

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Eda KÜÇÜKBAŞOL

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Kudret YILDIRIM

Mayıs 2019

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANDROSTENDİONUN CLADOSPORIUM
SPHAEROSPERMUM VE ULOCLADIUM
CHARTARUM İLE BİYOTRANSFORMASYONLARI

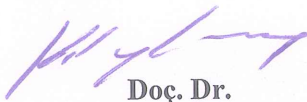
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Eda KÜÇÜKBAŞOL

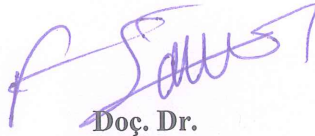
Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA

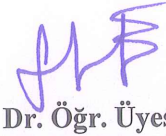
Bu tez 20/05/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.



Doç. Dr.
Kudret YILDIRIM
Juri Başkanı



Doç. Dr.
Fatih SÖNMEZ
Üye



Dr. Öğr. Üyesi
Semra YILMAZER KESKİN
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.

Eda KÜÇÜKBAŞOL

24.04.2019

TEŞEKKÜR

Çalıőmayı 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 teőekkürlerimi sunarım.

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

Bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan, yaşamım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve bu süreçte yanımda olan değerli ailelerime sonsuz teőekkürlerimi 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.	
ANDROSTENDİON BİLEŞİĞİNİN BAZI KÜFLER İLE BİYOTRANSFORMASYONLARI	5
2.1. Biyotransformasyonlar.....	5
2.2. Enzimlerin Avantajları ve Dezavantajları	5
2.3. Mikrobiyal Biyotransformasyonlar	8
2.4. Küfler ile Steroid Biyotransformasyonları	11
2.4.1. <i>Cladosporium sphaerospermum</i>	12
2.4.2. <i>Ulocladium chartarum</i>	13
2.5. Çalışmanın Amacı	13
BÖLÜM 3.	
MATERYAL VE METOT	14
3.1. Cihazlar, Sarf Malzemeler ve Kullanılan Yöntemler	14
3.2. Yatık Agar Besiyerlerinin Hazırlanması	15

3.3. Kf Kültürlerinin Hazırlanması	15
3.4. Küflere Ait Besiyerlerinin Hazırlanması	15
3.5. Biyotransformasyon alışması	16
3.6. Metabolitlerin Saflaştırılması ve Yapılarının Tayini	16
BÖLÜM 4.	
DENEYSEL BULGULAR	18
BÖLÜM 5.	
SONUÇLAR VE TARTIşMA	25
KAYNAKLAR	34
EKLER	38
ZGEMİş	63

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

δ_C	: ^{13}C NMR spektrumundaki kimyasal kayma değeri
δ_H	: ^1H NMR spektrumundaki kimyasal kayma değeri
Δ	: Fark yada çift bağdaki ilk karbonları gösteren simge
$\Delta\delta_C$: ^{13}C NMR spektrumundaki kimyasal kayma değerleri farkı
$\Delta\delta_H$: ^1H NMR spektrumundaki kimyasal kayma değerleri farkı
atm	: Atmosferik basınç birimi
bs	: Geniş singlet (broad singlet)
cm	: Santimetre
$^{\circ}\text{C}$: Santigrat derece
^{13}C NMR	: Karbon 13 Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
DHEA	: Dehidroepiandrosteron
DMF	: Dimetilformamit
g	: Gram
^1H NMR	: Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
Hz	: Hertz
IR	: Infrared (kızılötesi)
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

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Genel steroid yapısı.....	2
Şekil 1.2. Kolesterol.....	2
Şekil 1.3. Bazı steroid hormonların biyosentezi	3
Şekil 2.1. <i>R. arrhizus</i> ile progesteron (3) biyotransformasyonu.....	11
Şekil 4.1. Substratın karbon iskeleti.....	18
Şekil 4.2. Substratın <i>C. sphaerospermum</i> ile biyotransformasyonu.....	20
Şekil 4.3 Substratın <i>U. chartarum</i> ile biyotransformasyonu.....	23
Şekil 5.1 Substratın <i>C. sphaerospermum</i> ile biyotransformasyonu.....	25
Şekil 5.2 Substratın <i>U. chartarum</i> ile biyotransformasyonu.....	29

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Bütün hücre sistemlerine karşı izole enzimler kullanmanın avantaj ve dezavantajları	9
Tablo 5.1. Androstendion (5) ve bazı metabolitleri için ¹³ C NMR değerleri ...	28
Tablo 5.2. Androstendion (5) ve diğer bazı metabolitleri için ¹³ C NMR değerleri.....	30
Tablo 5.3. <i>C. sphaerospermum</i> MRC 70266 küfü ile metabolit verimleri	32
Tablo 5.4. <i>U. chartarum</i> MRC 72584 küfü ile metabolit verimleri	33

ÖZET

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

Bu çalışmada, *Cladosporium sphaerospermum* MRC 70266 ve *Ulocladium chartarum* MRC 72584 küfleri ile androstendion bileşiğinin biyotransformasyonları gerçekleştirildi.

Androstendion bileşiğinin *Cladosporium sphaerospermum* MRC 70266 ile inkübasyonu 17 β -hidroksiandrost-4-en-3-on (%2), 5 α -androstan-3,6,17-trion (%3), 6 β -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (%37), 17 β -hidroksiandrost-4-en-3,16-dion (%5), 6 β ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (%6), 15 α -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (%4) ve 6 β ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3,16-dion (%3) bileşikleri ile sonuçlandı. Androstendion bileşiğinin *Ulocladium chartarum* MRC 72584 ile inkübasyonu ise 5 α -androstan-3,6,17-trion (%13), 17 β -hidroksi-5 α -androstan-3,6-dion (%3), 14 α -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (%14), 7 β -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (%18) ve 7 α -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (%10) bileşiklerini verdi. 6 β ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3, 16-dion yeni bileşik olarak tanımlandı.

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

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

SUMMARY

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

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

Incubation of androstenedione with *Cladosporium sphaerospermum* MRC 70266 yielded 17 β -hydroxyandrost-4-en-3-one (2%), 5 α -androstane-3,6,17-trione (3%), 6 β -hydroxyandrost-4-en-3,17-dione (37%), 17 β -hydroxyandrost-4-en-3,16-dione (5%), 6 β ,17 β -dihydroxyandrost-4-en-3-one (6%), 15 α -hydroxyandrost-4-en-3,17-dione (4%) and 6 β ,17 β -dihydroxyandrost-4-en-3,16-dione (3%). Incubation of androstenedione with *Ulocladium chartarum* MRC 72584 yielded 5 α -androstane-3,6,17-trione (13%), 17 β -hydroxy-5 α -androstane-3,6-dione (3%), 14 α -hydroxyandrost-4-en-3,17-dione (14%), 7 β -hydroxyandrost-4-en-3,17-dione (18%) and 7 α -hydroxyandrost-4-en-3,17-dione (10%). 6 β ,17 β -dihydroxyandrost-4-en-3,16-dione was identified as a new compound.

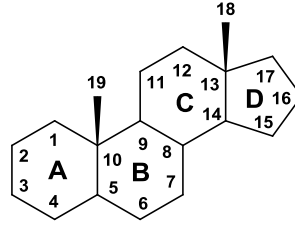
The structures of the metabolites were revealed by comparing melting points, NMR and IR spectra of the starting material with those of metabolites.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Doğal ürünler, canlıların büyüme ve üremesi için esas teşkil etmeyen sekonder metabolizmanın sekonder metabolitler olarak da bilinen ürünleri olup bulunduğu canlılara faydalar sağlayan ve daha çok diğer canlılar üzerindeki etkilerinden dolayı dikkat çeken kimyasal maddelerdir [1,3]. Doğal ürünler hemen hemen her grup canlıda bulunmalarına rağmen özellikle bitkilerde, mikroorganizmalarda, mantarlarda ve böceklerde daha yaygın olarak gözlenirler. Ayrıca bu bileşikler bitkiler, hayvanlar, böcekler ve mikroorganizmalar arasındaki etkileşimin düzenlenmesinde önemli ekolojik roller oynar. Canlılar için büyük öneme sahip olan doğal ürünler daha çok bitkiler ve mikroorganizmalarda gözlenirler [3].

Bu bileşikler çok sayıda ve farklı yapılarda olsalar da genelde tabiattaki biyosentezlerinden kaynaklanan bazı özel yapısal özelliklere sahip olmaları sebebi ile yağ asitleri, terpenoidler, stereoidler, poliketidler, alkaloidler, fenilpropanoidler, peptidler, özelleşmiş karbonhidratlar ve özelleşmiş aminoasitler gibi sınıflar altında incelenirler [1].

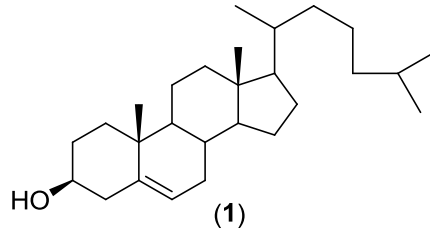
Steroidler siklopentanoperhidrofenantren veya sadece steran halkası olarak bilinen birbirleri ile kaynaşmış dört halk içerirler [4,5]. Bu halkalar sırasıyla A, B ve C halkaları olarak adlandırılan üç adet sikloheksan halkası ile D halkası olarak adlandırılan bir adet siklopentan halkası içerir (Şekil 1.1.). Komşu halka çiftlerinin her biri halka bağlantılarında iki karbon atomu paylaşır. Çoğu doğal steroid 10. ve 13. karbon pozisyonlarında metil grupları içerir. Bazı steroidler D halkasındaki 17. karbondan orjinlenen yan zincirlere de sahiptir [4].



Şekil 1.1. Genel steroid yapısı

A halkalarındaki 3 numaralı karbon atomlarında hidroksil grubuna sahip olan steroidlere steroller adı verilir [4,5]. Kolesterol (**1**), ergosterol ve stigmasterol en çok bilinen sterollerdir. Kolesterol (**1**) hayvansal kaynaklı gıdalarda, ergosterol mantarlarda ve stigmasterol ise bitkilerde bulunur [5].

Kolesterol (**1**) dört halka, bir yan zincirden oluşan 27 karbonlu bir bileşiktir (Şekil 1.2.). Memeli hücrelerindeki en yaygın sterol olan kolesterol (**1**) membran akışkanlığını düzenlemesinden dolayı biyokimyasal olarak önemlidir. Ayrıca kolesterol (**1**) steroid hormonları, safra asitleri, D₃ vitamini öncüsü olan bir bileşiktir [4,5].

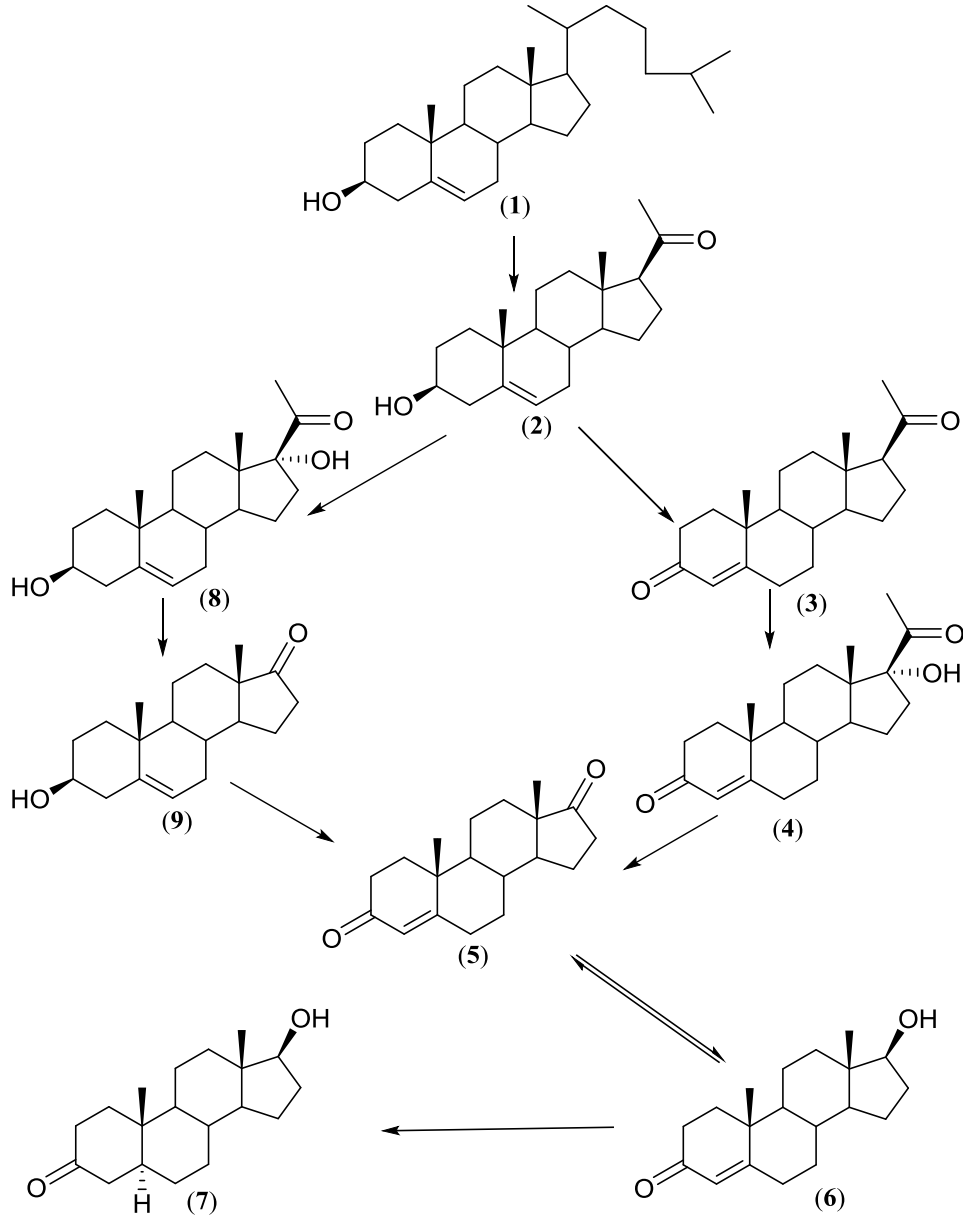


Şekil 1.2. Kolesterol

Kolesterol (**1**) türevi olan steroid hormonlar; glukokortikoidler, mineralokortikoidler, androjenler, östrojenler ve progestinler olmak üzere beş grupta incelenmektedirler [5]. Androjenler, östrojenler ve progestinler eşey hormonları olarak da bilinir [4]. Bu hormonlar üreme ile ilgili organların gelişme ve büyümelerini, ikincil eşey karakterlerini ve üreme döngüsünü düzenlerler [4,5].

Androjenler erkek üreme organlarının farklılaşmasını ve olgunlaşmasını kontrol eden erkek eşey hormonlarıdır. Androjenlerin vücuttaki asıl sentez yeri erbezleri (testis)

olsa da bu hormonların bir kısmı adrenal korteksten salınmaktadır. Adrenal korteks ve testislerdeki androjenlerin biyosentezi Δ^4 yolu veya Δ^5 yolu olmak üzere iki farklı şekilde (Şekil 1.3.) gerçekleşmektedir [4].



Şekil 1.3. Bazı steroid hormonların biyosentezi

Androjen biyosentezinin ana yolu olan Δ^4 yolunda kolesterol (1) bileşiğinden türetilen pregnenolon (2) ilk önce C-4 pozisyonunda çift bağ oluşturmak için progesterona (3) daha sonra ise 17 α -hidroksiprogesterona (4) dönüştürülür. 17 α -Hidroksiprogesteron (4) bünyesindeki yan zincirin uzaklaştırılması ile androst-4-en-

3,17-dion olarak da bilinen androstendion (5) bileşigi oluşur. Androstendion (5) bileşiginin C-17'deki indirgenmesiyle güçlü bir androjen olan ve testosteron olarak da bilinen 17 β -hidroksiandrost-4-en-3-on (6) bileşigi oluşur. 17 β -hidroksiandrost-4-en-3-on (6) ise daha sonra 5 α -redüktaz aktivitesi ile daha etkin bir diğer androjen olan ve DHT olarak da bilinen dihidrotestosteron (7) bileşigine dönüştürülür [4].

Aslında bir yan yol olan Δ^5 yolunda ise kolesterol (1) bileşiginden türevlenen pregnenolon (2) 17 α -hidroksipregnenolon (8) bileşigine dönüştürüldükten sonra DHEA olarak da bilinen dehidroepiandrosteron (9) bileşigi elde edilir. Dehidroepiandrosteron (9) ise androstendion (5) bileşigine çevrildikten sonra testosterona (6) dönüşebilmektedir. Dişi bireylerde etkili eşey hormonları olan östrojenler ise androstendion (5) ve testosteron (6) bileşiklerinden sentezlenmektedir [4].

Androstendion (5) androjen metabolizmasındaki önemli bir metabolit olmasının yanında farmasötik açıdan önemli androjenler, anabolik ilaçlar ve spironolakton gibi birçok önemli bileşigin hazırlanmasında da çıkış maddesi olarak kullanılmaktadır [6].

BÖLÜM 2. ANDROSTENDİON BİLEŞİĞİNİN BAZI KÜFLER İLE BİYOTRANSFORMASYONLARI

2.1. Biyotransformasyonlar

Enzimleri ya da enzimleri içeren biyolojik sistemleri kullanarak ksenobiyotikler üzerinde gerçekleştirilen kimyasal reaksiyonlara biyotransformasyonlar adı verilir [7]. Enzimler çeşitli biyolojik sistemlerin (hücre, doku ve organ kültürleri, mikrozomlar, mikroorganizmalar veya mikroorganizma sporları gibi) bünyesinde bulunabileceği gibi izole edildikten sonra sabitlenmiş veya serbest olarak da kullanılabilir [7,8]. Son zamanlarda biyotransformasyonlar için kullanılan enzimlerin çoğu biyolojik kaynaklardan izole edilirken bir kısmı ticari olarak elde edilmektedir.

2.2. Enzimlerin Avantajları ve Dezavantajları

Enzimlerin oldukça hassas, pahalı, sadece kendi substratları üzerinde ve sadece kendilerine özgü olan doğal çevrelerinde etkili oldukları gibi bazı önyargılar bulunmasına rağmen biyotransformasyon çalışmalarında kullanılan çoğu enzim için bu ifadeler doğru değildir [8].

Enzimler çok hızlı çalıştıkları için birçok avantajlar sağlar. Örneğin, enzimler ile gerçekleşen bir reaksiyon enzim olmaksızın gerçekleşen bir reaksiyona göre 10^8 - 10^{10} kat daha hızlı gerçekleşir. İlaveten enzim kullanılan reaksiyonlarda katalizör oranı % 10^{-3} - 10^{-4} mol arasında değişirken diğer katalizörlerin kullanıldığı bir reaksiyonda bu oran % 0,1-1 mol aralığına kadar çıkabilmektedir.

Enzimler, klasik sentez yöntemlerindeki çoğu reaktifin aksine doğada tamamen parçalanabilir ve doğa dostu olarak bilinirler.

Enzimler genellikle maksimum aktiviteye sahip oldukları optimum pH ve sıcaklık aralığına sahiptirler. Enzimler, yaklaşık pH değerinin 5-8 ve sıcaklığın 20-40°C aralığında olduğu koşullarda çalışırlar. Bahsedilen şartlarda bozunma, izomerizasyon, rasemizasyon ve yeniden düzenleme gibi istenmeyen yan reaksiyonların gerçekleşme oranını azaltabilir.

Enzimler metabolik yollardaki multienzim sistemlerine benzer veya aynı şartlar altında etkili olabildikleri için bir reaksiyon ağındaki birden fazla seri reaksiyonu aynı ortamda gerçekleştirebilirler.

Enzimler reaksiyonlarını her iki yönde de gerçekleştirebilirler. Enzimler kullanılarak 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 gibi reaksiyonlar gerçekleştirilebilir.

Karmaşık bir üç boyutlu yapıya sahip olan enzimler regioseçici ve stereoseçici biyomoleküller oldukları için aynı substrat molekülünün farklı kısımlarındaki fonksiyonel grupları bile ayırabilirler. Enzimler ayrıca kemoseçici olmaları sebebi ile genelde tek bir spesifik fonksiyonel grup üzerinde etki gösterirler.

Enzimler sadece L-amino asitleri içeren kiral biyokatalizörlerdir ve enantiyoseçici davranırlar. Bu sayede prokiral bir substrat enzimlerin etkisi sonucunda sadece bir enantiyomere dönüşürken genelde enzimlerin rasemik karışımlardaki enantiyomerlerden sadece birini etkilemesiyle enantiyomerler bile ayrılabilir [8].

Enzimler yukarıda bahsedilen bu avantajları sayesinde klasik sentez yöntemleriyle gerçekleşmesi çok zor veya imkânsız olan tepkimeleri kolayca gerçekleştirilebilmektedirler.

Enzimlerin bazı dezavantajları da bulunmaktadır [8]. Enzimler sadece belirli bir enantiyomerik yapıya sahip oldukları için diğer enantiyomerlerin D-amino asitlerden sentezi için genel bir yol olmaması nedeniyle yalnızca belirli bir enantiyomer ile reaksiyon verebilirler.

Enzimler ayrıca kendi aktiviteleri üzerinde etkili olan pH ve sıcaklık gibi parametrelerdeki değişimlere karşı oldukça duyarlıdır.

Enzimler için en uygun reaksiyon ortamının su olmasına rağmen çoğu organik bileşiğin sudaki çözünürlükleri oldukça düşüktür. Enzimatik bir reaksiyon organik bir çözücüde gerçekleştiğinde enzimler denatüre olabileceği için aktivite kaybı yaşanabilir ve bu istenmeyen bir durumdur.

Enzimler inhibisyona çok hassas biyomoleküllerdir. Enzimatik reaksiyonların çoğunda enzimler, yüksek orandaki substrat ve ürün varlığında inhibe olurlar. Bu şekildeki substrat inhibisyonu, düşük miktarlarda substrat miktarından başlanarak ortama sürekli substrat eklenerek engellenebilir. Miktarı artan ürünün reaksiyon ortamından aralıklarla uzaklaştırılması genelde ürünün bir sonraki reaksiyon basamağına dahil olması sebebi ile oldukça zordur.

Enzimler kendilerine özgü doğal kofaktörlerine bağımlıdır ve enzimatik reaksiyonlarda NADH ve NAD(P)H gibi kofaktörlerin reaksiyon ortamında bulunmaları ve sürekli yenilenmeleri gerekir. Kofaktörlerin sentetik eşdeğerlerinin kendilerinin yerine kullanılamaması, kararsız ve oldukça pahalı moleküller olmaları da enzimler ile gerçekleştirilen reaksiyonların önemli dezavantajları arasındadır.

Buna ilaveten bazı enzimler alerjik reaksiyonlara da neden olabildikleri için diğer kimyasal maddeler gibi dikkat edilerek kullanılmalıdırlar. Enzimleri dikkatli kullanımları ile bu alerjik reaksiyonlar engellenebilir veya en aza indirgenebilir [8].

2.3. Mikrobiyal Biyotransformasyonlar

Biyotransformasyonlar genellikle izole enzimler ya da bütün hücre sistemleri ile gerçekleştirilir. Bütün hücre sistemleri bitki ve hayvanlara ait hücre, doku ve organ kültürleri ile mikroorganizmalardan oluşur. Bütün hücre sistemleri ile izole enzimlerin sahip oldukları avantaj ve dezavantajları Tablo 2.1.'de özetlenmiştir [8].

