

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROGESTERON, PREGNENOLON, TESTOSTERON,
DEHİDROEPIANDROSTERON VE EPIANDROSTERON STEROİDLERİNİN
BAZI *ASPERGİLLUS* TÜRLERİ İLE BİYOTRANSFORMASYONLARI

DOKTORA TEZİ

Ali KURU

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

Mayıs 2017

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROGESTERON, PREGNENOLON, TESTOSTERON,
DEHİDROEPIANDROSTERON VE EPIANDROSTERON STEROİDLERİNİN
BAZI ASPERGİLLUS TÜRLERİ İLE BİYOTRANSFORMASYONLARI

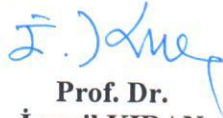
DOKTORA TEZİ


Ali KURU


Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA


Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA


Bu tez 20/06/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr.
İsmail KIRAN
Jüri Başkanı


Doç. Dr.
Mehmet İŞLEYEN
Üye


Doç. Dr.
İlkay ŞİŞMAN
Üye


Doç. Dr.
Kudret YILDIRIM
Üye


Yrd. Doç. Dr.
Semra YILMAZER KESKİN
Üye

BEYAN

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



Ali KURU

05.05.2017

TEŞEKKÜR

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

Doktora öğrenimim boyunca ihtiyacım olan her konuda bana destek olan Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyelerine ve araştırma görevlilerine; ayrıca lisans öğrenimini gördüğüm Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği Bölümü ile yüksek lisans öğrenimi gördüğüm Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim dalı öğretim üyelerine ve araştırma görevlilerine teşekkürlerimi sunarım.

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

Bu çalışma SAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje no: 2015-50-02-015).

İÇİNDEKİLER

BEYAN	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
TABLolar LİSTESİ	xv
ÖZET	xvi
SUMMARY	xvii
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2.	
BAZI <i>ASPERGİLLUS</i> TÜRLERİ İLE STEROİD BİYOTRANSFORMASYONLARI	6
2.1. Biyotransformasyonların Kısa Tarihçesi	6
2.2. Enzimler, Avantajları ve Dezavantajları	9
2.3. Biyotransformasyon Teknikleri	12
2.3.1. Sabitlenmiş hücreler ile biyotransformasyon	13
2.3.2. Serbest ve sabitlenmiş enzimler ile biyotransformasyon	13
2.3.3. İzole enzimler ile biyotransformasyon	14
2.3.4. Sporlar ile biyotransformasyon	14
2.3.5. Durağan hücreler ile biyotransformasyon	14
2.3.6. Büyüyen hücreler ile biyotransformasyon	14
2.4. Mikrobiyal Biyotransformasyonlar	15
2.4.1. Mikrobiyal hidroksillenmeler	17
2.4.2. Steroidlerin mikrobiyal hidroksillenme modelleri	19

2.5. Bazı <i>Aspergillus</i> Türleri ile Steroid Biyotransformasyonları	22
2.5.1. Bazı <i>Aspergillus</i> türleri ile progesteron (2) biyotransformasyonları	22
2.5.2. Bazı <i>Aspergillus</i> türleri ile pregnenolon (3) biyotransformasyonları	37
2.5.3. Bazı <i>Aspergillus</i> türleri ile testosteron (4) biyotransformasyonları	39
2.5.4. Bazı <i>Aspergillus</i> türleri ile DHEA (9) biyotransformasyonları	43
2.5.5. Bazı <i>Aspergillus</i> türleri ile epiandrosteron (15) biyotransformasyonları	47
2.6. Çalışmanın Amacı	48
BÖLÜM 3.	
MATERYAL VE METOT	50
3.1. Kullanılan Yöntemler, Cihazlar ve Sarf Malzemeler	50
3.2. Deneysel Çalışmalar	51
3.2.1. Yatık agar besiyerlerinin hazırlanması	51
3.2.2. Küf kültürlerinin hazırlanması	51
3.2.3. Küf besiyerlerinin hazırlanması	52
3.2.4. Biyotransformasyon çalışması	52
3.2.5. Metabolitlerin izole edilmesi	52
3.2.6. Metabolitlerin saflaştırılması ve yapılarının tayini	53
BÖLÜM 4.	
DENEYSEL BULGULAR	54
4.1. <i>A. sydowii</i> ile Substratların Biyotransformasyonları	54
4.1.1. <i>A. sydowii</i> ile progesteron (2) biyotransformasyonu	54
4.1.2. <i>A. sydowii</i> ile pregnenolon (3) biyotransformasyonu	57
4.1.3. <i>A. sydowii</i> ile testosteron (4) biyotransformasyonu	58
4.1.4. <i>A. sydowii</i> ile DHEA (9) biyotransformasyonu	59
4.1.5. <i>A. sydowii</i> ile epiandrosteron (15) biyotransformasyonu	61

4.2. <i>A. candidus</i> ile Substratların Biyotransformasyonları	64
4.2.1. <i>A. candidus</i> ile progesteron (2) biyotransformasyonu	64
4.2.2. <i>A. candidus</i> ile pregnenolon (3) biyotransformasyonu	65
4.2.3. <i>A. candidus</i> ile testosteron (4) bileşğinin ilk biyotransformasyonu	67
4.2.4. <i>A. candidus</i> ile testosteron (4) bileşğinin ikinci biyotransformasyonu	67
4.2.5. <i>A. candidus</i> ile testosteron (4) bileşğinin üçüncü biyotransformasyonu	67
4.2.6. <i>A. candidus</i> ile DHEA (9) biyotransformasyonu	69
4.2.7. <i>A. candidus</i> ile epiandrosteron (15) biyotransformasyonu ...	71
4.3. <i>A. japonicus</i> ile Substratların Biyotransformasyonları	74
4.3.1. <i>A. japonicus</i> ile progesteron (2) bileşğinin 1. biyotransformasyonu	74
4.3.2. <i>A. japonicus</i> ile progesteron (2) bileşğinin 2. biyotransformasyonu	75
4.3.3. <i>A. japonicus</i> ile pregnenolon (3) bileşğinin 1. biyotransformasyonu	75
4.3.4. <i>A. japonicus</i> ile pregnenolon (3) bileşğinin 2. biyotransformasyonu	75
4.3.5. <i>A. japonicus</i> ile testosteron (4) bileşğinin 1. biyotransformasyonu	76
4.3.6. <i>A. japonicus</i> ile testosteron (4) bileşğinin 2. biyotransformasyonu	76
4.3.7. <i>A. japonicus</i> ile DHEA (9) bileşğinin 1. biyotransformasyonu	76
4.3.8. <i>A. japonicus</i> ile DHEA (9) bileşğinin 2. biyotransformasyonu	77
4.3.9. <i>A. japonicus</i> ile epiandrosteron (15) bileşğinin 1. biyotransformasyonu	77
4.3.10. <i>A. japonicus</i> ile epiandrosteron (15) bileşğinin 2. biyotransformasyonu	77

BÖLÜM 5.	
SONUÇLAR VE TARTIŞMA	79
KAYNAKLAR	106
EKLER	115
ÖZGEÇMİŞ	121



SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

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_{C}	: ^{13}C NMR spektrumundaki kimyasal kayma
δ_{H}	: ^1H NMR spektrumundaki kimyasal kayma
DHEA	: Dehidroepiandrosteron
DMF	: Dimetilformamit
d	: Dublet
dd	: Dubletin dubleti
dt	: Tripletlerin dubleti
g	: Gram
^1H NMR	: Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
Hz	: Hertz
IR	: Infrared Spektroskopisi
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
J	: Etkileşme sabiti
lit.	: Literatür
m	: Multiplet
mg	: Miligram
MHz	: Megahertz
mL	: Mililitre
MRC	: Marmara Research Center (Marmara Araştırma Merkezi)
PDA	: Potato Dextrose Agar

pH	: Hidrojen iyonu derişiminin eksi logaritması
ppm	: Milyonda bir kısım
rpm	: Dakika başına dönüş sayısı
s	: Singlet
t	: Triplet
td	: Dubletlerin tripleti
tt	: Tripletlerin tripleti



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Genel steroid yapısı	2
Şekil 1.2.	Kolesterolün yapısı	3
Şekil 1.3.	Bazı androjen ve östrojenlerin biyosentezi	4
Şekil 1.4.	Testosteron (2) bileşiğinin bazı metabolitleri	5
Şekil 2.1.	<i>R. arrhizus</i> ile progesteron (5) bileşiğinin biyotransformasyonu	8
Şekil 2.2.	Substrata bir O atomunun ilave edilmesinin mekanizması	18
Şekil 2.3.	Oksidant ve substrat arasındaki radikalleri içeren mekanizma .	19
Şekil 2.4.	Enzim-substrat etkileşimin Jones modeli	20
Şekil 2.5.	Brannon modeline göre bağlanma oryantasyonları	21
Şekil 2.6.	Enzim-substrat etkileşimi McCrindle modeli	22
Şekil 2.7.	Sabitlenmiş <i>A. ochraceus</i> TS ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu	23
Şekil 2.8.	<i>A.ochraceus</i> NRRL 405 ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu	23
Şekil 2.9.	Sabitlenmiş <i>A. ochraceus</i> TS ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu	24
Şekil 2.10.	<i>A.ochraceus</i> izolatu ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu	24
Şekil 2.11.	<i>A.ochraceus</i> ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu	25
Şekil 2.12.	<i>A. niger</i> 100 ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu	25
Şekil 2.13.	<i>A. niger</i> 567 ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu	26
Şekil 2.14.	<i>A. niger</i> 37 ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu	26

Şekil 2.15.	<i>A. niger</i> NRRL 599 ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu	27
Şekil 2.16.	<i>A. niger</i> ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu ...	27
Şekil 2.17.	<i>A. niger</i> 3N, <i>A. niger</i> 100 ve <i>A. niger</i> 1R izolatları ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu	28
Şekil 2.18.	<i>A. fumigatus</i> ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu	28
Şekil 2.19.	<i>A. fumigatus</i> ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu	29
Şekil 2.20.	<i>A. tamarii</i> QM1223 ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu	29
Şekil 2.21.	<i>A. tamarii</i> MRC 72400 ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu	30
Şekil 2.22.	<i>A. terreus</i> MRC 200365 ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu	30
Şekil 2.23.	<i>A. terreus</i> ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu	30
Şekil 2.24.	<i>A. oryzae</i> ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu	31
Şekil 2.25.	<i>A. oryzae</i> ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu	31
Şekil 2.26.	<i>A. phoenicis</i> ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu.....	32
Şekil 2.27.	<i>A. fischeri</i> ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu	32
Şekil 2.28.	<i>A. aureogulgens</i> ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu	33
Şekil 2.29.	<i>A. subolivaceus</i> ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu	33
Şekil 2.30.	<i>A. nidulans</i> ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu	34
Şekil 2.31.	<i>A. versicolor</i> ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu	34
Şekil 2.32.	<i>A. brasiliensis</i> ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu	35

Şekil 2.33.	<i>A. giganteus</i> ATCC 10059 ile progesteron (2) bileşiminin biyotransformasyonu	35
Şekil 2.34.	<i>A. flavus</i> , <i>A. flavo-furcatis</i> , <i>A. parasiticus</i> ve <i>A. tamarii</i> türlerine ait birer izolatu ile progesteron (2) bileşiminin biyotransformasyonu	36
Şekil 2.35.	Bazı <i>Aspergillus</i> türleri ile progesteron (2) bileşiminin biyotransformasyonu	36
Şekil 2.36.	<i>A. niger</i> 58F, <i>A. niger</i> 73, bir <i>A. niger</i> izolatu bir <i>A. ochraceus</i> izolatu ve bir <i>A. phoenicis</i> ile progesteron (2) bileşiminin biyotransformasyonu	37
Şekil 2.37.	<i>A. tamarii</i> QM 1223 ile pregnenolon (3) bileşiminin biyotransformasyonu	37
Şekil 2.38.	<i>A. auerogulgens</i> ile pregnenolon (3) bileşiminin biyotransformasyonu	37
Şekil 2.39.	<i>A. oryzae</i> ile pregnenolon (3) bileşiminin biyotransformasyonu	38
Şekil 2.40.	<i>A. wentii</i> MRC 200316 ile pregnenolon (3) bileşiminin biyotransformasyonu	38
Şekil 2.41.	<i>A. terreus</i> MRC 200365 ile pregnenolon (3) bileşiminin biyotransformasyonu	39
Şekil 2.42.	<i>A. tamarii</i> MRC 72400 ile pregnenolon (3) bileşiminin biyotransformasyonu	39
Şekil 2.43.	<i>A. niger</i> ATCC 9142 ile testosteron (4) bileşiminin biyotransformasyonu	40
Şekil 2.44.	<i>A. niger</i> NRRL 599 ile testosteron (4) bileşiminin biyotransformasyonu	40
Şekil 2.45.	<i>A. oryzae</i> ATCC 11601 ile testosteron (4) bileşiminin biyotransformasyonu	41
Şekil 2.46.	<i>A. fischeri</i> ile testosteron (4) bileşiminin biyotransformasyonu	41
Şekil 2.47.	<i>A. fumigatus</i> ile testosteron (4) bileşiminin biyotransformasyonu	42
Şekil 2.48.	<i>A. auerogulgens</i> ile testosteron (4) bileşiminin biyotransformasyonu	42

Şekil 2.49.	<i>A. wentii</i> MRC 200316 ile testosteron (4) bileşiğinin biyotransformasyonu	42
Şekil 2.50.	<i>A. terreus</i> MRC 200365 ile testosteron (4) bileşiğinin biyotransformasyonu	43
Şekil 2.51.	<i>A. tamarii</i> QM 1223 ve MRC 72400 ile testosteron (4) bileşiğinin biyotransformasyonu	43
Şekil 2.52.	<i>A. parasiticus</i> ile DHEA (9) bileşiğinin biyotransformasyonu	44
Şekil 2.53.	<i>A. niger</i> NRLL 599 ile DHEA (9) bileşiğinin biyotransformasyonu	44
Şekil 2.54.	<i>A. oryzae</i> ATCC 11601 ile DHEA (9) bileşiğinin biyotransformasyonu	45
Şekil 2.55.	<i>A. wentii</i> MRC 200316 ile DHEA (9) bileşiğinin biyotransformasyonu	45
Şekil 2.56.	<i>A. terreus</i> IFO 6113 ile DHEA (9) bileşiğinin biyotransformasyonu	45
Şekil 2.57.	<i>A. tamarii</i> QM 1223 ile DHEA (9) bileşiğinin biyotransformasyonu	46
Şekil 2.58.	<i>A. tamarii</i> MRC 72400 ile DHEA (9) bileşiğinin biyotransformasyonu	46
Şekil 2.59.	<i>A. terreus</i> MRC 200365 ile epiandrosteron (15) bileşiğinin biyotransformasyonu	47
Şekil 2.60.	<i>A. wentii</i> MRC 200316 ile epiandrosteron (15) bileşiğinin biyotransformasyonu	47
Şekil 2.61.	<i>A. tamarii</i> QM 1223 ile epiandrosteron (15) bileşiğinin biyotransformasyonu	48
Şekil 2.62.	<i>A. tamarii</i> MRC 72400 ile epiandrosteron (15) bileşiğinin biyotransformasyonu	48
Şekil 4.1.	Androstan (a) ve pregnan (b) karbon iskeletlerinin numaralandırılması	54
Şekil 4.2.	<i>A. sydowii</i> MRC 200653 ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu	55

Şekil 4.3.	<i>A. sydowii</i> MRC 200653 ile pregnenolon (3) bileşiminin biyotransformasyonu	57
Şekil 4.4.	<i>A. sydowii</i> MRC 200653 ile testosteron (4) bileşiminin biyotransformasyonu	58
Şekil 4.5.	<i>A. sydowii</i> MRC 200653 ile DHEA (9) bileşiminin biyotransformasyonu	60
Şekil 4.6.	<i>A. sydowii</i> MRC 200653 ile epiandrosteron (15) bileşiminin biyotransformasyonu	61
Şekil 4.7.	<i>A. candidus</i> MRC 200634 ile progesteron (2) bileşiminin biyotransformasyonu	64
Şekil 4.8.	<i>A. candidus</i> MRC 200634 ile pregnenolon (3) bileşiminin biyotransformasyonu	66
Şekil 4.9.	<i>A. candidus</i> MRC 200634 ile testosteron (4) bileşiminin ilk iki biyotransformasyonu	67
Şekil 4.10.	<i>A. candidus</i> MRC 200634 ile testosteron (4) 3. biyotransformasyonu	68
Şekil 4.11.	<i>A. candidus</i> MRC 200634 ile DHEA (9) biyotransformasyonu	69
Şekil 4.12.	<i>A. candidus</i> MRC 200634 ile epiandrosteron (15) biyotransformasyonu	73
Şekil 4.13.	<i>A. japonicus</i> MRC U-3048 küfü ile steroid biyotransformasyonu denemeleri	78
Şekil 5.1.	<i>A. sydowii</i> MRC 200653 ile progesteron (2) biyotransformasyonu	80
Şekil 5.2.	<i>A. sydowii</i> MRC 200653 ile pregnenolon (3) biyotransformasyonu	82
Şekil 5.3.	<i>A. sydowii</i> MRC 200653 ile testosteron (4) biyotransformasyonu	84
Şekil 5.4.	<i>A. sydowii</i> MRC 200653 ile DHEA (9) bileşiminin biyotransformasyonu	85
Şekil 5.5.	<i>A. sydowii</i> MRC 200653 ile epiandrosteron (15) biyotransformasyonu	87

Şekil 5.6.	<i>A. candidus</i> MRC 200634 ile progesteron (2) biyotransformasyonu	91
Şekil 5.7.	<i>A. candidus</i> MRC 200634 ile pregnenolon (3) biyotransformasyonu	91
Şekil 5.8.	<i>A. candidus</i> MRC 200634 ile testosteron (4) bileşiğinin ilk iki biyotransformasyonu	92
Şekil 5.9.	<i>A. candidus</i> MRC 200634 ile testosteron (4) bileşiğinin 3. biyotransformasyonu	93
Şekil 5.10.	<i>A. candidus</i> MRC 200634 ile DHEA (9) biyotransformasyonu	94
Şekil 5.11.	<i>A. candidus</i> MRC 200634 ile epiandrosteron (15) biyotransformasyonu	96
Şekil 5.12.	<i>A. japonicus</i> MRC U-3048 küfü ile steroid biyotransformasyonu denemeleri	100
Şekil A.1.	Epiandrosteron (15) bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu	
Şekil A.2.	Epiandrosteron (15) bileşiğinin ¹³ C NMR spektrumu	
Şekil A.3.	1 α ,3 α -Dihidroksi-5 α -androstan-17-on (73) bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu	
Şekil A.4.	1 α ,3 α -Dihidroksi-5 α -androstan-17-on (73) bileşiğinin ¹³ C NMR spektrumu	
Şekil A.5.	15 β ,17 β -Dihidroksi-5 α -androstan-3-on (76) bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu	
Şekil A.6.	15 β ,17 β -Dihidroksi-5 α -androstan-3-on (76) bileşiğinin ¹³ C NMR spektrumu	

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 5.1.	Progesteron (2), pregnenolon (3) ve metabolitlerinin CDCl_3 veya $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}^*$ 'deki ^{13}C NMR sinyalleri	81
Tablo 5.2.	Testosteron (4) ve bazı metabolitlerinin CDCl_3 'teki ^{13}C NMR sinyalleri	83
Tablo 5.3.	DHEA (9) ve bazı metabolitlerinin CDCl_3 'teki ^{13}C NMR sinyalleri	86
Tablo 5.4.	Epiandrosteron (15) ve <i>A. sydowii</i> MRC 200653 ile verdiği bazı metabolitlerin CDCl_3 'teki ^{13}C NMR sinyalleri	88
Tablo 5.5.	Epiandrosteron (15) ve <i>A. candidus</i> MRC 200634 ile verdiği bazı metabolitlerinin ^{13}C NMR sinyalleri	97
Tablo 5.6.	<i>A. sydowii</i> MRC 200653 küfü ile elde edilen metabolit verimleri	101
Tablo 5.7.	<i>A. candidus</i> MRC 200634 küfü ile elde edilen metabolit verimleri	104

ÖZET

Anahtar Kelimeler: Biyotransformasyon, *Aspergillus*, Progesteron, Pregnenolon, Testosteron, Dehidroepiandrosteron, Epiandrosteron, Hidroksillenme

Steroidlerin küfler ile biyotransformasyonları yüksek bölgesel ve stereoseçicilikleri sebebi ile çok daha önemli ve fonksiyonlu bileşiklerin üretimi için dünya çapında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada progesteron, pregnenolon, testosteron, DHEA ve epiandrosteron steroidlerinin *Aspergillus sydowii* MRC 200653, *Aspergillus candidus* MRC 200634 ve *Aspergillus japonicus* MRC U-3048 küfleri ile biyotransformasyonları incelendi. *A. sydowii* MRC 200653 ve *A. candidus* MRC 200634 ile gerçekleştirilen biyotransformasyon çalışmaları steroid halkasının farklı pozisyonlarından hidroksillenmiş metabolitler ile sonuçlanırken, *A. japonicus* MRC U-3048 ile gerçekleştirilen biyotransformasyonlar sonucunda herhangi bir metabolit elde edilemedi.

Metabolitlerin yapı tayinleri başlangıç maddeleri ile metabolitlerin erime noktaları, ^1H NMR, ^{13}C NMR ve IR spektrumlarının karşılaştırılması ile belirlendi.

**BIOTRANSFORMATIONS OF PROGESTERONE, PREGNENOLONE,
TESTOSTERONE, DEHYDROEPIANDROSTERONE AND
EPIANDROSTERONE BY SOME *ASPERGILLUS* SPECIES**

SUMMARY

Keywords: Biotransformation, *Aspergillus*, Progesterone, Pregnenolone, Testosterone, Dehydroepiandrosterone, Epiandrosterone, Hydroxylation

Fungal steroid biotransformations have been widely used throughout the world in order to produce more valuable and functional compounds due to their remarkable regio- and stereoselectivities.

In this study, the biotransformations of progesterone, pregnenolone, testosterone, DHEA and epiandrosterone were investigated by *Aspergillus sydowii* MRC 200653, *Aspergillus candidus* MRC 200634 and *Aspergillus japonicus* MRCI-3048. The biotransformations of the steroids by *A. sydowii* MRC 200653 and *A. candidus* MRC 200634 resulted in hydroxylated metabolites at different positions of the steroid ring whereas the biotransformations of the steroids by *A. japonicus* MRC U-3048 yielded no metabolites.

Structures of the metabolites were determined by comparison of their melting points, ^1H NMR, ^{13}C NMR and IR spectra with those of the starting materials

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Canlılarda doğal şekilde bulunan organik bileşikler üç temel gruba ayrılır. İlk gruba bütün hücreler için ortak olan, hücrelerin büyüme ve üremelerinde önemli rol oynayan birincil (primer) metabolitler adı verilen bileşikler girer. İkinci gruba selüloz, ligninler ve proteinler gibi hücrel yapıları oluşturan yüksek moleküler ağırlıklı biyopolimerler girerken son gruba ise canlıların büyüme ve üremesi için çok gerekli olmayan ikincil (sekonder) metabolizmanın bileşenleri olan, doğal ürünler veya sekonder metabolitler olarak da adlandırılan bileşikler girer [1-3].

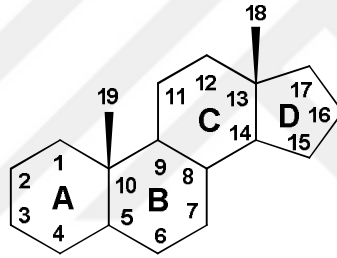
Doğal ürünler hayat için elzem değildirler ancak genellikle canlıların hayatta kalmalarına yardımcı olurlar ve daha çok diğer canlılar üzerindeki etkileri sebebi ile dikkat çekerler [1-3]. Doğal ürünler hemen her grup canlıda bulunurlar, özellikle bitkiler, mikroorganizmalar, mantarlar ve böceklerde daha yaygın olarak gözlenirler. Doğal ürünler en çok bitkiler ve mikroorganizmalarda bulunur. Tıbbi, ticari ve zehirli bitkilerin biyolojik açıdan aktif bileşenlerinin çoğu doğal üründür ve bu doğal ürünler organik kimyanın gelişimi süresince çalışılmıştır.

Bitkiler, mikroorganizmalar, böcekler ve diğer hayvanlar arasındaki etkileşimlerin düzenlenmesinde özellikle doğal ürünler ekolojik role sahip olan bileşiklerdir. Bu doğal ürünler genellikle stres koşullarında devreye giren savunma maddeleri, hoş olmayan tatları sayesinde söz konusu bitkilerin otçullar tarafından tüketilmesini önleyen bileşikler, diğer canlıları buldukları canlılara çeken renkli ve kokulu bileşikler ve özellikle böcekler gibi bazı canlılar arasında iletişimi sağlayan feromonlar olarak görev yaparlar.

Doğal ürünler ilk bakışta birbirinden yapıca farklı bileşikler olmalarına rağmen bu bileşiklerin çoğunun genellikle doğadaki biosentezlerinden kaynaklanan bazı özel yapısal karakterleri vardır. Bu sayede poliketidler, yağ asitleri, terpenler, steroidler,

fenolik bileşikler, alkaloidler, özelleşmiş karbohidratlar ile özelleşmiş amino asitler ve peptidler gibi sınıflardan birine dahil edilirler [3].

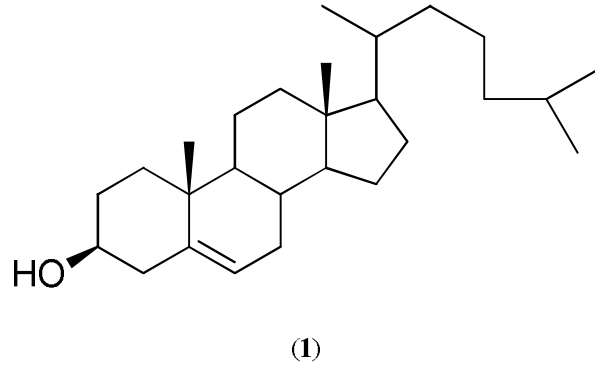
Doğal ürünlerin önemli bir sınıfı steroidlerdir. Steroid kelimesinin kökeni Latince’de katı anlamına gelen “steros” kelimesidir. Steroidler, siklopentanoperhidrofenantren halkası içeren bileşiklerdir. Bu halka sırası ile birbirleri ile kaynaşmış A, B ve C halkaları olarak adlandırılan 3 tane sikloheksan halkası ve D halkası olarak adlandırılan bir siklopentan halkasından oluşur (Şekil 1.1). Steroidlerin çoğu yapılarındaki 13. ve 10. karbonlarında, sırası ile 18. ve 19. karbonlar olarak tanımlanan ve molekül düzleminin yukarısında bulunan metil grupları taşır. Steroidler genelde 3. ve 17. karbonlarında hidroksil veya karbonil grupları taşırlar. Bazı steroidler ayrıca D halkasındaki 17. karbona bağlı zincirler de içerir [4].



Şekil 1.1. Genel steroid yapısı [4].

Steroidlerin önemli bir grubunu 3. karbonunda hidroksil grubu, 17. karbonunda ise 7, 8 veya 9 karbonlu alifatik yan zincirler taşıyan steroller oluşturur. Kolesterol (1), stigmasterol ve ergosterol en iyi bilinen sterollerdir. Kolesterol (1) insan ve hayvanlarda bulunurken stigmasterol bitkilerde, ergosterol ise mantarlarda gözlenir [1,4].

Şekil 1.2.’de açık yapısı gösterilen kolesterol (1) steroidlerin en yaygın üyelerinden birisidir. Kolesterol (1) insan ve hayvan membranlarındaki akışkanlığın düzenlenmesinde rol alan çok önemli bir lipittir. Kolesterol (1) ayrıca D₃ vitamini, safra asitleri ve steroid hormonlar gibi birçok önemli fonksiyonu bulunan bileşiklerin de başlangıç maddesidir [1, 4].

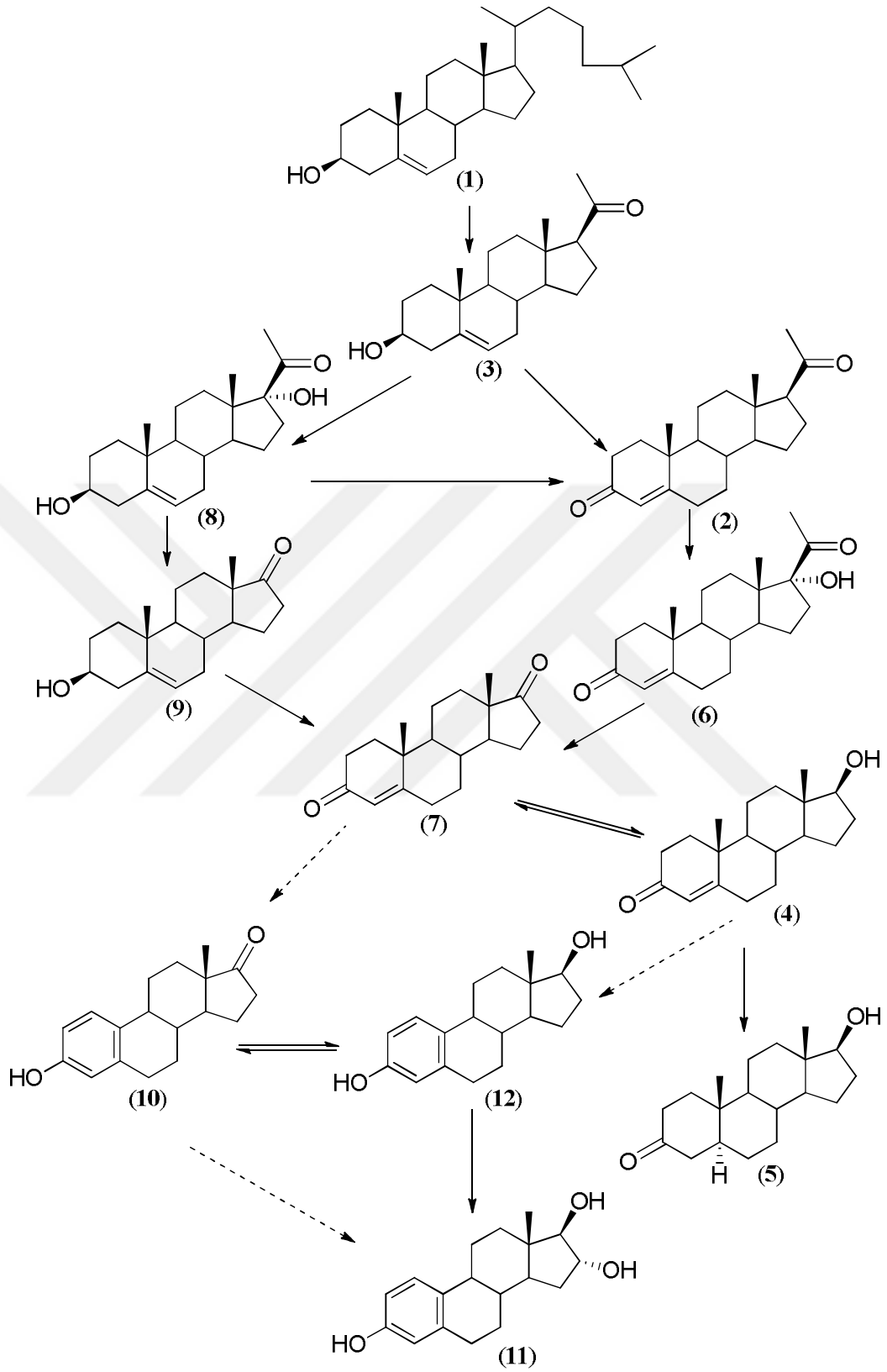


Şekil 1.2. Kolesterolün yapısı [4].

Steroid hormonlar glukokortikoidler, mineralokortikoidler, androjenler, östrojenler ve progestagenler (progesterinler) olmak üzere 5 ana sınıfta incelenmektedir [5]. Androjenler, östrojenler ve progestagenler ayrıca eşey hormonları olarak da bilinirler. Eşey hormonlarının görevi üreme ile ilgili organların gelişme ve büyümelerini, ikincil eşey karakterlerini ve üreme döngüsünü düzenlemektir. Bu hormonlar güçlü anabolik etkileri sayesinde kemik, kaslar ve deri gibi birçok dokunun gelişmesi ve metabolizmanın sürekliliğini de sağlarlar [4].

Steroid hormonlar kolesterolden (1) oluşan progesteron (2) bileşiğinin türevleridirler. Kolesterol (1) yan zinciri uzaklaştırılıp pregnenolon (3) bileşiğine çevrildikten sonra pregnenolon (3) bileşiğinden iki ayrı reaksiyonla progesteron (2) bileşiği sentezlenir.

Aynı zamanda östrojenlerin çıkış maddeleri de olan androjenler, omurgalı erkek bireylerinde etkili olan eşey hormonlarıdır. Testosteron (4) ve dihidrotestosteron (5) androjenlerin en etkili hormonlarıdır. Androjenlerin vücuttaki asıl sentez yeri erbezleri (testis) olsa da bu hormonların bir kısmı adrenal korteksten de salınmaktadır. Adrenal korteks ve testislerde androjenlerin sentezi kolesterol bileşiğinden (1) pregnenolon (3) oluşması ile başlar (Şekil 1.3.). Pregnenolon (3) üzerinden androjenlerin biyosentezi Δ^4 yolu veya Δ^5 yolu olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleşmektedir [4].

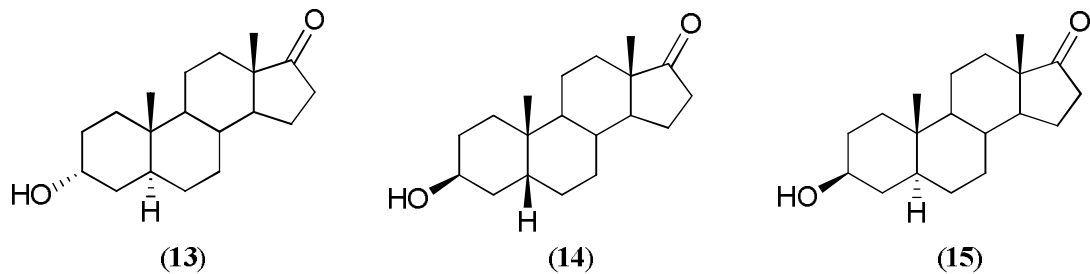


Şekil 1.3. Bazı androjen ve östrojenlerin biyosentezi [4].

Androjen biyosentezinin ana yolu Δ^4 yoludur. Bu yolda pregnenolon (3) önce progesterona (2) daha sonra ise 17 α -hidroksiprogesterona (6) dönüştürülür. Testosteron (4) bileşiği 17 α -hidroksiprogesteron (6) bünyesindeki yan zincirinin enzimatik olarak parçalanması ile oluşan androst-4-en-3,17-dion (7) bileşiğinin C-17'deki indirgenmesi sonucunda sentezlenir. Testosteron (4) ise daha sonra 5 α -redüktaz aktivitesi ile daha etkin bir diğer androjen olan dihidrotestosteron (5) bileşiğine dönüştürülür.

Daha çok bir yan yol olan Δ^5 yolunda ise pregnenolon (3) 17 α -hidroksipregnenolon (8) bileşiğine çevrildikten sonra DHEA olarak da bilinen dehidroepiandrosteron (9) bileşiğine dönüştürülmektedir. Dehidroepiandrosteron (9) ise androst-4-en-3,17-dion (7) bileşiğine çevrildikten sonra testosterona (4) yükseltgenmektedir. Bu yolda oluşan 17 α -hidroksipregnenolon (8) ayrıca doğrudan progesterona (2) çevrilebilmektedir.

Yukarıdaki şekilden de (Şekil 1.3.) görülebileceği gibi androjenlerin biyosentezindeki Δ^4 yolu ve Δ^5 yolunun ortak son ürünü androstendion (7) bileşiğidir. Testosteronun çıkış maddesi olan androst-4-en-3,17-dion (7) östron (10) ve östriol (11) gibi östrojenlerinde çıkış maddesidir [4]. Kendisi bir östrojen olan östradiol (12) (17 β -östradiol) bileşiğinin de sentezlendiği testosteron (4) biyolojik etkinliğini tamamladıktan sonra birçok dokuda androst-4-en-3,17-dion (7) üzerinden düşük aktiviteli veya tamamen inaktif metabolitler olan androsteron (13), etikolanon (14) ve epiandrosteron (15) gibi metabolitlere dönüştürülür (Şekil 1.4.).



Şekil 1.4. Testosteron (2) bileşiğinin bazı metabolitleri [4].

BÖLÜM 2. BAZI *ASPERGILLUS* TÜRLERİ İLE STEROİD BİYOTRANSFORMASYONLARI

Canlılar hayatlarının birçok döneminde ksenobiyotikler olarak bilinen, kendilerine yabancı olan ilaçlar, besin katkı maddeleri, kozmetik ürünleri gibi kimyasal maddeler ile karşılaşabilir [4]. Bu ksenobiyotiklerin üzerinde enzimler veya enzimleri içeren hücre, doku, organ kültürleri ve mikroorganizmalar ya da mikroorganizmaların sporları yolu ile meydana getirilen kimyasal değişikliklere biyotransformasyon adı verilir [3, 6].

2.1. Biyotransformasyonların Kısa Tarihçesi

İnsanlık tarihi boyunca mikroorganizmalar sosyal ve ekonomik açıdan büyük öneme sahipti. Varlıklarından haberdar olunmadan çok önce bile insanoğlu yiyecek ve içeceklerin üretiminde mikroorganizmaları kullanıyordu. 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 [7]. Sümerler ve Babillilerin M.Ö. 6000 yılında alkollü içecekler yaptıkları bildirilmiştir. Bununla birlikte, fermantasyon yoluyla alkoller ve organik asitler gibi kimyasalların üretilmesine ilişkin bilgiler nispeten yenidir ve literatürdeki ilk raporlar sadece 19. yüzyılın ikinci yarısında ortaya çıkmıştır. Zamanla, mikroorganizmaların belirli bileşikleri basit ve kimyasal olarak iyi tanımlanmış reaksiyonlarla değiştirebileceği keşfedildi. Günümüzde bu süreç “biyotransformasyon” olarak adlandırılmaktadır [8].

1858 yılında Pasteur, tartarik asidin mikrobiyal çözünürlüğünü ortaya koyan ilk kişi oldu. *Penicillium glaucum* küfünün aracılık ettiği rasemik tartarik asidin amonyum tuzunun fermantasyonunu gerçekleştirdi ve fermantasyon sonucu (-) - tartarik asit oluştu [9].

1862'de Pasteur alkolün sirke haline dönüştürülmesini araştırdı, sirke üzerinde oluşan ve "sirke çiçeği" olarak adlandırdığı zarın havadaki oksijen için çok sayıda organik maddeye ulaşım yöntemi olarak hizmet ettiğini belirtti [9]. 1886'da Brown, Pasteur'ün bulgularını onayladı ve sirke oluşumuna sebep olan ajana *Bacterium xylinum* adını verdi, aynı zamanda bu mikroorganizmanın propanolü propiyonik aside ve mannitolü de fruktoza yükseltgediğini buldu [10]. Aynı yıl Brown etanol oksidasyonunu da gerçekleştirebilen *Bacterium aceti* ile propanolün propiyonik aside yükselttiğini bildirmiştir. Aynı çalışmada ayrıca, Berthelot'un *Bacterium aceti* ile mannitolün fruktoza ve glukozun glukonik aside dönüşümlerine yönelik ilk çalışmalarının devamı bildirildi [3].

1874'de Dumas, *Saccharomyces cerevisiae* olarak adlandırılan bira mayasının kükürdü hidrojen sülfüre indirgediği bildirildi. Windisch ise 1898'de furfuralın, furfuril alkole indirgenebileceğini bildirdi [3].

1897'de Buchner maya hücrelerinin kum ile öğütülmesi ile elde edilen hücre içermeyen ekstraktın da alkolik fermantasyonu, gerçekleştirebileceğini bildirdi [10].

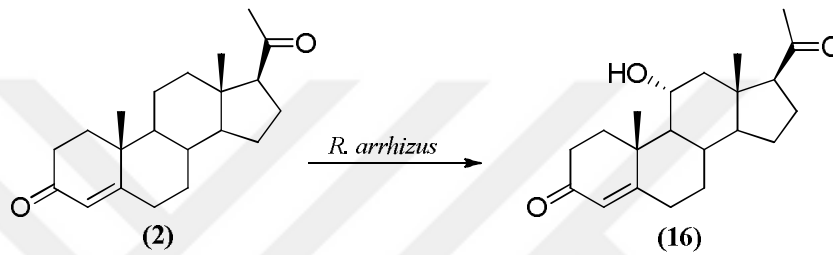
1921'de Neuberg ve Hirsch maya varlığında benzaldehit ve asetaldehitin kondenzasyonu sonucu optikçe aktif 1-hidroksi-1-fenil-2-propanon bileşiğini elde etti [11]. Daha sonra bu bileşik 1930'da L-(-) efedrin alkaloidine dönüştürüldü [12].

Acetobacter suboxydans isimli bakteri 1923'de izole edildi ve D-sorbitolden L-sorbozun yüksek verimle elde edilmesinde kullanıldı [13]. L-sorboz 1930'larda C vitamini sentezinde kullanılması ile önem kazandı [14].

1937 yılında *Saccharomyces cerevisiae* ile yapılan bir çalışmada DHEA bileşiğinden testosteron elde edildi [3].

1948'de *Proactinomyces roseus* bakterisi ile yapılan çalışmalarda kolesterolün C-7 pozisyonunda okside olduğu ayrıca bu bakterinin sterollerin degradasyon ve oksidasyonlarını da gerçekleştirdiği bildirildi [3].

1953’de Peterson ve arkadaşları *Rhizopus arrhizus* küfunün progesteronu (2) kortizon sentezinde bir aracı olan 11 α -hidroksiprogesteron (16) bileşiğine (Şekil 2.1.) dönüştürdüğünü bildirdi [15]. Bu mikrobiyal hidroksillenme kortikosteroid hormonların ve bunların türevlerinin çok adımlı kimyasal sentezinin verimliliğini basitleştirdi ve önemli ölçüde geliştirdi. 615 kg deoksikolik asitten yola çıkılarak 31 basamak sonra 1 kg kortizon asetat elde edilirken, progesteronun 11 α -hidroksiprogesteronu mikrobiyal hidroksillenmesi sayesinde kortizonun maliyetinin gram başına 200\$’dan 1\$’ın altına düşmesine sebep oldu [16].



Şekil 2.1. *R. arrhizus* ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu [15].

1960’ların ilk yıllarında her iki enantiyomerini de içeren Thalidomide adlı ilaç teratojenik problemlere sebep olmuştur. Bu problemler ilaç endüstrisinde etkin tek enantiyomerlerin üretiminin önemini ortaya koymuş ve sonra *Pseudomonas putida* gibi mikroorganizmalar çeşitli esterazlar ve lipazlarla, biyotransformasyonların kiral sentezlerde kullanılmasını tetiklemiştir.

Geçmişte spesifik enzimlerin kullanımı yetersiz üretimleri nedeniyle kısıtlı iken günümüzde özellikle gen mühendisliği sayesinde bu enzimlerin eldesi kolaylaştı ve kullanımı çok daha yaygınlaştı [17]. Günümüzde biyotransformasyonlarda modifiye edilmiş enzimler, yarı sentetik enzimler ve antikor yapıdaki enzimler (abzimler) kullanılmaktadır. Enzimlerle gerçekleştirilen biyotransformasyon çalışmalarındaki en önemli problemlerden biri metabolitlerin izolasyonu esnasında kullanılan ayırma metotlarının enzimi denatüre etmesi ve tekrar kullanılmasını sınırlamasıdır. Bu sorun enzimlerin sabitlemesi ile çözülmüştür [18]. Bu sayede birçok enzim ve mikroorganizma sabitleme sonrasında sürekli kullanılabilir. Enzimlerle gerçekleştirilen biyotransformasyon çalışmalarındaki bir diğer sorun ise çoğu organik substratın sudaki düşük çözünürlüğüdür. 1985’de özellikle lipazlar gibi bazı

enzimlerin organik çözücüler içerisinde kullanılabilceği gösterilmiştir ve bu şekildeki biyotransformasyonlar giderek yaygınlaşmıştır [3].

2.2. Enzimler, Avantajları ve Dezavantajları

Biyotransformasyonlar için kullanılan enzimler serbest halde, sabitlenmiş halde veya çeşitli biyolojik sistemlerin bünyesinde bulunabilir. Günümüzde birçok enzim izole edilerek ve bazı enzimler ticari olarak elde edilerek biyotransformasyonlar için kullanılmaktadır. Enzimler, Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim Komisyonu tarafından sırasıyla oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlar olmak üzere altı ayrı sınıfa ayrılmıştır. Her bir sınıf ise kendi içerisinde 4-13 arası alt sınıflara ayrılmaktadır [5].

Oksidoredüktazlar sınıfı, dehidrojenazlar, redüktazlar, oksijenazlar, oksidazlar gibi 2 ayrı substrat arasındaki redoks reaksiyonlarını katalizleyen enzimleri içerirler. Transferazlar ise 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 hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Liyazlar substratlardan belirli grupların ayrılması ile çift bağ oluşumunu ve ayrıca çift bağlara katılmaları katalizleyen enzimlerdir. İzomerazlar; rasemaz, epimeraz, mutaz gibi isimlerle anılan enzimleri içerirler ve çeşitli izomerlerin birbirlerine dönüşümünü katalizlerler. Ligazlar iki substratın birbirlerine bağlanmasını katalizleyen enzimlerdir [5].

Enzimler ile ilgili pahalı oldukları, oldukça duyarlı oldukları, sadece kendi doğal substratları ve kendi doğal çevreleri üzerinde etkili oldukları şeklinde pek çok enzim için geçerli olmayan bazı önyargılar vardır [18].

Enzimlerin biyokatalizör olarak birçok avantajı vardır. Örneğin enzimler, çok hızlı çalışan biyokatalizörlerdir ve enzimatik bir reaksiyon enzimatik olmayan bir reaksiyona göre 10^8 - 10^{10} kat daha hızlı gerçekleşir. Enzimatik reaksiyonlarda

katalizör oranı % 10^{-3} - 10^{-4} mol arasında olması istenirken, kimyasal katalizörlü bir reaksiyonda bu oran % 0,1-1 mol aralığına kadar çıkabilir.

Enzimler doğada tamamen parçalanabilirler ve bu özellikleri sayesinde katalizör olarak kullanılan ağır metaller ve sentetik amaçlı kullanılan çoğu reaktifin aksine çevreye uyumlu biyomoleküllerdir.

Sentetik amaçlı kullanılan çoğu reaktifin aksine, enzimler ılıman şartlarda etkili biyomoleküllerdir. Enzimler genellikle pH 5-8 aralığında ve sıcaklığın 20-40 °C arası olduğu ılıman şartlar altında çalışırlar. Bu sayede sentetik metotlarla sıklıkla karşılaşılan izomerleşme, rasemizasyon, çevrilme ve bozunma gibi yan reaksiyonlar azaltılabilmektedir.

Enzimler çoğu zaman kendi doğal rollerinden farklılık gösterebilirler. Örneğin çoğu enzim, geniş bir substrat spektrumuna sahiptir ve bu sayede birçok doğal veya sentetik bileşik üzerinde etkili olabilir. Ayrıca bazı enzimler gerektiğinde organik çözücülerde de kullanılabilirler.

Enzimler genellikle aynı ve benzer şartlar altında etkilidir ve bu sayede bir reaksiyon ağındaki birkaç seri reaksiyon aynı ortamda gerçekleşebilir. Metabolik yollardaki multienzim sistemleri bu şekilde çalışmaktadır.

Enzimlerin geniş bir reaksiyon çeşitliliği vardır. Hemen her sentetik reaksiyona eş değer bir enzimatik reaksiyon söz konusudur. Enzimler ile gerçekleşen reaksiyonlara 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, amonyak ve hidrojen siyanür ilavesi veya eliminasyonu, açiloin ve aldol reaksiyonları, Michael katılma reaksiyonu ve Diels-Alder reaksiyonları örnek olarak verilebilir.

