



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TİYOL GRUBU TAŞIYAN KALİKS(4)ARENLERİN SENTEZİ VE LİPAZ KATALİZLİ ENANTİYOSEÇİMLİ TEPKİMELERDE KULLANILMASI

Hasan YILDIZ

YÜKSEK LİSANS

KİMYA Anabilim Dalı

Ağustos-2015
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Hasan YILDIZ

Tarih: 13.08.2015

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TİYOL GRUBU TAŞIYAN KALİKS(4)ARENLERİN SENTEZİ VE LİPAZ KATALİZLİ ENANTİYOSEÇİMLİ TEPKİMELERDE KULLANILMASI

Hasan YILDIZ

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Mustafa YILMAZ

2015, 115 Sayfa

Jüri
Prof. Dr. Mustafa YILMAZ
Doç. Dr. Erdal KOCABAŞ
Doç. Dr. Elif ÖZYILMAZ

Bu çalışmada tiyol grupları taşıyan farklı yapıda kaliks[4]arenler sentezlenerek lipaz immobilizasyonunda katkı materyali olarak kullanılması amaçlandı. Bunun için literatürde belirtilen metoda göre *p-ter*-bütilkaliks[4]arenin diester türevi (**2**) sentezlendikten sonra sistamin ile etkileştirilerek kaliks[4]arenin halkalı yapıdaki disülfan türevi **(3)** sentezlendi.

Ayrıca sentezlenen kaliks(4)aren bileşiği 1,3-dibrompropan ile etkileştirilerek **(4)** numaralı *p-ter*-bütilkaliks[4]aren di brom türevi elde edildi. Elde edilen dibrom türevi uygun koşullarda tiyoüre ile reaksiyona sokularak tiyol grubu taşıyan kaliks[4]aren bileşiği **(5)** elde edildi.

Bunlara ilaveten p-*ter*-bütilkaliks[4]arenin diester türevi (**2**) hidrazin ile etkileştirilerek kaliks[4]arenin dihidrazit türevi **(6)** elde edildi. Daha sonra bu bileşik **(6)** lipoik asit ile uygun koşullarda tepkimeye sokularak kaliks[4]arenin alkil-1,2-ditiyolan türevi **(7)** sentezlendi. Sentezlenen bütün bileşiklerin yapıları spektroskopik teknikler (FTIR, ^{1}H NMR) ile aydınlatıldı.

Sentezlenen kaliks[4]aren türevleri (**3, 5, 7)** Fe_3O_4 manyetik nanopartiküller varlığında lipaz immobilizasyonunda katkı maddesi olarak kullanıldılar. Elde edilen immobilize lipazlar sol-gel tekniğine göre rasemik flurbiprofen metil esterinin enantiyoseçimli tepkimelerinde kullanıldılar.

Anahtar Kelimeler: Kaliksaren, tiyol, sol-gel, enantiyoseçimlilik, flurbiprofen

ABSTRACT

MS THESIS

SYNTHESIS AND APPLICATION OF CALIX(4)ARENE DERIVATIVES BEARING THIOL GROUPS IN THE LIPASE CATALYZED ENANTIOSELECTIVE REACTIONS

HasanYILDIZ

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELCUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN CHEMISTRY

Advisor: Prof. Dr. Mustafa YILMAZ

2015, 115 Pages

Jury
Prof. Dr. Mustafa YILMAZ
Doç. Dr. Erdal KOCABAŞ
Doç. Dr. Elif ÖZYILMAZ

In this study, synthesis of calix[4]arene derivatives bearing various thiol groups and using in lipase immobilization as additive material have been intended. For this, according to the method described in the literature derivative of the p-tert-butylcalix[4]arene diester **(2)** has been synthesized and after reacted with cystamine, calix[4]arene disulfide derivative of the cyclic structure **(3)** was synthesized.

Furturmore the synthesized calix[4]arene compound was reacted with 1,3-dibromopropane **(4)**, p-tert-butylcalix[4]arene di bromo derivative were obtained. the obtained dibromo derivative is reacted with thiourea under appropriate conditions and bearing thiol group of calix[4]arene compound **(5)** was obtained.

Additionally, after p-tert-butylcalix[4]arene diester derivative **(2)** was reacted with hydrazine, calix [4] arene dihydrazide derivative **(6)** was obtained. Then obtained compound was reacted with lipoic acid under under suitable conditions and alkyl-1,2-dithiolane derivative at calix[4]arene **(7)** was synthesized. The structures of synthesized all compounds was illuminated with spectroscopic techniques (FTIR and ^{1}H NMR).

Synthesis of calix[4]arene derivatives **(3, 5, 7)** was used lipase immobilization in the presence of Fe_3O_4 magnetic nanoparticles. Obained immobilized lipases were used enantioselective reactions of racemic flurbiprofen methyl ester by the sol-gel technique.

Keywords: Calixarene, tiol, sol-gel, enantioselectivity, Flurbiprofen

ÖNSÖZ

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Mustafa YILMAZ yönetiminde yapılarak Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne Yüksek Lisans Tezi olarak sunulmuştur.

Bu çalışma, Tübitak 113Z445 nolu araştırma projesinin bir kısmı olarak ve Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri koordinatörlüğü tarafından BAP 15201003 nolu yüksek lisans tez projesi olarak desteklenmiştir.

İlk olarak bu çalışmanın seçiminde, hazırlanmasında ve araştırılmasında her türlü bilgi ve öneriyle bana yön veren, danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa YILMAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde beni maddi olarak destekleyen Tübitak ve Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarımda bana her konuda yardımcı olan ve tezimin hazırlanmasında emeği geçen Doç. Dr.Elif ÖZYILMAZ, Doç. Dr. Serkan ERDEMİR, Doç. Dr. Özlem ŞAHİN, Arş. Gör. Dr. Ezgi AKCEYLAN, Arş. Gör. Dr. Arzu UYANIK ve Uzman Dr. Mustafa TOPKAFA'ya, NMR Uzmanı Kadir TANRIVERDİ ve yüksek lisans öğrencileri Mehmet AKTAŞ, Latife KAYA ve doktora öğrencisi Mehmet OĞUZ'a teşekkür ederim.

Ayrıca tez çalışmam boyunca bana büyük sabır ve ilgi gösteren, maddi, manevi yardımlarını ve desteklerini benden esirgemeyen çok değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hasan YILDIZ
KONYA-2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **ix**

1. GİRİŞ **1**

1.1. Kaliksarenler 1
1.1.1. Kaliksaren Tarihçesi 1
1.1.2. Kaliksarenlerin Adlandırılması 3
1.1.3. *p-ter*-Bütil Kaliks[n]arenlerin Sentezi 4
1.1.4. *p-ter*-Bütilkaliks[n]arenlerin Sentezini Etkiyen Faktörler 5
1.1.5. Kaliks[4]arenlerin Elde Edilişi ve Reaksiyon Mekanizması 6
1.1.6. Kaliks[4]arenlerin Konformasyonları 8
1.1.7. Kaliks[4]arenlerin Fonksiyonlandırılması 11
1.1.8. Kaliksarenlerin Kullanım Alanları 14
1.2. Enzimler ve Genel Özellikleri 22
1.2.1. Lipazlar 25
1.2.2. *Candida Rugosa* Lipaz (CRL) 28
1.2.3. Enzim İmmobilizasyonu 29
1.2.4. İmmobilizasyon Yöntemleri 31
1.3. Flurbiprofen 39

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **42**

3. MATERYAL VE YÖNTEM **52**

3.1.Enstrümantal Teknikler 52
3.2.Kimyasal Sentezler ve Karakterizasyon 52
3.2.1. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,26,27,28-tetrahidroksikaliks[4]aren (Gutsche, 1990) 53
3.2.2. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,27-dimetoksikarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi kaliks[4]aren (Collins, 1991) 54
3.2.3. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,27-dimetoksikarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi kaliks[4]aren 2,2'- diaminodietildisülfit dihidroklorid Türevi (Debdeep, 2011) 54
3.2.4. 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,27-bis(2-brometoksi)-26,28-dihidrosi - kaliks-[4]aren (Li ve Ark..1999) 56
3.2.5. 25,27-Bis(3-tiyopropoksi)-26,28-dihidroksi-5,11,17,23-tetra(ter-bütil)-kaliks[4]aren 57
3.2.6. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,27-dihidrazonamid karbonilmetoksi-26-28-dihidroksi-kaliks[4]aren (Maity, 2011) 57

3.2.7. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-26,28-dihidroksi kaliks[4]aren 25,27-dihidrazonamid karbonilmetoksi-26-28-dihidroksi-kaliks[4]aren Lipoik Asit Türevi (Yu, 2007) 58
3.2.8. Manyetik Fe_3O_4 nanopartikülünün sentezi (Zeng, 2005) 59
3.2.9. Sol-gel metoduna göre Lipaz İmmobilizasyonu 60
- Protein miktarı (Bradford, 1976) 61
- Aktivite Tayini (Hung, 2003; Chiou, 2004) 61
- Optimum pH tayini 62
- Optimum sıcaklık tayini 62
3.2.17. HPLC çalışmaları 63

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA 65

4.1. Sol-Jel Tekniğine göre Lipaz İmmobilizasyonu 70
Optimum pH 72
Optimum sıcaklık 73
Reuse (Tekrar Kullanılabilirlik) 74
4.2. İmmobilize Lipazların Enantiyoseçimli Tepkimelerde Kullanılması 75
Tekrar kullanılabilirlik 81

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 85

KAYNAKLAR 86

EKLER 100

ÖZGEÇMİŞ 105

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar

APTES	3-Aminopropiltrietoksisilan
TFA	Trifloroasetikasit
HMTA	Hegzametilentetraamin
MN	Manyetik nanopartikül
CRL	*Candida Rugosa* Lipaz
TMOS	Tetrametoksisilan
MTMOS	Metiltrimetoksisilan
TEOS	Tetraetoksisilan
OTES	Oktiltrietoksisilan
p-NPP	*p*-nitrofenil palmitat
p-NP	*p*-nitrofenol
BSA	Bovin serum albumin
Enc	Enkapsüle
NSAİ	Nonsteroid Antiinflamatuvar İlaçlar

Simgeler

δ	Kimyasal kayma degeri
G	Gram
Mg	Miligram
N	Mol
M	Molarite
M_A	Molekül ağırlığı
mL	Mililitre
Mmol	Milimol
-p-	Para
Ter	Tersiyer
Eq	Eşdeğer gram

1. GİRİŞ

Son dönemlerde gelişen teknoloji ile birlikte artan yaşam standartları birçok sorunu beraberinde getirmiştir. İnsan ve çevre üzerinde birçok zararı olduğu bilinen toksik maddelerin uzaklaştırılmasında ve son zamanlarda özellikle farmokolojide birçok ilacın etken maddesi olan kiral bileşiklerin enantiomerlerinin ayrılmasında farklı metotlar geliştirilmiştir.

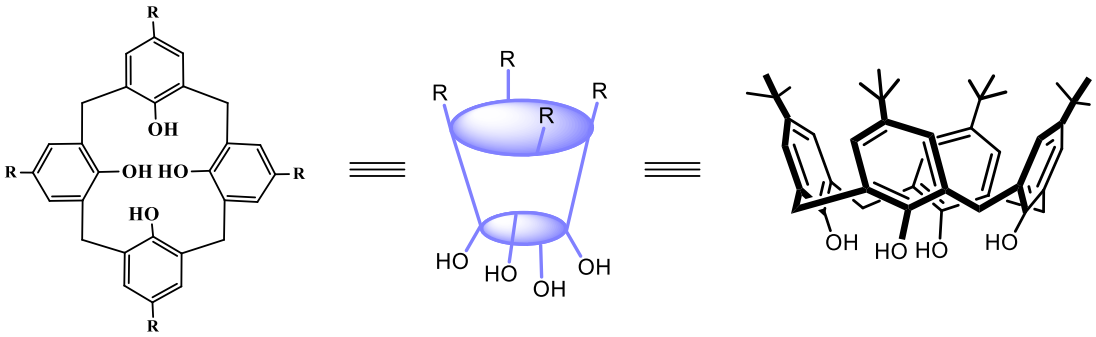
Supramoleküler kimyada da bu problemlerin giderilmesine yönelik uygun fonksiyonel gruplar bulunduran makromoleküller sentezlenmiştir. Supramoleküler kimyanın üçüncü kuşak bileşiği, değişik moleküllerle kompleks yapabilen hidrofobik bir boşluk oluşturacak şekilde fenolik birimlerin hidroksil gruplarına göre orto pozisyonundan metilen köprüleri ile birbirine bağlanmış, halkalı esnek yapıdaki bir oligomer bileşik olan kaliksarenlerdir. Kaliksarenlerin, seçimli olarak farklı gruplarla türevlendirilerek iyon ve molekül taşıma özelliklerinin yanında suda ve organik çözücülerdeki çözünürlükleride değiştirilebilmektedir. Fonksiyonlardırma zenginliğindeki avantajlarına, anyon, katyon ve nötral maddelerle konuk-konak kompleksi yapabilme özelliklerine, tek basamakta sentezlenebilme gibi kolaylıklara sahip olan kaliksarenler farklı amaçlarda kullanıldığı gibi toksik maddelerin uzaklaştırılmasında ve ilaç salınımında da kullanılmıştır. Bu çalışmada sentezlenen tiyol grubu taşıyan kaliksaren bileşikleri lipaz enzimi ile immobilize edilerek rasemik profen türevlerinden flurbiprofenin enantiyomerlerine ayrılmasında kullanılmıştır.

1.1. Kaliksarenler

1.1.1. Kaliksaren Tarihçesi

Kaliksarenler, metasiklofan sınıfına ait makrosiklik oligomerlerdir ve formaldehit ile *p*-sübstitüe fenollerin bazik ortamdaki kondenzasyonu sonucu fenol birimlerinin hidroksil gruplarına göre orto pozisyonundan birbirlerine metilen köprüleriyle bağlanması sonucu oluşurlar. Kaliks(n)aren de parantez içerisindeki ‘n’

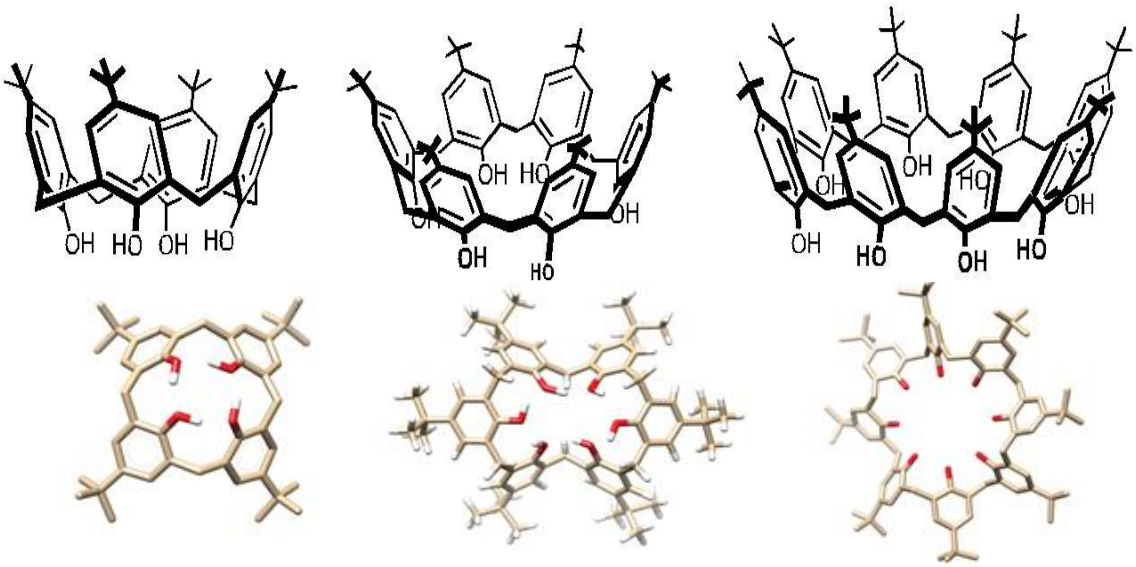
molekül boşluğunu oluşturan metilen köprüleriyle birbirine bağlı fenolik birimlerin sayısını göstermektedir. Supramoleküler kimyada taç eterler ve siklodekstrinler, birinci ve ikinci kuşak supramolekülleri oluştururken, benzer özellik göstermesi sebebiyle kaliksarenler, üçüncü kuşak supramoleküller olarak tanımlanmaktadırlar. Kaliksarenler halkalı yapıda olması, kolay sentezlenmesi, kolay türevlendirilmesi ve farklı büyüklükte molekül boşluğu oluşturabilmesi sebebiyle son yıllarda konuk-konak kimyasında önemli bir çalışma alanı olmuştur. Kökeni 1905'te Nobel ödülü alan Adolf von Baeyer'in çalışmasına kadar dayanmaktadır (Gusche 1989). Baeyer, 1872'de fenol ile sulu formaldehiti ısıtarak, katı reçinemsi kristal olmayan bir ürün elde etmiş fakat o günlerdeki enstrümental teknikler sınırlı olduğundan, yapısını tam olarak aydınlatamamıştır. Leo Hendrick Baekeland'ın, fenol-formaldehit reaksiyonundan katı, esnek bir reçine elde etmesi ancak 20. yüzyılda gerçekleşmiştir. Hendrick Baekeland fenol ile sulu formaldehitin reaksiyonundan katı, esnek bir reçine elde etti ve bu reçineler "bakalit" adı altında piyasaya sunuldu (Baekeland 1908). Böylelikle fenol-formaldehit reaksiyonlarına ilgi daha da artmış oldu. Zinke ve Ziegler *p-ter*-bütil fenolü, sulu formaldehit ve sodyum hidroksit ile önce 50–55 ^{0} C da, sonra 110–120 ^{0} C da iki saat etkileştirdikten sonra bezir yağı içerisinde 200 ^{o}C ye kadar birkaç saat ısıtıldığında erime noktası yaklaşık 340 ^{o}C olan bir madde elde ettiler. Zinke elde edilen bu ürünlerin *p*-alkilfenolün sadece iki orto pozisyonu ile formaldehitin reaksiyonu sonucunda oluşan lineer bir polimerin halkalaşmasıyla elde edilen siklik tetramer yapıda saf bir bileşik olduğunu iddia etti.



1. R = *ter*-Butil **1. R = *ter*-Butil** **1. R = *ter*-Butil**

Şekil 1.1. Kaliks[4]arenlerin farklı gösterimleri

David Gutsche ve arkadaşları bu yapınının sadece tetramer yapı değil, tetramer, hekzamer, oktamer ve bir miktar da lineer oligomer karışımı olduğunu ispatladılar. Daha sonra Gutsche tarafından 4, 5, 6 ve 8 fenolik birimden oluşan kaliksarenler için uygun sentetik tek basamakta sentez prosedürleri geliştirilmiştir. Gutsche 4, 6 ve 8 fenolik birimden oluşan kaliksarenleri (tetramer, hekzamer, oktamer) yüksek verimle ve ayrı ayrı saf olarak elde etmiştir (Gutsche 1990).



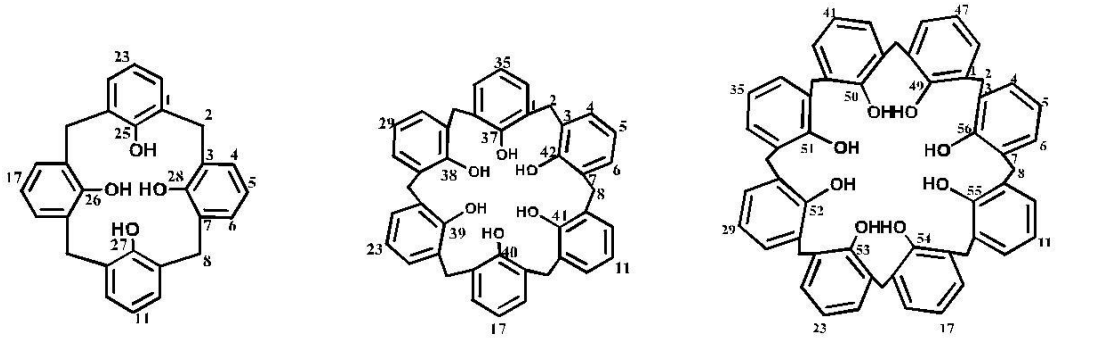
p-ter-Bütilkaliks[4]aren *p-ter*-Bütilkaliks[6]aren *p-ter*-Bütilkaliks[8]aren

Şekil 1.2. Kaliks[n]arenlerin yapısı

1.1.2. Kaliksarenlerin Adlandırılması

Kaliksarenler, formaldehit ile *p*-sübstitüe fenollerin bazik ortamdaki kondenzasyonu sonucu hidroksil gruplarına göre orto pozisyonundaki metilen grupları ile bağlı fenil halkalarının siklik dizilişinden oluşan, yapı olarak siklodekstrinlere benzeyen "metasiklofan" olarak sınıflandırılır (IUPAC 1970). Bu tip bileşikler IUPAC sistemine göre adlandırılması çok zor olduğundan (örneğin; literatürlerde p-alkil fenolden oluşan dört üyeli halkalı tetramer yapıdaki kaliksaren, sistematik olarak 5,11,17,23-tetra-alkil-25,26,27,28-tetra-hidroksi kaliks[4]aren şeklinde isimlendirilir) Gutsche bu bileşikleri daha pratik bir yoldan isimlendirerek IUPAC"a kabul ettirmiştir.

Kaliks[n]aren terimindeki, “kaliks(chalice)” yunanca taç, aren de organik kimyada aromatik halkayı ifade ettiğinden Gutsche bunları “kaliks[n]aren” olarak isimlendirmiştir. Bileşikteki “n’’ ise fenolik birimlerin sayısını yani makrosiklik bileşiğin büyüklüğünü gösterir (Akceylan, 2004). (Şekil 1.3).

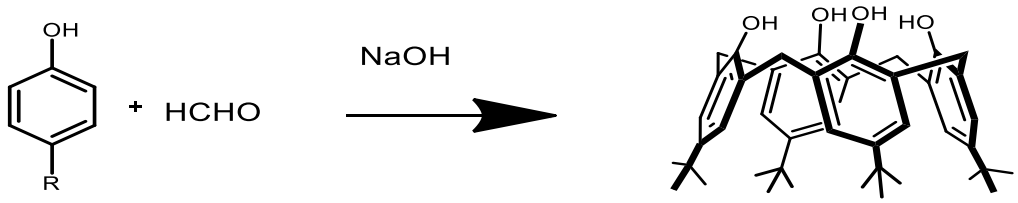


Şekil 1.3 Kaliks[4]aren, kaliks[6]aren ve kaliks[8]arenlerin yapıları ve numaralandırılması

1.1.3. *p-ter*-Bütil Kaliks[n]arenlerin Sentezi

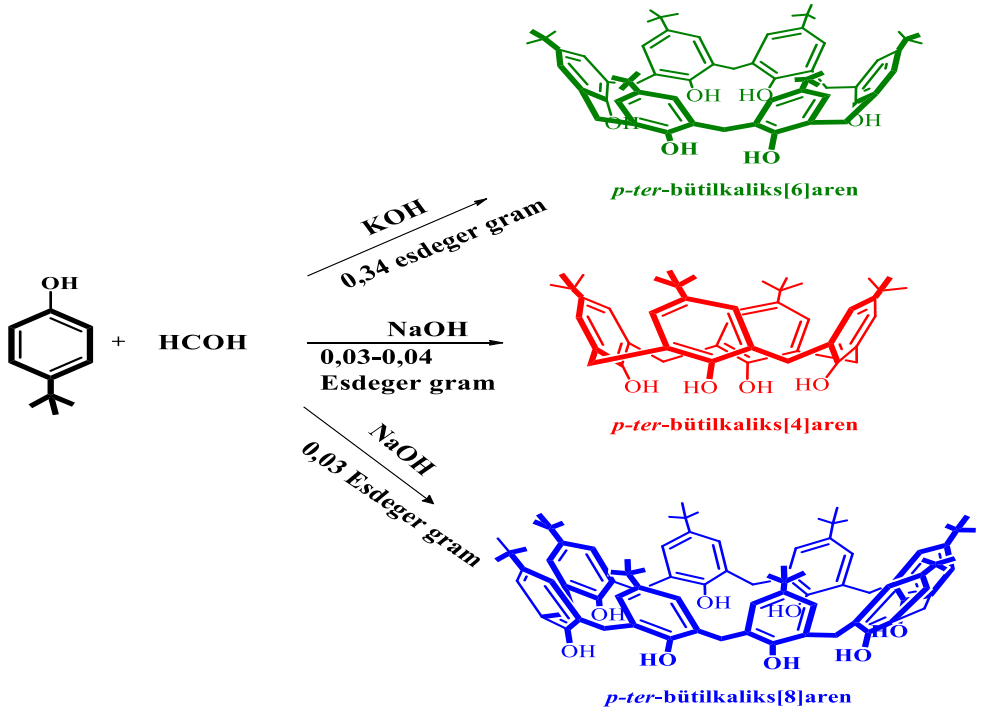
Kaliks[n]arenler konuk moleküller olduklarından konuk-konak kimyasındaki yeri oldukça önemlidir. Literatürlerde tetramer, hegzamer, oktamer halindeki kaliks[n]arenler ve türevleri üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır. Kolay, tek basamakta ve yüksek verimde sentezlenebilmeleri bu çalışmalarda birçok avantaj sağlamaktadır (Aksoy, 2011).

Zinke ve Ziegler p-ter bütil kaliks[4]aren sentezi ile ilgili bir prosedür bulmuş ve Gutsche bu prosedürü geliştirerek sentezi daha kolay hale getirmiştir. Bu metoda göre p-ter bütil fenol, %37 lik formaldehit ve fenole eşdeğer sodyum hidroksit karışımı 110-120 ^{0}C da 2 saat ısıtılır. Oluşan ilk ürün koyu sarı renkte olup difenil eter ilave edilerek geri soğutucu altında 2 saat kaynatılarak halkalaşma işlemi tamamlanır. Son karışım oda sıcaklığına getirilip etil asetat eklenir ve en az 1 saat karıştırılır. Karıştırma sonunda süzülürek önce etil asetat ile sonra asetik asit ile yıkanır. Son olarak su ile pH ı nötr olana kadar yıkanır. Kristallendirme işlemi sonunda erime noktası 342-344 ^{0}C olan parlak beyaz bir madde elde edilmiş olunur.



1. R = *ter*-Butil

Şekil.1.4. *p-ter*-bütilkaliks[4]aren'in sentezi



Şekil 1.5. *p-ter*-Bütilkaliks[4]aren, *p-ter*-bütilkaliks[6]aren ve *p-ter*-bütilkaliks[8]arenlerin yapıları

1.1.4. *p-ter*-Bütilkaliks[n]arenlerin Sentezini Etkiyen Faktörler

Kaliksarenlerin sentezi için gerekli olan ortam şartları uzun yıllar süren çalışmalar ile incelenmiş sıcaklığın, çözücünün, kullanılan bazın ve farklı miktarlarının sentez üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Çözücü Etkisi : Apolar çözücüler (ksilen, difenileter, tetralin) kaliksaren oluşumu için daha çok tercih edilirken, polar çözücüler (kinolin) ise kaliksaren oluşumunu inhibe ettiği için kullanılmamaktadır.

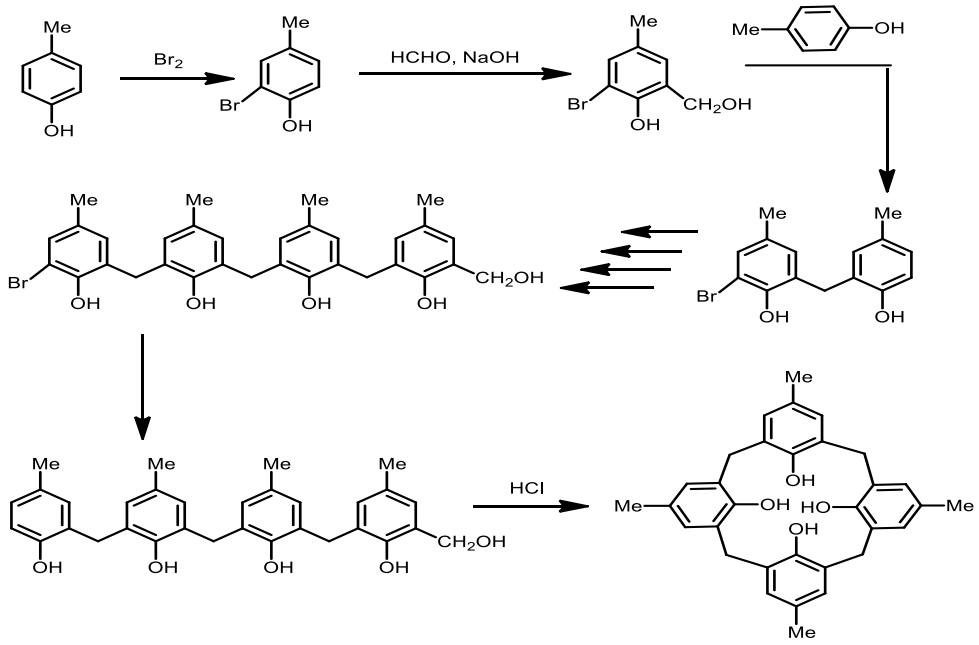
Sıcaklık Etkisi : Siklik oktamer ve hekzamer için düşük sıcaklık tercih edilirken (~140 ^{0}C), siklik tetramer için yüksek sıcaklık gereklidir (~256 ^{0}C).

Baz Etkisi : *p-ter*-Bütilkaliks[4]aren'in sentezinde baz miktarı oldukça önemlidir. Bazın konsantrasyonu ürün verimini ve sentezlenecek oligomerin cinsini etkilemektedir. Halkalı oktamer ve tetramerin eldesinde katalitik miktarda baz kullanılırken halkalı hekzamer eldesinde ise stokiyometrik oranda baz kullanılmalıdır (Gutsche, 1981, 1984; Dhawan, 1987).

Tetramer, hekzamer ve oktamerin sentezinde kullanılan bazın miktarı kadar türü de önemlidir. Bu nedenle kaliks[n]arenlerin sentezi için farklı alkali metal hidroksitleri kullanılmıştır. Halkalı hekzamer sentezinde RbOH veya CsOH kullanıldığında çok yüksek verim elde edilirken halkalı tetramer ve oktamer sentezinde ise LiOH veya NaOH kullanıldığında yüksek verim elde edilmiştir. Kullanılan bazın seçiminde alkali metal katyonlarının iyon çapları göz önüne alınmıştır. Bu kaliksarenler üzerinde bulunan oksijen atomları arasındaki mesafenin ölçülmesi ile açıklanmaya çalışılmıştır. . Bu durum 'template etki' ile açıklanmaktadır (Gutsche, 1990).

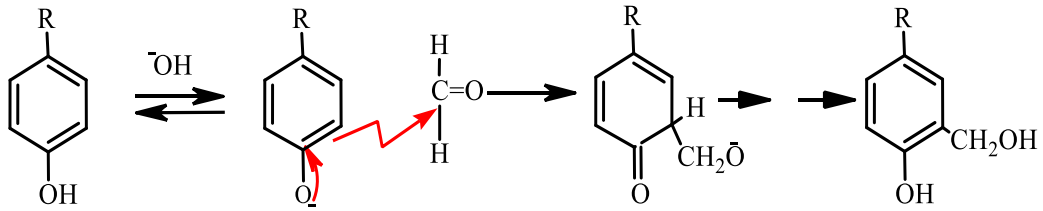
1.1.5. Kaliks[4]arenlerin Elde Edilişi ve Reaksiyon Mekanizması

Kaliksarenlerin çok basamaklı eldesi ilk olarak Hayes ve Hunter tarafından gerçekleştirildi. Bu metodda çıkış maddesi *p*-kresolün orto köşelerinden biri bromla korundu. Sonrasında hidroksimetilleme ve arilleme ile lineer tetramer elde edildi. Oluşan lineer yapıdaki tetramere hidrojenleme ve debrominasyon işlemleri ile seyreltik asidik ortamındaki halkalaşma reaksiyonu sonucunda *p-metil*- kaliks[4]aren elde edildi. Bu metot verimin çok düşük olması ve uzun zaman alması nedeniyle tercih edilmemiştir.

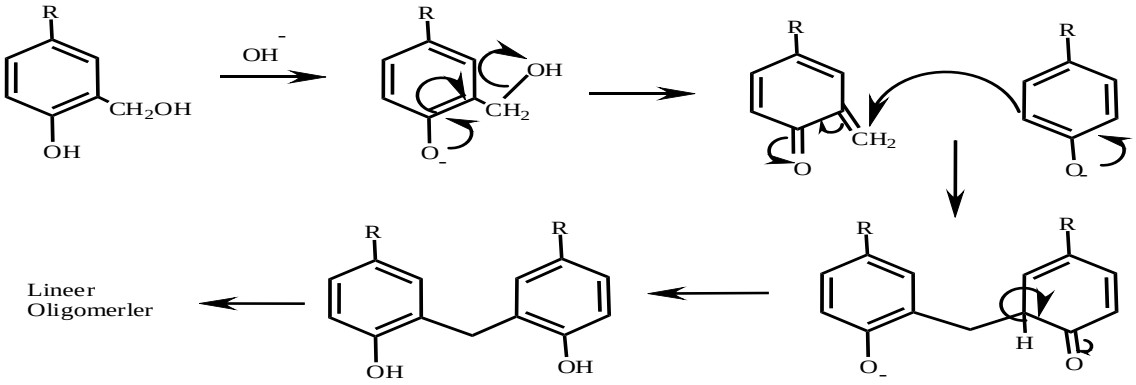


Şekil 1.6. Kaliks[4]arenin çok basamaklı sentezi

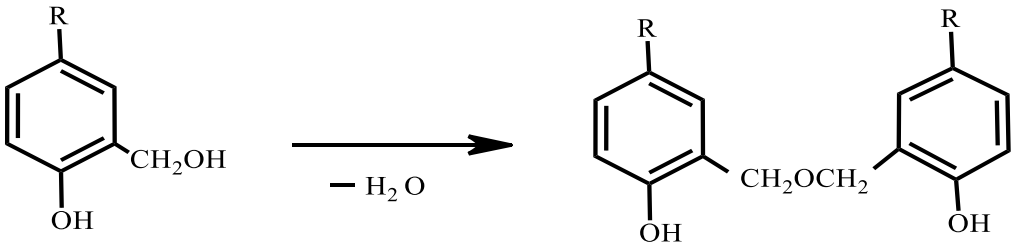
Fenol-formaldehit oligomeri olan kaliksarenlerin baz katalizli reaksiyon mekanizması yıllardır çalışma konusu olmuştur. Mekanizmanın ilk aşaması bazın etkisiyle bir karbon nükleofili olarak rol oynayan fenoksit iyonunun oluşmasıdır. Etkin hale gelen bu nükleofil formaldehitin karbonil karbonu ile kolaylıkla reaksiyona girer.



Uygun koşullar altında reaksiyon bu basamakta durdurulur ya da hidroksimetil fenoller izole edilip karakterize edilebilir (Gutsche 1989). Biraz daha iyi şartlarda ise reaksiyon, muhtemelen Michael prosesindeki gibi fenolat iyonları ile o-kinonmetit ara ürünlerinin reaksiyona girmesi sonucu diarilmetil bileşiklerinin oluşması şeklinde ilerler;



Bütün oligomerlerin oluşumunda o-kinonmetitler ara ürün olmaktadır (Gutsche, 1989). Diarilmetanların yerine dibenzil eterlerin dehidratasyonla oluşum reaksiyonu da hidroksimetil fenollerin diğer bir reaksiyonudur. Bundan dolayı meydana gelen kaliksarenler karışımı oligomerizasyonun farklı aşamalarında oluşan difenil metan türü ve dibenzil eter türü bileşikleri içermektedir (Dhawan, 1987).



1.1.6. Kaliks[4]arenlerin Konformasyonları

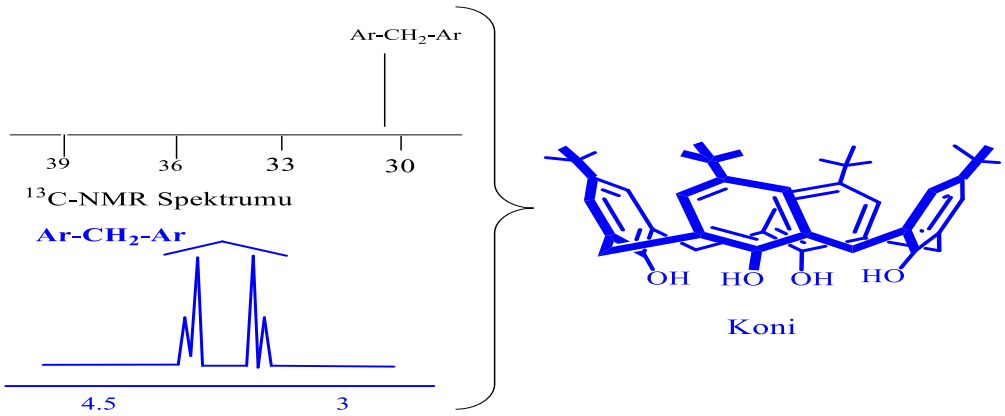
Substitue olmamış kaliksarenler oda sıcaklığında ve çözelti içerisinde hareketli bir konformasyona sahiptir. Fenolik halkaların çözücü, kullanılan baz ve ortamın sıcaklığına bağlı olarak yönlenmesiyle konformasyon değişiklikleri meydana gelmektedir. Bu konformasyon farklılığında fenolik birimler farklı olarak iki şekilde dönme hareketi yaparlar. Bu hareketlerden birisi *p*-substitüentli kısmının diğeri ise fenolik birimlerin oksijenli kısmının halkaya doğru yönlenmeleridir.

