

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TESTOSTERON BİLEŞİĞİNİN BAZI KÜFLER İLE
BİYOTRANSFORMASYONLARI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İlknur KÜPÇÜ

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Kudret Yıldırım

HAZİRAN 2010

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TESTOSTERON BİLEŞİĞİNİN BAZI KÜFLER İLE BİYOTRANSFORMASYONLARI


YÜKSEK LİSANS TEZİ


İlknur KÜPÇÜ


Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA

Bu tez 11 / 06 / 2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Ahmet TUTAR
Jüri Başkanı


Doç. Dr. İsmail KIRAN
Üye


Yrd. Doç. Dr. Kudret YILDIRIM
Üye

TEŞEKKÜR

Çalıőmayı 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 teőekkürlerimi sunarım.

Laboratuardaki meőakkatli çalıőmalarım esnasında bana desteğini esirgemeyen Dr. Araő. Gör. Semra YILMAZER'e teőekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisansa beraber baőladıęımız ve çalıőmalarıma büyük katkıları olan Fatih GÜLŐAN'a teőekkürlerimi sunarım.

Yaőamım boyunca maddi manevi her türlü desteği esirgemeyen aileme ve arkadaşlarıma teőekkürlerimi sunarım.

Nisan 2010
İlknur KÜPÇÜ

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.	
TESTOSTERON BİLEŞİĞİNİN KÜFLER İLE BİYOTRANSFORMASYONLARI.....	3
2.1. Testosteron.....	3
2.2. Testosteron (4) Bileşiminin Küfler ile Biyotransformasyonları.....	6
2.3. Çalışmanın Amacı.....	8
BÖLÜM 3.	
MATERYAL VE METOT.....	10
3.1. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler.....	10
3.2. Taze Yatık Agar Kültürlerinin Hazırlanması.....	11
3.3. Substratın Bazı Küfler ile Biyotransformasyonu.....	11
3.3.1. Substratın <i>Penicillium digitatum</i> ile biyotransformasyonu.....	11
3.3.2. Substratın <i>Aspergillus wentii</i> ile biyotransformasyonu.....	12

BÖLÜM 4.	
DENEYSEL BULGULAR.....	14
BÖLÜM 5.	
SONUÇLARVE TARTIŞMA.....	18
KAYNAKLAR.....	23
EKLER.....	28
ÖZGEÇMİŞ.....	43

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

α	: Molekül düzleminin altındaki süstitüentler
β	: Molekül düzleminin üstündeki süstitüentler
bs	: Broad singlet (küt singlet)
$^{\circ}\text{C}$: Santigrat derece
cm	: Santimetre
^{13}C NMR	: Karbon 13 Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
Δ	: Kimyasal kayma farkı
δ_{H}	: ^1H NMR spektrumundaki kimyasal kayma
δ_{C}	: ^{13}C NMR spektrumundaki kimyasal kayma
DHEA	: Dehidroepiandrosteron
DHT	: Dihidrotestosteron
DMF	: Dimetilformamit
e. n.	: Erime noktası
^1H NMR	: Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
Hz	: Hertz
IR	: Infrared Spektroskopisi
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
J	: Etkileşme sabiti
L	: Litre
lit.	: Literatür
m	: Multiplet
mg	: Miligram
MHz	: Megahertz
mL	: Mililitre
MRC	: Marmara Research Center (Marmara Araştırma Merkezi)
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
PDA	: Potato Dextrose Agar
pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonunun eksi logaritması

ppm	: Milyonda bir kısım
rpm	: Dakika başına dönüş sayısı
s	: Singlet
sp.	: Belirli bir cinse ait tür
t	: Triplet
tt	: Tripletin tripleti
TÜBİTAK	: Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Progesteronun <i>R. arrhizus</i> ile biyotransformasyonu.....	2
Şekil 2.1.	Testosteron (4) ve DHT (5) bileşiklerinin biyosentezi	4
Şekil 2.2.	Testosteron (4) bileşiğinin bazı metabolitleri	5
Şekil 2.3.	Dihidrotestosteron (5) bileşiğinin metabolitleri	5
Şekil 4.1.	Substrat karbon iskeletinin numaralandırılması.....	14
Şekil 4.2.	Substratın <i>Penicillium digitatum</i> ile biyotransformasyonu.....	16
Şekil 4.3.	Substratın <i>Aspergillus wentii</i> ile biyotransformasyonu.....	17
Şekil A.1.	Testosteron (4) bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu	29
Şekil A.2.	Testosteron (4) bileşiğinin ¹³ C NMR spektrumu	30
Şekil A.3.	5 α -Androstan-3,17-dion (16) bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu	31
Şekil A.4.	5 α -Androstan-3,17-dion (16) bileşiğinin ¹³ C NMR spektrumu...	32
Şekil A.5.	3 α -Hidroksi-5 α -androstan-17-on (11) bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu	33
Şekil A.6.	3 α -Hidroksi-5 α -androstan-17-on (11) bileşiğinin ¹³ C NMR spektrumu	34
Şekil A.7.	3 β Hidroksi-5 α -androstan-17-on (13) bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu	35
Şekil A.8.	3 β -Hidroksi-5 α -androstan-17-on (13) bileşiğinin ¹³ C NMR spektrumu	36
Şekil A.9.	Androst-4-en-3,17-dion (8) bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu	37
Şekil A.10.	Androst-4-en-3,17-dion (8) bileşiğinin ¹³ C NMR spektrumu	38
Şekil A.11.	6 β ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (17) bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu	39
Şekil A.12.	6 β ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (17) bileşiğinin ¹³ C NMR spektrumu	40
Şekil A.13.	14 α ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (18) bileşiğinin ¹ H NMR	41

spektrumu	
Şekil A.14. $14\alpha,17\beta$ -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (18) bileşiğinin ^{13}C NMR	42
spektrumu	

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1. Testosteronun (4) <i>Penicillium</i> türleri ile biyotransformasyonları....	6
Tablo 2.2. Testosteronun (4) <i>Aspergillus</i> türleri ile biyotransformasyonları.....	6
Tablo 2.3. Testosteronun (4) <i>Fusarium</i> türleri ile biyotransformasyonları.....	7
Tablo 2.4. Testosteronun (4) <i>Rhizopus</i> türleri ile biyotransformasyonları.....	7
Tablo 2.5. Testosteronun (4) <i>Mucor</i> türleri ile biyotransformasyonları.....	7
Tablo 2.6. Testosteronun (4) <i>B. obtusa</i> ile biyotransformasyonu.....	8
Tablo 2.7. Testosteronun (4) <i>N. haematococca</i> ile biyotransformasyonu.....	8
Tablo 2.8. Testosteronun (4) diğer küfler ile biyotransformasyonları.....	9
Tablo 3.1. <i>Penicillium digitatum</i> küfüne ait besiyeri çözeltilisinin bileşenleri.....	11
Tablo 3.2. <i>Aspergillus wentii</i> küfüne ait besiyeri çözeltilisinin bileşenleri.....	13
Tablo 5.1. Bileşik ¹ H NMR spektrumlarının karşılaştırılması.....	19
Tablo 5.2. Bileşik ¹³ C NMR spektrumlarının karşılaştırılması.....	20

ÖZET

Anahtar Kelimeler: Biyotransformasyon, Testosteron, *Penicillium digitatum*, *Aspergillus wentii*

Bu çalışmada, testosteronun *Aspergillus wentii* MRC 200316 ve *Penicillium digitatum* MRC 500787 küfleri ile biyotransformasyonları gerçekleştirildi. *Aspergillus wentii* MRC 200316 ile inkübasyon iki metabolit verirken *Penicillium digitatum* MRC 500787 ile inkübasyon ise dört ayrı metabolit verdi.

Elde edilen metabolitlerin yapıları, erime noktaları, ^1H NMR, ^{13}C NMR, ve IR spektrumları ile tayin edildi. *Aspergillus wentii* ile inkübasyon $6\beta,17\beta$ -dihidroksandrost-4-en-3-on ve $14\alpha,17\beta$ -dihidroksandrost-4-en-3-on bileşiklerini verirken *Penicillium digitatum* ile inkübasyon 5α -androstan-3,17-dion, 3α -hidroksi- 5α -androstan-17-on, 3β -hidroksi- 5α -androstan-17-on ve androst-4-en-3,17-dion bileşiklerini verdi.

THE BIOTRANSFORMATION OF TESTOSTERONE BY SOME FUNGI

SUMMARY

Keywords : Biotransformation, Testosterone, *Penicillium digitatum*, *Aspergillus wentii*

In this work, testosterone was incubated with *Aspergillus wentii* MRC 200316 and *Penicillium digitatum* MRC 500787. Incubation with *Aspergillus wentii* MRC 200316 afforded two metabolites whereas incubation with *Penicillium digitatum* MRC 500787 afforded four metabolites.

The structures of the metabolites were elucidated by the melting points, ^1H NMR, ^{13}C NMR and IR spectra. Incubation with *Aspergillus wentii* afforded $6\beta,17\beta$ -dihydroxyandrost-4-en-3-one and $14\alpha,17\beta$ -dihydroxyandrost-4-en-3-one while incubation with *Penicillium digitatum* afforded 5α -androstane-3,17-dione, 3α -hydroxy- 5α -androstane-17-one, 3β -hydroxy- 5α -androstane-17-one and androst-4-en-3,17-dione.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

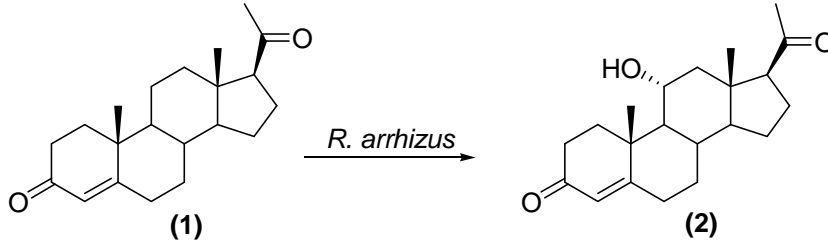
Canlılar hayatları boyunca kendilerine yabancı olan ve ksenobiyotikler adı verilen çeşitli kimyasal maddeler ile karşılaşır. Enzimler veya enzimleri içeren biyolojik sistemlerin kendilerine yabancı olan bu maddeler üzerinde gerçekleştirdikleri kimyasal değişiklere biyotransformasyonlar adı verilir [1]. En eski ve en iyi bilinen biyotransformasyonlardan ikisi; sirke üretiminde etil alkolün bakteriler tarafından asetik aside oksidasyonu ve şekerin bira mayası tarafından etil alkole dönüştürülmesidir [1, 2].

Biyotransformasyonlar için genellikle mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Bunun başlıca sebepleri arasında mikroorganizmalar ile gerçekleştirilen biyotransformasyonların çevre dostu olmaları, daha kısa sürede, daha ucuza ve erlenden fabrika fermentörüne kadar çeşitli ortamlarda gerçekleştirilebilmeleri sayılabilir. Mikroorganizmalar biyotransformasyonlar için serbest veya uygun yüzeylere sabitlenmiş olarak kullanılabilir. Küfler, mayalar, bakteriler ve mikrobiyal algler en yaygın olarak kullanılan mikroorganizma gruplarıdır [3].

Özellikle küfler ve bakteriler gibi mikroorganizmalar, spesifik olmayan enzim sistemleri sayesinde hem doğal hem de sentetik birçok substrat üzerinde çok sayıda farklı kimyasal reaksiyonlar gerçekleştirebilirler. Mikrobiyal hidroksilasyonlar çoğu biyotransformasyon reaksiyonlarını katalizleyen sitokrom P-450 enzimlerince gerçekleştirilirler. Mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonlarının en önemlilerinden birisi mikrobiyal hidroksilasyondur [1].

Mikrobiyal hidroksilasyonun önemi ilk olarak kortikal steroidlerin sentezinde ortaya çıkmıştır. Kortikal steroidlerin sentezinde fonksiyonel grupların oldukça uzakta bulunan C-11'e bir oksijen fonksiyonu yerleştirmek, klasik kimyasal yöntemlerle oldukça uzun ve masraflı bir işlemdir. Bu problemin *Rhizopus arrhizus* küfünün

progesteronu (1) 11 α -hidroksipregn-4-en-3,20-dion (2) bileşimine dönüştürmesi (Şekil 1.1.) ile çözülmesi dikkatleri mikrobiyal biyotransformasyonlar üzerine çekmiştir [1, 4].



Şekil 1.1. Progesteronun (1) *R. arrhizus* ile biyotransformasyonu

Mikrobiyal hidrosilasyonun öneminin anlaşılmasından sonra steroidler ve diğer birçok farklı madde üzerinde çok sayıda değişik mikroorganizma ile farklı ve yeni biyotransformasyon reaksiyonları gerçekleştirilmiştir [1, 5]. Steroidal ilaçlar ve hormonlar gibi çok sayıdaki önemli kimyasal madde çoğu çevre kirletici olan klasik sentez yöntemleri ile uzun sürede ve oldukça maliyetli olarak üretildiğinden mikrobiyal biyotransformasyonlar günümüzde giderek yaygınlaşmakta ve bu amaç doğrultusunda halen birçok steroid özellikle farklı küf türleri ile biyotransformasyonlara maruz bırakılmaktadır [5].

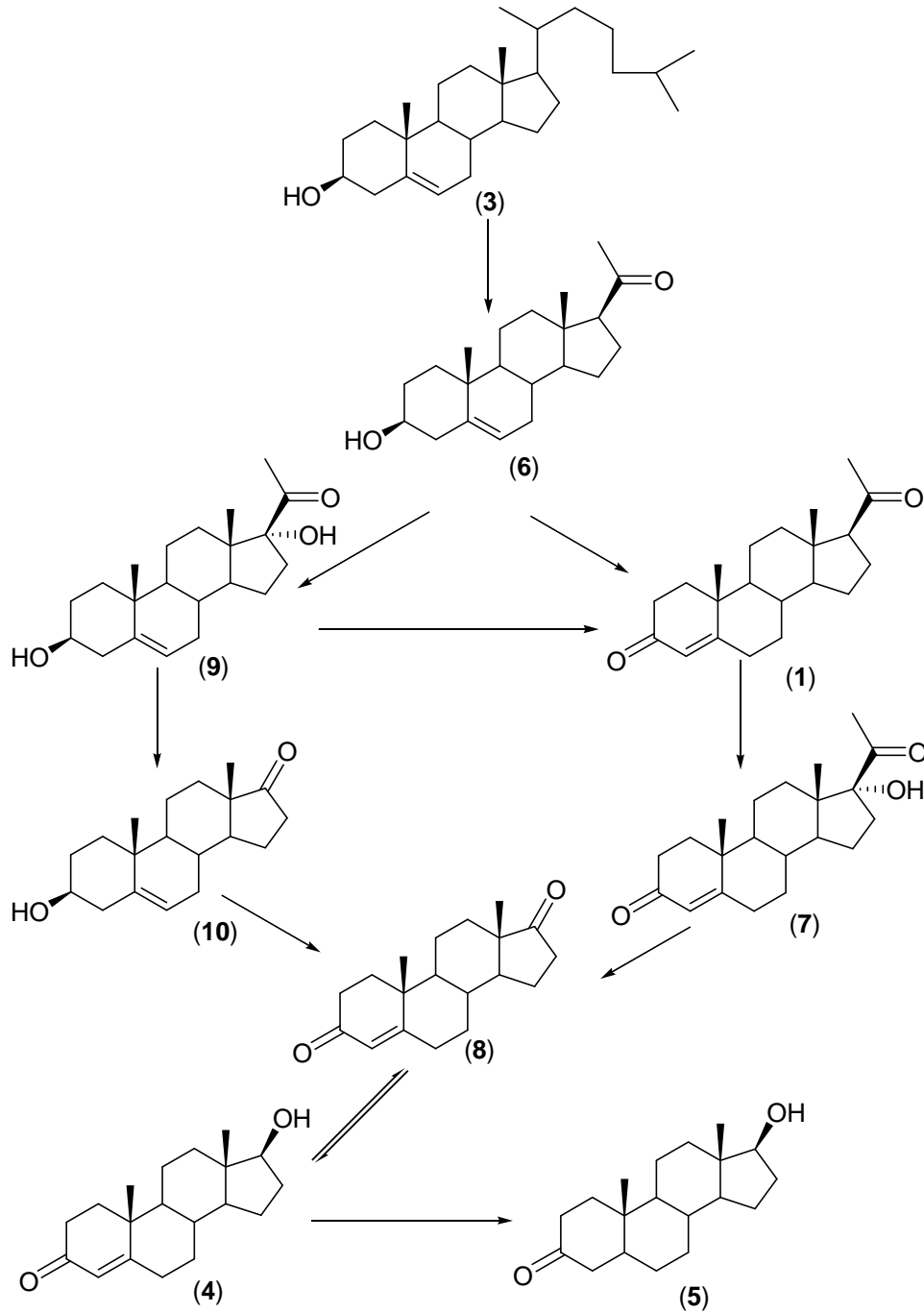
BÖLÜM 2. TESTOSTERON BİLEŞİĞİNİN KÜFLER İLE BİYOTRANSFORMASYONLARI

2.1. Testosteron

Hayvansal membranlardaki akışkanlığının düzenlenmesinde önemli bir lipid olan kolesterol (3) bileşiği, steroid hormonlar, safra asitleri ve D₃ vitamini gibi birçok hayati fonksiyonu bulunan bileşiğin de başlangıç maddesidir [6, 7]. Kolesterol (3) kökenli steroid hormonlar glukokortikoidler, mineralokortikoidler, androjenler, östrojenler ve progestagenler (progestinler) olmak üzere beş ana sınıfta incelenmektedir [6]. 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 [6].

