

T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NANDROLON BİLEŞİĞİNİN BAZI *ASPERGILLUS*  
TÜRLERİ İLE BİYOTRANSFORMASYONLARI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Çağla AYHAN**

**Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA**

**Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA**

**Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Kudret YILDIRIM**

**ARALIK 2012**

T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NANDROLON BİLEŞİĞİNİN BAZI ASPERGILLUS  
TÜRLERİ İLE BİYOTRANSFORMASYONLARI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Çağla AYHAN**

**Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA**

**Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA**

**Bu tez 29 / 01 / 2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.**



**Doç. Dr. Mehmet İŞLEYEN**  
Jüri Başkanı



**Doç. Dr. İlkay ŞİŞMAN**  
Üye



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

## TEŞEKKÜR

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

Laboratuvardaki 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 Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyelerine ve araştırma görevlilerine teşekkürlerimi sunarım.

Yaşamım boyunca maddi manevi her türlü desteği esirgemeyen ve her zaman her konuda yanımda olan aileme teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma SAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje no: 2012-50-01-009).

Aralık 2012  
Çağla AYHAN

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ÖZET.....	x
SUMMARY.....	xi
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.	
NANDROLON BİLEŞİĞİNİN KÜFLER İLE BİYOTRANSFORMASYONLARI.....	3
2.1. Doğal Ürünler.....	3
2.2. Steroidler.....	4
2.2.1. Androjenler.....	4
2.2.2. Nandrolon.....	7
2.3. Küfler ile Nandrolon Biyotransformasyonları.....	7
2.4. Çalışmanın Amacı.....	15
BÖLÜM 3.	
MATERYAL VE METOT.....	16
3.1. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler.....	16
3.2. Taze Yatık Agar Kültürlerinin Hazırlanması.....	17
3.3. Substratın <i>Aspergillus</i> Türleri ile Biyotransformasyonları.....	17

3.3.1. Substratın <i>A. wentii</i> ile biyotransformasyonu.....	17
3.3.2. Substratın <i>A. tamarii</i> ile biyotransformasyonu.....	18
BÖLÜM 4.	
DENEYSEL BULGULAR.....	20
BÖLÜM 5.	
SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	24
KAYNAKLAR.....	30
EKLER.....	34
ÖZGEÇMİŞ.....	49

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

bs	: Broad singlet (küt singlet)
<sup>0</sup> C	: Santigrat derece
cm	: Santimetre
<sup>13</sup> C NMR	: Karbon 13 Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
Δ	: Kimyasal kayma farkı
δ <sub>C</sub>	: <sup>13</sup> C NMR spektrumundaki kimyasal kayma
δ <sub>H</sub>	: <sup>1</sup> H NMR spektrumundaki kimyasal kayma
DMF	: Dimetilformamit
d	: Dublet
dd	: Dubletin dubleti
<sup>1</sup> H NMR	: Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
Hz	: Hertz
IR	: Infrared Spektroskopisi
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
<i>J</i>	: Etkileşme sabiti
lit.	: Literatür
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.	<i>R. arrhizus</i> ile steroid biyotransformasyonu .....	2
Şekil 2.1.	Bazı androjenlerin biosentezi.....	5
Şekil 2.2.	Bazı östrojenlerin androjenlerden biosentezi.....	6
Şekil 2.3.	<i>R. stolonifer</i> ile nandrolon (10) biyotransformasyonu.....	7
Şekil 2.4.	<i>R. nigricans</i> ile nandrolon (10) biyotransformasyonu.....	8
Şekil 2.5.	<i>R. arrhizus</i> ile nandrolon (10) biyotransformasyonu .....	8
Şekil 2.6.	<i>F. culmorum</i> ile nandrolon (10) biyotransformasyonu.....	8
Şekil 2.7.	<i>F. solani</i> ve <i>C. radicola</i> ile nandrolon (10) biyotransformasyonu..	9
Şekil 2.8.	<i>F. orhtoceras</i> ve bir <i>Penicillium</i> türü ile nandrolon (10) biyotransformasyonu.....	9
Şekil 2.9.	<i>P. decumbens</i> ile nandrolon (10) biyotransformasyonu.....	10
Şekil 2.10.	<i>P. notatum</i> ile nandrolon (10) biyotransformasyonu.....	10
Şekil 2.11.	<i>A. ochraceus</i> ve <i>B. bassiana</i> ile nandrolon (10) biyotransformasyonu.....	10
Şekil 2.12.	<i>A. tamaritii</i> ATCC 1005 ile nandrolon (10) biyotransformasyonu.....	11
Şekil 2.13.	<i>B. paeoniae</i> ile nandrolon (10) biyotransformasyonu.....	11
Şekil 2.14.	<i>B. cinerea</i> ile nandrolon (10) biyotransformasyonu.....	11
Şekil 2.15.	<i>H. kusanoi</i> ile nandrolon (10) biyotransformasyonu.....	12
Şekil 2.16.	<i>H. buchloes</i> ile nandrolon (10) biyotransformasyonu.....	12
Şekil 2.17.	<i>A. coerulea</i> ile nandrolon (10) biyotransformasyonu.....	12
Şekil 2.18.	<i>A. glauca</i> ile nandrolon (10) biyotransformasyonu.....	13
Şekil 2.19.	<i>T. hamatum</i> ile nandrolon (10) biyotransformasyonu.....	13
Şekil 2.20.	<i>C. lunata</i> ile nandrolon (10) biyotransformasyonu.....	14
Şekil 2.21.	<i>C. derriidis</i> ile nandrolon (10) biyotransformasyonu.....	14
Şekil 2.22.	<i>M. latebrosa</i> ile nandrolon (10) biyotransformasyonu.....	15

Şekil 2.23.	<i>H. aurantius</i> ile nandrolon ( <b>10</b> ) biyotransformasyonu.....	15
Şekil 2.24.	<i>C. aphidicola</i> ile nandrolon ( <b>10</b> ) iyotransformasyonu.....	15
Şekil 4.1.	Substrat karbon iskeletinin numaralandırılması.....	20
Şekil 4.2.	Substratın <i>A.wentii</i> ile biyotransformasyonu.....	20
Şekil 4.3.	Substratın <i>A. tamarii</i> ile biyotransformasyonu.....	22
Şekil 5.1.	Substratın <i>A.wentii</i> ile biyotransformasyonu.....	24
Şekil 5.2.	<i>A. wentii</i> MRC200316 ile testosteron ( <b>2</b> ) biyotransformasyonu.....	26
Şekil 5.3.	Substratın <i>A. tamarii</i> ile biyotransformasyonu.....	27
Şekil 5.4.	<i>C. lunata</i> ile nandrolon ( <b>10</b> ) biyotransformasyonu.....	29



## TABLULAR LİSTESİ

Tablo 5.1. Bileşiklerin $^{13}\text{C}$ NMR spektrumu sinyalleri .....	21
Tablo 5.2. Bileşiklerin $^1\text{H}$ NMR spektrumu sinyallerin karşılaştırılması.....	22

## ÖZET

Anahtar Kelimeler: Biyotransformasyon, *Aspergillus wentii*, *Aspergillus tamarii*, Nandrolon.

Bu çalışmada nandrolon (19-nortestosteron) bileşiğinin *Aspergillus wentii* MRC 200316 ve *Aspergillus tamarii* MRC 72400 küflerinde nasıl metabolize edileceğini incelemek için bileşiğin söz konusu küfler ile beş gün süren biyotransformasyonları gerçekleştirildi. *A. wentii* MRC 200316 ve *A. tamarii* MRC 72400 ile bileşiğin inkübasyonları üç ayrı metabolit verdi.

Substratın *A. wentii* MRC 200316 ile inkübasyonundan 10 $\beta$ -hidroksi-19-nortestosteron (%2), 6 $\beta$ -hidroksi-19-nortestosteron (%60) ve 14 $\alpha$ -hidroksi-19-nortestosteron (%5) bileşikleri elde edildi. Substratın *A. tamarii* MRC 72400 ile inkübasyondan ise 19-norandrost-4-en-3,17-dion (%4), 19-nortestolakton (%75) ve 11 $\beta$ -hidroksi-19-nortestolakton (%5) bileşikleri elde edildi. Metabolitlerin yapı tayinleri nandrolon ile metabolitlerin erime noktaları, NMR ve IR spektrumları karşılaştırılarak gerçekleştirildi.

# THE BIOTRANSFORMATION OF NANDROLONE BY SOME ASPERGILLUS SPECIES

## SUMMARY

Keywords : Biotransformation, *Aspergillus wentii*, *Aspergillus tamaraii*, Nandrolone.

In this work, nandrolone (19-nortestosterone) was incubated with *Aspergillus wentii* MRC 200316 and *Aspergillus tamaraii* MRC 72400 in order to see how it would be metabolized by these two fungi. Incubations of nandrolone with *A. wentii* MRC 200316 and *A. tamaraii* MRC 72400 both fungi afforded three different metabolites.

Incubation of nandrolone with *A. wentii* 200316 afforded 10 $\beta$ -hydroxy-19-nortestosterone (2%), 6 $\beta$ -hydroxy-19-nortestosterone (60%) ve 14 $\alpha$ -hydroxy-19-nortestosterone (5%). Incubation of nandrolone with *A. tamaraii* 72400 afforded 19-norandrost-4-en-3,17-dion (4%), 19-nortestolakton (75%) ve 11 $\beta$ -hidroksi-19-nortestolakton (5%). The structures of the metabolites were elucidated by comparing melting points, NMR and IR spectra of nandrolone with those of metabolites.

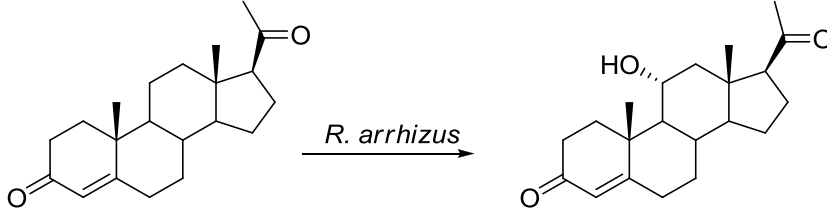
## BÖLÜM 1. GİRİŞ

Canlıların kendi doğal substratları olmayan maddeler üzerinde enzimleri veya bu enzimleri içeren mikroozomlar, hücre kültürleri, doku kültürleri, organ kültürleri, mikroorganizmalar ya da mikroorganizma sporları gibi biyolojik sistemler sayesinde meydana getirdiği kimyasal değişikliklere biyotransformasyonlar adı verilir. Sirke üretiminde etil alkolün bakteriler tarafından asetik aside oksidasyonu ve şekerin bira mayası tarafından etil alkole dönüştürülmesi en eski ve en iyi bilinen biyotransformasyonlara örnek olarak verilebilir [1].

Günümüzde biyotransformasyonlar için daha çok mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Bunun en önemli sebepleri arasında mikroorganizmalar ile gerçekleştirilen biyotransformasyonların çevre dostu olmaları, daha kısa sürede ve daha ucuza mal edilmeleri ile erlenden fabrika fermentörüne kadar çeşitli ortamlarda gerçekleştirilebilmeleri sayılabilir. Mikroorganizmalar biyotransformasyonlar için serbest veya uygun yüzeylere sabitlenmiş olarak kullanılabilir ve en yaygın olarak kullanılan mikroorganizma grupları küfler, mayalar, bakteriler ve mikrobiyal alglerdir [2].

Mikroorganizmalar içerdikleri spesifik olmayan enzim sistemleri sayesinde hem doğal hem de sentetik birçok substrat üzerinde çok sayıda farklı kimyasal reaksiyonlar gerçekleştirebilirler. Biyotransformasyon reaksiyonlarının en önemlilerinden birisi mikrobiyal hidroksilasyondur [1]. Mikrobiyal hidroksilasyonun önemi ilk olarak iltihap giderici olarak kullanılan kortikal steroidlerin sentezinde ortaya çıkmıştır [1,3]. Kortikal steroidlerin sentezinde fonksiyonel grupların oldukça uzakta bulunan C-11 pozisyonuna bir oksijen fonksiyonu yerleştirmek klasik kimyasal yöntemlerle oldukça uzun ve masraflı bir işlemdir. Bu sorunun 1950'li yıllarda *Rhizopus arrhizus* küfü ile hidroksilasyon sayesinde tek basamakta ve

yüksek verimli olarak çözülmesi (Şekil 1.1) dikkatleri mikrobiyal biyotransformasyonlar üzerine çekmiştir [1].



Şekil 1.1. *R. arrhizus* ile steroid biyotransformasyonu

Mikrobiyal hidroksilasyonun öneminin anlaşılmasından sonra steroidler ve diğer birçok farklı madde üzerinde çok sayıda değişik mikroorganizma ile hidrolitik reaksiyonlar,  $5\alpha$ -redüksiyonları, mikrobiyal Baeyer-Villiger oksidasyonları, mikrobiyal kondensasyonlar, izomerleşme gibi yeni biyotransformasyon reaksiyonları gerçekleştirilmiştir [1,4]. Elde edilmeleri klasik sentez yöntemleri ile uzun sürede ve oldukça maliyetli olan steroidal ilaçlar ve steroid hormonlar gibi çok sayıdaki önemli kimyasal maddeler mikrobiyal biyotransformasyonlar ile kolayca ve ucuza üretilmektedir. Bu amaç doğrultusunda halen birçok steroid özellikle farklı küf türleri ile biyotransformasyonlara maruz bırakılmaktadır [4].

## **BÖLÜM 2. NANDROLON BİLEŞİĞİNİN KÜFLER İLE BİYOTRANSFORMASYONLARI**

### **2.1. Doğal Ürünler**

Canlıların bünyesindeki organik bileşikler üç ayrı temel gruba ayrılabilir. Birinci gruba, bütün canlılarda ortak olan, canlıların büyüme ve gelişmelerinde merkezi rol oynayan primer metabolitler adı verilen bileşikler girer. İkinci gruba selüloz, ligninler ve proteinler gibi hücresel yapıları oluşturan yüksek moleküler ağırlıklı biyopolimerler girer. Üçüncü gruba ise canlıların büyüme ve gelişmelerinde elzem olmayan sekonder metabolizmanın bileşenleri olan, doğal ürünler veya sekonder metabolitler olarak da adlandırılan ve sadece bir veya belirli birkaç tür için karakteristik olan bileşikler girer [5].

Doğal ürünler her ne kadar hayat için elzem olmasalar da kendilerini içeren canlıların hayatta kalmalarına yardımcı olurlar ve daha çok diğer canlılar üzerindeki etkileri sebebi ile dikkat çekerler. Bu bileşikler hemen her grup canlıda bulunmalarına rağmen özellikle bitkiler, mikroorganizmalar, mantarlar ve böcekler de daha yaygın olarak gözlenirler [5,6].

Doğal ürünler özellikle bitkiler, mikroorganizmalar, böcekler ve diğer hayvanlar arasındaki etkileşimlerin düzenlenmesinde ekolojik role sahip olan bileşiklerdir. Bunlar genellikle stres şartlarında devreye giren savunma maddeleri, hoş olmayan tatları ile otçullar tarafından tüketilmeyi önleyen bileşikler, diğer canlıları buldukları canlılara çeken renkli ve kokulu bileşikler ve özellikle böcekler gibi bazı hayvanlar arasında iletişimi sağlayan feromonlar olarak görev yaparlar [6].

Doğal ürünler ilk bakışta çok sayıda ve birbirinden yapıcı farklı bileşikler olmasına rağmen bu bileşiklerin çoğu genellikle doğadaki biyosentezlerinden kaynaklanan

bazı özel yapısal karakterlerinden dolayı poliketidler, yağ asitleri türevleri, terpenler, steroidler, fenolik bileşikler, alkaloidler, amino asit türevleri ve özelleşmiş peptidler gibi sınıflardan birine dahil edilirler [1].

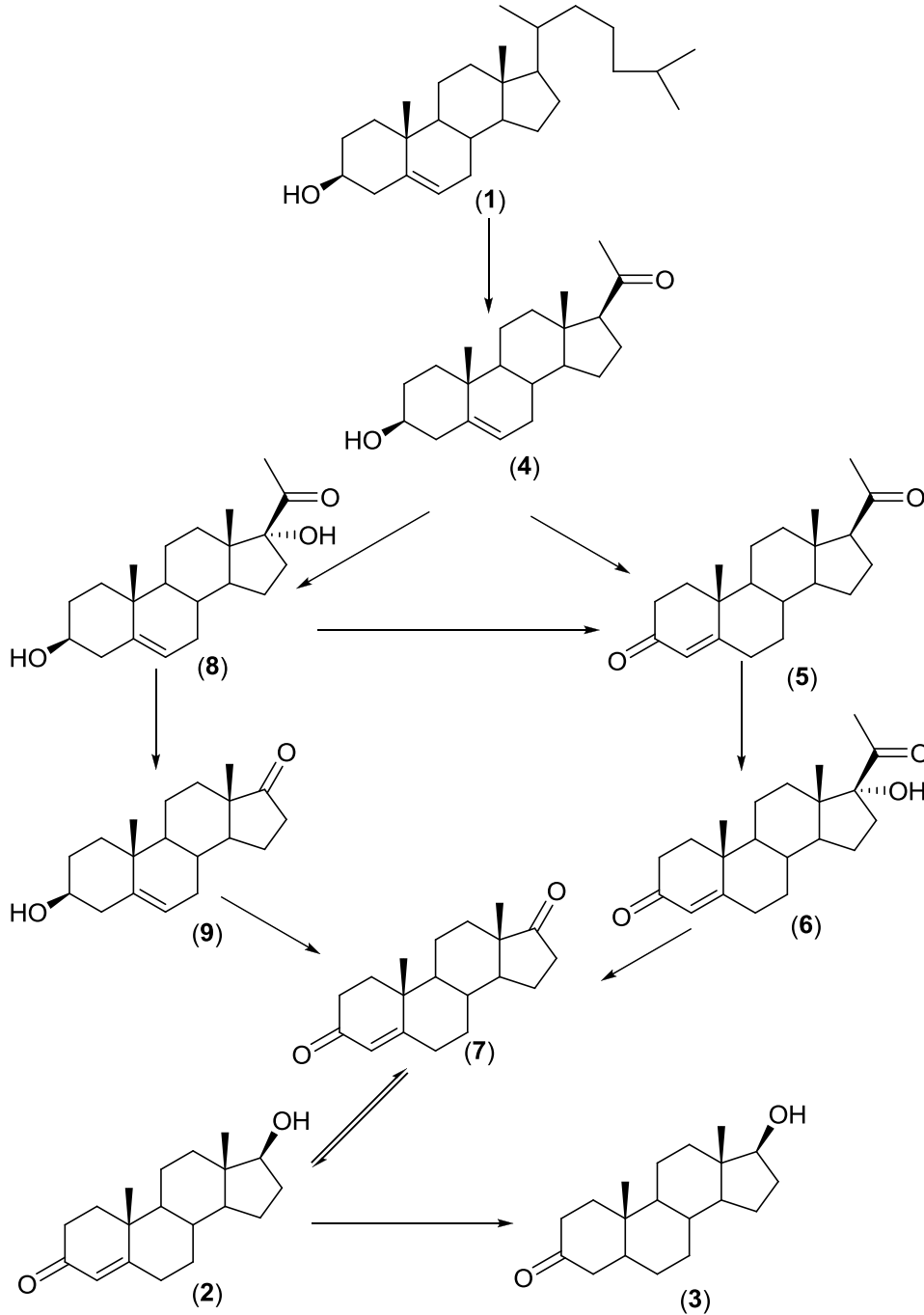
## 2.2. Steroidler

Doğal ürünlerin önemli bir sınıfı olan steroidlerin en yaygın temsilcilerinden birisi kolesteroldür (1). Kolesterol (1) insan ve hayvan membranlarındaki akışkanlığının düzenlenmesinde oldukça önemlidir. Kolesterol (1) ayrıca steroid hormonlar, safra asitleri ve D<sub>3</sub> vitamini gibi birçok hayati fonksiyonu bulunan bileşiğin de başlangıç maddesidir. Kolesterol (1) kökenli steroid hormonlar glukokortikoidler, mineralokortikoidler, androjenler, östrojenler ve progestagenler (progestinler) olmak üzere beş ana sınıfta 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 [7,8].

