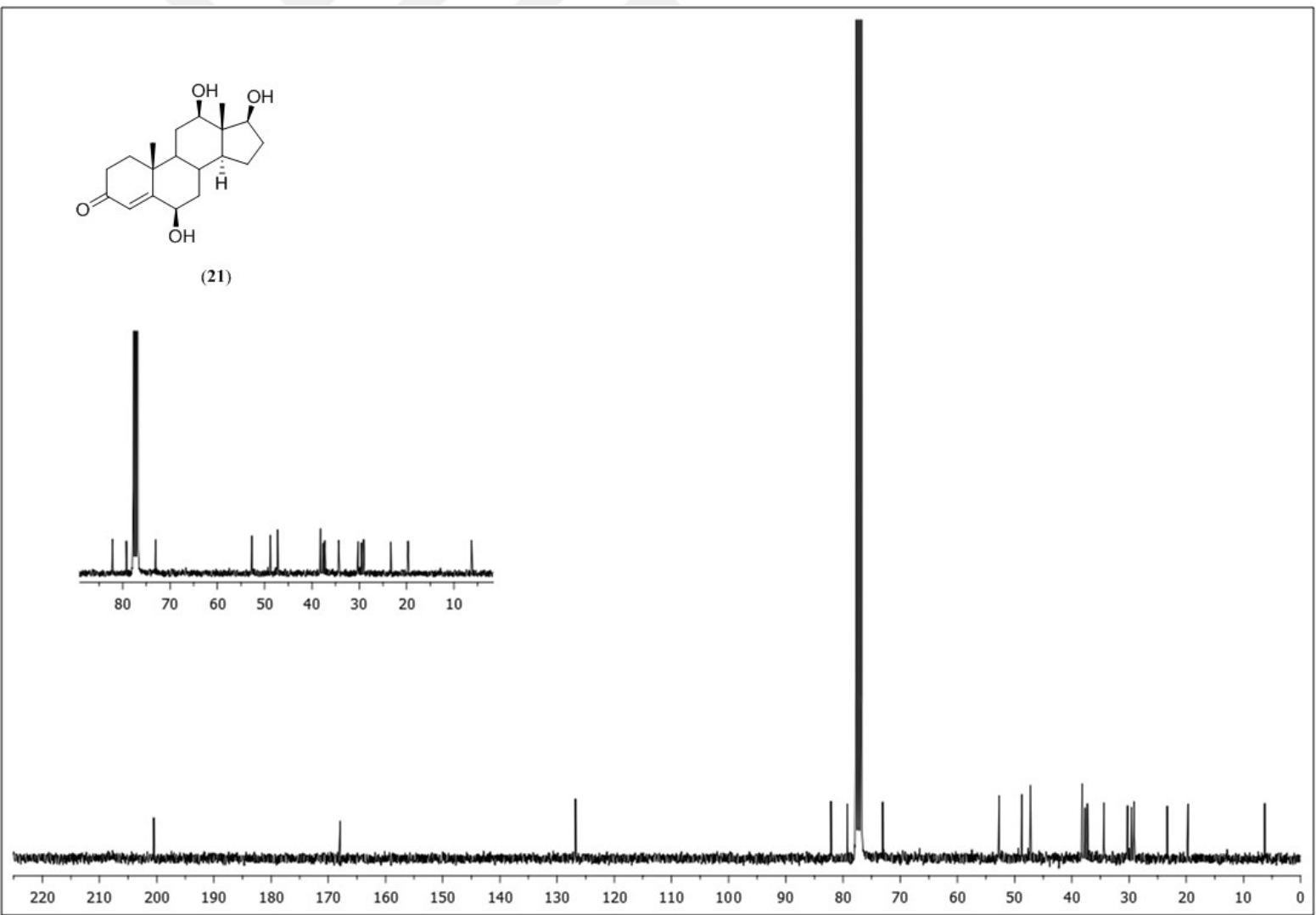


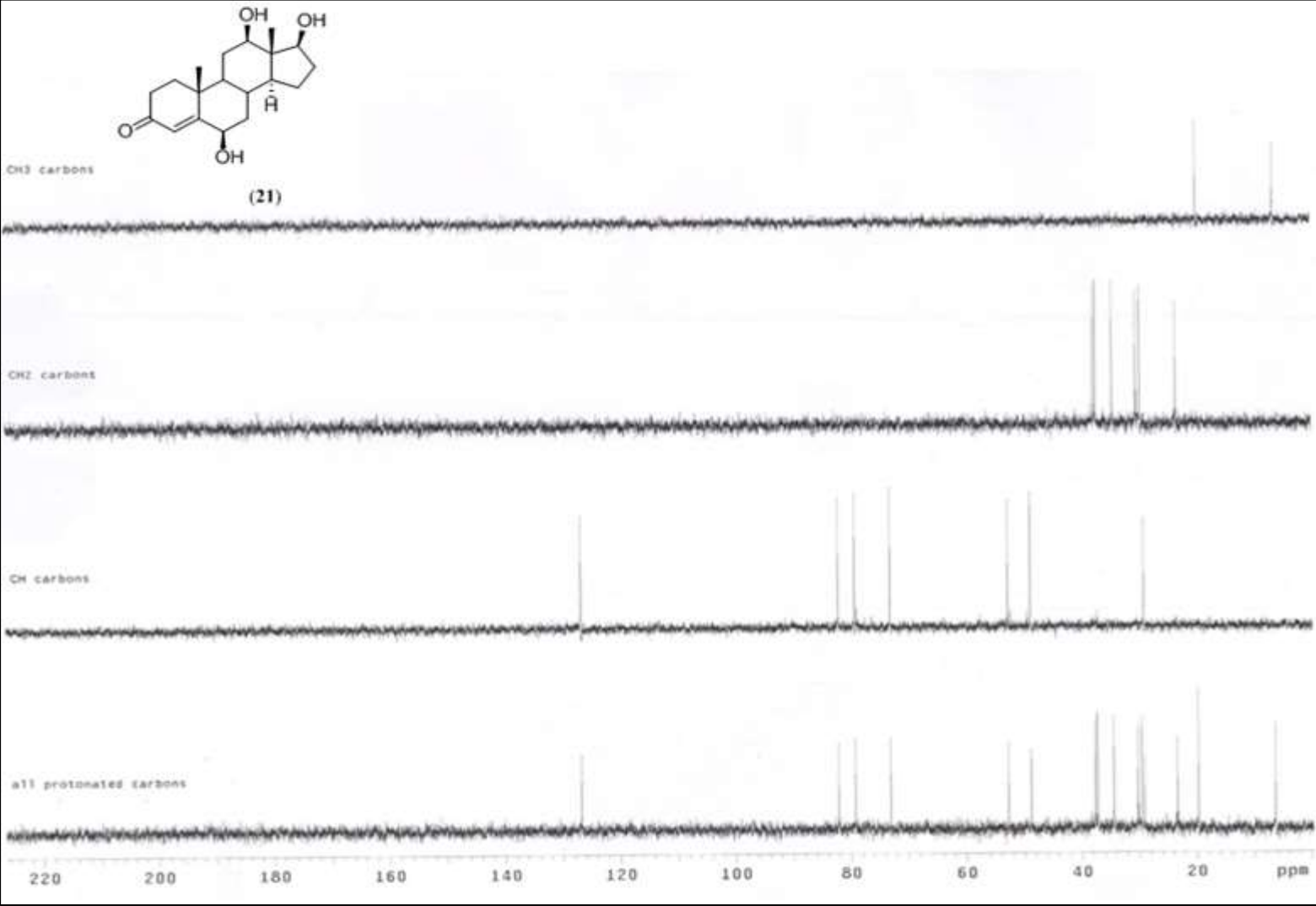
EK 15: 6 β ,16 β ,17 β -Trihidroksiandrosta-4-en-3-on (20) için DEPT spektrumu