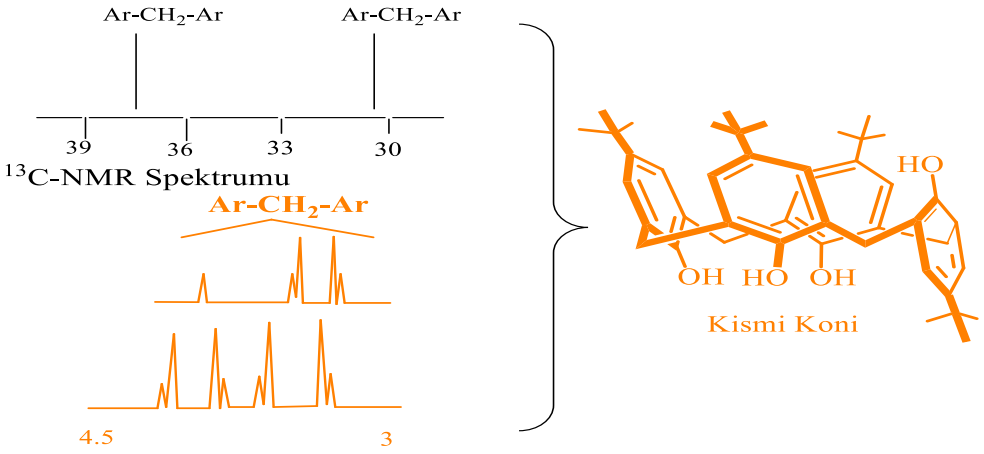
Kaliks[4]arenler, 4 farklı konformasyonu aril halkalarının "aşağı" ve "yukarı" doğru yönlenmeleri sonucu gerçekleştirirler. Bunlar "koni", "kısmi koni" , "1-2 karşılıklı" ve "1-3 karşılıklı" olarak isimlendirilirler. Bir kaliks[4]arenin hangi

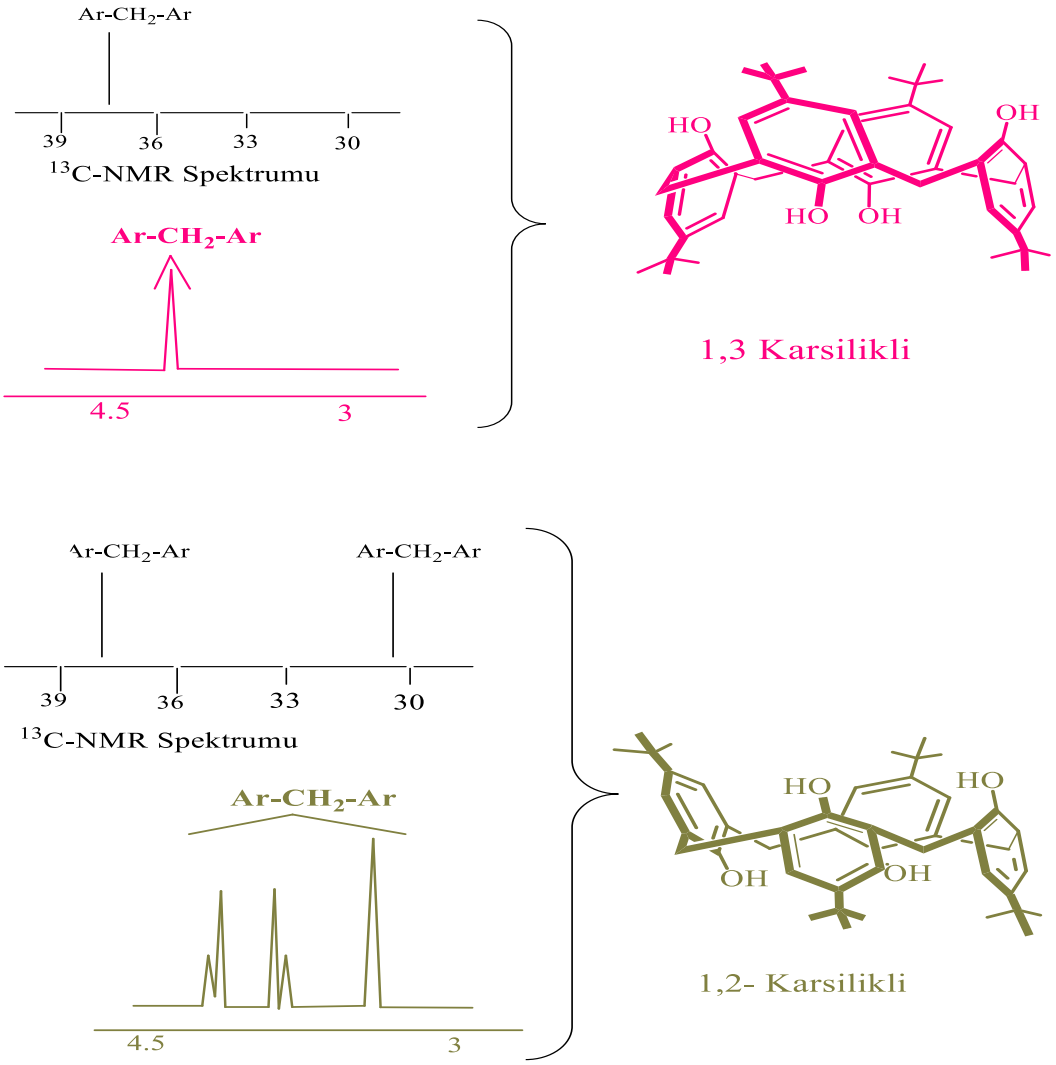
konformasyonda olduğu bu bileşiğin köprü Ar-CH_2–Ar protonlarının ^{1}H NMR spektrumlarından tespit edilebilir (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Kaliks[4]aren' in Ar-CH_2-Ar protanlarının ^{1}H NMR spektrumları

Konformasyon	**Ar-CH_2-Ar protonları**
Koni	Bir çift dublet
Kısmi Koni	İki çift dublet (1:1) veya bir çift dublet ve bir singlet (1:1)
1,2-Karşılıklı	Bir singlet ve iki dublet (1:1)
1,3-Karşılıklı	Bir singlet







Şekil 1.7. *p-ter*-Bütilkaliks[4]arenin dört farklı karakteristik konformasyonları ve ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR spektrumları.

Aromatik halka arasında bulunan metilen hidrojenleri yüksek sıcaklıklarda singlet pik verirken düşük sıcaklıklarda bir çift dublet verir. Bu durum sıcaklığın değişmesiyle kaliks[4]arenlerin konformasyonlarınında değiştiğini göstermektedir. Genellikle sübstitüe olmamış kaliksarenler oda sıcaklığında ve çözelti içerisinde hareketli bir konformasyona sahiptirler (Gutsche, 1989). Konformasyonel ara dönüşümün azaltılması için başlıca iki yol vardır.

a) Fenolik-O' den ve *p*-pozisyonundan büyük hacimli gruplar bağlamak

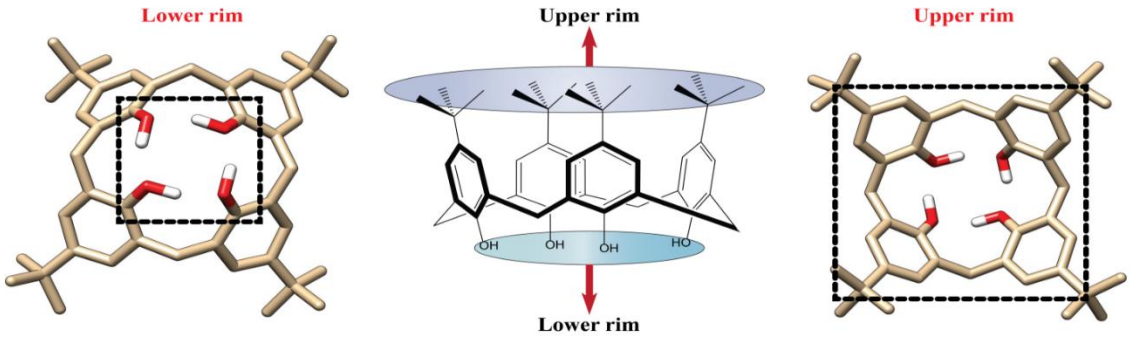
b) Her bir aril halkasına molekül içi köprüler kurmak (Takeshita, 1995).

Çözücüler, sübstitüentler kadar konformasyonlar arasındaki dönüşüme de etki edeler. Kloroform, toluen, brombenzen ve karbondisülfür gibi çözücüler kaliksarenlerle kompleks oluşturarak konformasyon dönüşüm serbest enerjisini yükseltir. Aseton ve asetonitril gibi çözücülerin piridinin molekül içi hidrojen bağlarını bozması sebebiyle konformasyon dönüşümüne etkisinin büyük olduğu düşünülmektedir (Gutsche, 1981).

1.1.7. Kaliks[4]arenlerin Fonksiyonlandırılması

Kaliksarenlerin sentez aşamasında ve sonrasında kolaylıkla modifikasyona uğratılabilmeleri halkalı yapıdaki taç eterlere ve siklodektrinlere göre daha önemli hale getiren bir özellikleridir.

p-ter-butil kaliks[4]arenlerin bir çok organik çözücüdeki çözünürlüğü azdır. Bu nedenle *p-ter*-butil kaliks[4]arenler istenilen amaca yönelik olabilmeleri için fenil halkasının para konumundan (upper rim) veya fenolik oksijen (lower rim) üzerinden fonksiyonlandırılırlar (Şekil 1.10). Böylelikle çözünürlükleri, özellikleri ve uygulama alanları artırılmış olur.

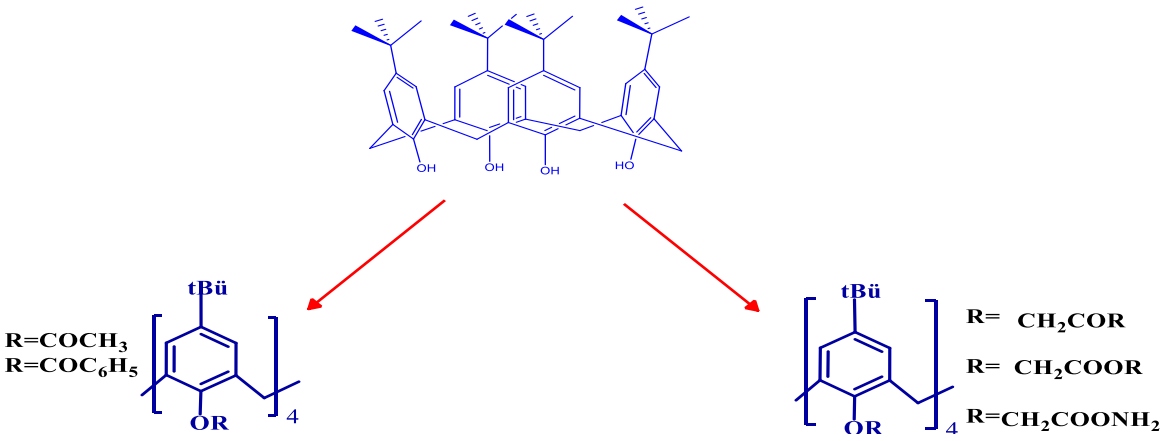


Şekil 1.8. Kaliks[4]arenin *p*-konumunun ve fenolik O- bölgesinin şematik gösterimi

1.1.7.1. Kaliksarenlerin fenolik-OH üzerinden fonksiyonlandırılması

p-ter-butil kaliks[4]arenler fenolik hidroksil gruplarına (lower rim) eter, ester, keton, fosfon, imin ve oksim gruplarının bağlanmasıyla fonksiyonlandırılmaktadır

(Yilmaz, 1999; Ting, 1990; Cameron, 1995). Kaliksarenlerin fenolik hidroksil gruplarının esterleşme ve eterleşme reaksiyonları oldukça yaygındır. Oluşan *p-ter*-butil kaliks[4]aren türevleri daha düşük erime noktasına ve daha fazla çözünürlüğe sahip olmalarından dolayı üzerinde çok çalışılmasına sebep olmuştur. Ayrıca konformasyonları hareketli olan kaliksarenler bu grupların bağlanması ile kolaylıkla rijit (hareketsiz) yapılar oluşturulabilir.



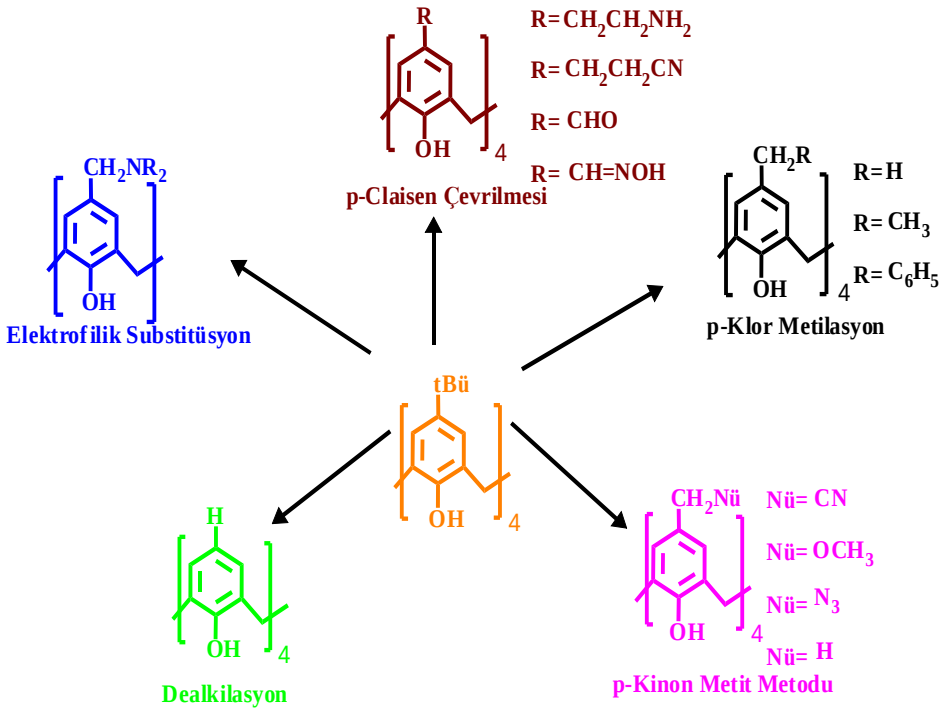
Şekil 1.9. Kaliks[4]arenlerin fenolik –OH den fonksiyonlandırılması

1.1.7.2.Kaliksarenlerin *para*-pozisyonlarından fonksiyonlandırılması

Fenil halkalarına bağlı *tert*-bütil gruplarının Friedel-Crafts dealkilasyonu ile $AlCl_3$'ün toluen içerisinde katalizör olarak kullanılmasıyla kolayca giderilir. Böylece kaliksarenlerin *p*-pozisyonuna elektrofilik substitusyon reaksiyonu ile çok sayıda farklı fonksiyonel grupların bağlanabilmesine olanak sağlanmış olunur. Kaliks[4]arenlerin *p*-pozisyonu üzerinden modifiye çalışmaları bromlama, iyotlama, nitrolama, sülfolama, klorsülfolama, klormetilleme, açilleme, diazolama ve formülasyon gibi elektrofilik "kinon-metit" tipi substitüsyon reaksiyonlarıdır (Erdemir, 2006). Kaliks[4]arenin formaldehit ve uygun bir sekonder aminle (Mannich Reaksiyonu) aminometilasyonu ve daha sonra metil iyodür ile kuaternizasyonu sonucu kuaterner amonyum bileşiği elde edilir (Gutsche ve Nam 1988). Bu bileşik düşünülen reaksiyonlar için başlangıç

maddesi olabilecek nükleofil ile *p-ter*-tetrakis(siyanometil) kaliksarenler reaksiyona sokulur. Kaliks[4]arenin alil eterlerinin *p*-Claisen çevrilmesi metodu, fenolik grupların *p*-pozisyonuna fonksiyonel grupların transferinin gerçekleştiği bir başka metottur (Gutsche 1985).

Kaliks[4]arenin kontrollü olarak nitrolama, formilasyon, iyotlama ve aminometilleme gibi kısmi substitüsyon reaksiyonlarıda gerçekleştirilmiştir. Farklı olarak *o*-alkilli, *o*-açilli kaliks[4]arenlerin *ter*-bütil grupları istemli olarak giderilmiş ve para pozisyonlarından seçimli olarak modifiye edilebilmiştir (See, 1991; Kanamathareddy, 1995; Sharma, 1996). Ayrıca fenolik grupların *p*-pozisyonunda (upper rim) iki veya daha fazla fonksiyonel grup bulunduran kaliksarenlerin sentezi için birtakım metotlar geliştirilmiştir (Gutsche, 1989; Böhmer, 1995; Erdemir, 2006). (Şekil 1.10).



Şekil 1.10. Kaliksarenlerin para-pozisyonlarından fonksiyonlandırılması

1.1.8. Kaliksarenlerin Kullanım Alanları

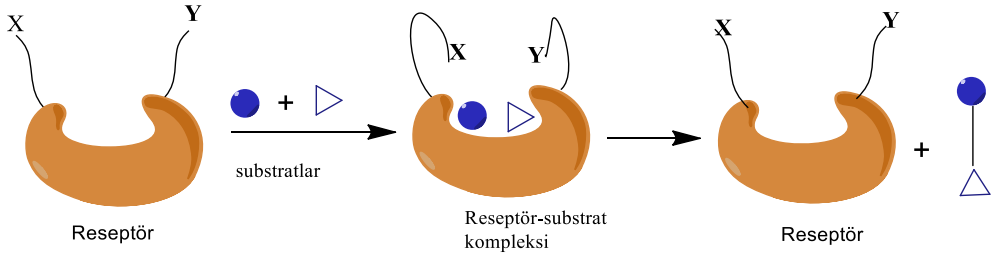
- ✓ Enzim-mimik olarak kaliksarenler
- ✓ Molekül / iyon taşıyıcı olarak kaliksarenlerin kullanımı
- ✓ Kromotografik uygulamalarda kaliksarenler
- ✓ Kaliksarenlerin sensör (iyon seçici elektrot, ISE) ve membran tekniklerinde kullanılması
- ✓ Katalizör çalışmalarında kaliksarenler
- ✓ Enzim immobilizasyonunda kaliksarenlerin kullanılması

a. Enzim-mimik olarak kaliksarenler

Kaliksarenler enzim mimik özellik gösterebilecek şekilde uygun gruplarla fonksiyonlandırılırsa enzimin aktif bölgesini oluşturarak substratların katalitik olarak ürünlere dönüşmesini sağlayabilir.

Boşluklu yapıya sahip olan kaliksarenlerin bu şekilde potansiyel enzim mimik olarak kullanılabileceğini ilk olarak Gutsche önermiştir (Gutsche 1989). Guest türlerinin sentetik hostlar tarafından moleküler tanınması üzerine yapılan yaygın çalışmalar biyo(in)organik kimyacıları enzimlerin aktif bölgesini mimik eden katalizörler tasarlamaya teşvik etmiştir.

Enzim mimik yapının temel hedefi enzimin aktif bölgelerine sahip kaliksaren bazlı sentetik bir model oluşturmaktır. Bu model, substratlar için taşıdığı fonksiyonel gruplar sayesinde substratlarla onları ürünlere katalitik olarak dönüştürmek için etkileşim kurar (Breslow, 1995). (Şekil 1.11).

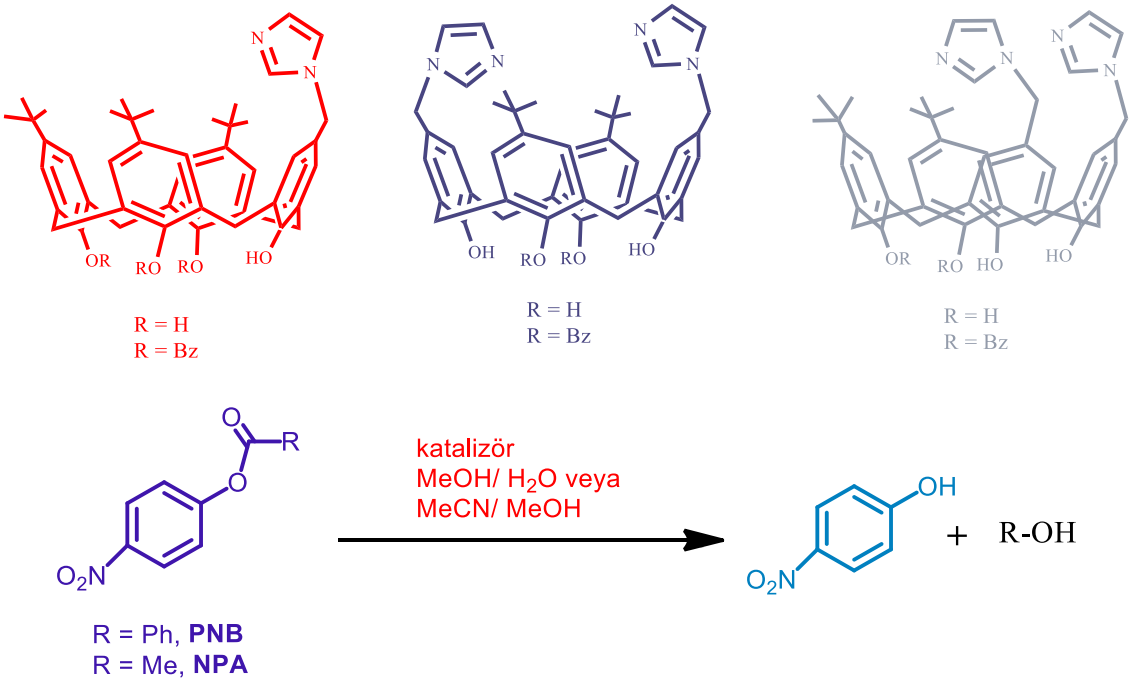


Şekil 1.11. Fonksiyonlaştırılmış kaliksarenler üzerinde enzim modellerinin şematik gösterimi

Biyolojik çalışmalar için uygun model veya mimiğin tasarlanabilmesi için araştırmacılar tarafından birçok çalışma yapılmıştır. Bunlar tasarlanırken belli başlı özellikleri bulundurması istenir. Bunlar:

- Uygun büyüklüğe, şekle ve boşluğa sahip olmaları.
- Reaktif bağlanma bölgelerinin bulunması.
- Dallar ve köprülerin bulunması.

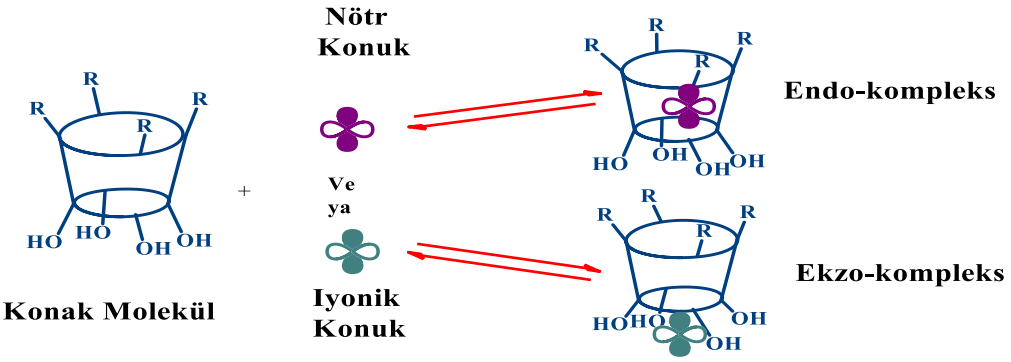
Dospil ve Schatz (2001), *p*-konumundaki farklı pozisyonlarda imidazol grupları taşıyan kaliks[4]arenler sentezlemişlerdir. Bunların tampon çözeltilerde *p*-nitrofenil esterlerden *p*-nitrofenolü açığa çıkaran enzim gibi davrandıkları görülmüştür (Şekil 1.12).



Şekil 1.12. *p*-Konumunda farklı şekillerde imidazol grubu taşıyan kaliks[4]arenler

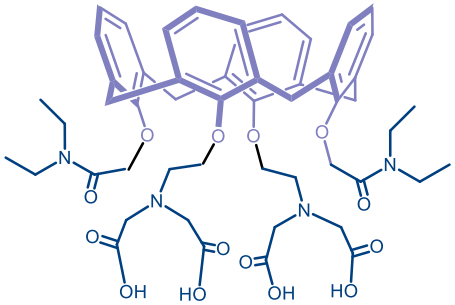
b. Molekül / iyon taşıyıcı olarak kaliksarenlerin kullanımı

Kaliksarenlerin en önemli özelliklerinden birisi de farklı konformasyonları ve yapılarında bulunan halka boşluğunun olmasıdır. Bu özellikleri sayesinde hem katı fazda hem de çözeltide katyon, anyon ve nötral bileşiklerle kompleks yapabilmektedirler. Bu kompleksler endo- ve ekzo- kompleksler şeklindedir. Bu nedenle molekül ve iyon taşıma aracı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.



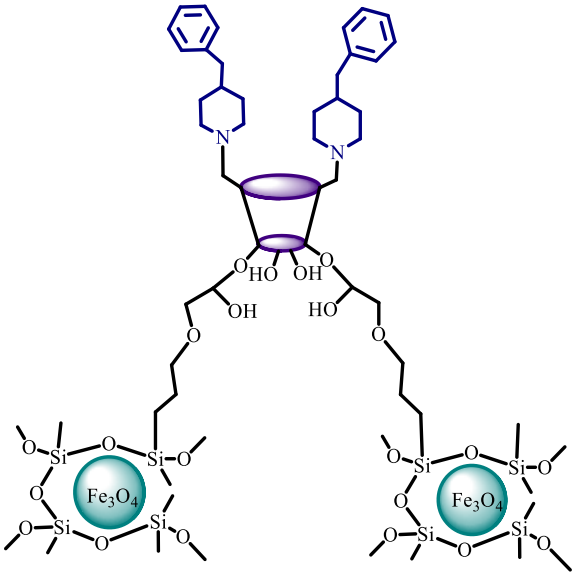
Şekil 1.13. Türevlendirilmiş kaliksarenler üzerinde iyon/molekül modellerinin şematik Gösterimi

Botta, Casnati ve arkadaşları (2001), kaliks [4]arenin diamit tetraasit türevini sentezlemişler ve Gd^{+3} metal kompleksini hazırlamışlardır. Daha sonra bu bileşiğin insan serum albuminiyle bağlayıcı etkisini incelemişlerdir



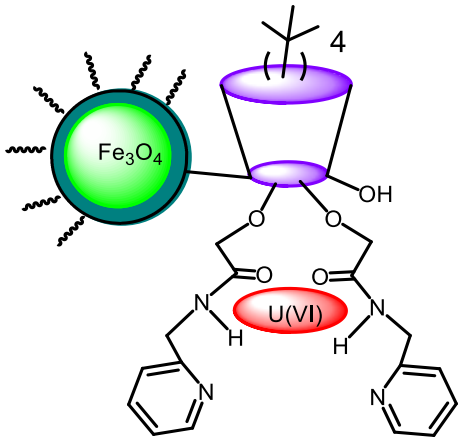
Şekil 1.14. Kaliks[4]aren diamit tetraasit türevinin Gd(III) atomu ile kompleksleşme çalışması

Sayin ve ark. (2010), kaliks[4]aren ile 4-benzil piperdini mannich reaksiyonu sonucunda türevlendirerek Fe_3O_4 manyetik nanoparçacıklarına immobilize etmişlerdir. Elde edilen kaliks[4]aren türevli bu manyetik nanoparçacıkları arsenat ve dikromat anyonlarının sulu çözeltilerden uzaklaştırılmasında kullanmışlardır (Şekil 1.15).



Şekil 1.15. Mannich tepkimesiyle oluşturulan kaliks[4]arenin manyetik parçacığa immobilizasyonu

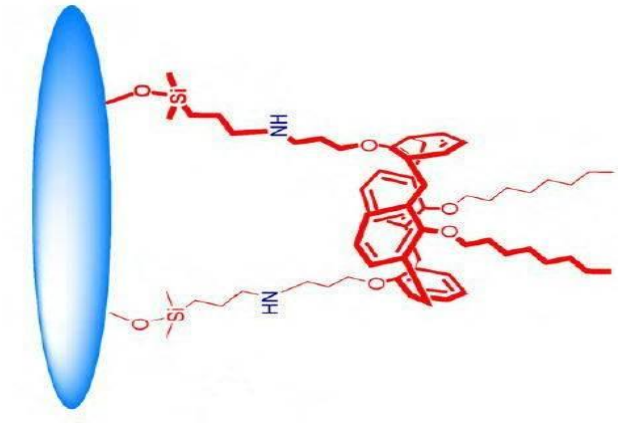
Sayin ve ark. (2011), bu çalışmada *p-ter*-bütilkaliks[4]arenin diamit türevlerini sentezleyerek Fe_3O_4 manyetik nanopartiküllerine immobilize etmişlerdir. Elde edilen materyaller sıvı-sıvı ekstraksiyon ve katı-sıvı ekstraksiyon ile sulu çözeltilerden uranil katyonlarının uzaklaştırmasını incelemişlerdir. Uranil iyonlarını uzaklaştırmada manyetik nanopartiküllerin kaliks[4]aren türevlerinden daha iyi olduğunu gözlemlemişlerdir (Şekil 1.16).



Şekil 1.16. Uranil (VI) ekstraksiyonunda kullanılan manyetik nanopartiküle bağlı kaliks[4]aren bileşiği

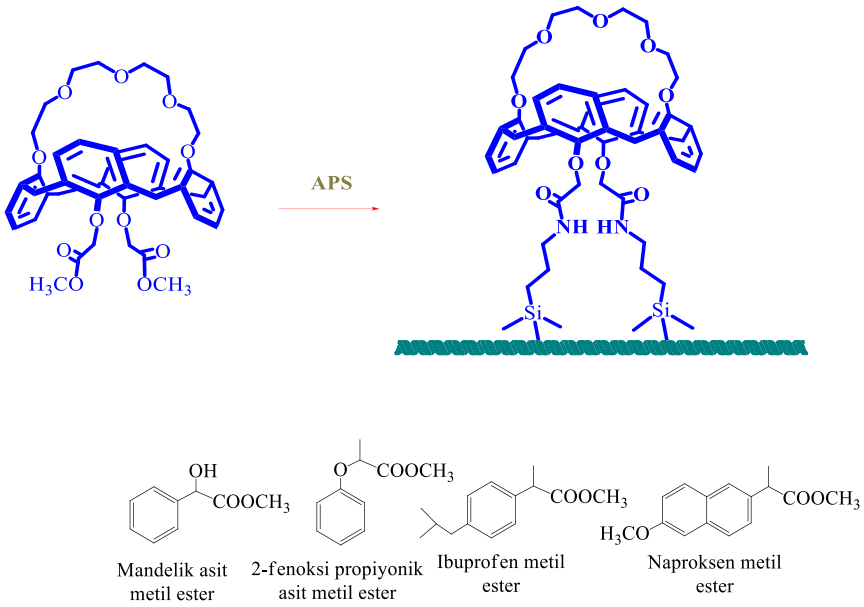
c. Kromatografik Uygulamalarda Kaliksarenler

Xu ve ark. (1998) yaptıları bu çalışmada silikajele *p-ter*-bütil kaliks[6]aren bağlayarak (Şekil 1.17) yüksek performanslı sıvı kromotografisinde (HPLC) sabit faz olarak kullanmışlardır. Hareketli faz olarak metanol/su karışımı kullanarak *o,m,p*-nitroanilin, *o,m,p*-nitrofenol ve polisiklik aromatik hidrokarbonların ayrılmasını incelemişlerdir.



Şekil 1.17 Diamin dioktil türevli kaliks[4]aren

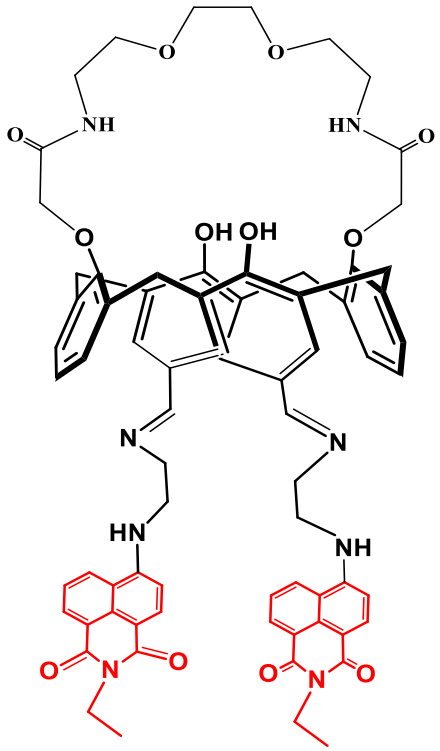
Erdemir ve Yilmaz (2011), kaliks[4]crown-5 makrosiklik bileşiğine silika bağlayarak sabit faz hazırlamışlardır. Hazırladıkları sabit fazı ilaçların ayrımı, aromatik aminler ve fenoller için kromotografik olarak ayırmda amaçlı kullanmışlar. Sonuç olarak bazı aromatik aminler, fenoller ve ilaçların hazırlanan kaliksaren bazlı sabit faz ile başarılı bir şekilde ayrıldığını tespit etmişlerdir (Şekil 1.18).



Şekil 1.18. İlaçları ayırmada kullanılan kaliks[4]crown-5 bileşiği bağlanmış silika sabit fazı

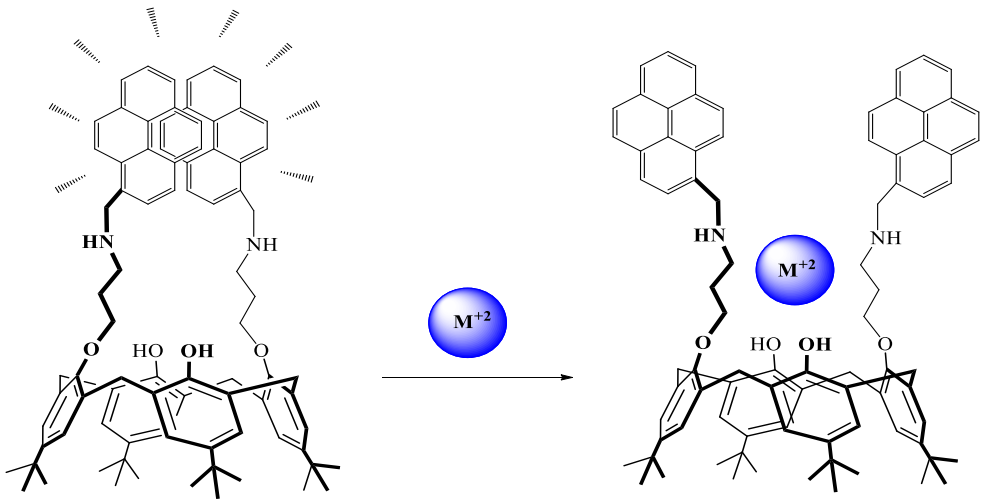
d. Kaliksarenlerin sensör (iyon seçici elektrot, ISE) ve membran tekniklerinde kullanılması

Şahin ve Yilmaz (2012), bir dizi seçilmiş metal iyonları arasından Cu^{+2} iyonu için oldukça yüksek seçiciliğe sahip yeni bir kaliks[4]aren naftilamit türevi sentezledi. Elde edilen bu bileşiğin floresans özelliği UV, NMR ve floresans spektroskopi teknikleri kullanılarak farklı metal iyonlar ve bazı anyonlar arasında incelendi ve Cu^{+2} iyonuna karşı oldukça yüksek seçicilik gösterdiği bildirildi.



Şekil 1.19. Cu^{+2} iyonu için floresans özeellik gösteren kaliks[4]aren naftilamit türevi

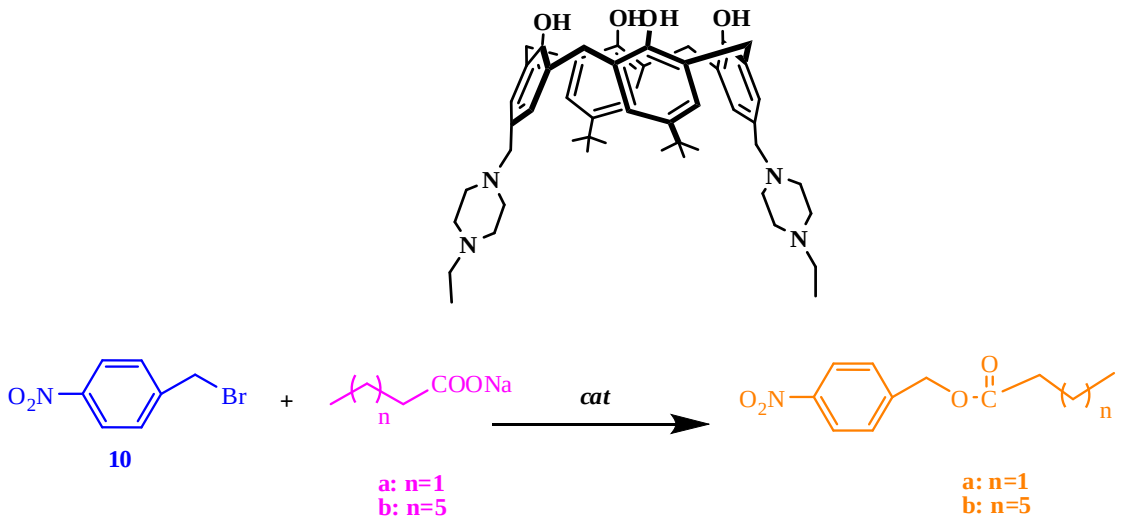
Başka bir çalışmalarında Sahin ve Yilmaz (2011), fenolik-O'nin 1,3 pozisyonunda piren grubu taşıyan florojenik *p-ter*-bütilkaliks[4]aren bileşiğini sentezlemişlerdir. Kaliks[4]arenin piren amin türevlerinin, sırasıyla Pb^{+2} ve Cu^{+2} iyonları için seçimli bir sensör olarak rol oynadığını bulmuşlardır (Şekil 1.20).



Şekil 1.20. Pb^{+2} ve Cu^{+2} iyonu için sensör özellikteki kaliks[4]aren bileşiği

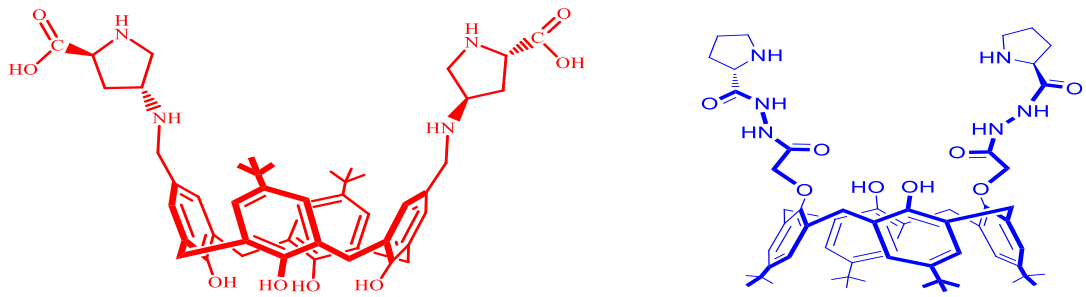
e. Katalizör çalışmalarında kaliksarenlerin kullanılması

Akceylan ve Yilmaz (2011), yaptıkları çalışmada faz transfer katalizörü olarak kullanmak için kaliks[4]arenin N-etilpiperazin, diallilamin ve 4-benzilpiperidin türevlerini sentezlemişlerdir. Kaliksar[4]arenin N-etilpiperazin türevini katalizör olarak esterleşme reaksiyonunda kullanmışlardır (Şekil 1.21).



Şekil 1.21. Esterleşme reaksiyonunda kaliks(4)arenin katalizör olarak kullanılması

Yılmaz ve ark. (2014), kaliks[4]areni hem –O bölgesinden hem de fenolik birimmlerin para konumundan L-pirolin ile fonksiyonlandırdıktan sonra kiral aldol tepkimelerinde kullandılar. Yapılan çalışmada sentezlenen bu iki kiral kaliksaren türevinin sulu çözeltide hem enantiyoseçimlilik hem de diastereoseçimlilik gösterdiğini gözlemlediler.



Şekil 1.22. L-prolin türevli kaliks[4]arenin organokatalizör olarak kullanılması

1.2. Enzimler ve Genel Özellikleri

Enzimler, canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran, yan ürün olmadan tepkimenin yüksek verimle gerçekleşmesini sağlayan protein yapılı biyokimyasal katalizörlerdir. Kimyasal katalizörlere oranla enerji ihtiyacını azaltırlar ve 10^8-10^{10} kat daha hızlı katalizlerler (Keha, 2004). Düşük sıcaklık (genellikle 20-40 ^oC), sulu çözeltilerde ılımlı koşullar ve atmosfer basıncı altında reaksiyonları katalizleme özelliğine sahiptirler. Organizmadaki organik moleküllerin yapımı, yıkımı, kas hareketleri ve solunum gibi fizyolojik olaylar enzimlerin yardımıyla yürütülmektedir. Enzim proteinleri genler tarafından şifrelenir. Dolayısıyla amino asit dizilimi kendine özgüdür. Bazı enzimler sadece proteinden oluşmuşken çoğunluğunda protein kısmına organik veya anorganik moleküllerin bağlanmasıyla oluşmuş protein yapı gözlenir. Protein kısım; "Apoenzim" olarak adlandırılırken enzimin hangi maddeye etki edeceğini saptar. Diğer kısım ise enzimin etkinlik göstermesi için ihtiyaç duyduğu organik veya anorganik moleküllerden meydana gelmiş, protein kısmından daha küçük olan "koenzim" kısmıdır. Enzimde işlev gören ve esas iş yapan kısımdır. Koenzim kısmı genellikle protein kısmından ayrılabilir ve bünyesinde birçok vitamin bulundurduğu tespit edilmiştir. Yan grup olarak metal iyonları kullanılıyorsa "kofaktör" olarak adandırılır (Telefoncu, 1997). Koenzim ve kofaktörler, enzimatik reaksiyonlarda elektron alış verişini sağlayıp dengenin daha hızlı kurulmasında etkindir. Apoenzim ile koenzim kısmın birbirlerine kovalent bağla bağlanmasıyla "Holoenzim" oluşmaktadır. Bu durumda apoenzimle koenzimin yalnız başlarına etkin olmadıklarını anlayabiliriz.

