

T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DEHİDROEPIANDROSTERON BİLEŞİĞİNİN BAZI  
KÜFLER İLE BİYOTRANSFORMASYONLARI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Sinan ERGİN**

**Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA**

**Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA**

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

**Aralık 2020**

## BEYAN

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



Sinan ERGİN

28.11.2020

## TEŞEKKÜR

Laboratuvar olanakları konusunda anlayıő ve yardımıını esirgemeyen, çalıőmayı büyük bir titizlik ve sabırla yöneten, çalıőma boyunca desteğini gördüğüm, araőtırmanın planlanmasından yazılmasına kadar tüm aőamalarında yardımıını esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Kudret YILDIRIM'a sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans öğrenimim boyunca ihtiyacım olan her konuda bana destek olan Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü ęretim üyelerine ve araştırma görevlilerine, laboratuvar arkadaőlarıma, Dr. Öęr. Üyesi Ali KURU'ya ve Lisans öğrenimim boyunca yardımlarını esirgemeyen, teővik eden, aynı titizlikle beni yönlendiren, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım üzerimde büyük emeği olan kıymetli hocam Dr. Öęr. Üyesi Emre KOÇ'a sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan, yaőamım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve koőulsuz yanımda olan değerli babam İrfan ERGİN'e ve sevgili annem Gülhan ERGİN'e sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR .....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ .....	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	vi
TABLolar LİSTESİ .....	vii
ÖZET .....	viii
SUMMARY .....	ix
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ .....	1
BÖLÜM 2.	
KAYNAK ARAŞTIRMASI .....	5
2.1. Biyotransformasyonlar .....	5
2.2. Mikrobiyal Biyotransformasyonlar .....	9
2.3. Küfler ile Steroid Biyotransformasyonları .....	12
2.3.1. <i>C. sphaerospermum</i> ile steroid biyotransformasyonları....	12
2.3.2. <i>U. chartarum</i> ile steroid biyotransformasyonları.....	13
2.4. Çalışmanın Amacı .....	14
BÖLÜM 3.	
MATERYAL VE METOT .....	15
3.1. Cihazlar, Sarf Malzemeler ve Kullanılan Yöntemler .....	15
3.2. Yatık Agar Besiyerlerinin Hazırlanması .....	16
3.3. Küf Kültürlerinin Hazırlanması .....	16
3.4. Küflere Ait Besiyerlerinin Hazırlanması .....	16

3.5. Biyotransformasyon Çalışması .....	17
3.6. Metabolitlerin Saflaştırılması ve Yapılarının Tayini .....	17
BÖLÜM 4.	
DENEYSEL BULGULAR .....	19
BÖLÜM 5.	
SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	26
KAYNAKLAR .....	36
EKLER .....	39
ÖZGEÇMİŞ .....	66

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

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

$\delta_H$

:  $^1\text{H}$  NMR spektrumundaki kimyasal kayma

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Genel steroid yapısı.....	2
Şekil 1.2.	Kolesterol .....	2
Şekil 1.3.	Bazı steroid hormonların biyosentezi .....	3
Şekil 2.1.	<i>R. arrhizus</i> ile steroid biyotransformasyonu .....	11
Şekil 4.1.	Substratın karbon iskeleti .....	19
Şekil 4.2.	Substratın <i>U. chartarum</i> ile biyotransformasyonu .....	20
Şekil 4.3.	Substratın <i>C. sphaerospermum</i> ile biyotransformasyonu .....	24
Şekil 5.1.	Substratın <i>U. chartarum</i> ile biyotransformasyonu .....	27
Şekil 5.2.	Substratın <i>C. sphaerospermum</i> ile biyotransformasyonu .....	30



## TABLULAR LİSTESİ

Tablo 5.1. DHEA (9) ve bazı metabolitleri için <sup>13</sup> C NMR değerleri .....	28
Tablo 5.2. DHEA (9) ve diğer bazı metabolitleri için <sup>13</sup> C NMR değerleri ....	31
Tablo 5.3. <i>U. chartarum</i> MRC 72584 küfü ile metabolit verimleri .....	33
Tablo 5.4. <i>C. sphaerospermum</i> MRC 70266 küfü ile metabolit verimleri .....	33

## ÖZET

Anahtar Kelimeler: Biotransformasyon, Dehidroepiandrosteron, *Cladosporium sphaerospermum*, *Ulocladium chartarum*

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

Dehidroepiandrosteron bileşiğinin *Ulocladium chartarum* MRC 72584 ile inkübasyonu 3 $\beta$ -hidroksiandrost-5-en-7,17-dion (%6), 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -dihidroksiandrost-5-en-17-on (%16), 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -dihidroksiandrost-5-en-17-on (%12), 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -dihidroksi-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoksiandrostan-17-on (%2), 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -dihidroksi-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoksiandrostan-17-on (%3), 3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,7 $\alpha$ -trihidroksiandrost-5-en-17-on (%3) ve 3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,7 $\beta$ -trihidroksiandrost-5-en-17-on (%4) metabolitlerini verdi. 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -Dihidroksi-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoksiandrostan-17-on, 3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,7 $\alpha$ -trihidroksiandrost-5-en-17-on ile 3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,7 $\beta$ -trihidroksiandrost-5-en-17-on metabolitleri yeni olarak tanımlandı. Aynı substratın *Cladosporium sphaerospermum* MRC 70266 ile inkübasyonu ise 5 $\alpha$ -androstan-3,6,17-trion (%4), 6 $\beta$ -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (%15), 6 $\alpha$ -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (%5), 7 $\alpha$ -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (%6), 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -dihidroksiandrost-5-en-17-on (%4) ve 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -dihidroksiandrost-5-en-17-on (%20) bileşikleri elde edildi.

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

# BIOTRANSFORMATIONS OF DEHYDROEPIANDROSTERONE BY SOME MOLDS

## SUMMARY

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

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

Incubation of dehydroepiandrosterone with *Ulocladium chartarum* MRC 72584 gave 3 $\beta$ -hydroxyandrost-5-en-7,17-dione (6%), 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -dihydroxyandrost-5-en-17-one (16%), 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -dihydroxyandrost-5-en-17-one (12%), 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxyandrostan-17-one (2%), 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -dihydroxy-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxyandrostan-17-one (3%), 3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,7 $\alpha$ -trihydroxyandrost-5-en-17-one (3%) and 3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,7 $\beta$ -trihydroxyandrost-5-en-17-one (4%). 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -Dihydroxy-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxyandrostan-17-one, 3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,7 $\alpha$ -trihydroxyandrost-5-en-17-one and 3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,7 $\beta$ -trihydroxyandrost-5-en-17-one were identified as new compounds. Incubation of the same substrate with *Cladosporium sphaerospermum* MRC 70266 gave 5 $\alpha$ -androstan-3,6,17-trione (4%), 6 $\beta$ -hydroxyandrost-4-en-3,17-dione (15%), 6 $\alpha$ -hydroxyandrost-4-en-3,17-dione (5%), 7 $\alpha$ -hydroxyandrost-4-en-3,17-dione (6%), 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -dihydroxyandrost-5-en-17-one (4%) and 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -dihydroxyandrost-5-en-17-one (20%).

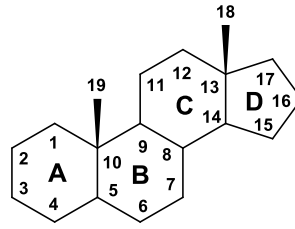
The structures of the metabolites were revealed by comparing melting points, NMR and IR spectra of the starting material with those of metabolites.

## BÖLÜM 1. GİRİŞ

Canlıların büyüme ve gelişmesi için esas teşkil etmeyen sekonder metabolizmanın sekonder metabolitler olarak da bilinen bileşenlerine ayrıca doğal ürünler adı verilmektedir. Doğal ürünler bulunduğu canlılara faydalar sağlayan ve daha çok diğer canlılar üzerindeki etkilerinden dolayı dikkat çeken kimyasal maddelerdir. Doğal ürünler tüm canlılarda bulunmalarına rağmen özellikle bitkilerde, mikroorganizmalarda, mantarlarda ve böceklerde daha yaygın olarak gözlenirler. Bu bileşikler ayrıca bitkiler, hayvanlar, böcekler ve mikroorganizmalar arasındaki etkileşimin düzenlenmesinde önemli ekolojik roller oynar. Canlılar için büyük öneme sahip olan doğal ürünler daha çok bitkiler ve mikroorganizmalardan elde edilirler (Hanson, 2003; Clayden ve ark., 2001).

Doğal ürünler çok sayıda ve farklı yapılarda olsalar da genelde tabiattaki biyosentezlerinden kaynaklanan bazı özel yapısal özelliklere sahip olmaları sebebi ile yağ asitleri, terpenoidler, steroidler, poliketidler, alkaloidler, fenilpropanoidler, özelleşmiş karbonhidratlar, özelleşmiş peptitler gibi sınıflar altında incelenirler (Hanson, 2003; Mann, 1994).

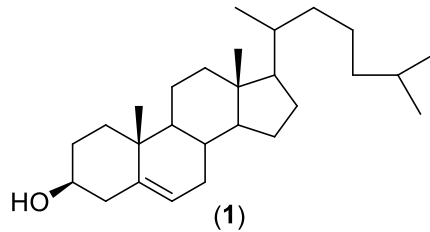
Steroidler doğal ürünlerin önemli bir sınıfıdır. Steroidler steran olarak da adlandırılan siklopentanoperhidrofenantren halkasına sahiptirler. Bu yapı sırasıyla A, B ve C halkaları olarak adlandırılan üç adet sikloheksan halkası ile D halkası olarak adlandırılan bir adet siklopentan halkası içerir (Şekil 1.1.). Komşu halka çiftlerinin her biri halka bağlantılarında iki karbon atomu paylaşır. Çoğu doğal steroid 10. ve 13. karbon pozisyonlarında metil grupları içerir. Bazı steroidler D halkasındaki 17. karbondan orjinlenen yan zincirlere de sahiptir (Onat ve ark., 2002).



Şekil 1.1. Genel steroid yapısı (Onat ve ark., 2002).

A halkalarındaki 3 numaralı karbon atomlarında hidroksil grubu taşıyan steroidlere steroller adı verilir. Kolesterol (**1**), ergosterol ve stigmasterol en yaygın sterollerdir. Kolesterol (**1**) hayvanlar ve insanlarda, ergosterol mantarlarda ve stigmasterol bitkilerde bulunur (Onat ve ark., 2002; Keha ve Küfrevioğlu, 2005).

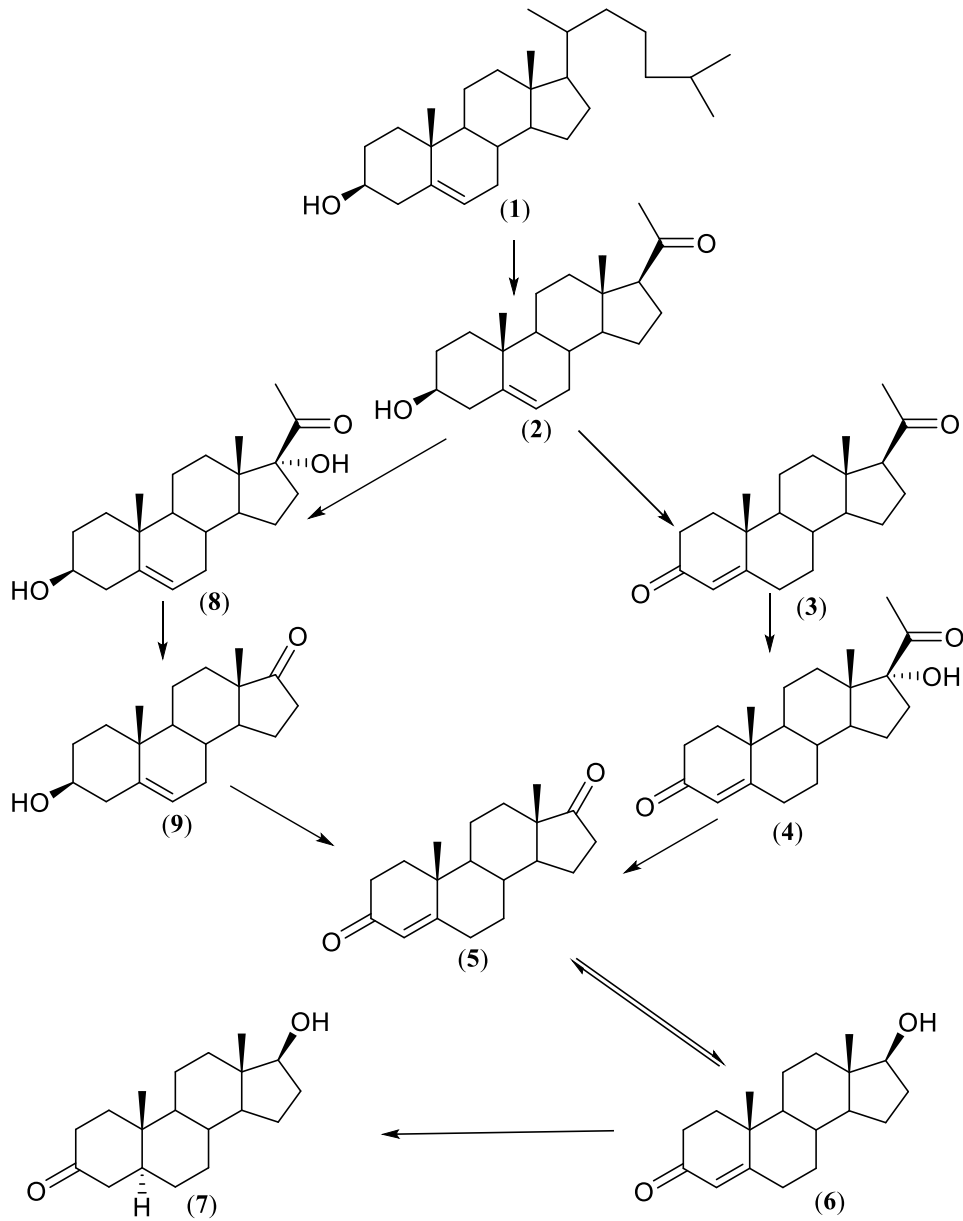
Kolesterol (**1**) A, B, C ve D olmak üzere dört halka ile D halkasına bağlı bir yan zincirden oluşan 27 karbonlu bir steroldür (Şekil 1.2.). İnsanlar ve hayvanlarda yaygın olarak bulunan kolesterol (**1**) membran akışkanlığının düzenleyiciliğine ilave olarak steroid hormonlar, safra asitleri, D<sub>3</sub> vitamini gibi önemli maddelerin de çıkış maddesidir (Onat ve ark., 2002; Keha ve Küfrevioğlu, 2005).



Şekil 1.2. Kolesterol (Onat ve ark., 2002; Keha ve Küfrevioğlu, 2005).

Kolesterol (**1**) türevi olan steroid hormonlar glukokortikoidler, mineralokortikoidler, androjenler, östrojenler ve progestinler olmak üzere beş grup altında incelenirler. Androjenler, östrojenler ve progestinler ayrıca eşey hormonları olarak da bilinirler. Eşey hormonları üreme organlarının gelişme ve büyümelerini, ikincil eşey karakterlerini ve üreme döngüsünü düzenlerler (Onat ve ark., 2002; Keha ve Küfrevioğlu, 2005).

Androjenler erkek üreme organlarının farklılaşmasını ve olgunlaşmasını kontrol eden erkek eşey hormonlarıdır. Androjenlerin vücuttaki asıl sentez yeri erbezleri (testis) olsa da bu hormonların bir kısmı adrenal korteksten salınmaktadır. Adrenal korteks ve testislerdeki androjenlerin biyosentezi  $\Delta^4$  yolu veya  $\Delta^5$  yolu olmak üzere iki farklı yol üzerinden (Şekil 1.3.) gerçekleşmektedir (Onat ve ark., 2002; Keha ve Küfrelioğlu, 2005).



Şekil 1.3. Bazı steroid hormonların biyosentezi (Onat ve ark., 2002).

Androjen biyosentezinin ana yolu olan  $\Delta^4$  yoludur. Bu yolda kolesterol (1) bileşiminden türelenen pregnenolon (2) ilk önce progesteron (3) bileşimine daha sonra ise 17 $\alpha$ -hidroksiprogesterona (4) dönüştürülür. 17 $\alpha$ -Hidroksiprogesteron (4) bünyesindeki yan zincirin uzaklaştırılması ile androst-4-en-3,17-dion olarak da bilinen androstendion (5) bileşimi oluşur. Androstendion (5) bileşiminin C-17'deki indirgenmesiyle güçlü bir androjen olan testosteron (6) oluşur. Testosteron (6) ise daha sonra 5 $\alpha$ -redüktaz aktivitesi ile daha etkin bir diğer androjen olan ve DHT olarak da bilinen dihidrotestosteron (7) bileşimine dönüştürülür (Onat ve ark., 2002; Keha ve Küfrevioğlu, 2005).

Aslında bir yan yol olan  $\Delta^5$  yolunda ise kolesterol (1) bileşiminden türelenen pregnenolon (2) 17 $\alpha$ -hidroksipregnenolon (8) bileşimine dönüştürüldükten sonra bu bileşikten DHEA olarak da bilinen dehidroepiandrosteron (9) bileşimi elde edilir. Dehidroepiandrosteron (9) ise androstendion (5) bileşimine çevrildikten sonra testosterona (6) dönüşebilmektedir. Dişi bireylerdeki etkili eşey hormonları olan östrojenler ise androstendion (5) ve testosteron (6) bileşimlerinden sentezlenmektedir (Onat ve ark., 2002; Keha ve Küfrevioğlu, 2005).

DHEA (9) bileşimi eksikliği yaygın lupus kızarıklığı (sistemik lupus eritematozus), diyabet (diabetes mellitus), Alzheimer hastalığı ve bazı kanser türleri ile ilişkilendirilen önemli bir hormondur (Olech ve Merrill, 2005).

## **BÖLÜM 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI**

### **2.1. Biyotransformasyonlar**

Enzimler veya enzimleri içeren biyolojik sistemlerin kendi substratları olmayan maddeler üzerinde gerçekleştirdikleri kimyasal değişimlere biyotransformasyonlar adı verilir (Hanson, 1995).

Biyotransformasyonlar için kullanılan enzimler serbest veya belirli bir yüzeye sabitlenmiş ya da çeşitli biyolojik sistemlerin bünyesinde olabilirler. Günümüzde birçok enzim izole edilerek ve bazıları ticari olarak sağlandıktan sonra biyotransformasyonlar için kullanılmaktadır. Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim Komisyonu enzimleri sırasıyla oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlar olmak üzere altı ayrı sınıfa ayrılmıştır. Ayrıca her bir sınıf kendi içerisinde 4-13 arası alt sınıflara ayrılabilir (Keha ve Küfrevioğlu, 2005).

Oksidoredüktazlar 2 ayrı substrat arasındaki redoks reaksiyonlarını katalizleyen dehidrojenazlar, redüktazlar, oksijenazlar, oksidazlar gibi enzimleri içerir. Transferazlar 2 ayrı substrat arasındaki belirli atom ve grupların transferini katalizleyen enzimlerdir. Hidrolazlar ise ester, eter, anhidrit, peptid, glikozid, C-halojenür veya P-N bağları gibi bazı bağların su katılımıyla parçalanmasını katalizleyen enzimlerdir. Liyazlar substratlardan belirli grupların ayrılması ile çift bağ oluşumunu ve ayrıca çift bağlara çeşitli grupların ilave edilmesini katalizleyen enzimlerdir. İzomerazlar çeşitli izomerlerin birbirlerine dönüşümünü katalizleyen rasemaz, epimeraz, mutaz gibi isimlerle anılan enzimleri içerir. Ligazlar iki substratın birbirlerine bağlanmasını katalizleyen enzimlerdir (Keha ve Küfrevioğlu, 2005; Faber, 2003).



Enzimler hakkında pahalı oldukları, oldukça duyarlı, sadece kendi doğal substratları ve kendi doğal çevreleri üzerinde etkili oldukları yönünde bazı genel önyargılar söz konusudur. Buna rağmen pek çok enzim için bu olumsuz yargılar geçerli değildir (Faber, 2003).

Enzimler kullanıcılarına birçok avantaj sağlar (Faber, 2003). Örneğin, enzimler çok hızlı çalışır ve enzimatik bir reaksiyon enzimsiz gerçekleşen bir reaksiyona göre  $10^8$ - $10^{10}$  kat daha hızlı gerçekleşir. Enzimatik reaksiyonlarda katalizör oranı %  $10^{-3}$ - $10^{-4}$  mol arasında olabilirken, kimyasal katalizörlü bir reaksiyonda bu oran % 0,1-1 mol aralığına kadar olabilir.

Doğada tamamen parçalanabilir olan enzimler katalizör olarak kullanılan ağır metaller ve sentetik amaçlı kullanılan çoğu reaktifin aksine çevre dostu biyomoleküllerdir.

Sentez için kullanılan çoğu reaktifin aksine enzimler, ılıman şartlarda etkili biyomoleküllerdir. Enzimler genelde pH 5-8 aralığında ve sıcaklığın 20-40 °C arası olduğu ılıman şartlar altında çalışırlar. Bu nedenle enzimler kullanıldığında klasik sentez yöntemleri ile sıklıkla karşılaşılan izomerleşme, rasemizasyon, çevrilme ve bozunma gibi yan reaksiyonlara rastlanılmaz.

Enzimler çoğu zaman kendi doğal rollerinden farklılık gösterebilirler. Örneğin, çoğu enzim geniş bir substrat spektrumuna sahip olmaları sebebi ile birçok doğal veya sentetik bileşik üzerinde etkili olabilir. Ayrıca gerektiğinde bazı enzimler organik çözücülerde de kullanılabilir.

Enzimler genellikle aynı ve benzer şartlar altında etkili olduklarından, bir reaksiyon ağındaki birkaç seri reaksiyon aynı ortamda gerçekleşebilir.

Enzimler geniş bir reaksiyon çeşitliğine sahiptirler. Neredeyse tüm sentetik reaksiyonlara eş değer enzimatik reaksiyonlar söz konusudur. Örneğin, enzimler ile ester, eter, lakton, laktam, epoksit, asit anhidrit, amid ve nitrillerin hidrolizi veya

sentezi, alkan, alken, aromatik bileşikler, alkol, aldehit, keton, sülfürlerin ve sülfoksitlerin yükseltgenmesi ya da indirgenmesi, karboksilasyon, dekarboksilasyon, alkilasyon ve dealkilasyon, halojenasyon ve dehalojenasyon, izomerizasyon, su, amonyak ve hidrojen siyanür ilavesi veya eliminasyonu, açiloin ve aldol reaksiyonları, Michael katılması ve Diels-Alder reaksiyonları gerçekleştirilebilir.

Enzimler kompleks üç boyutlu yapıları sebebi ile regioseçici ve diastereoseçici biyomoleküller oldukları için aynı substrat molekülünün farklı bölgelerindeki fonksiyonel grupları dahi ayırt edebilirler.

Enzimler kemoseçici biyomoleküller oldukları için belirli bir fonksiyonel grup üzerinde etkili olurlar ve diğer fonksiyonel grupları etkilemedikleri için genellikle yan ürünlerin oluşumlarına neden olmazlar.

Enantiyoseçici biyomoleküller olan enzimler L-amino asitlerden oluştukları için kiral biyokatalizörlerdir. Substrat bünyesindeki herhangi bir kiralite enzim-substrat kompleksi oluşumu esnasında tanımlanır. Prokiral bir substrat sadece bir enantiyomere dönüşürken genellikle rasemik karışımlardaki enantiyomerlerden sadece birinin etkilenmesi ile enantiyomerlerin ayrılmaları da gerçekleştirilebilir.

Enzimlerin yukarıda belirtilen özellikleri sayesinde klasik sentez yöntemleriyle gerçekleştirilebilmesi çok zor ya da imkansız olan reaksiyonlar kolaylıkla gerçekleştirilebilmektedir.

Enzimlerin biyokatalizörler olarak kullanılması bazı dezavantajlara da neden olabilir (Faber, 2003). Örneğin enzimler doğada tek bir enantiyomerik forma sahip olmaları ve diğer enantiyomerik formlarının D-amino asitlerden sentezi için genel bir yol olmaması nedeniyle sadece belirli bir enantiyomer ile reaksiyona girebilirler. Bundan dolayı diğer enantiyomerik ürünün elde edebilmek için zıt bir stereokimyasal seçiciliğe sahip bir enzim kullanılması gereklidir. Bu ise bazen mümkün olabilmektedir.