Androjenler erkek bireylerde etkili olan eşey hormonlarıdır. Testosteron olarak bilinen 17 β -hidroksiandrost-4-en-3-on (4) ve dihidrotestosteron veya kısaca DHT olarak bilinen 17 β -hidroksi-5 α -androstan-3-on (5) bileşikleri 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 (3) pregnenolon (6) oluşması ile başlar (Şekil 2.1). Adenohipofizden salınan LH (lüteinleştirici hormon) kolesterolden (3) pregnenolon (6) sentezini uyarır. LH salınması ise kandaki serbest testosteron düzeyi tarafından düzenlenir. Pregnenolon (6) üzerinden androjenlerin biyosentezi Δ^4 yolu ve Δ^5 yolu olmak üzere iki ayrı şekilde gerçekleşmektedir. Androjen biyosentezinin ana yolu Δ^4 yoludur. Bu yolda pregnenolon (6) önce progesterona (1) dönüştürülür. Progesteron (1) ise daha sonra 17 α -hidroksiprogesterona (7) dönüştürülür. 17 α -Hidroksiprogesteron (7) bünyesindeki yan

zincirinin enzimatik olarak parçalanması ile oluşan androstendion (8) bileşiğinin C-17'deki indirgenmesi sonucunda testosteron (4) sentezlenir. Testosterondan (4) ise daha sonra 5α -redüktaz aktivitesi ile daha etkin bir diğer androjen olan dihidrotestosteron (5) sentezlenir [6].

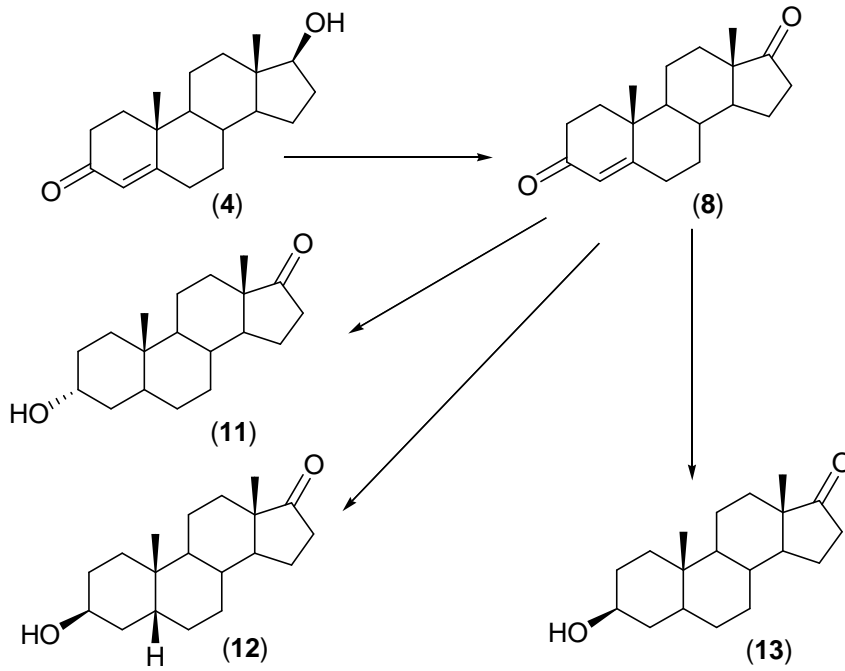


Şekil 2.1. Testosteron (4) ve DHT (5) bileşiklerinin biyosentezi

Bir yan yol olan Δ^5 yolunda pregnenolon (6) 17 α -hidroksipregnenolon (9) bileşiğine çevrildikten sonra yan zincirin uzaklaştırılması ile dehidroepiandrosteron (DHEA) (10) bileşiğine çevrilmektedir. DHEA ise androst-4-en-3-17-dion (8) bileşiğine

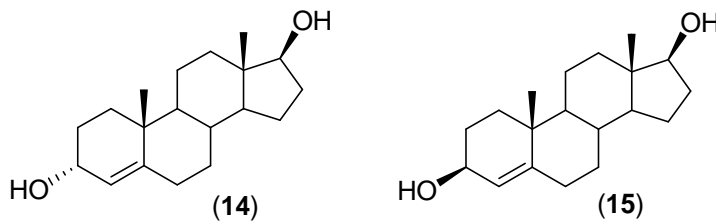
çevrildikten sonra testosterona (4) yükseltgenmektedir. Bu yolda oluşan 17α -hidroksipregnenolon (9) ayrıca doğrudan progesterona (1) çevrilebilmektedir [6].

Testosteron (4) biyolojik etkinliğini tamamladıktan sonra birçok dokuda düşük aktiviteli veya tamamen inaktif metabolitlere dönüştürülmektedir. Testosteron (4) androst-4-en-3-17-dion (8) bileşiğine çevrildikten sonra bu bileşiğin A halkasındaki bir seri tepkimeler ile indirgenmesi sonucunda Şekil 2.2’de yapıları verilen 3α -hidroksi- 5α -androstan-17-on (11), 3β -hidroksi- 5β -androstan-17-on (12) ve 3β -hidroksi- 5α -androstan-17-on (13) gibi metabolitlerin oluştuğu bildirilmiştir [6].



Şekil 2.2. Testosteron (4) bileşiğinin bazı metabolitleri

Dihidrotestosteron (5) bileşiğinin ise A halkasındaki dehidrojenasyonu takiben 3 nolu karbon atomunda gerçekleşen redüksiyonlar sonucu Şekil 2.3’de verilen 3α -androstendiol (14) ve 3β -androstendiol (15) metabolitlerine dönüştüğü bilinmektedir [6].



Şekil 2.3. Dihidrotestosteron (5) bileşiğinin metabolitleri

2.2. Testosteron (4) Bileşiminin Küfler ile Biyotransformasyonları

Testosteron (4) bileşiminin küfler ile biyotransformasyonu hakkında literatürde birçok çalışma bulunmaktadır [8-40]. Örneğin testosteronun (4) bazı *Penicillium* türleri ile biyotransformasyonları Tablo 2.1.'de gösterildiği gibi genellikle mikrobiyal hidrogenasyonlar, Baeyer-Villiger oksidasyonları ve C-3 pozisyonunda bazı indirgenmeler ile sonuçlanmıştır.

Tablo 2.1. Testosteronun (4) *Penicillium* türleri ile biyotransformasyonları

Küf	Ürün	Kaynak
<i>Penicillium crustosum</i>	17 β -Hidroksi-5 α -androstan-3-on (5)	[8]
	5 α -Androstan-3,17-dion (16)	
	3 α -Hidroksi-5 α -androstan-17-on (11)	
	3 α -Hidroksi-5 β -androstan-17-on	
<i>Penicillium chrysogenum</i>	17 β -Hidroksi-5 α -androstan-3-on (5)	[8]
	Androst-4-en-3,17-dion (8)	
<i>Penicillium notatum</i> KCH 904	Testolakton	[9]
<i>Penicillium decumbens</i> ATCC 10436	5 α -Androstan-3,17-dion (16)	[10]
	17 β -Hidroksi-5 α -androstan-3-on (5)	

Testosteronun (4) çeşitli *Aspergillus* türleri ile biyotransformasyonları Tablo 2.2.'de özetlendiği gibi mikrobiyal hidroksilasyonlar, mikrobiyal hidrojenasyonlar ve Baeyer-Villiger oksidasyonları ile sonuçlanmıştır.

Tablo 2.2. Testosteronun (4) *Aspergillus* türleri ile biyotransformasyonları

Küf	Ürün	Kaynak
<i>Aspergillus aerofulgens</i>	Androst-4-en-3,17-dion (8)	[11]
	5 β -Androstan-3,17-dion	
	Testolakton	
<i>Aspergillus tamarii</i>	Testolakton	[12]
	11 β ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	15 β ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on	[13]

Testosteronun (4) çeşitli *Fusarium* türleri ile biyotransformasyonları Tablo 2.3.'de gösterildiği gibi mikrobiyal hidroksilasyonlar, mikrobiyal dehidrojenasyonlar ve C-17 pozisyonunda bazı oksidasyonlar ile sonuçlanmıştır.

Tablo 2.3. Testosteronun (4) *Fusarium* türleri ile biyotransformasyonları

Küf	Ürün	Kaynak
<i>Fusarium lini</i>	Androst-4-en-3,17-dion (8)	[14]
	11 α -Hidroksiandrosta-1,4-dien-3,17-dion	
	11 α ,17 β -Dihidroksiandrosta-4-en-3-on	
	Androsta-1,4-dien-3,17-dion	
	17 β -Hidroksiandrosta-1,4-dien-3-on	
	11 α ,17 β -Dihidroksiandrosta-1,4-dien-3-on	
<i>Fusarium culmorum</i>	6 β -Hidroksiandrosta-4-en-3,17-dion	[15]
	6 β ,17 β -Dihidroksiandrosta-4-en-3-on (17)	
	15 α -Hidroksiandrosta-4-en-3,17-dion	
	15 α ,17 β -Dihidroksiandrosta-4-en-3-on	

Testosteronun (4) çeşitli *Rhizopus* türleri ile biyotransformasyonları Tablo 2.4.'de verildiği gibi mikrobiyal hidroksilasyonlar, mikrobiyal dehidrojenasyonlar ve Baeyer-Villiger oksidasyonları ile sonuçlanmıştır.

Tablo 2.4. Testosteronun (4) *Rhizopus* türleri ile biyotransformasyonları

Küf	Ürün	Kaynak
<i>Rhizopus stolonifer</i>	11 α -Hidroksiandrosta-4-en-3,17-dion	[14]
	Testolakton	
	Androst-4-en-3,17-dion (8)	
	17 β -Hidroksiandrosta-3,6-dion	
	11 α -Hidroksitestolakton	
<i>Rhizopus nigricans</i>	11 α -Hidroksiandrosta-4-en-3,17-dion	[16]
	11 α -Hidroksiandrosta-1,4-dien-3,17-dion	
<i>Rhizopus arrhizus</i> ATCC-11145	6 β ,17 β -Dihidroksiandrosta-4-en-3-on (17)	[17]
<i>Rhizopus nigricans</i>	11 α -Hidroksiandrosta-4-en-3-on	[18]

Testosteronun (4) çeşitli *Mucor* türleri ile biyotransformasyonları Tablo 2.5.'de özetlendiği gibi mikrobiyal hidroksilasyonlar ile sonuçlanmıştır.

Tablo 2.5. Testosteronun (4) *Mucor* türleri ile biyotransformasyonları

Küf	Ürün	Kaynak
<i>Mucor plumbeus</i>	6 β ,17 β -Dihidroksiandrosta-4-en-3-on (17)	[19]
	14 α ,17 β -Dihidroksiandrosta-4-en-3-on (18)	
<i>Mucor griseocyanus</i>	14 α ,17 β -Dihidroksiandrosta-4-en-3-on (18)	[20]
	14 α -Hidroksiandrosta-4-en-3,17-dion	
<i>Mucor piriformis</i>	14 α -Hidroksiandrosta-4-en-3,17-dion	[21]

Testosteronun (4) *Botryosphaeria obtusa* küfö ile biyotransformasyonu Tablo 2.6.'de özetlendiği gibi çeşitli mikrobiyal hidroksilasyonlar ile sonuçlanmıştır.

Tablo 2.6. Testosteronun (4) *B. obtusa* ile biyotransformasyonu

Küf	Ürün	Kaynak
<i>Botryosphaerica obtusa</i>	6 β ,7 β -Dihidroksiandrosta-4-en-3,17-dion	[22]
	6 β -Hidroksiandrosta-4-en-3,17-dion	
	6 β ,17 β -Dihidroksiandrosta-4-en-3-on (17)	
	7 α ,17 β -Dihidroksiandrosta-4-en-3-on	
	7 β ,17 β -Dihidroksiandrosta-4-en-3-on	
	11 β ,17 β -Dihidroksiandrosta-4-en-3-on	
	12 β ,17 β -Dihidroksiandrosta-4-en-3-on	
	15 α -Hidroksiandrosta-4-en-3,17-dion	
	15 α ,17 β -Dihidroksiandrosta-4-en-3-on	

Testosteronun (4) *Nectria haematococca* küfö ile biyotransformasyonu Tablo 2.7.'de gösterildiği gibi genellikle mikrobiyal hidroksilasyonlar ve dehidrojenasyonlar ile sonuçlanmıştır.

Tablo 2.7. Testosteronun (4) *N. haematococca* ile biyotransformasyonu

Küf	Ürün	Kaynak
<i>Nectria haematococca</i>	11 α ,17 β -Dihidroksiandrosta-1,4-dien-3-on	[23]
	11 α -Hidroksiandrosta-1,4-dien-3,17-dion	
	11 α -Hidroksiandrosta-4-en-3,17-dion	
	17 β -Hidroksiandrosta-1,4-dien-3-on	
	Androsta-1,4-dien-3,17-dion	
	Androst-4-en-3,17-dion (8)	

Testosteronun (4) bileşinin diğer küflerle gerçekteştirilen biyotransformasyonları ise Tablo 2.8.'de özetlendiği gibi genellikle mikrobiyal hidroksilasyonlar, Baeyer-villiger oksidasyonları, mikrobiyal hidrojenasyonlar ve dehidrojenasyonlar ile sonuçlanmıştır.

2.3. Çalışmanın Amacı

Küfler ile steroid biyotransformasyonları için en sık kullanılan türlerin birçoğu *Aspergillus* ve *Penicillium* cinslerine aittir. Bu küf cinslerine ait türler sahip oldukları etkin enzim sistemleri [1,3] sayesinde dünyanın neredeyse her yerinde yaşayabilen canlılardır [3]. Bu çalışmanın amacı testosteron (4) bileşinin *Penicillium digitatum* MRC 500787 ve *Aspergillus wentii* MRC 200316 küflerinde nasıl metabolize edileceğinin incelenmesidir.