Enzimler bölgesel seçici ve diastereoseçici biyomoleküllerdir ve kompleks üç boyutlu yapıları sayesinde aynı substrat molekülünün üzerinde bulunan farklı bölgelerdeki fonksiyonel grupları dahi ayırt edebilirler.

Enzimler kimyasal seçici biyomoleküllerdir, bu özellikleri ile belirli bir fonksiyonel grup üzerinde etkili olurlar ve duyarlı diğer fonksiyonel grupları etkilemezler, bu sayede yan ürünlerin oluşmasına engel olurlar.

Enzimler enantioseçici biyomoleküllerdir. L-amino asitlerden oluştuklarından 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 olasıdır.

Enzimlerin yukarıda belirtilen özellikleri sayesinde organik sentez yöntemleriyle gerçekleştirilebilmesi çok zor ya da imkansız olan reaksiyonlar enzimler sayesinde kolaylıkla gerçekleştirilebilmektedirler.

Enzimlerin biyokatalizörler olarak kullanılmasında bazı dezavantajlar da vardır [18]. Örneğin enzimler doğada sadece bir enantiyomerik forma sahip olmaları ve diğer enantiyomerik formlarının D-amino asitlerden sentezi için genel bir yol olmaması sebebi ile sadece belirli bir enantiyomer ile reaksiyona girebilirler. Bu durumda diğer enantiyomerik ürünün elde edilmesi için zıt bir stereokimyasal seçiciliğe sahip bir enzim kullanılması gereklidir.

Enzimlerin değişkenleri sınırlıdır. Yavaş gerçekleşen bir enzimatik reaksiyonu hızlandırmak için sıcaklık ve pH gibi değişkenler, enzimlerin protein yapısı sebebi ile genellikle fazla değiştirilemez.

Enzimler için en uygun reaksiyon ortamı sudur, ancak çoğu organik bileşiğin sudaki çözünürlükleri oldukça düşüktür. Enzimatik bir reaksiyonun sulu bir ortam yerine

organik bir çözücüde gerçekleştirilmesi çoğu zaman enzimlerin denatürasyonuna ve böylelikle aktivite kaybına sebep olmaktadır.

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

Enzimler kendi doğal kofaktörlerine bağımlıdır. Enzimatik reaksiyonlarda NADH ve NADPH gibi kofaktörler rol oynuyorsa bu kofaktörlerin bizzat kendilerinin reaksiyon ortamında olmaları ve yenilenmeleri gerekir. Kofaktörlerin genelde kararsız moleküller olması, sentetik eşdeğerleri ile yer değıştirmelerinin mümkün olmaması ve oldukça pahalı olmaları enzimatik reaksiyonların önemli dezavantajlarındanır.

Enzimler alerjik reaksiyonlara sebep olabilirler. Bu biyomoleküller kimyasal maddeler olarak değerlendirilir ve dikkatli kullanılırsa, bu özellikleri en aza indirilebilir [18].

2.3. Biyotransformasyon Teknikleri

Biyotransformasyonlar genelde izole enzimler veya bütün hücre sistemleri ile olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleştirilir. Bütün hücre sistemleri tabiri genel olarak mikroorganizmalar ile bitki ve hayvanlara ait hücre, doku ve organ kültürlerini içerir [18, 19].

Biyotransformasyon reaksiyonlarında genellikle bütün hücre sistemleri tercih edilmektedir. Bunun en önemli sebeplerinden biri çoğu hücre içi enzimin hücre dışında kararsız olabilmesi, hücre içi enzimlerin homojenasyon sırasında bazı proteolitik enzimlerin etkisi ile hidrolizlenmesi, hücre içi enzimlerin kofaktör

ihtiyaçlarının sağlanması ve sürekli yenilenmesi, hücre içi enzimlerin izolasyonunun zorluğu ve yüksek maliyeti sayılabilir [19].

Enzimler veya bütün hücre sistemlerinin kullanıldığı biyotransformasyonlar birçok farklı şekillerde gerçekleştirilebilirler. Bu biyotransformasyon teknikleri hakkında aşağıda kısaca bilgi verilmiştir [6].

2.3.1. Sabitlenmiş hücreler ile biyotransformasyon

Mikroorganizmalar, rn ve substratın geçişine izin verecek şekilde poliakrilamid, kappa-karragenan, alginat, selüloz, nişasta gibi bir polimer matrikste sabitlenmiş hale getirilir. Sabitlenmiş hale getirilen hücreler, istenildiği anda ortamdan uzaklaştırılabilir ve yeniden kullanılabilirler. Bu yöntemle sürekli biyotransformasyon işlemleri gerçekleştirilebilir. *Mortierella isabellinan*'ın alginat ile, *Penicillium raistrickii*'nin sporlarının çapraz bağlı polimerler ve alginatta tutulması ve *Rhizopus nigricans* sporlarının poliakrilamid, agar ve chitosan matrikslerde tutulmasıyla değişik sabitlenmiş hücrelerin elde edilmesi, örnek olarak verilebilir [6].

2.3.2. Serbest ve sabitlenmiş enzimler ile biyotransformasyon

Sabitlenmiş hücrelerin biyotransformasyon amacıyla kullanılmasının ekonomik açıdan avantajları vardır. Bu yöntemin en önemli dezavantajı ise çok basit bir hücrenin bile binlerce enzim sistemini içermesi ve istenmeyen yan reaksiyonlara neden olmasıdır. Serbest enzimler pahalı maddelerdir, fakat saf olmalarından dolayı tek tip reaksiyonları gerçekleştirmeleri nedeniyle tercih edilirler. Son dönemlerde izole enzim sistemleri yerine daha ucuz olan sabitlenmiş formlarının kullanılması, ekonomik açıdan büyük avantaj sağladıklarından, yaygınlaşmıştır [6, 20-22].

2.3.3. İzole enzimler ile biyotransformasyon

Bu gibi enzimlerin çoğunluğu sitokrom P450 monooksijenaz enzimleridir ve steroid hormonların hidrosillenmesi reaksiyonlarında önemli bir yer tutarlar. *Pycomyces blakesleanus*'dan izole edilen hidrosilaz enzimleri, steroidlerde 7 α - ve 15 β - seçiciliği gösterirler. Ayrıca *Mucor pirifermis*'in izole enzimleri de 14 α -hidrosilazlar olarak bilinir [3, 6, 20-22].

2.3.4. Sporlar ile biyotransformasyon

Bu yöntemde mikroorganizmaların sporları kullanılmaktadır. Uygun besi ortamı koşullarında üretilen mikroorganizmaların sporları misellerden ayrılmakta ve soğuk ortamda saklanmaktadır. Bu yöntemin en önemli avantajı, sporların kolayca depolanması ve defalarca kullanılabilmesidir [6, 20-22].

2.3.5. Durağan hücreler ile biyotransformasyon

Biyotransformasyon çalışmalarında durağan (stasyoner) hücreler de kullanılabilir. Hücreler veya mikroorganizmalar geliştirildikleri ve kendilerine has besiyerlerinden filtrasyon veya santrifüjleme gibi teknikler ile ayrılırlar ve biyotransformasyon çalışmasının yapılacağı asıl ortama dağıtılırlar. Bu yeni ortama daha sonra substrat ilavesi yapılır ve biyotransformasyonlar gerçekleştirilir. Bu yöntemin biyotransformasyon süresince ortamdaki hücre sayısının sabit kalması ve ürünün izolasyonunun kolay olması gibi iki önemli avantajı vardır [6].

2.3.6. Büyüyen hücreler ile biyotransformasyon

Mikroorganizmalar, belirlenen en ideal besi ortamında geliştirilir ve daha sonra ortama biyotransformasyon için substrat ilave edilir. Bu yöntemin en önemli yanı yüksek verim elde edilme olasılığıdır [6, 20-22].

2.4. Mikrobiyal Biyotransformasyonlar

Mikrobiyal hücreler biyotransformasyon reaksiyonları için kullanılan bütün hücre sistemleri içinde en çok tercih edilenlerdir [18]. Mikrobiyal hücrelerin büyüme ve gelişme hızı, bitki ve hayvan hücrelerine göre çok daha yüksektir. Bu da mikrobiyal hücreler ile biyotransformasyonların hızlı ve kısa sürede gerçekleşmesini sağlar. Mikrobiyal hücreler, küçük boyutları ve etkili hücre duvarı yapıları sayesinde bitki ve hayvan hücrelerine göre mekanik olarak daha kararlıdır ve bu sayede değişik kültür tekniklerinde bu tip hücrelerin ortama uyumu açısından avantajlıdır. Ayrıca mikrobiyal hücreler bitki ve hayvan hücrelerine göre çok daha farklı tipte substratları metabolize edebilirler.

Günümüzde mikrobiyal biyotransformasyonlar, diğer kimyasal sentez metotlarına karşı olan avantajları sayesinde, biyoteknolojinin temel öğeleri haline gelmiştir [18].

Mikroorganizmalar genetik olarak değiştirilebilirler. Mikroorganizmalar üzerinde gerçekleştirilen genetik değişiklikler ve diğer kimyasal yöntemler ile düşük verimle elde edilen önemli ürünler, daha yüksek verimlerde elde edilebilir. Hatta genetik değişiklikler ile ürünler üzerinde istenilen değişikliklerin sağlanması bile mümkün olabilmektedir [17].

Mikroorganizmalar, yapılarındaki spesifik olmayan enzim sistemleri sayesinde, hem doğal hem de sentetik çok sayıdaki farklı substrat üzerinde bir çok farklı kimyasal reaksiyonu gerçekleştirebilir [3].

Mikrobiyal biyotransformasyonlar, klasik kimyasal metotlara göre, çok daha ılıman şartlarda gerçekleşir. Pek çok mikrobiyal biyotransformasyon oda sıcaklığında ve 1 atmosfer basınç altında gerçekleşmektedir [18].

Mikrobiyal biyotransformasyonlar klasik kimyasal metotlara göre daha ucuza mal olur ve daha kısa sürede gerçekleştirilir. Hedef bileşikler daha kısa süreler içerisinde

ve genellikle daha yüksek verimlerde, kimyasal reaktiflere göre çok ucuza mal edilen besiyeri bileşenleri ve mikroorganizmalar kullanılarak elde edilmektedir [3, 18].

Mikrobiyal biyotransformasyonlar çevre dostudur. Klasik kimyasal sentez metotlarında kullanılan çoğu reaktif, çevreye çok büyük zararlar vermektedir [3].

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 [18].

Klasik kimyasal sentez yöntemlerinin aksine mikrobiyal biyotransformasyonlar esnasında substratlar üzerindeki diğer fonksiyonel grupların korunması gerekmez. Bu üstünlük enzimlerin bölgesel seçicilikleri sebebi ile ortaya çıkar [3, 18].

Mikrobiyal biyotransformasyonlar genel olarak fonksiyonel grupların varlığına ihtiyaç duymaz. Örneğin, mikrobiyal hidrosillenmeler fonksiyonel grupların uzağında meydana gelir [3].

Mikroorganizmalar değişik ortamlara kolayca uyum sağlayabilirler. Bu özellikleri sayesinde erlenden fabrika fermentörlerine kadar birçok ortama kolayca uyarlanarak kullanılabilirler [3, 17, 18].

Mikrobiyal biyotransformasyonlar için çeşitli mikroorganizmalar uygun yüzeylere sabitlenmiş olarak kullanılabilir. Biyotransformasyonlarda 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 [17].

Mikroorganizmalar ile birçok sentetik reaksiyona eş değer reaksiyon gerçekleştirilebilmektedir. Buna ek olarak mikrobiyal hidrosillenmeler gibi bazı

mikrobiyal biyotransformasyonlar, sentetik reaksiyonlar ile tek basamakta gerçekleştirilemez.

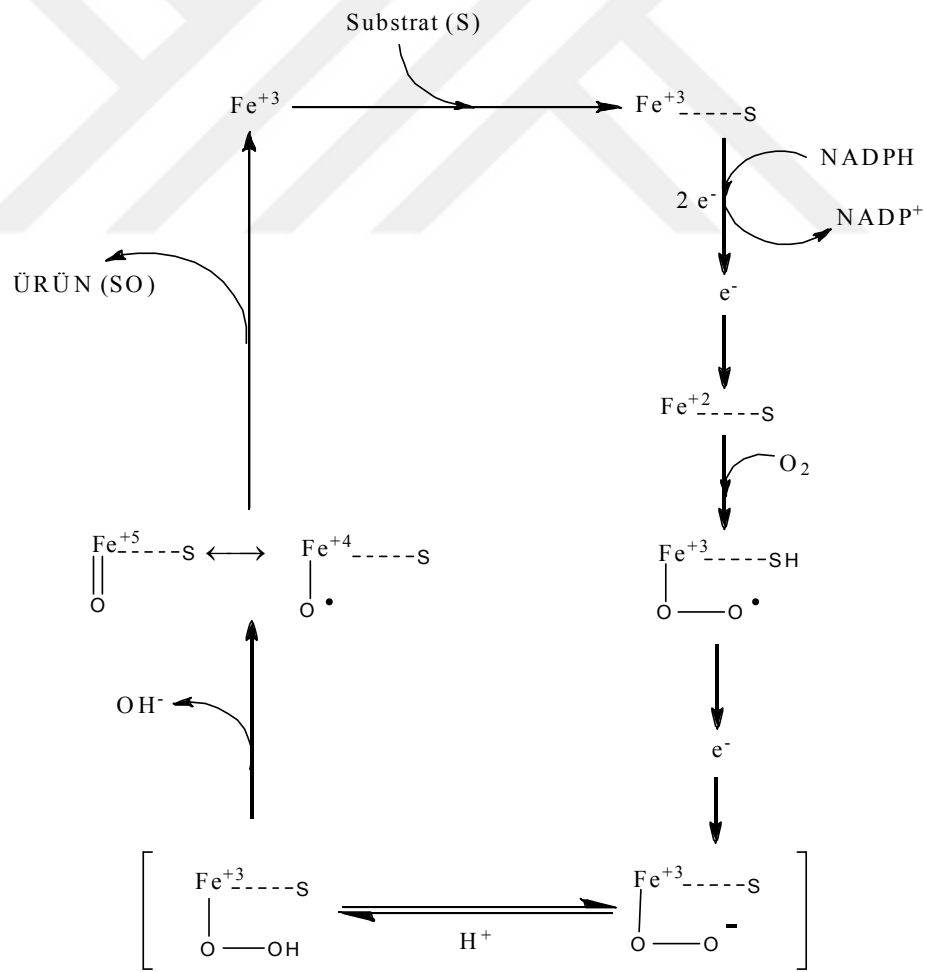
2.4.1. Mikrobiyal Hidroksillenmeler

Mikrobiyal hidroksillenmeler en önemli mikrobiyal biyotransformasyon reaksiyonlarından birisidir [3]. Mikrobiyal hidroksillenmenin 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 söz konusu sorunun *Rhizopus arrhizus* küfünün yüksek verimli bir 11 α -hidroksillenmesi ile çözülmesi dikkatleri mikrobiyal biyotransformasyonlar üzerine çekmiştir.

Bakteriler ve küflerin büyük kısmı steroidlerin hidroksillenmesini gerçekleştirebilirler [3]. Bu durum hem mikrobiyal hidroksillenmenin mekanizması hem de steroidlerin mikrobiyal hidroksillenmesinin modellenmesi konusunda bilgi sağlamaktadır [23].

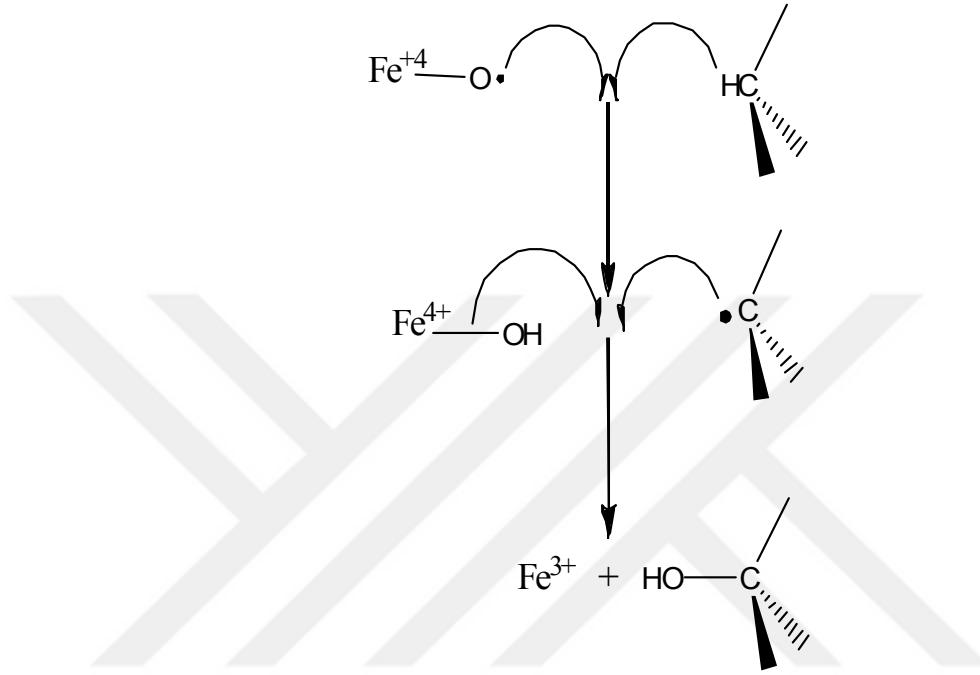
Steroidlerin mikrobiyal hidroksillenmesini çoğu canlılarda bulunan sitokrom P-450 enzimlerince katalizlendiği düşünülmektedir [3]. Mikrobiyal hidroksillenmenin gerçekleşmesi için ayrıca O₂, NADH veya NADPH gibi bir hidrojen kaynağı ve 1 molekül H₂O gerekmektedir [23]. Mikrobiyal hidroksillenmenin mekanizması özellikle *Pseudomonas putida* bakterisinin kamfor bileşiğinin hidroksillenmesini katalizleyen kamfor hidroksilaz enzimine ait sitokrom P-450 üzerinde çalışılarak ortaya çıkarılmıştır [3]. Sitokrom P-450'nin yapısı X ışınları kristallografi tekniği ile aydınlatılmıştır [23]. Kristal yapı tayinleri kamfor bileşiğinin enzimin aktif merkezine iki etkileşim ile sıkıca bağlı olduğunu göstermiştir. Birinci etkileşim kamforun karbonil grubu ile aktif merkezdeki bir tirozinin hidroksil grubu arasındaki hidrojen bağı iken ikinci etkileşimin kamfor molekülü ile çevresindeki alifatik ve aromatik amino asitler arasındaki hidrofobik etkileşimler olduğu görülmüştür.

Şekil 2.2.'de görüldüğü gibi mikrobiyal hidroksillenme sırasında diatomik moleküler oksijenin bir atomu organik substrata bağlanmaktadır [3,23,24]. İndirgeyici 2 elektron genellikle NADPH bazen ise NADH'dan sağlanmaktadır. İlk adımda substrat bağlanması gerçekleşir ve bu bağlanma diatomik oksijenin atomlarından birisinin demire bağlanabilmesi için elzemdir. Substrat bağlandıktan sonra bir elektronun nakli ile Fe^{+3} , Fe^{+2} 'ye indirgenmektedir. Elektronların teker teker nakli mikrobun türüne göre NADPH veya NADH'dan bir flavin nükleotid, Fe-S proteinleri ve/veya sitokrom b_5 vasıtası ile gerçekleşmektedir. Moleküler oksijen ilk elektron naklinden sonra bağlanır. Moleküler oksijenin bağlanmasını ikinci elektronun O-O bağına nakledilmesi izler. Bu nakil sonrasında O-O bağı kopar ve bir oksijen atomu su molekülü olarak ayrılırken Fe^{+3} , Fe^{+4} 'e oksitlenmektedir. Bu oksidasyon ile oluşan son oksidant artık substratla reaksiyona girebilir.



Şekil 2.2. Substrata bir O atomunun ilave edilmesinin mekanizması [3].

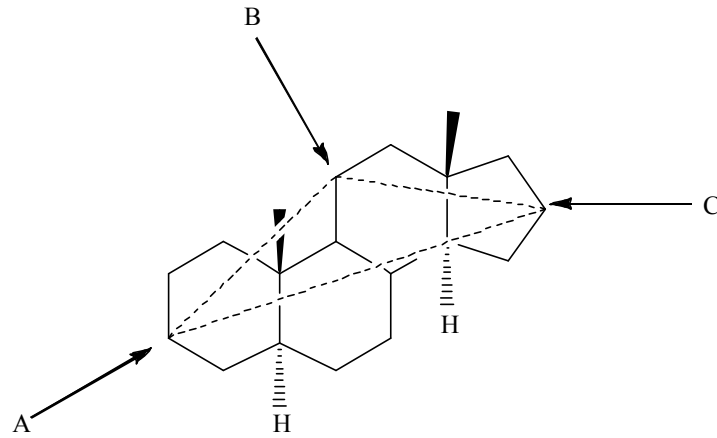
Oksidant ve substrat arasındaki reaksiyonun mekanizması henüz yeterince anlaşılmasına rağmen oksidant ve substrat arasındaki reaksiyonun Şekil 2.3.'deki gibi muhtemelen radikalleri içeren bir mekanizma ile gerçekleştiği düşünülmektedir [23].



Şekil 2.3. Oksidant ve substrat arasındaki radikalleri içeren mekanizma [3].

2.4.2. Steroidlerin mikrobiyal hidrosillenme modelleri

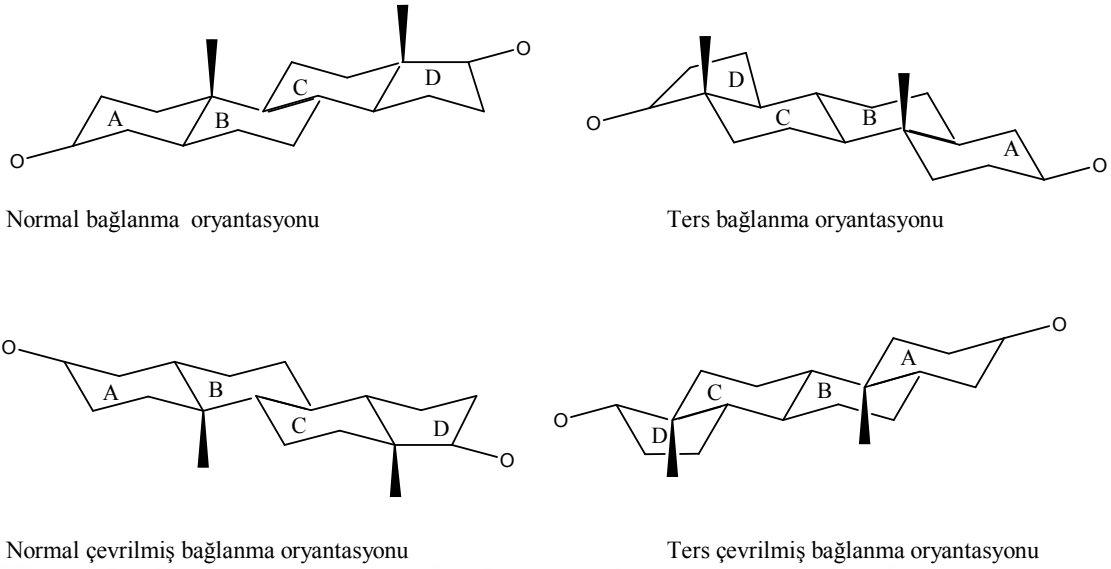
Jones ve grubunun çalışmalarında bir oksijen fonksiyonu ($-CO$ veya $-COH$ gibi) içeren 5α -H androstanların küfler ile biyotransformasyonları çoğunlukla ikili hidrosillenmeler ile sonuçlanırken iki oksijen fonksiyonu içeren 5α -H androstanların küfler ile biyotransformasyonları çoğunlukla tekli hidrosillenmeler ile sonuçlanmıştır. Bu durum Jones modelinin ortaya atılmasına sebep olmuştur. Bu modele göre (Şekil 2.4.) hidrosilaz enzimlerinde 3 aktif merkez vardır ve steroidlerin hidrosillenmesi ile substratın enzime bağlanmasında bu 3 aktif merkez rol oynamaktadır [25].



Şekil 2.4. Enzim-substrat etkileşimin Jones modeli [25].

Enzimlerin üzerindeki bu merkezler steroidlerin C-3, C-11 ve C-16 (normal bağlanma) veya C-3, C-6 (C-7) ve C-16 (ters bağlanma) atomlarına denk gelen hayali bir üçgen olarak verilebilir. Bu modele göre oksijenli merkezler ve bağlanma noktalarındaki oryantasyonları hidroksillenme pozisyonunu belirlemektedir. Mesala, A halkasındaki bir oksijen fonksiyonu hidroksillenmeyi D halkasına yönlendirirken, D halkasındaki bir oksijen fonksiyonu hidroksillenmeyi A halkasına yönlendirir. Ayrıca hidroksillenmesi muhtemel bir pozisyon veya civarındaki bir oksijen fonksiyonunun belirtilen pozisyonun civarındaki hidroksillenmeleri de engellediği gözlenmiştir. Yapılan çalışmalar neticesinde steroidler üzerindeki oksijen fonksiyonlarının enzime bağlanma ve hidroksillenmeleri yönlendirmedeki etkinliklerinin 3-CO , $3\beta\text{-OH}$, $3\beta\text{-OCH}_3 > 17\text{-CO} > 3\alpha\text{-OH}$, $3\alpha\text{-OCH}_3$ şeklinde olduğu belirlenmiştir [25].

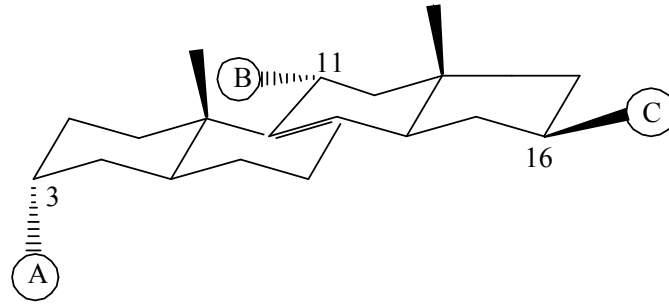
Brannon ve grubu steroid hidroksillenmesi için hidroksilaz bünyesinde dört bağlanma oryantasyonu olduğunu önermişlerdir [26]. Bunlar normal bağlanma oryantasyonu, ters bağlanma oryantasyonu, normal çevrilmiş bağlanma oryantasyonu ve ters çevrilmiş bağlanma oryantasyonlardır. Normal çevrilmiş ve ters çevrilmiş oryantasyonlar C-3 ve C-17 nolu atomları arasında aksisle 180 derecelik bir dönme ile elde edilirler. Normal ve ters oryantasyonlar daha tercih edilebilirdir ve Jones hidroksillenme modeli sadece normal ve ters bağlanma oryantasyonlarını içermektedir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Brannon modeline göre bağlanma oryantasyonları [26].

McCrinde ve grubu Jones modelini biraz daha geliştirmişlerdir. Bu modelde enzimin bünyesinde steroid halka sistemi düzleminin aşağısında ve yukarısında enzimin steroidlere bağlanabilecekleri ve steroidleri hidroksilleyebilecekleri A, B ve C ile adlandırılan özel bölgelerin olduğu düşünülmektedir. A bölgesi steroid halka sistemi düzleminin aşağısında, B bölgesi halka sistemi düzleminin aşağısında veya hizasında C bölgesi ise halka sistemi düzleminin yukarısındadır (Şekil 2.6.).

Bağlanmada A bölgesi halka sistemi düzleminin aşağısındaki oksijen atomlarını tercih eder ve hidroksillenme α -oryantasyonludur. B bölgesi de bağlanma için halka sistemi düzleminin aşağısındaki oksijen atomlarını tercih eder ama hidroksillenme α -oryantasyonlu (aksiyal veya ekvatoryal) veya β -oryantasyonludur (sadece ekvatoryal). C bölgesi ise bağlanmada halka sistemi düzleminin aşağısındaki oksijen atomlarını tercih eder ve hidroksillenme β -oryantasyonludur (sadece ekvatoryal) [27].



Şekil 2.6. Enzim-substrat etkileşimi McCrindle modeli [27].

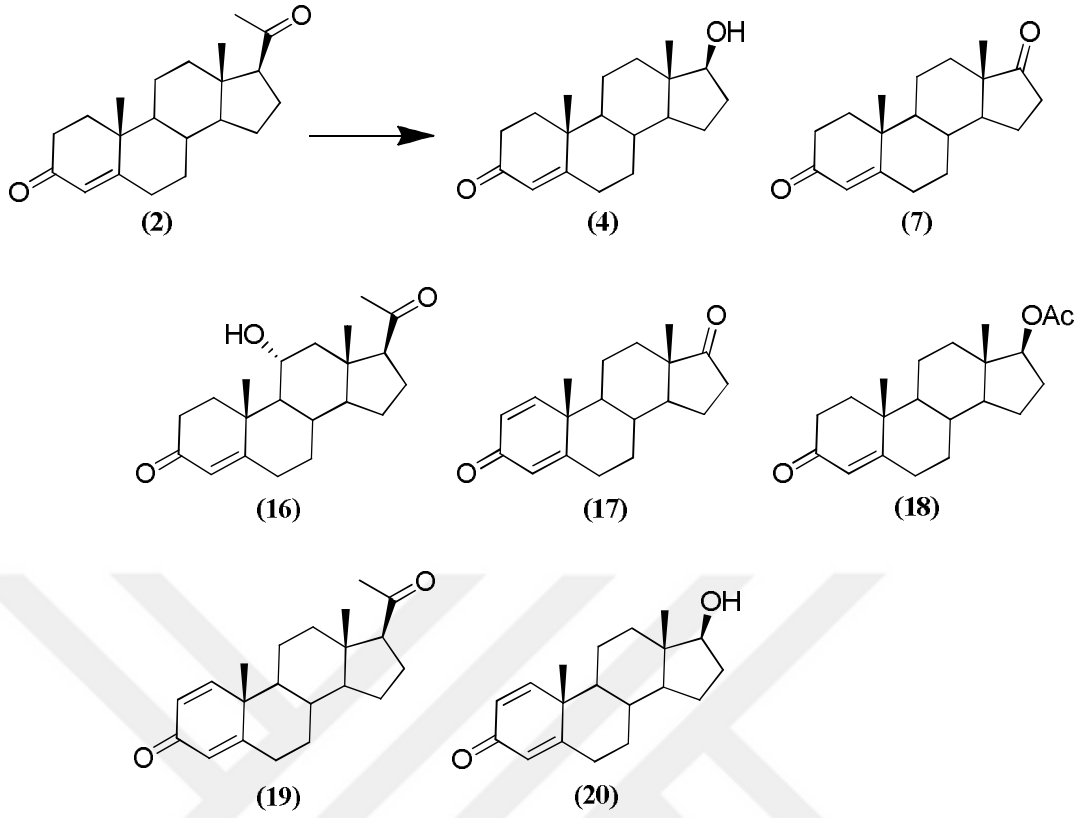
2.5. Bazı *Aspergillus* türleri ile steroid biyotransformasyonları

Küfler ile steroid biyotransformasyonları için kullanılan türlerin bir kısmı *Aspergillus* cinsine aittir. *Aspergillus* türleri ile gerçekleştirilen steroid biyotransformasyonları genellikle mikrobiyal hidroksillenmeler, Baeyer-Villiger oksidasyonları, yan zincirin uzaklaştırılması, hidroksil gruplarının oksidasyonu, keton gruplarının redüksiyonu, A halkasının aromatikleşmesi, steroid halkalarının mikrobiyal hidrojenasyonları ve dehidrojenasyonları ile sonuçlanmıştır [28,29].

2.5.1. Bazı *Aspergillus* türleri ile progesteron (2) biyotransformasyonları

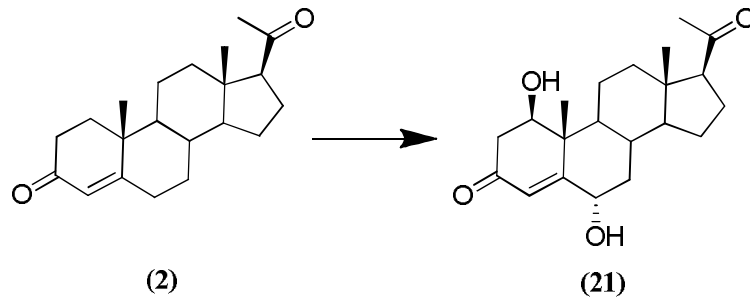
Steroid hormonlarının çıkış maddesi ve bir eşey hormonu olan progesteron (2) *Aspergillus* ve diğer mikroorganizma türleri ile en çok çalışılmış olan steroidlerden biridir [30].

Sabitlenmiş *A. ochraceus* TS sporları ile gerçekleştirilen progesteron (2) biyotransformasyonundan (Şekil 2.7.) testosteron (4), androst-4-en-3,17-dion (7), 11 α -hidroksipregn-4-en-3,20-dion (16), androsta-1,4-dien-3,17-dion (17), 17 β -asetoksiandrost-4-en-3-on (18), pregna-1,4-dien-3,20-dion (19) ve 17 β -hidroksiandrosta-1,4-dien-3-on (20) bileşikleri elde edilmiştir [31].



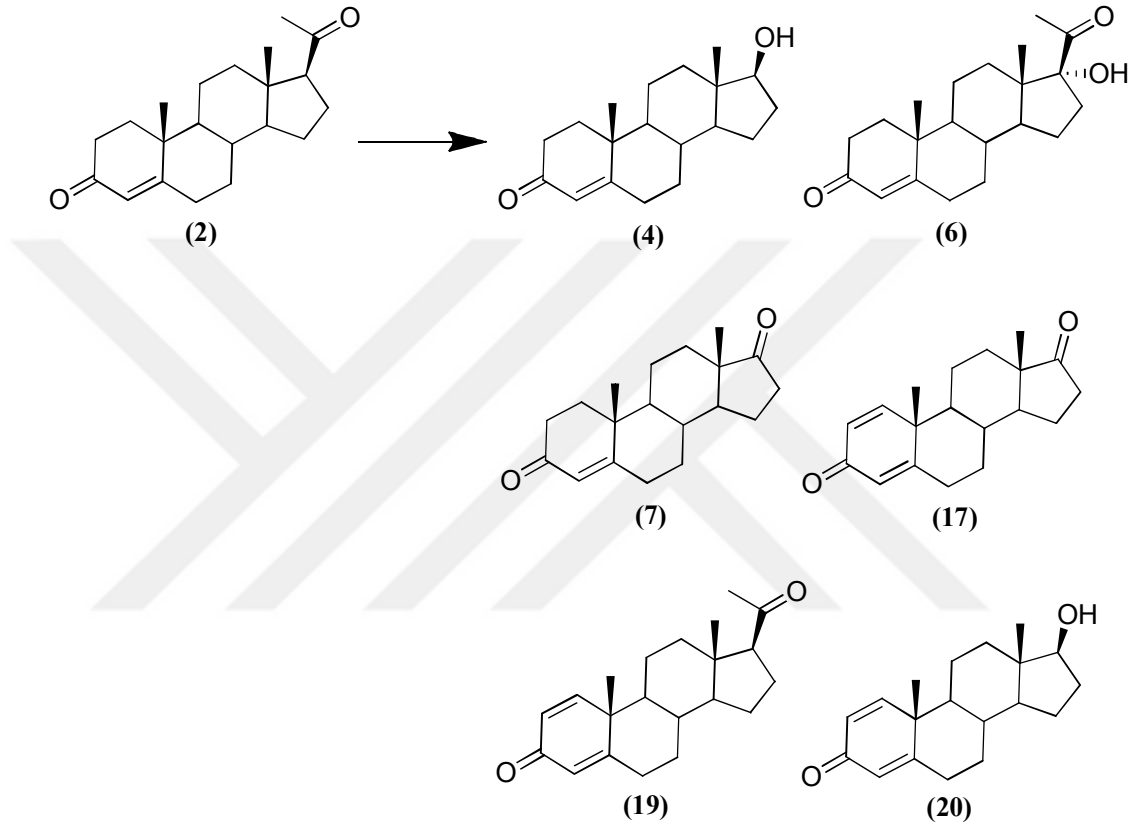
Şekil 2.7. Sabitlenmiş *A. ochraceus* TS ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu [31].

A. ochraceus NRRL 405 küfünün progesteron (2) ile inkübasyonu (Şekil 2.8.) sonucu 1 β ,6 α -dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (21) oluşmuştur [32].



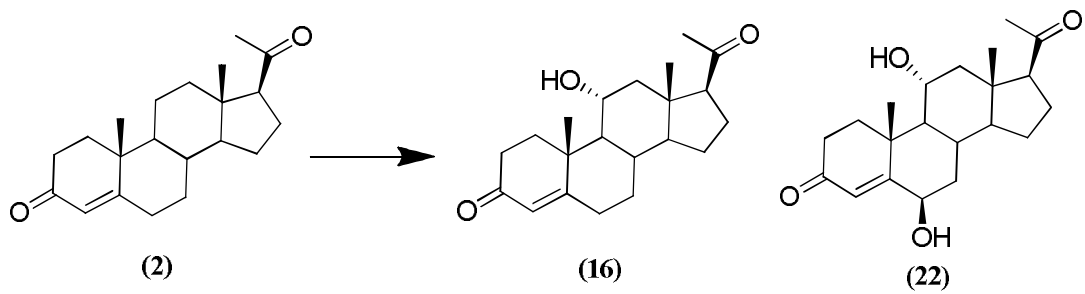
Şekil 2.8. *A. ochraceus* NRRL 405 ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu [32].

Sabitlenmiş *A. ochraceus* TS sporları ile gerçekleştirilen bir diğer progesteron (2) inkübasyonu (Şekil 2.9) ise testosteron (4), 17 α -hidroksipregn-4-en-3,20-dion (6), androst-4-en-3,17-dion (7), androsta-1,4-dien-3,17-dion (17), pregna-1,4-dien-3,20-dion (19) ve 17 β -hidroksiandrosta-1,4-dien-3-on (20) bileşikleri ile sonuçlanmıştır [33].



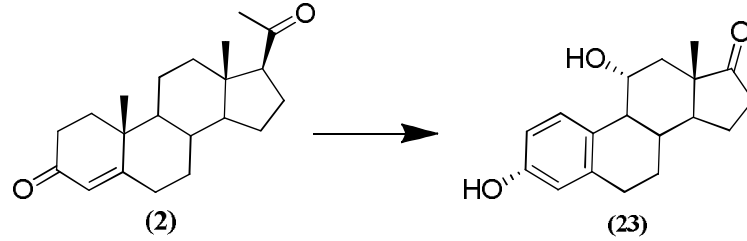
Şekil 2.9. Sabitlenmiş *A. ochraceus* TS ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu [33].

Bir *A. ochraceus* izolatu ile gerçekleştirilen progesteron (2) biyotransformasyonunda (Şekil 2.10.) 11 α -hidroksipregn-4-en-3,20-dion (16) ve 6 β ,11 α -dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (22) bileşikleri oluşmuştur [34].



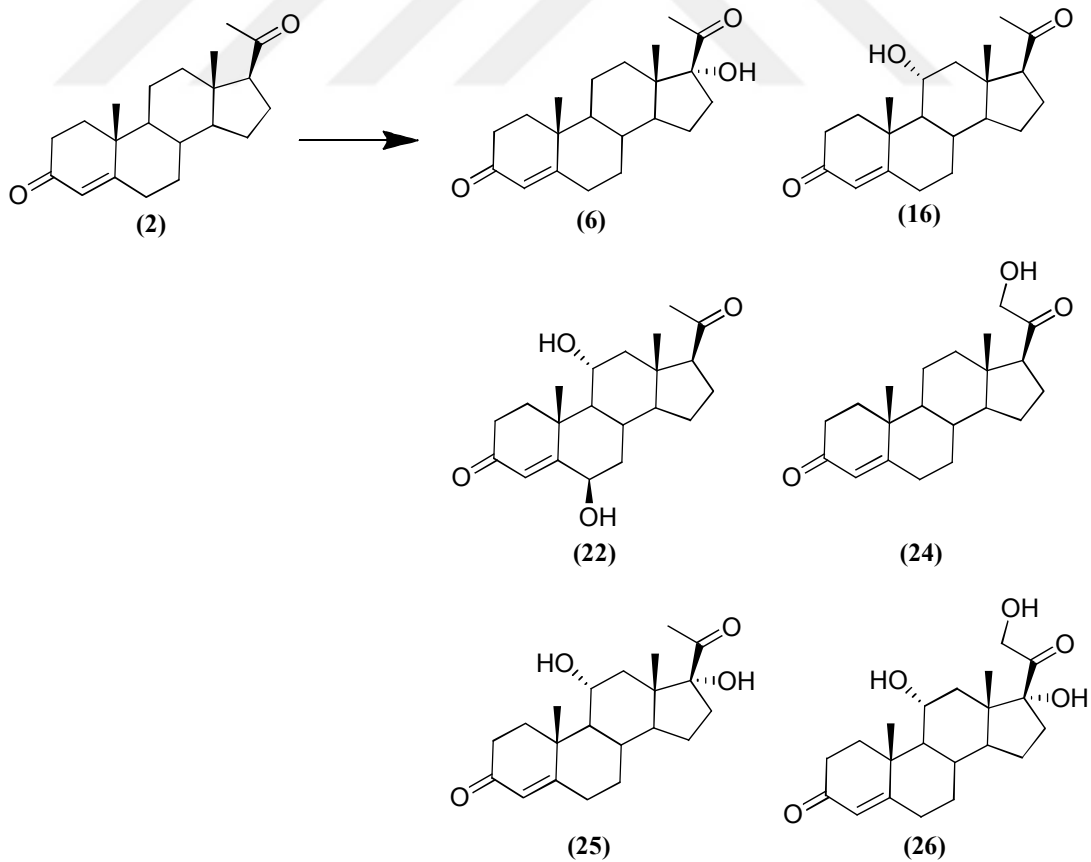
Şekil 2.10. *A. ochraceus* izolatu ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu [34].

Bir diğ er *A. ochraceus* izol at ı ile ger çek le ş tir il en prog ester on (2) ink ü ba syo nu (Ş e kil 2.11.) 3,11 α -di hi drok si es tra-1,3,5-tri en-17-on (23) bi le Ő i ğ i ni ver mi Ő tir [29].



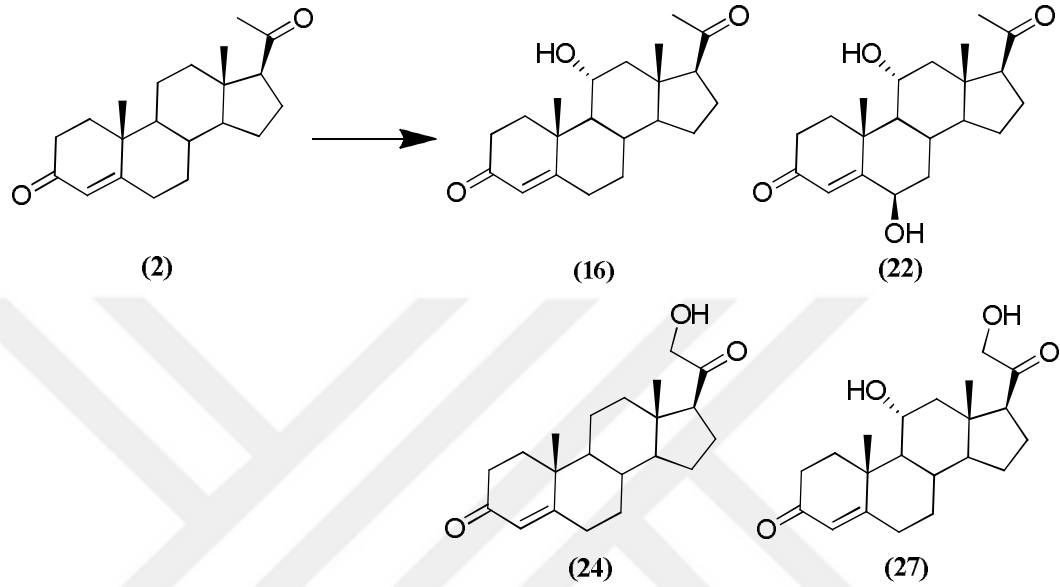
Ş e kil 2.11. *A. ochraceus* ile prog ester on (2) bi le Ő i ğ i ni n bi yo tr an s for ma syo nu [29].

A. niger 100 k ü f ü n ü n prog ester on (2) ile bi yo tr an s for ma syo nu (Ş e kil 2.12.) 17 α -hi drok si pre gn-4-en-3,20-dion (6), 11 α -hi drok si pre gn-4-en-3,20-dion (16), 6 β ,11 α -di hi drok si pre gn-4-en-3,20-dion (22), 21-hi drok si pre gn-4-en-3,20-dion (24), 11 α ,17 α -di hi drok si pre gn-4-en-3,20-dion (25) ve 11 α ,17 α ,21-tri hi drok si pre gn-4-en-3,20-dion (26) bi le Ő i k le ri ni ver mi Ő tir [35, 36].



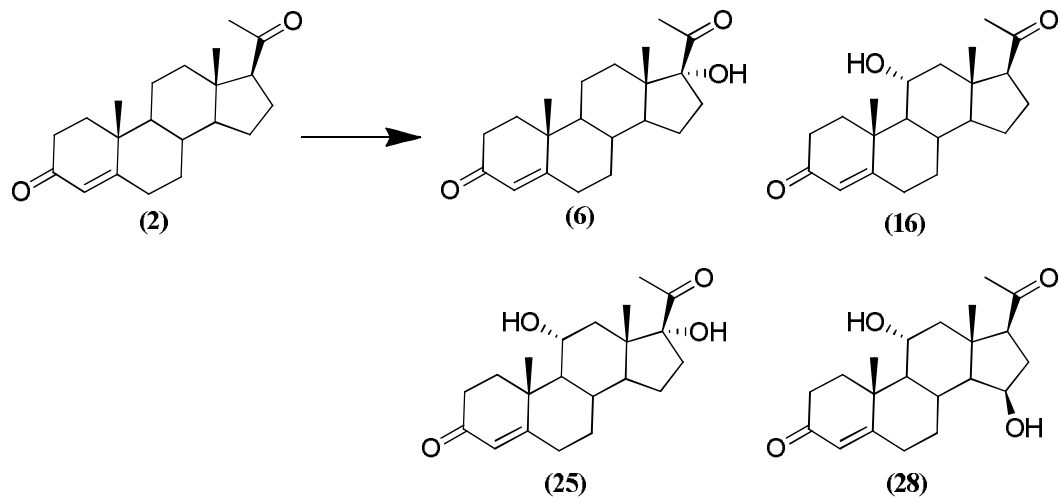
Ş e kil 2.12. *A. niger* 100 ile prog ester on (2) bi le Ő i ğ i ni n bi yo tr an s for ma syo nu [35, 36].

A. niger 567 ile progesteron (2) biyotransformasyonundan (Şekil 2.13.) 11 α -hidroksipregn-4-en-3,20-dion (16), 6 β ,11 α -dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (22), 21-hidroksipregn-4-en-3,20-dion (24), ve 11 α ,21-dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (27) bileşikleri elde edilmiştir [35, 36].



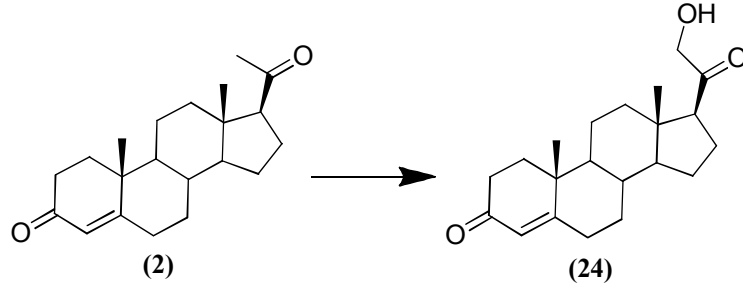
Şekil 2.13. *A. niger* 567 ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu [35, 36].