Yavaş gerçekleşen bir enzimatik reaksiyonu daha çok hızlandırmak için sıcaklık ve pH gibi değişkenler, enzimlerin protein yapısında olmalarından dolayı genelde fazla değiştirilemezler.

Enzimler için en uygun reaksiyon ortamı su olsada çoğu organik bileşiğin sudaki çözünürlükleri oldukça düşüktür. Enzimatik bir reaksiyonun sulu bir ortam yerine organik bir çözücüye alınması çoğu zaman enzimlerin denatürasyonu sonucu aktivite kaybına neden olmaktadır.

Enzimler inhibisyona duyarlı biyomoleküllerdir. Çoğu enzimatik reaksiyon çok yüksek substrat ve yüksek ürün konsantrasyonlarında inhibe olurlar. Substrat inhibisyonu, düşük seviyede substrat miktarları ile başlayarak ortama sürekli substrat ilave edilmesi suretiyle kolaylıkla önlenabilir. Reaksiyon ortamından artan ürünün kademeli bir şekilde ortamdan uzaklaştırılması genellikle ürünün bir sonraki reaksiyon basamağına dahil olması nedeniyle oldukça güçtür.

Enzimler kendi doğal kofaktörlerine bağımlıdır. Enzimatik reaksiyonlarda NAD(P)H gibi kofaktörler rol oynuyorsa, bu kofaktörlerin bizzat kendilerinin reaksiyon ortamında olmaları ve yenilenmeleri gerekir. Kofaktörlerin genelde kararsız moleküller olması, yapay eşdeğerleri ile yer değiştirmelerinin mümkün olmaması ve oldukça pahalı olmaları enzimatik reaksiyonların önemli dezavantajlarındanır.

Enzimler alerjik reaksiyonlara da neden olabilir. Bu durumu engellemek için enzimler eğer kimyasal maddeler olarak değerlendirilir ve dikkatli kullanılırsa allerjen özellikleri en aza indirilebilir.

Biyotransformasyonlar genelde izole enzimler veya bütün hücre sistemleri ile olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleştirilir. Bütün hücre sistemleri terimi genellikle bitki ve hayvanlara ait hücre, doku ve organ kültürleri ile mikroorganizmaları kapsar (Faber, 2003).

Biyotransformasyon reaksiyonlarında genelde bütün hücre sistemleri tercih edilmektedir. Bu tercihin nedenleri arasında çoğu hücre içi enzimin hücre dışında kararsız olabilmesi, hücre içi enzimlerin izolasyonunun zorluğu, hücre içi enzimlerin homojenasyon sırasında bazı proteolitik enzimlerin etkisi ile hidrolizlenmesi, hücre içi enzimlerin kofaktör ihtiyaçlarının temini ve sürekli yenilenmesi ve yüksek maliyetleri sayılabilir (Faber, 2003).

## 2.2. Mikrobiyal Biyotransformasyonlar

Biyotransformasyon reaksiyonları için kullanılan bütün hücre sistemleri içinde en çok tercih edilenler mikrobiyal hücrelerdir. Mikrobiyal hücrelerin büyüme ve gelişme hızı, bitki ve hayvan hücrelerine göre çok daha yüksektir. Bu da mikrobiyal hücreler ile biyotransformasyonların hızlı ve kısa sürede gerçekleşmesine neden olur. Mikrobiyal hücreler, küçük boyutları ve etkili hücre duvarı yapısı sayesinde bitki ve hayvan hücrelerine göre mekanik olarak daha kararlı olmalarından dolayı değişik kültür tekniklerinde bu tip hücrelerin ortama uyumu açısından avantajlıdır. Ayrıca mikrobiyal hücreler bitki ve hayvan hücrelerine göre çok daha farklı tipte substratları metabolize edebilir (Faber, 2003).

Günümüzde mikrobiyal biyotransformasyonların biyoteknolojinin temel öğeleri haline gelmesi, diğer kimyasal sentez metotlarına göre bazı avantajlara sahip olmalarıdır (Faber, 2003).

Mikroorganizmalar genetik olarak değiştirilebilir. Mikroorganizmalar üzerinde gerçekleştirilen genetik uygulamalar ve diğer kimyasal yöntemler ile düşük verimle elde edilen önemli ürünler, daha yüksek verimlerde elde edilebilir. Hatta genetik uygulamalar ile ürünler üzerinde istenilen değişikliklerin sağlanması bile mümkün olabilmektedir (Demain, 2000).

Yapılarındaki spesifik olmayan enzim sistemleri sayesinde mikroorganizmalar, hem doğal hem de sentetik çok sayıda farklı substratlar üzerinde bir çok farklı kimyasal reaksiyonları gerçekleştirebilir (Hanson, 1995)

Klasik kimyasal yöntemlere göre mikrobiyal biyotransformasyonlar, çok daha ılıman şartlarda gerçekleşir. Çoğu mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonları oda sıcaklığı ve 1 atmosfer basınç gibi ılıman şartlar altında gerçekleşmektedir (Faber, 2003).

Mikrobiyal biyotransformasyonlar klasik kimyasal yöntemlere göre daha ucuza ve daha kısa sürede gerçekleştirilir. Hedef bileşikler daha kısa süreler içerisinde ve genellikle daha yüksek verimlerde, kimyasal reaktiflere göre çok ucuza temin edilen besiyeri bileşenleri ve mikroorganizmalar kullanılarak hazırlanmaktadır (Hanson, 1995; Faber, 2003).

Mikrobiyal biyotransformasyonlar çevre dostudur. Klasik kimyasal sentez metotlarında kullanılan çoğu reaktif, çevreye çok büyük zararlar vermektedir (Hanson, 1995; Faber, 2003).

Mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonları enantioseçicidir. Klasik kimyasal sentez yöntemleri ile genel olarak hedef moleküller, ayrılmaları çok zor olan rasemik karışımlar olarak elde edilmektedir. Özellikle ilaç etkin maddelerinin sentezinde tek enantiyomer üretmek oldukça önemlidir. Tek enantiyomerin seçimli üretimi için mikroorganizmaların kullanılmaları günümüzde gittikçe yaygınlaşmıştır (Hanson, 1995).

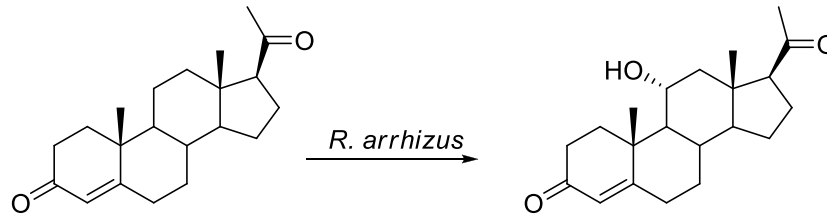
Klasik kimyasal sentez yöntemlerinin aksine mikrobiyal biyotransformasyonlar esnasında substratlar üzerindeki diğer fonksiyonel grupların korunması gerekmez. Bu üstünlük enzimlerin regioseçicilikleri sebebi ile ortaya çıkar (Hanson, 1995; Faber, 2003).

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

Mikroorganizmalar değişik ortamlara kolayca adapte olabilen canlılardır. Bu özelliklerinden dolayı mikroorganizmalar erlenden fabrika fermentörlerine kadar birçok farklı ortamda kolayca kullanılabilir (Hanson, 1995; Faber, 2003).

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

Birçok sentetik reaksiyona eşdeğer reaksiyonlar mikroorganizmalar ile gerçekleştirilebilmektedir. Buna ek olarak mikrobiyal hidroksilasyonlar gibi bazı mikrobiyal biyotransformasyonlar, sentetik reaksiyonlar ile tek basamakta gerçekleştirilemez (Hanson, 1995).



Şekil 2.1. *R. arrhizus* ile steroid biyotransformasyonu (Hanson, 1995).

En önemli mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonlarından birisi mikrobiyal hidroksilasyondur. Mikrobiyal hidroksilasyonun önemi ilk olarak iltihap giderici olarak kullanılan kortikal steroidlerin sentezinde anlaşılmıştır. Bu steroidlerin sentezinde, fonksiyonel gruplardan oldukça uzakta bulunan C-11 pozisyonuna bir oksijen eklenmesi, klasik kimyasal yöntemlerle oldukça uzun ve masraflı bir işlem olmasına rağmen bahsi geçen bu sorunun *Rhizopus arrhizus* küfünün yüksek verimli bir 11-hidroksilasyon ile çözülmesi (Şekil 2.1.) dikkatleri mikrobiyal biyotransformasyonlar üzerine çekmiştir (Hanson, 1995).

### 2.3. Küfler ile Steroid Biyotransformasyonları

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

Günümüze kadar DHEA (9) bileşiğinin çok sayıda farklı küf türleri ile biyotransformasyonları gerçekleştirilmiştir. Bu biyotransformasyon çalışmalarından Baeyer-Villiger oksidasyonları, mikrobiyal hidroksilasyonlar ile steran halkasının farklı kısımlarına hidroksil gruplarının eklenmesi, mikrobiyal hidrosilasyonlar ile eklenen bu hidroksil gruplarının oksidasyonları, keton gruplarının redüksiyonu, A halkasının aromatikleşmesi, B halkasının hidrojenasyonu ve steran halkasındaki farklı kısımların mikrobiyal dehidrojenasyonları gibi ilginç sonuçlar elde edilmiştir (Nassiri-Koopaei ve Faramarzi, 2015; Donova ve Egorova, 2012; Bhatti ve Khera, 2012; Fernandes ve ark., 2003; Mahato ve Garai, 1997).

#### 2.3.1. *C. sphaerospermum* ile steroid biyotransformasyonları

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

Yeryüzünde geniş dağılım gösteren *Cladosporium sphaerospermum* yüksek tuz derişimleri ve ozmotik basınca dayanıklı bir küftür (Zalar ve ark., 2007). Bu küf

çoğu zaman iç ve dış mekanlardan (Aihara ve ark., 2001; Park ve ark., 2004), insanlar (Yano ve ark., 2003) ve bitkilerden (Pereira ve ark., 2002) izole edilir.

Literatürde sadece *C. sphaerospermum* MRC 70266 ile androstendion (5) (Yildirim ve ark., 2020) ve testosteron (6) (Yildirim ve ark., 2019) bileşikleri üzerine gerçekleştirilmiş iki ayrı steroid biyotransformasyonu çalışması bulunmaktadır.

*C. sphaerospermum* MRC 70266 küfü androstendionu (5) ağırlıklı olarak C-6 $\beta$  pozisyonunda hidroksillerken C-15 $\alpha$  pozisyonunda bir diğer hidroksillenme, C-17'de bir indirgenme, B halkasında bir 5 $\alpha$ -indirgenmesi ile C-6 and C-16 pozisyonlarındaki hidroksillenmeleri takiben gerçekleşen yükseltgenmelerde gözlenmiştir.

*C. sphaerospermum* MRC 70266 testosteron (6) bileşimini C-6 $\beta$ , C-7 $\beta$ , C-12 $\beta$ , C-15 $\alpha$  ve C-16 $\beta$  pozisyonlarında hidroksillerken bir 5 $\alpha$ -indirgenmesi ile bir C-17 oksidasyonu da gerçekleştirmiştir.

### 2.3.2. *Ulocladium chartarum* ile steroid biyotransformasyonları

Askomiset mantarlarından olan *Ulocladium* türleri farklı dağılımlara ve rollere sahiptirler. Çoğunlukla safrofit olan *Ulocladium* türlerinin bazıları bitki patojenleriyken bazıları ise gıdalarda bozulmalara yol açarlar. Birkaç *Ulocladium* türü ise önemli enzim kaynakları ve biyokontrol ajanları olarak dikkat çekmektedir. *Ulocladium* cinsinin bir üyesi olan *Ulocladium chartarum* küfü daha çok iç mekanlarda rastlanan bir küftür. (Andersen ve Hollensted, 2008).

Literatürde sadece *U. chartarum* MRC 72584 ile androstendion (5) (Yildirim ve ark., 2020) ve testosteron (6) (Yildirim ve ark., 2018) bileşikleri üzerine gerçekleştirilmiş iki ayrı steroid biyotransformasyonu çalışması bulunmaktadır.

*U. chartarum* MRC 72584 androstendion (5) bileşimini üzerinde C-6 $\beta$ , C-7 $\alpha$ , C-7 $\beta$  ve C-14 $\alpha$  pozisyonlarında hidroksillenmeler, C-6'daki hidroksillenme sonrasında



gerçekleşen bir yükseltgenme, bir 5 $\alpha$ -indirgenmesi ve C-17'de bir indirgenme gerçekleştirmiştir.

*U. chartarum* MRC 72584 küfü testosteron (6) bileşimini C-6 $\beta$ , C-7 $\beta$ , C-12 $\beta$  ve C-14 $\alpha$  pozisyonlarında hidroksillerken C-6 $\beta$ 'da gerçekleşen hidroksillenmeyi takip eden bir yükseltgenme, bir 5 $\alpha$ -indirgenmesi ile C-17'de gerçekleşen bir yükseltgenme de gözlenmiştir.

#### **2.4. Çalışmanın Amacı**

Bu çalışmada *C. sphaerospermum* MRC 70266 ve *U. chartarum* MRC 72584 küfleri ile DHEA (9) bileşiminin nasıl metabolize edileceğinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

### 3.1. Cihazlar, Sarf Malzemeler ve Kullanılan Yöntemler

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

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

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

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

DHEA (9) bileşiği Sigma-Aldrich firmasından satın alındı. Küfler için hazırlanan besiyerinde kullanılan tüm kimyasallar, yatık agar besiyerleri için kullanılan PDA ve agar, çalışmada kullanılan tüm solventler ise Merck firmasından satın alındı.

### **3.2. Yatık Agar Besiyerlerinin Hazırlanması**

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

### **3.3. Küf Kültürlerinin Hazırlanması**

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

### **3.4. Küflere Ait Besiyerlerinin Hazırlanması**

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

### 3.5. Biyotransformasyon Çalışmaları

Hazırlanan 1 L besiyeri çözeltileri her bir küf için 10 adet 250 mL erlene paylaştırılarak otoklavda sterilize edildi. Daha önce hazırlanan en taze alt kültürdeki küflerin her biri 10 erlene steril şartlar altında aktarıldı ve bu erlenler yeterli miktarda küf oluşabilmesi için 28 °C sıcaklıkta, çalkalamalı inkübatörde (160 rpm), 3 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. Üçüncü günün sonunda her bir biyotransformasyon çalışması için DHEA (9) (1 g), DMF (10 mL) içerisinde çözülerek yeterli miktarda küf içeren erlenlere eşit hacimlerde ve steril şartlarda ilave edildikten sonra, 5 gün boyunca 28 °C'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı (160 rpm).

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

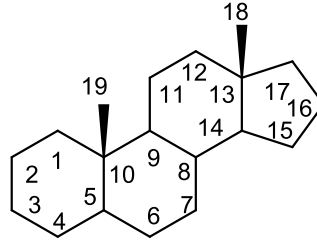
### 3.6. Metabolitlerin Saflaştırılması ve Yapılarının Tayini

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

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

## BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

DHEA (**9**) bileşiğinin *U. chartarum* MRC 72584 ve *C. sphaerospermum* MRC 70266 küfleri ile biyotransformasyonundan elde edilen bileşiklerin yapı tayinlerini gerçekleştirmek için substrat ve elde edilen bileşiklerin erime noktaları, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR ve IR spektrumları karşılaştırıldı. DHEA (**9**) bileşiğinin karbon iskeleti numaralandırılması Şekil 4.1.'de verilmiştir.



Şekil 4.1. Substratın karbon iskeleti.

DHEA (**9**) bileşiğinin (1 g) *U. chartarum* MRC 72584 ile 28 °C'de 5 gün süren inkübasyonu sonrasında elde edilen yağimsı madde (2127 mg) ile gerçekleştirilen kolon kromatografisi çalışmasından değişime uğramayan başlangıç maddesi (197 mg) ile 3 $\beta$ -hidroksiandrost-5-en-7,17-dion (**11**) (%6), 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -dihidroksiandrost-5-en-17-on (**12**) (%16), 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -dihidroksiandrost-5-en-17-on (**13**) (%12), 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -dihidroksi-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoksiandrostan-17-on (**14**) (%2), 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -dihidroksi-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoksiandrostan-17-on (**15**) (%3), 3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,7 $\alpha$ -trihidroksiandrost-5-en-17-on (**16**) (%3) ve 3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,7 $\beta$ -trihidroksiandrost-5-en-17-on (**17**) (%4) bileşikleri elde edildi (Şekil 4.2.).

3 $\beta$ -Hidroksiandrost-5-en-7,17-dion (**11**), (63 mg, %6)

%60'lık çözen sistemiyle elüsyon neticesinde metanolden prizmalar şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 237-238°C, lit., 239°C (Koçek ve ark., 2011).

IR ( $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ ): 3485, 1730 ve 1660.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0,86 (3H, s, 18-H); 1,18 (3H, s, 19-H); 3,64 (1H, m, 3 $\alpha$ -H); 5,70 (1H, bs, 6-H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 220,60 (C-17); 201,20 (C-7); 166,55 (C-5); 125,65 (C-6); 70,03 (C-3); 49,92 (C-9); 47,78 (C-13); 45,57 (C-8); 44,18 (C-14); 41,74 (C-4); 38,32 (C-1); 36,17 (C-10); 35,54 (C-16); 30,88 (C-2); 30,55 (C-12); 24,04 (C-15); 20,43 (C-11); 17,31 (C-19); 13,63 (C-18).

3 $\beta$ ,7 $\beta$ -Dihidroksiandrost-5-en-17-on (**12**), (170 mg, %16)

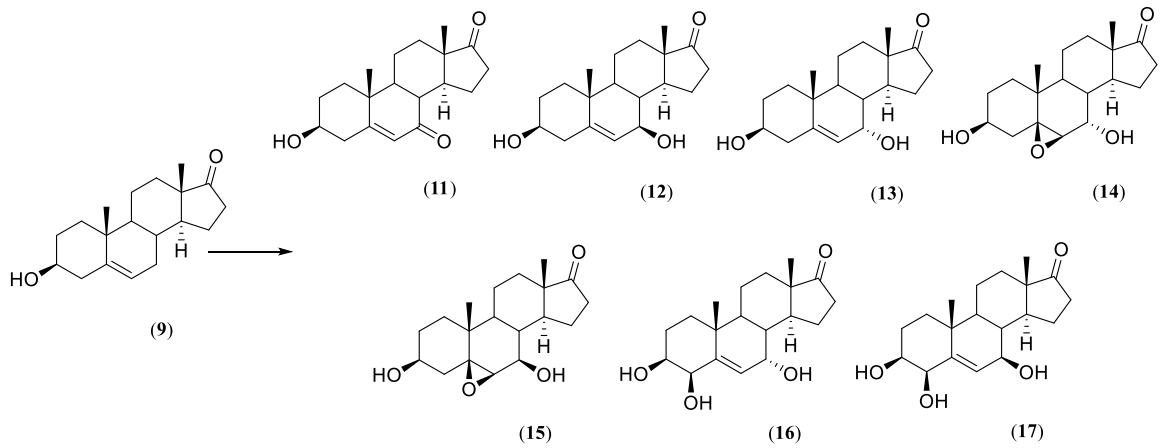
%80'lik çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde etil asetat-petrol eterinden iğneler şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 212-213°C, lit., 215-217°C (Kolek ve ark., 2011).

IR ( $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ ): 3245 ve 1735.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0,87 (3H, s, 18-H); 1,05 (3H, s, 19-H); 3,52 (1H, m, 3 $\alpha$ -H); 3,91 (1H, m, 7 $\alpha$ -H); 5,28 (1H, bs, 6-H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 221,50 (C-17); 143,48 (C-5); 125,49 (C-6); 72,66 (C-7); 71,07 (C-3); 51,10 (C-14); 48,13 (C-9); 47,73 (C-13); 41,52 (C-4); 40,23 (C-8); 36,79 (C-1); 36,56 (C-10); 35,93 (C-16); 31,33 (C-12); 31,11 (C-2); 24,11 (C-15); 20,29 (C-11); 19,09 (C-19); 13,51 (C-18).



Şekil 4.2. Substratın *U. chartarum* ile biyotransformasyonu.

3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -Dihidroksiandrost-5-en-17-on (**13**), (127 mg, %12)

%80'lik çözügen sistemiyle elüsyon neticesinde etil asetat-petrol eterinden iğneler şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 179-180°C, lit., 181-182°C (Kolek ve ark., 2011).

IR ( $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ ): 3360 ve 1740.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 0,86 (3H, s, 18-H); 0,98 (3H, s, 19-H); 3,54 (1H, m, 3 $\alpha$ -H); 3,94 (1H, bs, 7 $\beta$ -H); 5,60 (1H, d,  $J = 5$  Hz, 6-H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 221,38 (C-17); 146,35 (C-5); 123,46 (C-6); 70,98 (C-3); 64,13 (C-7); 47,06 (C-13); 44,83 (C-14); 42,47 (C-4); 41,84 (C-9); 37,42 (C-8); 37,10 (C-10); 36,86 (C-1); 35,74 (C-16); 31,15 (C-12); 30,96 (C-2); 21,82 (C-15); 19,97 (C-11); 18,19 (C-19); 13,20 (C-18).

3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -Dihidroksi-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoksiandrostan-17-on (**14**), (22 mg, %2)

%90'lık çözügen sistemiyle elüsyon neticesinde etil asetatтан iğneler şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 181-182 °C, lit., 177-179 °C (Holland ve Diakow, 1979).

IR ( $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ ): 3400, 1740, 1145 ve 1085.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0,84 (3H, s, 18-H); 1,01 (3H, s, 19-H); 3,12 (1H, d,  $J = 3,2$  Hz, 6 $\alpha$ -H); 3,73 (1H, bs, 3 $\alpha$ -H); 4,17 (1H, bs, 7 $\beta$ -H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 220,89 (C-17); 68,89 (C-3); 65,95 (C-7); 64,62 (C-6); 63,72 (C-5); 46,96 (C-13); 44,48 (C-14); 41,90 (C-9); 41,44 (C-4); 36,58 (C-1); 35,45 (C-16); 34,28 (C-10); 34,14 (C-8); 30,89 (C-12); 30,50 (C-2); 20,97 (C-15); 20,95 (C-11); 16,99 (C-19); 13,02 (C-18).

3 $\beta$ ,7 $\beta$ -Dihidroksi-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoksiandrostan-17-on (**15**), (34 mg, %3)

%90'lık çözügen sistemiyle elüsyon neticesinde etil asetatтан iğneler şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 181-182°C.

IR ( $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ ): 3352, 1740, 1140 ve 1090.

Elementel analiz: C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub> için %71,22 C ve %8,81 H hesaplanırsa da %71,08 C ve %8,67 H gözlemlendi.



$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 0,85 (3H, s, 18-H); 1,03 (3H, s, 19-H); 3,18 (1H, bs, 6 $\alpha$ -H); 3,64 (1H, t,  $J = 9.5$  Hz, 7 $\alpha$ -H); 3,72 (1H, m, 3 $\alpha$ -H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 221,50 (C-17); 74,24 (C-7); 68,78 (C-3); 67,56 (C-6); 67,41 (C-5); 50,58 (C-14); 49,73 (C-9); 47,75 (C-13); 41,49 (C-4); 37,66 (C-8); 36,84 (C-1); 35,86 (C-16); 34,34 (C-10); 31,12 (C-12); 30,69 (C-2); 24,95 (C-15); 21,20 (C-11); 16,85 (C-19); 13,50 (C-18).

3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,7 $\alpha$ -Trihidroksiandrost-5-en-17-on (**16**), (33 mg, %3)

Etil asetat ile elüsyon neticesinde etil asetatın iğneler şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 203-204°C.

IR ( $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ ): 3430 ve 1740.

Elementel analiz:  $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_4$  için %71,22 C ve %8,81 H hesaplanırsa da %71,10 C ve %8,65 H gözlemlendi.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 0,89 (3H, s, 18-H); 1,21 (3H, s, 19-H); 3,62 (1H, m, 3 $\alpha$ -H); 4,06 (1H, bs, 7 $\beta$ -H); 4,18 (1H, d,  $J = 3,2$  Hz, 4 $\alpha$ -H); 5,90 (1H, d,  $J = 5$  Hz, 6-H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 221,33 (C-17); 146,97 (C-5); 129,21 (C-6); 76,68 (C-4); 71,86 (C-3); 64,16 (C-7); 47,06 (C-13); 44,76 (C-14); 42,82 (C-9); 37,14 (C-10); 37,05 (C-8); 36,55 (C-1); 35,73 (C-16); 30,84 (C-12); 24,77 (C-2); 21,90 (C-15); 19,42 (C-11); 19,32 (C-19); 13,22 (C-18).