Tablo 2.8. Testosteronun (4) diğ er küfl er ile biyotransformasyonları

Küf	Ürün	Kaynak
<i>Absidia coerulea</i>	14 α ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (18)	[24]
	14 α -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion	
<i>Myceliophthora thermophila</i>	17 β -Asetoksiandrost-4-en-3-on	[25]
	Androst-4-en-3,17-dion (8)	
	11 α ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on	
<i>Whetzelinia sclerotiorum</i>	6 β ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (17)	[19]
	Androst-4-en-3,17-dion (8)	
	2 β ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on	
	2 β ,16 β ,17 β -Trihidroksiandrost-4-en-3-on	
<i>Chaetomium</i> sp.	6 β ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (17)	[26]
	14 α -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion	
	6 β -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion	
<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	6 β ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (17)	[27]
	7 α ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on	
	17 β -Hidroksiandrosta-1,4-dien-3-on	
	Androst-4-en-3,17-dion (8)	
	Androsta-1,4-dien-3,17-dion	
<i>Thamnostylum piriforme</i>	14 α ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (18)	[20]
	6 β -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion	
	6 β ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (17)	
	9 α ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on	
<i>Curvularia lunata</i>	Androst-4-en-3,17-dion (8)	[28]
	15 α ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on	
<i>Absidia glauca</i>	Androst-4-en-3,17-dion (8)	[29]
	12 β ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on	
	6 β ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (17)	
	10 β -Hidroksi-19-nortestosteron	
<i>Beauveria bassiana</i>	11 α ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on	[30]
	11 α -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion	
	5 α -Androstan-11 α ,17 β -diol-3-on	
	5 α -Androstan-11 α -ol-3,17-dion	
<i>Trichoderma hamatum</i> KCh25	1-Dehidrotestolakton	[31]
	6 α -Hidroksiandrosta-1,4-dien-3,17-dion	
	11 α -Hidroksiandrosta-1,4-dien-3,17-dion	
<i>Cephalosporium aphidicola</i>	6 β ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (17)	[32]
	14 α ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (18)	
<i>Giberella fujikuroi</i> NCIM 665	6 β ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-one (17)	[33]
	Androst-4-en-3,17-dion (8)	
<i>Exophiala jeanselmei</i> IMI 312989	17 β -Hidroksi-5 α -androstan-3-on (5)	[34]
	3 β ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en (15)	
	3 α -Hidroksi-5 β -androstan-17-on	
	3 α ,17 β -Dihidroksi-5 β -androstan	
<i>Ceratocystis paradoxa</i> IMI 374529	Androst-4-en-3,17-dion (8)	[34]
	3 α -Hidroksi-5 α -androstan-17-on (11)	
<i>Cylindrocarpon radicola</i>	1-Dehidrotestolakton	[35]
<i>Botrytis cinerea</i> AHU 9424	7 β ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on	[36]
<i>Botrytis cinerea</i> AM 235	7 α ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on	[37]
<i>Phytophthora infestans</i>	Androst-4-en-3,17-dion (8)	[38]
<i>Gnomonia fructicola</i> ATCC-11430	2 β ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on	[39]
<i>Aphanocladium album</i>	3 α ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en (14)	[40]
<i>Phanerochaete chrysosporum</i>	6 β ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (17)	[19]

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. ¹H NMR spektrumları tetrametilsilan standart iç sinyal olarak kullanılarak, 300 MHz'de döterokloroform içerisinde ve Varian Mercury 300 NMR spektrometresi kullanılarak alındı. ¹³C NMR spektrumları, aynı cihaz kullanılarak 75 MHz'de döterokloroform içerisinde alındı. Steroidleri ayırmak için adsorban olarak Merck kalite silika jel 60 (230-400 mesh) içeren Kolon kromatografisi gerçekleştirildi ve bu bileşikler hekzan içerisinde artan etil asetat konsantrasyonları elüent olarak kullanılarak kolondan ayrıldı. Biyotransformasyon deneyinin sonucu ve kolon kromatografi çalışmalarının sonuçları ince tabaka kromatografisi (İTK) ile izlendi. İTK 0,25 mm kalınlığında silika jel tabakaları (Merck silika jel GF254) ve etil asetat-hekzan (1:1) çözgen sistemi kullanılarak yapıldı. İTK tabakalarındaki bileşikler *p*-anisaldehit-sülfürik asit reaktifine daldırıldıktan sonra 120 °C'de 3 dakika ısıtıldıktan sonra görünür hale getirildi. Erime noktaları Elektrothermal IA 9200 erime noktası tayin cihazı ile tespit edildi.

Penicillium digitatum MRC 500787 ve *Aspergillus wentii* MRC 200316 küfleri TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi Gıda Teknoloji ve Araştırma Enstitüsü'nden yatık agar besiyerilerindeki stok kültürleri olarak temin edildi. Stok kültürler PDA içeren yatık agar besiyerlerinde ve 4 °C'de muhafaza edildi. Testosteron (4) bileşiği Fluka şirketinden satın alındı. Tüm solventler, yatık agar

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

3.2. Taze Yatık Agar Kültürlerin Hazırlanması

PDA (potato dekstroz agar) (5,85 g) ve agar (1,35 g) karışımı saf su ile 150 mL'ye tamamlandıktan sonra kaynatılarak besiyeri 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 Bazı Küfler ile Biyotransformasyonları

3.3.1. Substratın *Penicillium digitatum* ile biyotransformasyonu

Penicillium digitatum besiyerinin hazırlanması için kullanılan kimyasal maddelerin listesi ve bir litre çözelti içinde bulunan miktarları Tablo 3.1'de verilmiştir [41].

Tablo 3.1. *Penicillium digitatum* küfüne ait besiyeri çözeltisinin bileşenleri

Bileşenler	Miktar
Malt ekstrakt	20 g
Glukoz	10 g
Bakteriyolojik pepton	10 g
Maya ekstraktı	3 g

Hazırlanan 1 L besiyeri 10 adet 250 mL erlene paylaştırıldıktan sonra otoklavda sterilize edildi. Daha önce hazırlanan en taze alt kültürdeki küf erlenlerden herbirine steril şartlar altında nakledildi. Bu erlenler yeterli miktarda küf oluşabilmesi için 2 gün boyunca 24°C’de çalkalamalı inkübatörde (150 rpm) inkübasyona bırakıldı.

Testosteron (4) (500 mg) 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 besiyeri 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 (687 mg) elde edildi.

Yağimsı madde daha sonra silika jel 60 üzerinde kolon kromatografisine tabi tutuldu. Kolon kromatografisi çalışmasında çözgen sistemi olarak hekzan içerisinde artan oranlarda etil asetat kullanıldı. Kolondan %15’lik çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde bir bileşik elde edildi. %20’lik çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde ise kolondan iki ayrı bileşik elde edildi. Kolondan %25’lik çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde ise birisi başlangıç madesi ile aynı polariteye sahip olan iki ayrı bileşik elde edildi.

3.3.2. Substratın *Aspergillus wentii* ile biyotransformasyonu

Aspergillus wentii besiyerinin hazırlanması için kullanılan kimyasal maddelerin listesi ve bir litre çözelti içinde bulunan miktarları Tablo 3.1’de verilmiştir [42].

Tablo 3.2. *Aspergillus wentii* küfüne ait besiyeri çözeltisinin bileşenleri

Bileşenler	Miktar
Sukroz	15 g
Glukoz	15 g
Polipepton	5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	10 mg

Tablo 3.2.'ye göre hazırlanan ve pH'sı 7,2'ye ayarlanan 1 L besiyeri 10 adet 250 mL erlene paylaştırıldıktan sonra otoklavda sterilize edildi. Daha önce hazırlanan en taze alt kültürdeki küf erlenlerinden 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.

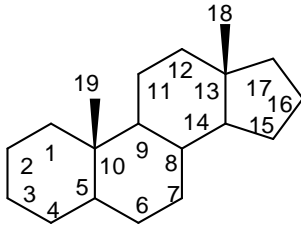
Testosteron (4) (500 mg) DMF (10 mL) içerisinde çözünerek yeterli miktarda küf içeren erlenlere eşit hacimlerde, steril koşullar altında ilave edildikten sonra 5 gün süresince 27 °C' de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

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 yağmsı bir madde (713 mg) elde edildi.

Yağmsı madde daha sonra silika jel 60 üzerinde kolon kromatografisine tabi tutuldu. Kolondan %50'lik çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde farklı polaritelere sahip iki bileşik elde edildi.

BÖLÜM 4. DENEYSEL BULGULAR

Testosteron (**4**) bileşiğinin *Penicillium digitatum* MRC 500787 ve *Aspergillus wentii* MRC 200316 küfleri ile biyotransformasyonlarından elde edilen bileşiklerin yapılarını belirlemek için hem başlangıç maddesinin hem de elde edilen bileşiklerin ^1H NMR, ^{13}C NMR, IR spektrumları alındı ve erime noktaları tayin edildi. Bileşiklere ait ^1H NMR ve ^{13}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

Testosteron (**4**) (500 mg) bileşiğinin *Penicillium digitatum* ile 24 °C'de 5 gün süren inkübasyonu neticesinde 5 α -androstan-3,17-dion (**16**) (32 mg, % 6,4), 3 α -hidroksi-5 α -androstan-17-on (**11**) (18 mg, % 3,6), 3 β -hidroksi-5 α -androstan-17-on (**13**) (45 mg, % 8,9), androst-4-en-3,17-dion (**8**) (81 mg, % 16,3) ve değişmeyen başlangıç maddesi (240 mg) elde edildi. Elde edilen başlangıç maddesinin yapısı ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının testosteron (**4**) bileşiğinin ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının karşılaştırılmasıyla anlaşıldı.

5 α -Androstan-3,17-dion (**16**)

Etil asetatın iğneler şeklinde kristaller.

e. n.: 129-131 °C, (lit. [43] e. n.: 130-132 °C).

IR: 1730, 1716.

^1H NMR: 0,87 (3H, s, 18-H); 1,02 (3H, s, 19-H).

^{13}C NMR: 221,00; 211,69; 53,81; 51,16; 47,69; 46,54; 44,53; 38,38; 38,02; 35,78; 35,75; 35,17; 31,42; 30,47; 28,55; 21,73; 20,65; 13,75; 11,41.

3 α -Hidroksi-5 α -androstan-17-on (**11**)

Etil asetatтан іğneler şeklinde kristaller.

e. n.: 180-182 °C, (lit. [44] e. n.: 182-183 °C).

IR: 3440, 1720.

^1H NMR: 0,80 (3H, s, 18-H); 0,86 (3H, s, 19-H); 4,05 (1H, m, 3 β -H).

^{13}C NMR: 221,55; 66,42; 54,39; 51,46; 47,80; 39,10; 36,23; 35,85; 35,75; 35,02; 32,11; 31,53; 30,83; 28,98; 28,22; 21,73; 20,02; 13,81; 11,16.

3 β -Hidroksi-5 α -androstan-17-on (**13**)

Etil asetatтан іğneler şeklinde kristaller.

e. n.: 175-177 °C, (lit. [45] e. n.: 174-176 °C).

IR: 3470, 1726.

^1H NMR: 0,82 (3H, s, 19-H); 0,84 (3H, s, 18-H); 3,53 (1H, tt, J : 5 ve 12 Hz, 3 α -H).

^{13}C NMR: 221,50; 71,06; 54,35; 51,34; 47,76; 44,76; 37,98; 36,87; 35,80; 35,57; 34,97; 31,47; 31,35; 30,83; 28,32; 21,72; 20,43; 13,76; 12,25.

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

Etil asetatтан prizmalar şeklinde kristaller.

e. n.: 172-173 °C, (lit. [46] e. n.: 174-176 °C).

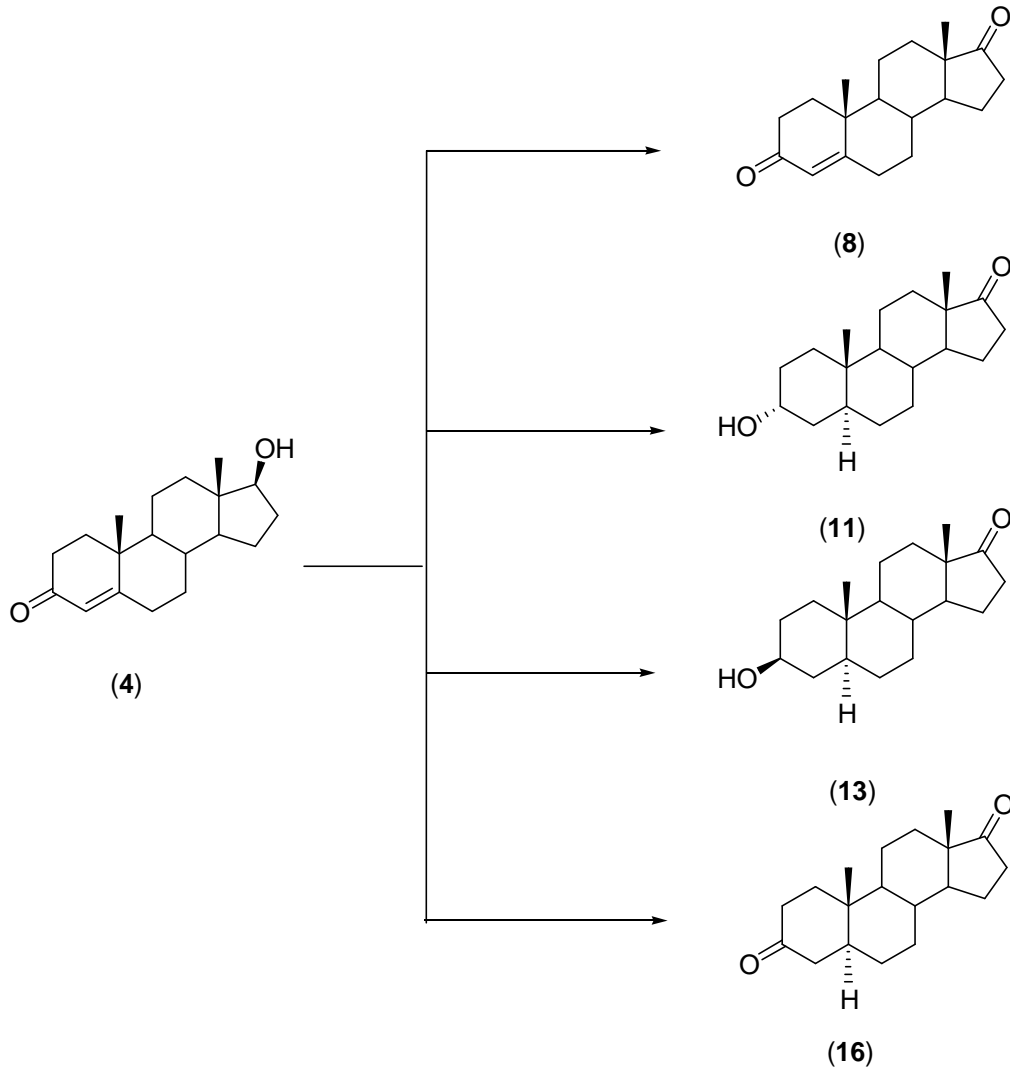
IR: 1730, 1712, 1640.

^1H NMR: 0,90 (3H, s, 18-H); 1,20 (3H, s, 19-H); 5,74 (1H, s, 4-H).

^{13}C NMR: 220,43; 199,33; 170,35; 124,07; 53,74; 50,76; 47,45; 38,58; 35,69; 35,62; 35,07; 33,84; 32,50; 31,20; 30,68; 21,68; 20,24; 17,31; 13,64.

Testosteron (**4**) (500 mg) bileşіğinin *A. wentii* küfü ile 27 °C'de 5 gün süren inkübasyonu neticesinde 6 β ,17 β -dihidroksandrost-4-en-3-on (**17**) (401 mg, % 76) ve 14 α ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (**18**) (37 mg, % 7) bileşikleri elde edildi. 6 β ,17 β -Dihidroksandrost-4-en-3-on (**17**) ve 14 α ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (**18**) bileşiklerinin yapıları ise ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının testosteron (**4**)

bileşğinin *A. wentii* ile biyotransformasyonundan elde edilen metabolitlerin ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının karşılaştırılmasıyla tespit edildi.



Şekil 4.2. Substratın *Penicillium digitatum* ile biyotransformasyonu

6 β ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (17)

Asetondan iğneler şeklinde kristaller.

e. n.: 202-204 °C, (lit. [20] e. n.: 206-210 °C).

IR: 3396, 1664, 1620.

^1H NMR: 0,81 (3H, s, 18-H); 1,38 (3H, s, 19-H); 3,66 (1H, t, J : 8,5 Hz, 17 α -H); 4,35 (1H, bs, 6 α -H); 5,81 (1H, s, 4-H).

^{13}C NMR: 200,73; 168,63; 126,23; 81,63; 72,86; 53,62; 50,36; 42,84; 38,00; 37,92; 37,00; 36,31; 34,15; 30,31; 29,70; 23,22; 20,52; 19,47; 11,07.