A. niger 37 küfö ile progesteron (2) inkübasyonu (Şekil 2.14) 17 α -hidroksipregn-4-en-3,20-dion (6), 11 α -hidroksipregn-4-en-3,20-dion (16), 11 α ,17 α -dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (25) ve 11 α ,15 β -dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (28) bileşiklerini vermiştir [37].



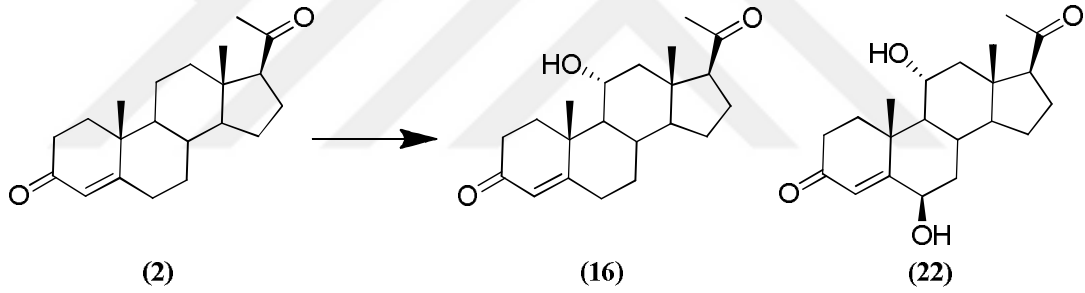
Şekil 2.14. *A. niger* 37 ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu [37].

A. niger NRRL 599 ile progesteron (2) inkübasyonu (Şekil 2.15.) sonucunda ise 21-hidroksipregn-4-en-3,20-dion (24) oluşmuştur [24].



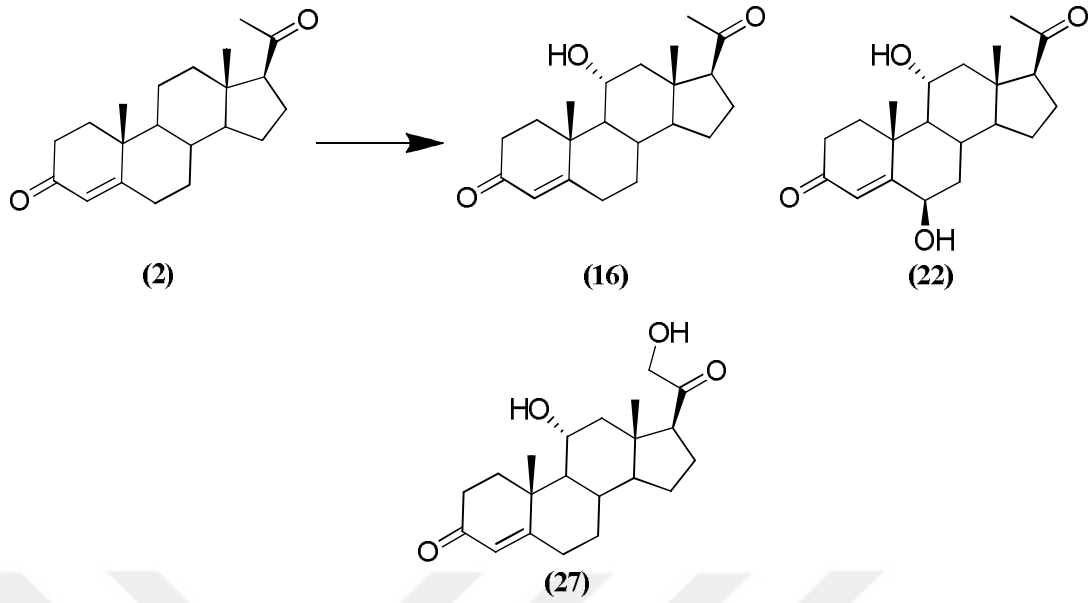
Şekil 2.15. *A. niger* NRRL 599 ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu [24].

Bir *A. niger* izolatu ile progesteron (2) biyotransformasyonu (Şekil 2.16.) 11 α -hidroksipregn-4-en-3,20-dion (16) ve 6 β ,11 α -dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (22) bileşikleri vermiştir [38].



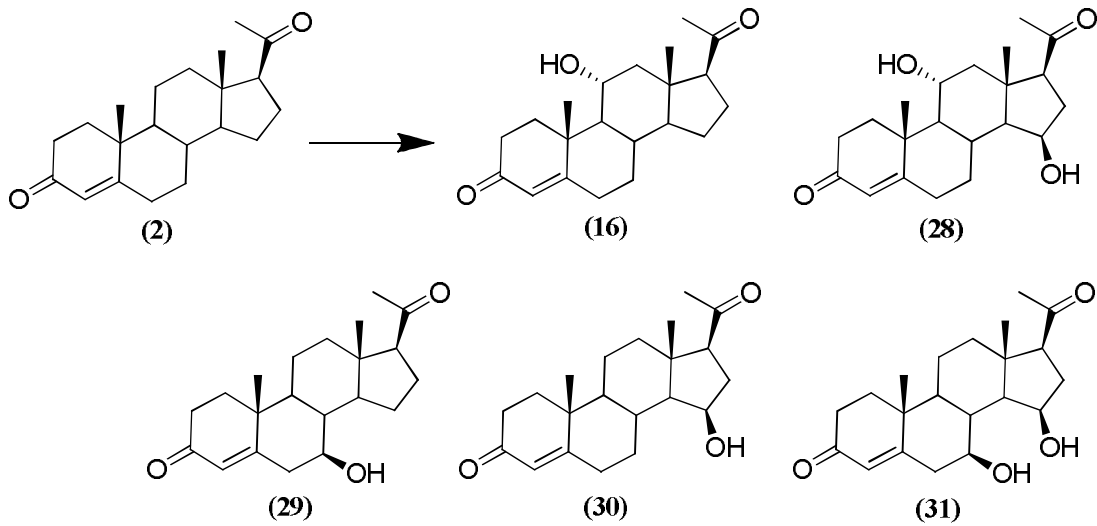
Şekil 2.16. *A. niger* ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu [38].

Progesteron (2) bileşiğinin *A. niger* 3N [35], *A. niger* 100 [35, 36] ve *A. niger* 1R [35, 36] küfleri ile biyotransformasyonlarından (Şekil 2.17.) 11 α -hidroksipregn-4-en-3,20-dion (16), 6 β ,11 α -dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (22) ve 11 α ,21-dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (27) bileşikleri oluşmuştur.



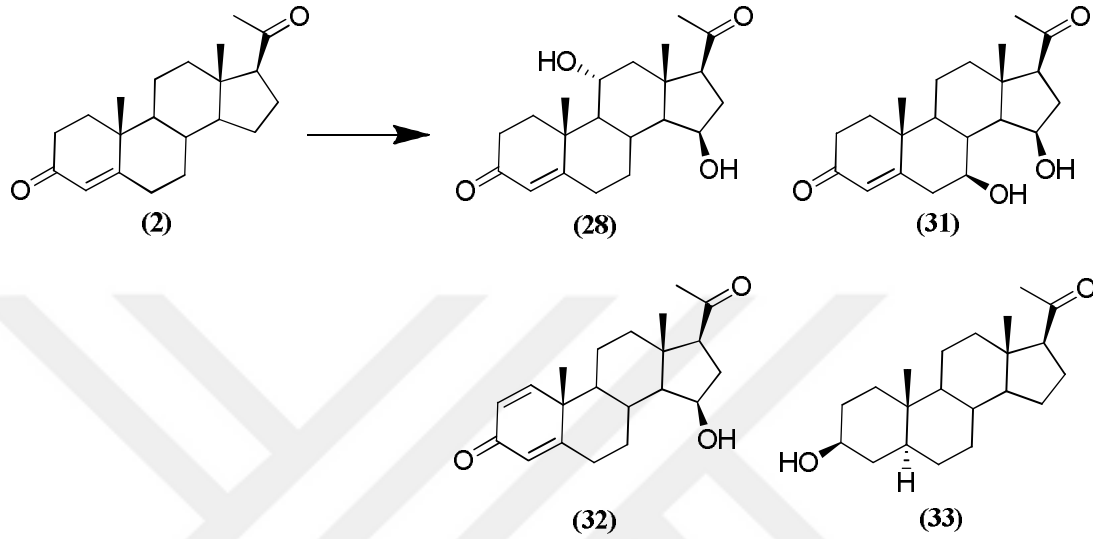
Şekil 2.17. *A. niger* 3N [35], *A. niger* 100 [35, 36] ve *A. niger* 1R [35, 36] izolatları ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu.

Bir *A. fumigatus* izolatı ile gerçekleştirilen progesteron (2) biyotransformasyonundan (Şekil 2.18.) 11 α -hidroksipregn-4-en-3,20-dion (16), 11 α ,15 β -dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (28), 7 β -hidroksipregn-4-en-3,20-dion (29), 15 β -hidroksipregn-4-en-3,20-dion (30), 7 β ,15 β -dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (31) ve bileşikleri ile sonuçlanmıştır [39].



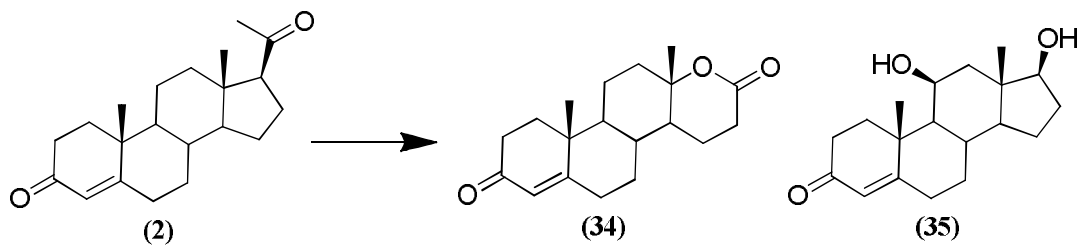
Şekil 2.18. *A. fumigatus* ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu [39].

Bir diğ er *A. fumigatus* izol at ı ile yapılan progesteron (2) biyotransformasyonundan (Ş ekil 2.19.) ise 11 α ,15 β -dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (28), 7 β ,15 β -dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (31), 15 β -hidroksipregna-1,4-dien-3,20-dion (32) ve 3 β -hidroksi-5 α -pregnan-20-on (33) bileş ikleri oluş muştur [40].



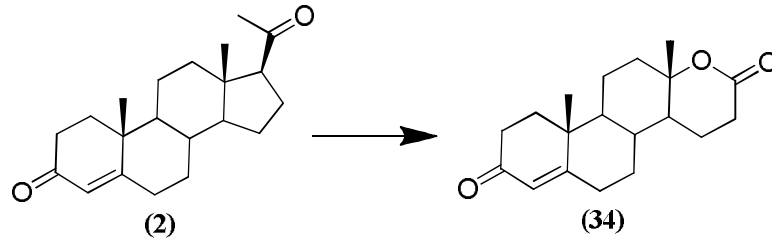
Ş ekil 2.19. *A. fumigatus* ile progesteron (2) bileş iğ inin biyotransformasyonu [40].

A. tamarii QM1223 ile yapılan progesteron (2) biyotransformasyonundan (Ş ekil 2.20.) 17 α -okza-D-homo-androst-4-en-3,17-dion (34) ve 11 β ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (35) bileş ikleri oluş muştur [41].



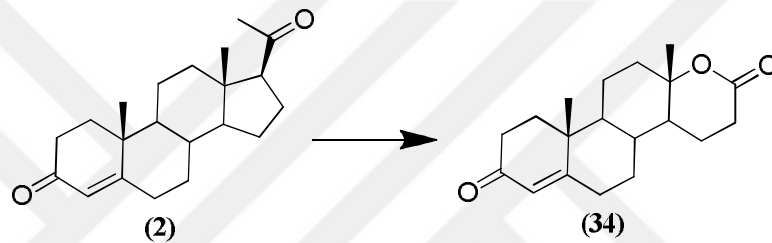
Ş ekil 2.20. *A. tamarii* QM1223 ile progesteron (2) bileş iğ inin biyotransformasyonu [41].

A. tamarii MRC 72400 ile yapılan progesteron (2) biyotransformasyonundan (Ş ekil 2.21.) ise sadece 17 α -okza-D-homo-androst-4-en-3,17-dion (34) bileş iğ i elde edilmiş tir [42].



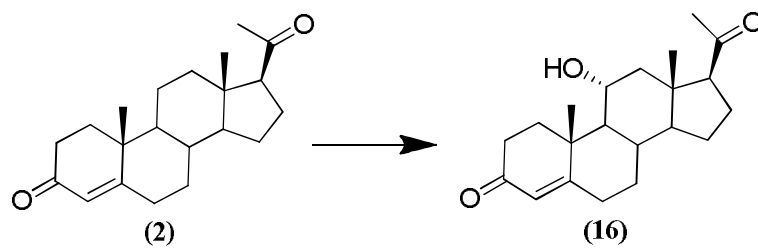
Şekil 2.21. *A. tamarii* MRC 72400 ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu [42].

A. terreus MRC 200365 küfü ile gerçekleştirilen progesteron (2) biyotransformasyonunda (Şekil 2.22.) 17α-okza-D-homo-androst-4-en-3,17-dion (34) bileşiği elde edilmiştir [43].



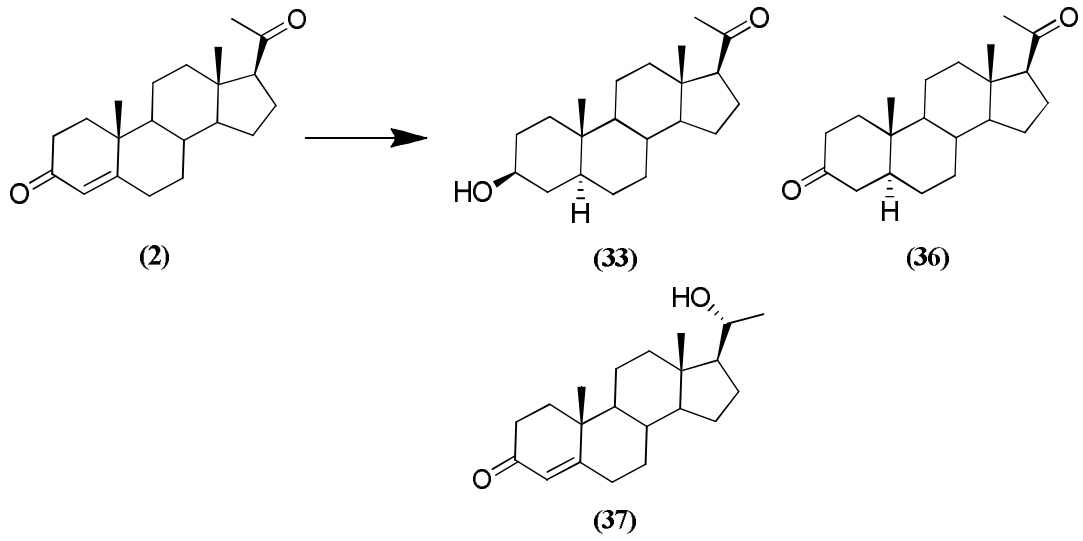
Şekil 2.22. *A. terreus* MRC 200365 ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu [43].

Sabitlenmiş bir *A. terreus* izolatu ile gerçekleştirilen progesteron (2) biyotransformasyonundan ise (Şekil 2.23.) 11α-hidroksipregn-4-en-3,20-dion (16) bileşiği elde edilmiştir [44].



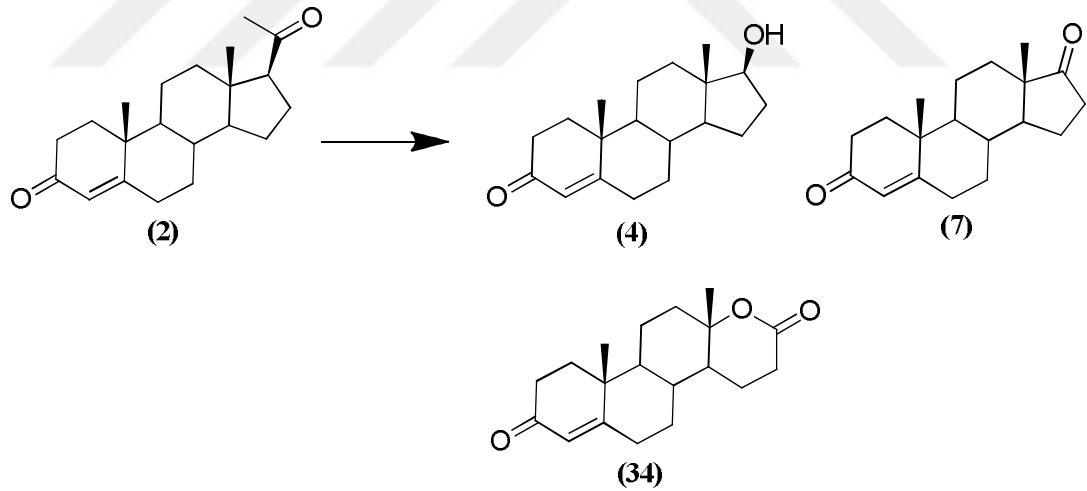
Şekil 2.23. *A. terreus* ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu [44].

A. oryzae küfü ile gerçekleştirilen progesteron (2) biyotransformasyonu (Şekil 2.24.) 3β-hidroksi-5α-pregnan-20-on (33), 5α-pregnan-3,20-dion (36) ve (20R)-20-hidroksipregn-4-en-3-on (37) ile sonuçlanmıştır [45].



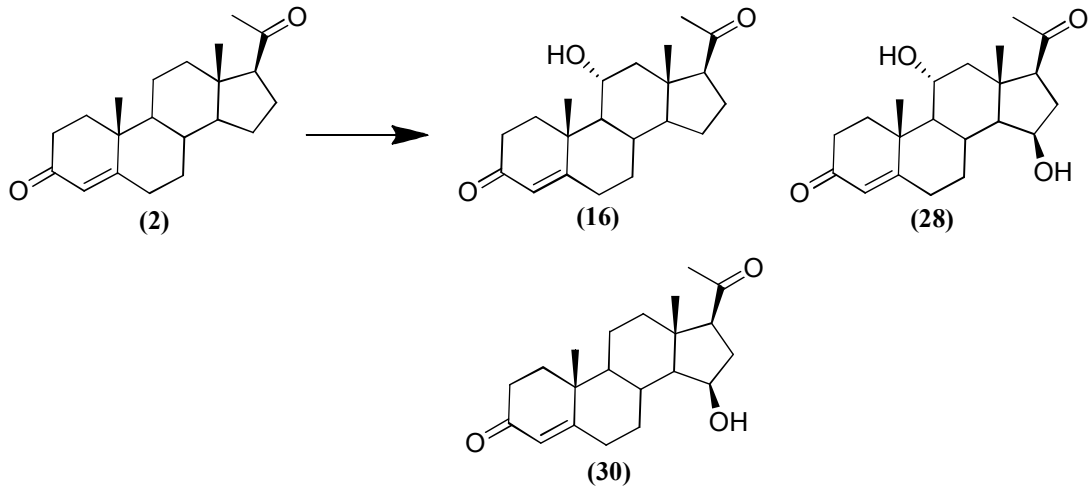
Şekil 2.24. *A. oryzae* ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu [45].

Bir diğer *A. oryzae* küfü ile progesteron (2) biyotransformasyonu (Şekil 2.25.) testosteron (4), androst-4-en-3,17-dion (7) ve 17α-okza-D-homo-androst-4-en-3,17-dion (34) bileşiklerini vermiştir [46].



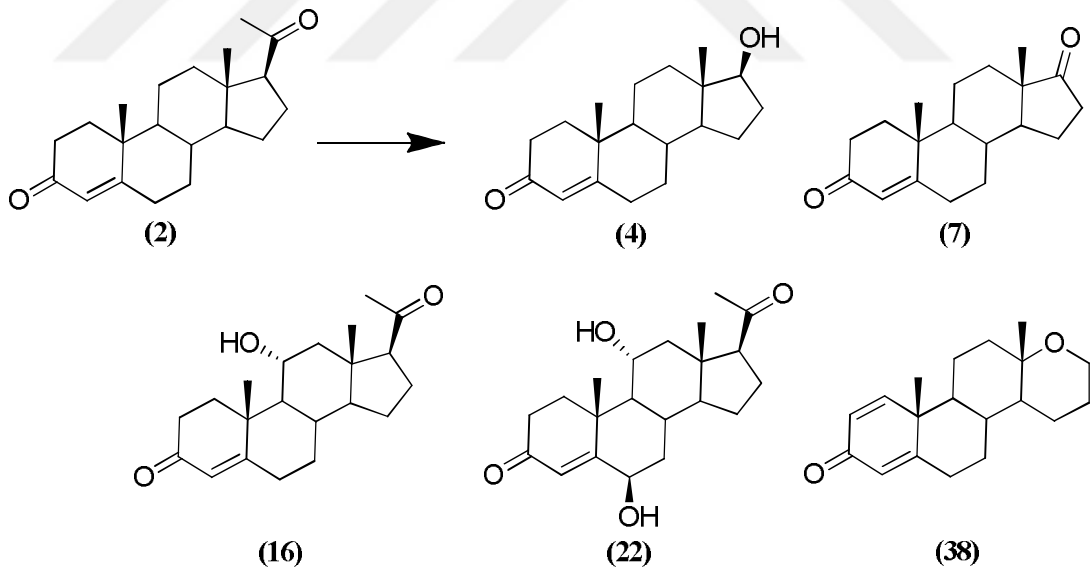
Şekil 2.25. *A. oryzae* ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu [46].

A. phoenicis küfünün bir izolatu ile gerçekleştirilen progesteron (2) inkübasyonu (Şekil 2.26) 11α-hidroksipregn-4-en-3,20-dion (16), 11α,15β-dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (28) ve 15β-hidroksipregn-4-en-3,20-dion (30) ile sonuçlanmıştır [47].



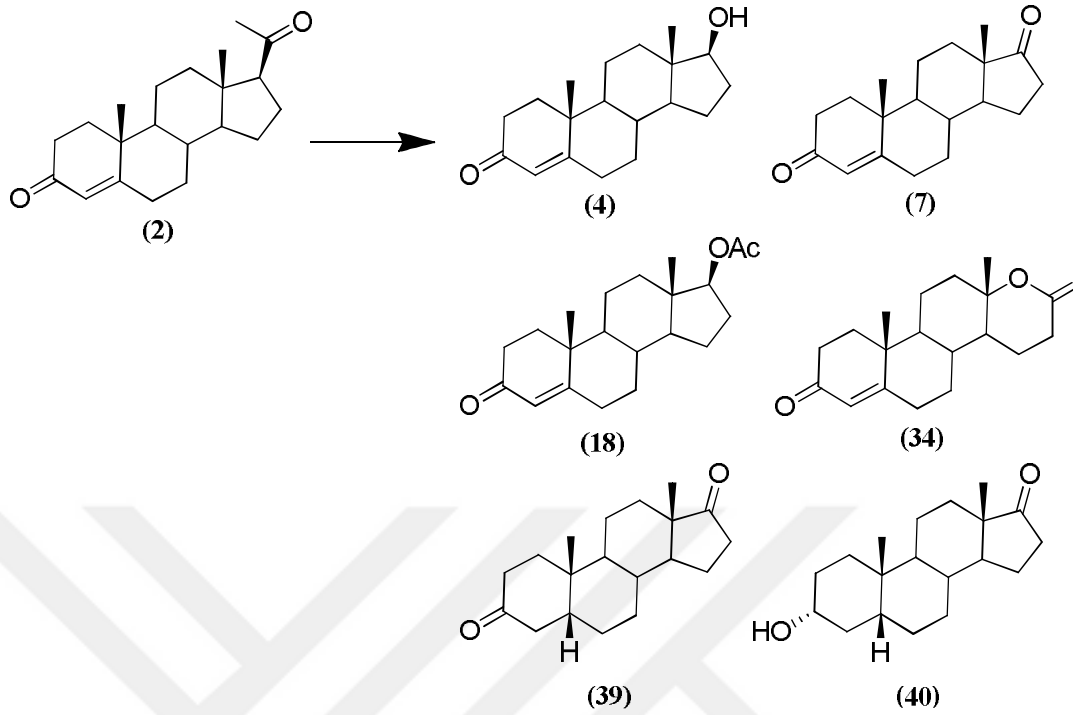
Şekil 2.26. *A. phoenicis* ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu [47].

Bir *A. fischeri* izolatu ile gerçekleştirilen progesteron (2) biyotransformasyonu (Şekil 2.27) ise testosteron (4), androst-4-en-3,17-dion (7), 11 α -hidroksipregn-4-en-3,20-dion (16), 6 β ,11 α -dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (22) ve 17 α -okza-D-homo-androsta-1,4-dien-3,17-dion (38) bileşikleri ile sonuçlanmıştır [48].



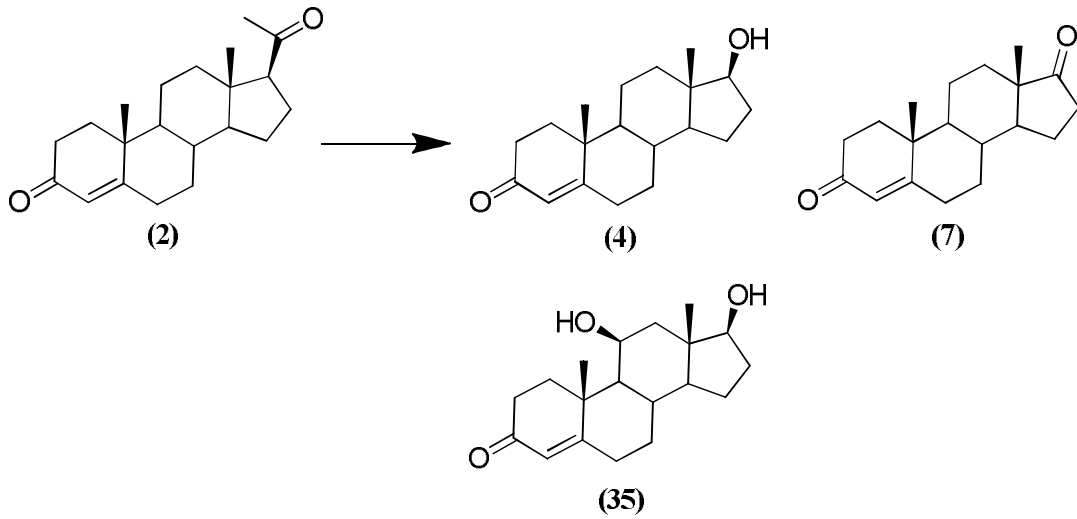
Şekil 2.27. *A. fischeri* ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu [48].

A. aureogulgens ile gerçekleştirilen progesteron (2) biyotransformasyonu (Şekil 2.28.) testosteron (4), androst-4-en-3,17-dion (7), 17 β -asetoksiandrost-4-en-3-on (18), 17 α -okza-D-homo-androst-4-en-3,17-dion (34), 5 β -androstan-3,17-dion (39) ve 3 α -hidroksi-5 β -androstan-17-on (40) bileşikleri ile sonuçlanmıştır [49].



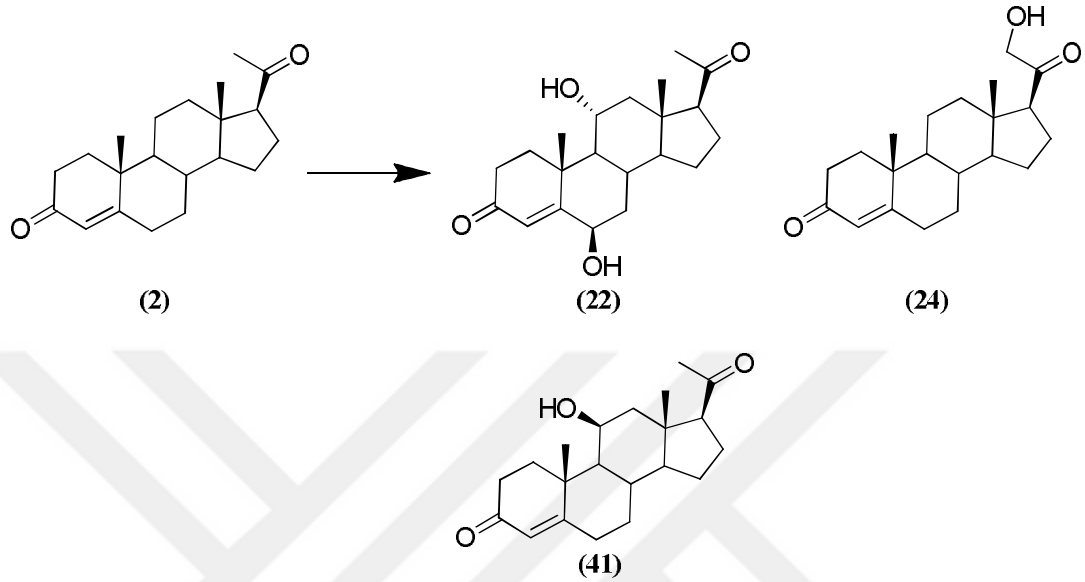
Şekil 2.28. *A. aureogulgens* ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu [49].

A. subolivaceus küfö ile progesteron (2) inkübasyonu (Şekil 2.29.) testosteron (4), androst-4-en-3,17-dion (7) ve 11 β ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (35) bileşikleriyle sonuçlanmıştır [46].



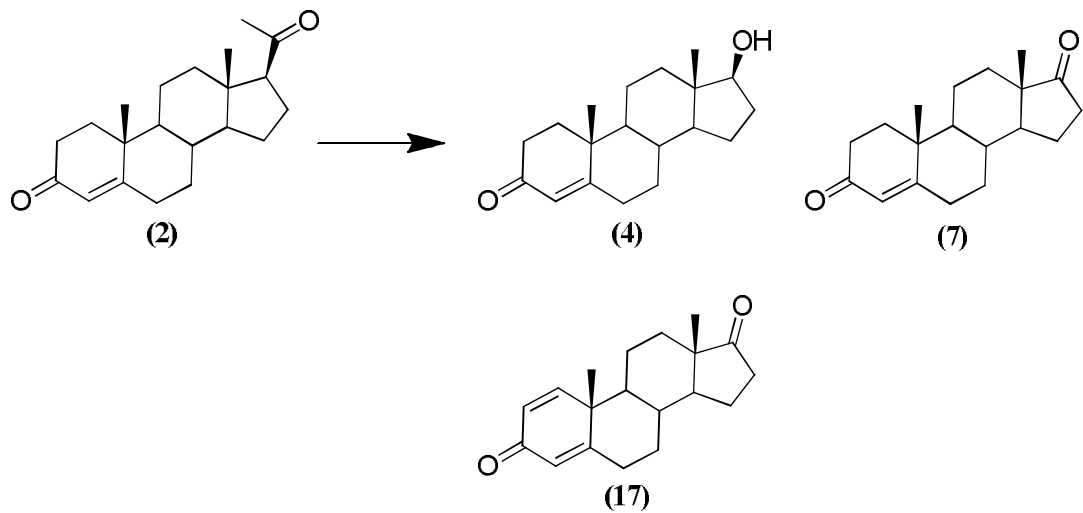
Şekil 2.29. *A. subolivaceus* ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu [46].

A. nidulans ile progesteron (2) inkübasyonundan (Şekil 2.30.) $6\beta,11\alpha$ -dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (22), 21-hidroksipregn-4-en-3,20-dion (24) ve 11β -hidroksipregn-4-en-3,20-dion (41) bileşikleri oluşmuştur [50].



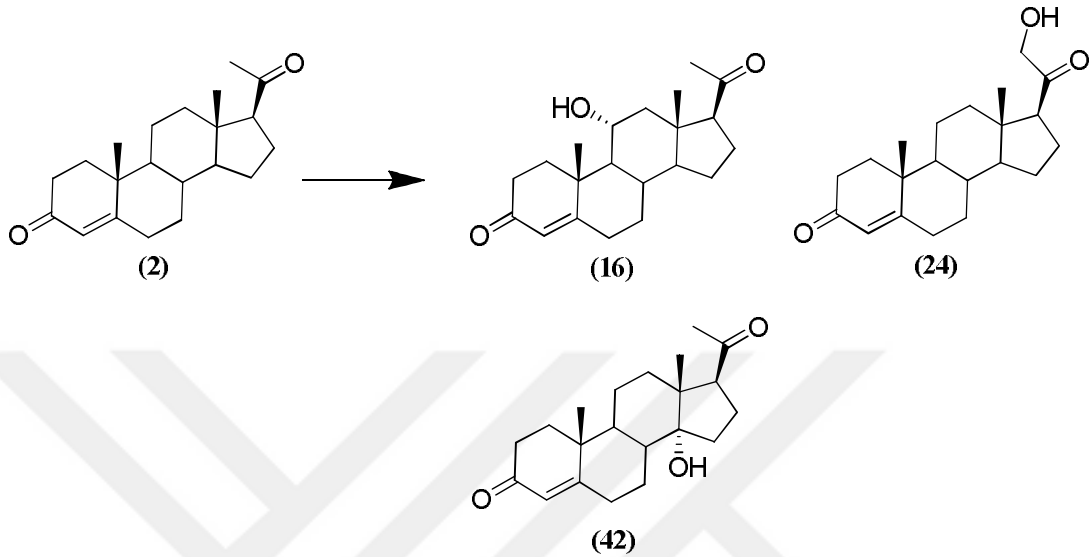
Şekil 2.30. *A. nidulans* ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu [50].

A. versicolor küfö ile progesteron (2) biyotransformasyonundan (Şekil 2.31.) testosteron (4), androst-4-en-3,17-dion (7) ve androsta-1,4-dien-3,17-dion (17) bileşikleri elde edilmiştir [51].



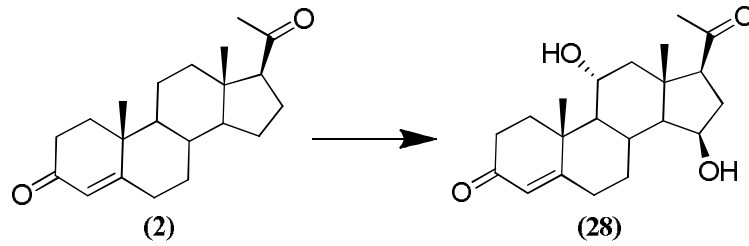
Şekil 2.31. *A. versicolor* ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu [51].

A. brasiliensis küfünün progesteron (2) ile inkübasyonundan (Şekil 2.32) 11 α -hidroksipregn-4-en-3,20-dion (16), 21-hidroksipregn-4-en-3,20-dion (24) ve 14 α -hidroksipregn-4-en-3,20-dion (42) bileşikleri elde edilmiştir [52].



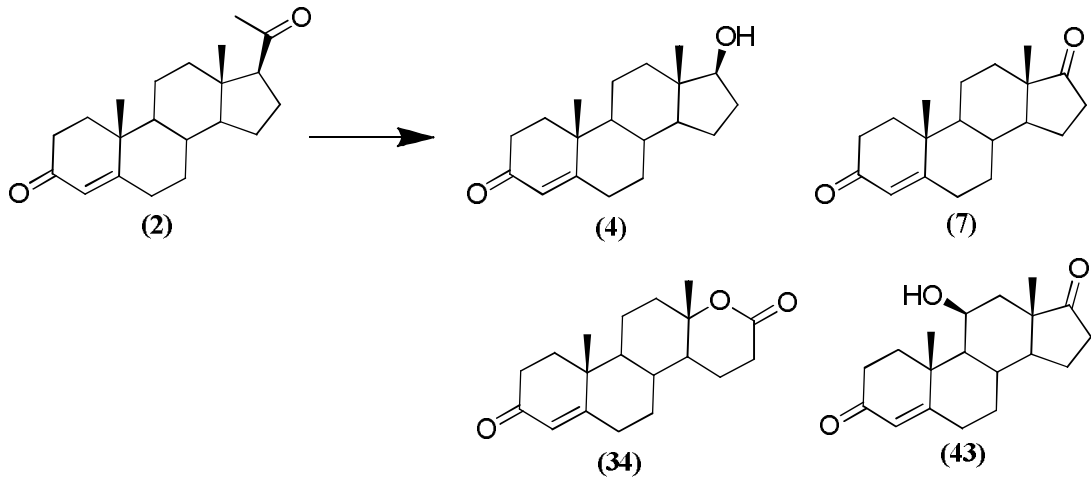
Şekil 2.32. *A. brasiliensis* ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu [52].

A. giganteus ATCC 10059 ile progesteron (2) inkübasyonundan (Şekil 2.33.) 11 α ,15 β -dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (28) bileşiği oluşmuştur [53].



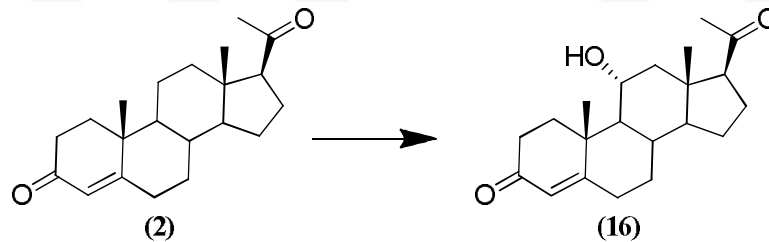
Şekil 2.33. *A. giganteus* ATCC 10059 ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu [53].

A. flavus, *A. flavo-furcatis*, *A. parasiticus* ve *A. tamarii* türlerine ait birer izolattın progesteron (2) ile inkübasyonları (Şekil 2.34.) testosteron (4), androst-4-en-3,-17-dion (7), 17 α -okza-D-homo-androst-4-en-3,17-dion (34) ve 11 β -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (43) bileşiklerini vermiştir [46].



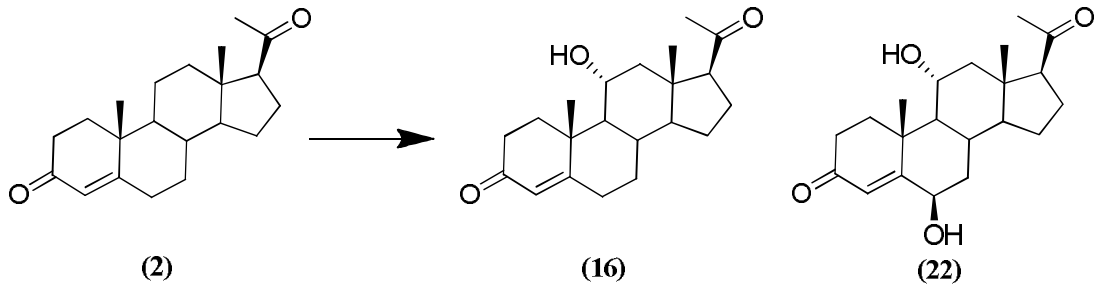
Şekil 2.34. *A. flavus*, *A. flavo-furcatis*, *A. parasiticus* ve *A. tamarii* türlerine ait birer izolat ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu [46].

Progesteron (2) bileşiğinin *A. ochraceus* TS [54,55], sabitlenmiş *A. ochraceus* G-8 [56], farklı *A. ochraceus* izolatları [32, 50, 57-60], sabitlenmiş *A. niger* NCIM 589 [61], bir *A. niger* izolatı [62], sabitlenmiş bir *A. phoenicis* [29, 50] izolatı ve bir *A. egyptiacus* [63] izolatı ile gerçekleştirilen biyotransformasyonlarından (Şekil 2.35.) 11 α -hidroksipregn-4-en-3,20-dion (16) bileşiği elde edilmiştir.



Şekil 2.35. Bazı *Aspergillus* türleri [29, 32, 50, 54-63] ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu.

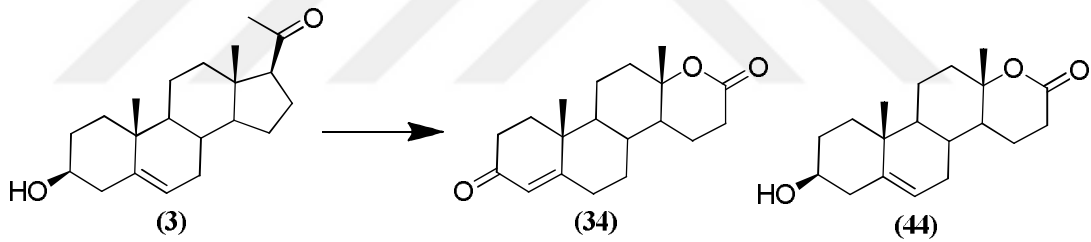
Progesteron (2) bileşiğinin *A. niger* 58F [35], *A. niger* 73 [35], bir *A. niger* izolatı [37] bir *A. ochraceus* izolatı [63, 64] ve bir *A. phoenicis* [29,35] izolatı ile gerçekleştirilen biyotransformasyonlarından (Şekil 2.36.) 11 α -hidroksipregn-4-en-3,20-dion (16) ve 6 β ,11 α -dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (22) bileşikleri elde edilmiştir.



Şekil 2.36. *A. niger* 58F [35], *A. niger* 73 [35], bir *A. niger* izolatu [37] bir *A. ochraceus* izolatu [63, 64] ve bir *A. phoenicis* [29, 35] ile progesteron (2) bileşiğinin biyotransformasyonu

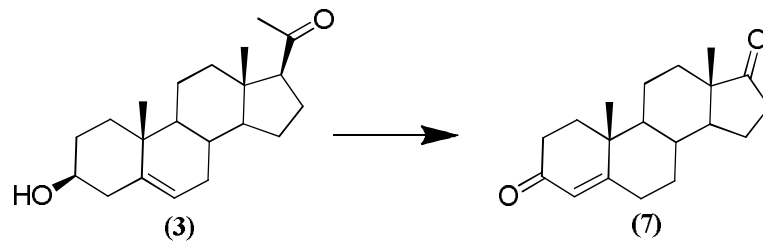
2.5.2. Bazı *Aspergillus* türleri ile pregnenolon (3) biyotransformasyonları

Progesteronun (2) çıkış maddesi olan pregnenolon (3) bileşiğinin bazı *Aspergillus* türleri ile biyotransformasyon çalışmaları mevcuttur [65]. *A. tamarii* QM 1223 küfünün pregnenolon (3) ile biyotransformasyonundan (Şekil 2.37.) 17a-okza-D-homo-androst-4-en-3,17-dion (34) ve 3β-hidroksi-17a-okza-D-homo-androst-5-en-17-on (44) bileşikleri oluşmuştur [26].



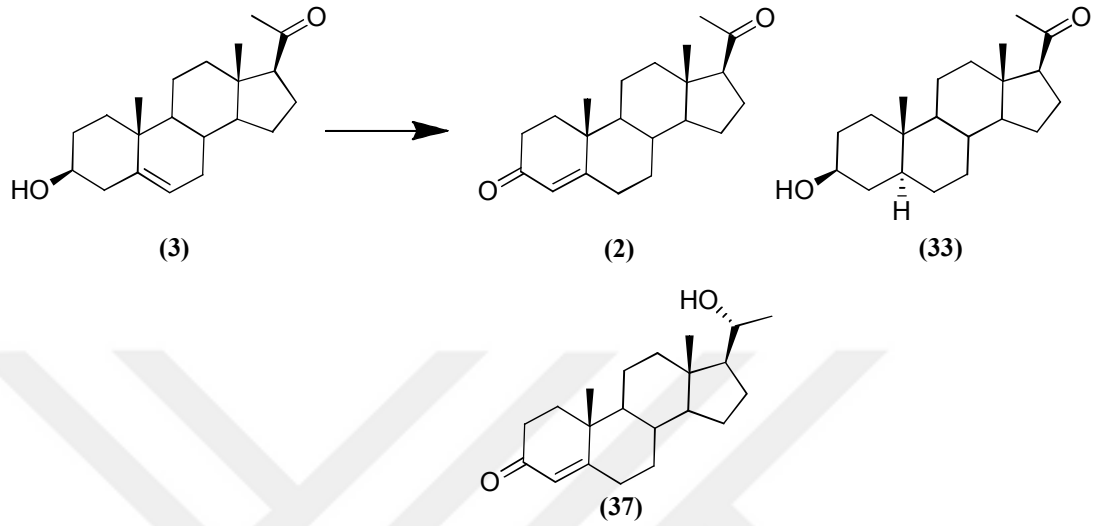
Şekil 2.37. *A. tamarii* QM 1223 ile pregnenolon (3) bileşiğinin biyotransformasyonu [26].

A. auerogulgens küfünün pregnenolon (3) ile biyotransformasyonu sonucu (Şekil 2.38.) androst-4-en-3,17-dion (7) elde edilmiştir [49].



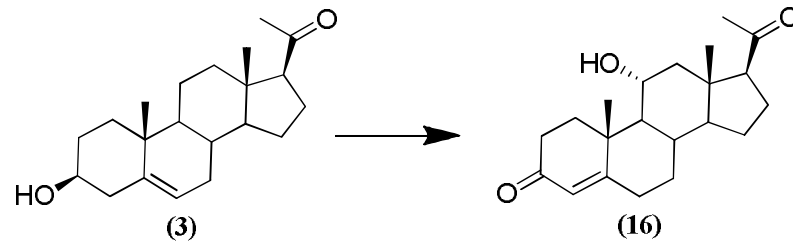
Şekil 2.38. *A. auerogulgens* ile pregnenolon (3) bileşiğinin biyotransformasyonu [49].

A. oryzae ile gerçekleştirilen pregnenolon (**3**) inkübasyonu (Şekil 2.39.) progesteron (**2**), 3 β -hidroksi-5 α -pregnan-20-on (**33**) ve (20R)-20-hidroksi-pregn-4-en-3-on (**37**) bileşikleri ile sonuçlanmıştır [45].



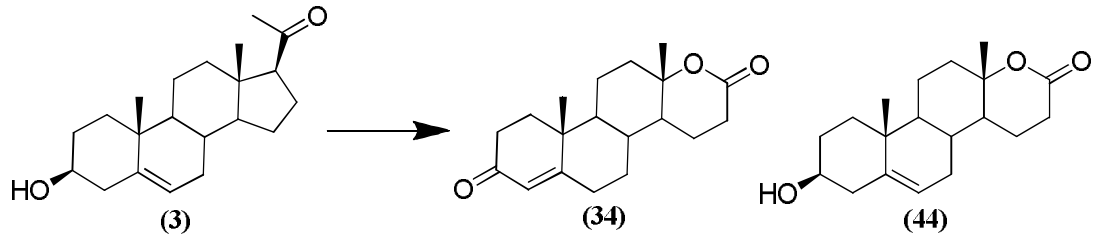
Şekil 2.39. *A. oryzae* ile pregnenolon (**3**) bileşiğinin biyotransformasyonu [45].

A. wentii MRC 200316 küfü ile pregnenolon (**3**) biyotransformasyonu (Şekil 2.40.) sonucu 11 α -hidroksipregn-4-en-3,20-dion (**16**) oluşmuştur [66].



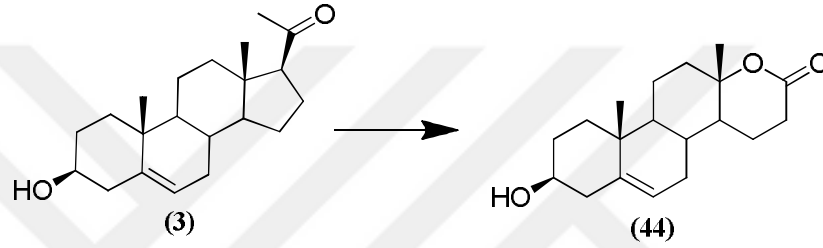
Şekil 2.40. *A. wentii* MRC 200316 ile pregnenolon (**3**) bileşiğinin biyotransformasyonu [66].

A. terreus MRC 200365 ile gerçekleştirilen pregnenolon (**3**) inkübasyonundan (Şekil 2.41) 17 α -okza-D-homo-androst-4-en-3,17-dion (**34**) ve 3 β -hidroksi-17 α -okza-D-homo-5 α -androst-5-en-17-on (**44**) bileşikleri elde edilmiştir [43].