3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,7 $\beta$ -Trihidroksiandrost-5-en-17-on (**17**), (45 mg, %4)

Etil asetat ile elüsyon neticesinde etil asetatın iğneler şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 203-204°C.

IR ( $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ ): 3455 ve 1740.

Elementel analiz:  $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_4$  için %71,22 C ve %8,81 H hesaplanırsa da %71,12 C ve %8,69 H gözlemlendi.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 0,90 (3H, s, 18-H); 1,26 (3H, s, 19-H); 3,60 (1H, m, 3 $\alpha$ -H); 3,96 (1H, d,  $J = 7,9$  Hz, 7 $\alpha$ -H); 4,17 (1H, d,  $J = 3,2$  Hz, 4 $\alpha$ -H); 5,62 (1H, d,  $J = 2,1$  Hz, 6-H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 221,22 (C-17); 144,96 (C-5); 131,08 (C-6); 76,13 (C-4); 72,62 (C-7); 72,05 (C-3); 51,18 (C-14); 48,85 (C-9); 47,70 (C-13); 40,36

(C-8); 36,55 (C-10); 36,18 (C-1); 35,95 (C-16); 31,04 (C-12); 25,06 (C-2); 24,09 (C-15); 20,63 (C-19); 19,86 (C-11); 13,53 (C-18).

DHEA (**9**) bileşiğinin (1 g) *C. sphaerospermum* MRC 70266 ile 28 °C'de 5 gün süren inkübasyonu sonrasında elde edilen yağimsı madde (1943 mg) ile gerçekleştirilen kolon kromatografisi çalışmasından değişmeyen başlangıç maddesi (180 mg) ile 5 $\alpha$ -androstan-3,6,17-trion (**18**) (%4), 6 $\beta$ -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**19**) (%15), 6 $\alpha$ -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**20**) (%5), 7 $\alpha$ -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**21**) (%6), 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -dihidroksiandrost-5-en-17-on (**12**) (%4) ve 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -dihidroksiandrost-5-en-17-on (**13**) (%20) bileşikleri elde edildi (Şekil 4.3.).

5 $\alpha$ -Androstan-3,6,17-trion (**18**), (42 mg, %4)

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

Erime noktası: 191-192°C, lit., 196-197°C (Numazawa ve ark., 1988).

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

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0,89 (3H, s, 18-H); 1,00 (3H, s, 19-H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 219,65 (C-17); 210,90 (C-3); 208,22 (C-6); 57,39 (C-5); 53,32 (C-9); 51,38 (C-14); 48,01 (C-13); 45,22 (C-7); 41,10 (C-4); 37,86 (C-10); 37,35 (C-1); 37,21 (C-8); 36,82 (C-2); 35,54 (C-16); 30,95 (C-12); 21,56 (C-15); 20,84 (C-11); 13,72 (C-18); 12,53 (C-19).

6 $\beta$ -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**19**), (157 mg, %15)

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

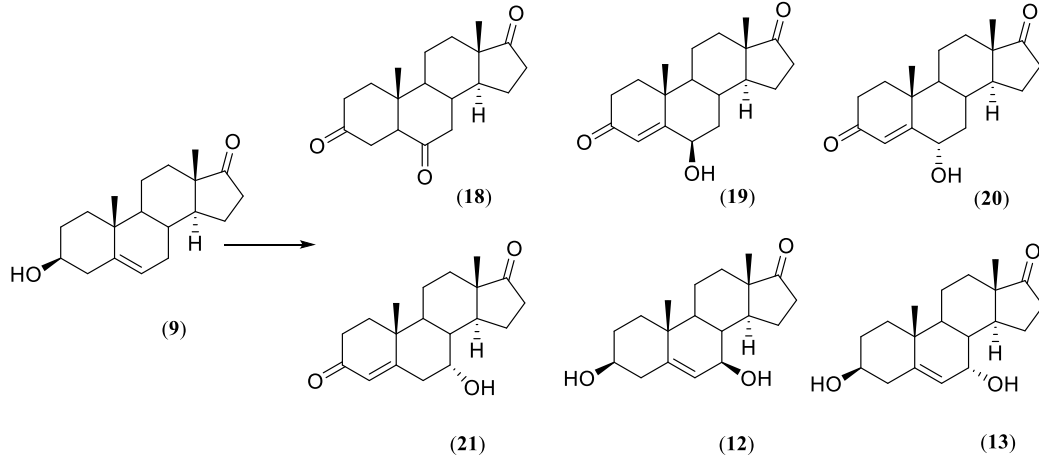
Erime noktası: 189-190°C, lit., 190-193°C (Hanson ve ark., 1996).

IR ( $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ ): 3445, 1740 ve 1670.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  0,91 (3H, s, 18-H); 1,37 (3H, s, 19-H); 4,36 (1H, bs, 6 $\alpha$ -H); 5,81 (1H, s, 4-H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  220,81 (C-17); 200,58 (C-3); 168,35 (C-5); 126,20 (C-4); 72,40 (C-6); 53,50 (C-9); 50,75 (C-14); 47,56 (C-13); 37,96 (C-10); 37,11

(C-7); 36,89 (C-1); 35,69 (C-16); 34,03 (C-2); 31,12 (C-12); 29,29 (C-8); 21,59 (C-15); 20,14 (C-11); 19,40 (C-19); 13,67 (C-18).



Şekil 4.3. Substratın *C. sphaerospermum* ile biyotransformasyonu.

6 $\alpha$ -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**20**), (53 mg, %5)

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

Erime noktası: 224-225 °C, lit., 229-230°C (Balant ve Ehrenstein, 1952).

IR ( $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ ): 3500, 1735 ve 1655.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0,93 (3H, s, 18-H); 1,22 (3H, s, 19-H); 4,37 (1H, m, 6 $\beta$ -H); 6,19 (1H, d,  $J = 1,8$  Hz, 4-H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 220,14 (C-17); 199,48 (C-3); 171,10 (C-5); 119,96 (C-4); 68,19 (C-6); 53,69 (C-9); 50,50 (C-14); 47,51 (C-13); 39,89 (C-7); 39,00 (C-10); 36,19 (C-1); 35,67 (C-16); 33,68 (C-2); 31,07 (C-12); 29,64 (C-8); 21,70 (C-15); 20,25 (C-11); 18,20 (C-19); 13,65 (C-18).

7 $\alpha$ -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**21**), (63 mg, %6)

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

Erime noktası: 232-233°C, lit., 227-230°C (Holland ve Thomas, 1982).

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

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0,91 (3H, s, 18-H); 1,22 (3H, s, 19-H); 4,10 (1H, bs, 7 $\beta$ -H); 5,83 (1H, s, 4-H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 220,92 (C-17); 199,33 (C-3); 166,96 (C-5); 126,95 (C-4); 66,93 (C-7); 47,25 (C-13); 45,54 (C-14); 45,22 (C-9); 40,95 (C-8); 39,25 (C-6); 38,48 (C-10); 35,66 (C-16); 35,30 (C-1); 33,82 (C-2); 30,87 (C-12); 21,19 (C-15); 20,07 (C-11); 16,94 (C-19); 13,43 (C-18).

3 $\beta$ ,7 $\beta$ -Dihidroksiandrost-5-en-17-on (**12**), (43 mg, %4)

%80'lik çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde elde edildi ve  $^1\text{H}$  ile  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumlarının aynı substratın daha önce *U. chartarum* MRC 72584 ile inkübasyonundan izole edilen metabolite ait  $^1\text{H}$  ile  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumları ile karşılaştırılması neticesinde yapısı belirlendi.

3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -Dihidroksiandrost-5-en-17-on (**13**), (211 mg, %20)

%80'lik çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde elde edildi ve  $^1\text{H}$  ile  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumlarının aynı substratın daha önce *U. chartarum* MRC 72584 ile inkübasyonundan izole edilen metabolite ait  $^1\text{H}$  ile  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumları ile karşılaştırılması neticesinde yapısı belirlendi.

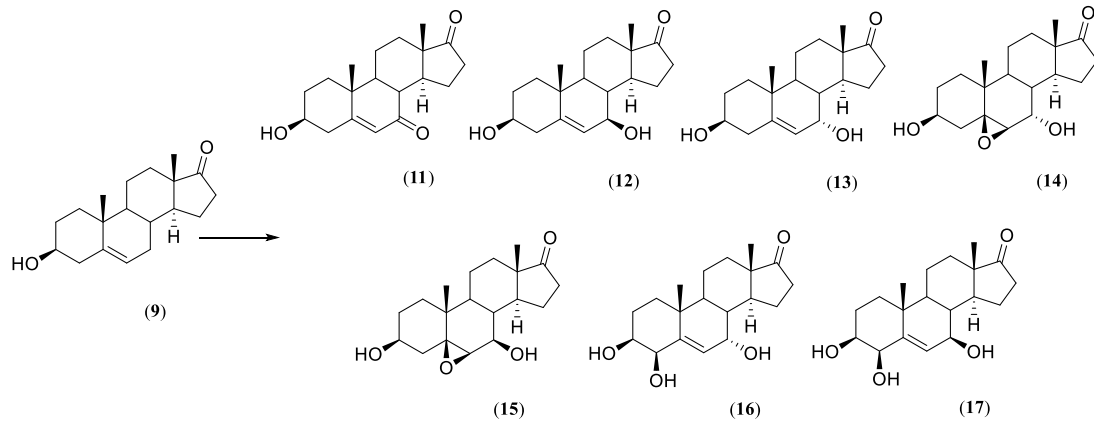
## BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

*U. chartarum* MRC 72584 ve *C. sphaerospermum* MRC 70266 küfleri ile gerçekleştirilen biyotransformasyon çalışmaları sonucunda elde edilen bileşiklerin yapılarını tayin amacıyla, DHEA (**9**) ve söz konusu bileşiklerin erime noktaları,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR ve IR spektrumları karşılaştırıldı.

DHEA (**9**) bileşiğinin *U. chartarum* MRC 72584 ile beş gün inkübasyonu yedi metabolit verdi (Şekil 5.1.). İlk metabolit  $3\beta$ -hidroksiandrost-5-en-7,17-dion (**11**) olarak tanımlandı. Metabolitin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu başlangıç maddesinin  $\delta_{\text{C}}$  31,13 ppm'deki C-7 rezonansını vermezken  $\delta_{\text{C}}$  201,20 ppm'de yeni bir C atomu rezonansı verdi. Metabolitin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumunun C-8 için aşağı alana doğru bir kayma ( $\Delta$  14,38 ppm) verirken C-14 için ise yukarı alana doğru bir kayma ( $\Delta$  7,26 ppm) vermesi C-7'de bir oksidasyon gerçekleşmiş olduğunu gösterdi. Metabolitin NMR değerleri (Tablo 5.1.) literatür değerleriyle uyum gösterdi (Koçek ve ark., 2011).

İkinci metabolit  $3\beta,7\beta$ -dihidroksiandrost-5-en-17-on (**12**) olarak tanımlandı. Metabolit  $^1\text{H}$  NMR spektrumunun  $\delta_{\text{H}}$  3,91 ppm'de verdiği karakteristik (Koçek ve ark., 2011) rezonans (1H, m) ve aynı spektrumda başlangıç maddesinin 6-H rezonansı için ise yukarı alana doğru bir kayma ( $\Delta$  0,07 ppm) vermesi bir  $7\beta$ -hidroksil grubunun varlığını düşündürdü. Metabolitin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu C-6 ve C-8 için aşağı alana doğru kaymalar (sırası ile  $\Delta$  5,05 ppm ve  $\Delta$  9,04 ppm) gösterirken C-9 ve C-14 için yukarı alana doğru  $\gamma$ -gauche kaymaları (sırası ile  $\Delta$  1,79 ppm ve  $\Delta$  0,34 ppm) gösterdi. Bu kimyasal kayma değerleri bir  $7\beta$ -hidroksil grubunun varlığını daha da pekiştirdi. Metabolitin NMR değerleri literatür değerleriyle oldukça benzerlik gösterdi (Koçek ve ark., 2011).

Üçüncü metabolit  $3\beta,7\alpha$ -dihidroksiandrost-5-en-17-on (**13**) olarak tanımlandı. Metabolite ait  $^1\text{H}$  NMR spektrumunun  $\delta_{\text{H}}$  3,94 ppm'deki karakteristik (Kolek ve ark., 2011) rezonansı (1H, bs) ve aynı spektrumda başlangıç maddesi 6-H rezonansının aşağı alana doğru bir kayma ( $\Delta$  0,25 ppm) göstermesi bir  $7\alpha$ -hidroksil grubunun varlığına işaret etti. Metabolit  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumunun C-6 ve C-8 için aşağı alana doğru kaymalar (sırası ile  $\Delta$  3,02 ppm ve  $\Delta$  6,23 ppm) gösterirken C-9 ve C-14 için yukarı alana doğru  $\gamma$ -gauche kaymaları (sırası ile  $\Delta$  1,79 ppm ve  $\Delta$  8,08 ppm) göstermesi bir  $7\alpha$ -hidroksil grubunun varlığını daha da netleştirdi. Metabolitin NMR değerleri literatür değerleriyle uyum gösterdi (Kolek ve ark., 2011).



Şekil 5.1. Substratın *U. chartarum* ile biyotransformasyonu.

Dördüncü metabolit  $3\beta,7\alpha$ -dihidroksi-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoksiandrostan-17-on (**14**) olarak tanımlandı. Metabolit  $^1\text{H}$  NMR spektrumunun başlangıç maddesinin  $\delta_{\text{H}}$  5,35 ppm'deki 6-H rezonansını (1H, d,  $J = 5$  Hz) vermeyip  $\delta_{\text{H}}$  3,12 ppm'de yeni bir rezonans (1H, d,  $J = 3,2$  Hz) vermesi bir epoksidin varlığını düşündürdü. Metabolitin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumundaki  $\delta_{\text{C}}$  63,72 ppm (C-5) ve  $\delta_{\text{C}}$  64,62 ppm'deki (C-6) karakteristik oksijen bağlı karbon atom rezonansları ile  $\delta_{\text{C}}$  36,58 ppm'de gözlenen karakteristik C-1 rezonansı epoksitletmenin  $\beta$ -yüzünden gerçekleştiğini gösterdi (Poza ve ark., 2008). Metabolitin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu ayrıca sırası ile  $3\beta$ - ve  $7\alpha$ -hidroksil gruplarının varlığını gösteren karakteristik rezonansları  $\delta_{\text{C}}$  68,89 ppm ve  $\delta_{\text{C}}$  65,95 ppm'de verdi (Poza ve ark., 2008). Metabolitin  $^1\text{H}$  NMR değerleri literatür değerleriyle oldukça benzerlik gösterdi (Holland ve Diakow, 1979).

Beşinci metabolit 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -dihidroksi-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoksiandrostan-17-on (**15**) olarak tanımlandı. Metabolit  $^1\text{H}$  NMR spektrumunun başlangıç maddesinin  $\delta_{\text{H}}$  5,35 ppm'deki 6-H rezonansını (1H, d,  $J = 5$  Hz) vermeyip  $\delta_{\text{H}}$  3,18 ppm'de yeni bir rezonans (1H, bs) vermesi bir epoksidin varlığını akla getirdi. Metabolitin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumunun  $\delta_{\text{C}}$  67,41 ppm (C-5) ve  $\delta_{\text{C}}$  67,56 ppm (C-6) verdiği karakteristik iki yeni oksijen taşıyıcı C atom rezonansları ile  $\delta_{\text{C}}$  36,84 ppm'de gözlenen karakteristik C-1 rezonansı epoksitlemenin  $\beta$ -yüzünden gerçekleştiğini gösterdi (Poza ve ark., 2008). Metabolitin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu ayrıca sırası ile 3 $\beta$ - ve 7 $\beta$ -hidroksil gruplarının varlığını gösteren karakteristik rezonansları  $\delta_{\text{C}}$  68,78 ppm ve  $\delta_{\text{C}}$  74,24 ppm'de verdi (Poza ve ark., 2008). Metabolitin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu 19 karbon rezonansı verirken DEPT spektrumunun iki metil, altı metilen, yedi metin ve dört kuarterner karbon rezonansları vermesi tanımlanan metabolitin yapısını daha da doğruladı. 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -dihidroksi-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoksiandrostan-17-on (**15**) yeni bir metabolit olarak belirlendi.

Tablo 5.1. DHEA (**9**) ve bazı metabolitleri için  $^{13}\text{C}$  NMR değerleri

C atomu	(9)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)
1	36.93	38.32	36.79	36.86	36.58	36.84	36.55	36.18
2	31.19	30.88	31.11	30.96	30.50	30.69	24.77	25.06
3	71.01	70.03	71.07	70.98	68.89	68.78	71.86	72.05
4	41.81	41.74	41.52	42.47	41.44	41.49	76.68	76.13
5	140.92	166.55	143.48	146.35	63.72	67.41	146.97	144.96
6	120.44	125.65	125.49	123.46	64.62	67.56	129.21	131.08
7	31.13	201.20	72.66	64.13	65.95	74.24	64.16	72.62
8	31.19	45.57	40.23	37.42	34.14	37.66	37.05	40.36
9	49.92	49.92	48.13	41.84	41.90	49.73	42.82	48.85
10	36.36	36.17	36.56	37.10	34.28	34.34	37.14	36.55
11	20.07	20.43	20.29	19.97	20.95	21.20	19.42	19.86
12	30.50	30.55	31.33	31.15	30.89	31.12	30.84	31.04
13	47.30	47.78	47.73	47.06	46.96	47.75	47.06	47.70
14	51.44	44.18	51.10	44.83	44.48	50.58	44.76	51.18
15	21.61	24.04	24.11	21.82	20.97	24.95	21.90	24.09
16	35.59	35.54	35.93	35.74	35.45	35.86	35.73	35.95
17	221.32	220.60	221.50	221.38	220.89	221.50	221.33	221.22
18	13.27	13.63	13.51	13.20	13.02	13.50	13.22	13.53
19	19.18	17.31	19.09	18.19	16.99	16.85	19.32	20.63

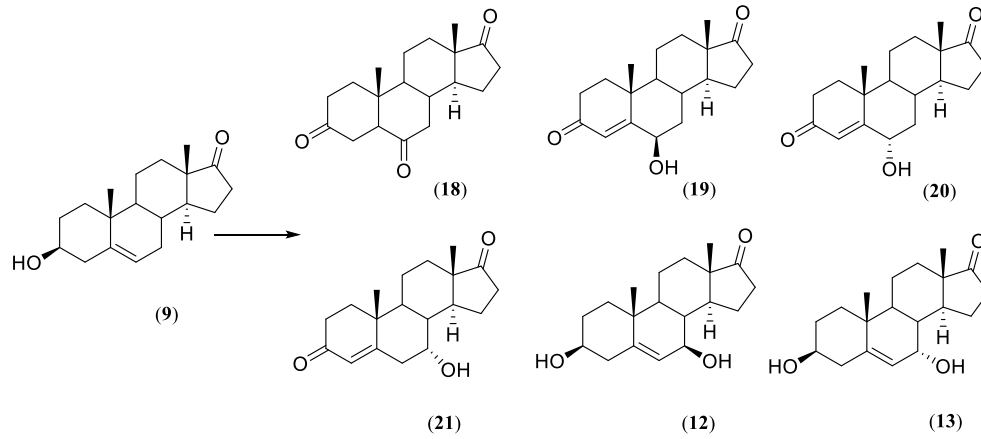
Altıncı metabolit 3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,7 $\alpha$ -trihidroksiandrost-5-en-17-on (**16**) olarak tanımlandı. Metabolitin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu sırası ile 3 $\beta$ - ve 4 $\beta$ -hidroksil gruplarının varlığını gösteren karakteristik rezonansları  $\delta_{\text{C}}$  71,86 ve  $\delta_{\text{C}}$  76,68 ppm'de verdi (Ruddock ve ark., 1998). Metabolitin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu ayrıca bir 7 $\alpha$ -hidroksil grubunun varlığını gösteren diğer bir karakteristik rezonansı ise  $\delta_{\text{C}}$  64,16 ppm'de verdi (Kolek ve ark., 2011). Metabolitin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumunun C-8 için aşağı alana doğru bir kayma ( $\Delta$  5,86 ppm) gösterirken C-9 için ise yukarı alana doğru bir kayma ( $\Delta$  7,10 ppm) göstermesi 7 $\alpha$ -hidroksil grubunun varlığını daha fazla doğruladı. Metabolitin DEPT spektrumunun iki metil, altı metilen, yedi metin ve dört kuarterner karbon rezonansları vermesi tanımlanan triolün yapısını daha da netleştirdi. 3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,7 $\alpha$ -Trijidroksiandrost-5-en-17-on (**16**) bileşiği yeni bir metabolit olarak tanımlandı.

Yedinci metabolit 3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,7 $\beta$ -trihidroksiandrost-5-en-17-on (**17**) olarak tanımlandı. Metabolitin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu sırası ile 3 $\beta$ - ve 4 $\beta$ -hidroksil gruplarının varlığını gösteren karakteristik rezonansları  $\delta_{\text{H}}$  3,60 ppm (1H, m) ve  $\delta_{\text{H}}$  4,17 ppm'de (1H, d,  $J = 3,2$  Hz) verdi (Ruddock ve ark., 1998). Metabolitin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu ayrıca bir 7 $\beta$ -hidroksil grubunun varlığını gösteren diğer bir karakteristik rezonansı (1H, d,  $J = 7,9$  Hz) ise  $\delta_{\text{H}}$  3,96 ppm'de verdi (Kolek ve ark., 2011). Metabolitin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumunun C-8 için aşağı alana doğru bir kayma ( $\Delta$  9,17 ppm) gösterirken C-9 için ise yukarı alana doğru bir kayma ( $\Delta$  1,07 ppm) göstermesi 7 $\beta$ -hidroksil grubunun varlığını daha fazla doğruladı. Metabolite ait DEPT spektrumunun iki metil, altı metilen, yedi metin ve dört kuarterner karbon rezonansları göstermesi tanımlanan triolün yapısıyla benzerlik gösterdi. 3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,7 $\beta$ -Trijidroksiandrost-5-en-17-on (**17**) bileşiği yeni bir metabolit olarak belirlendi.

DHEA (**9**) bileşiğinin *C. sphaerospermum* MRC 70266 ile 5 gün süren inkübasyonu altı metabolit verdi (Şekil 5.2.). İlk metabolit 5 $\alpha$ -androstan-3,6,17-trion (**18**) olarak tanımlandı. Metabolit NMR spektrumlarında  $\delta_{\text{H}}$  3,46 ppm (1H, tt,  $J = 5$  ve 12 Hz) ve  $\delta_{\text{C}}$  71,01 ppm'deki rezonansların gözlenmemesi başlangıç maddesinin 3 $\beta$ -hidroksil grubunun bir karbonil grubuna yükseltgendiğini gösterdi. Metabolit  $^1\text{H}$  NMR spektrumunun başlangıç maddesinin  $\delta_{\text{H}}$  5,35 ppm'deki 6-H rezonansını (1H, d,  $J = 5$



Hz) göstermemesi B halkasındaki çift bağı hidrojenasyona uğramış olduğunu düşündürdü. Bu değişim metabolit  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumunun başlangıç maddesinin  $\delta_{\text{C}}$  120,44 ppm ve 140,92 ppm'deki çift bağ rezonanslarını içermemesi ile doğrulandı. Metabolitin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu değerlerinin literatürdeki çalışmalar ile karşılaştırılması sonucunda başlangıç maddesindeki çift bağı  $\alpha$ -yüzünden indirgenliğini gösterdi (Al-Awadi ve ark., 2005). Metabolit  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumunun başlangıç maddesinin  $\delta_{\text{C}}$  120,44 ppm'deki C-6 rezonansı yerine  $\delta_{\text{C}}$  208,22 ppm'de yeni bir karbon rezonansı vermesi C-6'daki muhtemel bir hidroksilasyonu takiben bir oksidasyonun gerçekleştiğini gösterdi. Metabolitin NMR değerleri (Tablo 5.2.) literatür değerleriyle oldukça uyum gösterdi (Al-Awadi ve ark., 2005).