EK 16: 6 β ,12 β ,17 β -Trihidroksiandrosta-4-en-3-on (21) için ^1H NMR spektrumu



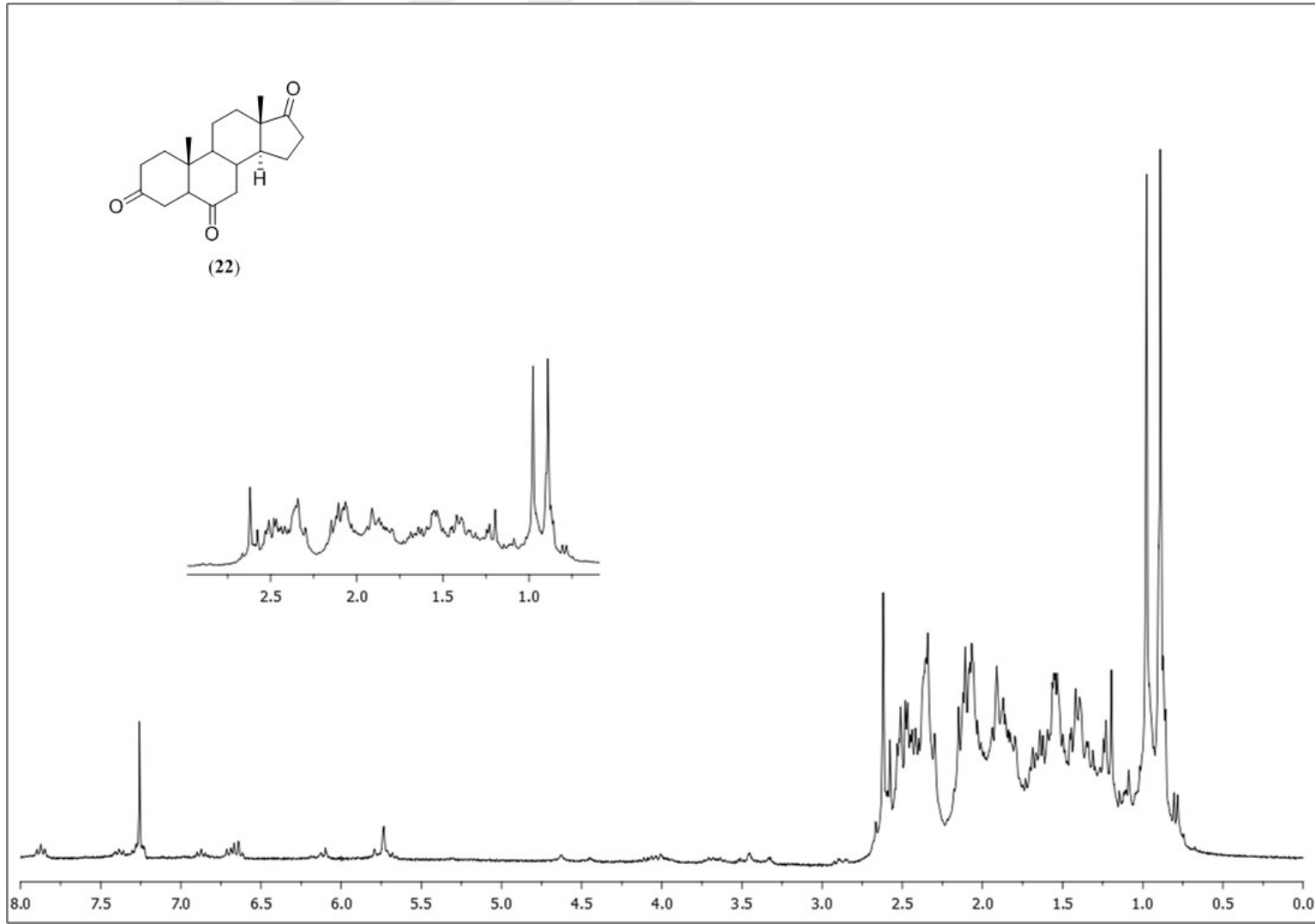
EK 17: 6 β ,12 β ,17 β -Trihidroksiandrosta-4-en-3-on (21) için ^{13}C NMR spektrumu



