



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PRİDİL VE NİTRO GRUBU TAŞIYAN KALİKS[4] AREN TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE LİPAZ KATALİZLİ ENANTİYOSEÇİMLİ TEPKİMELERDE KULLANILMASI

Vildan DOĞAN

YÜKSEK LİSANS

KİMYA Anabilim Dalı

Haziran-2015
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS

PRİDİL VE NİTRO GRUBU TAŞIYAN KALİKS[4] AREN TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE LİPAZ KATALİZLİ ENANTİYOSEÇİMLİ TEPKİMELERDE KULLANILMASI

Vildan DOĞAN

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa YILMAZ

2015, 97 Sayfa

Jüri
Prof. Dr. Erol PEHLİVAN
Prof. Dr. Mustafa YILMAZ
Doç. Dr. Elif Özyılmaz

Bu çalışmada nitro ve piridil gruplarının etkisinin lipaz katalizli enantiyoseçimli tepkimedeki etkilerini gözlemlemek için, nitro, piridil ve her iki grubu bulunduran kaliks[4]aren türevleri (**5, 6, 9, 10**) sentezlendi. Sentezlenen bileşiklerin yapıları spektroskopik teknikler (FTIR, ^{1}H NMR ve ^{13}C- NMR) ile aydınlatıldı.

Sonra foksiyonlu kaliks[4]aren bileşikleri Fe_3O_4 varlığında lipaz immobilizasyonu yapılarak rasemik flurbiprofen metil esterinin enantiyoseçimli hidroliz tepkimelerinde kullanıldı. Reaksiyonlar normal faz kiral kolon kullanılarak ürünlerin enantiyomerik kompozisyon analizi ve enantiyomerik fazlalıkları sıvı kromatografisi tekniği (HPLC) ile yapıldı.

Anahtar Kelimeler: Kaliksaren, sol-jel, enantiyoseçimlilik, flurbiprofen

ABSTRACT

MS THESIS

SYNTHESIS AND APPLICATION OF CALIX[4]ARENE DERIVATIVES BEARING PYRIDYL AND NITRO GROUPS, IN THE LIPASE-CATALYZED ENANTIOSELECTIVE REACTIONS

Vildan DOĞAN

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

Advisor: Prof. Dr. Mustafa YILMAZ

2015, 97 Pages

Jury
Prof. Dr. Erol PEHLİVAN
Prof. Dr. Mustafa YILMAZ
Assoc.Prof.Dr.Elif Özyılmaz

In order to determine the effects of nitro and pyridyl moieties on the lipase catalyzed enantioselective reactions, various calix[4]arene derivatives-functionalized with nitro, pyridine and both of functional groups (**5**,**6**,**9**,**10**) have been synthesized. Structures of all synthesized compounds have been characterized using spectroscopic techniques (FTIR, ^{1}H NMR and ^{13}C- NMR).

Different functionalized calix[4]arene derivatives and Fe_3O_4 magnetic nanoparticles were used as additives for the encapsulation of lipase. Then, these encapsulated lipases were performed as effective catalysts for the enantioselective hydrolysis reaction of (R/S)-flurbiprofen methyl ester. Moreover, the effects of reaction parameters such as temperature and pH on the catalytic affinities of the encapsulated lipases were also discussed.

Keywords: Calixarene, sol-gel, enantioselective, 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, Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri koordinatörlüğü (BAP) tarafından 15201004 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 Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri koordinatörlüğüne teşekkür ederim.

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde bana her konuda yardımcı olan ve tezimin hazırlanmasında emeği geçen Yrd. Doç. Dr. Serkan SAYIN ve Arş. Gör. Dr. Arzu UYANIK hocalarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımda bana destek veren ve yardımlarını gördüğüm Doç. Dr Elif ÖZYILMAZ ve laboratuar çalışma arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans tez çalışmalarımda labarotuvar imkanlarını kullandırdığı için kimya bölüm başkanlığına teşekkür ederim.

Ayrıca tez çalışmamda ve öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini gördüğüm aileme sonsuz minnettarlığımı sunarım.

Vildan DOĞAN
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 isimlendirilmesi 4
1.1.3. Kaliksarenlerin Sentezi 5
1.1.4. p-ter-Bütilkaliks[n]arenlerin Sentezi Üzerine Kullanılan Bazın Etkisi 6
1.1.5. Kaliksarenlerin Elde Edilişi ve Reaksiyon Mekanizması 6
1.1.6. Kaliksarenlerin Konformasyonları 8
1.1.7. Kaliksarenlerin Fonksiyonlandırılması 9
1.1.8. Kaliksarenlerin Kullanım Alanları 11
- Molekül / İyon Taşıyıcı Kaliksarenler 12
- Sabit faz olarak kaliksarenlerin kromotografide kullanılması 14
- Kaliksarenlerin sensör (iyon seçici elektrot, ISE) ve membran tekniklerinde kullanılması 16
- Enzim-mimik olarak kaliksarenler 16
- Katalizör çalışmalarında kaliksarenlerin kullanılması 18

1.2. Enzimler ve Genel Özellikleri 19
1.2.1. Lipazlar 20
1.2.2. Candida Rugosa Lipaz (CRL) 21
1.2.3. Lipazların Genel Özellikleri 22
- Optimum pH 22
- Optimum sıcaklık 22
- Lipazın aktivasyonu ve inhibisyonu 22
- İzoelektrik nokta(pI) 22
- Aktivite 23

1.2.4. Enzim İmmobilizasyonu 23
1.2.5. İmmobilizasyon Yöntemleri 24

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **30**

3. MATERYAL VE YÖNTEM..... 37

3.1. Enstrümental Teknikler..... 37
3.2. Kimyasal Sentezler..... 37
3.2.1. *p-ter*-Butilkaliks[4]aren (1) ' in sentezi (Gutsche 1990)..... 38
3.2.2. Kaliks[4]aren (2)' in sentezi (Gutsche 1990)..... 38
3.2.3. 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,27-dimetoksikarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi-kaliks[4]aren (3) (Collins, 1991)..... 39
3.2.4. 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,27-dihidrazinamitkarbonilmetoksi-..... 40
3.2.5. 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,27-(4-(4-nitrofenil)-1-ditiyosemikarbazit) karbonilmetoksi-26,28-dihidroksi-kaliks[4]aren (5)..... 41
3.2.6. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,27-bis(2-nitropiridil-2-ilamin)etilaminkar- 42
3.2.7. 25,27-Dimetoksikarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi-kaliks[4]aren (7) (Unob, 1998)..... 43
3.2.8. 25,27-Bis(3-hidroksipropil)amitkarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi-kaliks[4]aren (8)..... 43
3.2.9. 25,27-Bis(3-(*p*-nitrofenilkarbamat)propil)amitkarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi-kaliks[4]aren (9)..... 44
3.2.10. 5,11,17,23-tetra-4-(etilaminometil)piridil-25,26,27,28-tetrahidroksi kaliks[4]aren (10) (Mermer 2012)..... 46
3.2.11. Manyetik Fe_3O_4 nanopartikülünün sentezi (Zeng, 2005)..... 47
3.2.12. Sol-gel metoduna göre Lipaz İmmobilizasyonu..... 47
- Kaliksarenlerin Sol-jel tutuklama metodu (Reetz, 2003)..... 47
- Protein miktarı (Bradford, 1976)..... 47
- Aktivite Tayini (Hung, 2003; Chiou, 2004)..... 48
- Optimum pH tayini..... 49
- Optimum sıcaklık tayini..... 49

3.2.13. HPLC çalışmaları..... 49
- Enantioseçimli Tepkimelerin Genel Prosedürü (Cernia, 2002)..... 49

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA..... 51

4.1. Sol-Jel Tekniğine göre Lipaz İmmobilizasyonu..... 57
Optimum pH..... 59
Optimum sıcaklık..... 60
4.2. İmmobilize Lipazların Enantiyoseçimli Tepkimelerde Kullanılması..... 61
Farklı pH ve sıcaklıklarda dönüşümler..... 63
Tekrar kullanılabilirlik..... 67

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER..... 70

KAYNAKLAR..... 71

EKLER..... 78

ÖZGEÇMİŞ..... 97

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar

CPS	Kloropropilsilikajel
MN	Manyetik nanopartikül
CRL	*Candida Rugosa* Lipaz
TMOS	Tetrametoksisilan
MTMOS	Metiltrimetoksisilan
TEOS	Tetraetoksisilan
OTES	Oktiltrietoksisilan
p-NPP	*p*-nitrofenil palmitatın
p-NP	*p*-nitrofenol
BSA	Bovin serum albumin
Enc	Enkapsüle
E.N	Erime noktası
DMF	Dimetil formamid
DCM	Diklormetan
EtAc	Etilasetat
Büt	Tersiyer bütil
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
IR	Kızıl ötesi
ITK	İnce tabaka kromotografisi
UV	Ultraviole visible spektroskopisi

1. GİRİŞ

İnsanoğlu, geçen her gün teknolojiyi geliştirmekte ve ekonomik faaliyetlerde bulunmaktadır. Teknolojinin gelişmesiyle beraber çevre kirliliği büyük bir sorun haline gelmiştir. Supramoleküler kimya bu sorunların giderilmesi amacıyla, yeni sentetik metodlar ve ayırma teknikleri geliştirmiştir. Yavaş yürüyen yada hiç yürümeyen kimyasal tepkimelerin hızını ve ürün seçiciliğini artırmak amacı ile birçok çalışma yapılmaktadır. Organik tepkimelerin hızını artırmada en yaygın olarak katalizörler kullanılmaktadır. Bunlar organokatalizörler ve biyokatalizörlerdir. Biyokatalizörlerin aktivitesini artırmak amacı ile supramolekül olarak başlangıçta siklodekstrinler (Bender 1978 , Szejtle 1998) ve taç eterler (Petersen 1967 , 1988 [a,b] , İzatt 1992) kullanılmıştır. Son yıllarda ise kaliks(n)arenler kullanılmaktadır. Kaliksarenler, halkalı yapıda olması, kolaylıkla türevlendirilebilmesi ve farklı büyüklükte molekül boşluğu oluşturabilmesi nedeniyle katyon, anyon ve nötral moleküller için iyi birer taşıyıcıdırlar (Böhmer 1995). Bundan dolayı geniş uygulama alanına sahip olmuşlardır.

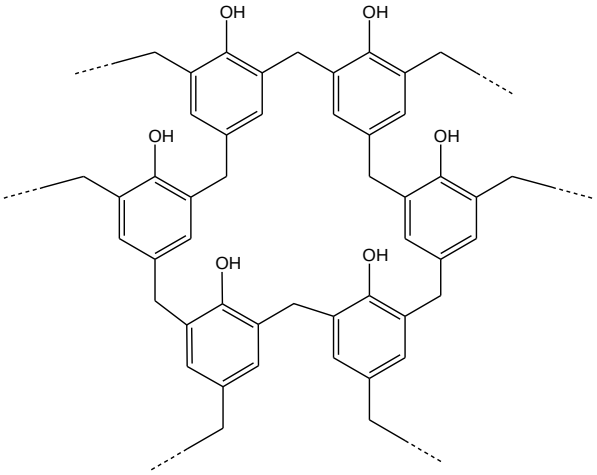
1.1. Kaliksarenler

Supramoleküler kimyanın siklodekstrinler ve taç eterlerden sonra üçüncü kuşak bileşiği olarak bilinen kaliksarenler, halkalı bir yapıya sahip olmasından dolayı anyon, katyon ve nötral bileşikler ile konuk-konak türü kompleks yapabilmektedirler. Bunun yanı sıra, kaliksarenler bir fenol türevi olduğundan organik kimyada fenolik bileşiklerin verdiğin pek çok reaksiyonu verebilme özelliğine sahiptir. Fenolik bileşiklerin aksine kaliksarenler sadece halka boşluğu sayesinde uygun molekül/iyonlar ile seçimli kompleks oluşturmaz aynı zamanda fenolik birimler üzerinden veya fenolik halkaların para pozisyonundan fonksiyonlanmış gruplarda bu tür kompleksleşmede kooperatif etki denilen olayla kompleksleşmeye katkı sağlar.

1.1.1. Kaliksaren tarihçesi

Kaliksarenlerin sentezi, ilk kez bir Alman organik kimyacısı Adolph Von Baeyer (Baeyer 1872) tarafından 1872'de yapıldı. Fazlaca sert, reçinemsi ve

kristallenemeyen bir madde elde edilmiş (Baeyer 1872, Gutsche 1989). Fakat o zamanlarda ki enstrümental tekniklerin yetersizliğinden dolayı yapısı tam olarak aydınlatılamamıştır. Leo Hendrick Baekeland fenol-formaldehit reaksiyonunu geliştirerek bulduğu elastiki katı bir reçineniyi ilk fenoplast olarak isimlendirmiş ve ticari piyasada "bakalit" adıyla pazarlanmıştır (Baekeland 1908). Ticari piyasada ilgi odağı olan bakalitin bulunmasıyla, fenol-formaldehit kimyası git gide büyümüştür.



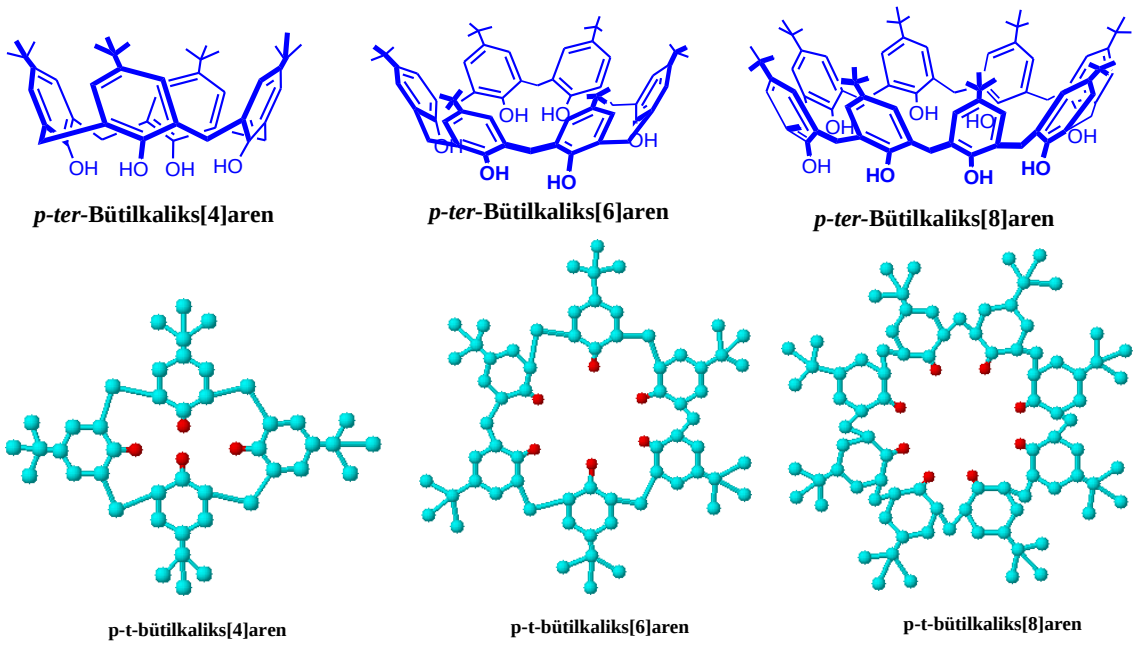
Şekil. 1.1. Fenolik reçine (Bakalit)

1941 yılında Avusturyalı kimyacı Alois Zinke ve Erich Zeigler *p-ter*-bütilfenol ve sulu formaldehiti bazik ortamda etkileştirip, erime noktası 340^{o}C, çözünürlüğü az olan, yüksek molekül ağırlıklı halkalı tetramerik yapıda bir madde elde etmişler (Zinke ve Ziegler, 1944). Ancak o günün analitik ölçümlerinin sınırlı olmasından dolayı yapısını tam olarak aydınlatılamamıştır (Zinke 1944).