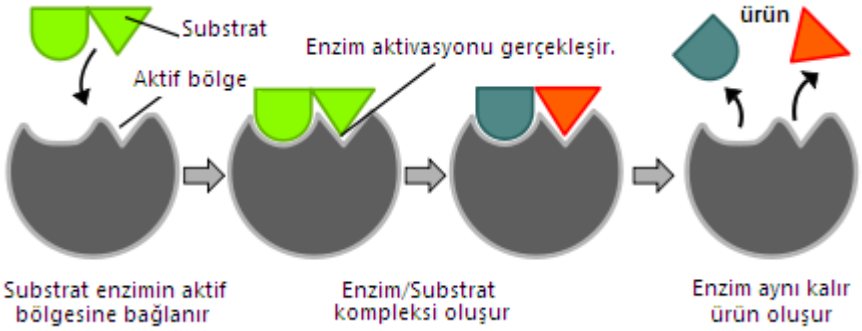
Biyokatalizörlerin 10^{-3}-10^{-4} derişiminde göstermiş olduğu katalitik etkiyi kimyasal katalizörler genellikle % 0,1–10 derişim aralığında gösterirler. (Tiryaki, 1993; Kennedy, 1995; Faber, 2000; Bakkal, 2006; Etci, 2011).

Enzimler sadece canlı ortamlarda etkinlik göstermez canlı olmayan ortamlarda da aktif olarak işlev gerçekleştirirler. Bu durum canlı olmayan ortamlarda da enzimlerin kullanılmasını sağlamıştır. Böylelikle enzimlerden endüstride birçok yerde faydalanılmış, birçok proseste kullanımı yaygınlaşmıştır.

Çizelge 1.2. Enzimlerin Kullanım Alanları (Telefoncu, 1997)

Enzim	Kullanım alanı
Penisilin amidaz, oksidaz	Eczacılıkta
Kolesterol oksidaz	Tıp' ta kolesterol tayininde
Proteazlar, lipaz, amilaz	Deterjan sanayinde
Redüktaz, amilaz, fosfataz, oksidazlar	Analitik amaçlı analizlerde
Laktaz, mikrobiyal proteazlar	Süt ve süt ürünleri endüstrisinde
Katalaz, amilaz	Tekstil sanayinde
Pektinaz, selülaz, limonaz	Meyve suyu sanayinde
Proteaz, lipaz	Deri sanayinde
Amilaz, glukoz izomeraz	Nişasta endüstrisinde
Ksilenaz	Kağıt endüstrisinde
Amilaz, amiloglikozidaz, pentosanaz	Ekmek sanayinde
Papain, katalaz	Et sanayinde
Termolizin	Aspartam üretiminde

Enzimlerin katalizör görevi yaptığı ve spesifik olarak etki ettiği madde veya madde karışımına "substrat" denir. Her substrat veya substrat grubunun özel bir enzimi vardır. Substrat grubu ve enzim ile ilk olarak kararlılığı düşük olan enzim-substrat ara kompleksi oluşur. Bu ara ürün tepkimenin gerçekleşmesi için gerekli olan enerjiye sahipse tepkime gerçekleşir. Tepkimenin gerçekleşmesi için gerekli olan bu minimum enerjiye "Aktivasyon Enerjisi" denir. Aktivasyon enerjisi ne kadar küçükse tepkime o kadar hızlıdır. Ve enzimler tepkimenin aktivasyon enerjisini düşürmede etkindirler. Ayrıca substrat yüzeyi enzimin aktifliğini artırır. Enzimler sulu ortamda etkinlik gösterirler, hücre içinde üretilmelerine rağmen hücre dışında da aktiftirler. Enzimatik reaksiyonların çoğu çift yönlüdür. Protein yapılarından dolayı proteinin etkilendiği faktörlerden etkilenirler. Enzimlerin üç boyutlu katlanmış protein moleküllerinden oluşan yapısı ve substrata oranla çok büyük molekül olmasına rağmen substrat moleküllerinin bağlanabildiği, asıl reaksiyonun gerçekleştiği yeri oldukça küçük bir bölgedir. Bu bölgeye enzimin "Aktif Bölgesi" denir. Aktif merkez ve bağlanma yerinin durumu anahtarın kilide uymasına benzer bir durumdur (Faber, 2000; Bakkal, 2006; Tüzün, 2002; Telefoncu, 1997).



Şekil 1.23. Enzim Substrat Anahtar- Kilit Uyumu

Aktif yerler bir şerit yarık, çatlak ya da oyuklardır ve kataliz için gerekli temel polar artıklarda ihtiva ederler. Yapıları bilinen enzimlerde substrat molekülleri yarık veya çatlaklara bağlanırlar. Aktif yerler bir enzimin total hacmine oranla çok küçük bir kısmını teşkil eder. Aktif merkezde, bir enzimin substrata yapıştığı bölge ve bir de kataliz olayının gerçekleştirildiği bölge (katalitik yer) olmak üzere 2 kısım bulunur. Bir enzimin amino asit artıklarının çoğu substratla temas halinde değildir. Birçok enzimde katalitik bölgede serin, sistin, histidin, tirozin ve lizin bulunur (Tüzün, 2002; Wolley,1994).

Enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonların hızını etkileyen faktörler bulunmaktadır. Hızı etkileyen faktörlerin başında pH, sıcaklık, zaman gelmektedir. Bunların dışında ışık ve diğer fiziksel faktörler, enzim konsatrasyonu, substrat konsantrasyonu, reaksiyon ürünleri, ortamda çeşitli iyonların varlığı, hormonların ve diğer biyokimyasal faktörlerin etkisi sayılabilir.

pH : Enzimin reaksiyon hızı, ortamın pH'ına da bağlıdır. Belirli bir pH alanında enzimin etkisi daha fazladır. Bir enzimin reaksiyonu en fazla hızlandırdığı pH'ya enzimin optimum pH'sı denir.

Sıcaklık: Enzimatik reaksiyonun hızı sıcaklık ile artar. Fakat belirli bir sıcaklık aşıldıktan sonra enzimler de diğer proteinler gibi denatüre olacağından etkilerini kaybederler. Her enzim için birim zamanda substratını en fazla değişikliğe uğrattığı belirli bir sıcaklık vardır. Bu sıcaklığa o enzimin optimum sıcaklığı denir. Hayvansal

enzimlerin çoğunun optimum sıcaklığı 40-50 ^{0}C arasındadır. Bitkisel kaynaklı enzimler daha yüksek sıcaklığa dayanıklıdır, optimum sıcaklıkları 50-60 ^{0}C arasındadır.

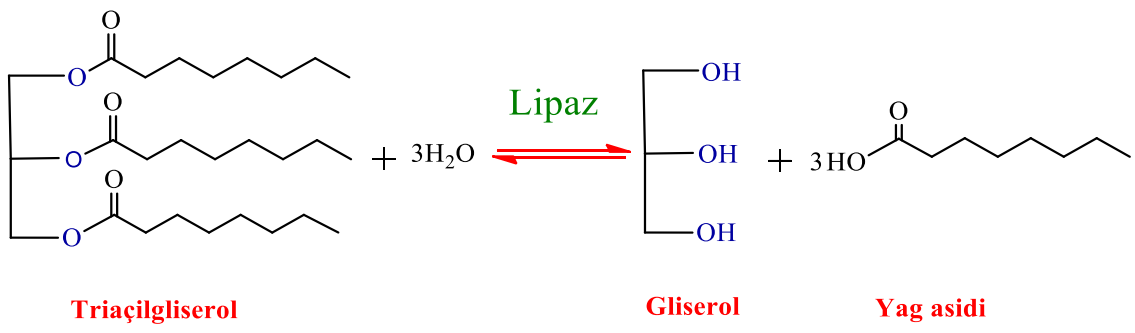
Zaman: Bir enzim tarafından katalize edilen bir reaksiyon sürerken reaksiyonun hızı giderek düşer. Bunun nedeni reaksiyon devam ederken oluşan ürünlerin aralarında birleşerek aksi yönde bir reaksiyon oluşturmaları, enzimin zamanla inaktive olması, reaksiyonu önleyen maddelerin teşekkül etmesi ve substratın tükenmesi gibi faktörlerdir (Yılmaz,2010).

1.2.1. Lipazlar

Lipazlar (triaçil gliserol ester hidrolazlar, E.C. 3.1.1.3) gliserinin ester bağlarının hidrolizini katalizleyen hidrolaz grubu enzimlerdir. Hidroliz sonucunda karboksilik asit ve alkoller oluşur. (Bakkal, 2006; Etci, 2011) (Şekil 1.26). Lipazlar suda çözünürler ve genelde suda çözünmeyen substratlar üzerinde etkilidirler.

Lipazların bilinen üç boyutlu yapıları molekül kütlesi 19-60 kDa aralığında değişir (Garrett ve Grisham1999; Gao 2004). Aminoasit sırasının bir hayli değişmesi lipazın yapısında en önemli özelliklerinden biridir. GXSXG daminoasit dilizimine sahip olup, burada G:glisin, S: serin, X:herhangi bir aminoasittir. Ayrıca serin, aspartik asit ve histidin amino asitlerinin varlığında yaklaşık ayrı 50 kalıntı bulunur. Aktif bölgelerine göre serin hidrolazlar olarak da sınıflandırılırlar.

Trigliseritlerin yanı sıra sulu çözeltilerde diğer karboksilik esterlerin hidrolizinide gerçekleştirir. Su miktarının sınırlı olduğu hidrofobik organik çözücü ortamında ise denge sentez yönüne kayar.



Şekil 1.24. Lipaz enzim katalizli hidroliz şeması

Lipaz enzimi hidroliz dışında uzun zincire sahip açil gliserollerin sentezini de katalizlemektedirler. Organik kimyada yaygın olarak kullanılan lipazlar biyokatalizörleri önemli hale getirmişlerdir (Jaeger ve Reetz, 1998). Lipazlara, biyoteknoloji çalışmalarında çok amaçlı kullanılabilirlikleri, spesifikliğin olmadığı kimyasal proseslere spesifiklik kazandırmaları, çok çeşitli substratları kullanabilme yeteneğine sahip olmaları, çok yüksek sıcaklık ve pH değerlerinde ve organik çözücülere karşı yüksek kararlılık göstermeleri, yan reaksiyonu önlemeleri ve reaksiyon ürünlerinin ayrılmasıyla ilgili problemleri kolaylaştırmaları gibi birçok özellikleri nedeniyle her geçen gün artan bir ilgi ve talep vardır Önemli olmasının ve araştırmacıların dikkatini çekmesinin diğer nedenleri de, kimyasal özelliğinin fazla olması, bölgesel ve çift yönlü seçiciliğe sahip olması, fungi ve bakteriler gibi birçok mikroorganizma tarafından yüksek verimle üretildiği için bol ve ucuz olmasıdır. Bilimsel araştırmalar sonucunda çoğu lipazın kristal yapısının aydınlatılmış olması da lipazlara olan ilgiyi arttırmıştır (Karaca 2006; Paiva ve ark., 2000; Hung ve ark., 2003; Zaitsev ve ark., 2003; Villeneuve ve ark., 2000; Akkuş 2006).

Ayrıca lipazlar, hidroliz, esterleşme ve transesterleşme reaksiyonlarını düşük sıcaklıkta katalizlemeleri, yüksek katalitik güçleri, kofaktör istememeleri, yan ürün oluşumunu önlemeleri, susuz ortamda kararlı ve aktif olmaları, yüksek substrat seçimlilikleri nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır (Sharma ve ark., 2001; İşbakan, 2006) (Çizelge 1.3). Lipaz enziminin genel özellikleri de sıklıkla tercih edilmelerinin nedenlerindendir.

Çizelge 1.3. Lipazların endüstrideki bazı uygulamaları (Etci, 2011)

Endüstri	Tepkime	Ürün/uygulama
Deterjan	Yağların hidrolizi	Fabrikalardan yağ atıklarının uzaklaştırılması
Kimyasallar	Enantiyomseçimlilik, sentez	Kiral yapı taşları
Yağ	Transesterleşme, hidroliz	Kakao yağı, margarin, yağ asitleri, gliserol
Farmasotik	Transesterleşme, Hidroliz	Sindirime yardımcı, özel yağlar
Süt ürünleri	Süt yağının hidrolizi, peynirin olgunlaşması	Süt, peynir ve tereyağında tat geliştirme
İçecek	Aroma geliştirme	İçki
Kağıt	Hidroliz	Kaliteli kağıt üretimi
Et ve balık	Tat artırma	Et balık ürünleri
Kozmetik	Sentez	Nemlendirme
Deri	Hidroliz	Deri Ürünleri

Enzimlerin aktivitesinin yüksek olduğu ve yüksek verimle çalıştığı pH değeri "optimum pH" olarak adlandırılır. Genellikle yüksek pH değerleri enzim konformasyonunu etkileyerek aktivitenin azalmasına neden olabilir. Birçok enzimin pH aralığı 4-8 değerleri arasındadır.

Enzimlerin en yüksek verim sağladığı sıcaklık "optimum sıcaklık"tır ve lipazların sıcaklık değerleri genelde 30-40 C^0 aralığındadır.

İnhibitörler enzimin etkisini azaltan maddelerdir substrata benzediklerinden enzimin karşısında substratla rekabet halindedirler ve enzimin aktivitesini etkilerler. İyonların ve reaktiflerin lipaz aktivitesine olan etkilerinin incelenmesi sonucu, ağır metal iyonlarının lipaz aktivitesini inhibe ettiği bunun tersi olarak alkali metal iyonlarının ise artırdığı görülmüştür. Lipaz aktifliği üzerine en etkili iyon Ca^{+2} dir. Lipaz aktivitesini inhibe eden iyonlara Co^{+2}, Ni^{+2}, Hg^{+2}, Sn^{+2}, boronik asitler ve dietil-p-dinitrofenil fosfat örnek verilebilir (Akoh, 1998).

Proteinlerin çözünürlüğünü etkileyen "izoelektrik nokta" enzim aktivitesini de etkilediği için önemli bir yere sahiptir. Net yükün sıfır olduğu ve moleküllerin hareket etmediği noktaya izoelektrik nokta denir. Bu noktadan uzaklaşıldıkça iyonlaşan gruplar arttığı için proteinlerin çözünmesi de artar.

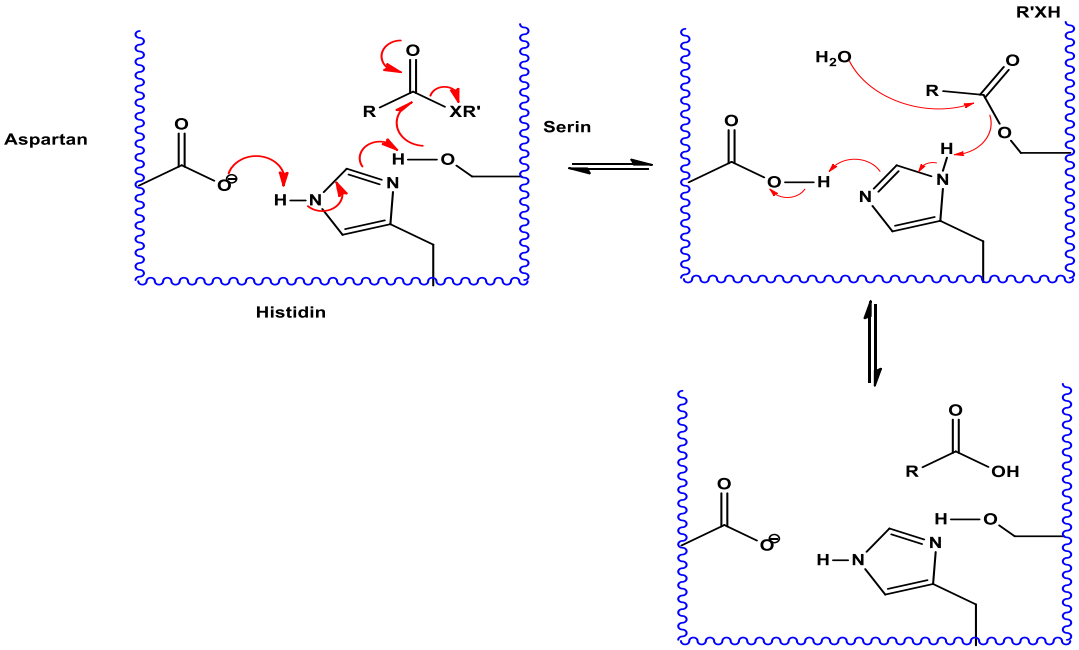
Enzimin aktivitesi birim zamanda dönüştürülen substratın mol sayısıdır. Enzim birimi Unit = 1 µmol/dak olarak bilinmektedir. Unit, Bir mikromol (1 µmol) substratı optimum şartlarda bir dakikada ürüne çeviren enzim miktarıdır.

İmmobilize lipaz aktivitesi:

$$\text{Lipaz aktivite (U/g destek maddesi)} = \frac{\text{Immobilize lipaz aktivitesi}}{\text{Immobilize lipaz miktari}}$$

$$\text{Spesifik Aktivite (U/mg protein)} = \frac{\text{Immobilize lipaz aktivitesi}}{\text{Immobilize lipazin protein miktari}}$$

Aktif merkezinde aspartat, serin ve histidin kalıntıları bulunduran lipaz enziminin su ortamındaki mekanizması gösterildiği gibi gerçekleşmektedir.



Şekil 1.25. Lipaz enziminin reaksiyon mekanizması

Lipaz enzim çeşitleri,

- ✓ Phycomyces nitens
- ✓ Porcine pancreas
- ✓ Humicola lanuginosa
- ✓ Aspergillus niger
- ✓ Candida cylindracea
- ✓ Candida antarctica
- ✓ *Candida rugosa*

Bu lipazlardan yüksek aktivite ve düşük fiyatından dolayı Candida Rugosa tercih edilmiştir.

1.2.2. Candida Rugosa Lipaz (CRL)

Candida rugosa, tek hücreli, patojenik olmayan bir yapıya sahip sporsuz, yüksek verimli lipaz üretiminden dolayı ucuz ve kolay temini olduğu için ticari olarak kullanılan bir mikroorganizmadır. Serin, Glutamin ve Histidin üçlüsünden oluşmaktadır. 31 amino asitten oluşan bir kapağa sahip yapısı vardır. (Benjamin ve Pandey, 1998;

Paiva ve ark..2000; Bakkal, 2006). Kapağın iç yüzeyi aktif bölgeye bakıp hidrofobik, dış yüzeyi ise hidrofilik yapıdadır. Bu kapak aktif bölgeyi kısmen kaplar (Tejo ve ark., 2004). Aktif bölge kapak tarafından kapatıldığı zaman 'kapalı form' enzim inaktif olarak aktivitesi ve enantiyoseçimliliği düşerken, kapağın hidrofilik yüzeyle etkileşerek açılması durumunda ise 'açık form' substrat ile etkileşerek enzimin aktivitesinin önemli ölçüde arttığı konumdur. (Secundo ve ark., 2003). Enzimler organik çözücülerde çözünmediklerinden tepkime organik-su ara fazında gerçekleşir. Bu durum ara yüzey aktivasyonu olarak bilinmektedir ve *Candida Rugosa* lipazda gözlenmektedir. Candida Rugosa Lipaz enziminin kapağının kapalı ve hidrofilik kısmının çözücüye doğru dönük olması suda çözündüğünde gerçekleşir. Lipazın su-organik çözücü ara yüzeyinde kapak açılır ve enzimin hidrofobik kısmı ara yüzeyde ortaya çıkar (Mutlu, 2006; Etci, 2011).

Lipazlar arasında, *Candida Rugosa* lipaz yaygın olarak yağ hidrolizinde, esterifikasyonda, transesterleşmede ve enantiyoseçimli biyodönüşümlerde çok önemli özellik göstermektedir (Bezbradica ve ark., 2006; Santos ve Castro, 2006; Ting ve ark., 2006).

1.2.3. Enzim İmmobilizasyonu

Son yıllarda enzimler kimya, biyoteknoloji ve diğer endüstri alanlarında çok çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır. Enzimlerin (katalizörlerin) pahalı ve ortam koşullarına karşı dayanıksız olması, bilim adamlarını enzimlerin daha ekonomik ve kullanışlı hale getirilme olanaklarının araştırılmasına yöneltmiştir. Çeşitli kaynaklardan izole edilen enzimlerin reaksiyon ortamında aktivitelerini yitirmeden geri kazanılmaları olanaksızdır. Bu durum enzimlerin çok spesifik ve katalizör olmalarına neden olur ve maliyeti yükseltir (Telefoncu, 1997).

Enzimler sürekli üretim sistemlerine de uygulanmazlar. Bu nedenlerden dolayı enzimleri endüstri için daha çekici hale getirmek adına immobilizasyon tekniklerinin uygulanması bu problemler için çözüm olmaktadır. Enzim kaynağı ister bitkisel, ister hayvansal isterse mikrobiyal olsun bu biyokatalizörlerin potansiyellerinden yaralanmak gereklidir (Aksoy 2003).

Kelime anlamı olarak immobilizasyon hareketi sınırlandırma demektir. Genel anlamda ise, enzim moleküllerinin suda çözünmeyen katı destek maddelerine bağlanması veya hapsedilmesidir. Enzimler polimer veya gözenekli taşıyıcılara bağlanarak, yine suda çözünmeyen yüzey aktif taşıyıcılarda adsorplanarak, biyofonksiyonel reaktiflerle çapraz bağlanarak ve polimer matrikste, yarı geçirgen membran veya mikrokapsüllerde hapsedilerek immobilize edilirler ve böylece hareketleri sınırlandırılır Genellikle immobilize enzimlerin işletme koşulları altında aktif olduğu süre, serbest enzime göre daha yüksektir. Böylece işlem süresi kısalır ve daha fazla saf ürün elde edilir. Bunların dışında immobilizasyonun dezavantajları da vardır (Tischer ve Wedekind, 1999; Kim ve ark., 2000; Oh ve ark., 2007).

- İmmobilizasyon sırasında sıcaklık, pH değişimi, serbest radikaller oluşması gibi etkenler enzimin denatüre olmasına, dolayısı ile aktivitesini kaybetmesine sebeptir. Bu nedenle enzim immobilizasyonu sırasında aktif gruplar korunmalıdır. İmmobilizasyon çok ılıman koşullarda (oda sıcaklığı, nötral pH vb.) gerçekleştirilmelidir.
- Çok basamaklı immobilizasyon işlemlerinde enzim kararlılığı sınırlıdır.
- Enzim taşıyıcıların maliyeti yüksektir.

İmmobilize edilen enzimden beklenilen özellikleri:

- ✓ Yüksek kararlılık
- ✓ Tekrar kullanılabilirlik
- ✓ Yüksek saflık
- ✓ Sürekli üretime olanak vermesi
- ✓ Reaksiyon üretimine olanak vermesi
- ✓ Yüksek ürün yüzdesi
- ✓ Ekonomik olması

Her enzim için ideal taşıyıcı ve immobilzasyon yöntemi seçiminde bilimsel standartların oluştuğunu söylemek mümkün değildir. Taşıyıcı ve immobilizasyon yöntemi seçilirken immobilize edilecek enzimin karakteristiklerinin kullanılacağı alan, seçilen yöntem ile taşıyıcı kombinasyonunun karakteristikleri, limitasyonleri ve

özelliklerinin uyumuna dikkat edilmelidir. Enzim immobilizasyonunda doğal veya sentetik birçok organik ve inorganik materyal taşıyıcı olarak kullanılmaktadır. Taşıyıcı suda çözünmeyen katı bir madde veya polimer olabilir (Zeng ve ark. 2006; Chiou ve Wu 2004; Hung ve ark. 2003; Cao, 2006; Bakkal, 2006; Wang ve ark., 2007).

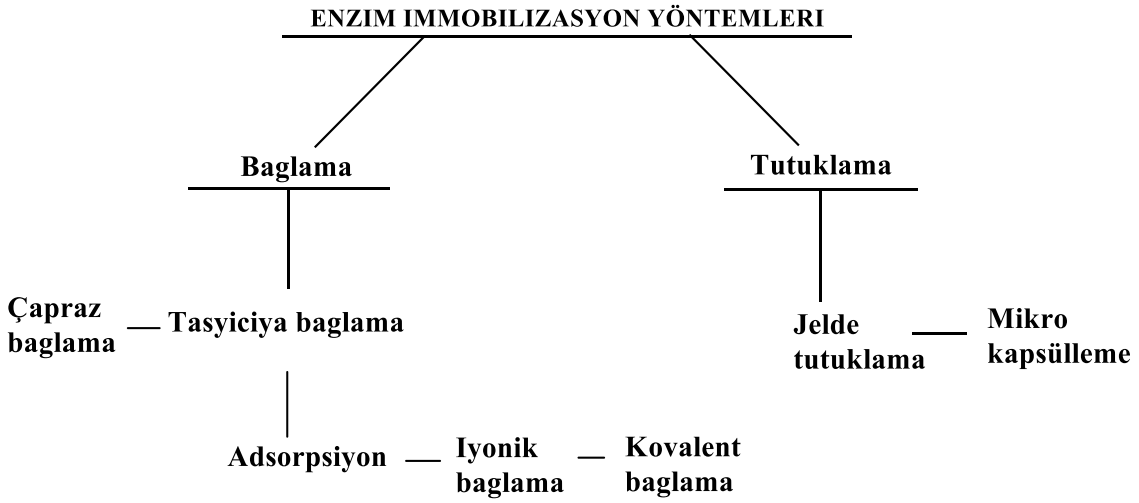
Enzim immobilizasyonunda en yaygın kullanılan taşıyıcılar anoraganik, doğal ve sentetik polimerlerdir (Çizelge 1.4). Kullanılan immobilizasyon tekniği hangi yöntem olursa olsun immobilize edilen enzimden beklenilen özellikler şunlardır,

- Çevre koşullarına (pH, sıcaklık vb.) karşı daha dayanıklıdır.
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
- Sürekli işlemlere uygulanabilir.
- Doğal enzime kıyasla daha kararlıdır.
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
- Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterbilir.
- Enzimin kendi kendini parçalaması (autoysis, self-digestion) olasılığı azalır.
- Karıştırma, çalkalama gibi çalışmalar (mekanistik) için uygundur.
- Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.

İmmobilize enzimler serbest enzimlere göre birçok üstünlüklere sahiptir. Bu da enzimlerin kesikli veya sürekli işlemlerde kullanımını kolaylaştırmaktadır (Telefoncu 1997).

1.2.4. İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzim immobilizasyonda kullanılacak yöntemi seçerken, immobilizasyon sırasında veya immobilizasyondan sonra enzim aktif merkezin zarar görmeyeceği bir yöntem olmasına dikkat edilmelidir. Böyle bir seçim yaparken enzimin yapısı çok iyi bilinmelidir.



Şekil 1.26. İmmobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması

1.2.4.1.Taşıyıcıya Bağlama ile İmmobilizasyon Yöntemi

Enzim immobilizasyonda doğal ve sentetik birçok organik ve inorganik materyal kullanılmaktadır. Taşıyıcı, membranda suda çözünmeyen katı veya polimer olabilir ve taşıyıcının aşağıda verilen niteliklere sahip olması gerekir.

- ✓ Suda çözünmeme
- ✓ Hidrofilik karakter
- ✓ Gözenekli (poröz) yapı
- ✓ Mekanik stabilite ve uygun partikül formu
- ✓ Kimyasal ve termal stabilite
- ✓ Mikroorganizmaya karşı dirençlik
- ✓ Ucuzluk
- ✓ Düşük toksitite
- ✓ Rejenere olabilme
- ✓ Kovalent bağlamada kullanılacak taşıyıcılar yumuşak koşullarda reaksiyon verebilen fonksiyonel gruplar taşımalı (Telefoncu, 1997) (Çizelge 1.4).

Çizelge1.4. Enzim İmmobilizasyonunda yaygın olarak kullanılan taşıyıcılar (Etci, 2011)

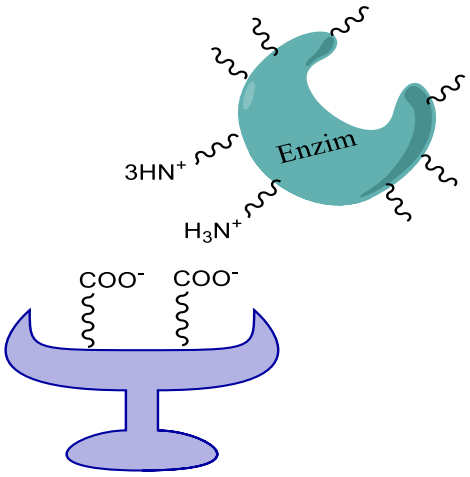
Anorganik	Doğal polimerler	Sentetik polimerler
Kil, cam	Selüloz	Polistiren türevleri
Silikajel	Nişasta	Poliakrilamid
Hidroksiapatit	Jelatin	M. anhidrid polimerler
Aktif karbon	Albumin	Siklodekstrin polimerleri
Bentonit	Agar ve agaroz	Vinil ve alil polimerler
Titandioksit	Karragenan	Oxiranlar
Metaller	Dextran	Naylon
Nikeloksit	Kollagen	Metakrilat
Pomza taşı	Kitin kitosan	İ. Değiştirici reçineler

a. Adsorpsiyon İle İmmobilizasyon

En basit immobilizasyon metodudur. Bu yöntemde hidrofilik etkileşimler söz konusu olsa da en çok Van der Waals, iyonik ve hidrojen bağı etkileşimleri gibi elektrostatik güçler etkindir. Bu yöntem suda çözünmeyen adsorpsiyon özelliklerine sahip bir yüzey aktif taşıyıcı ile enzim çözeltisinin uygun koşullarda (pH, iyonik güç vb.) bir süre inkübasyonu ile oluşur (Hung, 2003). Tutuklanmış enzimin aşırısının iyice uzaklaştırılması ile immobilizasyon işlemi tamamlanır. Yöntemin avantajları basit, hızlı, ucuz olması, çok sayıda farklı biçim ve yükteki taşıyıcıları seçme olanağı vermesidir; sakıncaları ise, enzim ile taşıyıcı arasında kuvvetli bir bağlanma olmadığı takdirde, enzimin serbest halde reaksiyon ortamında geçerek ürünleri kirletmesi ve optimal koşulların saptanmasının zor olmasıdır (Knežević, 2004; Winkler, 1990; Etci, 2011).

b. İyonik Bağlama ile İmmobilizasyon

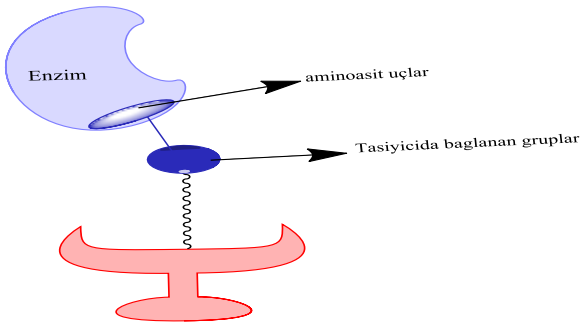
İyonik bağlama yöntemi, iyon değiştirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik bağlarla bağlanması temeline dayanır. Bu şekilde enzimin katıya bağlanması fiziksel adsorpsiyondan daha güçlü bir bağlamdır. İyonik bağlanma çok ılman koşullarda gerçekleştiğinden enzimin yapısında değişikliğe neden olmaz. Ancak enzim ile destek arasındaki bağ kadar güçlü olamadığından enzim kaçışı söz konusudur. (Chiou 2004; Karaca 2006) (Şekil 1.27).



Şekil.1.27. İyonik bağlama ile immobilizasyon

c. Kovalent Bağlama ile İmmobilizasyon

Genellikle sulu ortamda suda çözünmeyen bir taşıyıcıya enzimin kovalent bağlarla tuturulmasıdır. Yüksek substrat derişimi veya yüksek iyonik koşullarda sızma olmaması sebebiyle en çok araştırılan tutuklama yöntemidir. Kovalent bağlama ile tutuklamada destek matrisi ile enzimin katalitik aktif bölgesindeki fonksiyonel gruplar arasında bağ oluşmaması gerekmektedir. Ancak bunu sağlamak güçtür ve genellikle aktivite kaybı meydana gelir. Aktif bölgedeki temel amino asit ile ön reaksiyonlar inaktivitasyonu önler ve immobilizasyon sonunda düşük aktivite elde edilir (Kennedy, 1995; Karaca, 2006).



Şekil.1.28. Kovalent bağlama

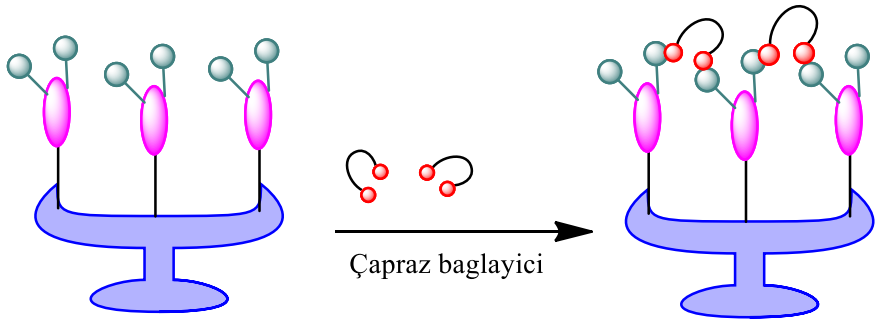
1.2.4.2.Çapraz Bağlama Yöntemleri ile İmmobilizasyon

Bu yöntem iki veya daha fazla fonksiyonel grup taşıyan enzim moleküllerinin birbirlerine çapraz bağlanması ve bu şekilde suda çözünmeyen bir kompleks oluşturması temeline dayanır. Bu yöntemde enzimleri birbirine bağlamak amacıyla glutaraldehit, alkildi izosiyanatlar ve diazobenzin gibi maddeler kullanılır (Sultanoğlu, 2009; Yıldız, 2012).

Küçük moleküllü bifonksiyonel veya multifonksiyonel reaktifler enzim molekülleri arasında bağlar yaparak sonuçta suda çözünmeyen agregaların oluşmasını sağlarlar. Çapraz bağlama derecesi ve immobilizasyon, protein ve reaktif konsantrasyonuna, pH'ya ve immobilize edilecek enzime çok bağımlıdır. İntermoleküller bağlanmalar yanında intramoleküler bağlanmalar da söz konusudur (Shaw, 1990).

Bu yöntemin dezavantajları şunlardır:

- Reaksiyonu kontrol etmek zordur.
- Fazla miktarda enzime ihtiyaç vardır.
- Enzimin bağlanma sırasında aktivitesini kaybetme olasılığı fazladır.



Şekil.1.29. Çapraz bağlı immobilize enzimler (Cao, 2005)

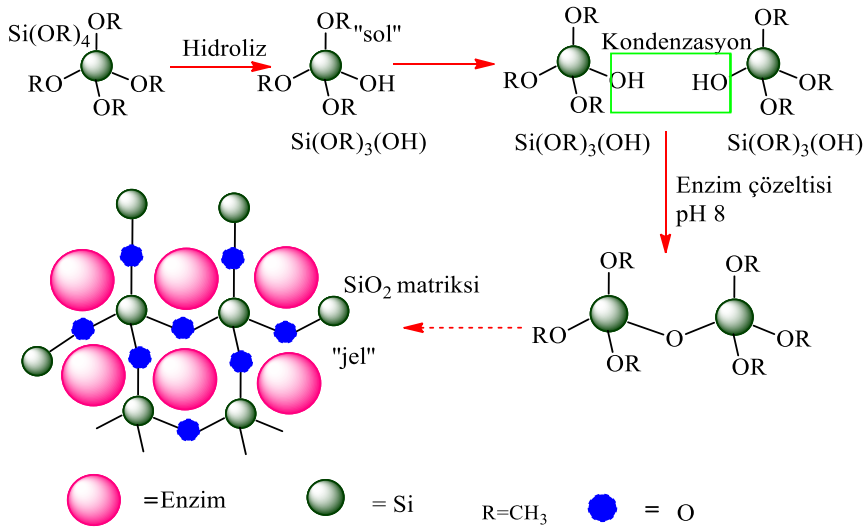
1.2.4.2.1. Tutuklama Yöntemleri ile İmmobilizasyon

Tutuklama yöntemi ile immobilizasyon; enzimin, substratın ulaşabileceği bir polimer ya da membran içinde fiziksel olarak alıkonması yöntemidir. Bu yöntem diğer tutuklama yöntemlerine göre daha küçük substrat ve ürün molekülleri için uygundur. Biyokatalizörler jel veya membrana bağlanmaz, belirli bir ortamda tutulur. Enzim molekülleri polimer matris içindeki kafeslerde, yarı geçirgen membranlar içinde, mikrokapsülleme ve misellerde tutulur. Genellikle farklı boyutlardaki ve özellikteki enzimler ile hemen hemen hiç biyolojik aktivite kaybı olmadan ve enzim özelliklerini değiştirmeden uygulanabilen bir yöntemdir (Yıldız, 2012).

a. Sol-jel metodu ile tutuklama:

Sol-jel matrikslere enzim enkapsülasyonu yapılarak, enzim immobilize metodları arasında en popüler yöntemlerden biri bulunmuştur. Bu sentetik protokolde, tetrametilortosilikat (TMOS) veya tetraetilortosilikat (TEOS) "sol" içinde hidroliz edilir. Sol içine enzim çözeltisinin eklenmesi "jel" oluşumuna neden olan kondensasyon tepkimesini başlatır ve enzimler silikat matrikslere enkapsüle olurlar (Braun ve ark., 1990). Bu yaklaşımda, 0,1-500 nm aralığında boyutlara sahip oluşan silikat matrikslerde çeşitli kanallar ve gözenekler oluşturulur. Bu sistem, ekapsüle olmuş enzimleri korumak için iyi bir optimizasyon gerektirir. Enzim korunursa, sol-jel gözenekleri kapatarak enkapsüllenmiş enzimin denatürasyonu ve katlanmaları önlenmiş olunur. Böylece enzim kararlılığı sağlanır. Enzimler silikat formasyonunun erken evrelerinde eklendiklerinden dolayı, sol-jel yaklaşımında enzimler sıkıca hapsedilebilmektedirler. Bu yöntem ile yapılan enzim immobilizasyonunda, enkapsüle enzimler serbest enzime oranla daha kararlıdırlar. Bu şekilde enkapsüle olmuş enzimin kararlılığının enzim konsatrasyonuna, pH'a ve iyonik kuvvete bağlılığı fazladır (Arica ve ark., 1996;Cao, 2005). Proses de bağlayıcı silan bileşikleri olarak alkil ve alkoksi silan bileşikleri kullanılmaktadır. Sol-jel teknikleri, enzim varlığında alkoksi silanların asit veya baz katalizi ile yapılır (Hench ve West, 1990; Brinker ve Scherer, 1990). Başka bir ifadeyle bağlayıcı silan bileşiklerinin alkoksi grupları hidroliz olur ve çapraz bağlı kondenzasyon

reaksiyonu ile enzimin enkapsüle olduğu SiO_2 yapısı meydana gelir. Oluşan sağlam yapıdaki sol-jel polimeri enzimin daha kararlı olmasını sağladığı gibi enzimin enkapsüle olduğu bölgeden uzaklaşmasını engeller.



Şekil.1.30. Enzimlerin sol-jel tutuklanması (Nouger, 2002; Gao, 2004)

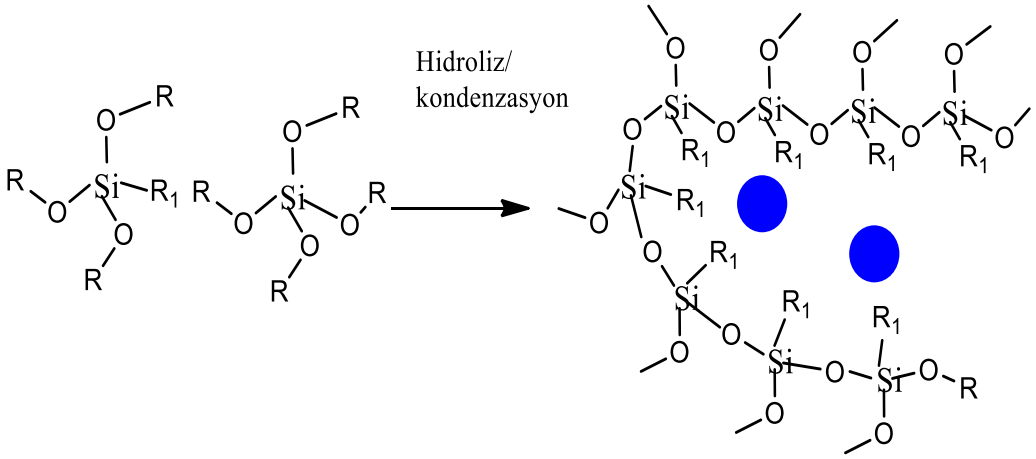
Sol-jel enkapsülasyon immobilize enzimler için özellikle etkili ve kolay olduğu ispatlanmış, Avnir ve ark. (1994) bu tekniğe öncülük etmişlerdir. Destek maddesinin inertliği, mükemmel termal dayanıklılığı, ılıman işlem şartları ile bu metodun ayırıcı karakterisittik özellikleri arasındadır.