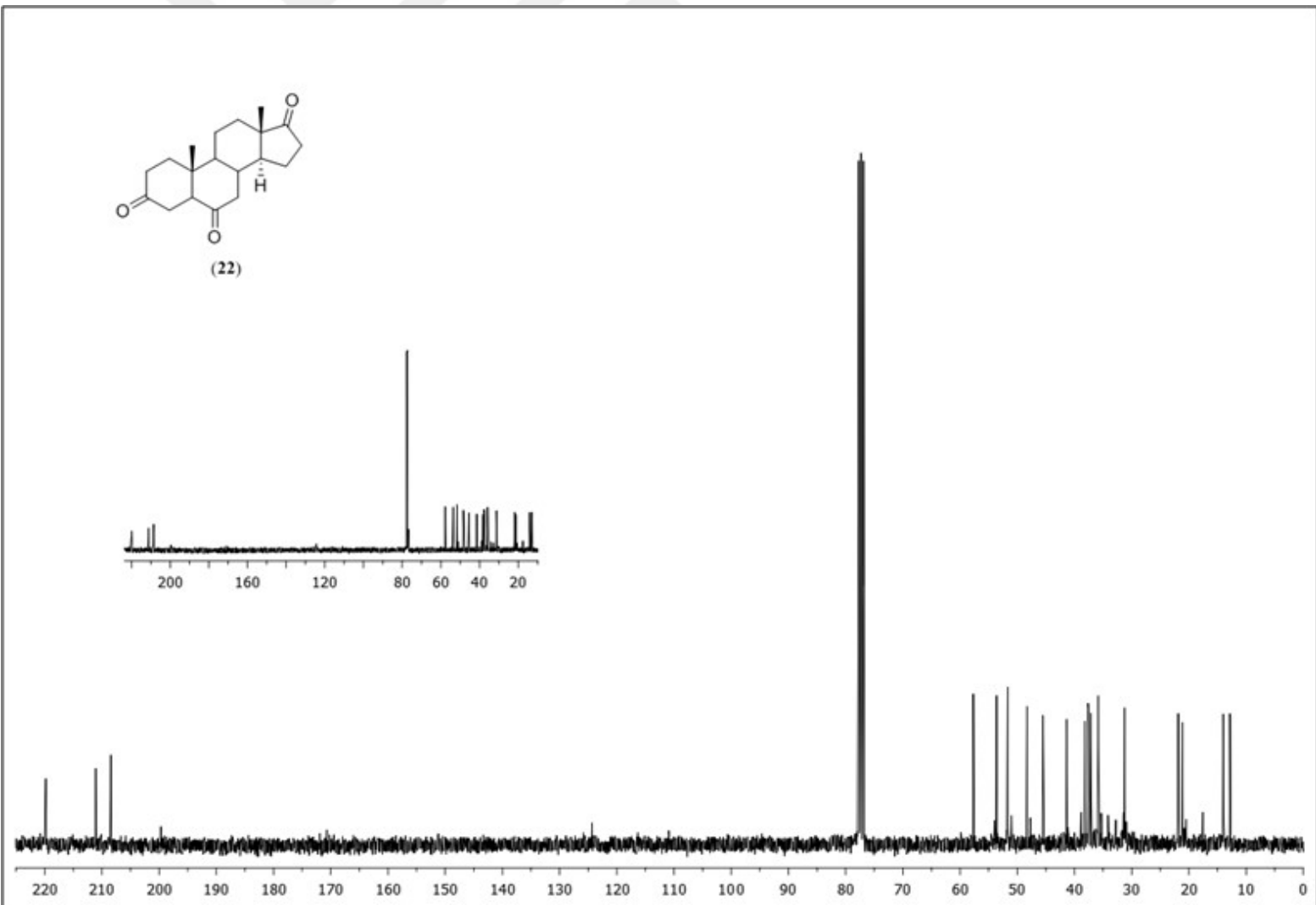


EK 18: 6 β ,12 β ,17 β -Trihidroksiestandrost-4-en-3-on (21) için DEPT spektrumu

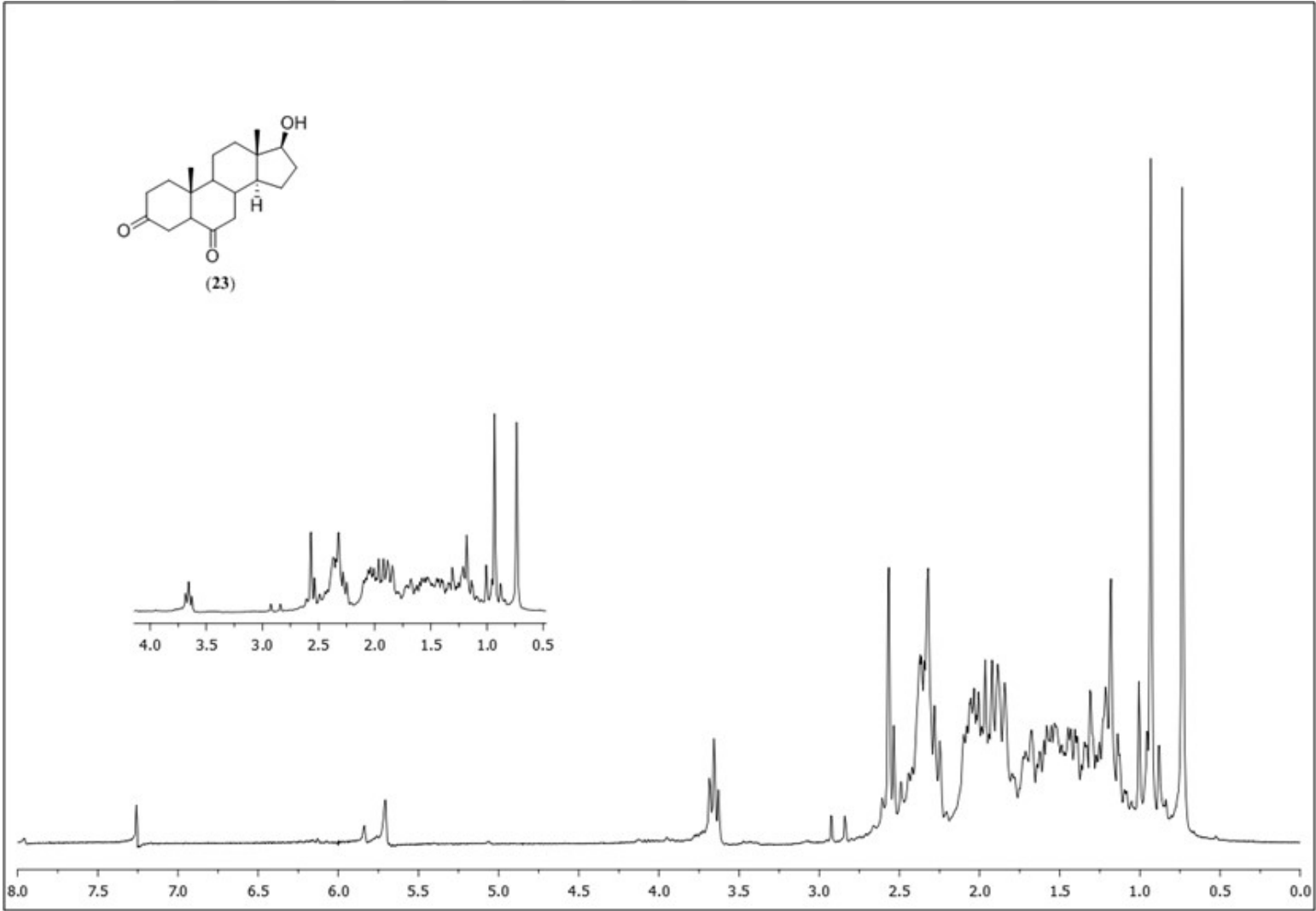
EK 19: 5 α -Androstan-3,6,17-trion (22) için ^1H NMR spektrumu