Çoğu hücre içi enzimin hücre dışında kararsız olabilmeleri, homojenasyonları esnasında bazı proteolitik enzimlerin etkisi ile parçalanmaları, kofaktör ihtiyaçlarının giderilmesi, kofaktörlerin reaksiyon ortamına sürekli ilave edilmesi zorunluluğu, enzimlerin yüksek izolasyon maliyetleri ve izolasyonlarının zorluğu gibi problemler sebebi ile biyotransformasyon çalışmalarında genelde bütün hücre sistemleri tercih edilmektedir.

Bütün hücre sistemleri ile gerçekleştirilen biyotransformasyon için ise genelde mikrobiyal hücreler kullanılmaktadır. Mikrobiyal hücrelerin büyüme ve gelişimi bitki ve hayvan hücrelerine göre çok daha hızlı gerçekleştiği için mikrobiyal hücreler ile biyotransformasyonlar daha kısa zaman alırlar. Mikrobiyal hücreler, daha küçük boyutları ve sağlam hücre duvarları sayesinde bitki ve hayvan hücrelerine göre mekanik olarak daha kararlıdırlar. Mikrobiyal hücrelerin buldukları ortama kolayca adapte olabilmeleri kullanıcılarına avantaj sağlar. Ayrıca mikrobiyal hücreler bitki ve hayvan hücrelerine göre çok farklı tipte substratları metabolize edebilirler.

Mikrobiyal biyotransformasyonlar klasik sentez yöntemlerine karşı bazı üstünlükleri sebebi ile biyoteknolojinin temel elemanları arasında yer alırlar [7,9]. Mikroorganizmaların genetik olarak değiştirilebilmeleri biyoteknolojideki kullanımlarını daha da yaygınlaştırmaktadır. Mikroorganizmalar üzerindeki gerçekleştirilen genetik değişiklikler sayesinde klasik sentez yöntemleriyle düşük

verimle elde edilen önemli ürünler daha yüksek verimlerde elde edilebilir. Genetik uygulamalar ile hedef ürünler üzerinde spesifik değişiklikleri gerçekleştirmek bile mümkün olabilmektedir [9].

Tablo 2.1. Bütün hücre sistemlerine karşı izole edilmiş enzimler kullanmanın avantaj ve dezavantajları [8]

Biyokatalizör	Formlar	Avantaj	Dezavantaj
İzole enzimler	Genel	Basit düzenekler Basit işlemler Yüksek konsantrasyon toleransı ile iyi verim	Kofaktöre ihtiyaç duyulması Sınırlı enzim kararlılığı
	Sulu ortam	Yüksek enzim aktivitesi	Yan reaksiyon ihtimali Lipofilik substratların düşük çözünürlüğü Ekstraksiyon gerekliliği
	Organik çözücü	Çalışma kolaylığı Lipofilik substrat kolaylığı Enzimin geri kazanım kolaylığı	Düşük aktivite
	İmmobilize olan	Enzimin tekrar kullanılabilirliği	İmmobilizasyon ile aktivite kaybı
Bütün hücreler	Genel	Kofaktöre ihtiyaç duyulmaması	Pahalı donanım Büyük hacimlerle çalışma zorluğu Düşük konsantrasyon toleransı sebebi ile düşük verim
	Büyüyen kültür	Yüksek aktivite	Yüksek yan ürün verme Çok miktarda biyokütle gelişmesi Yan ürün fazlalığı Proses kontrol güçlüğü
	Durağan hücreler	Çalışma kolaylığı Az yan ürün oluşumu	Düşük aktivite
	İmmobilize olmuş hücreler	Hücrenin yeniden kullanılabilirliği	Düşük aktivite

Mikrobiyal hücreler spesifik olmayan enzim sistemleri ile hem doğal hem de sentetik olan çok sayıdaki farklı substrat üzerinde pek çok farklı kimyasal reaksiyonları gerçekleştirebilmektedir [7].

Mikrobiyal biyotransformasyonların çoğu klasik sentez yöntemlerine göre oda sıcaklığı ve 1 atm basınç altındaki basınçlar gibi çok daha ılıman şartlarda gerçekleşir [8].

Mikrobiyal biyotransformasyonlar klasik sentez yöntemlerine göre daha ucuza ve daha kısa sürede gerçekleştirilir. Mikrobiyal biyotransformasyonlar sayesinde hedef bileşikler, genellikle oldukça yüksek verimlerde, daha kısa süreler içerisinde, kimyasal reaktiflere göre çok daha ucuza mal edilen besiyeri bileşenleri ve mikroorganizmalar kullanılarak elde edilebilmektedir [7,8].

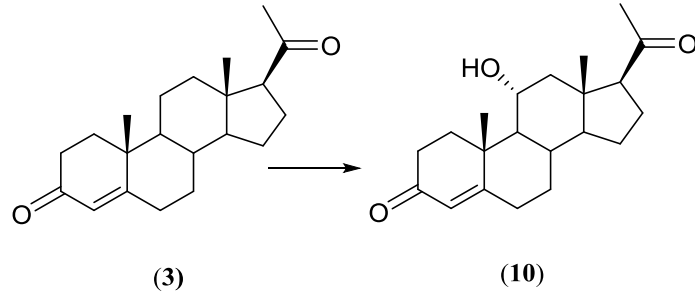
Çevreye büyük zararlar veren klasik sentez yöntemlerinde kullanılan reaktiflerin aksine mikrobiyal biyotransformasyonlar çevre dostudur [7].

Mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonları enzimler tarafından gerçekleştirildikleri için enantioseçicidir. Hedef moleküller klasik sentez yöntemleri ile çoğu zaman ayrılmaları oldukça zor olan rasemik karışımlar ile sonuçlanır. Özellikle ilaç etken maddelerinin sentezinde yalnızca hedeflenen enantiyomeri elde edilebilmesi son derece önemlidir. Günümüzde tek enantiyomerin seçimli sentezi için mikroorganizmaların kullanılmaları gittikçe yaygınlaşmaktadır [8].

Klasik kimyasal sentez yöntemlerinin aksine biyotransformasyon reaksiyonlarında kullanılan mikroorganizmaların sahip oldukları enzimlerin regioseçici olmaları sebebi ile mikrobiyal biyotransformasyonlar esnasında substratlar üzerindeki diğer fonksiyonel grupların korunmasına gerek kalmaz [7,8].

Klasik kimyasal sentez yöntemlerinin aksine substrattaki mikrobiyal biyotransformasyonların gerçekleşeceği yerin civarında çoğu zaman belirli bir fonksiyonel grubun bulunmasına gerek yoktur. Örneğin, mikrobiyal hidroksilasyonlar fonksiyonel grupların uzağında meydana gelir [7].

Çoğu klasik sentez yöntemlerine karşılık gelen reaksiyonlar mikroorganizmalar kullanılarak da gerçekleştirilebilmektedir. Buna ilaveten mikrobiyal hidroksillenmeler (hidroksilasyonlar) gibi bazı mikrobiyal biyotransformasyonlar, klasik sentez yöntemleri ile tek basamakta bile gerçekleştirilemezler. Mikrobiyal hidroksillenmeler biyotransformasyon reaksiyonlarının en yaygın ve önemli olanlarından [8]. Mikrobiyal hidroksillenmeler ilk olarak iltihap giderici olarak kullanılan kortikosteroidlerin sentezine yönelik çalışmalarda gözlenmiştir. Bu steroidlerin sentezinde, herhangi bir fonksiyonel gruptan çok uzakta bulunan C-11 pozisyonuna bir oksijen yerleştirilmesi, klasik sentez yöntemleri ile oldukça uzun ve pahalı bir işlem olmasına rağmen bu reaksiyonun bir basamakta *Rhizopus arrhizus* küfü kullanılarak yüksek verimli bir 11-hidroksillenmesi ile gerçekleştirilebilmesi dikkatleri mikrobiyal biyotransformasyonlar üzerine çekmiştir. Söz konusu reaksiyon sayesinde (Şekil 2.1) progesteron (3) mikrobiyal hidroksillenme ile 11 α -hidroksiprogesteron (10) bileşiğine dönüştürülmüştür [7].



Şekil 2.1. *R. arrhizus* ile progesteron (3) biyotransformasyonu

Günümüze kadar çok sayıda farklı mikroorganizma türü mikrobiyal biyotransformasyonlar için serbest veya uygun yüzeylere sabitlenmiş olarak kullanılmıştır ve halen kullanılmaktadır. Mikrobiyal biyotransformasyonlar için genelde bakteriler, küfler ve mayalar kullanılmaktadır [9].

2.4. Küfler ile Steroid Biyotransformasyonları

Steroidlerin küfler ile biyotransformasyonları fungal biyotransformasyonların yüksek regio ve stereoseçicilikleri sebebi ile steroid ilaçlar ve hormonlar gibi çok daha önemli ve fonksiyonlu bileşiklerin üretimi için halen yaygın olarak kullanılmaktadır

[10,14]. Bilinen mikrobiyal biyotransformasyonların verimlerini artırmaya, kullanılabilir yeni mikroorganizmalar ve reaksiyonlar elde etmeye yönelik çalışmalar aralıksız olarak sürdürülmektedir [10].

Günümüze kadar androstendion (5) bileşiğinin çok sayıda farklı küf türleri ile biyotransformasyonları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarından Baeyer-Villiger oksidasyonları, mikrobiyal hidrosillenmeler ile steran halkasının farklı kısımlarına hidroksil gruplarının eklenmesi, mikrobiyal hidrosillenmeler 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 [10,14].

2.4.1. *Cladosporium sphaerospermum*

Cladosporiaceae familyasına dahil olan *Cladosporium* askomiset mantarlarının yaygın ve önemli bir cinsidir [15]. Dünyanın her yerinde yayılım gösteren *Cladosporium* türleri genelde hava, gıda, bitkiler, boya ve elbiselerden izole edilirler [15,16]. Yaygın endofitler ve bitki patojenleri olan bu türler diğer mantarların parazitleri bile olabilmektedir [15]. Bazı *Cladosporium* türlerinin insan ve hayvanlar için bile patojen olduğu bilinmektedir [17].

Cladosporium sphaerospermum türü yeryüzünde geniş dağılım gösteren, yüksek tuz derişimleri ve ozmotik basınca dayanıklı bir küftür [18]. *C. sphaerospermum* çoğu zaman iç ve dış mekanlardan [19,20], insanlar [21] ve bitkilerden [22] izole edilir. Literatürde *C. sphaerospermum* ile gerçekleştirilmiş sadece bir steroid biyotransformasyonu çalışması bulunmaktadır [23]. Bu çalışmada *C. sphaerospermum* MRC küfü 70266 17 β -hidroksiandro-4-en-3-on (6) bileşiğinin çoğunu C-6 β pozisyonunda hidrosillerken, C-17'de bir oksidasyon, bir 5 α -indirgenmesi, C-7 β , C-12 β , C-15 α ve C-16 β pozisyonlarında diğer bazı hidrosillenmeler de gözlenmiştir.

2.4.2. *Ulocladium chartarum*

Askomiset mantarlarının önemli ve yaygın bir diğer cinsine ait olan *Ulocladium* türleri farklı dağılımlara ve rollere sahip küflerdir. *Ulocladium* türlerinin çoğu safrofit olarak yaşarken, bazıları bitki hastalıklarına, bazıları ise gıdalarda bozulmalara yol açarlar. Bazı *Ulocladium* türleri ise önemli enzim kaynakları ve biyokontrol ajanları olarak kullanılmaktadır [24].

Ulocladium cinsinin yaygın bir üyesi olan *Ulocladium chartarum* daha çok iç mekanlarda gözlenen bir küftür [24]. Literatürde *U. chartarum* ile gerçekleştirilmiş sadece bir steroid biyotransformasyonu çalışması bulunmaktadır [25]. Söz konusu bu çalışmada *U. chartarum* MRC 72584 küfü 17 β -hidroksiandrost-4-en-3-on (6) bileşiği üzerinde C-6 β , C-7 β , C-14 α ve C-12 β pozisyonlarında hidroksillenmeler, bir 5 α -indirgenmesi ve C-6 ve C-17'de oksidasyonlar gerçekleştirmiştir.

2.5. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada *Cladosporium sphaerospermum* ve *Ulocladium chartarum* küflerinde androstendion (5) bileşiğinin nasıl metabolize edildiğini görmek için substratın söz konusu küfler ile 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.

Androstendion (5) 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 hazırlamak 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 agarbesiyerleri hazırlandı.

3.3. Küf Kültürlerinin Hazırlanması

Oda sıcaklığında 15 gün süresince çoğalmaya bırakılmak üzere, stok fungal kültüründeki küflerin bir kısmı yatık agarbesiyerlerinin 3 tanesine steril koşullarda aktarıldı. 15 günde bir 3 yeni yatık agarbesiyerine 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 [26].

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 androstendion (5) (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.

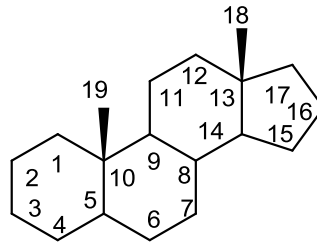
3.6. Metabolitlerin Saflaştırılması ve Yapılarının Tayini

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

Androstendion (**5**) 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, ¹³C NMR ve IR spektrumları karşılaştırıldı. Biyotransformasyonu gerçekleştirilen androstendion (**5**) bileşiğinin karbon iskeleti numaralandırılması Şekil 4.1.'deki gibidir.



Şekil 4.1. Substratın karbon iskeleti

Androstendion (**5**) (1 g) bileşiğinin *C. sphaerospermum* MRC 70266 ile 27°C'de 5 gün süren inkübasyonu sonrasında elde edilen yağimsı madde (2021 mg) ile gerçekleştirilen kolon kromatografisi çalışmasından değişime uğramayan başlangıç maddesi (115 mg) ile 17β-hidroksiandrost-4-en-3-on (**6**) (%2), 5α-androstan-3,6,17-trion (**11**) (%3), 6β-hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**12**) (%37), 17β-hidroksiandrost-4-en-3,16-dion (**13**) (%5), 6β,17β-dihidroksiandrost-4-en-3-on (**14**) (%6), 15α-hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**15**) (%4) ve 6β,17β-dihidroksiandrost-4-en-3,16-dion (**16**) (%3) bileşikleri elde edildi (Şekil 4.2.).

17β-Hidroksiandrost-4-en-3-on (**6**), (20 mg, %2)

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

Erime noktası: 151-152°C, lit., 1151-153°C [27].

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3200, 1650 ve 1620.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ_{H} 0,80 (3H, s, 18-H); 1,18 (3H, s, 19-H); 3,65 (1H, t, $J = 8,5$ Hz, 17 α -H); 5,72 (1H, s, 4-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ_{C} 199,75 (C-3); 171,50 (C-5); 123,75 (C-4); 81,51 (C-17); 53,78 (C-9); 50,36 (C-14); 42,71 (C-13); 38,58 (C-10); 36,30 (C-12); 35,60 (C-8); 35,54 (C-1); 33,87 (C-2); 32,73 (C-6); 31,42 (C-7); 30,29 (C-16); 23,25 (C-15); 20,54 (C-11); 17,32 (C-19); 11,00 (C-18).

5 α -Androstan-3,6,17-trion (**11**), (32 mg, %3)

%40'lık çözügen sistemiyle elüsyon neticesinde etil asetatın yassı pulcuklar şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 193-194°C, lit., 196-197°C [28].

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 1745, 1715 ve 1700.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ_{H} 0,90 (3H, s, 18-H); 0,98 (3H, s, 19-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ_{C} 219,46 (C-17); 210,74 (C-3); 208,10 (C-6); 57,51 (C-5); 53,48 (C-9); 51,50 (C-14); 48,05 (C-13); 45,30 (C-7); 41,16 (C-4); 37,97 (C-10); 37,43 (C-1); 37,26 (C-8); 36,88 (C-2); 35,58 (C-16); 31,06 (C-12); 21,63 (C-15); 20,92 (C-11); 13,78 (C-18); 12,58 (C-19).

6 β -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**12**), (391 mg, %37)

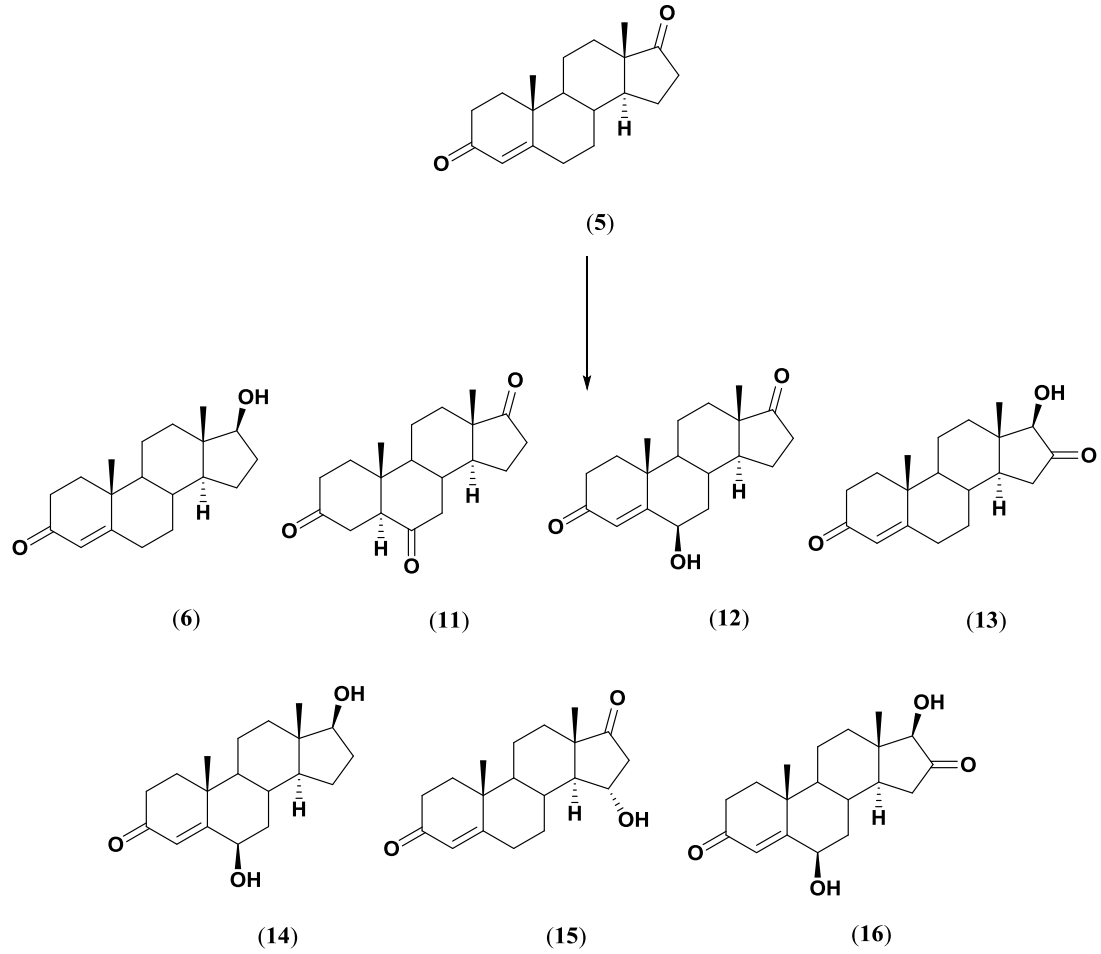
%50'lik çözügen sistemiyle elüsyon neticesinde asetonun prizmalar şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 191-192°C, lit., 190-193°C [29].

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

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ_{H} 0,92 (3H, s, 18-H); 1,38 (3H, s, 19-H); 4,37 (1H, bs, 6 α -H); 5,79 (1H, s, 4-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ_{C} 220,88 (C-17); 200,63 (C-3); 168,41 (C-5); 126,05 (C-4); 72,22 (C-6); 53,40 (C-9); 50,63 (C-14); 47,49 (C-13); 37,83 (C-10); 37,04 (C-7); 36,80 (C-1); 35,63 (C-16); 33,96 (C-2); 31,02 (C-12); 29,20 (C-8); 21,91 (C-15); 20,05 (C-11); 19,30 (C-19); 13,59 (C-18).



Şekil 4.2. Substratın *C. sphaerospermum* ile biyotransformasyonu

17 β -Hidroksiandrost-4-en-3,16-dion (**13**), (53 mg, %5)

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

Erime noktası: 156-157°C, lit., 153-154°C [30].

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3455, 1760, 1675 ve 1620.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ_{H} 0,77 (3H, s, 18-H); 1,22 (3H, s, 19-H); 3,76 (1H, bs, 17 α -H); 5,75 (1H, s, 4-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ_{C} 216,52 (C-16); 199,32 (C-3); 169,99 (C-5); 124,19 (C-4); 86,11 (C-17); 53,65 (C-9); 44,47 (C-14); 42,39 (C-13); 38,65 (C-10); 36,19 (C-12); 35,48 (C-1); 35,36 (C-15); 34,48 (C-8); 33,85 (C-2); 32,45 (C-6); 31,79 (C-7); 20,27 (C-11); 17,35 (C-19); 11,33 (C-18).

6 β ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (**14**), (64 mg, %6)

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

Erime noktası: 222-223°C, lit., 215-220°C [29].

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3500, 1655 ve 1630.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ_{H} 0,82 (3H, s, 18-H); 1,37 (3H, s, 19-H); 3,64 (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): δ_{C} 200,72 (C-3); 168,73 (C-5); 126,17 (C-4); 81,58 (C-17); 72,76 (C-6); 53,60 (C-9); 50,34 (C-14); 42,81 (C-13); 37,97 (C-12); 37,90 (C-10); 36,97 (C-7); 36,29 (C-1); 34,14 (C-2); 30,31 (C-16); 29,68 (C-8); 23,20 (C-15); 20,50 (C-11); 19,46 (C-19); 11,07 (C-18).

15 α -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**15**), (43 mg, %4)

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

Erime noktası: 203-204 °C, lit., 193,5-195°C [31].

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3430, 1730, 1670 ve 1620.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ_{H} 0,95 (3H, s, 18-H); 1,22 (3H, s, 19-H); 4,40 (1H, m, 15 β -H); 5,74 (1H, s, 4-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ_{C} 215,77 (C-17); 199,35 (C-3); 170,26 (C-5); 123,93 (C-4); 70,31 (C-15); 57,38 (C-14); 53,66 (C-9); 50,50 (C-13); 46,25 (C-16); 38,63 (C-10); 35,68 (C-1); 35,41 (C-8); 33,86 (C-2); 32,59 (C-6); 31,91 (C-12); 31,26 (C-7); 20,21 (C-11); 17,47 (C-19); 15,31 (C-18).

6 β ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3,16-dion (**16**), (33 mg, %3)

%80'lik çözügen sistemiyle elüsyon neticesinde etil asetatın iğneler şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 222-224°C.

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3455, 1760 ve 1665.

Elementel analiz: $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_4$ için %71,67 C ve %8,23 H hesaplanırsa da %71,49 C ve %8,10 H gözlemlendi.

¹H NMR (CDCl₃): δ_H 0,77 (3H, s, 18-H); 1,38 (3H, s, 19-H); 3,76 (1H, bs, 17α-H); 4,34 (1H, bs, 6α-H); 5,82 (1H, s, 4-H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ_C 216,79 (C-16); 200,54 (C-3); 168,4 (C-5); 126,28 (C-4); 86,09 (C-17); 72,31 (C-6); 53,37 (C-9); 44,37 (C-14); 42,37 (C-13); 38,20 (C-10); 38,01 (C-7); 36,72 (C-1); 36,07 (C-12); 35,38 (C-15); 34,02 (C-2); 28,69 (C-8); 20,14 (C-11); 19,43 (C-19); 11,37 (C-18).