Şekil 5.2. Substratın *C. sphaerospermum* ile biyotransformasyonu.

İkinci metabolit 6 $\beta$ -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**19**) olarak tanımlandı. Metabolit  $^1\text{H}$  NMR spektrumu başlangıç maddesinin  $\delta_{\text{H}}$  3,46 ppm'deki 3 $\alpha$ -H rezonansını (1H, tt,  $J = 5$  ve 12 Hz) vermedi ve başlangıç maddesinin  $\delta_{\text{H}}$  5,35 ppm'deki çift bağ rezonansı (1H, d,  $J = 5$  Hz) ile  $\delta_{\text{H}}$  1,01 ppm'deki 19-H rezonansı (3H, s) için aşağı alanlara doğru kaymalar (sırası ile  $\Delta$  0,46 ppm ve 0,36 ppm) gösterdi. Bu sonuçlar başlangıç maddesinin 5-en-3 $\beta$ -hidroksi kısmının 4-en-3-ketoya çevirildiğini gösterdi. Metabolitin NMR spektrumları  $\delta_{\text{H}}$  4,36 ppm (1H, bs) ve  $\delta_{\text{C}}$  72,40 ppm'de bir 6 $\beta$ -hidroksil grubu için karakteristik olan iki yeni rezonans verdi (Hanson ve ark., 1996). Metabolitin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumunun C-7 için aşağı alana doğru bir kayma ( $\Delta$  14,04 ppm) gösterirken C-8 için ise yukarı alana doğru bir kayma ( $\Delta$  1,90 ppm) göstermesi

bir 6 $\beta$ -hidroksil grubu varlığını daha da doğruladı. Metabolitin NMR değerleri literatür değerleriyle oldukça benzerlik gösterdi (Hanson ve ark., 1996).

Üçüncü metabolit 6 $\alpha$ -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**20**) olarak tanımlandı. Metabolit <sup>1</sup>H NMR spektrumunun başlangıç maddesinin  $\delta_H$  3,46 ppm'deki 3 $\alpha$ -H rezonansını (1H, tt,  $J = 5$  ve 12 Hz) vermeyip başlangıç maddesinin  $\delta_H$  5,35 ppm'deki çift bağ rezonansı (1H, d,  $J = 5$  Hz) ile  $\delta_H$  1,01 ppm'deki 19-H rezonansı (3H, s) için aşağı alanlara doğru kaymalar (sırası ile  $\Delta$  0,84 ppm ve 0,21 ppm) göstermesi DHEA (**9**) bünyesindeki 5-en-3 $\beta$ -hidroksi kısmının 4-en-3-ketoya dönüştürüldüğünü gösterdi. Metabolitin NMR spektrumları  $\delta_H$  4,37 ppm (1H, m) ve  $\delta_C$  68,19 ppm'de bir 6 $\alpha$ -hidroksil grubu için karakteristik olan iki yeni rezonans verdi (Kollerov ve ark., 2008). Metabolit <sup>13</sup>C NMR spektrumunun C-7 için aşağı alana doğru bir kayma ( $\Delta$  8,76 ppm) verirken C-8 için ise yukarı alana doğru bir kayma ( $\Delta$  1,55 ppm) vermesi bir 6 $\alpha$ -hidroksil grubu varlığını daha da netleştirdi. Metabolitin NMR değerleri literatür değerleriyle uyum gösterdi (Kollerov ve ark., 2008).

Tablo 5.2. DHEA (**9**) ve diğer bazı metabolitleri için <sup>13</sup>C NMR değerleri

C atomu	(9)	(18)	(19)	(20)	(21)
1	36.93	37.35	36.89	36.19	35.30
2	31.19	36.82	34.03	33.68	33.82
3	71.01	210.90	200.58	199.48	199.33
4	41.81	41.10	126.20	119.96	126.95
5	140.92	57.39	168.35	171.10	166.96
6	120.44	208.22	72.40	68.19	39.25
7	31.13	45.22	37.11	39.89	66.93
8	31.19	37.21	29.29	29.64	40.95
9	49.92	53.32	53.50	53.69	45.22
10	36.36	37.86	37.96	39.00	38.48
11	20.07	20.84	20.14	20.25	20.07
12	30.50	30.95	31.12	31.07	30.87
13	47.30	48.01	47.56	47.51	47.25
14	51.44	51.38	50.75	50.50	45.54
15	21.61	21.56	21.59	21.70	21.19
16	35.59	35.54	35.69	35.67	35.66
17	221.32	219.65	220.81	220.14	220.92
18	13.27	13.72	13.67	13.65	13.43
19	19.18	12.53	19.40	18.20	16.94

Dördüncü metabolit  $7\alpha$ -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**21**) olarak tanımlandı. Başlangıç maddesinin  $\delta_H$  3,46 ppm'deki  $3\alpha$ -H rezonansını (1H, tt,  $J = 5$  ve 12 Hz) vermeyen metabolit  $^1H$  NMR spektrumu başlangıç maddesinin  $\delta_H$  5,35 ppm'deki çift bağ rezonansı (1H, d,  $J = 5$  Hz) ile  $\delta_H$  1,01 ppm'deki 19-H rezonansı (3H, s) için ise aşağı alanlara doğru kaymalar (sırası ile  $\Delta$  0,47 ppm ve 0,21 ppm) verdi. Bu sonuçlar başlangıç maddesi olan DHEA (**9**) bünyesindeki 5-en- $3\beta$ -hidroksi kısmının 4-en-3-ketoya çevirildiğini kanıtladı. Metabolitin NMR spektrumları  $\delta_H$  4,10 ppm (1H, bs) ve  $\delta_C$  66,93 ppm'de bir  $7\alpha$ -hidroksil grubu için karakteristik olan iki yeni rezonans verdi (Holland ve Thomas, 1982). Metabolit  $^{13}C$  NMR spektrumunun C-8 için aşağı alana doğru bir kayma ( $\Delta$  9,76 ppm) gösterirken C-9 için ise yukarı alana doğru bir kayma ( $\Delta$  4,70 ppm) göstermesi bir  $7\alpha$ -hidroksil grubu varlığını daha da doğruladı. Metabolitin NMR değerleri literatür değerleriyle oldukça benzerlik gösterdi (Holland ve Thomas, 1982).

Beşinci metabolit  $3\beta,7\beta$ -dihidroksiandrost-5-en-17-on (**12**) olarak tanımlandı. Metabolitin yapısı NMR spektrumlarının aynı substratın daha önce *U. chartarum* MRC 72584 ile inkübasyonundan izole edilen metabolite ait NMR spektrumları ile karşılaştırılması neticesinde belirlendi.

Altıncı metabolit  $3\beta,7\alpha$ -dihidroksiandrost-5-en-17-on (**13**) olarak tanımlandı. Metabolitin yapısı NMR spektrumlarının aynı substratın daha önce *U. chartarum* MRC 72584 ile inkübasyonundan izole edilen metabolite ait NMR spektrumları ile karşılaştırılması neticesinde belirlendi.

Tablo 5.3.'den de görülebileceği gibi *U. chartarum* MRC 72584 küfü DHEA (**9**) bileşiğini ağırlıklı olarak C- $7\alpha$  ve C- $7\beta$  pozisyonlarında hidroksilledi. Ayrıca C- $4\beta$  pozisyonlarında da düşük verimli bir hidroksillenme,  $\beta$ -yüzünden düşük verimli bir epoksitleme ve C-7 pozisyonundaki muhtemel hidroksillenmeleri takiben gerçekleşen düşük verimli bir yükseltgenme de gözlemlendi. *U. chartarum* MRC 72584 küfünün DHEA (**9**) bileşiği ile inkübasyonundan elde edilen  $3\beta,7\beta$ -dihidroksi- $5\beta,6\beta$ -epoksiandrostan-17-on (**15**),  $3\beta,4\beta,7\alpha$ -trihidroksiandrost-5-en-17-on (**16**) ve

3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,7 $\beta$ -trihidroksiandrost-5-en-17-on (**17**) metabolitleri yeni bileşikler olarak tanımlandı.

Tablo 5.3. *U. chartarum* MRC 72584 küfü ile metabolit verimleri

Substrat	Metabolit	% Verim
DHEA ( <b>9</b> )		
	3 $\beta$ -Hidroksiandrost-5-en-7,17-dion ( <b>11</b> )	6
	3 $\beta$ ,7 $\beta$ -Dihidroksiandrost-5-en-17-on ( <b>12</b> )	16
	3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -Dihidroksiandrost-5-en-17-on ( <b>13</b> )	12
	3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -Dihidroksi-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoksiandrost-17-on ( <b>14</b> )	2
	3 $\beta$ ,7 $\beta$ -Dihidroksi-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoksiandrost-17-on ( <b>15</b> )	3
	3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,7 $\alpha$ -Trihidroksiandrost-5-en-17-on ( <b>16</b> )	3
	3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,7 $\beta$ -Trihidroksiandrost-5-en-17-on ( <b>17</b> )	4

Tablo 5.4.'den de görülebileceği gibi *C. sphaerospermum* MRC 70266 küfü DHEA (**9**) bileşiğinin önemli bir kısmı üzerinde gösterdiği 3 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaz/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  izomeraz aktivitesini takiben C-6 $\beta$  pozisyonunda yüksek verimli bir hidroksillenme, daha düşük verimli olmak üzere C-6 $\alpha$  ve C-7 $\alpha$  pozisyonlarında hidroksillenmeler ve C-6 pozisyonundaki muhtemel hidroksillenmeleri takibeden bir yükseltgenme de gözlemlendi. *C. sphaerospermum* MRC 70266 DHEA (**9**) bileşiğinin kalan kısmı üzerinde yüksek verimli bir C-7 $\alpha$ -hidroksillenmesi ile düşük verimli bir C-7 $\beta$ -hidroksillenmesi de gösterdi. Ayrıca *C. sphaerospermum* MRC 70266 küfünün DHEA (**9**) bileşiğindeki çift bağı 3 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaz/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  izomeraz aktivitesi sonrasında veya bu aktiviteyi hiç göstermeden  $\alpha$ -yüzünden indirgediği anlaşıldı.

Tablo 5.4. *C. sphaerospermum* MRC 70266 küfü ile metabolit verimleri

Substrat	Metabolit	% Verim
DHEA ( <b>9</b> )		
	5 $\alpha$ -Androstan-3,6,17-trion ( <b>18</b> )	4
	6 $\beta$ -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion ( <b>19</b> )	15
	6 $\alpha$ -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion ( <b>20</b> )	5
	7 $\alpha$ -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion ( <b>21</b> )	6
	3 $\beta$ ,7 $\beta$ -Dihidroksiandrost-5-en-17-on ( <b>12</b> )	4
	3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -Dihidroksiandrost-5-en-17-on ( <b>13</b> )	20

Tablo 5.3. ve Tablo 5.4.'den de görülebileceği gibi *U. chartarum* MRC 72584 ve *C. sphaerospermum* MRC 70266 küfleri DHEA (**9**) bileşiğini farklı şekillerde metabolize etti.

Literatürdeki küfler ile steroid biyotransformasyon çalışmaları incelendiğinde DHEA (9) bileşiği üzerinde C-7 $\alpha$  ve C-7 $\beta$  pozisyonlarında hidroksillenmeler, çift bağın  $\alpha$ -yüzünden hidrojenasyonu, 3 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaz/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  izomeraz aktivitesi ve bu aktiviteyi takiben C-6 $\beta$  ve C-7 $\alpha$  pozisyonlarında hidroksillenmeler ile hidroksillenmelerin peşinden gerçekleşen yükseltgenmeler daha yağın olarak olarak gözlenmişti (Nassiri-Koopaei ve Faramarzi, 2015; Donova ve Egorova, 2012; Bhatti ve Khera, 2012; Fernandes ve ark., 2003; Mahato ve Garai, 1997). Buna rağmen, DHEA (9) bileşiğinin C-4 $\beta$  pozisyonunda hidroksillenmesi (Rahman ve ark., 2000) ve  $\beta$ -yüzünden epoksitlenmesi (Uszycka-Horawa ve ark., 1986) çok daha nadir olarak gözlenmişti. Örneğin, *Metarrhizium velutinum* M6 küfü (Uszycka-Horawa ve ark., 1986) DHEA (9) bileşiğini C-4 $\beta$  pozisyonunda hidroksillerken, *Cephalosporium aphidicola* (Rahman ve ark., 2000) aynı substrat üzerinde  $\beta$ -yüzünden epoksitlenme gerçekleştirmiştir. DHEA (9) bileşiğinin bir küf ile 3 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaz/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  izomeraz aktivitesini takiben C-6 $\alpha$  pozisyonunda hidroksillenmesi ise ilk defa *C. sphaerospermum* MRC 70266 ile gözlendi.

Yukarıda daha önce belirtildiği gibi *U. chartarum* MRC 72584 ve *C. sphaerospermum* MRC 70266 küfleri DHEA (9) bileşiğini oldukça farklı şekillerde metabolize etti. *U. chartarum* MRC 72584 ve *C. sphaerospermum* MRC 70266 küfleri daha önceki çalışmalarda yapıları birbirlerine çok daha benzer olan androstendion (5) ve testosteron bileşiklerini de çok farklı şekillerde metabolize etmişlerdi. *U. chartarum* MRC 72584 androstendion (5) bileşiğini üzerinde C-6 $\beta$ , C-7 $\alpha$ , C-7 $\beta$  ve C-14 $\alpha$  pozisyonlarında hidroksillenmeler, C-6'daki hidroksillenme sonrasında gerçekleşen bir yükseltgenme, bir 5 $\alpha$ -indirgenmesi ve C-17'de bir indirgenme gerçekleştirmişti (Yildirim ve ark., 2020). *U. chartarum* MRC 72584 küfü testosteron (6) bileşiğini ise C-6 $\beta$ , C-7 $\beta$ , C-12 $\beta$  ve C-14 $\alpha$  pozisyonlarında hidroksillerken C-6 $\beta$ 'da gerçekleşen hidroksillenmeyi takip eden bir yükseltgenme, bir 5 $\alpha$ -indirgenmesi ile C-17'de gerçekleşen bir yükseltgenmede gözlenmişti (Yildirim ve ark., 2018). *C. sphaerospermum* MRC 70266 küfü androstendionu (5) ağırlıklı olarak C-6 $\beta$  pozisyonunda hidroksillerken C-15 $\alpha$  pozisyonunda bir diğer hidroksillenme, C-17'de bir indirgenme, B halkasında bir 5 $\alpha$ -indirgenmesi ile C-6

and C-16 pozisyonlarındaki hidroksillenmeleri takiben gerçekleşen yükseltgenmelerde gözlenmişti (Yildirim ve ark., 2020). *C. sphaerospermum* MRC 70266 testosteron (**6**) bileşimini ise C-6 $\beta$ , C-7 $\beta$ , C-12 $\beta$ , C-15 $\alpha$  ve C-16 $\beta$  pozisyonlarında hidroksillerken bir 5 $\alpha$ -indirgenmesi ile bir C-17 oksidasyonu da gerçekleştirmişti (Yildirim ve ark., 2019).

Kısaca, *U. chartarum* MRC 72584 ve *C. sphaerospermum* MRC 70266 küfleri DHEA (**9**) bileşimini farklı şekillerde metabolize etti ve *U. chartarum* MRC 72584 küfünün DHEA (**9**) bileşimi ile inkübasyonu elde edilen metabolitlerden 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -dihidroksi-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoksiandrostan-17-on (**15**), 3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,7 $\alpha$ -trihidroksiandrost-5-en-17-on (**16**) ve 3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,7 $\beta$ -trihidroksiandrost-5-en-17-on (**17**) yeni olarak tanımlandı. *C. sphaerospermum* MRC 70266, *Ulocladium chartarum* MRC 72584 ve diğer küfler ile steroid biyotransformasyonlarına yönelik çalışmalarımız sürmektedir.

## KAYNAKLAR

- Aihara, M., Tanaka, T., Takatori, K. 2001. *Cladosporium* as the Main Fungal Contaminant of Locations in Dwelling Environments. *Biocontrol Sci.*, 6(1), 49-52.
- Al-Awadi, S. Afzal, M. Oommen, S. 2005. Studies on *Bacillus stearothermophilus*: Part IV. Influence of Enhancers on Biotransformation of Testosterone. *Steroids*, 70(4), 327-333.
- Andersen, B., Hollensted, M. 2008. Metabolite Production by Different *Ulocladium* Species. *Int. J. Food Microbiol.*, 126(1-2), 172-179.
- Balant, C.P., Ehrenstein, M. 1952. Investigations on steroids. XX. 6 $\beta$ - and 6 $\alpha$ -Acetoxy- and Hydroxy-Derivatives of Progesterone and Androstenedione, *J. Org. Chem.*, 17, 1587-1596.
- Bensch, K., Braun, U., Groenewald, J. Z., Crous, P. W. 2012. The Genus *Cladosporium*. *Stud. Mycol.*, 72, 1-401.
- Bhatti, H. N., Khera, R. A. 2012. Biological Transformations of Steroidal Compounds: A Review. *Steroids* 77(12), 1267-1290.
- Clayden, J., Greeves, N., Warren, S., Wothers, P. 2001. *Organic Chemistry*. First Edition, Oxford University Press, Oxford, 1413-1414.
- Demain, A. L. 2000. Small Bugs Big Business: The Economic Power of the Microbe. *Biotechnol. Adv.*, 18(6), 499-514.
- Donova, M. V., Egorova, O. V. 2012. Microbial Steroid Transformations: Current State and Prospects. *Appl. Microbiol. Biot.*, 94(6), 1423-1447.
- Faber, K. 2003. *Biotransformations in Organic Chemistry*, Fifth Edition, Springer-Verlag, Berlin, 1-407.
- Fernandes, P., Cruz, A., Angelova, B., Pinheiro, H. M., Cabral, J. M. S. 2003. Microbial Conversion of Steroid Compounds: Recent Developments. *Enzyme Microb. Tech.*, 32(6), 688-705.
- Hanson, J. R. 1995. *An Introduction to Biotransformations in Organic Chemistry*, W. H. Freeman and Company, New York, 1-62.
- Hanson, J. R. 2003. *Natural Products: the Secondary Metabolites*. Roy. Soc. Chem., Cambridge, 1-2.
- Hanson, J. R., Nasir, H., Parvez, A. 1996. The Hydroxylation of Testosterone and Some Relatives by *Cephalosporium aphidicola*. *Phytochemistry*, 42(2), 411-415.

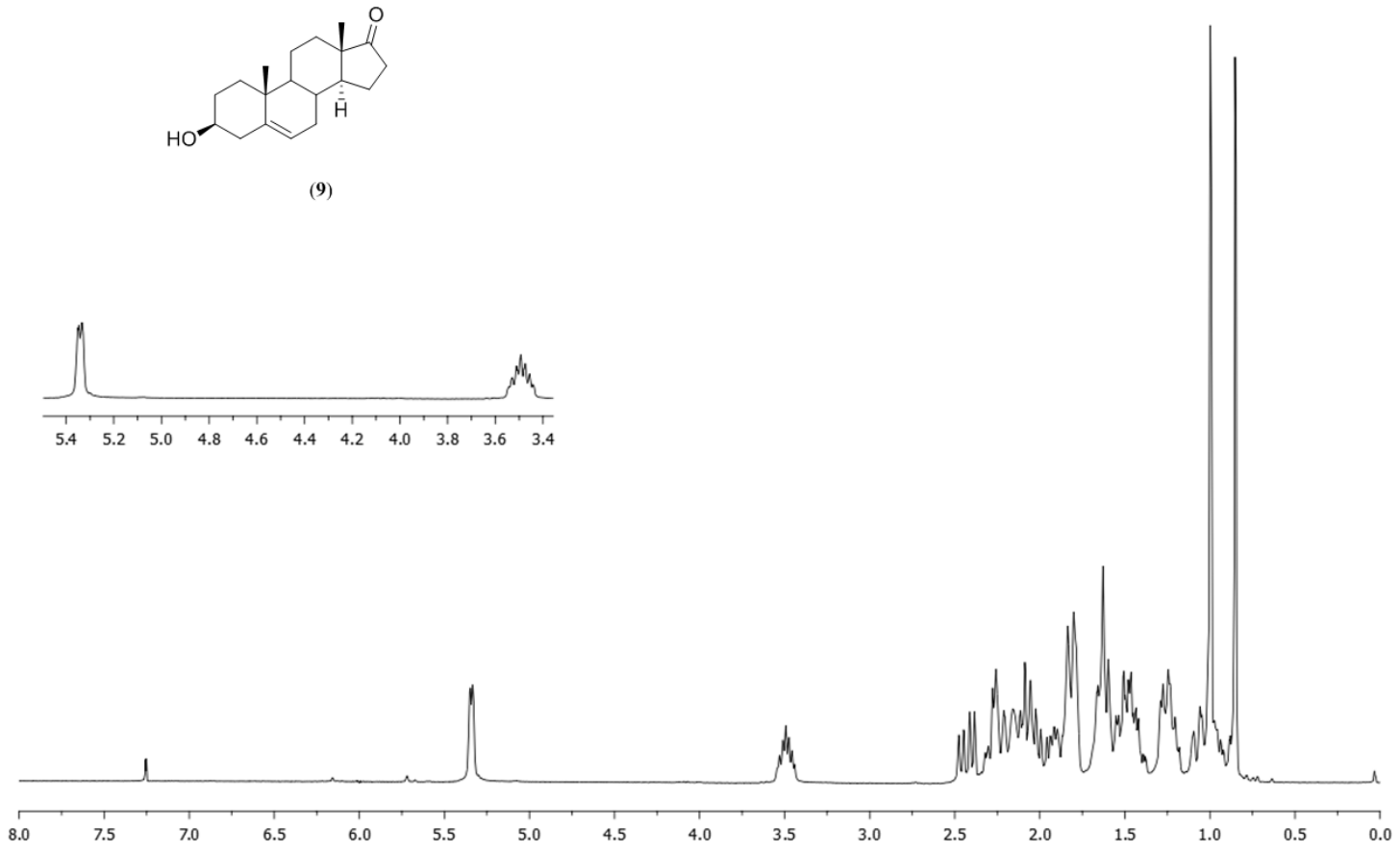
- Holland, H. L., Diakow, P. R. P. 1979. Microbial hydroxylation of steroids. 5. Metabolism of androst-5-ene-3,17-dione and related compounds by *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145, *Can. J. Chem.*, 57(4), 436-440.
- Holland, H. L., Thomas, E. M. 1982. Microbial Hydroxylation of Steroids. 8. Incubation of Cn Halo- and Other Substituted Steroids with Cn Hydroxylating Fungi. *Can. J. Chem.*, 60(2), 160-164.
- Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. İ. 2005. *Biyokimya, Dördüncü Baskı, Aktif Yayınevi, Erzurum*, 185-188.
- Kołek, T., Milecka, N., Świzdor, A., Panek, A., Bialońska, A. 2011. Hydroxylation of DHEA, androstenediol and epiandrosterone by *Mortierella isabellina* AM212. Evidence indicating that both constitutive and inducible hydroxylases catalyze 7 $\alpha$ - as well as 7 $\beta$ -hydroxylations of 5-ene substrates, *Org. Biomol. Chem.*, 9, 5414-5422.
- Kollerov V. V., Shultov A. A., Fokina V. V., Sukhodolskaya G.V., Donova M.V. 2008. Biotransformation of 3-keto-androstanes by *Gongronella butleri* VKM F-1033. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 55, 61-68.
- Mahato, S. B., Garai, S. 1997. *Advances in Microbial Steroid Biotransformation. Steroids*, 62(4), 332-345.
- Mann, J. 1994. *Chemical Aspects of Biosynthesis. First Edition, Oxford University Press, New York*, 2-4.
- Nassiri-Koopaei, N., Faramarzi, M. A. 2015. Recent Developments in the Fungal Transformation of Steroids. *Biocatal. Biotransform.*, 33(1), 1-28.
- Numazawa, M., Mutsumi, A., Ogata, M. 1988. Reactions of enolizable steroidal 4-en-3-ones and 17-ones with hypervalent iodine. *Chem. Pharm. Bull.*, 36, 3381-3386.
- Olech, E., Merrill, J. T. 2005. DHEA supplementation: the claims in perspective, *Cleveland Clin. J. Med.*, 72(11), 965-984.
- Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E. Y. 2002. *İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, Ankara*, 481-659.
- Park, H. G., Managbanag, J. R., Stamenova, E. K., Jong, S. C. 2004. Comparative Analysis of Common Indoor *Cladosporium* Species Based on Molecular Data and Conidial Characters. *Mycotaxon*, 89, 441-451.
- Pereira, P. T., De Carvalho, M. M., Girio, F. M., Roseiro, J. C., Amaral-Collaco, M. T. 2002. Diversity of Microfungi in the Phylloplane of Plants Growing in a Mediterranean Ecosystem. *J. Basic Microbiol.*, 42(6), 396-407.
- Poza, J. J., Jimenez, C., Rodriguez, J. 2008. J-Based Analysis and DFT-NMR Assignments of Natural Complex Molecules: Application to 3 $\beta$ ,7-Dihydroxy-5,6-epoxycholestanes. *Eur. J. Org. Chem.*, 3960-3969.
- Rahman A.U; Choudhary, M. I., Asif, F., Farooq, A., Yaqoob, M. 2000. Fungal Transformations of Steroids by *Cephalosporium aphidicola* and *Trichothecium roseum*, *Nat. Prod. Lett.*, 14(3), 217-224.