### 2.2.1. Androjenler

Androjenler erkek bireylerde 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 2.1). Adenohipofizden salınan LH (lüteinleştirici hormon) kolesterolden (1) pregnenolon (4) sentezini uyarmaktadır. LH salınması ise kandaki serbest testosteron düzeyi tarafından düzenlenir. Pregnenolon (4) üzerinden androjenlerin biyosentezi  $\Delta^4$  yolu ve  $\Delta^5$  yolu olmak üzere iki ayrı şekilde gerçekleşmektedir. Androjen biyosentezinin ana yolu  $\Delta^4$  yoludur. Bu yolda pregnenolon (4) önce progesterona (5) dönüştürülür. Progesteron (5) ise daha sonra 17 $\alpha$ -hidroksiprogerona (6) dönüştürülür. 17 $\alpha$ -Hidroksiprogeron (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 [8].



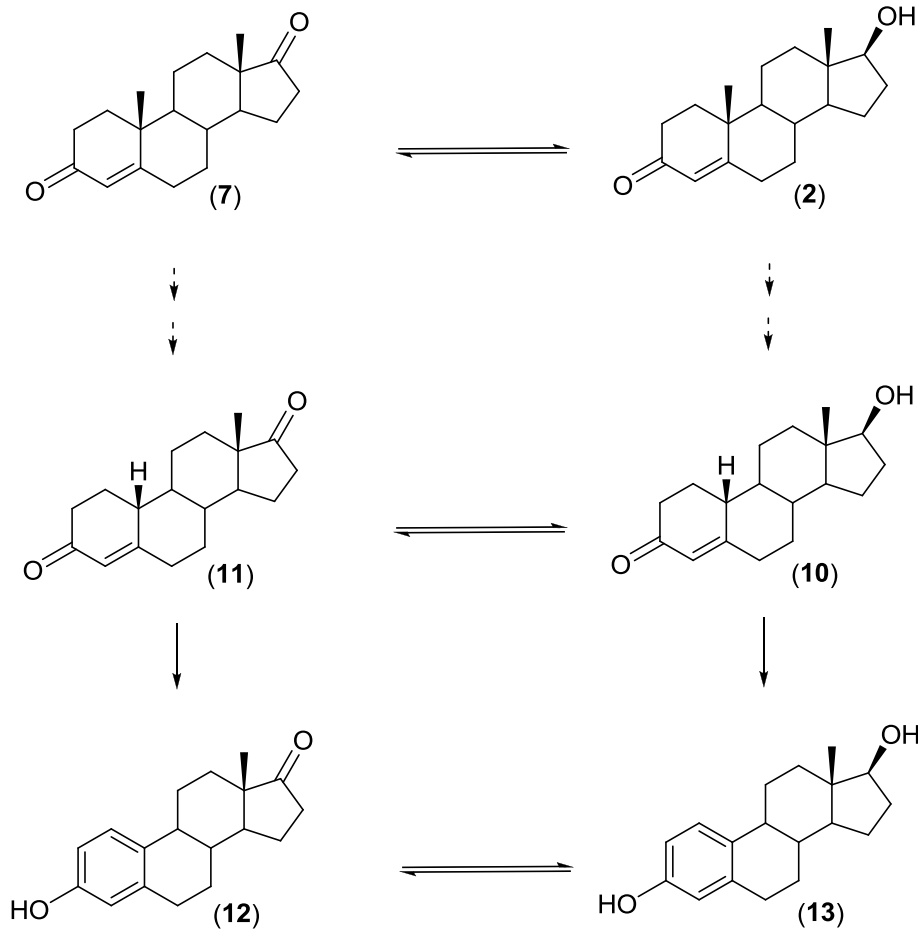
Şekil 2.1. Bazı androjenlerin biyosentezi.

Bir yan yol olan  $\Delta^5$  yolunda 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 [8].

Dişi bireylerde etkili eşey hormonları olan östrojenler ise aromataz enzimi varlığında androjenlerden sentezlenir (Şekil 2.2.). Bu sentez esnasında birbirlerine de dönüşebilen androjenler olan testosteron (2) ve androst-4-en-3,17-dion (7) bileşikleri iki ayrı basamak üzerinden sırası ile nandrolon (10) ile 19-norandrost-4-en-3,17-dion (11) bileşiklerine çevrilir. Enzimatik olarak birbirlerine de dönüşebilen 19-norandrostendion (11) ile nandrolon (10) daha sonra sırası ile östron (12) ve östradiol (13) östrojenlerine çevrilir. Östron (12) ve östradiol (13) hormonları da enzimatik olarak birbirlerine çevrilebilmektedir [9].



Şekil 2.2. Bazı östrojenlerin androjenlerden biyosentezi.

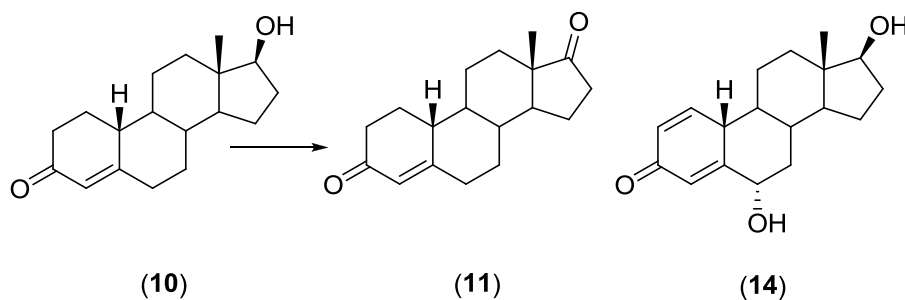
### 2.2.2. Nandrolon

Nandrolon (**10**) yada diğ er adı ile 19-nortestosteron bileş iğ i 19 $\beta$ -metil grubu iç ermez. Bu tip 19 $\beta$ -metil grubu iç ermeyen steroidlere norsteroidler adı verilir ve norsteroidler androjenik etkili anabolik bileş iklerdir. Nandrolon (**10**) bileş iğ i ç ok az miktarda da olsa (<0,6ng mL<sup>-1</sup>) hem erkek hem de diş i bireylerde doç al olarak oluş maktadır. Nandrolon (**10**) ve bazı esterleri ayrıca bir takım rahatsızlıklara karş i tıbbi tedavi amacı ile kullanılmaktadır. Buna rağ men aynı bileş ikler kas kütlesi ve performans artırıcı yani anabolik etkilerinden dolayı bazı sporcular tarafından doping maddeleri olarak da kullanılmaktadır. Bugüne kadar birç ok ünlü sporcu nandrolon metabolitlerinin idrarlarında belirli bir düzeyin (erkeklerde 2 ng/mL ve bayanlarda 5 ng/mL) üzerinde ç ıkması yüzünden kariyerini sıfırlamış tır [9].

### 2.3. Küfler ile Nandrolon Biotransformasyonları

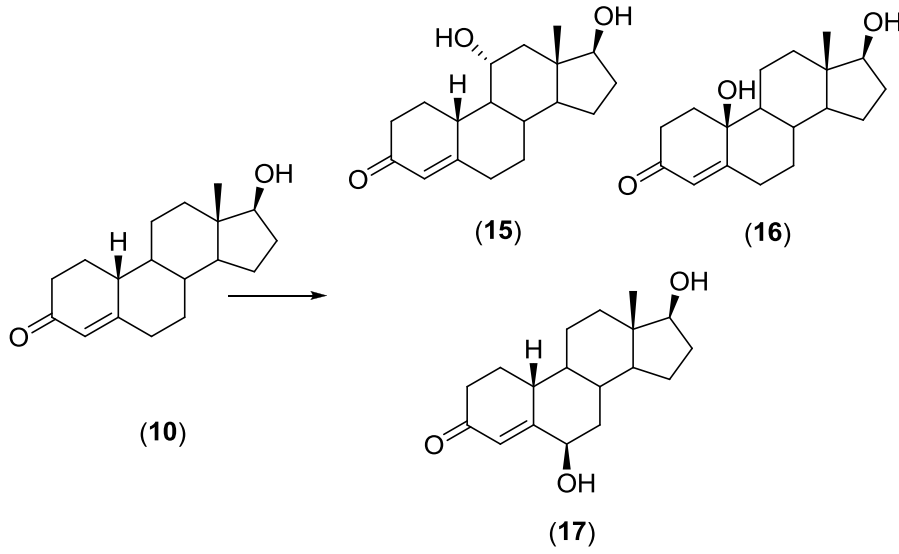
Literatürde nandrolon (**10**) bileş iğ inin farklı küf türleri ile biyotransformasyonuna yönelik ç ok sayıda ç alış ma mevcuttur [10-31]. Sö z konusu ç alış malar ç ok sayıda farklı metabolitler ile sonuçlanmış tır.

*Rhizopus stolonifer* ile nandrolon (**10**) biyotransformasyonundan (Ş ekil 2.3.) 19-norandrost-4-en-3,17-dion (**11**) ve 6 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihidroksi-19-norandrost-1,4-dien-3-on (**14**) bileş ikleri elde edilmiş tir [10].



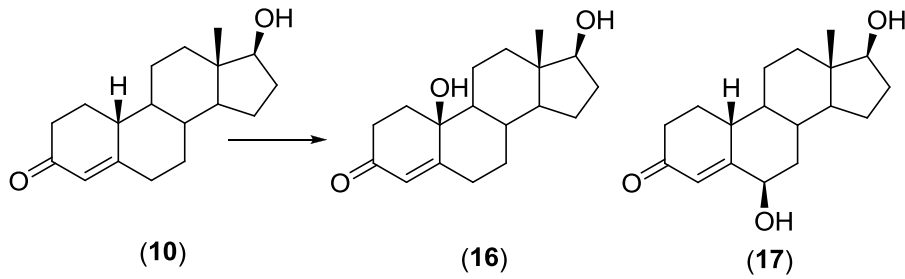
Ş ekil 2.3. *R. stolonifer* ile nandrolon (**10**) biyotransformasyonu.

*Rhizopus nigricans* ile nandrolon (**10**) ile biyotransformasyonu (Ş ekil 2.4.) sonucu 11 $\alpha$ -hidroksi-19-nortestosteron (**15**), 10 $\beta$ -hidroksi-19-nortestosteron (**16**) ve 6 $\beta$ -hidroksi-19-nortestosteron (**17**) bileş iklerini vermiş tir [11].



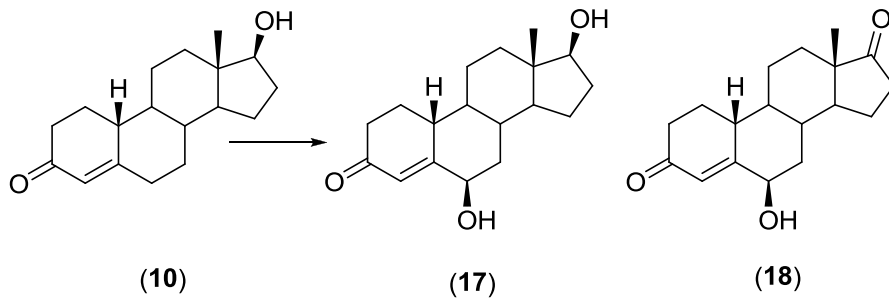
Şekil 2.4. *R. nigricans* ile nandrolon (10) biyotransformasyonu.

*Rhizopus arrhizus* ile nandrolon (10) biyotransformasyonu (Şekil 2.5.) 10β-hidroksi-19-nortestosteron (16) ve 6β-hidroksi-19-nortestosteron (17) bileşikleriyle sonuçlanmıştır [12].



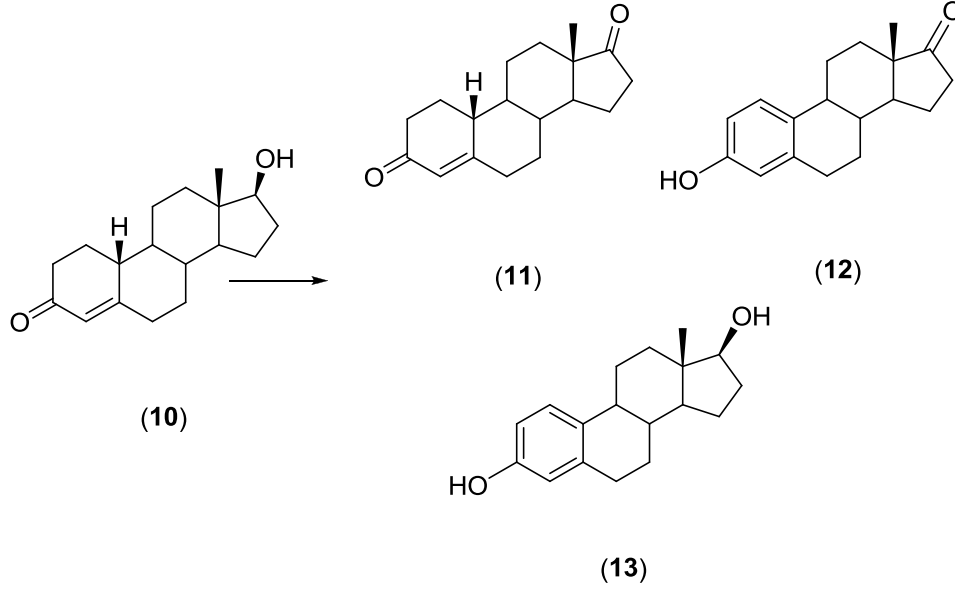
Şekil 2.5. *R. arrhizus* ile nandrolon (10) biyotransformasyonu.

*Fusarium culmorum* ile nandrolon (10) biyotransformasyonu (Şekil 2.6.) 6β-hidroksi-19-nortestosteron (17) ve 6β-hidroksi-19-norandrost-4-en-3,17-dion (18) bileşiklerini vermiştir [13].



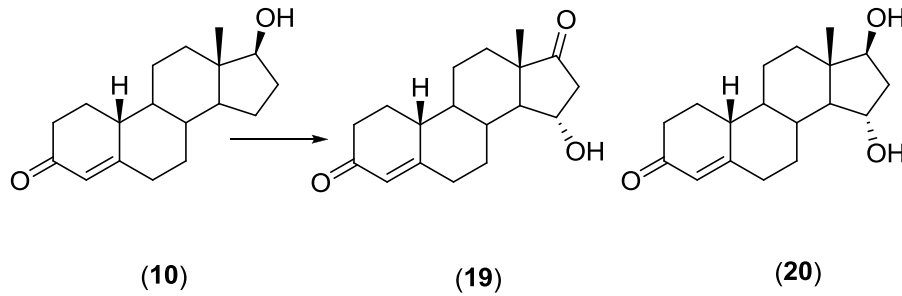
Şekil 2.6. *F. culmorum* ile nandrolon (10) biyotransformasyonu.

*Fusarium solani* [14] ve *Cylindrocarpon radicola* [15] ile nandrolon (10) biyotransformasyonları (Şekil 2.7.) sonucunda 19-norandrost-4-en-3,17-dion (11), östron (12) ve östradiol (13) bileşikleri elde edilmiştir.



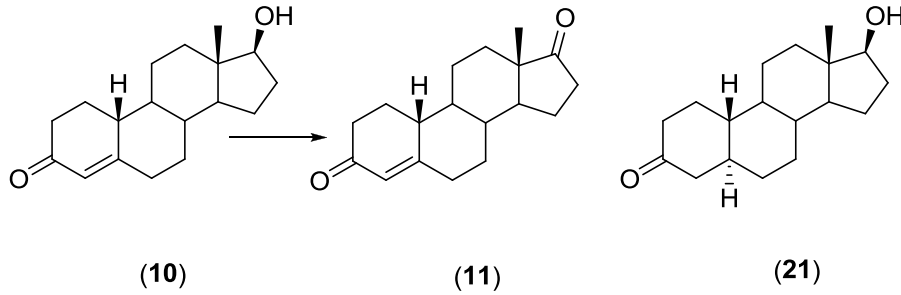
Şekil 2.7. *F. solani* ve *C. radicola* ile nandrolon (10) biyotransformasyonu.

*Fusarium orhtoceras* ve bir *Penicillium* türü ile nandrolon (10) biyotransformasyonları (Şekil 2.8.) 15 $\alpha$ -hidroksi-19-norandrost-4-en-3,17-dion (19) ve 15 $\alpha$ -hidroksi-19-nortestosteron (20) bileşikleriyle sonuçlanmıştır [16].



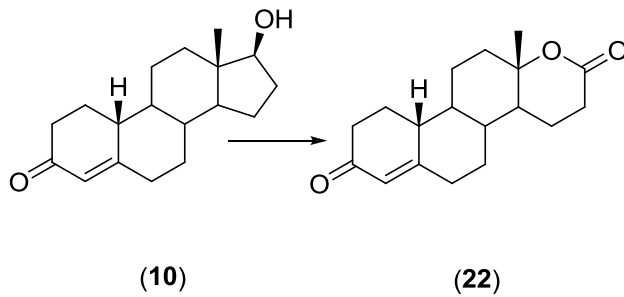
Şekil 2.8. *F. orhtoceras* ve bir *Penicillium* türü ile nandrolon (10) biyotransformasyonu.

*Penicillium decumbens* ile nandrolon (10) biyotransformasyonundan (Şekil 2.9.) 19-norandrost-4-en-3,17-dion (11) ve 19-nor-5 $\alpha$ -dihidrotestosteron (21) bileşikleri elde edilmiştir [17].



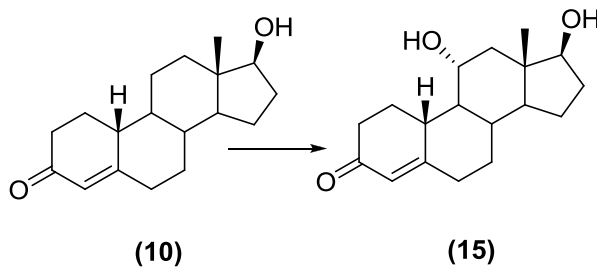
Şekil 2.9. *P. decumbens* ile nandrolon (10) biyotransformasyonu.

*Penicillium notatum* ile nandrolon (10) biyotransformasyonu (Şekil 2.10.) neticesinde 19-nortestolakton (22) bileşiği yüksek bir verimle (%96) elde edilmiştir [18].