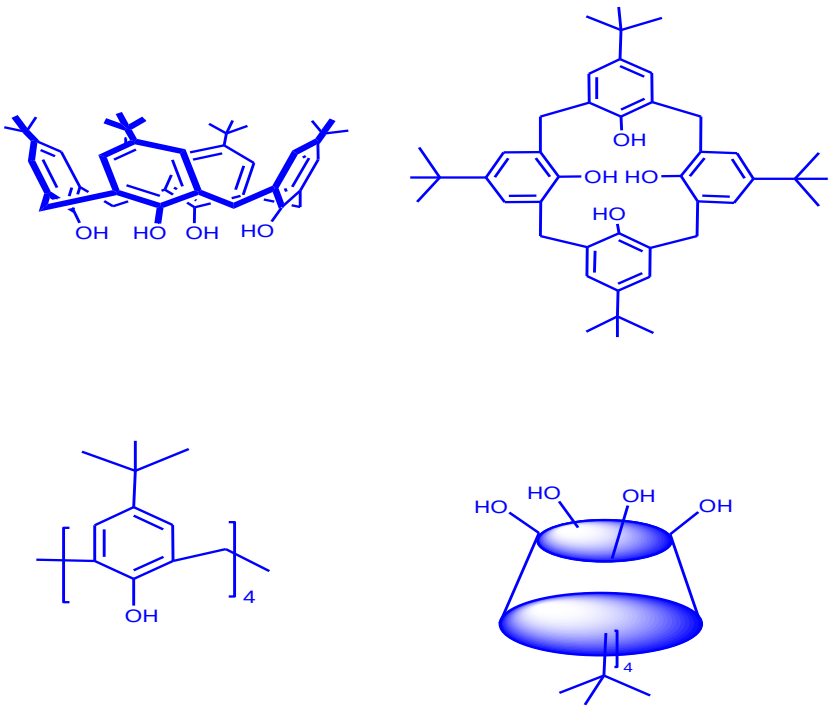
Cornforth, *p-ter*-bütil fenol ile sulu formaldehiti reaksiyona sokarak kimyasal formülleri aynı $(C_{11}H_{14}O)_n$ fakat erime noktaları farklı olan iki ayrı ürün izole etmiştir (Gutsche 1989). Cornforth bu bileşiklerin aynı bileşik olabileceğini ancak iki farklı konformasyonda bulunduklarından dolayı iki farklı erime noktasına sahip olduklarını bildirmiştir (Gutsche 1989).

Gutsche ve arkadaşları, Zinke ve Ziegler'in elde ettikleri ürünün yalnızca tetramer olmadığını belirterek bu ürünün tetramer, hekzamer, oktamer ve bir miktarda lineer oligomer karışımı olduğunu söylemişlerdir. Gutsche, *p-ter*-bütilfenol ile formaldehiti uygun koşullar altında reaksiyona sokarak halkalı tetramer, hekzamer ve oktamer sentezlerini gerçekleştirmek için çeşitli yöntemler geliştirip saf olarak ve

yüksek verim ile bu bileşikleri sentezlemeyi başarmıştır (Gutsche, 1990, 1993). Gutsche ve arkadaşları halkalı pentamer ve heptamer yapılarını da saf olarak fakat düşük verimle elde etmişlerdir (Stewart ve Gutsche, 1993).



Şekil. 1.2. *p-ter*-Bütilkaliks[4]aren (halkalı tetramer), *p-ter*-Bütilkaliks[6]aren (halkalı hekzamer) ve *p-ter*-Bütilkaliks[8]aren (halkalı oktamer)

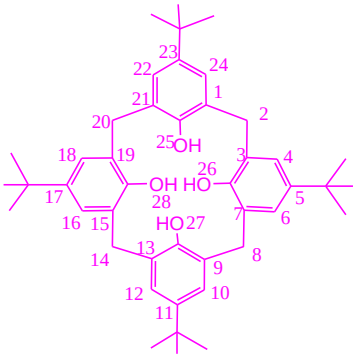


Şekil. 1.3. *p-ter*-Bütilkaliks[4]arenin farklı gösterilişi

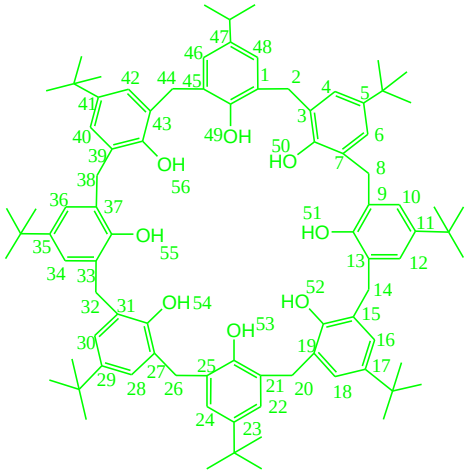
1.1.2. Kaliksarenlerin isimlendirilmesi

Sistematik adlandırmaya göre halkalı tetramer "Pentasiklo-[19.3.1.^{3,7}1.^{9,13}1.^{15,19}]-oktakosa-1-(25),3,5,7(28),9,11,13(27),-15,17,19(26),21,23-dodesan 25,26,27,28-tetrol" olarak adlandırılmaktadır (Gutsche 1989, Sayin 2008). "Midwest Regional Meeting of the American Chemical Society" kongresinde Gutsche kaliksarenlerin sistematik olarak isimlendirilmesinde daha kolay bir yol izlenmesi gerektiğini söylemiştir (Gutsche 1975). Gutsche, halkalı oligomer ürününü, taç şeklindeki bir yapıya benzeterek bu ürünü aromatik halkayı belirten "chalice (kaliks)" kelimesi ve "aren" kelimesinin birleşiminden oluşan kaliksaren olarak adlandırmayı tercih etmiştir (Gutsche 1978).

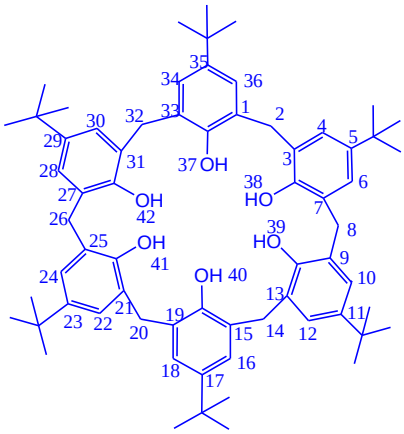
Farklı boyuttaki halkalı oligomerlerin türevleri arasında karışıklığa sebebiyet vermemek için Gutsche ve ark. 'kaliks' ve 'aren' kelimeleri arasına parantez içinde sayı ile yapıdaki aromatik birimlerin sayısının belirtilmesi ve ürün hangi fenolden elde ediliyorsa ürünün isminin başına *p*-sübstitüe eki getirerek adlandırmada büyük kolaylık sağlanacağını belirtmişlerdir (Gutsche 1990). Dolayısıyla tetramer yapıdaki bu bileşik, 5,11,17,23-tetra-*tert*-alkil-25,26,27,28-tetrahidroksi kaliks[4]aren yada kısaca p-alkil-kaliks[4]aren olarak adlandırılmıştır.



5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,26,27,28-tetrahidroksikaliks[4]aren



5,11,17,23,29,35,41,47-Okta-*ter*-bütil-49,50,51,52,53,54,55,56-oktahidroksikaliks[8]aren



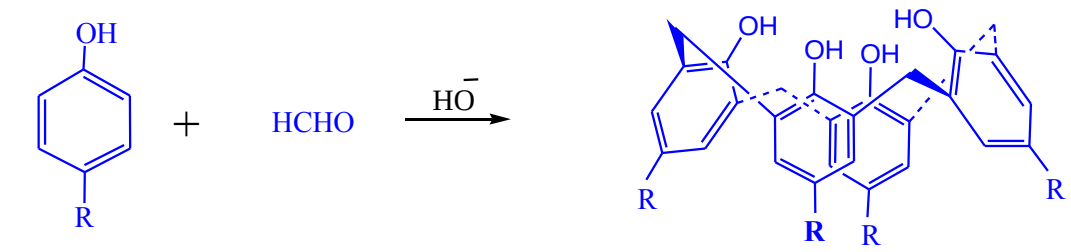
5,11,17,23,29,35-Heksa-*ter*-bütil-37,38,39,40,41,42-heksahidroksikaliks[6]aren

Şekil. 1.4. *p-ter*-Bütilkaliks[4]aren, *p-ter*-bütilkaliks[6]aren ve *p-ter*-bütilkaliks[8]aren yapıları ve numaralandırılması

1.1.3. Kaliksarenlerin Sentezi

Geniş kullanım alanına sahip kaliksarenler son yıllarda büyük bir ilgi görmekte ve üzerinde sıkça çalışma yapılan bir araştırma konusu haline gelmektedir. Gutsche'nin p-tert-bütilkaliks[4]aren (Gutsche ve Iqbal 1990), p-tert-bütilkaliks[6]aren (Gutsche 1990) ve p-tert-bütilkaliks[8]aren (Munch ve Gutsche 1990) olarak tekrarlanan birimlere sahip *tert*-bütilkaliks[n]arenler için tek-basamaklı sentez metotlarının yapılması yeni kaliksaren türevlerinin çoğalmasına sebeb olmuştur.

p-tert-bütilkaliks[4]arenin sentezi aşağıdaki gibidir.



R = *tert*-bütil

R = *tert*-bütil

Şekil 1.5. *p-tert*-Bütilkaliks[4]aren'in sentezi

1.1.4. p-ter-Bütilkaliks[n]arenlerin Sentezi Üzerine Kullanılan Bazın Etkisi

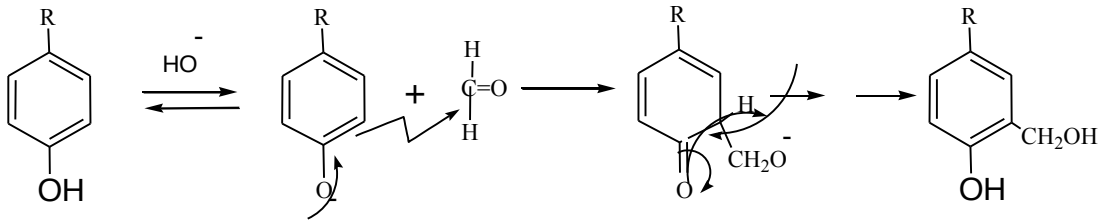
Kaliksarenlerin sentezi yıllarca araştırılıp sıcaklığın, çözücünün, kullanılan bazın kaliksarenlerin sentezi üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

p-ter-Bütilkaliks[4]aren sentezinde baz miktarı ve baz türü büyük bir önem taşımaktadır. Optimum miktarda baz kullanılması gerekir. Halkalı oktamer ve tetramerin sentezinde katalitik oranda baz kullanmamız gerekirken halkalı hekzamer sentezinde de stokiyometrik oranda baz kullanılmaktadır (Gutsche, 1981, 1984; Dhawan, 1987).

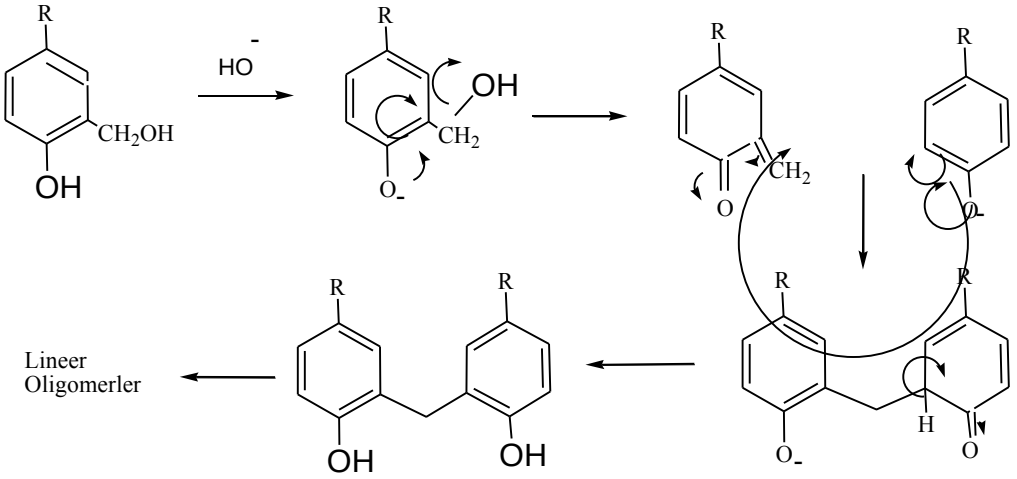
Dolayısıyla tetramer, hekzamer ve oktamerin sentezi için birbirinden farklı alkali metal hidroksitleri kullanılmaktadır. Halkalı hekzamer sentezinde RbOH veya CsOH kullandığımızda çok yüksek verim elde edilirken aynı zamanda halkalı tetramer ve oktamer sentezinde de LiOH veya NaOH kullanıldığında da yüksek verim elde edilmektedir.

1.1.5. Kaliksarenlerin Elde Edilişi ve Reaksiyon Mekanizması

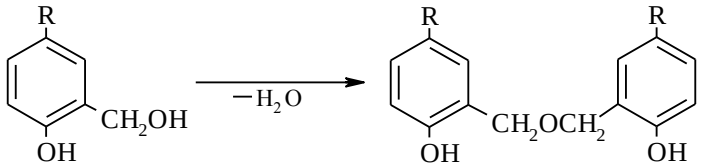
Fenol-formaldehit'in baz katalizli reaksiyon mekanizması yıllarca önemli araştırma konusu olmuştur. İlk olarak bir karbon nükleofili olan fenoksit iyonu oluşmaktadır. Bu nükleofil formaldehitin karbonil karbonu ile kolayca reaksiyona girer:



Biraz daha etkin şartlarda reaksiyon, Michael prosesindeki gibi fenolat iyonları ile o-kinonmetit ara ürünlerinin reaksiyona girmesiyle beraber diarilmetil bileşikleri oluşur;

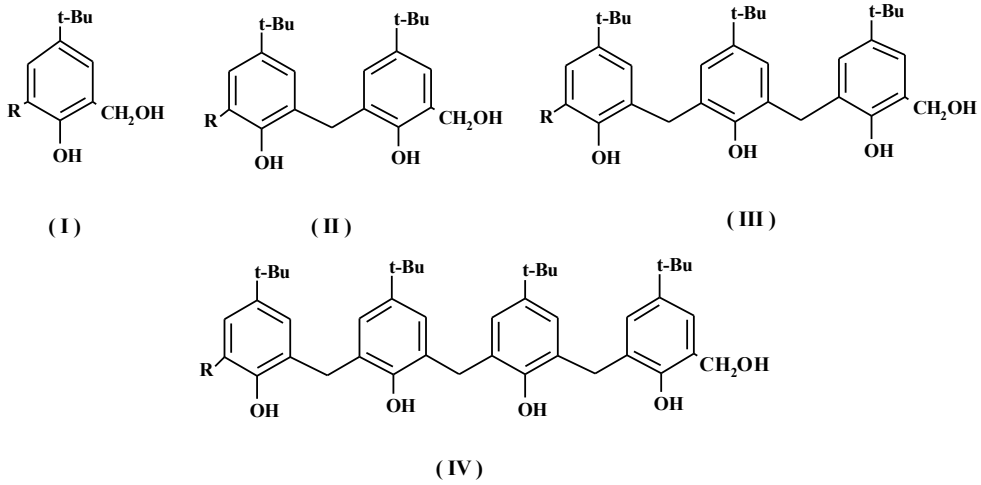


Bütün oligomerlerin oluşumunda o-kinonmetitlerin ara ürün olarak ortaya çıktığı bilinmekteydi (Gutsche 1989). Hidroksimetil fenollerin diğer bir reaksiyonu ise diarilmetanların yerine, dibenzil eterlerin dehidratasyonla oluşum mekanizmasıdır.



Bu sebeble meydana gelen kaliksarenler karışımı oligomerizasyonun farklı aşamalarında oluşan difenil metan türü ve dibenzil eter türü bileşikleri içermektedir.

Aşağıda gösterilen I-IV bileşiklerin (R=H ve CH_2OH) hepsi, bir dizi özel şartlar altında tamamen benzer ürün karışımlarını verir (Dhawan 1987).



