

T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI ANDROJENLERİN *MUCOR HIEMALIS* KÜFÜ  
İLE BİYOTRANSFORMASYONLARI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Ömer Faruk DOLU**

**Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA**  
**Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA**  
**Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Kudret YILDIRIM**

**Ocak 2014**

T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI ANDROJENLERİN *MUCOR HIEMALIS* KÜFÜ  
İLE BİYOTRANSFORMASYONLARI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Ömer Faruk DOLU**

**Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA**

**Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA**

**Bu tez 31 / 01 / 2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.**

**Prof. Dr. Ahmet  
TUTAR  
Jüri Başkanı**

**Doç. Dr. Suzan  
ÖZTÜRK YILMAZ  
Üye**

**Yrd. Doç. Dr. Kudret  
YILDIRIM  
Üye**

## TEŞEKKÜR

Çalışmayı büyük bir titizlik ve sabırla yöneten, çalışma boyunca desteğini bir an bile esirgemeyen, ilim ve tecrübesinden istifade ettiğim kıymetli hocam Yrd. Doç. Dr. Kudret YILDIRIM'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuardaki çalışmalarım esnasında bana desteğini esirgemeyen Araş. Gör. Ali KURU ile gerçekleştirdiği NMR spektroskopisi çalışmaları için Araş. Gör. Sedat SEVMEZLER'e teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans öğrenimim boyunca ihtiyacım olan her konuda bana destek olan ve öğrenimim boyunca iyi bir kimyager olarak yetişmemde büyük katkıları olan Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyelerine ve araştırma görevlilerine; ayrıca lisans öğrenimini gördüğüm Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyelerine ve araştırma görevlilerine teşekkürlerimi sunarım.

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

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ÖZET.....	viii
SUMMARY.....	ix

### BÖLÜM 1.

GİRİŞ.....	1
------------	---

### BÖLÜM 2.

#### MUCOR TÜRLERİ İLE BAZI ANDROJENLERİN

BİYOTRANSFORMASYONLARI.....	5
2.1. Biyotransformasyonlar.....	5
2.2. Mikrobiyal Biyotransformasyonlar.....	9
2.3. Küfler ile Steroid Biyotransformasyonları.....	11
2.4. <i>Mucor</i> Türleri ile Androjen Biyotransformasyonları.....	12
2.5. Çalışmanın Amacı.....	14

### BÖLÜM 3.

MATERYAL VE METOT.....	15
3.1. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler.....	15
3.2. Taze Yatık Agar Kültürlerin Hazırlanması.....	16

3.3. <i>M. hiemalis</i> MRC 70325 ile Testosteron (2) İnkübasyonu.....	16
3.4. <i>M. hiemalis</i> MRC 70325 ile Epiandrosteron (12) İnkübasyonu.....	17
BÖLÜM 4.	
DENEYSEL BULGULAR.....	19
BÖLÜM 5.	
SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	23
KAYNAKLAR.....	27
EKLER.....	30
ÖZGEÇMİŞ.....	45

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

bs	: Broad singlet (küt singlet)
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat derece
cm	: Santimetre
$^{13}\text{C}$ NMR	: Karbon 13 Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
$\Delta$	: Kimyasal kayma farkı
$\delta_{\text{C}}$	: $^{13}\text{C}$ NMR spektrumundaki kimyasal kayma
$\delta_{\text{H}}$	: $^1\text{H}$ NMR spektrumundaki kimyasal kayma
DMF	: Dimetilformamit
g	: Gram
$^1\text{H}$ NMR	: Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
Hz	: Hertz
IR	: Infrared Spektroskopisi
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
$J$	: Etkileşme sabiti
lit.	: Literatür
m	: Multiplet
mg	: Miligram
MHz	: Megahertz
mL	: Mililitre
MRC	: Marmara Research Center (Marmara Araştırma Merkezi)
PDA	: Potato Dextrose Agar
pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonunun eksi logaritması
ppm	: Milyonda bir kısım
rpm	: Dakika başına dönüş sayısı
s	: Singlet
t	: Triplet

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Bazı androjenlerin biyosentezi.....	3
Şekil 1.2. Testosteron (2) bileşiğinin bazı metabolitleri.....	4
Şekil 2.1. <i>R. arrhizus</i> ile progesteron (5) biyotransformasyonu.....	11
Şekil 2.2. Sabitlenmiş <i>M. plumbeus</i> ile testosteron (2) biyotransformasyonu.....	12
Şekil 2.3. <i>M. plumbeus</i> ile testosteron (2) biyotransformasyonu .....	13
Şekil 2.4. <i>M. griseocyanus</i> ile testosteron (2) biyotransformasyonu .....	13
Şekil 2.5. <i>M. piriformis</i> ile testosteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu.....	13
Şekil 2.6. <i>Mucor</i> 881 ile testosteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu.....	14
Şekil 4.1. Substratların karbon iskeletlerinin numaralandırılması.....	19
Şekil 4.2. <i>M. hiemalis</i> MRC 70325 ile testosteron (2) biyotransformasyonu.....	20
Şekil 4.3. <i>M. hiemalis</i> MRC 70325 ile epiandrosteron (12) biyotransformasyonu.....	21
Şekil 5.1. <i>M. hiemalis</i> MRC 70325 ile testosteron (2) biyotransformasyonu.....	23
Şekil 5.2. <i>M. hiemalis</i> MRC 70325 ile epiandrosteron (12) biyotransformasyonu.....	25

## TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 5.1. Bileşiklerin <sup>13</sup> C NMR spektrumu sinyalleri .....	24
------------------------------------------------------------------------	----



## ÖZET

Anahtar Kelimeler: Biyotransformasyon, *Mucor hiemalis*, Testosteron, Epiandrosteron.

Bu çalışmada, testosteron ve epiandrosteron steroidlerinin *Mucor hiemalis* MRC 70325 küfünde nasıl metabolize edileceklerini incelemek için bu steroidlerin söz konusu küf ile beş gün süren biyotransformasyonları gerçekleştirildi.

Testosteron bileşiminin *M. hiemalis* MRC 70325A ile inkübasyonundan androstendion, 14 $\alpha$ -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion, 6 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihidroksiandrost-4-en-3-on ve 14 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihidroksiyandrost-4-en-3-on elde edildi. Epiandrosteron bileşiminin *M. hiemalis* MRC 70325 ile inkübasyonundan ise sadece 3 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihidroksiandrostan metaboliti elde edildi. Metabolitlerin yapı tayinleri, başlangıç maddeleri ile metabolitlerin erime noktaları, NMR ve IR spektrumları karşılaştırılarak gerçekleştirildi.

## BIOTRANSFORMATIONS OF SOME ANDROGENS BY MUCOR HIEMALIS

### SUMMARY

Keywords: Biotransformation, *Mucor hiemalis*, Testosterone, Epiandrosterone.

In this work, testosterone and epiandrosterone were incubated by *Mucor hiemalis* MRC 70325 for 5 days in order to see how these steroids would be metabolized by the fungus.

Incubation of testosterone with *M. hiemalis* MRC 70325 afforded androstendione, 14 $\alpha$ -hydroxyandrost-4-en-3,17-dione, 6 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihydroxyandrost-4-en-3-one and 14 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihydroxyandrost-4-en-3-one. Incubation of epiandrosterone with *M. hiemalis* MRC 70325 only afforded 3 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihydroxyandrostan. The structures of the metabolites were elucidated by comparing melting points, NMR and IR spectra of the starting materials with those of metabolites.

## BÖLÜM 1. GİRİŞ

Canlı bünyesinde doğal olarak gözlenen organik bileşikler üç ayrı grupta incelenebilir. İlk gruba, hücrelerin üreme ve gelişmelerinde merkezi rol oynayan ve tüm hücrelerde ortak olan birincil metabolitler adı verilen bileşikler girer. İkinci gruba selüloz, ligninler ve proteinler gibi hücresel yapıları meydana getiren büyük moleküler ağırlıklı biyopolimerler girer. Son gruba ise canlıların üreme ve gelişmesi için esansiyel olmayan ikincil metabolizmanın bileşenleri olan, doğal ürünler veya sekonder metabolitler olarak adlandırılan ve yalnızca bir veya birkaç tür için karakteristik olan bileşikler girer [1].

Doğal ürünler hayat için elzem olmasalar da genellikle diğer canlılar üzerindeki etkileri ve ekseriyetle de canlıların hayatta kalmalarına yardımcı olmaları sebebi ile dikkat çeker [1-3]. Bu ürünler çoğu canlıda bulunsalar da özellikle bitkiler, mikroorganizmalar, mantarlar ve böceklerde daha yaygın olarak gözlenirler [3]. Doğal ürünlerin en fazla oranda bulunduğu canlılar, bitkiler ve mikroorganizmalardır. Tıbbi, ticari ve zehirli bitkilerdeki doğal ürünler olan biyolojik açıdan aktif bileşiklerin çoğu organik kimyanın gelişimi süresince çalışılmıştır. Günümüzdeki ilaçların %40'ından fazlasının doğal ürün kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

Doğal ürünler özellikle bitkiler, mikroorganizmalar, böcekler ve diğer hayvanlar arasındaki etkileşimlerin düzenlenmesinde ekolojik role sahiptirler. Bu bileşikler çoğu zaman stres altında ortaya çıkan savunma bileşikleri, hoş olmayan tatları nedeniyle otçullar tarafından tüketilmeyen bileşikler, diğer canlıları buldukları canlılara çeken renkli ve kokulu bileşikler ve özellikle böcekler gibi bazı hayvanlar arasında iletişimi sağlayan feromonlar olarak görev yaparlar [3].

Doğal ürünler çok sayıda ve birbirinden farklı yapıda bileşikleri içersede bu bileşiklerin birçoğu genelde doğadaki biyosentezlerinden kaynaklanan bazı özel yapısal karakterleri nedeniyle poliketidler, yağ asitleri, terpenler, steroidler, fenolik bileşikler, alkaloidler, özelleşmiş karbohidratlar ile özelleşmiş amino asitler ve peptidler gibi sınıflardan birine dahil olurlar [1].

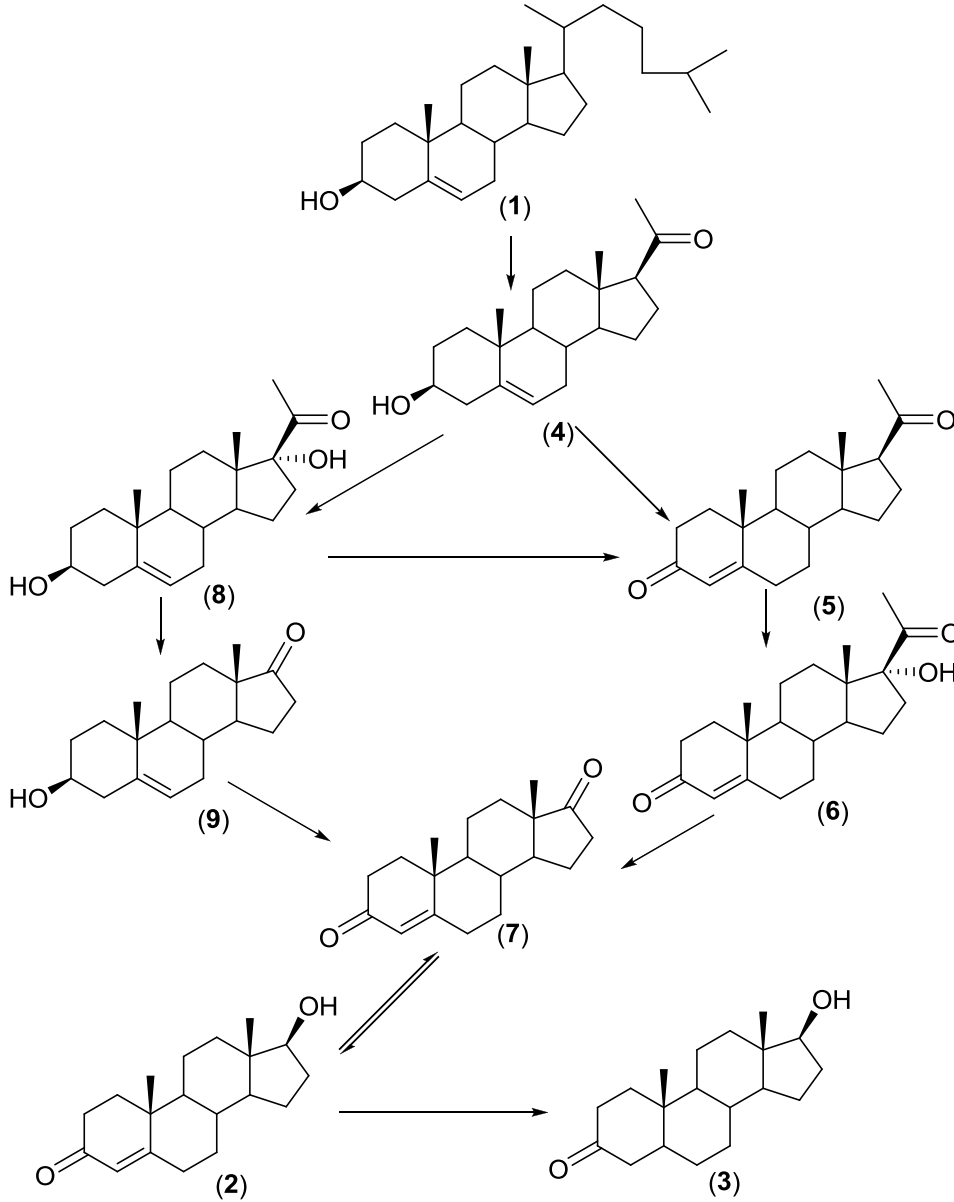
Doğal ürünlerin önemli bir sınıfı olan steroidlerin en bilinen temsilcilerinden birisi kolesterol (1) bileşiğidir. Kolesterol (1) insan ve hayvan membranlarındaki akışkanlığının düzenlenmesinde oldukça önemlidir. Kolesterol (1) ayrıca safra asitleri, D<sub>3</sub> vitamini ve steroid hormonlar gibi birçok önemli fonksiyonu bulunan bileşiklerinde başlangıç maddesidir [4].

Kolesterol (1) kökenli steroid hormonlar glukokortikoidler, mineralokortikoidler, androjenler, östrojenler ve progestagenler (progestinler) olmak üzere beş ana grupta incelenmektedir. Androjenler, östrojenler ve progestagenler üreme ile ilgili organların gelişme ve büyümelerini, ikincil eşey karakterlerini ve üreme döngüsünü düzenleyen eşey hormonları olarak da bilinirler. Eşey hormonları ayrıca güçlü anabolik etkileri sayesinde kemik, kaslar ve deri gibi birçok dokunun gelişmesini ve metabolizmanın da sürekliliğini sağlarlar [4,5].

Östrojenlerin başlangıç maddeleri de olan androjenler omurgalı erkek bireylerinde etkili olan eşey hormonlarıdır. Testosteron (2) ve dihidrotestosteron (3) en etkin androjenlerdir. Androjenlerin vücuttaki asıl sentez yeri erbezleri (testis) olmasına rağmen bu hormonların bir kısmı adrenal korteksten salınmaktadır. Adrenal korteks ve testislerde androjenlerin sentezi önce kolesterolden (1) pregnenolon (4) oluşması ile başlar (Şekil 1.1). Adenohipofizden salınan lüteinleştirici hormon (LH) kolesterolden (1) pregnenolon (4) sentezini uyarmaktadır. LH salınması ise kandaki serbest testosteron düzeyi tarafından düzenlenir. Pregnenolon (4) üzerinden androjenlerin biyosentezi  $\Delta^4$  yolu veya  $\Delta^5$  yolu üzerinden gerçekleşmektedir [5].

Androjen biyosentezinin ana yolu  $\Delta^4$  yoludur. Bu yolda pregnenolon (4) önce progesterona (5) dönüştürülür. Progesteron (5) ise daha sonra 17 $\alpha$ -hidroksiprogesterona (6) dönüştürülür. 17 $\alpha$ -Hidroksiprogesteron (6) bünyesindeki yan

zincirinin enzimatik olarak parçalanması ile oluşan androstendion (7) bileşiğinin C-17'deki indirgenmesi sonucunda testosteron (2) sentezlenir. Testosterondan (2) ise daha sonra  $5\alpha$ -redüktaz aktivitesi ile daha etkin bir diğer androjen olan dihidrotestosteron (3) sentezlenir [5].

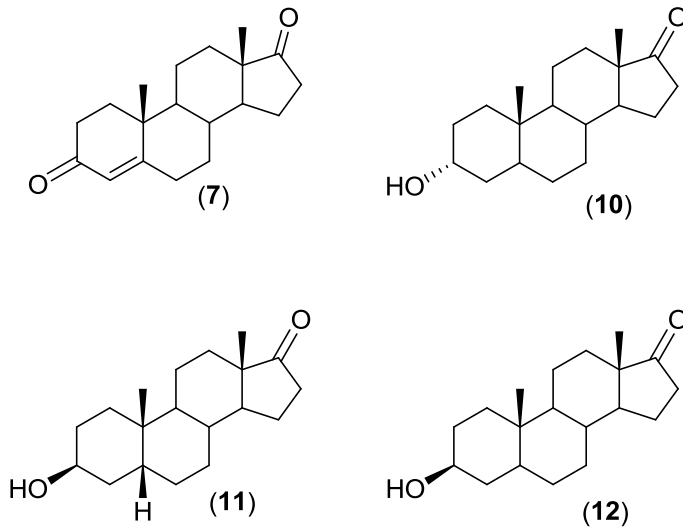


Şekil 1.1. Bazı androjenlerin biyosentezi.