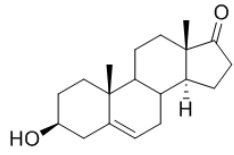
- Ruddock, P. L. D., Williams, D. J., Reese, P. B. 1998. The scope and limitations of the reaction of  $\Delta^5$ -steroids with mercury(II) trifluoroacetate, *Steroids*, 63(12), 650-664.
- Sandoval-Denis, M., Gene, J., Sutton, D. A., Wiederhold, N. P. 2016. New Species of *Cladosporium* associated with Human and Animal Infections. *Persoonia*, 36, 281-298.
- Sandoval-Denis, M., Sutton, D. A., Martin-Vicente, A., Cano-Lira, J. F., Wiederhold, N., Guarro, J., Gene, J. 2015. *Cladosporium* Species Recovered from Clinical Samples in the United States. *J. Clin. Microbiol.*, 53(9), 2990-3000.
- Shebany, Y. M. 2012. Antimicrobial Activity of Endophytic Fungi Isolated From *Avicennia marina* Plant, Red Sea, Egypt. *Egypt J. Microbiol.*, 47, 141-152.
- Uszycka-Horawa, T., Skibinska, M., Smolinska, J., Malinowska, M., Golonkova, J. 1986. Determination of the structure of the product obtained by androstenedione transformation using the *Metarrhizium velutinum* M6 strain. *Acta Pol. Pharm.*, 43 (1), 84-89.
- Yano, S., Koyabashi, K., Kato, K. 2003. Intrabronchial Lesion Due to *Cladosporium sphaerospermum* in a Healthy, Non-asthmatic Woman. *Mycoses*, 46(8), 330-332.
- Yildirim, K., Kuru, A., Yılmaz, Ş. 2018. Biotransformation of Testosterone by *Ulocladium chartarum* MRC 72584. *J. Chem. Res.*, 42, 444-446.
- Yildirim, K., Kuru, A., Küçükbaşol, E. 2020. Microbial transformation of androstenedione by *Cladosporium sphaerospermum* by *Ulocladium chartarum*. *Biocatalysis and Biotransformation*, 38, 7-14.
- Yildirim, K., Kuru, A., Yılmaz, Ş. 2019. Biotransformation of testosterone by *Cladosporium sphaerospermum*. *Biocatalysis and Biotransformation*, 37, 409-413.
- Zalar, P., De Hoog, G. S., Schroers, H. J., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Gunde-Cimemam, N. 2007. Phylogeny and Ecology of the Ubiquitous Saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with Descriptions of Seven New Species from Hypersaline Environments. *Stud. Mycol.*, 58, 157-183.

## EKLER

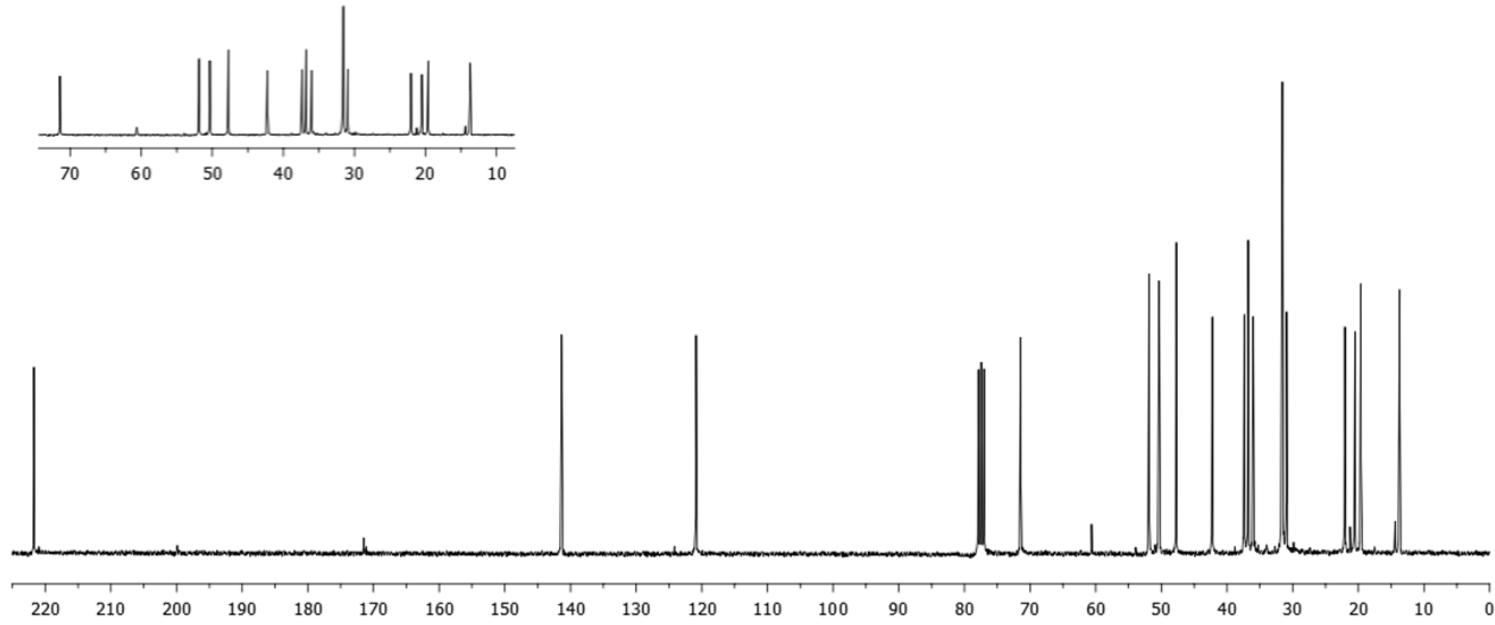
EK 1: Dehidroepiandrosteron (9) için  $^1\text{H}$  NMR spektrumu



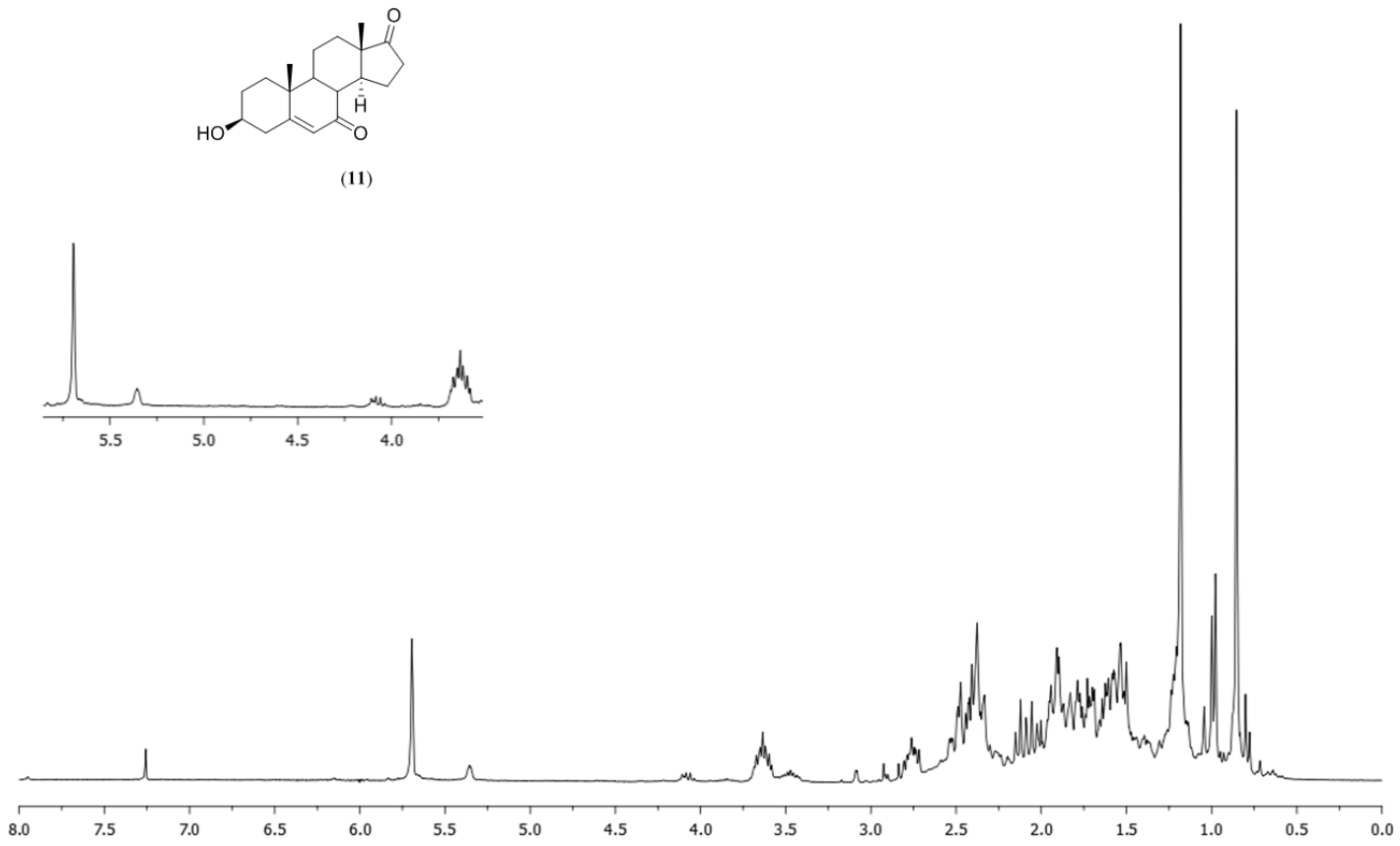
**EK 2:** Dehidroepiandrosteron (9) için  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu



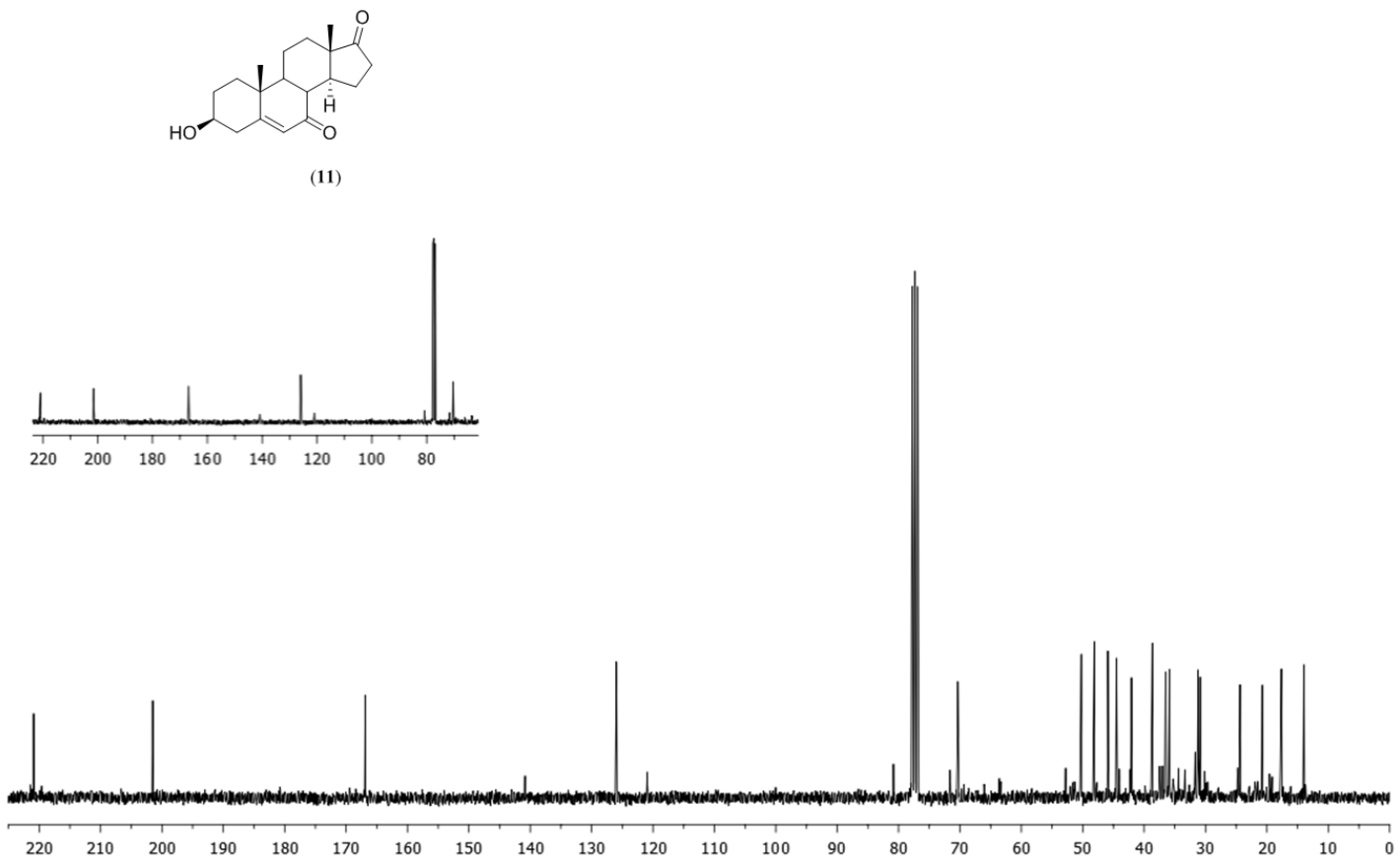
(9)



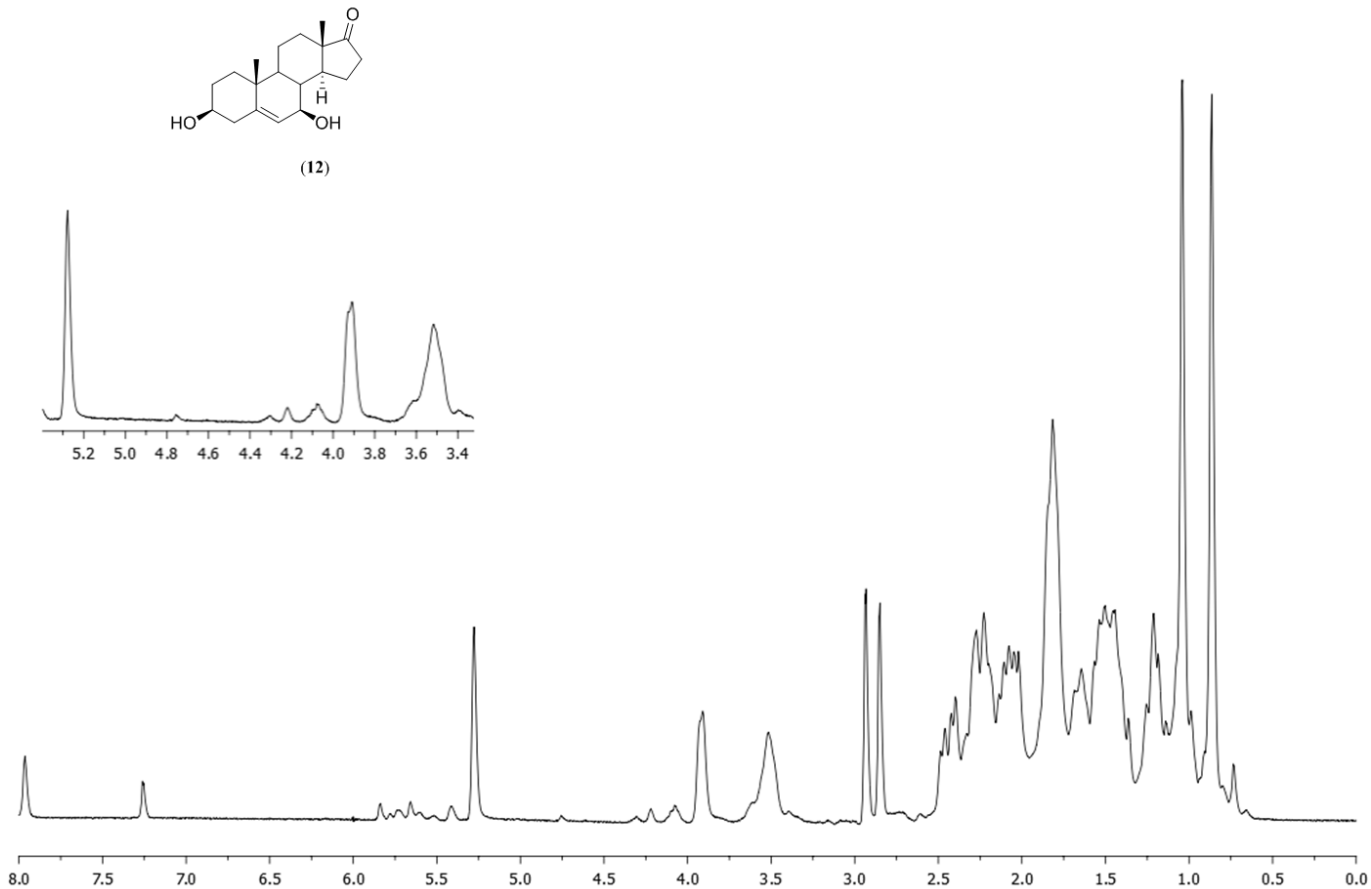
**EK 3.** 3 $\beta$ -Hidroksiandrosta-5-en-7,17-dion (**11**) için  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

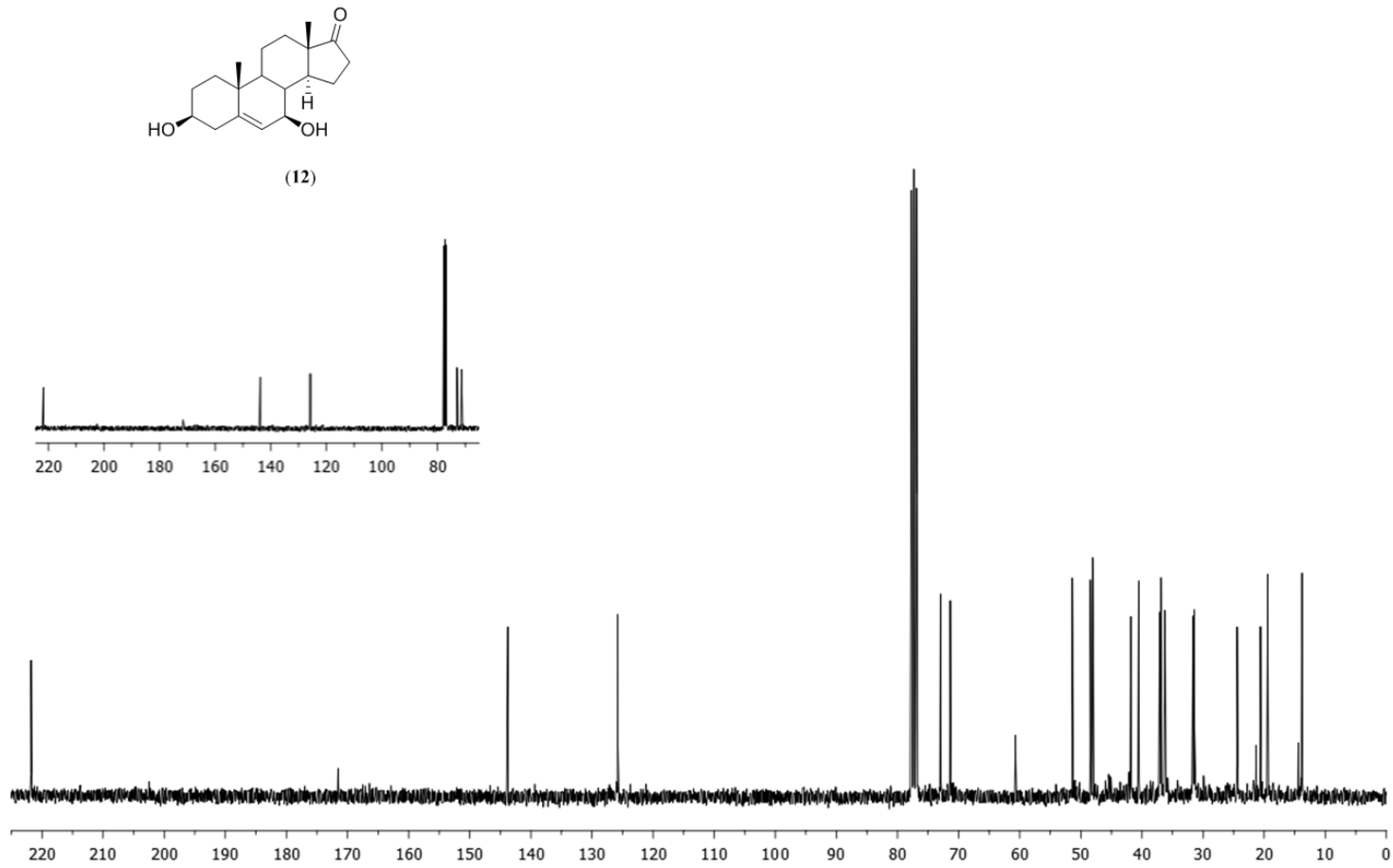


**EK4.** 3 $\beta$ -Hidroksiandroster-5-en-7,17-dion (11) için  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu

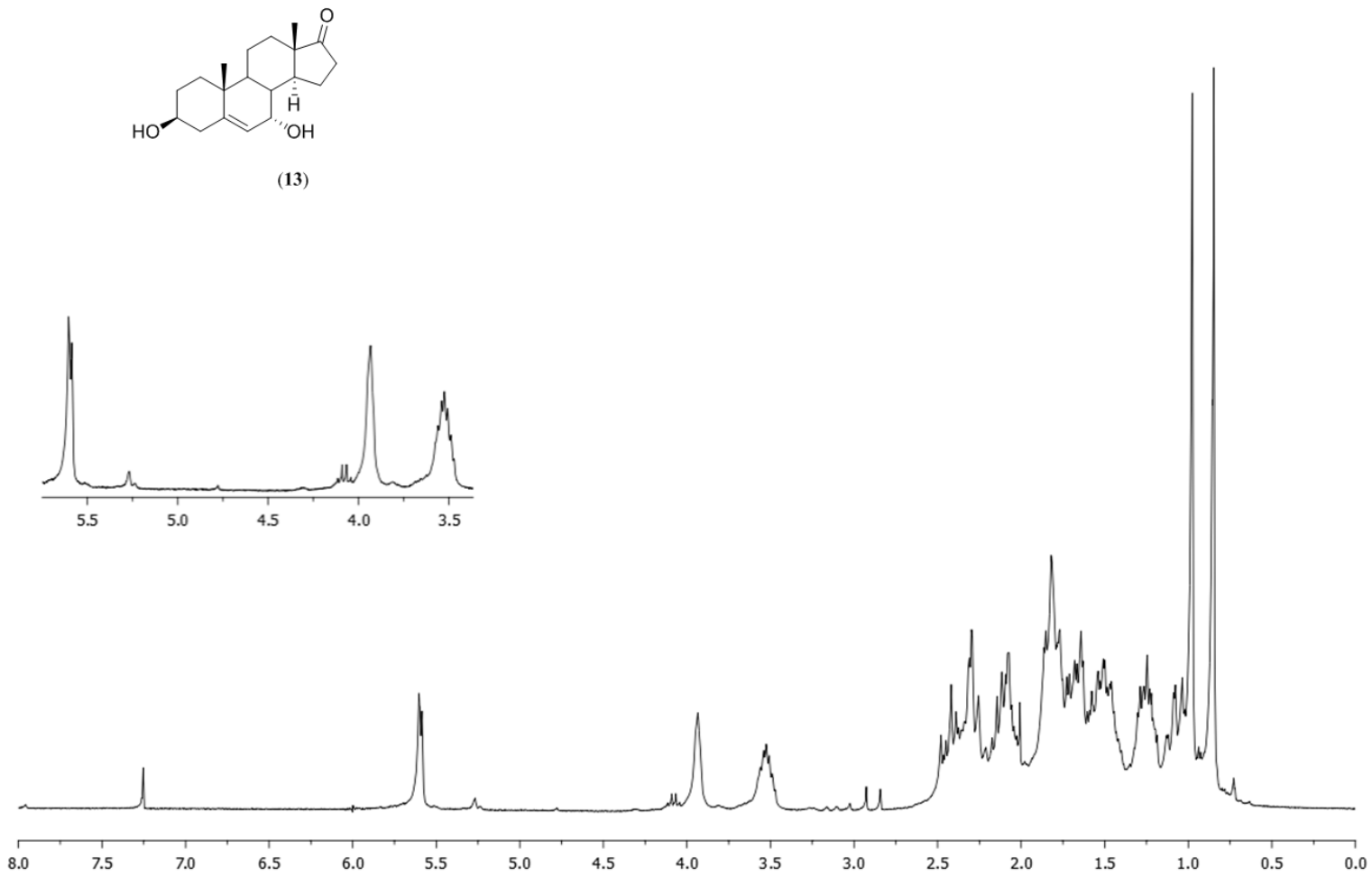


**EK 5:** 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -Dihidroksianandrost-5-en-17-on (**12**) için  $^1\text{H}$  NMR spektrumu