Sol-jel metotlarında aktivite kazanımıyla açığa çıkan gözlemler diğer enzim immobilizasyon metodlarıyla karşılaştırılabilir. Buna göre enzim stabilize edilebilir, matriks yüksek molekül ağırlıklı substratlar için geçirgen olmayabilir (Johnson ve Whateley, 1971) ve enzimler moleküler hapsetme yüzünden etkilenebilir (Glad ve ark., 1985). İsopropanol, polivinilalkol, siklodekstrinler ve kaliksarenler gibi katkı maddelerinin lipaz immobilizasyonunda sol-jel tutuklama yönteminin etkisini artırdığı bilinmektedir. Böylece, organik çözücülerde, su- organik çözücü ara fazında ve iyonik sıvılarda esterifikasyon veya transesterifikasyon reaksiyonlarını gerçekleştirmektir (Yılmaz, 2010).

Tutuklama ile immobilizasyon, kolay hazırlanması ve biyomoleküllerin serbest bulunması, kolay bir yöntem olması ve tekrarlanabilirliğinin yüksek olması nedeniyle ilgi odağı haline gelmiştir. Sol-jel tutuklama metodunda, biyomoleküllerin tutunması

polimer matriks ile arasında kovalent bağ olmadan gerçekleşir. Bu şekilde dönme ve sarmalın hareketi sınırlandırılmış, enzim-substrat etkileşimi kolaylaştırılmış olur (Edmiston ve ark., 1994; Dave ve ark., 1995; Gottfried ve ark., 1999; Hartnett ve ark., 1999). Bunların yanında tutuklanmış biyomolekülün sızıntısı olmaksızın düşük molekül ağırlıklı moleküllerin iletilmesini sağlayan matriksin geçirgenliği; farklı boyutta biyomoleküllerin tutunmasına izin veren, ayarlanabilir materyal gözenekliliği vardır.

Tetrametoksisilan [TMOS; $Si(OCH_3)_4$] veya metiltrimetoksisilan [MTMOS; $CH_3Si(OCH_3)_3$] eklenmesiyle sulu ortamda ve asidik pH değerinde metal alkoksitlerin silisyum hidroksit gruplarının (Si-OH) oluşumuyla ilk adım gerçekleşmektedir. Daha sonra, bazik pH' da, silisyum hidroksit fonsiyonel grupları arasında kondenzasyon reaksiyonu biyomoleküllerin tutuklanacak (Si-O-Si) matriksini oluştururlar (Guisan, 2006; Campàs ve Marty, 2006) (Şekil 1.31).

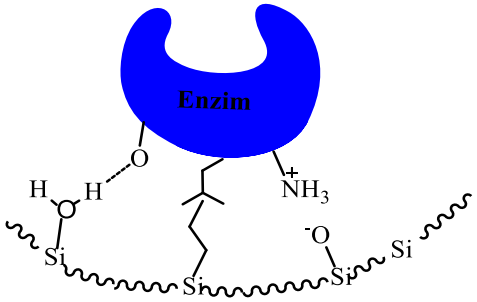


Şekil.1.31. Sol-jel matriksinde enzim tutuklanması (Gao, 2004)

Ayrıca büyük gözeneklerin oluşması için NaF gibi temel katalizörlerde kullanılmaktadır (Reetz, 2006; Guisan, 2006). Enzimin daha kararlı olması için polivinilalkol ve metiltrimetoksisilan $CH_3Si(OCH_3)_3$ (MTMS) kullanılmıştır (Reetz ve ark., 1995; Reetz ve ark., 1996; Reetz, 2006; Guisan, 2006). Son olarak eklenen TMOS ile birlikte alkil grubu metil-, etil-, n-propil-, n- bütil-, n- $C_{18}H_{37}$ ya da 1,6 bis(trimethoxysilyl)-hexane) olan fonksiyon edilmiş alkoksitleri kullanmışlardır. Yapılan bir çalışmada metil<etil<n-propil<n-butil gibi farklı alkiltrimetoksisilan bileşiklerini kullanarak lipaz aktivitesinin artışında alkil etkisini gözlemlenmiş ve artan hidrofobik gruplarla enzim aktivitesinin arttığı görülmüştür (Reetz, 1997). Reetz ve

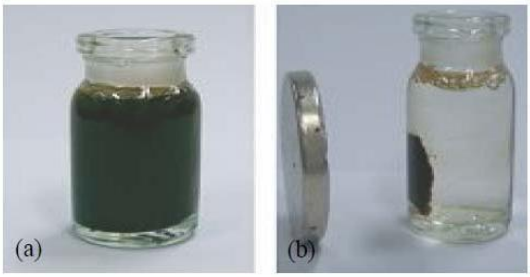
ark., (2003) enantiyoselektif reaksiyonlarda heterojen katalizör olarak sol-jel tutuklamanın çok uygun olduğunu gözlemişlerdir.

Daha yüksek termal kararlılık ve aktivite, Şekil.1.33'de gösterildiği gibi hidrofobik etkileşimler (Van der Walls) ve iç etkileşimlerin yanı sıra hidrojen bağlarıyla sağlanmaktadır.



Şekil.1.32. Enzimle jel matriks arasında kovalent içetkileşimin olmadığını gösteren genel sol-jel tutuklama şeması (Guisan, 2006)

Bu konuda diğer bir gelişme özellikle sol-jel işlemi sırasında manyetik demir oksitin lipaz immobilizasyonunda kullanılması ile kullanılabilirliğinde büyük pratiklik getirilmesidir (Reetz ve ark., 1998; Reetz, 2006; Guisan, 2006)



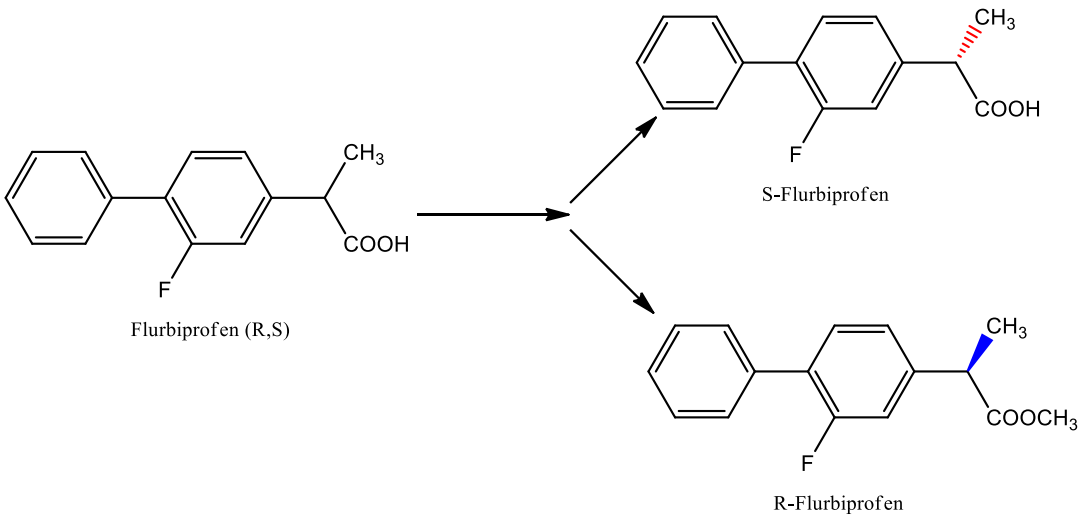
Şekil.1.33. Manyetik Fe_3O_4 nanopartiküller a) manyetik alan olmadığı durum b) manyetik alan altında olduğu durum

1.3. Flurbiprofen

Rasemik karışımlardan enantiyomerlerin ayrılması işlemine rezolüsyon (ayrılma) denir. Rezolüsyonun amacı, enantiyomerlerden birini saf ya da

zenginleştirilmiş olarak elde etmektir.

Flurbiprofen, [(R,S)-2-(2-florobifenil) propanoik asit], kapalı formülü $C_{15}H_{13}FO_2$ olup bifenil grubu içeren ve ikinci fenil halkasının orto pozisyonunda bir flor atomu bulunduran, 4,22 pKa değerine sahip, erime noktası 115 ^{0}C ve molekül ağırlığı 224,26 g/mol olan, suda hemen hemen çözünmeyen beyaz kristaller halinde bulunan rasemik (kiral) bir karışımdır (Ghanem, 2010; Sarasija, 2005; Aydın, 2010).



Şekil.1.34. Rasemik Flurbiprofen

Flurbiprofen, antiinflamatuvar, analjezik ve antipiretik etki gösteren nonsteroidal bir ilaçtır. Etki mazkanizması, diğer benzer ilaçlarda olduğu gibi tamamen anlaşılmamıştır ve prostaglandin sentez inhibisyonuyla ilgili olduğu düşünülmektedir. Diğer Nonsteroid Antiinflamatuvar İlaçlar (NSAİ) da olduğu gibi; flurbiprofen, vücut dokularında COX-1 ve COX-2 izoenzimleri dahil olmak üzere siklooksijenazı (COX) inhibe ederek prostaglandin sentezini inhibe eder. Flurbiprofen, en güçlü prostaglandin inhibitör aktivite gösteren NSAİ ilaçlarından biridir (Bae, 2006; Alkan, 2012).

Flurbiprofen kararlı konsantrasyonda 24 saat süresince, ortalama plazma seviyeleri eşdeğer dozdaki konvansiyonel tabletle aynıdır. Fakat minimum ve maksimum plazma konsantrasyonları arasındaki fark daha azdır. Flurbiprofen SR' nin sürekli salınımı akümülasyona neden olmaz.

Flurbiprofenin emilimi, oral olarak alındığında gastrointestinal yoldan kolayca absorbe edilir ve uygulamadan 4-6 saat sonra doruk plazma konsantrasyonuna ulaşır.

Yaklaşık olarak %99 oranında plazma proteinlerine bağlanır. Eliminasyon yarılanma ömrü 3-4 saattir. Flurbiprofenin farmakokinetiği doğrusaldır ve plazma düzeyleri verilen doza bağlı olarak artış gösterir. Ayrıca yapılan çalışmalar sonucunda karsinojenik, teratojenik, advers reprodüktif etkileri görülmemiştir (Dural, 2002; Bae, 2006).

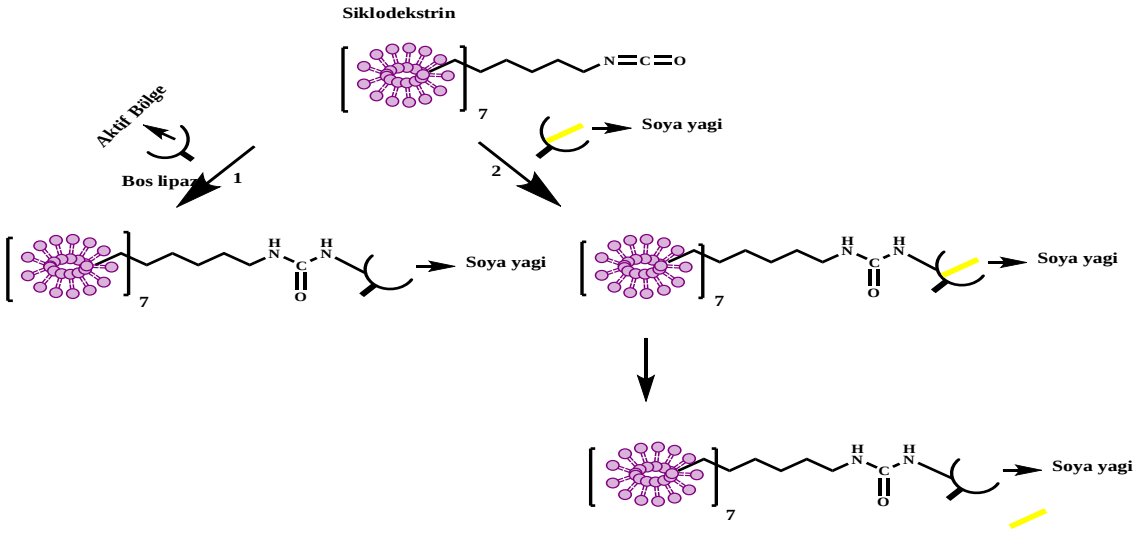
Flurbiprofen, taşıdığı karboksilik asit grubu sayesinde asidk özellik kazanmıştır ve burada ki asimetrik karbondan dolayı S(+) ve R(-) enantiyomer karışımı halindedir. Bağlandığı reseptör bölgesi düz, ona uygun düz olmayan farklı bir alan ve katyonik bölgeden oluşmaktadır. Böylelikle reseptörün katyonik kısmına karboksilik asit grubu ile bağlanarak tam uygunluk gösterir. R ve s izomer çifti arasında S konfigürasyonu reseptör ile daha iyi etkileşir ve daha kuvvetli etki gösterir. Son olarak R enantiyomeri metastatik prostat kanseri ve Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılmak üzere klinik denemeler aşamasındadır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

İmmobilize lipazların, serbest enzimlere göre biyokatalitik proseslerde kullanımı daha kolay, dayanıklı ve ekonomiktir. Bu nedenle günümüzde araştırmacılar mevcut tekniklerin geliştirilmesi ve kullanış açısından daha etkili farklı taşıyıcıların immobilizasyonu üzerine çalışmalarını yoğunlaştırmışlardır.Son yıllarda çeşitli manyetik ayırma işlemleri biyomolekülleri ayırma ve saflaştırma yöntemleri için geliştirilmiştir (Saiyed ve ark., (2003). Bu tekniklerin avantajları, kolay ve hızlı geri dönüşümü ve kompleks karışımından moleküllerin ayrılabilmesine yönelik spesifikliğidir.

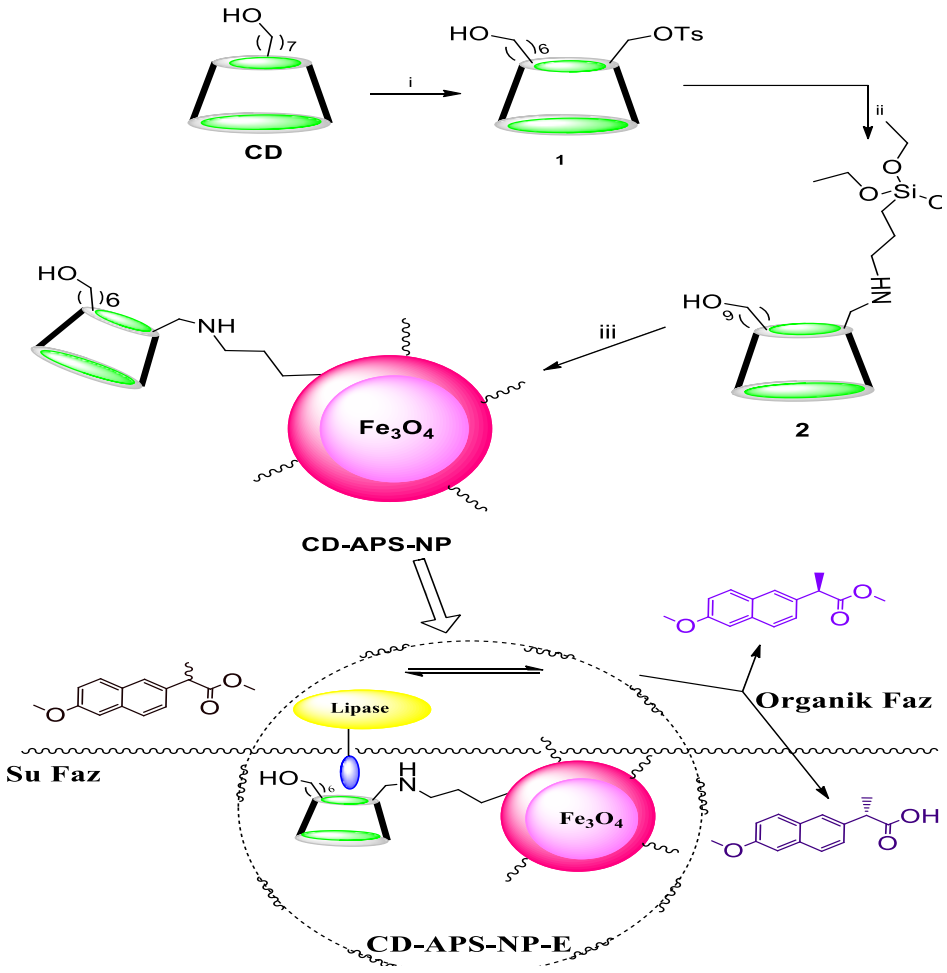
Lipaz enzimi ilk olarak 1956 yılında H. Brandenberger tarafından kovalent bağlama yöntemi ile iyon değiştirici reçine üzerine immobilize edilmiştir (Iwai ve ark. 1964). Iwai ve arkadaşlarının (1964) çalışmalarıyla lipazın ester hidrolizinde veya ester sentezinde kullanılması ile ilgili uygulamaya yönelik çalışmalar başlamıştır (Sökmen 2005).

Yilmaz ve ark. (2009), *Candida Rugosa Lipaz* enzimini soya yağı ile ön işlemle etkileştirdikten sonra hekzametilen diizosiyonat fonksiyonlu *β*-siklodekstrin üzerine immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Elde edilen *β*-siklodekstrin-içeren immobilize lipazın, soya yağı ile etkileştirilmeyen immobilize lipaz'dan daha yüksek bir katalitik aktivitenin yanı sıra daha kararlı bir yapıya sahip olduğunu da görmüşlerdir (Şekil 2.4).



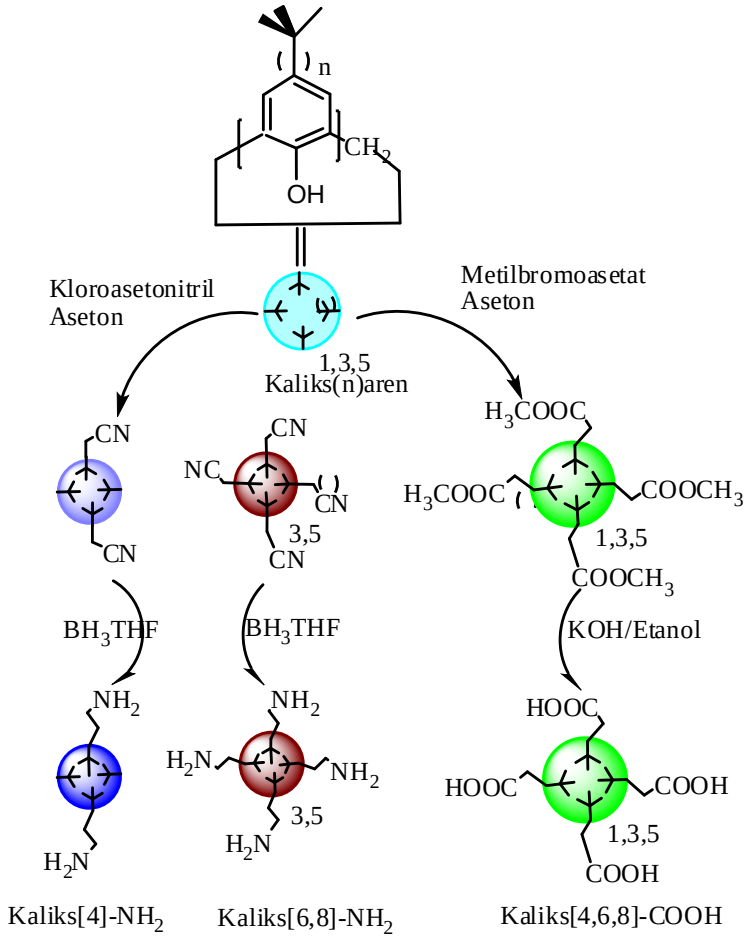
Şekil 2.1. *Candida rugosa lipaz*ın soya yağı ile etkileştirildikten sonra immobilizasyonu

Ozyılmaz ve ark. (2014), manyetik nanopartiküllere bağlı β-siklodekstrini tetraetoksisilan (TEOS) ve oktiltiretoksisilan varlığında CRL ile immobilize ederek rasemik naproksen metil esterinin enantiyoseçimli reaksiyonunda kullanmışlardır.



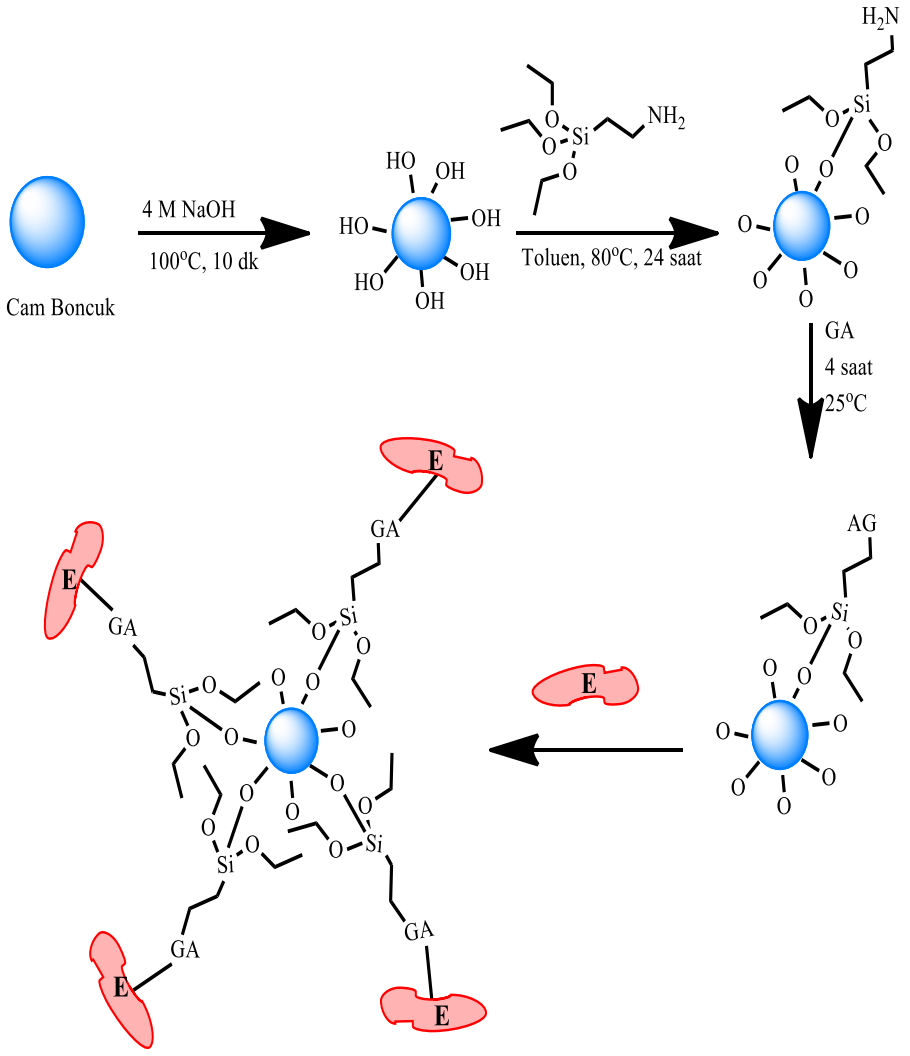
Şekil 2.2. Manyetik nanopartikül bağlı β-siklodestrin lipaz ile hidrolizi

Sahin ve ark. (2009), kaliks[n]aren bileşiklerini (n=4,6,8) amino ve karboksil grubu ile türevlendirerek lipaz immobilizasyonunda ve rasemik naproksenin enantiyoseçimli çalışmalarında katkı maddesi olarak kullanmışlardır. Yapılan çalışmada bu bileşiklerin rasemik naproksen esterinin enantiyoseçimli hidrolizini ve enantiyoseçimliliğini önemli oranda artırdığını göstermişleridir (Şekil 2.3).



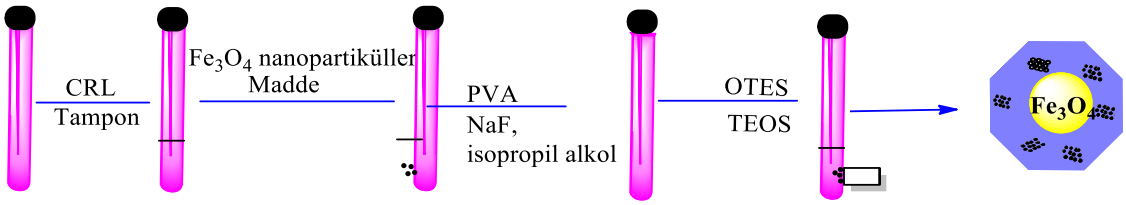
Şekil 2.3. Kaliksaren asit ve amin türevleri

Bir başka çalışmada Yilmaz ve ark. (2011), cam boncukları aminopropil grubu taşıyan silika ile etkileştirilerek aminopropil cam boncukları elde etmişlerdir. Elde edilen bu cam boncuklarının glutaraldehitle reaksiyon sonucunda sonra serbest dialdehit grubu bulunduran ve enzim immobilizasyonunda kullanılabilecek yeni bir bileşik elde etmişlerdir. Hazırlanan bu yapılar rasemik naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidroliz çalışmalarında kullanılmışlar. S-naproksen için %98 ee değeri ile immobilize lipazın (E>400) yüksek enantiyoseçimliliğe sahip olduğunu gözlemişlerdir (Şekil 2.4).



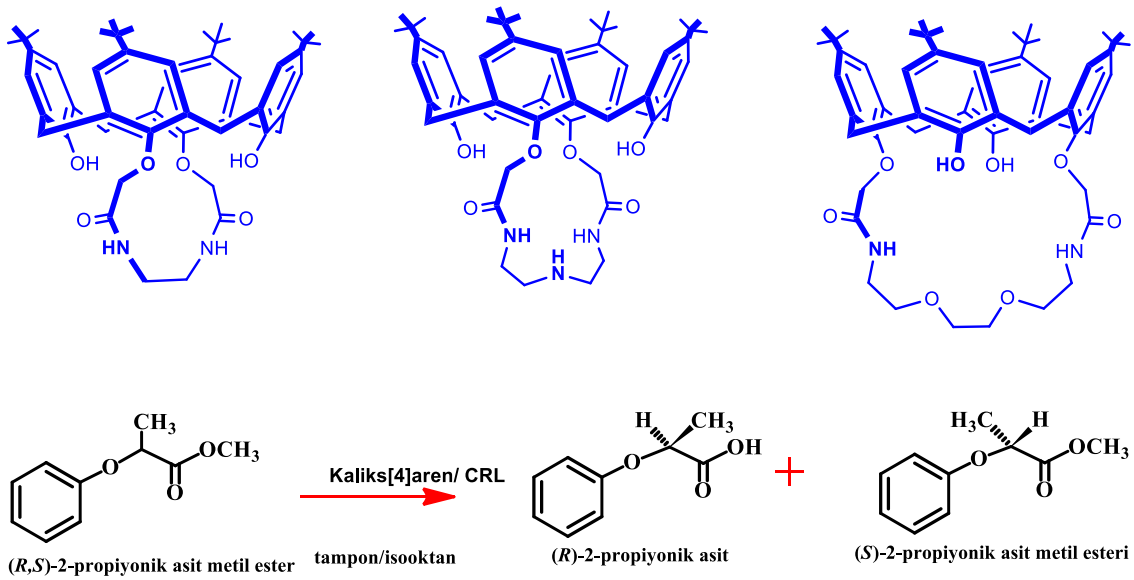
Şekil 2.4. Cam boncuk yüzeyine immobilizasyonun gösterimi.

Yılmaz ve ark. (2011) manyetik Fe_3O_4 partikülleri ve manyetik Fe_3O_4 partiküllü sporopollenin (Fe_3O_4-Spo-E) varlığında *Candida rugosa* lipazını sol-jel tutuklama metoduna göre immobilize etmişler. İmmobilize lipazları rasemik naproksenin enantiyoseçimli hidrolizinde kullanmışlar, enantiyoseçimliliğinin 400' ün üzerinde olduğu (E = >400), serbest lipazın E'sinin 137 olduğunu gözlemişlerdir.



Şekil 2.5. Manyetik Fe_3O_4 partikülleri ve manyetik nanopartikülerine sol-gel tutuklama protokolü

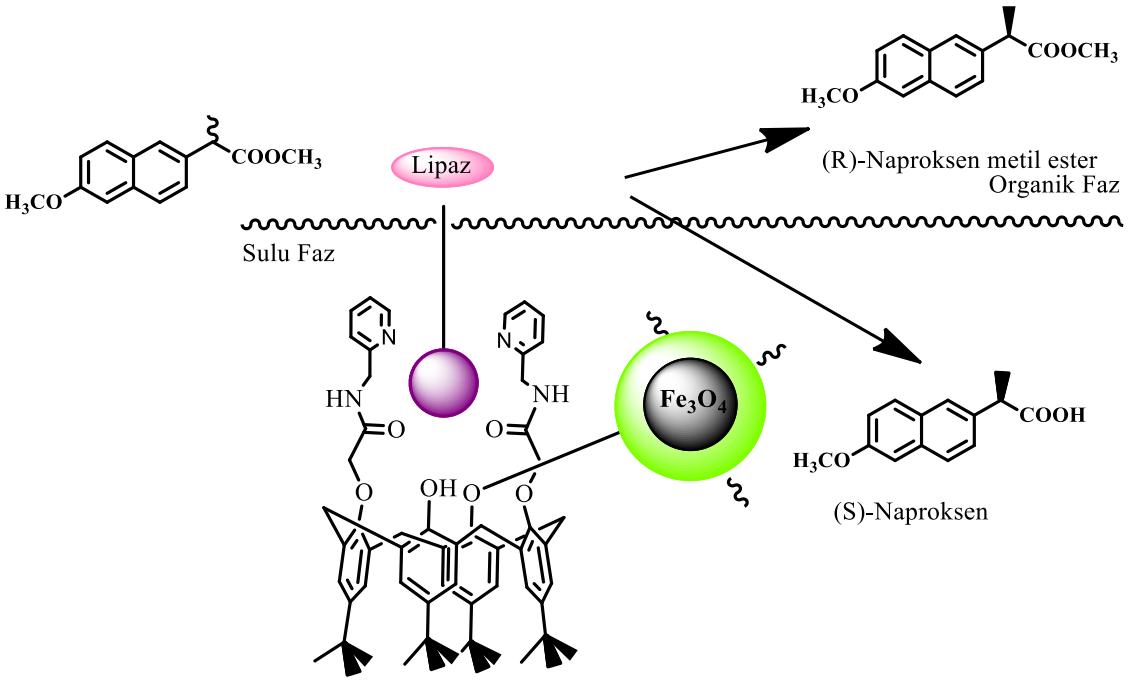
Uyanık ve ark. (2011), yaptıkları çalışmada kaliks[4]aren amid türevlerini ve kaliks(aza)crows destek maddeleri sentezleyerek Candida rugosa lipazı immobilizasyonunda katkı materyali olarak kullanmışlar. Elde ettikleri enkapsülasyonu rasemik arilpropiyonik asit enantiyoseçimli tepkimelerinde kullanmışlar ve enantiyoseçimliliği E=297, ee ise %89 bulmuşlardır. Kaliks(aza)crows destek maddelerinin ise 6 kullanımdan sonra kalan dönüşüm yüzdesinin %18 olduğunu gözlemlemişlerdir.



Şekil 2.6. Propiyonik asit metil esteri hidrolizi

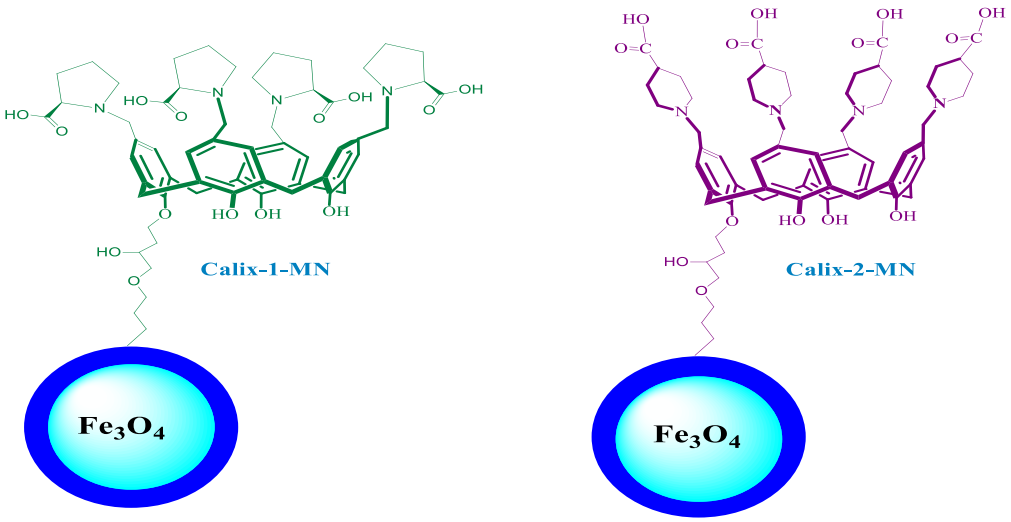
Ozyilmaz ve Sayin (2013), yaptıkları çalışmada manyetik Fe_3O_4 nanopartükülüne bağlı kaliks[4]aren'in dipridin türevini, *Candida Rugosa Lipaz* ile immobilizasyonunda katkı maddesi olarak kullanmışlar. İmmobilize lipazın, *p*-nitro fenil palmitatın (*p*-NPP)

hidrolizi ile aktivitesi tayin edilmiş ve bu immobilize lipaz rasemik naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidroliz tepkimelerinde kullanılmıştır. İmmobilize lipazın katalitik akitivitelerinin ve enantiyoseçiciliğinin (E>400) yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 2.7).



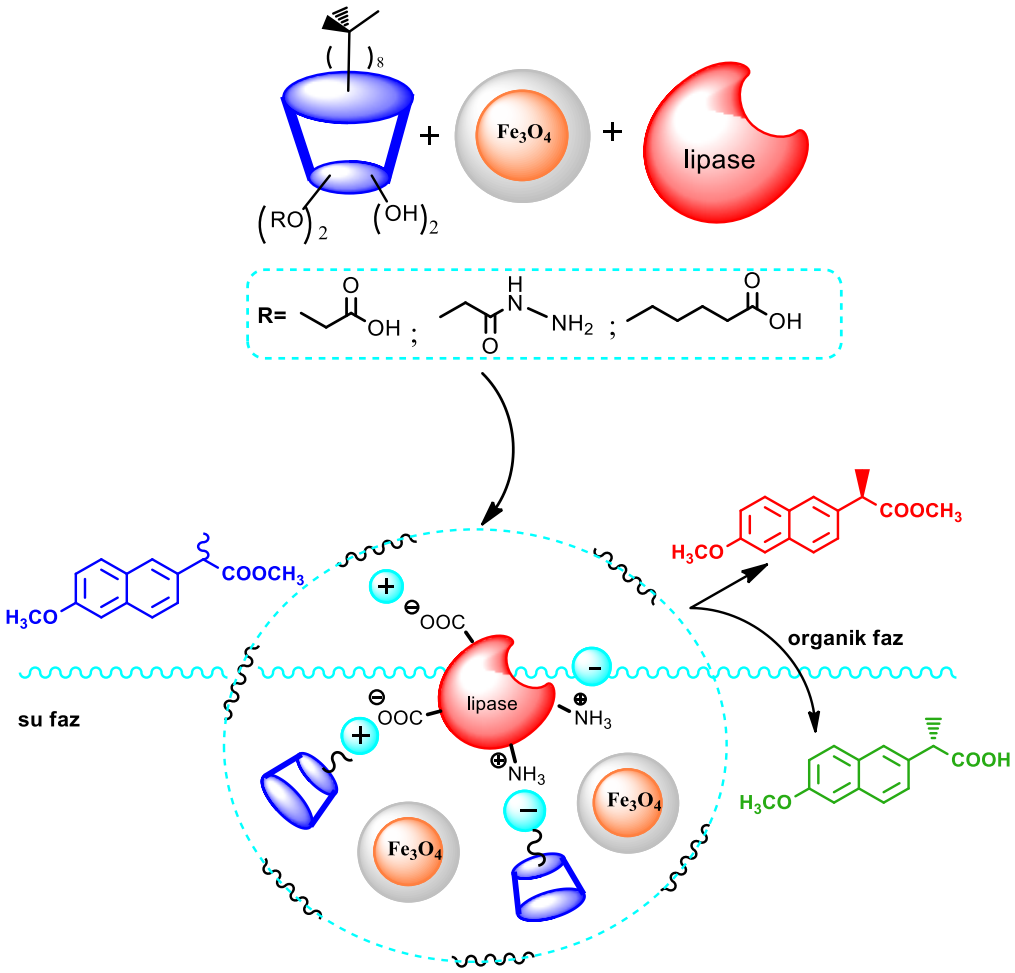
Şekil 2.7. Naproksen metil esterinin ekstraksiyon ile ayrılması

Akceylan ve ark. (2013), Fe_3O_4 nanopartikülü immobilize edilmiş kaliks[4]aren karboksilik asit türevlerinin *Candida Rugosa Lipazı*, sol-jel metoduna göre immobilize etmişlerdir. İmmobilize lipaz, *p*-nitro fenil palmitatın (*p*-NPP) ve naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizinde kullanılmıştır. İmmobilize lipazların (E=373, E=381) serbest enzime (E=137) daha yüksek enantiyoseçimliliğe sahip olduğu görülmüştür (Şekil 2.8).



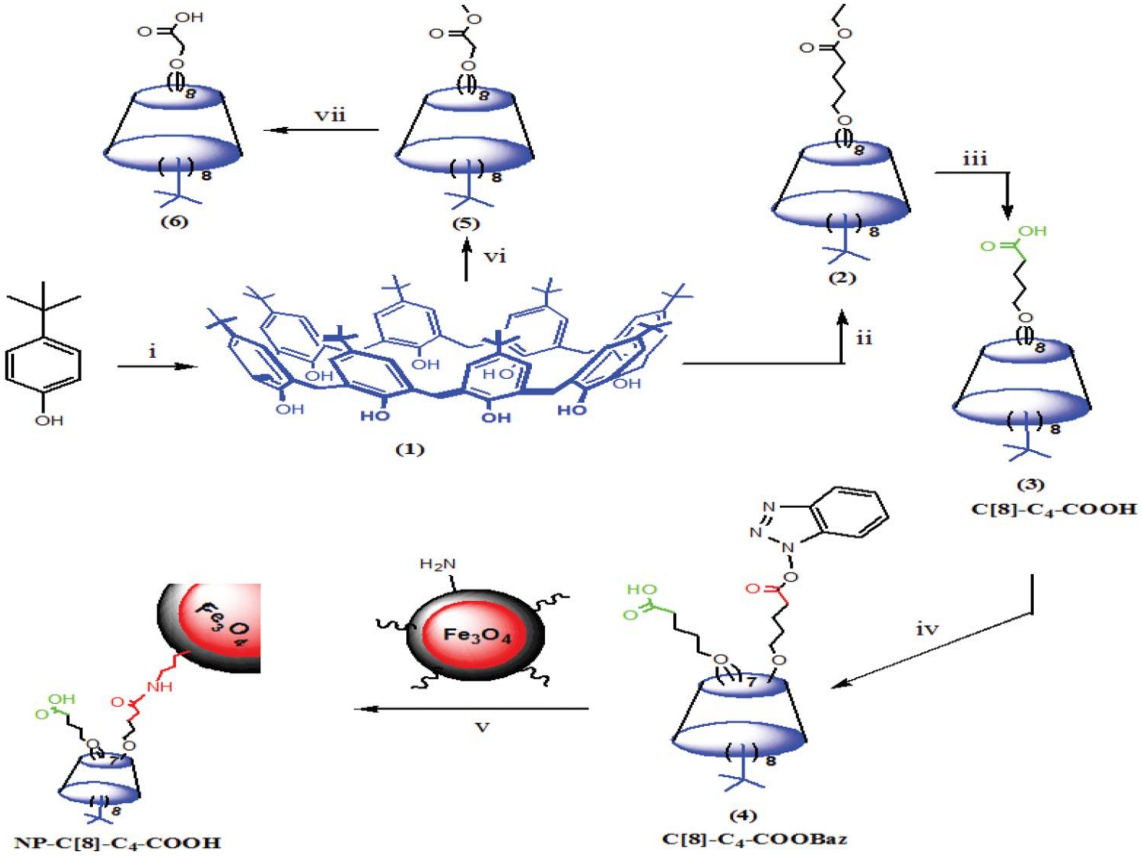
Şekil 2.8. Kaliks[4]aren karboksilik asit türevlerinin manyetik Fe_3O_4 nanopartilülüne bağlanması

Akoz ve ark. (2014), kaliks[8]aren valerik asit ve Fe_3O_4 manyetik nanopartikülleri varlığında *Candida Rugosa Lipazı* sol-gel tekniğine göre immobilize ederek rasemik naproksen metil esterinin enantioseçimli tepkimelerinde kullanılmışlardır. İmmobilize lipazın (E=371) serbest enzime (E=126) daha yüksek enantiyoseçimliliğe sahip olduğu görülmüştür (Şekil 2.9).