Bir yan yol olan  $\Delta^5$  yolunda ise pregnenolon (4) 17 $\alpha$ -hidroksipregnenolon (8) bileşiğine çevrildikten sonra yan zincirin uzaklaştırılması ile dehidroepiandrosteron (9) bileşiğine çevrilmektedir. Dehidroepiandrosteron (9) ise androst-4-en-3,17-dion (7) bileşiğine çevrildikten sonra testosterona (2) yükseltgenmektedir. Bu yolda

oluşan  $17\alpha$ -hidroksipregnenolon (8) ayrıca doğrudan progesterona (5) çevrilebilmektedir.

Biyolojik etkinliğini tamamlayan testosteron (2) birçok dokuda düşük aktiviteli veya tamamen inaktif metabolitlere dönüştürülür. Testosteron (2) önce C-17'deki gerçekleşen bir oksidasyonla androstendiona (7) çevrilir. Androstendionun (7) A halkasındaki bir seri tepkimeler ile indirgenmesi sonucunda Şekil 1.2'de verilen androsteron (10), etikolanon (11) ve epiandrosteron (12) gibi metabolitler oluşur [5].



Şekil 1.2. Testosteron (2) bileşiğinin bazı metabolitleri

Epiandrosteron (12) zayıf androjenik etkili bir testosteron metabolitidir. Bu metabolit testosteron kökenli androstendion (7) üzerindeki  $5\alpha$ -redüktaz aktivitesini takiben oluşan androstandion (13) bileşiğindeki 3-keto grubunun  $\beta$ -yüzünden redüksiyonu ile sentezlenir. Aslında epiandrosteron bileşiği doğal olarak daha çok DHEA olarak da bilinen dehidroepiandrosteron (9) bileşiğinin  $5\alpha$ -redüktaz aktivitesi ile redüksiyonu sonucunda oluşur [6].

## **BÖLÜM 2. *MUCOR* TÜRLERİ İLE BAZI ANDROJENLERİN BİYOTRANSFORMASYONLARI**

### **2.1. Biyotransformasyonlar**

Enzimlerin veya enzimleri içeren biyolojik sistemlerin kendilerine yabancı olan maddeler üzerinde gerçekleştirdikleri kimyasal değişikliklere biyotransformasyonlar adı verilir [7].

Biyotransformasyonlarda kullanılan enzimler çeşitli biyolojik sistemlerin bünyesinde olabileceği gibi tek başına immobilize veya serbest olarak da bulunabilir. Günümüzde biyotransformasyonlar için kullanılan enzimlerin birçoğu izole edilerek bazıları ise ticari olarak elde edilir. Enzimler, Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim Komisyonu tarafından oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlar olmak üzere altı ayrı gruba ayrılmıştır. Bu gruplar ise kendi içerisinde 4-13 arası alt gruplara ayrılmaktadır [4,8].

Oksidoredüktazlar dehidrojenazlar, redüktazlar, oksijenazlar, oksidazlar gibi enzimleri içeren, iki ayrı substrat arasındaki redoks reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Transferazlar iki ayrı substrat arasındaki hidrojen atomu haricindeki belirli atomlar veya grupların transferini katalizleyen enzimlerdir. Hidrolazlar ise ester, eter, anhidrit, peptid, glikozid, C-halojenür veya P-N bağları gibi bazı bağların su eklenerek parçalanmasını katalizleyen enzimlerdir. Liyazlar substratlardan belirli grupların ayrılması ile çift bağ oluşumunu ve çift bağlara çeşitli grupların eklenmesini katalizleyen enzimlerdir. İzomerazlar, rasemaz, epimeraz, mutaz gibi isimlerle anılan ve çeşitli izomerlerin birbirlerine dönüşümünü katalizleyen enzimleri içerir. Ligazlar ise iki substratın birbirlerine eklenmesini katalizleyen enzimlerdir [4,8].

Enzimler için oldukça hassas, pahalı, yalnızca kendi spesifik substratları ve kendi doğal çevreleri üzerinde etkili oldukları yönünde bazı önyargılar vardır. Enzimlerin birçoğu için bu olumsuz düşünceler doğru değildir [8].

Enzimler biyokatalizör olarak kullanıcılarına pekçok avantaj sağlar. Örneğin, enzimler oldukça hızlı çalışan biyokatalizörlerdir. Enzimatik bir reaksiyon enzimsiz gerçekleşen normal bir reaksiyona göre  $10^8$ - $10^{10}$  kat daha hızlı gerçekleşir. Enzimatik reaksiyonlarda katalizör oranının %  $10^{-3}$ - $10^{-4}$  mol arasında olması istenirken, bu oran kimyasal katalizörlü bir reaksiyonda % 0,1-1 mol aralığına kadar çıkabilir.

Enzimler, katalizör olarak kullanılan ağır metaller ve sentetik amaçlı kullanılan çoğu reaktifin aksine doğaya uyumlu biyomoleküllerdir.

Enzimler, sentetik amaçlı kullanılan çoğu reaktiften farklı olarak ılıman şartlarda etkili biyomoleküllerdir. Enzimler genellikle sıcaklığın 20-40 °C arası olduğu ılıman şartlar altında pH 5-8 aralığında çalışırlar. Böylelikle sentetik metotlarda sıklıkla karşılaşılan izomerleşme, rasemizasyon, çevrilme ve bozunma gibi yan reaksiyonlar azaltılabilmektedir.

Enzimler doğal rolleri dışındaki farklı aktiviteleri de gösterebilirler. Örneğin, geniş bir substrat spektrumuna sahip olmalarından ötürü çoğu enzim, sentetik veya doğal birçok bileşik üzerinde etkili olabilir. Buna ilaveten gerektiğinde bazı enzimler organik çözücülerde de kullanılabilir.

Benzer hatta aynı şartlar altında etkin olduklarından enzimler, bir reaksiyon ağındaki birden fazla seri reaksiyon aynı ortamda gerçekleştirebilir. Metabolik yollardaki multienzim sistemleri de bu şekilde çalışmaktadır.

Enzimler çok farklı tipte reaksiyonları katalizleyebilirler. Neredeyse her sentetik reaksiyona eşdeğer bir enzimatik reaksiyon söz konusudur. Enzimler ile ester, eter, lakton, laktam, epoksit, asit anhidrit, amid ve nitrillerin hidroliz veya sentezi, alkan, alken, aromatik bileşikler, alkol, aldehit, keton, sülfürler ve sülfoksitlerin yükseltgenmesi ya da indirgenmesi, karboksilasyon, dekarboksilasyon, alkilasyon ve



dealkilasyon, halojenasyon ve dehalojenasyon, izomerizasyon, su, amonyak ve hidrojen siyanür eklenmesi veya eliminasyonu, açiloin ve aldol reaksiyonları, Michael katılması ve Diels-Alder reaksiyonları gerçekleştirilebilir.

Enzimler regioseçici ve diastereoseçici biyomoleküller olup, kompleks üç boyutlu yapıları sebebi ile aynı substrat molekülünde bulunan farklı bölgelerdeki fonksiyonel grupları bile ayırt edebilirler.

Kemoseçici biyomoleküller olan enzimler spesifik bir fonksiyonel grup üzerinde etkili olurlar ve hassas diğer fonksiyonel gruplarda etkin olmadıkları için genellikle yan ürünlerin oluşumlarına engel olurlar.

Enantiyoseçici biyomoleküller olan enzimler L-amino asitlerden oluştukları için kiral biyokatalizörlerdir. Substrat içeriğindeki herhangi bir kiralite, enzim-substrat kompleksi oluşumu esnasında tanımlanır. Prokiral bir substrat yalnızca bir enantiyomere dönüşürken çoğunlukla rasemik karışımlardaki enantiyomerlerden sadece birinin etkilenmesi sebebi ile enantiyomerlerin ayrılmaları da mümkün olabilmektedir.

Enzimlerin yukarıda anlatılan avantajları sayesinde, organik sentez yöntemleriyle gerçekleştirilebilmesi çok zor hatta imkansız olarak nitelenen reaksiyonlar kolaylıkla gerçekleştirilebilmektedir [8].

Enzimlerin biyokatalizörler olarak kullanılmasının bazı dezavantajları da vardır. Örneğin, enzimler yalnızca bir enantiyomerik forma sahip olmaları ve diğer enantiyomerik formlarının D-amino asitlerden sentezi için genel bir yol olması sebebiyle yalnızca spesifik bir enantiyomer ile reaksiyona girebilir. Böyle bir durumda, diğer enantiyomerin ürün olarak elde edilebilmesi için zıt tipte stereokimyasal seçiciliğe sahip bir enzimin kullanılması gereklidir. Bu çoğu zaman mümkün olamamaktadır [8].

Enzimlerin aktiviteleri kendilerini etkileyen çeşitli parametrelerdeki değişimlere oldukça duyarlıdır. Örneğin, protein tabiatında olmaları sebebi ile yavaş ilerleyen bir enzimatik reaksiyonu hızlandırmak için pH ve sıcaklık benzeri parametreler çok fazla değiştirilemez.

Enzimler için en uygun reaksiyon ortamı su olsa da çoğu organik substratın sudaki çözünürlükleri oldukça düşüktür. Enzimatik bir reaksiyonun sulu bir ortam yerine substratların daha iyi çözüldüğü organik bir çözücüde gerçekleştirilmesi çoğu zaman enzimlerin denatürasyonu ile sonuçlanıp aktivite kaybına neden olmaktadır.

İnhibisyona duyarlı biyomoleküller olan enzimler, çoğu enzimatik reaksiyonda yüksek oranlı substrat ve ürün konsantrasyonlarında inhibe olurlar. Substrat inhibisyonu, düşük miktarlarda substrat düzeyinden başlanıp ortama sürekli substrat ilave edilerek kolaylıkla engellenebilir. Reaksiyon ortamından artan ürünün aşama aşama uzaklaştırılması genellikle ürünün bir sonraki reaksiyon basamağına dahil olması nedeniyle oldukça güçtür.

Enzimler kendilerine özgü doğal kofaktörlerine bağımlıdır. Enzimatik bir reaksiyonda NADH veya NADPH gibi kofaktörler rol oynuyorsa, bu kofaktörlerin bizzat reaksiyon ortamında olmaları ve yenilenmeleri gerekir. Kofaktörlerin genelde kararsız moleküller olması, sentetik muadilleri ile yer değiştirilmelerinin mümkün olmaması ve oldukça pahalı olmaları enzimatik reaksiyonların önemli dezavantajlarından biridir.

Enzimler alerjik reaksiyonlara sebebiyet verebildikleri için kimyasal madde olarak değerlendirilip dikkatli kullanılırlarsa, bu özellikleri sorun olmaktan çıkar.

Temelde biyotransformasyonlar izole enzimler veya bütün hücre sistemleriyle biyotransformasyonlar olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleştirilir. Bütün hücre sistemleri tanımı genel olarak bitki ve hayvanlara ait hücre, doku ve organ kültürleri ile mikroorganizmaları kapsar. Biyotransformasyon reaksiyonlarında çoğunlukla bütün hücre sistemleri tercih edilmektedir. Bu tercihin sebepleri arasında çoğu hücre içi enzimin hücre dışında kararsız olabilmesi, hücre içi enzimlerin izolasyonunun

zorluğu, hücre içi enzimlerin homojenasyon sırasında bazı proteolitik enzimlerin etkisi ile hidrolizlenmesi, hücre içi enzimlerin kofaktör ihtiyaçlarının temini ve sürekli yenilenme isteği ve yüksek maliyetleri sayılabilir.

## 2.2. Mikrobiyal Biyotransformasyonlar

Biyotransformasyon reaksiyonlarında kullanılan yöntemlerden olan bütün hücre sistemleri içinde en çok tercih edilenler mikrobiyal hücrelerdir. Mikrobiyal hücrelerin büyüme ve gelişme hızı, bitki ve hayvan hücrelerine göre oldukça yüksektir. Bu da mikrobiyal hücreler ile biyotransformasyonların kısa zamanda hızlı bir şekilde gerçekleşmesini sağlar. Mikrobiyal hücreler, minimal boyutları ve güçlü hücre duvarı yapıları sayesinde bitki ve hayvan hücrelerine göre mekanik olarak daha kararlı olmalarıyla farklı kültür tekniklerinde bu tip hücrelerin ortama uyumu yönüyle avantajlıdır. Buna ilaveten mikrobiyal hücreler bitki ve hayvan hücrelerine göre çok farklı türde substratları metabolize edebilir [8].

Günümüzde mikrobiyal biyotransformasyonların biyoteknolojinin esas öğeleri arasında yer alması, kimyasal sentez metotlarına karşı olan üstünlüklerinden kaynaklanır [7-9].

Mikroorganizmaların genetiği ile oynanabilmektedir. Mikroorganizmalar üzerinde gerçekleştirilen genetik değişiklikler sayesinde diğer kimyasal yöntemler ile düşük verimle elde edilen önemli ürünler daha yüksek verimlerde elde edilebilir. Hatta genetik uygulamalar ile ürünler üzerinde spesifik değişiklikler bile mümkün olabilmektedir [9].

Mikroorganizmalar yapılarındaki spesifik olmayan enzim sistemleri sayesinde, hem doğal hem de sentetik olan çok sayıdaki farklı substratlar üzerinde pek çok farklı kimyasal reaksiyonları gerçekleştirebilir [7].

Geleneksel kimyasal yöntemlere göre mikrobiyal biyotransformasyonlar, oldukça ılıman şartlarda gerçekleşir. Çoğu mikrobiyal biyotransformasyon oda sıcaklığında ve 1 atm basınç altında gerçekleşmektedir [8].

Mikrobiyal biyotransformasyonlar geleneksel kimyasal yöntemlere göre daha ucuza daha kısa sürede gerçekleştirilir. Hedeflenen bileşikler daha kısa süreler içerisinde ve genelde oldukça yüksek verimlerle, kimyasal reaktiflere göre çok daha ucuza mal edilen besiyeri bileşenleri ve mikroorganizmalar kullanılarak hazırlanmaktadır [7,9].

Mikrobiyal biyotransformasyonlar çevre dostu iken geleneksel kimyasal sentez metotlarında kullanılan çoğu reaktif, çevreye çok büyük zararlar vermektedir [7].

Mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonları enantioseçicidir. Geleneksel kimyasal sentez yöntemleri ile genelde hedeflenen moleküller, ayrışmaları oldukça zor olan rasemik karışımlar halinde oluşmaktadır. Özellikle ilaçta etken maddelerin sentezinde sadece istenen enantiyomeri üretmek oldukça önemlidir. Günümüzde tek enantiyomerin seçimli sentezinde mikroorganizmaların kullanılmaları gittikçe yaygınlaşmaktadır [8].

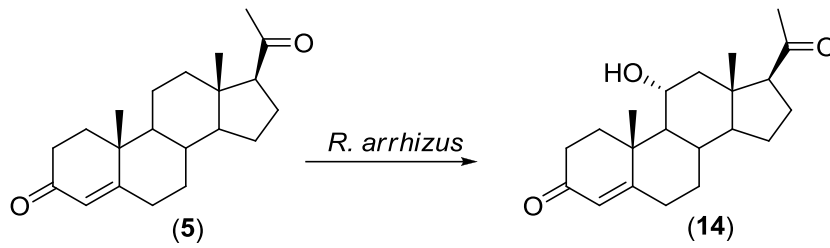
Geleneksel kimyasal sentez yöntemlerinin aksine mikrobiyal biyotransformasyonlar esnasında substratlar üzerindeki diğer fonksiyonel grupların korunması gerekmez. Bu üstünlük enzimlerin regioseçiciliklerinden kaynaklanmaktadır [7,8].

Mikrobiyal biyotransformasyonlar çoğu zaman fonksiyonel grupların varlığına ihtiyaç duymaz. Örneğin, mikrobiyal hidroksilasyonlar fonksiyonel grupların uzağında meydana gelir [7].

Mikroorganizmalar farklı ortamlara kolaylıkla uyum sağlayabildikleri için erlenden fabrika fermentörlerine kadar birçok ortamda kolayca kullanılabilir [7-9].

Mikroorganizmalar ile pekçok sentetik reaksiyona muadil reaksiyonlar gerçekleştirilebilmektedir. Buna ilaveten mikrobiyal hidroksilasyonlar gibi bazı mikrobiyal biyotransformasyonlar, sentetik reaksiyonlar ile tek basamakta gerçekleştirilemez. Mikrobiyal hidroksilasyonlar en önemli mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonlarından [4]. Mikrobiyal hidroksilasyonların önemi ilk olarak iltihap giderici olarak kullanılan kortikal steroidlerin sentezinde anlaşılmıştır. Bu steroidlerin sentezinde, fonksiyonel gruplardan oldukça uzakta

bulunan C-11 pozisyonuna bir oksijen ilavesi, klasik kimyasal yöntemlerle oldukça uzun ve pahalı bir işlem olmasına rağmen söz konusu bu sorunun *Rhizopus arrhizus* küfünün yüksek verimli bir 11-hidroksilasyonu ile giderilmesi dikkatleri mikrobiyal biyotransformasyonlar üzerinde toplamıştır. Bahsi geçen reaksiyonda (Şekil 2.1) progesteron (5) mikrobiyal hidroksilasyon ile 11 $\alpha$ -hidroksiprogesteron (14) bileşiğine çevrilmiştir [7].