Şekil 2.41. *A. terreus* MRC 200365 ile pregnenolon (3) bileşiğinin biyotransformasyonu [43]

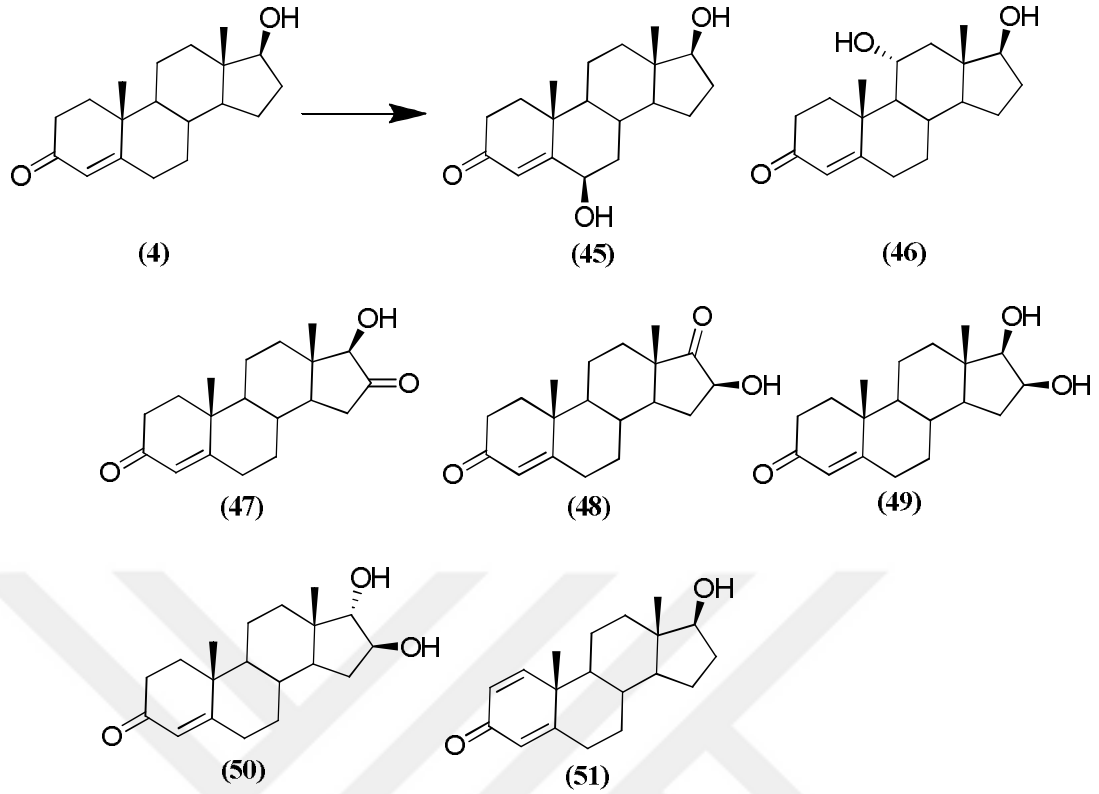
A. tamarii MRC 72400 küfünün pregnenolon (3) ile biyotransformasyonundan (Şekil 2.42.) 3β-hidroksi-17α-okza-D-homo-androst-5-en-17-on (44) elde edilmiştir [42].



Şekil 2.42. *A. tamarii* MRC 72400 ile pregnenolon (3) bileşiğinin biyotransformasyonu [42]

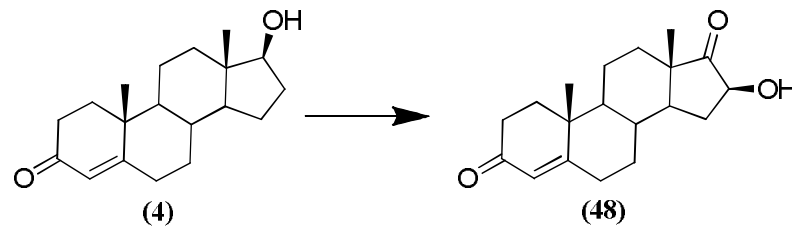
2.5.3. Bazı *Aspergillus* türleri ile testosteron (4) biyotransformasyonları

Kuvvetli bir androjen olan testosteron (4) bileşiğinin *Aspergillus* türleri ile inkübasyonlarına yönelik literatürde çok sayıda çalışma vardır [67]. *A. niger* ATCC 9142 küfünün testosteron (4) ile biyotransformasyonu sonucu (Şekil 2.43.) 6β,17β-dihidroksiandrost-4-en-3-on (45), 11α,17β-dihidroksiandrost-4-en-3-on (46), 17β-hidroksiandrost-4-en-3,16-dion (47), 16β-hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (48), 16β,17β-dihidroksiandrost-4-en-3-on (49), 16β,17α-dihidroksiandrost-4-en-3-on (50) ve 17β-hidroksiandrosta-1,4-dien-3-on (51) bileşikleri elde edilmiştir [68].



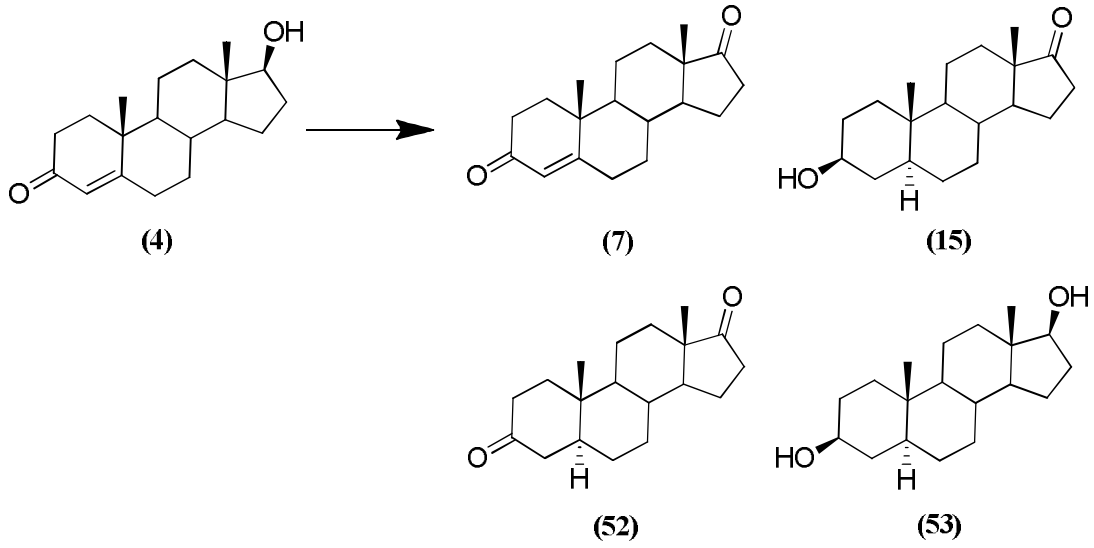
Şekil 2.43. *A. niger* ATCC 9142 ile testosteron (4) bileşiğinin biyotransformasyonu [68].

A. niger NRRL 599 ile testosteron (4) inkübasyonu (Şekil 2.44.) ise 16β-hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (48) bileşiğini vermiştir [69].



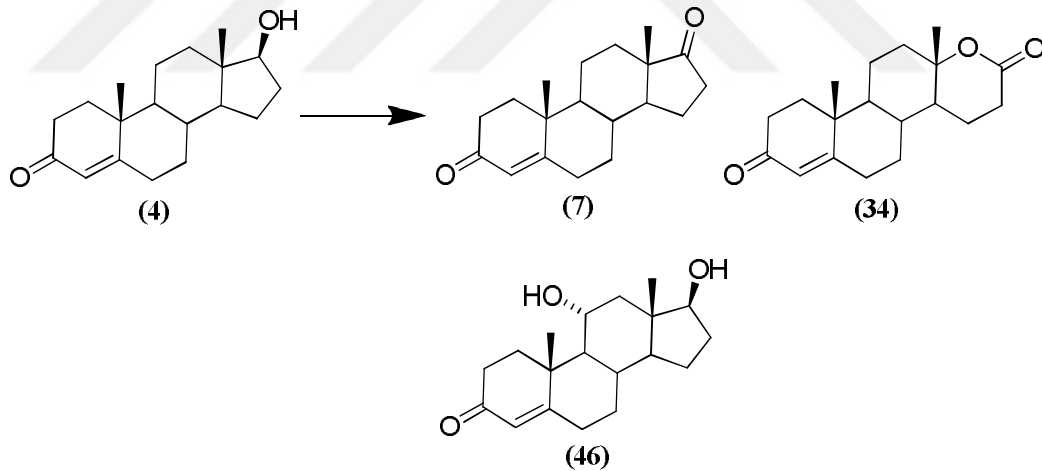
Şekil 2.44. *A. niger* NRRL 599 ile testosteron (4) bileşiğinin biyotransformasyonu [69].

A. oryzae ATCC 11601 ile gerçekleştirilen testosteron (4) biyotransformasyonu (Şekil 2.45.) androst-4-en-3,17-dion (7), epiandrosteron (15), 5α-androstan-3,17-dion (52) ve 3β,17β-dihidroksi-5α-androstan (53) bileşiklerini vermiştir [45].



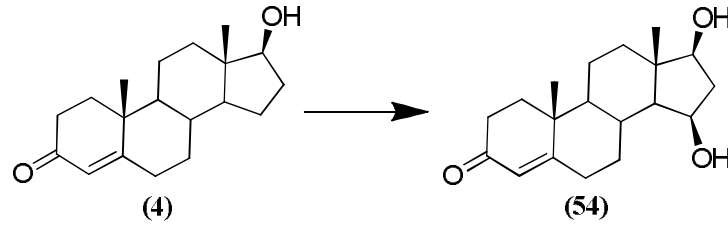
Şekil 2.45. *A. oryzae* ATCC 11601 ile testosteron (4) bileşiğinin biyotransformasyonu [45].

A. fischeri küfünün testosteron (4) ile biyotransformasyonu (Şekil 2.46.) androst-4-en-3,17-dion (7), 17a-okza-D-homo-androst-4-en-3,17-dion (34) ve 11 α ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (46) bileşikleri ile sonuçlanmıştır [48].



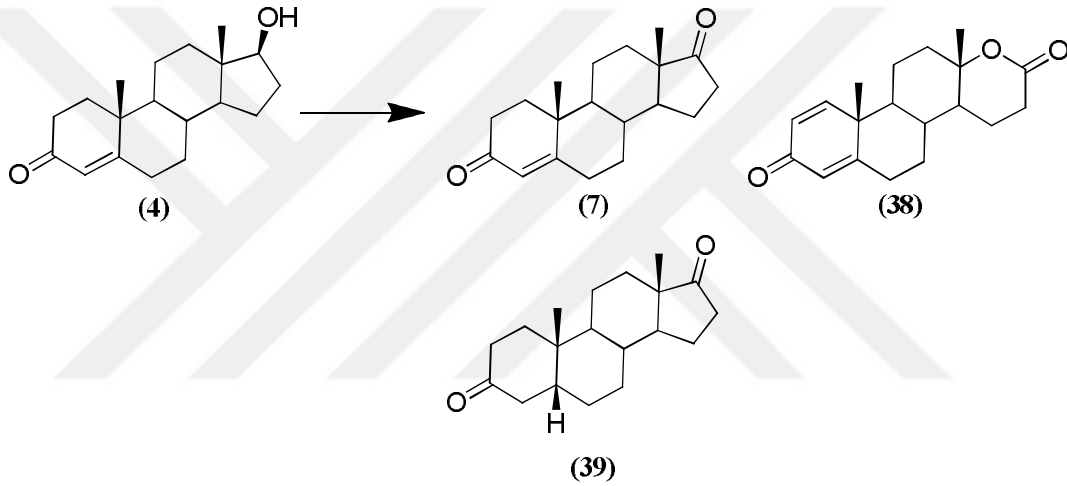
Şekil 2.46. *A. fischeri* ile testosteron (4) bileşiğinin biyotransformasyonu [48].

Testosteronun (4) *A. fumigatus* ile inkübasyonundan (Şekil 2.47.) 15 β ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (54) elde edilmiştir [70].



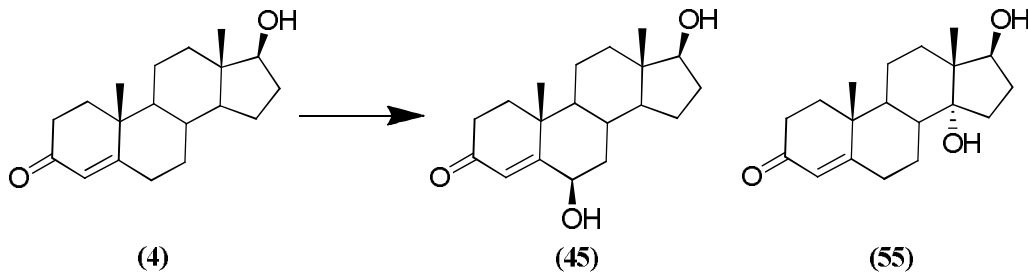
Şekil 2.47. *A. fumigatus* ile testosteron (4) bileşiğinin biyotransformasyonu [70].

A. aerogulgens küfünün testosteron (4) ile biyotransformasyonu (Şekil 2.48.) sonucu androst-4-en-3,17-dion (7), 17 α -okza-D-homo-androsta-1,4-dien-3,17-dion (38) ve 5 β -androstan-3,17-dion (39) elde edilmiştir [49].



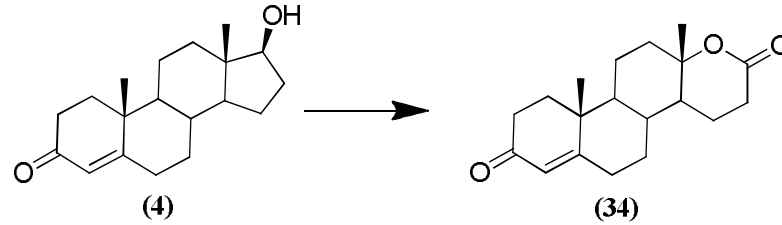
Şekil 2.48. *A. aerogulgens* ile testosteron (4) bileşiğinin biyotransformasyonu [49].

A. wentii MRC 200316 küfünün testosteron (4) ile biyotransformasyonu (Şekil 2.49.) 6 β ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (45) ve 14 α ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (55) bileşiklerini vermiştir [66].



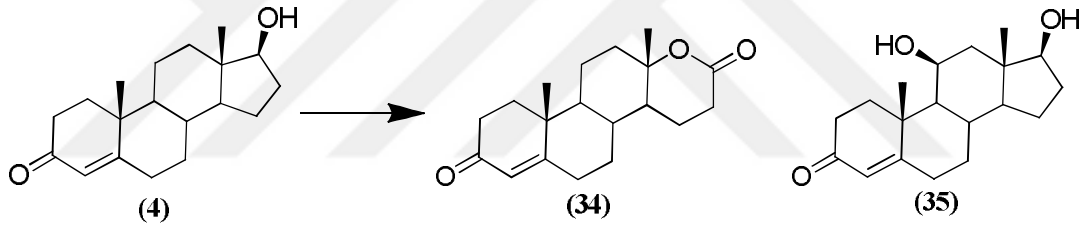
Şekil 2.49. *A. wentii* MRC 200316 ile testosteron (4) bileşiğinin biyotransformasyonu [66].

A. terreus MRC 200365 küfünün testosteron (4) ile inkübasyonu (Şekil 2.50.) sonucu 17a-okza-D-homo-androst-4-en-3,17-dion (34) oluşmuştur [43].



Şekil 2.50. *A. terreus* MRC 200365 ile testosteron (4) bileşiğinin biyotransformasyonu [43].

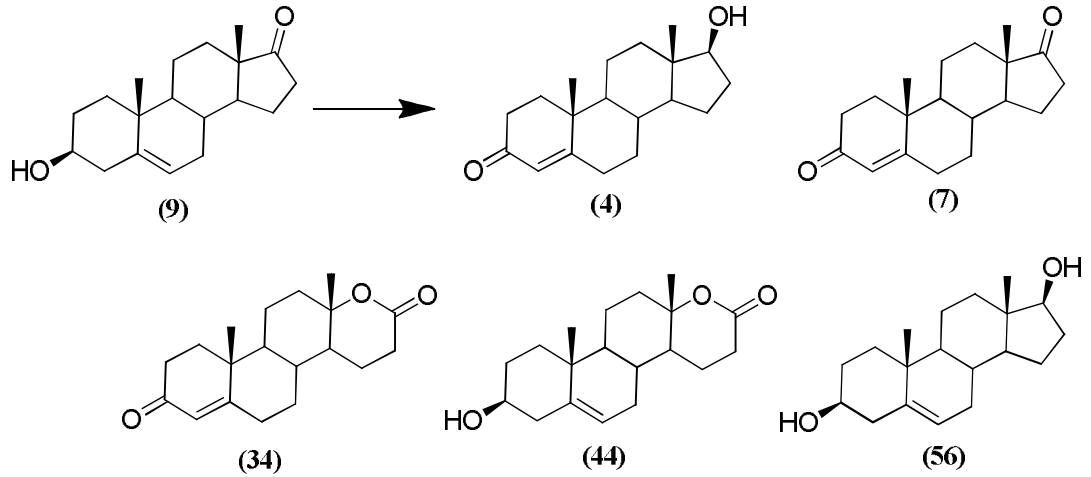
A. tamarii QM 1223 [41] ve *A. tamarii* MRC 72400 [42] ile gerçekleştirilen testosteron (4) biyotransformasyonları (Şekil 2.51.) 17a-okza-D-homo-androst-4-en-3,17-dion (34), 11 β ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (35) bileşikleriyle sonuçlanmıştır.



Şekil 2.51. *A. tamarii* QM 1223 [41] ve *A. tamarii* MRC 72400 [42] ile testosteron (4) bileşiğinin biyotransformasyonu.

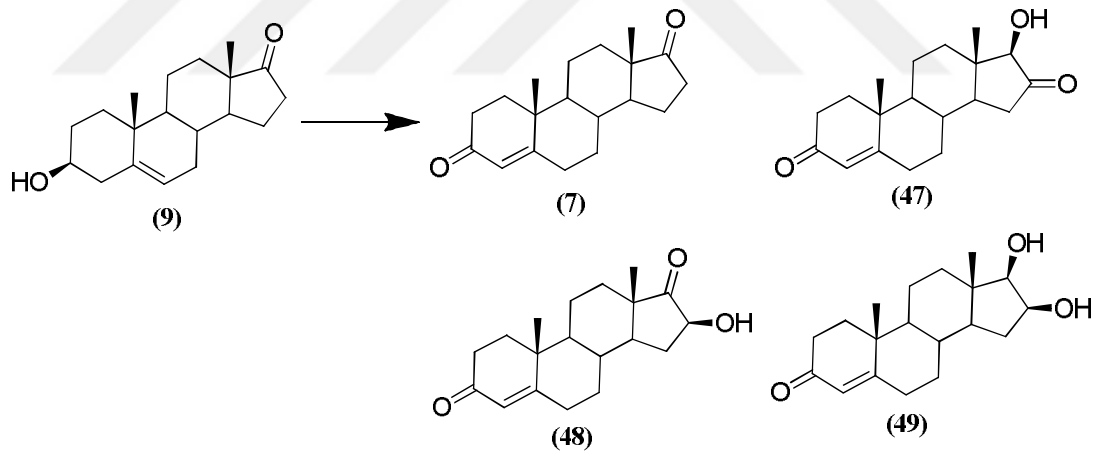
2.5.4. Bazı *Aspergillus* türleri ile DHEA (9) biyotransformasyonları

Zayıf bir androjen olan DHEA (9) bileşiğinin *Aspergillus* türleri ile inkübasyonlarına yönelik literatürde 7 çalışma mevcuttur. *A. parasiticus* küfü ile gerçekleştirilen DHEA (9) inkübasyonu (Şekil 2.52.) sonucu testosteron (4), androst-4-en-3,17-dion (7), 17a-okza-D-homo-androst-4-en-3,17-dion (34), 3 β -hidroksi-17a-okza-D-homo-5 α -androst-5-en-17-on (44) ve 3 β -17 β -dihidroksiandrost-5-en (56) bileşikleriyle elde edilmiştir [71].



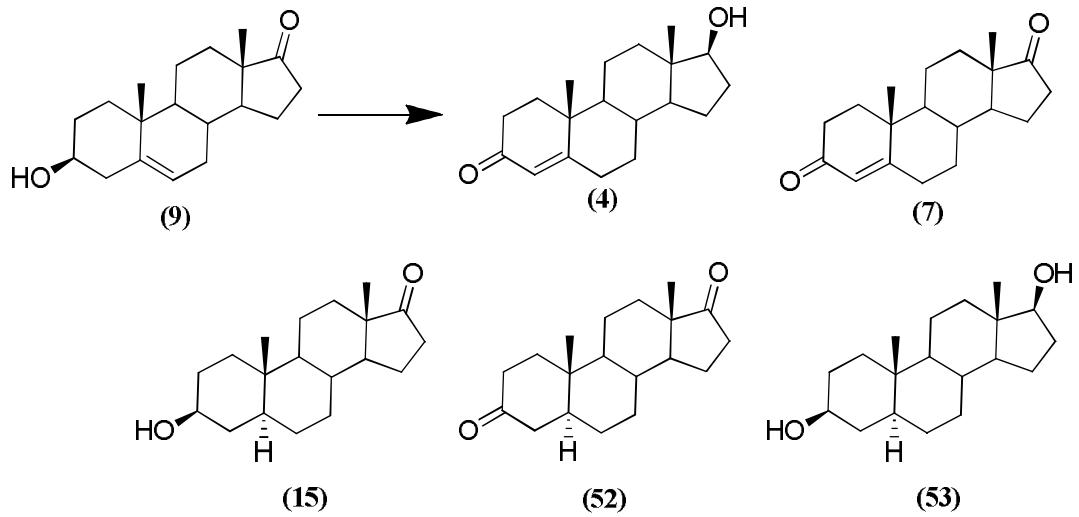
Şekil 2.52. *A. parasiticus* ile DHEA (9) bileşiğinin biyotransformasyonu [71].

A. niger NRRL 599 küfünün DHEA (9) ile biyotransformasyonu sonucu (Şekil 2.53.) androst-4-en-3,17-dion (7), 17β-hidroksiandrost-4-en-3,16-dion (47), 16β-hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (48) ve 16β,17β-dihidroksiandrost-4-en-3-on (49) bileşikleri elde edilmiştir [69].



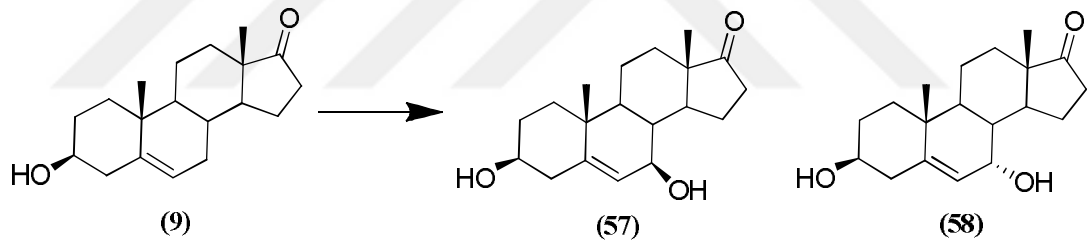
Şekil 2.53. *A. niger* NRLL 599 ile DHEA (9) bileşiğinin biyotransformasyonu [69].

A. oryzae ATCC 11601 ile DHEA (9) biyotransformasyonundan (Şekil 2.54.) testosteron (4), androst-4-en-3,17-dion (7), epiandrosteron (15), 5α-androstan-3,17-dion (52) ve 3β,17β-dihidroksi-5α-androstan (53) bileşikleri elde edilmiştir [45].



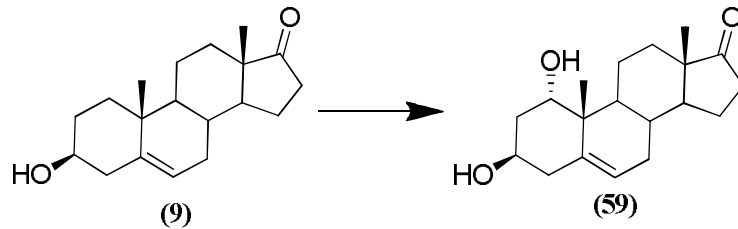
Şekil 2.54. *A. oryzae* ATCC 11601 ile DHEA (9) bileşiğinin biyotransformasyonu [45].

A. wentii MRC 200316 ile DHEA (9) biyotransformasyonundan (Şekil 2.55.) 3β,7β-dihidroksiandrost-5-en-17-on (57) ve 3β,7α-dihidroksiandrost-5-en-17-on (58) elde edilmiştir [66].



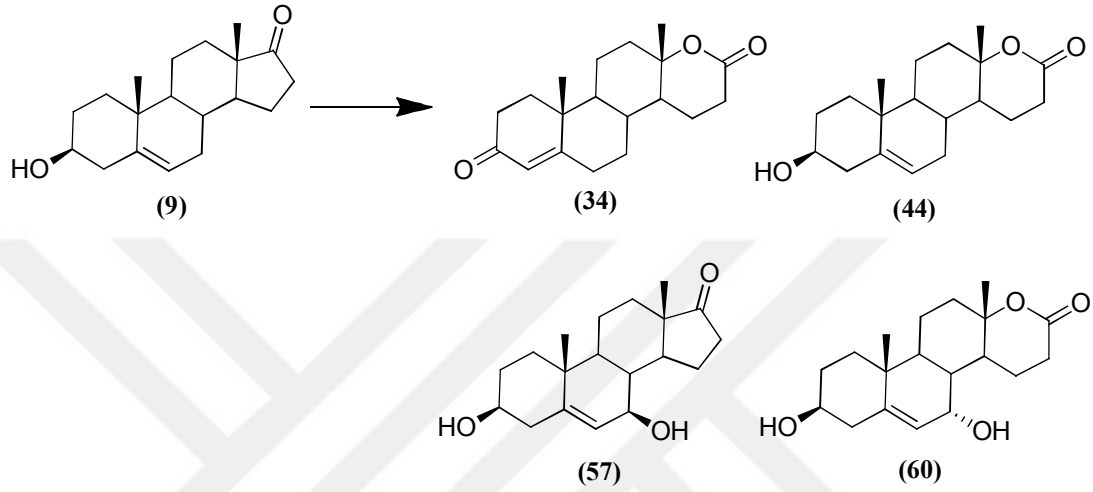
Şekil 2.55. *A. wentii* MRC 200316 ile DHEA (9) bileşiğinin biyotransformasyonu [66].

A. terreus IFO 6113 küfö ile gerçekleştirilen DHEA (9) inkübasyonu sonucu (Şekil 2.56.) 1α,3β-dihidroksiandrost-5-en-17-on (59) bileşiğini vermiştir [72].



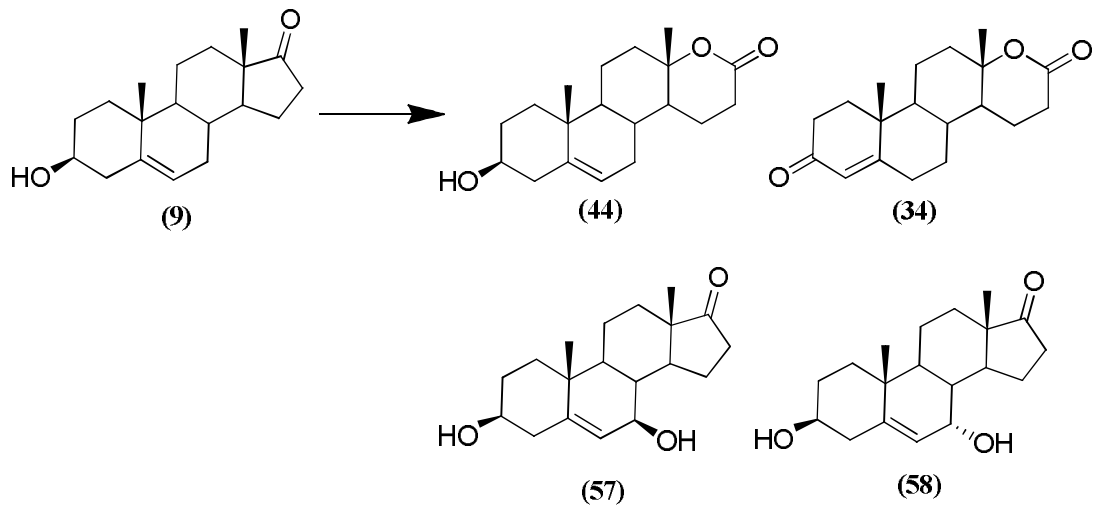
Şekil 2.56. *A. terreus* IFO 6113 ile DHEA (9) bileşiğinin biyotransformasyonu [72].

A. tamarii QM 1223 küfö ile yapılan DHEA (9) biyotransformasyonu (Şekil 2.57). 17a-okza-D-homo-androst-4-en-3,17-dion (34), 3 β -hidroksi-17a-okza-D-homo-androst-5-en-17-on (44), 3 β ,7 β -dihidroksiandrost-5-en-17-on (57), ve 3 β ,7 α -dihidroksi-17a-okza-D-homo-androst-5-en-17-on (60) bileşikleri ile sonuçlanmıştır [73].



Şekil 2.57. *A. tamarii* QM 1223 ile DHEA (9) bileşğinin biyotransformasyonu [73].

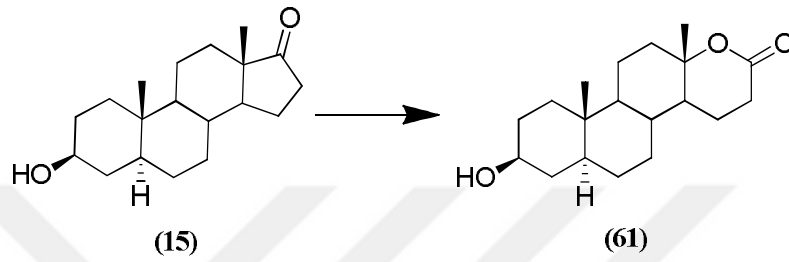
A. tamarii MRC 72400 küfünün DHEA (9) ile inkübasyonu (Şekil 2.58.) ise 3 β -hidroksi-17a-okza-D-homo-androst-5-en-17-on (44), 17a-okza-D-homo-androst-4-en-3,17-dion (34), 3 β ,7 β -dihidroksiandrost-5-en-17-on (57) ve 3 β ,7 α -dihidroksiandrost-5-en-17-on (58) bileşiklerini vermiştir [42].



Şekil 2.58. *A. tamarii* MRC 72400 ile DHEA (9) bileşğinin biyotransformasyonu [42].

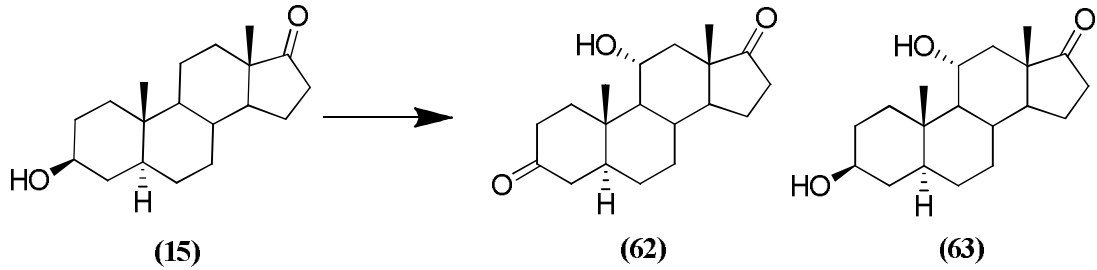
2.5.5. Bazı *Aspergillus* türleri ile epiandrosteron (15) biyotransformasyonları

Zayıf bir androjen olan epiandrosteron (15) bileşiğinin *Aspergillus* türleri ile biyotransformasyonuna yönelik 4 çalışma mevcuttur. *A. terreus* MRC 200365 küfı ile gerçekleştirilen epiandrosteron (15) inkübasyonu (Şekil 2.59.) 3 β -hidroksi-17 α -okza-D-homo-androst-17-on (61) bileşiği ile sonuçlanmıştır [43].



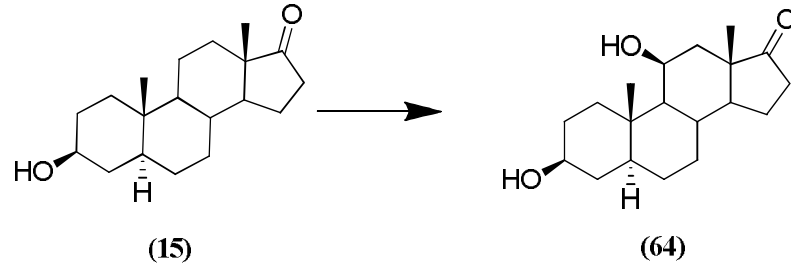
Şekil 2.59. *A. terreus* MRC 200365 ile epiandrosteron (15) bileşiğinin biyotransformasyonu [43].

A. wentii MRC 200316 ile epiandrosteron (15) biyotransformasyonundan (Şekil 2.60.) 11 α -hidroksi-5 α -androstan-3,17-dion (62) ve 3 β ,11 α -dihidroksi-5 α -androstan-17-on (63) bileşikleri elde edilmiştir [66].



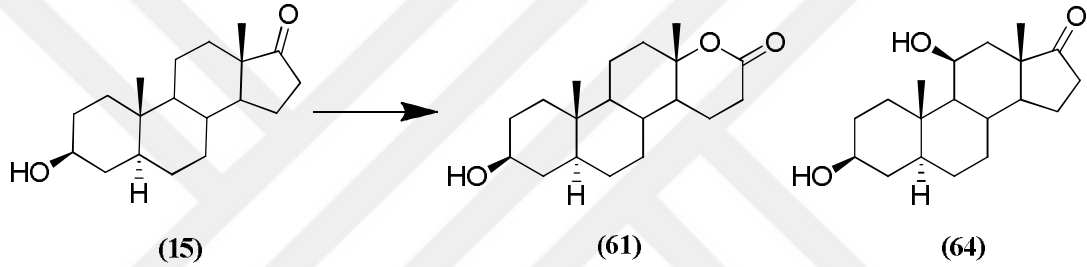
Şekil 2.60. *A. wentii* MRC 200316 ile epiandrosteron (15) bileşiğinin biyotransformasyonu [66].

A. tamarii QM 1223 küfı ile yapılan epiandrosteron (15) biyotransformasyonu (Şekil 2.61.) 3 β ,11 β -dihidroksi-5 α -androstan-17-on (64) bileşiğini vermiştir [26].



Şekil 2.61. *A. tamarii* QM 1223 ile epiandrosteron (15) bileşiğinin biyotransformasyonu [26].

A. tamarii MRC 72400 ile epiandrosteron (15) biyotransformasyonundan (Şekil 2.62.) 3β-hidroksi-17a-okza-D-homo-5α-androstan-17-on (61) ve 3β,11β-dihidroksi-5α-androstan-17-on (64) bileşikleri elde edilmiştir [42].



Şekil 2.62. *A. tamarii* MRC 72400 ile epiandrosteron (15) bileşiğinin biyotransformasyonu [42].

2.6. Çalışmanın Amacı

Steroidlerin küfler ile mikrobiyal biyotransformasyonları yüksek bölgesel ve stereoseçicilikleri sebebi ile çok daha önemli ve fonksiyonlu bileşiklerin sentezi için dünya çapında yaygın olarak kullanılmaktadır. Günümüzde, bilinen mikrobiyal biyotransformasyonların etkinliklerini artırmak, kullanılabilir yeni mikroorganizmalar ve reaksiyonlar bulmak için çalışmalar yoğun olarak sürdürülmektedir [54, 74-77].

Bu çalışmada progesteron (2), pregnenolon (3), testosteron (4), DHEA (9) ve epiandrosteron (15) steroidlerinin *Aspergillus sydowii* MRC 200653, *Aspergillus candidus* MRC 200634 ve *Aspergillus japonicus* MRC U-3048 küflerindeki biyotransformasyonlarının nasıl gerçekleşeceğini incelenmesi amaçlandı. Söz konusu amaç doğrultusunda yukarıda adı geçen steroidler daha önce steroid biyotransformasyonları için kullanılmamış olan *Aspergillus sydowii* MRC 200653,

Aspergillus candidus MRC 200634 ve *Aspergillus japonicus* MRC U-3048 küfleri ile biyotransformasyonlara maruz bırakıldı. Elde edilen metabolitlerin yapıları spektroskopik yöntemler kullanılarak aydınlatıldı.



BÖLÜM 3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Yöntemler, Cihazlar ve Sarf Malzemeler

Biyotransformasyon çalışmalarında kullanılan besiyeri ve cam malzemelerin sterilizasyonu 121 °C'de 20 dakika süre ile Nüve OT 40L marka otoklav ile gerçekleştirildi. Küflerin tazelenmesi ve biyotransformasyon çalışmaları esnasındaki inokülasyonlar Nükleon marka Sınıf II Tip Biyolojik Güvenlik Kabini (steril kabin) kullanılarak gerçekleştirildi. Küflerin geliştirilmesi ve biyotransformasyon çalışmaları için Gerhardt THO 500 Laboshake Çalkalamalı İnkübatör kullanıldı. Infrared spektrumları, Perkin Elmer Spectrum Two spektrometre cihazı ile alındı. ¹H NMR spektrumları, tetrametilsilan standart iç sinyal olarak kullanılarak, 300 MHz'de dötero kloroform (CDCl₃) veya dötero piridin (C₅D₅N) içerisinde Varian Mercury 300 NMR spektrometresi kullanılarak alındı. ¹³C NMR spektrumları aynı cihaz kullanılarak 75 MHz'de dötero kloroform (CDCl₃) veya dötero piridin (C₅D₅N) içerisinde alındı. Elementel analiz için Thermo Finnigan Flash EA 1112 elementel analiz cihazı kullanıldı.

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 ısıtılarak görünür hale getirildi. Erime noktaları Schorp MPM-H1 erime noktası tayin cihazı kullanılarak tespit edildi.

A. sydowii MRC 200653, *A. candidus* MRC 200634 ve *A. japonicus* MRC U-3048 küfleri Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu, Marmara Araştırma Merkezi Gıda Teknoloji ve Araştırma Enstitüsü'nden yatık agar kültürleri olarak

temin edildi. Bu kültürler PDA (potato dekstroz agar) içeren yatık agar besiyerlerinde ve 4 °C’de muhafaza edildi.

Progesteron (2), pregnenolon (3) testosteron (4), DHEA (9) ve epiandrosteron (15) steroidleri Sigma-Aldrich şirketinden satın alındı. Tüm solventler, yatık agar besiyerleri için kullanılan PDA ve agar ile küfler için hazırlanan besiyerinde kullanılan tüm kimyasallar Merck şirketinden temin edildi.

3.2. Deneysel Çalışmalar

3.2.1. Yatık agar besiyerlerinin hazırlanması

PDA (potato dekstroz agar) (5,85 g) ve agar (1,20 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 yarılarna kadar ilave edilerek otoklav içerisinde 121 °C’de 20 dakika sterilize edildi. Sterilizasyondan sonra şişeler içerisinde erimiş haldeki besiyerleri, donmadan önce 45 dereceye yakın bir eğim oluşturacak şekilde soğumaya bırakılmak suretiyle yatık agar besiyerleri hazırlandı.

3.2.2. Küf kültürlerinin hazırlanması

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 çalışmalarında kullanıldı.

3.2.3. Küf besiyelerinin hazırlanması

A. sydowii MRC 200653 küfü için kullanılacak besiyeri $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1,36 g), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (9,68 g), KCl (0,61 g), NaCl (30 g), Na_2HPO_4 (0,014 g), Na_2SO_4 (3,47 g), NaHCO_3 (0,17 g), KBr (0,1 g), $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,04 g) ve H_3BO_3 (0,03 g) içeren 1 litrelik yapay deniz suyunda malt ekstrakt (30 g) ve pepton (3 g) çözünerek hazırlandı [78]. *A. candidus* MRC 200634 ve *A. japonicus* MRC U-3048 küfleri için kullanılacak besiyeri ise sukroz (30 g), NaNO_3 (3 g), K_2HPO_4 (1 g), KCl (0,5 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g) ve $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01 g) 1 litrelik distile suda çözünerek hazırlandı [79].

3.2.4. Biyotransformasyon çalışması

Biyotransformasyon çalışmasında kullanılacak küfe göre hazırlanan 1 L besiyeri çözeltisi 10 adet 250 mL erlene paylaştırıldıktan sonra otoklavda sterilize edildi. Daha önce hazırlanan en taze alt kültürdeki küf 10 erlene steril şartlar altında nakledildi ve bu erlenler yeterli miktarda küf oluşabilmesi için küfe uygun sıcaklıkta 3 gün boyunca çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı (150 rpm).

Üçüncü günün sonunda biyotransformasyonu gerçekleştirilecek her bir steroid (1 g) DMF veya etanol (10 mL) içerisinde çözünerek yeterli miktarda küf içeren erlenlere eşit hacimlerde, steril koşullar altında ilave edildikten sonra kullanılacak küfe uygun sıcaklıkta 5 gün boyunca çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı (150 rpm).

3.2.5. Metabolitlerin izole edilmesi

İnkübasyon tamamlandıktan sonra besiyeri bir Buchner hunisi yardımıyla filtrasyon işlemine tabi tutularak küf kültürüne ait misellerden süzülerek ayrıldı. Buchner hunisinde kalan miseller etil asetat (500 mL) kullanılarak yıkandı. Erlendeki süzüntü her seferinde etil asetat (1 L) kullanılarak 3 ekstraksiyon gerçekleştirildi. Daha sonra ekstraktlara susuz sodyum sülfat ilave edilerek ortamda bulunabilecek su

uzaklaştırıldı. Etil asetat evaporatörde uzaklaştırıldıktan sonra yağimsı bir madde elde edildi.

3.2.6. Metabolitlerin saflaştırılması ve yapılarının tayini

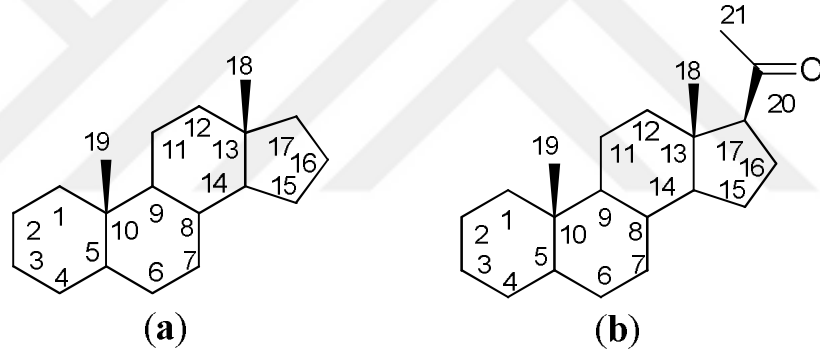
Her bir biyotransformasyon çalışması için substrat ve elde edilen yağimsı maddeyi karşılaştıracak şekilde bir İTK çalışması gerçekleştirildi. Yağimsı madde içerisindeki steroidleri ayırmak için adsorban olarak silika jel 60 (Merck 107734, 230-400 mesh) kullanılan kolon kromatografisi gerçekleştirildi ve bu bileşikler hekzan içerisinde artan etil asetat derişimleri elüent olarak kullanılarak kolondan ayrıldı. Kolondan karışım olarak elde edilen steroidler ise adsorban olarak alüminyum oksit 90 aktif nötral (Merck 101077, aktivite seviyesi I) içeren kolon kromatografisi ile 2-3 saat süresince hekzan içerisinde artan etil asetat derişimleri elüent olarak kullanılarak ayrıldı.

Ayrılan bileşiklerin yapılarının tayini için başlangıç maddeleri ile elde edilen her bir maddenin erime noktaları, NMR ve FTIR spektrumları karşılaştırılarak gerçekleştirildi.

Her biyotransformasyon çalışması bir kontrol erleni ile takip edildi. Her bir kontrol erleni için sadece inoküle edilmemiş steril besiyeri ve substratlardan biri kullanıldı. Asıl biyotransformasyon çalışmalarındaki bütün işlemler her bir kontrol erleni için aynen uygulandı. Bu erlenlerden İTK alındığında herhangi bir metabolit gözlenmediği için asıl biyotransformasyon deneylerinden elde edilen metabolitlerin gerçek biyotransformasyon ürünleri olduğu anlaşıldı. Ayrıca inkübasyon süresince tüm erlenlerdeki küf gelişimleri ve besiyeri görünümünde değişimler olup olmadığı takip edildi.

BÖLÜM 4. DENEYSEL BULGULAR

Progesteron (2), pregnenolon (3) testosteron (4), DHEA (9) ve epiandrosteron (15) steroidlerinin *A. sydowii* MRC 200653, *A. candidus* MRC 200634 ve *A. japonicus* MRC U-3048 küfleri ile biyotransformasyonundan elde edilen bileşiklerin yapılarını belirlemek için hem substratların hem de elde edilen bileşiklerin erime noktaları, ^1H NMR, ^{13}C NMR ve IR spektrumları karşılaştırıldı. Biyotransformasyonları gerçekleştirilen substratlara ait androstan (a) ve pregnan (b) karbon iskeletlerinin numaralandırılması Şekil 4.1.'de ki gibidir.

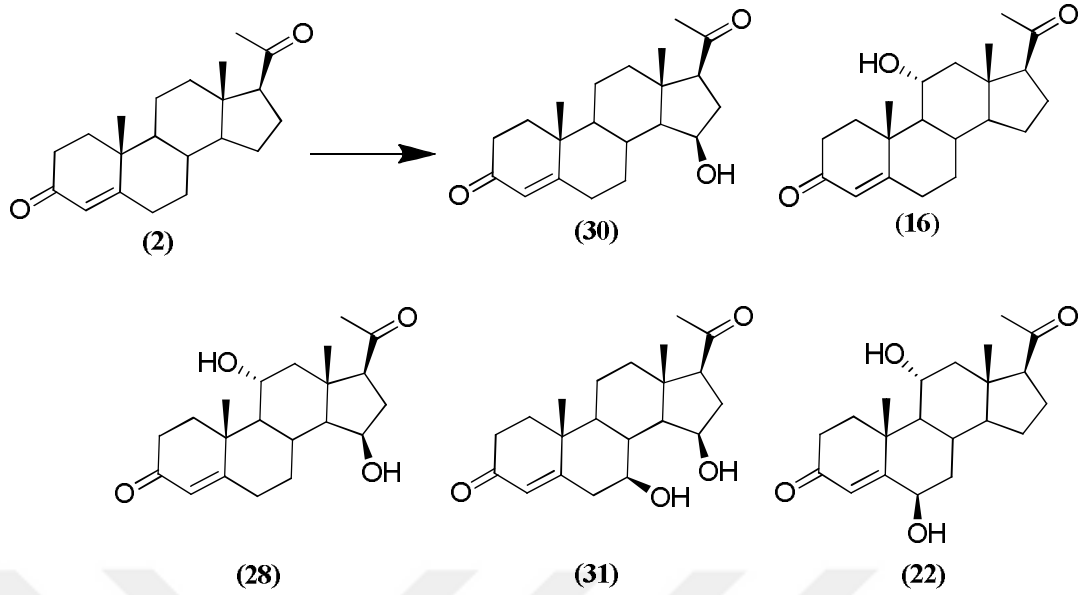


Şekil 4.1. Androstan (a) ve pregnan (b) karbon iskeletlerinin numaralandırılması [23].

4.1. *A. sydowii* ile Substratların Biyotransformasyonları

4.1.1. *A. sydowii* ile progesteron (2) biyotransformasyonu

Progesteron (2) (1 g) bileşiğinin *A. sydowii* MRC 200653 ile 32 °C'de 5 gün süren inkübasyonundan elde edilen yağimsı maddenin (2157 mg) üzerinde gerçekleştirilen kolon kromatografisi çalışmasından sırasıyla değişmeyen başlangıç maddesi (145 mg) ve aşağıdaki metabolitler elde edildi (Şekil 4.2.);



Şekil 4.2. *A. sydowii* MRC 200653 ile progesteron (2) biyotransformasyonu

15β-Hidroksipreg-4-en-3,20-dion (30) (315 mg, %30)

%60'lık çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde aseton-hegzandan iğne şeklinde kristallendirildi. Erime noktası: 200-201 °C, (lit. [80] erime noktası: 195-199 °C).