Androstendion (**5**) (1 g) bileşiğinin *U. chartarum* MRC 72584 ile 28°C'de 5 gün süren inkübasyonu sonrasında elde edilen yağimsı madde (1987 mg) ile gerçekleştirilen kolon kromatografisi çalışmasından değişmeyen başlangıç maddesi (123 mg) ile 5α-androstan-3,6,17-trion (**11**) (%13), 17β-hidroksi-5α-androstan-3,6-dion (**17**) (%3), 14α-hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**18**) (%14), 7β-hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**19**) (%18) ve 7α-hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**20**) (%10) bileşikleri elde edildi (Şekil 4.3.).

5α-Androstan-3,6,17-trion (**11**), (137 mg, %13)

%40'lık çözen sistemiyle elüsyon neticesinde elde edildi ve ¹H ile ¹³C NMR spektrumlarının aynı substratın daha önce *C. sphaerospermum* MRC 70266 ile inkübasyonundan izole edilen metabolite ait ¹H ile ¹³C NMR spektrumları ile karşılaştırılması neticesinde yapısı belirlendi.

17β-Hidroksi-5α-androstan-3,6-dion (**17**), (32 mg, %3)

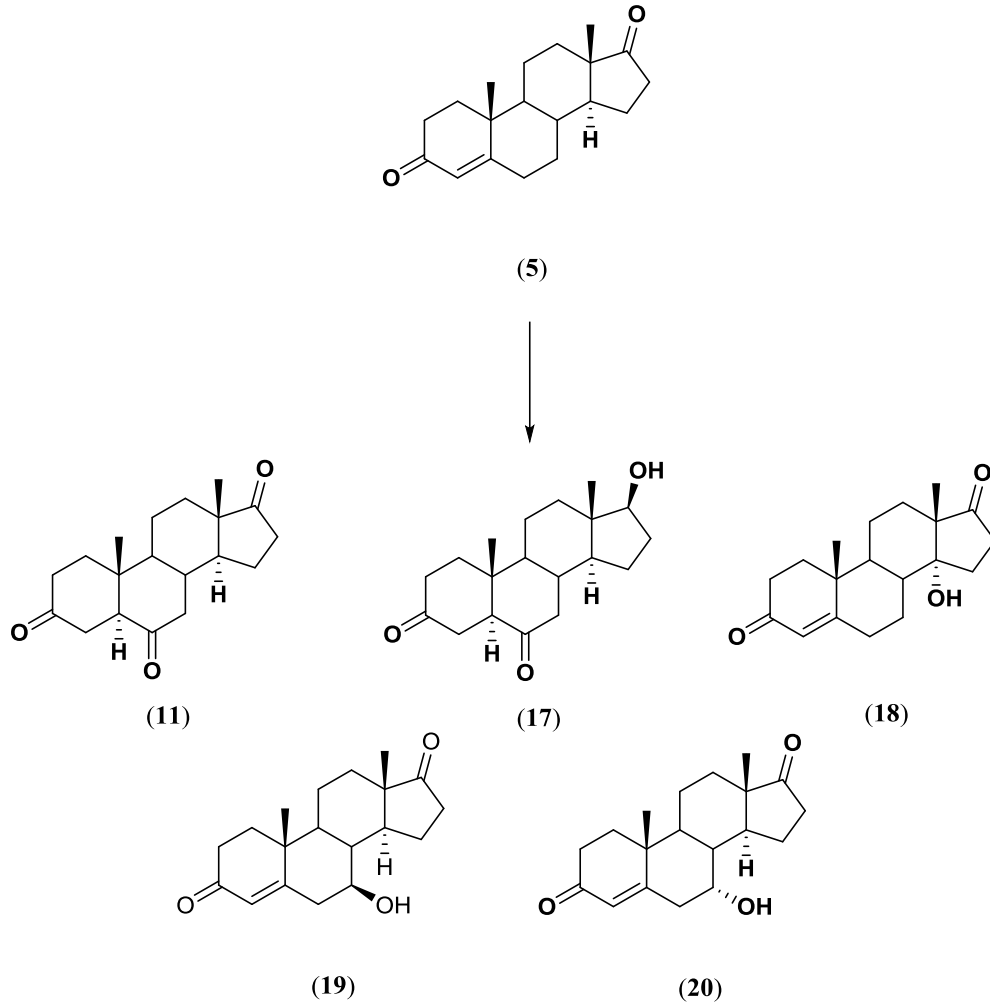
%50'lik çözen sistemiyle elüsyon neticesinde asetonan iğneler şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 229-230°C, lit., 230-231°C [28].

IR (ν_{max}/cm⁻¹): 3545 ve 1720.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ_H 0,81 (3H, s, 18-H); 1,01 (3H, s, 19-H); 3,66 (1H, t, *J* = 8,5 Hz, 17α-H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ_C 211,37 (C-3); 208,87 (C-6); 81,14 (C-17); 57,32 (C-5); 53,30 (C-9); 51,05 (C-14); 45,92 (C-7); 43,29 (C-13); 41,10 (C-4); 37,88 (C-1); 37,88 (C-10); 37,20 (C-2); 36,81 (C-12); 36,01 (C-8); 30,02 (C-16); 23,03 (C-15); 21,16 (C-11); 12,45 (C-19); 11,01 (C-18).



Şekil 4.3. Substratın *U. chartarum* ile biyotransformasyonu

14 α -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**18**), (148 mg, % 14)

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

Erime noktası: 256-257°C, lit., 255-260°C [29].

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3420, 1735, 1665 ve 1615.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ_{H} 0,99 (3H, s, 18-H); 1,21 (3H, s, 19-H); 5,73 (1H, s, 4-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ_{C} 218,64 (C-17); 199,61 (C-3); 170,39 (C-5); 123,84 (C-4); 80,38 (C-14); 52,46 (C-13); 46,60 (C-9); 38,51 (C-10); 38,51 (C-8); 37,79 (C-1); 35,49 (C-12); 33,73 (C-2); 32,98 (C-6); 32,23 (C-7); 29,97 (C-16); 24,33 (C-15); 18,98 (C-11); 17,68 (C-19); 17,15 (C-18).

7 β -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**19**), (189 mg, %18)

%60'lık çözücü sistemiyle elüsyon neticesinde aseton dan yassı pulcuklar şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 222-223°C, lit., 218-220°C [32].

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3460, 1675 ve 1625.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ_{H} 0,94 (3H, s, 18-H); 1,24 (3H, s, 19-H); 3,58 (1H, m, 7 α -H); 5,77 (1H, s, 4-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ_{C} 220,60 (C-17); 199,12 (C-3); 166,54 (C-5); 125,02 (C-4); 74,28 (C-7); 50,72 (C-9); 50,45 (C-14); 48,00 (C-13); 42,65 (C-8); 42,49 (C-6); 38,01 (C-10); 35,89 (C-16); 35,59 (C-1); 33,86 (C-2); 31,16 (C-12); 24,95 (C-15); 20,32 (C-11); 17,33 (C-18); 13,93 (C-19).

7 α -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**20**), (106 mg, %10)

%60'lık çözücü sistemiyle elüsyon neticesinde metanolden iğneler şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 236-237°C, lit., 227-230°C [32].

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3400, 1740, 1660 ve 1615.

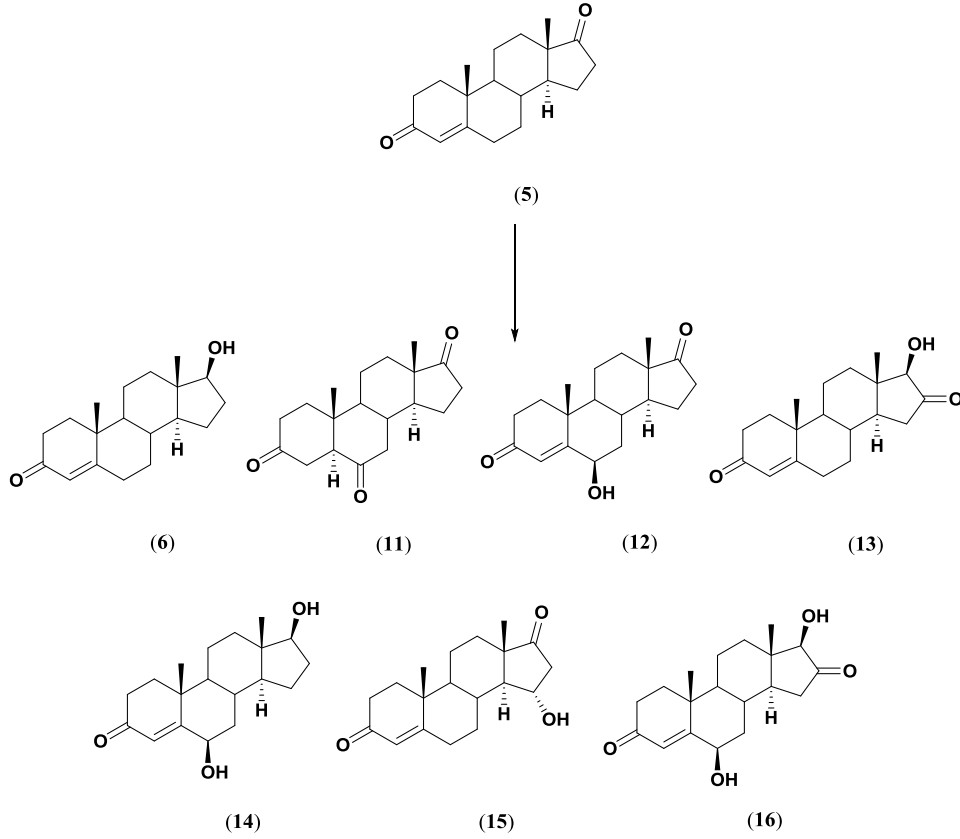
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ_{H} 0,97 (3H, s, 18-H); 1,25 (3H, s, 19-H); 4,15 (1H, m, 7 β -H); 5,85 (1H, s, 4-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ_{C} 220,29 (C-17); 198,68 (C-3); 166,74 (C-5); 127,16 (C-4); 67,10 (C-7); 47,29 (C-13); 45,62 (C-14); 45,36 (C-9); 40,77 (C-8); 39,30 (C-6); 38,52 (C-10); 35,67 (C-16); 35,38 (C-1); 33,87 (C-2); 30,92 (C-12); 21,24 (C-15); 20,12 (C-11); 16,98 (C-19); 13,47 (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, androstendion (5) ve söz konusu bileşiklerin erime noktaları, ^1H NMR, ^{13}C NMR ve IR spektrumları karşılaştırıldı.

Androstendion (5) bileşiğinin *C. sphaerospermum* MRC 70266 ile beş gün inkübasyonu yedi metabolit verdi (Şekil 5.1.).



Şekil 5.1. Substratın *C. sphaerospermum* ile biyotransformasyonu

İlk metabolit 17 β -hidroksiandrost-4-en-3-on (**6**) olarak tanımlandı. Metabolitin ¹³C NMR spektrumunun (Tablo 5.1.) substratın δ_C 220,45 ppm'deki C-17 rezonansını vermeyip δ_C 81,51 ppm'de yeni bir karbon atomu rezonansı vermesi 17 β -hidroksil grubunun varlığını düşündürdü. Metabolitin ¹H NMR spektrumunun δ_H 3,65 ppm'de yeni bir rezonans (1H, t, $J = 8,5$ Hz) vermesi 17 β -hidroksil grubunun varlığını doğruladı. Metabolitin NMR değerleri literatürle uyum gösterdi [27].

İkinci metabolit 5 α -androstan-3,6,17-trion (**11**) olarak tanımlandı. Metabolitin ¹H NMR spektrumunun substratın δ_H 5,75 ppm'deki 4-H rezonansını (1H, s) vermemesi A halkasındaki çift bağın indirgendiğini gösterdi. Metabolit ¹³C NMR spektrumunun literatürdekiler ile karşılaştırılması substrata ait α,β -doymamış sisteminin α -yüzünden indirgendiğini gösterdi [33]. Metabolitin ¹³C NMR spektrumunun substratın δ_C 32,53 ppm'deki C-6 rezonansını vermeyip δ_C 208,10 ppm'de yeni bir rezonans vermesi C-6'da önce bir hidrosillenmenin gerçekleştiğini daha sonra ise hidroksil grubunun bir ketona yükseltgendiğini gösterdi. Metabolitin NMR değerleri mevcut literatür değerleriyle yüksek benzerlik gösterdi [33].

Üçüncü metabolit 6 β -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**12**) olarak tanımlandı. Metabolitin NMR spektrumları δ_H 4,37 ppm (1H, bs) ve δ_C 72,22 ppm'de bir 6 β -hidroksil grubu için karakteristik olan iki yeni rezonans verdi [29]. Metabolitin ¹³C NMR spektrumunun C-7 için aşağı alana doğru bir kayma ($\Delta\delta_C$ 5,81 ppm) gösterirken C-14 için ise yukarı alana doğru bir kayma ($\Delta\delta_C$ 5,91 ppm) göstermesi bir 6 β -hidroksil grubu varlığını doğruladı. Metabolitin NMR değerleri literatür değerleriyle uyum gösterdi [29].

Dördüncü metabolit 17 β -hidroksiandrost-4-en-3,16-dion (**13**) olarak tanımlandı. Metabolit ¹³C NMR spektrumunun substratın δ_C 220,45 ppm'deki C-17 rezonansının yerine δ_C 86,11 ppm'de yeni bir karbon atomu rezonansı vermesi 17 β -hidroksil grubunun varlığını düşündürdü. Metabolitin ¹³C NMR spektrumu substratın δ_C 35,72 ppm'deki C-16 rezonansını vermeyip δ_C 216,52 ppm'de yeni bir karbon atomu rezonansı vermesi ise C-16'da bir karbonil grubu varlığını gösterdi. Metabolit ¹H NMR spektrumunun δ_H 3.76 ppm'de karakteristik geniş bir singlet vermesi C-

16'daki karbonil grubu komşuluğundaki bir 17 β -hidroksil grubunun varlığını gösterdi [34,35]. Tüm bu sonuçlar C-17'de bir indirgenmenin C-16'da ise hidroksillenmeyi takiben bir yükseltgenmenin gerçekleştiğini gösterdi. Metabolitin NMR değerleri literatür değerleriyle uyum gösterdi [34,35].

Beşinci metabolit 6 β ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (**14**) olarak tanımlandı. Metabolitin ¹³C NMR spektrumu ise δ_C 72,76 ppm ve δ_C 81,58 ppm'de sırası ile 6 β - ve 17 β -hidroksil gruplarının varlığını gösteren iki karakteristik rezonans verdi [29]. Metabolitin ¹H NMR spektrumu δ_H 3,64 ppm (1H, t, $J = 8,5$ Hz) ve δ_H 4,36 ppm'de (1H, bs) sırası ile 17 β - ve 6 β -hidroksil gruplarının varlığını daha da belirginleştiren rezonanslar verdi. Metabolitin NMR değerleri literatür değerleriyle oldukça benzerlik gösterdi [29].

Altıncı metabolit 15 α -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**15**) olarak tanımlandı. Metabolitin NMR spektrumları δ_H 4,40 ppm (1H, m) ve δ_C 70,31 ppm'de bir 15 α -hidroksil grubunun varlığını gösteren karakteristik rezonanslar verdi [36]. Metabolitin ¹³C NMR spektrumunun C-14 ve C-16 rezonansları için aşağı alana doğru kaymalar (sırası ile $\Delta\delta_C$ 6,58 ppm ve $\Delta\delta_C$ 10,53 ppm) göstermesi bir 15 α -hidroksil grubu varlığını daha da doğruladı. Metabolitin NMR değerleri literatür değerleriyle uyum gösterdi [36].

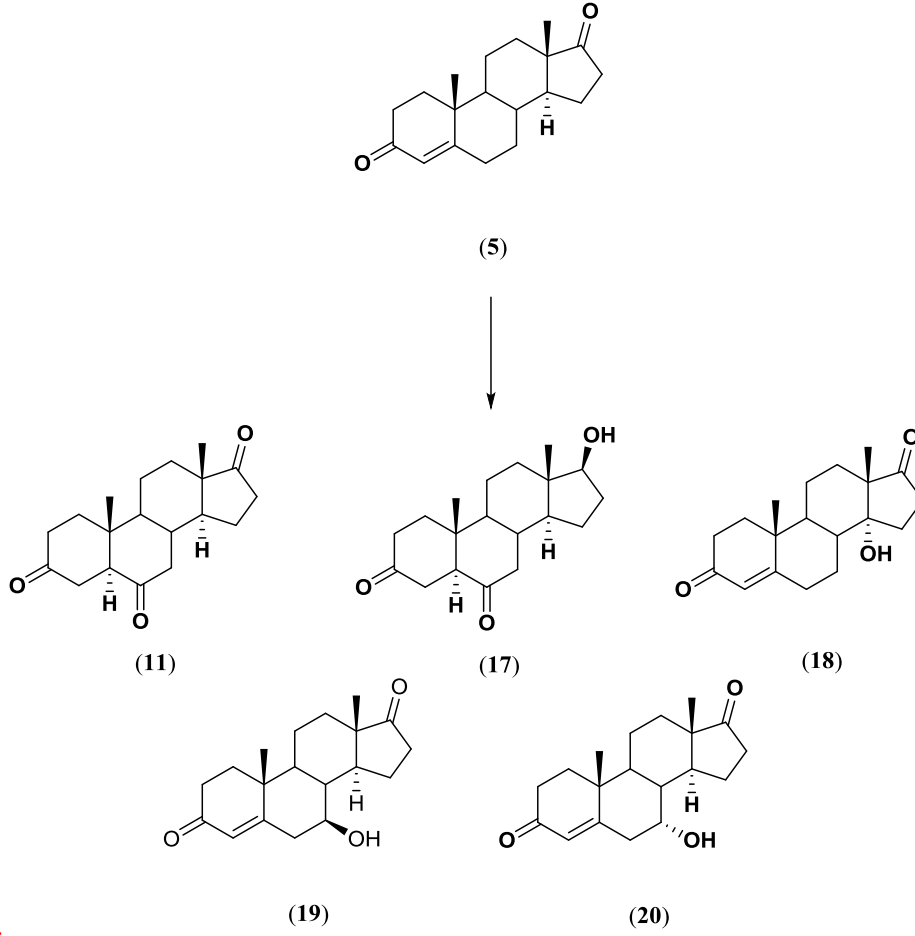
Yedinci metabolit 6 β ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3,16-dion (**16**) olarak belirlendi. Metabolitin ¹³C NMR spektrumu bir 6 β -hidroksil grubunun varlığını gösteren karakteristik rezonansı δ_C 72,31 ppm'de verdi [29]. Metabolitin ¹³C NMR spektrumunun substratın δ_C 220,45 ppm'deki C-17 rezonansını vermeyip δ_C 86,09 ppm'de yeni bir rezonans vermesi ise bir 17 β -hidroksil grubunun varlığını gösterdi. Buna ilaveten metabolitin ¹³C NMR spektrumunun δ_C 216,79 ppm'de yeni bir rezonans vermesi D halkasında bir karbonil grubunun varlığını gösterdi. Metabolitin ¹H NMR spektrumunun δ_H 3,76 ppm'de verdiği karakteristik geniş singlet ise C-16'daki karboni grubunun komşuluğundaki bir 17 β -hidroksil grubunun varlığını gösterdi [34,35]. Bu sonuçlar C-16'daki hidroksillenmeyi takibeden bir oksidasyonun, C-17'de ise bir indirgenmenin gerçekleştiğini gösterdi. Metabolite ait

DEPT spektrumunun iki metil, altı metilen, altı metin ve beş kuarterner karbon rezonansları vermesi tanımlanan triolün kimyasal yapısıyla uyum gösterdi. 6 β ,17 β -Dihidroksiandroster-4-en-3,16-dion (**16**) yeni bir bileşik olarak belirlendi.

Tablo 5.1. Androstendion (**5**) ve bazı metabolitleri için ^{13}C NMR değerleri

C atomu	(5)	(6)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)
1	35,66	35,54	37,43	36,80	35,48	36,29	35,68	36,72
2	33,88	33,87	36,88	33,96	33,85	34,14	33,86	34,02
3	199,35	199,75	210,74	200,63	199,32	200,72	199,35	200,54
4	124,12	123,75	41,16	126,05	124,19	126,17	123,93	126,28
5	170,34	171,50	57,51	168,41	169,99	168,73	170,26	168,04
6	32,53	32,73	208,10	72,22	32,45	72,76	32,59	72,31
7	31,23	31,42	45,30	37,04	31,79	36,97	31,26	38,01
8	35,11	35,60	37,26	29,20	34,48	29,68	35,41	28,69
9	53,78	53,78	53,48	53,40	53,65	53,60	53,66	53,37
10	38,60	38,58	37,97	37,83	38,65	37,90	38,63	38,20
11	20,27	20,54	20,92	20,05	20,27	20,50	20,21	20,14
12	30,71	36,30	31,06	31,02	36,19	37,98	31,91	36,07
13	47,48	42,71	48,05	47,49	42,39	42,81	50,50	42,37
14	50,80	50,36	51,50	50,63	44,47	50,34	57,38	44,37
15	21,72	23,25	21,63	21,51	35,36	23,20	70,31	35,38
16	35,72	30,29	35,58	35,63	216,52	30,31	46,25	216,79
17	220,45	81,51	219,46	220,88	86,11	81,58	215,77	86,09
18	13,67	11,00	13,78	13,59	11,33	11,07	15,31	11,37
19	17,34	17,32	12,58	19,30	17,35	19,46	17,47	19,43

Androstendion (**5**) bileşiğinin *U. chartarum* MRC 72584 ile 5 gün süren inkübasyonu, beş metabolit verdi (Şekil 5.2.). İlk metabolit ^1H ile ^{13}C NMR spektrumlarının aynı substratın daha önce *C. sphaerospermum* MRC 70266 ile inkübasyonundan izole edilen metabolite ait ^1H ile ^{13}C NMR spektrumları ile karşılaştırılması neticesinde 5 α -androsteran-3,6,17-trion (**11**) olarak tanımlandı.



Şekil 5.2. Substratın *U. chartarum* ile biyotransformasyonu

İkinci metabolit 17 β -hidroksi-5 α -androstan-3,6-dion (17) olarak tanımlandı. Metabolitin ^1H NMR spektrumunun substratın δ_{H} 5,75 ppm'deki 4-H rezonansını (1H, s) içermemesi A halkasındaki çift bağın indirgendiğini gösterdi. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumunda (Tablo 5.2.) substratın δ_{C} 32,53 ppm'deki C-6 rezonansını vermeyip δ_{C} 208,87 ppm'de yeni bir rezonans vermesi neticesinde C-6'da önce bir hidroksillenmenin gerçekleştiğini daha sonra ise oluşan hidroksil grubunun bir karbonil grubuna yükseltildiği anlaşıldı. Metabolit NMR spektrumlarının δ_{H} 3,66 ppm (1H, t, $J = 8,5$ Hz) ve δ_{C} 81,14 ppm'de diğer yeni rezonansları vermesi ise C-17'deki karbonil grubunun bir 17 β -hidroksil grubuna indirgendiği gösterdi. Metabolitin NMR değerlerinin literatür ile uyumlu olduğu belirlendi [33].