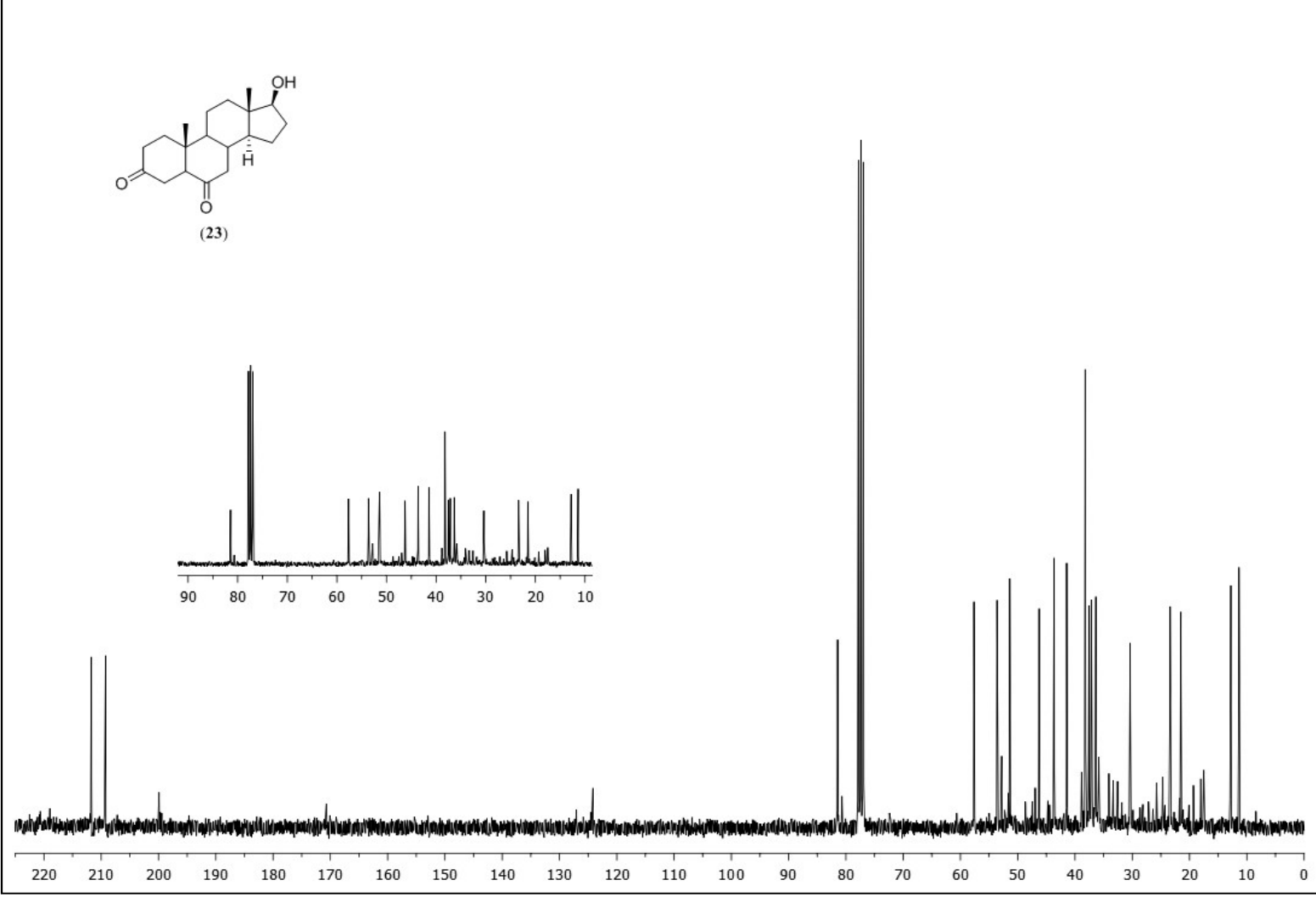


EK 20: 5 α -Androstan-3,6,17-trion (**22**) için ^{13}C NMR spektrumu



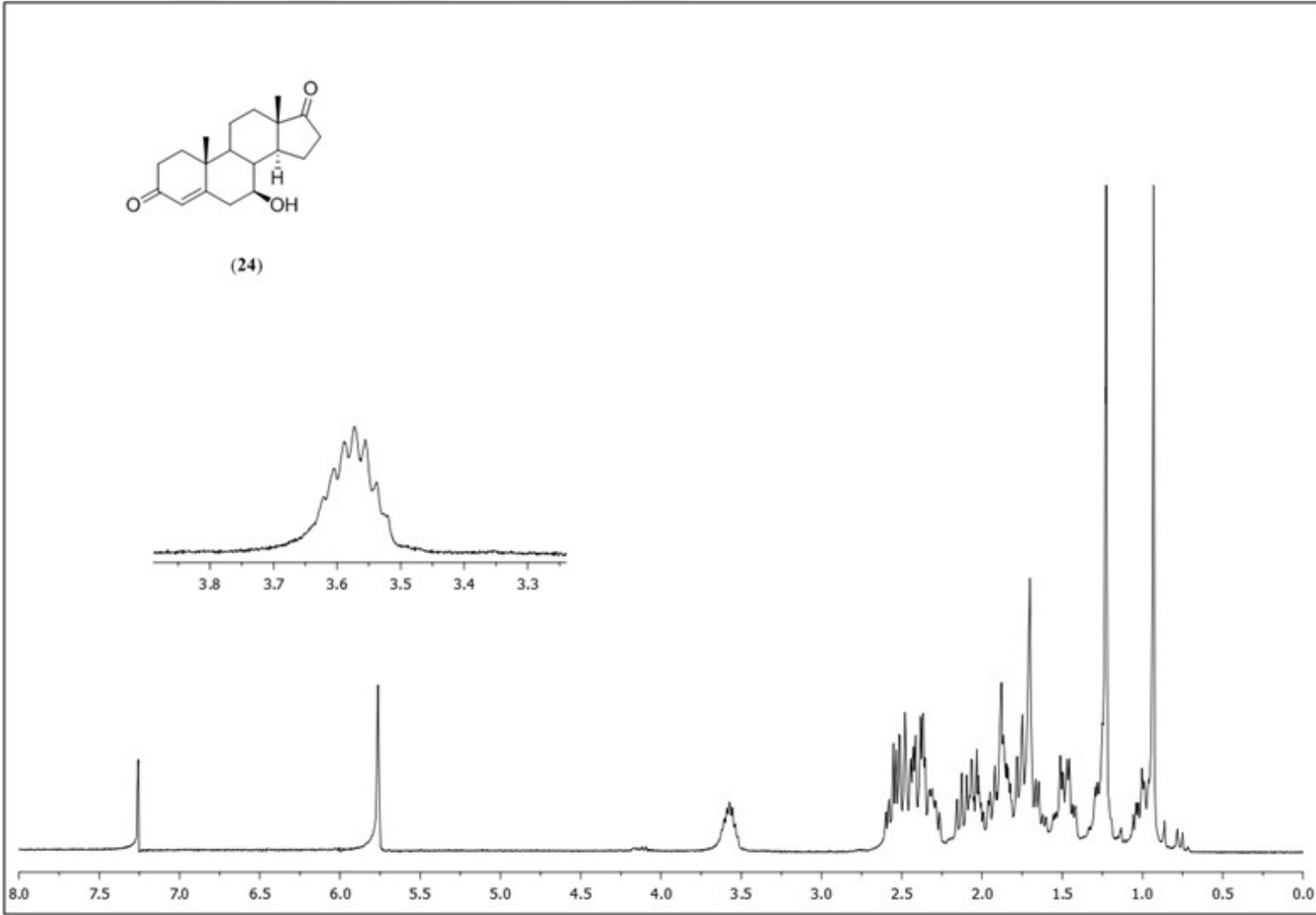
EK 21: 17 β -Hidroksi-5 α -androstan-3,6-dion (**23**) için ^1H NMR spektrumu