Şekil 1.6. Ön ürünün (precursor) bileşimleri

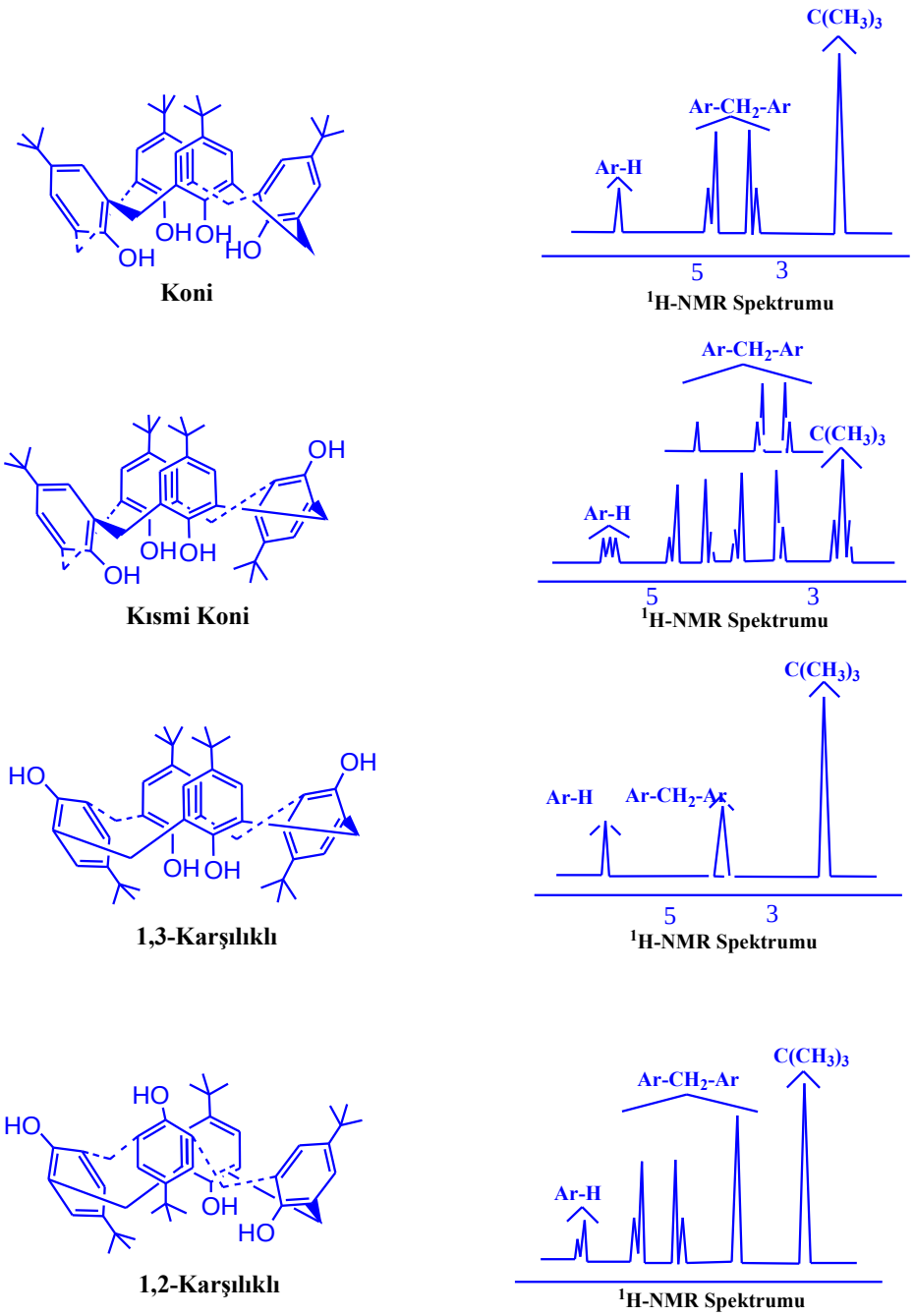
Ara ürün olarak oluşan bu 4 farklı bileşik yüksek sıcaklıkta benzer ürün karışımlarına dönüşerek halkalı yapıdaki kaliksarenleri oluşturur (Dhawan 1987).

1.1.6. Kaliksarenlerin Konformasyonları

Kaliks[4]arenler, yapısında bulunan aril halkalarının yönlenmeleri sonucu dört farklı konformasyonlarda bulunurlar. Bunları "koni", "kısmi koni", "1-2 karşılıklı" ve "1-3 karşılıklı" olarak söyleyebiliriz. Bir kaliks[4]arenin hangi konformasyonda olduğunu ancak bu bileşiğin köprü Ar-CH_2–Ar protonlarının ^{1}H NMR spektrumlarına bakarak anlıyabiliriz. (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

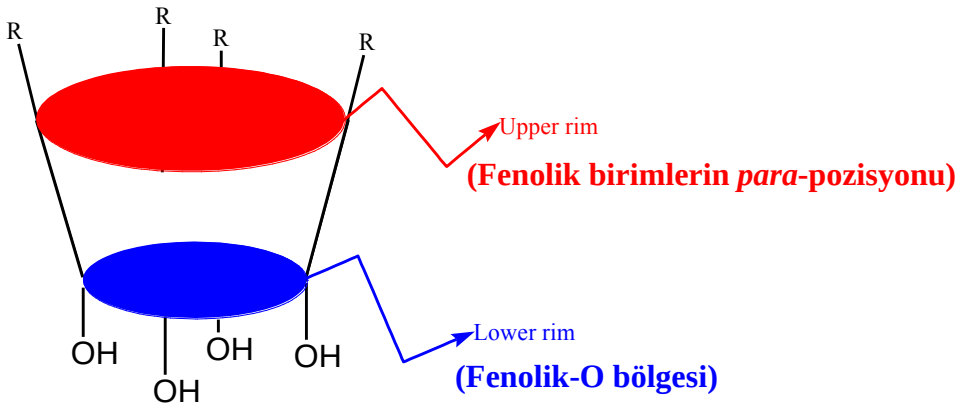


Şekil 1.7. p-*t*-bütilkaliks[4]aren'in konformasyonları ve ^{1}H NMR spektrumları

1.1.7. Kaliksarenlerin Fonksiyonlandırılması

Kaliksarenlerin, bu kadar önemli hale gelmesinin sebebi farklı fonksiyonel gruplar kullanılarak kolaylıkla modifikasyona uğratılabilmesidir. Kaliksarenlerin fenolik -OH gruplarının bulunduğu dar olan kısmına *''lower rim''* (alt kenar) denilirken aril halkalarının para pozisyonunun bulunduğu geniş olan kısmana ise *''upper rim''* (üst

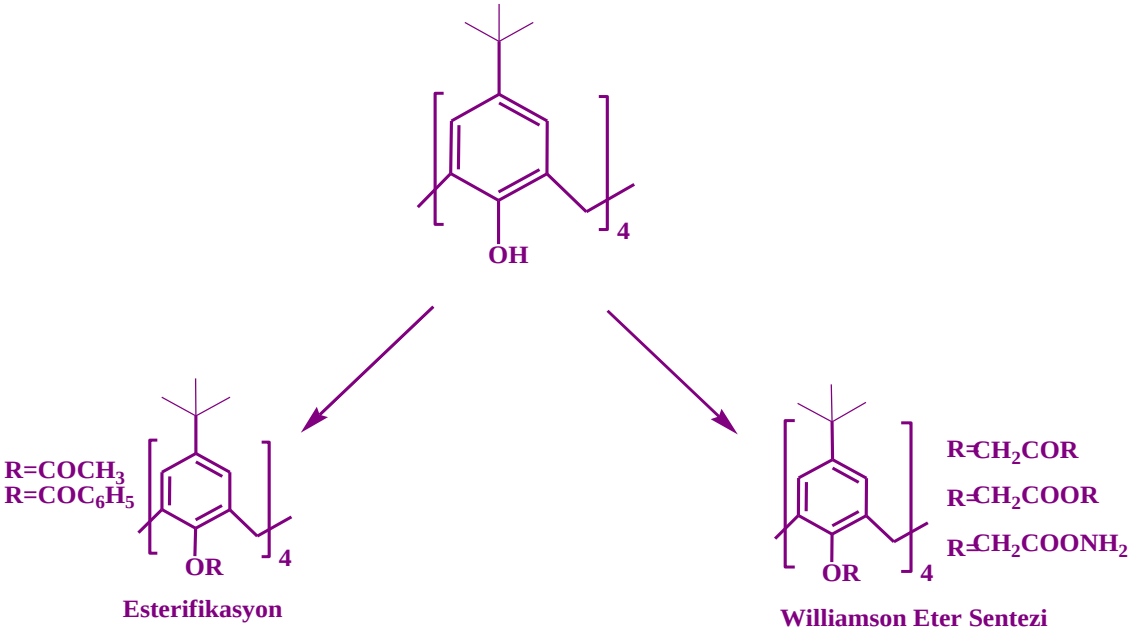
kenar) ismi verilmektedir. Bunlar üzerinden fonksiyonlandırılarak geniş bir uygulama alanına sahip olur.



Şekil 1.8. Kaliksarenlerin fenolik-O ve fenolik birimlerin *p*-konumu kısımları

1.1.7.1. Kaliksarenlerin fenolik-OH üzerinden fonksiyonlandırılması

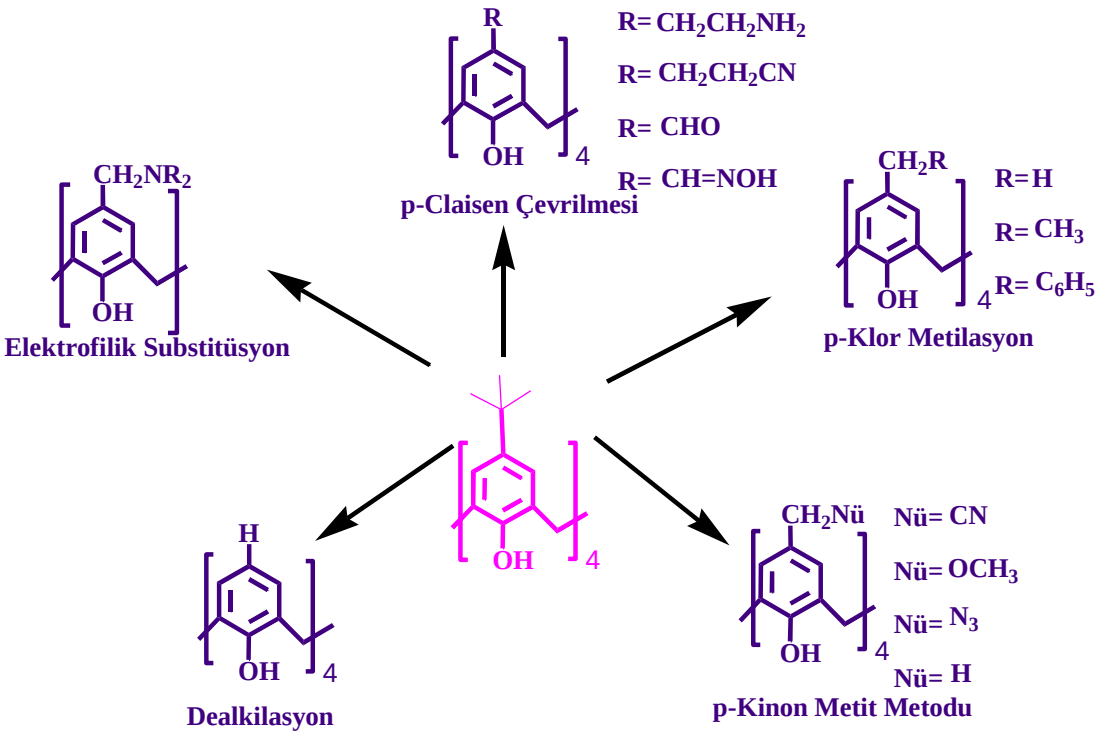
Kalikarenlerin fenolik birimlerin *p*-konumu üzerinden fonksiyonlandırılması oldukça zor ve uğraştırıcıyken fenolik-O üzerinde fonksiyonlandırılması ise oldukça basitdir. Kaliksarenlerin fenolik-O kısmındaki OH grupları farklı gruplarla etkileştirilerek farklı ve çeşitli eter ve ester türevleri senteztenebilmektedir.



Şekil 1.9. Kaliksarenlerin fenolik –OH den fonksiyonlandırılması

1.1.7.2. Kaliksarenlerin *para*-pozisyonlarından fonksiyonlandırılması

Kaliksarene bağlı *ter*-bütil gruplarının toluen/$AlCl_3$ ortamında dealkilasyonu sonucu kaliksarenlerin fenolik grupların *p*-pozisyonuna birçok fonksiyonel grubun bağlanmasını sağlar. Kaliksarenlerin *p*-pozisyonlarından fonksiyonlandırılması çoğunlukla bromlama, iyotlama, nitrolama, sülfolama, klor sülfolama, klormetilleme, açilleme, diazolama ve formülasyondur.



Şekil 1.10. Kaliksarenlerin para-pozisyonlarından fonksiyonlandırılması

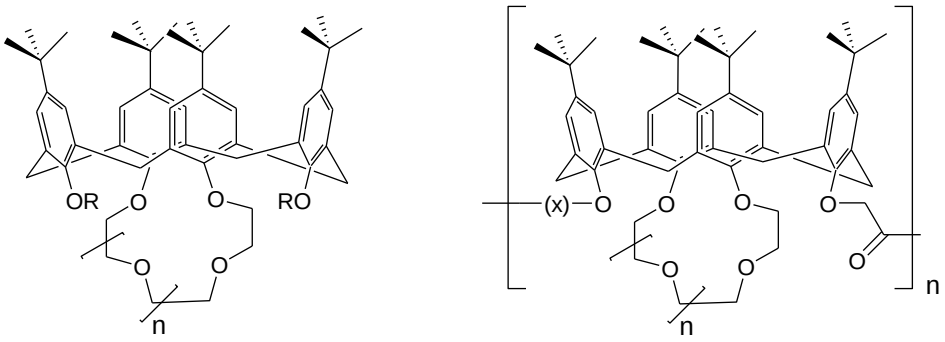
1.1.8. Kaliksarenlerin Kullanım Alanları

- ✓ Molekül ve iyon taşıyıcı kaliksarenler
- ✓ Kromotografik uygulamalarda kaliksarenler
- ✓ Membran ve sensör teknikleri
- ✓ Enzim-mimik olarak kaliksarenler
- ✓ Katalizör çalışmalarında kaliksarenler

- **Molekül / İyon Taşıyıcı Kaliksarenler**

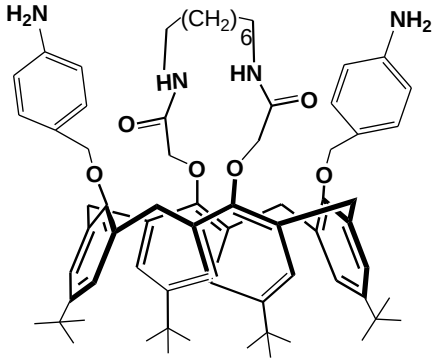
Kaliksarenler yapısındaki halka boşluğundan dolayı farklı şekildeki çoğu molekül veya iyonlarla kompleks yapma özelliğindedir. Bu yüzden kaliksarenler molekül ve iyon taşıyıcı olarak sıkça kullanılmaktadır. Bu bileşikler endo- ve ekzo-kompleks şeklindedir.

Memon ve ark. (2001), bazı kalikscrown iyonoforlarını ve bunların polimerlerini sentezleyip, metal taşıma özelliklerini incelemiştir (Şekil 1.11.) .



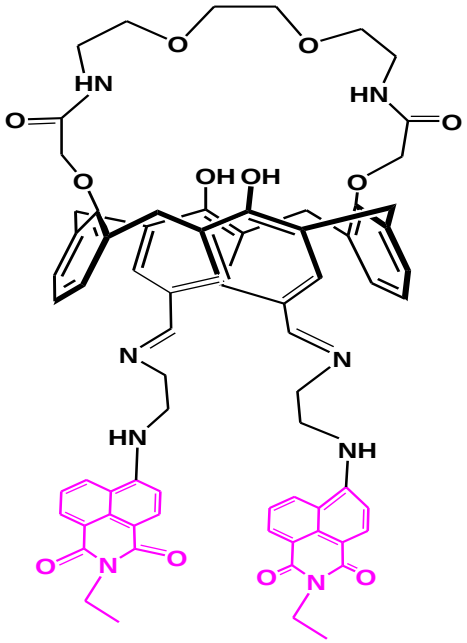
Şekil 1.11. Kaliks[4]crown iyonoforları ve polimerleri

Akkuş ve ark. (2009), amino grubu içeren kaliks[4]azacrown bileşiğini sentezledikten sonra Na^{+}, K^{+}, Cs^{+}, Cu^{+2}, Co^{+2} Cd^{+2} Ni^{+2}, Hg^{+2} ve Pb^{+2} gibi metal katyonlarına karşı sıvı-sıvı ekstraksiyon özelliğini araştırmışlardır. Yapılan araştırmanın sonucunda bu bileşiğin kullanılan tüm metal katyonlarına karşı duyarlı olduğu bulunmuştur (Şekil 1.12.).



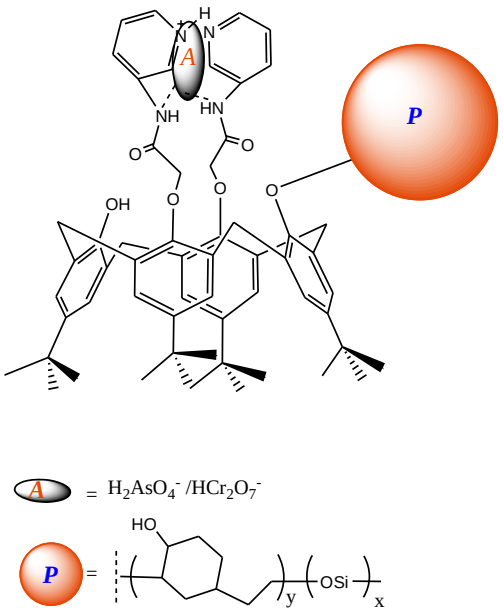
Şekil 1.12. Amino grubu içeren kaliks[4]azacrown bileşiği

Sahin ve Yilmaz (2012), bir naftilamit sübstitüe kaliks[4]aren bileşiğini sentezleyerek bu bileşin floresans özelliğinden yararlanarak metal iyonlarına karşı davranışını gözlemlemişlerdir. Bu bileşiğin Na^{+}, Li^{+}, Mg^{+2}, Ni^{+2}, Ba^{+2}, Cu^{+2}, Pb^{+2} ve Zn^{+2} metal iyonları arasında en çok Cu^{+2} iyonuna karşı duyarlı olduğu belirtilmiştir (Şekil 1.13) .