Üçüncü metabolit 14 α -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**18**) olarak tanımlandı. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu δ_{C} 80,38 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 için aşağı alana doğru bir kayma ($\Delta\delta_{\text{C}}$ 3,40 ppm) ile C-16 için yukarı alana doğru bir kayma ($\Delta\delta_{\text{C}}$ 5,75 ppm) göstermesi tersiyer hidroksil grubunun C-14'de olduğunu gösterdi. Hidroksil grubunun pozisyon ve konfigürasyonu NMR spektrumlarının literatür ile karşılaştırılması ile belirlendi [29].

Tablo 5.2. Androstendion (**5**) ve diğer bazı metabolitleri için ^{13}C NMR değerleri

C atomu	(5)	(17)	(18)	(19)	(20)
1	35,66	37,88	37,79	35,59	35,38
2	33,88	37,20	33,73	33,86	33,87
3	199,35	211,37	199,61	199,12	198,68
4	124,12	41,10	123,84	125,02	127,16
5	170,34	57,32	170,39	166,54	166,74
6	32,53	208,87	32,98	42,49	39,30
7	31,23	45,92	32,23	74,28	67,10
8	35,11	36,01	38,51	42,65	40,97
9	53,78	53,30	46,60	50,72	45,36
10	38,60	37,88	38,51	38,01	38,52
11	20,27	21,16	18,98	20,32	20,12
12	30,71	36,81	35,49	31,16	30,92
13	47,48	43,29	52,46	48,00	47,29
14	50,80	51,05	80,38	50,45	45,62
15	21,72	23,03	24,33	24,95	21,24
16	35,72	30,02	29,97	35,89	35,67
17	220,45	81,14	218,64	220,60	220,29
18	13,67	11,01	17,15	17,33	13,47
19	17,34	12,45	17,68	13,93	16,98

Dördüncü metabolit 7 β -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**19**) olarak tanımlandı. Metabolitin NMR spektrumları δ_{H} 3,58 ppm (1H, m) ve δ_{C} 74,28 ppm'de bir 7 β -hidroksil grubunun varlığına işaret eden karakteristik rezonanslar verdi [32]. Metabolit ^{13}C NMR spektrumunun C-8 için aşağı alana doğru bir kayma ($\Delta\delta_{\text{C}}$ 7,54

ppm) gösterirken C-9 için ise yukarı alana doğru bir kayma ($\Delta\delta_C$ 3,06 ppm) göstermesi bir 7 β -hidroksil grubunun varlığına daha da belirginleştirdi. Metabolitin NMR değerlerinin literatürdeki değerler ile uyumlu olduğu tespit edildi [32].

Beşinci metabolit 7 α -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**20**) olarak tanımlandı. Metabolitin NMR spektrumları δ_H 4,15 ppm (1H, m) ve δ_C 67,10 ppm'de bir 7 α -hidroksil grubunun varlığına işaret eden karakteristik rezonanslar verdi [32]. Metabolit ^{13}C NMR spektrumunun C-8 için aşağı alana doğru bir kayma ($\Delta\delta_C$ 5,86 ppm) gösterirken C-9 için ise yukarı alana doğru bir kayma ($\Delta\delta_C$ 8,42 ppm) göstermesi bir 7 α -hidroksil grubunun varlığına daha da netleştirdi. Metabolitin NMR değerlerinin literatürdeki değerler ile uyumlu olduğu tespit edildi [32].

Tablo 5.3.'den de anlaşılacağı gibi *C. sphaerospermum* MRC 70266 küfü androstendionu (**5**) ağırlıklı olarak C-6 β pozisyonunda hidroksillerken C-15 α pozisyonunda bir diğer hidroksillenme, C-17'de bir oksidasyon, bir 5 α -indirgenmesi ile C-6 and C-16 pozisyonlarındaki hidroksillenmeleri takiben gerçekleşen oksidasyonlarda gözlemlendi. Buna rağmen yakın zamandaki bir çalışmada *C. sphaerospermum* MRC küfü 70266 17 β -hidroksiandrost-4-en-3-on (**6**) bileşimini daha farklı bir şekilde metabolize etti [23]. Aynı küf 17 β -hidroksiandrost-4-en-3-on (**6**) bileşiminin çoğunu C-6 β pozisyonunda hidroksillerken, C-17'de bir oksidasyon, bir 5 α -indirgenmesi, C-7 β , C-12 β , C-15 α ve C-16 β pozisyonlarında diğer bazı hidroksillenmeler de gözlemlendi. Bu sonuçlar *C. sphaerospermum* MRC 70266 küfünün androstendion (**5**) ve 17 β -hidroksiandrost-4-en-3-on (**6**) bileşiklerini androstendion (**5**) bileşiminin yapısında bir 17 β -hidroksil grubu olmaması sebebi ile farklı metabolize edebileceğini ortaya çıkardı. Buna benzer bir sonuç *Fusarium culmorum* küfü ile bazı 4-en-3-okzo steroidlerin biyotransformasyonlarında da gözlenmiştir [37]. Son zamanlardaki bir diğer çalışmada ise farklı bir *Cladosporium* izolatu olan *Cladosporium cladosporioides* MRC 70282 androstendion (**5**) ve 17 β -hidroksiandrost-4-en-3-on (**6**) bileşiklerini *C. sphaerospermum* MRC 70266 küfüne göre daha farklı olarak metabolize etti [38]. *C. cladosporioides* MRC 70282 androstendion (**5**) bileşimini C-17'de indirgeyip C-16 β pozisyonunda hidroksilledikten sonra C-16'da oluşan hidroksil gruplarının çoğu karbonil grubuna

yükseltgendi. Buna ilaveten, C-17’de küçük verimli bir epimerleşme de gerçekleşti. Aynı çalışmada *C. cladosporioides* MRC 70282 küfü 17 β -hidroksiandrost-4-en-3-on (**6**) bileşimini C-16 β pozisyonunda hidroksilledi ve oluşan hidroksil grubunun çoğu daha sonra bir karbonil grubuna yükseltgendi. *C. cladosporioides* MRC 70282 küfü ayrıca aynı substratı C-17’de küçük verimli bir epimerleşme ve yükseltgenmeye de maruz bıraktı.

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

Substrat	Metabolit	% Verim
Androstendion (5)		
	17 β -Hidroksiandrost-4-en-3-on (6)	2
	5 α -Androstan-3,6,17-trion (11)	3
	6 β -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (12)	37
	17 β -Hidroksiandrost-4-en-3,16-dion (13)	5
	6 β ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (14)	6
	15 α -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (15)	4
	6 β ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3,16-dion (16)	3

Tablo 5.4.’den de görülebileceği gibi *U. chartarum* MRC 72584 küfü androstendion (**5**) bileşimini *C. sphaerospermum* MRC 70266 küfüne göre daha farklı metabolize etti. *U. chartarum* MRC 72584 androstendion (**5**) bileşimini üzerinde C-6 β , C-7 α , C-7 β ve C-14 α pozisyonlarında hidroksillenmeler, C-6’daki hidroksillenme sonrasında gerçekleşen bir yükseltgenme, bir 5 α -indirgenmesi ve C-17’de bir indirgenme gerçekleştirdi. Yakın zamandaki bir çalışmada ise *U. chartarum* MRC 72584 küfü 17 β -hidroksiandrost-4-en-3-on (**6**) bileşiği üzerinde C-6 β , C-7 β , C-14 α ve C-12 β pozisyonlarında hidroksillenmeler, bir 5 α -indirgenmesi ve C-6 ve C-17’de oksidasyonlar gerçekleştirdi [25]. Bu sonuçlar *U. chartarum* MRC 72584 küfünün androstendion (**5**) ve 17 β -hidroksiandrost-4-en-3-on (**6**) bileşiklerini androstendion (**5**) bileşiminin yapısında bir 17 β -hidroksil grubu olmaması sebebi ile farklı metabolize edebileceğini düşündürdü.

Tablo 5.4. *U. chartarum* MRC 72584 küf? ile metabolit verimleri

Substrat	Metabolit	% Verim
Androstendion (5)		
	5 α -Androstan-3,6,17-trion (11)	13
	17 β -Hidroksi-5 α -androstan-3,6-dion (17)	3
	14 α -Hidroksiandrosta-4-en-3,17-dion (18)	14
	7 β -Hidroksiandrosta-4-en-3,17-dion (19)	18
	7 α -Hidroksiandrosta-4-en-3,17-dion (20)	10

Literat?rdeki k?fler ile steroid biyotransformasyon ?alışmaları incelendiğinde androstendion (5) bileşiğinin 5 α -indirgenmesi, hidroksillenmelerden sonra hidroksil gruplarında y?kseltgenmeler, C-17'de indirgenme, C-6 β ve C-7 α pozisyonlarındaki hidroksillenmeleri olduk?a yaygındır [10,14]. Buna rağmen bu bileşiğin C-7 β ve C-15 α pozisyonlarındaki hidroksillenmeleri nadiren ger?ekleşir. ?rneğin, *Mucor racemosus* androstendion (5) bileşiğini C-6 β , C-7 α , C-7 β ve C-11 α pozisyonlarında hidroksillerken C-17'de ise bir indirgenme ger?ekleştirdi [39]. *Gongronella butleri* [40] androstendion (5) bileşiğini C-6 β , C-6 α , C-7 α , C-7 β ve C-14 α pozisyonlarında hidroksillerjken *Botryosphaeria obtusa* [41] aynı substratı C-6 β ve C-7 β pozisyonlarında hidroksilledi. Diğer bir ?alışmada, *Gibberella saubineti* androstendion (5) bileşiğini C-6 β ve C-15 α pozisyonlarında hidroksilledi [42]. Son zamanlardaki bir ?alışmada ise *Colletotrichum lini* aynı substratı C-11 α ve C-15 α pozisyonlarında hidroksilledi [43].

Sonuç olarak bu ?alışmada *C. sphaerospermum* MRC 70266 ve *U. chartarum* MRC 72584 k?flerinin androstendion (5) bileşiğini farklı şekillerde metabolize ettikleri g?zlenirken ?alışmalardan elde edilen 6 β ,17 β -dihidroksiandrosta-4-en-3,16-dion (16) yeni bir bileşik olarak tanımlandı. *C. sphaerospermum* MRC 70266, *Ulocladium chartarum* MRC 72584 ve diğer k?fler ile steroid biyotransformasyonlarına y?nelik ?alışmalarımız s?rmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Hanson, J.R., Natural Products: The Secondary Metabolites. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1-2, 2003.
- [2] Clayden, J., Greeves, N., Warren, S., Wothers, P., Organic Chemistry, First edition. Oxford University Press, Oxford, 1413-1414, 2001.
- [3] Mann, J., Chemical Aspects of Biosynthesis, First edition. Oxford University Press, New York, 2-4, 1994.
- [4] Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E.Y., İnsan Biyokimyası. Palme Yayıncılık, 481-495, Ankara, 2002.
- [5] Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ., Biyokimya, Dördüncü baskı. Aktif Yayınevi, 93-188, Erzurum, 2005.
- [6] Malaviya, A., Gomes, J., Rapid Screening and Isolation of a Fungus for Sitosterol to Androstenedione Biotransformation. Applied Biochemistry and Biotechnology, 158, 374-386, 2009.
- [7] Hanson, J. R., An Introduction to Biotransformations in Organic Chemistry. W. H. Freeman and Company, New York, 1-62, 1995.
- [8] Faber, K., Biotransformations in Organic Chemistry, Fifth Edition. Springer-Verlag, Berlin, 1-407, 2003.
- [9] Demain A.L., Small Bugs, Big Business: The Economic Power of the Microbe. Biotechnology Advances, 18, 499-514, 2000.
- [10] Nassiri-Koopaei N., Faramarzi M.A., Recent developments in the fungal transformation of steroids. Biocatal Biotransform 33:1-28, 2015.
- [11] Bhatti H.N., Khera R.A., Biological transformations of steroidal compounds: a review. Steroids 77:1267-1290, 2012.
- [12] Donova, M.V., Egorova, O.V., Microbial Steroid Transformation: Current State and Prospects. Applied Microbiology and Biotechnology, 94, 1423-1447, 2012.
- [13] Fernandes P., Cruz A., Angelova B., Pinheiro H.M., Cabral J.M.S., Microbial conversion of steroid compounds: recent developments. Enzyme Microbial Technol 32:688-705, 2003.

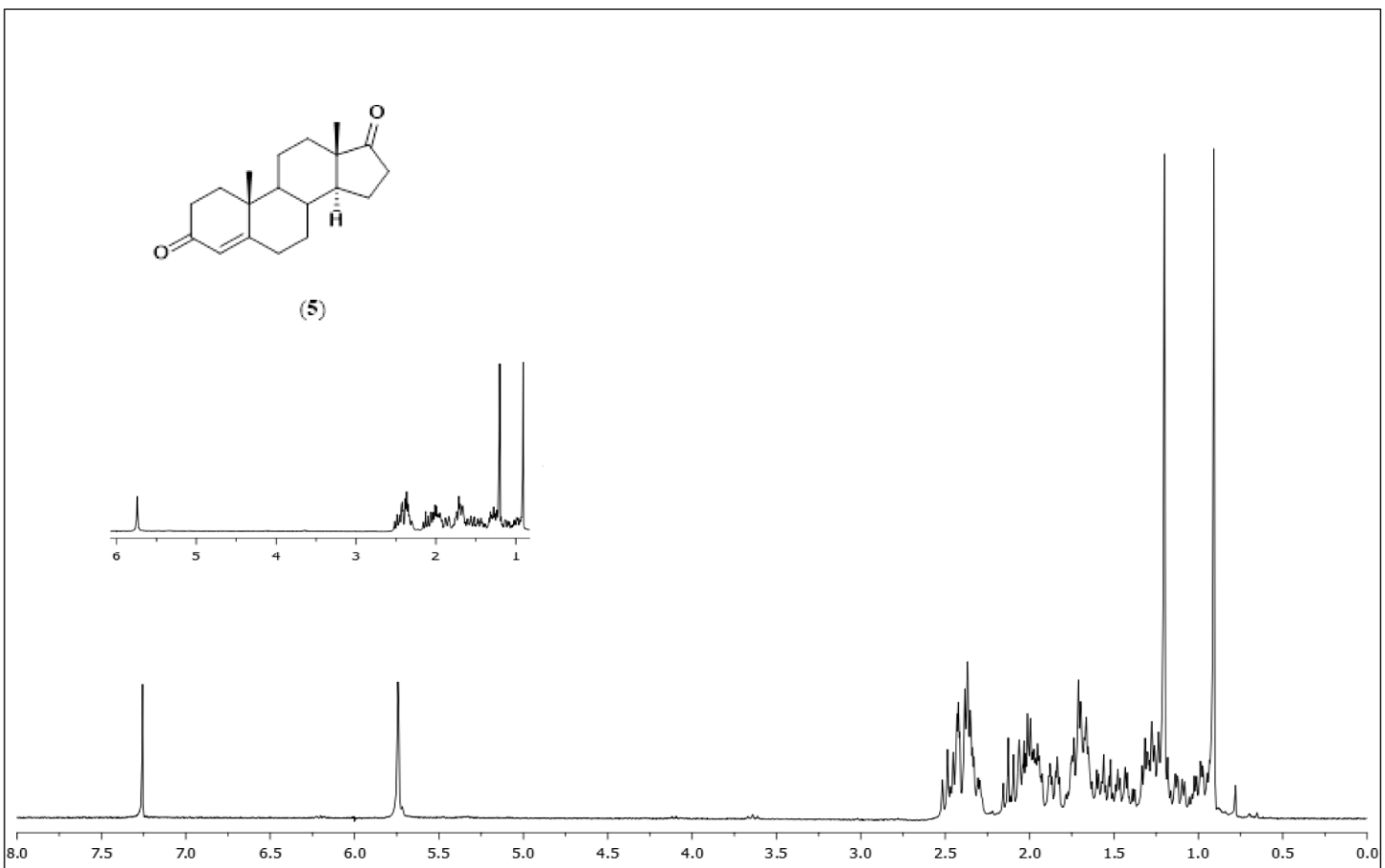
- [14] Mahato, S.B., Garai, S., Advances in Microbial Steroid Biotransformation. *Steroids*, 62, 332–345, 1997.
- [15] Sandoval-Denis, M., Gene, J., Sutton, D.A., Wiederhold, N. P., New species of *Cladosporium* associated with human and animal infections. *Persoonia*, 36, 281-298, 2016.
- [16] Bensch, K., Braun, U., Groenewald, J. Z., Crous, P. W., The Genus *Cladosporium*. *Stud. Mycol.*, 72, 1-401, 2012.
- [17] Sandoval-Denis, M., Sutton, D.A., Martin-Vicente, A., Cano-Lira, J.F., Wiederhold, N., Guarro, J., Gene, J., *Cladosporium* Species Recovered from Clinical Samples in the United States. *J. Clin. Microbiol.*, 53(9), 2990-3000, 2015.
- [18] Zalar, P., De Hoog, G. S., Schroers, H. J., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Gunde-Cimemam, N., Phylogeny and Ecology of the Ubiquitous Saprobe *Cladosporium shaerospermum*, with Descriptions of Seven New Species from Hypersaline Environments. *Stud. Mycol.*, 58, 157-183, 2007.
- [19] Aihara, M., Tanaka, T., Takatori, K., *Cladosporium* as the Main Fungal Contaminant of Locations in Dwelling Environments. *Biocontrol Sci.*, 6(1), 49-52, 2001.
- [20] Park, H. G., Managbanag, J. R., Stamenova, E. K., Jong, S. C., Comparative Analysis of Common Indoor *Cladosporium* Species Based on Molecular Data and Conidial Characters. *Mycotaxon*, 89, 441-451, 2004.
- [21] Yano, S., Koyabashi, K., Kato, K., Intrabronchial Lesion Due to *Cladosporium shaerospermum* in a Healthy, Non-asthmatic Woman. *Mycoses*, 46(8), 330-332, 2003.
- [22] Pereira, P. T., De Carvalho, M. M., Girio, F. M., Roseiro, J. C., Amaral-Collaco, M. T., Diversity of Microfungi in the Phylloplane of Plants Growing in a Mediterranean Ecosystem. *J. Basic Microbiol.*, 42(6), 396-407, 2002.
- [23] Yildirim K., Kuru A., Yılmaz Ş., Biotransformation of Testosterone by *Cladosporium sphaerospermum*. *Biocatal Biotransform.* doi:10.1080/10242422.2019.1583747, 2019.
- [24] Andersen, B., Hollensted, M., Metabolite Production by Different *Ulocladium* Species. *International Journal of Food Microbiology*, Denmark, 1-2, 172-179, 2008.
- [25] Yildirim K., Kuru A., Yılmaz Ş., Biotransformation of testosterone by *Ulocladium chartarum* MRC 72584. *J Chem Res* 42:444-446, 2018.

- [26] Shebany Y.M., Antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from *Avicennia marina* plant. Red Sea, Egypt, Egypt J Microbiol 47:141-152, 2012.
- [27] Świzdor, A., Panek, A., Milecka-Tronina, N., Hydroxylative Activity of *Aspergillus niger* Towards Androst-4-ene and androst-5-ene Steroids. Steroids, 126, 101-106, 2017.
- [28] Numazawa, M., Mutsumi, A., Ogata, M., Reactions of enolizable steroidal 4-en-3-ones and 17-ones with hypervalent iodine. Chem. Pharm. Bull., 36, 3381-3386, 1988.
- [29] Hanson, J. R., Nasir, H., Parvez, A., The Hydroxylation of Testosterone and Some Relatives by *Cephalosporium aphidicola*. Phytochemistry, 42(2), 411-415, 1996.
- [30] Yamashita H., Shibata K., Yamakoshi N., Kurosawa Y., Mori H., Microbial 16 β -hydroxylation of steroids with *Aspergillus niger*. Agr Biol Chem 40:505-509, 1976.
- [31] Hosoda H., Yamashita K., Tadano K., Nambara T., Synthesis of 15 α -hydroxytestosterone and related C 19 steroids. Chem Pharm Bull 25:2650-2656, 1977.
- [32] Holland H.L., Thomas E.M., Microbial hydroxylations of steroids, 8. Incubation of Cn halo- and other substituted steroids with Cn hydroxylating fungi. Can J Chem 60:160-164, 1982.
- [33] Al-Awadi S., Afzal M., Oommen S., Studies on *Bacillus stearothermophilus*, Part IV, Influence of enhancers on biotransformation of testosterone. Steroids, 70:327-333, 2005.
- [34] 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 1 H NMR spectra of the steroid hormones, their hydroxylated derivatives, and related compounds. J Chem Soc Perkin Trans 2:1567-1594, 1990.
- [35] Peart P.C., Reynolds W.F., Reese P.B., The facile bioconversion of testosterone by alginate-immobilised filamentous fungi. J Mol Catal B: Enzym 95:70-81, 2013.
- [36] Huang L.H., Li J., Xu G., Zhang X.H., Wang Y.G., Yin Y.L., Liu H.M., Biotransformation of dehydroepiandrosterone (DHEA) with *Penicillium griseopurpureum* Smith and *Penicillium glabrum* (Wehmer) Westling. Steroids 75:1039-1046, 2010.