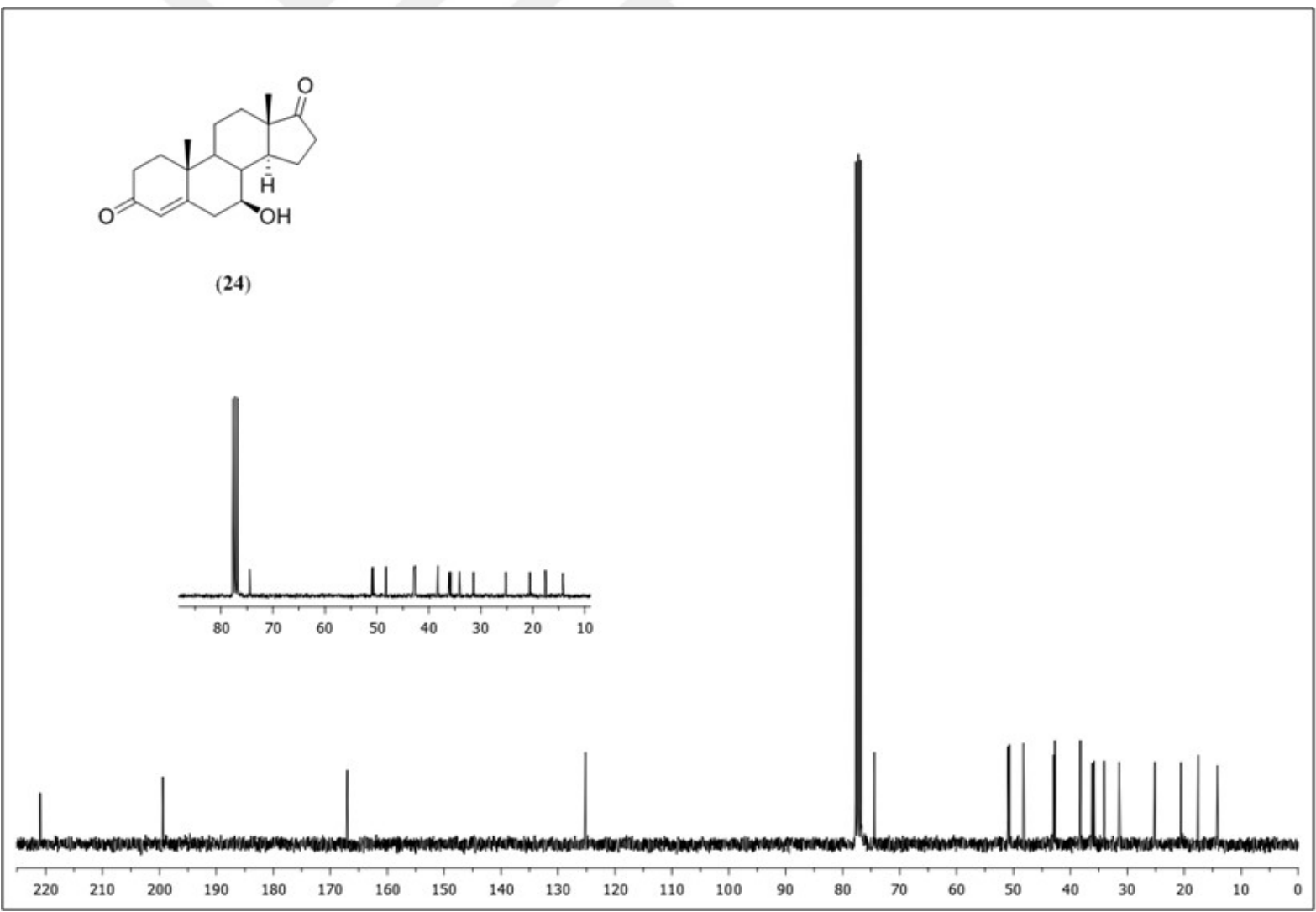


EK 22: 17 β -Hidroksi-5 α -androstan-3,6-dion (23) için ^{13}C NMR spektrumu

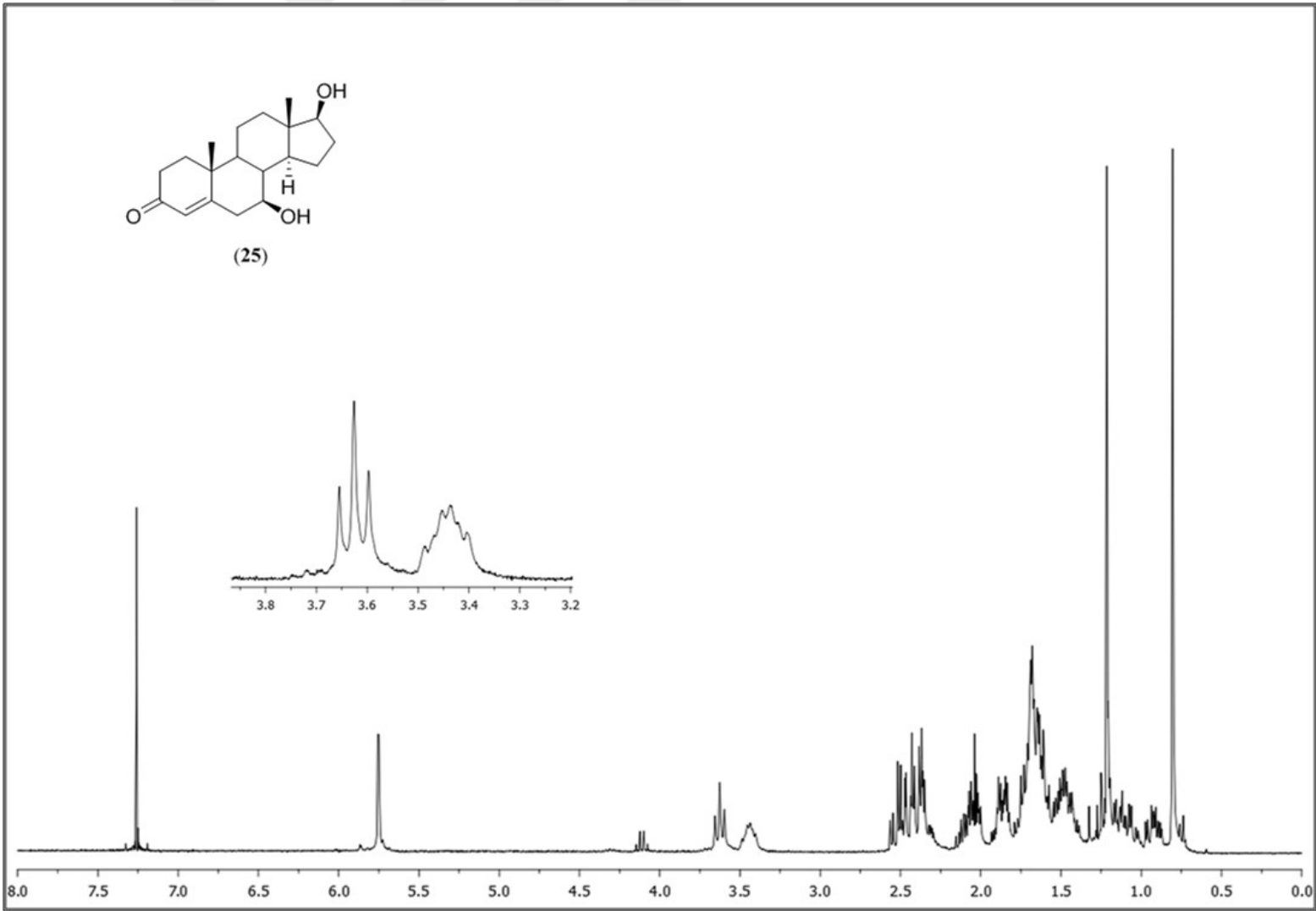
EK 23: 7β-Hidroksiandroster-4-en-3,17-dion (**24**) için ¹H NMR spektrumu