Şekil 1.13. Cu^{+2} iyonuna karşı duyarlı naftilamit sübstitüe kaliks[4]aren bileşiği

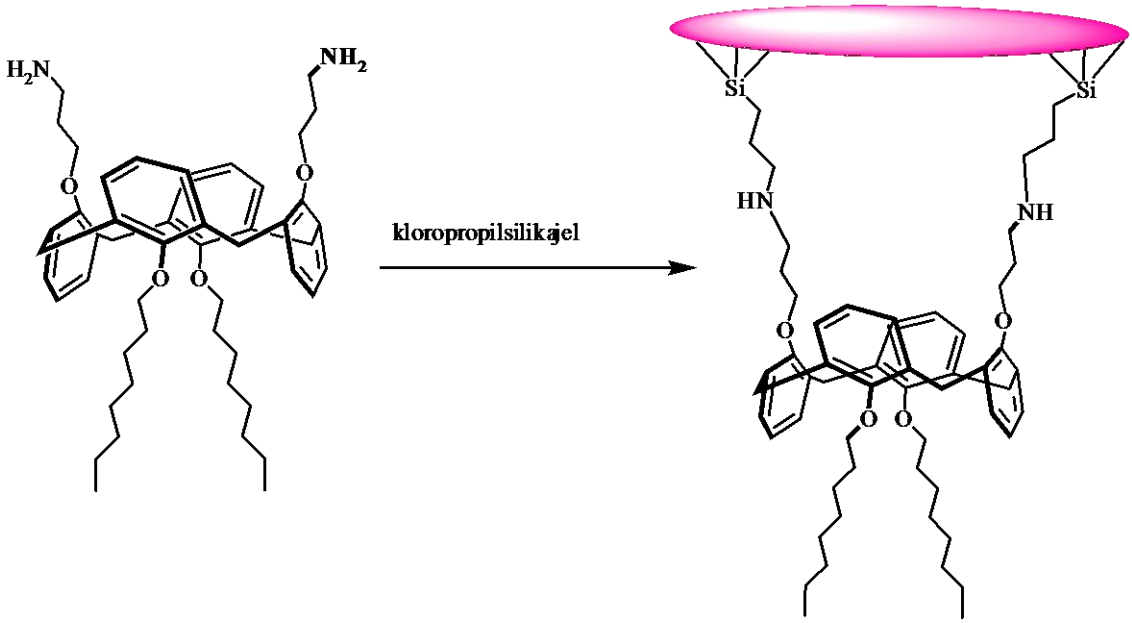
Sayin ve ark. (2010), koni konformasyonda pridil gruplarıyla fonksiyonlu kaliks[4]aren türevini sentezleyerek silika üzerine kovalent bağla immobilize etmiştir. sentezlenen bu kaliksaren polimerinin farklı pH aralığındaki dikromat ve arsenat anyonlarıyla olan kompleksleşme özellikleri incelenmiştir (Şekil 1.14.) .

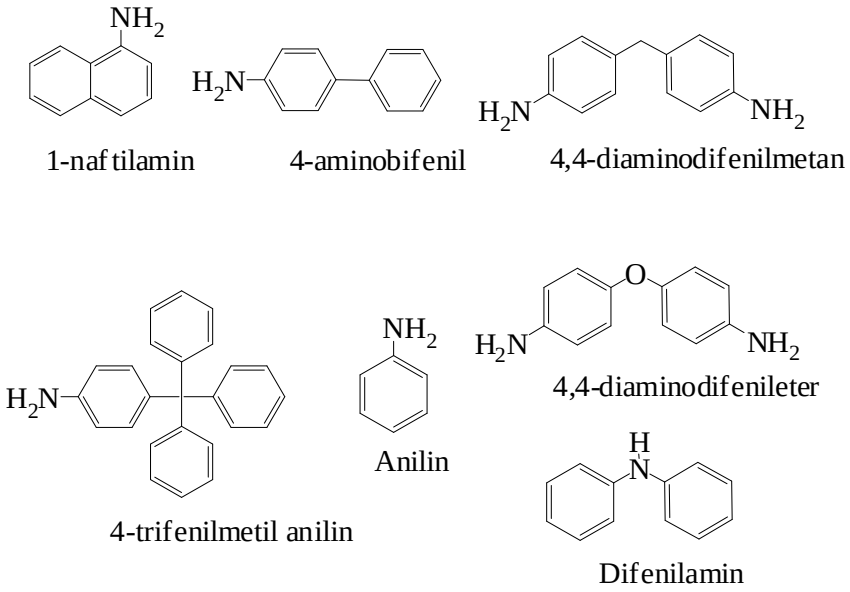


Şekil 1.14. Kaliks[4]aren dikromat ve arsenat iyonu reseptörü

- **Sabit faz olarak kaliksarenlerin kromotografide kullanılması**

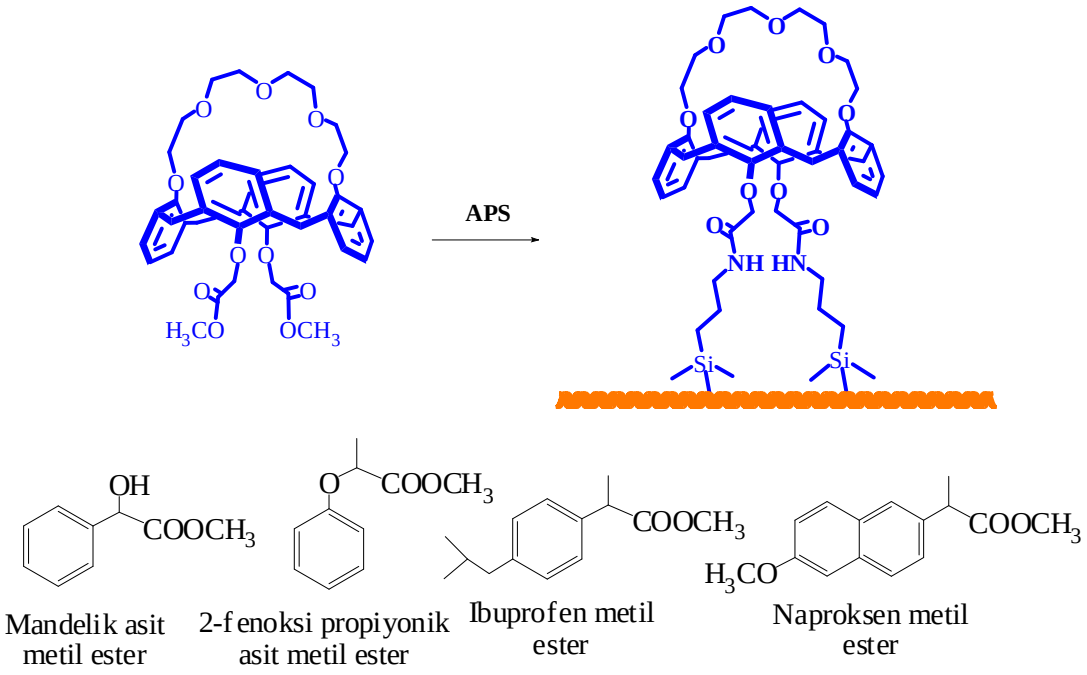
Erdemir ve Yilmaz (2010), sentezlenen 1,3-konformasyonuna sahip kaliks[4]aren türevini immobilize ederek kolon dolgu maddesi olarak kullanmışlardır. HPLC de elde edilen bu kolanla bazı aromatik hidrokarbonlar, fenolik bileşikler, aromatik aminler ve bazı ilaç karışımlarını ayırmada kullanmışlardır (Şekil 1.15).





Şekil 1.15. Aminleri ayırmada kloropropilsilikajele immobilize edilmiş kaliks[4]aren türevinin kolon dolgu maddesi olarak kullanılması

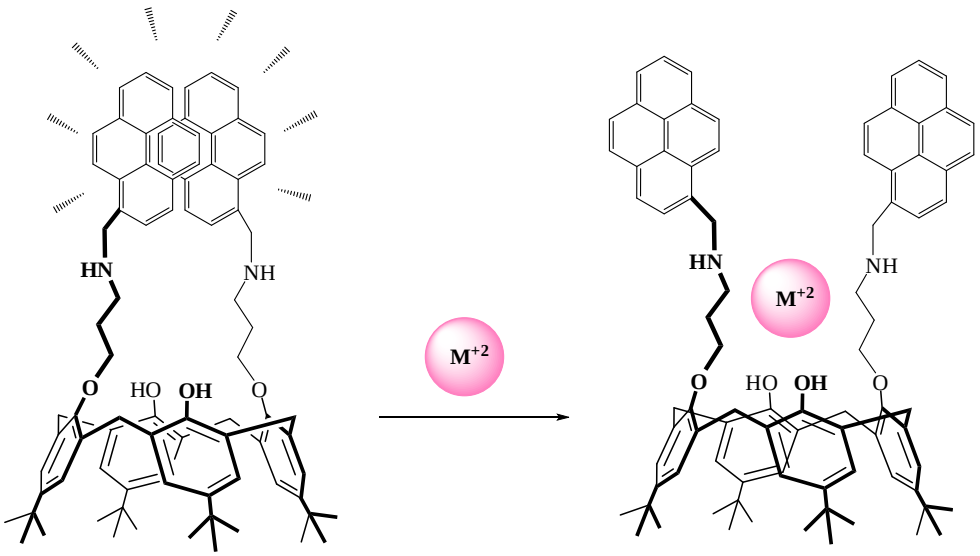
Erdemir ve Yilmaz (2011), kaliks[4]crown-5 makrosiklik bileşiğine bağlı silika sabit fazını hazırlamışlardır. Daha sonra aromatik aminler, fenoller ve ilaçların ayrımı için kromotografik bir yöntem geliştirmede kullanmışlardır. Bunun sonucunda bazı aromatik aminler, fenoller ve ilaçların hazırlanan kaliksaren bazlı sabit faz ile başarılı bir şekilde ayrıldığını tespit etmişlerdir (Şekil 1.16.).



Şekil 1.16. İlaçları ayırmadakullanılan kaliks[4]crown-5 bileşiği bağlanmış silika sabit fazı

- **Kaliksarenlerin sensör (iyon seçici elektrot, ISE) ve membran tekniklerinde kullanılması**

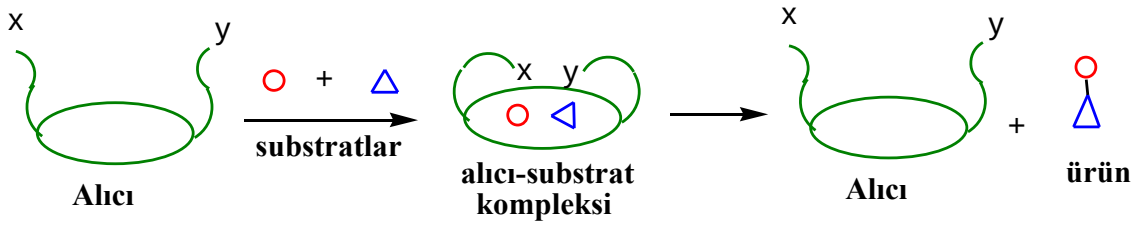
Sahin ve Yilmaz (2011), fenolik-O'nin 1,3 pozisyonunda piren grubu taşıyan florojenik *p-ter*-bütilkaliks[4]aren bileşiğini sentezlemişlerdir. Kaliks[4]arenin piren amin türevlerinin, sırasıyla Pb^{+2} ve Cu^{+2} iyonları için seçimli bir sensör olarak rol oynadığını belirtmişlerdir (Şekil 1.17.).



Şekil 1.17. Pb^{+2} ve Cu^{+2} iyonu için sensör özellikteki kaliks[4]aren bileşiği

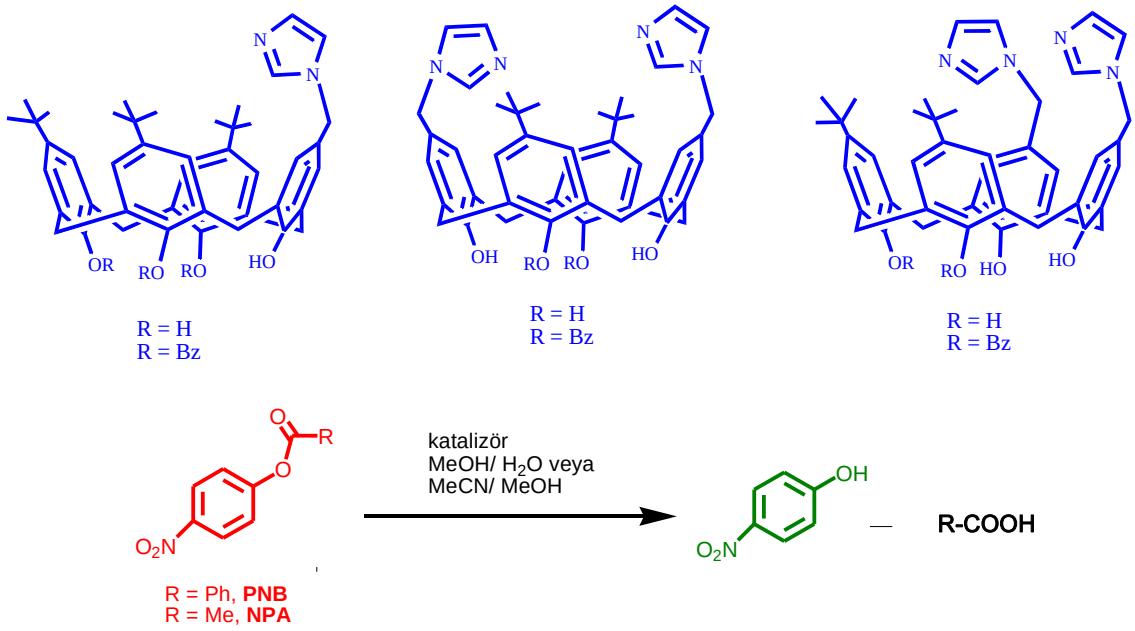
- **Enzim-mimik olarak kaliksarenler**

Enzim mimik yapısının ana fikri, enzimin aktif bölgesine benzer kaliksaren bazlı sentetik bir model yapmaktır. Bu durumda molekül, diğer fonksiyonel gruplarla beraber bağlanan substratlar için bir boşluk bulunduracaktır. Böylece substratlarda etkileşim, katalitik olarak substratların ürünlere dönüşmesini sağlayacaktır (Breslow, 1995) .



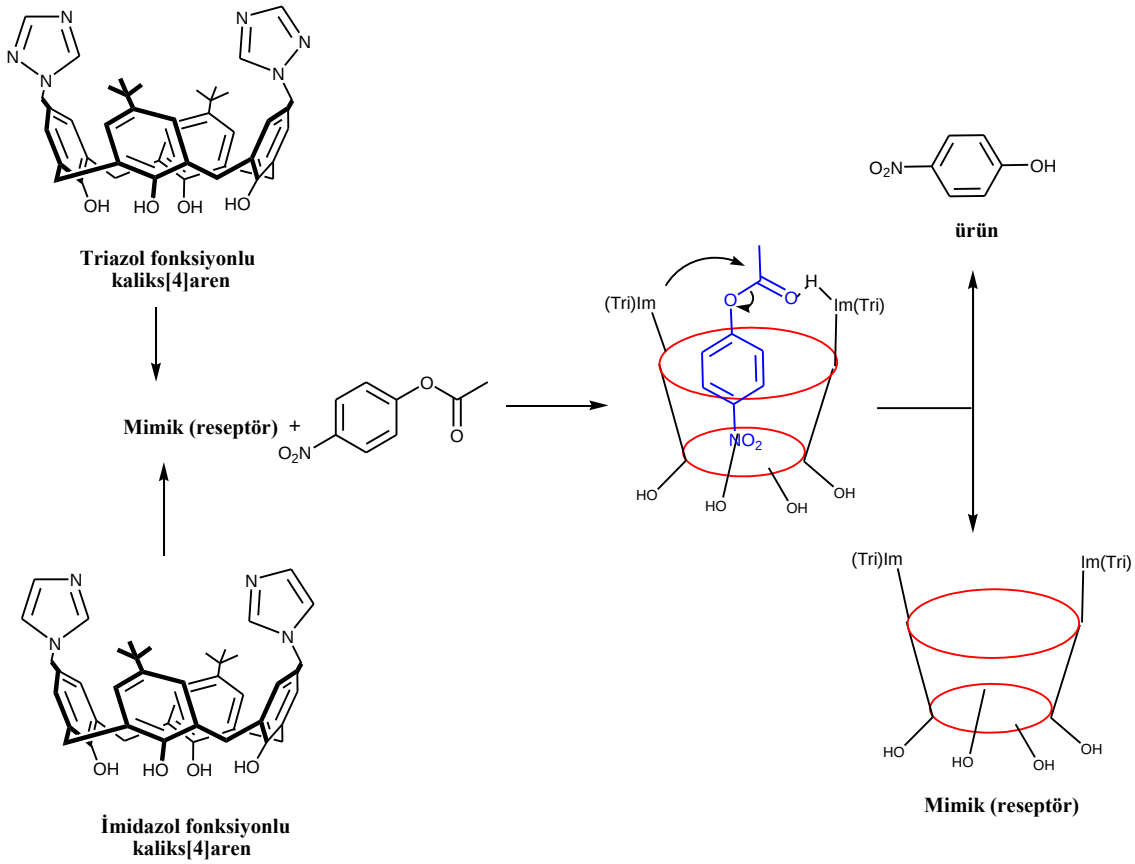
Şekil. 1.18. Enzim-mimik modeli

Dospil ve Schatz (2001), *p*-konumundaki farklı pozisyonlarda imidazol grupları taşıyan kaliks[4]arenler sentezlemişlerdir. Sentezlenen bu maddelerin tampon çözeltilerde *p*-nitrofenil esterlerden *p*-nitrofenolü açığa çıkaran enzim gibi davrandıklarını gözlemlemişler (Şekil 1.19.).