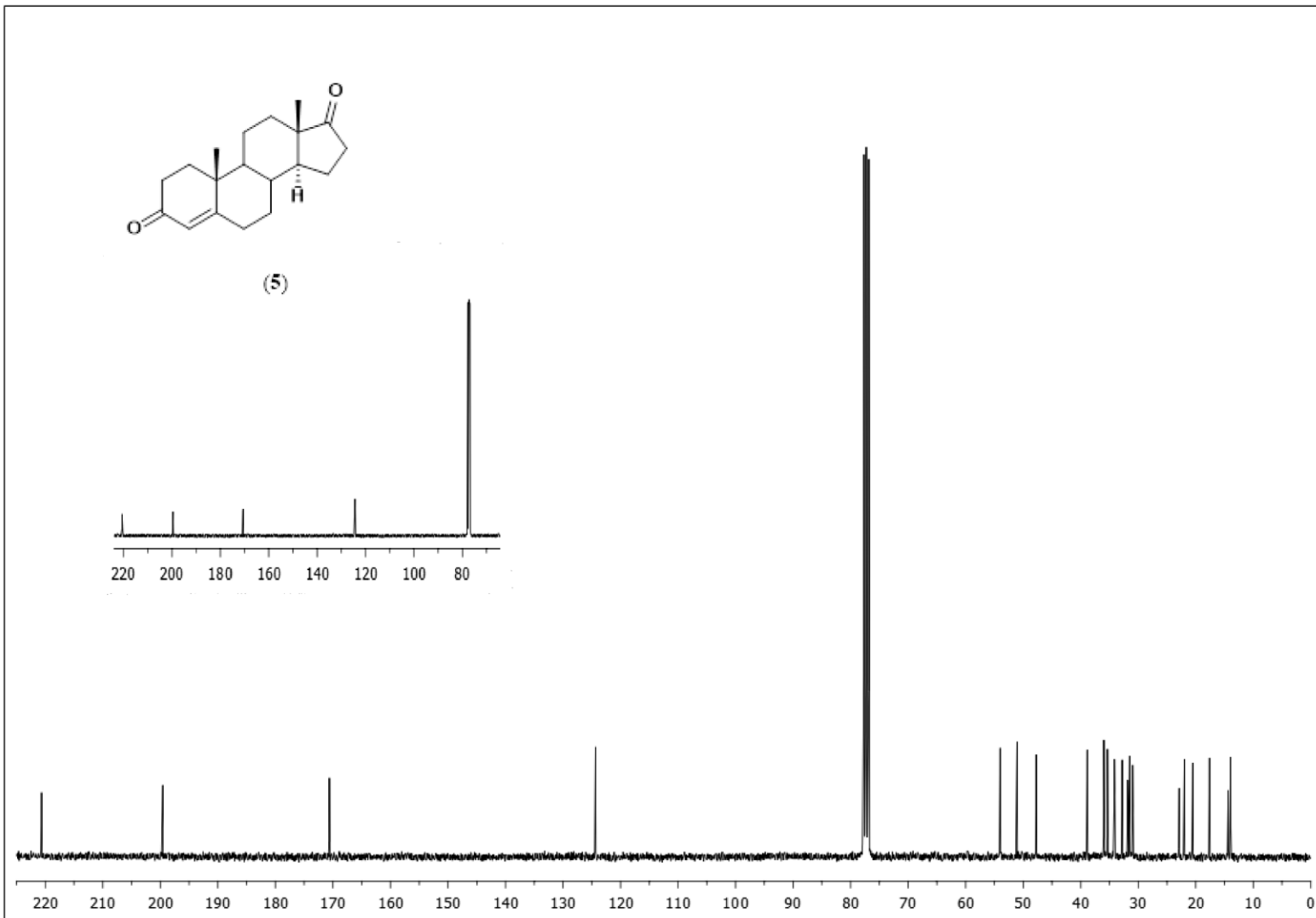
- [37] Kołek T., Świzdor A., Biotransformation XLV. Transformations of 4-ene-3-oxo steroids in *Fusarium culmorum* culture. *J Steroid Biochem Molec Biol* 67:63-69, 1988.
- [38] Yildirim K., Kuru A., Yılmaz R.F., Microbial transformation of some steroids by *Cladosporium cladosporioides* MRC 70282. *J Chem Res* 42:408-411, 2018.
- [39] Faramarzi M.A., Badiie M., Yazdi M.T., Amini M., Torshabi M., Formation of hydroxysteroid derivatives from androst-4-en-3,17-dione by filamentous fungus *Mucor racemosus*. *J Mol Catal B: Enzym* 50:7-12, 2008.
- [40] Kollerov V.V., Shultov A.A., Fokina V.V., Sukhodolskaya G.V., Donova M.V., Biotransformation of 3-keto-androstanes by *Gongronella butleri* VKM F-1033. *J Mol Catal B: Enzym* 55:61-68, 2008.
- [41] Smith K.E., Latif S., Kirk D.N., Microbial transformations of steroids - VI. Transformation of testosterone and androstenedione by *Botryosphaerica obtusa*. *J Steroid Biochem* 35:115- 120, 1990.
- [42] Urech J., Vischer E., Wettstein A., Steroids. CLXVIII. Microbiological reactions, IX. Substrate specific hydroxylations of steroids with fungi of the genus *Gibberella*. *Helv Chim Acta* 43:1077-1086, 1960.
- [43] Wu Y., Li H., Zang X-M., Gong J-C., Rao Z-M., Shi J-S., Zang X-J., Xu Z-H., Efficient hydroxylation of functionalized steroids by *Colletotrichum lini* ST-1. *J Mol Catal B: Enzym* 120:111-118, 2015.

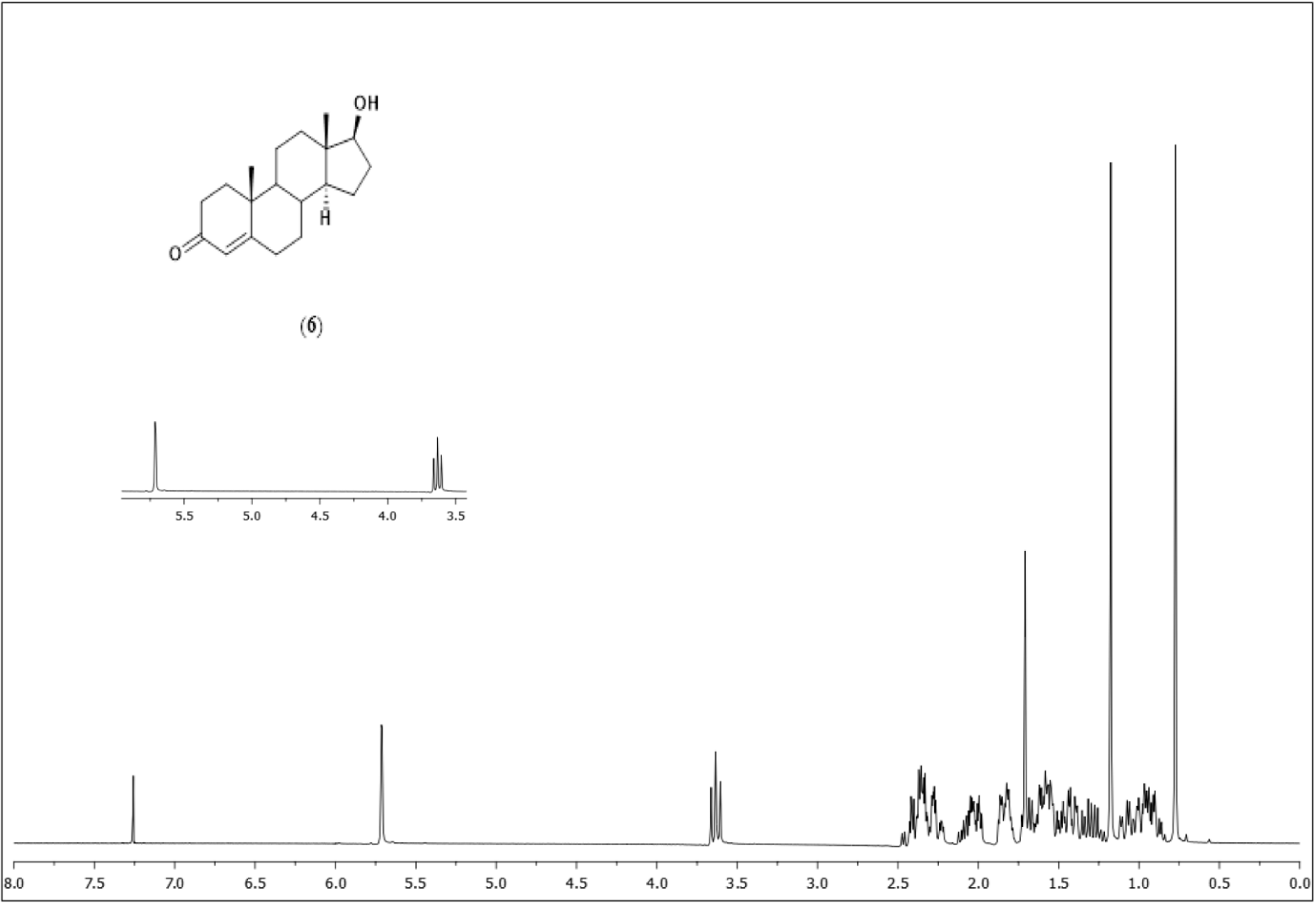
FKI,FR

EK 1: Androstendion (5) için ^1H NMR spektrumu



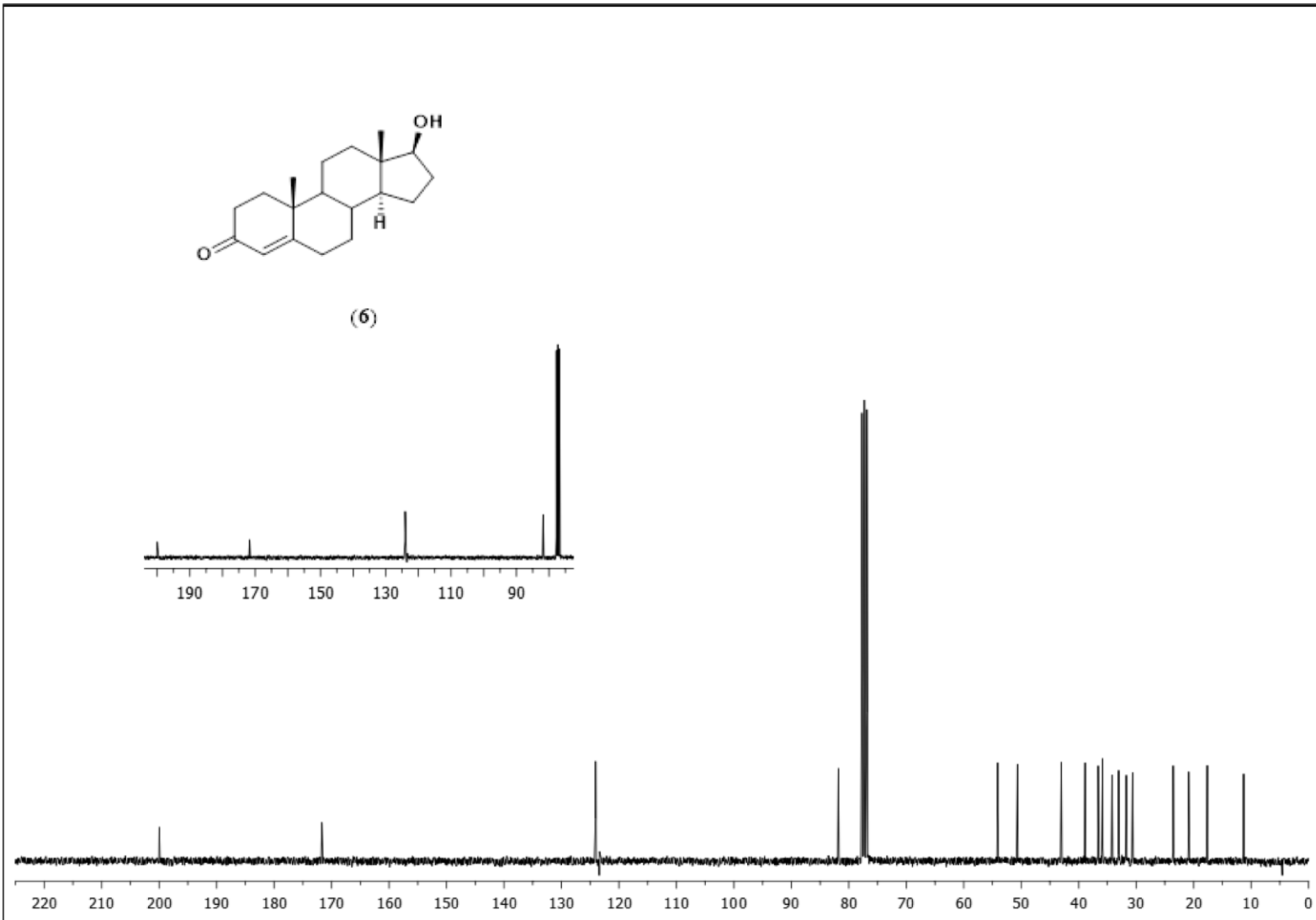
EK 2: Androstendion (5) için ^{13}C NMR spektrumu



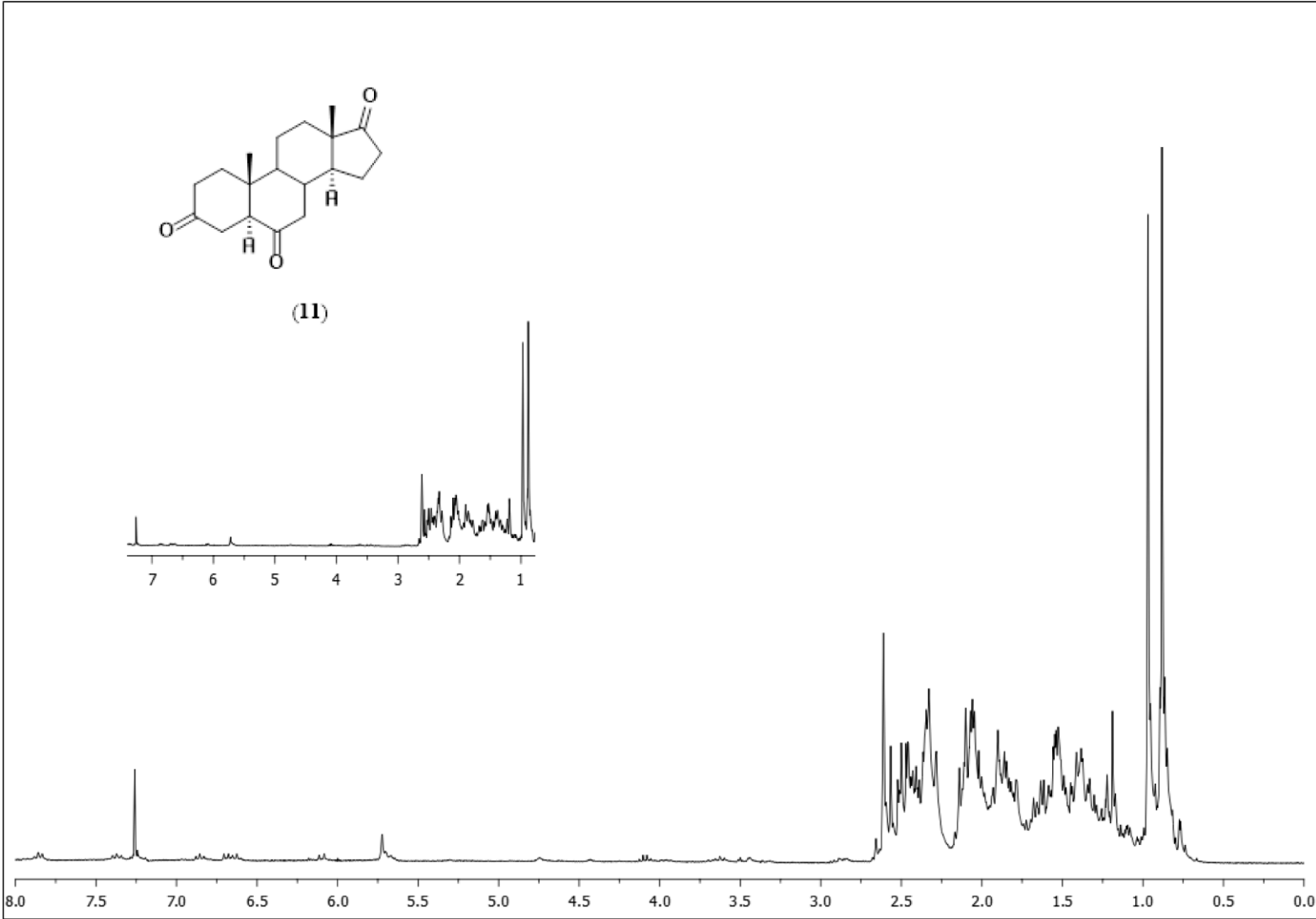


EK 3: 17 β -Hidroksisteroid-4-en-3-on (6) için ^1H NMR spektrumu

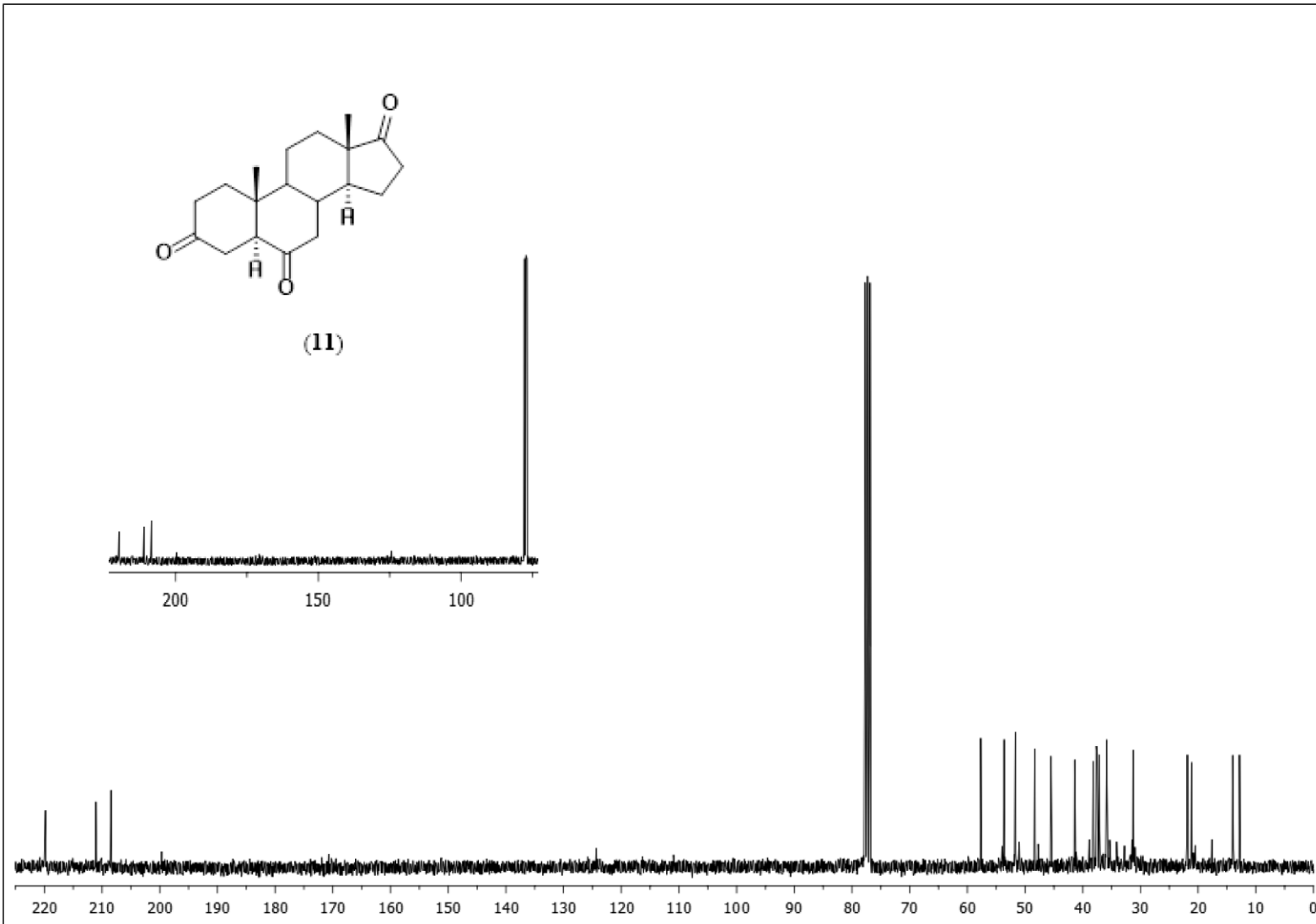
EK 4: 17 β -Hidroksiandrosta-4-en-3-on (**6**) için ^{13}C NMRspektrumu



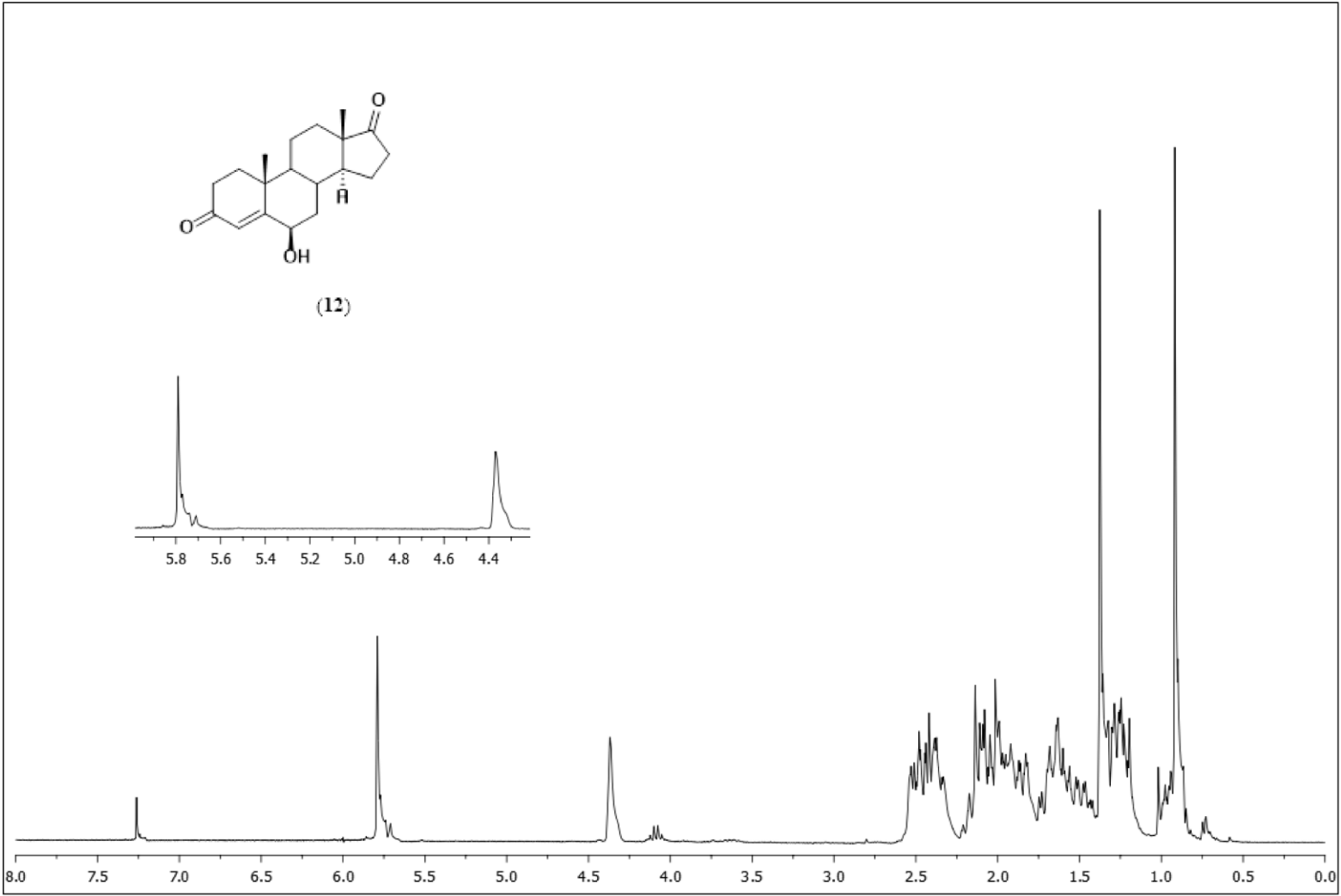
EK 5: 5 α -Androstan-3,6,17-trion (**11**) için ^1H NMR spektrumu