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3473, 1705, 1662 ve 1613

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,93 (3H, s, 18-H); 1,21 (3H, s, 19-H); 2,14 (3H, s, 21-H), 2,50 (1H, t, $J = 9$ Hz, 17 α -H), 4,32 (1H, m, 15 α -H), 5,73 (1H, s, 4-H)

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): (Tablo 5.1.).

11α-Hidroksipreg-4-en-3,20-dion (16) (368 mg, %35)

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

Erime noktası: 161-162 °C, (lit. [81] erime noktası: 165-166 °C).

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3280, 1660 ve 1617.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,68 (3H, s, 18-H); 1,33 (3H, s, 19-H); 2,13 (3H, s, 21-H); 2,58 (1H, t, $J = 9$ Hz, 17 α -H); 4,03 (1H, dt, $J = 5$ ve 10 Hz, 11 β -H); 5,72 (1H, s, 4-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): (Tablo 5.1.).

11 α ,15 β -Dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (**28**) (66 mg, %6)

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

Erime noktası: 179-180 °C, (lit. [82] erime noktası: 182-183 °C).

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3530,1730, 1675 ve1610.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,96 (3H, s, 18-H); 1,33 (3H, s, 19-H); 2,14 (3H, s, 21-H); 2,50 (1H, t, $J = 9$ Hz, 17 α -H); 4,05 (1H, dt, $J = 5$ ve 10 Hz, 11 β -H); 4,31 (1H, m, 15 α -H); 5,73 (1H, s, 4-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): (Tablo 5.1.).

7 β ,15 β -Dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (**31**) (110 mg, %10)

%70'lik çözen sistemiyle elüsyon neticesinde metanolden prizmalar şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 232-233 °C, (lit. [83] erime noktası: 231-233 °C).

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3500, 3365, 1700, 1680 ve 1630.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,96 (3H, s, 18-H); 1,25 (3H, s, 19-H); 2,15 (3H, s, 21-H); 2,44 (1H, t, $J = 9$ Hz, 17 α -H); 3,63 (1H, m, 7 α -H); 4,46 (1H, m, 15 α -H); 5,77 (1H, s, 4-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): (Tablo 5.1.).

6 β ,11 α -Dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (**22**) (33 mg, %3)

%80'lik çözen sistemiyle elüsyon neticesinde metanolden prizmalar şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 245-247 °C, (lit. [81] erime noktası: 246-250 °C).

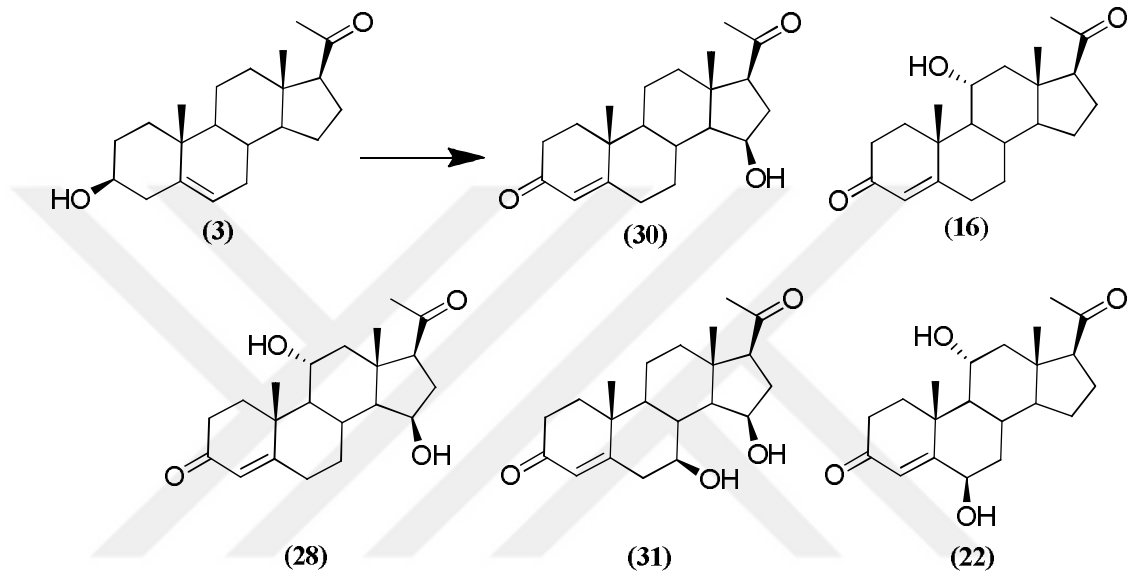
IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3440, 3375, 1722, 1700 ve 1660.

^1H NMR (300 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): 0,75 (3H, s, 18-H); 1,80 (3H, s, 19-H); 2,05 (3H, s, 21-H); 2,80 (1H, t, $J = 9$ Hz, 17 α -H); 4,34 (1H, dt, $J = 5$ ve 10 Hz, 11 β -H); 4,55 (1H, t, $J = 3$ Hz, 6 α -H); 6,05 (1H, bs, 4-H).

^{13}C NMR (75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): (Tablo 5.1.).

4.1.2. *A. sydowii* ile pregnenolon (3) biyotransformasyonu

Pregnenolon (3) (1 g) bileşiğinin *A. sydowii* MRC 200653 ile 32 °C’de 5 gün süren inkübasyonundan elde edilen yağimsı maddenin (2100 mg) üzerinde gerçekleştirilen kolon kromatografisi çalışmasından sırasıyla değişmeyen başlangıç maddesi (216 mg) ve aşağıdaki metabolitler elde edildi (Şekil 4.3.);



Şekil 4.3. *A. sydowii* MRC 200653 ile pregnenolon (3) biyotransformasyonu

15 β -Hidroksipreg-4-en-3,20-dion (30) (272 mg, %26)

%60’lık çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde elde edildi. Bu bileşiğin yapı tayini ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının daha önce izole edilmiş metabolitin ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının karşılaştırılmasıyla gerçekleştirildi.

11 α -Hidroksipreg-4-en-3,20-dion (16) (334 mg, %32)

%60’lık çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde elde edildi. Bileşiğin yapı tayini ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının daha önce izole edilmiş metabolitin ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının karşılaştırılmasıyla aydınlatıldı.

11 α ,15 β -Dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (**28**) (33 mg, %3)

%70'lik çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde elde edildi. Bileşiğin yapı tayini ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının daha önce izole edilmiş metabolitin ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının karşılaştırılmasıyla gerçekleştirildi.

7 β ,15 β -Dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (**31**) (77 mg, %7)

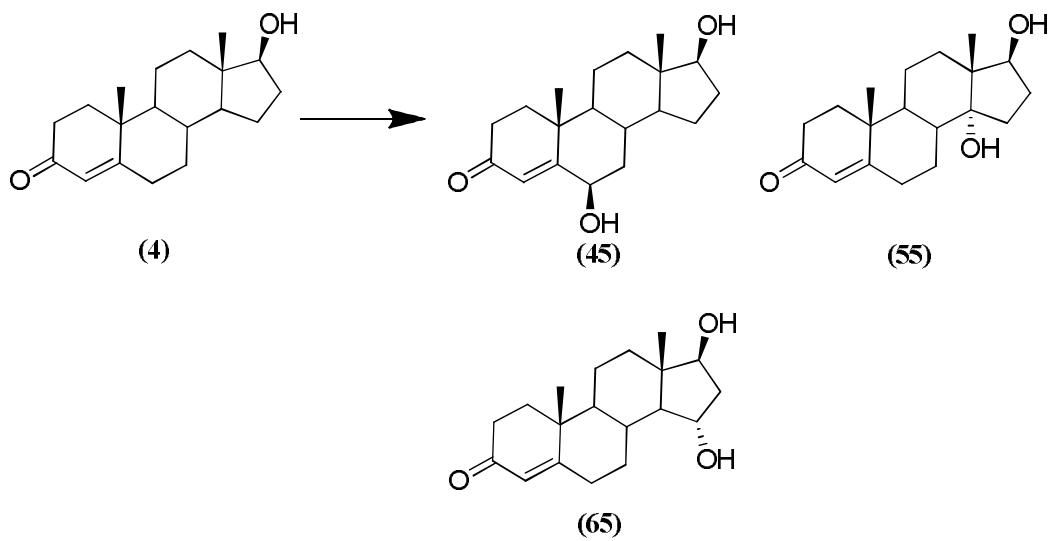
%70'lik çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde elde edildi. Bileşiğin yapı tayini ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının daha önce izole edilmiş metabolitin ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının karşılaştırılmasıyla gerçekleştirildi.

6 β ,11 α -Dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (**22**) (22 mg, %2)

%80'lik çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde elde edildi. Bileşiğin yapı tayini ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının daha önce izole edilmiş metabolitin ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının karşılaştırılmasıyla aydınlatıldı.

4.1.3. *A. sydowii* ile testosteron (**4**) biyotransformasyonu

Testosteron (**4**) (1 g) bileşiğinin *A. sydowii* MRC 200653 ile 32 °C'de 5 gün süren inkübasyonundan elde edilen yağimsı maddenin (2043 mg) üzerinde gerçekleştirilen kolon kromatografisi çalışmasından sırasıyla değişmeyen başlangıç maddesi (214 mg) ve aşağıdaki metabolitler elde edildi (Şekil 4.4.);



Şekil 4.4. *A. sydowii* MRC 200653 ile testosteron (**4**) biyotransformasyonu

6 β ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (**45**) (507 mg, %48)

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

Erime noktası: 217-218 °C, (lit. [84] erime noktası: 215-220 °C).

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3497, 1660 ve 1622.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,83 (3H, s, 18-H); 1,37 (3H, s, 19-H); 3,64 (1H, t, $J = 8,5$ Hz, 17 α -H); 4,35 (1-H, bs, 6 α -H); 5,81 (1H, s, 4-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): (Tablo 5.2.).

14 α ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (**55**) (64 mg, %6)

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

Erime noktası: 180-181 °C, (lit. [84] erime noktası: 181-185 °C).

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3445, 1658 ve 1643.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,91 (3H, s, 18-H); 1,21 (3H, s, 19-H); 4,31 (1H, t, $J = 8,5$ Hz, 17 α -H); 5,72 (1H, s, 4-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): (Tablo 5.2.).

15 α ,17 β - Dihidroksiandrost-4-en-3-on (**65**) (106 mg, %10)

Etil asetat ile elüsyon neticesinde asetonun iğneler şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 98-99 °C, (lit. [85] erime noktası: 93-94 °C).

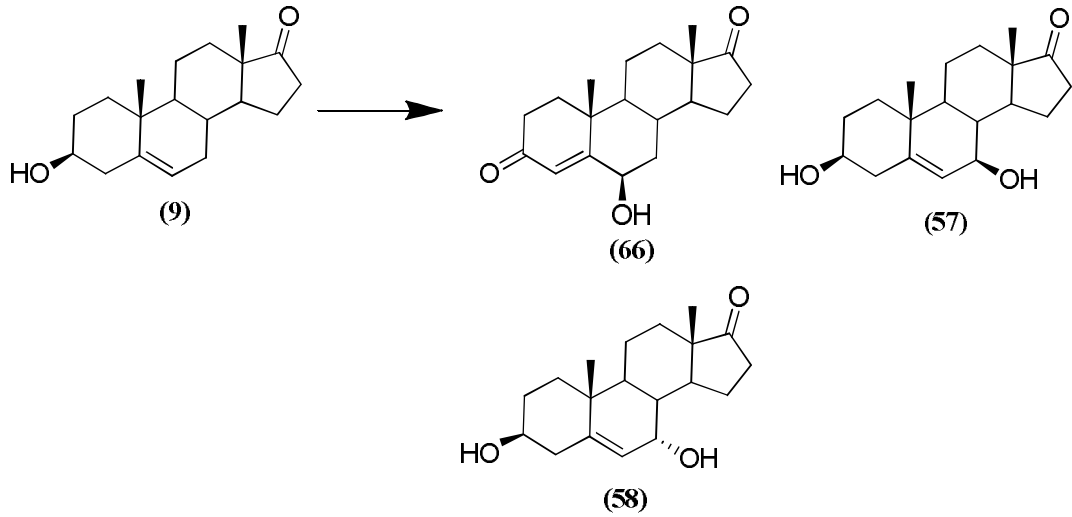
IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3394, 2927, 1665 ve 1645.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,84 (3H, s, 18-H); 1,22 (3H, s, 19-H); 3,92 (1H, t, $J = 8,5$ Hz, 17 α -H); 4,13 (1H, dt, $J = 4$ ve 10 Hz, 15 β -H); 5,75 (1H, s, 4-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): (Tablo 5.2.).

4.1.4. *A. sydowii* ile DHEA (**9**) biyotransformasyonu

DHEA (**9**) (1 g) bileşiğinin *A. sydowii* MRC 200653 ile 32 °C'de 5 gün süren inkübasyonundan elde edilen yağimsı maddenin (2100 mg) üzerinde gerçekleştirilen kolon kromatografisi çalışmasından sırasıyla değişmeyen başlangıç maddesi (415 mg) ve aşağıdaki metabolitler elde edildi (Şekil 4.5.);



Şekil 4.5. *A. sydowii* MRC 200653 ile DHEA (9) bileşiğinin biyotransformasyonu

6β-hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (66) (422 mg, %40)

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

Erime noktası: 190-191 °C, (lit. [84] erime noktası: 190-193 °C).

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

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,92 (3H, s, 18-H); 1,39 (3H, s, 19-H); 4,37 (1H, t, $J = 3$ Hz, 6 α -H); 5,81 (1H, bs, 4-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): (Tablo 5.3.).

3β,7β-dihidroksiandrost-5-en-3,17-dion (57) (54 mg, %5)

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

Erime noktası: 205-206 °C, (lit. [86] erime noktası: 207 °C).

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3242,1737 ve 1660.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,92 (3H, s, 18-H); 1,06 (3H, s, 19-H); 3,54 (1H, tt, $J = 5$ ve 10 Hz, 3 α -H); 3,94 (1H, dt, $J = 8$ ve 4 Hz, 7 α -H); 5,30 (1H, bs, 6H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): (Tablo 5.3.).

3β,7α-dihidroksiandrost-5-en-17-on (58) (32 mg, %3)

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

Erime noktası: 178-179 °C, (lit. [86] erime noktası: 177 °C).

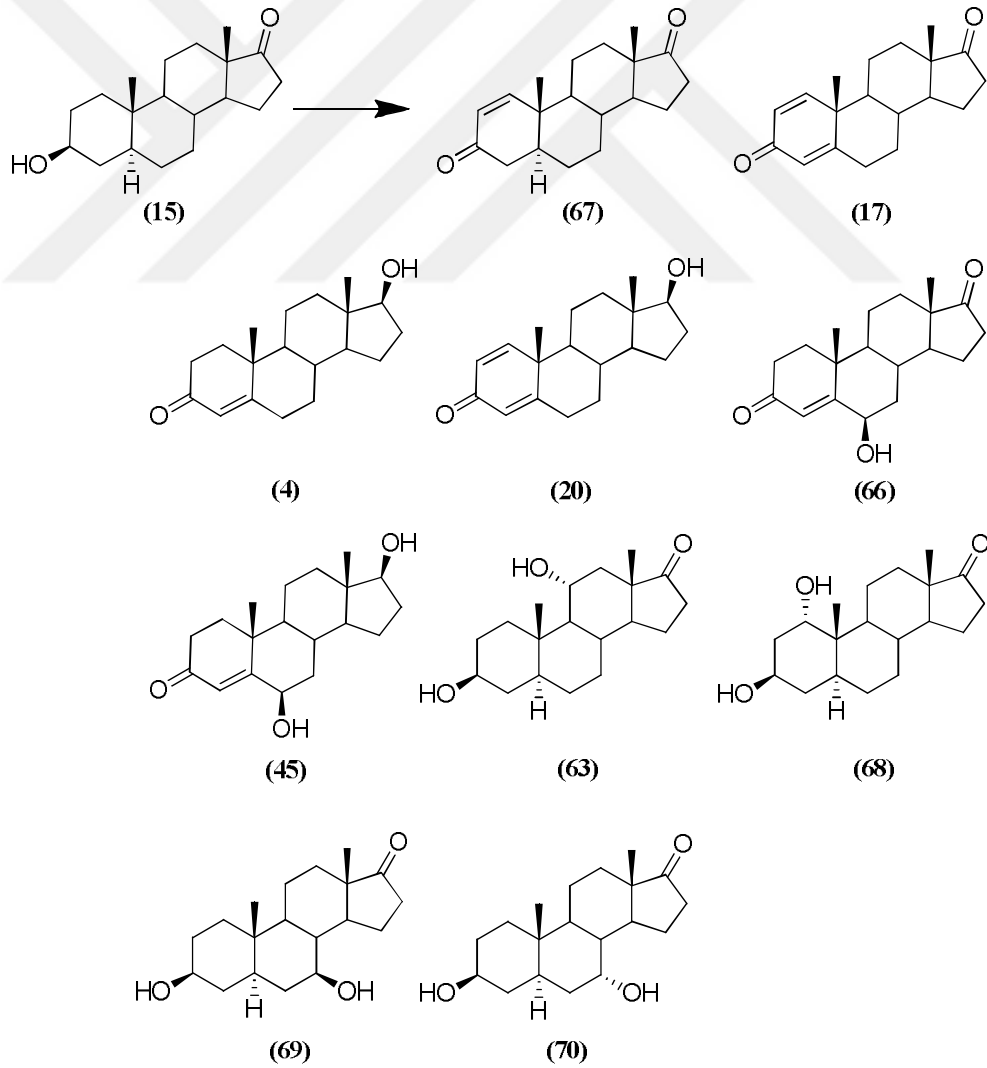
IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3417, 1740 ve 1658.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,88 (3H, s, 18-H); 1,01 (3H, s, 19-H); 3,56 (1H, tt, $J = 5$ ve 10 Hz, $3\alpha\text{-H}$); 3,96 (1H, bs, $7\beta\text{-H}$); 5,63 (1H, d, $J = 5$ Hz, 6-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): (Tablo 5.3.).

4.1.5. *A. sydowii* ile epiandrosteron (15) biyotransformasyonu

Epiandrosteron (15) (1 g) bileşiğinin *A. sydowii* MRC 200653 ile 32 °C'de 5 gün süren inkübasyonundan elde edilen yağimsı maddenin (2847 mg) üzerinde gerçekleştirilen kolon kromatografisi çalışmasından değişmeyen başlangıç maddesi (155 mg) ve aşağıdaki metabolitler elde edildi (Şekil 4.6.);



Şekil 4.6. *A. sydowii* MRC 200653 ile epiandrosteron (15) biyotransformasyonu

5 α -Androst-1-en-3,17-dion (**67**) (20 mg, %2)

%20'lik çözen sistemiyle elüsyon neticesinde etil asetatın iğneler şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 141-142 °C, (lit. [87] erime noktası: 139,5-140,5 °C).

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 1740 ve 1671.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,93 (3H, s, 18-H); 1,04 (3H, s, 19-H); 5,86 (1H, d, $J = 10$ Hz, 2-H); 7,15 (1H, d, $J = 10,0$ Hz, 1-H)

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): (Tablo 5.4.).

Androsta-1,4-dien-3,17-dion (**17**) (49 mg, %5)

%30'luk çözen sistemiyle elüsyon neticesinde aseton-*n*-hegzandan iğneler şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 143-144 °C, (lit. [88] erime noktası: 141-142 °C).

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 2920, 2860, 1738 ve 1660.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,94 (3H, s, 18-H); 1,24 (3H, s, 19-H); 6,10 (1H, s, 4-H); 6,24 (1H, d, $J = 10$ Hz, 2-H); 7,10 (1H, d, $J = 10$ Hz, 1-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): (Tablo 5.4.).

Testosteron (**4**) (20 mg, %2)

%40'luk çözen sistemiyle elüsyon neticesinde elde edildi. Bileşiğin yapı tayini ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının otantik bir numuneye ait ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları ile karşılaştırılmasıyla anlaşıldı.

17 β -Hidroksiandrosta-1,4-dien-3-on (**20**) (31 mg, %3)

%40'luk çözen sistemiyle elüsyon neticesinde asetonun iğneler şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 172-173 °C, (lit. [89] erime noktası: 169-170 °C).

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3520, 1660, 1620 ve 1600.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,82 (3H, s, 18-H); 1,24 (3H, s, 19-H); 3,64 (1H, t, $J = 8,5$ Hz, 17 α -H); 6,08 (1H, s, 4-H); 6,21 (1H, dd, $J = 1,8$ ve 10 Hz, 2-H); 7,05 (1H, d, $J = 10$ Hz, 1-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): (Tablo 5.4.).

6 β -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**66**) (333 mg, %32)

%50'lik çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde elde edildi. Bileşiğin yapı tayini ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının daha önce izole edilmiş metabolitin ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının karşılaştırılmasıyla anlaşıldı.

6 β ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (**45**) (21 mg, %2)

%60'lık çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde elde edildi. Bileşiğin yapı tayini ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının daha önce izole edilmiş metabolitin ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının karşılaştırılmasıyla anlaşıldı.

3 β ,11 α -Dihidroksi-5 α -androstan-17-on (**63**) (22 mg, %2)

%60'lık çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde asetondan yassı çubuklar şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 105-106 °C, (lit. [90] erime noktası: 103-106 °C).

IR ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3473 ve 1740.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,92 (3H, s, 18-H); 1,01 (3H, s, 19-H); 3,57 (1H, tt, $J = 5$ ve 11 Hz, 3 α -H); 3,96 (1H, dt, $J = 5$ ve 10 Hz, 11 β -H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): (Tablo 5.4.).

1 α ,3 β -Dihidroksi-5 α -androstan-17-on (**68**) (53 mg, %5)

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

Erime noktası: 204-205 °C, (lit. [91] erime noktası: 200-201 °C).

IR ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3495, 3430 ve 1730.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,86 (3H, s, 18-H); 0,83 (3H, s, 19-H); 3,83 (1H, bs, 1 β -H); 4,03 (1H, tt, $J = 5$ ve 11 Hz, 3 α -H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): (Tablo 5.4.).

3 β ,7 β -Dihidroksi-5 α -androstan-17-on (**69**) (32 mg, %3)

%80'lik çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde asetondan küpler şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 238-239 °C, (lit. [92] erime noktası: 240-244 °C).

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3425 ve 1740.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,86 (3H, s, 18-H); 0,89 (3H, s, 19-H); 3,45 (1H, m, 7 α -H); 3,60 (1H, tt, $J = 5$ ve 11 Hz, 3 α -H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): (Tablo 5.4.).

3 β ,7 α -Dihidroksi-5 α -androstan-17-on (**70**) (21 mg, %2)

%80'lik çözügen sistemiyle elüsyon neticesinde asetondan prizmalar şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 197-198 °C, (lit. [90] erime noktası: 194 °C).

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3600, 3420 ve 1740.

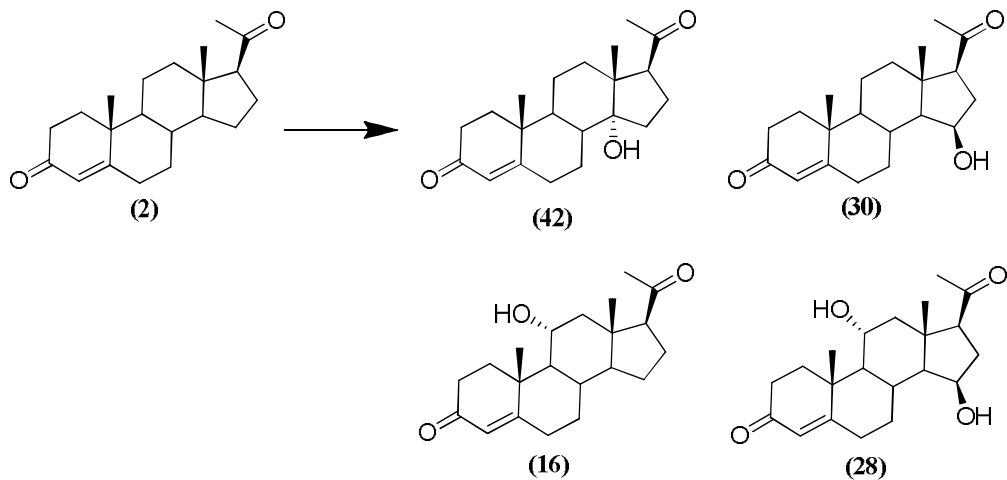
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,84 (3H, s, 18-H); 0,87 (3H, s, 19-H); 3,58 (1H, tt, $J = 5$ ve 11 Hz, 3 α -H); 3,95 (1H, bs, 7 β -H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): (Tablo 5.4.).

4.2. *A. candidus* ile Substratların Biotransformasyonları

4.2.1. *A. candidus* ile progesteron (**2**) biyotransformasyonu

Progesteron (**2**) (1 g) bileşiğinin *A. candidus* MRC 200634 küfö ile 28 °C'de 5 gün süren inkübasyonundan elde edilen yağimsı maddenin (2137 mg) üzerinde gerçekleştirilen kolon kromatografisi çalışmasından sırasıyla değişmeyen başlangıç maddesi (100 mg) ve aşağıdaki metabolitler elde edildi (Şekil 4.7.);



Şekil 4.7. *A. candidus* MRC 200634 ile progesteron (**2**) biyotransformasyonu

14 α -Hidroksipregn-4-en-3,20-dion (**42**) (64 mg, %6)

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

Erime noktası: 202-203 °C, (lit. [93] erime noktası: 204-206 °C).

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3480, 2930, 1695 ve 1650

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,79 (3H, s, 18-H); 1,21 (3H, s, 19-H); 2,15 (3H, s, 21-H); 3,22 (1H, t, $J = 8,5$ Hz, 17 α -H); 5,74 (1H, s, 4-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): (Tablo 5.1.).

15 β -Hidroksipregn-4-en-3,20-dion (**30**) (251 mg, %24)

%60'lık çözen sistemiyle elüsyon neticesinde elde edildi. Bileşiğin yapı tayini ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının daha önce izole edilmiş metabolitin ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının karşılaştırılmasıyla anlaşıldı.

11 α -Hidroksipregn-4-en-3,20-dion (**16**) (318 mg, %30)

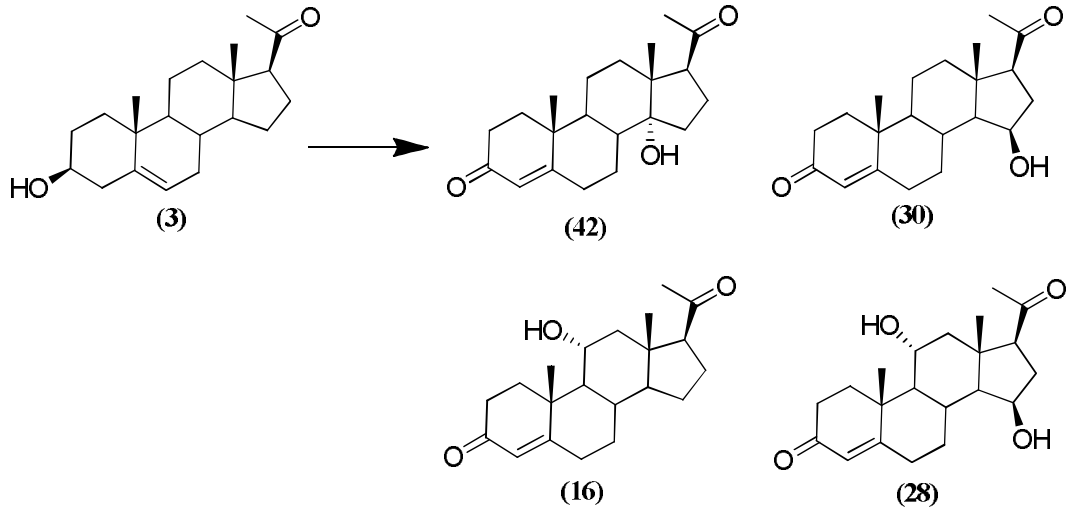
%60'lık çözen sistemiyle elüsyon neticesinde elde edildi. Bileşiğin yapı tayini ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının daha önce izole edilmiş metabolitin ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının karşılaştırılmasıyla anlaşıldı.

11 α ,15 β -Dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (**28**) (87 mg, %8)

%70'lik çözen sistemiyle elüsyon neticesinde elde edildi. Bileşiğin yapı tayini ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının daha önce izole edilmiş metabolitin ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının karşılaştırılmasıyla anlaşıldı.

4.2.2. *A. candidus* ile pregnenolon (**3**) biyotransformasyonu

Pregnenolon (**3**) (1 g) bileşiğinin *A. candidus* MRC 200634 küfö ile 28 °C'de 5 gün süren inkübasyonundan elde edilen yağimsı maddenin (2177 mg) üzerinde gerçekleştirilen kolon kromatografisi çalışmasından sırasıyla değişmeyen başlangıç maddesi (136 mg) ve aşağıdaki metabolitler elde edildi (Şekil 4.8.);



Şekil 4.8. *A. candidus* MRC 200634 ile pregnenolon (3) biyotransformasyonu

14 α -Hidroksipreg-4-en-3,20-dion (42) (42 mg, %4)

%50'lik çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde elde edildi. Bileşiğin yapı tayini ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının daha önce izole edilmiş metabolitin ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının karşılaştırılmasıyla anlaşıldı.

15 β -Hidroksipreg-4-en-3,20-dion (30) (178 mg, %17)

%60'lık çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde elde edildi. Bu bileşiğin yapı tayini ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının daha önce izole edilmiş metabolitin ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının karşılaştırılmasıyla anlaşıldı.

11 α -Hidroksipreg-4-en-3,20-dion (16) (260 mg, %25)

%60'lık çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde elde edildi. Bileşiğin yapı tayini ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının daha önce izole edilmiş metabolitin ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının karşılaştırılmasıyla anlaşıldı.

11 α ,15 β -Dihidroksipreg-4-en-3,20-dion (28) (54 mg, %5)

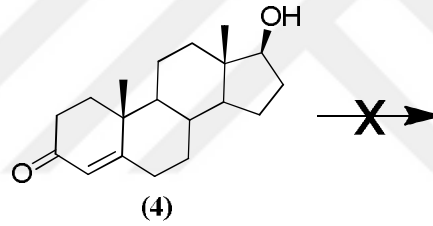
%70'lik çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde elde edildi. Bileşiğin yapı tayini ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının daha önce izole edilmiş metabolitin ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının karşılaştırılmasıyla anlaşıldı.

4.2.3. *A. candidus* ile testosteron (4) bileşiğinin ilk biyotransformasyonu

10 mL DMF içinde çözülmüş testosteron (4) (1 g) bileşiğinin *A. candidus* MRC 200634 ile 28 °C'de 5 gün süren inkübasyonundan elde edilen yağimsı maddenin (2111 mg) üzerinde gerçekleştirilen kolon kromatografisi çalışmasından değişmeyen başlangıç maddesi (981 mg) elde edildi (Şekil 4.9.).

4.2.4. *A. candidus* ile testosteron (4) bileşiğinin ikinci biyotransformasyonu

10 mL DMF içinde çözülmüş testosteron (1 g) bileşiğinin *A. candidus* MRC 200634 ile 28 °C'de 5 gün süren inkübasyonundan elde edilen yağimsı maddenin (2200 mg) üzerinde gerçekleştirilen kolon kromatografisi çalışmasından değişmeyen başlangıç maddesi (974 mg) elde edildi (Şekil 4.9.).



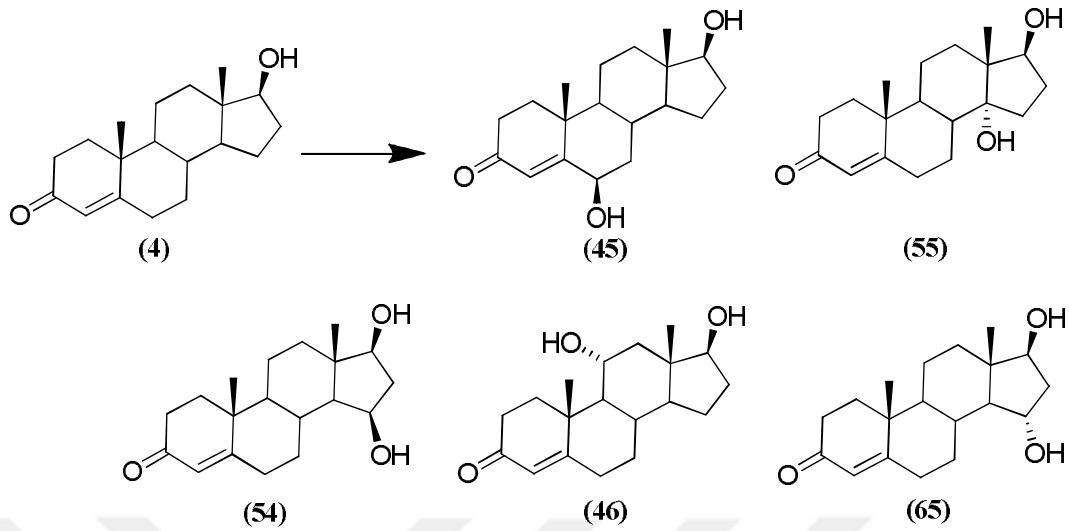
Şekil 4.9. *A. candidus* MRC 200634 ile testosteron (4) bileşiğinin ilk iki biyotransformasyonu

4.2.5. *A. candidus* ile testosteron (4) bileşiğinin üçüncü biyotransformasyonu

10 mL etanol içinde çözülmüş testosteron (4) (1 g) bileşiğinin *A. candidus* MRC 200634 ile 28 °C'de 5 gün süren inkübasyonundan elde edilen yağimsı maddenin (2241 mg) üzerinde gerçekleştirilen kolon kromatografisi çalışmasından sırasıyla değişmeyen başlangıç maddesi (227 mg) ve aşağıdaki metabolitler elde edildi (Şekil 4.10.);

6β,17β-Dihidroksiandrost-4-en-3-on (45) (32 mg, %3)

%60'lık çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde elde edildi. Bileşiğin yapı tayini ¹H ve ¹³C NMR spektrumlarının daha önce izole edilmiş metabolitin ¹H ve ¹³C NMR spektrumlarının karşılaştırılmasıyla anlaşıldı.



Şekil 4.10. *A. candidus* MRC 200634 ile testosteron (4) bileşiğinin 3. biyotransformasyonu

14 α ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (**55**) (53 mg, %5)

%70'lik çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde elde edildi. Bileşiğin yapı tayini ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının daha önce izole edilmiş metabolitin ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının karşılaştırılmasıyla anlaşıldı.

15 β ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (**54**) (44 mg, %4)

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

Erime noktası: 201-202 °C, (lit. [68] erime noktası: 201-205 °C).

IR ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3425, 2950 ve 1650.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 1,03 (3H, s, 18-H); 1,23 (3H, s, 19-H); 3,53 (1H, t, $J = 8,5$ Hz, 17 α -H); 4,20 (1H, ddd, $J = 7,8, 5,7, 2,5$ Hz, 15 α -H); 5,74 (1H, s, 4-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): (Tablo 5.2.).

11 α ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (**46**) (106 mg, %10)

%70'lik çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde asetondan küpler şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 171-172 °C, (lit. [68] erime noktası: 168-172 °C).

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

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,82 (3H, s, 18-H); 1,35 (3H, s, 19-H); 3,70 (1H, t, $J = 8,5$ Hz, 17 α -H); 4,00 (1H, td, $J = 10,5, 5,0$ Hz, 11 β -H); 5,73 (1H, s, 4-H).

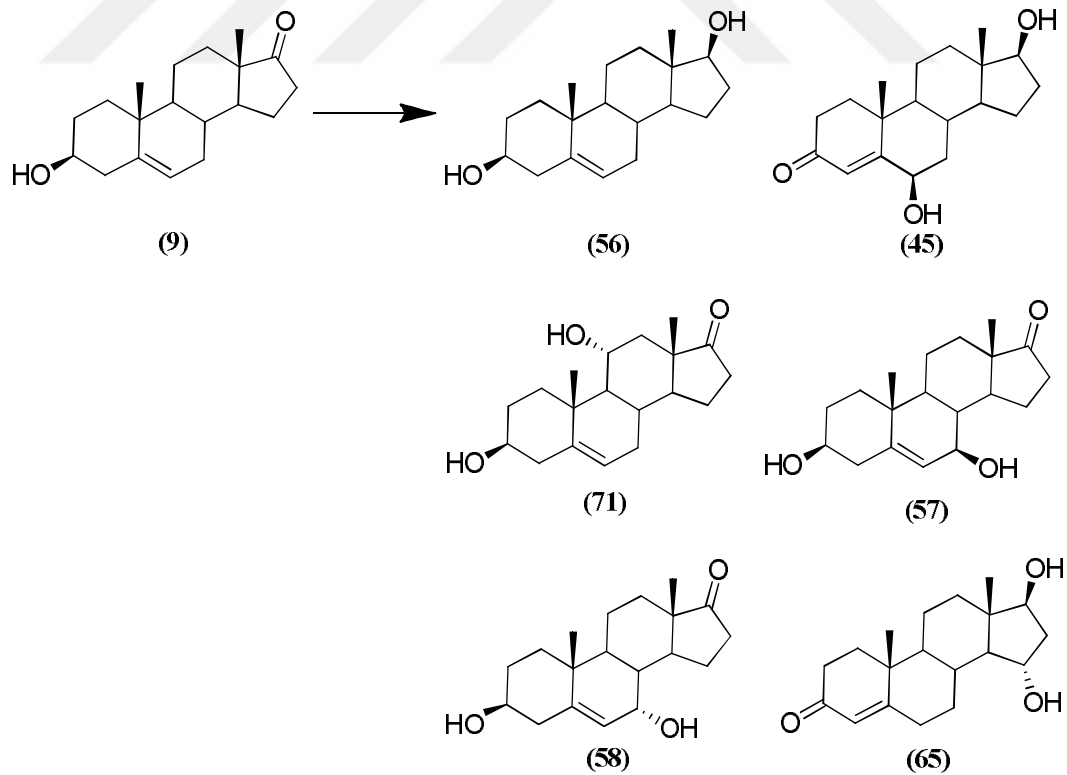
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): (Tablo 5.2.).

15 α ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (65) (128 mg, %12)

Etil asetat ile elüsyon neticesinde elde edildi. Bileşiğin yapı tayini ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının daha önce izole edilmiş metabolitin ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının karşılaştırılmasıyla anlaşıldı.

4.2.6. *A. candidus* ile DHEA (9) biyotransformasyonu

DHEA (9) (1 g) bileşiğinin *A. candidus* MRC 200634 küfö ile 28 °C'de 5 gün süren inkübasyonundan elde edilen yağimsı maddenin (1892 mg) üzerinde gerçekleştirilen kolon kromatografisi çalışmasından sırasıyla değişmeyen başlangıç maddesi (687 mg) ve aşağıdaki metabolitler elde edildi (Şekil 4.11.);



Şekil 4.11. *A. candidus* MRC 200634 ile DHEA (9) biyotransformasyonu

3 β ,17 β -Dihidroksiandrost-5-en (**56**) (30 mg, %3)

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

Erime noktası: 175-177 °C, (lit. [85] erime noktası: 188-189 °C).

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3472 ve 1660

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,76 (3H, s, 18-H); 1,03 (3H, s, 19-H); 3,55 (1H, m, 3 α -H); 3,65 (1H, t, $J = 8,5$ Hz, 17 α -H); 5,34 (1H, d, $J = 5$ Hz, 6-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): (Tablo 5.3.).

6 β ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (**45**) (20 mg, %2)

%60'lık çözen sistemiyle elüsyon neticesinde elde edildi. Bileşiğin yapı tayini ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının daha önce izole edilmiş metabolitin ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının karşılaştırılmasıyla anlaşıldı.

3 β ,11 α -Dihidroksiandrost-5-en-17-on (**71**) (73 mg, %7)

%70'lik çözen sistemiyle elüsyon neticesinde etil asetat-petrol eterinden iğneler şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 205-206 °C, (lit. [86] erime noktası: 210 °C).

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3450, 1740 ve 1650.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,87 (3H, s, 18-H); 1,20 (3H, s, 19-H); 3,54 (1H, tt, $J = 5$ ve 10 Hz, 3 α -H); 4,08 (1H, dt, $J = 5$ ve 10 Hz, 11 β -H); 5,42 (1H, d, $J = 5$ Hz, 6-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): (Tablo 5.3.).

3 β ,7 β -Dihidroksiandrost-5-en-17-on (**57**) (21 mg, %2)

%80'lik çözen sistemiyle elüsyon neticesinde elde edildi. Bileşiğin yapı tayini ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının daha önce izole edilmiş metabolitin ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının karşılaştırılmasıyla anlaşıldı.

3 β ,7 α -Dihidroksiandrost-5-en-3,17-dion (**58**) (62 mg, %6)

Etil asetat ile elüsyon neticesinde elde edildi. Bileşiğin yapı tayini ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının daha önce izole edilmiş metabolitin ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının karşılaştırılmasıyla anlaşıldı.

15 α ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (**65**) (23 mg, %2)

Etil asetat ile elüsyon neticesinde elde edildi. Bileşiğin yapı tayini ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının daha önce izole edilmiş metabolitin ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının karşılaştırılmasıyla anlaşıldı.

4.2.7. *A. candidus* ile epiandrosteron (**15**) biyotransformasyonu

Epiandrosteron (**15**) (1 g) bileşiğinin *A. candidus* MRC 200634 ile 28 °C'de 5 gün süren inkübasyonundan elde edilen yağimsı maddenin (2023 mg) üzerinde gerçekleştirilen kolon kromatografisi çalışmasından sırasıyla değişmeyen başlangıç maddesi (90 mg) ve aşağıdaki metabolitler elde edildi (Şekil 4.12) ;

11 α -Hidroksi-5 α -androstan-3,17-dion (**62**) (31 mg, %3)

%40'lık çözücü sistemiyle elüsyon neticesinde asetondan iğneler şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 195-196 °C, (lit. [94] erime noktası: 191-193 °C).

IR ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3420, 1734 ve 1720.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,90 (3H, s, 18-H); 1,15 (3H, s, 19-H); 4,03 (1H, dt, $J = 5$ ve 10 Hz, 11 β -H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): (Tablo 5.5.).

14 α -Hidroksi-5 α -androstan-3,17-dion (**72**) (42 mg, %4)

%40'lık çözücü sistemiyle elüsyon neticesinde metanolden prizmalar şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 226-227 °C, (lit. [95] erime noktası: 222-224 °C).

IR ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3410, 1730 ve 1710.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 1,01 (3H, s, 18-H); 1,04 (3H, s, 19-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): (Tablo 5.5.).

1 α ,3 α -Dihidroksi-5 α -androstan-17-on (**73**) (21 mg, %2)

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

Erime noktası: 194-195 °C.

IR ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3245 ve 1730.

Elementel analiz: $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_3$ (306,43) için %74,47 C, %9,87 H hesaplandı ve %74,56 C, %9,98 H gözlemlendi.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,85 (3H, s, 18-H); 0,77 (3H, s, 19-H); 3,73 (1H, bs, 1 β -H); 4,13 (1H, bs, 3 β -H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): (Tablo 5.5.).

3 α ,15 β -Dihidroksi-5 α -androstan-17-on (**74**) (128 mg, %12)

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

Erime noktası: 212-213 °C, (lit. [96] erime noktası: 214-219 °C).

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

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 1,14 (3H, s, 18-H); 0,81 (3H, s, 19-H); 4,02 (1H, bs, 3 β -H); 4,52 (1H, ddd, $J = 5,6, 4,4$ ve $1,4$ Hz, 15 α -H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): (Tablo 5.5.).

3 β ,14 α -Dihidroksi-5 α -androstan-17-on (**75**) (32 mg, %3)

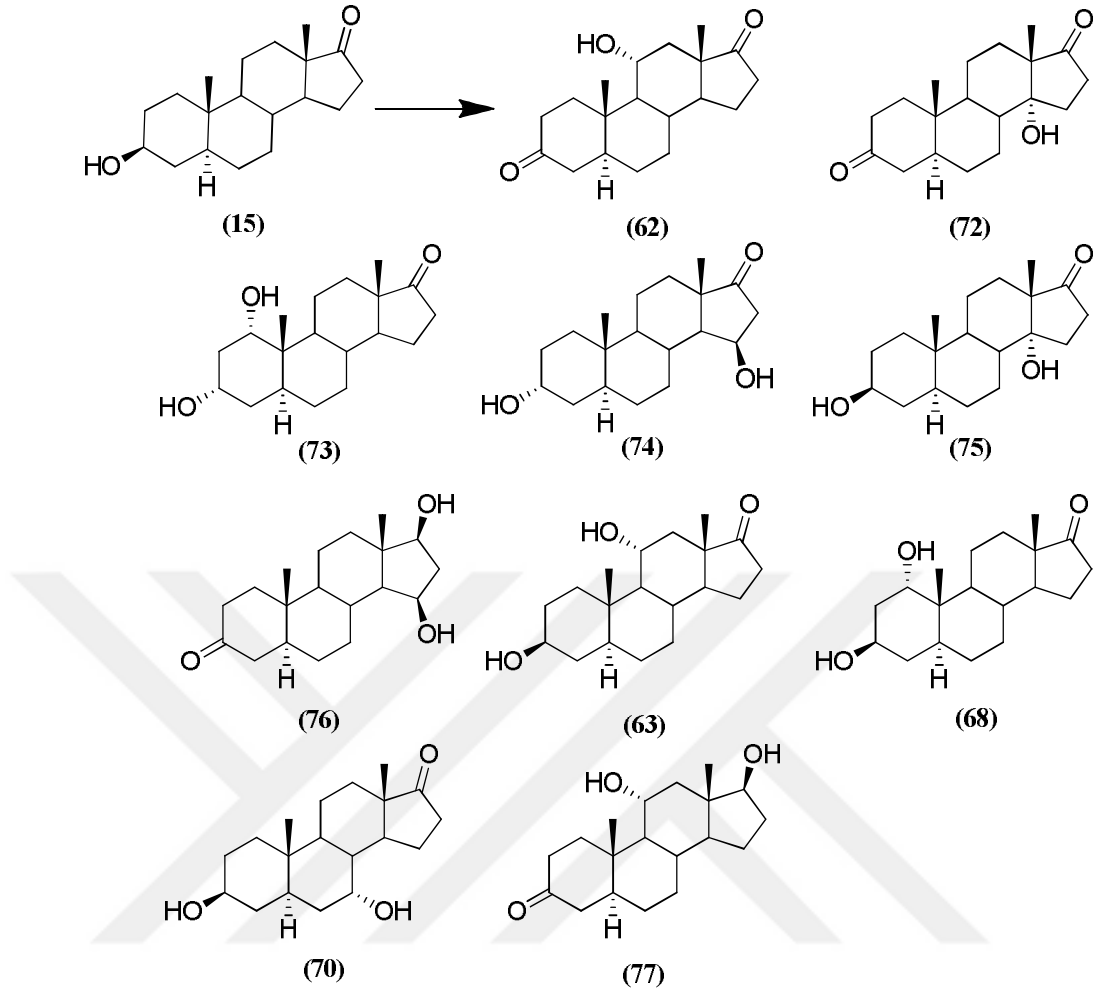
%60'lık çözücü sistemiyle elüsyon neticesinde etil asetatın iğneler şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 217-218 °C, (lit. [97] erime noktası: 218-220 °C).

IR ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3340 ve 1745.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,98 (3H, s, 18-H); 0,84 (3H, s, 19-H); 3,59 (1H, tt, $J = 5$ ve 11 Hz, 3 α -H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): (Tablo 5.5.).



Şekil 4.12. *A. candidus* MRC 200634 ile epiandrosteron (15) biyotransformasyonu

15 β ,17 β -dihidroksi-5 α -androstan-3-on (76) (20 mg, %2)

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

Erime noktası: 240-241 °C.

IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3380 ve 1710.