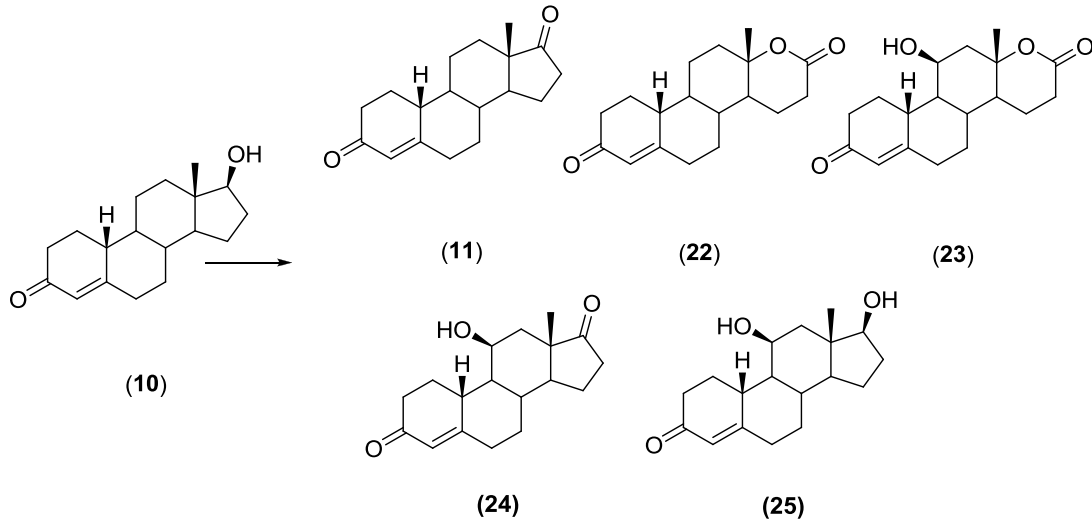
Şekil 2.10. *P. notatum* ile nandrolon (10) biyotransformasyonu.

*Aspergillus ochraceus* [19] ve *Beauveria bassiana* [20] ile nandrolon (10) biyotransformasyonları (Şekil 2.11.) 11 $\alpha$ -hidroksi-19-nortestosteron (15) bileşiği ile sonuçlanmıştır.



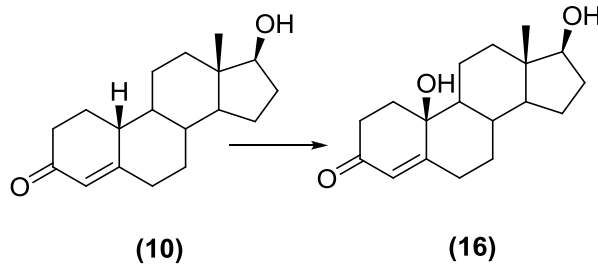
Şekil 2.11. *A. ochraceus* ve *B. bassiana* ile nandrolon (10) biyotransformasyonu.

*Aspergillus tamarii* ATCC 1005 küfü ile nandrolon (10) biyotransformasyonu (Şekil 2.12.) 19-norandrost-4-en-3,17-dion (11), 19-nortestolakton (22), 11 $\beta$ -hidroksi-19-nortestolakton (23), 11 $\beta$ -hidroksi-19-norandrost-4-en-3,17-dion (24) ve 11 $\beta$ -hidroksi-19-nortestosteron (25) bileşiklerini vermiştir [21]. *Aspergillus flavus* ile nandrolon (10) biyotransformasyonu ise değişmeyen başlangıç maddesi ile sonuçlanmıştır [22].



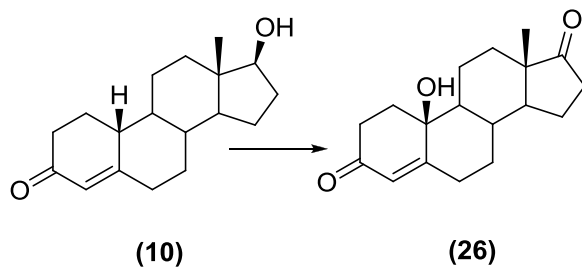
Şekil 2.12. *A. tamarii* ATCC 1005 ile nandrolon (10) biyotransformasyonu.

*Botrytis paeoniae* ile nandrolon (10) biyotransformasyonu (Şekil 2.13.) 10β-hidroksi-19-nortestosteron (16) bileşiğini vermiştir [19].



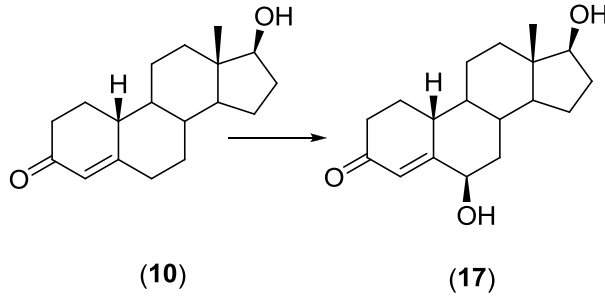
Şekil 2.13. *B. paeoniae* ile nandrolon (10) biyotransformasyonu.

*Botrytis cinerea* küfö ile nandrolon (10) biyotransformasyonundan (Şekil 2.14.) 10β-hidroksi-19-norandrost-4-ene-3,17-dion (26) bileşiği elde edilmiştir [23].



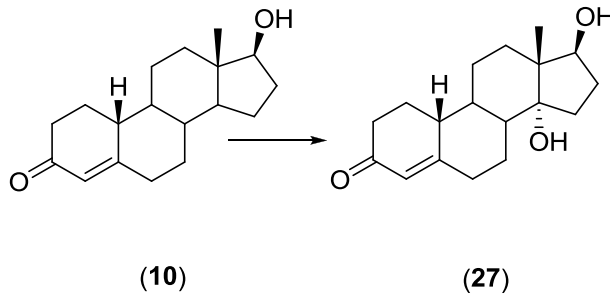
Şekil 2.14. *B. cinerea* ile nandrolon (10) biyotransformasyonu.

*Helminthosporium kusanoi* küfö ile nandrolon (10) biyotransformasyonu (Şekil 2.15.) 6β-hidroksi-19-nortestosteron (17) bileşiği ile sonuçlanmıştır [24].



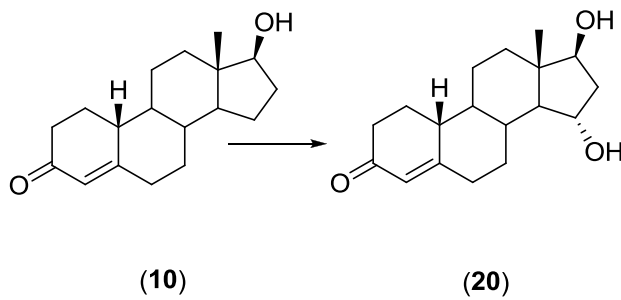
Şekil 2.15. *H. kusanoi* ile nandrolon (10) biyotransformasyonu.

*Helminthosporium buchloes* ile nandrolon (10) biyotransformasyonu (Şekil 2.16.) ise 14 $\alpha$ -hidroksi-19-nortestosteron (27) bileşiğini vermiştir [24].



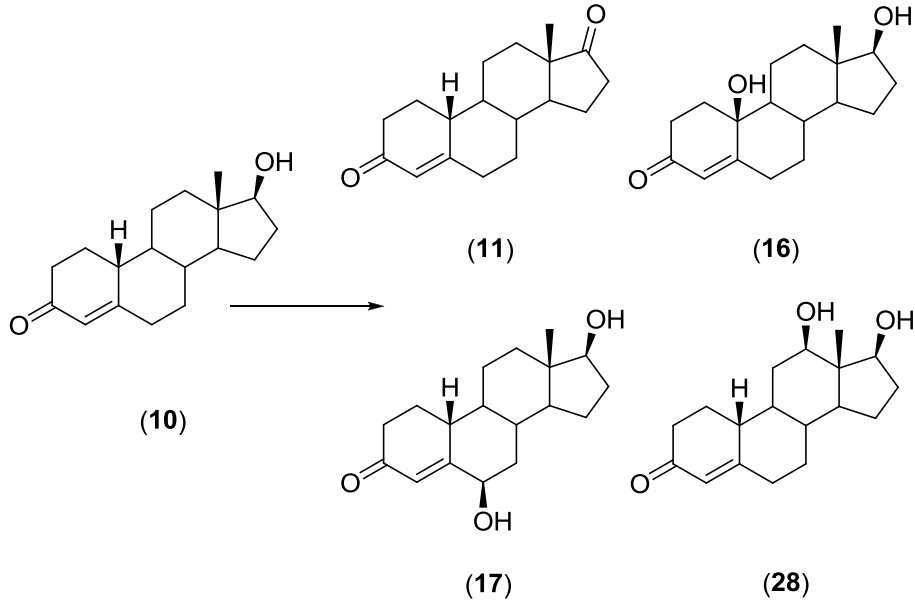
Şekil 2.16. *H. buchloes* ile nandrolon (10) biyotransformasyonu.

*Absidia coerulea* ile nandrolon (10) biyotransformasyonu (Şekil 2.17.) neticesinde 15 $\alpha$ -hidroksi-19-nortestosteron (20) bileşiği elde edilmiştir [25].



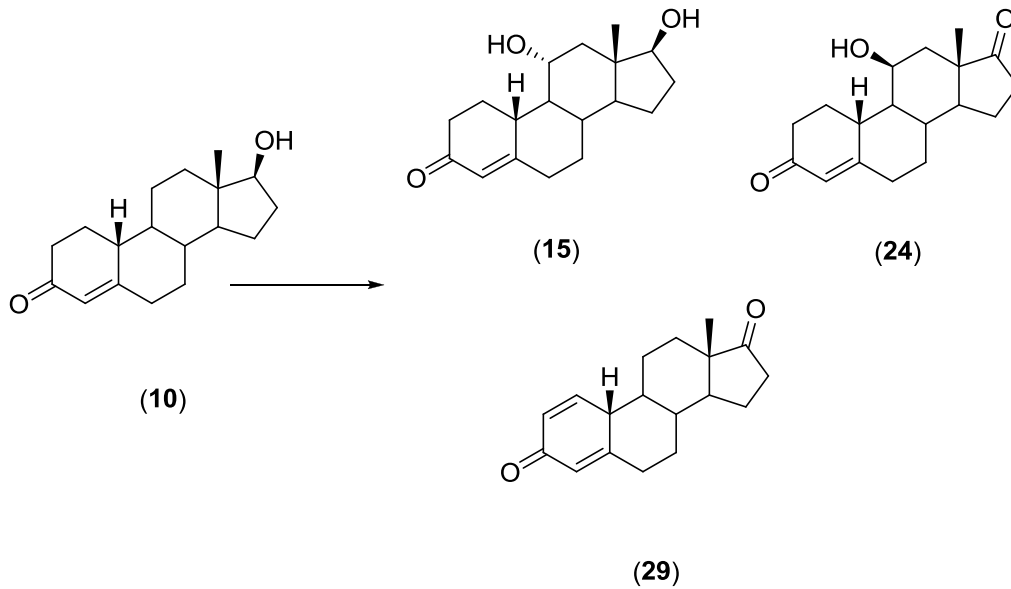
Şekil 2.17. *A. coerulea* ile nandrolon (10) biyotransformasyonu.

*Absidia glauca* ile nandrolon (10) biyotransformasyonu (Şekil 2.18.) 19-norandrost-4-en-3,17-dion (11), 10 $\beta$ -hidroksi-19-nortestosteron (16), 6 $\beta$ -hidroksi-19-nortestosteron (17) ve 12 $\beta$ -hidroksi-19-nortestosteron (28) bileşiklerini vermiştir [26].



Şekil 2.18. *A. glauca* ile nandrolon (10) biyotransformasyonu.

*Trichoderma hamatum* ile nandrolon (10) biyotransformasyonu (Şekil 2.19.) 11 $\alpha$ -hidroksi-19-nortestosteron (15), 11 $\beta$ -hidroksi-19-norandrost-4-en-3,17-dion (24) ve 19-norandrost-1,4-dien-3,17-dion (29) bileşikleri ile sonuçlanmıştır [27].

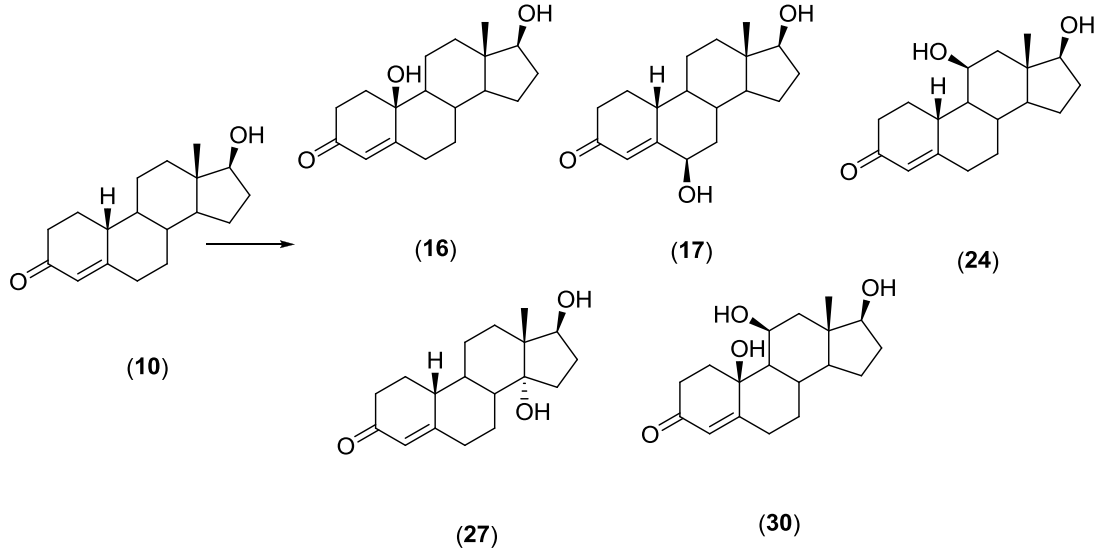


Şekil 2.19. *T. hamatum* ile nandrolon (10) biyotransformasyonu.

*Curvularia lunata* ile nandrolon (10) biyotransformasyonu (Şekil 2.20.) neticesinde 10 $\beta$ -hidroksi-19-nortestosteron (16) 6 $\beta$ -hidroksi-19-nortestosteron (17), 11 $\beta$ -hidroksi-

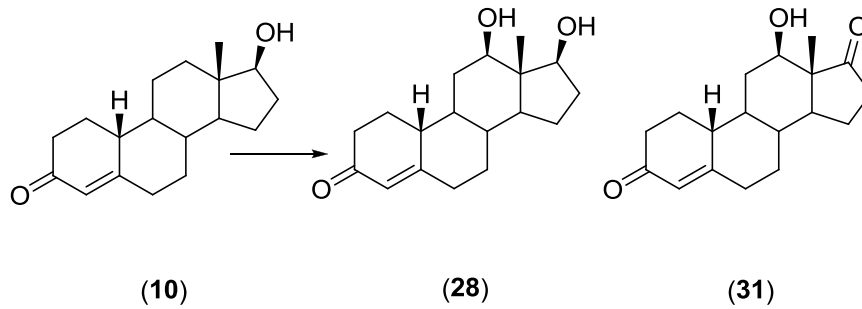


19-nortestosteron (**24**), 14 $\alpha$ -hidroksi-19-nortestosteron (**27**) ve 10 $\beta$ ,11 $\beta$ -dihidroksi-19-nortestosteron (**30**) bileşikleri elde edilmiştir [28].



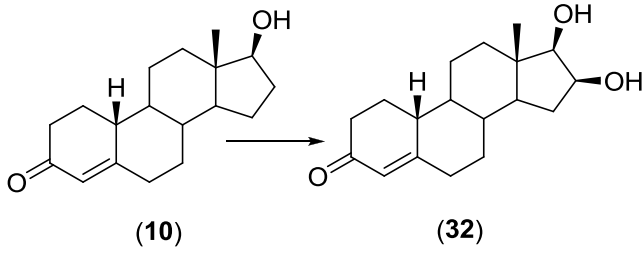
Şekil 2.20. *C. lunata* ile nandrolon (**10**) biyotransformasyonu.

*Colletotrichum derridis* ile nandrolon (**10**) biyotransformasyonu (Şekil 2.21.) 12 $\beta$ -hidroksi-19-nortestosteron (**28**) ve 12 $\beta$ -hidroksi-19-norandrost-4-en-3,17-dion (**31**) bileşiklerini vermiştir [29].



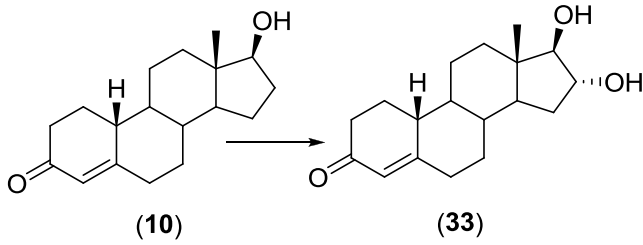
Şekil 2.21. *C. derridis* ile nandrolon (**10**) biyotransformasyonu.

*Mycosphaerella latebrosa* ile nandrolon (**10**) biyotransformasyonu (Şekil 2.22.) sonucu 16 $\beta$ -hidroksi-19-nortestosteron (**32**) bileşiği elde edilmiştir [30].



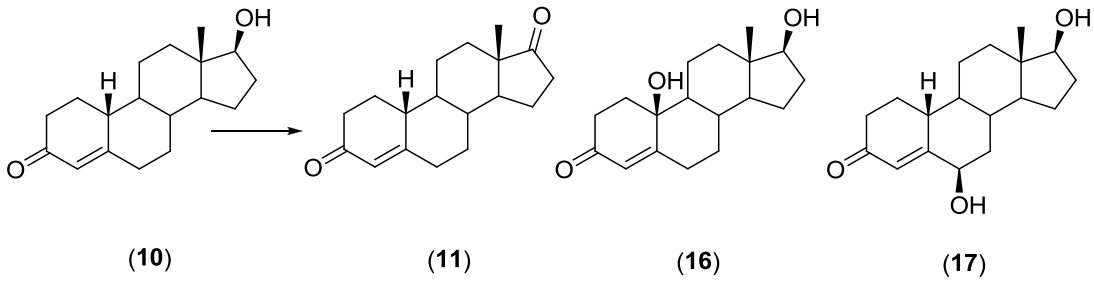
Şekil 2.22. *M. latebrosa* ile nandrolon (10) biyotransformasyonu.

*Hypomyces aurantius* ile nandrolon (10) biyotransformasyonu (Şekil 2.23.) 16 $\alpha$ -hidroksi-19-nortestosteron (33) bileşiğini vermiştir [30].



Şekil 2.23. *H. aurantius* ile nandrolon (10) biyotransformasyonu.

*Cephalosporium aphidicola* ile nandrolon (10) biyotransformasyonu (Şekil 2.24.) sonucunda 19-norandrost-4-en-3,17-dion (11), 10 $\beta$ -hidroksi-19-nortestosteron (16) ve 6 $\beta$ -hidroksi-19-nortestosteron (17) bileşikleri elde edilmiştir [31].



Şekil 2.24. *C. aphidicola* ile nandrolon (10) biyotransformasyonu.

## 2.4. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı nandrolon (10) bileşiğinin *Aspergillus wentii* MRC 200316 ve *Aspergillus tamarii* MRC 72400 küflerinde nasıl metabolize edileceğinin incelenmesidir.

## 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 ve 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 kromatografisi 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 Elektro thermal IA 9200 erime noktası tayin cihazı ile tespit edildi.