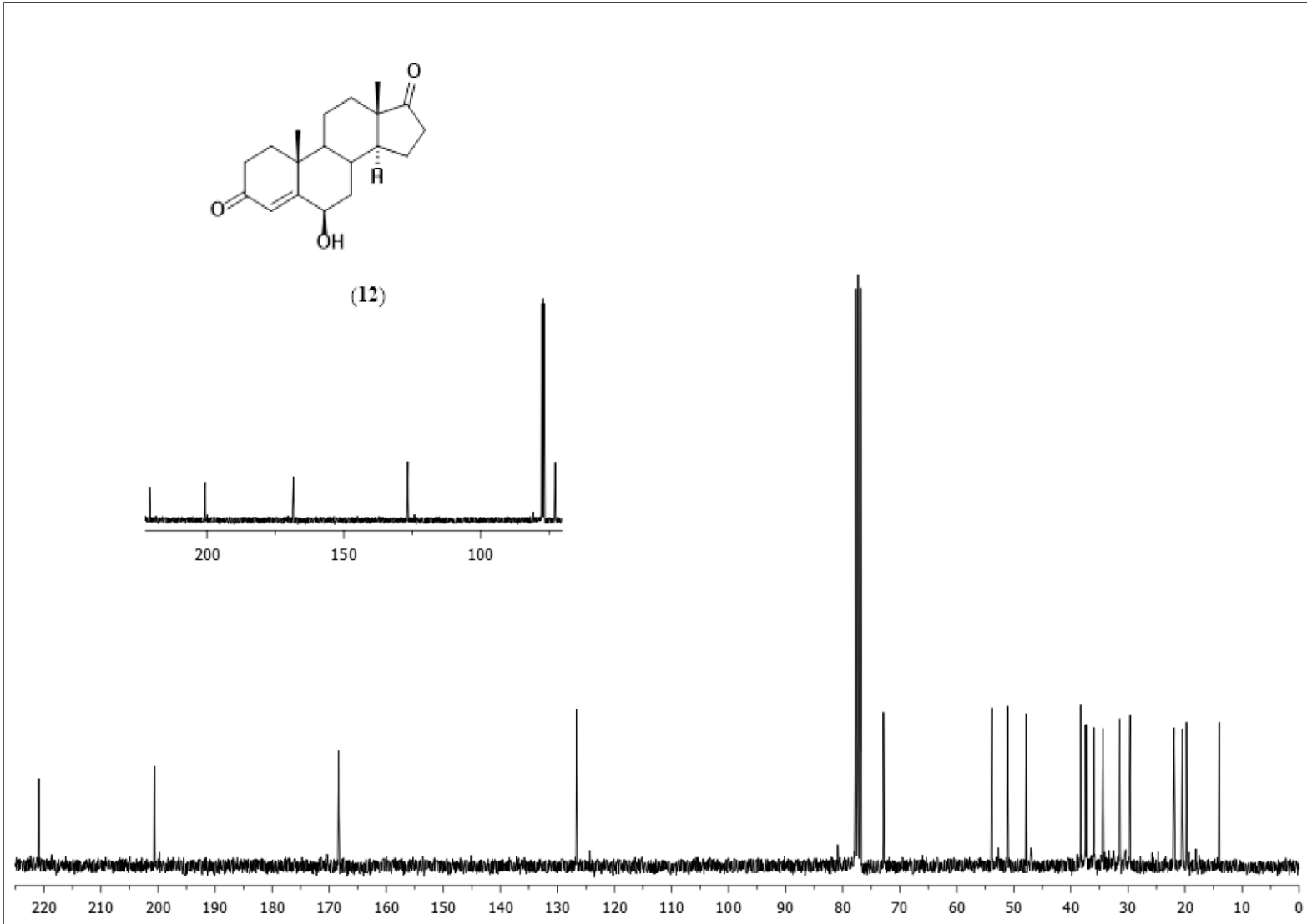
EK 6: 5 α -Androstan-3,6,17-trion (**11**) için ^{13}C NMR spektrumu



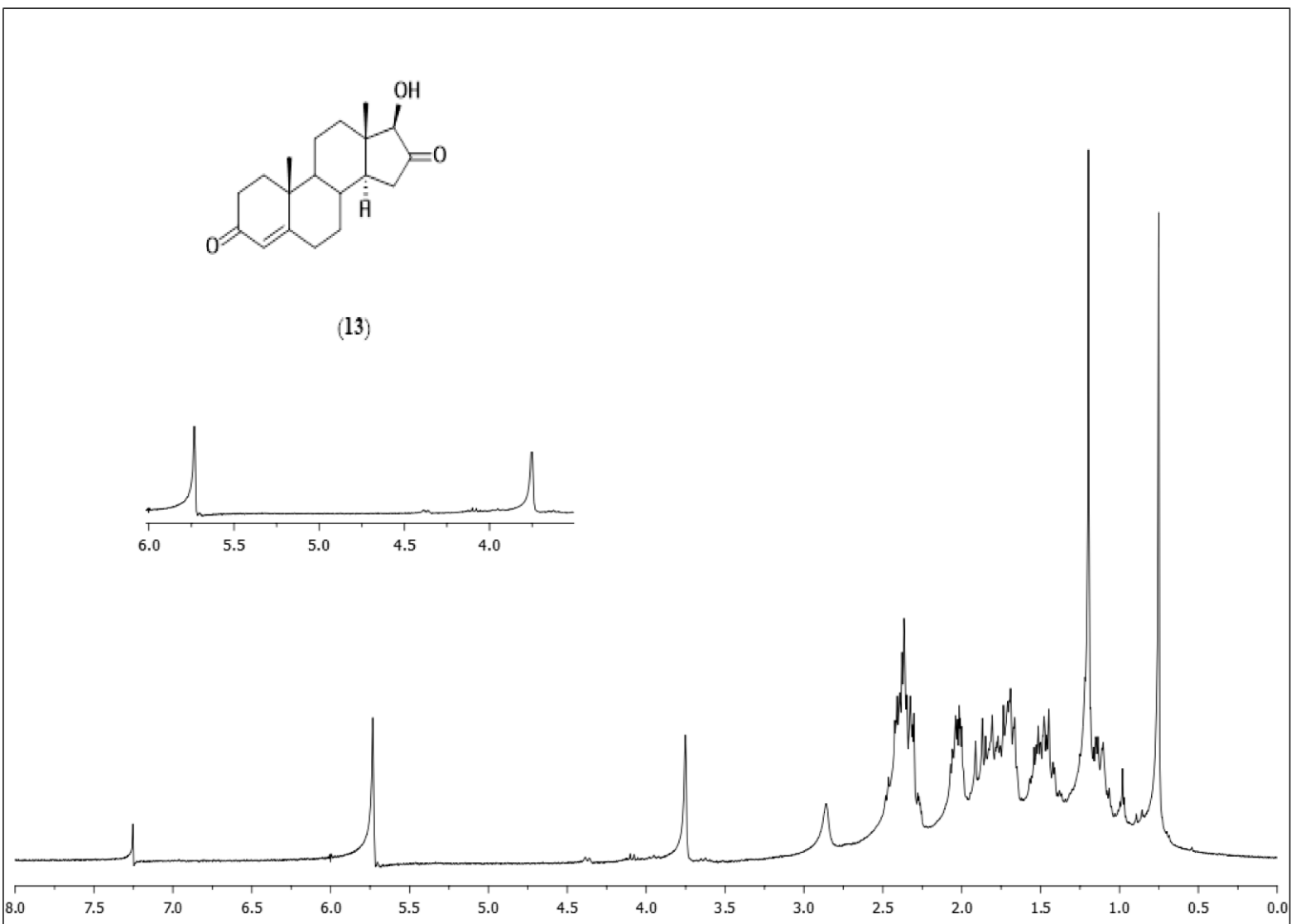
EK 7: 6 β -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**12**) için ^1H NMR spektrumu



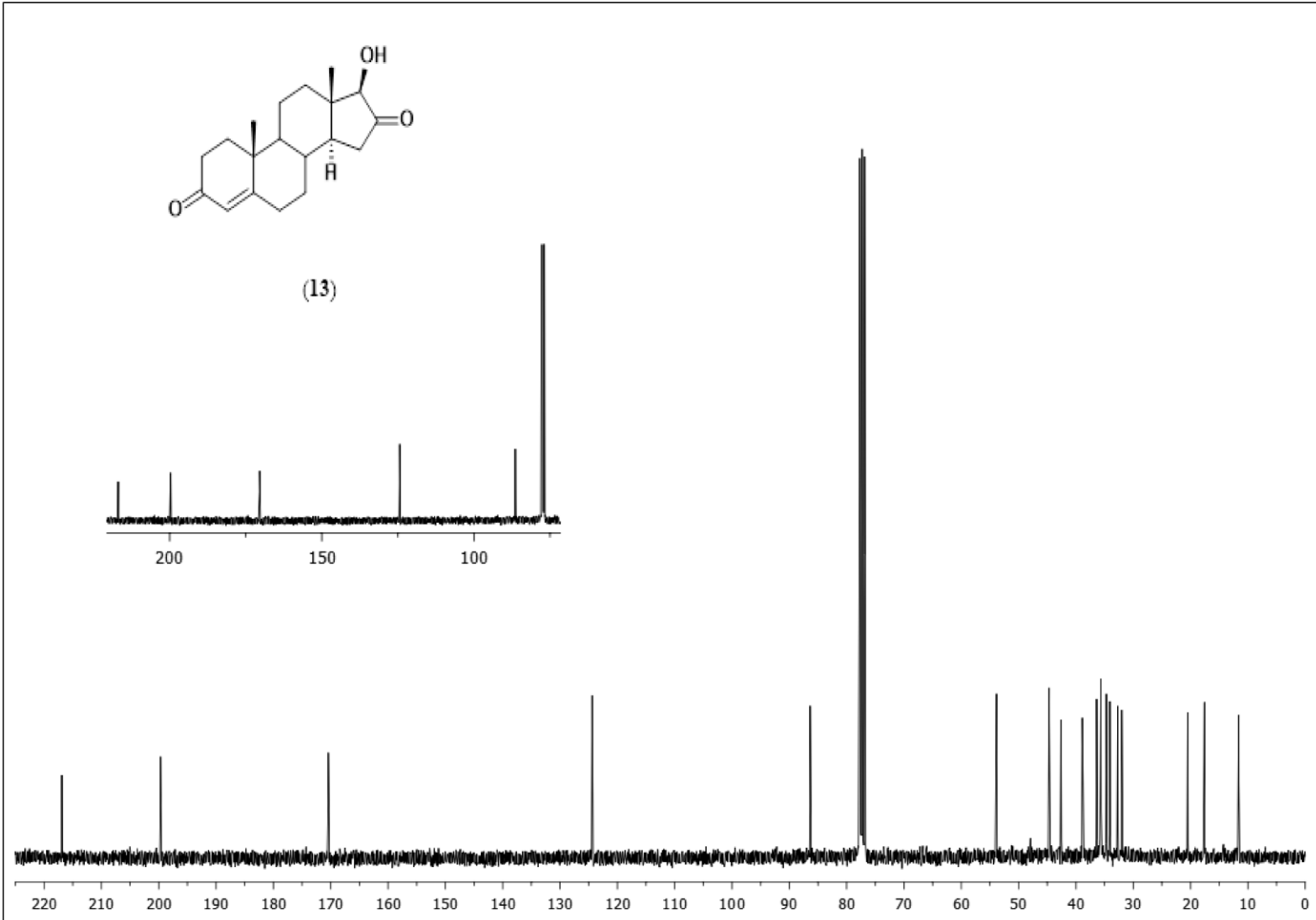
EK 8: 6 β -Hidroksiandroster-4-en-3,17-dion (**12**) için ^{13}C NMR spektrumu



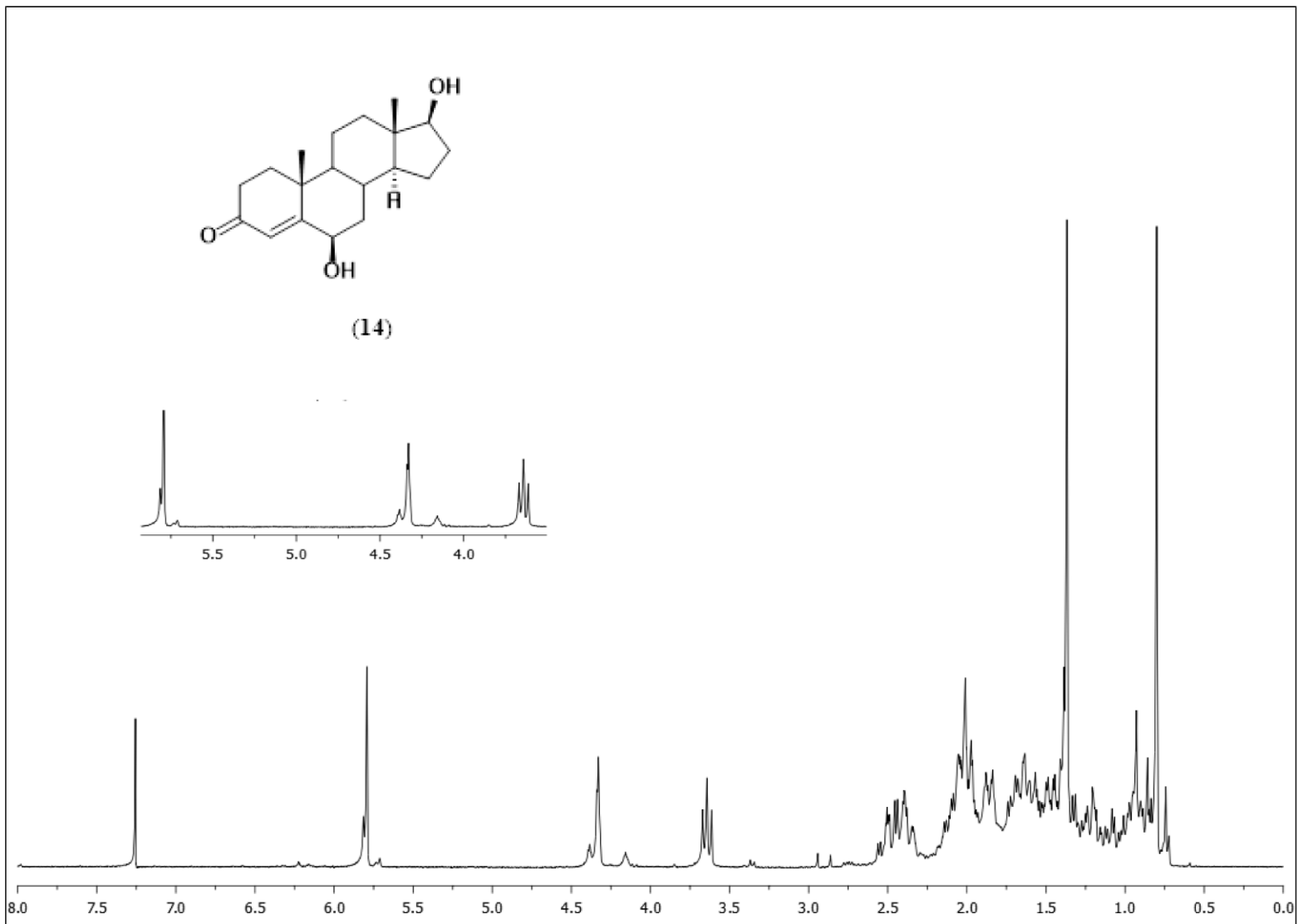
EK 9: 17 β -Hidroksiandrosta-4-en-3,16-dion (**13**) için ^1H NMR spektrumu



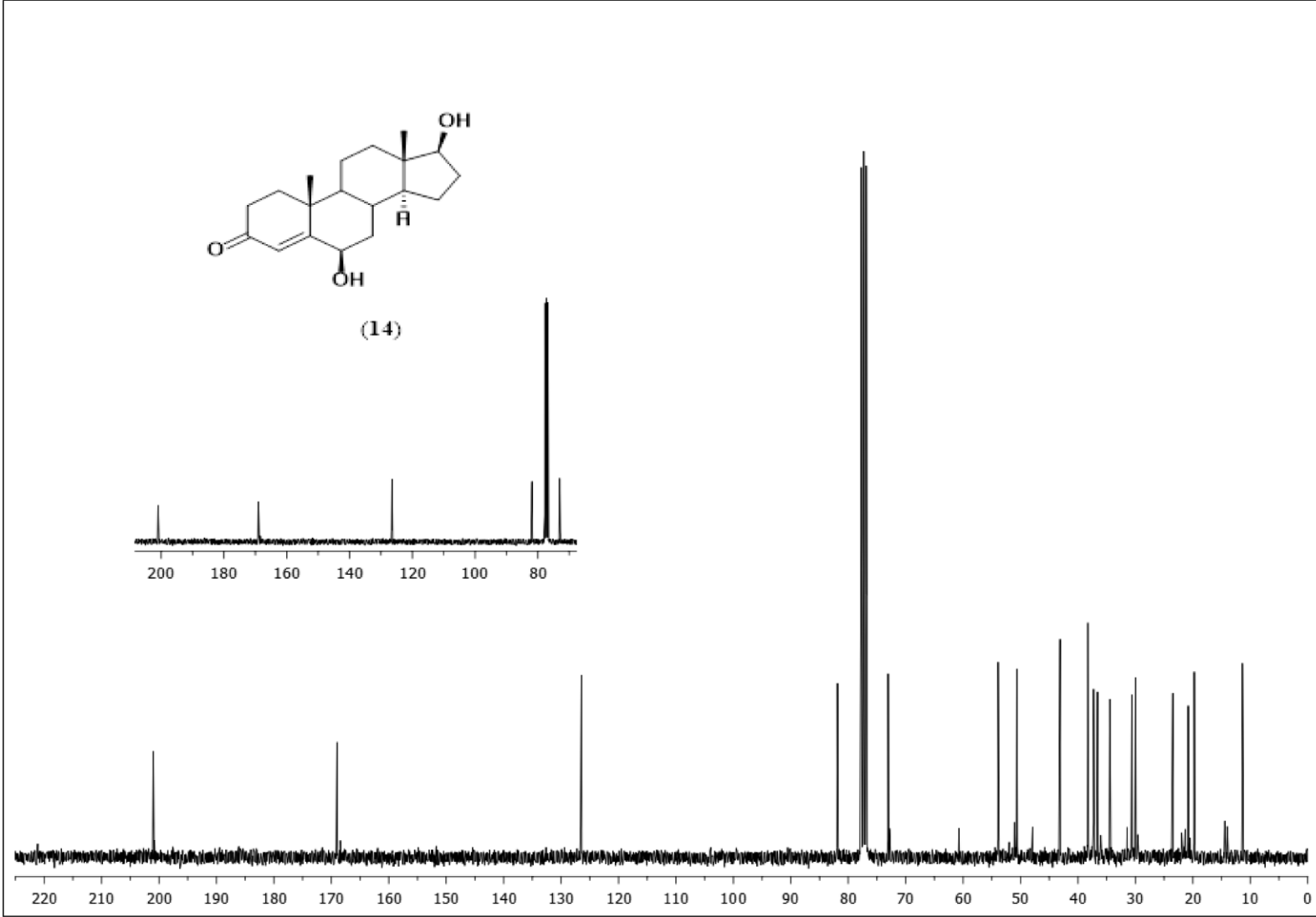
EK 10: 17 β -Hidroksiandroster-4-en-3,16-dion (**13**) için ^{13}C NMR spektrumu



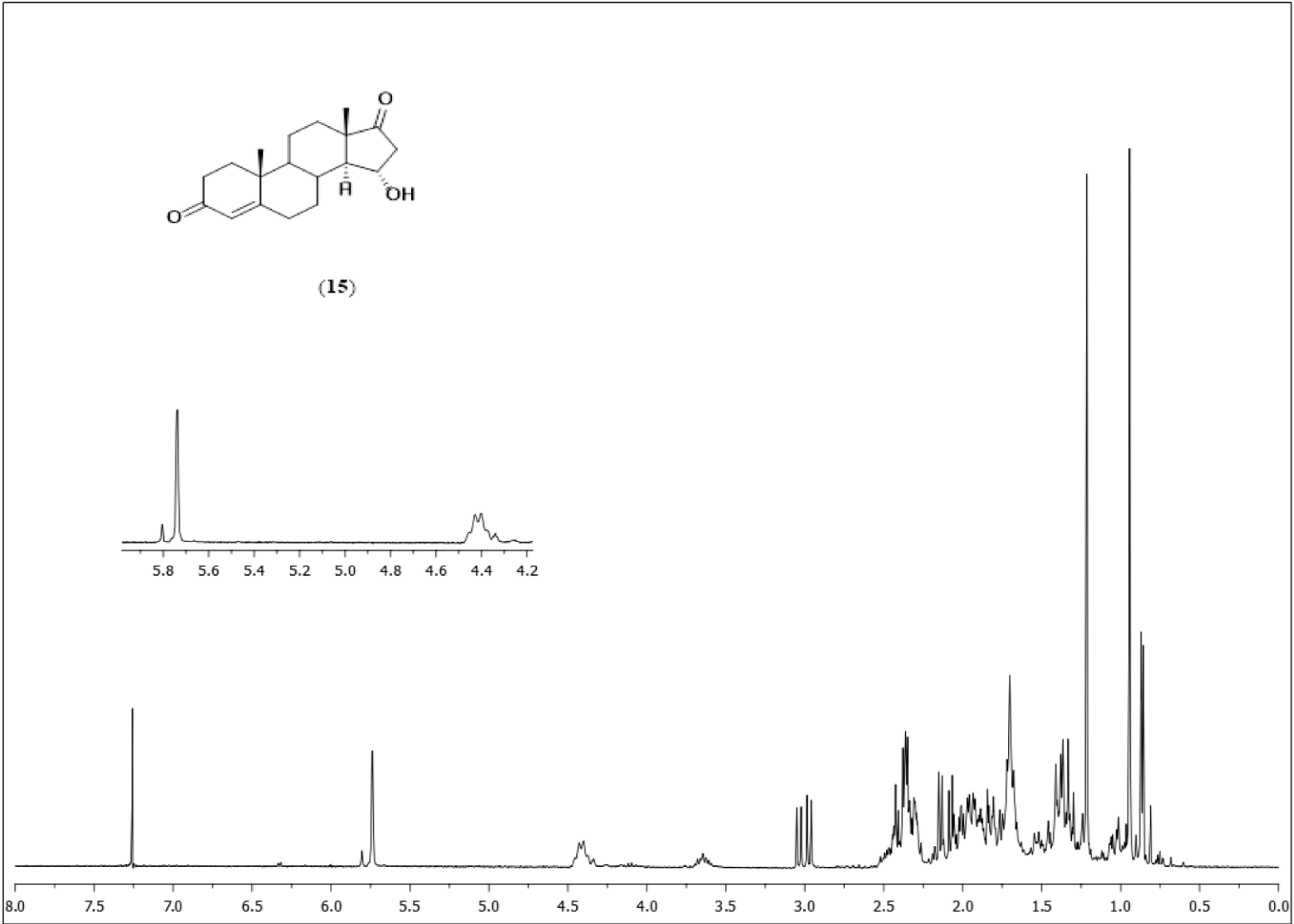
EK 11: 6 β ,17 β -Dihidroksistandro-4-en-3-on (**14**) için ^1H NMR spektrumu