Elementel analiz: C₁₉H₃₀O₃ (306,43) için %74,47 C, %9,87 H hesaplandı ve %74,58 C, %9,80 H gözlemlendi.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 1,03 (3H, s, 18-H); 1,06 (3H, s, 19-H); 3,57 (1H, t, $J = 8,7$ Hz, 17 α -H); 4,20 (1H, ddd, $J = 7,7$, 5,5 ve 2,4 Hz, 15 α -H)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): (Tablo 5.5.).

3 β ,11 α -Dihidroksi-5 α -androstan-17-on (**63**) (158 mg, %15)

%70'lik çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde elde edildi. Bileşiğin yapı tayini ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının daha önce izole edilmiş metabolitin ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının karşılaştırılmasıyla anlaşıldı.

1 α ,3 β -Dihidroksi-5 α -androstan-17-on (**68**) (149 mg, %14)

%80'lik çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde elde edildi. Bileşiğin yapı tayini ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının daha önce izole edilmiş metabolitin ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının karşılaştırılmasıyla anlaşıldı.

3 β ,7 α -Dihidroksi-5 α -androstan-17-on (**70**) (21 mg, %2)

%80'lik çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde elde edildi. Bileşiğin yapı tayini ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının daha önce izole edilmiş metabolitin ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının karşılaştırılmasıyla anlaşıldı.

11 α ,17 β -Dihidroksi-5 α -androstan-3-on (**77**) (22 mg, %2)

%80'lik çözgen sistemiyle elüsyon neticesinde metanolden iğneler şeklinde kristallendirildi.

Erime noktası: 185-186 °C, (lit. [98] erime noktası: 181-183 °C).

IR ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3415 ve 1717.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 0,76 (3H, s, 18-H); 1,13 (3H, s, 19-H); 3,73 (1H, t, $J = 8,5$ Hz, 17 α -H); 4,00 (1H, dt, $J = 5$ ve 10 Hz, 11 β -H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): (Tablo 5.5.).

4.3. A. japonicus ile Substratların Biyotransformasyonları

4.3.1. A. japonicus ile progesteron (2) bileşiğinin 1. biyotransformasyonu

DMF (10 mL) içerisinde çözülen progesteron (2) (1 g) bileşiğinin *A. japonicus* MRC U-3048 küfü ile 28 °C'de 5 gün inkübasyonundan elde edilen yağsı maddenin (1854 mg) üzerinde gerçekleştirilen kolon kromatografisi çalışmasından sadece bir bileşik (980 mg) elde edildi. Elde edilen bileşiğe ait ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları ile

otantik bir numunenin ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları karşılaştırıldığında bileşiğin değişmeyen başlangıç maddesi olduğu belirlendi (Şekil 4.13).

4.3.2. *A. japonicus* ile progesteron (2) bileşiğinin 2. biyotransformasyonu

Etanol (10 mL) içerisinde çözülen progesteron (2) (1 g) bileşiğinin *A. japonicus* MRC U-3048 küfö ile 28 °C'de 5 gün süren inkübasyonundan elde edilen yağimsı maddenin (1920 mg) üzerinde gerçekleştirilen kolon kromatografisi çalışmasından sadece bir bileşik (986 mg) elde edildi. Elde edilen bileşiğe ait ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları ile otantik bir numunenin ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları karşılaştırıldığında bileşiğin tepkime vermeyen başlangıç maddesi olduğu tespit edildi (Şekil 4.13).

4.3.3. *A. japonicus* ile pregnenolon (3) bileşiğinin 1. biyotransformasyonu

DMF (10 mL) içerisinde çözülen pregnenolon (3) (1 g) bileşiğinin *A. japonicus* MRC U-3048 küfö ile 28 °C'de 5 gün süren inkübasyonundan elde edilen yağimsı maddenin (1863 mg) üzerinde gerçekleştirilen kolon kromatografisi çalışmasından sadece bir bileşik (980 mg) elde edildi. Elde edilen bileşiğe ait ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları ile otantik bir numunenin ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları karşılaştırıldığında bileşiğin değişmeyen başlangıç maddesi olduğu belirlendi (Şekil 4.13).

4.3.4. *A. japonicus* ile pregnenolon (3) bileşiğinin 2. biyotransformasyonu

Etanol (10 mL) içerisinde çözülen pregnenolon (3) (1 g) bileşiğinin *A. japonicus* MRC U-3048 küfö ile 28 °C'de 5 gün süren inkübasyonundan elde edilen yağimsı maddenin (1789 mg) üzerinde gerçekleştirilen kolon kromatografisi çalışmasından sadece bir bileşik (990 mg) elde edildi. Elde edilen bileşiğe ait ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları ile otantik bir numunenin ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları karşılaştırıldığında bileşiğin değişmeyen başlangıç maddesi olduğu anlaşıldı (Şekil 4.13).

4.3.5. *A. japonicus* ile testosteron (4) bileşiminin 1. biyotransformasyonu

DMF (10 mL) içerisinde çözölen testosteron (4) (1 g) bileşiminin *A. japonicus* MRC U-3048 küfü ile 28 °C'de 5 gün süren inkübasyonundan elde edilen yağmsı maddenin (1784 mg) üzerinde gerçekleştirilen kolon kromatografisi çalışmasından sadece bir bileşik (975 mg) elde edildi. Elde edilen bileşime ait ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları ile otantik bir numunenin ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları karşılaştırıldığında bileşimin değişmeyen başlangıç maddesi olduğu tespit edildi (Şekil 4.13).

4.3.6. *A. japonicus* ile testosteron (4) bileşiminin 2. biyotransformasyonu

Etanol (10 mL) içerisinde çözölen testosteron (4) (1 g) bileşiminin *A. japonicus* MRC U-3048 küfü ile 28 °C'de 5 gün süren inkübasyonundan elde edilen yağmsı maddenin (1833 mg) üzerinde gerçekleştirilen kolon kromatografisi çalışmasından sadece bir bileşik (980 mg) elde edildi. Elde edilen bileşime ait ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları ile otantik bir numunenin ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları karşılaştırıldığında bileşimin değişmeyen başlangıç maddesi olduğu belirlendi (Şekil 4.13).

4.3.7. *A. japonicus* ile DHEA (9) bileşiminin 1. biyotransformasyonu

DMF (10 mL) içerisinde çözölen DHEA (9) (1 g) bileşiminin *A. japonicus* MRC U-3048 küfü ile 28 °C'de 5 gün süren inkübasyonundan elde edilen yağmsı maddenin (1769 mg) üzerinde gerçekleştirilen kolon kromatografisi çalışmasından sadece bir bileşik (977 mg) elde edildi. Elde edilen bileşime ait ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları ile otantik bir numunenin ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları karşılaştırıldığında bileşimin değişmeyen başlangıç maddesi olduğu anlaşıldı (Şekil 4.13).

4.3.8. *A. japonicus* ile DHEA (9) bileşığının 2. biyotransformasyonu

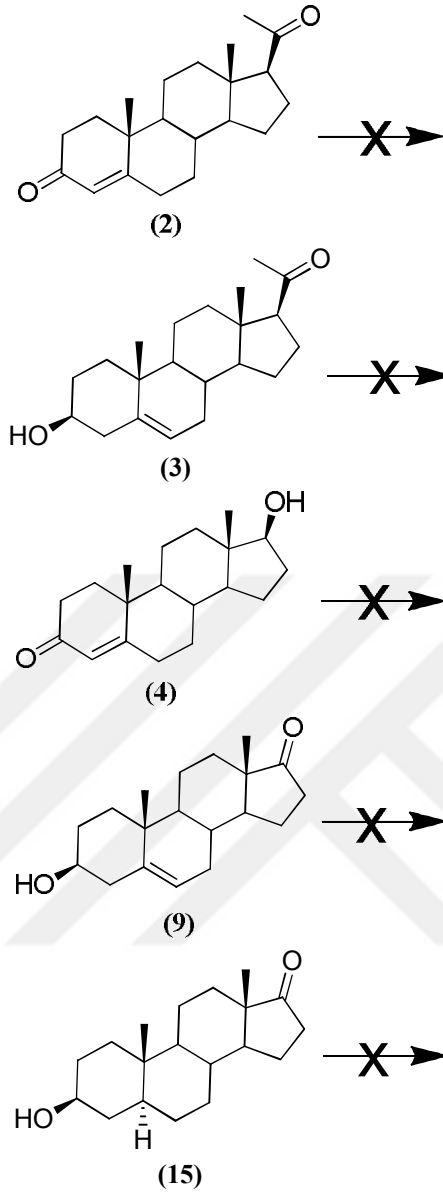
Etanol (10 mL) içerisinde çözülen DHEA (9) (1 g) bileşığının *A. japonicus* MRC U-3048 küfü ile 28 °C'de 5 gün süren inkübasyonundan elde edilen yağimsı maddenin (1800 mg) üzerinde gerçekleştirilen kolon kromatografisi çalışmasından sadece bir bileşik (983 mg) elde edildi. Elde edilen bileşiğe ait ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları ile otantik bir numunenin ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları karşılaştırıldığında bileşığın değişmeyen başlangıç maddesi olduğu belirlendi (Şekil 4.13).

4.3.9. *A. japonicus* ile epiandrosteron (15) bileşığının 1. biyotransformasyonu

DMF (10 mL) içerisinde çözülen epiandrosteron (15) (1 g) bileşığının *A. japonicus* MRC U-3048 küfü ile 28 °C'de 5 gün süren inkübasyonundan elde edilen yağimsı maddenin (1846 mg) üzerinde gerçekleştirilen kolon kromatografisi çalışmasından sadece bir bileşik (983 mg) elde edildi. Elde edilen bileşiğe ait ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları ile otantik bir numunenin ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları karşılaştırıldığında bileşığın değişmeyen başlangıç maddesi olduğu tespit edildi (Şekil 4.13).

4.3.10. *A. japonicus* ile epiandrosteron (15) bileşığının 2. biyotransformasyonu

Etanol (10 mL) içerisinde çözülen epiandrosteron (15) (1 g) bileşığının *A. japonicus* MRC U-3048 küfü ile 28 °C'de 5 gün süren inkübasyonundan elde edilen yağimsı maddenin (1921 mg) üzerinde gerçekleştirilen kolon kromatografisi çalışmasından sadece bir bileşik (980 mg) elde edildi. Elde edilen bileşiğe ait ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları ile otantik bir numunenin ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları karşılaştırıldığında bileşığın değişmeyen başlangıç maddesi olduğu belirlendi (Şekil 4.13).



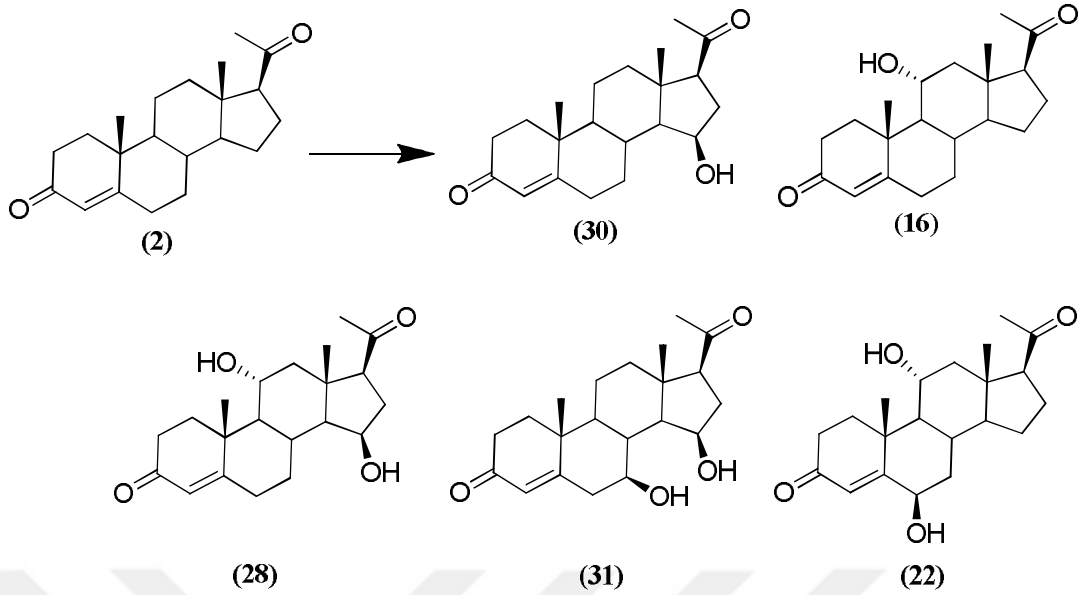
Şekil 4.13. *A. japonicus* MRC U-3048 küfö ile steroid biyotransformasyonu denemeleri

BÖLÜM 5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada progesteron (2), pregnenolon (3), testosteron (4), DHEA (9) ve epiandrosteron (15) steroidlerinin *A. sydowii* MRC 200653, *A. candidus* MRC 200634 ve *A. japonicus* MRC U-3048 küfleri ile biyotransformasyon çalışmaları gerçekleştirildi ve elde edilen metabolitlerin yapıları metabolitlerle substratların ¹H NMR ve ¹³C NMR spektrumları karşılaştırılarak aydınlatıldı.

Progesteron (2) bileşiğinin *A. sydowii* MRC 200653 ile beş gün süren inkübasyonu 5 metabolit verdi (Şekil 5.1.). İlk metabolit 15β-hidroksipregn-4-en-3,20-dion (30) olarak belirlendi. Metabolit δ_H 4.32 ppm (1H, m) ve δ_C 70.05 ppm'lerde bir 15β-hidroksil grubunun varlığını gösteren karakteristik rezonanslar verdi [99]. Buna ilaveten metabolitin ¹H NMR spektrumu 18-metil rezonansı bir 15β-hidroksil grubunun varlığını gösterecek şekilde aşağı alana doğru bir kayma (Δ 0.27 ppm) gösterdi. Metabolitin ¹³C NMR spektrumu C-14 rezonansı için aşağı alana doğru bir kayma (Δδ_C 4,42 ppm) gösterirken, C-8 rezonansı için ise yukarı alana doğru bir γ-gauche kayması (Δδ_C 3,94 ppm) göstermesi bir 15β-hidroksil grubunun varlığını daha da kuvvetlendirdi (Tablo 5.1.)

İkinci metabolit 11α-hidroksipregn-4-en-3,20-dion (16) olarak tanımlandı. Metabolit δ_H 4.03 ppm (1H, dt, *J* = 5 ve 10 Hz) ve δ_C 68.69 ppm'lerde bir 11α-hidroksil grubu için tipik olan yeni rezonanslar verdi [90]. Metabolitin ¹³C NMR spektrumu C-9 rezonansı için aşağı alana doğru bir kayma (Δδ_C 5,40 ppm) gösterirken, C-8 rezonansı için ise yukarı alana doğru bir γ-gauche kayması (Δδ_C 0,45 ppm) göstermesi bir 11α-hidroksil grubu varlığını daha da belirginleştirdi.



Şekil 5.1. *A. sydowii* MRC 200653 ile progesteron (2) biyotransformasyonu

Üçüncü metabolit 11 α ,15 β -dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (28) olarak belirlendi. Metabolit δ_H 4.05 ppm (1H, dt, $J = 5$ ve 10 Hz) ve δ_C 67.70 ppm'lerde bir 11 α -hidroksil grubu varlığını gösteren yeni rezonanslar verdi [90]. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu C-9 rezonansı için aşağı alana doğru bir kayma ($\Delta\delta_C$ 5,42 ppm) gösterirken, C-8 rezonansı için ise yukarı alana doğru bir γ -gauche kayması ($\Delta\delta_C$ 3,87 ppm) göstermesi bir 11 α -hidroksil grubu varlığını daha da doğruladı. Metabolit 1H NMR spektrumu bir 15 β -hidroksil grubunun varlığını gösterecek şekilde δ_H 4.31 ppm'de yeni bir rezonans (1H, m) verirken 18-metil rezonansı için aşağı alana doğru bir kayma ($\Delta\delta_H$ 0,30 ppm) gösterdi. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu C-14 ve C-16 rezonansları için aşağı alana doğru kaymalar (C-14 için $\Delta\delta_C$ 3,04 ppm ve C-16 için $\Delta\delta_C$ 14,91 ppm) gösterirken C-8 rezonansı için ise yukarı alana doğru bir γ -gauche kayması ($\Delta\delta_C$ 3,87 ppm) gösterdi. Bu kimyasal kayma değerleri bir 15 β -hidroksil grubunu varlığını daha da doğruladı.

Dördüncü metabolit 7 β ,15 β -dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (31) olarak tanımlandı. Metabolit δ_H 3,63 ppm (1H, m) ve δ_C 71,27 ppm'lerde bir 7 β -hidroksil grubunun varlığını gösteren karakteristik rezonanslar verdi [99]. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu C-6 rezonansı için aşağı alana doğru bir kayma ($\Delta\delta_C$ 9,88 ppm) gösterirken, C-5 rezonansı için ise yukarı alana doğru bir γ -gauche kayması ($\Delta\delta_C$

3,25 ppm) göstermesi bir 7 β -hidroksil grubunun varlığını daha da netleştirdi. Metabolit δ_H 4,46 ppm (1H, m) ve δ_C 73,69 ppm'lerde bir 15 β -hidroksil grubu için karakteristik olan diğer yeni rezonanslar da verdi [99]. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumunun C-14 ve C-16 rezonansları için aşağı alana doğru kaymalar (C-14 için $\Delta\delta_C$ 4,32 ppm ve C-16 için $\Delta\delta_C$ 11,07 ppm) göstermesi bir 15 β -hidroksil grubunu varlığını daha da doğruladı.

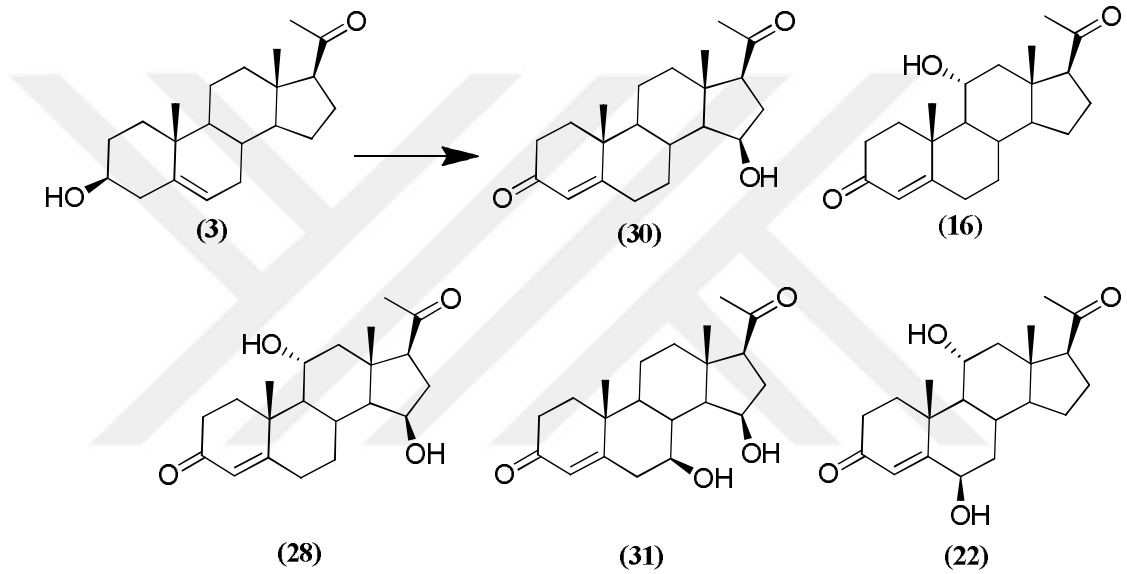
Tablo 5.1. Progesteron (2), pregnenolon (3) ve metabolitlerinin $CDCl_3$ veya $C_5D_5N^*$ 'deki ^{13}C NMR sinyalleri

C atomu	2	2*	3	16	22*	28	30	31	42
1	35,46	36,24	37,22	37,34	40,08	37,48	35,57	35,49	35,68
2	33,72	34,74	31,54	34,07	35,36	34,17	34,03	33,81	33,90
3	199,18	198,69	71,67	200,45	200,70	199,53	199,55	199,59	199,50
4	123,66	124,54	42,20	124,38	126,74	124,39	123,76	124,63	123,94
5	170,80	170,72	140,72	171,37	170,28	171,30	171,09	167,55	170,40
6	32,55	33,08	121,38	33,52	73,00	33,02	32,60	42,43	32,51
7	31,65	32,45	31,73	31,42	39,10	31,34	30,97	71,27	27,04
8	35,28	35,80	31,81	34,83	29,27	31,41	31,34	38,51	38,19
9	53,38	54,07	49,93	58,78	59,91	58,80	53,84	50,73	46,24
10	38,34	39,02	36,48	39,86	40,29	39,50	38,62	37,91	38,56
11	20,78	21,54	21,05	68,69	68,70	67,70	20,80	20,79	21,25
12	38,40	39,02	38,80	50,21	50,99	50,75	39,99	39,49	33,31
13	43,68	44,24	43,98	44,06	44,69	44,05	43,54	43,76	47,88
14	55,76	56,31	56,88	55,21	56,00	58,80	60,18	60,08	85,12
15	24,13	24,84	22,77	24,14	24,81	68,72	70,05	73,69	30,85
16	22,57	23,47	24,46	22,82	23,46	37,48	35,96	33,64	20,04
17	63,23	63,81	63,68	63,02	63,70	63,23	63,58	63,22	59,37
18	13,11	13,78	13,21	14,40	14,91	17,02	15,82	15,47	17,20
19	17,13	17,46	19,36	18,19	20,80	18,48	17,15	17,19	17,20
20	209,08	208,70	209,65	209,07	208,47	208,64	208,30	208,66	210,30
21	31,29	31,73	31,54	31,31	31,41	31,41	31,55	31,39	31,47

Beşinci metabolit 6 β ,11 α -dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (22) olarak belirlendi. Yüksek polaritesi yüzünden $CDCl_3$ yerine $C_5D_5N^*$ 'de çözünen metabolit δ_H 4,55 ppm (1H, t, $J = 3$ Hz) ve δ_C 73,00 ppm'de bir 6 β -hidroksil grubunun varlığını gösteren yeni rezonanslar verdi [81]. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu C-7 rezonansı için aşağı alana doğru bir kayma ($\Delta\delta_C$ 6,65 ppm) gösterirken, C-8 rezonansı için ise yukarı alana doğru bir γ -gauche kayması ($\Delta\delta_C$ 6,53 ppm) göstermesi bir 6 β -hidroksil grubunun varlığını ortaya koydu. Metabolit δ_C 68,70 ppm'de bir 11 α -hidroksil grubuna varlığını gösteren tipik bir rezonans verdi [81]. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu C-9 rezonansı için aşağı alana doğru bir kayma ($\Delta\delta_C$ 5,84 ppm)

gösterirken, C-8 rezonansı için ise yukarı alana doğru bir γ -gauche kayması ($\Delta\delta_C$ 6,53 ppm) göstermesi bir 11α -hidroksil grubunun varlığını daha da belirginleştirdi.

Pregnenolon (**3**) bileşiğinin *A. sydowii* MRC 200653 ile beş gün süren inkübasyonu daha önce progesteron (**2**) bileşiğinin *A. sydowii* MRC 200653 ile verdiği 5 aynı metaboliti verdi (Şekil 5.2.). Bu metabolitlerin yapı tayinleri ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları ile aynı küfle progesteron (**2**) inkübasyonundan elde edilen metabolitlere ait ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının karşılaştırılması ile gerçekleştirildi.



Şekil 5.2. *A. sydowii* MRC 200653 ile pregnenolon (**3**) biyotransformasyonu

Testosteron (**4**) bileşiğinin *A. sydowii* MRC 200653 ile beş gün süren inkübasyonu üç metabolit verdi (Şekil 5.3.). İlk metabolit $6\beta,17\beta$ -dihidroksiandro-4-en-3-on (**45**) olarak belirlendi. Metabolit δ_H 4,35 ppm (1H, bs) ve δ_C 72,57 ppm'lerde bir 6β -hidroksil grubu varlığı için karakteristik olan yeni rezonanslar verdi [100, 101]. Metabolitin ^1H NMR spektrumunun substratın δ_H 5.71 ppm'deki 4-H rezonansı (1H, s) için aşağı alana doğru bir kayma ($\Delta\delta_H$ 0.10 ppm) göstermesi 6β -hidroksil grubu varlığını daha da destekledi. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu C-7 rezonansı için aşağı alana doğru bir kayma ($\Delta\delta_C$ 5,77 ppm) gösterirken, C-8 rezonansı için ise yukarı alana doğru bir γ -gauche kayması ($\Delta\delta_C$ 5,53 ppm) göstermesi bir 6β -hidroksil grubunun varlığını netleştirdi (Tablo 5.2.).

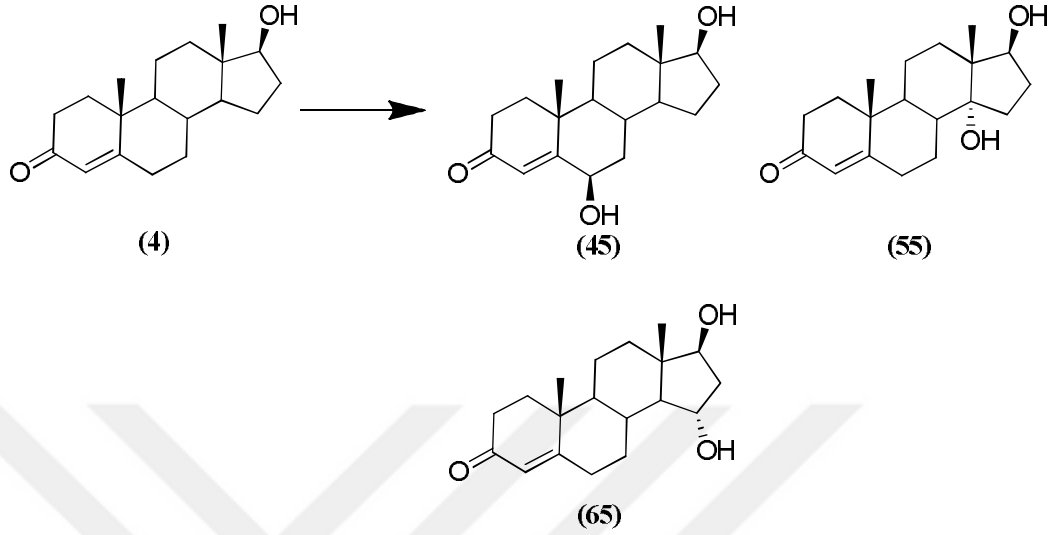
İkinci metabolit 14 α ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (**55**) olarak tanımlandı. Metabolit ^1H NMR spektrumu herhangi yeni bir rezonans vermezken metabolit ^{13}C NMR spektrumu δ_{C} 83,30 ppm'de tersiyer bir hidroksil grubunun varlığını gösteren yeni bir C atomu rezonansı verdi. Metabolite ait 17 α -H rezonansının aşağı alana doğru kayma ($\Delta\delta_{\text{H}}$ 0.70 ppm) göstermesi yeni bir 14 α -hidroksil grubu ile diaksiyal olarak etkileştiğini düşündürdü [84]. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu C-8 ve C-15 rezonansları için aşağı alana doğru kaymalar (C-8 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 3,66 ppm ve C-15 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 3,15 ppm) verirken C-9 ve C-16 rezonansları için ise yukarı alana doğru γ -gauche kaymaları (C-9 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 6,78 ppm ve C-16 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 0,12 ppm) verdi. Bu kimyasal kaymalar yeni bir 14 α -hidroksil grubunun varlığını teyit etti.

Tablo 5.2. Testosteron (**4**) ve bazı metabolitlerinin CDCl_3 'teki ^{13}C NMR sinyalleri

C atomu	4	45	46	54	55	65
1	35,18	36,28	37,35	35,71	35,67	35,84
2	33,46	34,08	34,11	33,91	33,88	34,05
3	199,57	200,80	200,58	199,70	199,72	200,11
4	123,24	126,01	124,37	123,88	123,81	123,82
5	171,66	168,90	171,38	171,23	170,87	171,81
6	32,42	72,57	33,56	32,65	32,50	32,96
7	31,13	36,90	31,38	30,99	28,51	32,31
8	35,18	29,65	35,23	31,42	38,84	35,47
9	53,50	53,58	59,08	54,22	46,72	54,04
10	38,25	37,96	39,95	38,76	38,74	38,84
11	20,21	20,46	68,77	20,52	19,65	20,64
12	36,00	37,96	43,48	37,82	32,65	36,76
13	42,36	42,77	48,29	42,20	46,91	44,41
14	50,02	50,32	49,69	55,11	83,30	58,46
15	22,91	23,16	23,18	69,06	26,06	72,51
16	29,65	30,17	29,64	43,34	29,53	42,59
17	80,75	81,46	80,89	81,06	78,52	78,77
18	10,76	11,07	12,23	13,70	14,86	12,77
19	16,96	19,37	18,31	17,28	17,18	17,66

Üçüncü metabolit 15 α ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (**65**) olarak belirlendi. Metabolit δ_{H} 4,13 ppm (1H, dt, $J = 4$ ve 10 Hz) ve δ_{C} 72,51 ppm'lerde yeni bir 15 α -hidroksil grubu varlığını gösteren tipik rezonanslar verdi [68]. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu C-14 ve C-16 rezonansları için aşağı alana doğru kaymalar (C-14 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 8,84 ppm ve C-16 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 12,94 ppm) verirken C-17 rezonansı için ise

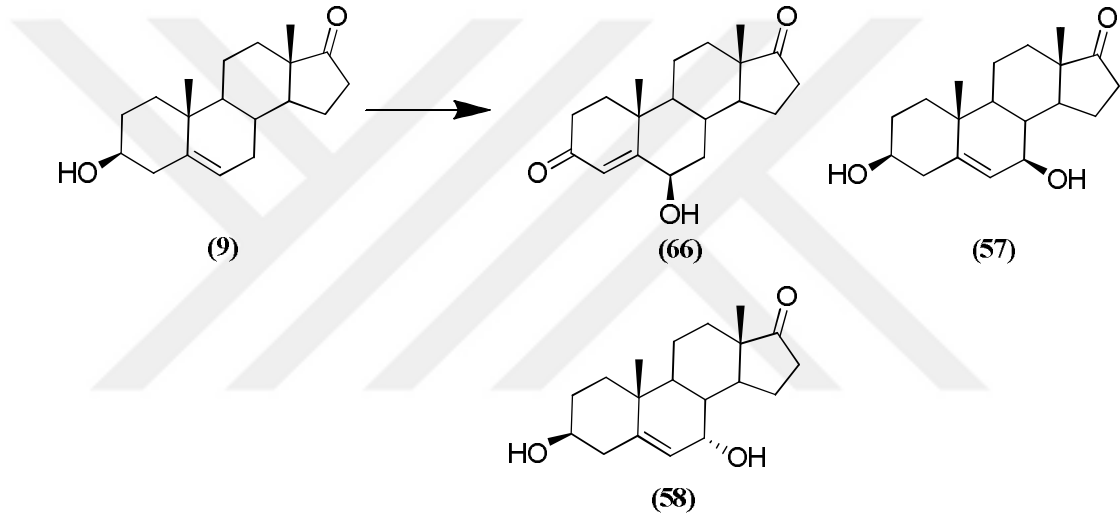
yukarı alana doğru bir γ -gauche kayması ($\Delta\delta_C$ 1,98 ppm) vermesi yeni bir 15 α -hidroksil grubunun varlığını netleştirdi.



Şekil 5.3. *A. sydowii* MRC 200653 ile testosteron (4) biyotransformasyonu

DHEA (9) bileşiğinin *A. sydowii* MRC 200653 ile beş gün süren inkübasyonu üç metabolit verdi (Şekil 5.4.). İlk metabolit 6 β -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (66) olarak tanımlandı. Metabolitin ^1H NMR spektrumu substratın δ_H 3.46 ppm'deki 3-H rezonansını (1H, tt, $J = 5$ ve 12.0 Hz) içermezken substratın δ_H 5.35 ppm'deki çift bağ protonu rezonansı (1H, d, $J = 5.0$ Hz) için aşağı alana doğru önemli oranda bir kayma ($\Delta\delta_H$ 0.46 ppm) içerdi. Bu değişimler substratın 5-en-3 β -hidroksi kısmının bir 4-en-3-keto kısmına dönüştüğünü gösterdi. Metabolit ^1H NMR spektrumunun 19-metil grubu için aşağı alana doğru önemli kayma ($\Delta\delta_H$ 0.38 ppm) göstermesi metabolitin yeni bir 4-en-3-keto kısmı içerdiğini doğruladı. Metabolit δ_H 4,37 ppm (1H, t, $J = 3.0$ Hz) ve δ_C 72,49 ppm'lerde bir 6 β -hidroksil grubu olduğunu gösteren yeni rezonanslar verdi [100, 101]. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu C-7 rezonansı için aşağı alana doğru bir kayma ($\Delta\delta_C$ 5,92 ppm) verirken, C-8 rezonansı için ise yukarı alana doğru bir γ -gauche kayması ($\Delta\delta_C$ 1,96 ppm) vermesi yeni bir 6 β -hidroksil grubunun varlığını teyit etti (Tablo 5.3.).

İkinci metabolit 3 β ,7 β -dihidroksiandrosta-5-en-3,17-dion (**57**) olarak belirlendi. Metabolitin ^1H NMR spektrumu 7 β -hidroksil grubu varlığını gösteren karakteristik yeni bir rezonansı (1H, dt, $J = 8$ ve 4 Hz) δ_{H} 3,94 ppm'de verdi [99]. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu C-6 ve C-8 rezonansları için aşağı alana doğru kaymalar (C-6 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 4,93 ppm ve C-8 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 8,69 ppm) gösterirken C-9 ve C-14 rezonansları için ise yukarı alana doğru γ -gauche kaymaları (C-9 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 1.93 ppm ve C-14 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 0.48 ppm) göstermesi yeni bir 7 β -hidroksil grubunun varlığını netleştirdi. Metabolit ^{13}C NMR spektrumunun substratın C-3 rezonansını δ_{C} 70,74 ppm'de vermesi 3 β -hidroksil grubunun korunduğunu gösterdi.



Şekil 5.4. *A. sydowii* MRC 200653 ile DHEA (**9**) bileşiğinin biyotransformasyonu

Üçüncü metabolit 3 β ,7 α -dihidroksiandrosta-5-en-3,17-dion (**58**) olarak tanımlandı. Metabolitin ^1H NMR spektrumu 6-H rezonansı için aşağı alana doğru önemli bir kayma ($\Delta\delta_{\text{H}}$ 0.28 ppm) gösterdi ve δ_{H} 3,94 ppm'de tipik bir yeni bir rezonans (1H, dt, $J = 8$ ve 4 Hz) verdi [85]. Bu değişimler 7 α -hidroksil grubunun varlığını düşündürdü. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu C-6 ve C-8 rezonansları için aşağı alana doğru kaymalar (C-6 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 2,53 ppm ve C-8 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 5,93 ppm) verirken C-9 ve C-14 rezonansları için ise yukarı alana doğru γ -gauche kaymaları (C-9 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 8,41 ppm ve C-14 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 6,92 ppm) vermesi yeni bir 7 α -hidroksil grubunun varlığını teyit etti. Substratın 3 α -H rezonansının (1H, tt, $J = 5$ ve 10 Hz) δ_{H} 3,56 ppm'de korunduğu gözlemlendi.

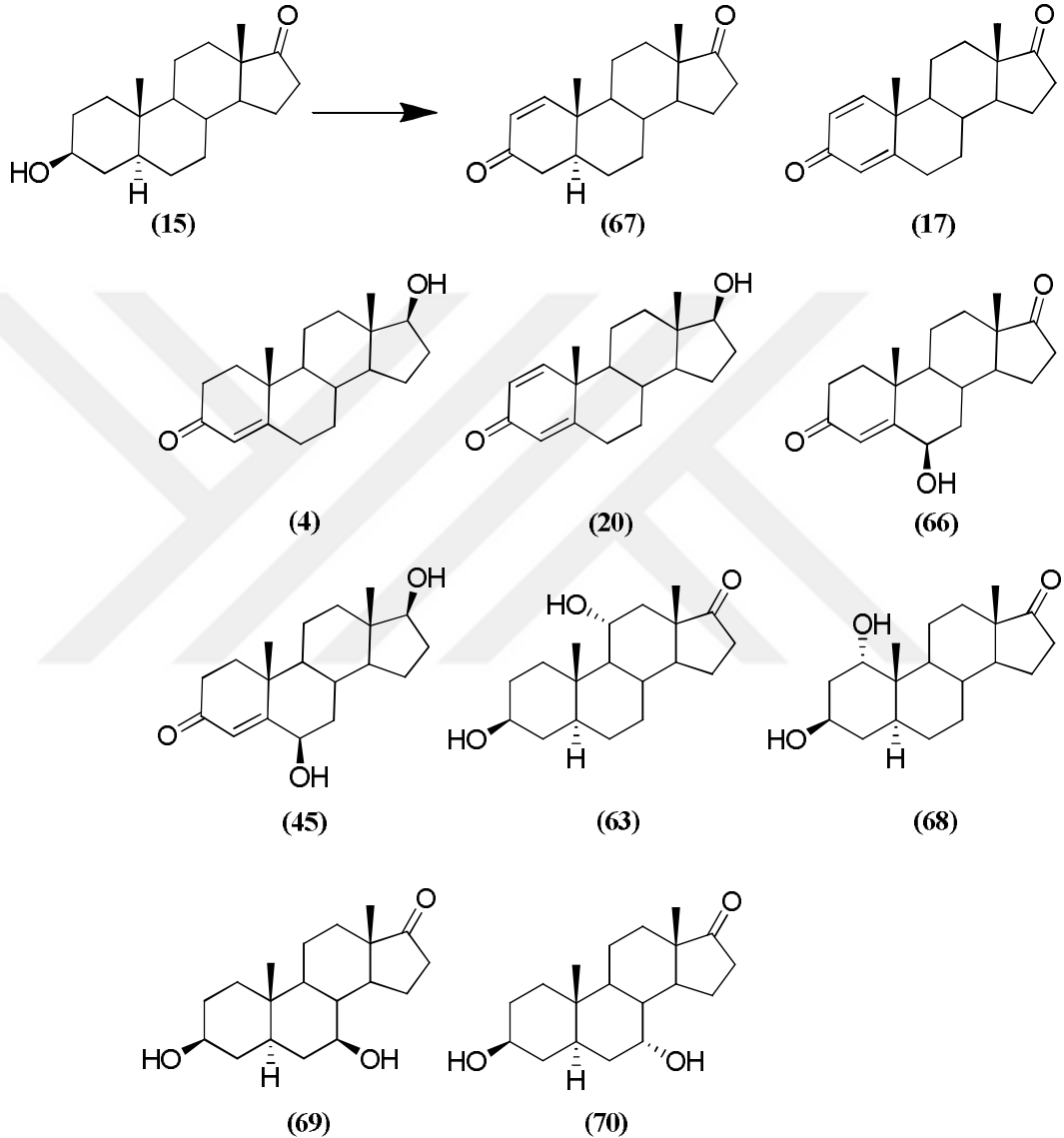
Tablo 5.3. DHEA (**9**) ve bazı metabolitlerinin CDCl₃'teki ¹³C NMR sinyalleri

C atomu	9	56	57	58	66	71
1	37,11	37,25	36,85	37,03	37,03	38,81
2	31,47	31,47	31,37	30,99	34,21	31,51
3	71,48	71,71	70,74	70,90	200,91	71,49
4	42,11	42,23	41,60	42,34	126,32	42,26
5	140,98	140,94	143,16	146,15	168,71	141,47
6	120,83	121,36	125,76	123,36	72,49	120,54
7	31,35	31,60	72,32	64,03	37,27	31,21
8	31,41	31,93	40,10	37,34	29,45	30,61
9	50,13	50,22	48,20	41,72	53,64	56,59
10	36,56	36,56	36,51	37,03	38,14	38,19
11	20,29	20,65	20,26	19,92	20,30	68,34
12	30,71	36,56	31,13	30,99	31,27	42,48
13	47,49	42,70	47,65	47,05	47,75	47,90
14	51,67	51,30	51,19	44,75	50,88	50,48
15	21,82	23,42	24,08	21,75	21,77	21,67
16	35,80	30,47	35,89	35,71	35,89	35,69
17	221,30	81,87	221,40	221,72	221,18	219,76
18	13,48	10,94	13,44	13,16	13,85	14,16
19	19,37	19,42	18,96	18,13	19,57	18,99

Epiandrosteron (**15**) bileşiğinin *A. sydowii* MRC 200653 ile beş gün süren inkübasyonu on metabolit verdi (Şekil 5.5.). İlk metabolit 5 α -androst-1-en-3,17-dion (**67**) olarak belirlendi. Metabolitin ¹H NMR spektrumu 19-metil grubu için aşağı alana doğru önemli kayma ($\Delta\delta_H$ 0,21 ppm) ile birlikte δ_H 5,86 ppm (1H, d, $J = 10$ Hz) ve δ_H 7,15 ppm'de (1H, d, $J = 10$ Hz) gözlenen karakteristik 1,2-çift bağı rezonansları gösterdi [87]. Metabolit ¹³C NMR spektrumunun δ_C 157,82 ppm ve δ_C 127,63 ppm'lerdeki yeni rezonansları 1,2-çift bağ varlığını gösterdi. Bunlara ilaveten metabolit ¹³C NMR spektrumu substratın δ_C 71,06 ppm'deki C-3 rezonansını vermezken δ_C 200,00 ppm'de yeni bir rezonans verdi. Bu değişimler 1,2-çift bağı ile konjuge olan yeni bir karbonil grubunun varlığını gösterdi. Substratın C-17 rezonansının δ_C 220,57 ppm'de muhafaza edildiği gözlemlendi (Tablo 5.4.).

İkinci metabolit androsta-1,4-dien-3,17-dion (**17**) olarak tanımlandı. Metabolitin ¹H NMR spektrumu 19-metil grubu için aşağı alana doğru önemli kayma ($\Delta\delta_H$ 0,41 ppm) ile birlikte δ_H 6.10 ppm (1H, s), δ_H 6.24 ppm (1H, d, $J = 10.0$ Hz) ve δ_H 7.10 ppm'lerde (1H,d, $J = 10.0$ Hz) gözlenen sırası ile karakteristik 4-H, 2-H ve 1-H protonlarını temsil eden rezonansları verdi [102]. Bu rezonanslar 1,2- ve 4,5-çift

bağlarının varlığını gösterdi. Metabolit ^{13}C NMR spektrumu substratın δ_{C} 71,06 ppm'deki C-3 rezonansını vermezken 1,2- ve 4,5-çift bağları ile konjuge olan yeni bir karbonil grubunun varlığını gösteren bir rezonansı δ_{C} 184,85 ppm'de verdi. Substratın C-17 rezonansının δ_{C} 220,07 ppm'de korunduğu tespit edildi.



Şekil 5.5. *A. sydowii* MRC 200653 ile epiandrosteron (15) biyotransformasyonu

Üçüncü metabolit, ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının otantik bir numunenin ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları ile karşılaştırılması sonrasında testosteron (4) olarak belirlendi.

Dördüncü metabolit 17 β -hidroksiandrosta-1,4-dien-3-on (20) olarak tanımlandı. Metabolitin ^1H NMR spektrumu 19-metil grubu için aşağı alana doğru önemli kayma

($\Delta\delta_H$ 0,41 ppm) ile birlikte δ_H 6,08 ppm (1H, s), δ_H 6,21 ppm (1H, dd, $J = 1,8$ ve 10 Hz) ve δ_H 7,05 ppm'lerde (1H,d, $J = 10$ Hz) gözlenen ve 1,2- ve 4,5-çift bağlarının varlığını gösteren tipik rezonansları verdi [102]. Metabolit ^{13}C NMR spektrumu substratın δ_C 71,06 ppm'deki C-3 rezonansını vermezken iki çift bağ ile konjuge olan yeni bir karbonil grubunun varlığını gösteren bir rezonansı δ_C 184,44 ppm'de verdi. Metabolit ^{13}C NMR spektrumu ayrıca substratın δ_C 221,50 ppm'deki C-17 rezonansını vermezken 17 β -hidrokil grubunun varlığına işaret eden bir rezonansı δ_C 81,47 ppm'de verdi.

Tablo 5.4. Epiandrosteron (**15**) ve *A. sydowii* MRC 200653 ile verdiği bazı metabolitlerin $CDCl_3$ 'teki ^{13}C NMR sinyalleri

C atomu	15	17	20	63	67	68	69	70
1	36,87	155,54	156,05	38,41	157,82	72,74	36,77	36,63
2	31,35	127,54	127,33	31,63	127,63	38,36	31,35	31,31
3	71,06	184,85	186,44	70,72	200,00	66,36	70,91	71,00
4	37,98	123,97	123,73	38,41	40,85	37,80	37,56	37,53
5	44,76	168,32	169,40	44,94	44,28	37,25	42,03	37,06
6	28,32	32,21	32,73	28,80	27,32	28,15	38,76	35,70
7	30,83	31,06	32,73	30,68	30,08	30,44	74,76	66,78
8	34,97	34,98	35,47	34,13	35,17	34,92	42,88	39,06
9	54,35	52,15	52,42	60,34	51,28	46,86	52,49	46,07
10	35,57	43,41	43,59	37,07	38,97	39,56	35,10	36,00
11	20,43	22,01	22,43	68,56	20,46	19,78	20,70	20,28
12	31,47	32,47	36,23	42,82	31,44	31,28	31,50	31,12
13	47,76	47,62	43,02	47,98	47,77	47,77	48,27	47,57
14	51,34	50,28	50,00	50,18	50,08	51,24	51,01	45,81
15	21,72	21,83	23,45	21,65	21,70	21,75	24,92	21,33
16	35,80	35,56	30,28	35,84	35,79	35,78	36,01	36,63
17	221,50	220,07	81,47	220,16	220,57	221,63	221,00	221,10
18	13,76	13,72	11,10	14,49	13,88	13,72	14,04	13,50
19	12,25	18,61	18,63	12,70	13,03	12,87	12,43	11,20

Beşinci metabolit 1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının daha önce izole edilen bir metabolite ait 1H ve ^{13}C NMR spektrumları ile karşılaştırılması sonrasında 6 β -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**66**) olarak belirlendi.

Altıncı metabolit, 1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının daha önce izole edilen bir metabolite ait 1H ve ^{13}C NMR spektrumları ile karşılaştırılması sonrasında 6 β ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (**45**) olarak tanımlandı.

Yedinci metabolit 3 β ,11 α -dihidroksi-5 α -androstan-17-on (**63**) olarak belirlendi. Metabolit δ_H 3,96 ppm'de (1H, dt, $J = 5$ ve 10 Hz) ve δ_C 68,56 ppm'de bir 11 α -hidroksil grubu varlığını gösteren yeni rezonanslar verdi [90]. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu C-9 rezonansı için aşağı alana doğru bir kayma ($\Delta\delta_C$ 5,99 ppm) verirken C-8 rezonansı için ise yukarı alana doğru γ -gauche bir kayma (δ_C 0,84 ppm) vermesi yeni bir 11 α -hidroksil grubunun varlığını teyit etti. Substratın 3 α -H rezonansının (1H, tt, $J = 5$ ve 11 Hz) δ_H 3,57 ppm'de korunduğu gözlemlendi.

Sekizinci metabolit 1 α ,3 β -dihidroksi-5 α -androstan-17-on (**68**) olarak tanımlandı. Metabolit 1 α -hidroksil ve 3 β -hidroksil gruplarının varlığına işaret eden karakteristik rezonansları [94] sırası ile δ_H 3,83 ppm'de (1H, bs) ve δ_H 4,03 ppm'de (1H, tt, $J = 5$ ve 11 Hz) verdi. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu C-2 ve C-10 rezonansları için aşağı alana doğru kaymalar (C-2 için $\Delta\delta_C$ 7,01 ppm ve C-10 için $\Delta\delta_C$ 3,99 ppm) verirken C-5 ve C-9 rezonansları için ise yukarı alana doğru γ -gauche kaymaları (C-5 için $\Delta\delta_C$ 7,51 ppm ve C-9 için $\Delta\delta_C$ 7,49 ppm) vermesi 1 α -hidroksil grubunun varlığını teyit etti. Metabolitin 1H NMR spektrumu 3 α -H rezonansı (1H, tt, $J = 5$ ve 11 Hz) için 1 α -hidroksil grubuna yakın olduğunu gösteren aşağı alana doğru önemli bir kayma ($\Delta\delta_H$ 0,44 ppm) gösterdi.