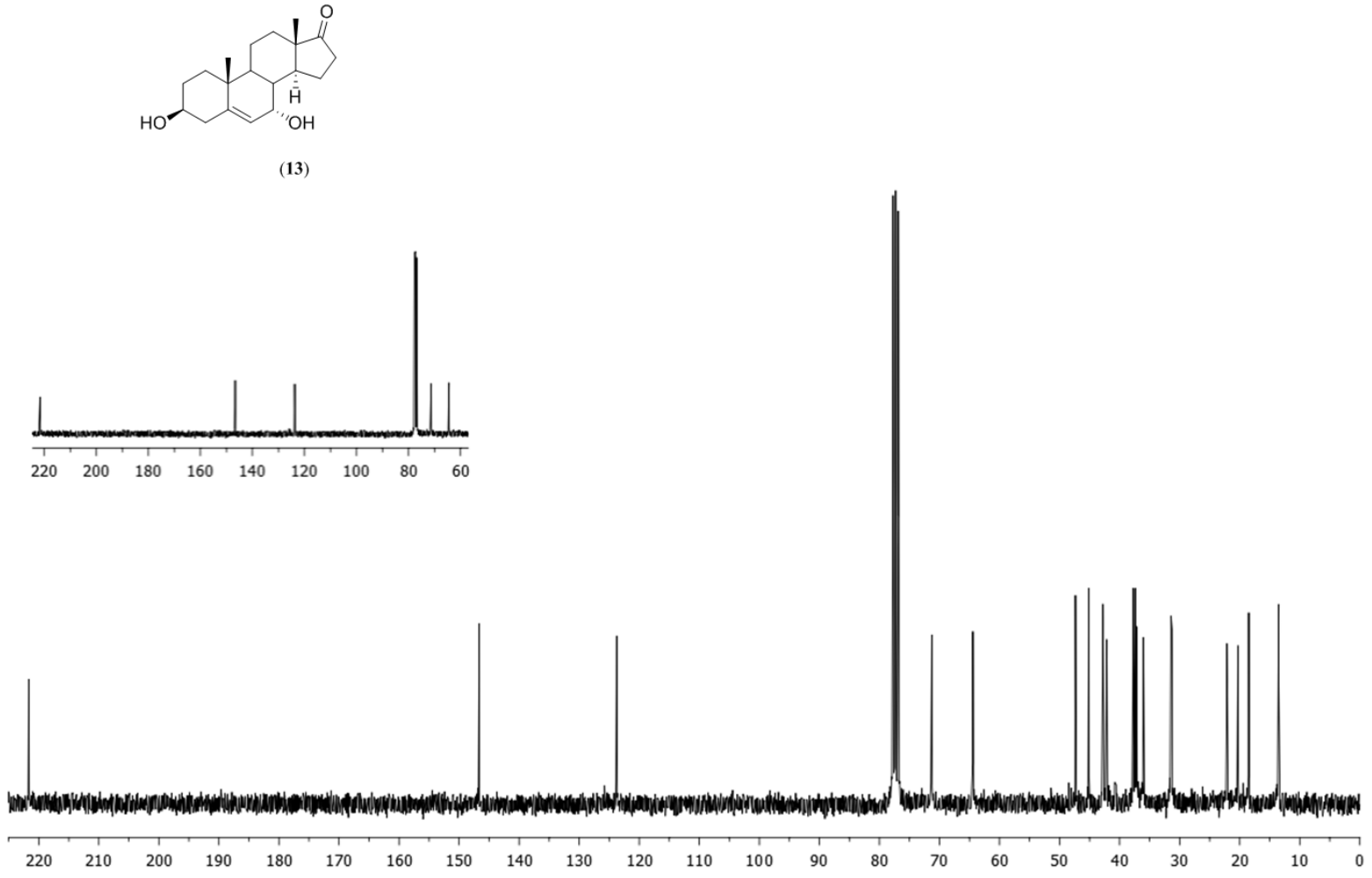


**EK 7 :** 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -Dihidroksian드로st-5-en-17-on (13) için  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

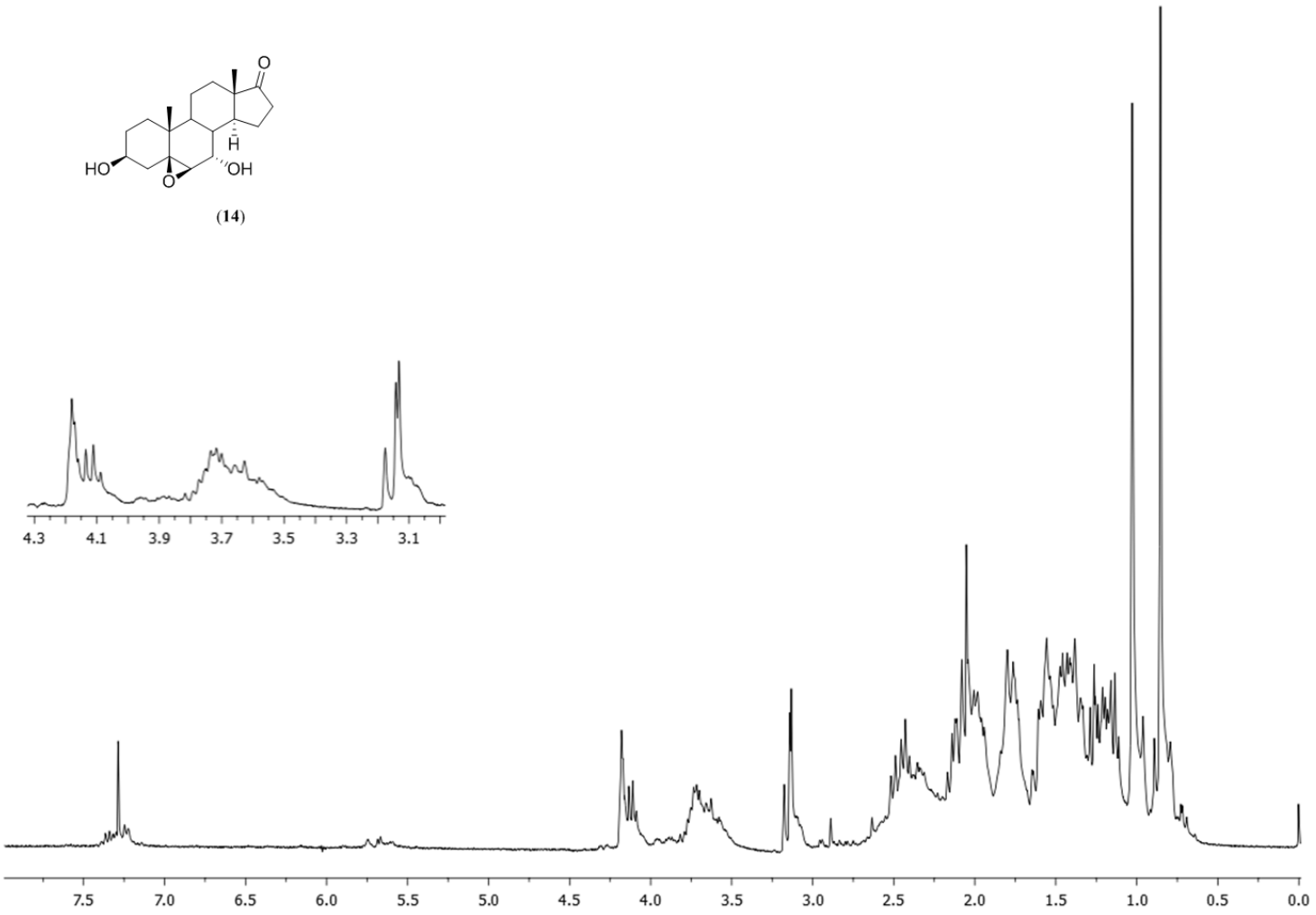




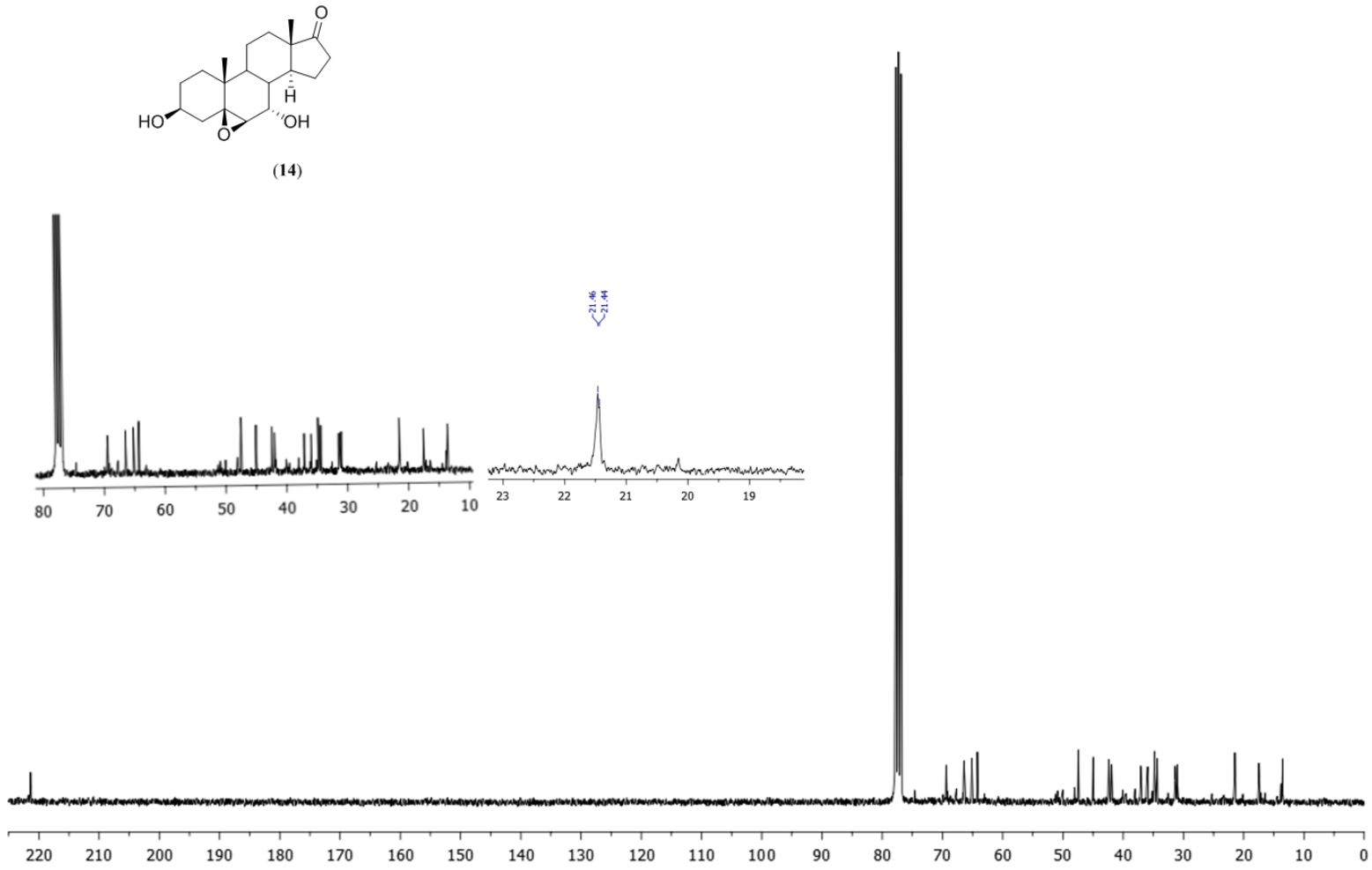
**EK 8:** 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -Dihidroksiandroster-5-en-17-on (**13**) için  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu



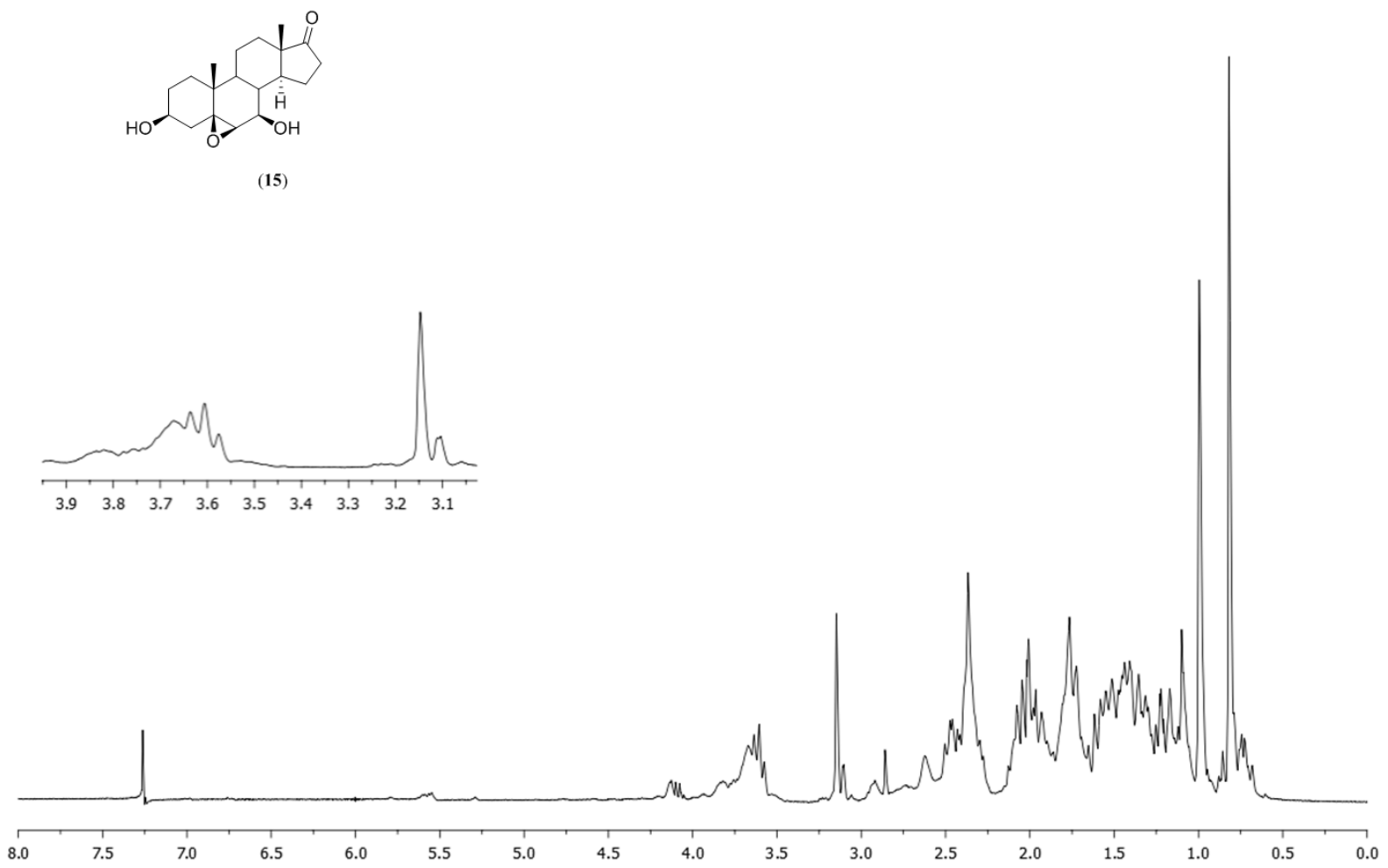
**EK 9:** 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -Dihidroksi-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoksiandrostan-17-on (**14**) için  $^1\text{H}$  NMR spektrumu



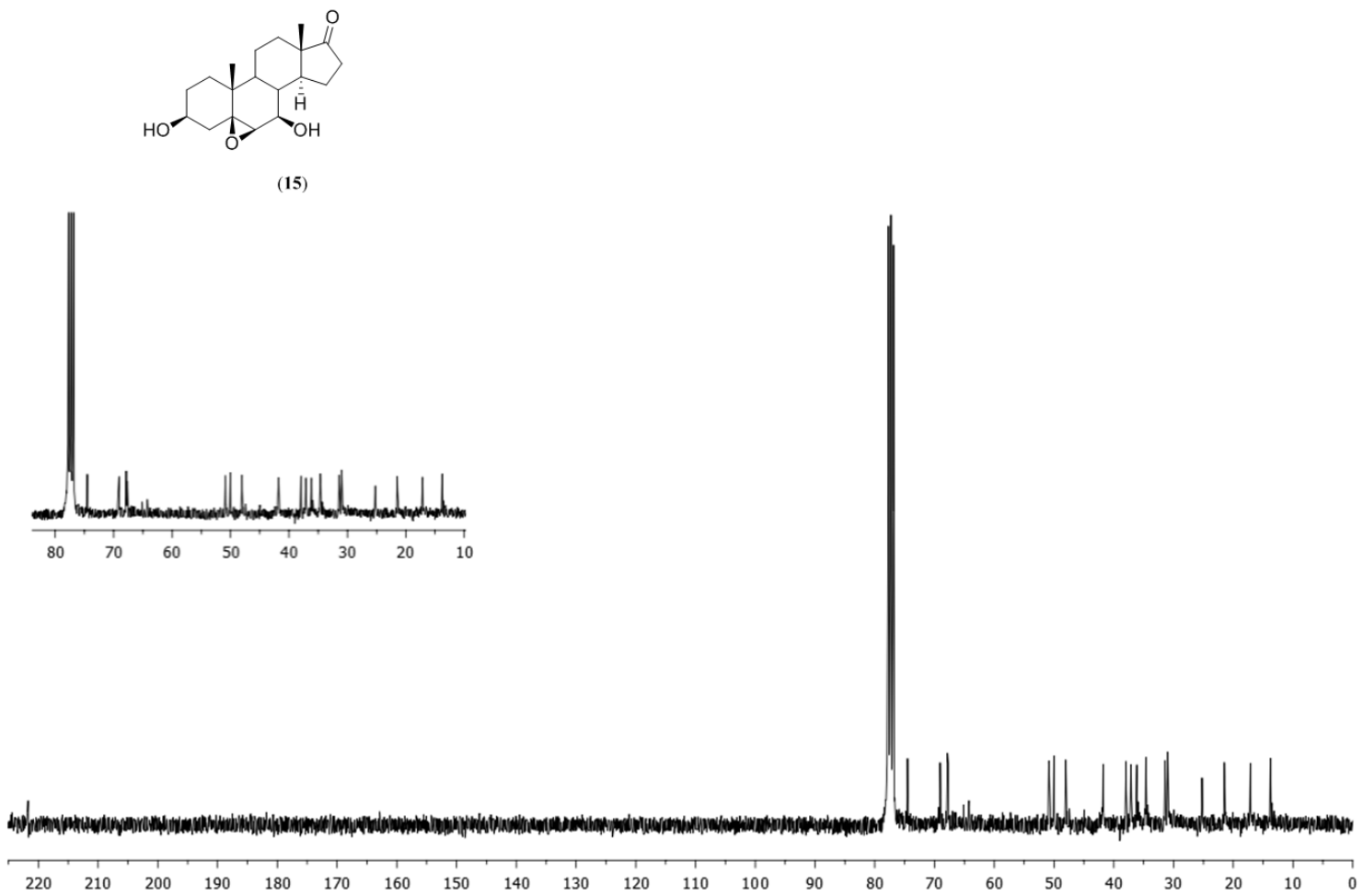
**EK 10:** 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -Dihidroksi-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoksiandrostan-17-on (**14**) için  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu

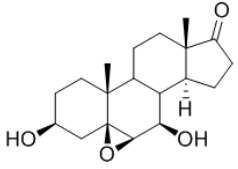


EK 11: 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -dihidroksi-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoksiandrostan-17-on (15) için  $^1\text{H}$  NMR spektrumu



EK 12. 3 $\beta$ , 7 $\beta$ -Dihidroksi-5 $\beta$ , 6 $\beta$ -epoksiandrostan-17-on (15) için  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu





(15)

CH3 carbons



CH2 carbons



CH carbons



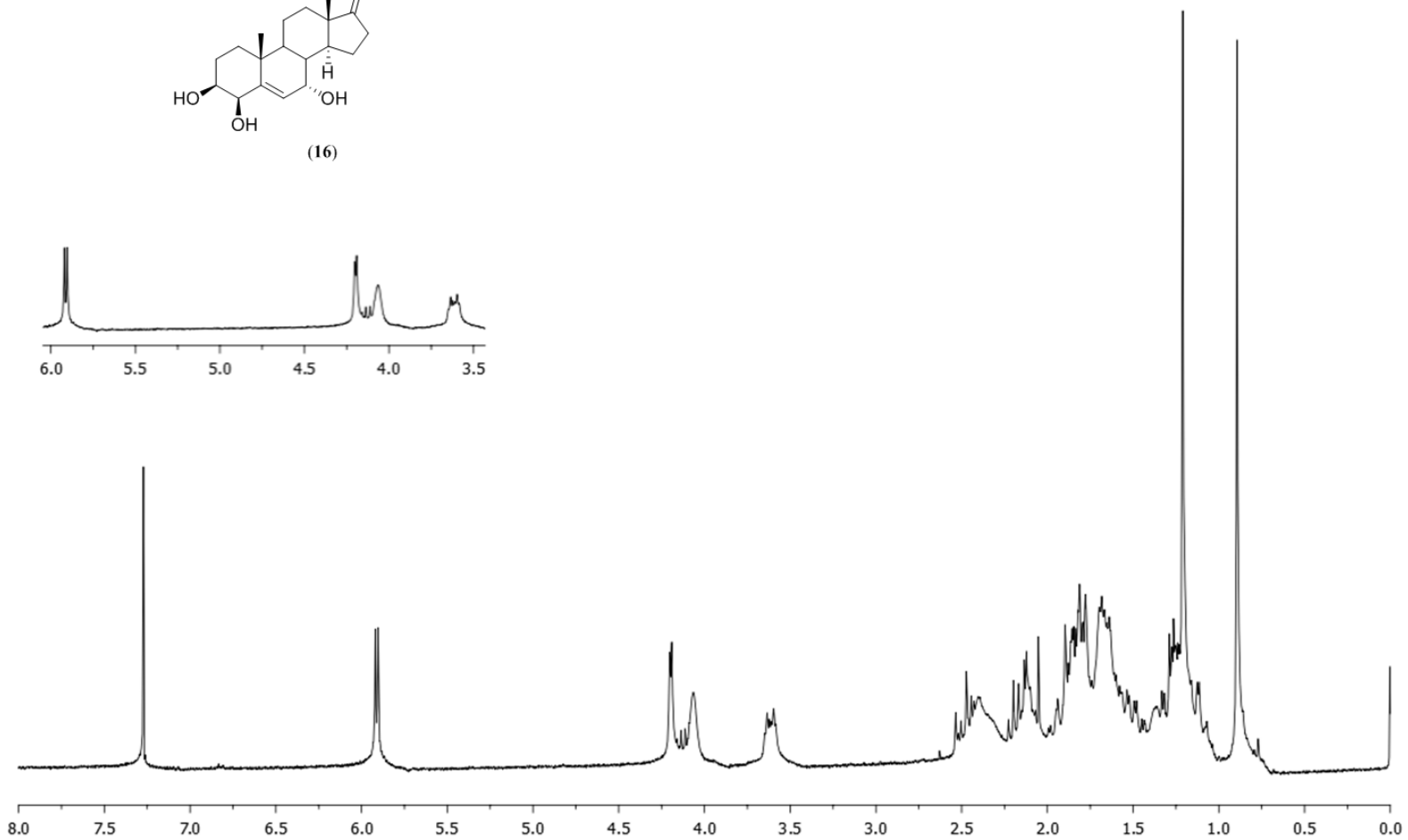
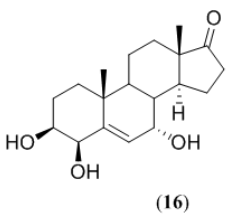
all protonated carbons