*Aspergillus wentii* MRC 200316 ve *Aspergillus tamarii* MRC 72400 küfleri 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. Nandrolon (**10**) bileşiği Sigma-Aldrich şirketinden satın alındı. Tüm solventler,

yatık agar besiyerleri için kullanılan PDA ve agar ile küfler için hazırlanan besiyerinde kullanılan malt ekstrakt 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 15 günde bir 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. Substratın *Aspergillus* Türleri ile Biyotransformasyonları**

#### **3.3.1. Substratın *A. wentii* ile biyotransformasyonu**

*Aspergillus wentii* besiyeri hazırlamak için sukroz (15 g), glukoz (15 g), polipepton (5 g), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.5 g), KCl (0.5 g), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1 g) ve FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (10 mg) 1 litre distile suda çözüldükten sonra pH 7.2'ye ayarlandı [32]. Bu şekilde 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 2 gün boyunca 27°C'de çalkalamalı inkübatörde (150 rpm) inkübasyona bırakıldı.

Nandrolon (**10**) (1 g) DMF (10 mL) içerisinde çözünerek yeterli miktarda küf içeren erlenlere eşit hacimlerde, steril koşullar altında ilave edildikten sonra 5 gün süresince 27 °C' de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona 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 doyunlaştırıldıktan 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 yağimsı bir madde (1453 mg) elde edildi.

Yağimsı madde daha sonra silika jel 60 üzerinde kolon kromatografisine tabi tutuldu. Kolondan %50 ve %60'lık çözgen sistemleriyle elüsyonlar neticesinde farklı polaritelere sahip üç ayrı bileşik elde edildi.

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

### **3.3.2. Substratın *A. tamarii* ile biyotransformasyonu**

% 3'lük 1 L malt ekstrakt besiyeri [33] 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 2 gün boyunca 24°C'de çalkalamalı inkübatörde (180 rpm) inkübasyona bırakıldı.

Nandrolon (**10**) (1 g) DMF (10 mL) içerisinde çözünerek yeterli miktarda küf içeren erlenlere eşit hacimlerde, steril koşullar altında ilave edildikten sonra 5 gün süresince 24 °C' de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

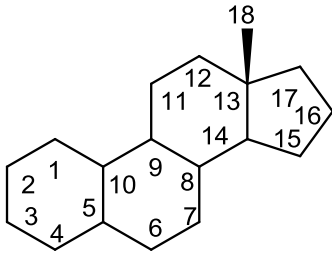
İnkübasyon işlemi tamamlandıktan sonra, besiyeri bir Buchner hunisi yardımıyla filtrasyon işlemine tabi tutuldu ve besi yeri küf kültürüne ait misellerden süzülerek ayrıldı. Buchner hunisinde kalan miseller etil asetat (500 mL) kullanılarak yıkandı. Filtrat her seferinde 1 L etil asetat kullanılarak 3 ayrı ekstraksiyona maruz bırakıldı. Daha sonra toplanan ekstraktlara susuz sodyum sülfat katılarak ortamda bulunabilecek su uzaklaştırıldı. Etil asetat evaporatörde uzaklaştırıldıktan sonra yağimsı bir madde (1530 mg) elde edildi.

Yağimsı madde daha sonra silika jel 60 üzerinde kolon kromatografisine tabi tutuldu. %20, %50 ve %60'lık çözgen sistemleriyle elüsyonlar neticesinde ise farklı polaritelere sahip üç 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.

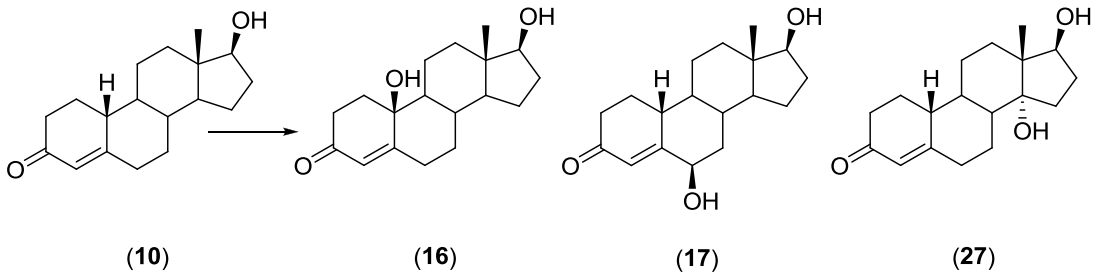
## BÖLÜM 4. DENEYSEL BULGULAR

Nandrolon (**10**) bileşiğinin *Aspergillus* türleri ile biyotransformasyonlarından elde edilen bileşiklerin yapılarını belirlemek için hem başlangıç maddesinin 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 başlangıç maddesine ait karbon iskeletinin numaralandırılması Şekil 4.1.'deki gibidir.



Şekil 4.1. Substrat karbon iskeletinin numaralandırılması

Nandrolon (**10**) (1 g) bileşiğinin *A.wentii* küfö ile 27 °C'de 5 gün süren inkübasyonu neticesinde 10 $\beta$ -hidroksi-19-nortestosteron (**16**) (%2), 6 $\beta$ -hidroksi-19-nortestosteron (**17**) (%60) ve 14 $\alpha$ -hidroksi-19-nortestosteron (**27**) (%5 ) bileşikleri elde edildi (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Substratın *A.wentii* ile biyotransformasyonu

10 $\beta$ -Hidroksi-19-nortestosteron (**16**); (21 mg, %2 )

%50'lik çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde beyaz bir toz olarak elde edildi.

Erime noktası: 205-206 °C, (lit. [19] erime noktası: 205-210 °C).

IR ( $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ ): 3290, 1660 ve 1620

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.83 (3H, s, 18-H), 3.67 (1H, t,  $J = 8.8$  Hz, 17 $\alpha$ -H), 5.78 (1H, s, 4-H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 199.17 (C-3), 164.37 (C-5), 124.71 (C-4), 81.60 (C-17), 70.34 (C-10), 52.62 (C-9), 50.05 (C-14), 42.82 (C-13), 36.10 (C-12), 35.30 (C-8), 33.72 (C-2), 33.64 (C-1), 31.93 (C-7), 31.25 (C-16), 30.45 (C-6), 23.34 (C-15), 20.02 (C-11), 10.94 (C-18).

6 $\beta$ -Hidroksi-19-nortestosteron (**17**) (635 mg, %60)

%60'lık çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde beyaz bir toz olarak elde edildi.

Erime noktası: 210-211 °C, (lit. [24] erime noktası: 209-213 °C).

IR ( $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ ): 3300, 1660 ve 1620.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.81 (3H, s, 18-H), 3.66 (1H, t,  $J = 8.5$  Hz, 17 $\alpha$ -H), 4.38 (1H, t,  $J = 2.5$  Hz, 6 $\alpha$ -H), 5.88 (1H, s, 4-H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 200.57 (C-3), 165.17 (C-5), 125.34 (C-4), 81.66 (C-17), 71.77 (C-6), 49.69 (C-14), 49.42 (C-9), 43.18 (C-13), 38.07 (C-7), 37.67 (C-10), 36.33 (C-12), 36.30 (C-2), 33.59 (C-8), 30.39 (C-16), 26.11 (C-1), 25.86 (C-11), 23.05 (C-15), 11.12 (C-18).

14 $\alpha$ -Hidroksi-19-nortestosteron (**27**) (53 mg, %5 )

%60'lık çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde beyaz bir toz olarak elde edildi.

Erime noktası: 193-194 °C, (lit. [24] erime noktası: 192-194 °C).

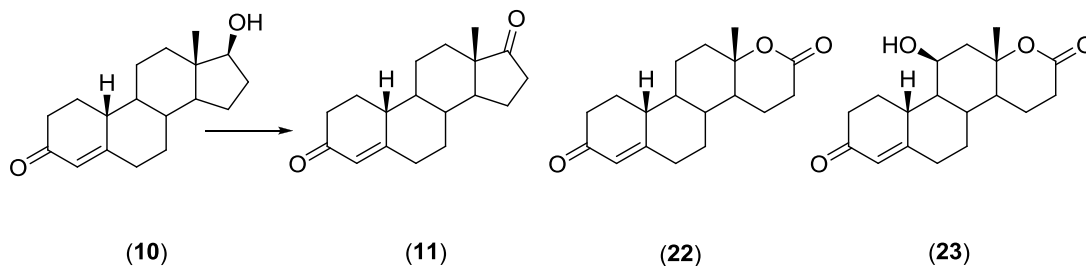
IR ( $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ ): 3342, 1670 ve 1610.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.93 (3H, s, 18-H), 4.32 (1H, dd,  $J = 6.9$  and 8.8 Hz, 17 $\alpha$ -H), 5.83 (1H, s, 4-H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 200.03 (C-3), 166.07 (C-5), 124.64 (C-4), 83.13 (C-14), 78.59 (C-17), 47.05 (C-13), 43.76 (C-8), 43.13 (C-10), 42.84 (C-9), 36.41 (C-2), 35.29 (C-6), 32.47 (C-12), 29.54 (C-16), 28.84 (C-7), 26.57 (C-1), 25.64 (C-15), 25.49 (C-11), 15.04 (C-18).



Nandrolon (**10**) (1 g) bileşiğinin *A.tamarii* küfü ile 24 °C’de 5 gün süren inkübasyonu neticesinde 19-norandrost-4-en-3,17-dion (**11**) (%4), 19-nortestolakton (**22**) (%75) ve 11 $\beta$ -hidroksi-19-nortestolakton (**23**) (%5) metabolitleri elde edildi (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. Substratın *A. tamarii* ile biyotransformasyonu

19-Norandrost-4-en-3,17-dion (**11**) (39 mg, %4)

%20’lik çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde beyaz bir toz olarak elde edildi.

Erime noktası: 170-173°C, (lit. [21] erime noktası: 171-173 °C).

IR ( $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ ): 2930, 1730, 1665 ve 1615.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0.93 (3H, s, 18-H), 5.87 (1H, s, 4-H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 220.49 (C-17), 199.75 (C-3), 165.93 (C-5), 124.60 (C-4), 49.88 (C-14), 49.28 (C-9), 47.52 (C-13), 42.19 (C-10), 39.60 (C-8), 36.27 (C-2), 35.56 (C-6), 35.05 (C-16), 31.07 (C-7), 29.64 (C-12), 26.39 (C-1), 25.48 (C-11), 21.44 (C-15), 13.60 (C-18).

19-Nortestolakton (**22**) (788 mg, %75)

%50’lik çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde beyaz bir toz olarak elde edildi.

Erime noktası: 198-200 °C, (lit. [21] erime noktası: 196-199 °C).

IR ( $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ ): 1724, 1660 ve 1620.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1.36 (3H, s, 18-H), 5.82 (1H, s, 4-H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 199.55 (C-3), 171.20 (C-17), 164.91 (C-5), 124.51 (C-4), 82.85 (C-13), 47.99 (C-9), 44.75 (C-14), 42.32 (C-12), 42.03 (C-10), 38.66 (C-8), 36.20 (C-2), 34.85 (C-6), 29.27 (C-7), 28.29 (C-16), 26.81 (C-11), 26.09 (C-1), 19.85 (C-15), 19.53 (C-18).

11 $\beta$ -Hidroksi-19-nortestolakton (**23**) (56 mg, %5)

%60'lık çözügen sistemiyle elüsyon neticesinde beyaz bir toz olarak elde edildi.

Erime noktası: 235-237 °C, (lit. [21] erime noktası: 233-235 °C).

IR ( $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ ): 3500, 1725, 1670 ve 1620.

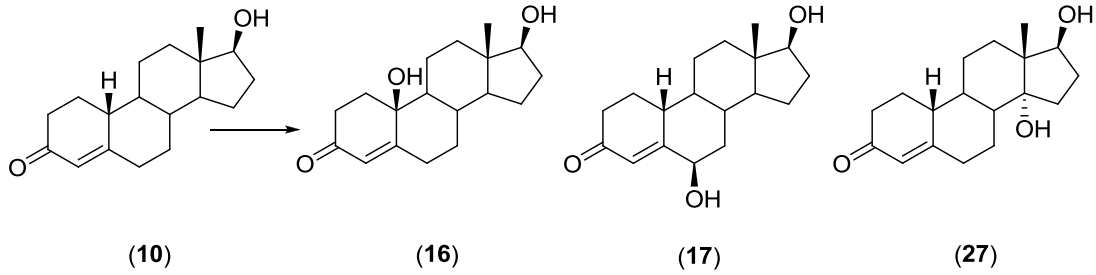
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1.66 (3H, s, 18-H), 4.32 (1H, bs, 11 $\alpha$ -H), 5.90 (1H, s, 4-H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 199.88 (C-3), 171.40 (C-17), 166.32 (C-5), 124.74 (C-4), 82.55 (C-13), 65.06 (C-11), 52.00 (C-9), 45.98 (C-14), 45.80 (C-12), 37.22 (C-10), 36.38 (C-8), 36.33 (C-2), 34.72 (C-6), 29.52 (C-7), 28.43 (C-16), 25.69 (C-1), 23.01 (C-15), 19.43 (C-18).

## BÖLÜM 5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Biyotransformasyon çalışmaları sonucunda elde edilen yeni bileşiklerin yapılarını tayin amacıyla nandrolon (**10**) ile biyotransformasyonlardan elde edilen bileşiklerin erime noktaları,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR ve IR spektrumları karşılaştırıldı.

Nandrolon (**10**) bileşiğinin *A. wentii* MRC 200316 ile beş gün inkübasyonu üç metabolit verdi (Şekil 5.1.). İlk metabolitin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu  $\delta_{\text{C}}$  70,34 ppm'de yeni bir hidroksil grubunun varlığını gösteren bir rezonans verdi. Metabolitin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu C-1 ve C-9 için aşağı alana doğru kaymalar (sırası ile  $\Delta$  7,12 ppm ve  $\Delta$  2,95 ppm) gösterirken C-2 ve C-11 için yukarı alana doğru  $\gamma$ -gauche kaymaları (sırası ile  $\Delta$  2,62 ppm ve  $\Delta$  6,05 ppm) gösterdi (Tablo 5.1.). Bu kaymalardan  $10\beta$ -hidroksil grubunun varlığı ve metabolitin  $10\beta$ -hidroksi-19-nortestosteron (**16**) olduğu anlaşıldı. Metabolitin  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR değerlerinin literatürdekiler ile karşılaştırılabilir olduğu gözlemlendi [31].



Şekil 5.1. Substratın *A.wentii* ile biyotransformasyonu

İkinci metabolit  $\delta_{\text{H}}$  4,38 ppm (1H, t,  $J= 2.5$  Hz) ve  $\delta_{\text{C}}$  72,86 ppm değerlerinde C-6'daki aksiyal protonunda bir hidroksilasyon gerçekleştiğini ve  $6\beta$ -hidroksil grubu oluştuğunu gösteren karakteristik rezonanslar verdi [34,35]. Metabolit nandrolon (**10**) bileşiğinin  $\delta_{\text{H}}$  5,83 ppm'deki 4-H rezonansı  $\delta_{\text{H}}$  5,88 ppm'e yani aşağı alana olan doğru bir kayma ( $\Delta$  0,05 ppm) gösterdi (Tablo 5.2.). Bu kayma değeri C-6'daki bir

hidroksil grubunun varlığıyla da uyum gösterdi. Metabolitin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu C-7 için aşağı alana doğru bir kayma ( $\Delta$  7,45 ppm) gösterirken C-8 için yukarı alana doğru bir  $\gamma$ -gauche kayması ( $\Delta$  6,82 ppm) gösterdi. Bu kaymalardan ikinci metabolitin 6 $\beta$ -hidroksi-19-nortestosteron (**17**) olduğu anlaşıldı. Metabolitin  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR değerlerinin literatürdekiler ile karşılaştırılabilir olduğu gözlemlendi [31].

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

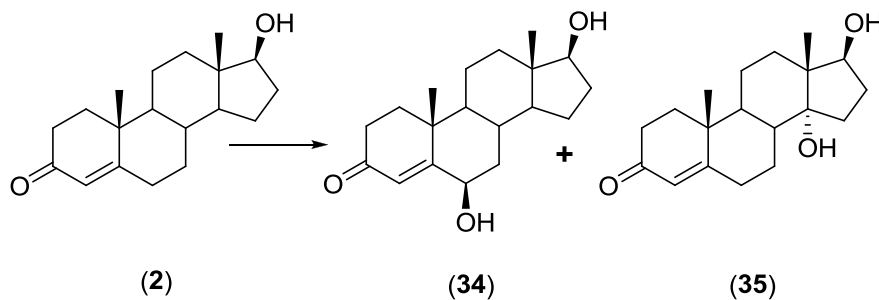
Karbon atomu	10	11	16	17	22	23	27
1	26,52	26,39	33,64	26,11	26,09	25,69	26,57
2	36,34	36,27	33,72	36,30	36,20	36,33	36,41
3	200,01	199,75	199,17	200,57	199,55	199,88	200,03
4	124,49	124,60	124,71	125,34	124,51	124,74	124,64
5	166,77	165,93	164,37	165,17	164,91	166,32	166,07
6	35,43	35,56	30,45	71,77	34,85	34,72	35,29
7	30,62	31,07	31,93	38,07	29,27	29,52	28,84
8	40,41	39,60	35,30	33,59	38,66	36,38	43,76
9	49,67	49,28	52,62	49,42	47,99	52,00	42,84
10	42,52	42,19	70,34	37,67	42,03	37,22	43,13
11	26,07	25,48	20,02	25,86	26,81	65,06	25,49
12	36,45	29,64	36,10	36,33	42,32	45,80	32,47
13	42,95	47,52	42,82	43,18	82,85	82,55	47,05
14	49,52	49,88	50,05	49,69	44,75	45,98	83,13
15	23,13	21,44	23,34	23,05	19,85	23,01	25,64
16	30,32	35,05	31,25	30,39	28,29	28,43	29,54
17	81,59	220,49	81,60	81,66	171,20	171,40	78,59
18	11,01	13,60	10,94	11,12	19,53	19,43	15,04

Üçüncü metabolit  $\delta_{\text{C}}$  83.13 ppm'de yeni bir hidroksil grubunun varlığını gösteren bir karbon rezonansı verdi. Metabolitin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu 17 $\alpha$ -H rezonansı için bir 14 $\alpha$ -hidroksil grubu ile karakteristik diaksiyal etkileşimini gösteren aşağı alana doğru bir kayma ( $\Delta$  0,67 ppm) verdi [31]. Metabolitin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu C-8, C-13 ve C-15 için aşağı alana doğru kaymalar (sırası ile  $\Delta$  3,35 ppm,  $\Delta$  4,10 ppm ve  $\Delta$  2,51 ppm) gösterirken C-7, C-12 ve C-16 için yukarı alana doğru  $\gamma$ -gauche kaymaları (sırası ile  $\Delta$  1,78 ppm,  $\Delta$  3,98 ppm ve  $\Delta$  0,78 ppm) gösterdi. Bu kaymalardan metabolitin 14 $\alpha$ -hidroksi-19-nortestosteron (**27**) olduğu anlaşıldı. Metabolit erime noktasının literatür ile karşılaştırılabilir olduğu gözlemlendi [24].