Şekil 1.19. *p*-Konumunda farklı şekillerde imidazol grubu taşıyan kaliks[4]arenler

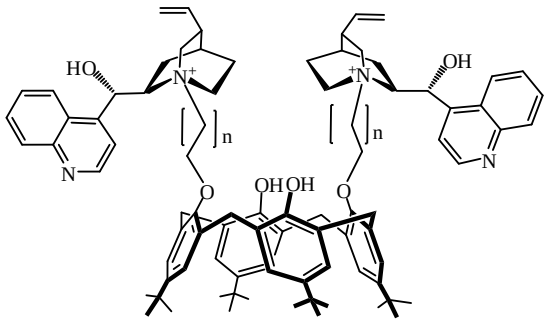
Tabakci ve ark. (2012), açiltransferaz mimik olabilecek imidazol veya triazol gruplarıyla fonksiyonlanmış kaliks[4]arenleri sentezleyerek bunların enzimatik performanslarıını araştırmışlardır. İmidazol grubuyla fonksiyonlu kaliks[4]aren' in triazol grubuyla fonksiyonlu kaliks[4]arenden daha etkin bir açiltransferaz mimik olduğu bulunmuştur (Şekil 1.20.) .



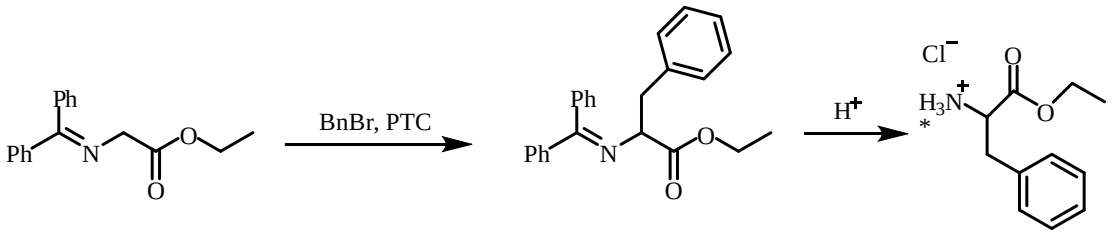
Şekil. 1.20. Açiltransferaz modeli olarak enzim-mimik çalışmalarında kaliksarenler

- **Katalizör çalışmalarında kaliksarenlerin kullanılması**

Bozkurt ve ark. (2008), cinchona alkaloitlerden türetilen kaliksaren bazlı kiral faz-transfer katalizörü sentezlemişlerdir. Bu kiral kaliks(4)aren'in katalitik özelliğini, N-(difenilmetilen)glisin etil ester ile benzil bromür arasındaki alkilasyon reaksiyonunu kullanarak değerlendirmişlerdir. Ayrıca reaksiyonun verimine ve enantiyoseçimliliğine etki eden diğer faktörleri de incelemişlerdir (Şekil 1.21).

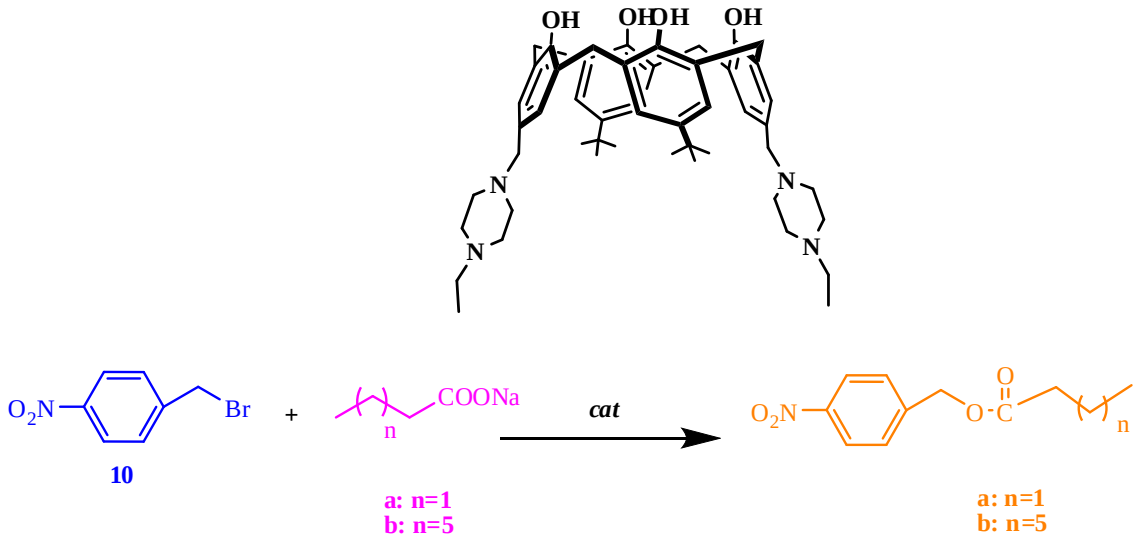


n = 1, 2, 3



Şekil 1.21. Kaliksaren bazlı kiral faz-transfer katalizörü

Akceylan ve Yilmaz (2011), bu çalışmada faz transfer katalizörü olarak kaliks[4]arenin N-etilpiperazin, diallilamin ve 4-benzilpiperidin türevlerini sentezlemişlerdir. Kaliksar[4]arenin N-etilpiperazin türevinin katalizör olarak kullanıldığı esterleşme reaksiyonunda en iyi verim elde edilmiştir (Şekil 1.22.).



Şekil 1.22. Esterleşme reaksiyonunda kaliks[4]arenin katalizör olarak kullanılması

1.2. Enzimler ve Genel Özellikleri

Enzimler, canlı sistemde gerçekleşen protein yapılı biyokimyasal reaksiyonlar için kullanılan biyokatalizörlerdir. Bunlar kimyasal katalizörlere göre daha düşük sıcaklıkta (genellikle 20-40 ^{o}C), sulu çözeltilerde ılımlı koşullar altında ve atmosfer basıncında reaksiyonları katalizleme özelliğine sahiptirler. Genel olarak optimum pH aralığı 5-8' dir. Biyokatalizörlerde rasemizasyon, izomerizasyon, bozulma, ve yeniden

düzenlenme gibi yan reaksiyonlar görülmez. Biyokatalizör tepkimeleri, kimyasal katalizörlere kıyasla 10^8-10^{10} kat daha hızlı kataliz özelliği gösterir ayrıca kimyasal katalizörler genellikle % 0,1–10 derişim aralığında kullanılırken, biyokatalizörler ise aynı katalitik etkiyi 10^{-3} - 10^{-4} derişiminde gösterir (Tiryaki, 1993; Kennedy, 1995; Faber, 2000; Bakkal, 2006).

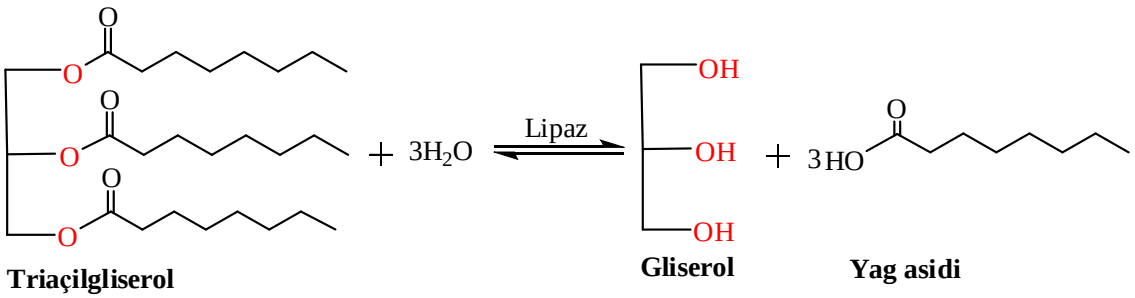
Enzimler canlı ortamlarda olduğu gibi, canlı olmayan ortamlarda da etkinlik gösterebildikleri için, birçok proseste kullanılırken aynı zamanda endüstriyelde de geniş bir çalışma konusu olmuştur (Çizelge 1.2).

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

1.2.1. Lipazlar

Lipazlar, bazı bitkilerde, insan, hayvansal organizmalarda ve mikroorganizmalarda bulunan, mono-, di- ve triaçil gliserollerin karboksil ester bağlarının bölünmelerini katalizleyen enzimlerdir.



Şekil 1.23. Lipazların genel şeması

Lipazlar, birçok nedenden dolayı geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Bunun sebebi esterleşme, transesterleşme ve hidroliz tepkimelerini düşük sıcaklıkta katalizlemeleri, susuz ortamda kararlı ve aktif olmaları, yüksek katalitik güce sahip ve ucuz olmaları, yan ürün olmayışı verilebilir.

Lipazlar birçok yapısal nedenden dolayı endüstriyelde geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Bunları aşağıdaki gibi sıralayabiliriz.

- ✓ Deterjan endüstrisinde kullanımı
- ✓ Gıda endüstrisinde kullanımı
- ✓ İlaç endüstrisinde kullanımı
- ✓ Organik sentezlerde kullanımı

Lipaz enziminin birçok çeşidi bulunmaktadır. Aşağıda belirtilen bu enzim çeşitlerinden yüksek aktivitede olması ve maddi olarak ucuz olmasından dolayı Candida Rugosa tercih edilmiştir.

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

1.2.2. Candida Rugosa Lipaz (CRL)

CRL, Histidin, Serin ve Glutamin (His-Ser- Glu) üçlüsünden oluşan ve sporsuz, tek hücreli, yüksek verimli lipaz üretiminden dolayı sıkça kullanılan bir mikroorganizmadır. 31 aminoasitten oluşan bir kapağa sahiptir (Benjamin ve Pandey, 1998; Paiva ve ark..2000;). Kapağın iç yüzeyi yani aktif bölgeye bakan kısmı hidrofobik, diğer kısmı yani dış yüzeyi ise hidrofilik yapıdadır (Tejo ve ark., 2004).

Kapak açık ve kapalı olmak üzere iki farklı konformasyon göstermektedir. Burda kapağın görevi enzimin aktif konumuna substrat girişini sağlamasına yardımcı olmaktır (Secundo ve ark., 2003). Açık olması halinde enzim aktif ve enantiyoseçimliliği yüksek iken kapalı olması halinde ise enzim inaktif ve enantiyoseçimliliği düşük özellik göstermektedir.

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

1.2.3. Lipazların Genel Özellikleri

- **Optimum pH**

Çoğunlukla yüksek pH enzimin etkinliğinin azalmasına neden olur. Enzimin en yüksek verimle çalıştığı pH aralığına optimum pH denilmektedir. Çoğu enzimin pH aralığı 4,5-8,5 tur.

- **Optimum sıcaklık**

Çoğunlukla lipazların en yüksek aktivite gösterdikleri sıcaklık aralığı 30-40 ^{0}C dır. Enzimlerin en yüksek verimle çalıştığı sıcaklık aralığına optimum sıcaklık denilir.

- **Lipazın aktivasyonu ve inhibisyonu**

Ağır metal iyonları lipaz aktivitesini inhibe ederken, alkali metal iyonlarınında lipaz aktivetisini artırdığını söyleyebiliriz.

- **İzoelektrik nokta(pI)**

Net yükü sıfır olan noktaya izoelektrik nokta denir. Proteinlerin çözünürlüğünü etkilediği için izoelektrik nokta büyük öneme sahiptir. Bu noktaya yakın proteinler suda daha az çözünürken, bu noktadan uzaklaştıkça da suda daha fazla çözünmektedir. Bunun sebebi bu noktadan uzaklaşıldıkça iyonlaşmış gruplarının sayısının artmasıdır.

- **Aktivite**

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

İmmobilize lipaz aktivitesi:

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

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

$$\text{Aktivite verimi (\%)} = \frac{\text{Immobilize lipazin spesifik aktivitesi}}{\text{Serbest lipazin spesifik aktivitesi}} \times 100$$

1.2.4. Enzim İmmobilizasyonu

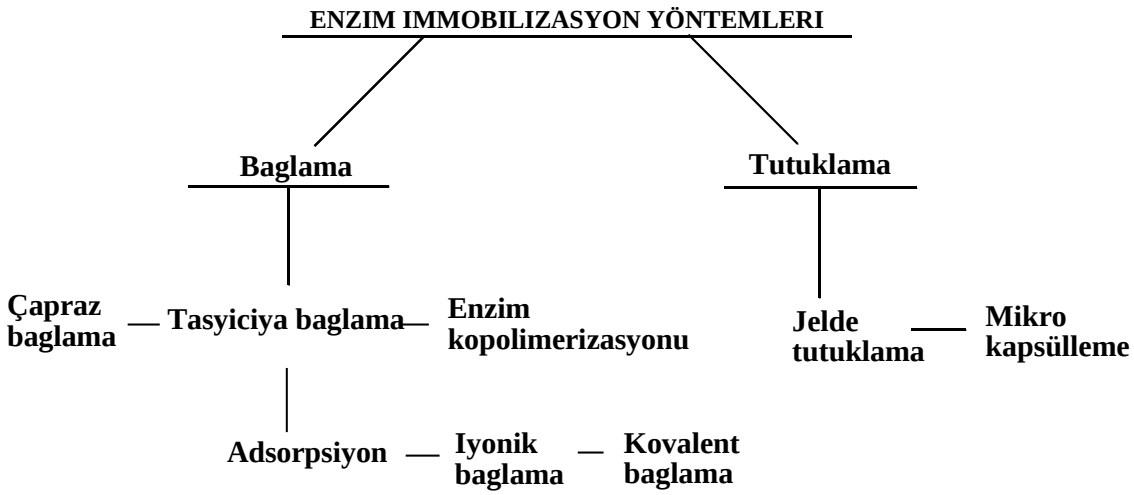
Enzimler, canlı hücrelerde sentezlenen protein yapısında maddelerdir. Enzimler suda çözündükleri için katalizör olarak kullanılan serbest enzimin aktivitesinin azalmadan geri kazanılması ne yazık ki mümkün değildir. Serbest enzim, kolayca istediğimiz zaman reaksiyon içerisinden uzaklaştırılamayınca bu konu hakkında çözüm bulmak için birçok bilim adamını harekete geçirmiştir. Bundan dolayı enzim immobilizasyonu üzerine çalışılmıştır.

Enzim immobilizasyonu, enzimin tekrar kullanılabilirliğini ve enzimlerin aktivitesinin kararlılığını artırmak için güvenilir bir yol haline gelmiştir (Chang ve ark. ,2008). Farklı metotlarla çözünmez hale getirilmiş olan immobilize enzimlerin serbest enzimlere göre bazı üstün tarafları vardır. Bunları aşağıdaki gibi sıralayabiliriz (Telefoncu, 1997);

- Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırabildiğimiz gibi ürünlerin de enzimler ile kirletilmesi söz konusu olmaz.
- Serbest enzimlere kıyasla daha kararlıdır.
- Enzimin kendi kendini parçalama (autolysis) olasılığı yok olur.

- Çevre koşullarından (pH,sıcaklık v.s.) etkilenmeleri azalır.
- Mekanistik çalışmalar için kullanımı kolaylaşır.
- Ürün oluşumunu kontrol altında almamızı sağlar.
- Birçok kez ve uzun sürede kullanılma olanağına sahip olur.
- Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilmektedir.

1.2.5. İmmobilizasyon Yöntemleri



Şekil 1.24. İmmobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması

1.2.5.1.Taşıyıcıya Bağlama Yöntemleri

Taşıyıcıya bağlama yönteminde enzim için uygun taşıyıcı sistem seçimi oldukça önem arz etmektedir. Bağlanma kimyasal (kovalent veya iyonik) veya fiziksel (adsorbsiyon) yolla olabilir.