14 α ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (**18**)

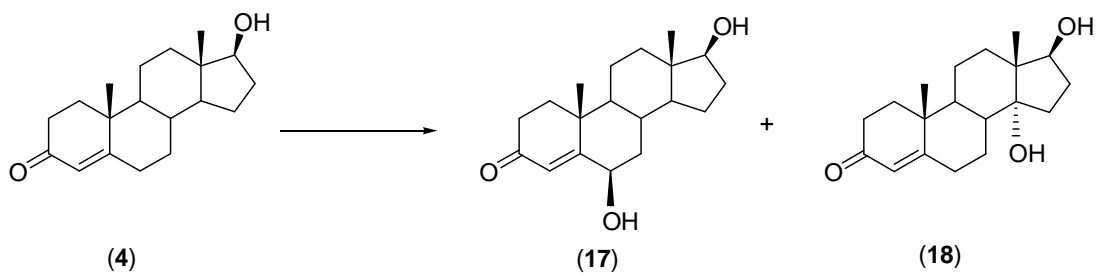
Etil asetatın iğneler şeklinde kristaller.

e. n.: 180-182 °C, (lit. [20] e. n.:181-184 °C).

IR: 3470, 1650, 1610.

¹H NMR: 0,90 (3H, s, 18-H); 1,20 (3H, s, 19-H); 4,29 (1H, t, *J* : 8,2 Hz, 17 α -H); 5,71 (1H, s, 4-H).

¹³C NMR: 199,94; 171,19; 123,71; 83,29; 78,49; 46,86; 46,66; 38,78; 38,66; 35,60; 33,82; 32,55; 32,49; 29,42; 28,45; 26,02; 19,60; 17,14; 14,86.



Şekil 4.3. Substratın *Aspergillus wentii* ile biyotransformasyonu

BÖLÜM 5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Biyotransformasyon çalışmaları sonucunda elde edilen yeni bileşiklerin yapılarını tayin amacıyla testosteron (**4**) ile biyotransformasyonlardan elde edilen bileşiklerin ^1H NMR, ^{13}C NMR, IR spektrumları alındı ve erime noktaları tayin edildi.

Testosteron (**4**) bileşiğinin *Penicilium digitatum* ile inkübasyonu sonucunda 4 farklı metabolit elde edildi. İlk metabolitin ^1H NMR spektrumu başlangıç maddesinin δ_{H} 3,61 ppm (1H, t, $J= 8,5$ Hz) ve δ_{H} 5,72 ppm değerlerinde gözlenen sırası ile $17\alpha\text{-H}$ and 4-H rezonanslarını göstermedi. Metabolitin ^1H NMR spektrumu başlangıç maddesindeki 19-metil grubu için yukarı alana doğru bir kayma ($\Delta 0,17$ ppm) gösterdi. Metabolit ^{13}C NMR spektrumunda testosteron (**3**) bileşiğinin δ_{C} 171,31 (C-5), δ_{C} 123,82 (C-4), δ_{C} 81,56 (C-17) rezonansları gözlenmedi. Bu sonuçlar A halkasındaki çift bağı indirgendiğini ve C-17'de bir yükseltgenmenin olduğunu düşündürdü. Metabolit ^{13}C NMR spektrumu değerlerinin literatür değerleri [47] ile karşılaştırılması neticesinde A halkasındaki çift bağı α yüzünden indirgendiğini ve bileşiğin $5\alpha\text{-androstan-3,17-dion}$ (**16**) olduğu anlaşıldı.

İkinci metabolit ^1H NMR spektrumu δ_{H} 4,05 ppm'de yeni bir rezonans (1H, m, 3-H) verdi ve başlangıç maddesinin δ_{H} 3,61 (1H, t, $J= 2$ Hz) ve δ_{H} 5,72 ppm (1H, bs) değerlerinde gözlenen sırası ile $17\alpha\text{-H}$ and 4-H rezonanslarını göstermedi. Metabolitin ^1H NMR spektrumu başlangıç maddesindeki 19-metil grubu için yukarı alana doğru bir kayma ($\Delta 0,33$ ppm) gösterdi. Metabolit ^{13}C NMR spektrumunda testosteron (**3**) bileşiğinin δ_{C} 199,62 (C-3), 171,31 (C-5), δ_{C} 123,82 (C-4), δ_{C} 81,56 (C-17) rezonansları gözlenmezken, δ_{C} 66,42 ppm ve δ_{C} 221,55 ppm'de iki yeni karbon atomu rezonansı gözlemlendi. Bu sonuçlar A halkasındaki çift bağda bir indirgenme, C-17'de bir yükseltgenme ve C-3'de bir indirgenmenin olduğunu düşündürdü. Metabolitin δ_{C} 66,42 ve δ_{H} 4,05 ppm değerlerinde gözlenen karakteristik rezonansları [47,48] yapıda bir $3\alpha\text{-hidroksil}$ grubunun varlığını

ispatladı. Metabolit ^{13}C NMR spektrumu değerlerinin literatür değerleri [47] ile karşılaştırılması neticesinde A halkasındaki çift bağın α yüzünden indirgendiğini ve bileşiğin 3 α -hidroksi-5 α -androstan-17-on (**11**) olduğu anlaşıldı.

Üçüncü metabolit ^1H NMR spektrumu δ_{H} 3,53 ppm'de yeni bir rezonans (1H, tt, $J = 5$ ve $J = 11$ Hz) verirken başlangıç maddesinin δ_{H} 3,61 (1H, t, $J = 2$ Hz) ve δ_{H} 5,72 ppm (1H, bs) değerlerinde gözlenen sırası ile 17 α -H and 4-H rezonanslarını göstermedi. Metabolitin ^1H NMR spektrumu başlangıç maddesindeki 19-metil grubu için yukarı alana doğru bir kayma (Δ 0,37 ppm) gösterdi. Metabolit ^{13}C NMR spektrumunda testosteron (**3**) bileşiğinin δ_{C} 199,62 (C-3), 171,31 (C-5), δ_{C} 123,82 (C-4), δ_{C} 81,56 (C-17) rezonansları gözlenmezken δ_{C} δ_{C} 71,06 ppm ve δ_{C} 221,50 ppm'de iki yeni karbon atomu rezonansı gözlendi. Bu sonuçlardan A halkasındaki çift bağda bir indirgenme, C-17'de bir yükseltgenme ve C-3'de bir indirgenmenin olduğunu anlaşıldı. Metabolitin δ_{C} 71,06 ppm ve δ_{H} 3,53 ppm'de gözlenen karakteristik rezonansları [47,48] yapıda bir 3 β -hidroksil grubunun varlığını ispatladı. Metabolit ^{13}C NMR spektrumu değerlerinin literatür değerleri [47] ile karşılaştırılması neticesinde A halkasındaki çift bağın α yüzünden indirgendiğini ve bileşiğin 3 β -hidroksi-5 α -androstan-17-on (**13**) olduğu anlaşıldı.

Dördüncü metabolit ^1H NMR spektrumu başlangıç maddesinin 4-H rezonansını (1H, s) δ_{H} 5,74 ppm'de verirken δ_{H} 3,61 ppm'deki 17 α -H rezonansını (1H, t, $J = 2$ Hz) rezonanslarını vermedi. Metabolitin ^1H NMR spektrumu başlangıç maddesindeki 18-metil grubu için aşağı alana doğru bir kayma (Δ 0,13 ppm) gösterdi. Metabolit ^{13}C NMR spektrumunda testosteron (**3**) bileşiğinin δ_{C} 199,33 (C-3), δ_{C} 170,35 (C-5) ve δ_{C} 124,07 (C-4) rezonansları gözlenirken δ_{C} 81,56 ppm'deki C-17 rezonansı gözlenmedi ve δ_{C} 220,43 ppm'de yeni bir karbonil karbon rezonansı verdi. Bu sonuçlar A halkasında bir değişiklik olmazken C-17'de bir yükseltgenme olduğunu ve metabolitin androst-4-en-3,17-dion (**8**) olduğunu ispatladı.

Testosteron (**4**) bileşiğinin *A. wentii* ile inkübasyonu sonucunda ise iki metabolit elde edildi. İlk metabolitin ^1H NMR spektrumunda başlangıç maddesinin 17 α -H and 4-H rezonanslarını sırası ile δ_{H} 3,66 ppm (1H, t, $J = 8,5$ Hz) ve δ_{H} 5,81 ppm (1H, bs) değerlerinde gözlendi. Metabolitin ^1H NMR spektrumu başlangıç maddesindeki 19-

metil grubu için aşağı alana doğru bir kayma (Δ 0,19 ppm) gösterdi. Metabolitin δ_H 4,35 ppm [48] ve δ_C 72,86 ppm [47] değerlerindeki karakteristik rezonanslar bir 6β -hidroksil grubunun varlığını gösterdi. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu başlangıç maddesinin C-7 rezonansı için aşağı bölgeye bir kayma (Δ 5,56 ppm) gösterirken C-8 rezonansı için ise yukarı alana doğru bir γ -gauche kayması (Δ 5,2 ppm) gösterdi. Bu sonuçlar metabolitte bir 6β -hidroksil grubunun varlığını ve metabolitin $6\beta,17\beta$ -dihidroksiandrost-4-en-3-on (**17**) olduğunu ortaya koydu.

İkinci metabolitin 1H NMR spektrumunda başlangıç maddesinin 4-H rezonansı δ_H 5,71 ppm (1H, bs) değerlerinde gözlemlendi. Metabolitin 1H NMR spektrumu başlangıç maddesindeki 18-metil grubu ve 17α -H rezonansları aşağı alana doğru iki ayrı kayma (sırası ile Δ 0,12 ppm ve Δ 0,68 ppm) gösterdi. Metabolitteki 17α -H rezonansının aşağı alana doğru gösterdiği kayma söz konusu protonun bir 14α -hidroksil grubu ile diaksiyal etkileşmesini önerdi. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu δ_C 83,29 ppm'deki yeni bir rezonansa sahip olması 14α -hidroksil grubunun varlığını destekler nitelikteydi. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumunda başlangıç maddesinin C-8, C-13 ve C-15 numaralı karbon atomları için aşağı bölgeye kaymalar gözlenirken (C-8 için Δ 3,16 ppm, C-13 için Δ 4,13 ppm, ve C-15 için Δ 2,75 ppm) C-7, C-12, C-17 ve C-16 numaralı karbon atomları için ise yukarı bölgeye doğru γ -gauche kaymaları gözlemlendi (sırası ile C-7 için Δ 3,00 ppm, C-12 için Δ 3,76 ppm, C-17 için Δ 3,03 ppm ve C-16 için Δ 0,90 ppm). Bütün bu karakteristik kayma değerleri bir 14α -hidroksil grubunun varlığını ve metabolitin $14\alpha,17\beta$ -dihidroksiandrost-4-en-3-on (**18**) olduğunu gösterdi.

Tablo 5.1. Bileşik 1H NMR spektrumlarının karşılaştırılması

Bileşik	4-H	17α -H	18-CH ₃	19-CH ₃	Diğer önemli sinyaller
4	5,72 (bs)	3,61(t, $J=8,5$ Hz)	0,78	1,19	-
16	*	-	0,87	1,02	-
11	*	-	0,80	0,86	4,05 (1H, m)
13	*	-	0,84	0,82	3,53 (1H, tt, $J=5$ ve 12 Hz)
8	5,74	-	0,90	1,20	-
17	5,81	3,66 (t, $J=8,5$ Hz)	0,81	1,38	4,35 (1H, bs, 6α -H)
18	5,71	4,29 (t, $J=8,2$ Hz)	0,90	1,20	-

*C-4'e 2 geminal hidrojen atomu bağlıdır

Bu çalışma ile *Penicillium digitatum* ve *Aspergillus wentii* küfleri ilk defa steroid biyotransformasyonları için kullanıldı. *P. digitatum* küfü *P. crustosum* [8], *P. chrysogenum* [8] ve *P. decumbens* [10] küflerinde olduğu gibi testosteron (**4**) üzerinde 5 α -redüktaz aktivitesi sonucunda gerçekleşen mikrobiyal hidrojenasyonlar gösterdi. *P. digitatum* küfü *P. chrysogenum* [8] ve *P. decumbens* [10] küflerinde olduğu gibi sadece α -yüzünden mikrobiyal hidrojenasyon gerçekleştirdi. *P. crustosum* ile yapılan çalışmada ise bu küf mikrobiyal hidrojenasyonu her iki yüzden (α - ve β -) gerçekleştirmişti [8]. *P. digitatum* küfü *P. crustosum* [8] ile testosteron inkübasyonunda olduğu gibi C-3 indirgenmeler gösterdi. Buna ek olarak 3 β -hidroksi-5 α -androstan-17-on (**11**) bileşiği ilk defa testosteron (**4**) bileşiğinin küfler ile gerçekleştirilen bir inkübasyonundan elde edildi.

Table 5.2. Bileşik ¹³C NMR spektrumlarının karşılaştırılması

Karbon atomu numarası	Bileşik						
	4	16	11	13	8	17	18
1	35,61	38,38	32,11	36,87	35,66	36,31	35,60
2	33,91	38,02	28,98	31,35	33,87	34,15	33,82
3	199,62	211,69	66,42	71,06	199,35	200,73	199,94
4	123,82	44,53	36,23	37,98	124,12	126,23	123,71
5	171,31	46,54	39,10	44,76	170,34	168,63	171,19
6	32,76	28,55	28,22	28,32	32,53	72,86	32,49
7	31,49	30,47	30,83	30,83	31,23	37,00	28,45
8	38,62	35,17	35,02	34,97	35,11	29,70	38,78
9	53,86	53,81	54,39	54,35	53,78	53,62	46,66
10	36,37	35,75	35,75	35,57	38,61	37,92	38,66
11	20,59	20,65	20,02	20,43	20,27	20,52	19,60
12	35,68	31,42	31,53	31,47	30,71	38,00	32,55
13	42,77	47,69	47,80	47,76	47,48	42,84	46,86
14	50,42	51,16	51,46	51,34	50,80	50,36	83,29
15	23,29	21,73	21,73	21,72	21,72	23,22	26,02
16	30,38	35,78	35,85	35,80	35,72	30,31	29,42
17	81,56	221,01	221,55	221,50	220,44	81,63	78,49
18	11,02	13,75	13,81	13,76	13,67	11,07	14,86
19	17,37	11,41	11,16	12,25	17,34	19,47	17,14

Literatürdeki testosteron (4) bileşiminin küfler ile inkübasyonlarında *A. wentii* gibi aynı bileşikler veren *Cephalosporium aphidicola* [32] ve *Mucor plumbeus* [19] olmak üzere iki küf bildirilmiştir. *C. aphidicola* ile testosteron (4) bileşiminden *A. wentii* gibi ana ürün olarak 6 β ,17 β -dihidroksiandrosteron-4-en-3-on (17), yan ürün olarak ise 14 α ,17 β -dihidroksiandrosteron-4-en-3-on (18) elde edilmiştir [32]. *Mucor plumbeus* [19] ile gerçekleştirilen inkübasyonda ise ana ürün olarak 14 α ,17 β -dihidroksiandrosteron-4-en-3-on (18) elde edilirken yan ürün olarak 6 β ,17 β -dihidroksiandrosteron-4-en-3-on (17) bileşiği elde edilmiştir. Her iki küf için bildirilen verimler *A. wentii* ile elde edilen verimlerden daha düşüktür.

Çalışmada kullanılan steroidlerin aynı küfler ile inkübasyonlarından daha yüksek verimler elde etmek için inkübasyon sıcaklığı, besiyeri bileşenleri, inkübasyon süresi gibi parametrelerin değiştirilmesine yönelik çabalar gelecek çalışmalarımız kapsamındadır. Ayrıca çalışmada kullanılan steroidler ve diğer bazı steroidlerin benzer çalışmalar için kullanılmamış diğer bazı küfler ile daha önemli sonuçlar ve daha yüksek verimli inkübasyonlarını gerçekleştirmeye yönelik araştırmalarımız sürecektir.