Şekil 2.1. *R. arrhizus* ile progesteron (5) biyotransformasyonu

Mikrobiyal biyotransformasyonlar için çeşitli mikroorganizmalar serbest veya uygun yüzeylere sabitlenmiş olarak kullanılabilir. En yaygın olarak kullanılan mikroorganizmalar, protista aleminin üyesi ve prokaryotik canlılar olan bakteriler ile mantarlar aleminin üyesi ve ökaryotik canlılar olan küfler ve mayalardır [9].

### 2.3. Küfler ile Steroid Biyotransformasyonları

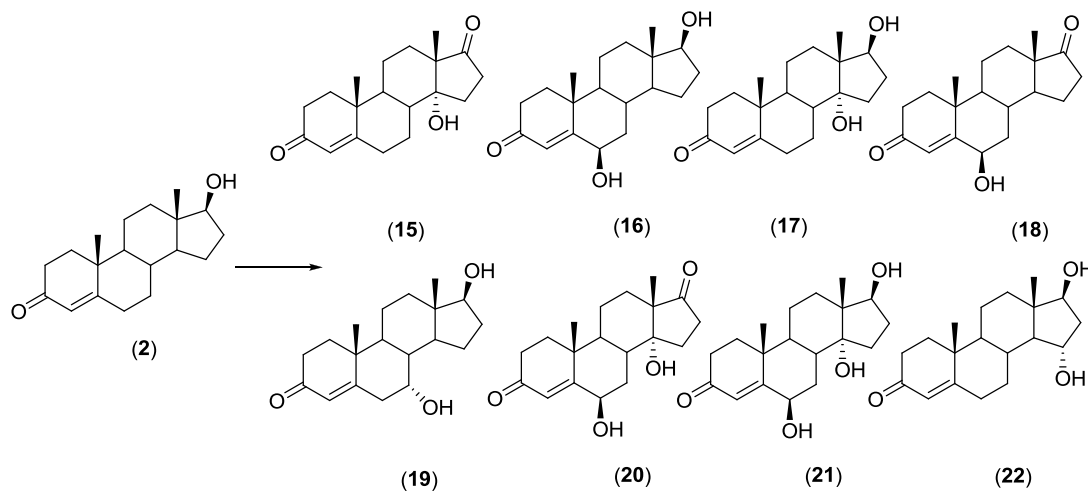
Steroidlerin küfler ile mikrobiyal biyotransformasyonları, yüksek regio ve stereoseçicilikleri sebebi ile çok daha önemli ve fonksiyonlu bileşiklerin üretimi için dünya çapında yaygın olarak kullanılmaktadır [10-14]. Günümüzde, bilinen mikrobiyal biyotransformasyonların etkinliklerini artırmak, kullanılabilir yeni mikroorganizmalar ve reaksiyonlar keşfetmeye yönelik çalışmalar yoğun olarak devam etmektedir [10].

Bugüne kadar farklı küf türleri ile birçok steroidin biyotransformasyonları gerçekleştirilmiştir. Bahsi geçen çalışmalardan Baeyer-Villiger oksidasyonları, 5 $\alpha$ -redüksiyonları ve steroidlerin farklı kısımlarında gerçekleşen mikrobiyal hidroksilasyonlar gibi dikkat çekici sonuçlar alınmıştır [10-14].

## 2.4. *Mucor* Türleri ile Androjen Biyotransformasyonları

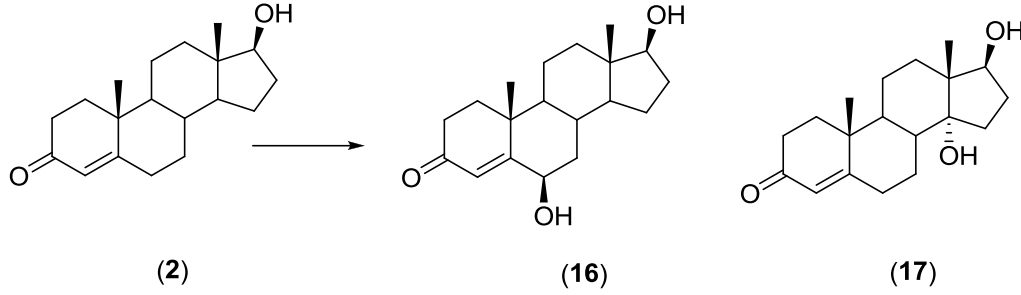
Yerkürenin her yerinde geniş dağılımları olan küfleri içeren mucorales takımı, mantarlar aleminin zigomiçetes sınıfında yer alır. Mucorales takımının üyeleri toprak, çürüyen sebzeler, meyveler ve tohumlardan izole edilebilir. Bu takım *Absidia*, *Rhizopus* ve *Mucor* [15] gibi oldukça iyi bilinen türleri içerir. *Mucor* cinsi çok sayıda tür ile mucorales takımının en çok üyeli cinsidir. *Mucor* türlerinin pekçoğu besinlerde bozulmalara yol açarken, bir kısmı da memeliler ve bitkiler için patojeniktir [16].

Literatürde *Mucor* türleri ile gerçekleştirilmiş bir çok steroid biyotransformasyonu mevcuttur. Bu biyotransformasyonların bir kısmı androjenler üzerinde gerçekleştirilmiştir. Söz konusu biyotransformasyonlar genelde androjenlerin farklı kısımlarında mikrobiyal hidroksilasyonlar olarak gerçekleşmiştir [10-14,17-22]. Etkin bir androjen olan testosteron (2) bileşiğinin farklı *Mucor* türleri ile biyotransformasyonuna yönelik bazı çalışmalar mevcuttur [17-22]. Bu çalışmaların birinde alginata sabitlenmiş *Mucor plumbeus* ATCC 4740 küfünün testosteron (2) ile biyotransformasyonu [17] 14 $\alpha$ -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (15), 6 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihidroksiandrost-4-en-3-on (16), 14 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihidroksiandrost-4-en-3-on (17), 6 $\beta$ -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (18), 7 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihidroksiandrost-4-en-3-on (19), 6 $\beta$ ,14 $\alpha$ -dihidroksiandrost-4-en-3,17-dion (20), 6 $\beta$ ,14 $\alpha$ ,17 $\beta$ -trihidroksiandrost-4-en-3-on (21) ve 15 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihidroksiandrost-4-en-3-on (22), bileşiklerini vermiştir (Şekil 2.2).



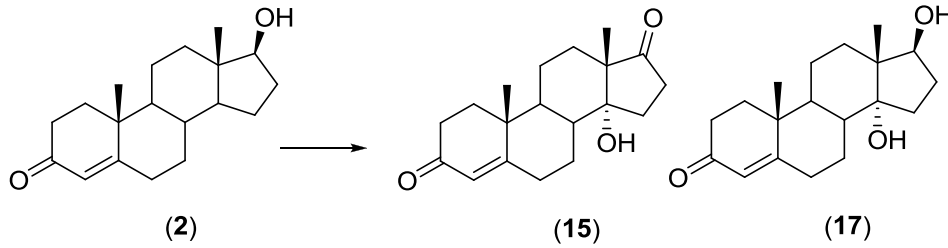
Şekil 2.2. Sabitlenmiş *M. plumbeus* ile testosteron (2) biyotransformasyonu

Serbest haldeki aynı küfün testosteron (**2**) bileşiği ile biyotransformasyonu [18] ise  $6\beta,17\beta$ -dihidroksiandrost-4-en-3-on (**16**) ve  $14\alpha,17\beta$ -dihidroksiandrost-4-en-3-on (**17**) bileşikleri ile sonuçlanmıştır (Şekil 2.3).



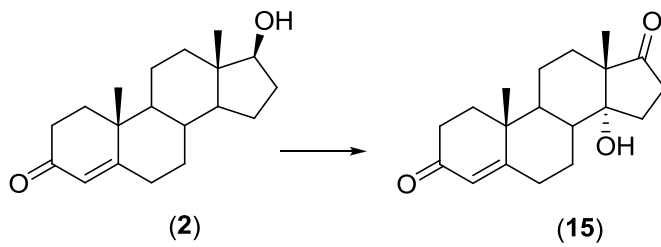
Şekil 2.3. *M. plumbeus* ile testosteron (**2**) biyotransformasyonu

*Mucor griseocyanus* küfü ile testosteron (**2**) bileşiğinin biyotransformasyonu [19]  $14\alpha$ -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**15**) ve  $14\alpha,17\beta$ -dihidroksiandrost-4-en-3-on (**17**) bileşikleri ile sonuçlanmıştır (Şekil 2.4.).



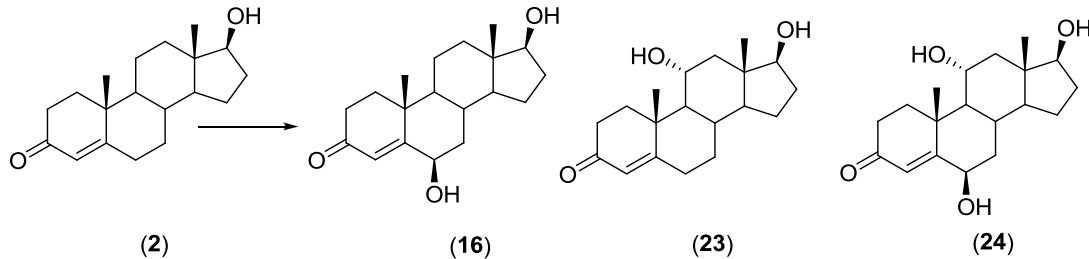
Şekil 2.4. *M. griseocyanus* ile testosteron (**2**) biyotransformasyonu

*Mucor piriformis* küfü ile testosteron (**2**) bileşiğinin biyotransformasyonu [20] ise sadece  $14\alpha$ -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**15**) bileşiği ile sonuçlanmıştır (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. *M. piriformis* ile testosteron (**2**) bileşiğinin biyotransformasyonu

Bir *Mucor* türü izolatu (*Mucor* 881 veya M881) ile testosteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu [21] 6 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihidroksiandrosteron-4-en-3-on (16), 11 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihidroksiandrosteron-4-en-3-on (23) ve 6 $\beta$ ,11 $\alpha$ ,17 $\beta$ -trihidroksiandrosteron-4-en-3-on (24) bileşikleriyle sonuçlanmıştır (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. *Mucor* 881 ile testosteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu

*Mucor silvaticus* küfö ile testosteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu [22] ise ağırlık olarak 7 $\alpha$ -hidroksilasyonlarıyla sonuçlanmıştır.

Zayıf bir androjen olan epiandrosteron (12) bileşiğinin literatürde *Mucor* türleri ile gerçekleştirilen bir biyotransformasyonu ise mevcut değildir.

## 2.5. Çalışmanın Amacı

*Mucor hiemalis* küfö, mucorales takımının yeryüzünün her yerinde bulunan en yaygın türüdür [23]. Bu küf özellikle etanol, citosan [24] ve bazı enzimlerin [23] elde edilmesindeki kullanımı ile dikkat çekmiştir.

Literatürde *Mucor hiemalis* ile gerçekleştirilmiş 2 ayrı steroid biyotransformasyonu bulunmaktadır. Bu biyotransformasyonlarda küf progesteron (2) [25] ve trimegeston [26] steroidlerini mikrobiyal hidroksilasyonlara maruz bırakmış ve bu biyotransformasyonlardan hidroksillenmiş bileşikler elde edilmiştir.

Bu çalışmanın amacı, testosteron (2) ve epiandrosteron (12) steroidlerinin *Mucor hiemalis* küfündeki biyotransformasyonlarının nasıl gerçekleşeceğini incelemesiydi. Söz konusu amaç doğrultusunda yukarıda adı geçen steroidler daha önce steroid biyotransformasyonları için kullanılmamış olan *Mucor hiemalis* MRC 70325 küfö ile biyotransformasyonlara maruz bırakıldı.



## BÖLÜM 3. MATERYAL VE METOT

### 3.1. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler

Biyotransformasyon çalışmalarında kullanılan besiyeri ve cam malzemelerin sterilizasyonu 121 °C'de 20 dakika süre ile Nüve OT 020 marka otoklav ile gerçekleştirildi. Küflerin geliştirilmesi ve biyotransformasyon çalışmaları için Gerhardt THO 500 Laboshake Çalkalamalı İnkübatör kullanıldı. Infrared spektrumları, Shimadzu IR Prestige-21 spektrometre cihazı ile alındı. <sup>1</sup>H NMR spektrumları, tetrametilsilan standart iç sinyal olarak kullanılarak, 300 MHz'de döterokloroform içerisinde Varian Mercury 300 NMR spektrometresi kullanılarak alındı. <sup>13</sup>C NMR spektrumları aynı cihaz kullanılarak 75 MHz'de döterokloroform içerisinde alındı. Steroidleri ayırmak için adsorban olarak Merck kalite silika jel 60 (230-400 mesh) içeren Kolon kromatografisi gerçekleştirildi ve bu bileşikler hekzan içerisinde artan etil asetat konsantrasyonları elüent olarak kullanılarak kolondan ayrıldı. Biyotransformasyon deneyinin sonucu ve kolon kromatografi çalışmalarının sonuçları ince tabaka kromatografisi (İTK) ile izlendi. İTK 0,25 mm kalınlığında silika jel tabakaları (Merck silika jel GF254) ve etil asetat-hekzan (1:1) çözgen sistemi kullanılarak yapıldı. İTK tabakalarındaki bileşikler *p*-anisaldehit-sülfürik asit reaktifine daldırıldıktan sonra 120 °C'de 3 dakika ısıtıldıktan sonra görünür hale getirildi. Erime noktaları Electrothermal IA 9200 erime noktası tayin cihazı ile tespit edildi.

*Mucor hiemalis* MRC 70325 küfü Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu, Marmara Araştırma Merkezi Gıda Teknoloji ve Araştırma Enstitüsü'nden yatık agar kültürleri olarak temin edildi. Bu kültürler PDA içeren yatık agar besiyerlerinde ve 4 °C'de muhafaza edildi. Testosteron (**2**) ve epiandrosteron (**12**) bileşikleri Sigma-Aldrich şirketinden satın alındı. Tüm solventler, yatık agar

besiyerleri için kullanılan PDA ve agar ile küfler için hazırlanan besiyerinde kullanılan tüm kimyasallar Merck şirketinden temin edildi.

### 3.2. Taze Yatık Agar Kültürlerin Hazırlanması

PDA (potato dekstroz agar) (5,85 g) ve agar (1,35 g) karışımı saf su ile 150 mL'ye tamamlandıktan sonra kaynatılarak besi yeri hazırlandı. Hazırlanan besiyeri soğumadan 15 adet 22 mL'lik Universal marka patolojik cam şişelerin yarısına kadar ilave edildi ve otoklav içerisinde 121 °C'de 20 dakika sterilize edildi. Sterilizasyondan sonra şişeler içerisinde erimiş haldeki besi yerleri, donmadan önce 45°'ye yakın bir eğim oluşturacak şekilde soğumaya bırakılmak suretiyle yatık agar besi yerleri elde edildi.

Stok fungal kültürdeki küflerin bir kısmı yatık agar besiyerlerinin 3 tanesine steril şartlarda aktarıldı ve oda sıcaklığında 15 gün süresince çoğalmaya bırakıldı. Bu şekilde hazırlanan yeni yatık agar kültürlerinin en gelişmişindeki küfler ayda bir kez 3 yeni yatık agar besiyerine steril şartlarda aktarıldı. Bu aktarma işlemi 2 kez tekrarlandıktan sonra elde edilen en taze ve en gelişmiş yatık agar kültüründeki küfler biyotransformasyon çalışmasında kullanıldı.

### 3.3. *M. hiemalis* MRC 70325 ile Testosteron (2) İnkübasyonu

*M. hiemalis* MRC 70325 besiyeri olarak PYG Broth hazırlamak için glukoz (20 g), pepton (10 g) ve maya ekstraktı (10 g) 1 litre distile suda çözüldü [25]. Hazırlanan 1 L besiyeri, 10 adet 250 mL erlene paylaştırıldıktan sonra otoklavda sterilize edildi. Daha önce hazırlanan en taze alt kültürdeki küf, erlenlerden her birine steril şartlar altında nakledildi. Bu erlenler yeterli miktarda küf oluşabilmesi için 3 gün boyunca 26°C'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona (100 rpm) bırakıldı.

Testosteron (2) (1 g) DMF (10 mL) içerisinde çözünerek yeterli miktarda küf içeren erlenlere eşit hacimlerde, steril koşullar altında ilave edildikten sonra 5 gün süresince 26 °C' de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona (100 rpm) bırakıldı.

İnkübasyon işlemi tamamlandıktan sonra, besiyeri bir Buchner hunisi yardımıyla filtrasyon işlemine tabi tutuldu ve besi yeri küf kültürüne ait misellerden süzülerek ayrıldı. Buchner hunisinde kalan miseller etil asetat (500 mL) kullanılarak yıkandı. Filtrat sodyum klorüre doygunlaştırıldıktan sonra her seferinde 1 L etil asetat kullanılarak 3 ayrı ekstraksiyona maruz bırakıldı. Daha sonra toplanan ekstraktlara susuz sodyum sülfat katılarak ortamda bulunabilecek su uzaklaştırıldı. Etil asetat evaporatörde uzaklaştırıldıktan sonra kahverengi yağimsı bir madde (1945 mg) elde edildi.