Dokuzuncu metabolit 3 β ,7 β -dihidroksi-5 α -androstan-17-on (**69**) olarak tanımlandı. Metabolit δ_H 3,45 ppm'de (1H, m) ve δ_C 74,76 ppm'de 7 β -hidroksil grubu varlığını gösteren karakteristik rezonanslar verdi [99]. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu C-6 ve C-8 rezonansları için aşağı alana doğru kaymalar (C-6 için $\Delta\delta_C$ 10,44 ppm ve C-8 için $\Delta\delta_C$ 7,91 ppm) verirken C-5 ve C-9 rezonansları için ise yukarı alana doğru γ -gauche kaymaları (C-5 için $\Delta\delta_C$ 2,73 ppm ve C-9 için $\Delta\delta_C$ 1,86 ppm) vermesi bir 7 β -hidroksil grubunun varlığını daha da netleştirdi. Metabolitin 1H NMR spektrumunda 3 α -H rezonansının (1H, tt, $J = 5$ ve 11 Hz) δ_H 3,60 ppm'de muhafaza edildiği görüldü.

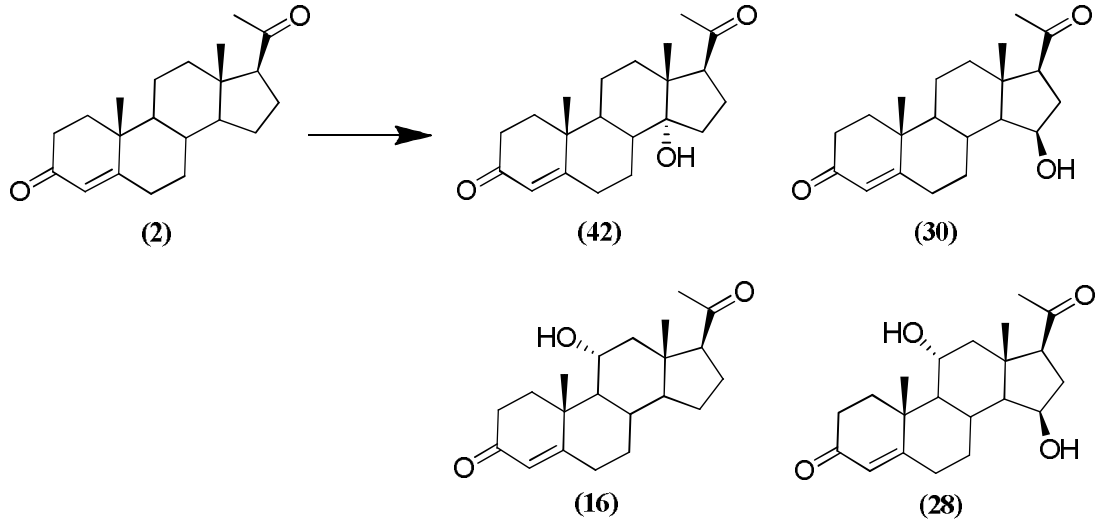
Onuncu metabolit 3 β ,7 α -dihidroksi-5 α -androstan-17-on (**70**) olarak belirlendi. Metabolit δ_H 3,95 ppm'de (1H, m) ve δ_C 66,78 ppm'de 7 α -hidroksil grubu varlığını gösteren karakteristik rezonanslar verdi [85]. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu C-6

ve C-8 rezonansları için aşağı alana doğru kaymalar (C-6 için $\Delta\delta_C$ 7,38 ppm ve C-8 için $\Delta\delta_C$ 4,09 ppm) gösterirken C-5 ve C-9 rezonansları için ise yukarı alana doğru γ -gauche kaymaları (C-5 için $\Delta\delta_C$ 7,70 ppm ve C-9 için $\Delta\delta_C$ 8,28 ppm) göstermesi bir 7 α -hidroksil grubunun varlığını daha da teyit etti. Metabolitin ^1H NMR spektrumunda 3 α -H rezonansının (1H, tt, $J = 5$ ve 11 Hz) δ_H 3,58 ppm'de korunduğu gözlemlendi.

Progesteron (**2**) bileşiğinin *A. candidus* MRC 200634 ile beş gün süren inkübasyonu dört metabolit verdi (Şekil 5.6.). İlk metabolit 14 α -hidroksipregn-4-en-3,20-dion (**42**) olarak belirlendi. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu δ_C 85,12 ppm'de bir hidroksil grubu varlığını gösteren bir rezonans versede metabolitin ^1H NMR spektrumunun yeni herhangi bir rezonans vermemesi tersiyer bir hidroksil grubunun varlığını işaret etti. ^1H NMR spektrumunda 17 α -H rezonansı için aşağı alana önemli bir kayma ($\Delta\delta_H$ 0,69 ppm) gözlenmesi bir 14 α -hidroksil grubu ile diaksiyal etkileşime girdiğini düşündürdü [84]. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu C-8 ve C-15 rezonansları için aşağı alana doğru kaymalar (C-8 için $\Delta\delta_C$ 2,91 ppm ve C-15 için $\Delta\delta_C$ 6,72 ppm) gösterirken C-9 ve C-16 rezonansları için ise yukarı alana doğru γ -gauche kaymaları (C-9 için $\Delta\delta_C$ 7,14 ppm ve C-16 için $\Delta\delta_C$ 2,53 ppm) göstermesi bir 14 α -hidroksil grubunun varlığını daha da netleştirdi (Tablo 5.1.).

İkinci metabolit ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının daha önce izole edilen bir metabolite ait ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları ile karşılaştırılması sonrasında 15 β -hidroksipregn-4-en-3,20-dion (**30**) olarak belirlendi.

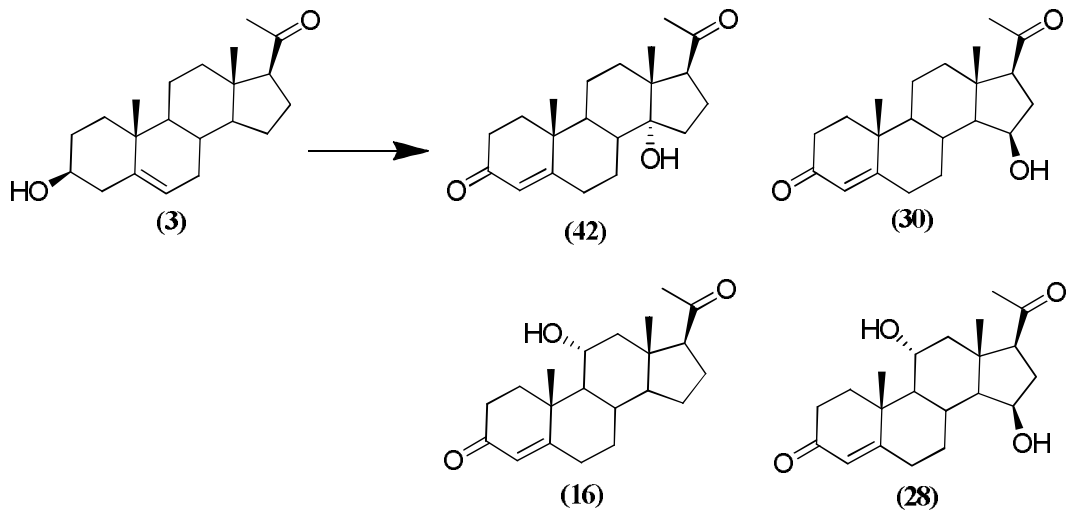
Üçüncü metabolit ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının daha önce izole edilen bir metabolite ait ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları ile karşılaştırılması sonrasında 11 α -hidroksipregn-4-en-3,20-dion (**16**) olarak tanımlandı.



Şekil 5.6. *A. candidus* MRC 200634 ile progesteron (2) biyotransformasyonu

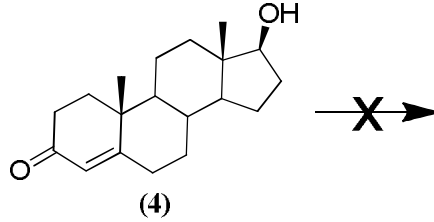
Dördüncü metabolit ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının daha önce izole edilen bir metabolite ait ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları ile karşılaştırılması sonrasında $11\alpha,15\beta$ -dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (28) olarak belirlendi.

Pregnenolon (3) bileşiğinin *A. candidus* MRC 200634 ile beş gün süren inkübasyonu daha önce progesteron (2) bileşiğinin *A. candidus* MRC 200634 ile verdiği 4 aynı metaboliti verdi (Şekil 5.7.). Bu metabolitlerin yapı tayinleri ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları ile aynı küfle progesteron (2) inkübasyonundan elde edilen metabolitlerle ait ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının karşılaştırılması ile gerçekleştirildi.



Şekil 5.7. *A. candidus* MRC 200634 ile pregnenolon (3) biyotransformasyonu

Testosteron (4) bileşiminin *A. candidus* MRC 200634 ile beş gün süren inkübasyonu sadece değişmeyen başlangıç maddesini verince aynı şartlar altında ikinci kez gerçekleştirildiğinde yine sadece değişmeyen başlangıç maddesini verdi (Şekil 5.8.).



Şekil 5.8. *A. candidus* MRC 200634 ile testosteron (4) bileşiminin ilk iki biyotransformasyonu

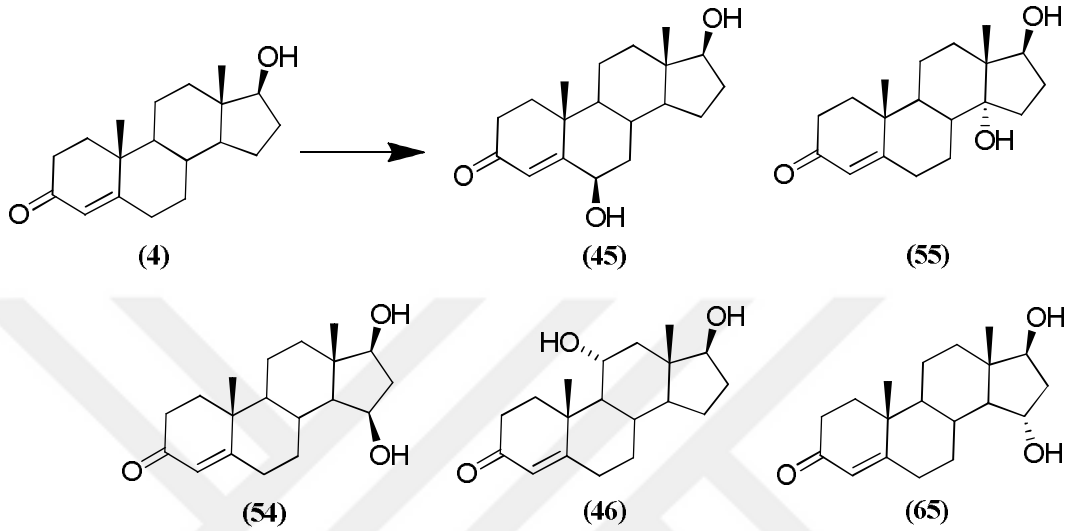
İlk iki biyotransformasyon çalışmalarında daha önceki çalışmalarda olduğu gibi yardımcı solvent olarak DMF kullanılmıştı. Bunun üzerine aynı biyotransformasyon çalışması bu sefer yardımcı solvent olarak etanol kullanılarak tekrarlandığında beş metabolit elde edildi (Şekil 5.9.). Birinci metabolit ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının daha önce izole edilen bir metabolite ait ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları ile karşılaştırılması sonrasında $6\beta,17\beta$ -dihidroksiandrost-4-en-3-on (45) olarak belirlendi.

İkinci metabolit ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının daha önce izole edilen bir metabolite ait ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları ile karşılaştırılması sonrasında $14\alpha,17\beta$ -dihidroksiandrost-4-en-3-on (55) olarak tanımlandı.

Üçüncü metabolit $15\beta,17\beta$ -dihidroksiandrost-4-en-3-on (54) olarak belirlendi. Metabolit δ_{H} 4,20 ppm'de (1H, ddd, $J = 7,8, 5,7, 2,5$ Hz) ve δ_{C} 69,06 ppm'de 15β -hidroksil grubu varlığını gösteren tipik rezonanslar verdi [99]. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu C-14 ve C-16 rezonansları için aşağı alana doğru kaymalar (C-14 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 5,09 ppm ve C-16 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 13,69 ppm) gösterirken C-8 rezonansı için ise yukarı alana doğru γ -gauche kayması (C-8 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 3.76 ppm) göstermesi bir 15β -hidroksil grubunun varlığını teyit etti (Tablo 5.2.).

Dördüncü metabolit $11\alpha,17\beta$ -dihidroksiandrost-4-en-3-on (46) olarak belirlendi. Metabolit δ_{H} 4,00 ppm'de (1H, td, $J = 10,5$ ve 5 Hz) ve δ_{C} 68,77 ppm'de bir

11 α -hidroksil grubu varlığını gösteren karakteristik rezonanslar verdi [90]. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu C-9 ve C-12 rezonansları için aşağı alana doğru kaymalar (C-9 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 5,58 ppm ve C-12 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 7,48 ppm) göstermesi bir 11 α -hidroksil grubunun varlığını daha da netleştirdi.

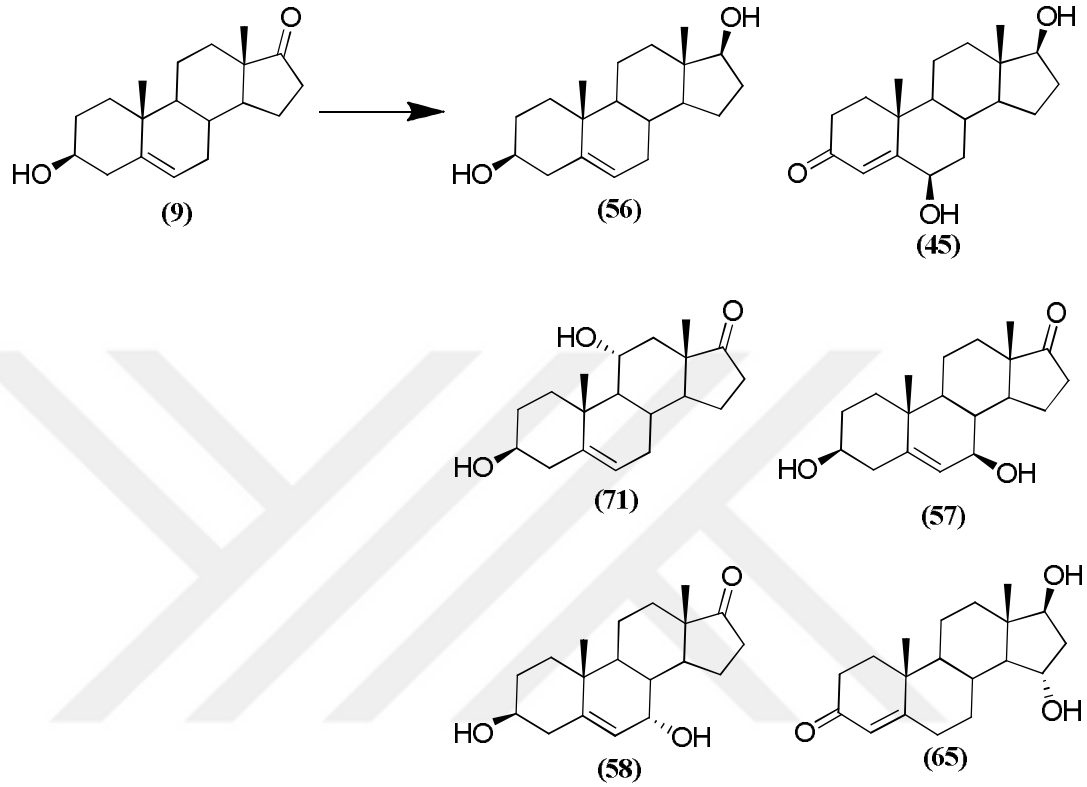


Şekil 5.9. *A. candidus* MRC 200634 ile testosteron (4) bileşiğinin 3. biyotransformasyonu

Beşinci metabolit ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının daha önce izole edilen bir metabolite ait ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları ile karşılaştırılması sonrasında 15 α ,17 β -dihidroksiandrostenon-4-en-3-on (65) olarak tanımlandı.

DHEA (9) bileşiğinin *A. candidus* MRC 200634 ile beş gün süren inkübasyonu altı metabolit verdi (Şekil 5.10.). İlk metabolit 3 β ,17 β -dihidroksiandrostenon-5-en (56) olarak belirlendi. Metabolitin ^1H NMR spektrumu δ_{H} 3,65 ppm'de yeni bir rezonans (1H, t, $J = 8,5$ Hz) verdi ve substratın 18-metil rezonansı için yukarı alana doğru bir kayma ($\Delta\delta_{\text{H}}$ 0.11 ppm) gözlemlendi. Bu değişimler 17 β -hidroksil grubu varlığını gösterdi. ^{13}C NMR spektrumu substratın δ_{C} 221,30 ppm'deki C-17 rezonansını vermezken δ_{C} 81,87 ppm'de yeni bir karbon atomu rezonansı vermesi 17 β -hidroksil grubu varlığını netleştirdi (Tablo 5.3.). Metabolitin ^1H NMR spektrumunda 3 α -H rezonansının (1H, m) δ_{H} 3,55 ppm'de korunduğu gözlemlendi.

İkinci metabolit ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının daha önce izole edilen bir metabolite ait ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları ile karşılaştırılması sonrasında 6 β ,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on (45) olarak tanımlandı.



Şekil 5.10. *A. candidus* MRC 200634 ile DHEA (9) biyotransformasyonu

Üçüncü metabolit 3 β ,11 α -dihidroksiandrost-5-en-17-on (71) olarak tanımlandı. Metabolit δ_{H} 4,08 ppm'de (1H, td, $J = 10,5$ ve 5 Hz) ve δ_{C} 68,34 ppm'de 11 α -hidroksil grubu varlığını gösteren yeni rezonanslar verdi [90]. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu C-9 ve C-12 rezonansları için aşağı alana doğru bir kaymalar (C-9 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 6,46 ppm ve C-12 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 11,77 ppm) gösterirken C-8 rezonansı için ise yukarı alana doğru γ -gauche kayması (C-8 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 0,80 ppm) göstermesi 11 α -hidroksil grubunun varlığını teyit etti. Substratın 3 α -H rezonansının (1H, tt, $J = 5$ ve 10 Hz) δ_{H} 3,54 ppm'de korunduğu gözlemlendi.

Dördüncü metabolit ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının daha önce izole edilen bir metabolite ait ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları ile karşılaştırılması sonrasında $3\beta,7\beta$ -dihidroksiandrost-5-en-17-on (**57**) olarak belirlendi.

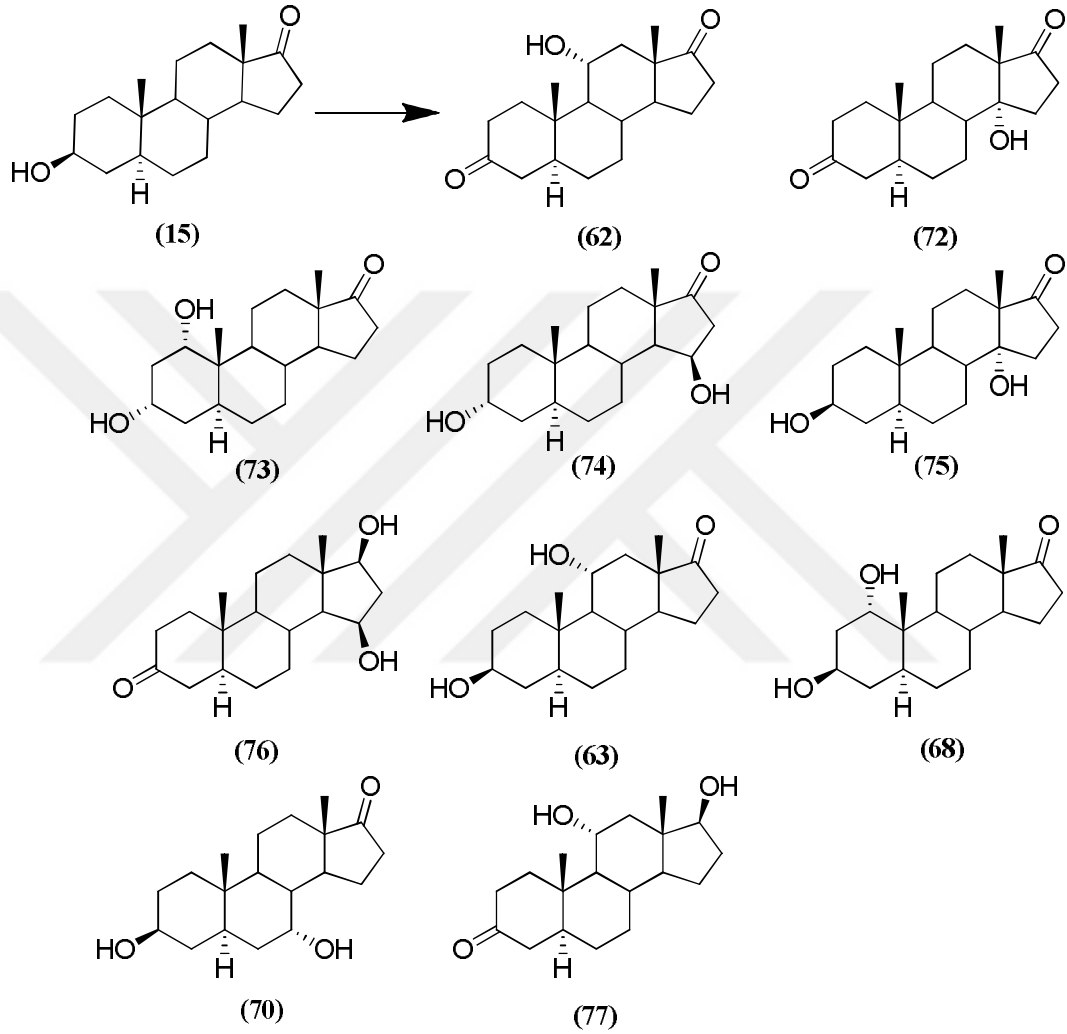
Beşinci metabolit ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının daha önce izole edilen bir metabolite ait ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları ile karşılaştırılması sonrasında $3\beta,7\alpha$ -dihidroksiandrost-5-en-3,17-dion (**58**) olarak tanımlandı.

Altıncı metabolit ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının daha önce izole edilen bir metabolite ait ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları ile karşılaştırılması sonrasında $15\alpha,17\beta$ -dihidroksiandrost-4-en-3-on (**65**) olarak belirlendi.

Epiandrosteron (**15**) bileşiğinin *A. candidus* MRC 200634 ile beş gün süren inkübasyonu altı metabolit verdi (Şekil 5.11.) İlk metabolit 11α -hidroksi- 5α -androstan-3,17-dion (**62**) olarak tanımlandı. Metabolit δ_{H} 4,03 ppm'de (1H, dt, $J = 5$ ve 10 Hz) ve δ_{C} 68,49 ppm'de 11α -hidroksil grubu varlığını gösteren yeni rezonanslar gösterdi [90]. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu C-9 ve C-12 rezonansları için aşağı alana doğru bir kaymalar (C-9 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 5,41 ppm ve C-12 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 11,35 ppm) verirken C-8 rezonansı için ise yukarı alana doğru γ -gauche kayması (C-8 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 1,00 ppm) göstermesi 11α -hidroksil grubunun varlığını netleştirdi. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu substratın δ_{C} 71,06 ppm'deki C-3 rezonansının vermezken δ_{C} 212,70 ppm'deki bir C atomu rezonansı vermesi C-3'te bir oksidasyonun gerçekleştiğini teyit etti (Tablo 5.5.).

İkinci metabolit 14α -hidroksi- 5α -androstan-3,17-dion (**72**) olarak belirlendi. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu δ_{C} 81,04 ppm'de yeni bir rezonans vermesine rağmen metabolitin ^1H NMR spektrumu yeni bir proton rezonansı vermediği ve 18-metil grubu için aşağı alana doğru bir kayma ($\Delta\delta_{\text{H}}$ 0,15 ppm) verdiği için bir 14α -hidroksil grubunun varlığı düşünüldü [84]. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu C-8, C-13 ve C-15 rezonansları için aşağı alana doğru kaymalar (C-8 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 2,70 ppm, C-13 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 4,85 ppm ve C-15 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 11,37 ppm) gösterirken C-7, C-12 ve C-16 rezonansları için ise yukarı alana doğru γ -gauche kaymaları (C-7 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 6,11 ppm, C-12 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 6,39 ppm ve C-16 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 5,59 ppm) göstermesi bir

14 α -hidroksil grubunun varlığını daha da belirginleştirdi. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu substratın δ_{C} 71,06 ppm'deki C-3 rezonansının vermezken δ_{C} 211,46 ppm'de yeni bir C atomu rezonansı vermesinden C-3'te bir oksidasyonun gerçekleştiği anlaşıldı.



Şekil 5.11. *A. candidus* MRC 200634 ile epiandrosteron (15) biyotransformasyonu

Üçüncü metabolit 1 α ,3 α -dihidroksi-5 α -androstan-17-on (73) tanımlandı. Metabolit δ_{H} 3,73 ppm'de (1H, brs) ve δ_{C} 72,54 ppm'de 1 α -hidroksil grubu varlığını gösteren yeni karakteristik rezonanslar gösterdi [94]. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu C-2 ve C-10 rezonansları için aşağı alana doğru kaymalar (C-2 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 4,75 ppm ve C-10 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 4,35 ppm) verirken C-5 ve C-9 rezonansları için ise yukarı alana doğru γ -gauche kaymaları (C-5 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 12,51 ppm ve C-9 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 7,41 ppm) vermesi bir

1 α -hidroksil grubunun varlığını daha da doğruladı. Metabolitin NMR spektrumları substratın δ_H 3,59 ppm'deki 3 α -H (1 H, tt, J = 5.0 ve 11.0 Hz) ve δ_C 71,06 ppm'deki C-3 rezonanslarını vermeyip δ_H 4,13 ppm'de (1 H, brs) ve δ_C 67,91 ppm'de yeni rezonanslar vermesinden C-3'te bir epimerleşmenin gerçekleştiğini ve 3 α -hidroksil grubunun oluştuğu anlaşıldı. 1 α ,3 α -Dihidroksi-5 α -androstan-17-on (**73**) yeni bir bileşik olarak tanımlandı.

Tablo 5.5. Epiandrosteron (**15**) ve *A. candidus* MRC 200634 ile verdiği bazı metabolitlerinin ^{13}C NMR sinyalleri

C atomu	15	62	72	73	74	75	76	77
1	36,87	39,82	38,45	72,54	32,01	37,00	38,58	40,07
2	31,35	38,22	37,99	36,10	28,86	31,35	38,12	38,31
3	71,06	212,70	211,46	67,91	66,27	71,03	211,22	212,36
4	37,98	44,98	44,47	33,57	35,59	37,69	44,63	45,10
5	44,76	47,21	46,22	32,25	39,09	44,46	46,80	47,40
6	28,32	28,99	28,32	28,02	28,05	28,06	28,66	29,27
7	30,83	30,19	24,72	30,57	30,50	24,77	30,83	31,04
8	34,97	33,97	37,67	34,98	31,19	37,94	31,30	34,79
9	54,35	59,76	46,93	46,94	54,76	47,40	54,32	59,87
10	35,57	37,27	35,86	39,92	36,28	35,70	35,90	37,05
11	20,43	68,49	19,42	19,39	19,91	19,18	20,97	68,82
12	31,47	42,82	25,08	31,29	32,80	25,33	38,12	48,48
13	47,76	47,89	52,61	47,81	46,78	52,66	42,38	43,35
14	51,34	50,11	81,04	51,31	55,49	81,27	55,53	49,90
15	21,72	21,71	33,09	21,80	67,11	33,13	69,33	23,30
16	35,80	35,74	30,21	35,83	46,86	30,06	46,23	30,40
17	221,50	219,80	218,51	221,49	220,45	219,02	81,29	81,08
18	13,76	14,50	17,96	13,79	17,64	17,99	13,80	12,13
19	12,25	11,70	11,35	12,32	11,07	12,19	10,09	11,79

Dördüncü metabolit 3 α ,15 β -dihidroksi-5 α -androstan-17-on (**74**) olarak belirlendi. Metabolitin NMR spektrumları substratın δ_H 3,59 ppm'deki 3 α -H (1 H, tt, J = 5.0 ve 11.0 Hz) ve δ_C 71,06 ppm'deki C-3 rezonanslarını vermeyip δ_H 4,02 ppm'de (1 H, brs) ve δ_C 66,27 ppm'de yeni rezonanslar vermesi bir 3 α -hidroksil grubunun varlığını düşündürdü. Metabolitin 1H NMR spektrumu 4,52 ppm'de yeni bir rezonans verdi (1H, ddd, J = 5,6, 4,4 ve 1,4 Hz) ve substratın 18-metil grubu için aşağı alana doğru bir kayma ($\Delta\delta_H$ 0,28 ppm) göstermesi bir 15 β -hidroksil grubunun varlığına işaret etti [99]. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu C-14 ve C-16 rezonansları için aşağı alana doğru kaymalar (C-14 için $\Delta\delta_C$ 4,15 ppm ve C-16 için $\Delta\delta_C$ 11,06 ppm) verirken C-8 rezonansı için ise yukarı alana doğru bir γ -gauche kayması ($\Delta\delta_C$ 3,78 ppm) vermesi bir 15 β -hidroksil grubunun varlığını teyit etti.

Beşinci metabolit 3 β ,14 α -dihidroksi-5 α -androstan-17-on (**75**) olarak tanımlandı. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu δ_{C} 81,274 ppm'de yeni bir rezonans göstermesine rağmen metabolitin ^1H NMR spektrumu yeni bir proton rezonansı göstermemesi ve 18-metil grubu için aşağı alana doğru bir kayma ($\Delta\delta_{\text{H}}$ 0,12 ppm) gösterdiği için bir 14 α -hidroksil grubunun varlığı düşünüldü. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu C-8, C-13 ve C-15 rezonansları için aşağı alana doğru kaymalar (C-8 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 2,97 ppm, C-13 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 4,90 ppm ve C-15 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 11,41 ppm) verirken C-7, C-12 ve C-16 rezonansları için ise yukarı alana doğru γ -gauche kaymaları (C-7 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 6,06 ppm, C-12 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 6,11 ppm ve C-16 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 5,74 ppm) göstermesi bir 14 α -hidroksil grubunun varlığını daha da netleştirdi. Metabolitin ^1H NMR spektrumunun δ_{H} 3,59 ppm'de verdiği rezonans (1H, tt, J = 5 ve 11 Hz) 3 β -hidroksil grubunun korunduğunu gösterdi.

Altıncı metabolit 15 β ,17 β -dihidroksi-5 α -androstan-3-on (**76**) olarak belirlendi. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu substratın δ_{C} 221,50 ppm'deki C-17 rezonansını vermezken δ_{C} 81,29 ppm'de yeni bir rezonans göstermesi yeni bir hidroksil grubunun varlığını düşündürdü. Metabolitin ^1H NMR spektrumunun δ_{H} 3,57 ppm'de verdiği yeni rezonans (1H, t, J = 8,7 Hz) bir 17 β -hidroksil grubunun varlığına işaret etti. Metabolitin ^1H NMR spektrumunun δ_{H} 4,20 ppm'de verdiği yeni rezonans (1H, ddd, J = 7,7, 5,5 ve 2,4 Hz) ve 18-metil grubu için aşağı alana doğru verdiği kayma ($\Delta\delta_{\text{H}}$ 0,17 ppm) bir 15 β -hidroksil grubunun varlığına düşündürdü. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu C-14 ve C-16 rezonansları için aşağı alana doğru kaymalar (C-14 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 4,19 ppm ve C-16 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 10,43 ppm) verirken C-8 rezonansı için ise yukarı alana doğru bir γ -gauche kayması ($\Delta\delta_{\text{C}}$ 3,67 ppm) vermesi bir 15 β -hidroksil grubunun varlığını daha da doğruladı. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu substratın δ_{C} 71,06 ppm'deki C-3 rezonansının vermezken δ_{C} 211,22 ppm'de yeni bir C atomu rezonansı vermesinden C-3'te bir oksidasyonun gerçekleştiği anlaşıldı. 15 β ,17 β -Dihidroksi-5 α -androstan-3-on (**76**) yeni bir bileşik olarak belirlendi.

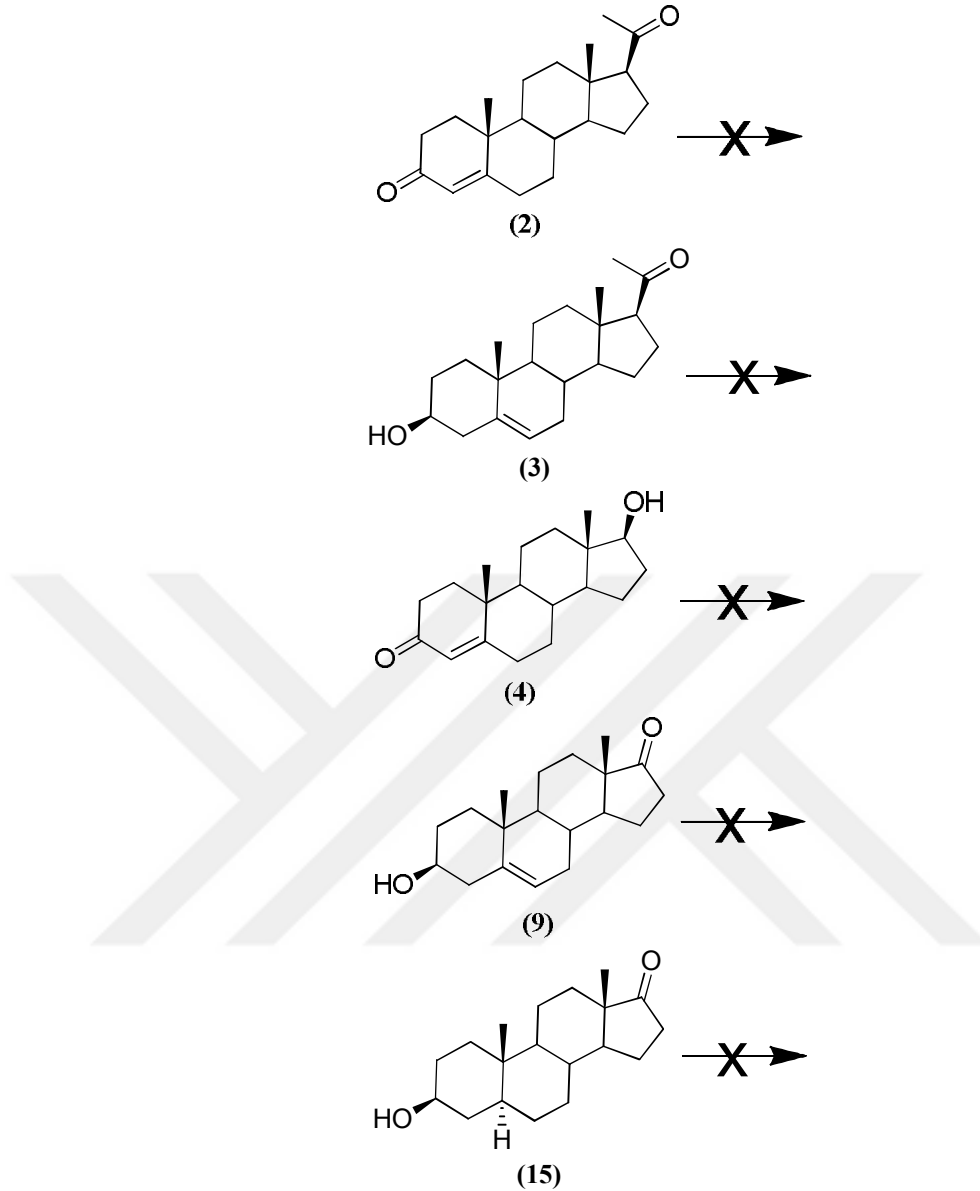
Yedinci metabolit ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının daha önce izole edilen bir metabolite ait ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları ile karşılaştırılması sonrasında 3 β ,11 α -dihidroksi-5 α -androstan-17-on (**63**) olarak tanımlandı.

Sekizinci metabolit ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının daha önce izole edilen bir metabolite ait ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları ile karşılaştırılması sonrasında $1\alpha,3\beta$ -dihidroksi- 5α -androstan-17-on (**68**) olarak belirlendi.

Dokuzuncu metabolit ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının daha önce izole edilen bir metabolite ait ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları ile karşılaştırılması sonrasında $3\beta,7\alpha$ -dihidroksi- 5α -androstan-17-on (**70**) olarak tanımlandı.

Onuncu metabolit $11\alpha,17\beta$ -dihidroksi- 5α -androstan-3-on (**77**) olarak belirlendi. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu substratın δ_{C} 221,50 ppm'deki C-17 rezonansını göstermezken δ_{C} 81,08 ppm'de yeni bir rezonans göstermesi yeni bir hidroksil grubunun varlığına işaret etti. Metabolitin ^1H NMR spektrumunun δ_{H} 3,73 ppm'de verdiği yeni rezonans (1H, t, $J = 8,5$ Hz) bir 17β -hidroksil grubunun varlığını teyit etti. Metabolit δ_{H} 4,00 ppm'de (1H, dt, $J = 5$ ve 10 Hz) ve δ_{C} 68,82 ppm'de bir 11α -hidroksil grubu varlığını gösteren yeni rezonanslar gösterdi [90]. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu C-9 ve C-12 rezonansları için aşağı alana doğru kaymalar (C-9 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 5,52 ppm ve C-12 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 17,01 ppm) verirken C-8 rezonansı için ise yukarı alana doğru γ -gauche kayması (C-8 için $\Delta\delta_{\text{C}}$ 0,18 ppm) göstermesi 11α -hidroksil grubunun varlığını doğruladı. Metabolitin ^{13}C NMR spektrumu substratın δ_{C} 71,06 ppm'deki C-3 rezonansı vermezken δ_{C} 212,36 ppm'de yeni bir C atomu rezonansı vermesi C-3'te bir oksidasyonun gerçekleştiğini gösterdi.

Progesteron (**2**), pregnenolon (**3**) testosteron (**4**), DHEA (**9**) ve epiandrosteron (**15**) bileşiklerinin yardımcı solvent olarak DMF kullanıldığı *A. japonicus* MRC U-3048 küfü ile beş gün süren inkübasyonları sadece değişmeyen başlangıç maddelerini verince aynı inkübasyonlar bu sefer yardımcı solvent olarak etanol kullanılarak tekrarlandığında yine değişmeyen başlangıç maddeleri elde edildi (Şekil 5.12.).



Şekil 5.12. *A. japonicus* MRC U-3048 küfü ile steroid biyotransformasyonu denemeleri

Tablo 5.6.'dan da görülebileceği gibi, *A. sydowii* MRC 200653 progesteron (2) üzerinde sadece hidroksilaz aktiviteleri gösterirken, pregnenolon (3) üzerinde hem 3β-hidroksisteroid dehidrogenaz/ Δ^5 - Δ^4 izomeraz hem de hidroksilaz aktiviteleri gösterdiği anlaşıldı. *A. sydowii* MRC 200653 ile progesteron (2) ve pregnenolon (3) inkübasyonlarında çoğunlukla C-11α ve C-15β pozisyonlarında yüksek verimli hidroksillenmelerin yanında C-6β ve C-7β pozisyonlarında düşük verimli hidroksillenmeler de gözlemlendi. Her iki substrat aynı metabolitleri versede progesteron (2) inkübasyonlarının verimleri daha yüksek olarak gerçekleşti. Progesteron (2) ve pregnenolon (3) C-17'de aynı yan zincire sahip bileşikler olduğu için *A. sydowii*

MRC 200653 ile pregnenolon (**3**) inkübasyonunda pregnenolon (**3**) progesterona (**2**) çevrildikten sonra bahsedilen yan zincirin hidroksillenmeleri aynı pozisyonlara yönlendirebileceği sonucuna ulaşıldı. *A. sydowii* MRC 200653 ile progesteron (**2**) inkübasyonuna benzer sonuçlar daha önce *A. fumigatus* ile progesteron (**2**) inkübasyonunda da gözlenmiş, aynı ve benzeri bazı metabolitler elde edilmiştir [39].

Tablo 5.6. *A. sydowii* MRC 200653 küfü ile elde edilen metabolit verimleri

Substrat	Metabolit	%
Progesteron (2)	15 β -Hidroksipregn-4-en-3,20-dion (30)	30
	11 α -Hidroksipregn-4-en-3,20-dion (16)	35
	11 α ,15 β -Dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (28)	6
	7 β ,15 β -Dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (31)	10
	6 β ,11 α -Dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (22)	3
Pregnenolon (3)	15 β -Hidroksipregn-4-en-3,20-dion (30)	26
	11 α -Hidroksipregn-4-en-3,20-dion (16)	32
	11 α ,15 β -Dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (28)	3
	7 β ,15 β -Dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (31)	7
	6 β ,11 α -Dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (22)	2
Testosteron (4)	6 β ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (45)	48
	14 α ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (55)	6
	15 α ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (65)	10
DHEA (9)	6 β -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (66)	40
	3 β ,7 β -Dihidroksiandrost-5-en-3,17-dion (57)	5
	3 β ,7 α -Dihidroksiandrost-5-en-3,17-dion (58)	3
Epieandrosteron (15)	5 α -Androst-1-en-3,17-dion (67)	2
	Androsta-1,4-dien-3,17-dion (17)	5
	Testosteron (4)	2
	17 β -Hidroksiandrosta-1,4-dien-3-on (20)	3
	6 β -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (66)	32
	6 β ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (45)	2
	3 β ,11 α -Dihidroksi-5 α -androstan-17-on (63)	2
	1 α ,3 β -Dihidroksi-5 α -androstan-17-on (68)	5
	3 β ,7 β -Dihidroksi-5 α -androstan-17-on (69)	3
	3 β ,7 α -Dihidroksi-5 α -androstan-17-on (70)	2

A. sydowii MRC 200653 ile testosteron (**4**) inkübasyonunun C-6 β pozisyonlarında yüksek verimli bir hidroksikasyonun yanında C-14 α ve C-15 α pozisyonlarındaki düşük verimli hidroksillenmeler ile sonuçlandı. *A. sydowii* MRC 200653 ile DHEA (**9**) inkübasyonu esnasında substratın tamamı önce bir 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaz/ Δ^5 - Δ^4 izomeraz ile dehidrogenasyona maruz kaldıktan sonra C-6 β

pozisyonundaki yüksek verimli bir hidroksillenme ile birlikte C-7 α ve C-7 β pozisyonlarındaki düşük verimli hidroksillenmelere maruz kaldığı anlaşıldı. Yapılan literatür çalışması sonucunda *A. sydowii* MRC 200653 küfünün testosteron (4) ve DHEA (9) substratlarını C-15 α pozisyonunda hidroksilleyen ilk *Aspergillus* türü olduğu anlaşıldı [41-43, 45, 48-49, 66, 68-73]. *A. sydowii* MRC 200653 ile epiandrosteron (15) inkübasyonu sonucunda bileşiğin büyük kısmı dehidrogenasyona maruz kaldıktan sonra çoğunlukla C-6 β pozisyonunda hidroksillenirken substratın geriye kalan az bir kısmı C-1 α , C-7 α , C-7 β ve C-11 α pozisyonlarında hidroksillendiği gözlemlendi. Literatür çalışmalarının gözden geçirilmesi sonucunda daha önceki *Aspergillus* türleri ile epiandrosteron (15) inkübasyonlarında substratın sadece C-11 α veya C-11 β pozisyonlarında hidroksillendiği ve bu substratın ilk olarak *A. sydowii* MRC 200653 küfö ile dehidrogenasyona uğradığı anlaşıldı [26, 42-43, 66]. *A. sydowii* MRC 200653 küfö ile testosteron (4), DHEA (9) ve epiandrosteron (15) inkübasyonları ortak bazı metabolitler vermesine rağmen küfün bu substratları farklı şekillerde metabolize ettiği gözlemlendi.

Tablo 5.7.'den de gözlenebileceği gibi *A. candidus* MRC 200634 ile hem progesteron (2) hemde pregnenolon (3) inkübasyonları bu substratların *A. sydowii* MRC 200653 küfö ile inkübasyonlarında olduğu gibi aynı metabolitleri verdi. Bu sonuçlar *A. candidus* MRC 200634 küfönünde pregnenolon (3) üzerinde hem 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaz/ Δ^5 - Δ^4 izomeraz hem de hidroksilaz aktiviteleri gösterirken progesteron (2) üzerinde sadece hidroksilaz aktiviteleri gösterdiğini düşündürdü. *A. candidus* MRC 200634 ile inkübasyonlarda her iki substrat aynı metabolitleri verse de bu iki substratın *A. sydowii* MRC 200653 inkübasyonlarında olduğu gibi progesteron (2) inkübasyonlarının verimleri daha yüksek olarak gerçekleşti. Benzer şekilde *A. candidus* MRC 200634 küfö ile progesteron (2) ve pregnenolon (3) inkübasyonlarında da her iki substrattta aynı olan yan zincirlerin hidroksillenmeleri aynı pozisyonlara yönlendirebileceği düşünüldü.

A. candidus MRC 200634 ile testosteron (4) inkübasyonu ilk iki kez DMF yardımcı solventi üçüncü ve son kez ise etanol yardımcı solventi ile gerçekleştirildi. Sadece üçüncü deneme C-6 β , C-11 α , C-14 α , C-15 α ve C-15 β pozisyonlarındaki düşük

verimli hidrosillenmeler ile sonuçlandı. Daha önceki testosteron (4) inkübasyonlarında DMF ile böyle bir anormal bir durum gözlenmemesi [42-43, 66] DMF'nin etanole göre küfü daha fazla olumsuz etkilediğini düşündürdü. Bu sonuçlar *A. sydowii* MRC 200653 küfünün aksine testosteron (4) bileşiğininin *A. candidus* MRC 200634 küfünde yetersiz ve farklı bir şekilde metabolize edildiğini gösterdi. *A. candidus* MRC 200634 ile DHEA (9) inkübasyonu ise C-6 β , C-7 α , C-7 β C-11 α ve C-15 α pozisyonlarındaki düşük verimli hidrosilaz aktiviteleri, düşük bir 3 β -hidrosisteroid dehidrogenaz/ Δ^5 - Δ^4 izomeraz aktivitesi ve C-17'de düşük verimli bir indirgenme ile sonuçlandı. Daha önceki *Aspergillus* türlerinin aksine, *A. candidus* MRC 200634 küfünün *A. sydowii* MRC 200653 küfü gibi testosteron (4) ve DHEA (9) substratlarını C-15 α pozisyonunda hidrosillediği anlaşıldı [41-43, 45, 48-49, 66, 68-73]. *A. candidus* MRC 200634 küfünün testosteron (4) ve DHEA (9) inkübasyonları ortak bazı metabolitler verse de küfün bu iki substratı farklı şekillerde metabolize ettiği gözlemlendi. Tablo 5.7.'den de görülebileceği gibi *A. candidus* MRC 200634 ile epiandrosteron (15) C-11 α , C-1 α ve C-15 β pozisyonlarında daha yüksek verimler ile hidrosillenirken C-7 α ve C-14 α pozisyonlarında daha düşük verimler ile hidrosillendi. Buna ilaveten, az miktarlarda da olsa C-17'de indirgenme C-3'te ise yükseltgenme ve epimerleşme gözlemlendi. Yapılan literatür taramasına göre [26, 42-43, 66] epiandrosteron (15) bileşiğinin bir *Aspergillus* türü tarafından C-3 epimerleşmesi ve C-14 α ile C-15 β pozisyonlarında hidrosillenmelerinin ilk olarak *A. candidus* MRC 200634 küfü ile gerçekleştirildiği anlaşıldı. *A. sydowii* MRC 200653 küfünün aksine *A. candidus* MRC 200634 küfü epiandrosteron (15) bileşiğini C-7 β pozisyonunda hidrosilleyemese de her iki küf bu substratı C-11 α , C-1 α ve C-7 α pozisyonlarında hidrosilleyebildi. Ayrıca *A. candidus* MRC 200634 ile epiandrosteron (15) inkübasyonu 1 α ,3 α -dihidroksi-5 α -androstan-17-on (73) ve 15 β ,17 β -dihidroksi-5 α -androstan-3-on (76) olmak üzere daha önce tanımlanmamış iki yeni bileşik ile sonuçlandı. Bütün bu sonuçlardan *A. candidus* MRC 200634 ile testosteron (4), DHEA (9) ve epiandrosteron (15) bileşiklerinin farklı şekillerde metabolize edildiği ve epiandrosteron (15) inkübasyonunun iki yeni metabolit ile sonuçlandığı anlaşıldı. Epiandrosteron (15) ile yeni metabolitler olan 1 α ,3 α -dihidroksi-5 α -androstan-17-on (73) ve 15 β ,17 β -dihidroksi-5 α -androstan-3-on (76) bileşiklerine ait ¹H NMR ve ¹³C NMR spektrumları Ekler bölümünde verilmiştir.