Tablo 5.2. Bileşiklerin <sup>1</sup>H NMR spektrumu sinyallerin karşılaştırılması

Bileşik	4-H	17 $\alpha$ -H	18-CH <sub>3</sub>	Diğer önemli sinyaller
<b>10</b>	5,83	3,65 (1H, t, <i>J</i> = 8,5 Hz)	0,80	-
<b>11</b>	5,87	-	0,93	-
<b>16</b>	5,78	3,67 (1H, t, <i>J</i> = 8,8 Hz)	0,83	-
<b>17</b>	5,88	3,66 (1H, t, <i>J</i> = 8,5 Hz)	0,81	4,38 (1H, t, <i>J</i> = 2,5 Hz, 6 $\alpha$ -H)
<b>22</b>	5,82	-	1,36	-
<b>23</b>	5,90	-	1,66	4,32 (1H, brs, 11 $\alpha$ -H)
<b>27</b>	5,83	4,32 (1H, dd, <i>J</i> = 6,9 ve 8,8 Hz)	0,93	-

*A. wentii* MRC 200316 küfü daha önceki diğer steroidler gibi [36,37] nandrolon (**10**) bileşimini de hidroksillede [38]. Küfün daha önceki testosteron (**2**) ile inkübasyonundan (Şekil 5.2.) 6 $\beta$ -hidroksitestosteron (**34**) (%76) ve 14 $\alpha$ -hidroksitestosteron (**35**) (%7) bileşikleri elde edilirken [36], 19-metil grubu eksik olan nandrolon (**10**) ile inkübasyonu 10 $\beta$ -hidroksi-19-nortestosteron (**16**) (%2), 6 $\beta$ -hidroksi-19-nortestosteron (**17**) (%60) ve 14 $\alpha$ -hidroksi-19-nortestosteron (**27**) (%5) bileşiklerini verdi [38]. Testosteron (**2**) ile çok daha yüksek verimler gözlenmişti [36].

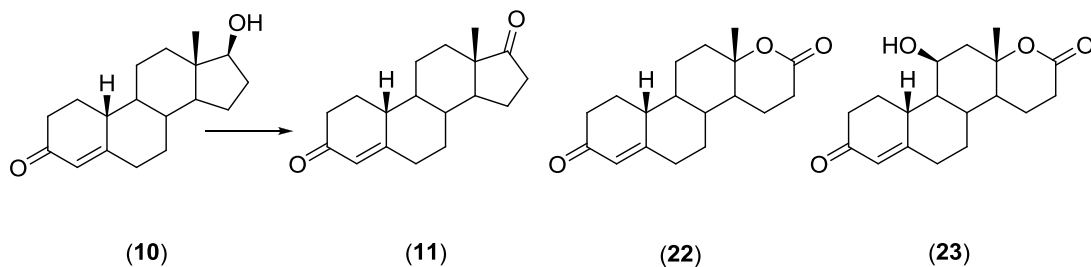
Şekil 5.2. *A. wentii* MRC200316 ile testosteron (**2**) biyotransformasyonu

Nandrolon (**10**) bileşimindeki 19-metil grubunun eksikliğinin diğer bazı küfler ile inkübasyonda C-10 $\beta$  pozisyonundaki hidroksillenmeyi oldukça teşvik ettiği düşünülmektedir [19,24]. Bu teşvik *A. wentii* küfü için çok zayıf olarak gerçekleşti ve düşük verimli (%2) bir 10 $\beta$ -hidroksilasyonu gözlemlendi [38]. Diğer küflerle daha yüksek verimli 10 $\beta$ -hidroksilasyonları elde edilmişti [12,19,24,26,28,31].

Nandrolon (**10**) bileşiğinin diğer küflerle inkübasyonları genelde hem C-10 $\beta$  hem de C-6 $\beta$  pozisyonlarındaki hidroksilasyonlar ile sonuçlanmaktadır [12,26,28,31]. *A. wentii* ile de aynı durum gözlemlendi [38]. Her iki hidroksilasyonun muhtemelen bir 6 $\beta$ -hidroksilaz enzim sistemi ile gerçekleştirildiği düşünülmektedir [26].

Nandrolon (**10**) bileşiğinin küflerle inkübasyonları bazen bağımsız ve düşük verimli bir 14 $\alpha$ -hidroksilasyonu ile sonuçlanmaktadır [19,24,28]. Benzer durum *A. wentii* ile de gözlemlendi [38]. *A. wentii*'nin verdiği üç metabolit daha önce *Curvularia lunata* küfö ile de elde edilmisti. *C. lunata* ile nandrolon (**10**) inkübasyonu 10 $\beta$ -hidroksi-19-nortestosteron (**16**) (%55.5), 6 $\beta$ -hidroksi-19-nortestosteron (**17**) (%4.4), 14 $\alpha$ -hidroksi-19-nortestosteron (**27**) (%13.3) ve diğer iki hidroksillenmiş metabolit vermişti [28]. *C. lunata* verimleri ile karşılaştırdığında *A. wentii* ile sadece 6 $\beta$ -hidroksi-19-nortestosteron (**17**) metabolitinin verimi daha yüksek olarak (%60) elde edildi [28,38].

*A. tamarrii* MRC 72400 küfö ile nandrolon (**10**) bileşiğinin beş gün süren inkübasyonu sonucunda 3 ayrı metabolit elde edildi (Şekil 5.3.). İlk metabolitin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu başlangıç maddesinin 17 $\alpha$ -H rezonansını vermedi. Metabolit, başlangıç maddesinin  $\delta_{\text{H}}$  0,80 ppm'deki 18-metil rezonansı için aşağı alana doğru  $\delta_{\text{H}}$  0,93 ppm'e bir kayma ( $\Delta$  0.13) gösterdi. Metabolit  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu başlangıç maddesinin  $\delta_{\text{C}}$  81,59 ppm'deki C-17 rezonansını vermezken  $\delta_{\text{C}}$  220,49 ppm'de yeni bir karbon rezonansı verdi. Bütün bu sonuçlardan C-17'de bir oksidasyon gerçekleştiğini ve metabolitin 19-norandrost-4-en-3,17-dion (**11**) olduğu anlaşıldı.



Şekil 5.3. Substratın *A. tamarrii* ile biyotransformasyonu

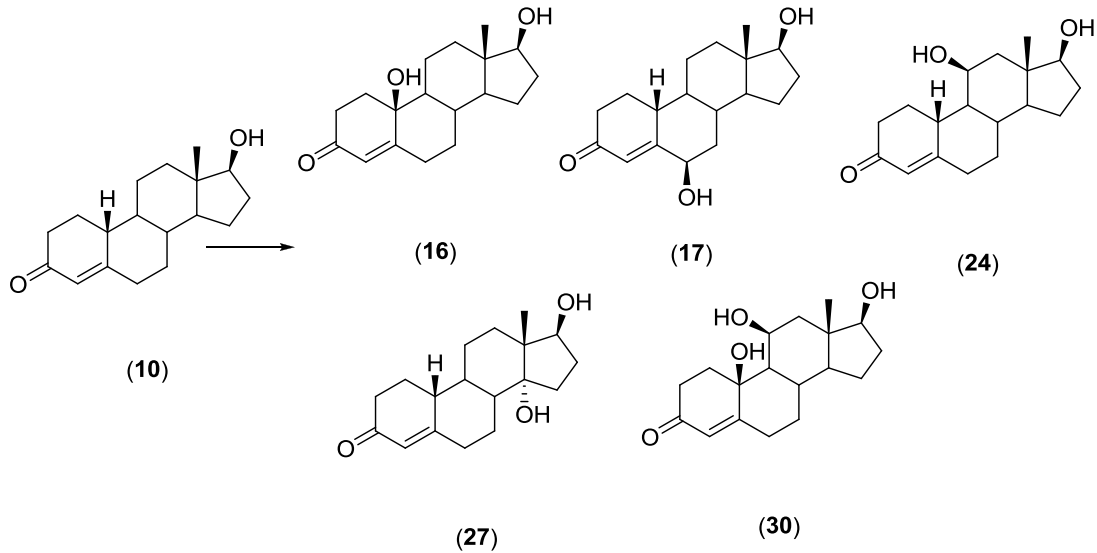
İkinci metabolit başlangıç maddesinin 17 $\alpha$ -H rezonansını vermedi. Başlangıç maddesinin  $\delta_{\text{C}}$  42,95 ppm'deki C-13 rezonansı  $\delta_{\text{C}}$  82,85 ppm'e yani aşağı alana

doğru bir kayma ( $\Delta$  39,90) gösterdi. Bu C-13 rezonansının bu kayma değeri ve  $17\alpha$ -H rezonansının kaybolması C-13 karbon atomunun D halkası tarafındaki komşuluğuna bir oksijen atomu eklendiğini yani laktonizasyonu düşündürdü. Başlangıç maddesinin  $\delta_H$  0,80 ve  $\delta_C$  11,01 ppm'lerdeki 18-metil rezonansları aşağı alana doğru kaymalar (sırası ile  $\Delta$  0,54 ppm ve  $\Delta$  8,52) gösterdi. Metabolitin  $^{13}C$  NMR spektrumu başlangıç maddesinin  $\delta_C$  81,59 ppm'deki C-17 rezonansını vermezken  $\delta_C$  171,20 ppm'de yeni bir karbon rezonansı verdi. Bütün bu sonuçlar D halkasında laktonizasyonun gerçekleştiğini ve metabolitin 19-nortestolakton (**22**) olduğunu gösterdi.

Üçüncü metabolitin  $^1H$  NMR spektrumu  $\delta_H$  4.32 ppm'de  $11\beta$ -hidroksilasyonunun gerçekleştiğini gösteren karakteristik bir  $11\alpha$ -H rezonansı verdi [34]. Metabolitin  $^{13}C$  NMR spektrumu C-9 ve C- 12 için aşağı alanlara kaymalar (sırası ile  $\Delta$  2,33 ppm ve  $\Delta$  9,35 ppm) gösterirken C-8 için yukarı alana doğru bir  $\gamma$ -gauche kayması ( $\Delta$  4.03 ppm) gösterdi. Bu kaymalar  $11\beta$ -hidroksilasyonu daha da doğruladı. Metabolit başlangıç maddesindeki  $17\alpha$ -H rezonansını vermedi. Başlangıç maddesinin  $\delta_C$  42,95 ppm'deki C-13 rezonansı  $\delta_C$  82,55 ppm'e yani aşağı alana doğru bir kayma ( $\Delta$  39,60 ppm) gösterdi.  $17\alpha$ -H rezonansının kaybolması ve C-13 rezonansının bu kayma değeri D halkasındaki bir laktonizasyonu düşündürdü. Metabolit başlangıç maddesinin  $\delta_H$  0,80 ve  $\delta_C$  11,01 ppm'lerdeki 18-metil rezonansları için laktonizasyonu destekleyecek şekilde aşağı alana doğru kaymalar (sırası ile  $\Delta$  0,86 ppm ve  $\Delta$  8,42) gösterdi. Metabolitin  $^{13}C$  NMR spektrumu başlangıç maddesinin  $\delta_C$  81,59 ppm'deki C-17 rezonansını vermezken  $\delta_C$  171,40 ppm'de yeni bir karbon rezonansı verdi. Bütün bu sonuçlar C halkasındaki  $11\beta$ -hidroksilasyonuna ilaveten D halkasında laktonizasyonun da gerçekleştiğini ve metabolitin  $11\beta$ -hidroksi-19-nortestolakton (**23**) olduğunu gösterdi.

*A. tamarii* suşları ile literatürdeki daha önceki steroid inkübasyonları da çoğunlukla Baeyer-Villiger oksidasyonları ile sonuçlanmıştı [33]. Nandrolon (**10**) bileşiğinin bir diğer *A. tamarii* suşu olan *A. tamarii* ATCC 1005 ile inkübasyonu (Şekil 5.4.) ise 19-norandrost-4-en-3,17-dion (**11**) (%2), 19-nortestolakton (**22**) (%66),  $11\beta$ -hidroksi-19-nortestolakton (**23**) (%3),  $11\beta$ -hidroksi-19-norandrost-4-en-3,17-dion (**24**) (%1.5) ve  $11\beta$ -hidroksi-19-nortestosteron (**25**) (%1) metabolitleri ile sonuçlanmıştı [18]. *A.*

*tamaris* MRC 72400 ile 11 $\beta$ -hidroksi-19-norandrost-4-en-3,17-dion (**24**) ve 11 $\beta$ -hidroksi-19-nortestosteron (**25**) metabolitleri elde edilmezken diğerk 3 metabolit çok daha yüksek verimler elde edildi [21]. Bir başkaka ifade ile *A. tamaris* MRC 72400 suşu nandrolon (**1**) bileşimini *A. tamaris* 1005 suşuna göre daha farklı olarak metabolize etti.



Şekil 5.4. *C. lunata* ile nandrolon (**10**) biyotransformasyonu.

Kısaca nandrolon (**10**) bileşiminin *A. wentii* ile inkübasyonu C-14 $\alpha$ - ve C-10 $\beta$ -pozisyonlarındaki bağımsız ve düşük verimli hidroksilasyonların eşlik ettiği C-6 $\beta$ -pozisyonundaki yüksek verimli bir hidroksilasyon ile sonuçlanırken aynı bileşimin *A. tamaris* MRC 72400 suşu inkübasyonu düşük verimli diğerk bazı oksidasyonların eşlik ettiği yüksek verimli bir Baeyer-Villiger oksidasyonu ile sonuçlandı. *Aspergillus* ve diğerk küf cinslerine ait küfler ile steroidler üzerinde gerçekleştirdiğimiz fungal biyotransformasyonlar sürmektedir.



## KAYNAKLAR

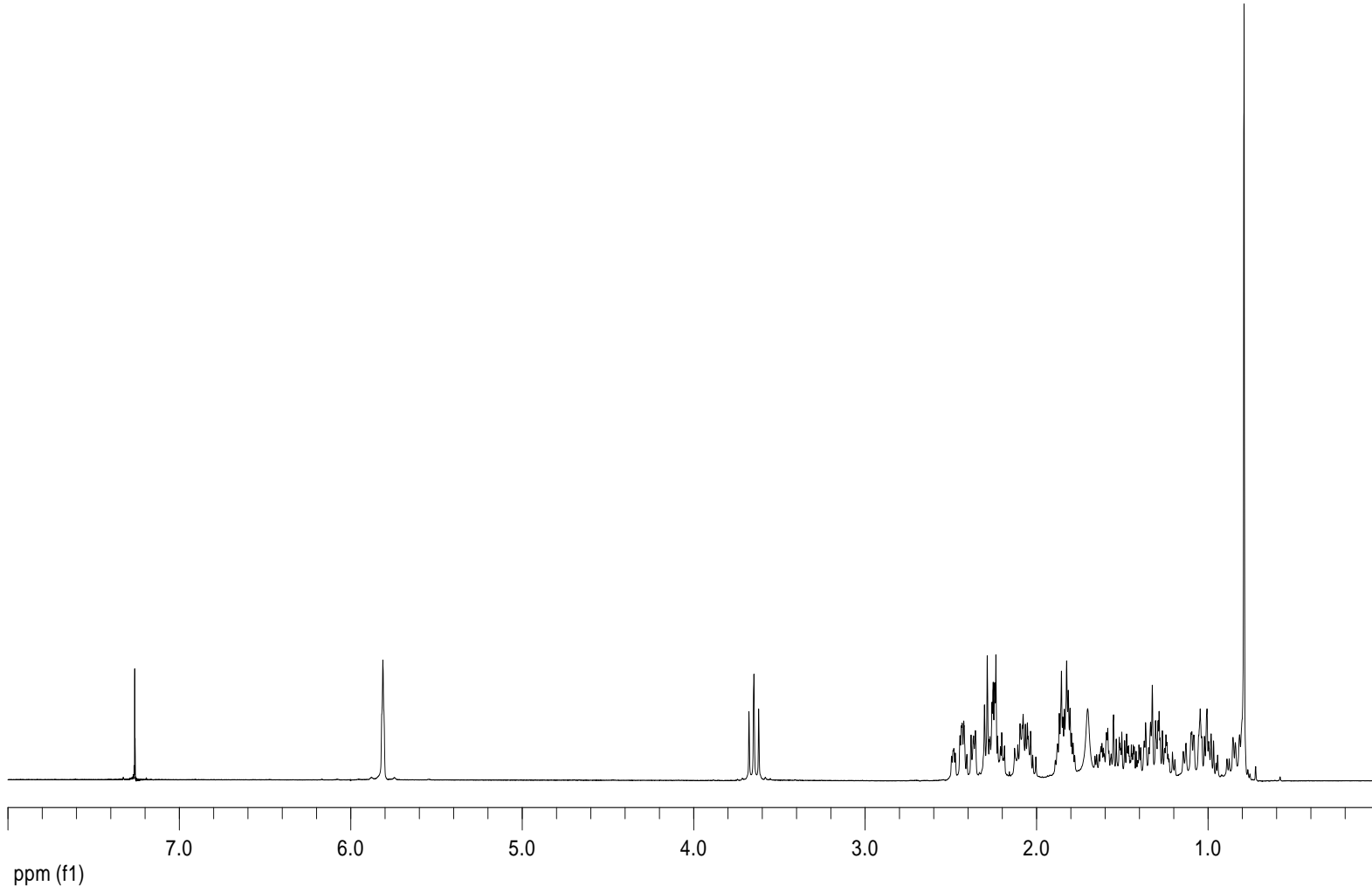
- [1] HANSON, J.R., An Introduction to Biotransformations in Organic Chemistry, W.H. Freeman Spektrum, 1-62, New York, 1995.
- [2] DEMAIN A.L., Small Bugs, Big Business: The Economic Power of the Microbe, Biotechnology Advances, 18, 499-514, 2000.
- [3] PETERSON, D. H., MURRAY, H. C., Microbial Oxygenation of Steroids at Carbon 11, Journal of American Chemical Society, 74, 1871-1872, 1952.
- [4] DONOVA, M.V., EGOROVA, O.V., Microbial Steroid Transformation: Current State and Prospects, Applied Microbiology and Biotechnology, 94, 1423-1447, 2012.
- [5] CLAYDEN, J., GREEVES, N., WARREN, S., WOTHERS, P., Organic Chemistry, First edition, Oxford University Pres, Oxford, 1413-1414, 2001.
- [6] MANN, J., Chemical Aspects of Biosynthesis, First edition, Oxford University Pres, New York, 2-4, 1994.
- [7] KEHA, E., KÜFREVİOĞLU, Ö. İ., Biyokimya, Dördüncü baskı, Aktif Yayınevi, 185-188, Erzurum, 2005.
- [8] ONAT, T., EMERK, K., SÖZMEN, E.Y., İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, 481-495, Ankara, 2002.
- [9] BRICOUT, V., WRIGHT, F., Update on Nandrolone and Norsteroids: How Endogenous or Xenobiotic are These Substances, European Journal of Applied Physiology, 92, 1-12, 2004.
- [10] CHOUDHARY, M. I., ADNAN, S., SHAH, A., ATTA-UR-RAHMAN, Microbial oxidation of anabolic steroids, Natural Product Research, 22, 1289-1296, 2008.
- [11] PEDERSON, R. L., CAMPBELL, J. A., BABCOCK, J. C., EPPSTEIN, S. H., MURRAY, H. C., WEINTRAUB, A., MEEKS, R. C., MEISTER, P. D., REINEKE, L. M., PETERSON, D. H., Microbiological Transformations of Steroids. XIV. The Preparation of a Tertiary Hydroxy-Steroid, 10 $\xi$ -Hydroxy-19-Nortestosterone, Journal of American Chemical Society, 78, 1512-1513, 1956.