Yağimsı madde daha sonra silika jel 60 üzerinde kolon kromatografisine tabi tutuldu. Kolondan bir tanesi %30'luk, bir diğeri %50'lik ve iki tanesi %60'luk çözgen sistemi ile elüsyonlar neticesinde farklı polaritelere sahip dört ayrı bileşik elde edildi.

Biyotransformasyon çalışmasının kontrolü için sadece steril besiyeri ve substratı içeren bir erlen aynı şartlarda 5 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonrasındaki İTK ile inceleme kontrol erleninde herhangi bir metabolit olmadığını gösterdi.

#### **3.4. *M. hiemalis* MRC 70325 ile Epiandrosteron (12) İnkübasyonu**

Yukarıda açıklandığı gibi hazırlanan 1 L PYG Broth besiyeri 10 adet 250 mL erlene paylaştırıldıktan sonra otoklavda sterilize edildi. Daha önce hazırlanan en taze alt kültürdeki küf erlenlerden her birine steril şartlar altında nakledildi. Bu erlenler yeterli miktarda küf oluşabilmesi için 3 gün boyunca 26° C'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona (100 rpm) bırakıldı.

Epiandrosteron (12) (1 g) DMF (10 mL) içerisinde çözünerek yeterli miktarda küf içeren erlenlere eşit hacimlerde, steril koşullar altında ilave edildikten sonra 5 gün süresince 26 °C' de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona (100 rpm) bırakıldı.

İnkübasyon işlemi tamamlandıktan sonra, besiyeri bir Buchner hunisi yardımıyla filtrasyon işlemine tabi tutuldu ve besi yeri küf kültürüne ait misellerden süzülerek ayrıldı. Buchner hunisinde kalan miseller etil asetat (500 mL) kullanılarak yıkandı. Filtrat her seferinde 1 L etil asetat kullanılarak 3 ayrı ekstraksiyona maruz bırakıldı.

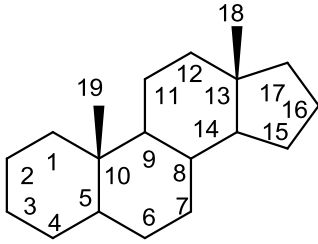
Daha sonra toplanan ekstraktlara susuz sodyum sülfaat katılarak ortamda bulunabilecek su uzaklaştırıldı. Etil asetat evaporatörde uzaklaştırıldıktan sonra kahverengi ve yağimsı bir madde (1798 mg) elde edildi.

Yağimsı madde daha sonra silika jel 60 üzerinde kolon kromatografisine tabi tutuldu. % 30'luk ve %60'luk çözgen sistemleri ile elüsyonlar neticesinde farklı polaritelere sahip iki ayrı bileşik elde edildi.

Biyotransformasyon çalışmasının kontrolü için sadece steril besiyeri ve substratı içeren bir erlen aynı şartlarda 5 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonrasındaki İTK ile inceleme kontrol erleninde herhangi bir metabolit olmadığını gösterdi.

## BÖLÜM 4. DENEYSEL BULGULAR

Testosteron (**2**) ve epiandrosteron (**12**) bileşiklerinin *M. hiemalis* MRC 70325 ile biyotransformasyonlarından elde edilen bileşiklerin yapılarını belirlemek için hem başlangıç maddelerinin hem de elde edilen bileşiklerin erime noktaları,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR ve IR spektrumları karşılaştırıldı. Bileşiklere ait  $^1\text{H}$  NMR ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumları Ekler Bölümünde verildi. Biyotransformasyonları gerçekleştirilen testosteron (**2**) ve epiandrosteron (**12**) bileşiklerine ait karbon iskeletlerinin numaralandırılması Şekil 4.1.'deki gibidir.



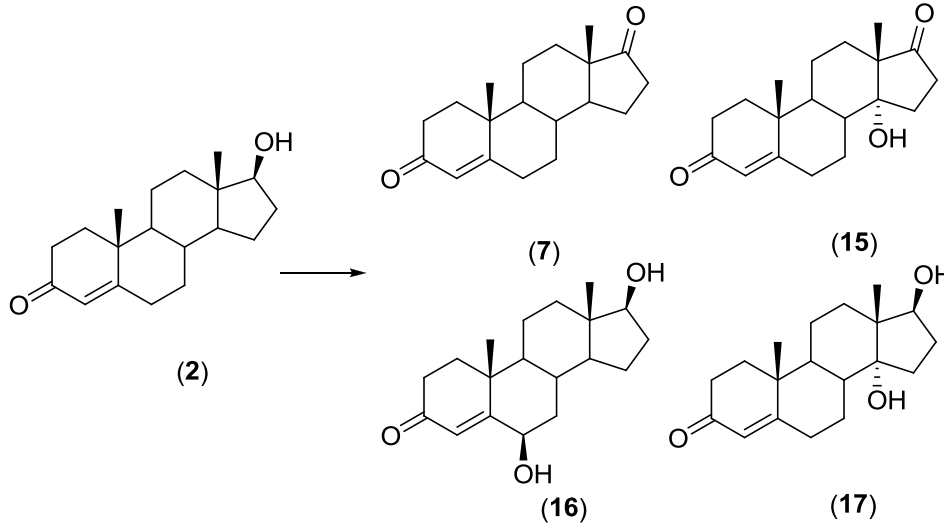
Şekil 4.1. Substratların karbon iskeletlerinin numaralandırılması

Testosteron (**2**) (1 g) bileşiğinin *M. hiemalis* MRC 70325 ile 26 °C'de 5 gün süren inkübasyonu [27] sonrasında gerçekleştirilen kolon kromatografisi çalışması sonrasında kolondan sırası ile androstendion (**7**) (%3), 14 $\alpha$ -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**15**) (%9), 6 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihidroksiandrost-4-en-3-on (**16**) (%2) ve 14 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihidroksiandrost-4-en-3-on (**17**) (%62) bileşikleri elde edildi (Şekil 4.2.).

Androstendion (**7**) (30 mg, %3)

- %30'luk çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde etilasetattan prizmalar şeklinde kristallendirildi.
- Erime noktası: 172-173 °C, (lit. [28] erime noktası: 174-176 °C).
- IR ( $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ ): 1732, 1720 ve 1615.
- $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0,90 (3H, s, 18-H); 1,20 (3H, s, 19-H); 5,74 (1H, s, 4-H).

- e.  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 220,43 (C-17); 199,33 (C-3); 170,35 (C-5); 124,07 (C-4); 53,78 (C-9); 50,76 (C-14); 47,45 (C-13); 38,58 (C-10); 35,69 (C-12); 35,62 (C-1); 35,07 (C-8); 33,84 (C-2); 32,50 (C-6); 31,20 (C-7); 30,68 (C-16); 21,68 (C-15); 20,24 (C-11); 17,31 (C-19); 13,64 (C-18).



Şekil 4.2. *M. hiemalis* MRC 70325 ile testosteron (2) biyotransformasyonu

#### 14 $\alpha$ -Hidroksiandrosta-4-en-3,17-dion (15) (95 mg, %9)

- %50'lik çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde metanolden yassı çubuklar şeklinde kristallendirildi.
- Erime noktası: 260-261 °C, (lit. [29] erime noktası: 255-260 °C).
- IR ( $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ ): 3417, 1730, 1660 ve 1620.
- $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1,00 (3H, s, 18-H); 1,20 (3H, s, 19-H); 5,72 (1H, s, 4-H).
- $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 218,56 (C-17); 199,3362 (C-3); 170,32 (C-5); 123,94 (C-4); 80,50 (C-14); 52,49 (C-13); 46,67 (C-9); 38,56 (C-10); 38,51 (C-8); 37,84 (C-1); 35,55 (C-12); 33,78 (C-2); 33,02 (C-6); 32,26 (C-7); 30,07 (C-16); 24,39 (C-15); 19,02 (C-11); 17,75 (C-19); 17,21 (C-18).

#### 6 $\beta$ ,17 $\beta$ -Dihidroksiandrosta-4-en-3-on (16) (21 mg, %2)

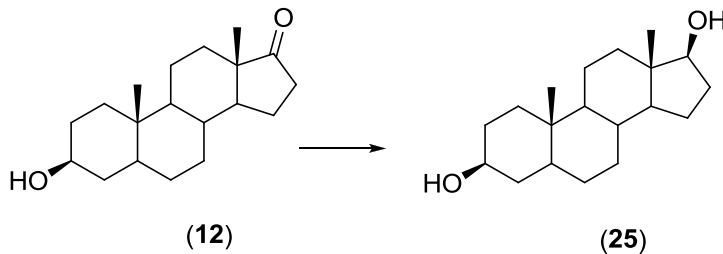
- %60'lık çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde etilasetattan prizmalar şeklinde kristallendirildi.
- Erime noktası: 210-212 °C, (lit. [29] erime noktası: 215-220 °C).

- c. IR ( $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ ): 3495, 1660 ve 1620.
- d.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0,81 (3H, s, 18-H); 1,38 (3H, s, 19-H); 3,66 (1H, t,  $J = 8,5$  Hz, 17 $\alpha$ -H); 4,35 (1H, bs, 6 $\alpha$ -H); 5,81 (1H, s, 4-H).
- e.  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 200,77 (C-3); 168,79 (C-5); 126,13 (C-4); 81,57 (C-17); 72,74 (C-6); 53,60 (C-9); 50,34 (C-14); 42,81 (C-13); 37,98 (C-12); 37,92 (C-10); 36,97 (C-7); 36,29 (C-1); 34,13 (C-2); 30,27 (C-16); 29,68 (C-8); 23,19 (C-15); 20,50 (C-11); 19,44 (C-19); 11,06 (C-18).

14 $\alpha$ ,17 $\beta$ -Dihidroksiandrosteron-4-en-3-on (**17**) (654 mg, %62)

- a. %60'lık çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde etilasetattan prizmalar şeklinde kristallendirildi.
- b. Erime noktası: 183-184 °C, (lit. [29] erime noktası: 181-185 °C).
- c. IR ( $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ ): 3447, 1662 ve 1640.
- d.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0,90 (3H, s, 18-H); 1,20 (3H, s, 19-H); 4,29 (1H, t,  $J = 8,2$  Hz, 17 $\alpha$ -H); 5,71 (1H, s, 4-H).
- e.  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 199,78 (C-3); 171,02 (C-5); 123,74 (C-4); 83,24 (C-14); 78,45 (C-17); 46,88 (C-13); 46,67 (C-9); 38,81 (C-8); 38,65 (C-10); 35,63 (C-1); 33,84 (C-2); 32,57 (C-12); 32,49 (C-6); 29,48 (C-16); 28,47 (C-7); 26,04 (C-15); 19,62 (C-11); 17,15 (C-19); 14,85 (C-18).

Epiandrosteron (**12**) (1 g) bileşiğinin *M. hiemalis* MRC 70325 ile 26 °C'de 5 gün süren inkübasyonu [27] akabinde gerçekleştirilen kolon kromatografisi çalışması sonrasında kolondan sırası ile değişmeyen başlangıç maddesi (%75, 750 mg) ile 3 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihidroksiandrosteron (**25**) (%3) bileşikleri elde edildi (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. *M. hiemalis* MRC 70325 ile epiandrosteron (**12**) biyotransformasyonu

3 $\beta$ ,17 $\beta$ -Dihidroksiandrostan (**25**) (31 mg, %3)

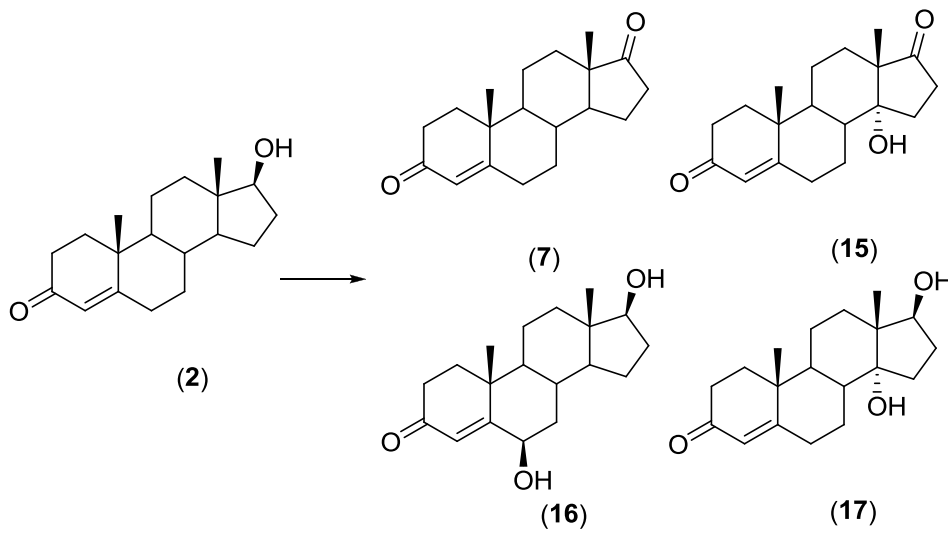
- a. %60'lık çözügen sistemiyle elüsyon sonrasında asetondan prizmalar şeklinde kristallendirildi.
- b. Erime noktası: 165-166 °C, (lit. [30] erime noktası: 167-168 °C).
- c. IR ( $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ ): 3460 ve 3200.
- d.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0,61 (3H, s, 18-H); 0,72 (3H, s, 19-H); 3,41 (2H, m, 3 $\alpha$ -H ve 17 $\alpha$ -H).
- e.  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 80,82 (C-17); 70,04 (C-3); 54,12 (C-9); 50,64 (C-14); 44,53 (C-5); 42,61 (C-13); 37,89 (C-4); 36,71 (C-12); 36,53 (C-10); 35,14 (C-1); 35,11 (C-8); 31,24 (C-7); 31,12 (C-16); 29,87 (C-2); 28,23 (C-6); 22,97 (C-15); 20,41 (C-11); 11,88 (C-19); 10,91 (C-18).



## BÖLÜM 5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Biyotransformasyon çalışmaları sonucunda elde edilen yeni bileşiklerin yapılarını tayin amacıyla, çıkış maddeleri olan testosteron (**2**) ve epiandrosteron (**12**) ile biyotransformasyonlardan elde edilen bileşiklerin erime noktaları,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR ve IR spektrumları karşılaştırıldı.

Testosteron (**2**) bileşiğinin *M. hiemalis* MRC 70325 ile beş gün inkübasyonu [27] dört metabolit verdi (Şekil 5.1.). İlk metabolit testosteron (**1**) bileşiğinin  $\delta_{\text{H}}$  3,61'deki  $17\alpha\text{-H}$  rezonansını (1H, t,  $J = 8,5$  Hz) vermezken 4-H rezonansını  $\delta_{\text{H}}$  5,74'de (1H, s) verdi. Metabolit başlangıç maddesinin  $\delta_{\text{H}}$  0,78'deki 18-metil rezonansı için  $\delta_{\text{H}}$  0,90 ppm'e yani aşağı alana doğru bir kayma gösterdi ( $\Delta$  0,12 ppm). Metabolit  $\delta_{\text{C}}$  81,56'deki C-17 rezonansını vermezken  $\delta_{\text{C}}$  220,43 ppm'de yeni bir karbonil grubu rezonansı verdi (Tablo 5.1.). Bu sonuçlar C-17'de oksidasyon gerçekleştiğini ve ilk metabolitin androstendion (**7**) olduğunu gösterdi.



Şekil 5.1. *M. hiemalis* MRC 70325 ile testosteron (**2**) biyotransformasyonu

İkinci metabolit C-17’de oksidasyon olduğunu gösterecek şekilde  $\delta_C$  81,56’deki C-17 rezonansını vermezken  $\delta_C$  218,56 ppm’de yeni bir karbonil grubu rezonansı verdi. Metabolit  $\delta_C$  80,50 ppm’de bir hidroksil grubu varlığına işaret eden yeni bir C atomu rezonansı verdi. Metabolit 18-metil rezonansı için aşağı alana doğru bir kayma ( $\Delta$  0,22 ppm) göstermesine rağmen yeni bir proton sinyali vermediğinden C-14’de tersiyer bir hidroksil grubunun bulunduğu düşünüldü. Metabolitin  $^{13}C$  NMR spektrumu C-8 ve C-13 rezonansları için aşağı alana doğru kaymalar gösterirken (C-8 için  $\Delta$  2,14 ppm ve C-13 için  $\Delta$  9,72 ppm) C-12 ve C-16 rezonansları için ise yukarı alana doğru  $\gamma$ -gauche kaymaları (C-12 için  $\Delta$  0,13 ppm ve C-16 için  $\Delta$  0,31 ppm) gösterdi. Bu kayma değerleri bir 14 $\alpha$ -hidroksil grubunun varlığını kanıtladı. Bütün bu sonuçlar ikinci metabolitin 14 $\alpha$ -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**15**) olduğunu gösterdi.

Tablo 5.1. Bileşiklerin  $^{13}C$  NMR spektrumu sinyalleri.