KAYNAKLAR

- [1] HANSON, J. R., An Introduction to Biotransformations in Organic Chemistry, W. H. Freeman and Company, 1-62, New York, 1995.
- [2] ALGUR, Ö. F., Temel Biyoteknoloji Ders Notları, Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Yayınları, 3-6, Erzurum, 1992.
- [3] ARNOLD, L., Small Bugs, Big Business: The Economic Power of the Microbe, Biotechnology Advances, 18, 499-514, 2000.
- [4] PETERSON, D. H., MURRAY, H. C., Microbial Oxygenation of Steroids at Carbon 11, Journal of the American Chemical Society, 74, 1871-1872, 1952.
- [5] FERNANDES, P., CRUZ, A., ANGELOV, B., PINHEIRO, H.M., CABRAL, J.M.S., Microbial Conversion of Steroids Compounds : Recent Developments, Enzyme and Microbial Technology, 32, 688-705, 2003.
- [6] ONAT, T., EMERK, K., SÖZMEN, E.Y., İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, 481-495, Ankara, 2002.
- [7] KEHA, E., KÜFREVİOĞLU, Ö. İ., Biyokimya, Dördüncü baskı, Aktif Yayınevi, 185-188, Erzurum, 2005.
- [8] CABEZA, M.S., GUTIERREZ, E.B., GARCIA, G.A., AVALOS, A.H., HERNANDEZ, M.A.H., Microbial Transformations of Testosterone to 5 α -Dihydrotestosterone by Two Species of *Penicillium*: *P. chrysogenum* and *P. crustosum*, Steroids, 64, 379-384, 1999.
- [9] BARTMANSKA, A., GLADYSZ, J.D., HUSZCZA, E., Steroids Transformation in *Penicillium notatum* Culture, Steroids, 70, 193-198, 2005.
- [10] HOLLAND, H.L., DORE, S., XU, W.L., BROWN, F.M., Formation of 5 α -Steroids by Biotransformation Involving the 5 α -Reductase Activity of *Penicillium ducembens*, Steroids, 59, 642-647, 1994.
- [11] VIOLA, F., CAPUTO, O., BALLIANO, G., DELPRINO, L., CATTEL, L., Side Chain Degradation and Microbial Reduction of Different Steroids by *Aspergillus auerogulgens*, Journal of Steroid Biochemistry, 19, 1451-1458, 1983.

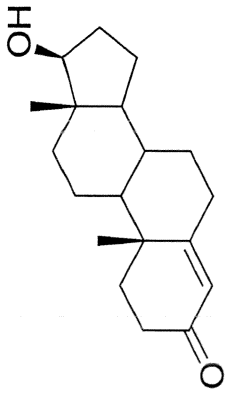
- [12] BRANNON, D.R., PARRISH, F.W., WILLEY, B.J., LONG, L., The Microbial Transformation of a Series of Androgens with *Aspergillus tamarii*, *Journal of Organic Chemistry*, 32, 1521-1527, 1967.
- [13] MAHATO, S.B., MUKHERJEE, A., Microbial Transformation of Testosterone by *Aspergillus fumigatus*, *Journal of Steroid Biochemistry*, 21, 341-342, 1984.
- [14] AL-ABOUDI, A., MOHAMMAD, M. Y., MUSHARRAF, S. G., CHOUDHARY, M. I., ATTA-UR-RAHMAN, Microbial transformation of Testosterone by *Rhizopus stolonifer* and *Fusarium lini*, *Natural Product Research*, 22, 1498-1509, 2008.
- [15] KOLEK, T., SWIZDOR, A., Biotransformation XLV. Transformations of 4-ene-3-oxo Steroids in *Fusarium culmorum* Culture, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 67, 63-69, 1998.
- [16] POKORNA, J., KASAL, A., Progesterone Side Chain Degradation beside Hydroxylation with *Rhizopus nigricans* Depends on the Presence of Nutrients, *Journal of Steroid Biochemistry*, 35, 155-156, 1990.
- [17] HOLLAND, H.L., Biotransformations of Δ^4 -3-Ketosteroids by the Fungus *Rhizopus arrhizus*, *Accounts of Chemical Research*, 17, 398-402, 1984.
- [18] MAHATO, S. B., BANERJEE, S., PODDER, S., Steroid Transformations by Microorganisms- III, *Phytochemistry*, 28, 7-40, 1989.
- [19] LAMM, A. S., CHEN, A. R. M., REYNOLDS, W. F., REESE, P. B., Steroid Hydroxylation by *Whetzelinia sclerotiorum*, *Phanerochaete chrysosporium* and *Mucor plumbeus*, *Steroids*, 72, 713-722, 2007.
- [20] HU, S., GENAIN, G., AZERAD, R., Microbial Transformation of Steroids: Contribution to 14 α -hydroxylations, *Steroids*, 60, 337-352, 1995.
- [21] MADYASTHA, K. M., Novel Microbial Transformations of Steroids, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 405, 259-270, 1996.
- [22] KELVIN, E. S., SHAHID, L., DAVID, N. K., Microbial Transformation of Testosterone and Androstenedione by *Botryosphaeria obtusa*, *Journal of Steroid Biochemistry*, 35, 115-120, 1990.
- [23] AHMED, F., WILLIAMS, R. A. D., SMITH, K. E., Microbial Transformations of Steroids 10. Cytochromes 450 11 α -Hydroxylase and C17 C20 Lyase and a 1-ene Dehydrogenase Transform Steroids in *Nectria haematococca*, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 58, 337-349, 1996.

- [24] BRZEZOWSKA, E., GLADYSZ, J.D., KOLEK, T., Biotransformation XXXIX. Metabolism of Testosterone Derivates in *Absidia coerulea* Culture, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 57, 357-362, 1996.
- [25] HUNTER, A. C., WATTS, K. R., DEDI, C., DODD, H. T., An Unusual Ring-A Opening and Other Reactions in Steroid Transformation by the Thermophilic Fungus *Myceliophthera thermophila*, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 116, 171-177, 2009.
- [26] JANECZKO, T., GLADYSZ, J. D., SUSLOW, E. K., BIALONSKO, A., CIUNIC, Z., Biotransformations of Steroid Compounds by *Chaetomium* sp. KCH 6651, *Steroids*, 74, 657-661, 2009.
- [27] KELVIN, E.S., SHAHID, L., DAVID, N.K., Microbial Transformation of Steroids-II. Transformations of Progesterone, Testosterone and Androstenedione by *Phycomyces blakesleanus*, *Journal of Steroid Biochemistry*, 32, 445-451, 1989.
- [28] ATTA-UR-RAHMAN, CHOUDHARY, M. I., ASIF, F., FAROOQ, A., YAQOOB, M., Microbial Transformations of Testosterone, *Natural Product Letters*, 12, 255-261, 1998.
- [29] HUSZCZA, E., GLADYSZ, J. D., Transformations of Testosterone and Related Steroids in *Absidia glauca* Culture, *Journal of Basic Microbiology*, 43, 113-120, 2003.
- [30] HUSZCZA, E., GLADYSZ, J. D., BARTMANSKA, A., Transformations of Steroids by *Beauveria bassiana*, *Zeitschrift für Naturforschung C*, 60, 103-108, 2005.
- [31] BARTMANSKA, A., GLADYSZ, J. D., Transformation of Steroids *Trichoderma homatum*, *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1615-1621, 2007.
- [32] HANSON, J.R., NASIR, H., PARVEZ, A., The Hydroxylation of Testosterone and Some Relatives by *Cephalosporium aphidicola*, *Pythochemistry*, 42, 411-415, 1996.
- [33] CHATTERJEE, T. K., BASAK, A., DAS GUPTA, C., BARUA, A. K., SEN, K., Microbiological Oxidation of Testosterone by *Giberalla fujikuroi* (NCIM), *Journal of General and Applied Microbiology*, 25, 339-341, 1979.
- [34] PORTER, R. B. R., GALLIMORE, W. A., REESE, P. B., Steroid Transformations with *Exophiala jeanselmei* var. *Lecanii-corni* and *Ceratocystis paradoxa*, *Steroids*, 64, 770-779, 1999.
- [35] FRIED, J., THOMA, R. W., KLINGSBERG, A., Oxidation of Steroids by Microorganisms III. Side Chain Degradation, Ring D-Cleavage and

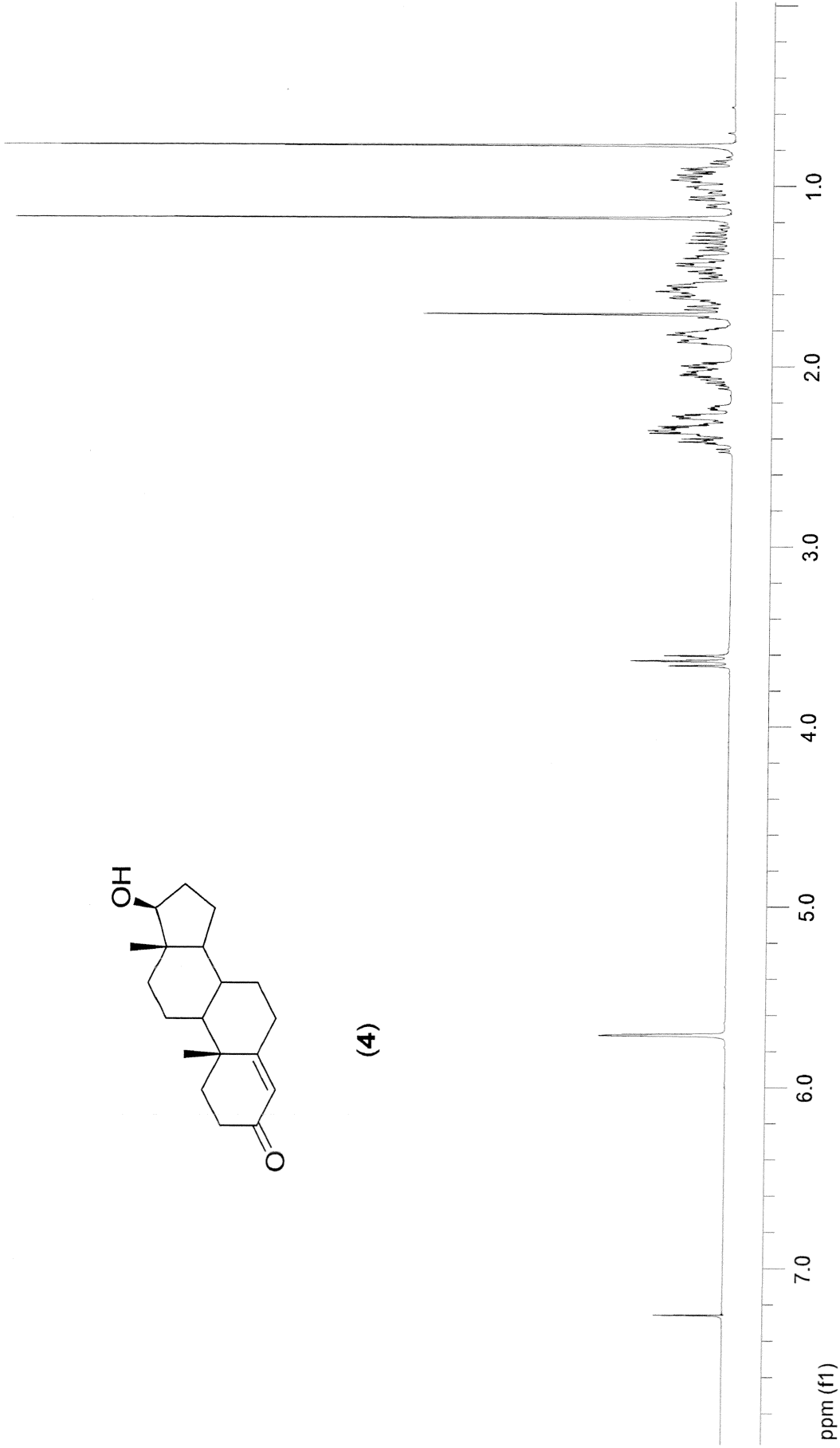
- Dehydrogenation in Ring A, Journal of the American Chemical Society, 75, 5764-5765, 1953.
- [36] FAROOQ, A., TAHARA, S., Biotransformation of Testosterone and Pregnenolone Catalyzed by the Fungus *Botrytis cinerea*, Journal of Natural Products, 63, 489-491, 2000.
- [37] HUSZCZA, E., DMOCHOWSKA-GLADYSZ, J., Transformations of Testosterone and Related Steroids by *Botrytis cinerea*, Phytochemistry, 62, 155-158, 2003.
- [38] HOLLAND, H. L., TAYLOR, G. J., Transformations of steroids and the Steroidal Alkaloid Solanine by *Phytophthora infestans*, Phytochemistry, 18, 437-440, 1979.
- [39] HOLLAND, H. L., BROWN, F. M., CHENCHIAH, P. C., CHERNISHENKO, M. J., KHAN, S. H., RAO, J. A., Microbial Hydroxylation of Steroids. Part 12. Hydroxylation of Testosterone and Related Steroids by *Gnomonia fructicola* ATCC 11430, Canadian Journal of Chemistry, 67, 268-274, 1989.
- [40] GLADYSZ, J.D., KOLEK, T., SIEWINSKI, A., Reduction of Testosterone, Androstenedione and Their Derivatives by *Aphanocladium album*, Journal of Basic Microbiology, 29, 1-12, 1989.
- [41] ADAMS, A., DEMYTTENAERE J. C. R., DE KIMPE, N., Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)- Limonene to α -Terpineol by *Penicillium digitatum* – Investigation of the Culture Conditions, Food Chemistry, 80, 525-534, 2003.
- [42] 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.
- [43] NUNES, R. M. D., PEIXOTO, A. F., AXET, M. R., PEREIRA, M. M., MORENO, M. J., KOLLAR, L., CLAVER, C., CASTILLON, S., Selective Hydrogenation of α,β - Unsaturated Oxosteroids with Homogeneous Rhodium Catalyst, Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, 247, 275-282, 2006.
- [44] HIRSCHMANN, H., Steroids of Urine of Ovariectomized Women, Journal of Biological Chemistry, 136, 483-502, 1940.
- [45] SHOPPE, C.W., PRINS, D.A., Die Umlagerung von 17-Oxy-20-keto-Steroiden IV. Die Umsetzung von $3\beta,17\alpha$ -Diacetoxy- α -pregnan- 20α -on mit Methylmagnesiumbromid, Helvetica Chimica. Acta, 26, 2089-2095, 1943.

- [46] PETERSON, D. H., EPPSTEIN S. H., MEISTER, P. D., MURRAY, H. C., LEIGH, H. M., WEINTRAUB, A., REINEKE, L. M., Microbiological Transformations of Steroids. IX. Degradation of C₂₁ Steroids to C₁₉ Ketones and to Testololactone, *Journal of the American Chemical Society*, 75, 5768-5769, 1953.
- [47] BLUNT, J. W., STOTHERS, J. B., ¹³C NMR Spectra of Steroids -A Survey and Commentary, *Organic Magnetic Resonance*, 9, 439-464, 1977.
- [48] 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 ¹H NMR Spectra of the Steroids Hormones, Their Hydroxylated Derivatives and Related Compounds, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* 2, 1567-1594, 1990.