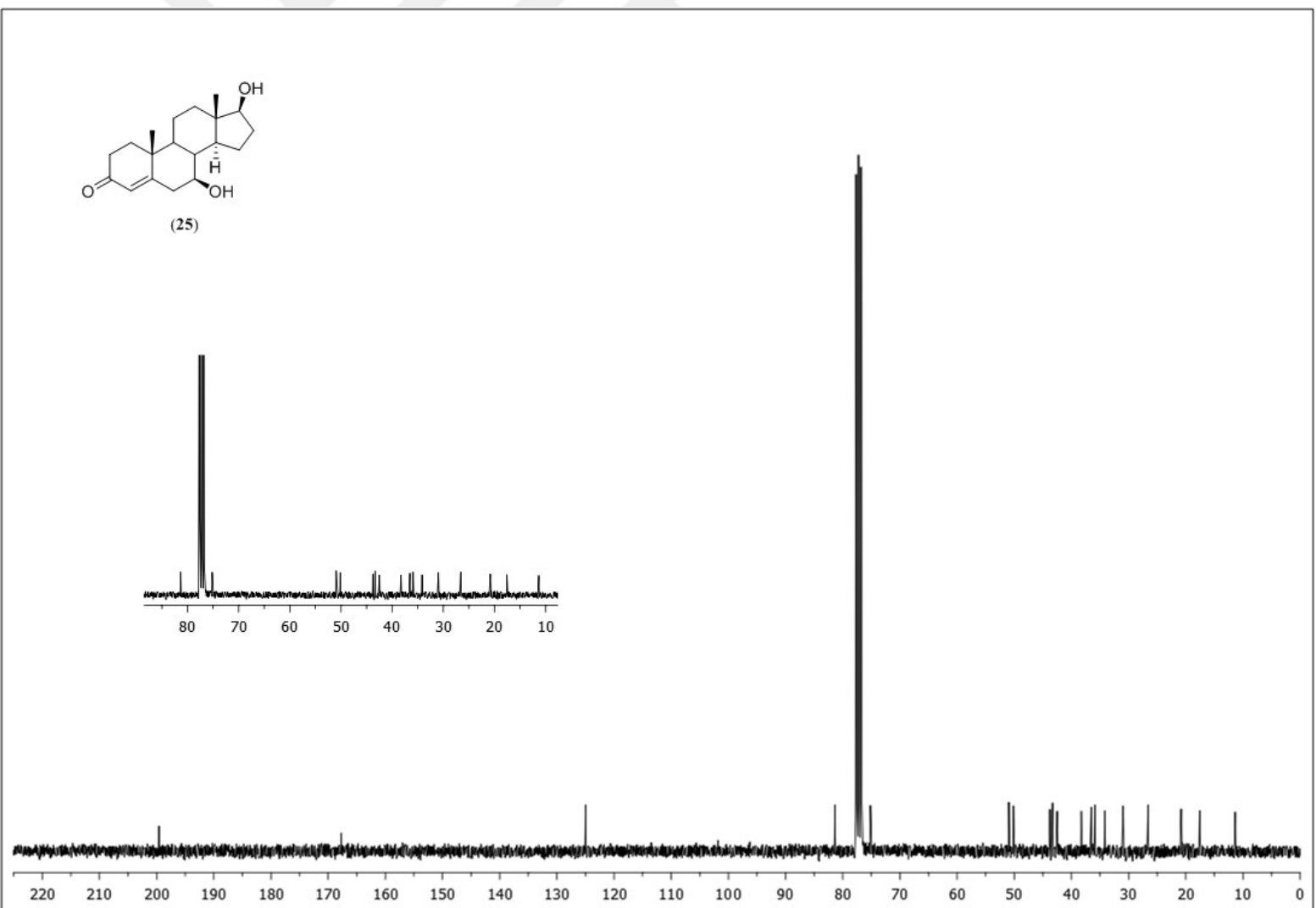
EK 24: 7 β -Hidroksiandrosta-4-en-3,17-dion (**24**) için ^{13}C NMR spektrumu



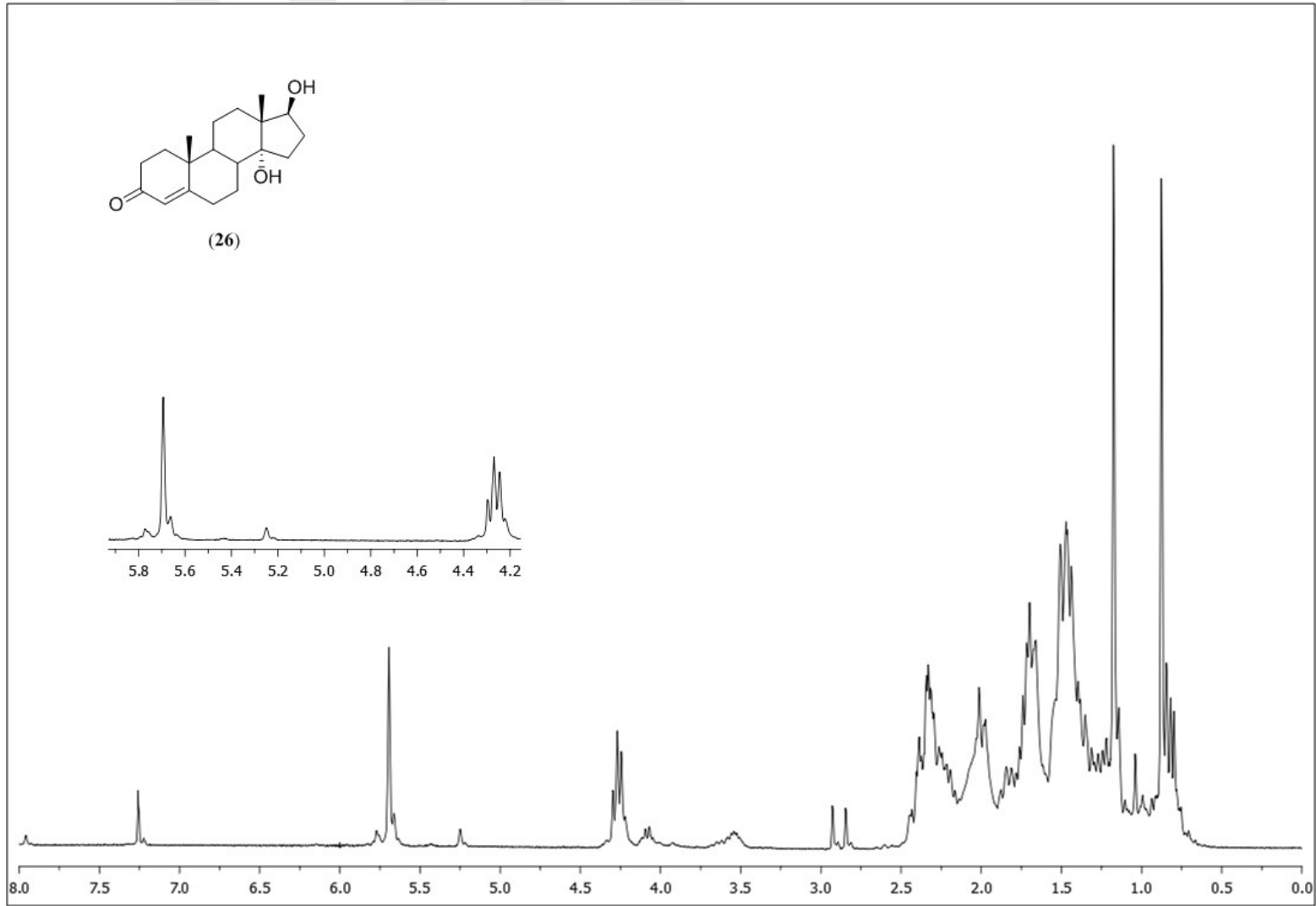
EK 25: 7 β ,17 β -Dihidroksiandrosta-4-en-3-on (25) için ^1H NMR spektrumu