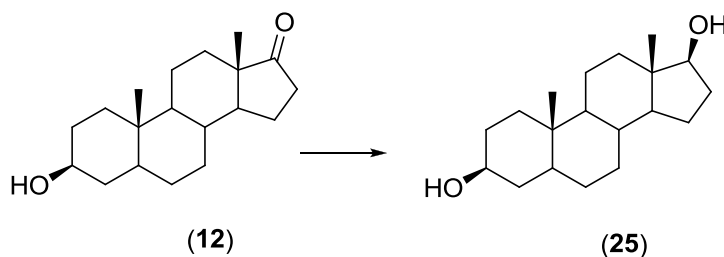
Karbon atomu	2	12	7	15	16	17	25
1	35,61	36,87	35,62	37,84	36,29	35,63	35,14
2	33,91	31,35	33,84	33,78	34,13	33,84	29,87
3	199,62	71,06	199,33	199,62	200,77	199,78	70,04
4	123,82	37,98	124,07	123,94	126,13	123,74	44,53
5	171,31	44,76	170,35	170,32	168,79	171,02	140,98
6	32,76	28,32	32,50	33,02	72,74	32,49	28,23
7	31,49	30,83	31,20	32,26	36,97	28,47	31,24
8	36,37	34,97	35,07	38,51	29,68	38,81	35,11
9	53,86	54,35	53,78	46,67	53,60	46,67	54,12
10	38,62	35,57	38,58	38,56	37,92	38,65	36,53
11	20,59	20,43	20,24	19,02	20,50	19,62	20,41
12	35,68	31,47	35,69	35,55	37,98	32,57	36,71
13	42,77	47,76	47,45	52,49	42,81	46,88	42,61
14	50,42	51,34	50,76	80,50	50,34	83,24	50,64
15	23,29	21,72	21,68	24,39	23,19	26,04	22,97
16	30,38	35,80	30,68	30,07	30,27	29,48	31,12
17	81,56	221,50	220,43	218,56	81,57	78,45	80,82
18	11,02	13,76	13,64	17,21	11,06	14,85	10,91
19	17,37	12,25	17,31	17,75	19,44	17,15	11,88

Üçüncü metabolit  $\delta_H$  4,35 ppm (1H, bs) ve  $\delta_C$  72,74 ppm’de bir 6 $\beta$ -hidroksil grubunun varlığını gösteren karakteristik rezonanslar [31,32] verdi. Metabolit, C-6’daki bir hidroksil grubunun varlığını destekler nitelikte başlangıç maddesinin  $\delta_H$  5,72 ppm’deki 4-H rezonansı için aşağı alana doğru bir kayma ( $\Delta$  0,09 ppm)

gösterdi. Metabolitin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu C-7 rezonansı için aşağı alana doğru bir kayma ( $\Delta$  5,48 ppm) verirken C-8 rezonansı için ise yukarı alana doğru  $\gamma$ -gauche kayması ( $\Delta$  6,69 ppm) verdi. Bu kayma değerleri üçüncü metabolitin 6 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihidroksiandrosteron (16) olduğunu gösterdi.

Dördüncü metabolit  $\delta_{\text{C}}$  83.24 ppm'de bir hidroksil grubunun varlığını  $\delta_{\text{C}}$  83,24 ppm'de yeni bir karbon atomu rezonansı verdi. Metabolitin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu 17 $\alpha$ -H rezonansı için bir 14 $\alpha$ -hidroksil grubu ile karakteristik [29] diaksiyal etkileşimini gösteren aşağı alana doğru bir kayma verdi ( $\Delta$  0,68 ppm). Metabolitin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu C-8 ve C-13 rezonansları için aşağı alana doğru kaymalar gösterirken (C-8 için  $\Delta$  2,44 ppm ve C-13 için  $\Delta$  4,11 ppm) C-12 ve C-16 rezonansları için ise yukarı alana doğru  $\gamma$ -gauche kaymaları (C-12 için  $\Delta$  3,11 ppm ve C-16 için  $\Delta$  0,90 ppm) gösterdi. Bu kayma değerleri bir 14 $\alpha$ -hidroksil grubunun varlığını daha da doğruladı ve dördüncü metabolitin 14 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihidroksiyandrosteron (17) olduğunu gösterdi.

Testosteron (2) bileşiğinin *M. hiemalis* MRC 70325 ile biyotransformasyonu, aynı bileşiğin diğer *Mucor* türleri olan *Mucor plumbeus* [17,18], *Mucor griseocyanus* [19] ve *Mucor piriformis* [20] küfleri ile biyotransformasyonlarındaki gibi ağırlıklı olarak 14 $\alpha$ -hidroksilasyonları ile sonuçlandı [26]. Bu *Mucor* türlerinin aksine *Mucor* 881 [21] ve *M. silvaticus* [22] ile testosteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonları farklı yerlerdeki hidroksilasyonlar ile sonuçlandı.



Şekil 5.2. *M. hiemalis* MRC 70325 ile epiandrosteron (12) biyotransformasyonu

Epiandrosteron (12) bileşiğinin *M. hiemalis* MRC 70325 ile beş gün inkübasyonu [27] sadece bir metabolit verdi (Şekil 5.2.). Metabolitin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu  $\delta_{\text{H}}$  3,41 ppm'de üst üste gelen ve birisi yeni olan iki rezonans (2H, m) gösterdi. Metabolit,

başlangıç maddesinin  $\delta_H$  0,84 ppm'deki 18-metil rezonansı için yukarı alana doğru bir kayma ( $\Delta$  0,23 ppm) gösterdi. Metabolit  $^{13}C$  NMR spektrumu başlangıç maddesinin  $\delta_C$  221,50 ppm'deki C-17 karbonil karbon atomu rezonansının yerine  $\delta_C$  80,82 ppm'de yeni bir hidroksil grubu rezonansı vermesi C-17 karbonil grubunun hidroksil grubuna indirgenliğini gösterdi. Bu sonuçlar C-17'de bir indirgenme gerçekleştiğini ve metabolitin  $3\beta,17\beta$ -dihidroksiandrostan (**25**) olduğu anlaşıldı.

Epiandrosteron (**12**) bileşiğinin *M. hiemalis* MRC 70325 ile inkübasyonu mikrobiyal hidroksilasyon yerine C-17'deki düşük verimli bir indirgenme ile sonuçlandı [26]. Daha önce diğer *Mucor* türleri ile testosteron (**2**) ve progesteron (**5**) gibi 4-en-3-on steroidlerin biyotransformasyonları genelde  $14\alpha$ -hidroksilasyonları ile sonuçlanırken pregnenolon (**4**) ve dehidroepiandrosteron (**9**) gibi 5-en- $3\beta$ -hidroksi steroidlerin biyotransformasyonları genelde  $7\alpha$ -hidroksilasyonları ile sonuçlanmıştı [27].

A yada B halkasında çift bağ içermeyen epiandrosteron (**12**) 4-en-3-on steroidleri veya 5-en- $3\beta$ -hidroksi steroidlerden biri değildir. Bu sonuçlar *Mucor* türleri ile mikrobiyal hidroksilasyonların gerçekleşebilmesi için steroid yapıdaki substratların A yada B halkasında çift bağ içermesi gerektirdiğini düşündürmektedir.

Kısaca *Mucor hiemalis* diğer çoğu *Mucor* türleri gibi A halkasında bir çift bağ içeren ve bir 4-en-3-on steroidi olan testosteron (**2**) bileşiğini ağırlıklı olarak  $14\alpha$ -hidroksilasyonlarına uğrattırken A veya B halkalarında çift bağ içermeyen epiandrosteron (**12**) bileşiğini herhangi bir hidroksilasyona uğratabilmedi [27]. *Mucor* ve diğer küf cinslerine ait küfler ile steroidler üzerinde gerçekleştirdiğimiz fungal biyotransformasyonlar sürmektedir.

## KAYNAKLAR

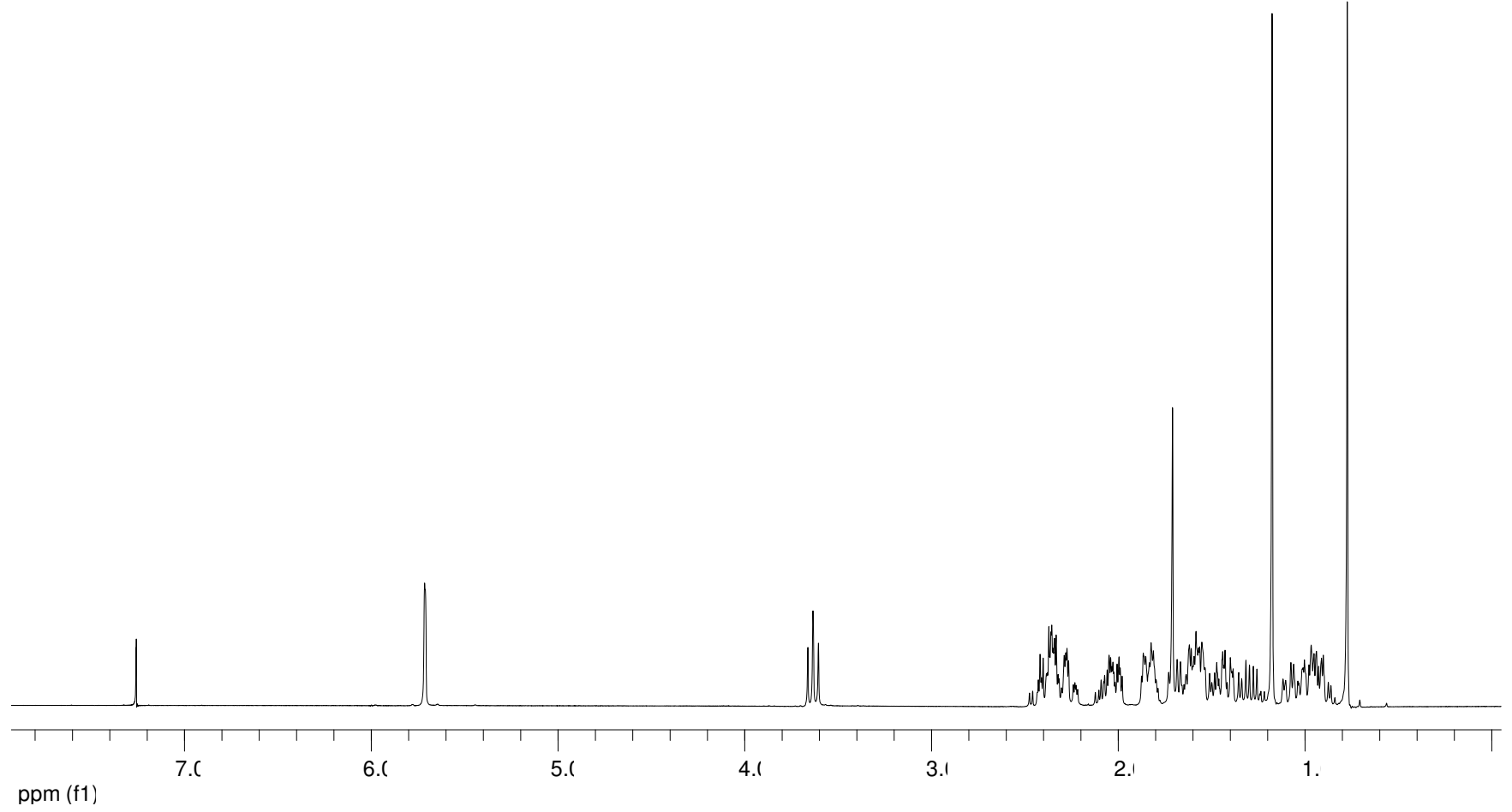
- [1] HANSON, J.R., Natural Products: The Secondary Metabolites, The Royal Society of Chemistry, 1-2, Cambridge, 2003.
- [2] CLAYDEN, J., GREEVES, N., WARREN, S., WOTHERS, P., Organic Chemistry, First edition, Oxford University Pres, Oxford, 1413-1414, 2001.
- [3] MANN, J., Chemical Aspects of Biosynthesis, First edition, Oxford University Pres, New York, 2-4, 1994.
- [4] KEHA, E. E., KÜFREVİOĞLU, Ö. İ., Biyokimya, Dördüncü baskı, Aktif Yayınevi, 93-188, Erzurum, 2005.
- [5] ONAT, T., EMERK, K., SÖZMEN, E.Y., İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, 481-495, Ankara, 2002.
- [6] CALLIES, F., ARLT, W., SIEKMANN, L., HUBLER, D., BIDLINGMAIER, F., ALLOLIO, B., Influence of oral dehydroepiandrosterone (DHEA) on urinary steroid metabolites in males and females, Steroids, 65, 98-102, 2000.
- [7] HANSON, J.R., An Introduction to Biotransformations in Organic Chemistry, W.H. Freeman Spektrum, 1-62, New York, 1995.
- [8] FABER, K., Biotransformations in Organic Chemistry, Fifth Edition, Springer-Verlag, Berlin, 1-407, 2003.
- [9] DEMAİN A.L., Small Bugs, Big Business: The Economic Power of the Microbe, Biotechnology Advances, 18, 499-514, 2000.
- [10] DONOVA, M.V., EGOROVA, O.V., Microbial Steroid Transformation: Current State and Prospects, Applied Microbiology and Biotechnology, 94, 1423–1447, 2012.
- [11] FERNANDES, P., CRUZ, A., ANGELOV, B., PINHEIRO, H. M., CABRAL, J. M. S., Microbial Conversion of Steroids Compounds: Recent Developments, Enzyme and Microbial Technology, 32, 688–705, 2003.
- [12] MAHATO, S. B., GARAI, S., Advances in Microbial Steroid Biotransformation, Steroids, 62, 332–345, 1997.

- [13] MAHATO, S. B., MAJUMDAR, I., Current Trends in Microbial Steroid Biotransformation, *Phytochemistry*, 34, 883-898, 1993.
- [14] MAHATO, S. B., BANERJEE, S., PODDER, S., Steroid Transformations by Microorganisms-III, *Phytochemistry*, 28, 7-40, 1989.
- [15] SANTIAGO, A. L. C. M., MOTTA, C. M. S., Isolation of Mucorales from Processed Maize (*Zea Mays* L.) and Screening for Protease Activity, *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 698-700, 2008.
- [16] CONNOLLY, J. H., STODART, B. J., ASHH, G. J., Genotypic Analysis of *Mucor* from the Platypus in Australia, *Journal of Wildlife Diseases*, 46, 55-69, 2010.
- [17] PATRICE C. PEART, WILLIAM F. REYNOLDS, PAUL B. REESE., The facile bioconversion of testosterone by alginate-immobilised filamentous fungi, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 95 (2013) 70–81
- [18] LAMM, A. S., CHEN, A. R. M., REYNOLDS, W. F., REESE, P. B., Steroid Hydroxylation by *Whetzelinia sclerotiorum*, *Phanerochaete chrysosporium* and *Mucor plumbeus*, *Steroids*, 72, 713-722, 2007.
- [19] SINGH, K., SEHGAL, S. N., VÉZINA C., Transformation Of Steroids By *Mucor griseocyanus*, *Canadian Journal of Microbiology*, 13, 1271-1281, 1967.
- [20] MADYASTHA, K. M., Novel Microbial Transformations of Steroids, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 405, 259-270, 1996.
- [21] KOLET, S. P., NILOFERJAHAN, S., HALDAR, S., GONNADE, R., THULASIRAM, H. V., Biocatalyst Mediated Production of 6 $\beta$ ,11 $\alpha$ -Dihydroxy Derivatives of 4-ene-3-one Steroids, *Steroids* 78, 1152–1158, 2013.
- [22] WANG, Y. J., SUN, D. M., CHEN, Z. B., RUAN, H. S., GE, W. H., Biotransformation of 3 $\beta$ -hydroxy-5-en-steroids by *Mucor silvaticus*, *Biocatalysis and Biotransformation*, 31, 168-174, 2013.
- [23] YAZDI, M. T., ZARRINI, G., MOHIT, E., FARAMARZI, M. A., SATAYESH, N., SEDIGHI, N., MOHSENI, A. F., *Mucor hiemalis*: a new Source for Uricase Production, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 22, 325-330, 2006.
- [24] VINCHE, M. H., ASACHI, R., ZAMANI, A., KARIMI, K., Ethanol and Chitosan Production from Wheat Hydrolysate by *Mucor hiemalis*, *J Chem Technol Biotechnol*, 88, 255–260, 2013.
- [25] ANTONIOU, T. N. H., CURRAN, B. P. G., SMITH, K. E., Is mRNA Sequestration involved in the regulation of Progesterone 14 $\alpha$  -hydroxylase Cytochrome P-450 expression in *Mucor hiemalis*?, *Microbiology*, 140, 1633-1640, 1994.