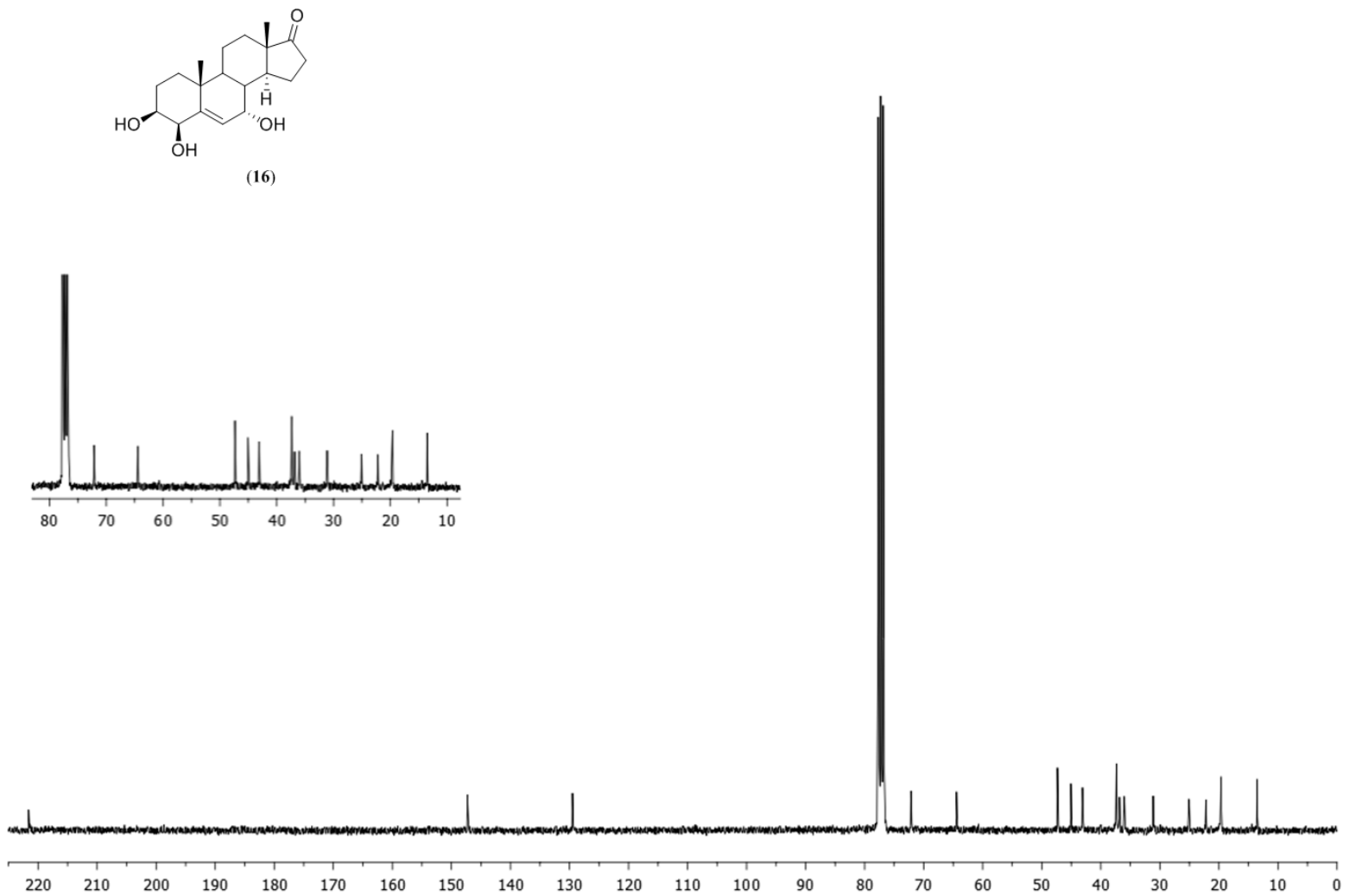
220 200 180 160 140 120 100 80 60 40 20 0 ppm

EK 13: 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -Dihidroksi-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoksiandrostan-17-on (15) için DEPT spektrumu

**EK 14:** 3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,7 $\alpha$ -Trihidroksiaandroster-5-en-17-on (**16**) için  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

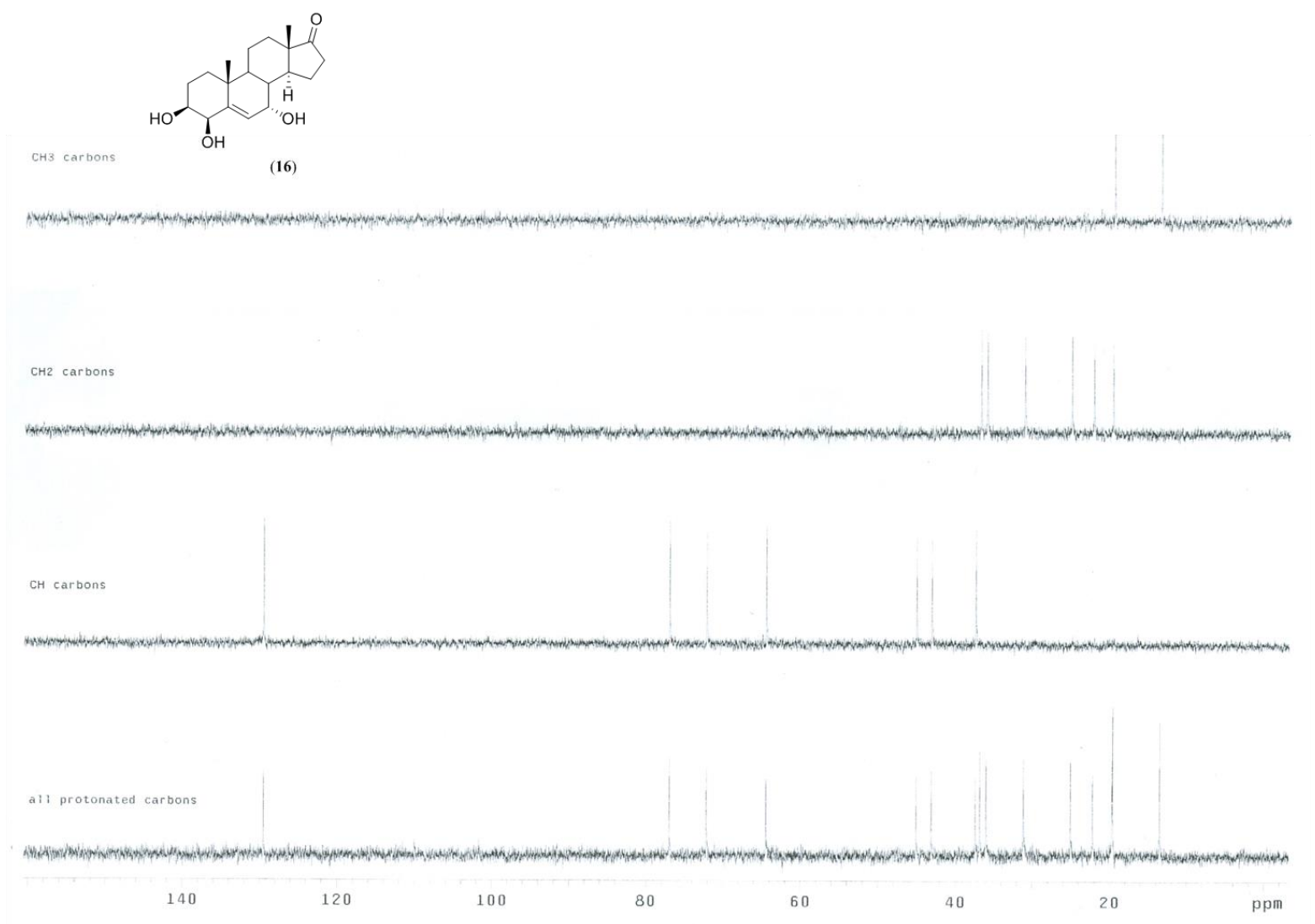


**EK 15:** 3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,7 $\alpha$ -Trihidroksiandroster-5-en-17-on (**16**) için  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu

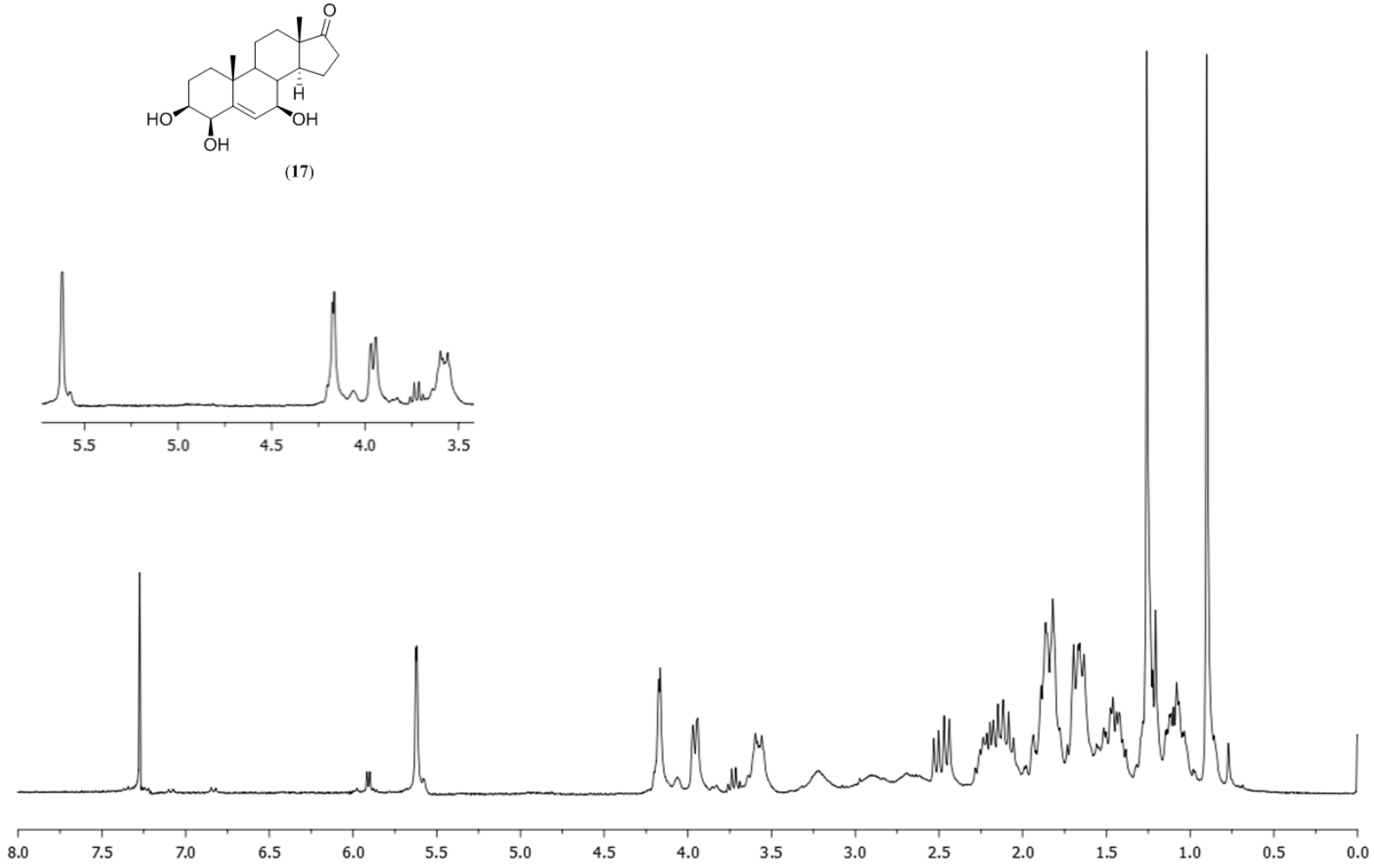




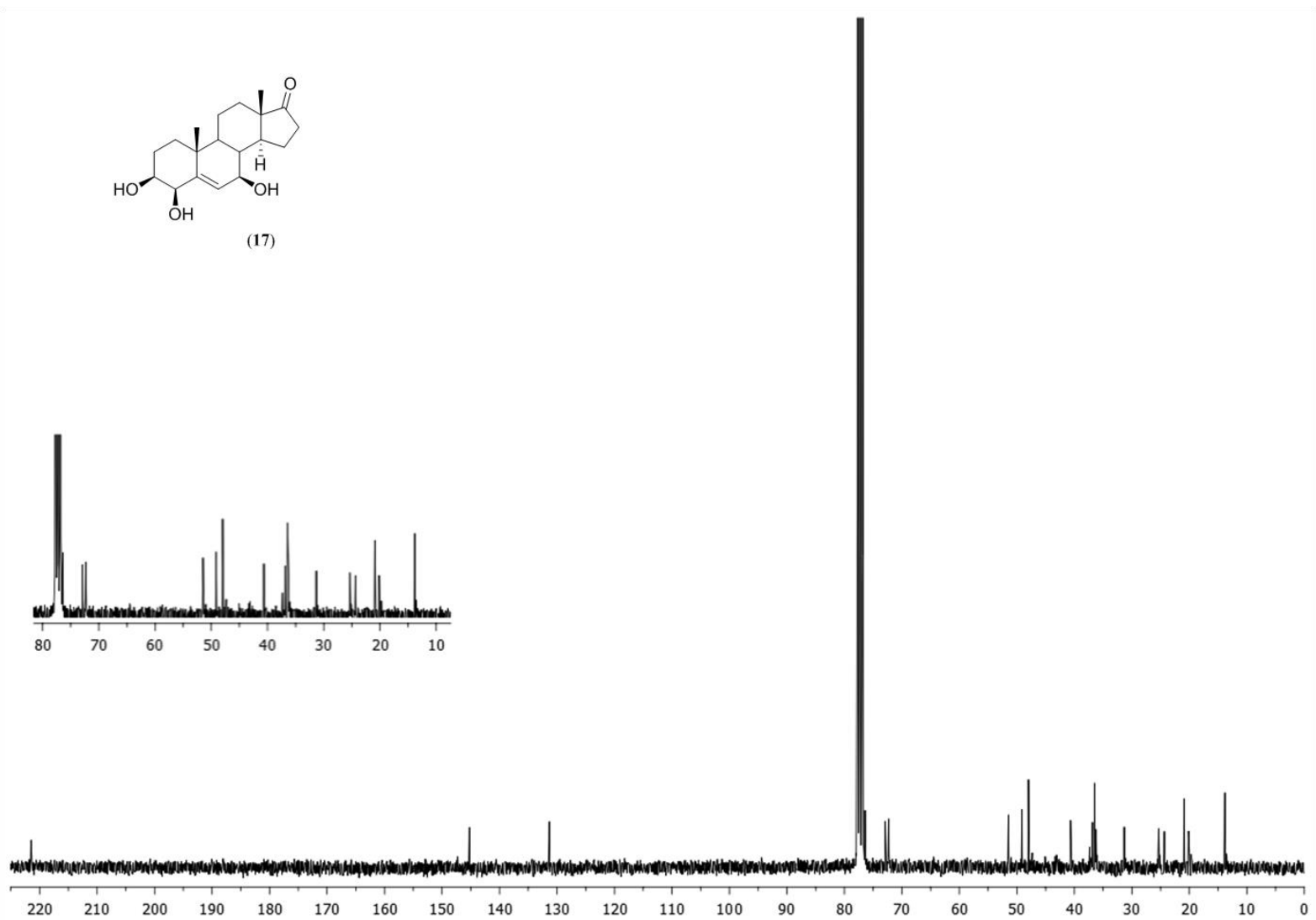
**EK 16:** 3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,7 $\alpha$ -Trihidroksianđrost-5-en-17-on (16) için DEPT spektrumu

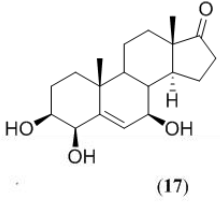


**EK 17:** 3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,7 $\beta$ -Trihidroksiestandrost-5-en-17-on (**17**) için <sup>1</sup>H NMR spektrumu



**EK 18:** 3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,7 $\beta$ -Trihidroksiandroster-5-en-17-on (**17**) için  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu





CH3 carbons



CH2 carbons



CH carbons



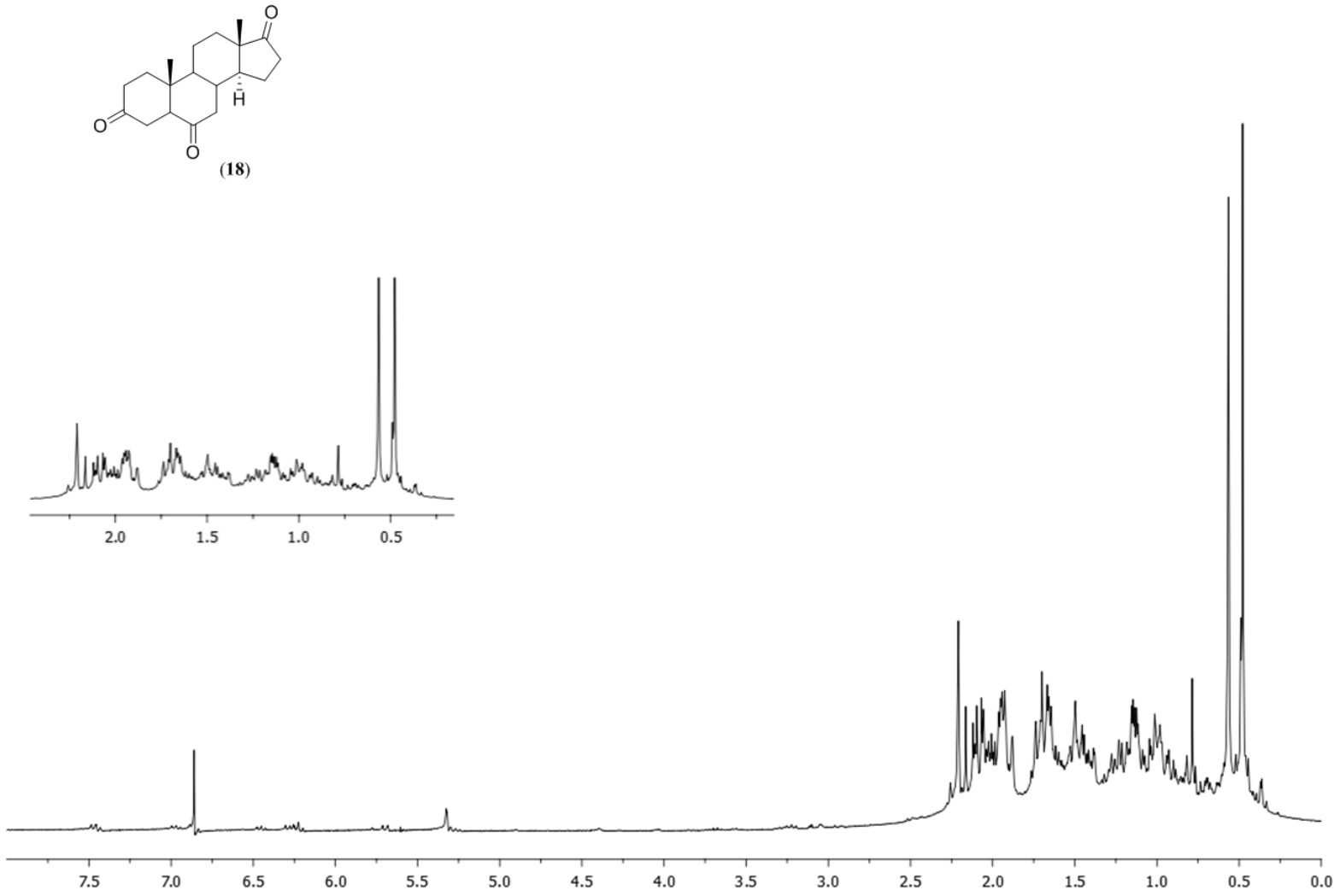
all protonated carbons



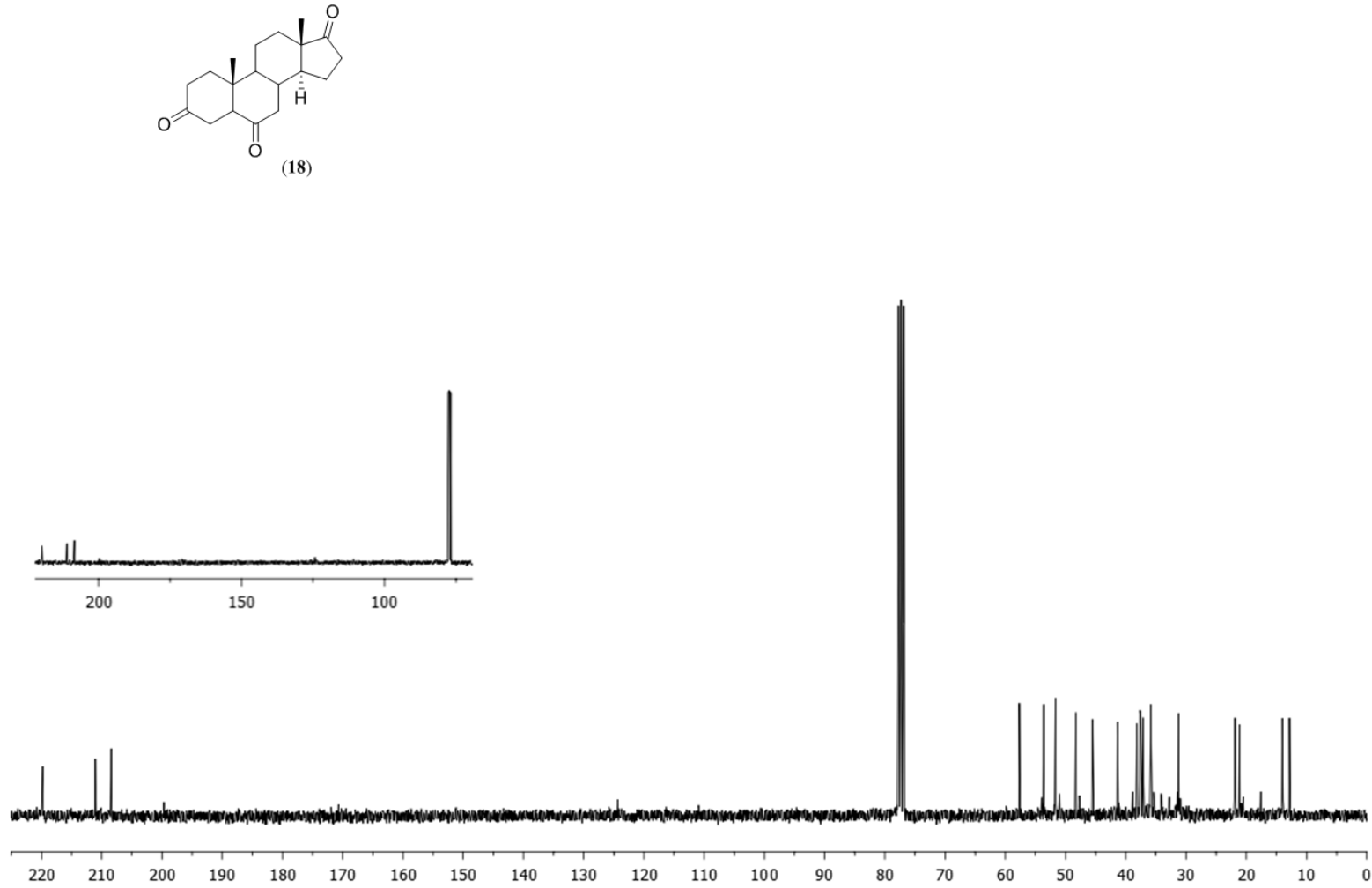
220 200 180 160 140 120 100 80 60 40 20 0 ppm