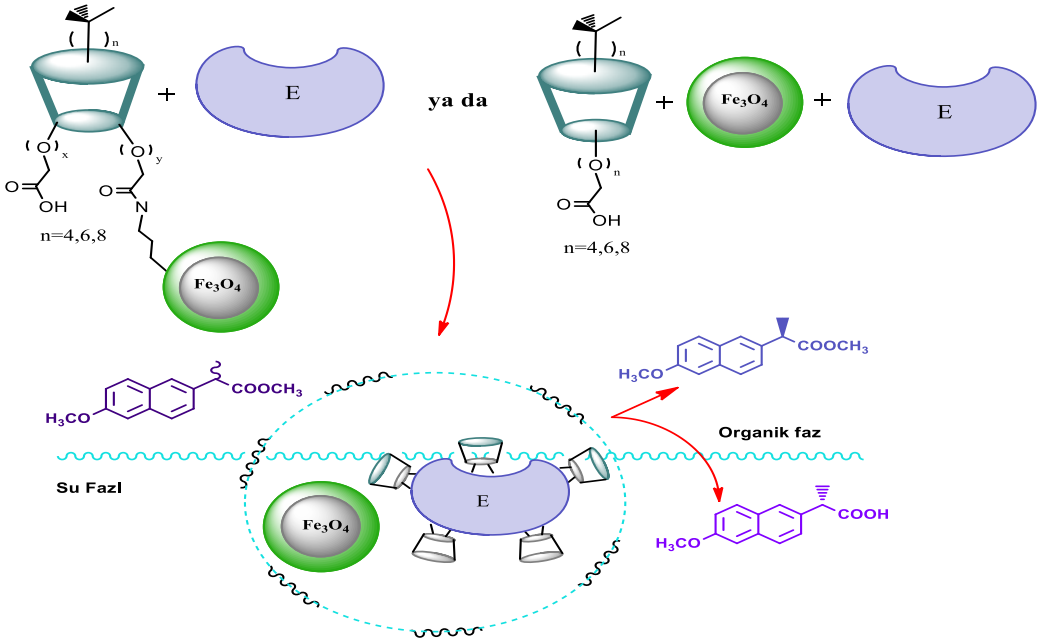
Şekil 2.9. Manyetik nanopartikül kaliks[8]aren valerik asit türevinin lipaz ile hidrolizi

Sayın ve ark. (2014), kaliks[8]aren valerik asiti seçimli olark demiroksit nanopartikülüne kovalent yoldan bağladıktan sonra hem bu materyali hem de p-ter-bütil-kaliks[4]aren valerik asidi katkı öaddesi olarak *Candida Rugosa Lipazın* immobilizasyonunda kullandılar. Rasemik naproksen metil esterinin katalizlenmesi ve enantioseçimliliğini araştırmışlar manyetik nanopartükül bağlı materyalin (E=371) p-ter-bütil-kaliks[4]aren valerik asitten (E=150) ve serbest enzimden (E=137) daha yüksek enantiyoselektivite gösterdiğini bulmuşlardır.



Şekil 2.10. Fe_3O_4 nanopartikülü katkılı Kaliks[8]aren valerik asit hazırlanması ve reaksiyon koşulları

Bir başka çalışmada Akoz ve ark. (2014), farklı kaliks[4]aren karboksilik asit türevlerini hem demiroksit nanopartüküllere kovalent yoldan bağlayarak hem de katkı maddesi olarak sol-gel metoduyla lipaz enziminin immobilizasyonunda kullanarak rasemik naproksen metil esterinin enantiyoseçimliliğini araştırmışlardır. Sonuç olarak İmmobilize lipazın (E=224) serbest enzime (E=137) daha yüksek enantiyoseçimliliğe sahip olduğu görülmüştür (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Kaliks[n]aren karboksilik asit ve manyetik nanopartiküllerinin lipaz enkapsilasyonu

Sunulan bu çalışmada bu zamana kadar yapılanlardan farklı olarak p-ter-bütil-kaliks[4]arenin alkil tiyol, alkil-1,2-ditiyolan ve halkalı disülfit bileşikleri sentezlenerek benzer şekilde lipaz immobilizasyonunda kullanıldılar. İmobilize edilen lipazlar rasemik flurbiprofenin enantiyoseçimli tepkimesinde kullanıldı.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1.Enstrümantal Teknikler

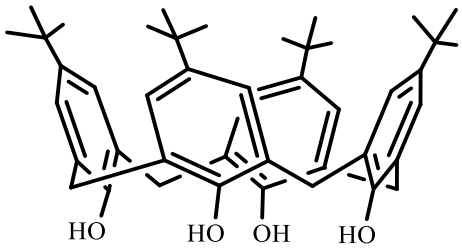
Sentez tepkimelerinin ilerleyişi TLC silika jel tabakasıyla (SiO_2, Merck 60 F_{254}) kaplanmış alüminyum plakalar kullanarak yapıldı. Kolon kromatografisi çalışmalarında silika jel 60 (Merck, tanecik büyüklüğü 0.040-0.063 mm, 230-240 mesh) kullanıldı. Sentezlenen bileşiklerin erime noktası tayini, EZ-Melt marka erime noktası tayin cihazı ile yapıldı. ^{1}H-NMR ve ^{13}C-NMR spektrumları, D_2O ve $CDCl_3$ içinde Varian 400 MHz spektrofotometre ile gerçekleştirildi ve spektrumlardaki kimyasal kayma değerleri (δ) ppm cinsinden belirtildi. FT-IR spektrumları ATR problu Perkin Elmer 1605 FTIR System Spectrum spektrofotometresinden alındı. UV-Vis ölçümlerinde Shimadzu160A UV-visible spektrofotometresi kullanıldı. HPLC ölçümleri Chiralcel OD-H (25 cm, 4.6 mm) kiral kolonu kullanılarak Agilent 1200 HPLC modeli ile gerçekleştirildi. HPLC de kullanılan çözücüler ve analitler HPLC saflıkta olup Merck' ten temin edildi. Santrifüj işlemleri Sigma 2-16 PK soğutmalı santrifüj cihazı ile yapıldı. Tüm sulu çözeltiler, Millipore Milli-Q Plus su arıtma cihazıyla saflaştırılan saf su ile hazırlandı. Sentez işleminde kullanılan başlangıç materyalleri ve reaktifleri analitik saflıkta Merck, Sigma-Aldrich ve Fluka firmalarından temin edilerek kullanıldı. İmmobilizasyon işlemlerinin kuruma basamağı Labconco marka Liyofilizatör içerisinde -45 ^{0}C ve yüksek basınç altında gerçekleştirildi.

3.2.Kimyasal Sentezler ve Karakterizasyon

Bu tez çalışmasında sentezlenen bileşikler literatürde bulunan metotlara göre hazırlandı ve bazıları daha önceki metotların modifiye edilmesiyle elde edildi. Aşağıda bu çalışmada kullanılan **1-7** nolu bileşiklerin genel sentetik prosedürleri verildi.

3.2.1. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,26,27,28-tetrahidroksikaliks[4]aren (Gutsche, 1990)

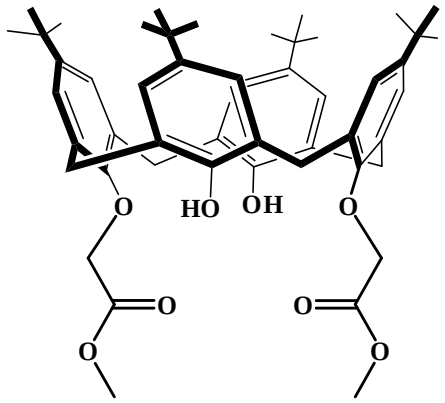
1 L'lik çift boyunlu bir balona, 50 g (0.665 mol) *p*-*t*-bütilfenol, 31.15 mL (0.83 mol) %37'lik formaldehit ve 0.6 g (0.03 mol) NaOH alınarak karışıtırılır. Reaksiyon karışımı, sıcaklığı 110-120 ^{o}C da sabit tutularak mantolu ısıtıcı ile ksilol cihazı takılı bir geri soğutucu sisteminde azot gazı altında 1.5-2 saat ısıtılır. Bu süre içerisinde reaksiyon karışımı beyaz viskoz bir halden önce turuncu renge daha sonra katı sarı bir kütleye dönüşür. Katı sarı kütlenin oluşmasıyla reaksiyon ortamı oda sıcaklığına kadar soğutulup 400-500 ml difenil eter ilave edilip 1 saat oda sıcaklığında karıştırılır. Azot girişi ve ksilol cihazı takıldıktan sonra karışımın berraklaşması için suyun ortamdan tamamen uzaklaşması sağlanır. Suyun tamamen uzaklaşmasından sonra karışım geri soğutucu altında 1.5-2 saat kaynatılır. Son kaynama süresinin tamamlanmasıyla reaksiyon karışımı oda sıcaklığına soğutulur, 400-500 ml etil asetat eklenerek en az 1 saat karıştırılır ve çökmenin tamamlanması beklenir. Oluşan beyazımsı çökelek süzülür ve renk berraklaşıncaya kadar (iki kez 100 mL) etil asetatla, bir kez 200 mL asetik asitle yıkanır. En son su ile pH nötr olana kadar yıkanır. Verim: 32.45 g (%64), E.n.: 342-344^{o}C, ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ 1.20 (s, 36H, Bu^t), 3.45 (d, 4H, Ar-CH_2-Ar), 4.25 (d, 4H, Ar-CH_2-Ar), 7.05 (s, 8H, ArH), 10.35 (s, 4H, -OH).



(1)

3.2.2. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,27-dimetoksikarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi kaliks[4]aren (Collins, 1991)

250 ml çift boyunlu balona, 5 g (7.71 mmol) *p-ter*-bütilkaliks[4]aren ve 1.279 g (9.4 mmol) K_2CO_3 yaklaşık 250 mL aseton içerisinde 70 ^{0}C de N_2 gazı altında 15 dakika karıştırılır. Daha sonra 1.56 mL (16.951 mmol) metil bromasetat damla damla ilave edildi ve 24 saat reflux edilerek karıştırıldı. Reaksiyon TLC ile takip edildi. Reaksiyon süresinin bitmesi ile soğutulan karışım süzülüp distillendi. Kalan katı etanol içerisinde kristallendirildi. Verim: % 73, E.n: 206-210 ^{o}C. IR: 3436 cm^{-1} (OH), 1755 cm-^{1} (C=O). ^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 0.97 ppm (s, 18H, Bu^t), 1.27 ppm (s,18H,Bu^t), 3.35 ppm (d, J = 13.1 Hz, 4H, $ArCH_2Ar$), 3.85 ppm (s, 6H, OCH_3), 4.48 ppm (d, J = 13.1 Hz, 4H, $ArCH_2Ar$), 4.75 ppm (s, 4H, OCH_2CO), 6.81 ppm (s, 4H, ArH), 6.97 ppm (s, 2H, ArOH),7.03 ppm (s, 4H, ArH).

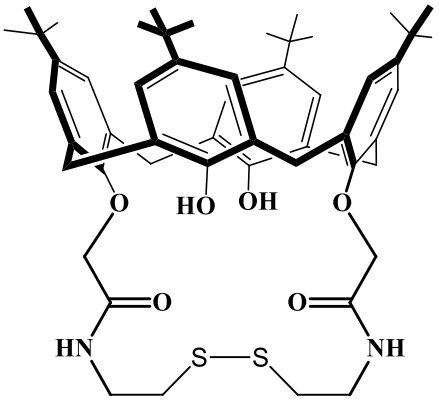


(2)

3.2.3. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,27-dimetoksikarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi kaliks[4]aren 2,2'- diaminodietildisülfit dihidroklorid Türevi (Debdeep, 2011)

250 ml çift boyunlu balona,1 gram (1,26 mmol) p-ter-bütilkaliks[4] aren di ester alınıp 40 ml metanol içerisinde çözünür. 100 ml'lik beher içerisine 5,67 gram (25,2

mmol) 2,2'- diaminodietildisülfit dihidroklorid alınıp üzerine eşdeğer oranda 3,5 ml (25,2 mmol) trietilamin eklenerek karışıtırılır. Tamamen çözününce p-ter-bütilkaliks[4] aren di ester yavaş yavaş ilave edilir. Reaksiyon 48 saat süre bir geri soğutucu altında etkileştirilir. TLC ile IR ile takip edilir. IR de diester pikinin (1755 cm^{-1}) kaybolması ile reaksiyon sonlandırılıp soğutulur. Soğutulan karışıma 1 M lık 100 ml HCl çözeltisi ilave edilerek çökme işlemi gerçekleştirilir. Çöken katı kısım süzülürek alınır ve saf su ile nötr olana kadar yıkanır. Verim: %72, E.n: 224-227 ^{0}C. IR: 1475 cm^{-1} (O=C-N), 549 cm^{-1} (S-S). ^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 0.92 ppm (s, 9H, Bu^t), 1.07 ppm (s, 9H,Bu^t), 1.32 ppm (s, 9H, Bu^t), 1.36 ppm (s, 9H, Bu^t), 3.00 ppm (t, J = 5.4 Hz, 4H, CH_2NH), 3.45 ppm (d, J= 13.4 Hz, 4H, $ArCH_2Ar$), 3.87 ppm (yayvan t, 4H, CH_2SH), 4.20 ppm (d, J=13.3 Hz, 4H, $ArCH_2Ar$), 4.64 ppm (ds, 2H, SH), 4.69 ppm (s, 2H O-CH_2-O), 6.78 ppm (s, 2H, CH_2), 6.97 ppm (s, 2H, CH_2), 7.13 ppm (s, 2H, CH_2), 7.19 ppm (s, 2H, CH_2), 7.78 ppm (s, 2H, OH), 8.42 ppm (t, J=4.76 Hz, 2H, NH),

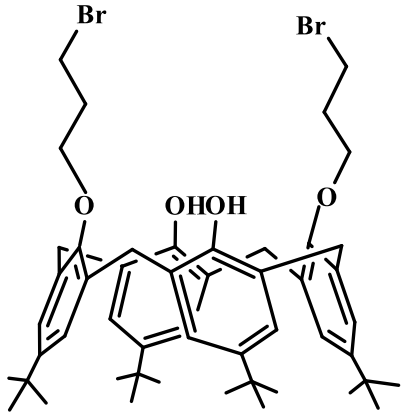


(3)

3.2.4. 25,27-Bis(2-bromoetoksi)-26,28-dihidroksi-5,11,17,23-tetra(ter-bütil)-kaliks-[4]aren (Li ve Ark..1999)

250 mL 'lik iki boyunlu balona N_2 atmosferi altında p-ter-bütilkaliks[4] aren (3.23 g 5.0 mmol), K_2CO_3 (1.52 g 11.0 mmol) ve 1,3-dibrompropan (10.1 g, 0.05 mol) alınır ve üzerine 125 mL kuru CH_3CN ilave edilir. Oluşan süspansiyon dört gün geri soğutucu

altında kaynatılır. İTK ile izlenerek bitirilen reaksiyon oda sıcaklığına getirilir ve çözücü uçurulur. 50 mL CH_2Cl_2 ile katının çözünmesi sağlanır. Ardından önce 50 mL 3M HCl sonra 50 ml 0.5 M HCl çözeltisi ile ekstraksiyon yapılır. Organik faz $MgSO_4$ üzerinden kurutulur ve süzülür. Daha sonra CH_2Cl_2 tamamen uçurularak elde edilen kalıntı 2 defa 10 mL EtOH ile yıkanır. Kalan katı 40 ml CH_2Cl_2 de tekrar çözülür ve çözünmeyen safsızlıklar süzülerek uzaklaştırılır. Süzüntü 25 ml ‘ ye kadar konsantre hale getirilir. Elde edilen katı $CHCl_3$/MeOH karışık çözücü sisteminden yeniden kristallendirilerek beyaz kristal olarak elde edilir. (Li ve ark., 1999). Verim 2.05 g (%70). E.N.: 289 ^oC (Lit., 288 – 290 ^oC). ^1H NMR ($CDCL_3$): δ (ppm) 1.00 (s, 18H, C(*CH*$_3$)$_3$, 1.28 (s, 18 H C(*CH*$_3$)$_3$), 2.52 (p, 4H, *J*= 6.0 Hz, $BrCH_2CH_2OAr$) , 3.32 (d, 4H, *J*= 13.0 Hz, Ar*CH*$_2$AR), 3.99 (t, 4H, *J*= 6.5 Hz, C*H*$_2$Br), 4.10 (t, 4H, *J* =5.3 Hz, C*H*$_2$O), 4.26 (d, 4H, *J*= 13.0 Hz, $ArCH_2Ar$), 6.86 (s, 4H,Ar*H*), 7.07 (s,4H,Ar*H*,) 7.55 (s, 2H ,ArO*H*).

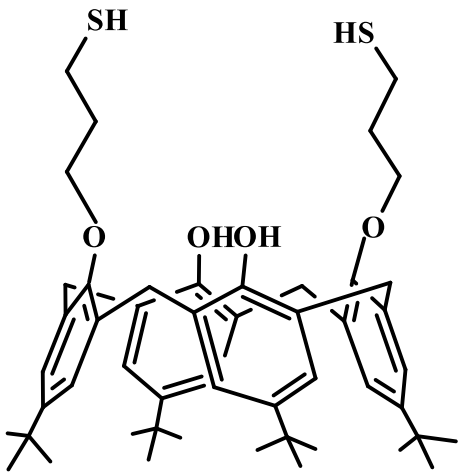


(4)

3.2.5. 25,27-Bis(3-tiyopropoksi)-26,28-dihidroksi-5,11,17,23-tetra(ter-bütil)-kaliks-[4]aren

0.5 g (0.561 mmol) 25,27-Bis(2-bromoetoksi)-26,28-dihidroksi-5,11,17,23-tetra(ter-bütil)-kaliks-[4]aren ve 0.14 g, (1.88 mmol) tiyoüre , 40 mL CH_3CN içerisinde geri soğutucu altında refluks edildi. Reaksiyona 45 saat devam edildi. Reaksiyon İTK ile izlendi (CH_2Cl_2/hekzan,1:1). Reaksiyon sonunda çözücü kuruluğa kadar evapore edildi ve karışıma 0.19 g KOH (3.423 mmol) in 40 ml sudaki çözeltisi ilave edilerek 2

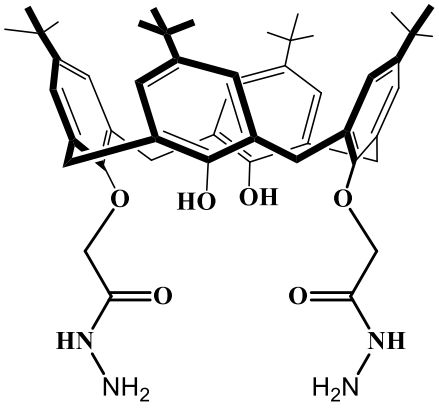
saat süre ile refluks edildi. Ürün karışımı önce 1 M HCl ile yıkanıp daha sonra $CHCl_3$ ile ekstrakte edildi. Kuru $MgSO_4$ ile kurutuldu. Verim:% 55 EN: 203–205 ^oC. ^{1} H NMR (400 MHz $CDCl_3$): d 1.19 (s, 18H, but), 1.22 (s, 18H, but), 1.57–1.69 (m, 2H, –SH), 2.42–2.48 (m, 4H, $–CH_2–$), 3.24 (t, 4H, J = 8.0 Hz, $–CH_2–S$), 3.38 (d, 4H, J = 12.8 Hz, Ar– $CH_2–Ar$), 4.01 (t, 4H, J =4.8 Hz, $–CH_2–O$), 4.23 (d, 4H, J = 12.8 Hz, $Ar–CH_2–Ar$), 7.01 (s, 4H, ArH), 7.07 (s, 4H, ArH), 9.13 (s, 2H, –OH).



(5)

3.2.6. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,27-dihidrazonamid karbonilmetoksi-26-28-dihidroksi-kaliks[4]aren (Maity, 2011)

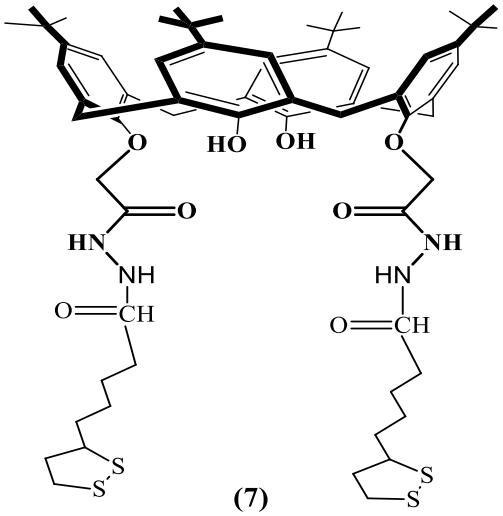
5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,27-metoksikarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi kaliks[4]aren (**2**) bileşiği (0.79 g, 1 mmol) ve 2 mL 80 % hidrazin hidrat çözeltisi kloroform/metanol (1:3, 60 mL) karışımında 12 saat karıştırılarak kaynatılır. Bu süre sonunda çözücü uzaklaştırılır. Destile suda çöktürülür. Süzülen katı madde su ve metanol ile yıkanır, vakumda kurutulur. Verim 0.71 g (% 90), E.n: 245-246 ^oC. IR: 1689 cm^{-1} (C=O). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 1.27 (s, 18H, Bu^t), 1.02 (s, 18H, Bu^t), 3.44 (d, 4H, *J* = 13.5 Hz, $ArCH_2Ar$), 4.11 (d, 4H, *J* = 13.5 Hz, $ArCH_2Ar$), 4.65 (s, 4H,$–OCH_2CO$), 6.93 (s, 4H, Ar-H), 7.08 (s, 4H , Ar-H), 7.80 (s, 2H, –CONH), 9.70 (s, 2H, –OH).



(6)

3.2.7. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-26,28-dihidroksi kaliks[4]aren 25,27-dihidrazonamid karbonilmetoksi-26-28-dihidroksi-kaliks[4]aren Lipoik Asit Türevi (Yu, 2007)

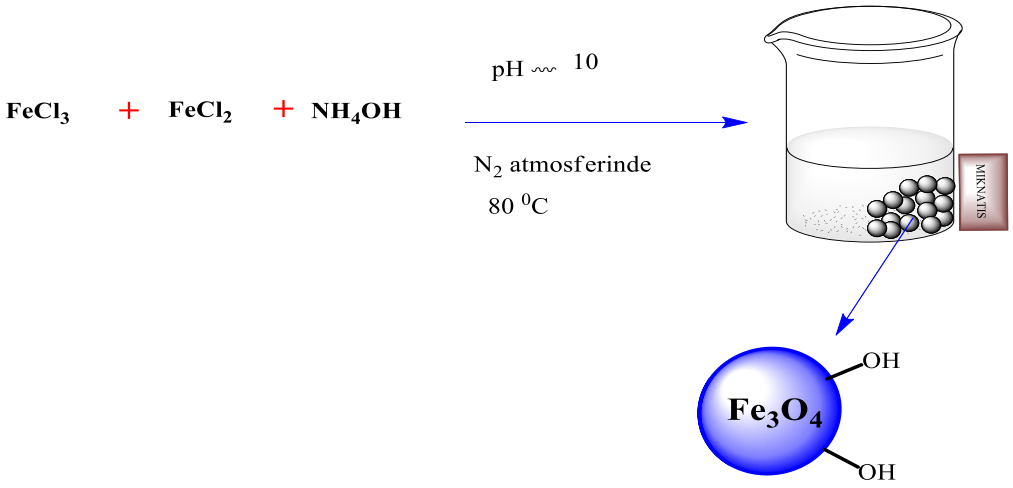
250 mL'lik tek boyunlu balona 0.219 gram (1.06 mmol) DCC, 0.143 gram (1.06 mmol) HOBT, 0.215 gram (1.06 mmol) Lipoik asit 150 mL DMF içerisinde oda sıcaklığında yaklaşık 45 dakika karıştırılır. Karışımın üzerine 0.4 gram (5.04 mmol) kaliks[4]aren hidrazin **(6)** türevi ilave edilir. Reaksiyon oda sıcaklığında 72 saat karıştırılır. Reaksiyon süresi sonunda İTK ile kontrol edilerek sonlandırılır. Daha sonra çözücü vakum altında uçurularak üzerine 50 mL EtOAc (etilasetat) eklenir. %10' luk 3x30 mL $NaHCO_3$ ile yıkanır. EtOAc fazı alınarak 3x30 mL %100 luk HCl ile yıkanır. Destile su ile nötral hale getirilir. Organik faz $MgSO_4$ ile kurutulup çözücü uçurulur. Verim 0.27 g (%68). E.n: 228-230 ^oC. IR: 1689 cm^{-1} (C=O), 486 cm^{-1} (S-S). ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 1.05 (s, 18H, Bu^t), 1.25 ppm (s, 18H, Bu^t), 1.75-1.66 ppm (yayvan, 8H, S-CH_2- CH_2), 1.99- 1.90 ppm (yayvan, 4H, CH_2- CH_2- **CH_2**), 2.88 ppm (yayvan, 2H, CH_2- **CH_2**), 2.94 ppm (yayvan, 2H, CH_2- **CH_2**), 3.25 ppm (s, CH_2- **CH**-CH_2), 3.58 ppm (d, 8H J=11.9 Hz, Ar-CH_2-Ar), 4.27 ppm (d, J=12.53 Hz, 4H, Ar-CH_2-Ar), 4.39-4.15 ppm (yayvan, 4H, O=C- **CH_2**-CH_2), 4.77 ppm (s, 4H, O- CH_2), 7.01 ppm (s, 4H, Ar- CH_2), 7.14 ppm (s, 4H, Ar- CH_2), 7.45 ppm (s, 2H, OH), 8.06 ppm (s, 2H, NH-NH), 8.2 ppm (s, 2H, NH-C=O).



(7)

3.2.8. Manyetik Fe_3O_4 nanopartikülünün sentezi (Zeng, 2005)

Fe^{2+} ve Fe^{3+} iyonları birlikte çöktürülerek Fe_3O_4 nanopartikülleri hazırlanmaktadır (Young ve ark. 2008). Bunun için 1,0 M $FeCl_2$ ve 1,75 M $FeCl_3$ çözeltilerinden 1:1 oranında alınır. Daha sonra bu iki karışım 250 ml'lik üç boyunlu reaksiyon balonuna aktarılır ve karışım geri soğutucu altında N_2 atmosferinde 60 ^oC ye kadar ısıtılır. Reaksiyon ortamı 60 ^oC ulaştığında % 25 (W/%) NH_4OH ile pH ~ 10-11'e ayarlanır. Ortam bazik olduğunda demir oksit partikülleri oluşur ve reaksiyon ortamı koyu kahverengi renge bürünür. Daha sonra reaksiyon 80 ^oC de 1 saat geri soğutucu altında reflaks edilir. Reaksiyon sonunda oluşan manyetik nanopartiküller bir mıknatıs yardımıyla su içerisinden alınıp ve yine deiyonize su ile pH nötral oluncaya kadar yıkanır. Nanopartiküller vakumlu etüvde 70 °C'de 12 saat kurutulur. Koyu kahverengi Fe_3O_4 partikülleri elde edilmiş olunur (Şekil 3.1). FTIR: (Fe_3O_4) Fe-O bandı 590 cm^{-1}'de gözlemlenir (Yılmaz, 2010).



Şekil 3.1. Manyetik Fe_3O_4 nanapartikül oluşumu

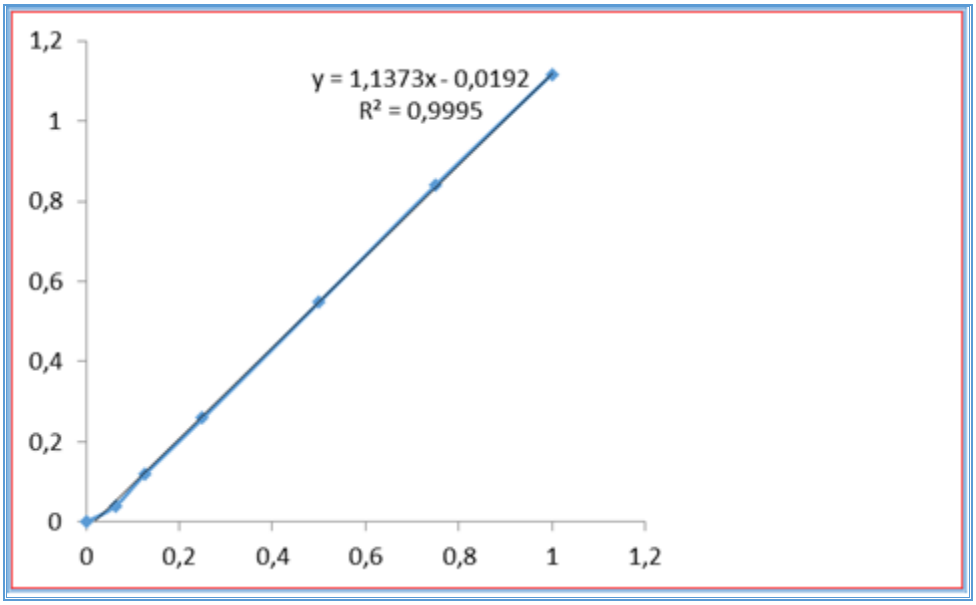
3.2.9. Sol-gel metoduna göre Lipaz İmmobilizasyonu

- **Kaliksarenlerin Sol-jel tutuklama metodu (Reetz, 2003)**

367,5 mg *Candida rugosa* lipazı, 2.34 mL 0,05 M, pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde inkübatör içerisinde homojen olana kadar karıştırıldı. Homojenlik sağlandıktan sonra karışıma 0,3 g kaliksaren, 0,3 g Fe_3O_4 ilave edilip aynı şekilde homojenlik sağlanıncaya kadar inkübatörde karıştırıldı. Daha sonra sıra ile (%4 w/v) 600 µL polivinil alkol, 300 µL NaF çözeltisi (0,1 M) ve 600 µL isopropil alkol ilave edilerek homojenize sağlandı. Tamamen homojen olunca 690 µL tetrametoksisilan (TMOS, 0,5 mmol) ve 4716 µL oktil trietoksisilan (2,5 mmol) eklenip karıştırılır. Oluşan bu jelatimsi karışım +4°C de buzdolabında ağzı açık şekilde bir gece bekletilir. Ertesi gün öncelikle 10 mL distile su ile daha sonra 10 mL izopropil alkol ile yıkandı. Yıkama çözeltileri birleştirilerek toplam hacim ölçüldü. Süzüntü Bradford metoduna göre protein tayininde kullanıldı. Daha sonra yıkanan jelimsi karışım liyofilizatörde kurutuldu.

- **Protein miktarı (Bradford, 1976)**

Serbest ve immobilize lipaz içerisindeki protein miktarı Bradford metoduna göre bulunur. Bu metodda standart olarak Bovin serum albumin (BSA)'in farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlanır. Bu çözeltilerin 0,1 mL'si 3 mL Bradford reagent (Coomassie Brilliant Blue G-250) ile etkileştirilip 595 nm dalga boyundaki absorbansları ölçülür. Standart olarak, absorbans-protein miktarı (mg/ml) grafiği çizilir ve yapılan protein çalışmalarında bu grafik referans alınır (Şekil 3.2).

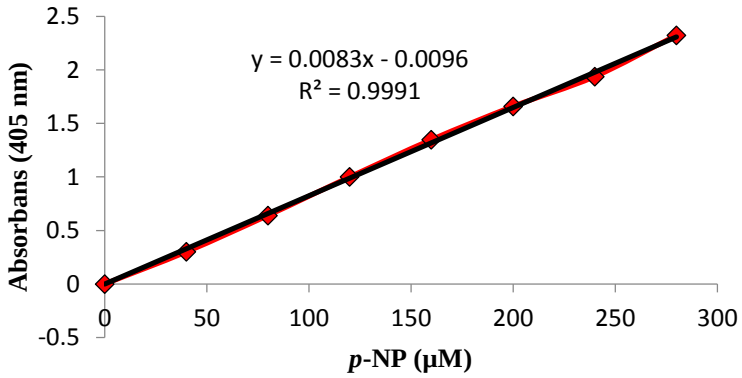


Şekil 3.2. Standart protein miktarı (mg/ml)- absorbans grafiği (λmax =595 nm)

- **Aktivite Tayini (Hung, 2003; Chiou, 2004)**

Belli miktarda (0,1 g) alınan serbest lipaz veya immobilize lipaz 1 mL fosfat tampon çözeltisi (pH 7,0) içerisine eklenip daha sonra 2-propanol içerisinde hazırlanan 14,4 mM'lık *p*-NPP çözeltisinden 1 mL ilave edilerek oda sıcaklığında 5 dk karıştırılır. 5 dakika sonra reaksiyon 2 mL 0,5 N Na_2CO_3 eklenerek durdurulur. Karışım santrifüj

edilerek, enzimatik aktivite UV-visible spektrofotometresinde açığa çıkan *p*-nitrofenol'ün (*p*-NP) 405 nm dalga boyundaki absorbansı ölçülerek bulunur. Bu absorbans değeri standart olarak çizilen *p*-NP (mol/litre) kalibrasyon grafiğinde yerine konularak açığa çıkan *p*-NP'ın miktarı spektrofotometrik olarak tespit edilir. Dakikada 1 µmol *p*-NPP hidroliz etmek için gerekli olan lipaz miktarına lipazın 1 Unit (U)'i denir. Bu verilerden yararlanılarak serbest ve immobilize lipazların aktiviteleri belirlenir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Standart *p*-NP (*p*-nitrofenol)- absorbans grafiği (*λmax=405 nm*)

- **Optimum pH tayini**

Farklı pH değerlerinde (pH 4,0-9,0) serbest ve immobilize enzim, 50 mM sodyum fosfat tamponunda bir saat inkübe edilip standart ölçüm koşullarında aktivite ölçümleri yapılarak enzimin aktifliğine pH'ın etkisi incelendi.

- **Optimum sıcaklık tayini**

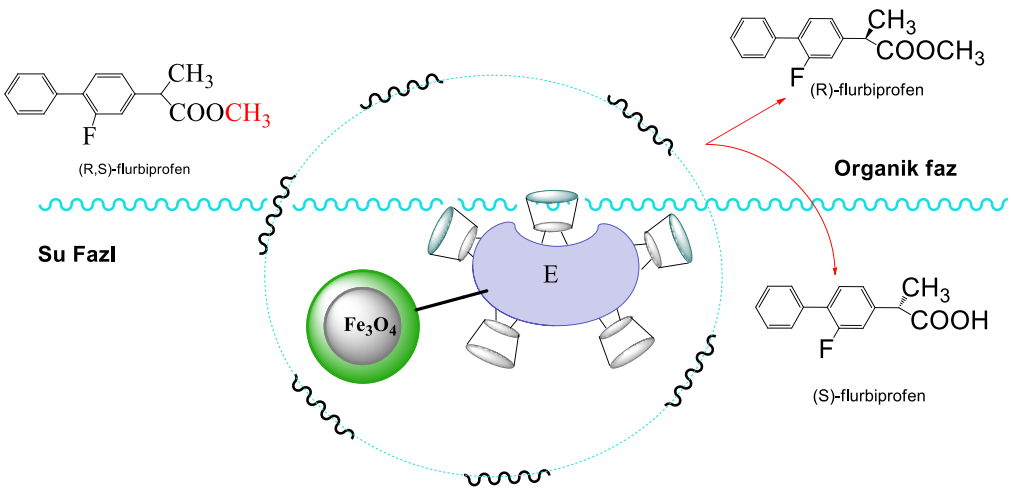
Serbest ve immobilize enzimin aktifliğine, sıcaklığın etkisini incelemek amacı ile serbest ve immobilize enzim farklı sıcaklıklarda (25-50^{o}C) fosfat tamponu içinde 20 dk karıştırılıp 25 ^{0}C'ye soğutulur. Daha sonra aktivite tayin edilerek sıcaklığın etkisi incelendi.

3.2.17. HPLC çalışmaları

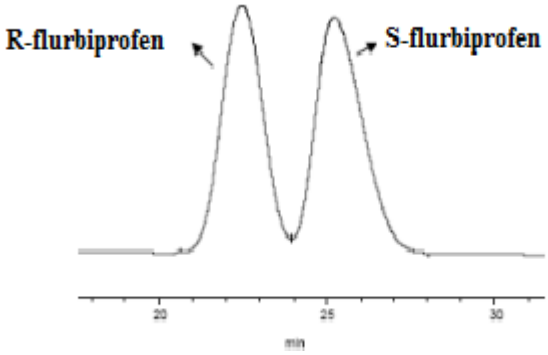
- **Enantioseçimli Tepkimelerin Genel Prosedürü (Cernia, 2002)**

5 mL'lik vial içerisine 2 mL serbest enzim çözeltisi (0,781mg/mL, pH 7.0, 0,05 M fosfat tamponu) ya da serbest lipaz'a eşdeğer Unit'de immobilize lipaz konulur. Daha sonra üzerine 100 µL (R/S)-Flurbiprofen metil esterinin izooktandaki çözeltisi (20 mM) ilave edilir, farklı süre ve farklı sıcaklık değerlerinde inkübatör içerisinde karıştırılır. Daha sonra karışım üzerine 2 mL izooktan eklenerek ekstraksiyon yapılır. İzoktan fazına alınan numune, HPLC cihazına verilerek (R/S)-Flurbiprofen metil esterinin (R)-Flurbiprofen ya da (S)-Flurbiprofen'e dönüşüm oranı belirlenir.

Bunun için kiral bir kolon olan Chiralcel OD-H kolon kullanılmış, n- hekzan / 2-propanol /trifloroasetikasit 100/0.1/0,1 (h/h/h) oranındaki taşıyıcı fazında 1 ml/ dk akış hızında ve UV dedektörde (λ = 254 nm) değerlendirildi. (Şekil 3.4).