- [12] FAVERO, J., MARCHAND, J., WINTERNITZ, F., Bioconversion of 19-nortestosterone by *Rhizopus arrhizus* Fischer. II, Bulletin de la Societe Chimique de France, 3-4, 310-312, 1977.
- [13] ŚWIZDOR, A., KOŁEK, T., Transformations of 4- and 17 $\alpha$ -substituted Testosterone Analogs by *Fusarium culmorum*, Steroids, 70, 817-824, 2005.
- [14] KONDO, E., Transformation of Steroids by Mikroorganisms. IX. Inhibition of Ring D Cleavage by The 11-hydroxyl Group, Kogyo Kagaku Zasshi, 67, 724-727, 1964.
- [15] KUSNER, E.J., GARRETT, R.D., Transformation of Selected Steroids by *Cylindrocarpon radicicola*. New Biosynthetic Pathway for Estrololactone, Steroids, 17, 521-529, 1971.
- [16] DE FLINES, J., VAN DER WAARD, W.F., MIJS, W.J., SZPILFOGEL, S.A., Microbiological Conversion of 19-nortestosterone: (IV) 15 $\alpha$  – hydroxylation, Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas, 82, 143-148, 1963.
- [17] HOLLAND, H.L., DORE, S., XU, W.L., BROWN, F.M., Formation of 5 $\alpha$ -Steroids by Biotransformation Involving the 5 $\alpha$ -Reductase Activity of *Penicillium ducembens*, Steroids, 59,642-647, 1994.
- [18] BARTMAŃSKA, A., DMOCHOWSKA-GŁADYSZ, J., HUSZCZA, E., Steroids' Transformation in *Penicillium notatum* culture, Steroids, 70, 193–198, 2005.
- [19] DE FLINES, J., VAN DER WAARD, W.F., MIJS, W.J., SZPILFOGEL, S.A., Microbiological Conversion of 19-nortestosterone: (II) 10- and 11-hydroxylation, Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas, 82, 129-138, 1963.
- [20] HUSZCZA, E., GŁADYSZ, J. D., BARTMAŃSKA, A., Transformations of Steroids by *Beauveria bassiana*, Zeitschrift für Naturforschung C: A Journal of Biosciences, 60, 103-108, 2005.
- [21] MCCURDY, J.T., GARNETT, R.D., Microbiological Transformation of Steroids. I. Synthesis of 19-nortestololactone, Journal of Organic Chemistry, 33, 660-661, 1968.
- [22] SCHUBERT, K., ROSE, G., HOERHOLD, C., Microbial Hydrogenation of an Aromatic System of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol, Journal of Steroid Biochemistry, 4, 283-288, 1973.
- [23] HUSZCZA, E., DMOCHOWSKA-GŁADYSZ, J., Transformations of Testosterone and Related Steroids by *Botrytis cinerea*, Phytochemistry, 62, 155-158, 2003.

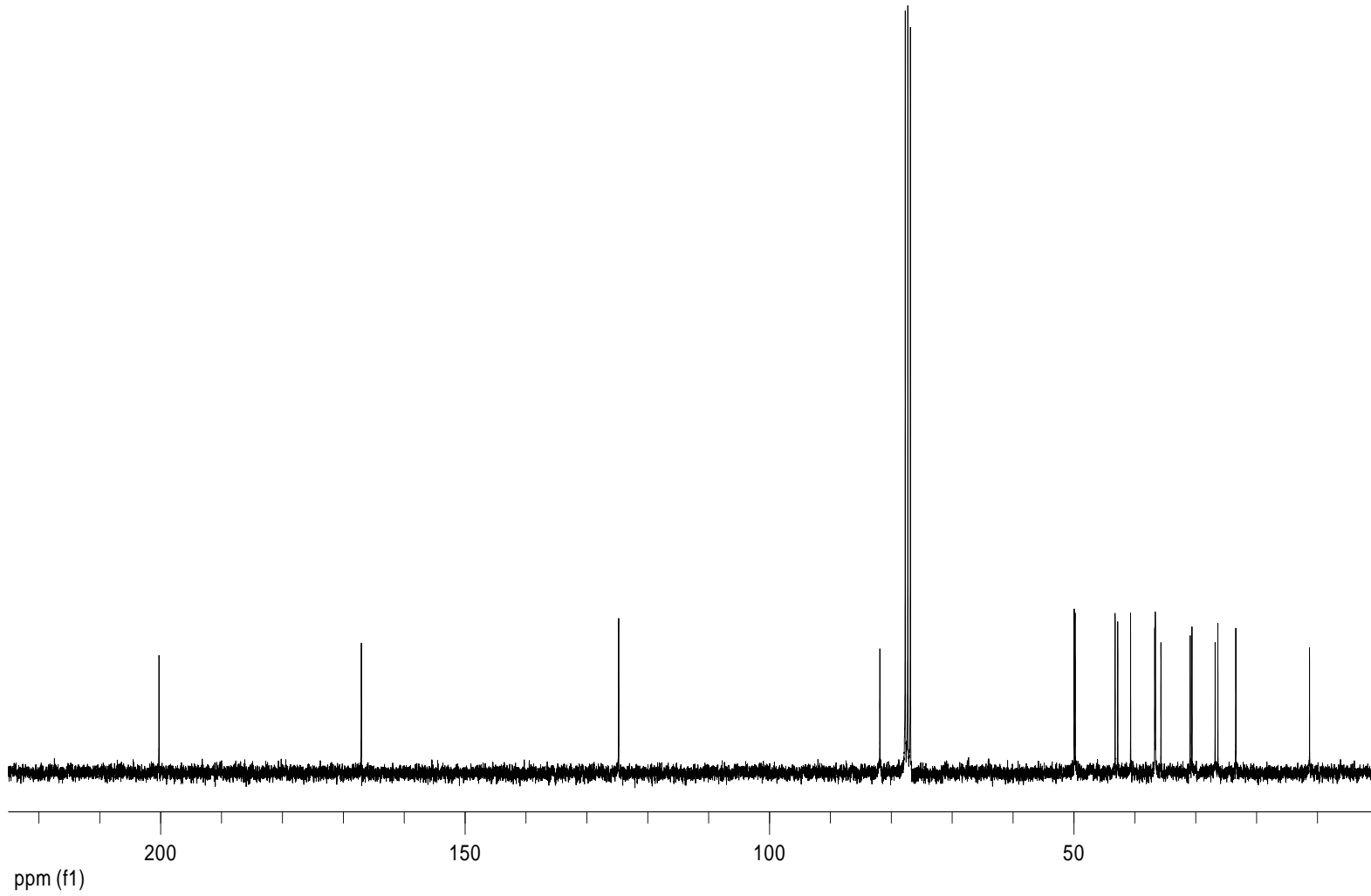
- [24] DE FLINES, J., VAN DER WAARD, W.F., MIJS, W.J., VAN DIJCK, L.A., SZPILFOGEL, S.A., Microbiological Conversion of 19-Nortestosterone: (V) 6 $\beta$ - and 14 $\alpha$ -Hydroxylation, *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, 82, 149-156, 1963.
- [25] BRZEZOWSKA, E., GŁADYSZ, J.D., Microbial Transformation of C18 Steroids: 19-nortestosterone and Its 17 $\alpha$ -alkyl and ethynyl Derivatives in *Absidia coerulea* culture, *Acta Scientiarum Polonorum, Biotechnologia*, 7, 3-12, 2008.
- [26] HUSZCZA, E., GŁADYSZ, J. D., Transformations of Testosterone and Related Steroids in *Absidia glauca* Culture, *Journal of Basic Microbiology*, 43, 113-120, 2003.
- [27] BARTMAŃSKA, A., GŁADYSZ, J.D., Transformation of Steroids by *Trichoderma hamatum*, *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1615-1621, 2007.
- [28] LIN, Y.Y., SHIBAHARA, M., SMITH, L.L., Microbial Hydroxylations. IV. Differential Metabolism of 19-Norsteroid Antipodes by *Curvularia lunata*, *Journal of Organic Chemistry*, 34, 3530-3539, 1969.
- [29] DE FLINES, J., VAN DER WAARD, W.F., MIJS, W.J., VAN DIJCK, L.A., SZPILFOGEL, S.A., Microbiological Conversion of 19-nortestosterone. III. 12-Hydroxylation, *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, 82, 139-142, 1963.
- [30] DE FLINES, J., VAN DER WAARD, W.F., MIJS, W.J., SZPILFOGEL, S.A., Microbiological Conversion of 19-nortestosterone. I. 16-Hydroxylation, *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, 82, 121-128, 1963.
- [31] HANSON, J.R., NASIR, H., PARVEZ, A., The Hydroxylation of Testosterone and Some Relatives by *Cephalosporium aphidicola*, *Pythochemistry*, 42, 411-415, 1996.
- [32] MIYAZAWA, M., TAKAHASHI, T., SAKATA, K., HORIBE, I., Biotransformation of Three Aromadendrane-type Sesquiterpenoids by *Aspergillus wentii*, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83, 1006-1011, 2008.
- [33] HUNTER, A. C., COYLE, E., MORSE, F., DEDI, C., DODD, H. T., KOUSSOROPLIS, S. J., Transformation of 5-ene Steroids by the Fungus *Aspergillus tamarii* KITA: Mixed Molecular Fate in Lactonization and Hydroxylation Pathways with Identification of a Putative 3 $\beta$ -hydroxy-Steroid Dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  Isomerase Pathway, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1791, 110-117, 2009.

- [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  $^1\text{H}$  NMR Spectra of the Steroids Hormones, Their Hydroxylated Derivatives and Related Compounds, *Journal of Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 1567-1594, 1990.
- [35] BLUNT, J. W., STOTHERS, J. B.,  $^{13}\text{C}$  NMR Spectra of Steroids -A Survey and Commentary, *Organic Magnetic Resonance*, 9, 439-464, 1977.
- [36] YILDIRIM, K., KUPCU, I., GULSAN, F., Biotransformation of Some Steroids by *Aspergillus wentii*, *Zeitschrift für Naturforschung C: A Journal of Biosciences*, 65, 688-692, 2010.
- [37] YILDIRIM, K., Microbial Hydroxylation of Some Steroids by *Aspergillus wentii* MRC 200316, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 75, 1273-1281, 2010.
- [38] YILDIRIM, K., AYHAN, C., Biotransformation of 19-nortestosterone by *Aspergillus wentii* MRC 200316, *Journal of Chemical Research*, 36, 541-542, 2012.

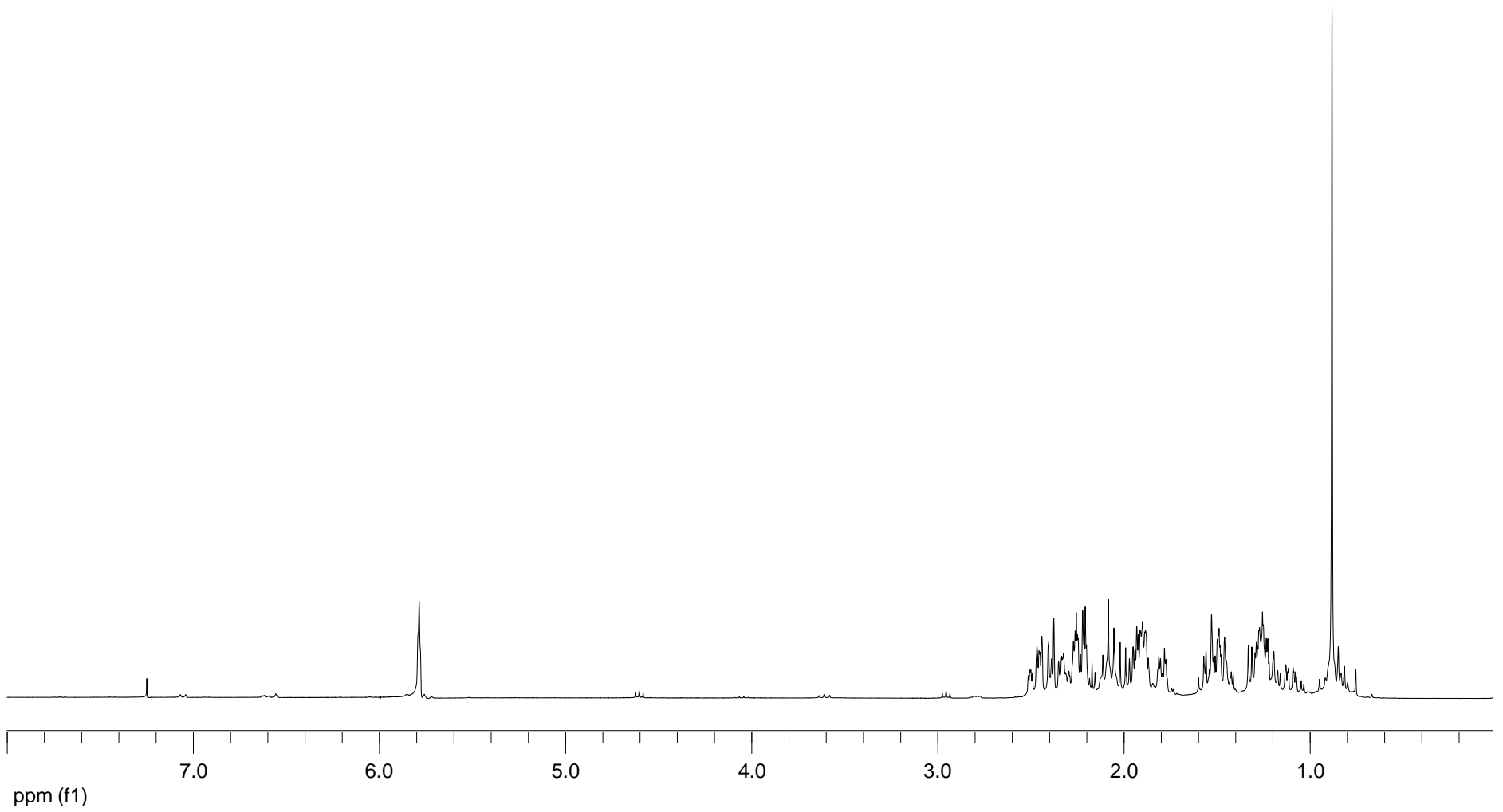
## **EKLER**



Şekil A.1. Nandrolon (**10**) için  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

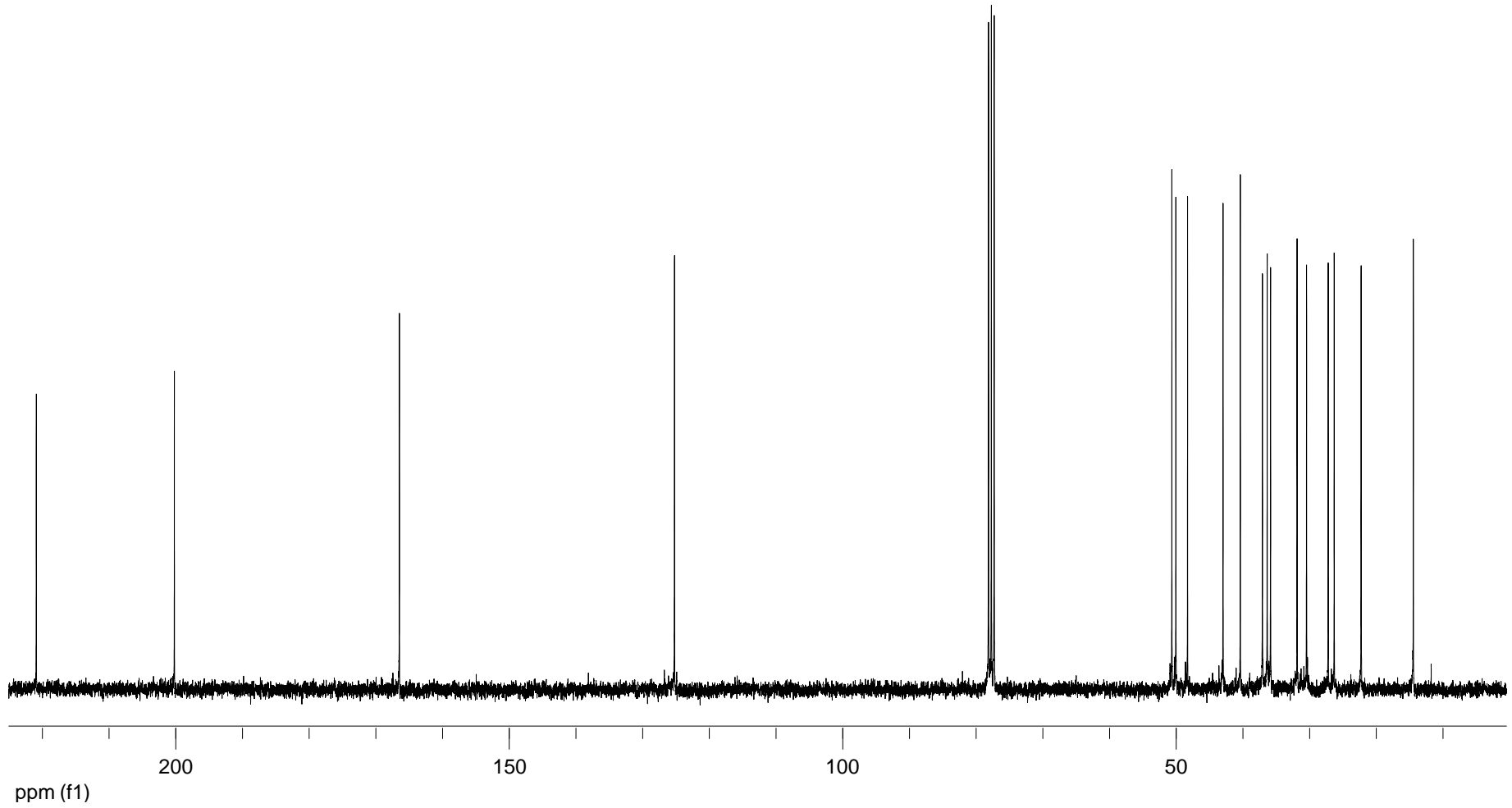


Şekil A.2. Nandrolon (10) için  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu