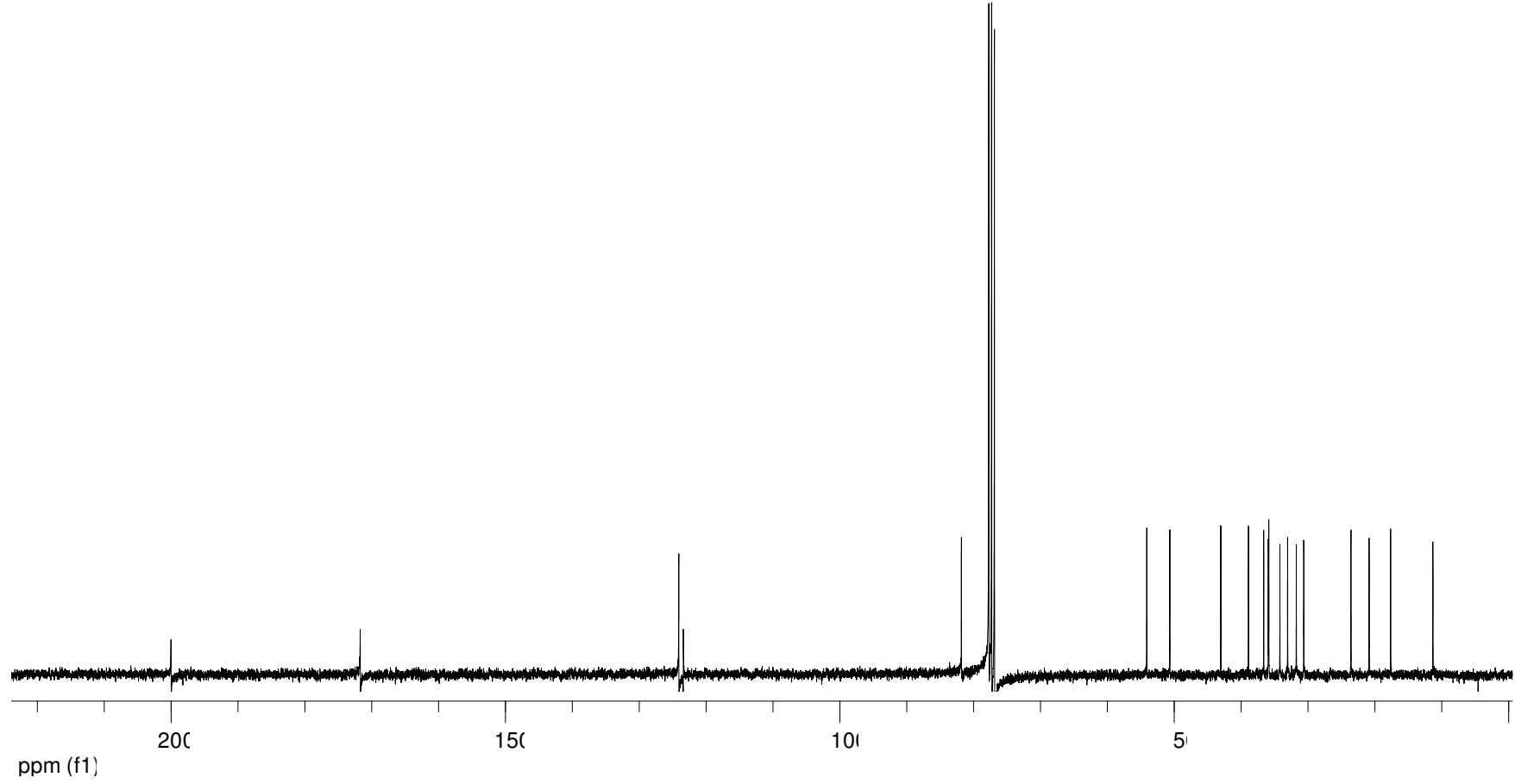
- [26] LACROIX, I., BITON, J., AZERAD, R., Microbial Models of Drug Metabolism: Microbial Transformations of Trimegestone (RU27987), a 3-Keto- $\Delta^{4,9(10)}$ -19-norsteroid Drug, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 7, 2329-2341, 1999.
- [27] YILDIRIM, K., SARAN, H., DOLU, O. F., KURU, A., Biotransformation of some steroids by *Mucor hiemalis* MRC 70325, *Journal of Chemical Research*, 37, 566-569, 2013.
- [28] PETERSON, D. H., EPPSTEIN S. H., MEISTER, P. D., MURRAY, H. C., LEIGH, H. M., WEINTRAUB, A., REINEKE, L. M., Microbiological Transformations of Steroids. IX. Degradation of C<sub>21</sub> Steroids to C<sub>19</sub> Ketones and to Testololactone, *Journal of the American Chemical Society*, 75, 5768-5769, 1953.
- [29] HANSON, J.R., NASIR, H., PARVEZ, A., The Hydroxylation of Testosterone and Some Relatives by *Cephalosporium aphidicola*, *Phytochemistry*, 42, 411-415, 1996.
- [30] BOYNTON, J., HANSON, J.R., HUNTER, A. C., The Hydroxylation of Some 13 $\alpha$ -Methylsteroids by *Cephalosporium aphidicola*, *Phytochemistry*, 45, 951-956, 1997.
- [31] KIRK, D. N., TOMS, H. C., DOUGLAS, C., WHITE, K. A., SMITH, K. E., LATIF, S., HUBBARD, R. W. P., A Survey of High Field <sup>1</sup>H NMR Spectra of the Steroids Hormones, Their Hydroxylated Derivatives and Related Compounds, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 1567-1594, 1990.
- [32] BLUNT, J. W., STOTHERS, J. B., <sup>13</sup>C NMR Spectra of Steroids -A Survey and Commentary, *Organic Magnetic Resonance*, 9, 439-464, 1977.

## **EKLER**

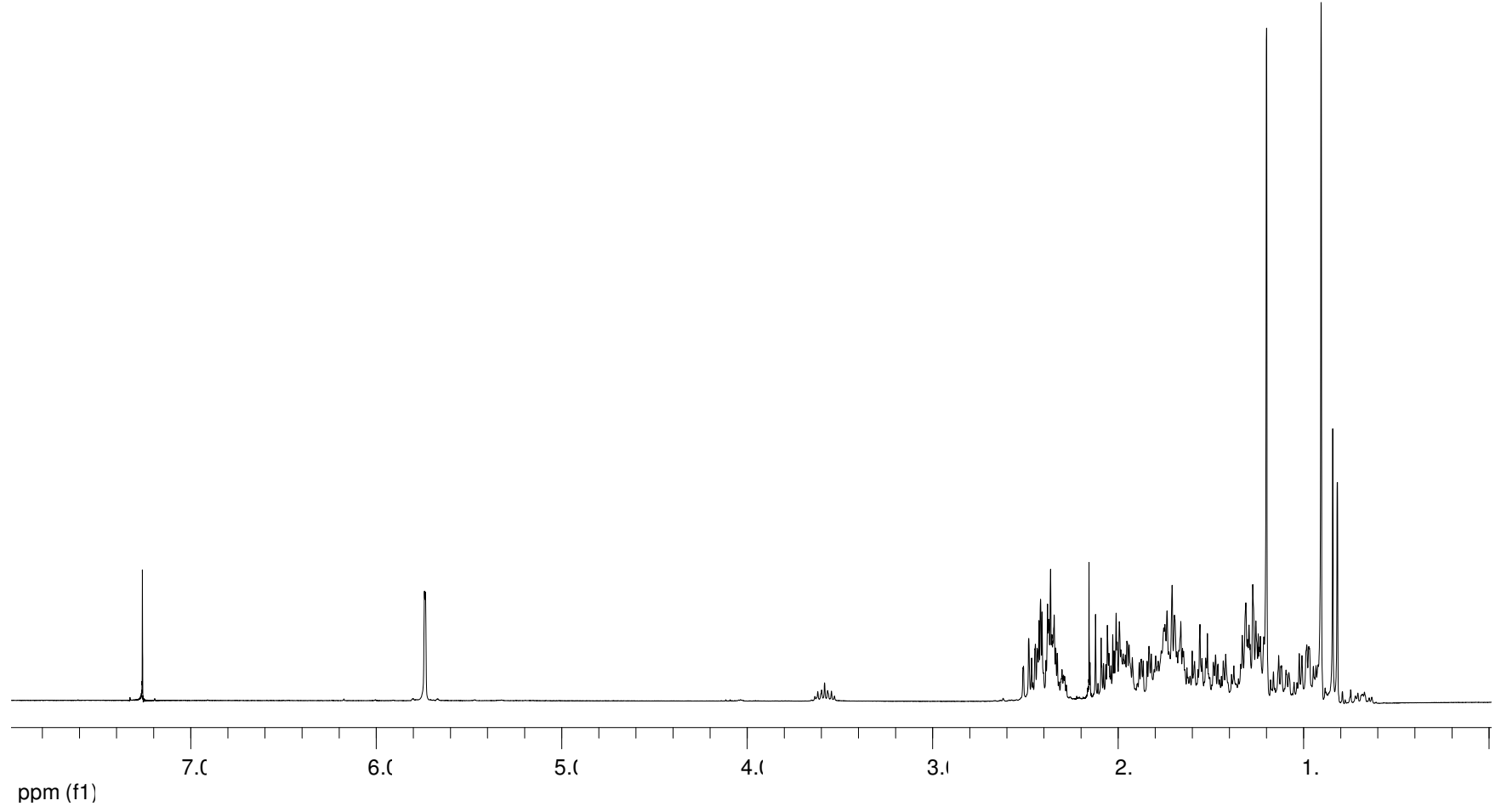




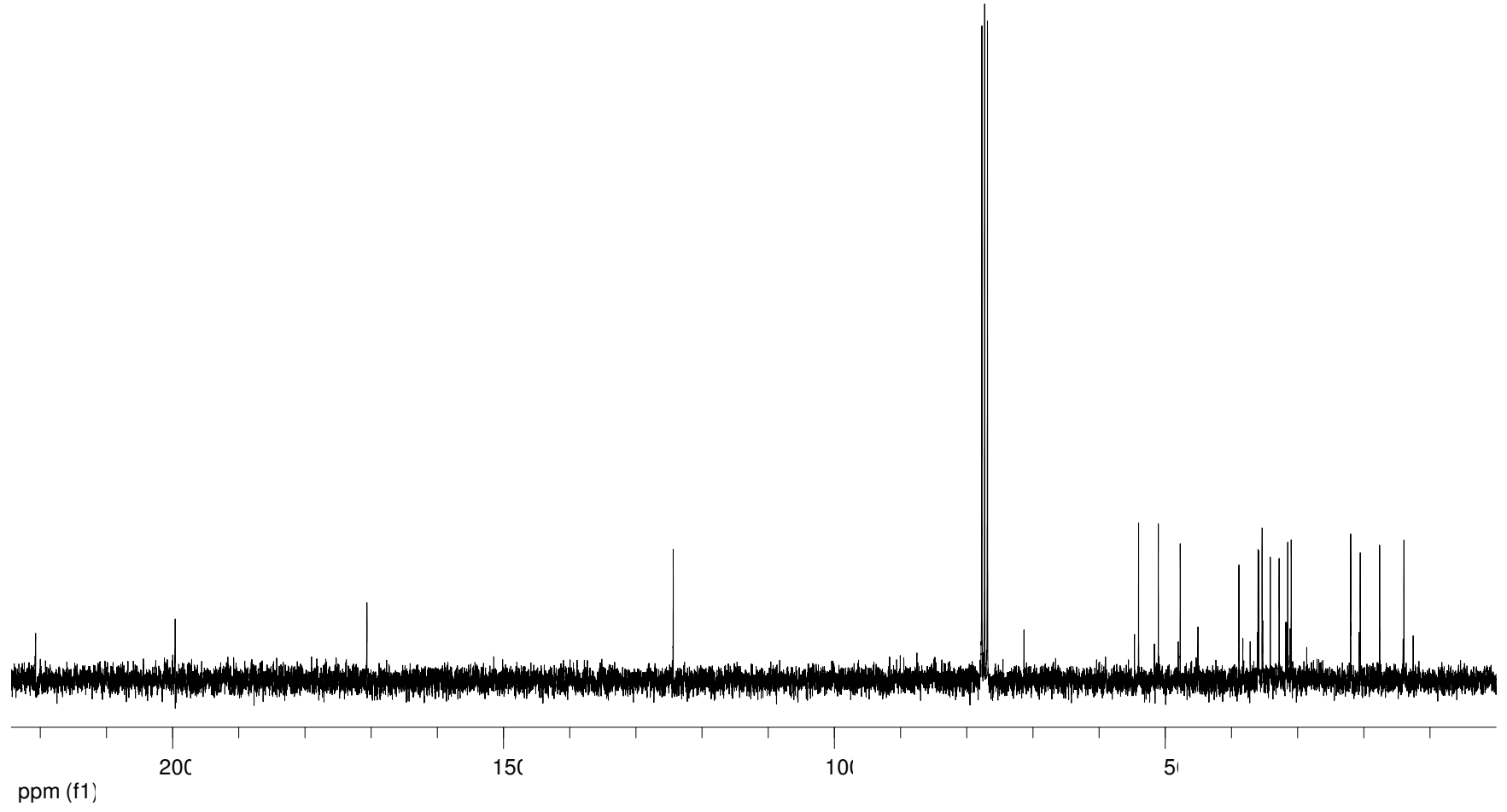
Şekil A.1. Testosteron (2) için <sup>1</sup>H NMR spektrumu



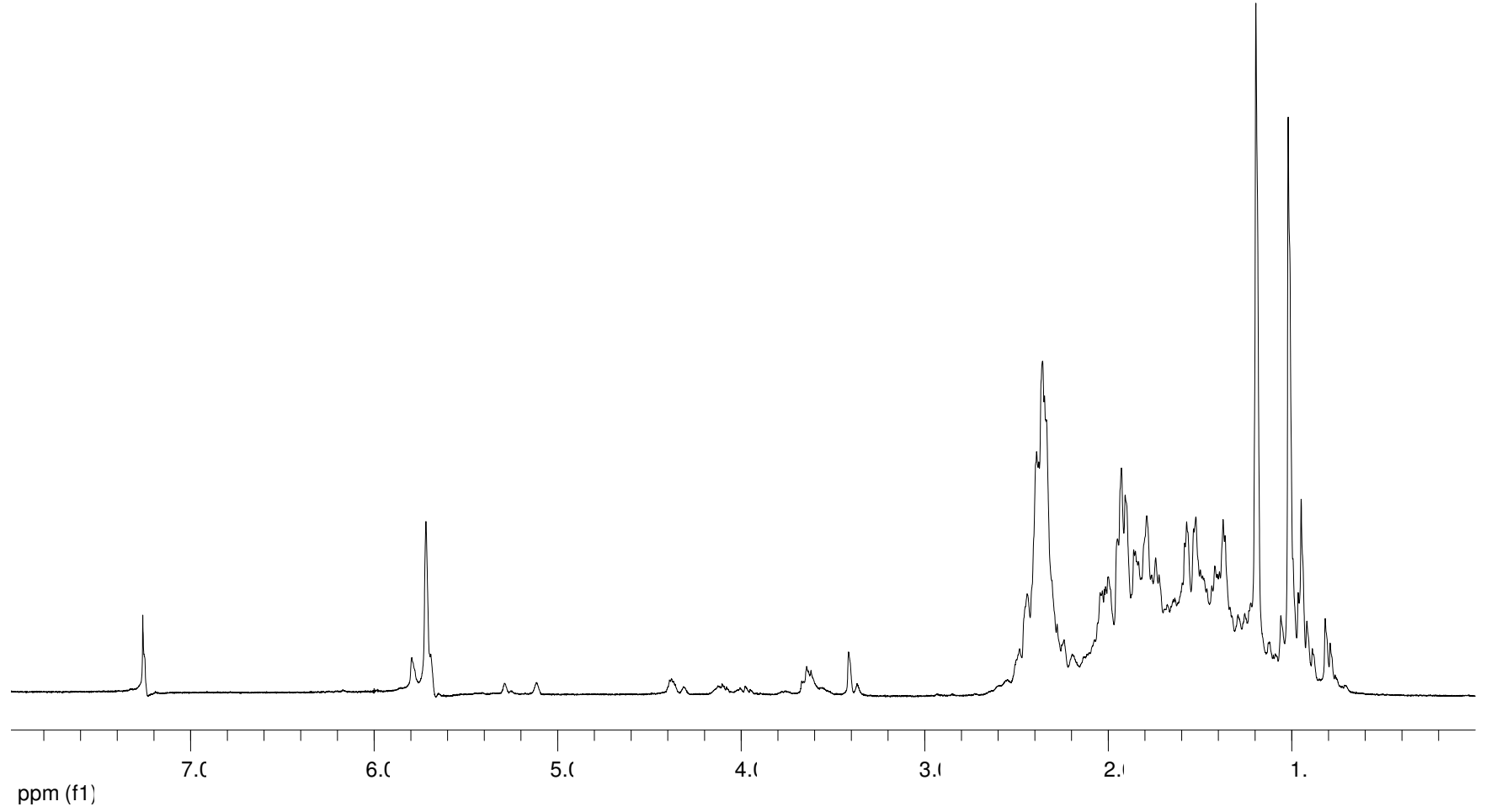
Şekil A.2. Testosteron (2) için  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu