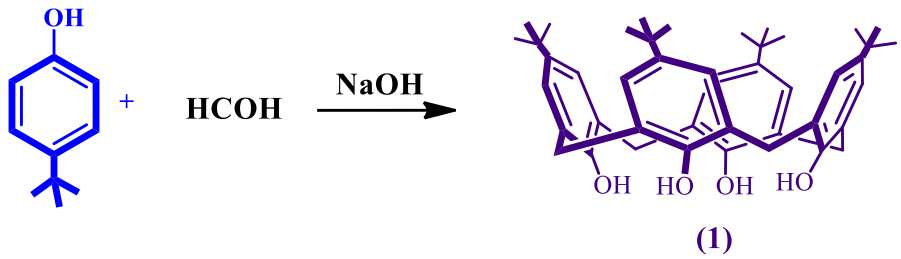
Şekil 3.4.(R/S)-Flurbiprofen metil ester



Şekil 3.5. (R/S-flurbiprofen) bileşiğin HPLC diyagramı

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

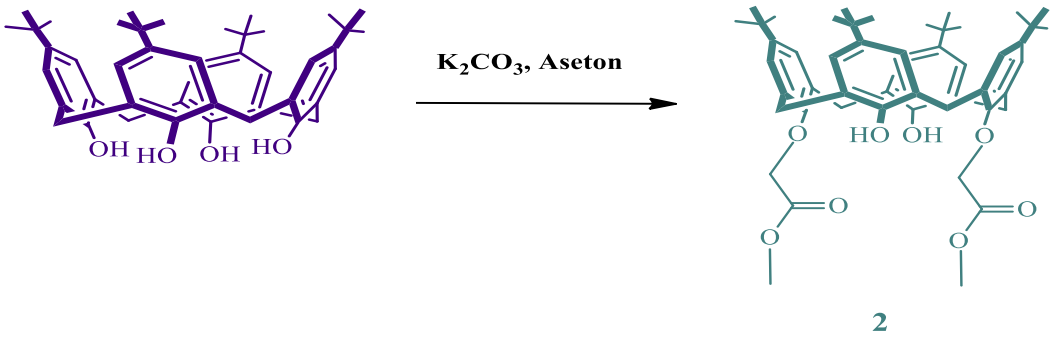
Supramoleküler kimyada taç eterler ve siklodekstrinler, birinci ve ikinci kuşak supramolekülleri oluştururken, halkalı yapıda bir fenol-formaldehit oligomeri olan kaliksarenler, üçüncü kuşak supramoleküller olarak tanımlanmaktadırlar. Kaliksarenler halkalı yapıda olması, kolay sentezlenmesi, kolay türevlendirilmesi ve farklı büyüklükte molekül boşluğu oluşturabilmesi sebebiyle son yıllarda konuk-konak kimyasında önemli bir çalışma alanı olmuştur. Bu zamana kadar lipaz immobilizasyonunda karboksil, amino, nitro, piridin, hidrazin grubu taşıyan kaliksarenler katkı materyali olarak kullanılaraketkileri incelendi. Bu çalışmada tiyol grubu taşıyan kaliks[4]aren türevlerini sentezleyerek, bazı profen türü (flurbiprofen) ilaçlarla lipaz katalizli enantiyoseçimli tepkimelerin çalışmasında kullanılmaktadır.



(1)

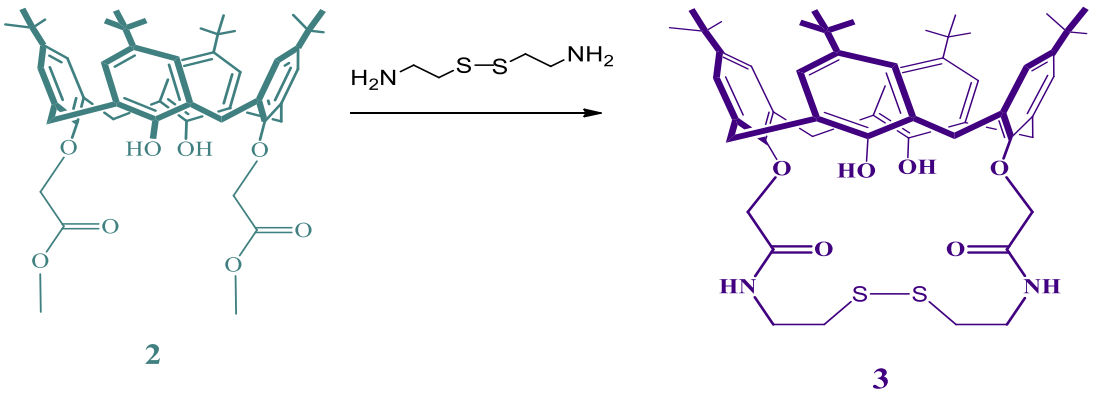
Şekil 4.1. *p-ter*-bütilkaliks[4]aren (**1**)

Bu amaçla başlangıç maddesi olan *p-ter*-bütilkaliks[4]aren (**1**) literatüre (Gutsche 1990) göre sentezlenerek yapısı spektroskopik yöntemlerle aydınlatıldı. ^{1}H-NMR spektrumunda δ: 3.45 ppm'de ve δ: 4.25 ppm'de görülen dublet 4 protonun ArC**H**$_2$Ar grubuna ait olduğu gözlendi. Bu sonuçlar *p-ter*-bütilkaliks[4]aren'in oluştuğunu doğrulamaktadır.



Şekil 4.2. *p-tert*-bütilkaliks[4]aren diester **(2)** reaksiyonu

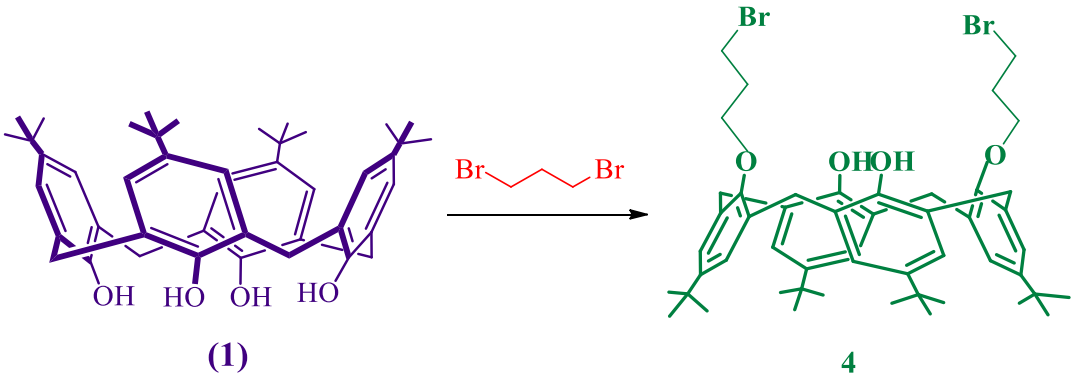
Sentezlenen *p-tert*-bütilkaliks[4]aren, literatüre göre (Collins, 1991) metil brom asetat ile K_2CO_3 varlığında kuru aseton içerisinde etkileştirilerek *p-tert*-bütilkaliks[4]aren diester **(2)** türevlerine dönüştürüldü. Bileşiğin F-TIR spektrumunda 1755 cm^{-1} de ester karboniline ait bandın gözlenmesi ve ^{1}H-NMR spektrumunda δ: 3.85 ppm'de görülen singlet 6 protonun OC**H**$_3$ grubuna, δ: 4.75 ppm'de görülen singlet 4 protonun OC**H**$_2$CO grubuna ait olduğu gözlenmesi diester türevinin oluştuğu doğrulamaktadır (Ek:1).



Şekil 4.3. 3 nolu bileşiğin sentez tepkimesi

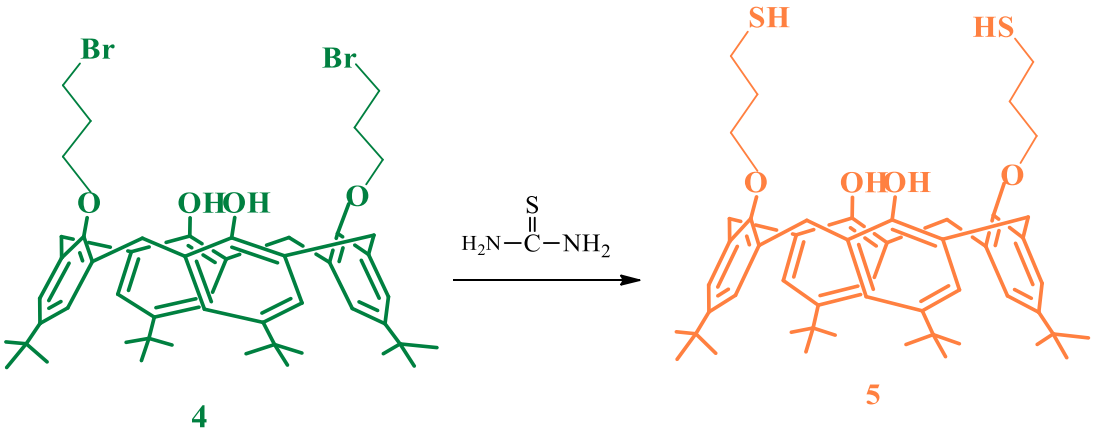
Sentezlenen *p-tert*-bütilkaliks[4]aren diester türevi **(2)**, literatüre göre (Debdeep, 2011) metanol ortamında 2,2-diaminodietildisülfit ile etkileştirilerek halkalı yapıda disülfan grubu taşıyan **(3)** numaralı madde elde edildi. Bu bileşiğin F-TIR spektrumunda 1755 cm^{-1} de gözlenen karbonil bandının kaybolup 1663 cm^{-1} de amid

karboniline ait bandın oluşması ve 1 H-NMR spektrumunda δ: 3.85 ppm'de görülen singlet 6 protonun O-C**H**$_3$ grubuna ait pikler kaybolup 3.00 ppm de triplet 4H CH_2-NH, 3.45 ppm'de triplet 4H Ar-CH2-Ar, 3.87 ppm'de triplet CH_2-S, 4.20 ppm'de dublet 4H Ar-CH_2, 8.42 ppm'de triplet 2H O=C-NH-CH_2 grubuna ait olduğunun gözlenmesi **(3)** numaralı maddenin olduğunu göstermektedir. (Ek:2)



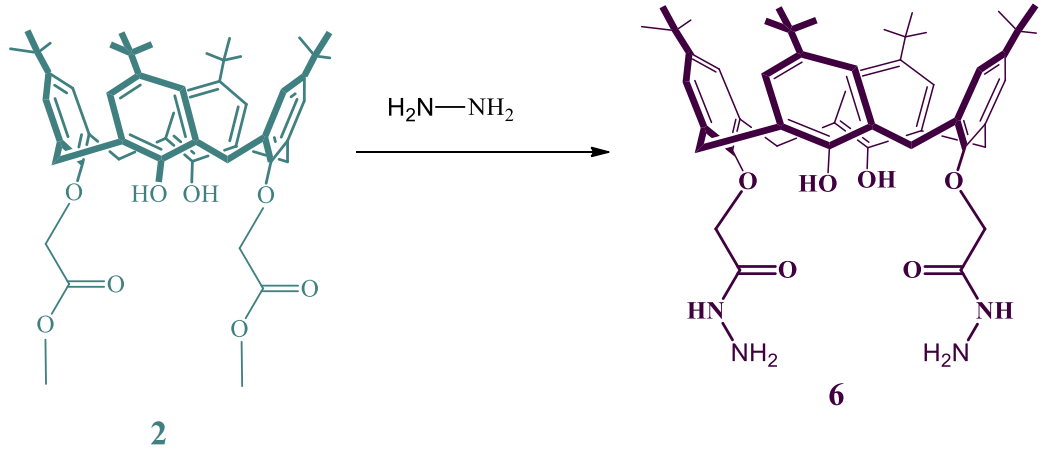
Şekil 4.4. *p-tert*-bütilkaliks[4]aren di brom **(4)** tepkimesi

p-tert-bütilkaliks[4]aren bileşiği 1,3-dibrom propan ile K_2CO_3 varlığında kuru asetonitril ortamında reaksiyona sokularak *p-tert*-bütilkaliks[4]aren di brom propil **(4)** türevi sentezlendi. Bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumunda δ: 2.52 pmm' de görülen pentet 4H Br-CH_2-**CH_2**-CH_2-O, 3.99 pmm'de görülen triplet 4 H **CH_2**Br gruplarına ait olduğu gözlendi. Bu sonuçlar dibrom türevinin oluştuğunu doğrulamaktadır. (Ek:3)



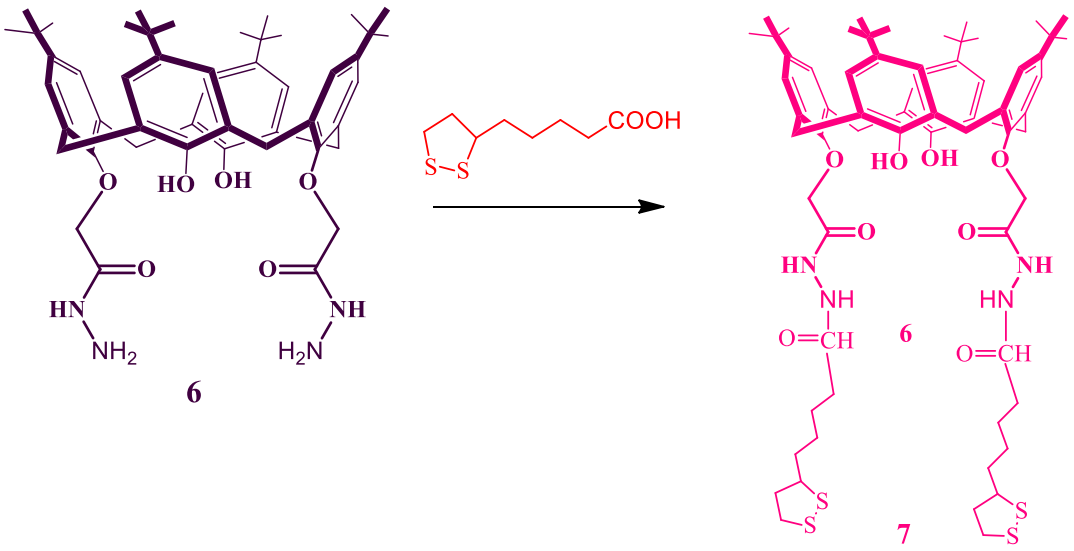
Şekil 4.5. Tiyol grubu bulunduran *p-tert*-bütilkaliks[4]aren **(5)** tepkimesi

p-tert-bütilkaliks[4]aren dibrom türevi, asetonitril ortamında tiyoüre ile tepkimeye sokularak tiyol grubu taşıyan 25,27-bis(3-tiyopropoksi)-26,28-dihidroksi-5,11,17,23-tetra(ter-bütil)-kaliks-[4]aren **(5)** bileşiği elde edildi. Bu bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumuna bakıldığında δ: 1.57–1.69 ppm' de (m, 2H, –SH) ve 3.24 pmm'de (t, 4H, –CH_2–S), 4.01 (t, 4H, J =4.8 Hz, –CH_2–O) piklerinin varlığı ditiyol türevinin olduğunu göstermektedir. (Ek:4)



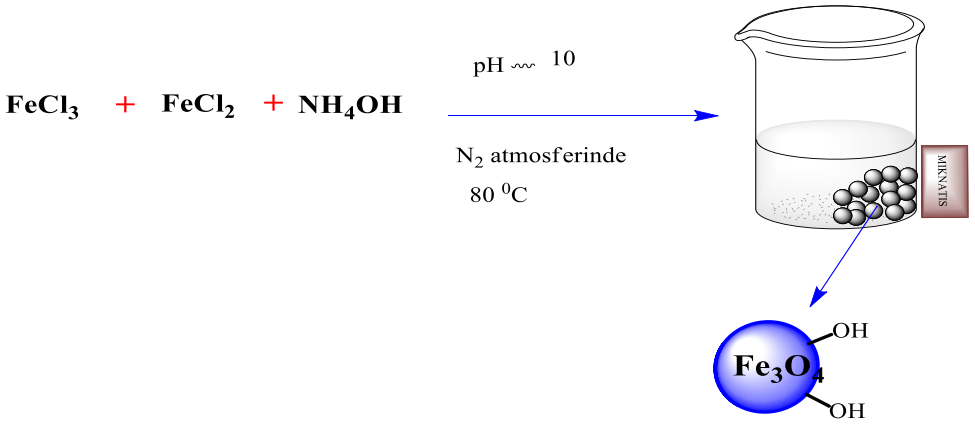
Şekil 4.6. *p-tert*-bütilkaliks[4]aren hidrazin türevi **(6)** tepkimesi

p-ter-bütilkaliks[4]arenin dihidrazid türevi literatüre göre (Alekseeva vd. 2000) sentezlenerek yapısı spektroskopik yöntemlerle aydınlatıldı. Bunun için *p-ter*-bütilkaliks[4]arenin diester türevi (**2**) CH_2Cl_2/CH_3OH ortamında $N_2H_4.H_2O$ ile tepkimeye sokularak bileşik **6** sentezlendi (Şekil 4.6). Bileşiğin yapısı F-TIR spektrumunda 1765 cm^{-1} deki ester karboniline ait pikin kaybolup, amit karboniline ait gerilme bandının 1689 cm^{-1} de görülmesiyle ve ^{1}H-NMR spektrumunda 3.85 ppm'de metoksi grubuna bağlı (CH_3-O) metil protonlarının sinyalinin kaybolarak 7.80 ppm'de NH-NH_2 gruplarındaki NH protonlarına ait pikin görülmesiyle anlaşıldı.



Şekil 4.7. *p-tert*-bütilkaliks[4]aren hidrazin türevinin lipoik asit tepkimesi **(7)**

p-tert-bütilkaliks[4]aren di hidrazin türevi **(6)** literatüre göre (Yu, 2007), DMF ortamında DCC ve HOBT varlığında lipoik asit ile tepkimeye sokularak numaralı kaliks[4]arenin alkil-1,2-ditiyolan **(7)** sentezlendi. Bileşiğin yapısı F-TIR spektrumunda 1765 cm^{-1} deki ester karboniline ait pikin kaybolup, amit karboniline ait gerilme bandının 1689 cm^{-1} de görülmesiyle ve 486 cm^{-1} (S-S) bandının varlığıyla aydınlatıldı. Ayrıca ^{1}H NMR 1.75-1.66 ppm (yayvan, 8H, S-CH_2- CH_2), 4.39-4.15 ppm (yayvan, 4H, O=C- **CH_2**-CH_2), 4.77 ppm (s, 4H, O- CH_2), 7.14 ppm (s, 4H, Ar- CH_2), 7.45 ppm (s, 2H, OH), 8.06 ppm (s, 2H, NH-NH), 8.2 ppm (s, 2H, NH-C=O) protonlarına ait piklerin varlığı ile anlaşıldı.

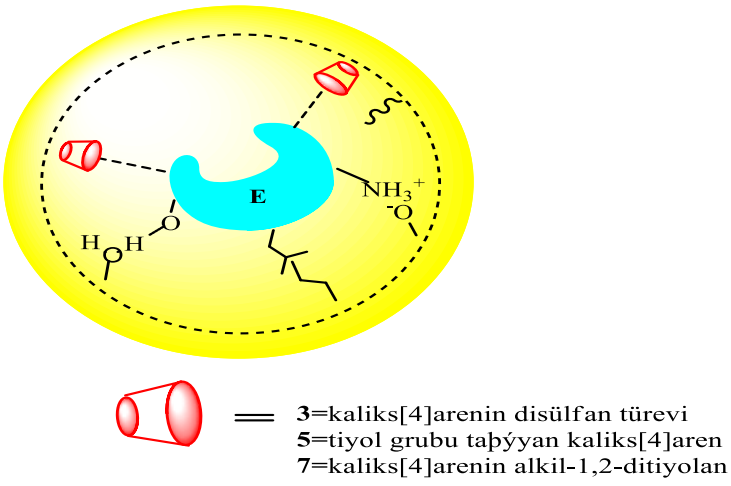


Şekil 4.8. Fe_3O_4 nanopartikül sentezi

$FeCl_2$ ve $FeCl_3$ su içerisinde literatüre göre (Zeng,2005) etkileştirilerek Fe_3O_4 nanopartiküllerine dönüştürüldü. Bunların IR spektrumunda 568 cm^{-1}görülen Fe-O bandına ait titreşim yapının oluştuğunu göstermektedir.

4.1.Sol-Jel Tekniğine göre Lipaz İmmobilizasyonu

Sol-jel tutuklama metoduna göre lipaz immobilizasyonu Bölüm 1.2.4' de İmmobilizasyon yöntemlerinde ayrıntılı olarak anlatıldı. Bu çalışmada kullanılan *Candida Rugosa* lipaz, sol-jel tutuklama metoduna göre **3, 5 ve 7** nolu bileşikler manyetik nanopartikülleri immobilize edilerek protein ve akivite tayinleri yapıldı (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Sol-jel metodu ile lipaz immobilizasyonu gösterimi

$$\text{Lipaz aktivite (U/g-destek maddesi)} = \frac{\text{Immobilize lipaz aktivitesi}}{\text{Immobilize lipaz miktari}}$$

$$\text{Spesifik aktivite (U/mg protein)} = \frac{\text{Immobilize lipaz aktivitesi}}{\text{Toplam protein miktari}}$$

Sol-gel tutuklanmış lipazların aktivite çalışmaları

Bu çalışmada bileşik **3**, **5** ve **7** ayrı ayrı Fe_3O_4 nanopartikül varlığında lipaz immobilizasyonunda katkı maddesi olarak kullanıldılar.

Çizelge 4.1. Optimum reaksiyon şartlarında serbest ve immobilize lipazların aktivitesi

	Tutuklanan Protein (mg/g)	***Tutuklanan Protein Yüzdesi (%)***	***Lipaz Aktivitesi (U/g)***	***Spesifik Aktivite (U/ mg-protein)***
Lipaz[a]$_{tut}$	28.5	58	95	3.3
3	4.58	35	18.0	2.93
5	13,45	64	62.24	4.62
7	15.33	73	47.3	3.08

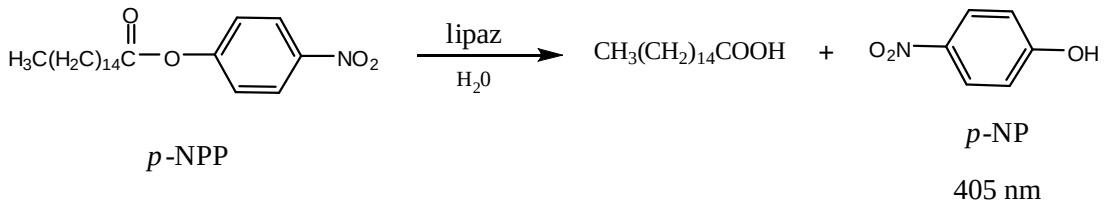
[a]Destek maddeleri kullanmadan tutuklanmış serbest lipaz

Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi immobilize bileşiklerin spesifik aktiviteleri kaliksarenin türevleri kullanılmadığı zaman yani serbest enzim ile tutuklanmış lipazın 3.3 gözlenirken, halkalı disülfit bağı içeren kaliks[4]aren bileşiğinin **(3)** için 2.93, serbest tiyol grupları taşıyan bileşik **(5)** için 4.62 iken lipoik asit bağlı olan kaliks[4]aren türevinin **(7)** için 3.08 olduğu gözlendi. Bu sonuçlara bakıldığında **5** ve **7** nolu bileşiklerin aktiviteleri yüksek görülmektedir. **(5)** nolu bileşik serbest -SH grubu, **(7)** nolu bileşik ditiyolan grubu taşıdığından lipaz enziminin -COOH, -SH, imidazol ve lisin grupları ile komplekleşerek enzimin konformasyonunun korunmasını ve aktivitenin artıtılmasını sağlamaktadır. Öncelikle *Candida Rugosa* enziminin aktif merkezini histidin-serin-glutamin üçlüsünden oluşan ve 31 amino asitten oluşan bir

kapağa sahiptir (Benjamin ve Pandey, 1998; Paiva ve ark..2000; Bakkal, 2006). Kapağın aktif bölgeye kalan kısmı hidrofobik özellikte, diğer yüzeyi ise hidrofilik özelliktedir (Tejo ve ark., 2004). Kapak açık iken enzim aktiftir.Bu kaliksaren türevleri yukarıda verilen kuvvetli hidrojen bağı yapan fonksiyonel gruplara sahip olduğundan enzimin kapağının açık kalmasını sağlayarak enzimin aktivitesinin artmasını sağlamaktadırlar. *Candida Rugosa Lipaz* enzimi suda çözündüğü zaman kapağı kapalı ve hidrofilik kısım suya doğu dönüktür. Kullanılan kaliksaren türevleri kapaktaki amino asitlerle kompleksleşerek kapağın kapanmasını önlemektedirler. **(3)** nolu bileşikte halkalı yapıdaki S-S bağları lipaz enziminin bu merkezleri ile yeterince etkileşmediğinden bunlar gibi kararlı konformasyona katkısı yeterli değildir.

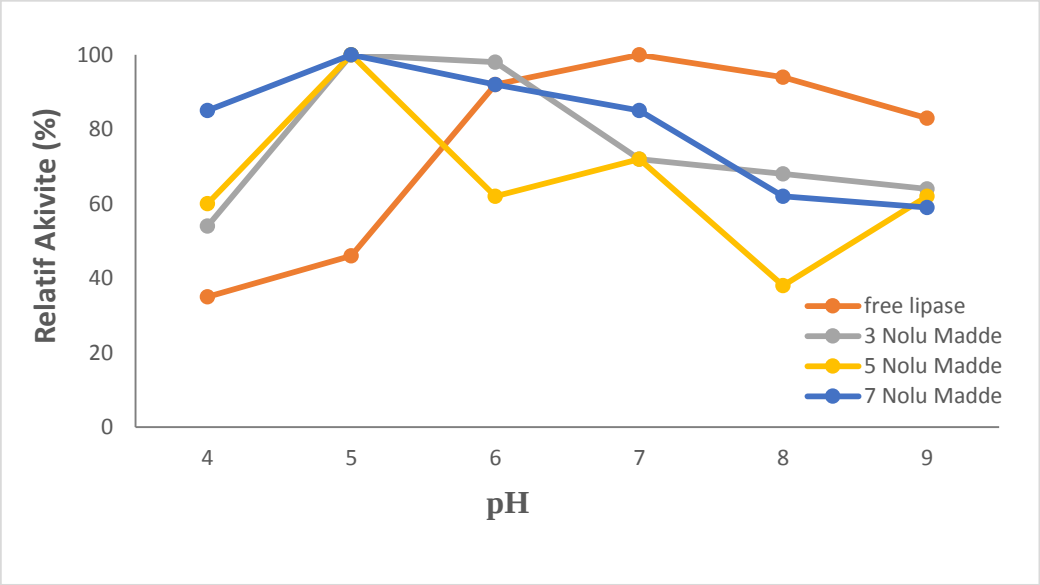
Optimum pH

Enzim aktivitesinde pH'nın büyük önemi vardır**.** Bu çalışmada serbest ve immobilize lipazlar için optimum pH belirlendi. 0.05 M fosfat tampon çözeltisi içerisinde serbest ve immobilize edilen lipazlar *p*-nitrofenilpalmitat ile etkileştirilerek hidrolitik aktivitelerine pH'nın etkisini incelemek amacı ile çeşitli pH'larda (pH=4-9) gerçekleştirilen tepkimelere ait relatif aktivite değerlerinin pH ile değişim grafiği çizildi. Serbest lipazın optimum pH'sı 7.0 olarak bulundu (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. *p*-Nitrofenilpalmitatın hidrolizi

Grafik incelendiğinde katkı maddesi olarak **3**, **5** ve **7** nolu bileşikler ilave edildiğinde optimum pH'nın 5.0'e kaydığı görülmektedir (Şekil 4.11). Optimum pH'ın asidik bölgeye kayması, enzimin katkı maddesi olarak etkileştikten sonra polikatyonik yapıya dönüşmesinden kaynaklanmaktadır (Faber, 1993)



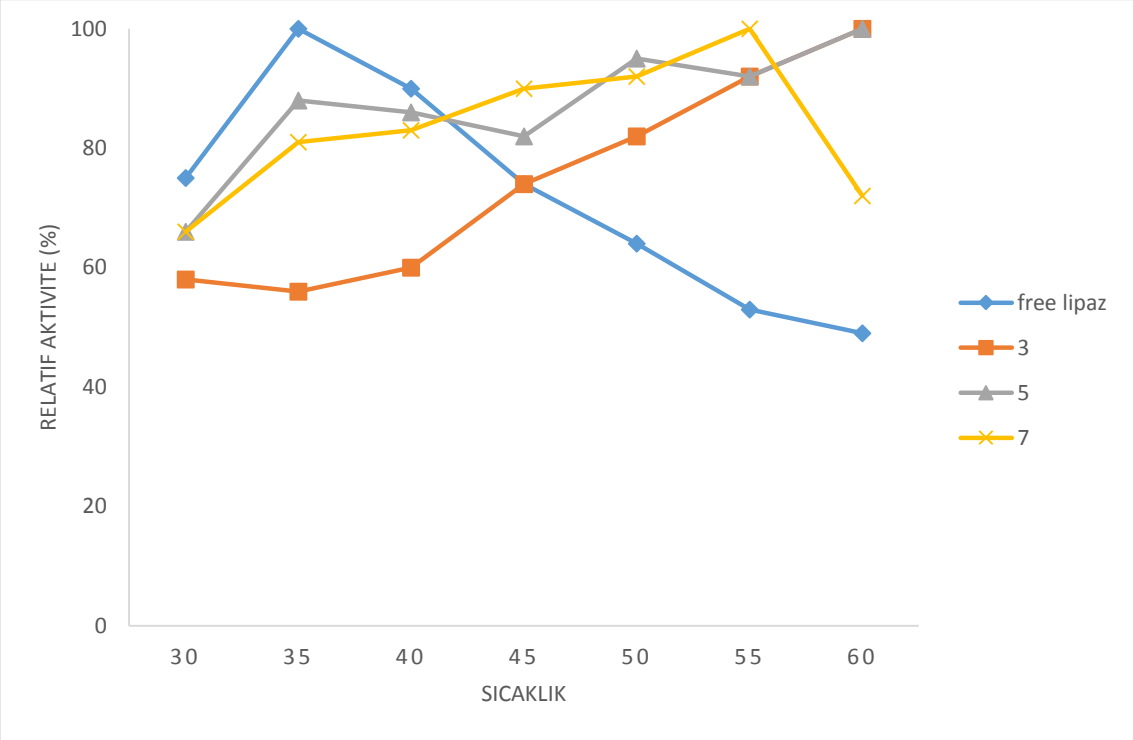
Şekil 4.11. 3, 5 ve 7 nolu bileşikler için lipaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

Optimum sıcaklık

Serbest ve immobilize edilen lipazların aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini incelemek amacı ile farklı sıcaklık değerlerinde (30–60ºC), 50 mM fosfat tamponunda (pH 7,0) 20 dk aralıklarla serbest ve immobilize enzimin aktiviteleri ölçülerek optimum sıcaklık değerleri belirlendi. Aktivite ölçümleri pH 7'de gerçekleştirildi. Serbest lipazın optimum sıcaklığı 35°C olarak bulundu.

Grafik incelendiğinde **3** nolu bileşik için optimum sıcaklık 60ºC, **5** nolu bileşik için 60ºC ve **7** nolu bileşik için optimum sıcaklık 55^0C olarak bulundu (Şekil 4.12).

Bu sonuçlar tiyol grubu bulunduran kaliks[4]arenlerin enzimin bir çok noktasında etkileşerek termal kararlılığını sağlamaktadır.

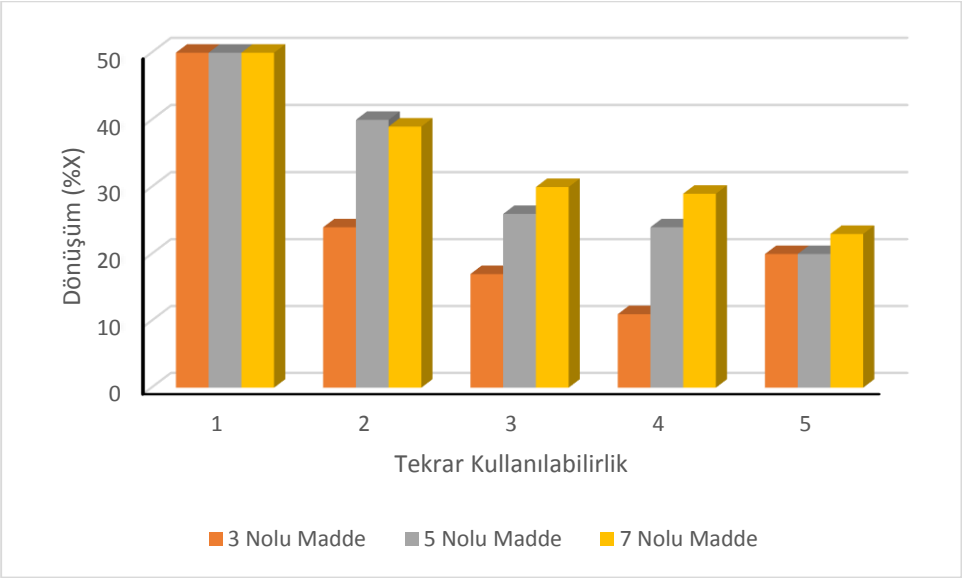


Şekil 4.12. 3, 5 ve 7 nolu bileşikler için lipaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Tekrar Kullanılabilirlik (Reuse)

Serbest ve immobilize edilen lipazların aktivitesi üzerine tekrar kullanımın etkisini incelemek amacı ile 0.05 M fosfat tampon çözeltisi içerisinde oda sıcaklığında ve pH 7 de *p*-nitrofenilpalmitat ile 5 defa etkileştirildi. Hidrolitik aktivitelerini incelemek amacı ile gerçekleştirilen tepkimelere ait relatif aktivite değerleri grafiği çizildi.

Bu değerlere baktığımızda 5 kez kullanımdan sonra 3 nolu bileşiğin kullanıldığı durumda dönüşüm %19, 5 nolu bileşik için %19 ve 7 nolu bileşik için %22' dir (Şekil 4.13).

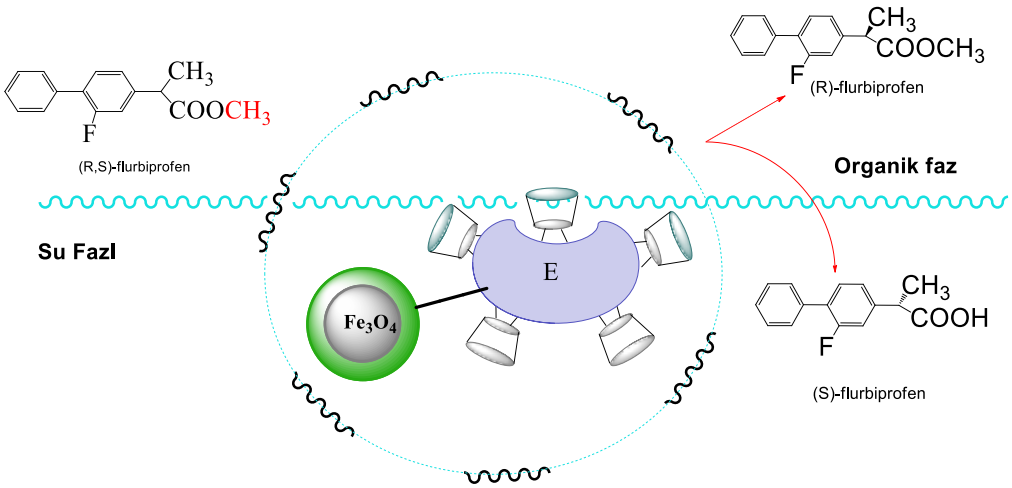


Şekil 4.13. 3, 5 ve 7 nolu bileşikler için lipaz aktivitesi üzerine tekrar kullanımın etkisi

4.2.İmmobilize Lipazların Enantiyoseçimli Tepkimelerde Kullanılması

Sol-jel tutuklama metoduna göre immobilize edilen lipazların enantiyoseçimlilik oranını belirlemek için rasemik Flurbiprofen metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizi yapıldı.

Rasemik flurbiprofen metil esteri hidroliz tepkimesi HPLC ile izlendi. Elde edilen ürünlerin enantiyomerik kompozisyon analizi ve enantiyomerik fazlalıkları (%ee) yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde (HPLC) kiral kolon ile belirlendi. Sonuçlar HPLC'de, hekzan/2-propanol/trifloroasetik asit (100/0.1/0.1) mobil fazı kullanılarak 254 nm'de 1 mL/dk akış hızında incelendi (Şekil 4.14).



Şekil 4.14.(R/S)-Flurbiprofen metil ester

HPLC'de elde edilen sonuçlara göre yapılan hesaplamalar literatürdeki (Chen ve ark., 1982) bağıntı kullanılarak yapılmıştır. Enantiyomerik fazlalık (ee), dönüşüm oranı (X), enantiyoseçimlilik (E) gibi değerler aşağıdaki bağıntılar kullanılarak bulunmaktadır.

$$E = \frac{\ln[(1-X)(1-ee_s)]}{\ln[(1-X)(1+ee_s)]}$$

$$X = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \qquad ee_s = \frac{C_R - C_S}{C_R + C_S} \qquad ee_p = \frac{C_S - C_R}{C_S + C_R}$$

ee_s : Kalan substratın enantiyomerik fazlalığı

ee_p : Oluşan ürünün enantiyomerik fazlalığı

C_R :R enantiyomerinin konsantrasyonu

C_S:S enantiyomerinin konsantrasyonu

Çizelge 4.2. Serbest ve immobilizelipaz kullanarakrasemik Flurbiprofen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizi

	X (%)	ee_s (%)	ee_p (%)	E
$Lipaz_{tut}$[a]	36	56	>98	174
3[b] (pH=5)	13.2	15	>98	**114**
3[b] (pH=7)	16.2	19	>98	**119**
5[b] (pH=5)	37	57	>98	**178**
5[b] (pH=7)	39	64	>98	**176**
7[b] (pH=5)	36	56	>98	**174**
7[b] (pH=7)	34	51	>98	**164**
7 (72 saat) (pH=5)	44	78	>98	**235**
7 (72 saat) (pH=7)	45	80	>98	**244**
7 (144 saat) (pH=5)	41	68	>98	**202**
7 (144 saat) (pH=7)	36	55	>98	**172**

[a] Destek maddeleri kullanmadan tutuklanmış serbest lipaz

[b] 48 saat etkileştirilen immobilize lipaz

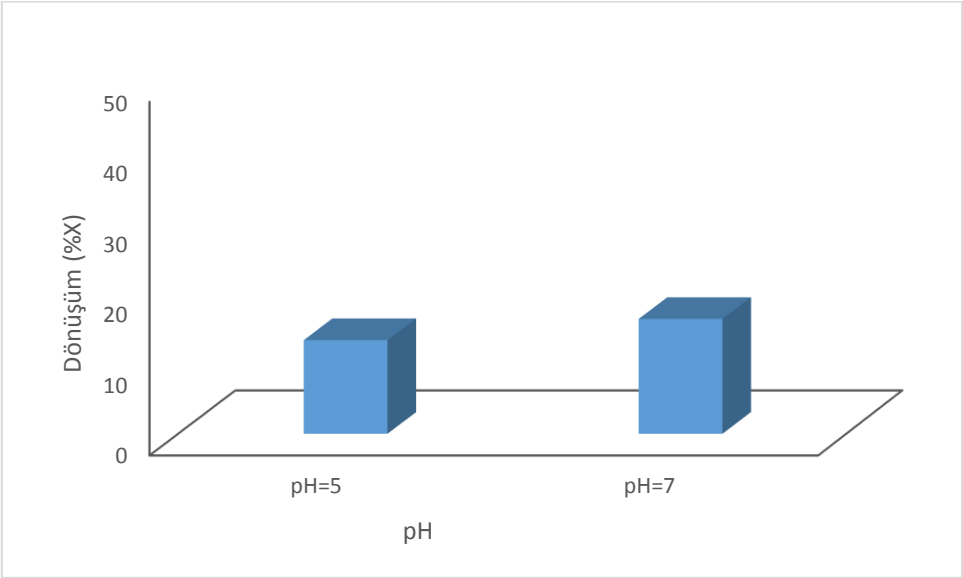
Farklı pH ve sıcaklıklarda dönüşümler

(R,S)-Flurbiprofen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizi pH=7 de ve optimum pH' larda farklı destek maddeleri varlığında tutuklanmış lipazlar ile inkübe edilerek belirlendi.