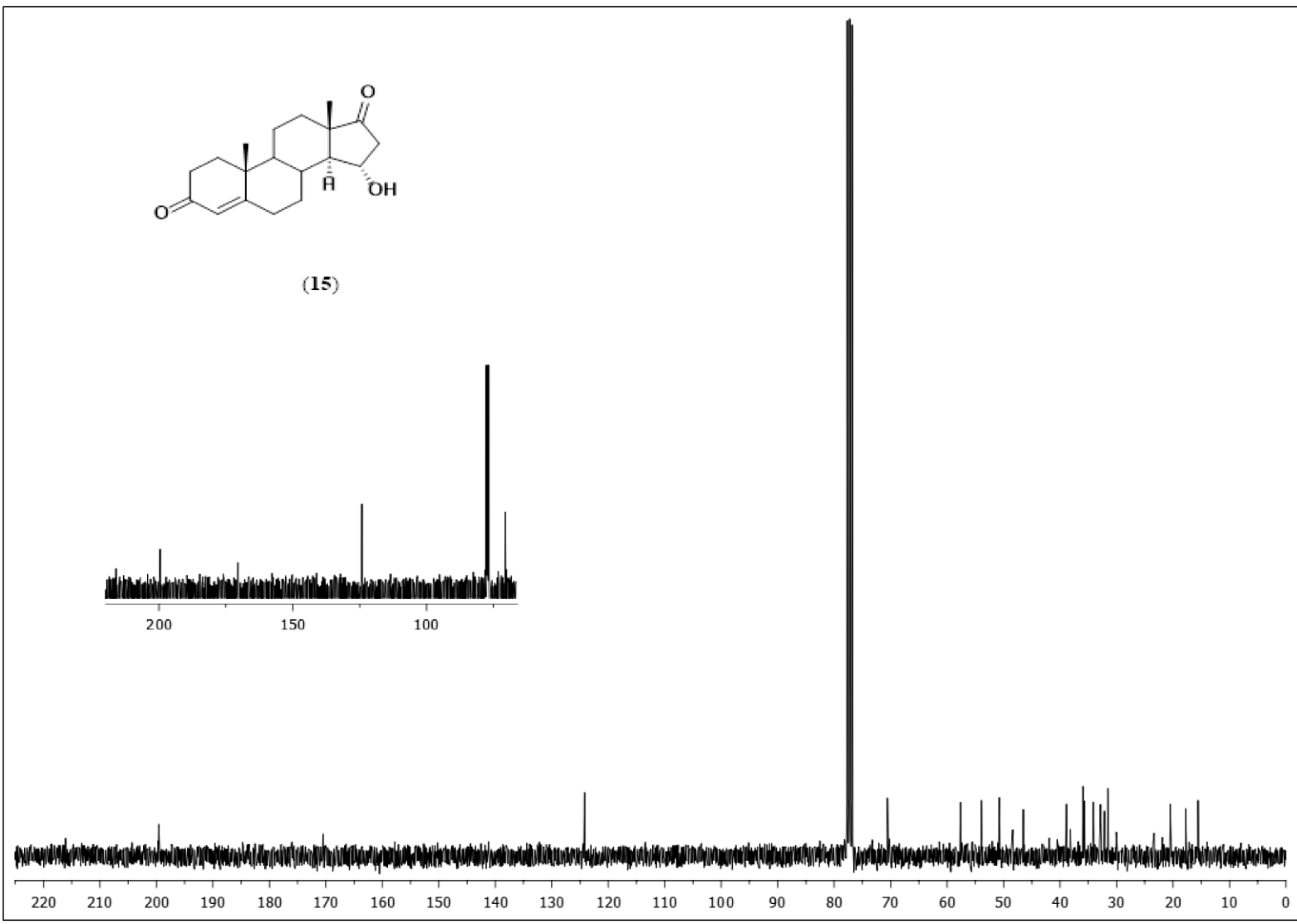
EK 12: 6 β ,17 β -Dihidroksianđrost-4-en-3-on (14) için ^{13}C NMR spektrumu



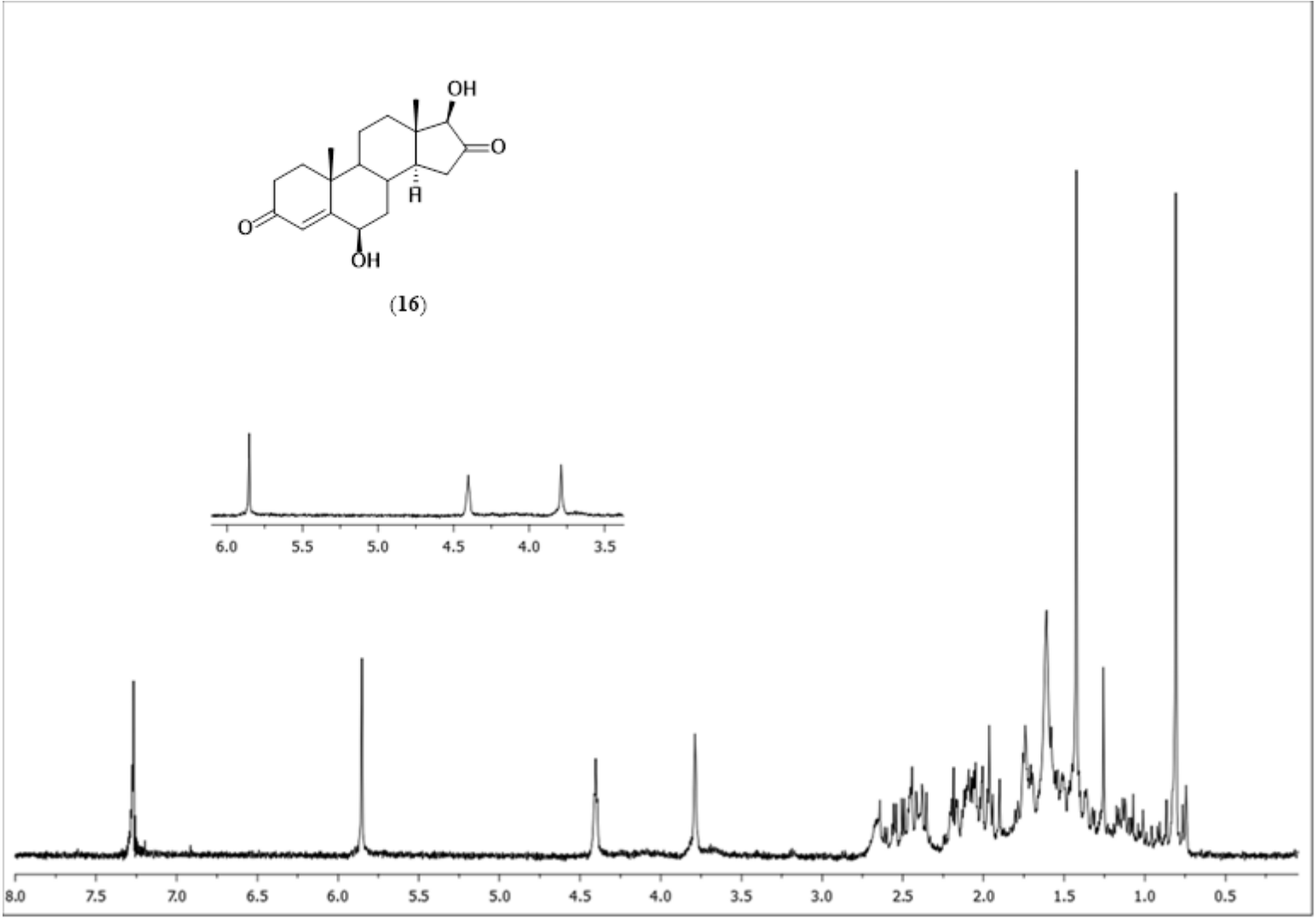
EK 13: 15 α -Hidroksiandrosta-4-en-3,17-dion (**15**) için ^1H NMR spektrumu



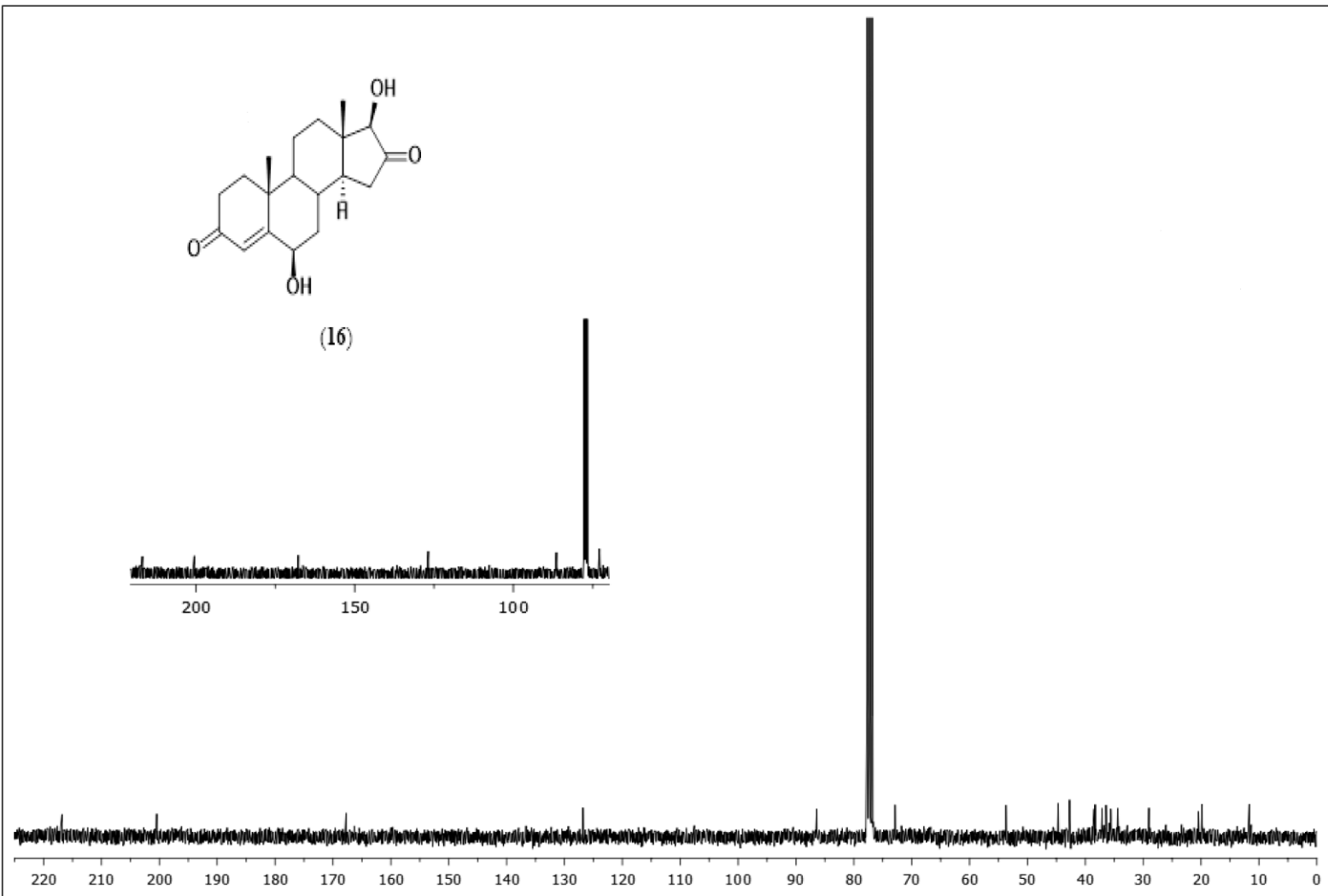
EK 14: 15 α -Hidroksiandrosta-4-en-3,17-dion (**15**) için ^{13}C NMR spektrumu



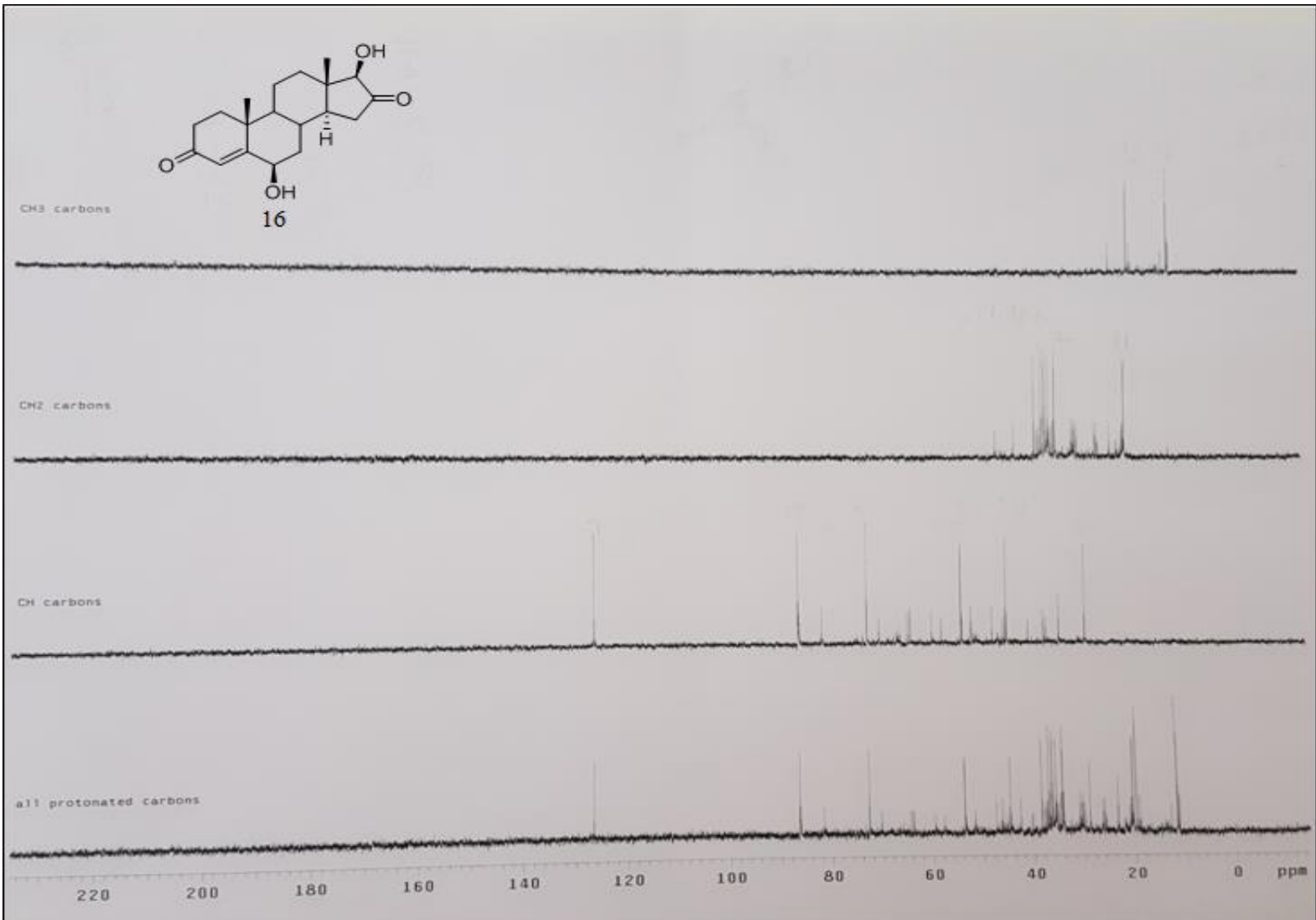
EK 15: 6 β ,17 β -Dihidroksianđrost-4-en-3,16-dion (**16**) için ^1H NMR spektrumu



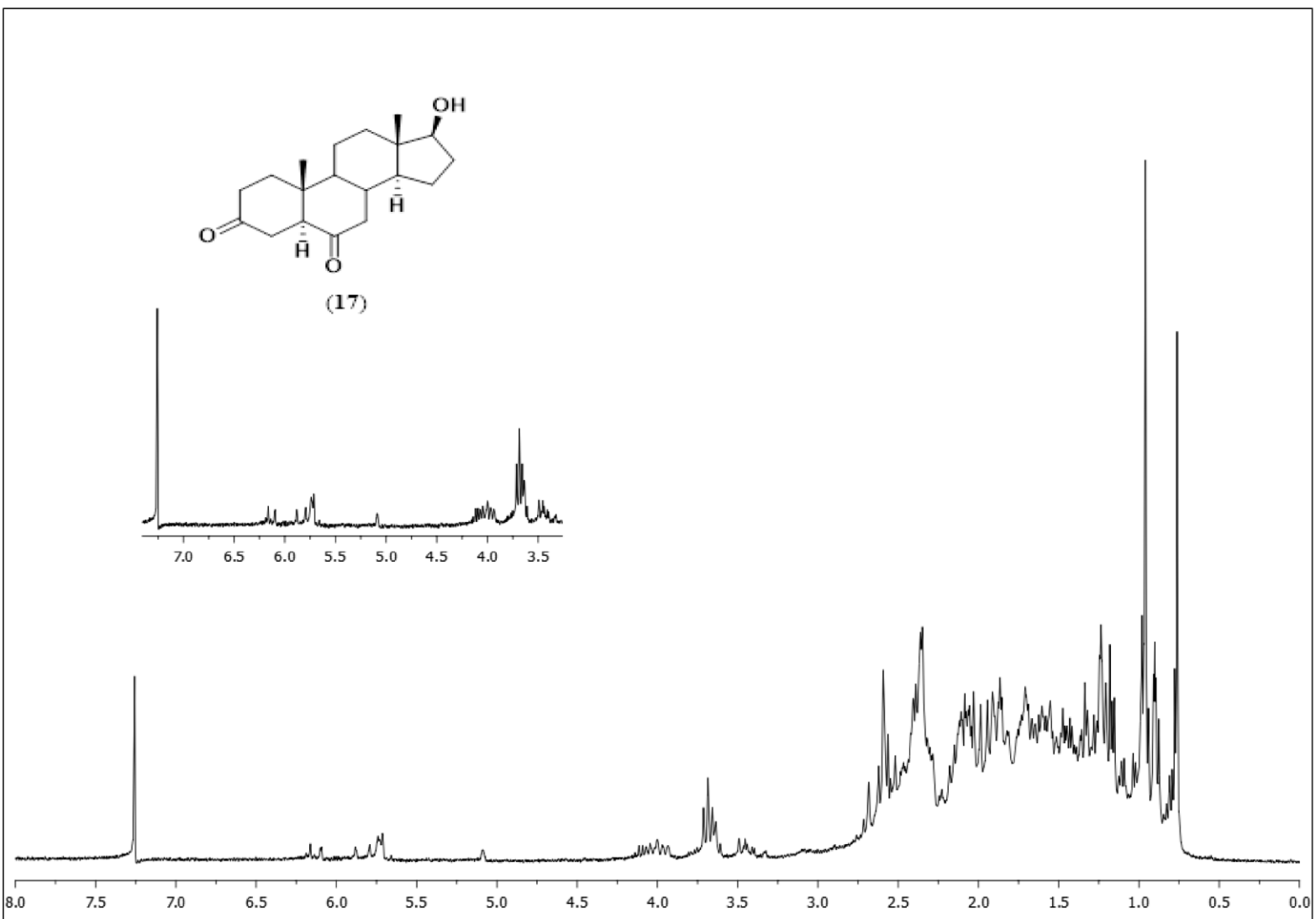
EK 16: 6 β ,17 β -Dihidroksiandroster-4-en-3,16-dion (**16**) için ^{13}C NMR spektrumu



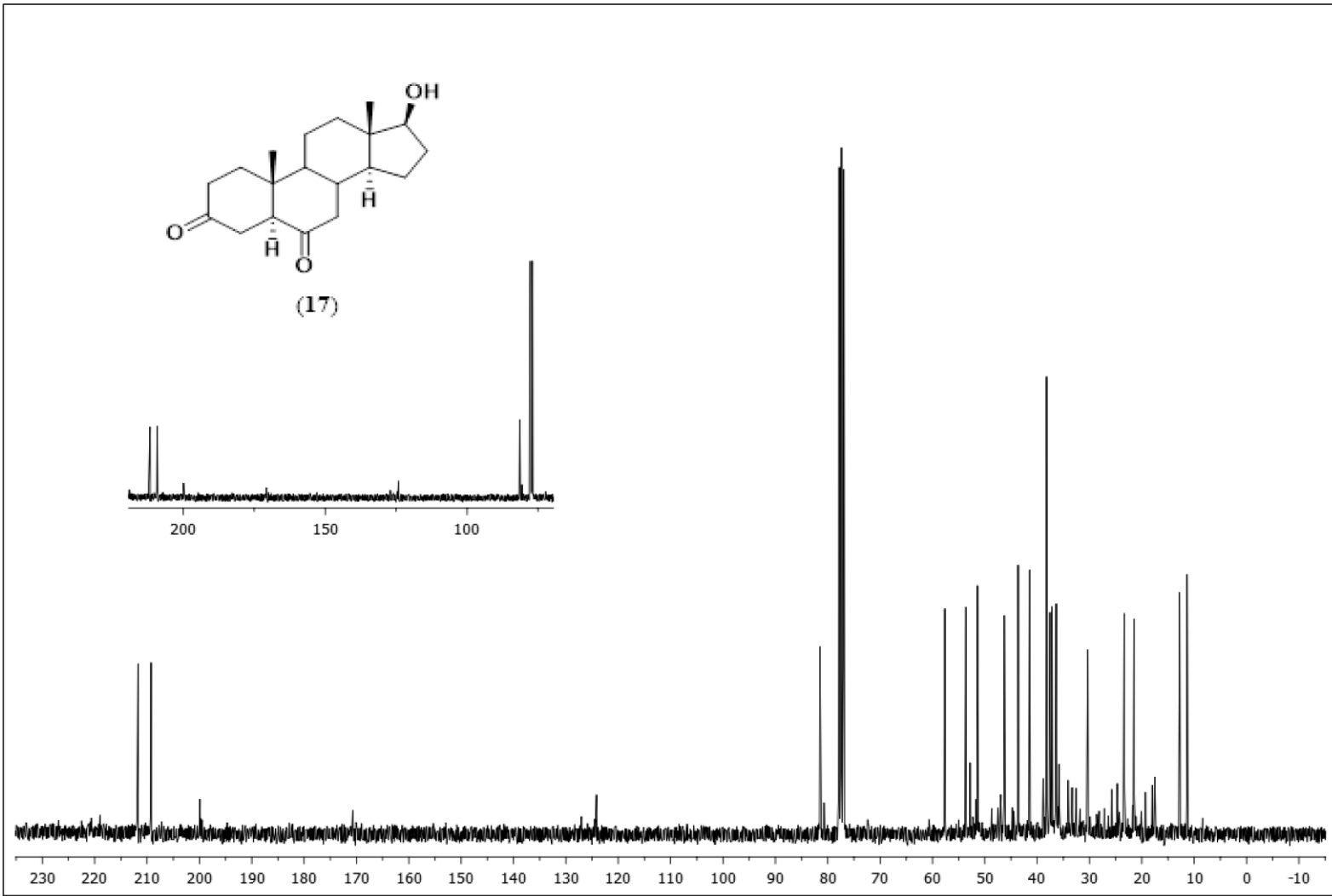
EK 17: 6 β ,17 β -Dihidroksiandroster-4-en-3,16-dion (**16**) için DEPT spektrumu