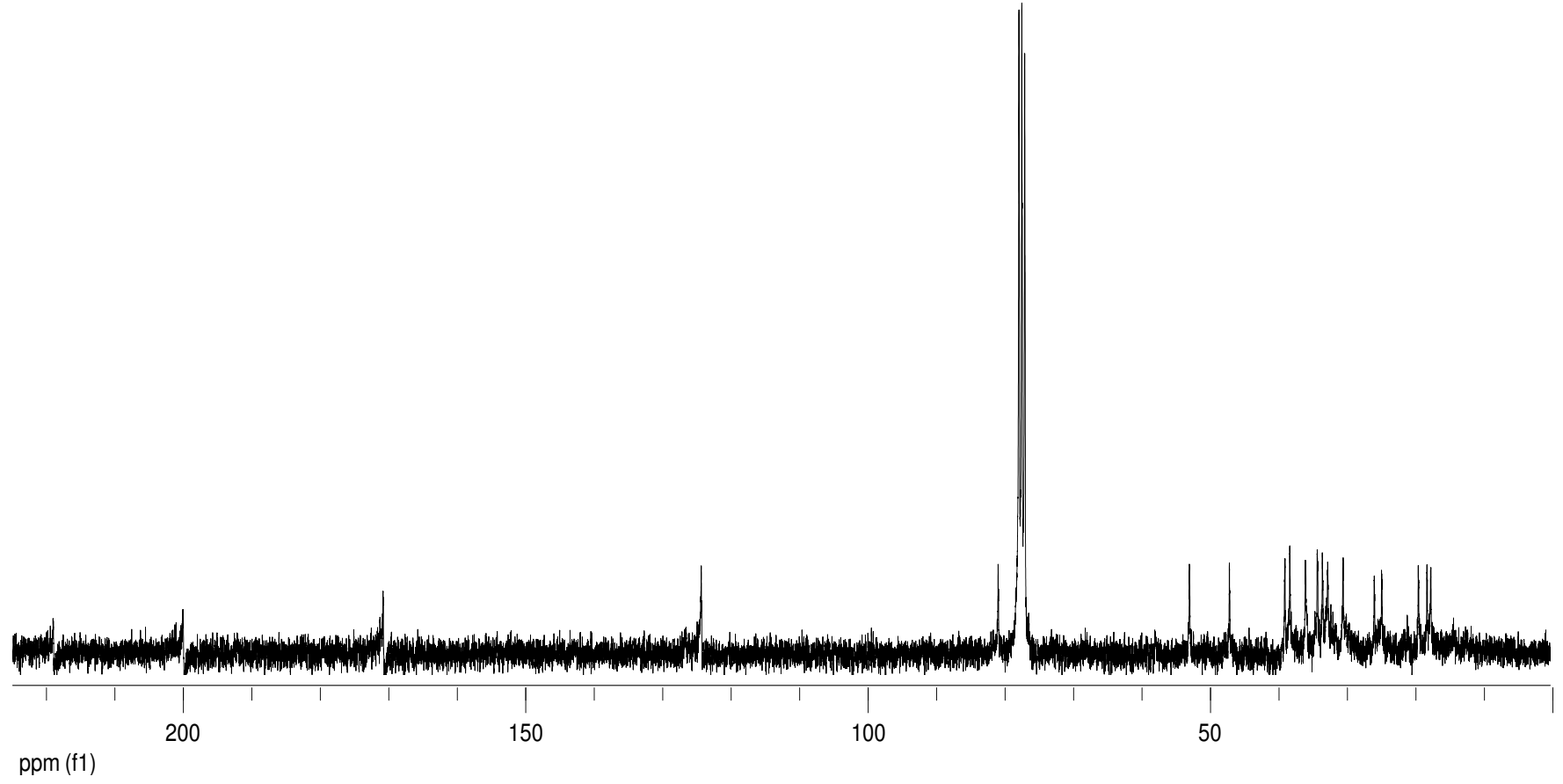
Şekil A.3. Androstendion (7) için <sup>1</sup>H NMR spektrumu



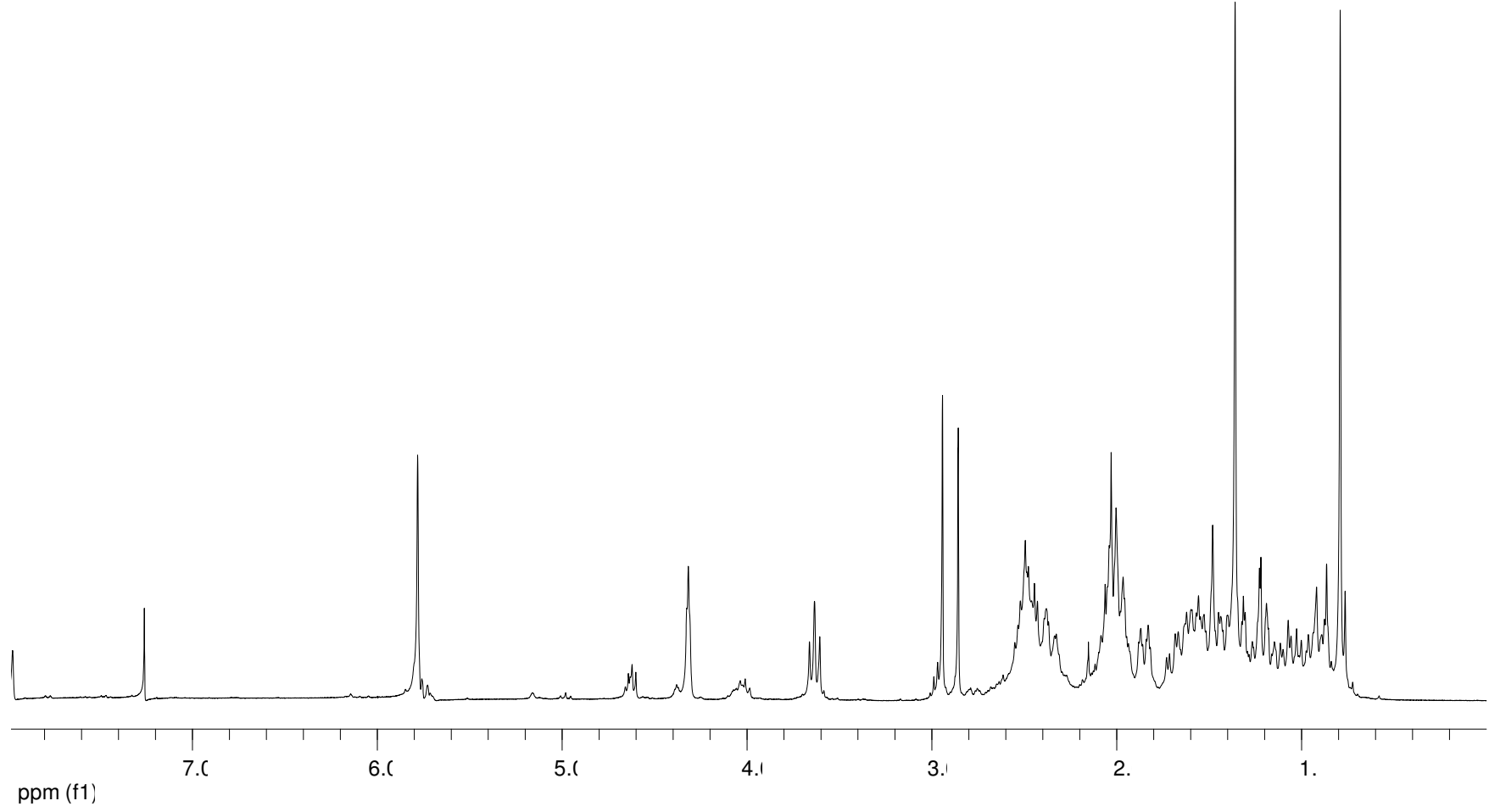
Şekil A.4. Androstendion (7) için  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu



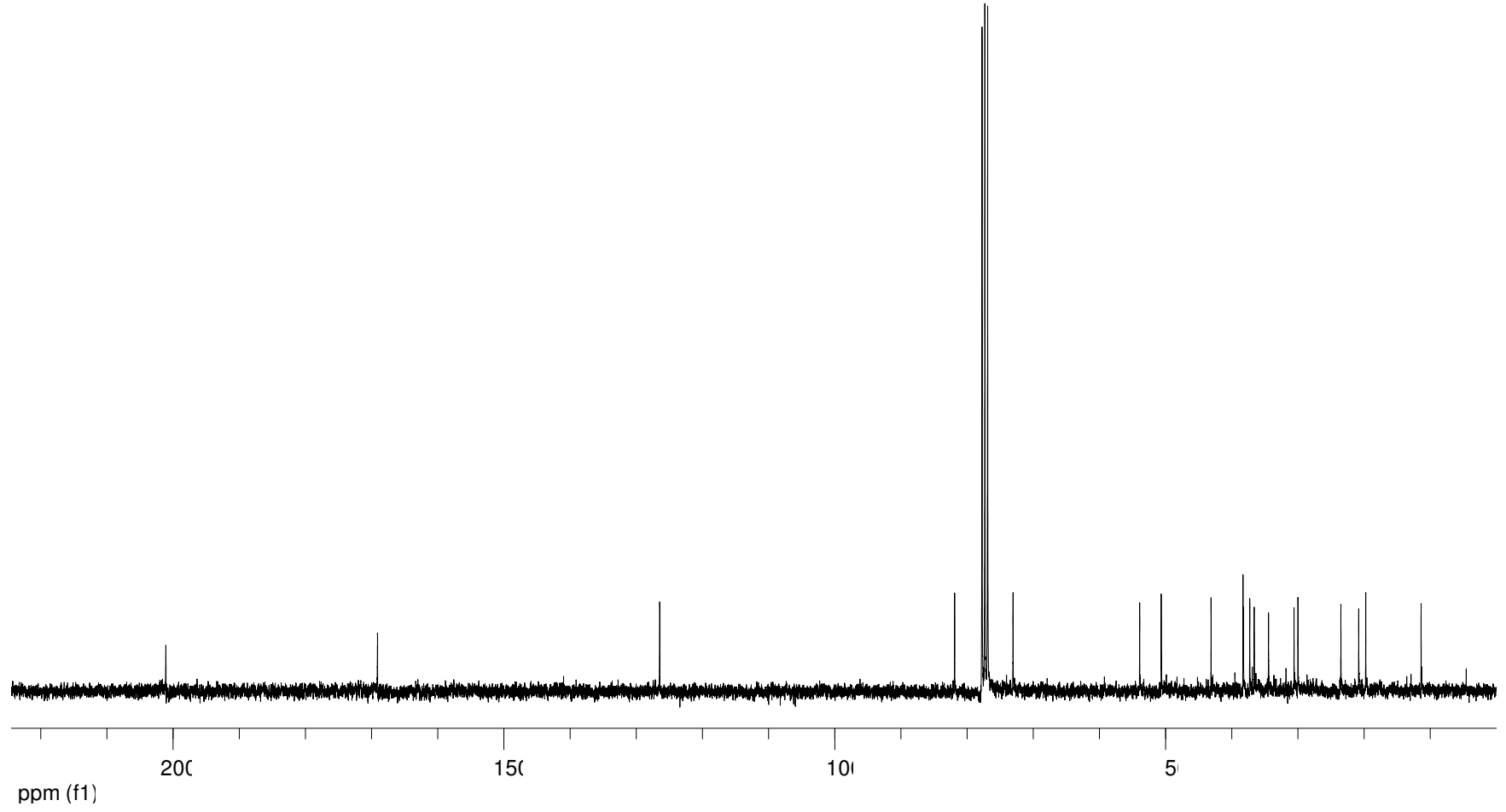
Şekil A.5. 14α-Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**15**) için <sup>1</sup>H NMR spektrumu



Şekil A.6.  $14\alpha$ -Hidroksiandrosta-4-en-3,17-dion (**15**) için  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu

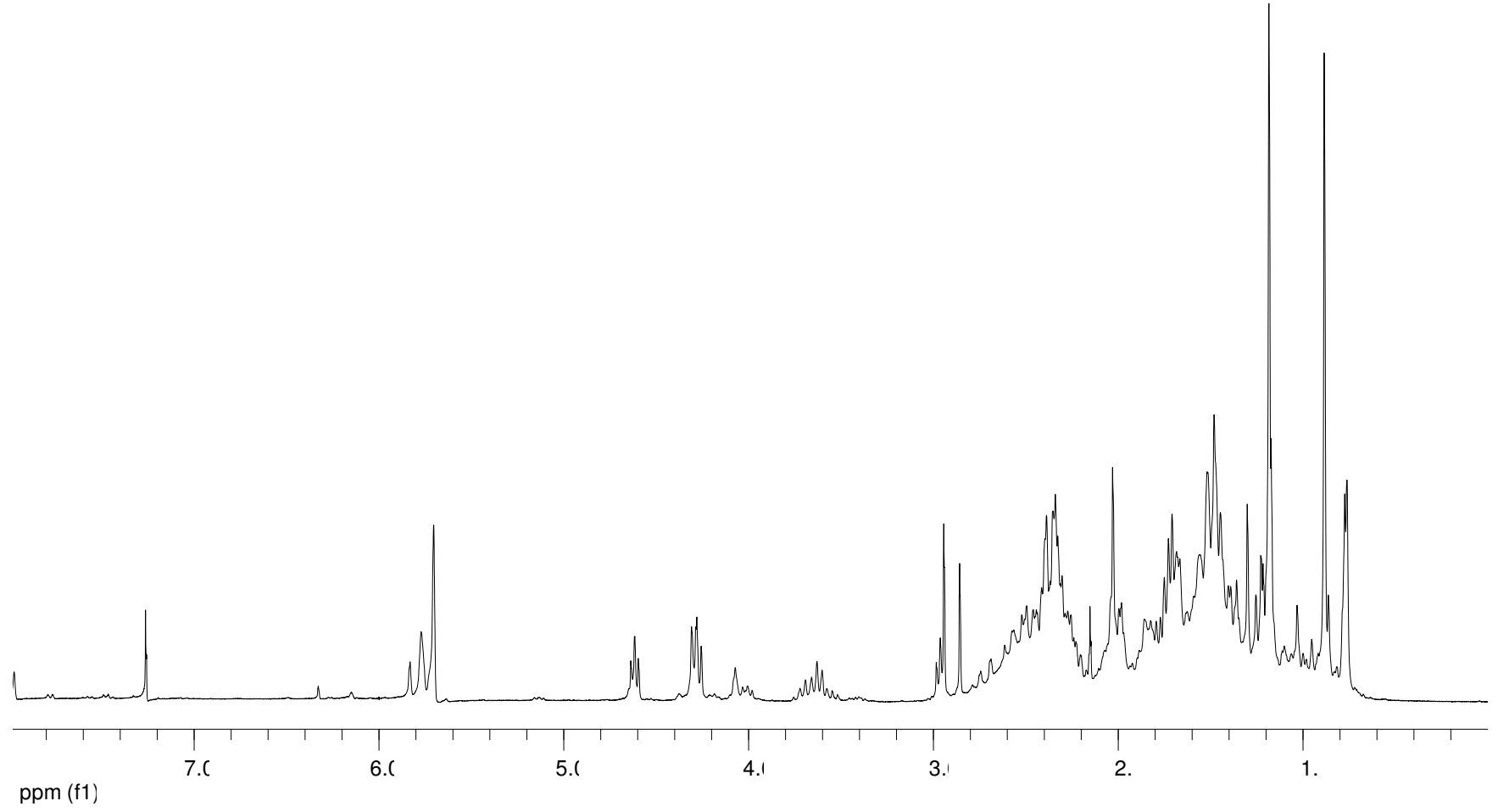


Şekil A.7. 6 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihidroksiandrosta-4-en-3-on (**16**) için  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

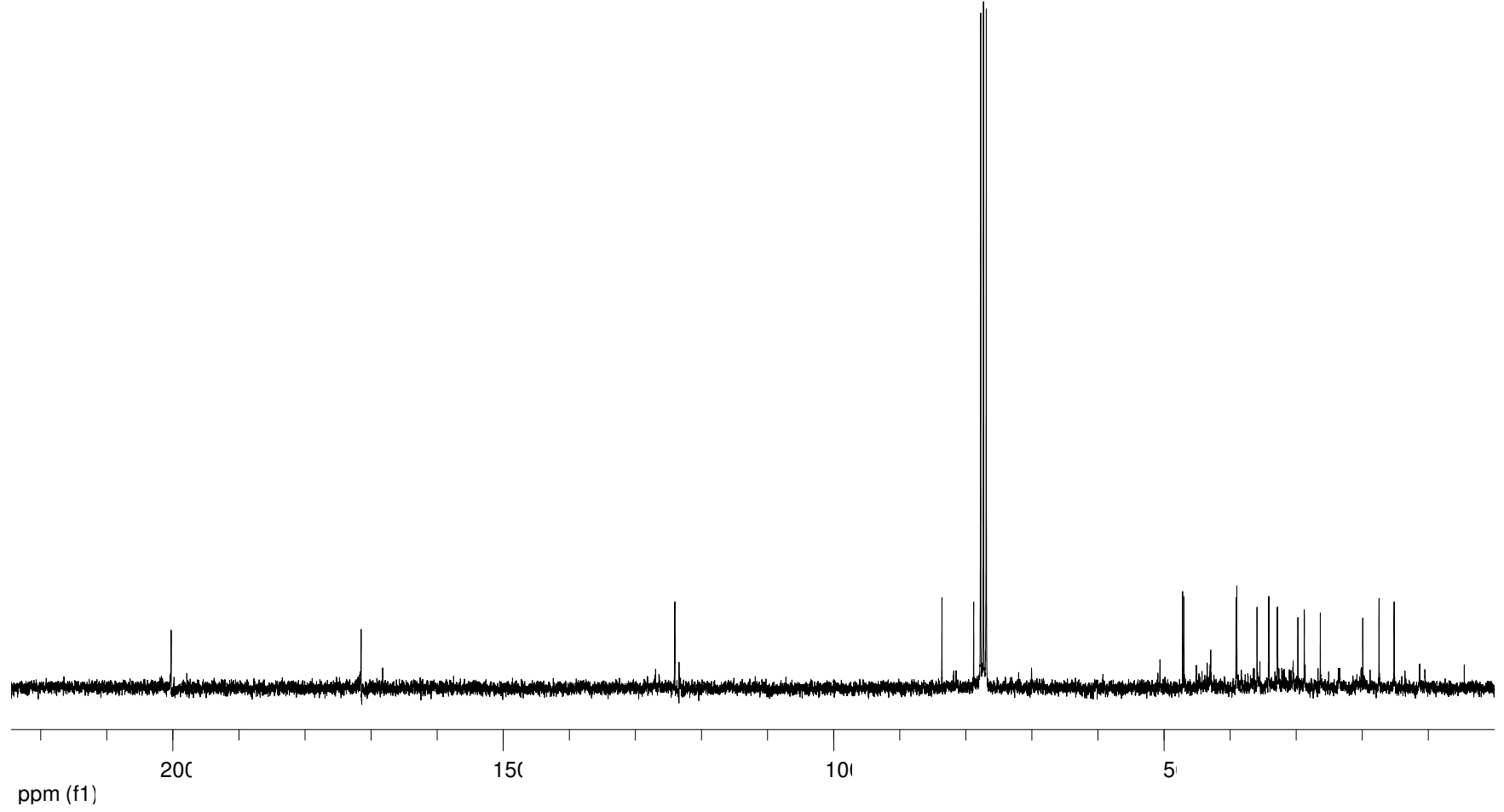


Şekil A.8.  $6\beta,17\beta$ -dihidroksiandrost-4-en-3-on (**16**) için  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu