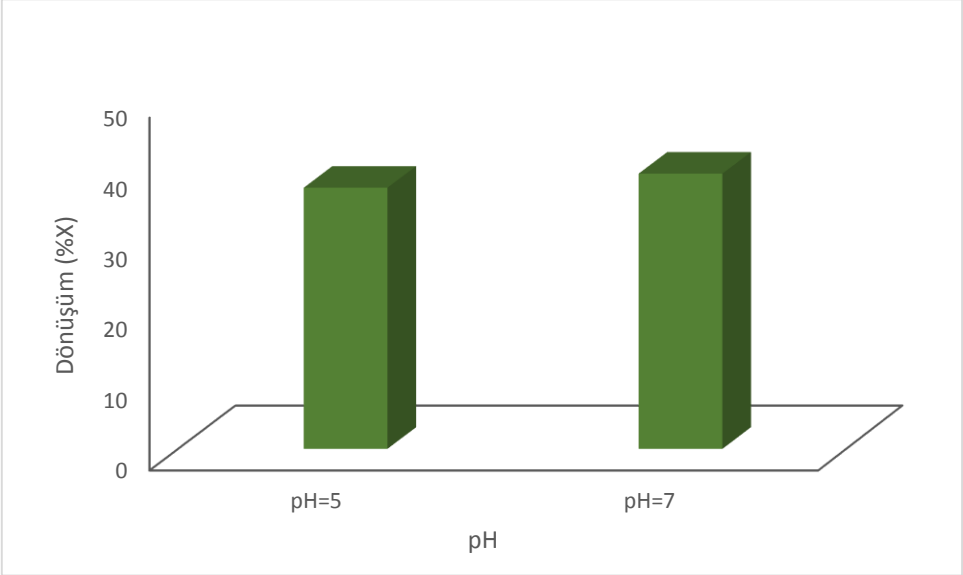
Şekil 4.14- 4.15' de ve Çizelge 4.2' de görüldüğü gibi **3** ve **5** nolu bileşik ile yapılan enantiyoseçimlilik hidrolizinde pH=7 en yüksek dönüşüm ve enantiyoseçimliliğe ulaştı.

Bu sonuçlara baktığımızda serbest enzimin kaliks[4]aren türevlerinin kullanılmadığı durumda enantiyoseçimlilik oranı E=174 iken, en yüksek

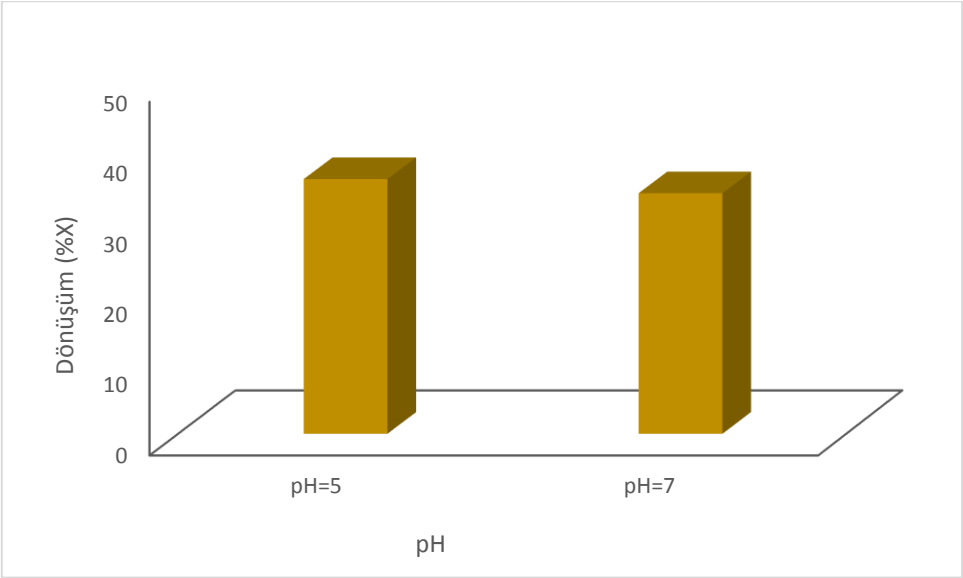
enantiyoseçimlilik 7 nolu kaliks[4]aren türevinin kullanıldığı durumda 72 saatlik etkileşim periyodunda ve pH 7' de (E=244) elde edilmiştir. Bu süre 144 saate çıkarıldığı zaman pH 5' de bu oranın E=202, pH 7' de E=172 ye düştüğü gözlendi (Şekil 4.17; 4.18; 4.19).



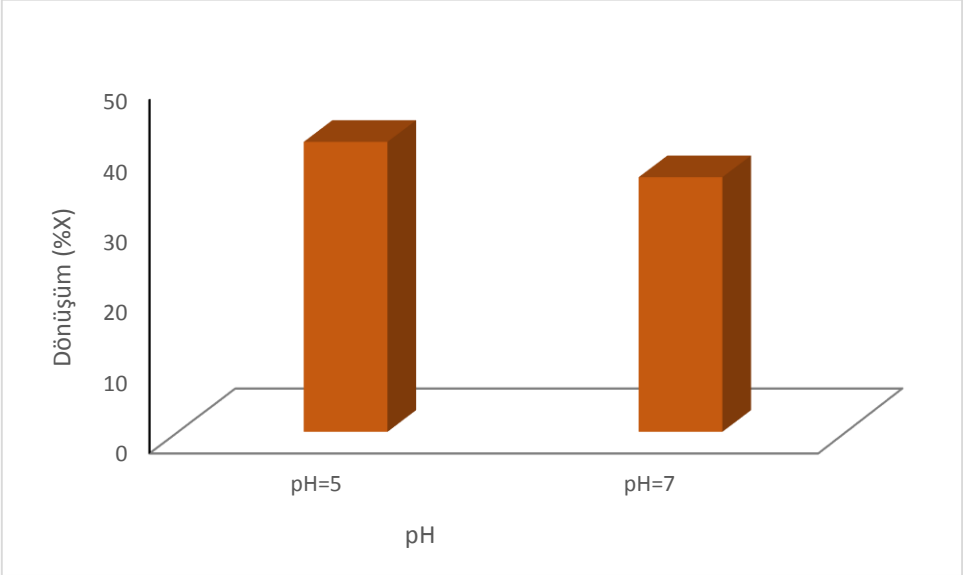
Şekil 4.15. 3 nolu bileşik için (R,S)- Flurbiprofen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde dönüşüme karşı pH'nın etkisi



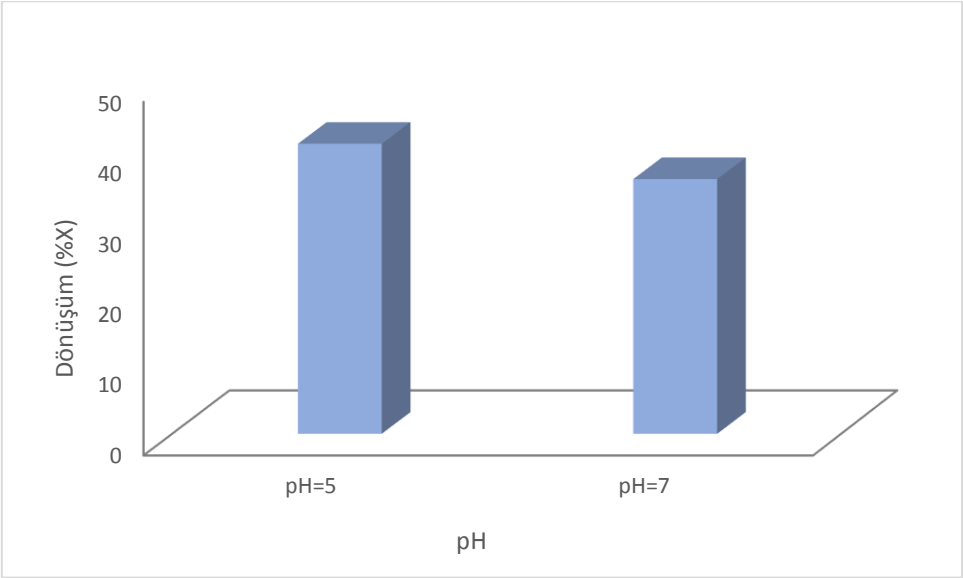
Şekil 4.16. 5 nolu bileşik için (R,S)- Flurbiprofen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde dönüşüme karşı pH'nın etkisi



Şekil 4.17. 7 nolu bileşik için (R,S)- Flurbiprofen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde dönüşüme karşı pH'nın etkisi (48 saat)

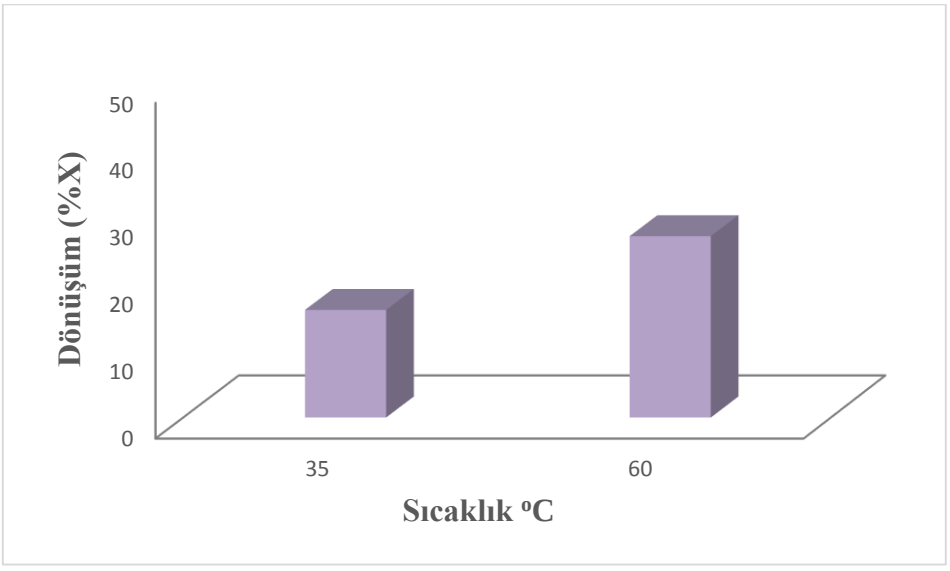


Şekil 4.18. 7 nolu bileşik için (R,S)- Flurbiprofen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde dönüşüme karşı pH'nın etkisi (72 saat)

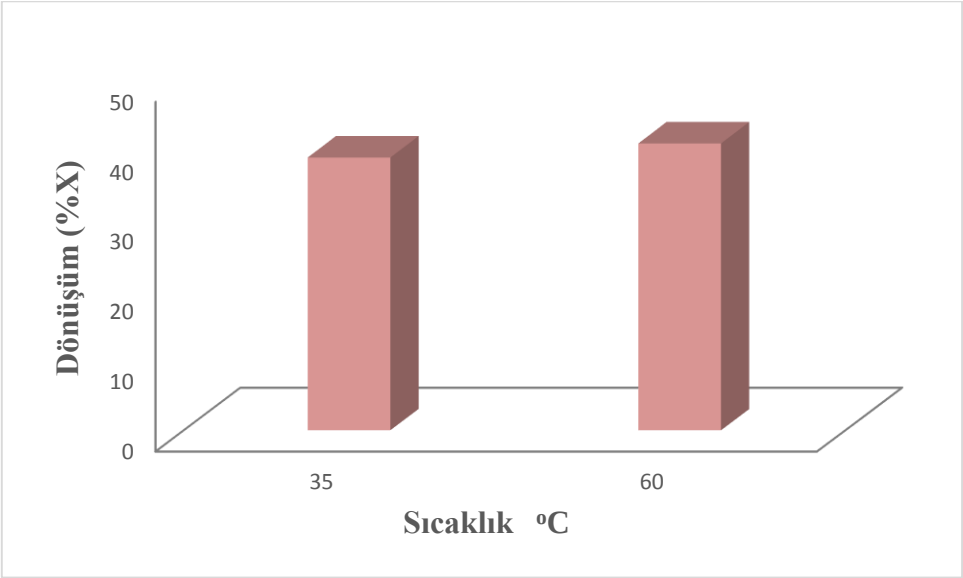


Şekil 4.19. 7 nolu bileşik için (R,S)- Flurbiprofen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde dönüşüme karşı pH'nın etkisi (144 saat)

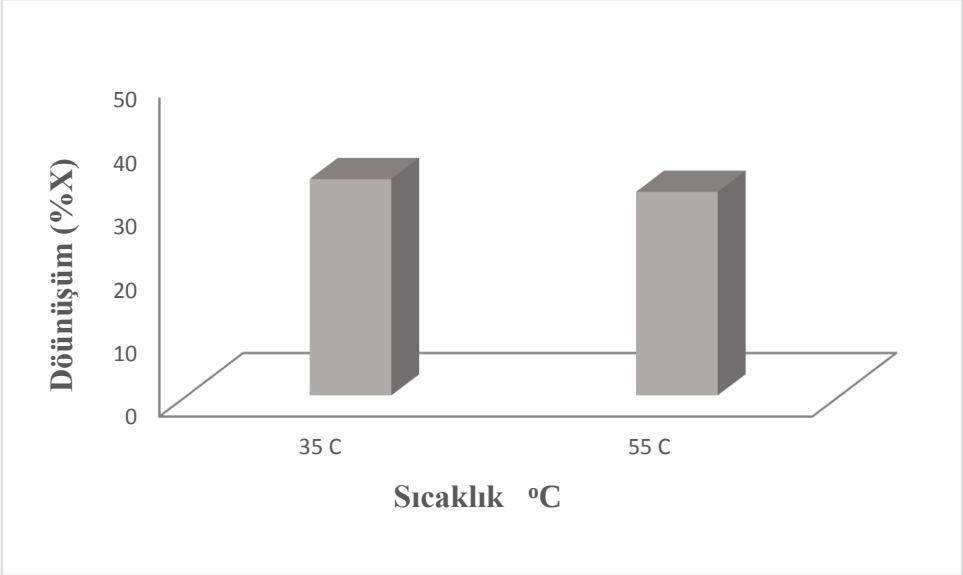
Optimum sıcaklık değerleri enantiyoseçimli hidroliz çalışmalarında en iyi dönüşüm ve enantiyoseçimlilik, **(3)** ve **(5)** nolu bileşikler için 60ºC (Şekil 4.19 ve Şekil 4.20), **(7)** nolu bileşik için 35ºC (Şekil 4.21) olarak bulundu.



Şekil 4.20. 3 nolu bileşik için (R,S)- Flurbiprofen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde dönüşüme karşı sıcaklığın etkisi



Şekil 4.21. 5 nolu bileşik için (R,S)- Flurbiprofen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde dönüşüme karşı sıcaklığın etkisi



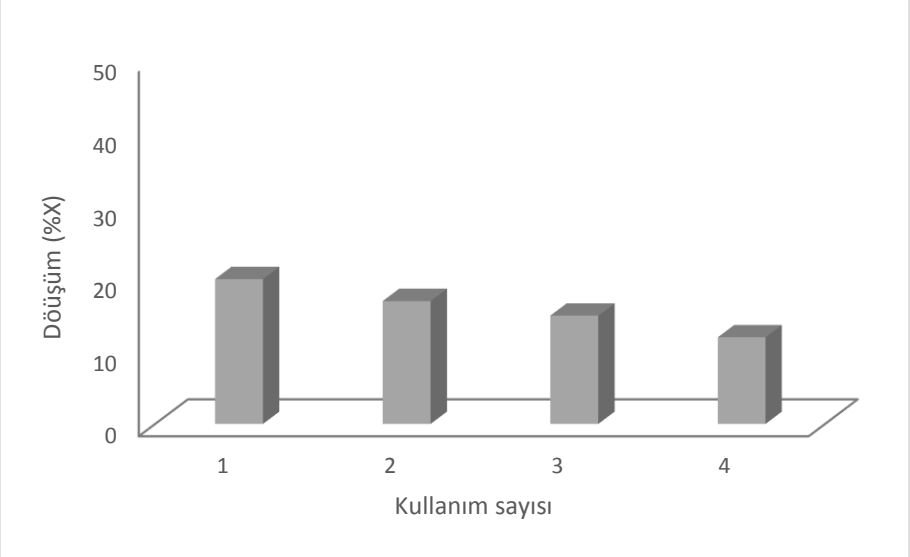
Şekil 4.22. 7 nolu bileşik için (R,S)- Flurbiprofen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde dönüşüme karşı sıcaklığın etkisi

Tekrar kullanılabilirlik

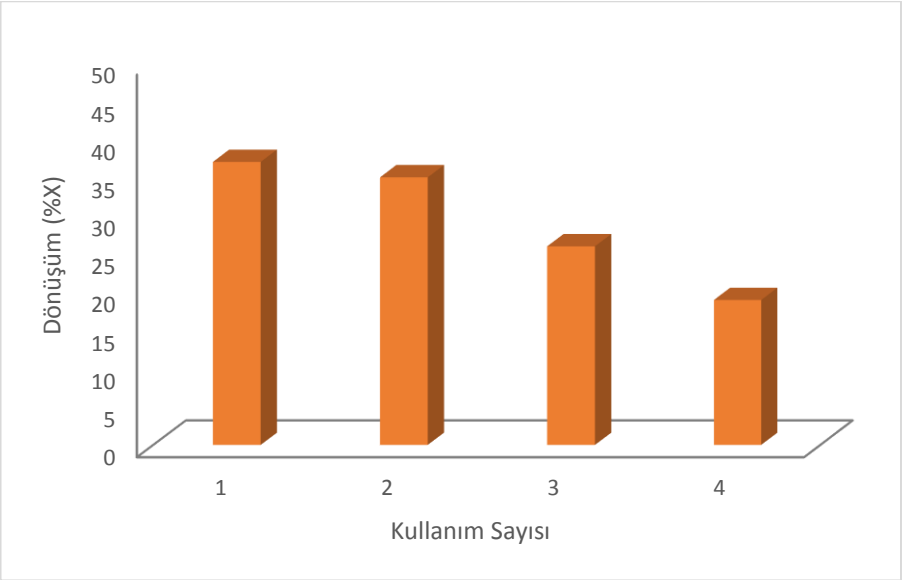
Kaliks[4]aren tiyol grubu bulunduran türevlerinin (**3, 5** ve **7**) tutuklanmış lipazların tekrar kullanılabirliklerini test etmede 35°C' de optimum pH'larda denemeler

yapıldı. Tekrar kullanılabilirlik, immobilize lipazların ilk kullanımdan sonra 3 kez 0.05M, pH 7.0 fosfat tamponu ile yıkanıp tekrar aktivitesine bakılarak yapıldı.

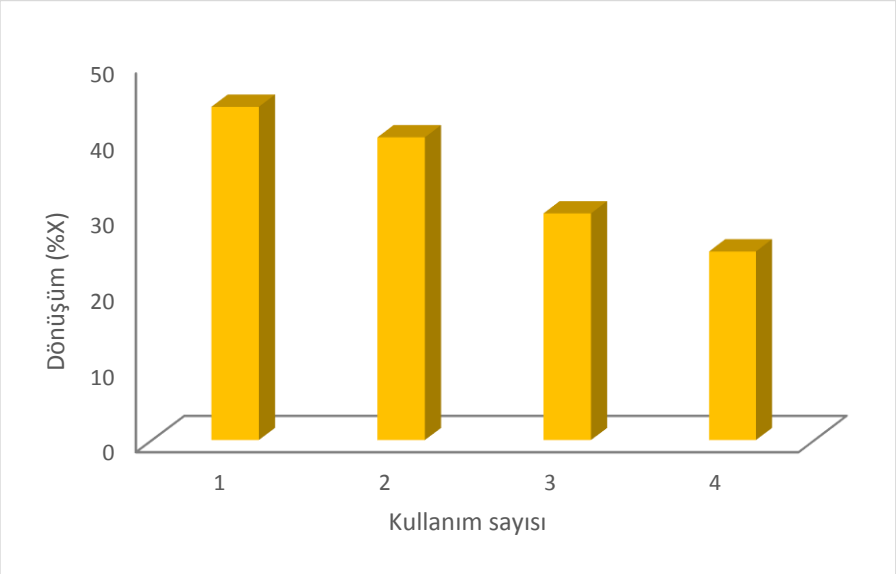
İmmobilize lipazlardan **(3)** nolu maddenin pH=7 ve optimum pH' sında 4 kullanım sonucunda dönüşümünün % 12 olduğu gözlendi. **(5)** nolu maddenin ise 4 kullanımdan sonra dönüşümü, pH=5 de % 19 e düştüğü gözlendi. Son olarak **(7)** nolu bileşik için pH=7' de 4 kullanım sonunda % 24 ve pH=5' de 4 kullanım sonunda % 25 olarak sonuçlandığı gözlenmiştir.



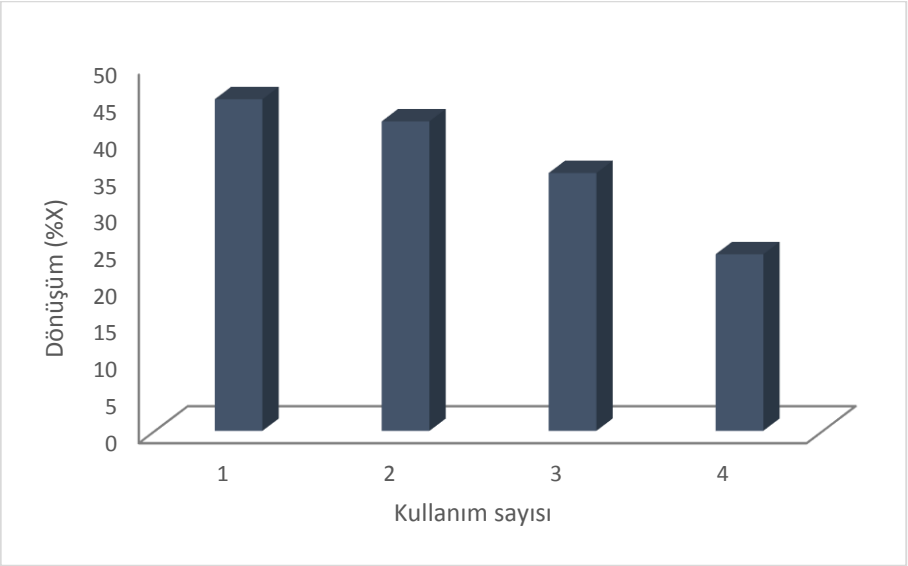
Şekil 4.23. 3 nolu bileşiğin pH=7'de tekrar kullanımı



Şekil 4.24. 5 nolu bileşiğin pH=5'de tekrar kullanımı



Şekil 4.25. 7 nolu bileşiğin pH= 5'de tekrar kullanımı



Şekil 4.26. 7 nolu bileşiğin pH= 7'de tekrar kullanımı

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- Bu çalışmada, tiyol grupları taşıyan kaliks[4]aren (**3**), (**5**), ve (**7**) türevleri hazırlandı.
- Sentezlenen kaliks[4]aren türevlerinin yapıları spektroskopi teknikler kullanılarak aydınlatıldı.
- Sentezlenen kaliks[4]aren tiyol türevleri sol-gel tutuklamama tekniğine göre *Candida Rugosa Lipaz* enzimi ile enkapsüle edildiler.
- Kaliksaren türevlerinin tutuklanmış lipazların spesifik aktiviteleri tayin edildi.
- Tutaklanan lipazlar rasemik flurbiprofen metil esterinin enantiyosecçimli hidroliz tepkimelerinde kullandı.
- HPLC tekniği kullanılarak % dönüşüm (X) ve enantiyoseçimliliği (E) değerleri hesaplandı.
- Tutuklanmış kaliksaren türevlerinin optimum pH ve sıcaklık araştırmaları yapıldı.
- Optimum pH ve sıcaklıklarda yapılan tutuklanmış lipazların tekrar kullanılabilirlikleri araştırıldı.
- Bu çalışmada kaliks[4]arenin tiyol türevlerinden (**7**) numaralı bileşik, pH=7 ve 35 ^{o}C'de 72 saat reaksiyon süresinde en yüksek dönüşüm ve enantiyoseçimliliği gösterdiği anlaşıldı.

KAYNAKLAR

Akceylan, E., 2011, Faz transfer katalizörü olabilecek kaliksaren türevlerinin sentezi ve seçimli reaksiyonlarda uygulamaları, Doktora Tezi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Konya

Akceylan, E., Yilmaz, M., 2011, Synthesis of calix[4]arene alkylamine derivatives as new phase-transfer catalysts for esterification reaction, *Tetrahedron*, 67, 6240-6245

Akceylan, E., Sahin, O., Yilmaz, M., 2013, Improvement of catalytic activity of lipase in the presence of wide rim substituted calix[4]arene carboxylic acid-grafted magnetic nanoparticles, *J Incl Phenom Macrocycl Chem*,

Akkuş, P. 2006. Lipaz Kullanılarak Şeker Esteri Sentezi, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze.

Akoh, C.C., Min, D.B., 1998, Microbial Lipases and Enzymaatic İnteresterification, Food Lipids-Chemstry, Nutrition and Biotechnology, Marel Deccer.

Akoz , E., Akbulut, O. Y., Yilmaz, M., 2014, Calix[n]arene Carboxylic Acid Derivatives as Regulators of Enzymatic Reactions: Enhanced Enantioselectivity in Lipase-Catalyzed Hydrolysis of (R/S)-Naproxen Methyl *Ester Appl. Biochem. Biotech.*, 172, 509–523

Akoz, E., Sayin, S., Yilmaz, M., 2014, Enhanced catalysis and enantioselective resolution of racemic naproxen methyl ester by lipase encapsulated within iron oxide nanoparticles coated with calix[8]arene valeric acid complexes, *Organic and Biomol. Chem.*, 12, 6634-6642

Aksoy, C., 2003, Lipaz ve üreaz enzimlerinin çeşitli taşıyıcılara immobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 1-68.

Aksoy, T., 2011, Farklı kaliks[n]aren bağlı manyetik nanopartiküllerin hazırlanması ve toksik bazı aromatik amin ve azo boyaların uzaklaştırılmasında kullanılması, Yüksek Lisans Tezi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Konya

Alkan, E., 2012, Flurbiprofenin Farmasötik Preparatlarda Analitik Yöntemlerle Miktar Tayini, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Erzurum, 1-76.

Andrade, J.D., Hlady, V., 1986, Protein adsorption and materials biocompatibility: A tutorial review and suggested hypotheses, *Advances in Polymer Science*, 79,1-63.

Arnaud-Neu, F., Collins, E. M., Deasy, M., Ferguson, G., Harris, S.J., Kaitner, B., Lough, A.J., McKervey, M.A., Marques, E., Ruhl, B.L., Schwing-Weill, M.J.,

Sewardt, E.M., 1989, Synthesis, X-ray crystal structures, and cation-bindingproperties of alkyl calixaryl esters and ketones, a newfamily of macrocyclic molecular receptors, *J. Am. Chem. Soc.*, 111,8681-8691

Arica, O, Suzuki, T, Sano Y, Murakami, Y., 1996, Immobilization of a thermostable enzyme using a sol–gel preparation method, *Journal of Fermentation and Bioengineering*,82, 341–345.

Avnir, D., Braun, S., Lev, O., Ottolenghi, M. 1994, Enzymes and Other Proteins Entrapped in Sol-gel Materials, *Chem. Mater.* 6, 1605–1614.

Aydın, S., 2010, Mikrodalga Yöntemi ile Flurbiprofenden Hareketle Yeni Hidrazit –Hidrazonların Sentezi ve Biyolojik Etkileri, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 1-140

Baekeland, L. H., 1908, Method of making insoluble products of phenol and formaldehyde, *U. S. Patent Number(s)*, 942, 699.

Bae, H., Lee, K., Lee, Y., 2006, Enantioselective Properties of Extracelluler Lipase From Serratia Marcescens ES-2 for Kinetic Resolution of (S)-Flurbiprofen, *J. Of Moleculer Cat. B. Enzymatic*, 40, 24-29

Bayramoglu, G., Arıca, M.Y. 2008, Preparation of poly(glycidylmethacrylate–methylmethacrylate) Magnetic Beads: Application in Lipase Immobilization, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 55: 76–83.

Bakkal, M.,2006, Tutuklanmış *Candida Rugosa* lipazı İle rasemik Naproksen Metil Esterden (S)-Naproksen üretiminde proses parametrelerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-139.

Benjamin, S., Pandey, A. 1998. Candida rugosa lipases, *Molecular biology and versatility in biotechnology*. Yeast, 14; 1069–1087.

Bezbradica, D., Mijin, D., Siler-Marinkovic, S., Knezevic, Z., 2006, The *Candida rugosa* lipase catalyzed synthesis of amyl isobutyrate in organic solvent and solvent-free system: A kinetic study, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 38, 11–16.

Bilensoy, E., Hıncal, A. A. (2008). Cyclodextrin based nanomaterials in pharmaceutical field. *Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes*, New Jersey, John Wiley&Sons, 1225-1247.

Bitter, I., Grün, A., Toth, G., Balazs, B., Horvarth, G., Toke, L., 1998, Studies on CaIix(aza)crowus, II.' synthesis of novel proximal doubly bridged Calix[4]arenes by intramolecular ring closure of syn l,3-and 1,2- w- chtoroalkylamides, *Tetrahedron*, 54, 3857-3870

Botta, M., Casnati, A., Fragai, M., Luchinat, C., Ungaro, R., Aime, S., Barge, A., 2001, A Calix[4]arene Gd^{III} Complex Endowed with High Stability, Relaxivity, and Binding Affinity to Serum Albumin, Angewandte Chemie, 113, 4873-4875

Böhmer, V., 1995, Calixarenes, macrocycles with (almost) unlimited possibilities, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 34, 713-745.

Bradford, M.M. 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.

Braun S., Rappoport S., Zussman R., Avnir D., Ottolenghi M., 1990, Sol-gel based enzyme immobilization, *Materials Letters*, 10, 42-49.

Braun, S, Rappoport, S, Zusman, R, Avnir, D, Ottolenghi, M., 1990, Biochemically active sol–gel glasses; the trapping of enzymes, *Materials Letters*,10,1–5.

Breslow, R., 1995, Biomimetic chemistry and artificial enzymes, *Acc. Chem. Res.*, 28, 146-153.

Brinker, C. J., Scherer, G. W., 1990, Sol-gel science: *The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, Academic Press, Boston.

Brzozowski, A. M., Derewenda, U., Derewenda, Z. S., 1991, A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex, *Nature* (London), 351, 491–494.

Cernia, E., Deflini, M., Cocco E.D., Palloci, C., Soro, S., 2002, Investigation of lipase catalysed hydrolysis of naproxen methyl ester: use NMR spectrescopy methods to study substrate–enzyme interaction. *Bioorg Chem*, 30, 276–84.

Challa, R., A. Ahuja, J.A., R.K. Khar., 2005,*AAPS Pharm. Sci. Tech.* 6**,** 2, 43.

Chang, S.-W., Shaw, J.-F., Yang, K.-H., Chang, S.-F., Shieh, C.J., 2008, Studies of optimum conditions for covalent immobilization of Candida rugosa lipase on poly(c-glutamic acid) by RSM, *Bioresource Technology*, 99, 2800-2805.

Chen, J.C., Tsai S.W. 2000, Enantioselective Synthesis of (S)-Ibuprofen Ester Prodrug in Cyclohexane by Candida rugosa Lipase Immobilized on Accurel MP1000. Biotechnol. Prog. 16: 986-992.

Cameron, B.R. and Loeb, S.J., 1997, Bis(amido)calix[4]arenes in the pinched cone conformation as tuneable hydrogen-bonding anion receptors, *Chem. Comm.*, 573.

Campàs M., Marty J.L., 2006, Encapsulation of enzymes using polymers and Sol-gel techniques, *Humana Press Inc.*, Totowa, NJ.,92-97.

Cao L.Q., 2005, Immobilized enzymes: science or art, *Current Opinion in Chemical Biology*, 9, 217–226.

Cao, L., 2005,Carrier-bound immobilized enzymesprinciples, applications and design, *Strauss GmbH, Morlenbach,Germany* ,373-378.

Cao, L., 2006, Carrier-bound Immobilized Enzymes Principles, Applications, and Design, Wiley-VCH, The Netherlands.

Chiou, S.H., Wu, W.T., 2004, Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups, *Biomaterials*, 25, 197-204.

Collins, E. M., McKervey, M. A., Madigan, E., Moran, M.B., Owens, M., Ferguson, G., J. Harris, G.J., 1991, Chemically modified Calix[4]arenes. regioselective synthesis of 1,3-(distal) derivatives and related compounds. X-Ray Crystal structure of a diphenol- dinitrile, *J. Chem. Soc. Perkın Trans. I,*3137-3142

Dave, B., Soyez, H., Miller, J. M., Dunn, B., Valentine, J. S., Zink, J. I., 1995, Synthesis of protein-doped sol-gel SiO2 thin films: evidence for rotational mobility of encapsulated cytochrome *c*, *Chemistry of Materials*, 7, 1431–1434.

Debdeep, M., Ashish, C., Ravi, G., Parimal, P., 2011, Calix[4]arene based molecular sensors with pyrene as fluorogenic unit: Effect of solvent in ion selectivity and colorimetric detection of flüoride, *İnorganica Chimica Acta*, 372, 126-135

Dhawan, B., Chen, S.-I., Gutsche, C. D., 1987, Calixarenes 19. studies of the formation of calixarenes via condensation of para-alkylphenols and formaldehyde, *Makromol. Chem.*, 188, 921-950.

Dospil, G., Schatz, J., 2001, Synthesis and characterization of imidazole-substituted calix[4]arenes as simple enzyme-mimics with acyltransferase activity, *Tetrahedron Lett*. 42, 7837-7840.

Duchene, D., Wouessidjewe, D., 1990, Pharmaceutical uses of cyclodextrin and derivatives, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 16,17, 2487-2499.

Dural, E.A.Ö., 2002, Farmakoloji ,Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul

Edmiston, P. L., Wambolt, C. L., Smith, M. K., and Saavedra, S. S., 1994, Spectroscopic characterization of albumin and myoglobin entrapped in bulk sol-gel glasses, *Journal of Colloid and Interface Science***,** 163, 395–406.

Encyclopedia of controled drug delivery, *John Wiley & Sons*, New York 1999, 1, 283

Erdemir, S., 2006, Kiral kaliks[4]aren amit türevlerinin sentezi ve aminoasitlerin seçimli ekstraksiyonunda kullanılması, Yüksek Lisans Tezi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Konya,

Erdemir, S., Yilmaz, M., 2011, Preparation and chromatographic performance of calix[4]crown-5 macrocyclebonded silica stationary phase, *J. Sep. Sci.*, 34, 393-401.

Etci, K., 2011, Sol- jel tekniğine göre manyetik nanopartiküllere lipaz immobilizasyonu ve bazı enantiyoseçimli tepkimelerde kullanılması, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.

Faber, K., 2000, Biotransformations in organic chemistry, 4th Edition, *Springer-Verlag*, Berlin.

Faber, K. Ottolina, G. Riva, S., 1993, Selectivity-enhancement of hydrolase reactions, *Biocatalysis*, 8, 91–132.

Ghanem, A., 2010, Direct Enantioselective HPLC Monitoring of Lipase-Catalyzed Kinetic Resolution of Flurbiprofen, Australian Centre for Research on Seperation Science; Scholl of Chemstry, Universty of Tasmania, Australia, Chirality, 22, 597-603

Gao, X.G., Cao, S.G., Zhang, K.C. 2000. Production, Properties and Application to Nonaqueous Enzymatic Catalysis of Lipase from a Newly Isolated *Pseudomonas* strain. Enzyme and Microbial Technology, 27: 74-82.

Gao, X.,2004, Immobilization of lipases via Sol-gel procedures and application of the immobilized lipases in oleochemical reactions, Ph.D., University of Nebraska, Lincoln, NE, 40-49.

Garrett, R., Grisham, C. 1999, Biochemistry, 2nd edition, edited by S. Kiselica, Saunder College Publishing, pp 426-435, Orlando, Florida.

Gezer, E.,2009, Lipaz enziminin immobilizasyonu ve aromatik esterlerin sentezinde kullanımı, Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Antakya/Hatay, 1-67.

Glad, M., Norrloew, O., Sellergren, B., Siegbahn, N., Mosbach, K. 1985, Use of Silane Monomers for Molecular Imprinting and Enzyme Entrapment in Polysiloxanecoated Porous Silica, *J. Chromatogr*, 347, 11-23.

Goldsteın, L., Manecke, G., 1976, *Applied Biochemistry And Bioengineering*, Academic Press, New York, 123-125.

Gottfried, D. S., Kagan, A., Hoffman, B. M., Friedman, J. M., 1999, Impeded rotation of a protein in a sol-gel matrix. *J. Phys. Chem. B*, 103, 2803–2807.

Guisan, J. M., 2006, Methods in biotechnology: immobilization of enzymes and cells, *Second Edition, Humana Press Inc.*, Totowa, NJ, 92-100.

Gutsche, C. D. and Mukhukrishnan, R., 1978, Calixarenes. 1. analysis of the product mixtures produce by the base-catalyzed condensation of formaldehyde with *p*-substitued phenols, *J. Org. Chem*., 43(25), 4905-6.

Gutsche, C. D., Dhawan, B., No, K. H., Muthukrishnan, R., 1981, Calixarenes. 4. the synthesis, characterization and properties of the calixarenes from *p*-tert-butylphenol, *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 3782-92. *Idem*, *ibid*., 1984, 106, 1891.

Gutsche, C. D., 1983, Calixarenes, *Acc. Chem. Res*., 16, 161.

Gutsche, C. D., Bauer, L. J., 1985, Calixarenes. 14. the conformational properties of the ethers and esters of the calix[6]arene and the calix[8]arene, *J. Am. Chem. Soc*., 107, 6059-6063.

Gutsche, C.D., Pagoria, P.F., 1985, Calixarenes. 16. functionalized calixarenes: direct substitution route, *J. Org. Chem.*, 50, 5795-5802.

Gutsche, C. D., Lin, L. G., 1986, Calixarenes12. the synthesis of functionalized calixarenes, *Tetrahedron*, 42 (16), 1633-40.

Gutsche, C. D., Iqbal, M., Stewart, D., 1986, Calixarenes 18. synthesis procedures for *p-ter*-butylcalix[4]arene, *J. Org. Chem*.,51, 742-5.

Gutsche, C. D., 1987, "Calixarenes" Prog. *Macrocyclic Chem.*, 3, 93.

Gutsche, C. D., Nam, K. C., 1988, Calixarenes 22. synthesis, properties and metal complexation of aminocalixarenes, *J. Am. Chem. Soc*., 110, 6153-62.

Gutsche, C. D.; Alam, I., 1988, Calixarenes. 23. the complexation and catalytic properties of water soluble calixarenes, *Tetrahedron*, 44, 4689.

Gutsche, C. D., 1989, Monograph in supramolecular chemistry: calixarenes, *The Royal Society of Chemistry, Cambridge, London*.

Gutsche, C. D. and Iqbal, M., 1990, *p-tert*-Butylcalix[4]arene, *Org.Syn.*, 68, 234-7.

Hartnett, A. M., Ingersoll, C. M., Baker, G. A., Bright, F. V., 1999, Kinetics and thermodynamics of free flavin and the flavin-based redox active site within

glucose oxidase dissolved in solution or sequestered within a sol-gel-derived glass, *Analytical Chemistry*, 71, 1215–1224.

Hench, L. L. and West, J. K., 1990, The sol-gel process, *Chemical Society*, 90, 33–79.

Hung, T.C., Giridhar, R., Chiou, S.H., Wu, W.T., 2003, Binary Immobilization of *Candida Rugosa* Lipase on Chitosan, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 26, 69-78.

Iwai, M., Tsuyisaka, M., Fukumoto, J. 1964, Lipase II. hydrolytic and esterifying actions of crystalline lipase of aspergillus niger, *Genetic Applied Microbiololgy*, 10: 13-22.

Izatt, R. M., Bradshaw, J. S., Pawlak, K., Bruening, R. I., Tarbet, B. J., 1992, Thermodynamıc and kınetıc data for macrocycle interaction with neutral molecules, *Chem. Rev.* 92 (6), 1261-1354.

İşbakan, N., 2006, Lipaz enzimi biyokatalizörlüğünde enantiyomerik saflıkta 1-fenil-1-propanolün transesterleşme tepkimesiyle kinetik rezolüsyonu, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-109.

Jaeger, K.E., Reetz, M. T., 1998, Microbial lipases form versatile tools for biotechology, *Trends in Biotechnology*, 16, 396-403.

Johnson, P., Whateley, T.L. 1971, Use of Polymerizing Silica Gel Systems for Immobilization of Trypsin, *J. Colloid Interface Sci*., 37, 557-563.