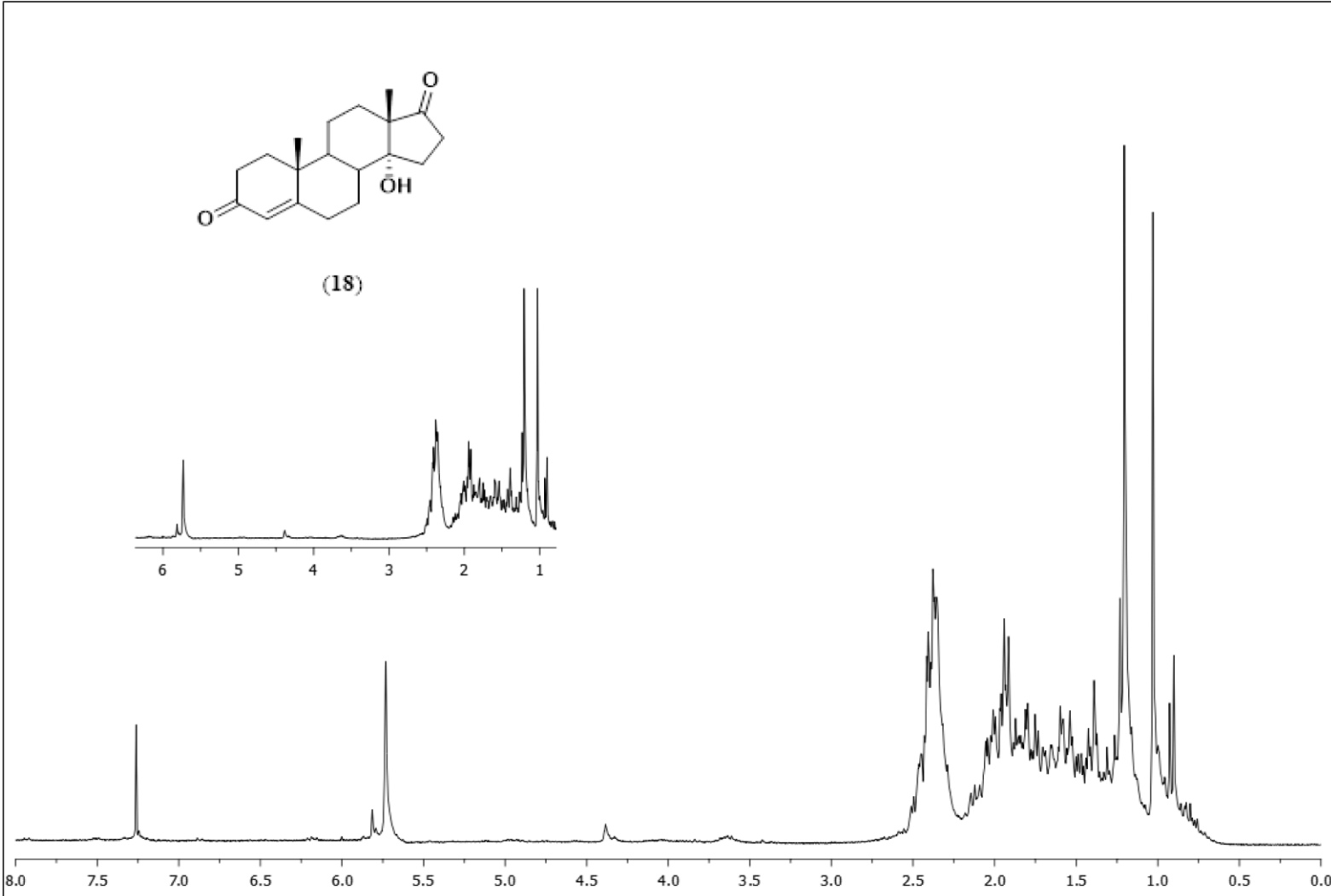
EK 18: 17 β -Hidroksi-5 α -androstano-3,6-dion (17) için ^1H NMR spektrumu



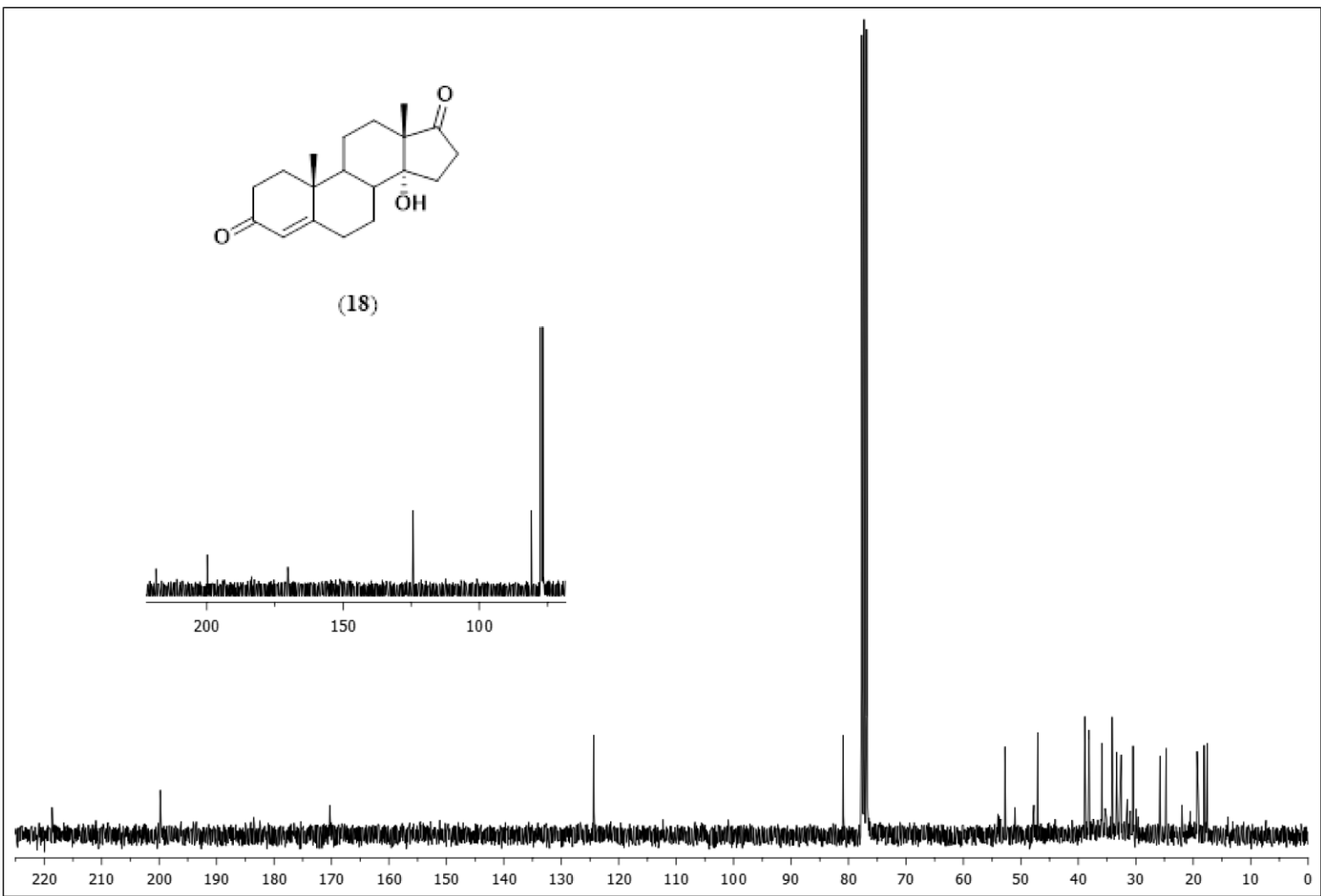
EK 19: 17 β -Hidroksi-5 α -androstan-3,6-dion (**17**) için ^{13}C NMR spektrumu



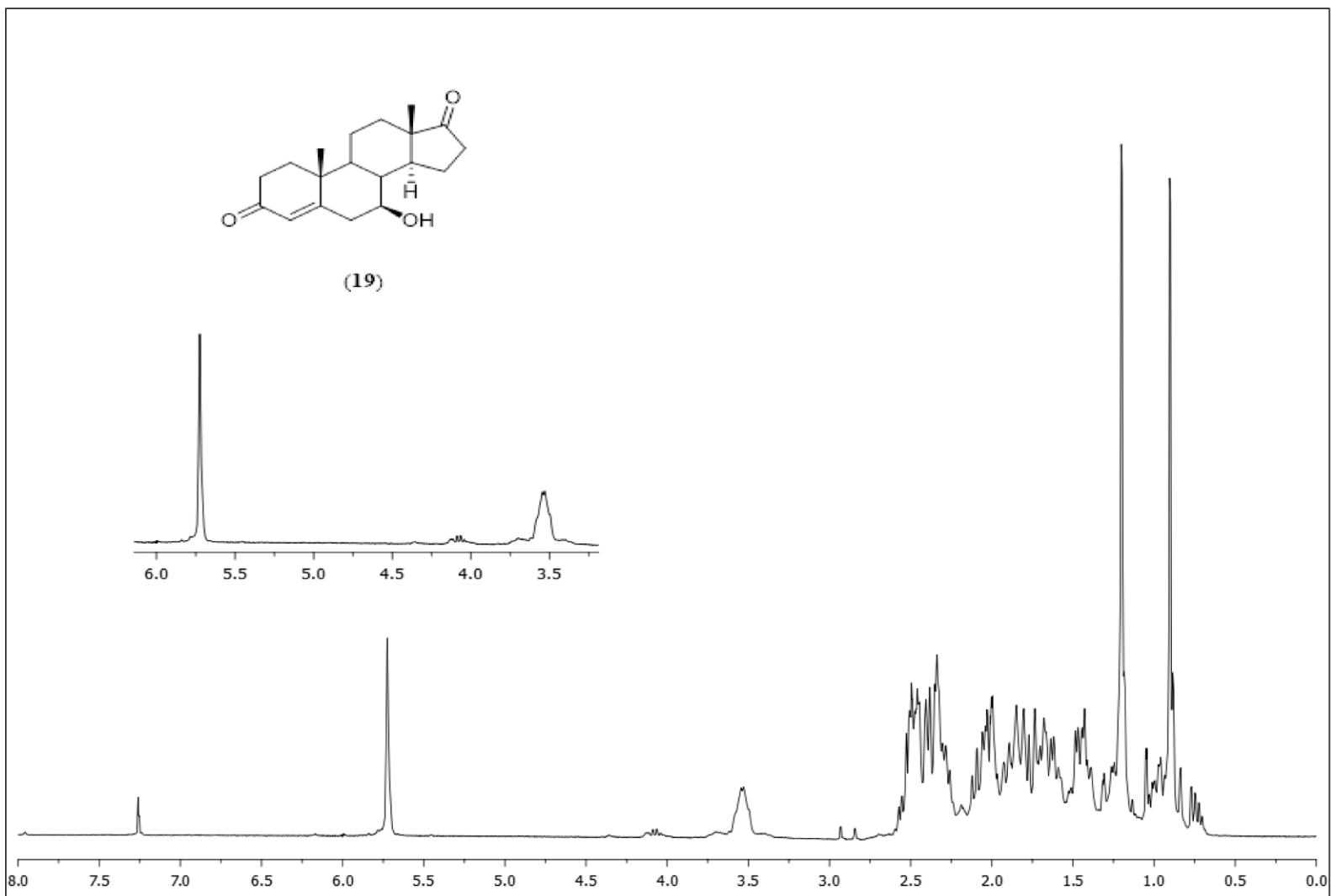
EK 20: 14 α -Hidroksiandrosta-4-en-3,17-dion (**18**) için ^1H NMR spektrumu



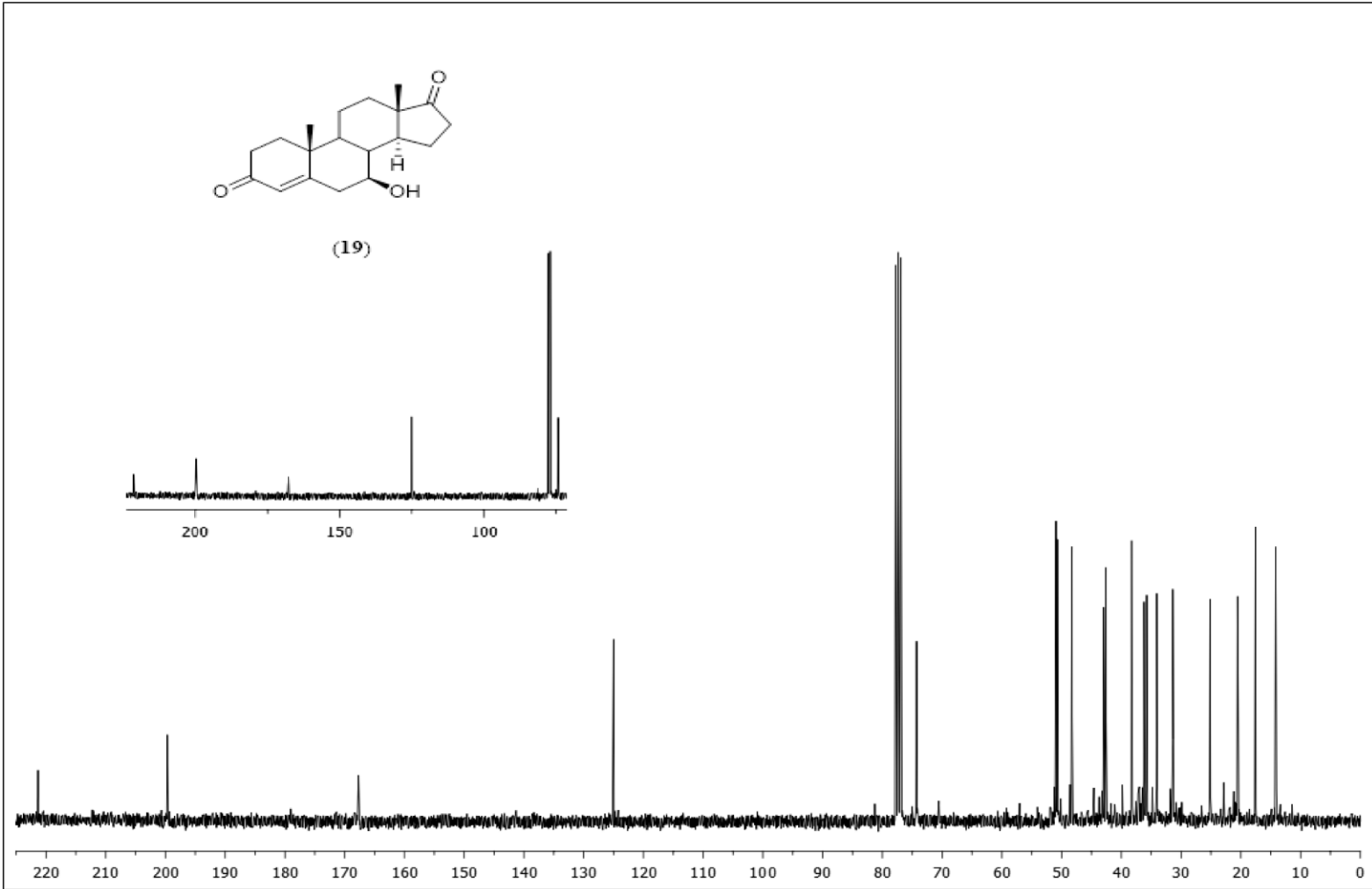
EK 21: 14 α -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**18**) için ^{13}C NMR spektrumu



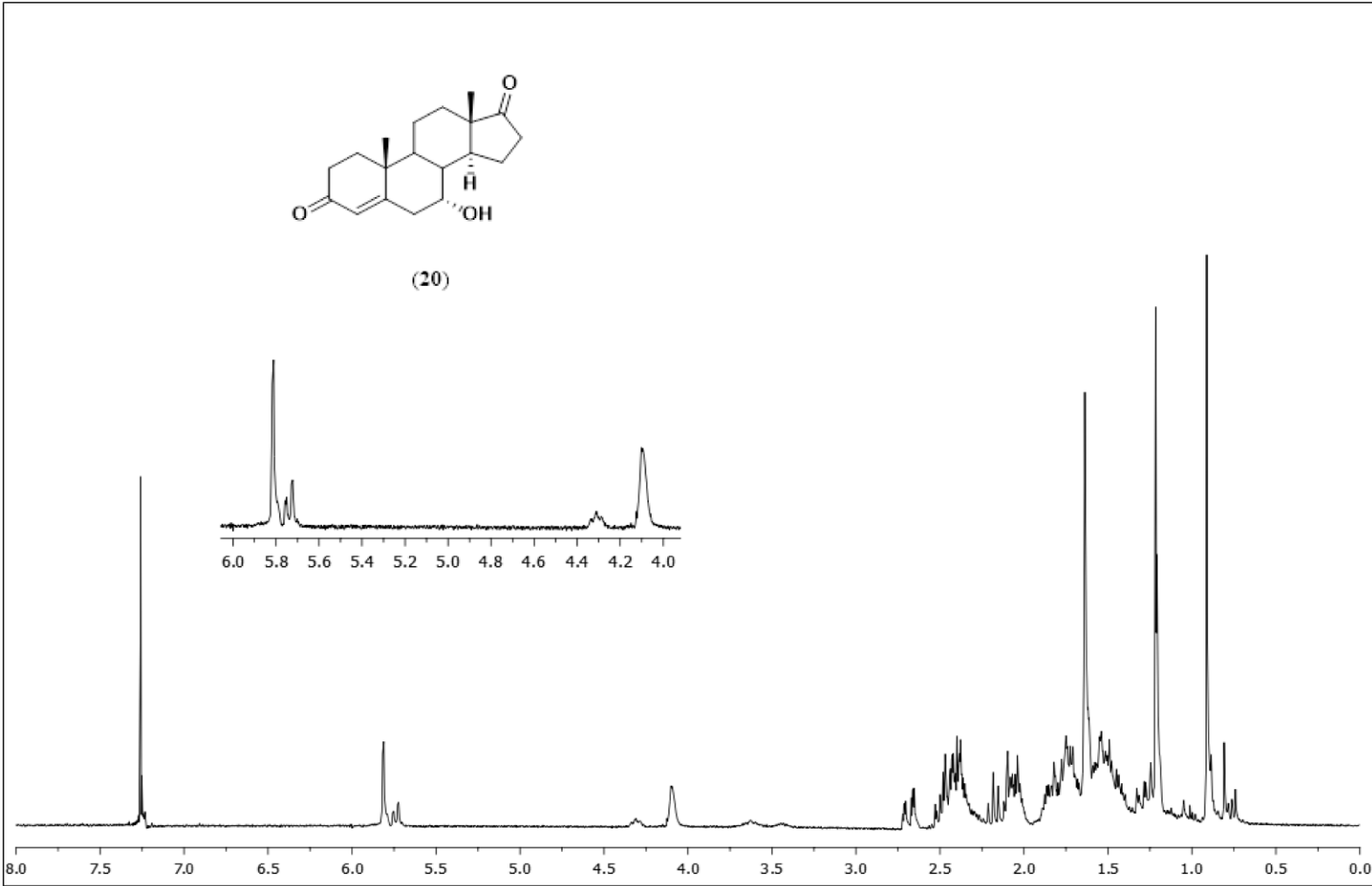
EK 22: 7 β -Hidroksiandrosta-4-en-3,17-dion (**19**) için ^1H NMR spektrumu



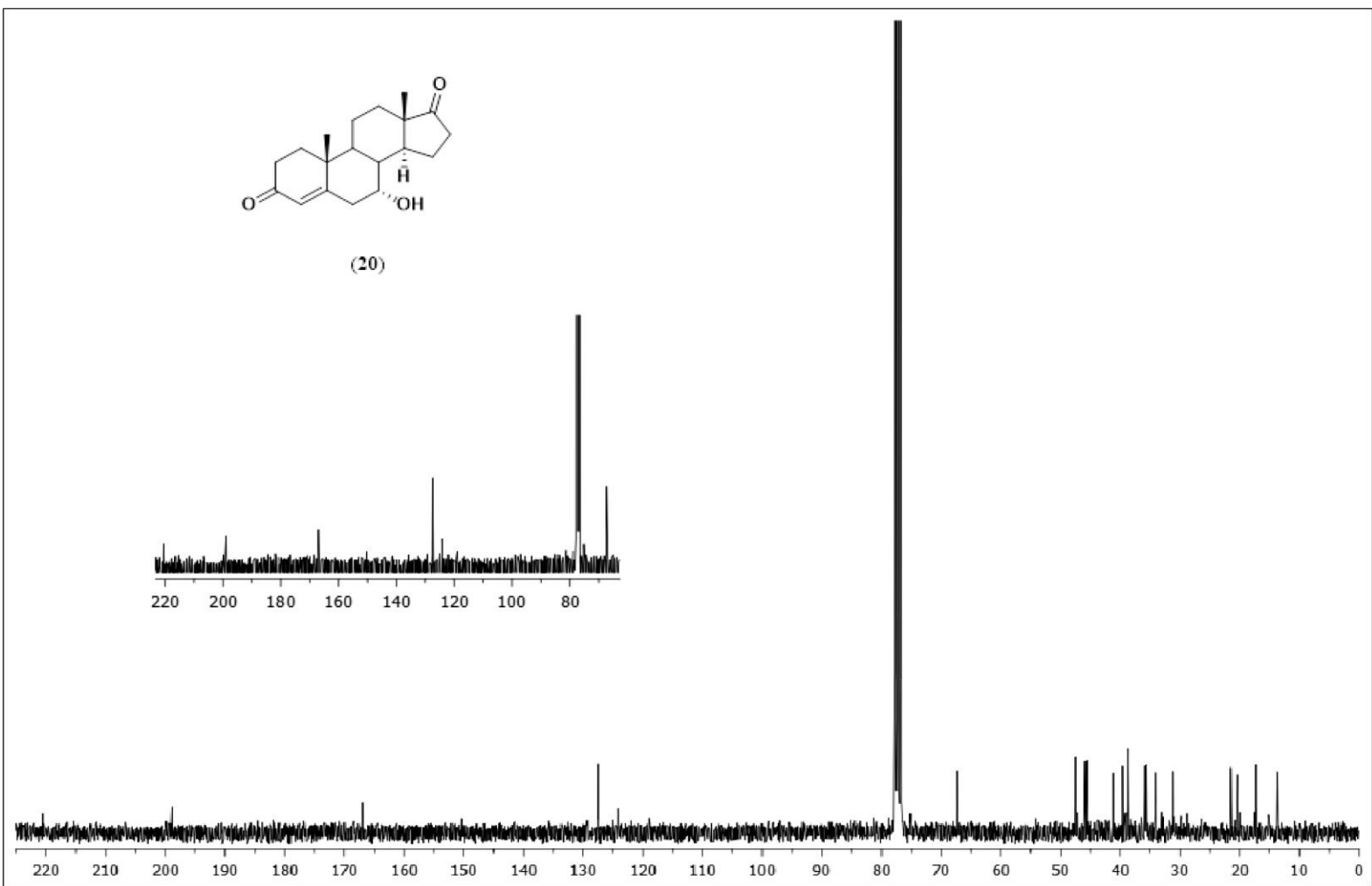
EK 23: 7 β -Hidroksiandrosta-4-en-3,17-dion (**19**) için ^{13}C NMR spektrumu



EK 24: 7 α -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (20) için ¹H NMR spektrumu



EK 25: 7 α -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**20**) için ^{13}C NMR spektrumu



ÖZGEÇMİŞ

Eda KÜÇÜKBAŞOL, 1992 yılında İstanbul'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini İstanbul'da tamamladı. 2010 yılında başladığı Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü 2014 yılında bitirdi. Yüksek lisans öğrenimine 2015 yılında Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında başladı. Meslek hayatına 2014 yılı eylül ayında İstanbul'da bir devlet lisesinde kimya öğretmeni olarak başladı. Buradaki görevine bir sene kadar devam etti. Daha sonra, iş hayatına, 2016 yılı ocak ayında Kocaeli'de Koruma Klor Alkali San. Ve Tic. A.Ş.'de Kalite Kontrol Sorumlusu olarak devam etti. Buradaki görevini bir sene dokuz ay kadar sürdürdü. Bu süreçte ek olarak Sakarya Üniversitesi Hendek Eğitim Fakültesinde Pedagojik Formasyon eğitimi aldı. O tarih itibariyle kişisel eğitimine ağırlık vermiş olup halen gelişimine devam etmektedir.