Tablo 5.7. *A. candidus* MRC 200634 küfü ile elde edilen metabolit verimleri

Substrat	Metabolit	%
Progesteron (2)	14 α -Hidroksipregn-4-en-3,20-dion (42)	6
	15 β -Hidroksipregn-4-en-3,20-dion (30)	24
	11 α -Hidroksipregn-4-en-3,20-dion (16)	30
	11 α ,15 β -Dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (28)	8
Pregnenolon (3)	14 α -Hidroksipregn-4-en-3,20-dion (42)	4
	15 β -Hidroksipregn-4-en-3,20-dion (30)	17
	11 α -Hidroksipregn-4-en-3,20-dion (16)	25
	11 α ,15 β -Dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (28)	5
Testosteron (4)	6 β ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (45)	3
	14 α ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (55)	5
	15 β ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (54)	4
	11 α ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (46)	10
	15 α ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (65)	12
DHEA (9)	3 β ,17 β -Dihidroksiandrost-5-en (56)	3
	6 β ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (45)	2
	3 β ,11 α -Dihidroksiandrost-5-en-17-on (71)	7
	3 β ,7 β -Dihidroksiandrost-5-en-17-on (57)	2
	3 β ,7 α -Dihidroksiandrost-5-en-3,17-dion (58)	6
	15 α ,17 β -Dihidroksiandrost-4-en-3-on (65)	2
Epiandrosteron (15)	11 α -Hidroksi-5 α -androstan-3,17-dion (62)	3
	14 α -Hidroksi-5 α -androstan-3,17-dion (72)	4
	1 α ,3 α -Dihidroksi-5 α -androstan-17-on (73)	2
	3 α ,15 β -Dihidroksi-5 α -androstan-17-on (74)	12
	3 β ,14 α -Dihidroksi-5 α -androstan-17-on (75)	3
	15 β ,17 β -Dihidroksi-5 α -androstan-3-on (76)	2
	3 β ,11 α -Dihidroksi-5 α -androstan-17-on (63)	15
	1 α ,3 β -Dihidroksi-5 α -androstan-17-on (68)	14
	3 β ,7 α -Dihidroksi-5 α -androstan-17-on (70)	2
	11 α ,17 β -Dihidroksi-5 α -androstan-3-on (77)	2

A. japonicus MRC U-3048 küfü ile progesteron (2), pregnenolon (3) testosteron (4), DHEA (9) ve epiandrosteron (15) bileşiklerinin yardımcı solvent olarak önce DMF ve daha sonra etanol kullanılan biyotransformasyon denemelerinin hepsi değişmeyen başlangıç maddesi ile sonuçlandı. Besiyerinde bir bulanıklık ve küflerde bir anormallik gözlenmediği için *A. japonicus* MRC U-3048 küfünün progesteron (2), pregnenolon (3) testosteron (4), DHEA (9) ve epiandrosteron (15) bileşiklerini metabolize edemediği sonucuna varıldı.

Kısaca, bu çalışmada progesteron (2), pregnenolon (3), testosteron (4), DHEA (9) ve epiandrosteron (15) bileşiklerinin *A. sydowii* MRC 200653, *A. candidus* MRC 200634 ve *A. japonicus* MRC U-3048 küfleri ile biyotransformasyonları gerçekleştirildi. *A. sydowii* MRC 200653 ve *A. candidus* MRC 200634 küflerinde progesteron (2) ve pregnenolon (3) bileşikleri benzer şekilde metabolize edilirken aynı küflerdeki testosteron (4), DHEA (9) ve epiandrosteron (15) bileşikleri farklı şekillerde metabolize edildi. *A. japonicus* MRC U-3048 küfünün ise progesteron (2), pregnenolon (3) testosteron (4), DHEA (9) ve epiandrosteron (15) bileşiklerini metabolize edemediği gözlemlendi.



KAYNAKLAR

- [1] Clayden, J., Greeves, N., Warren, S., Wothers, P., Organic Chemistry. First edition, Oxford University Pres, Oxford, 1413-1414, 2001.
- [2] Mann, J., Chemical Aspects of Biosynthesis. First edition, Oxford University Pres, New York, 2-4, 1994.
- [3] Hanson, J.R., An Introduction to Biotransformations in Organic Chemistry. W. H. Freeman Spektrum, New York, 1-62, 1995.
- [4] Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E.Y., İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, Ankara, 481-659, 2002.
- [5] Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. İ., Biyokimya, Dördüncü baskı, Aktif Yayınevi, Erzurum, 185-188, 2005.
- [6] Telefoncu, A., Biyoteknoloji, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 116-347, 1995.
- [7] Sheldon, R.A., Chirotechnology: Industrial Synthesis of Optically Active Compounds, Marcel Dekker, New York, 105, 1993.
- [8] Turner, M.K., Perspectives in Biotransformations. İçinde: Biotechnology. Wiley-VCH, Weinheim, 9, 1998.
- [9] Pasteur, L., Mémoire sur la fermentation. C. R. Acad. Sci., 46, 615-618, 1858.
- [10] Buchner, E., Alkoholische Gärung ohne Hefezellen. Ber. Dtsch. Chem. Ges., 30, 1110-1113, 1897.
- [11] Neuberg, C., Hirsch, J., Über ein Kohlenstoffketten Knüpfendes Ferment (Carboligase). Biochem. Z., 115, 282-310, 1921.
- [12] Hildebrandt, G., Klavehn, W., Verfahren zur Herstellung von l-1-Phenyl-2-methylaminopropan-1-ol, Knoll AG Chemische Fabriken in Ludwigshafen, Ger., 548-459, Pat. 548 459, 1930.
- [13] Kluyver, A.J., de Leeuw, F.J., *Acetobacter suboxydans*, een merkwaardige azijnbacterie, Tijdschr. Geneesk., 10, 170, 1924.

- [14] Reichstein, T., Grüssner, H., Eine ergiebige Synthese der l-Ascorbinsäure (C Vitamin). *Helv. Chim. Acta*, 17, 311–328, 1934.
- [15] Peterson, D.H., Murray, H.C., Epstein, S.H., Reineke, L.M., Weintraub, A., Meister, P.D., Leigh, H.M., Microbiological Oxygenation of Steroids, I. Introduction of Oxygen at Carbon-11 of Progesterone. *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 5933–5936, 1952.
- [16] Sebek, O.K., Perlman D., Microbial Transformation of Steroids and Sterols. *Microbial Technology*, Academic press, Second edition, New York, 1, 484-488, 1979.
- [17] Demain, A.L., Small Bugs Big Business: The Economic Power of the Microbe. *Biotechnol. Adv.*, 18, 499-514, 2000.
- [18] Faber, K., Biotransformations in Organic Chemistry, Fifth edition, Springer-Verlag, Berlin, 1-407, 2003.
- [19] Akar, T., Furanosteroid Yapılı Bazı Bileşiklerin Antifungal Etkinliğinin ve *Neurospora crassa* Fungal Kültürünün Biyotransformasyon ve Biyosorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 10-25, 2005.
- [20] Rajaguru, P., Kalaiselvi, K. and Subburam, V., Biodegradation of Azo Dyes in a Sequential Anaerobic-aerobic System. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54, 268-273, 2000.
- [21] Anonymous, Türk Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği, Resmi Gazete, Sayı No:19746, 1998.
- [22] Armstrong, D. W. and Yamazaki, H., Natural Flavours Production. *Trends Biotechnol.*, 4, 264-268, 1986.
- [23] Yildirim, K., The Biotransformation and Synthesis of Some Steroids. D. Phil. Thesis, Sussex University, England, 8-81, 2001.
- [24] Holland, H.L., The Mechanism of the Microbial Hydroxylation of Steroids. *Chem. Soc. Rev.*, 11, 371-395, 1982.
- [25] Jones, E.R.H., The Microbiological Hydroxylation of Steroids and Related Compounds. *Pure Appl. Chem.*, 33, 39-52, 1973.
- [26] Brannon, D. R., Parrish, F. W., Willey, B. J., Long, L., The Microbial Transformations of a Series of Androgens with *Aspergillus tamarii*. *J. Org. Chem.*, 32, 1521-1527, 1967.

- [27] McCrindle, R., Turnbull, J. K., Anderson, A. B., Microbiological Hydroxylation of 17-Norkauran-16-one and *ent*-17-Norkauran-16-one with the Fungus *Rhizopus nigricans*. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1202-1208, 1975.
- [28] Nassiri-Koopaei, N., Faramarzi, M.A., Recent developments in the fungal transformation of steroids. Biocatal. Biotransform., 33,1-28, 2015.
- [29] Mahato, S. B., Banarjee, S., Podder, S., Steroid Transformations by Microorganisms-III. Phytochemistry, 28, 7-40, 1989.
- [30] Maheshwari, R., Varahalarao, V., Suryanarayana, M.U., *Aspergillus* Mediated Biotransformation: A Review. Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci., 8, 828-840, 2017.
- [31] Dutta, T. K., Datta, J., Samanta, T. B., Onset of New Catalytic Activity in Immobilized Spores of *Aspergillus ochraceus* TS in situ Germination C17-C20 Lysis Accompanies 11 α -Hydroxylation of Steroid. Biochem. Biophys. Res. Commun., 192, 119-123, 1993.
- [32] Mahato, S. B., Banarjee, S., Steroid Transformations by Microorganisms-II. Phytochemistry, 24, 1403-1421, 1985.
- [33] Dutta, T. K., Samanta, T. B., Novel Catalytic Activity of Immobilized Spores Under Reduced Water Activity. Bioorg. Med. Chem. Lett., 7, 629-632, 1997.
- [34] Marilyn, C., The Hydroxylation of Progesterone by Conidia from *Aspergillus ochraceus*. Mycologia, 54, 317-319, 1962.
- [35] El-Refai, A. M. H., Sallam, L. A. R., El-Kady, I., Microbiological Transformations of Progesterone. J. Gen. and Appl. Microbiol., 15, 301-307, 1969.
- [36] El-Refai, A. M. H., Sallam, L. A. R., El-Kady, I., Transformation of Progesterone by *Aspergillus niger* 100 and *Rhizopus nigricans* REF ,129. Bull. Chem. Soc. Jpn., 43, 1239-1242, 1970.
- [37] El-Kady, I . A., 6 β -Hydroxylation of Steroids by Extracts of *Aspergillus niger*. J. Gen. Microbiol. 128, 2511-2514, 1982.
- [38] Walaa, A. F., Abbas, I.H., Elwan, K.M, Swellum, M.A. and El-DougDoug, Kh. A, Biotransformation of Progesterone by Microbial Steroids. J. Appl. Sci. Res., 5, 137-143, 2009.

- [39] Smith, K. E., Ahmed, F., Williams, R. A. D., Kelly, L. K., Microbial Transformations of Steroids-VIII. Transformation of Progesterone by Whole Cells and Microsomes of *Aspergillus fumigatus*. J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 49, 93-100, 1994.
- [40] Mukherjee, A., Banarjee, S., Mahato, S. B., Metabolism of Progesterone by *Aspergillus fumigatus*. J. Steroid Biochem., 17, 443-446, 1982.
- [41] Brannon, D. R., Martin, J., Oehlschlager A. C., Durham, N. N., Zalkow, L. H., Transformation of Progesterone and Related Steroids by *Aspergillus tamaris*. J. Org. Chem., 30, 760-762, 1965.
- [42] Yildirim, K., Uzuner, A., Gülcüoğlu E.Y., Baeyer-Villiger Oxidation Of Some Steroids By *Aspergillus tamaris* Mrc 72400. Collect. Czech. Chem. Commun., 76, 743-754, 2011.
- [43] Yildirim, K., Uzuner, A., Gülcüoğlu E.Y., Biotransformation of some steroids by *Aspergillus terreus* MRC 200365. Collect. Czech. Chem. Commun., 75, 665-673, 2010.
- [44] Ahmed, E.M., Production of 11 α -hydroxyprogesterone Using *Aspergillus terreus* Immobilized on Polytetrafluoroethylene. Braz. J. Microbiol., 38, 224-229, 2007.
- [45] Cvelbar, D., Zist, V., Kobal, K., Zigon, D., Zakelj-Mavrič, M., Steroid toxicity and detoxification in ascomycetous fungi. Chem.-Biol. Interact., 202, 243-258, 2012
- [46] Mostafa, M. E., Zohri, A. A., Progesterone Side-Chain Degradation by Some Species of *Aspergillus flavus* Group. Folia Microbiol., 45, 243-247, 2000.
- [47] Kim, M.N., Ergan, F., Dhulster, P., Atrat, P., Gellf, G., Thomas, D., Steroid Modification with Immobilized Mycelium of *Aspergillus phoenicis*. Biotechnol. Lett., 4, 233-238, 1982.
- [48] Sallam, L.A.R., El Refai, A.M.H., Nada, S. and Abdel Fattah A.F., Enzymic hydroxylation and side chain degradation of progesterone by *Aspergillus fischeri*. J. Gen. Appl. Microbiol., 19, 155-160, 1973.
- [49] Viola, F., Caputo, O., Balliano, G., Delprino, L., Cattel, L., Side Chain Degradation and Microbial Reduction of Different Steroids by *Aspergillus aureogulgens*. J. Steroid Biochem., 19, 1451-1458, 1983.
- [50] Mahato, S. B., Majumdar, I., Current Trends in Microbial Steroid Biotransformation. Phytochemistry, 34, 883-898, 1993.

- [51] Haiying, Y., Hailing S., Gang D., Guangjian S., Jingxian S., Haiyun C., Progesterone side-chain cleavage by *Aspergillus versicolor*. *Adv. Mater. Res.*, 781-784, 1164-167, 2013.
- [52] Hosseinabadi, T., Vahidi, H., Nickavar, B., Kobarfard, F., Biotransformation of Progesterone by Whole Cells of Filamentous Fungi *Aspergillus brasiliensis*. *Iran J. Pharm. Res.* 14, 919-924, 2015.
- [53] McMorris, TC., Le, P.H., Preus, M.W., Schow, S.R., Weihe, G.R., Synthesis of dehydro-oogoniol, a female-activating hormone of Achlya: the progesterone route. *Steroids*, 53, 345-361, 1989.
- [54] Samanta, T. B., Roy, N., Chattopadhyay, S., An Improved 11 α -Hydroxylation of Progesterone by *Aspergillus ochraceus* TS. *Biochem. J.*, 176, 593-594, 1978.
- [55] Ghosh, D., Samanta, T. B., 11 α -Hydroxylation of Progesterone by Cell Free Preparation of *Aspergillus ochraceus* TS. *J. Steroid Biochem.*, 14, 1063-1067, 1981.
- [56] Bihari, V., Goswami, P. P., Rivzi, S. H. M., Khan, A. W., Basu, S. K., Vora, V. C., Studies on Immobilized Fungal Spores for Microbial Transformation of Steroids: 11 α -Hydroxylation of Progesterone with Immobilized Spores of *Aspergillus ochraceus* G8 on Polyacrylamide Gel and Other Matrices. *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 1403-1408, 1984.
- [57] Weaver, E. A., Kenney, H. E., Wall, M. E., Effect of Concentration on the Microbiological Hydroxylation of Progesterone. *Appl. Microbiol.*, 8, 345-348, 1960.
- [58] Bihari, V., Joshi, A. K., Khan, A. W., Basu, S. K., Biochemical Engineering Studies for Steroid Transformations - 11 α -Hydroxylation of Progesterone Using *Aspergillus ochraceus*. *J. Microb. Biotechnol.*, 3, 45-50, 1988.
- [59] Broad, D. F., Foulkes, J., Dunnill, P., The Uptake of *Aspergillus ochraceus* Spores on Diatomaceous Particles and Their Use in the 11 α -Hydroxylation of Progesterone. *Biotechnol. Lett.*, 6, 357-362, 1984.
- [60] Tapan, K. D., Timir, B.S., Bioconversion of Progesterone by the Activated Immobilized Conidia of *Aspergillus ochraceus* TS. *Curr. Microbiol.*, 39, 309-312, 1999.
- [61] Kulkarni, A. G., Lele, S. S., Kulkarni, P. R., Improved Adsorption of *Aspergillus niger* 589 Spores on High-Density Polyethylene for Progesterone Biotransformation. *J. Ferment. Bioeng.*, 86, 510-512, 1998.
- [62] Mahato, S. B., Mukherjee, A., Steroid Transformations by Microorganisms. *Phytochemistry*, 23, 2131-2154, 1984.

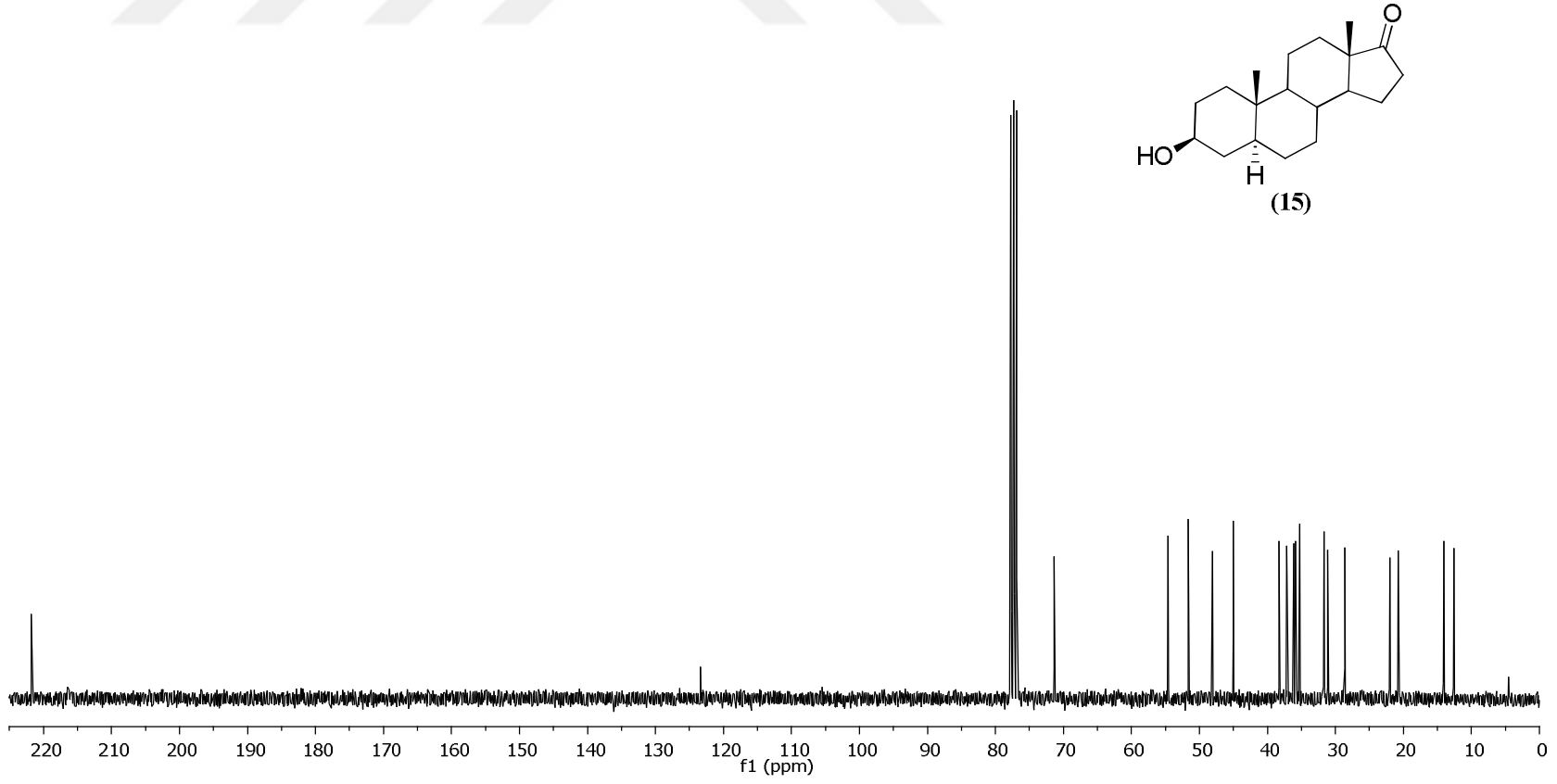
- [63] Ismail, M. A., Zohri, A. A., Confirmation of the Relationships of *Aspergillus egyptiacus* and *Emericella nidulans* Using Progesterone Transformation. Lett. Appl. Microbiol., 18, 130–131, 1994.
- [64] Somal, P., Chopra, C. L., Microbial Conversion of Steroids III: 11 α -Hydroxylation by Fungal Mycelium. Appl. Microbiol. Biotechnol., 21, 267-269, 1985.
- [65] Farooq, A., Tahara, S., Biotransformation of Testosterone and Pregnenolone Catalyzed by the Fungus *Botrytis cinerea*. J. Nat. Prod., 63, 489-491, 2000.
- [66] Yildirim, K., Microbial Hydroxylation of Some Steroids by *Aspergillus wentii* MRC 200316. Collect. Czech. Chem. Commun., 12, 1273-1281, 2010.
- [67] 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
- [68] Peart P.C., Reynolds W.F., Reese, P.B., The facile bioconversion of testosterone by alginate-immobilised filamentous fungi. J. Mol. Catal. B: Enzym., 95, 70– 81, 2013.
- [69] Haruo, Y., Kenyu, S., Nobuaki, Y., Yuichiro, K., Hiromu, M., Microbial 16 β -Hydroxylation of Steroids with *Aspergillus niger*. Agr. Biol. Chem., 40, 505-509, 1976.
- [70] Mahato, S. B., Mukherjee, A., Microbial transformation of testosterone by *Aspergillus fumigatus*. J. Steroid Biochem. 23, 341-342, 1984.
- [71] Mascotti, M.L., Palazzolo, M.A., Bisogno, F.R., Kurina-Sanz, M., Biotransformation of dehydro-epi-androsterone by *Aspergillus parasiticus*: Metabolic evidences of BVMO activity. Steroids, 109, 44-49, 2016
- [72] Fujiwara, A., Miyamoto, C.O.T., 1-Hydroxydehydroepiandrosterone is produced from dehydroepiandrosterone by fermentation with *Aspergillus terreus* and *Penicillium oxalicum*. EP, 14971, A1, 1980.
- [73] Hunter, A.C., Coyle, E., Morse, F., Dedi, C., Dodd, H.T., Koussoroplis, S.J., Transformation of 5-ene steroids by the fungus *Aspergillus tamarii* KITA: Mixed molecular fate in lactonization and hydroxylation pathways with identification of a putative 3 β -hydroxy-steroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 isomerase pathway. Biochim. Biophys. Acta, 1791, 110-117, 2009.

- [74] Lobastova, T. G., Gulevskaya, S. A., Sukhodolskaya, G. V., Turchin K. F., Donova, M. V., Screening of Mycelial Fungi for 7 α - and 7 β -Hydroxylase Activity towards Dehydroepiandrosterone. *Biocatal. Biotransform.*, 25, 434-442, 2007.
- [75] Donova, M.V., Egorova, O.V., Microbial Steroid Transformation: Current State and Prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 94, 1423–1447, 2012.
- [76] Fernandes, P., Cruz, A., Angelov, B., Pinheiro, H. M., Cabral, J. M. S., Microbial Conversion of Steroids Compounds: Recent Developments. *Enzyme Microb. Technol.*, 32, 688–705, 2003.
- [77] Mahato, S. B., Garai, S., Advances in Microbial Steroid Biotransformation. *Steroids*, 62, 332–345, 1997.
- [78] Rocha, L.C., Ferreira, H.C., Pimenta, E.F., Berlinck, R.G.S., Rezende, M.O.O., Landgraf, M.D., Selegim, M.H.R., Sette, L.D. and Porto, A.L.M., Biotransformation of α -Bromoacetophenones by the Marine Fungus *Aspergillus sydowii*. *Mar. Biotechnol.*, 12, 552, 2010.
- [79] Mascotti, M.L., Orden, A.A., Bisogno, F.B., Gonzalo, G., Kurina-Sanz, M., *Aspergillus* genus as a source of new catalysts for sulfide oxidation. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 82, 32–36, 2012.
- [80] Herzog, H.L., Gentles, M.J., Charney, W., Sutter, D., Townley, E., Yudis, M., Kabasakalian P. and Hershberg, E.B., Microbiological transformation of steroids. VII. 15 β -hydroxylation. *J. Org. Chem.*, 24, 691, 1959.
- [81] Farooq, A., Hanson, J.R. and Iqbal, Z., Hydroxylation of progesterone by *Cephalosporium aphidicola*. *Phytochemistry*, 37, 723, 1994.
- [82] Schubert, A., Langbein, G. and Siebert, R., Mikrobielle Hydroxylierung von Steroiden in 12- und 15-Stellung. *Chem. Ber.*, 90, 2576, 1957.
- [83] Tsuda, K., Asai, T., Sato, Y., Tana, T. and Hasegawa, H., Uber 7 β ,16 β -dihydroxypregn-4-en-3,20-dion. *Chem. Pharm. Bull.*, 8, 626, 1960.
- [84] Hanson, J.R., Nasir, H. and Parvez, A., The hydroxylation of testosterone and some relatives by *Cephalosporium aphidicola*. *Phytochemistry*, 42, 411, 1996.
- [85] Peart, P.C., McCook, K.P., Russell, F.A., Reynolds, W.F. and Reese, P.B., Hydroxylation of steroids by *Fusarium oxysporum*, *Exophiala jeanselmei* and *Ceratocystis paradoxa*. *Steroids*, 76, 1317, 2011.
- [86] Bensasson, C.M., Hanson, J.R. and Hunter, A.C., The hydroxylation of Δ^5 -androstenes by *Cephalosporium aphidicola*. *Phytochemistry*, 49, 2355, 1998.

- [87] Zang, H., and Qiu, Z., An efficient synthesis of 5 α -androst-1-ene-3,17-dione. *Steroids*, 71, 1088, 2006.
- [88] Abul-Hajj, Y.J., Unusual enolizations in 19-nor-3-ketosteroids. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 1479, 1985.
- [89] Nagasawa, M., Hashiba, H., Watanabe, N., Bae, M., Tamura, G. and Arima, K., Microbial Transformation of Sterols Part IV. C19-Steroid Intermediates in the Degradation of Cholesterol by *Arthrobacter simplex*. *Agr. Biol. Chem.*, 34, 801, 1970.
- [90] Kołek, T., Milecka, N., Świzdor, A., Panek A. and Białońska, A., Hydroxylation of DHEA, androstenediol and epiandrosterone by *Mortierella isabellina* AM212. Evidence indicating that both constitutive and inducible hydroxylases catalyze 7 α - as well as 7 β -hydroxylations of 5-ene substrates. *Org. Biomol. Chem.*, 9, 5414, 2011.
- [91] Dodson, R.M., Goldkamp, A.H. and Muir, R.D., Microbiological Transformations. V. 1 α - and 2 β -Hydroxylations of C19-Steroids. *J. Am. Chem. Soc.*, 82, 4026, 1960.
- [92] Milecka-Tronina, N., Kołek, T., Świzdor, A. and Panek, A., Hydroxylation of DHEA and its analogues by *Absidia coerulea* AM93. Can an inducible microbial hydroxylase catalyze 7 α - and 7 β -hydroxylation of 5-ene and 5 α -dihydro C19-steroids? *Bioorg. Med. Chem.*, 22, 883–891, 2014.
- [93] Yousefi, M., Mohammadi, M., Habibi, Z. and Shafiee, A., Biotransformation of Progesterone by *Acremonium chrysogenum* and *Absidia griseolla* var. *Īgachii*. *Biocatal. Biotransform.*, 28, 254, 2010.
- [94] Boynton, J., Hanson, J.R. and Hunter, A.C., The hydroxylation of some 13 α -methylsteroids by *Cephalosporium aphidicola*. *Phytochemistry*, 45, 951, 1997.
- [95] Sato, Y., Naito, A., Kato, M., Iizuka, H., Tsuda, K., Untersuchungen auf dem gebiet der mikrobiologischen umsetzung. XV. C1-Dehydrierung von reichsteins substanz S hydrocortison, pregnenolon und dehydroepiandrosteron durch *Bacillus pulvifaciens*. *Chem. Pharm. Bull.*, 9, 932–935, 1961.
- [96] Matsui, M., Kinuyama, Y., Synthesis of isomeric 5 α -androstane-3,15,17 β -triols. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1429–1432, 1976.
- [97] Chambers, V.E.M., Jones, E.R.H., Meakins, G.D., Miners, J.O., Wilkins, A.L., Microbiological hydroxylation. Part XIV. Hydroxylation in the terminal rings of dioxygenated 5 α -androstanes with the fungi *Wojnowicia graminis* and *Ophiobolus herpotrichus*. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 55–58, 1975.

- [98] Gumulka, M., Ibrahim, I.H., Bończa-Tomaszewski, Z., Engel, C.R., Steroids and related products. LII. 11-Aza steroids. Part IV. The synthesis of 11-aza 9α -steroids. II. The synthesis of 11-aza-4,5a-dihydrotestosterone. *Can. J. Chem.*, 63, 766–772. 1985.
- [99] Janeczko, T., Świzdor, A., Dmochowska-Gładysz, J., Białońska, A., Ciunik, Z. and Kostrzewa-Susłow, E., Novel metabolites of dehydroepiandrosterone and progesterone obtained in *Didymosphaeria igniaria* KCH 6670 culture. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 82, 24, 2012.
- [100] Kirk, D.N., Toms, H.C., Douglas, C., White, K.A., Smith, K.E., Latif, S. and Hubbard, R.W.P., A survey of the high-field ^1H NMR spectra of the steroid hormones, their hydroxylated derivatives, and related compounds. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1990, 1567.
- [101] Blunt, J.W. and Stothers, J.B., C NMR spectra of steroids a survey and commentary. *Org. Magn. Reson.*, 9, 439, 1977.
- [102] Al-Aboudi, A., Mohammed, M.Y., Musharraf, S.G., Choudhary M.I., and Rahman, A.U., Microbial transformation of testosterone by *Rhizopus stolonifer* and *Fusarium lini*. *Nat. Prod. Res.*, 22, 1498, 2008.

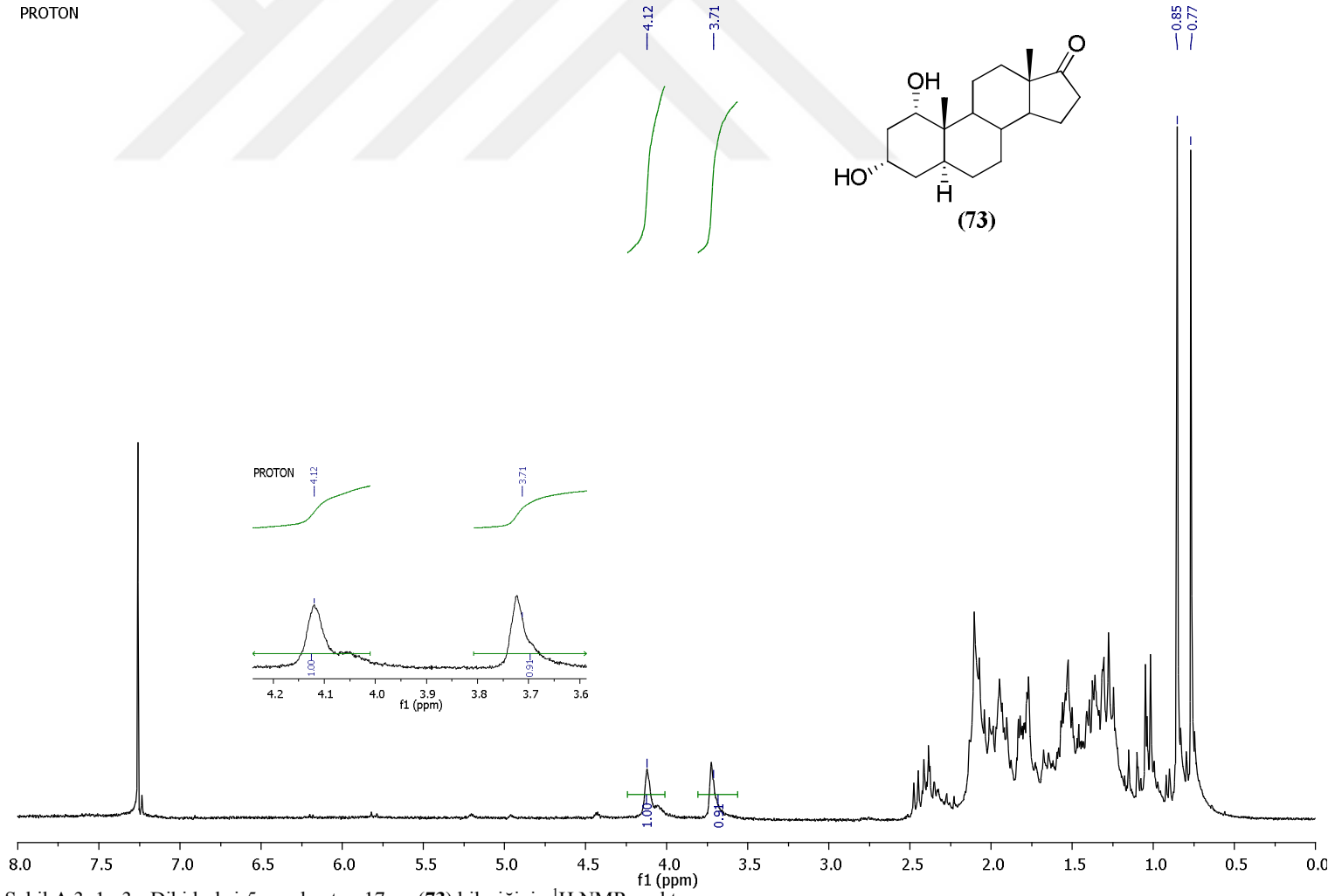
CARBON



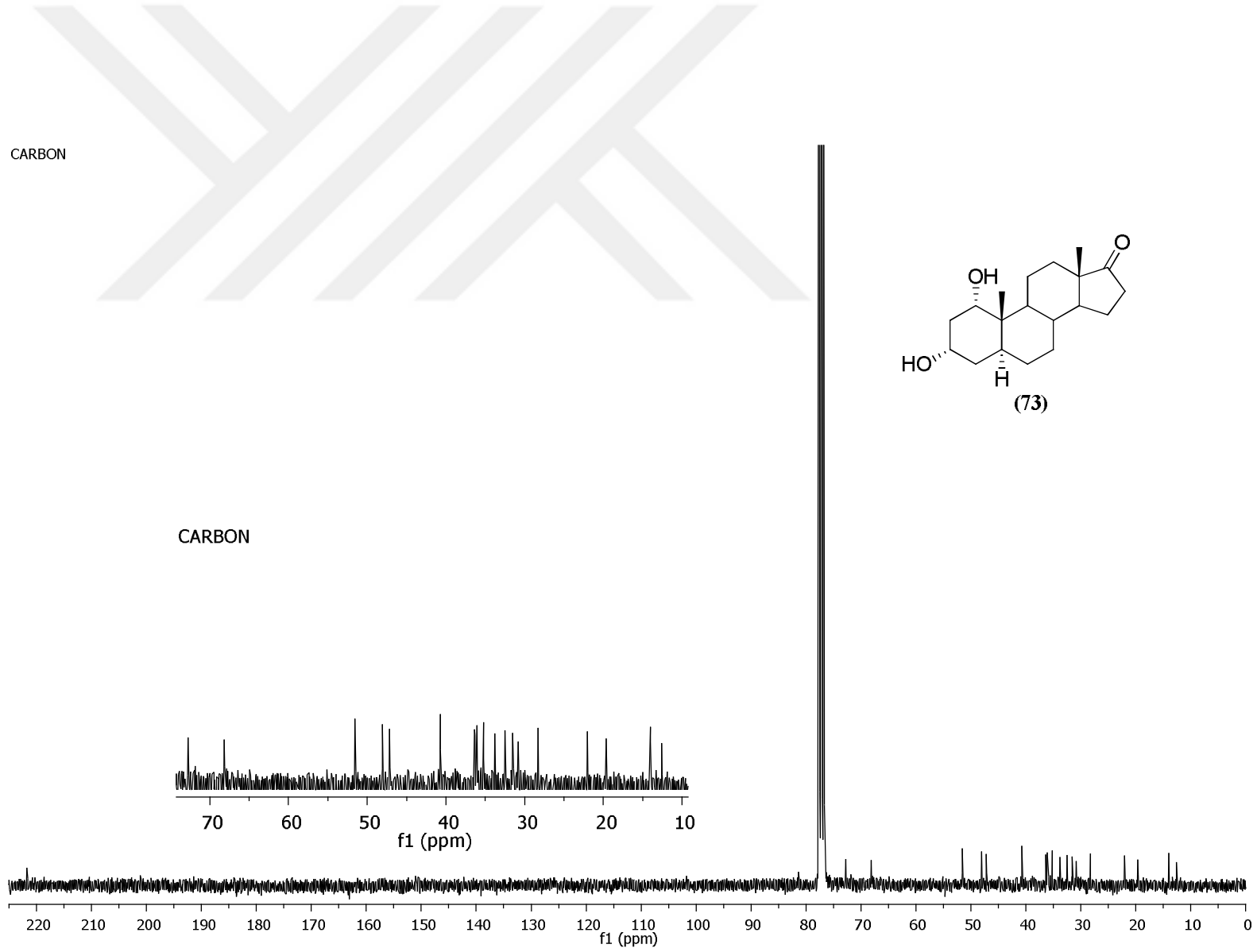
Şekil A.2. Epiandrosteron (15) bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu

EK A2 : Epiandrosteron (15) bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu

EK A3 : 1 α ,3 α -Dihidroksi-5 α -androstan-17-on (73) bileşiminin ¹H NMR spektrumu

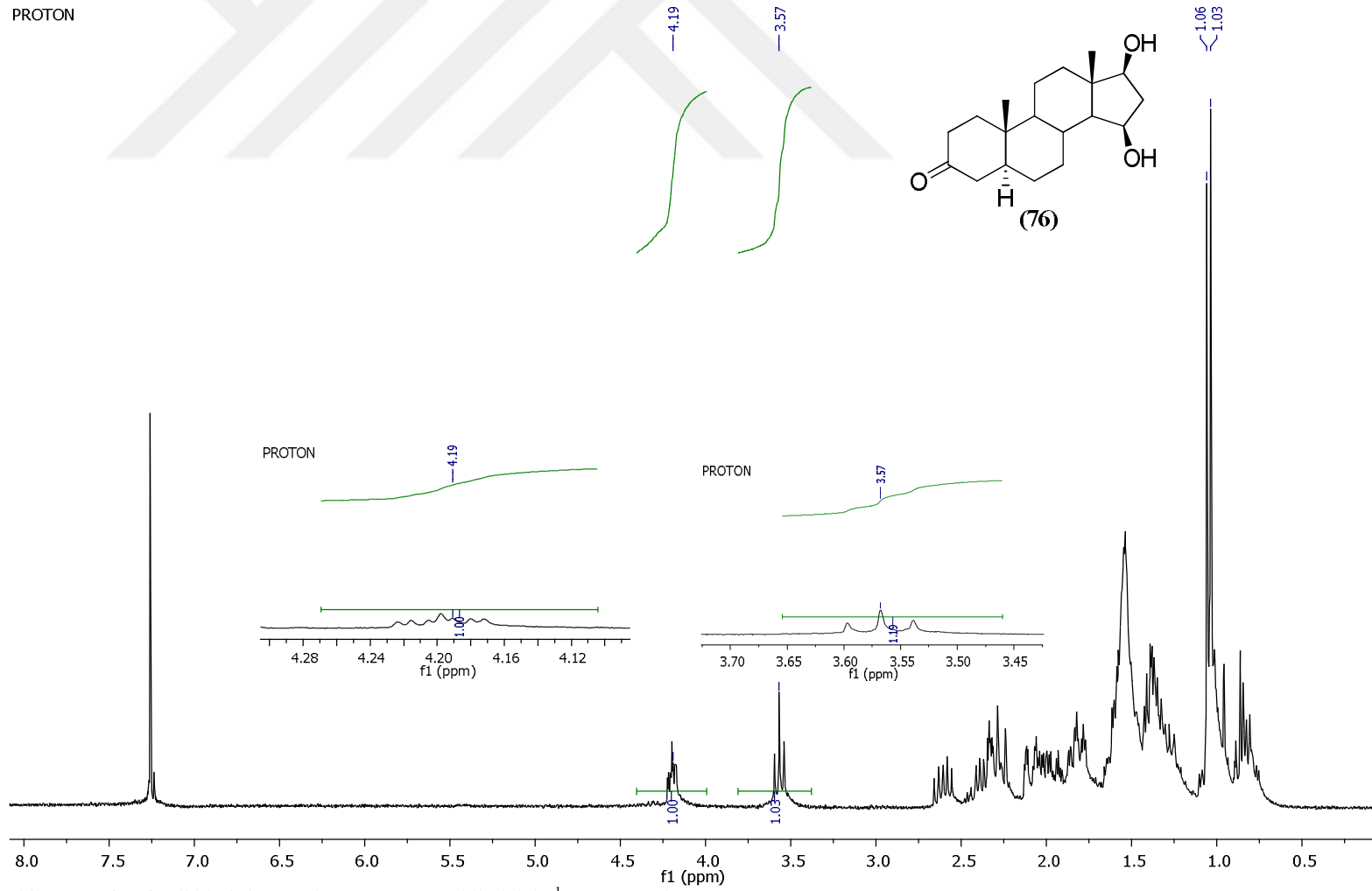


Şekil A.3. 1 α ,3 α -Dihidroksi-5 α -androstan-17-on (73) bileşiminin ¹H NMR spektrumu



Şekil A.4. 1 α ,3 α -Dihidroksi-5 α -androstan-17-on (73) bileşiminin ¹³C NMR spektrumu

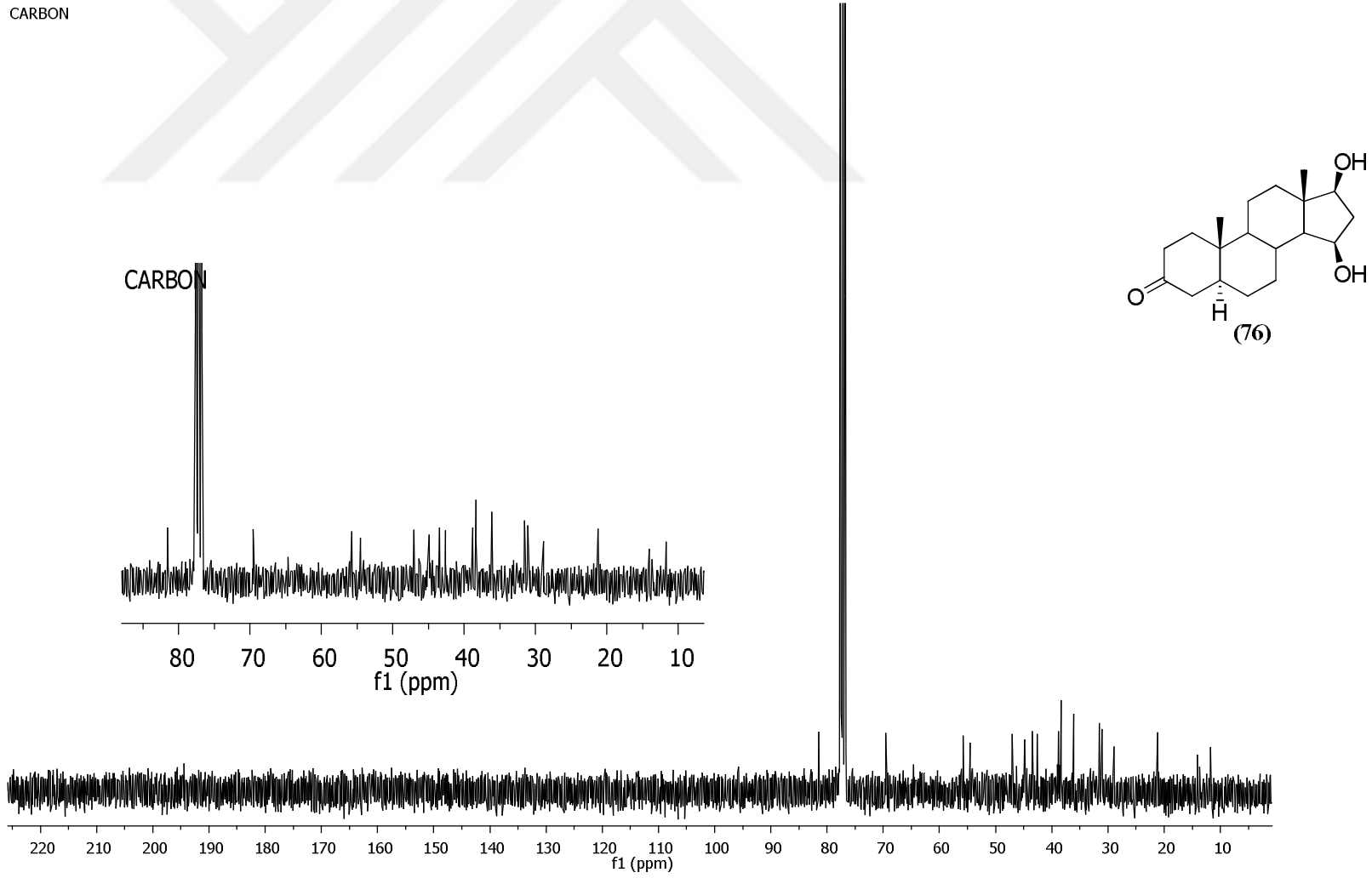
PROTON



Şekil A.5. 15β,17β-Dihidroksi-5α-androstan-3-on (76) bileşiğinin ¹H NMR spektrumu

EK A5 : 15β,17β-Dihidroksi-5α-androstan-3-on (76) bileşiğinin ¹H NMR spektrumu

CARBON



Şekil A.6. 15β,17β-Dihidroksi-5α-androstan-3-on (76) bileşiğinin ¹³C NMR spektrumu

EK A6 : 15β,17β-Dihidroksi-5α-androstan-3-on (76) bileşiğinin ¹³C NMR spektrumu

ÖZGEÇMİŞ

Ali KURU, 1982 yılında K.Maraş'ta doğdu. İlk ve orta öğrenimini K.Maraş'ta tamamladı. 2003 yılında başladığı Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği Bölümünü 2008 yılında bitirdi. Yüksek lisans öğrenimine 2008 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim dalında başladı ve 2011 yılında bitirdi. 2011 yılı Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı ile Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümüne Araştırma Görevlisi olarak atandı ve aynı yıl Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim dalında doktora öğrenimine başladı. Halen ilgili bölümde Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır. Ali KURU evli ve bir çocuk babasıdır.