**EK 19:** 3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,7 $\beta$ -Trihidroksiandrosta-5-en-17-on (17) için DEPT spektrumu

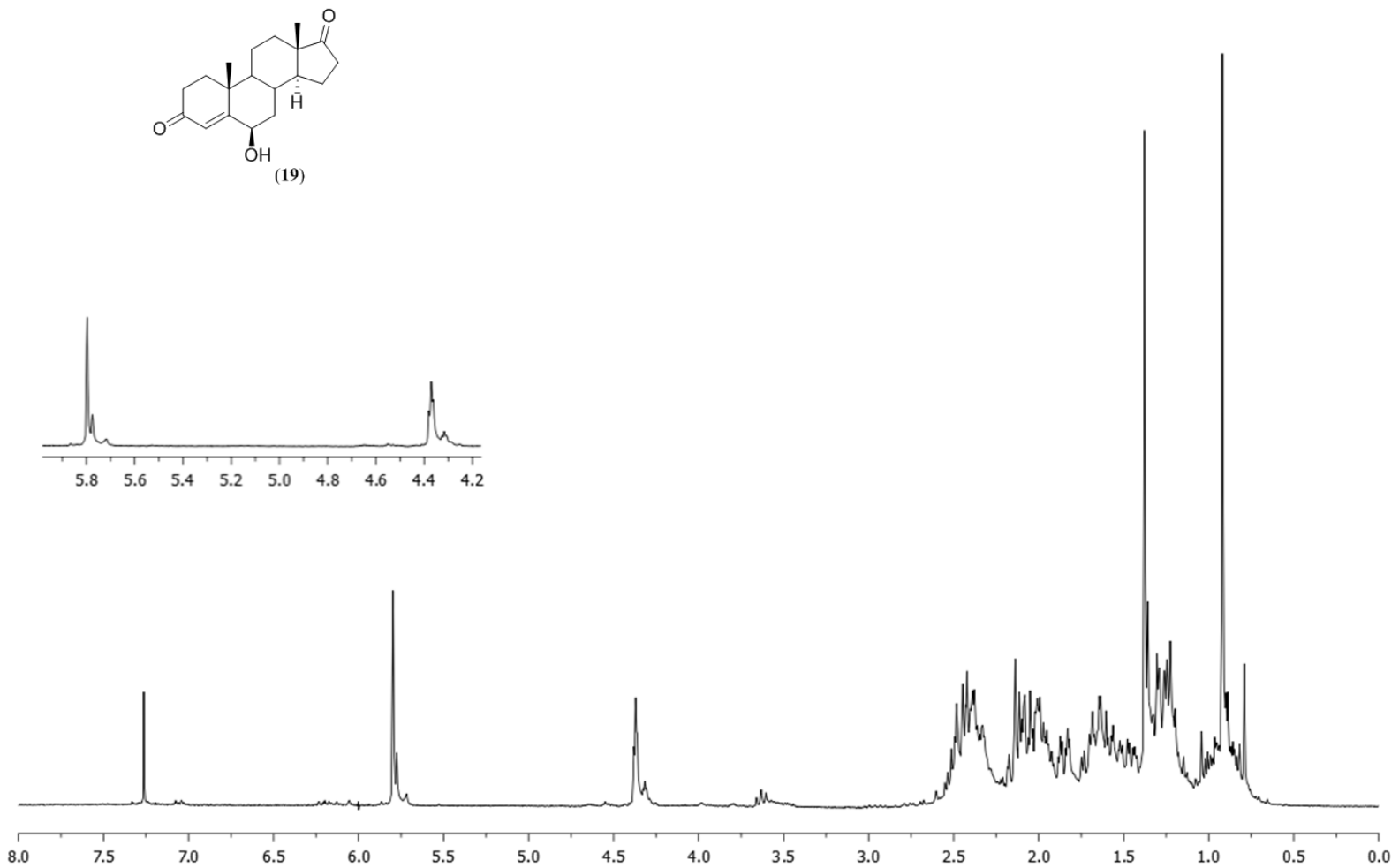
**EK 20:** 5 $\alpha$ -Androstan-3,6,17-trion (**18**) için  $^1\text{H}$  NMR spektrumu



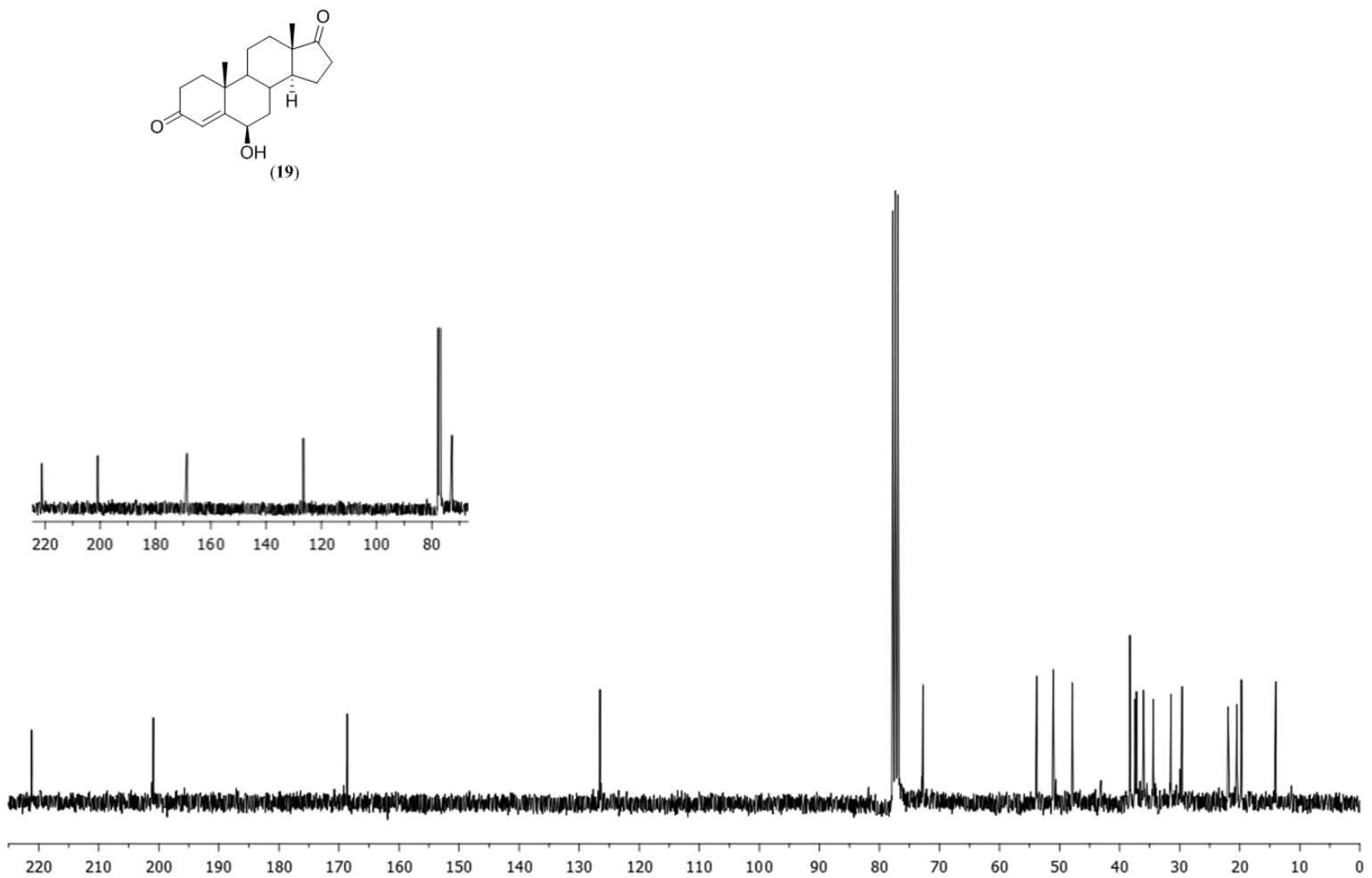
**EK 21:** 5 $\alpha$ -Androstan-3,6,17-trion (**18**) için  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu



**EK 22:** 6 $\beta$ -Hidroksianđrost-4-en-3,17-dion (**19**) için  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

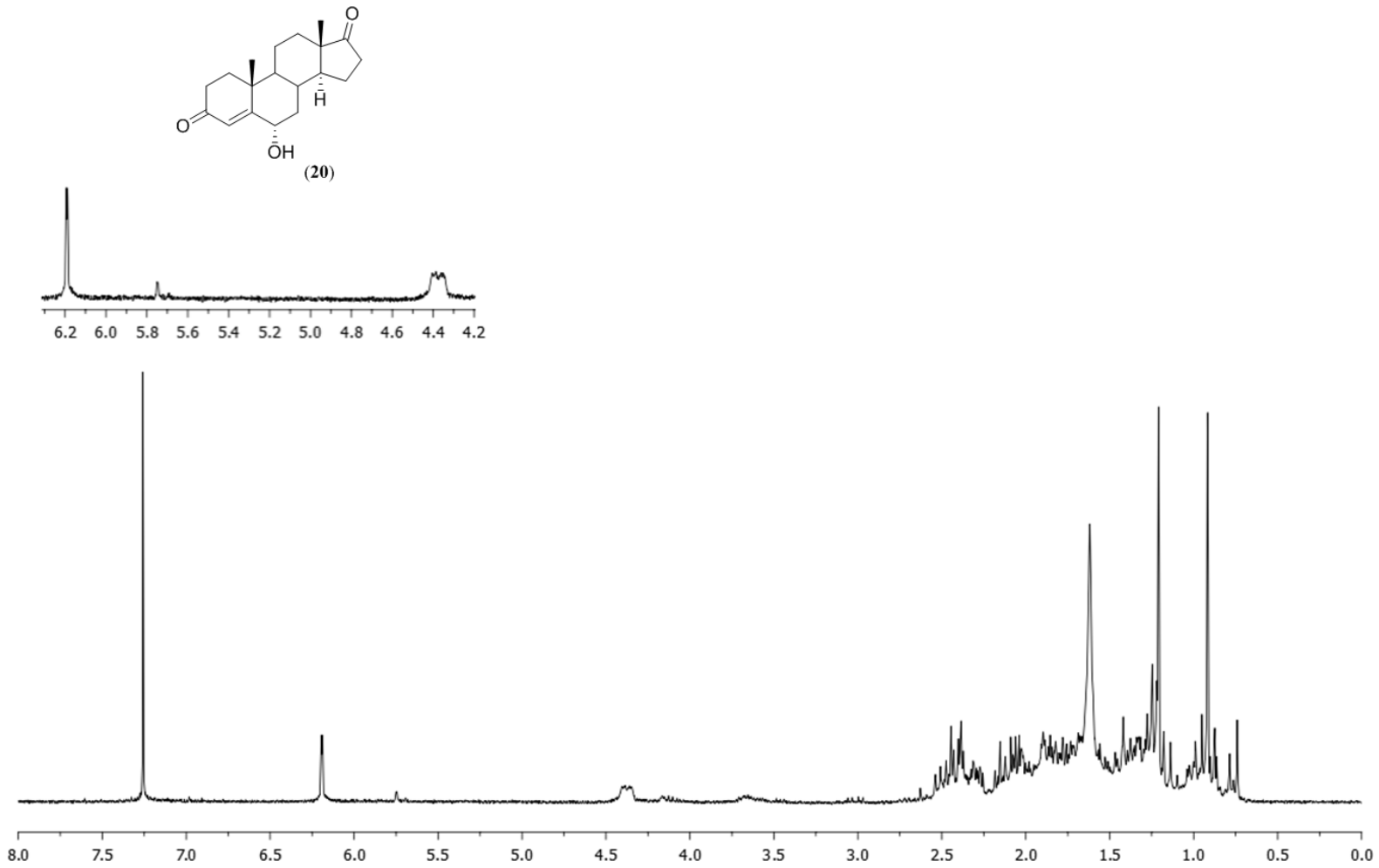


**EK 23:** 6 $\beta$ -Hidroksianandrost-4-en-3,17-dion (**19**) için  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu

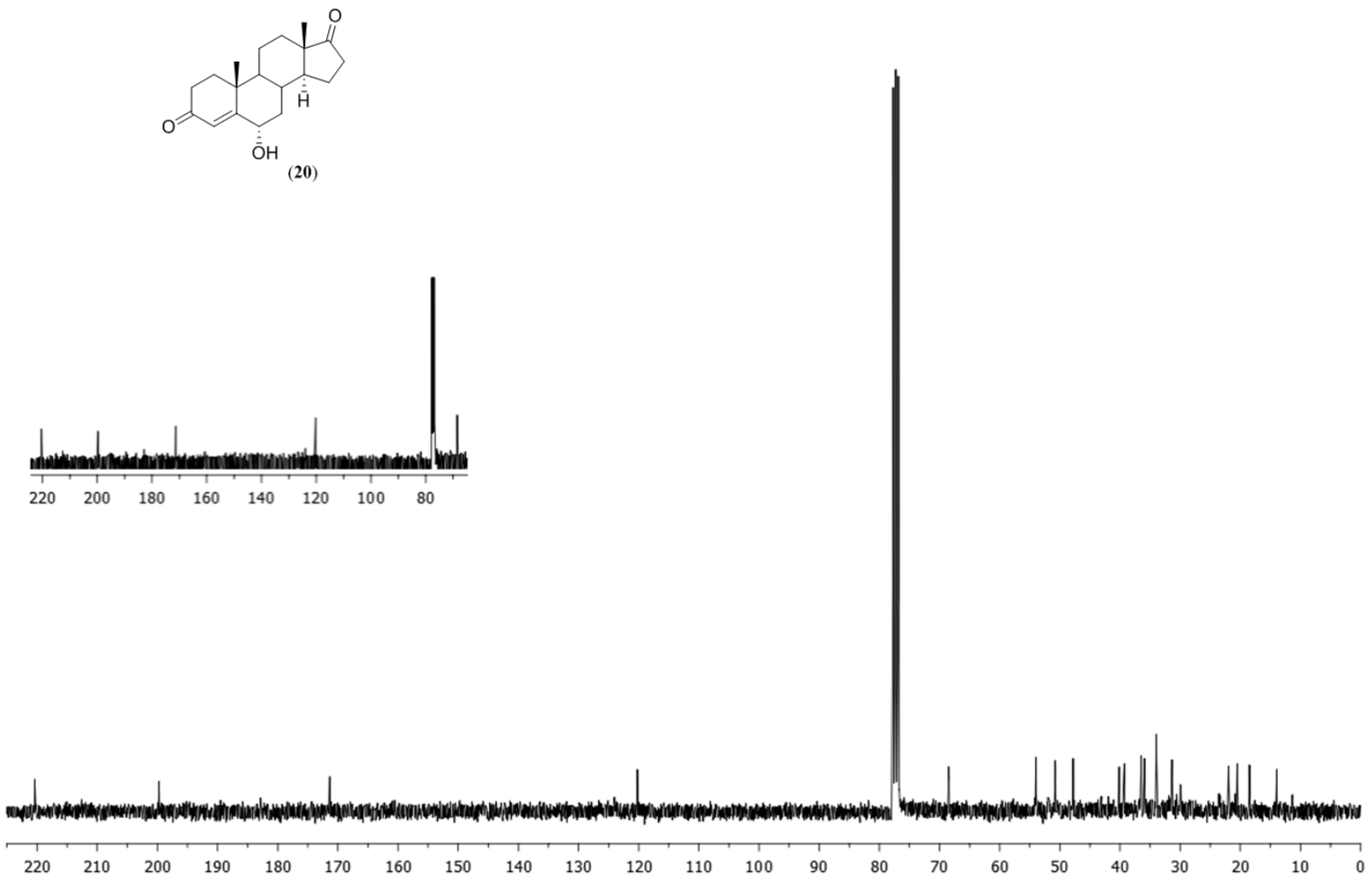




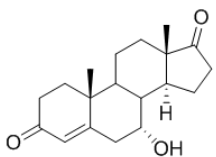
**EK 24:** 6 $\alpha$ -Hidroksiandrorost-4-en-3,17-dion (**20**) için  $^1\text{H}$  NMR spektrumu



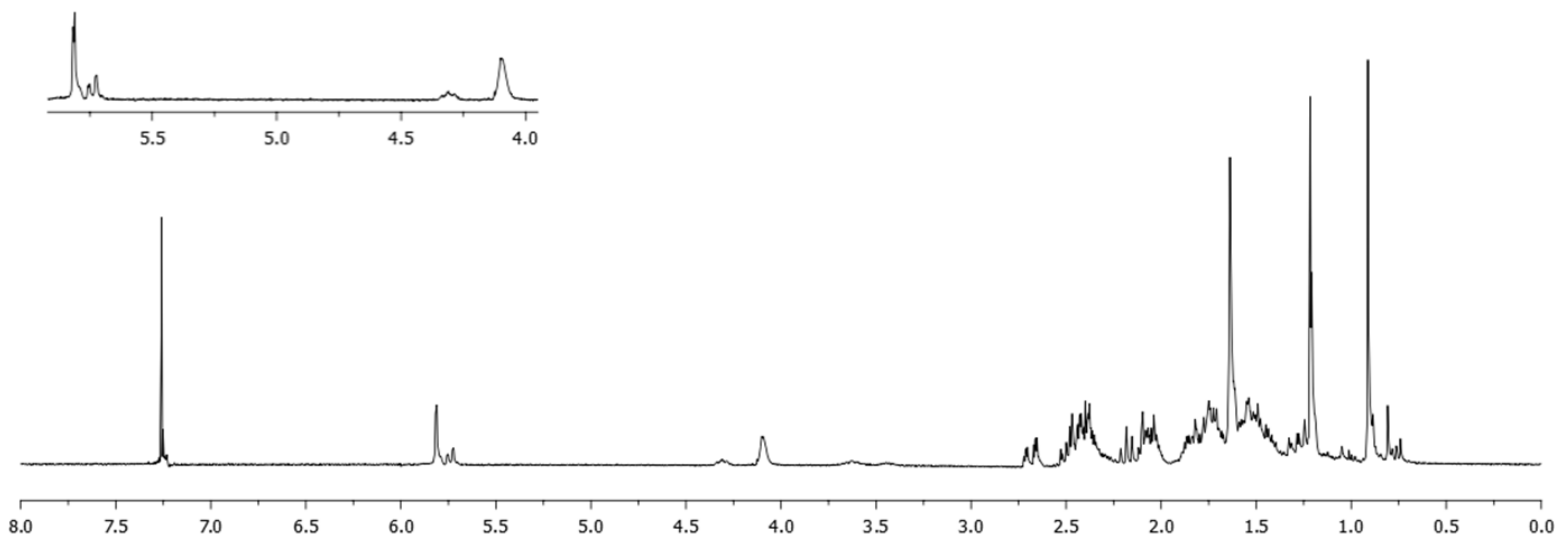
**EK 25:** 6 $\alpha$ -Hidroksiandrorost-4-en-3,17-dion (**20**) için  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu



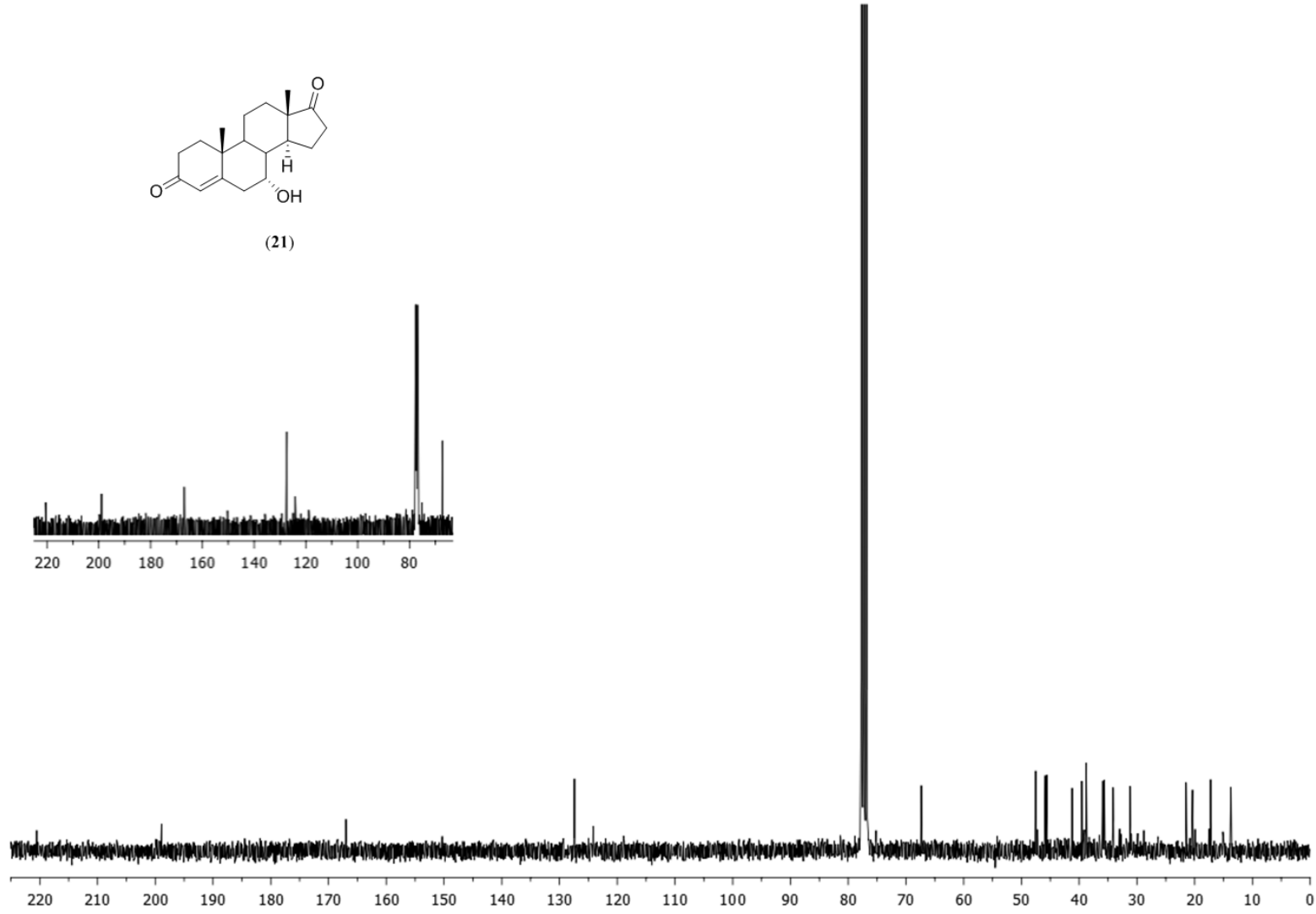
**EK 26:** 7 $\alpha$ -Hidroksiandrosta-4-en-3,17-dion (**21**) için  $^1\text{H}$  NMR spektrumu



**(21)**



**EK 27:** 7 $\alpha$ -Hidroksiandroster-4-en-3,17-dion (21) için  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu



## ÖZGEÇMİŞ

Sinan ERGİN 1994 yılında Sakarya'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Sakarya'da tamamladı. 2009 yılında Ali Dilmen Anadolu Lisesi'nden mezun oldu. 2009 yılında başladığı Cumhuriyet Üniversitesi Biyokimya Bölümü'nü 2017 yılında bitirdi. Yüksek lisans öğrenimine 2017 yılında Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim dalında başladı. Askerlik görevini takım komutanı olarak İzmir Menemen 57. Topçu Alayı'nda yedek subay rütbesiyle yaptı. Akabinde Sakarya Özel Gıda Kontrol Laboratuvarı'nda çalışmaya başladı bir müddet burada çalıştıktan sonra, ASTERPHARMA şirketinde kimyager olarak işe başladı aynı zamanda yüksek lisans çalışmalarına devam etti. Şu anda dermokozmetik ürünler üreten ESTEGLOBAL firmasında üretim sorumlusu olarak çalışmaktadır.