Kamboh, A., Akoz, E., Memon, S., Yilmaz, M., 2013, Synthesis of amino-substituted p-tert-butylcalix[4]arene for the removal of chicago Sky Blue and Tropaeolin 000 azo dyes from aqueous environment, *Water Air Soil Pollut*, 224, 1424

Karaca, N., 2006, Poli(N,N-dimetilakrilamit-ko-akrilamit) ve poli(N-izopropilakrilamit-ko-akrilamit)/$_K$-Karragenan polimerleri kullanılarak lipaz enziminin immobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2006, 1-73.

Karakucuk, A., Kocabas, E., Sirit, A., Memon, S., Yilmaz, M., Roundhill, D.M., 2005, Polymer supported calix[4]arene schiff bases: a novel chelating resin for Hg^{2+} and dichromate anions, *J. Macromol. Sci.-Pure Appl. Chem.*, 42, 691-704.

Keha, E., Kührevioğlu, İ., 2004, Biyokimya Şafak Yayınevi

Kennedy, J.F., 1995, Handbook of Enzyme Biotechnology, Third Edition, *Editör Allen Wisemann, EllisHorwood*, 235-310.

Kim, D. J., Shin, D. H., Hur, B. K., and Kim, E. K., 2000, Beef tallow hydrolysis by immobilized lipase, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10, 836.

Knezevic, Z.D., Siler-Marinkovic, S.S., Mojovic, L.V, 2004, Immobilized lipases as practical catalysts, *BIBLID*, 35, 151-164.

Lehn, J. -M., 1988[a], Supramolecular chemistry-scope and perspectives-molecules, supermolecules molecular devices, *J. Incl. Phenom.*, 6 (4), 351-396.

Lehn, J. –M., 1988[b], " Supramolecular chemistry-scope and perspectives molecules, supermolecules, and molecular devices", *Angew. Chem., Int. Ed. Engl*., 27, 89-112.

Lehn, J. –M., 1995, " Supramolecular chemistry", *VCH*, Weinheim.

Lei, L., Bai, Y., Li, Y.,Yi, L.,Yang, Y., Xia, C., 2009, Study on immobilization of lipase onto magnetic microspheres with epoxy groups, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 321, 252–258.

Li, Z. Y., Chen, J. W., Wang, L., Pan, Y., 2009, Highly enantioselective direct aldol reactions catalyzed by proline derivatives based on a calix[4]arene scaffold in the presence of water, *Synlett*, 14, 2356-2360.

Li, R., Liu, S., Zhao, J., Otsuka, H., Takahara, A., 2011, Preparation of superparamagneyic beta-cyclodextrin-functionalized composite nanoparticles with core-shell structures, *Springer*, 66, 1125-1136

Loftsson, T., E. Stefansson., 1997, *Drug Dev Ind Pharm.* 23**,** 473-481.

Luzardo-Álveraz, A., Antelo-Queijo, A., Soto, V.H., Blanco-Méndaz, J., 2012, Preparation and characterization of b-Cyclodextrin-linked chitosan microparticles, *Journal of Applied Polymer Science*, 123, 3595-3604.

Maity, P., Lepore, S.D., 2011, Catalytic Synthesis of Nonracemic Azaproline Derivatives by Cyclization of β-Alkynyl Hydrazines under Kinetic Resolution Conditions, *Angewandte Chemie*, 123, 8488-8491

Mosback, K., 1976, *Immobilized enzymes, methods in enzymology, academic press*, New York, 44.

Munch, J. H., Gutsche, C. D., 1990, para-tert-Butylcalix[8]arene, *Org. Syn.*, 68, 243-246.

Mutlu D., 2006, Rasemik Naproksen esterden enantiyoseçimli hidroliz ile S-Naproksen üretiminde reaksiyon parametrelerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-101.

Oh,J.M., Lee,D.H., Song,Y.S., Lee,S.G., Kim,S.W., 2007, Stability of immobilized lipase on poly(vinyl alcohol) microspheres, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry***,**13(3), 429-433.

Ozyilmaz, E., Sayin S., Arslan, M., Yilmaz, M., 2014, Improving catalytic hydrolysis reaction efficieny of sol-gel-encapsulated Candida rugosa lipase with magnetic β-cyclodextrin nanoparticles, *Colloids and Surfaces B:Biointerfaces*, 13, 182-189

Ozyilmaz, E., Sayin, S., 2013, Preparation of New Calix[4]arene-Immobilized Biopolymers for Enhancing Catalytic Properties of Candida rugosa Lipase by Sol–Gel Encapsulation, Appl Biochem Biotechnol, 170, 1871-1884.

Ozyilmaz, E., Sayin, S., 2013,A magnetically separable biocatalyst for resolution of racemic naproxen methyl ester, Appl Biochem Biotechnol, 36. 1803

Öztürk, N., 2006, Hidrofobik nano yapılarda *Candida Rugosa Lipaz* immobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniverstesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın, 1-128.

Özcan, F., Yeni Kaliks[4]aren Türevlenin Sentezi ve Arsenat Anyonunun Sulardan giderilmesinde kullanılması, Selçuk üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans, Kimya, 2006 – 2009.

Paiva, A.L., Balcao, V.M. and Maltaca, F. X., 2000, Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases, *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 187-204.

Park, S.W., Choi, S.Y., Chung, K.H., Hong, S.I., Kim, S.W., 2002, Characteristics of GL-7-ACA acylase immobilized on silica gel through silanization, *Biochemical Engineering Journal*, 11, 87-93.

Pedersen, C. J., 1967, Cyclic polyethers and their complexes with metal salts, *J. Am. Chem. Soc.*, 89, 2495.

Pedersen, C. J., 1988[a], The discovery of crown ethers, *Chem. Scripta.*, 28 (3), 229.

Pedersen, C. J., 1988[b], The discovery of crown ethers, *J. Incl. Phenom.*, 6, 337.

Petrak, K.,2005, *Drug Discovery Today* 10, 23/24.

Reetz, M. T., Zonta, A., Simpelkamp, J., 1995, Efficient heterogeneous biocatalysts by entrapment of lipases in hydrophobic sol-gel materials, *Angewandte Chemie* 107, 373–376; *Angewandte Chemie International Edition in English*, 34, 301–303.

Reetz, M. T., Zonta, A., Simpelkamp, J., 1996, Efficient immoblization of lipases by entrapment in hydrophobic sol-gel materials, *Biotechnology and Bioengineering* , 49, 527–534.

Reetz, M. T., 1997, Entrapment of biocatalysts in hydrophobic sol-gel materials for use in organic chemistry, *Advanced Materials,* Weinheim, Ger., 9, 943–954.

Reetz, M. T., Zonta, A., Vijayakrishnan, V., Schimossek, K., 1998, Entrapment of lipases in hydrophobic magnetite-containing sol-gel materials: magnetic separation of heterogeneous biocatalysts, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 134, 251–258.

Reetz, M.T., Tielman, P., Wiesenhoefer, W., Koenen, W., Zonta, A., 2003, Second generation sol–gel encapsulated lipases: robust heterogeneous biocatalysts, *Advanced Synthesis Catalysis*, 345, 717–728.

Reetz, M.T.,2006, Practical protocols for lipase immobilization via Sol-gel techniques, *Humana Press Inc.*, Totowa, NJ., 80-85.

Sahin, O., Erdemir S., Uyanik A., Yilmaz M., 2009, Enantioselective hydrolysis of (R/S)-Naproxen methyl ester with sol–gel encapculated lipase in presence of calix[n]arene derivatives, *Applied Catalysis A: General*, 369, 36-40.

Sahin, O., Yilmaz, M., 2011, Synthesis and fluorescence sensing properties of novel pyrene-armed calix[4]arene derivatives, *Tetrahedron*, 67, 3501-3508.

Sahin, O., Sahin, M., Yılmaz, M., 2012, Synthesis and Fluorescence Sensing Properties of a New Napththalimide Derivative of Calix[4]arene, *Tetrahedron Letters*, 53, 2319-2324.

Saiyed, Z. M., Telang, S. D., and Ramchand, C. N., 2003, Application of magnetic techniques in the field of drug discovery and biomedicine, *BioMagnetic Research and Technology*, 1, 2.

Santos, J.C., Castro, H.F., 2006, Optimization of lipase-catalysed synthesis of butyl butyrate using a factorial design, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 1007–1011.

Sarasija, S., Stutie, P., 2005, Chronotherapevtics; emerging role of biorthythms in the optimizing the drug therapty, *İndian Journal of Pharmaceutical Sciences,* 67, 137-140

Sayin, S., Ozcan, F., Yilmaz M., 2010, Synthesis of calix[4]arene bearing pyridinium units supported silica gel for sorption of arsenate and dichromate anions, *Desalination*, 262, 99–105.

Sayin, S., Ozcan, F., Yilmaz, M., Tor, A., Memon, S., Cengeloglu, Y., 2010, Synthesis of calix[4]arene-grafted magnetite nanoparticles and evaluation of their arsenate as well as dichromate removal efficiency, *Clean – Soil, Air, Water*, 38 (7), 639-648

Sayin, S., Yilmaz, M., 2011, Preparation and uranyl ion extraction studies of calix[4]arene-based magnetite nanoparticles, *Desalination*, 276, 328-335.

Sharma, R., Chisti Y., Banerjee, U. C., 2001, Production, purification, characterization,and applications of lipases, *Biotechnology Advances*, 19, 627-662.

Shaw, J.F., Chang, R.C., Wang, F.F., Wang, Y.J., 1990, Lipolytic Activites of a Lipase İmmobilized on Six Selected Suporting Materials, *Biotechnology Bioengineering*, 35,132-137.

Secundo, F., Carrea, G., Tarabiono, C., Brocca, S., 2003, Activity and enantioselectivity of wildtype and lid mutated *Candida rugo*sa lipase ısoform 1 in organic solvents, *Biotechnology and Bioengineering*, 86, 237- 240.

Shimizu, S., Shirakawa, S., Suzuki, T., Sasaki, Y., 2001, Water-soluble calixarenes as new inverse phase-transfer catalysts. Their application to aldol-type condensation and Michael additionreactions in water, *Tetrahedron*, 57, 6169-6173.

Sökmen, B. B. 2005, Kayısı (*Armeniaca Vulgaris* Lam.) tohumlarından lipazın saflaştırılması ve çeşitli taşıyıcılara immobilize edilmesi, Doktora Tezi, Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programı, İstanbul.

Sultanoğlu, P., Namlucuoğlu, F., 2009, Lipaz Enzimi ve Kullanım Alanları, Lisans Tezi, Konya, 48.

Stewart, D. R., Gutsche, C. D., 1993, The one-step synthesis of p-tert-butylcalix[5]arene, *Org. Prep. Proced. Int.*, 25, 137-139.

Tabakci, M., Yilmaz, M., 2008, Sorption characteristics of Cu(II) ions onto silica gel-immobilized calix[4]arene polymer in aqueous solutions: Batch and column studies, *J. Haz. Mat.*, 151, 331-338

Tabakcı, B., Yılmaz, M. and Beduk, A.D., 2012, Novel calix(4)arene-based polymeric catalysts as acyltransferase enzyme mimics. *J. Appl. Polym. Sci*., 125, 1012-1019.

Takac, S., Bakkal, M., 2007, Impressive effect ofiImmobilization conditions on thecatalytic activity and enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase toward *S*-Naproxen Production, *Process Biochemistry*, 42, 1021–1027.

Taneri, F., 2004, Bazı antimikrobiyal maddelerin siklodekstrin komplekslerinin hazırlanması ve bunların farmasötik formülasyonlarda kullanımı, Doktora Tezi, *Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, İzmir, 1-28.

Tejo, B. A., Salleh, A.B., Pleiss, J., 2004, Structure and dynamics of *Candida rugosa* lipase: The role of organic solvent, *Journal Molecular Model*, 10, 358-366.

Telefoncu A., 1997, Temel ve uygulamalı enzimoloji, biyokimya lisansüstü yaz okulu kitabı, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.

Ting, Y., Verboom, W., Groenen, L.C., van Loon, J-D., Reinhoudt, D.N., 1990, Selectively dehydroxylated calix[4]arenes and 1,3-dithiocalix[4]arenes-novel classes of calix[4]arenes, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 20, 1432-1433.

Ting, W.J., Tung ,K.Y., Giridhar, R., Wu, W.T., 2006, Application of binary immobilized *Candida rugosa* lipase for hydrolysis of soybean oil, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 42, 32–38.

Tiryaki, Ö. İ., 1993, Endüstriyel proseslerde biyokatalizör pelletlerin kullanımı, Yüksek Lisans Semineri, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Tischer, W. and Wedekind, F., 1999, Immobilized enzymes: methods and applications, *Topics inCurrent Chemistry***,** 200**,** 95–126.

Tutar, H.,Yilmaz, E., Pehlivan, E., Yilmaz, M., 2009, Immobilization of Candida rugosa lipase on sporopollenin from Lycopodium clavatum, *International Journal of Biological Macromolecules*, 45, 315–320.

Tüzün, C., 2002, Biyokimya, Palme Yayıncılık, 4. Baskı, Ankara, 1-484

Uekama, K., Horiuchi, Y., İrie, T., Hirayama, F., 1989, *O*-Carboxymethyl-*O*-ethyl-cyclomaltoheptaose as a delayed release type drug carrier. Improvement of the oral availability of diltiazem, *Carbohydrate Research,* 192, 323-330.

Uyanik, A., Sen, N.,Yilmaz M., 2011, Improvement of catalytic activity of lipase from Candida rugosa via sol–gel encapsulation in the presence of calix(aza)crown, *Bioresource Technology*,102, 4313–4318.

Vogtle, F., 1993, Supramolecular chemistry an introduction, *J. Wiley and Sons*, New York.

Villeneuve, P., Mudehwa, J.M., Haas, M.J., 2000, Customizing Lipasesfır Biocatalysis a Survay of Chemical, Physical and Moleculer Biological Approaches, *J. Moleculer Catalysis B: Enzymatic*, 9, 113-148

Wu, J.Y., Liu, S.W., 2000, Influence of alcohol concentration on lipase-catalyzed enantioselective esterification of racemic naproksen in isooctane: under controlled water activity, *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 124–130

Wolley, P., Petersen, S.B., 1994, Lipases Their Structure, Biochemistry and Appilication, Cambridge Universty Press, Cambridge

Yıldız, H., Kocaman,Ö., Bayındır, M., Dokuzbuçuk, Y., 2012, Selülozun Lipaz Enzimi ile İmmobilizasyonu, Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Lisans Bitirme Tezi, Konya, 1-70.

Yilmaz, A., Tabakci, B., Akceylan, E., Yilmaz,M., Synthesis and dichromate anion extraction ability of p-tert-butylcalix[4]arene diamide derivatives with different binding sites, Tetrahedron, 63, 5000-5005

Yilmaz, M., 1999, Synthesis of an oligomer-supported calix[4]arene and selective extraction of Li^{+}", *React. and Func. Polym.*, 40, 129-133.

Yilmaz, E., Sezgin, M., Yilmaz, M., 2009, Synthesis and characterization of cyclodextrin-based polymers as a support for immobilization of Candida rugosa lipase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 57, 109-114

Yılmaz, E., 2010, Farklı teknikler kullanarak değişik destek materyallerine lipazimmobilizasyonu ve bir anti-inflammator olan S-naproksenin oluşumunda kullanılması, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Entitüsü, Konya, 1-275.

Yılmaz (Ateş), F., 2008, Bazı Amin Grupları Taşıyan Kaliks[4]aren Türevlerinin Sentezi ve Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, 1-127.

Yilmaz, E., Sezgin, M., Yilmaz, M., 2010, Enantioselective hydrolysis of rasemic naproxen methyl ester with sol–gel encapsulated lipase in the presence of sporopollenin, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62, 162-168

Yilmaz, E., Sezgin, M., Yilmaz, M., 2011, Immobilization of Candida rugosa lipase on magnetic sol–gel composite supports for enzymatic resolution of (R,**S**)-Naproxen methyl ester, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 69, 35-41

Yilmaz, E., Can K., Sezgin, M., Yilmaz, M., 2011, Immobilization of Candida rugosa lipase on glass beads for enantioselective hydrolysis of racemic Naproxen methyl ester,*Bioresource Technology*, 102, 499-506

Fu, Y.Q., Li, Z.C., Ding, L.N., Tao, J.C., Zhang, S.H., Tang, M.S., 2007, Direct asymmetric aldol reaction catalyzed by simple prolinamide phenols, *Tetrahedron*, 17, 3351-3357

Zaitsev, S.Y., Gorokhova, I.V., Kashtigo, T.V., Zintchenko, A., Dautzenberg, H., 2003, General Approach for Lipases Immobilization in Polyelectrolyte Complexes, *Colloids and Surfaces A:Physicochemmistry Engineering Aspects*, 221, 209-220.

Zeng, L., Luo, K., Gong, Y., 2005, Preparation and characterization of dendritic composite magnetic particles as a novel enzyme immobilization carrier, *Journal of Molecular Catalysis B*:*Enzymatic*, 38, 24–30

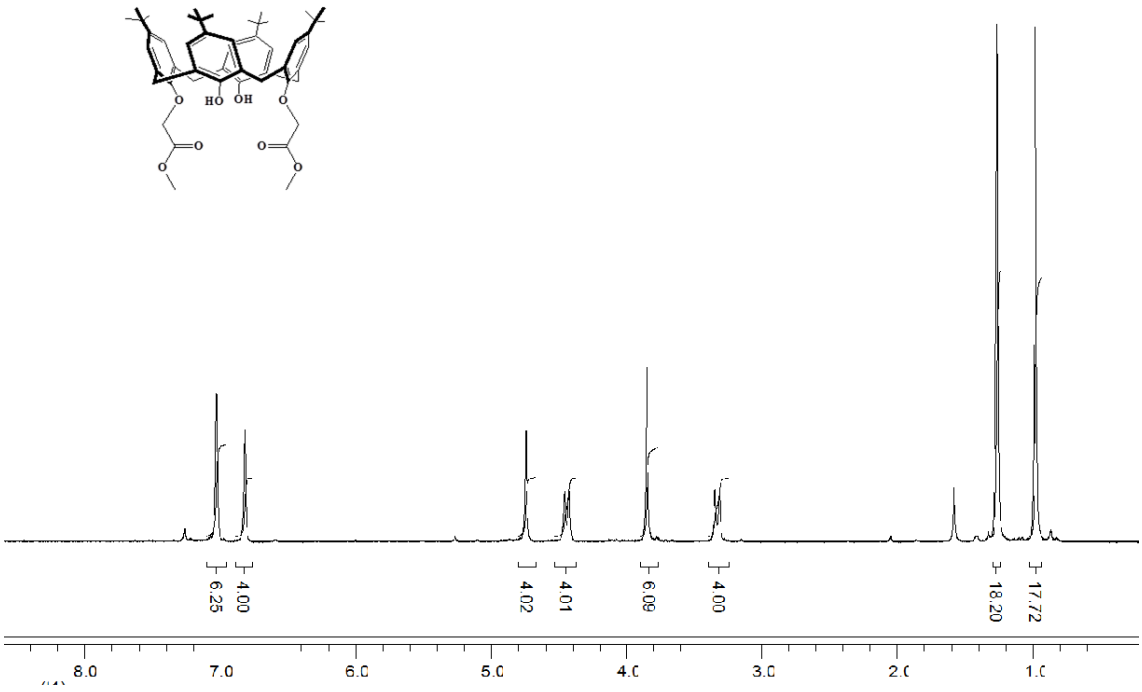
Zinke, A., Ziegler, E., Berlin, 1944., Zur kenntnis des hartungs-prozesses von phenol-formaldehyd-harzen, *X. Mitteilung, Ber*.Dtsch. Chem. Ges., 77 (B), 264-72.

Xu, W., Li, J.S., Feng, Y.Q., Da, S.L., Chen, Y.Y., Xiao, X.Z., 1998, Preparation and Characterization ofp-tert-Butyl-Calix[6]arene- Bonded Silica Gel Stationary Phase for High-Performance Liquid Chromatography, *Chromatographia*, 48, 245-250.

EKLER

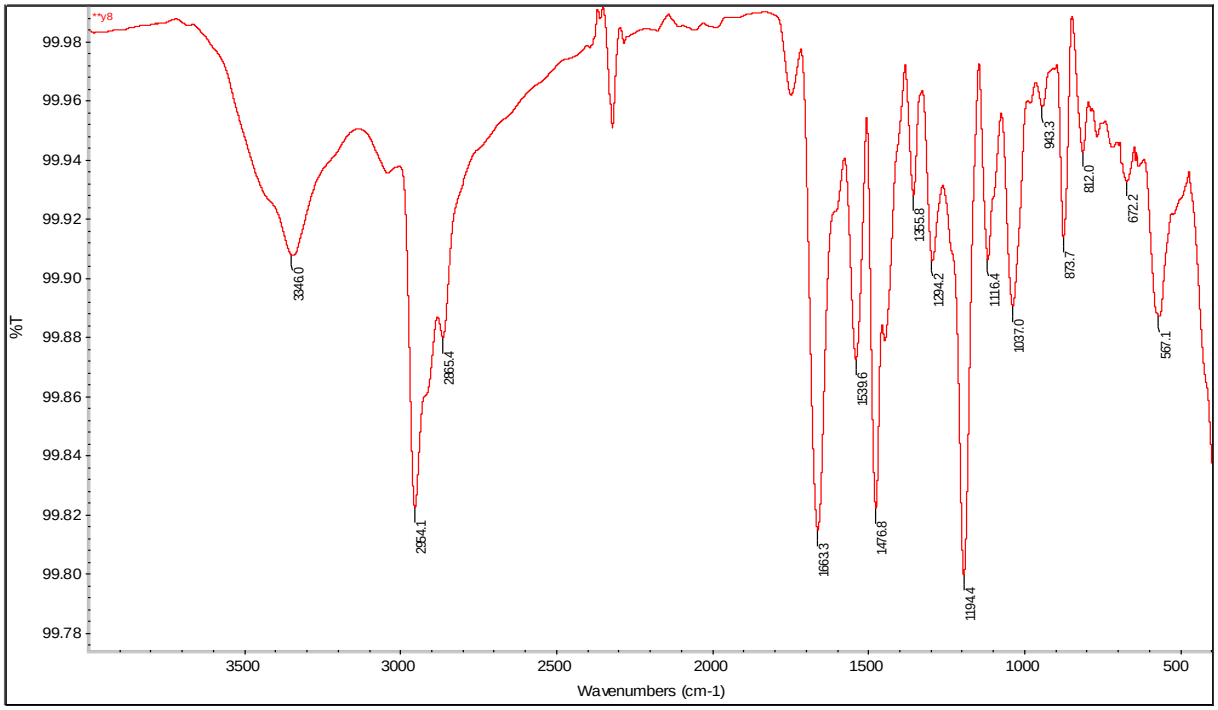
-SENTEZLENEN BİLEŞİKLERİN IR ve ^{1}H NMR SPEKTRUMLARI

Ek:1

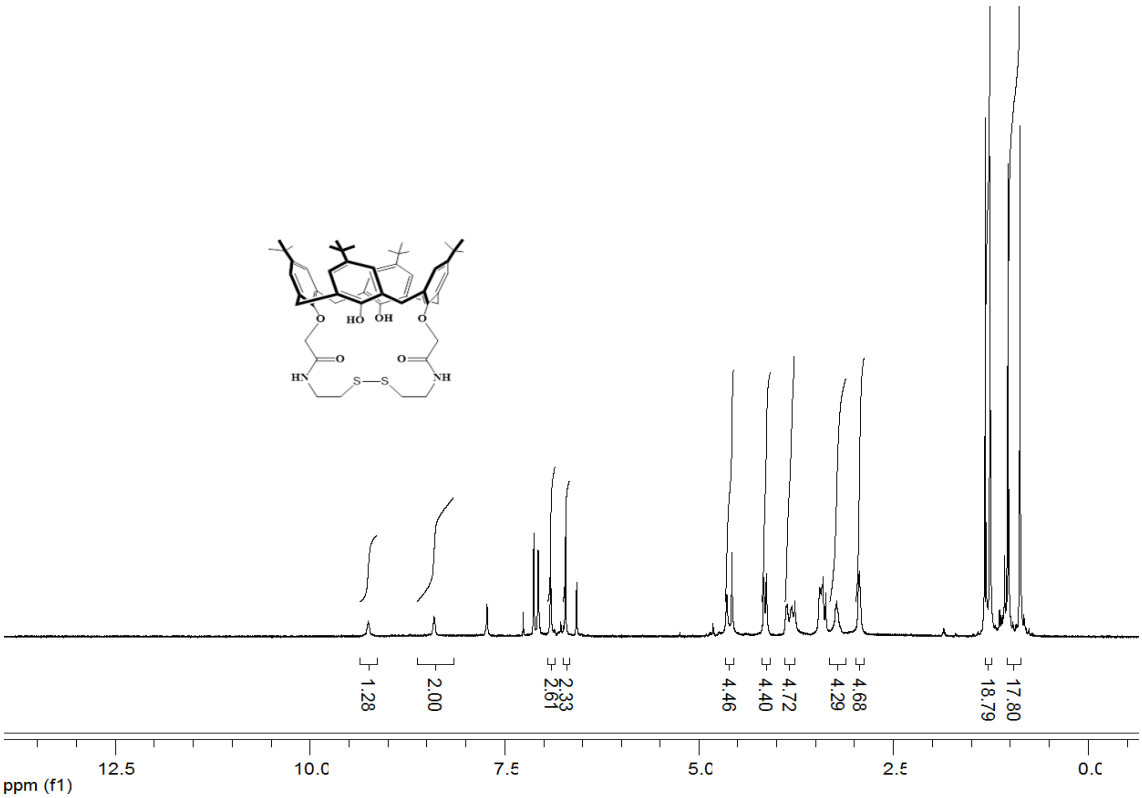


Şekil.1. 2 numaralı bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumu

Ek:2

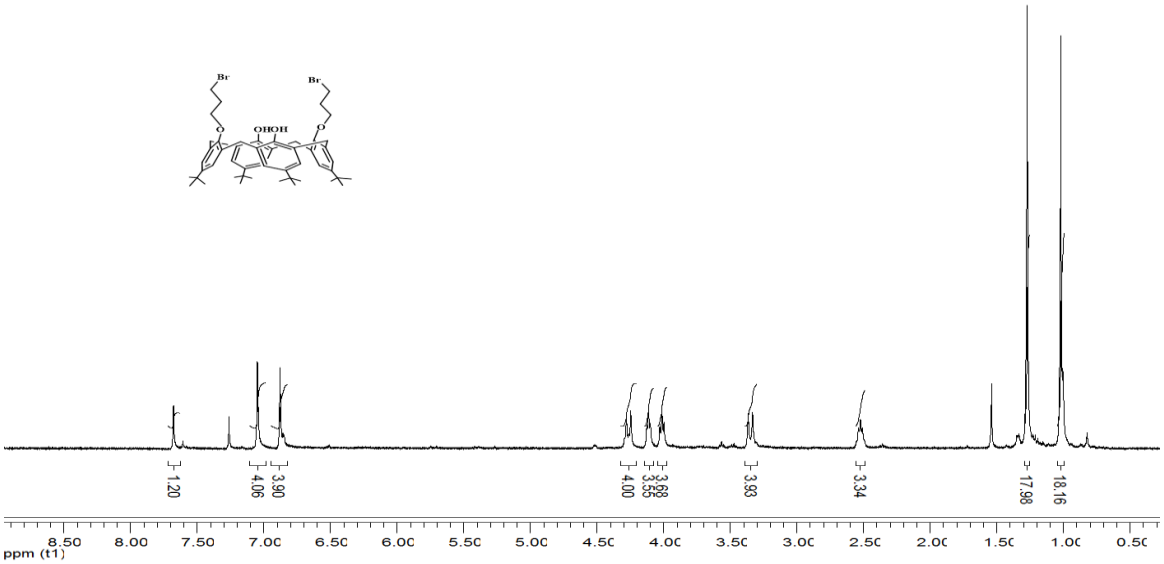


Şekil.2. 3 numaralı bileşiğin F-TIR spektrumu



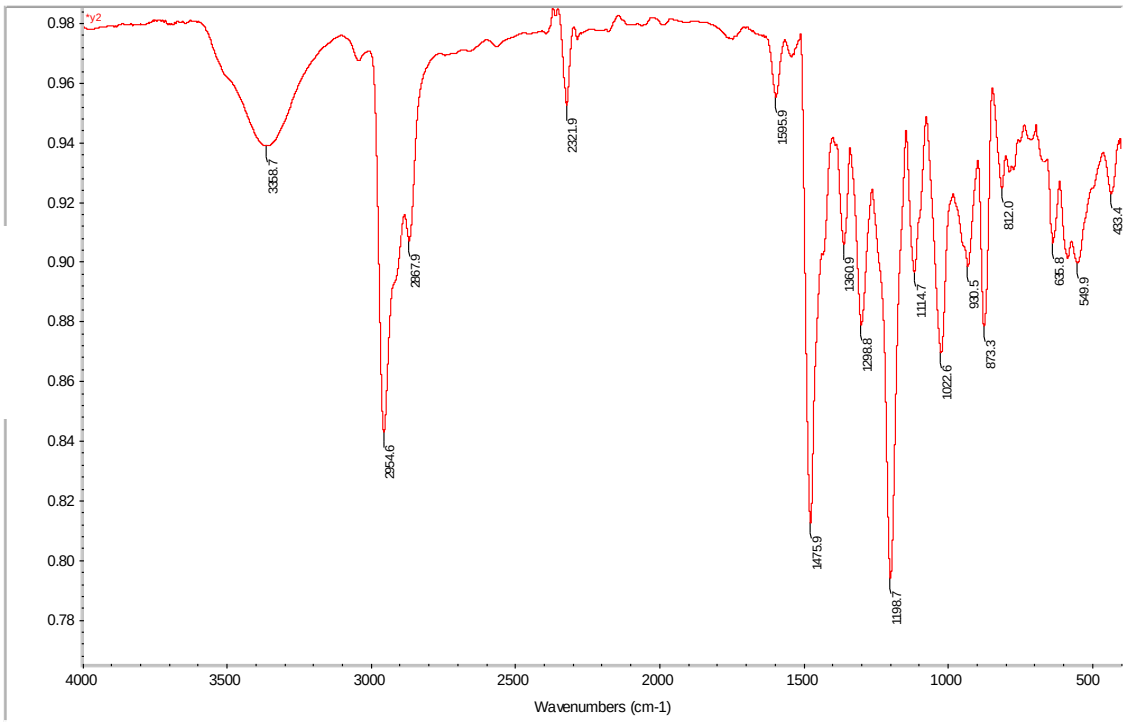
Şekil.3. 3 numaralı bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumu

Ek:3

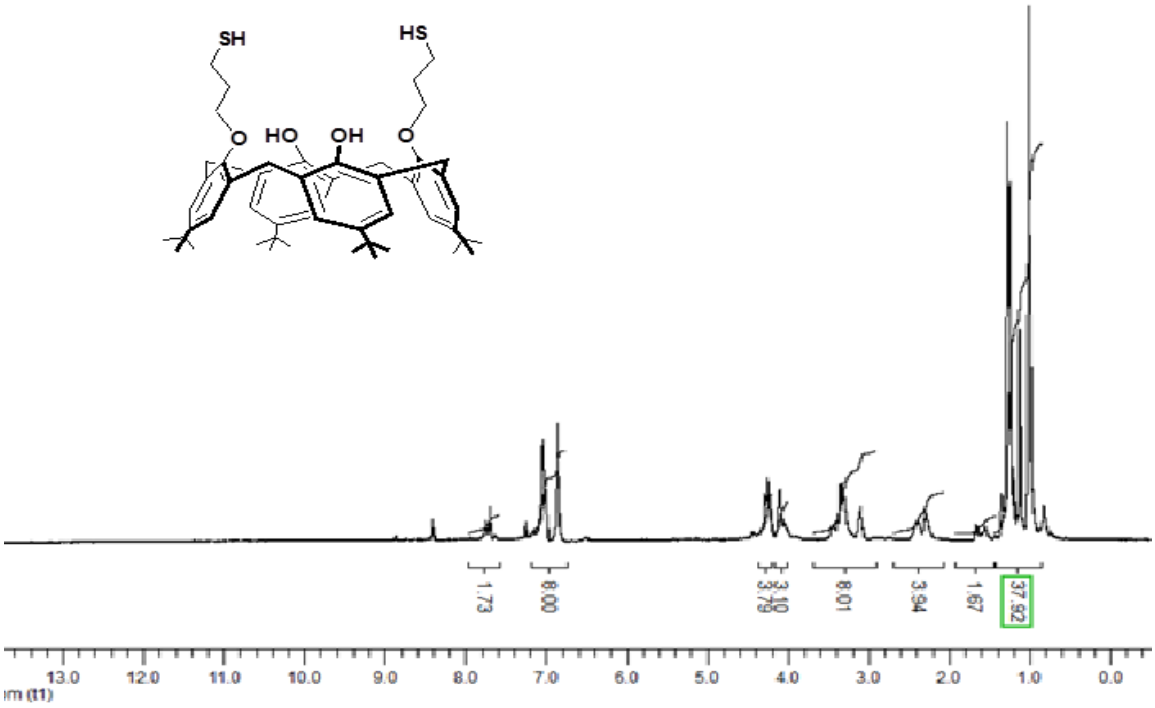


Şekil.4. 4 numaralı bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumu

Ek:4

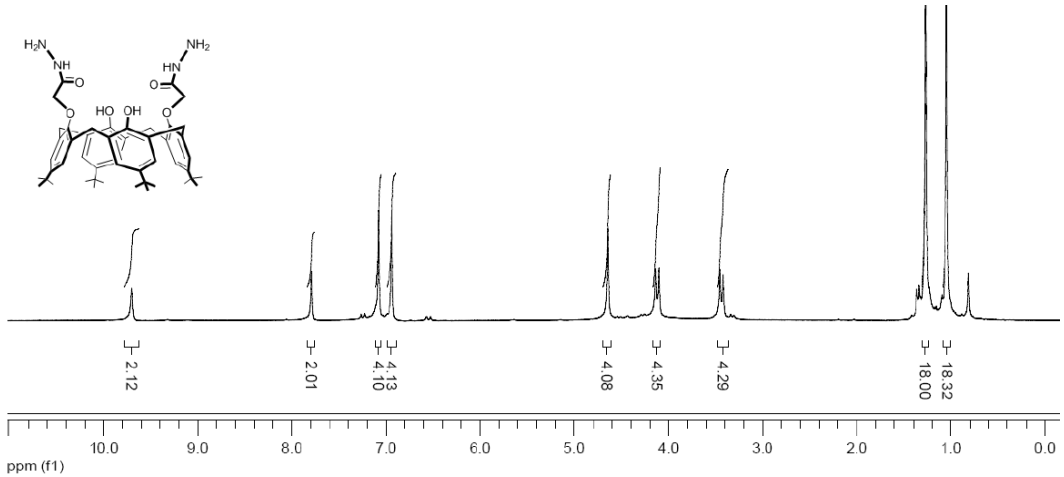


Şekil.5. 5 numaralı bileşiğin F-TIR spektrumu



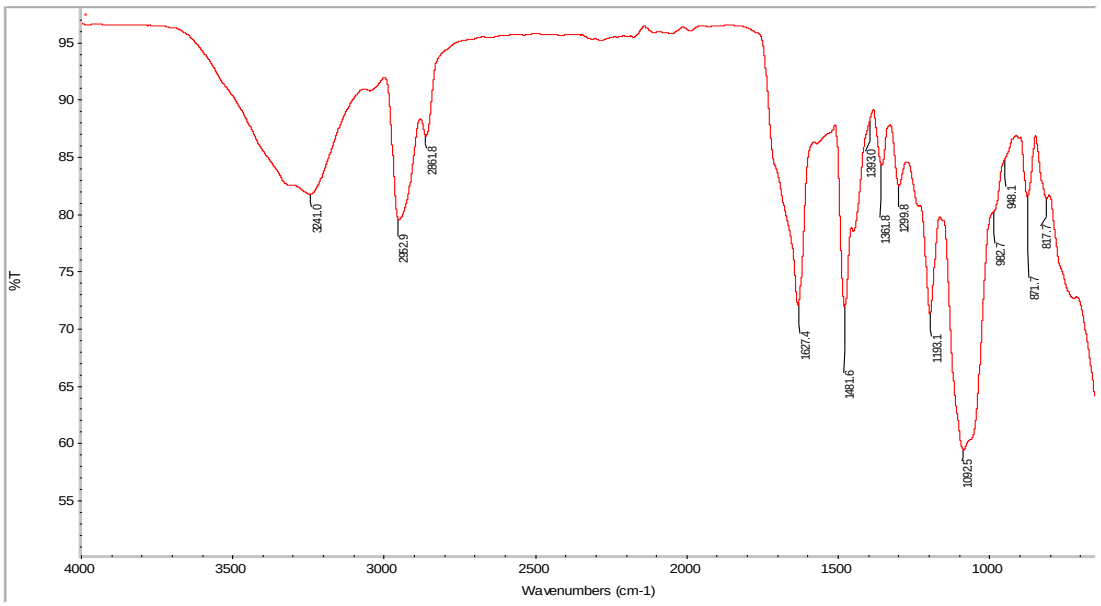
Şekil.6. 5 numaralı bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumu

Ek:5

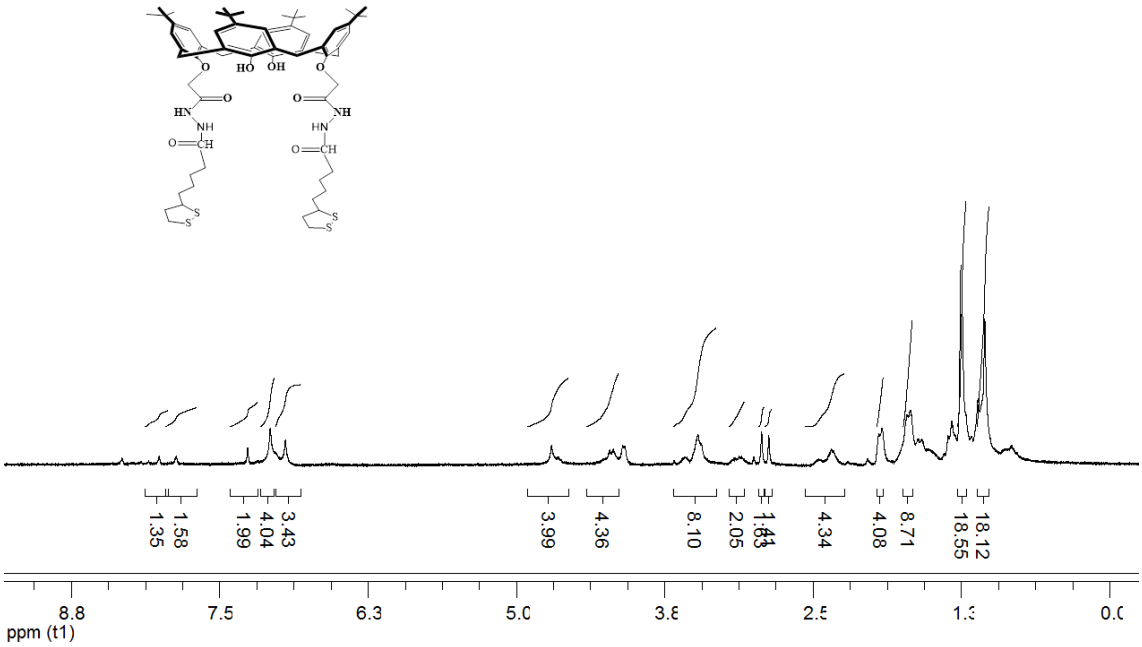


Şekil.7. 6 numaralı bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumu

Ek:6



Şekil.8. 7 numaralı bileşiğin F-TIR spektrumu



Şekil.9. 7 numaralı bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumu

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	**:**	Hasan YILDIZ
Uyruğu	**:**	T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi	**:**	Konya 09.09.1986
Telefon	**:**	0552461519
Faks	**:**	
e-mail	**:**	hyildiz.86@hotmail.com

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	Muhuttin Güzel Kılıç Lisesi / KONYA	2004
Üniversite	:	Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Selçuklu/KONYA	2011
Yüksek Lisans	:	Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsünde Halen Öğrenci Bulunmaktadır.	
Doktora	:		

YABANCI DİLLER

İngilizce