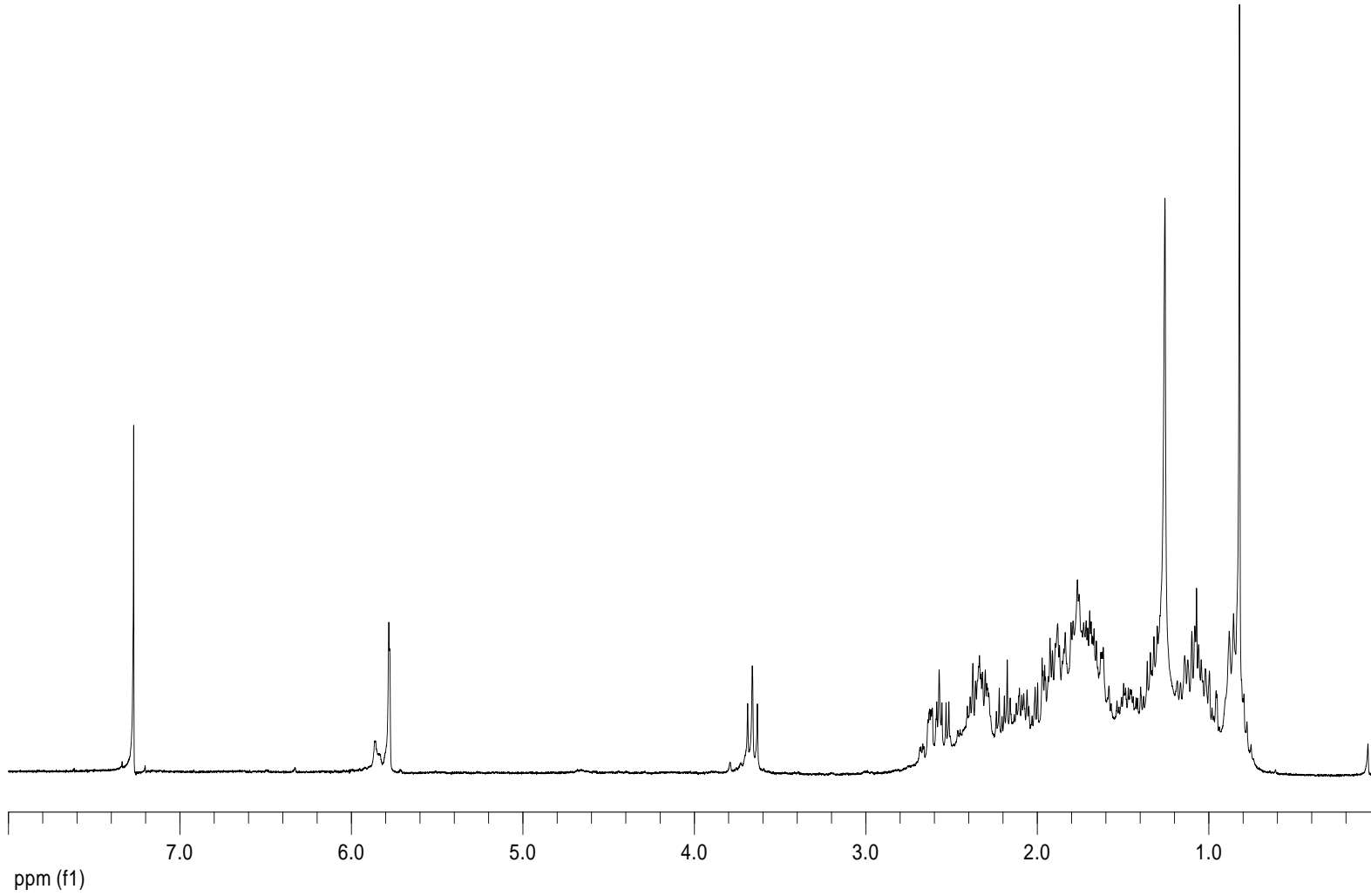


Şekil A.3. 19-Norandrost-4-en-3,17-dion (**11**) için <sup>1</sup>H NMR spektrumu

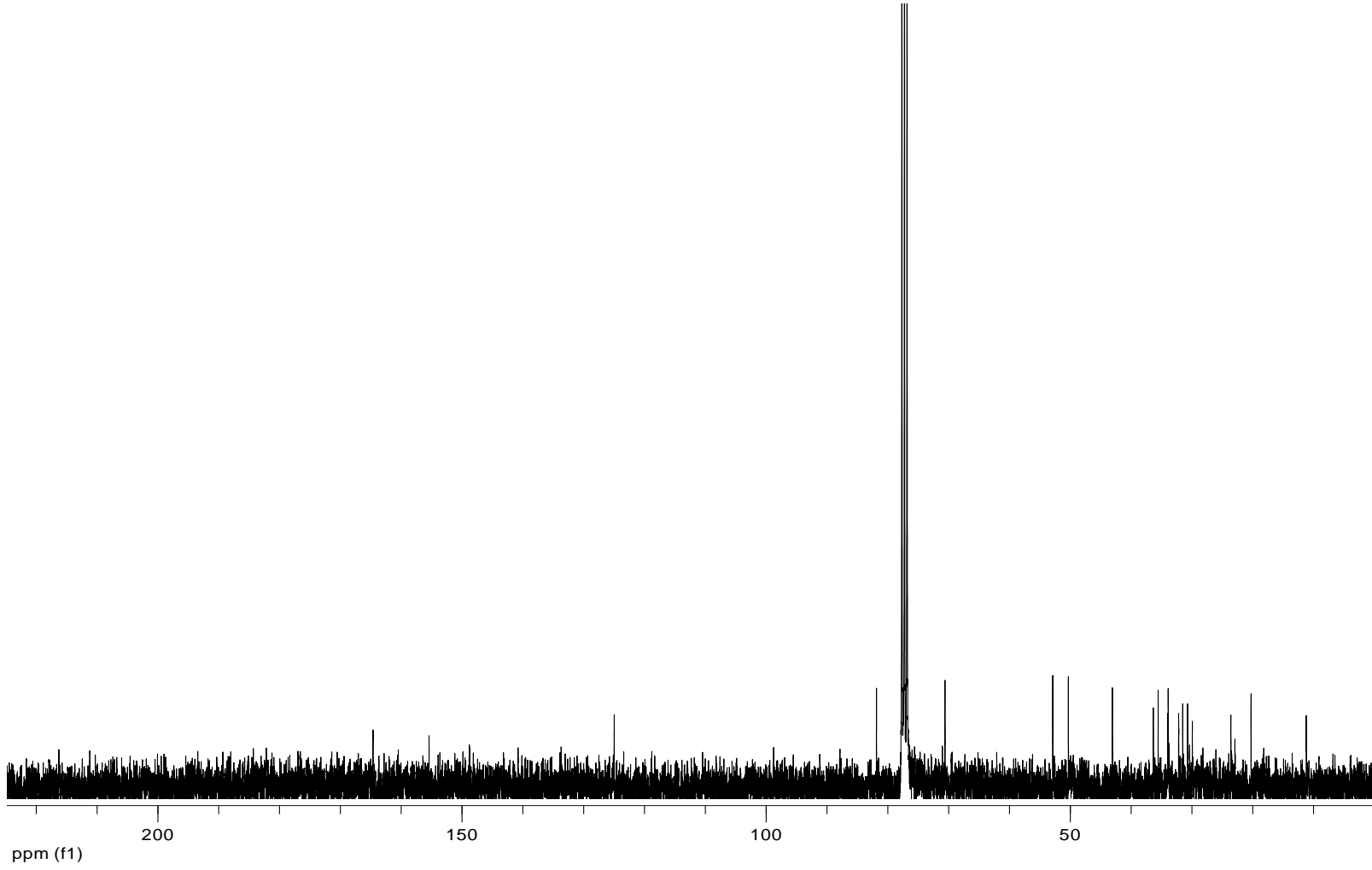




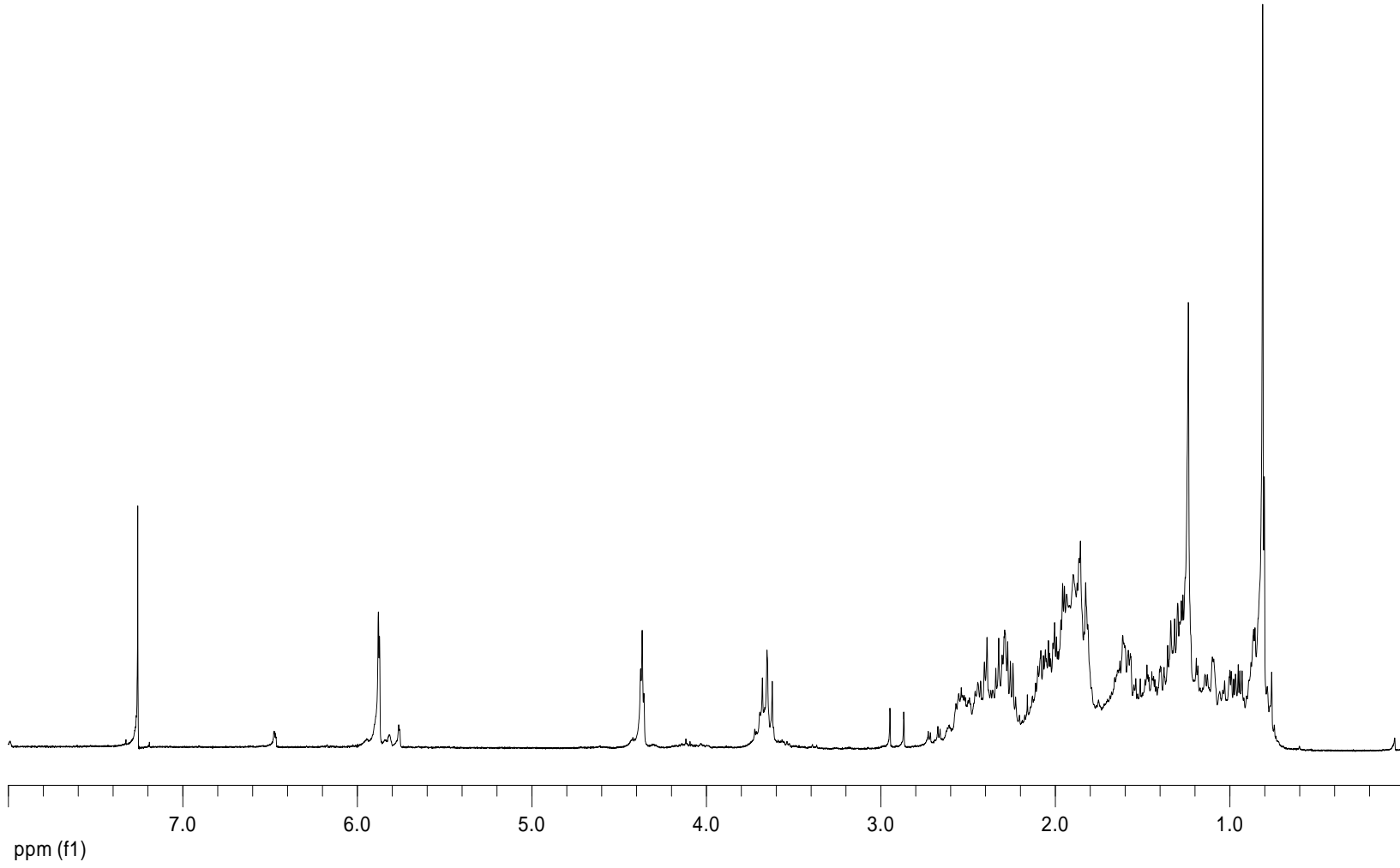
Şekil A.4. 19-Norandrost-4-en-3,17-dion (**11**) için  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu



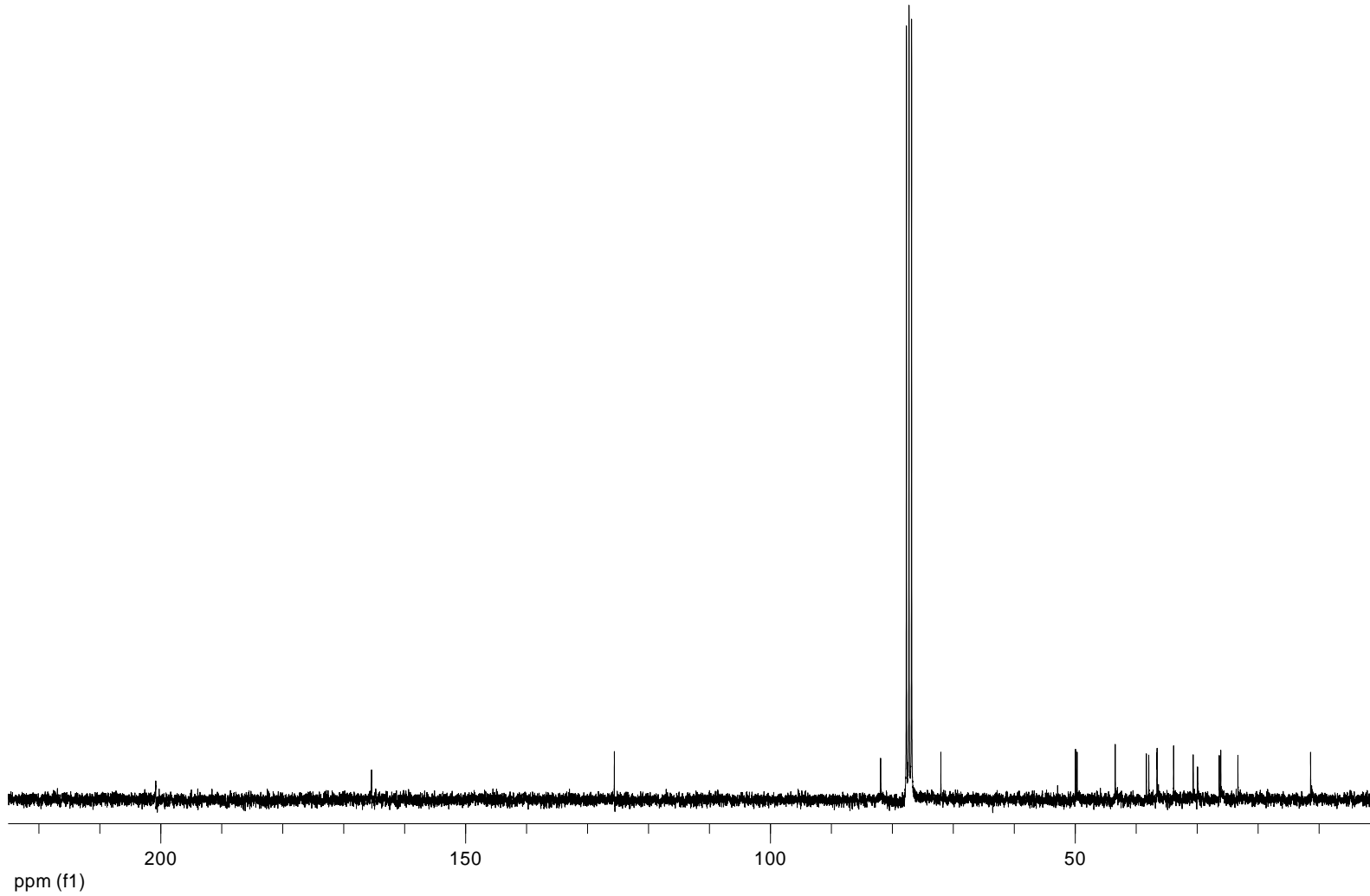
Şekil A.5. 10β-Hidroksi-19-nortestosteron (**16**) için  $^1\text{H}$  NMR spektrumu



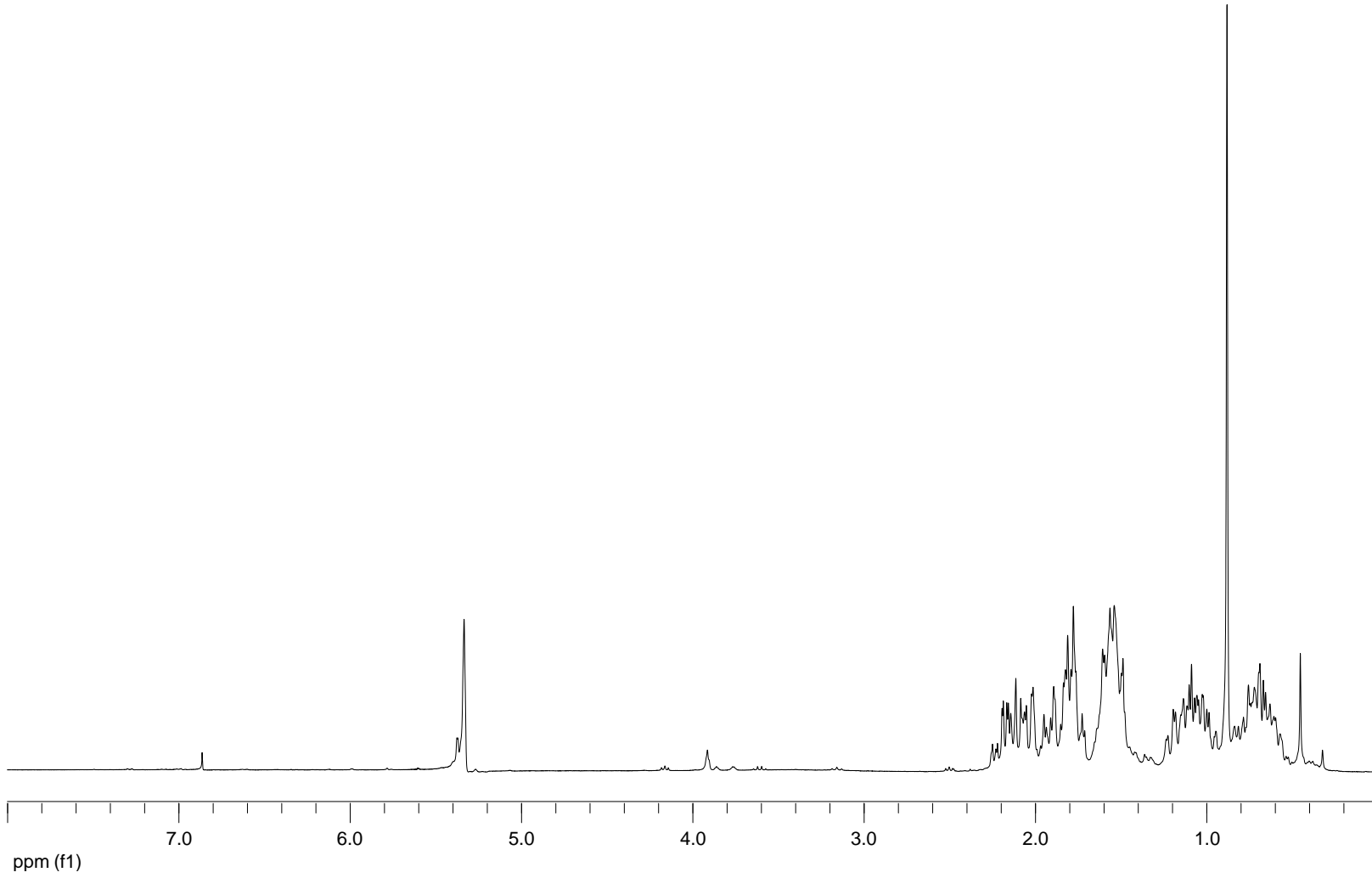
Şekil A.6. 10 $\beta$ -Hidroksi-19-nortestosteron (**16**) için  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu