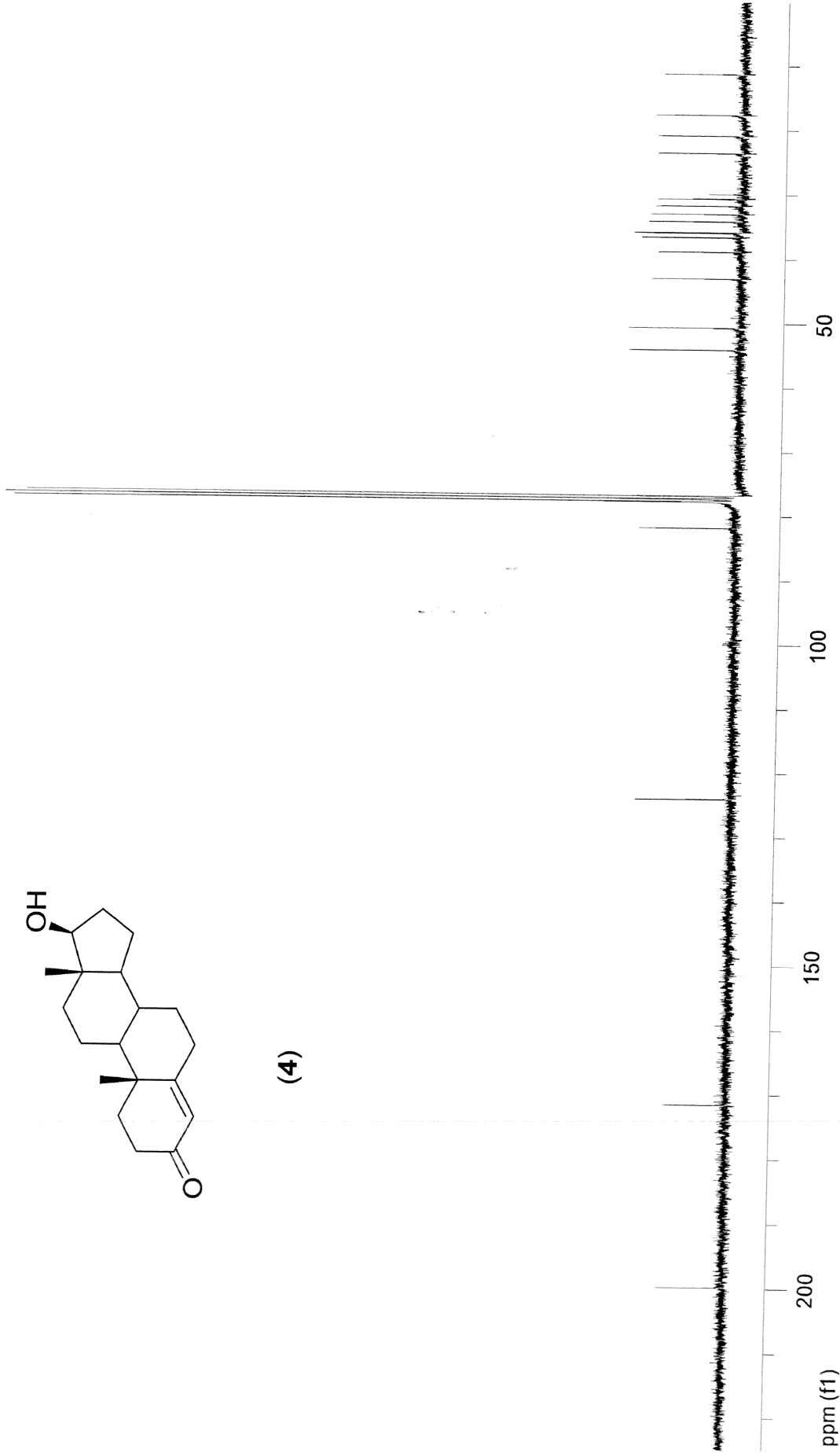
EKLER



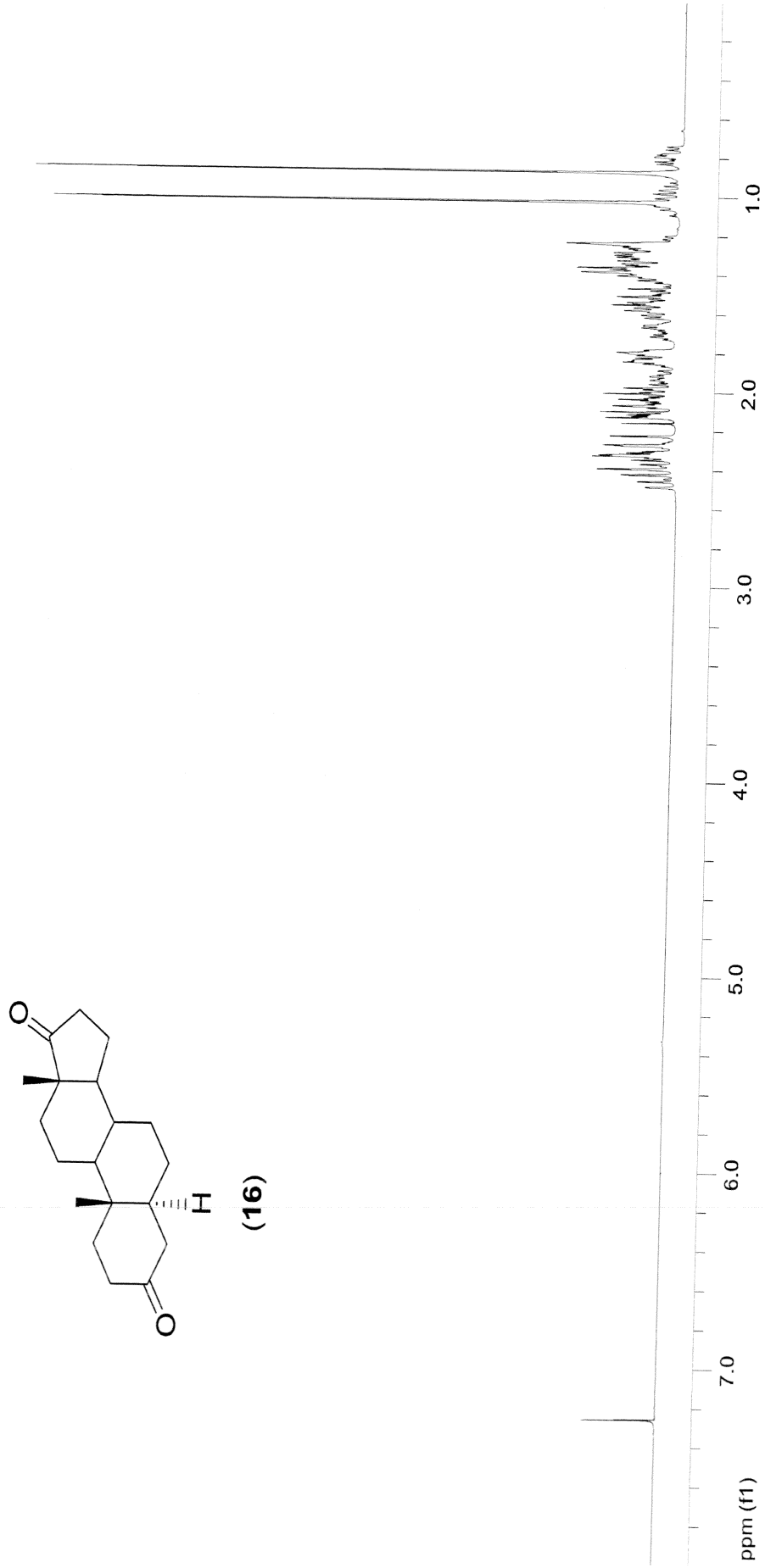
(4)



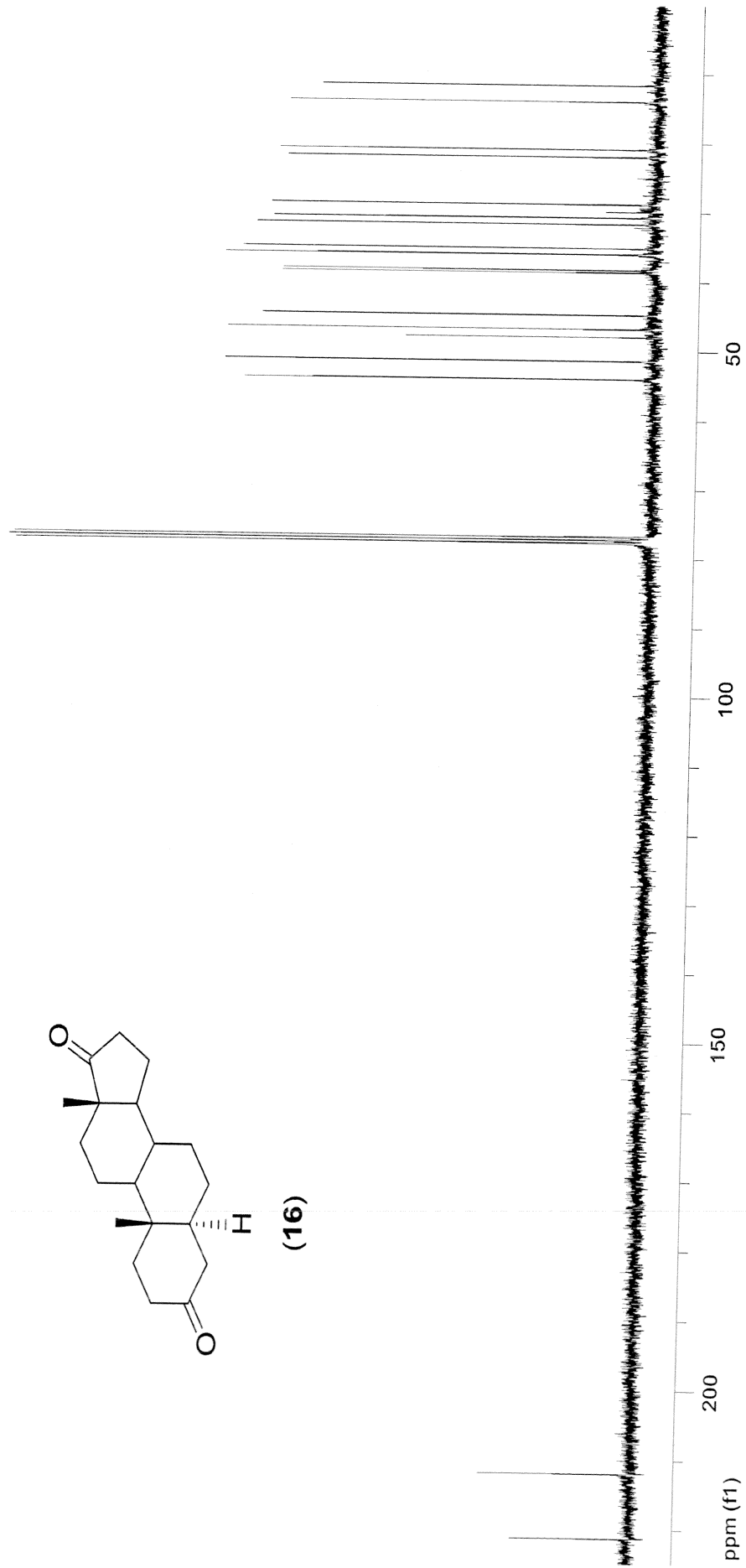
Şekil A.1. Testosteron (4) bileşiğinin ¹H NMR spektrumu



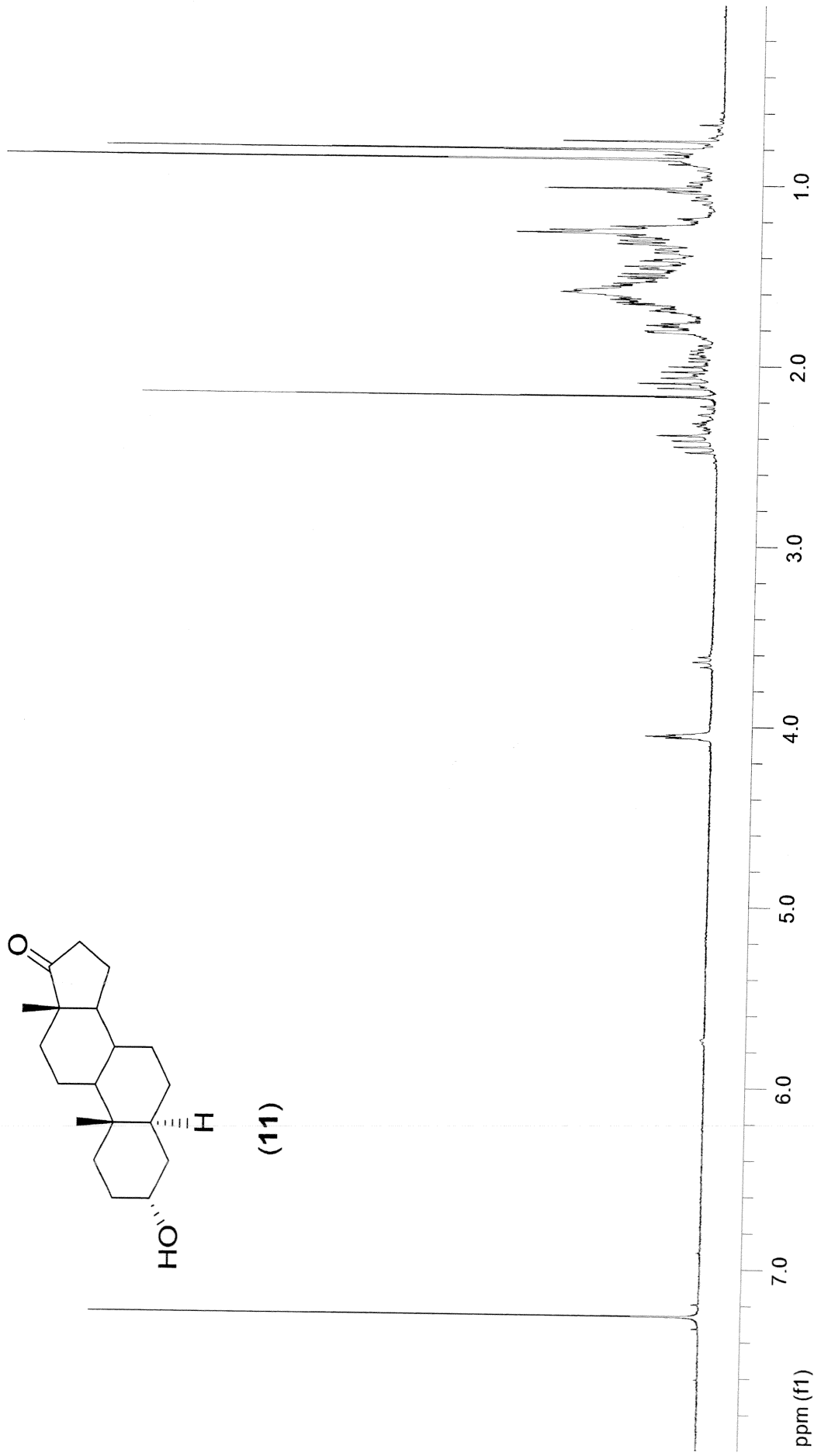
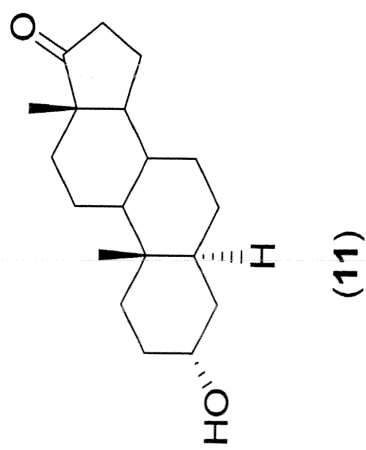
Şekil A.2. Testosteron (4) bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu



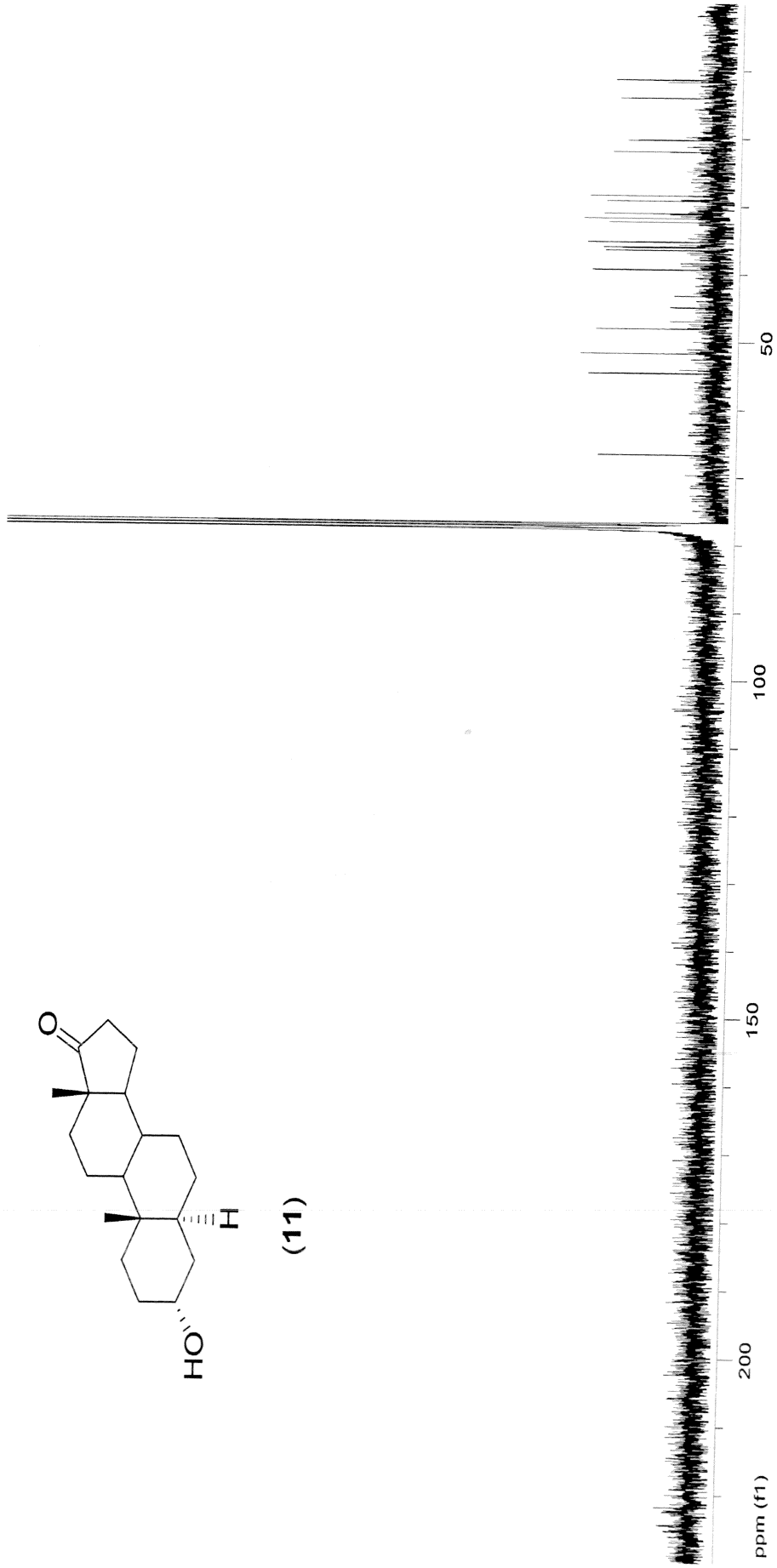
Şekil A.3. 5 α -Androstan-3,17-dion (16) bileşiğinin ¹H NMR spektrumu