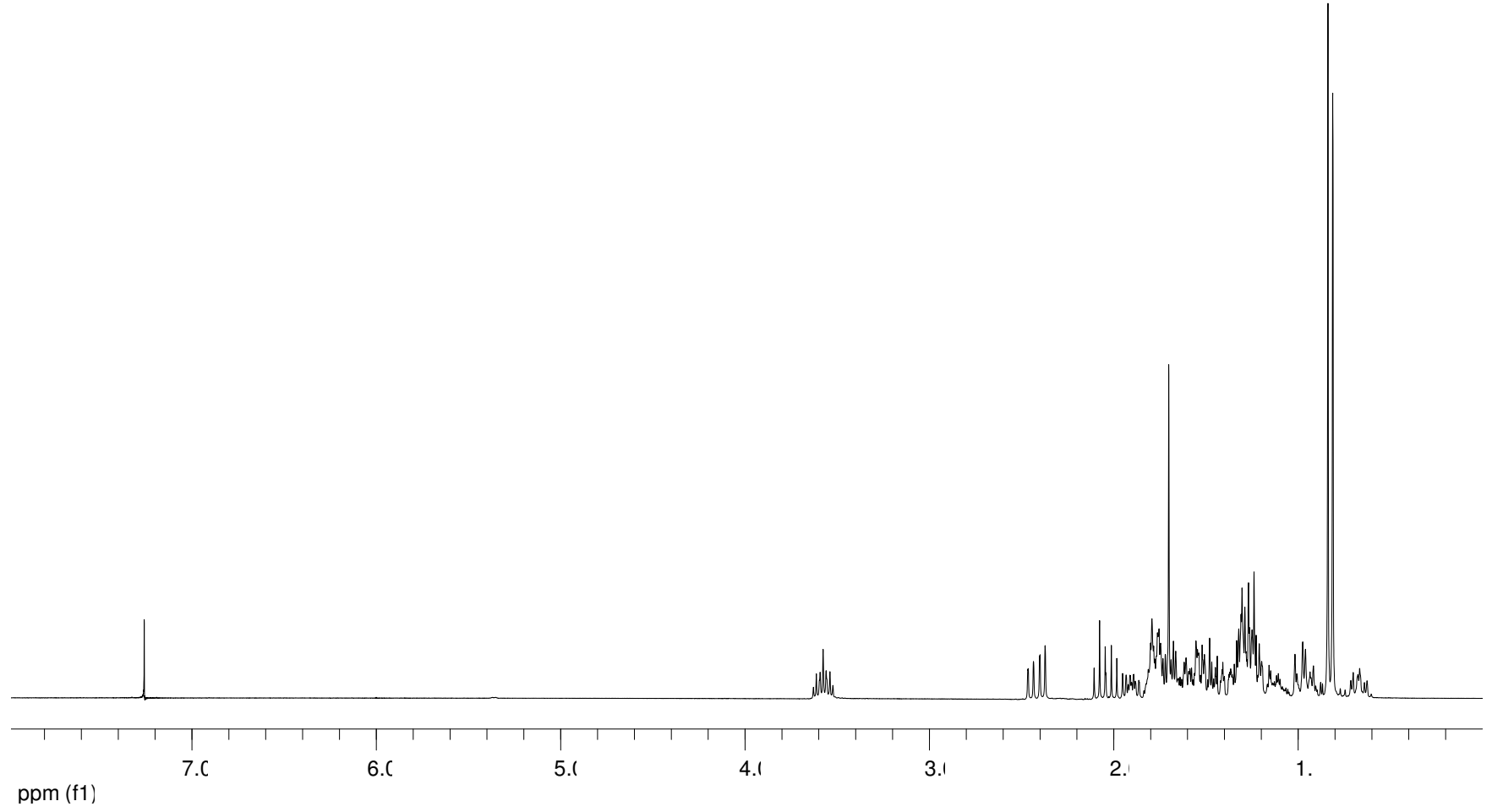




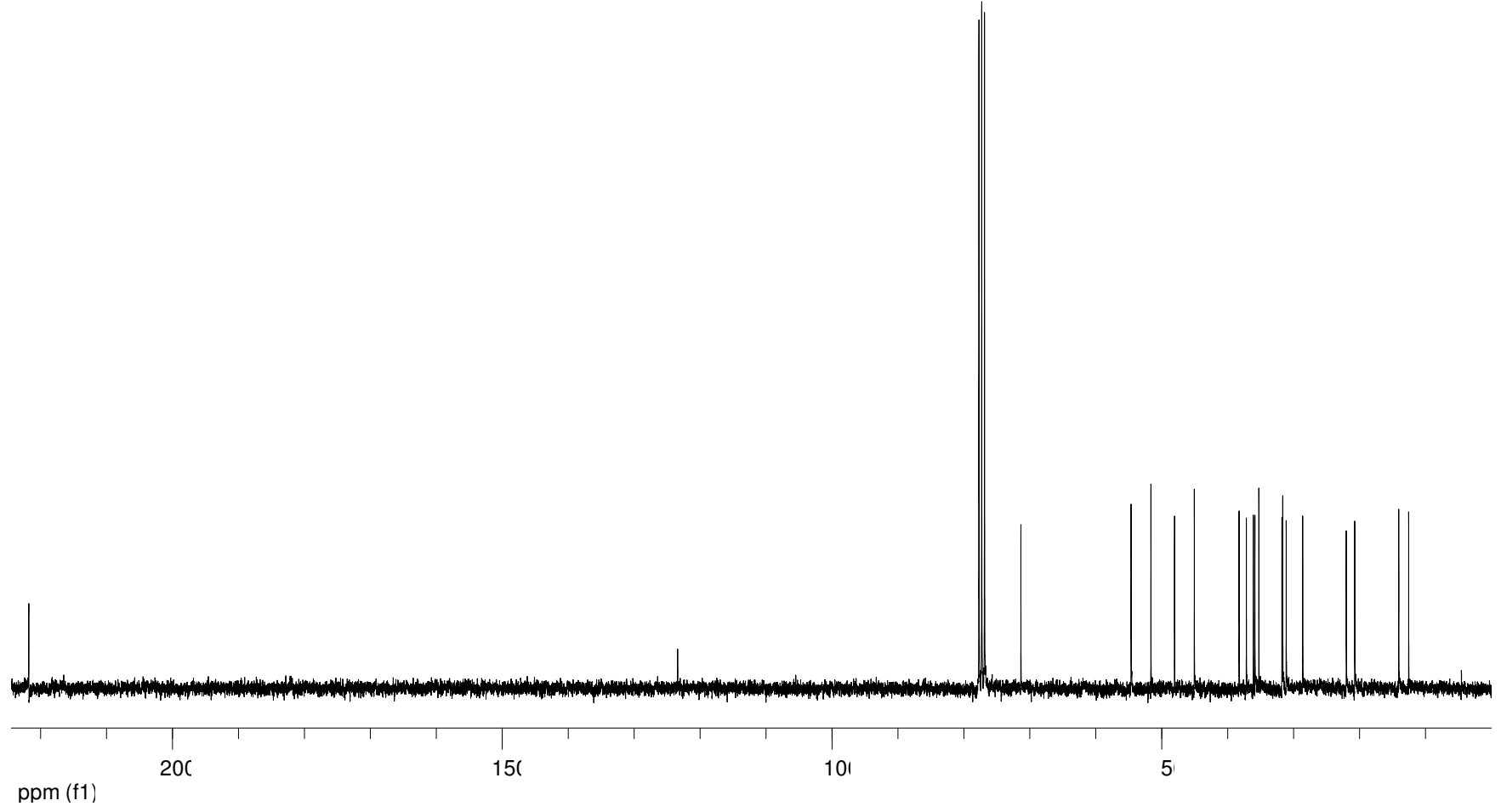
Şekil A.9. 14α,17β-Dihidroksiandrost-4-en-3-on (17) için <sup>1</sup>H NMR spektrumu



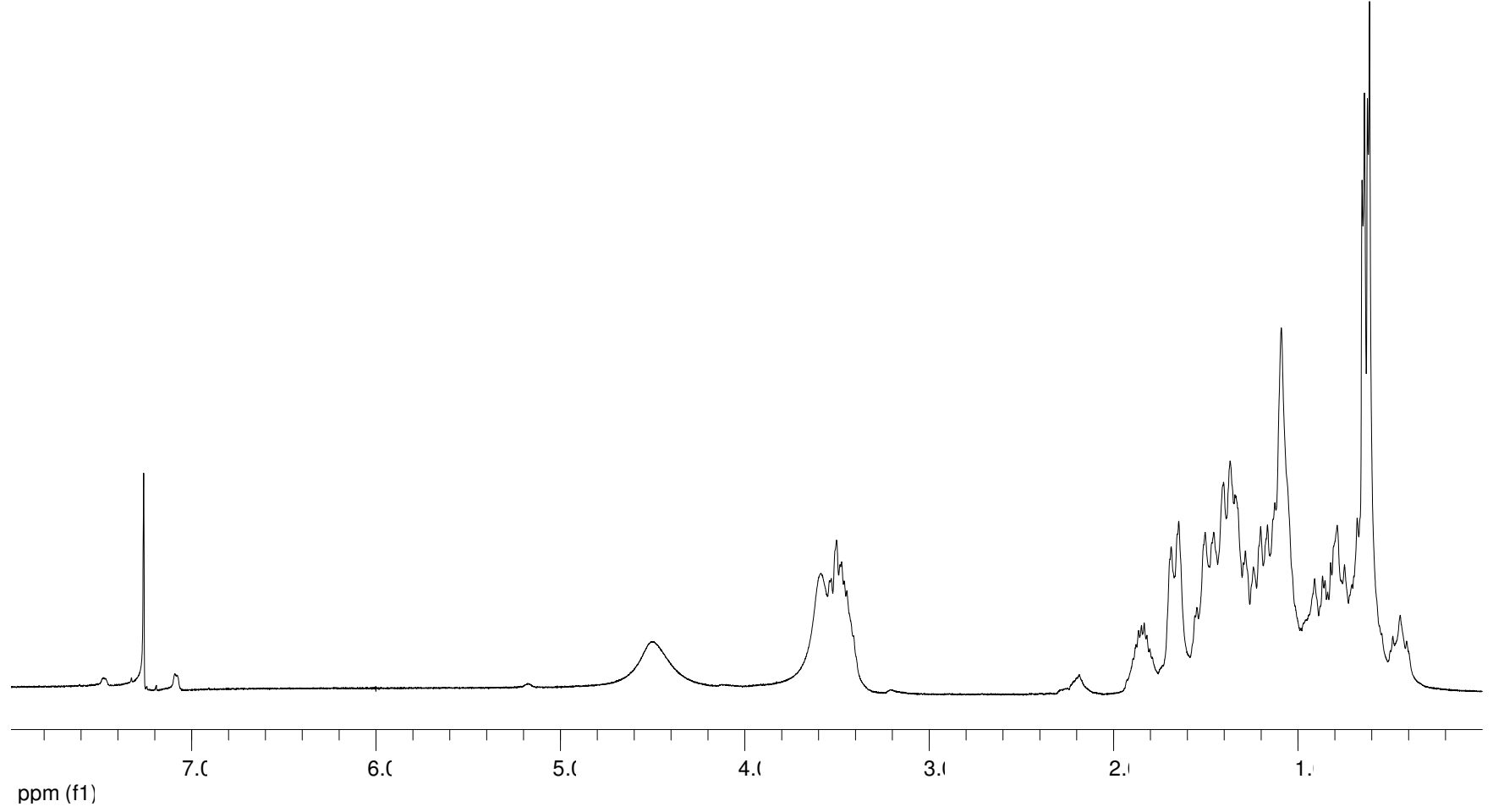
Şekil A.10. 14α,17β-Dihidroksiandrosta-4-en-3-on (**17**) için <sup>13</sup>C NMR spektrumu



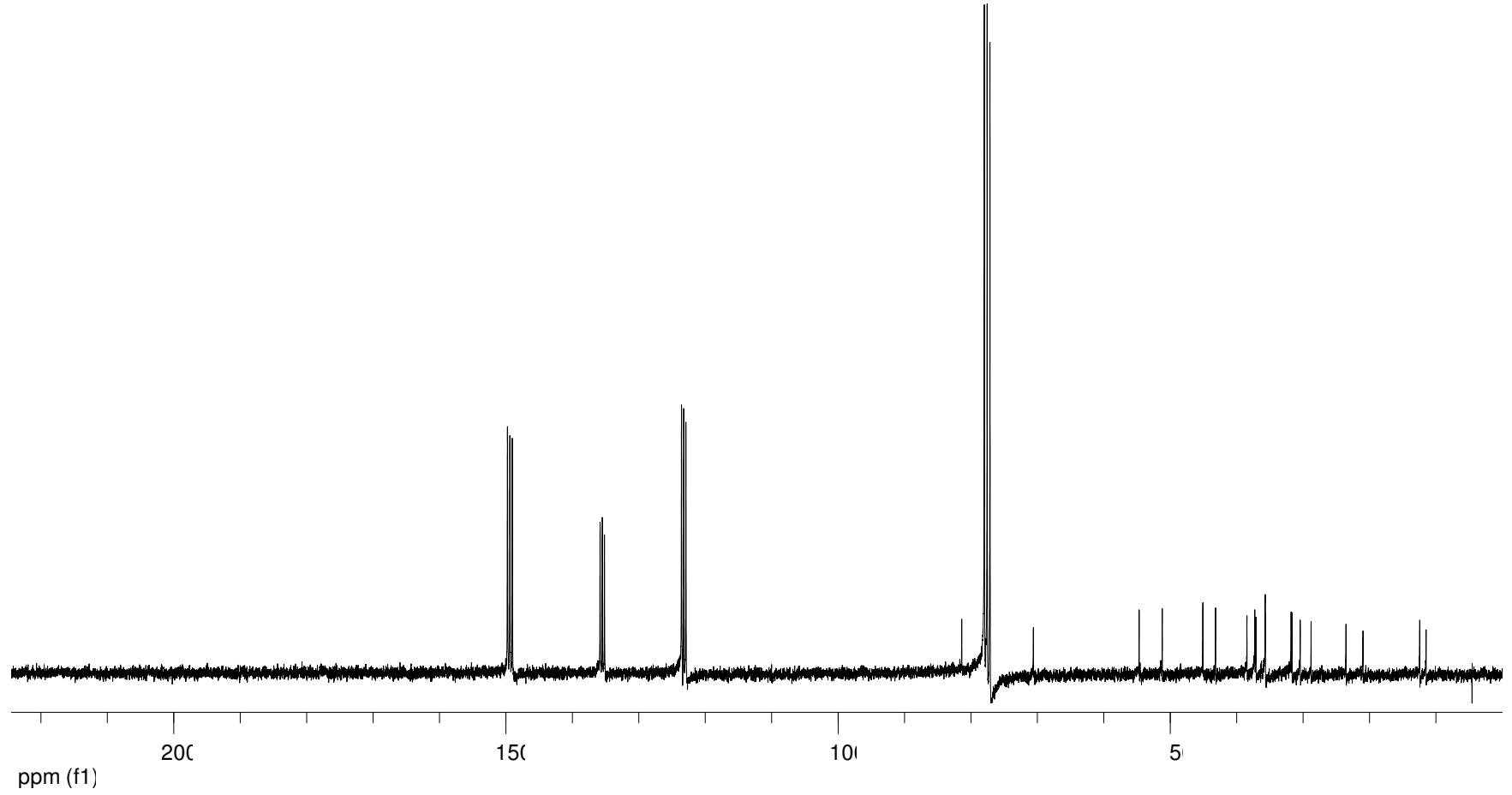
Şekil A.11. Epiandrosteron (**12**) için <sup>1</sup>H NMR spektrumu



Şekil A.12. Epiandrosteron (**12**) için  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu



Şekil A.13. 3β,17β-Dihidroksiandrostan (25) için <sup>1</sup>H NMR spektrumu



Şekil A.14. 3 $\beta$ ,17 $\beta$ -Dihidroksiandrostan (**25**) için  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu

## ÖZGEÇMİŞ

Ömer Faruk Dolu, 1987 yılında Konya'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Konya'da tamamladı. 2005 yılında başladığı Karadeniz Teknik Üniversitesi Kimya Bölümünü 2010 yılında bitirdi. Yüksek lisans öğrenimine 2012 yılında Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında başladı.

Meslek hayatına 2011 yılı Eylül ayında İstanbul'da özel bir etüt merkezinde eğitim koordinatörü olarak başladı. Aynı göreve 2013 yılı Ağustos ayına kadar devam etti. O tarih itibariyle kişisel eğitimine ağırlık vermiş olup halen gelişimine devam etmektedir.