Çizelge1.3. Enzim immobilizasyonunda en yaygın kullanılan taşıyıcılar (Etci, 2011)

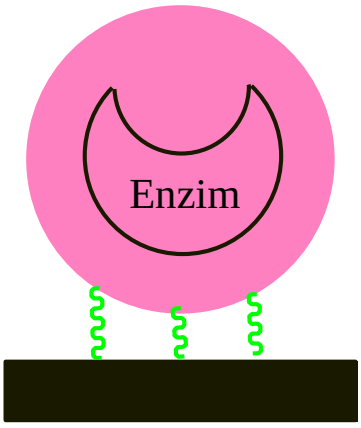
Anorganik	Doğal polimerler	Sentetik polimerler
Kil, cam	*Selüloz*	Polistiren türevleri
Silikajel	Nişasta	Poliakrilamid
Hidroksiapatit	Jelatin	M. anhidrid polimerler
Aktif karbon	Albumin	Siklodekstrin polimerleri
Bentonit	Agar ve agaroz	Vinil ve alil polimerler
Titandioksit	Karragenan	Oxiranlar
Metaller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

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcıda aranan nitelikler;

- Ucuz olması
- Rejenere olabilmesi
- Kimyasal ve termal stabilite
- Kovalent bağlamada kullanılacak taşıyıcıların ılıman koşullarda reaksiyon verecek fonksiyonel gruplar bulundurması
- Suda çözünmemesi
- Gözenekli (poröz) yapısı
- Hidrofilik karakter
- Mikroorganizmalara karşı dirençli olma
- Mekanik stabilite ve uygun partikül formu
- Zehirsiz olması

a. Kovalent bağlanma

Enzimin taşıyıcıya kovalent bağla bağlanmasında dikkat edilmesi gereken önemli bir husus, bağlanmanın enzim aktivitesi için zorunlu gruplar üzerinden olmaması ve bağlanma sırasında sterik engeller teşkil edilmemesidir (Telefoncu, 1997). Kovalent bağlama enzim zincirindeki aminoasitlerin taşıdığı fonksiyonel gruplar üzerinden bağlanmaktadır.



Şekil.1.25. Kovalent bağlama (Guisan, 2006)

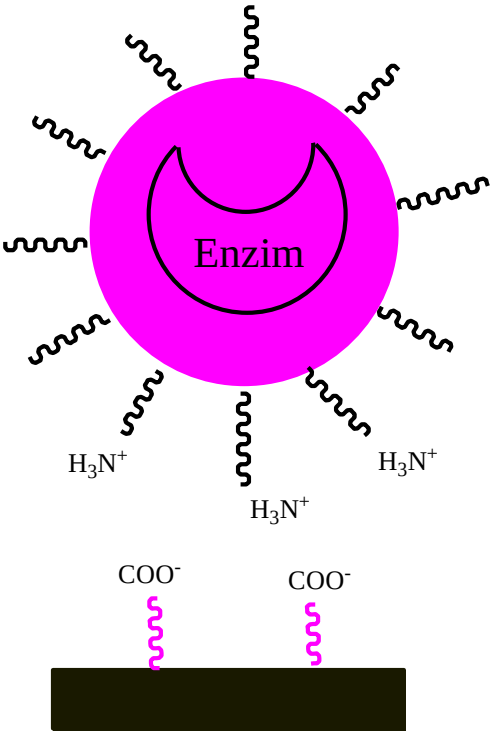
b. Adsorpsiyon

Adsorpsiyon yöntemi, suda çözünemeyen bir adsorbanın enzim çözeltisi ile karıştırılıp belli bir süre ekileştikten sonra, enzimin fazlasının iyice yıkanarak ortamdan uzaklaştırılmasına dayanır. Enzimin taşıyıcıya bağlanması sırasında Van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşimler rol oynamaktadır. Enzim immobilizasyonunda en çok tercih edilen adsorbanlar; nişasta, aktif karbon, silikajel, $CaCO_3$, gözenekli cam, diatome toprağı, kül, kollodyum, bentonit, hidroksiapatit, gluten ve kalsiyum fosfattır. Adsorbsiyon yönteminin avantaj yönleri; enzim immobilizasyon yönteminin basit olması, değişik biçim ve yükteki taşıyıcıların seçme olanağının olması ve bir yandan immobilizasyon yapılırken diğer yandan da enzim saflaştırılmasına olanak sağlamasıdır (Knežević, 2004; Andrade ve Hlady, 1986; Etci, 2011).

Yöntemin dezavantajları; immobilizasyon işlemi kolay olsada optimal koşulların saptanması çok güç ve uğraştırıcıdır. Eğer enzim ile taşıyıcı arasında kuvvetli bir bağlanma yoksa bu halde desorpsiyon sonucu enzim serbest hale geçtiği gibi aynı zamanda da ürünlerin kirlenmesine sebep olmaktadır (Telefoncu, 1997).

c. İyonik Bağlama

Bu yöntemde ise iyon değiştirme özelliğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik olarak bağlanmasıdır. İyonik bağlanma ılımlı koşullarda gerçekleştiğinden dolayı enzimin konformasyonunda ve aktif merkezinde değişikliğe sebebiyet vermez. Ancak enzim ile taşıyıcı arasındaki bağın kovalent bağdaki kadar güçlü olmamasından dolayı enzim kaçışı söz konusu olur (Telefoncu, 1997; Karaca 2006) (Şekil 1.26).



Şekil.1.26. İyonik bağlama

1.2.5.2.Çapraz Bağlama Yöntemleri

Çapraz bağlanma derecesi ve immobilizasyon, protein ve reaktif konsantrasyonuna, pH'a ve immobilize edilecek enzime bağımlıdır (Telefoncu, 1997).

Bu yöntem ile enzim immobilizasyonu dört farklı şekilde yapılmaktadır:

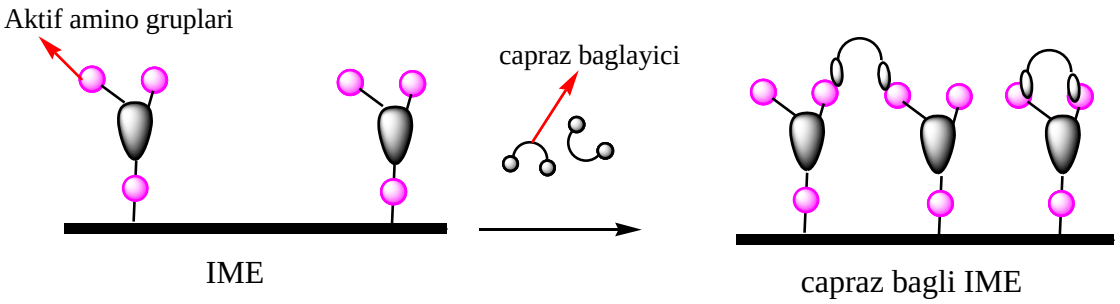
a) Enzimin yalnız bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu

b) Enzimin ikinci bir protein varlığında bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu

c) Enzimin suda çözünen bir taşıyıcıda adsorpsiyonundan sonra bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu

d) Enzimin bifonksiyonel reaktif tarafından aktive edilmiş polimer taşıyıcı ile reaksiyonudur.

En çok tercih edilen çapraz bağlama reaktifleri; glutaraldehid, klorformat, karbonildiimidazol, heterosiklik halojenürler, bisoksiranlar, divinilsulfanlar, p-benzokinonlar, geçiş metal iyonları ve epiklorhidrinlerdir. Çapraz bağlama reaksiyonu ılımlı koşullarda gerçekleşemediğinden dolayı önemli ölçüde aktivite kaybı olmaktadır (Telefoncu, 1997; Öztürk, 2006) (Şekil 1.27).



Şekil.1.27. Çapraz bağlı immobilize enzimler (Cao, 2005)

1.2.5.3.Tutuklama Yöntemleri

Tutuklama yöntemi, enzim molekülünün fiziksel veya kimyasal yöntemle herhangi bir taşıyıcıya bağlanmadan belirli bir ortamda tutulması demektir. Tutuklama işlemlerinde enzim moleküllerinin, polimer matris içindeki kafeslerde, yarı geçirgen membranlar içinde, mikrokapsülleme ve misellerde tutulur. Bu yöntemin kovalent bağlama ve çapraz bağlama immobilizasyonundan farklı kılan husus, enzim molekülünün kimyasal veya fiziksel olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır (Telefoncu, 1997).

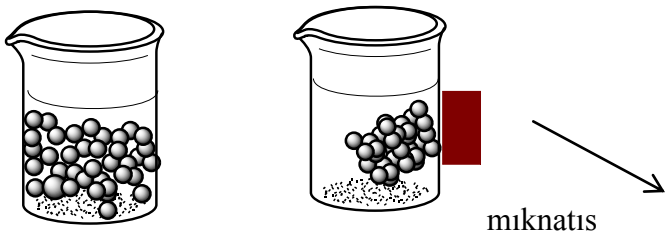
a) Sol-jel tutuklama

Sol-jel tutuklama yöntemine göre immobilize olmuş enzimin kararlılığına, enzim konsantrasyonu, pH, iyonik kuvvet ve diğer immobilizasyon şartlarının önemi büyüktür. Bu prosesde bağlayıcı silan bileşikleri olarak alkil ve alkoksi silan bileşikleri tercih edilmektedir. Sol-jel yöntemi, enzim varlığında alkoksi silanların asit veya baz katalizi ile yapılır (Hench ve West, 1990; Brinker ve Scherer, 1990)

İsopropanol, polivinilalkol, siklodekstrinler veya sürfektanlar gibi katkı maddelerinin lipaz immobilizasyonu üzerinde sol-jel tutuklama yönteminin etkisini artırmaktadır. Bu şekilde heterojen biyokatalizörlerin kullanılmasının amacı; organik çözücülerde ve iyonik sıvılarda esterifikasyon veya transesterifikasyon reaksiyonlarını gerçekleştirmektir (Etci, 2011).

Yöntemin uygulanması kolay ve tekrarlanabilirliği oldukça yüksek olduğu için geniş bir kullanım alanına sahiptir.

Bu konuda diğer bir gelişme ise sol-jel işlemi sırasında manyetik demir oksitin lipaz immobilizasyonunda kullanılmasıdır. Böylece tekrar kullanılabilirliğine büyük pratiklik getirilmiştir (Reetz ve ark., 1998; Reetz, 2006; Guisan, 2006) (Şekil 1.28).

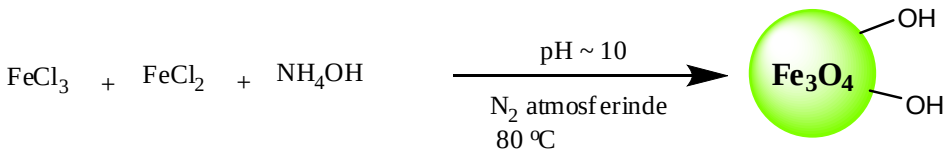


Şekil 1.28. Manyetik Fe_3O_4 nanopartiküller a) manyetik alan olmadığı durum b) manyetik alan altında olduğu durum

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

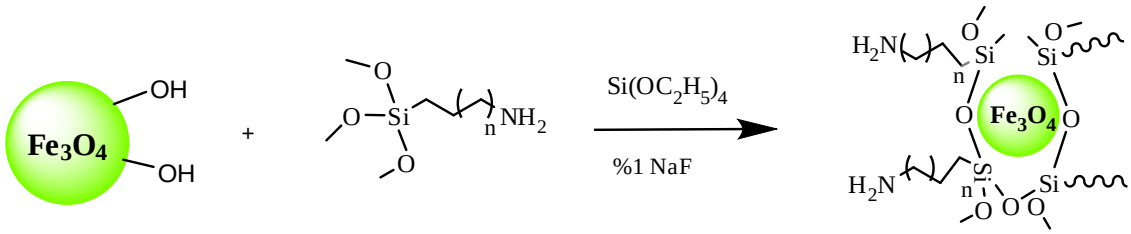
Lipaz enzimini ilk kez H. Brandenberger tarafından 1956 yılında kovalent bağlama yöntemi ile iyon değiştirici reçine üzerine immobilize etmiş (Iwai ve ark.1964), ancak lipazın ester hidrolizinde veya ester sentezinde kullanılması ile ilgili çalışmaları Iwai ve arkadaşları tarafından (1964) da çalışmaya başlamıştır (Sökmen, 2005).

Zeng ve ark. (2005), yaptıkları çalışmada $FeCl_2$, ve $FeCl_3$'den yola çıkarak bazik ortamda azot atmosferinde manyetik özellik gösteren Fe_3O_4 manyetik nanopartikülleri sentezlemişlerdir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Fe_3O_4 Manyetik nanopartiküllerin sentezi

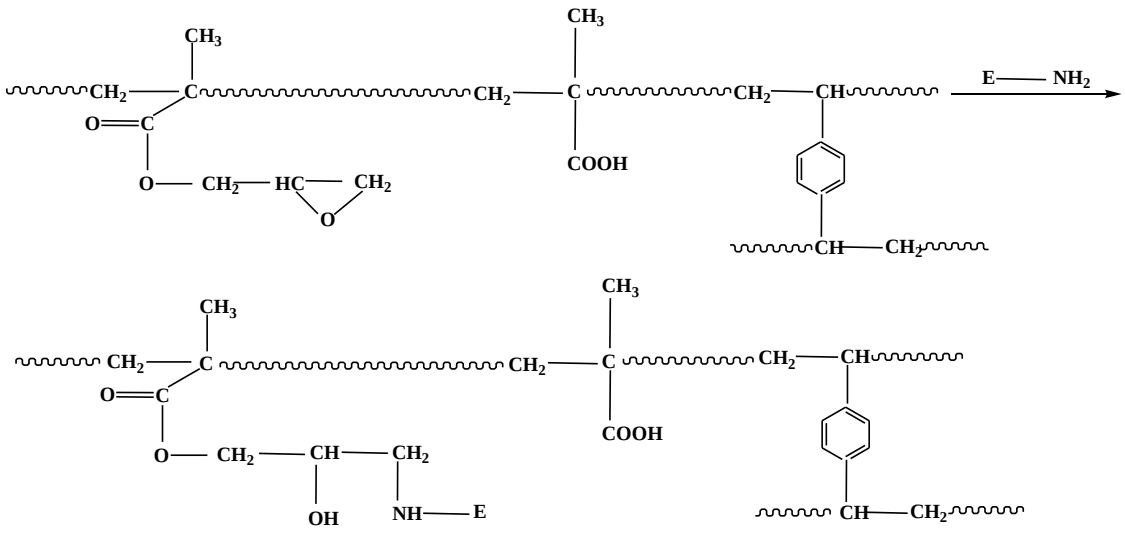
Daha sonra bu nano partikülleri amino alkil trimetoksisilan ile etkileştirerek silika-bazlı alkil amino grubu Fe_3O_4 manyetik nanopartikülleri elde etmişlerdir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Alkil amino-Fe_3O_4 Manyetik nanopartiküllerin sentezi

Lei ve ark. (2009), bu çalışmada oleik asit ile modifiye olmuş Fe_3O_4 nanopartiküllerini sentezledikten sonra glisidil metakrilat, metakrilik asit ve di-vinil benzen ile etkileştirilerek manyetik mikroküreler hazırlamışlardır. Daha sonra domuz pankreasından üretilen triaçilgliserol, kovalent bağlarla bu mikroküre yuzeyinde bulunan aktif epoksit gruplarından immobilize edilmiştir. Elde edilen immobilize lipazın serbest lipaza göre daha yüksek optimum sıcaklığa sahip olduğu ve cok daha iyi

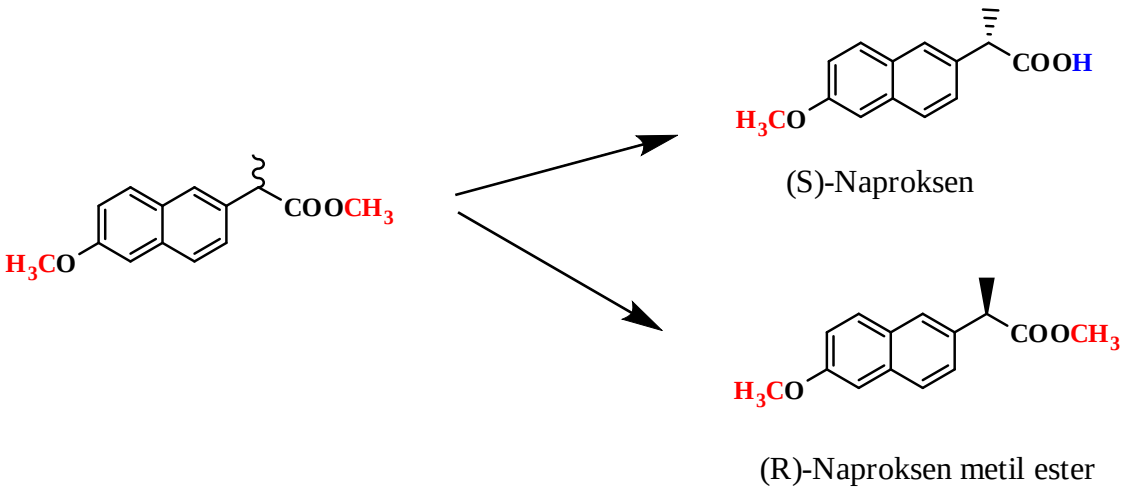
bir termal ve pH kararlılık sergilediği gözlemlenmiştir. Ayrıca manyetik özelliğinden dolayı çok iyi bir tekrar kullanım sergilediğide bildirilmiştir. Bunların dışında bu immobilize lipaz esterleşme reaksiyonunda etkin bir katalizör olarak kullanılmıştır.