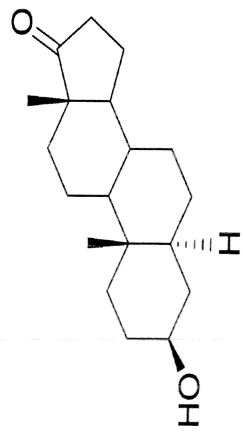
Şekil A.4. 5 α -Androstan-3,17-dion (16) bileşiğinin ¹³C NMR spektrumu



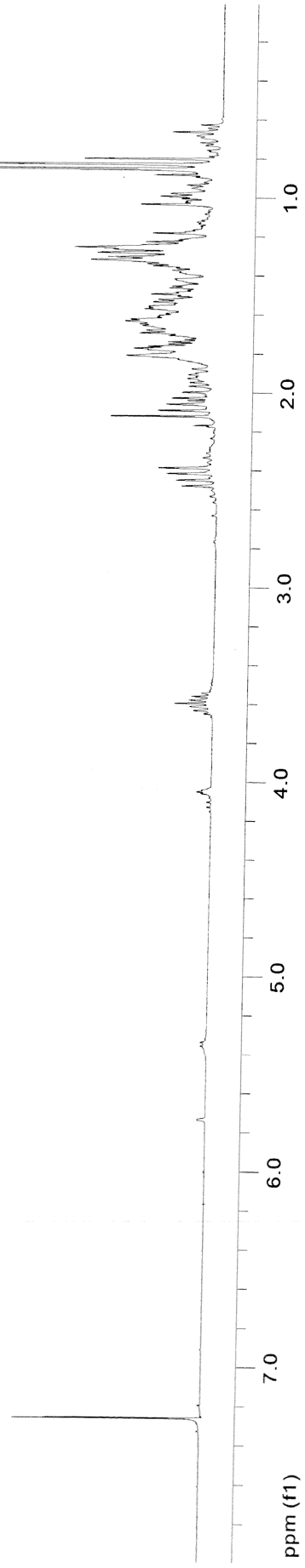
Şekil A.5. 3α-Hidroksi-5α-androstan-17-on (11) bileşiminin ¹H NMR spektrumu



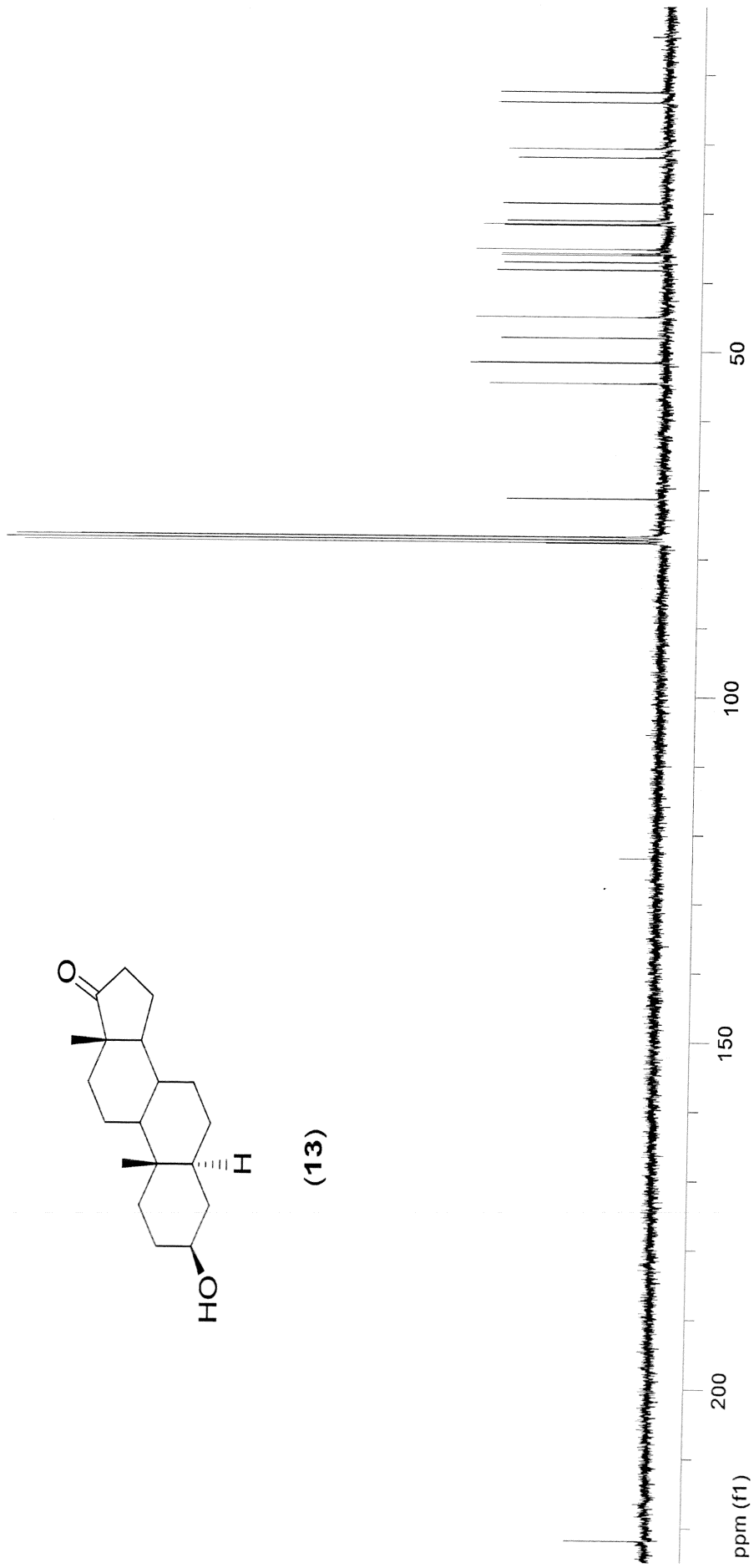
Şekil A.6. 3α-Hidroksi-5α-androstan-17-on (11) bileşiğinin ¹³C NMR spektrumu



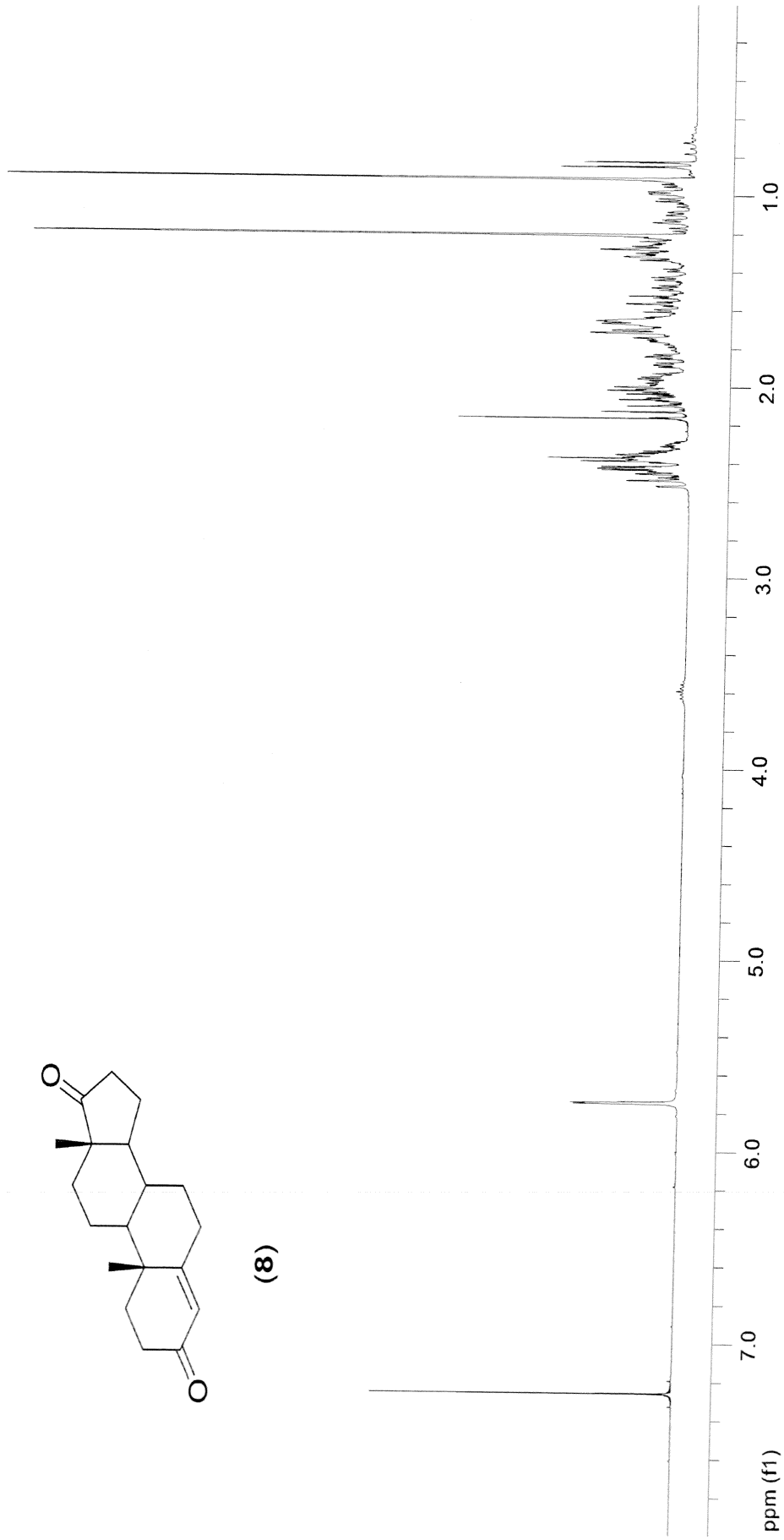
(13)



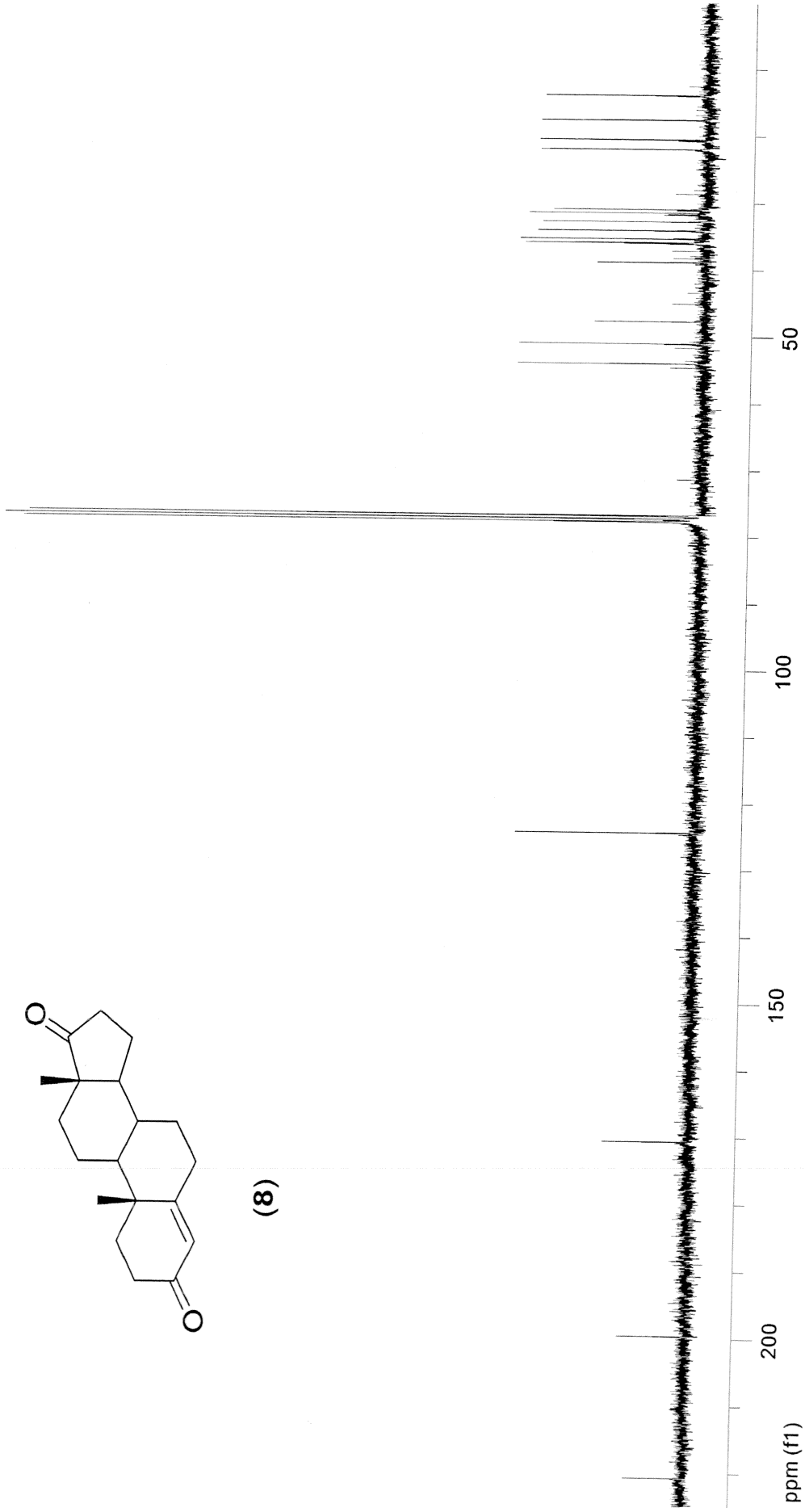
Şekil A.7. 3β Hidroksi-5α-androstan-17-on (13) bileşiğinin ¹H NMR spektrumu