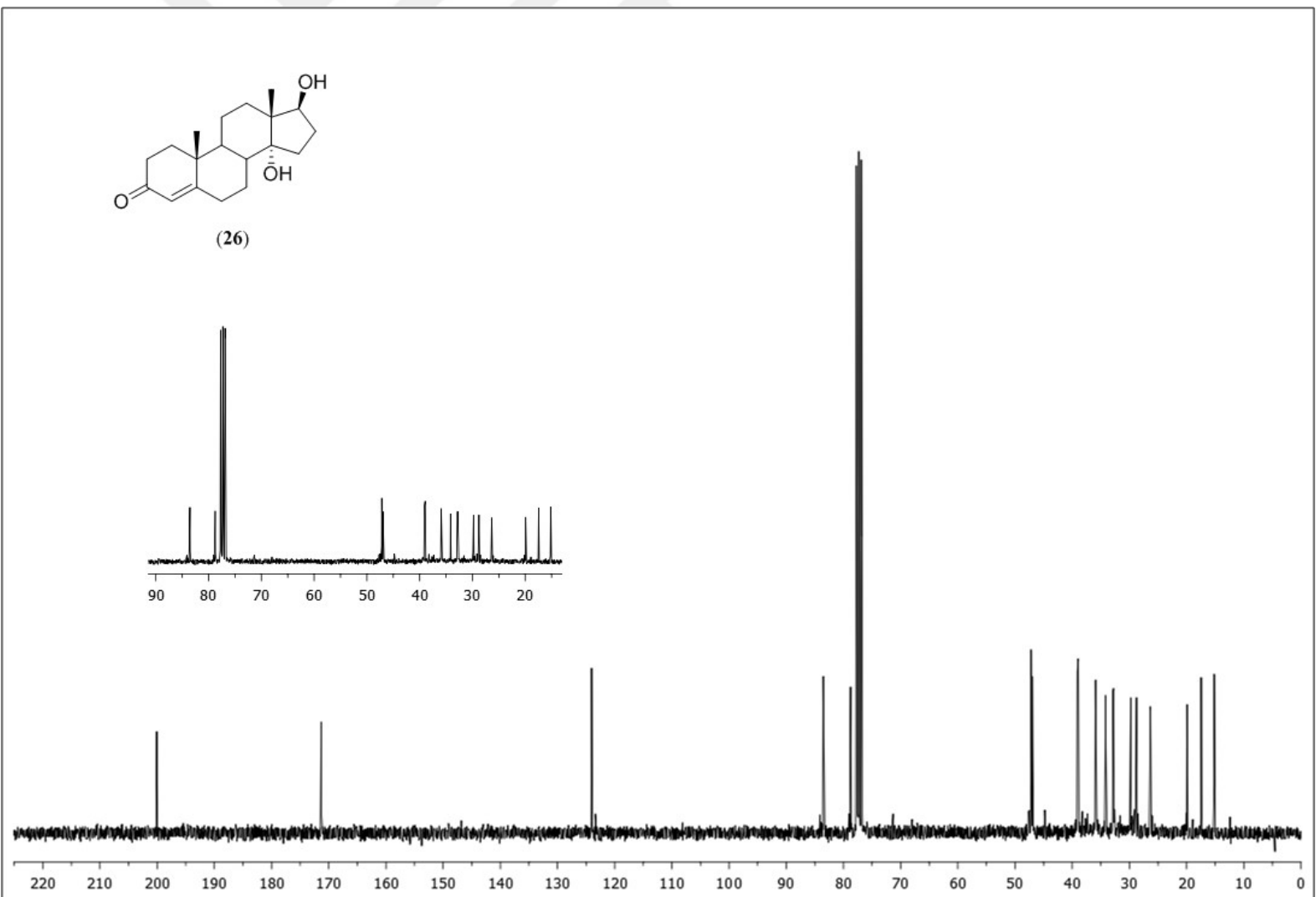
EK 26: 7 β ,17 β -Dihidroksiandroster-4-en-3-on (25) için ^{13}C NMR spektrumu