Şekil 2.3. Manyetik mikrokürelerin şekli ve lipazın kovalent immobilizasyon reaksiyonu

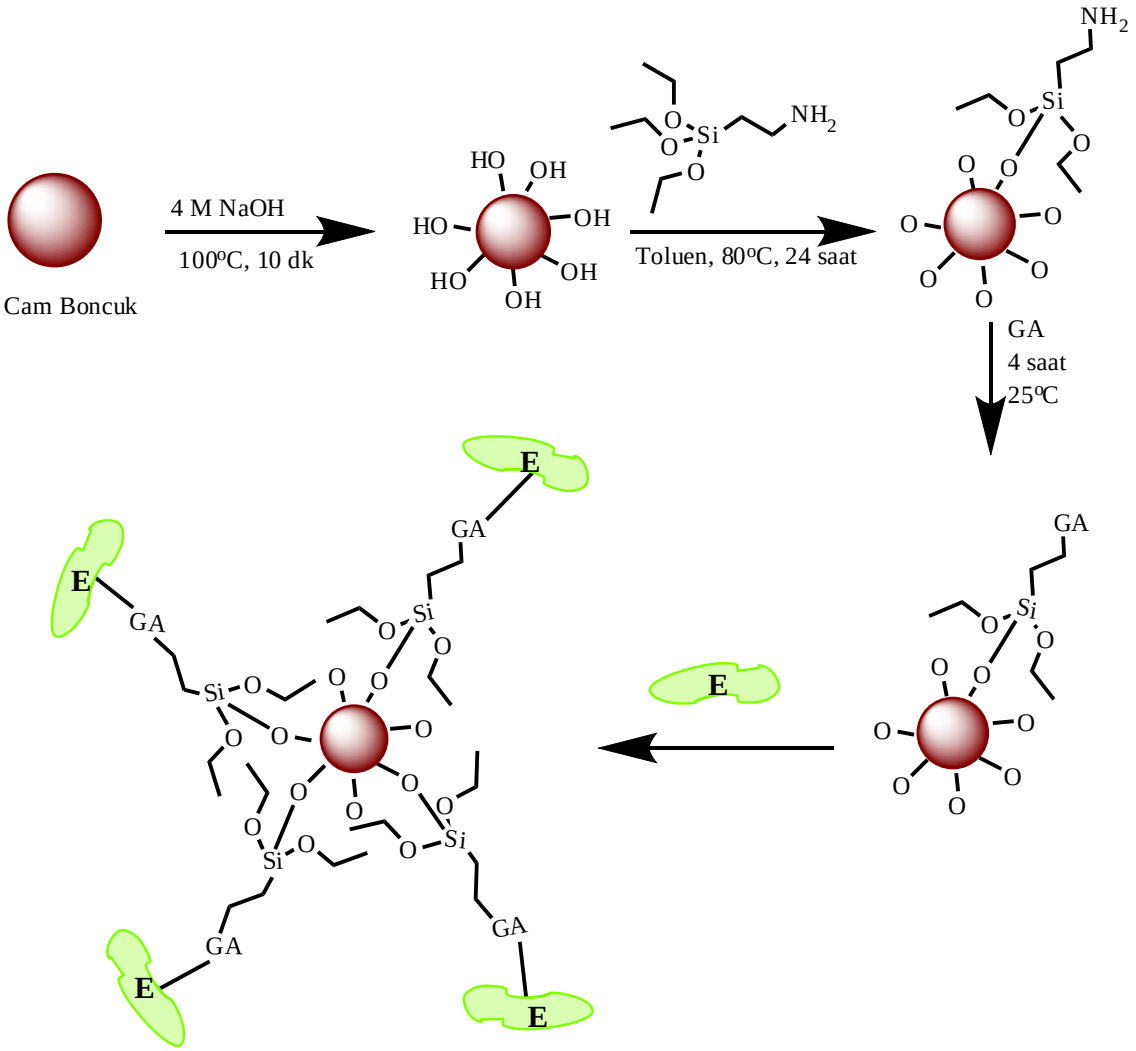
Tutar ve ark. (2009), yaptıkları bir çalışmada doğal bir ürün olan sporopollen'e *Candida Rugosa* lipazı immobilize ederek farklı pH ve sıcaklıktaki aktivitesini incelemişlerdir. İmmobilize edilmeyen lipaz ve immobilize lipazın optimum pH'ının sırayla 6.0 ve 7.0 olduğu görülmüştür. Aynı zamanda immobilize edilmeyen lipaz ve immobilize lipazın sıcaklığa bağlı aktivitelerinin de sırasıyla 35^{o}C ve 40^{o}C olduğu görülmüştür.

Yılmaz ve ark. (2010) *Candida Rugosa* lipaz enzimini sol-jel tutuklama metodunu kullanarak tetraetoksisilan (TEOS) ve oktiltrietoksisilan (OTES) varlığında sporopollenin'e immobilize etmişlerdir. Daha sonra hazırlanan immobilize lipazın katalitik özellikleri incelenmiş ve bulunan sonuçlar doğrultusunda resemik naproksenin enantiyoseçimli çalışmalarında kullanmışlardır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Naproksen metil ester

Yilmaz ve ark. (2011), bir başka çalışmada cam boncukları aminopropil grubu taşıyan silika ile etkileştirilerek aminopropil grubu taşıyan cam boncukları elde etmişlerdir. Elde edilen bu cam boncukların glutaraldehitle reaksiyon sonucunda serbest dialdehit grubu bulunduran ve enzim immobilizasyonunda kullanılabilecek yeni materyaller elde etmişlerdir. Sentezlenen bu yapılar rasemik naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidroliz çalışmalarında kullanılmıştır. S-naproksen için %98 ee değeri ile immobilize lipazın (E>400) yüksek enantiyoseçimliliğe sahip olduğunu gözlemişlerdir (Şekil 2.5).

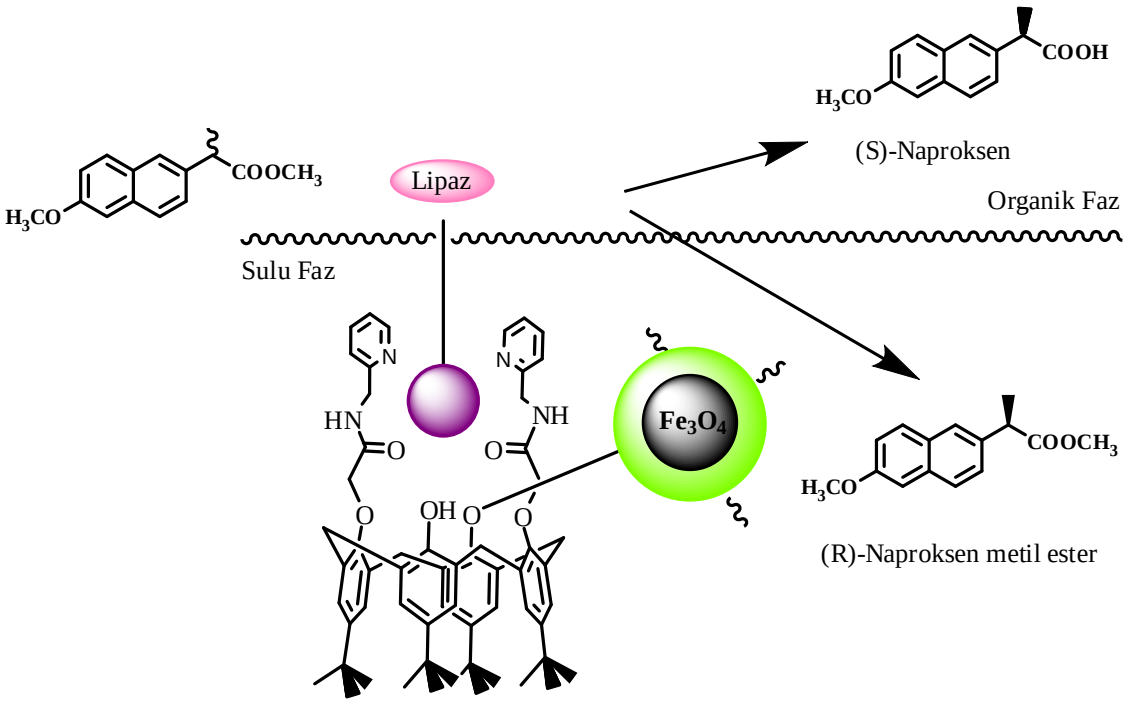


Şekil 2.5. Cam boncuk yüzeyine enzim immobilizasyonu gösterimi

Ozyilmaz ve Sayin (2013), yaptıkları çalışmada selüloz ve çitosan biopolimerleri üzerine uygun kaliksaren türevini immobilize ederek yeni biopolimerler elde etmişlerdir. *Candida Rugosa* lipaz enzimini sol-jel metodunundan yararlanarak tetraetoksisilan (TEOS) ve oktiltrietoksisilan (OTES) varlığında yeni biopolimere immobilize etmişlerdir. Hazırlanan bu materyaller, Rasemik naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidroliz çalışmalarında kullanılmıştır. Kaliksaren bazlı meteryalin, rasemik naproksenin enantiyoseçimliliğinin yüksek (E=300) olduğu gözlemişlerdir.

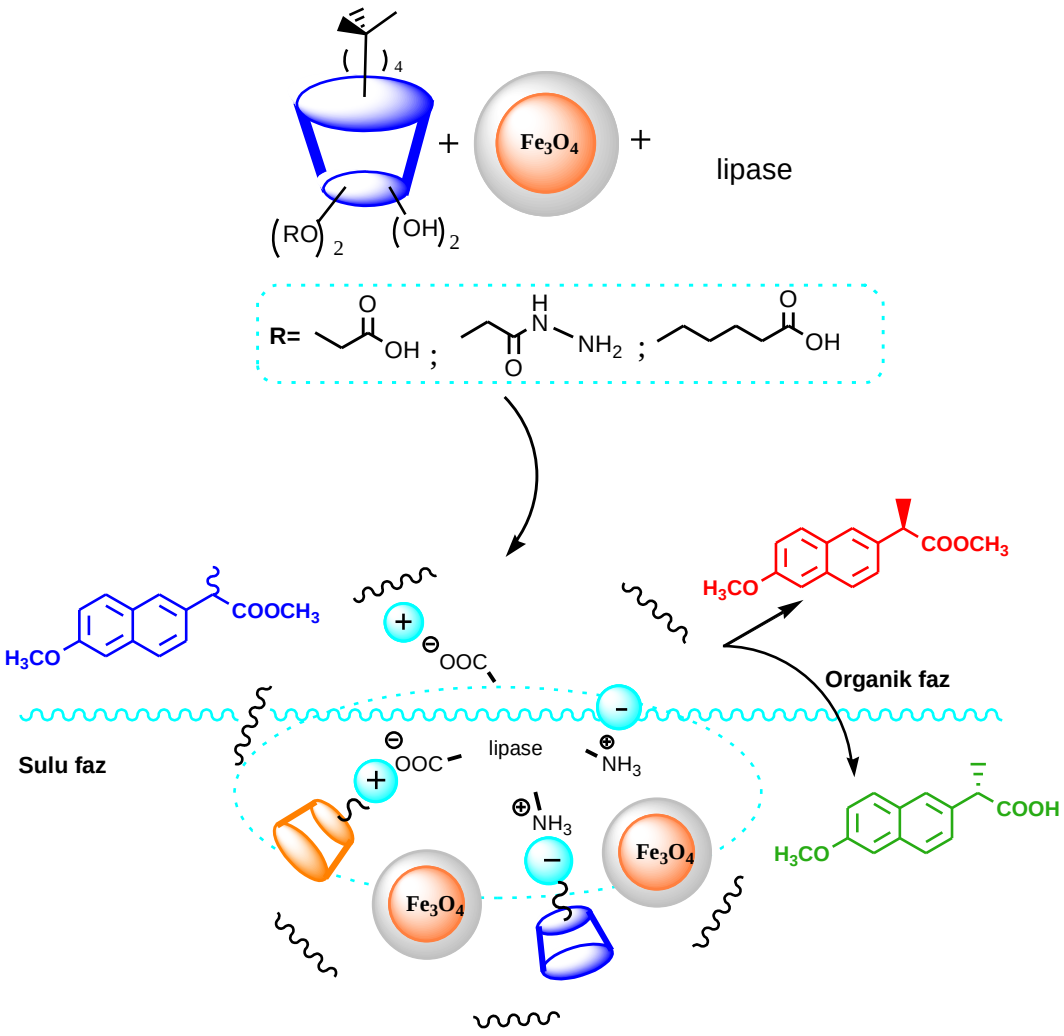
Ozyilmaz ve Sayin (2013), yaptıkları bir diğer çalışmada manyetik Fe_3O_4 nanopartükülüne bağlı kaliks[4]aren'in dipridin türevini, *Candida Rugosa* lipaz ile immobilize edildikten sonra, *p*-nitro fenil palmitatın (*p*-NPP) hidrolizi ile aktivitesi

ölçümleri ve bu immobilize lipaz rasemik naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidroliz tepkimelerinde kullanılmıştır. İmmobilize lipazın katalitik akitivitelerinin ve enantiyoseçiciliğinin (E>400) yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 2.6).



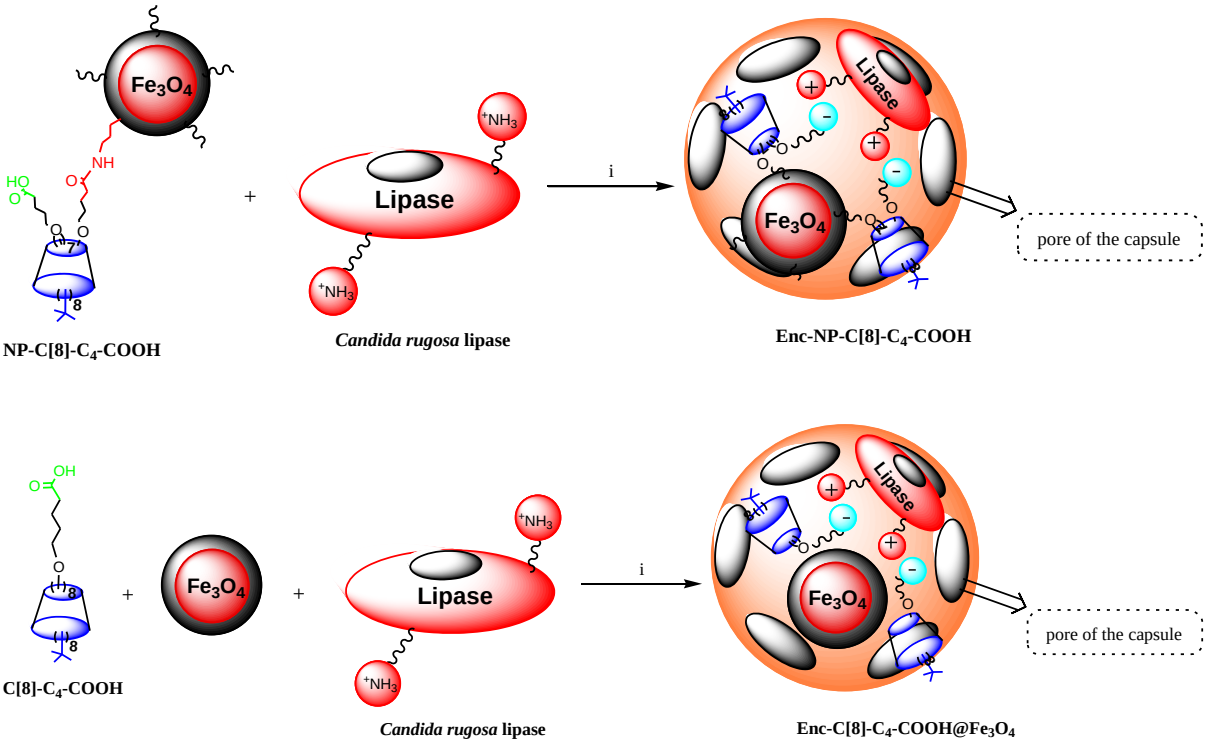
Şekil 2.6. Naproksen metil esterinin ekstraksiyon ile ayrılması

Yılmaz ve grubu (2015), yaptıkları bir çalışmada kaliks[4]aren'in hidrazin ve karboksil asit türevlerini hazırlayarak bu bileşikleri ve Fe_3O_4 nanopartikülleri bir katkı maddesi olarak sol-jel prosedürüne göre *Candida Rugosa* lipazın enkapsilasyonunda kullanmışlardır. Enkapsüle edilen bu lipazlar rasemik naproksen metil esterinin enantiyo seçimli hidrolizinde ve aynı zamanda *p*-nitro fenil palmitatın (*p*-NPP) hidrolizinde katalizör olarak kullanmışlardır. Elde edilen sonuçlarda kaliks[n]aren türevleri ve Fe_3O_4 nanopartikül enkapsüle lipazların serbest lipaza göre daha yüksek dönüşüm ve enantiyoseçimlilik gösterdiği gözlemlenmiştir (Şekil 2.7.).