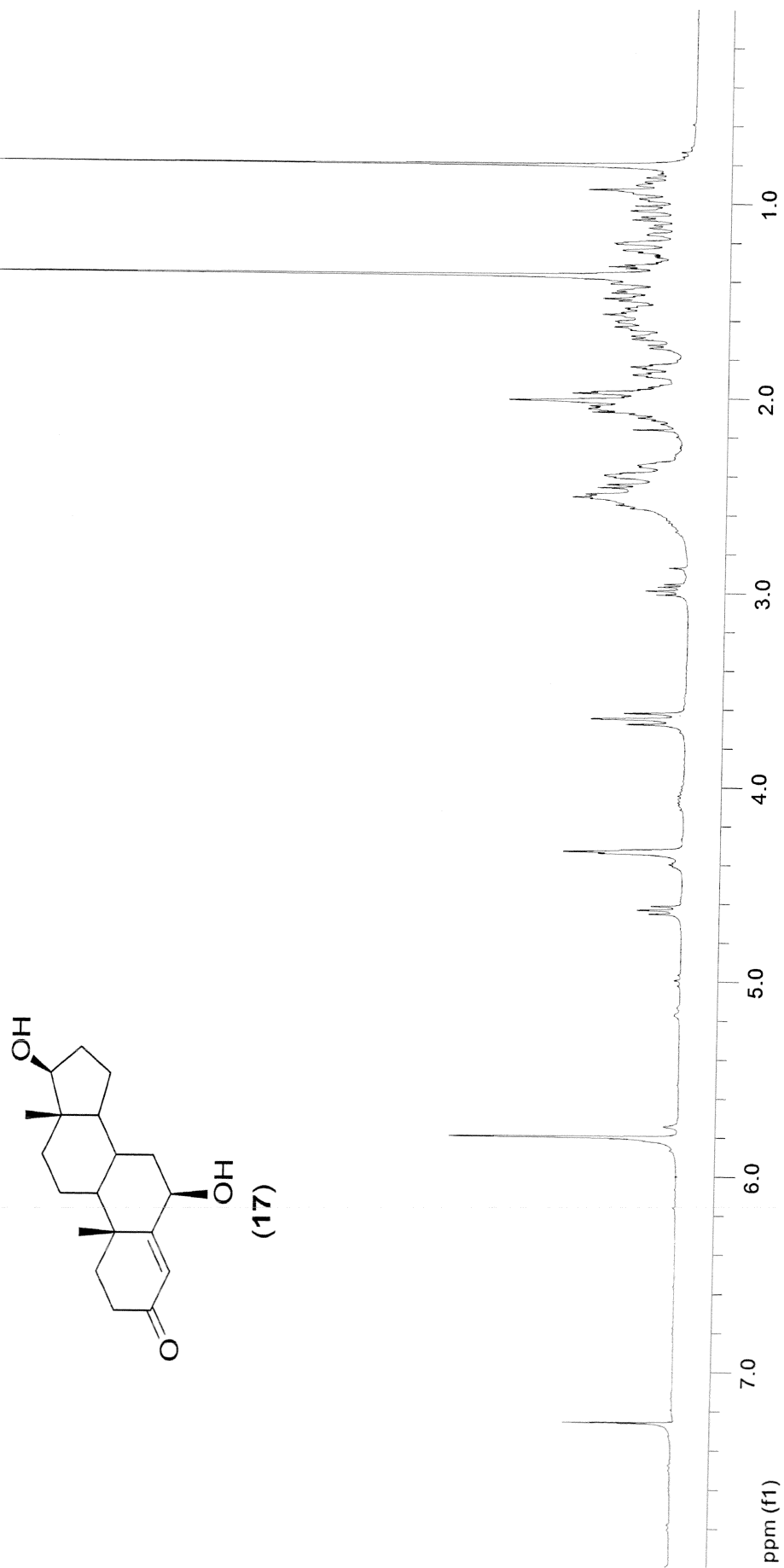
Şekil A.8. 3β-Hidroksi-5α-androstan-17-on (13) bileşiğinin ¹³C NMR spektrumu



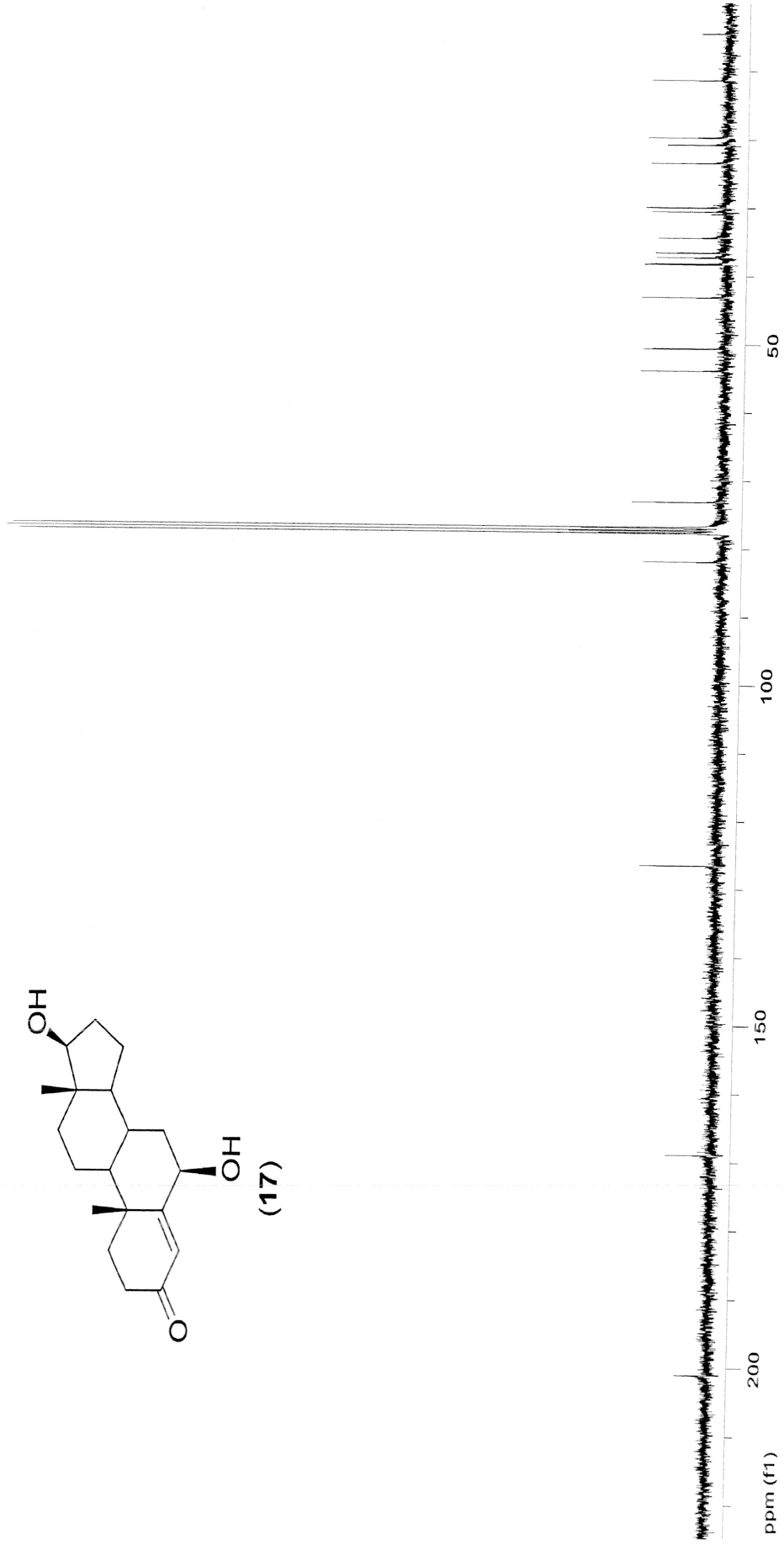
Şekil A.9. Androst-4-en-3,17-dion (8) bileşiğinin ¹H NMR spektrumu



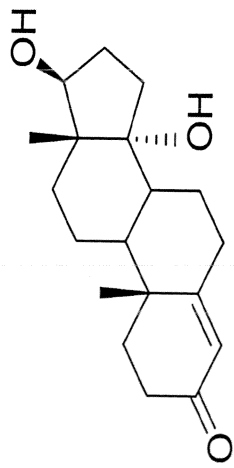
Şekil A.10. Androst-4-en-3,17-dion (8) bileşiğinin ¹³C NMR spektrumu



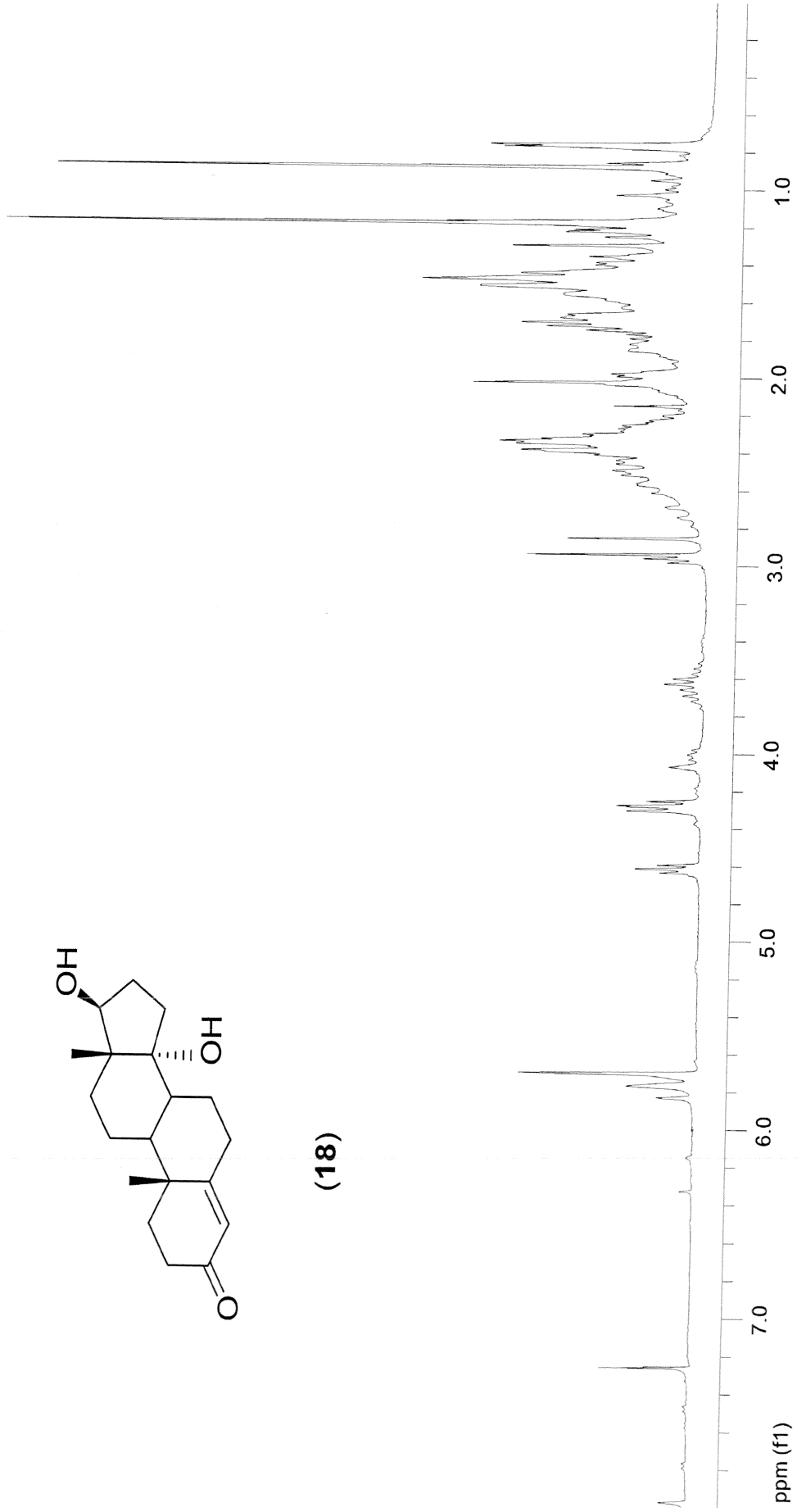
Şekil A.11. 6β,17β-Dihidroksiandrosta-4-en-3-on (17) bileşiğinin ¹H NMR spektrumu



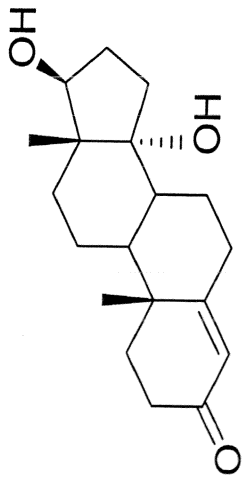
Şekil A.12. 6β,17β-Dihidroksiandrosta-4-en-3-on (17) bileşiğinin ¹³C NMR spektrumu



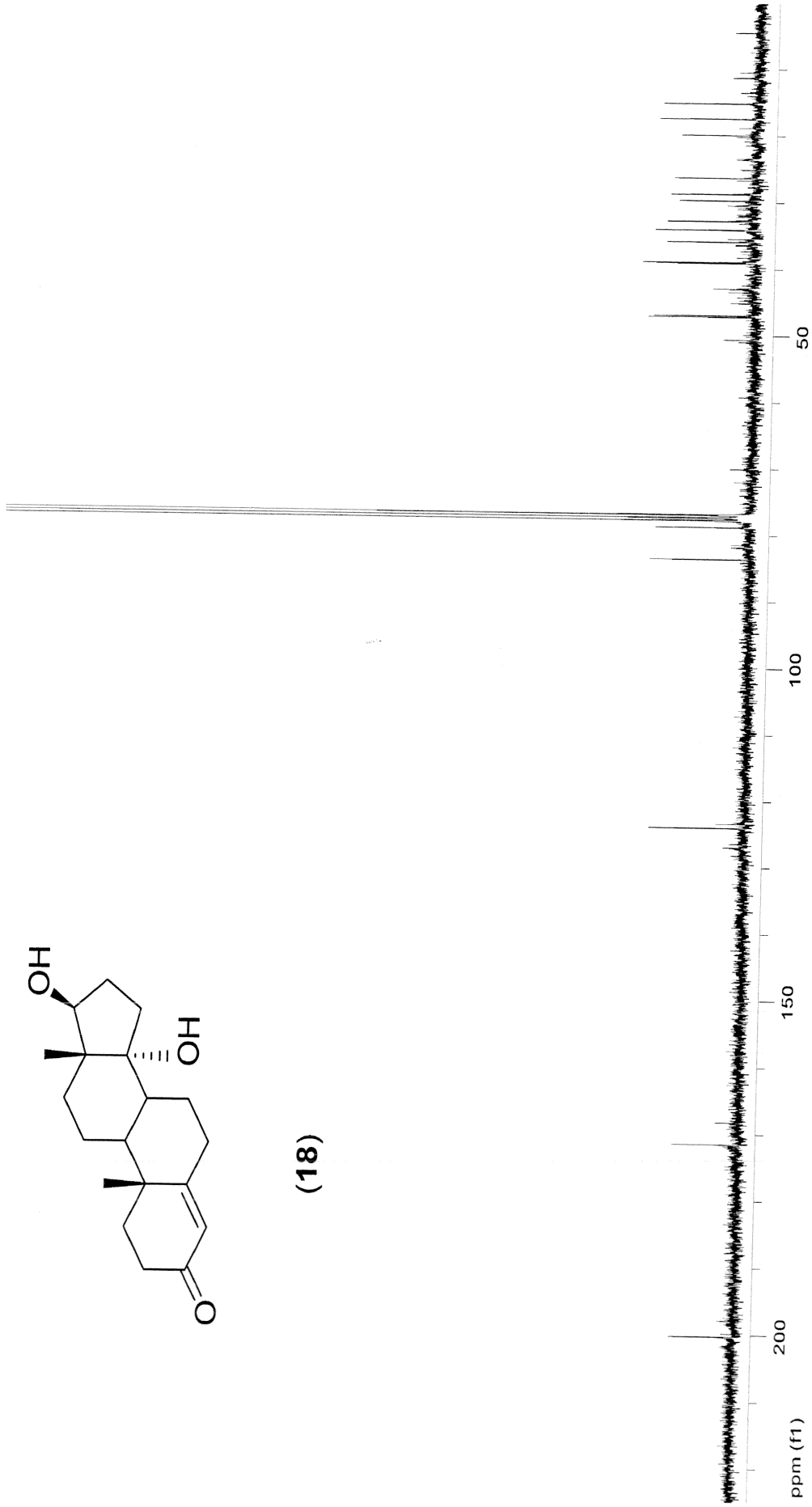
(18)



Şekil A.13. 14 α , 17 β -Dihidroksiandrosta-4-en-3-on (18) bileşiğinin ¹H NMR spektrumu



(18)



Şekil A.14. 14 α ,17 β -Dihidroksiandroster-4-en-3-on (18) bileşiminin ¹³C NMR spektrumu

ÖZGEÇMİŞ

İlknur Küpçü 1974 yılında Sakarya'da doğdu. İlk öğrenimini Atatürk İlkokulu'nda, orta öğrenimini ise Geyve Lisesi'nde tamamladı. Lisans öğrenimi 1996 yılında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Kimya bölümünde tamamladı. Meslek hayatına 1997 yılında İzmit Bilimsel Dershanesinde Kimya öğretmeni olarak başladı.

Yüksek lisans öğrenimine 2007 yılında Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında başladı.