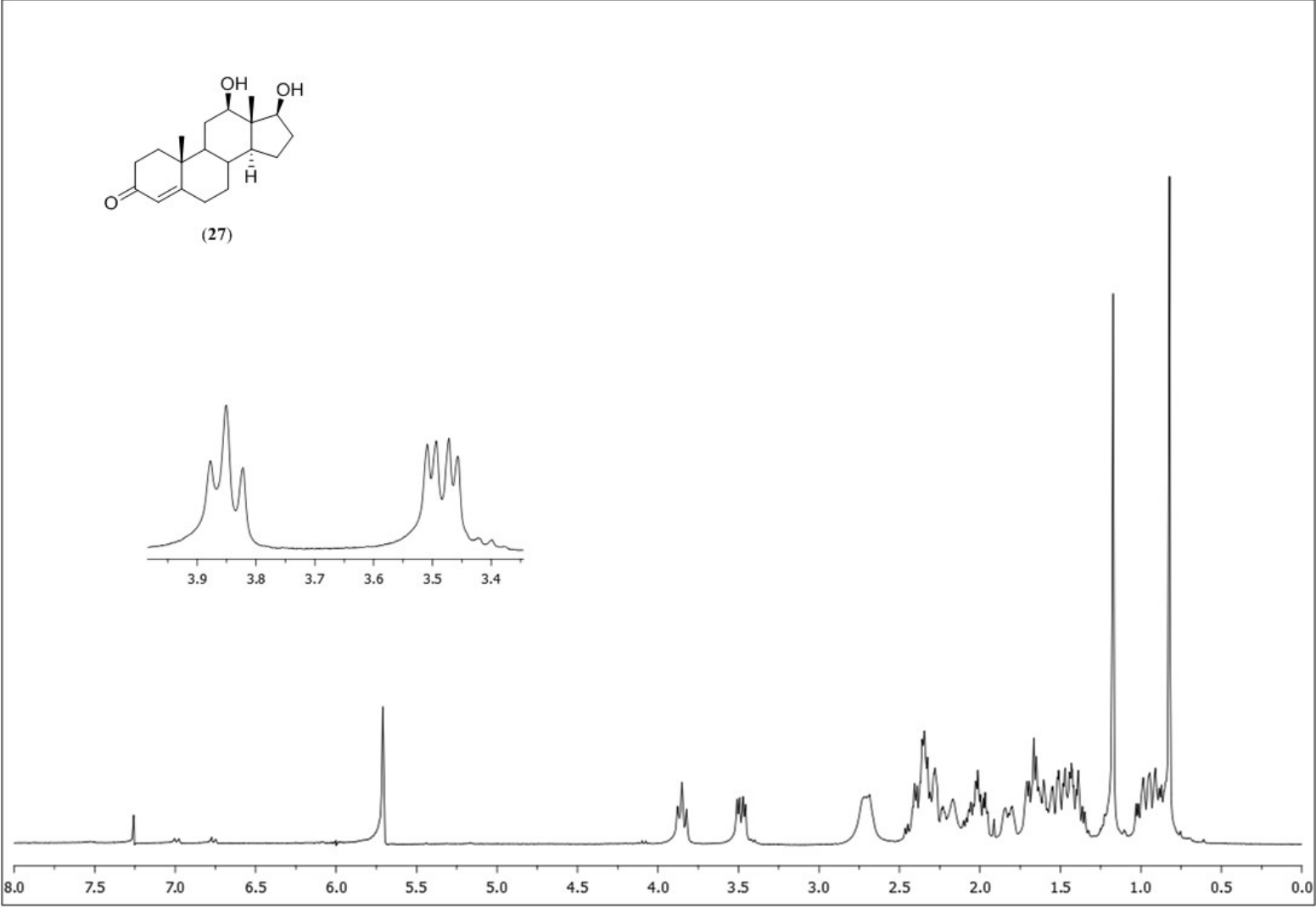


EK 27: 14α,17β-Dihidroksiandroster-4-en-3-on (**26**) için ¹H NMR spektrumu



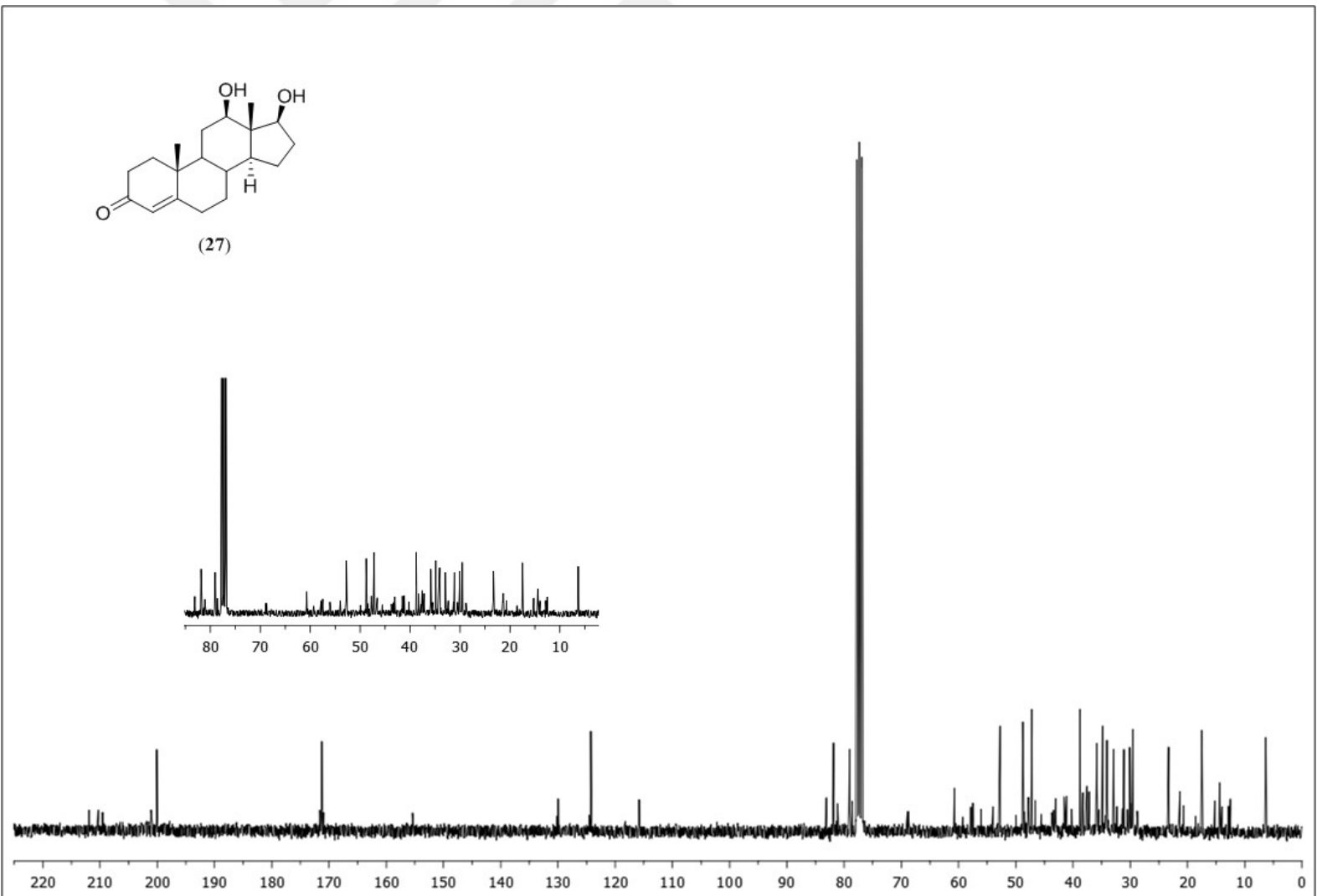
EK 28: 14 α ,17 β -Dihidroksiandrosta-4-en-3-on (26) için ^{13}C NMR spektrumu





EK 29: 12 β ,17 β -Dihidroksiandrosta-4-en-3-on (27) için ^1H NMR spektrumu

EK 30: 12 β ,17 β -Dihidroksiandrosta-4-en-3-on (**27**) ^{13}C NMR spektrumu



ÖZGEÇMİŞ

Şengül YILMAZ, 1991 yılında Samsun’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Samsun’da tamamladı. 2010 yılında başladığı Giresun Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü 2014 yılında bitirdi. Yüksek lisans öğrenimine 2016 yılında Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim dalında başladı ve halen devam etmektedir. Şengül YILMAZ evlidir.