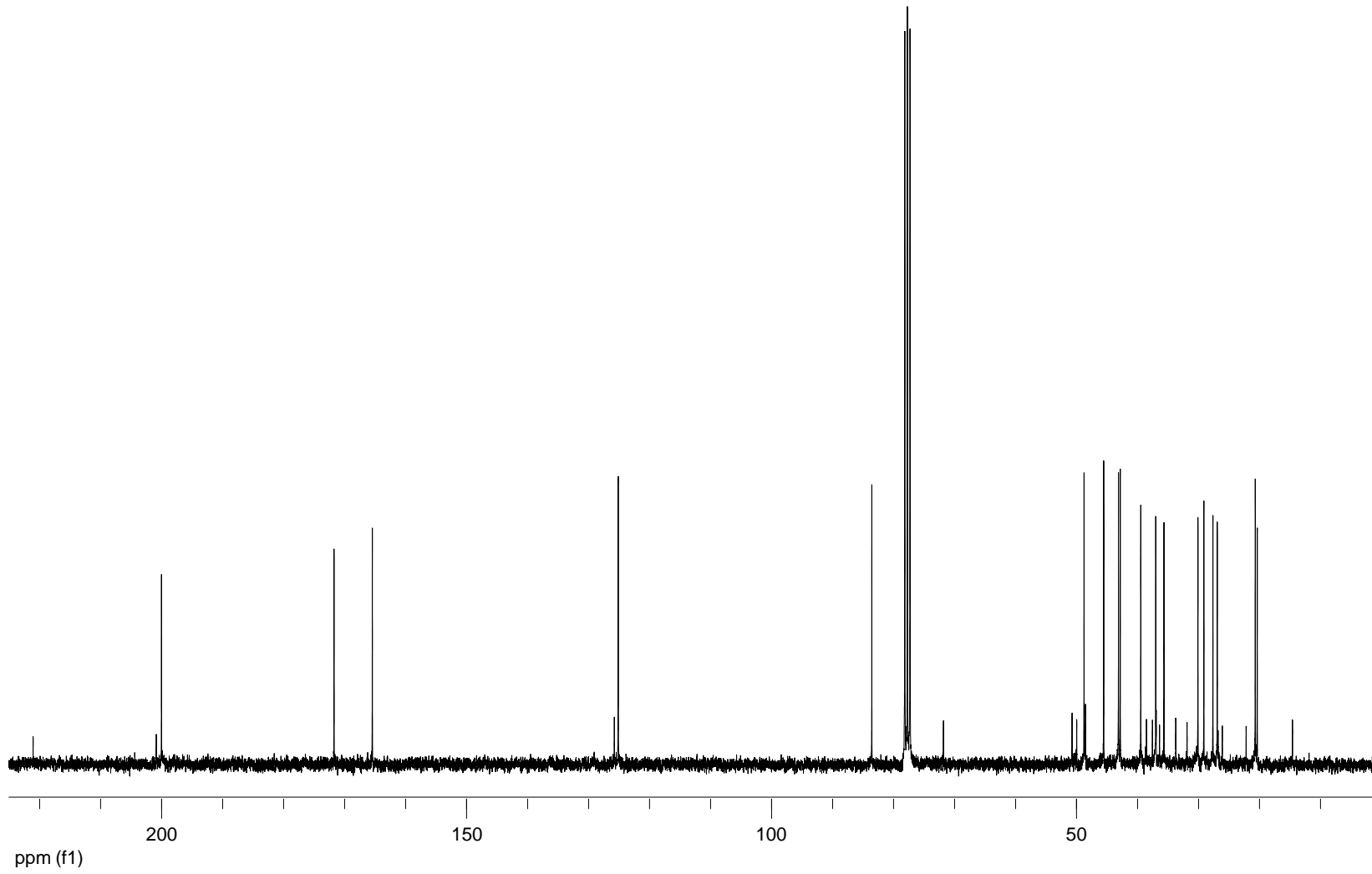
Şekil A.7. 6 $\beta$ -Hidroksi-19-nortestosteron (**17**) için  $^1\text{H}$  NMR spektrumu



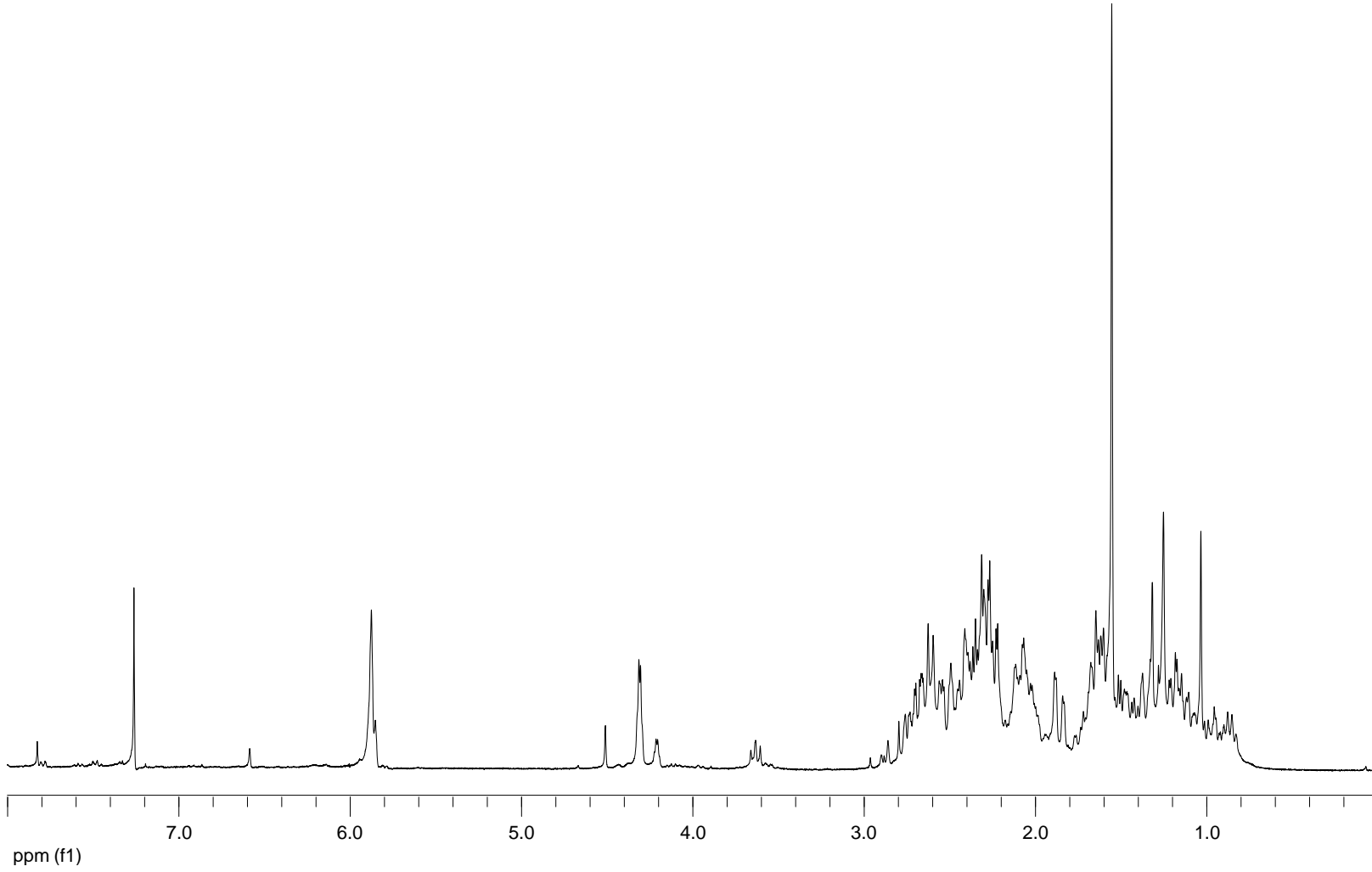
Şekil A.8. 6 $\beta$ -Hidroksi-19-nortestosteron (**17**) için  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu



Şekil A.9. 19-Nortestolakton (**22**) için <sup>1</sup>H NMR spektrumu

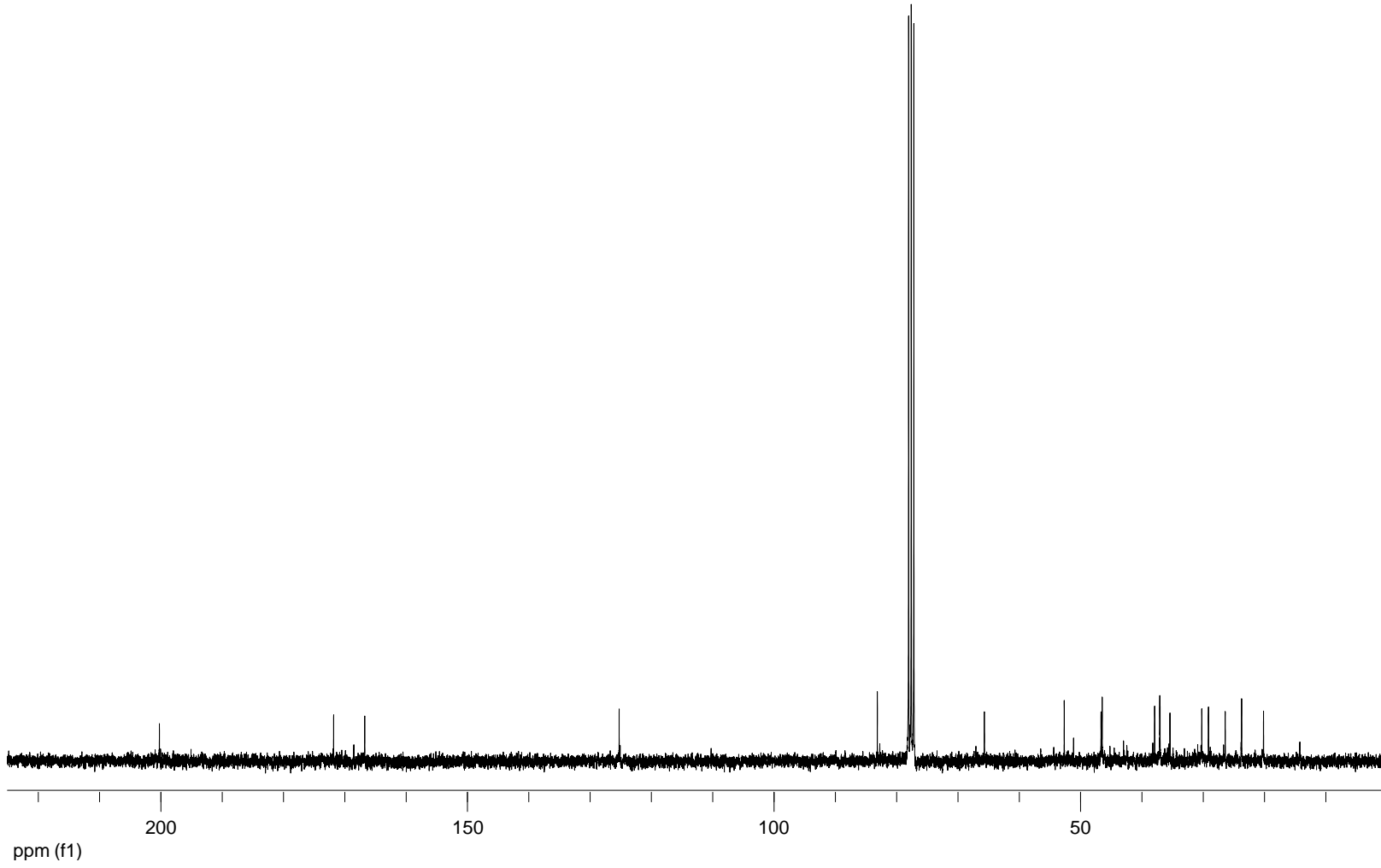


Şekil A.10. 19-Nortestolakton (**22**) için  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu

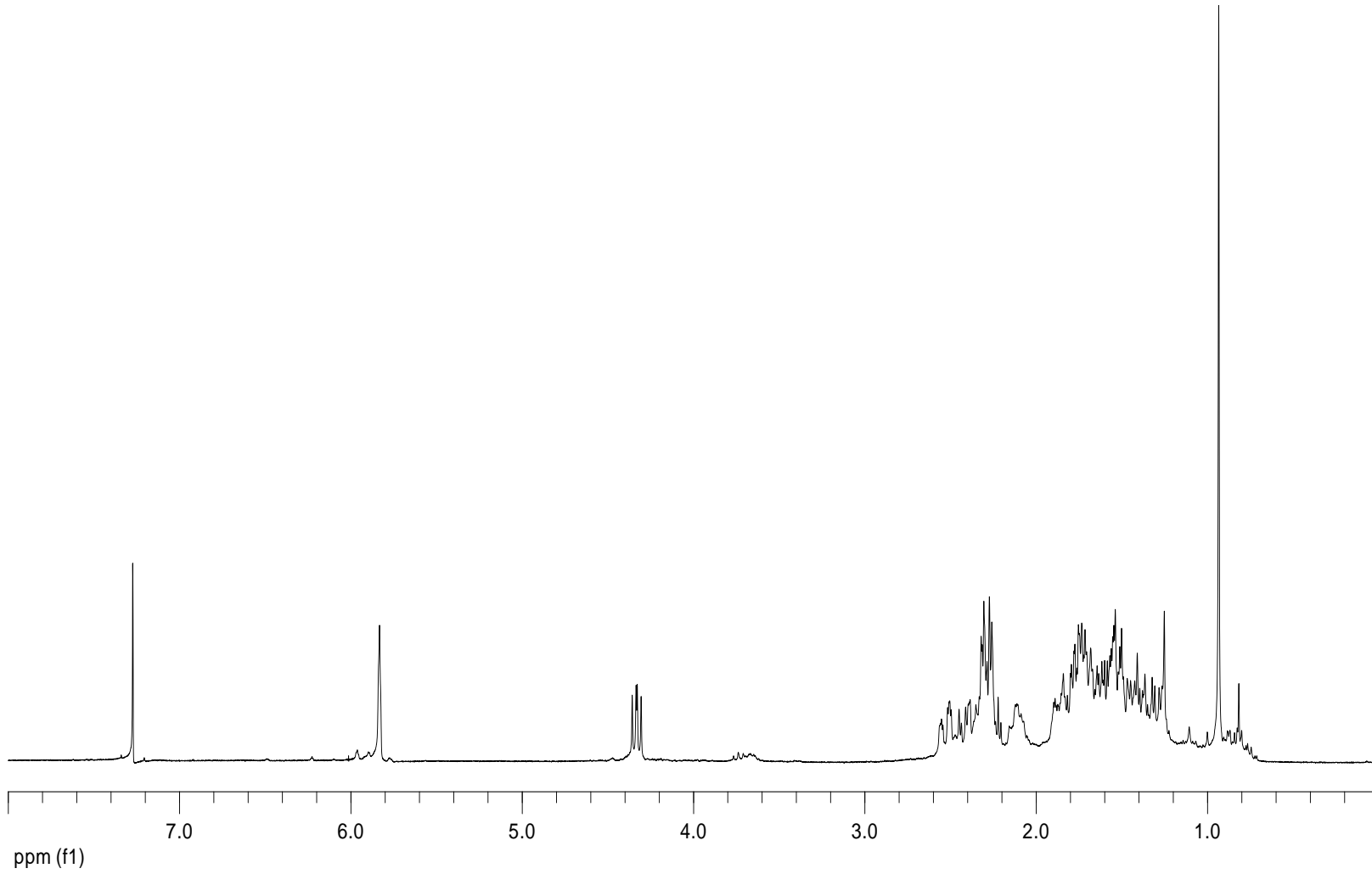


Şekil A.11. 11β-Hidroksi-19-nortestolakton (**23**) için <sup>1</sup>H NMR spektrumu

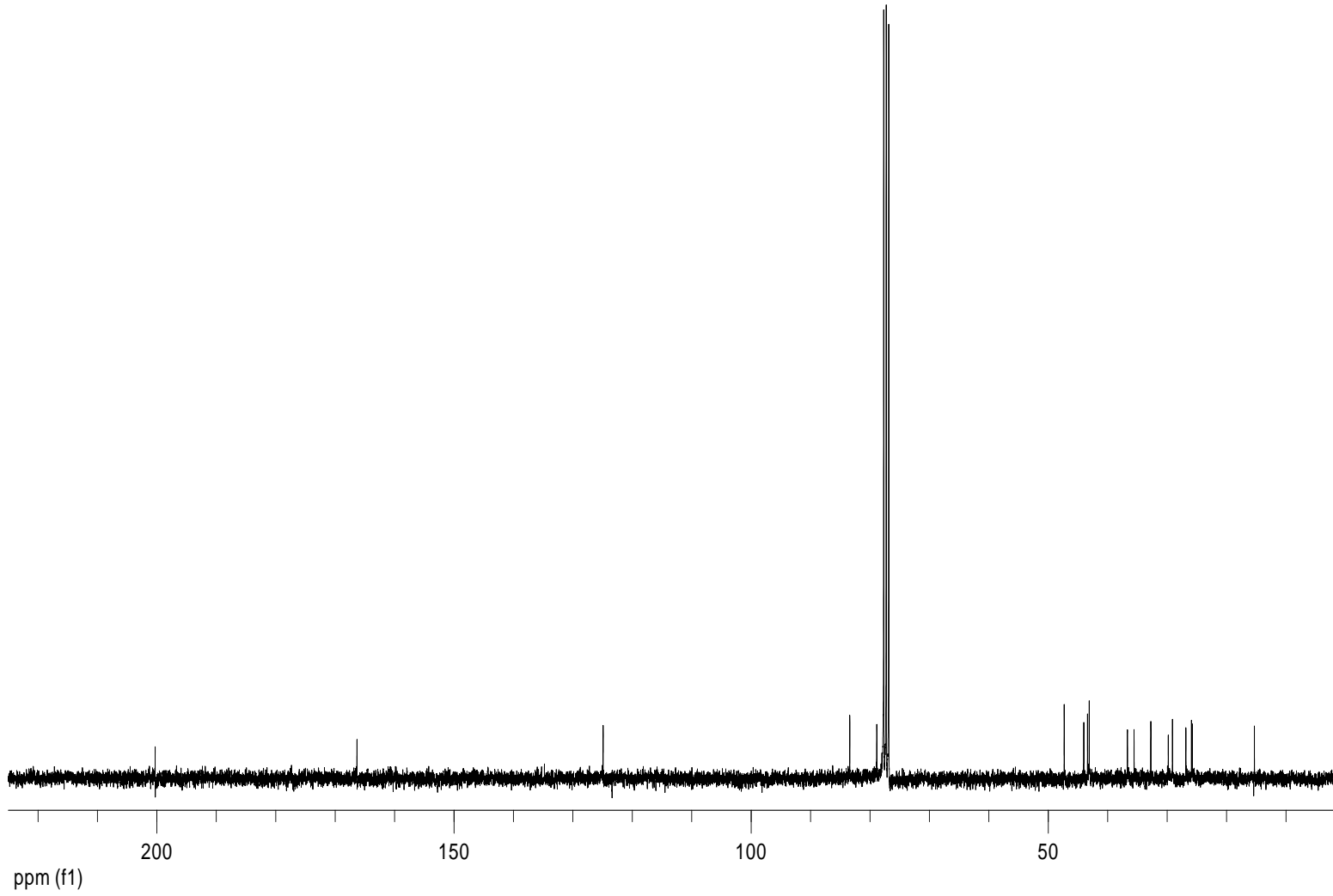




Şekil A.12. 11 $\beta$ -Hidroksi-19-nortestolakton (**23**) için  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu



Şekil A.13. 14α-Hidroksi-19-nortestosteron (**27**) için <sup>1</sup>H NMR spektrumu



Şekil A.14. 14 $\alpha$ -Hidroksi-19-nortestosteron (**27**) için  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu

## ÖZGEÇMİŞ

Çağla Ayhan 1986' da Elazığ'da doğdu. İlkokulu Namık Kemal İlkokulu'nda (Elazığ); orta öğrenimini de Elazığ Anadolu Lisesi'nde tamamladı. Lisans öğrenimi 2009 yılında Fırat Üniversitesi Kimya bölümünde tamamladıktan sonra 2009-2010 eğitim-öğretim yılında tezsiz yüksek lisans eğitimini yine Fırat Üniversitesi'nde tamamladı. Tezli yüksek lisans öğrenimine 2010 yılında Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında başladı.