Şekil 2.7. (R/S)-Naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizinin şematik gösterimi

Yılmaz ve grubu (2014), yaptıkları lipaz immobilizasyonunda hem serbest hem de kovalent bağlı kaliks[8]arenleri Fe_3O_4 nanopartikülü varlığında sol-jel metodunu kullanarak *Candida Rugosa* lipazının enkapsilasyonunda katkı maddesi olarak kullanmışlardır. Fe_3O_4 nanapartiküller sentezledikleri kaliks[8]aren okta valerik asit ile seçimli olarak bir karboksil gurubundan birisine bağlayarak elde ettikleri kaliks[8]aren Fe_3O_4 nanapartiküllere immobilize ettikten sonra sol-jel enkapsilasyon işlemine göre katkı maddesi olarak kullanmışlardır. Çalışmanın bir başka kısmında ise Fe_3O_4 nanopartiküller kaliks[8]aren okta valerik asit türevi ve *Candida Rugosa* lipazı varlığında immobilize edilerek enantiyo seçimliliklerini rasemik naproksen metil esterinin hidroliz reaksiyonunda kullanmışlardır. Kaliks[8]arenin kovalent bağlı enkapsüle edildiği lipazların beş kez kullanımdan sonra bile başlangıç aktivitesinin %86 düştüğü gözlenmiştir (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Enkapsüle lipazların hazırlanması. Reaksiyon şartları: (i) fosfat tamponu (pH 7.0), polivinil alkol, NaF, isopropil alkol, tetrametoksi silan, oktil-tri-metoksi silan

3. MATERYAL VE YÖNTEM

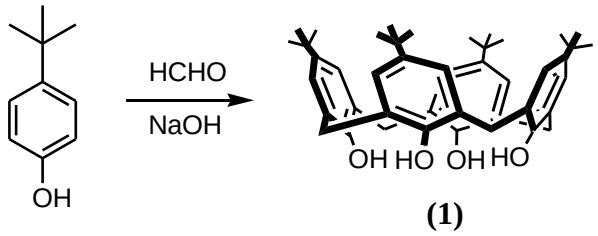
3.1. Enstrümental Teknikler

^{1}H-NMR ve ^{13}C-NMR spektrumları Varian 400 MHz spektrometre ile alındı. FTIR spektrumları ATR problu Perkin Elmer 1605 FTIR System Spectrum spektrofotometresinden alındı. UV-vis. ölçümlerinde Shimadzu 160A UV-Visible spektrofotometresi kullanıldı. Sentezlenen bileşiklerin erime noktası tayinleri, EZ-Melt marka erime noktası tayin cihazı ile yapıldı. HPLC ölçümleri Chiralcel OD-H (25 cm, 4.6 mm) kiral kolonu kullanılarak Agilent 1200 HPLC modeli ile gerçekleştirildi. Elementel analizler (C, H, N, S) CHNS-932 (LECO) elementel analiz cihazı ile yüksek sıcaklıkta (1000-1100 ^{o}C) yakma yoluyla bileşiklerdeki element yüzdeleri tayin edildi. Santrifüj işlemleri Sigma 2-16 PK soğutmalı santrifüj cihazı ile yapıldı. Sentez tepkimelerinin ilerleyişi İTK (DC Alufolien Kieselgel 60 F_{254} (Merck)) ile takip edildi. Kolon kromatografisi çalışmalarında silika jel 60 (Merck, tanecik büyüklüğü 0.040-0.063 mm, 230-240 mesh) kullanıldı. Tüm sulu çözeltiler, Millipore Milli-Q Plus su arıtma cihazıyla saflaştırılan saf su ile hazırlandı. Sentezlerde kullanılan başlangıç materyalleri ve reaktifleri analitik saflıkta Sigma, Merck veya Aldrich firmalarından temin edilerek kullanıldı.

3.2. Kimyasal Sentezler

Bu çalışmada sentezlenen bazı bileşikler literatürdeki metotlara göre geri kalan bileşikler (**5**, **8**, **9** ve **10**) ise ilk kez sentezlendi. Bu çalışmada kullanılan **1-10** nolu bileşiklerin sentezi aşağıda sırasıyla yer almaktadır.

3.2.1. *p-ter*-Butilkaliks[4]aren (1) ' in sentezi (Gutsche 1990)

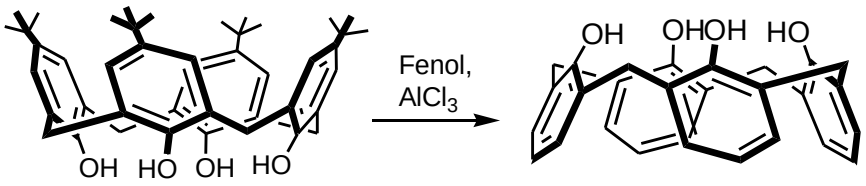


(1)

Şekil. 3.1. *p-ter*-bütilkaliks[4]aren (**1**)

1 L lik iki boyunlu bir balona *p-ter*-bütilfenol (100 g, 0.665 mol), % 37' lik formaldehit (62.3 mL, 0.83 mol) ve NaOH (1.2 g, 0.03 mol) ilave edilerek 110-120 ^{o}C'e ayarlı bir yağ banyosunda 1.5-2 saat ısıtıldı. Sarı renkli bir katı bir kütle elde edildikten sonra, reaksiyonun sıcaklığı oda sıcaklığına düşürülür ve 800 mL difenil eter ilave edilir. Bu süspanse karışım 1 saat oda sıcaklığında karıştırılır, reaksiyon sırasında oluşan suyun ortamdan uzaklaştırılmasında kolaylık sağlaması için azot gazı ve bir ksilol cihazı takılarak karışım ısıtıldı. Su çıkışı tamamlandıktan sonra bu karışım 1.5-2 saat daha geri soğutucu altında kaynatıldı. Sonra bu reaksiyon karışımı oda sıcaklığına getirilerek 500 mL etil asetat ile etkileştirildi. Oluşan çökelek süzülerek iki kez 100 mL etil asetat ile, bir defa 200 mL asetik asit ile ve son olarak su ile nötral pH'a kadar yıkandı. Ham ürün toluenden kristallendirilerek 61.6 g saf *p-ter*-bütilkaliks[4]aren elde edildi. E.n.; 342-344 ^{o}C (lit., 344-346 ^{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).

3.2.2. Kaliks[4]aren (2)' in sentezi (Gutsche 1990)

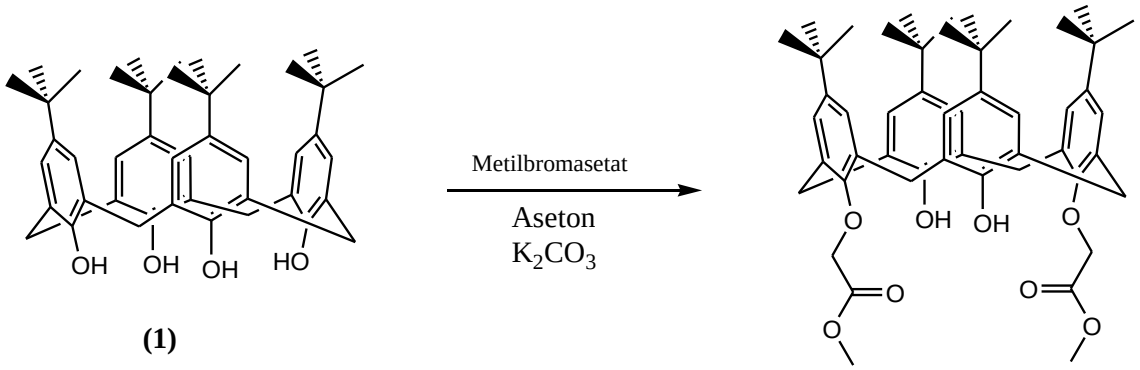


(1) **(2)**

Şekil. 3.2. Kaliks[4]aren dealkillenme tepkimesi

p-ter-Bütilkaliks[4]aren **1** (52.4 g, 70.71 mmol) 675 mL kuru toluende çözülerek üzerine fenol (32 g, 340 mmol) ilave edildi. $AlCl_3$ (76 g, 570 mmol) 10 ar dakika ara ile üç kısım halinde reaksiyon karışımına ilave edilerek 4 saat azot atmosferinde oda sıcaklığında karıştırıldı. 0.2 M HCl ilavesi ile reaksiyon durdurularak organik faz ayrılır ve su ile nötral pH'a kadar yıkandı. Organik faz $MgSO_4$ üzerinden kurutuldu ve toluen indirgenmiş basınç altında uzaklaştırıldı. Elde edilen ham ürün $CHCl_3$-MeOH ile kristallendirildi. Verim: % 78; E.n.: 313-315 ^oC (lit., 315-318 ^oC). ^1H-NMR ($CDCl_3$): δ 3.35 (d, 4H, Ar-CH_2-Ar), 4.23 (d, 4H, Ar-CH_2-Ar), 6.67 (t, 4H, ArH), 7.45 (d, 4H, ArH), 10.16 (s, 4H, -OH).

3.2.3. 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,27-dimetoksikarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi-kaliks[4]aren (3) (Collins, 1991)

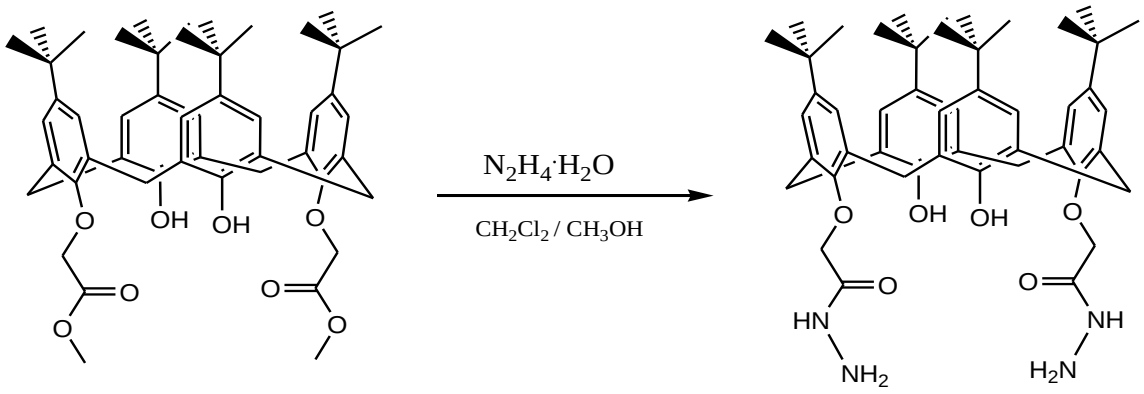


(1) **(3)**

Şekil. 3.3. 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,27-dimetoksikarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi-kaliks[4]aren **(3)**

500 mL lik iki boyunlu balona 2 g (3.0 mmol) *p-ter*-bütilkaliks[4]aren, 0.82 g (5.9 mmol) potasyum karbonat ve 6.0 mmol metil bromasetat 100 mL aseton içerisinde ilave edilerek 24 saat geri soğutucu altında karıştırıldı. Oda sıcaklığına getirilen karışım süzüldü ve evaporatörde çözücü uzaklaştırıldı. Elde edilen katı madde etanol ile kristallendirilerek saf ürün 3 %63.4 verimle sentezlendi. E.n: 202-207^oC. FTIR (ATR):1750 cm^{-1}(C=O). ^1H NMR ($CDCl_3$): δ 0.97 (s, 18H, Bu^t), 1.24 (s, 18H, Bu^t), 3.35 (d, 4H, *J*= 12.6 Hz, $ArCH_2Ar$), 3.85(s, 6H, OCH_3), 4.45 (d, 4H, *J*= 12.6, $ArCH_2Ar$), 4.78 (s, 4H, OCH_2CO), 6.85 (s, 4H, ArH), 7.05 (s, 4H, ArH), 7.10 (s, 2H, OH).

3.2.4. 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,27-dihidrazinamitkarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi-kaliks[4]aren (Alekseeva 2000)

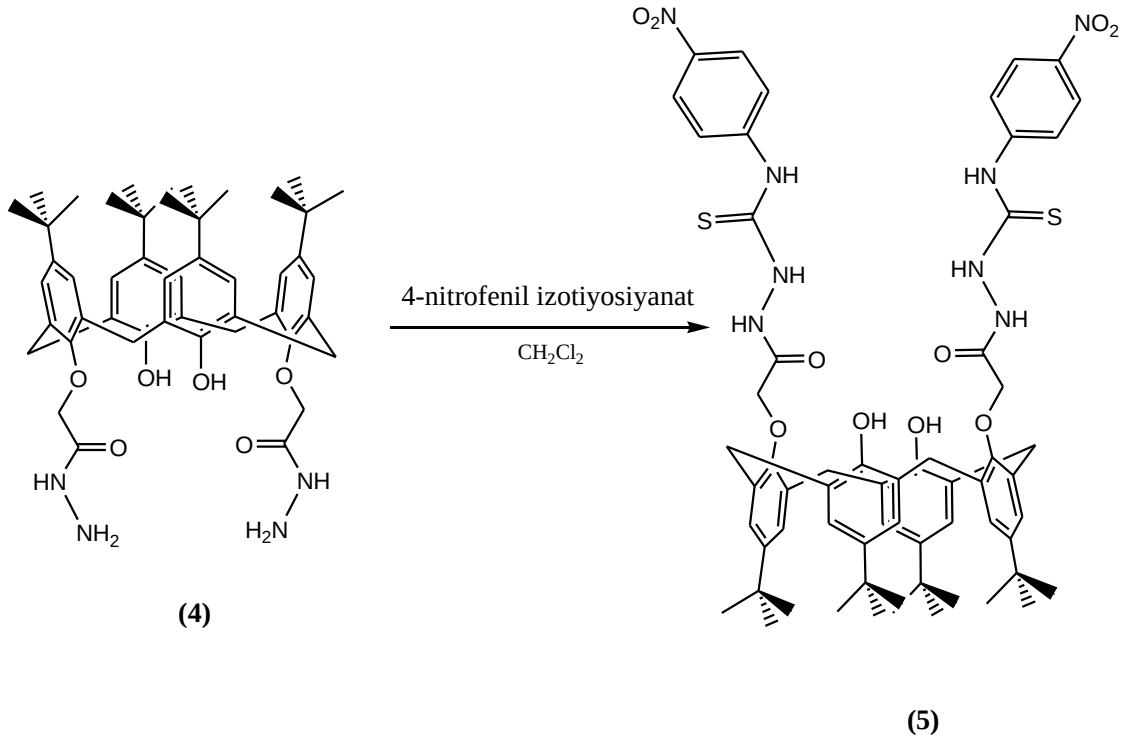


(3) **(4)**

Şekil. 3.4. 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,27-dihidrazinamitkarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi-kaliks[4]aren **(4)**

5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,27-dimetoksikarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi-kaliks[4]aren (3 g, 3.783 mmol) ve 1 mL hidrazin mono hidrat' ın diklormetan/metanol (48 ml/24 ml) içerisindeki karışımı üç gün oda sıcaklığında karıştırıldı. Reaksiyonun ilerleyişi hem İTK dan (EtOAc/heksan, 2 /1) hemde FTIR spektroskopisi (1750 cm^{-1} deki ester karbonil bandının 1684 cm^{-1} deki amid karbonil bandına dönüşümü) ile takip edilerek başlangıç maddelerinin ürüne dönüşümü gözlendi. Reaksiyon karışımının çözücüleri evaparasyon ile uzaklaştırıldı, geriye kalan katı ham ürün saf su ile nötral pH a kadar yıkandı ve vakumlu etüvde kurutuldu. Ham ürün CH_3OH den kristallendirilerek saflaştırıldı. Verim; 1.6 g (% 53.3). E.N.; 330-333 ^oC. FTIR : ν_{max} (ATR): 3389, 3342, 3048, 2954, 2872, 1684 cm^{-1}. ^1H NMR (400 MHz $CDCl_3$): δ 1.02 (s, 18H, *t*-Bu), 1.26 (s, 18H, *t*-Bu), 2.15 (d, 4H, *J*= 1.6 Hz, NH_2), 3.42 (d, 4H, *J*=13.3 Hz, $ArCH_2Ar$), 4.11 (d, 4H, *J*=13.2 Hz, $ArCH_2Ar$), 4.63 (s, 4H, OCH_2), 6.92 (s, 4H, ArH), 7.10 (s, 4H, ArH), 7.70 (s, 2H, OH), 9.61 (brs, 2H, NH). $C_{48}H_{64}N_4O_6$ için analitik hesaplanan: C; 72.70, H; 8.13, N; 7.06. Bulunan: C; 71.58, H; 8.27, N; 7.01.

3.2.5. 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,27-(4-(4-nitrofenil)-1-ditiyosemikarbazit) karbonilmetoksi-26,28-dihidroksi-kaliks[4]aren (5)

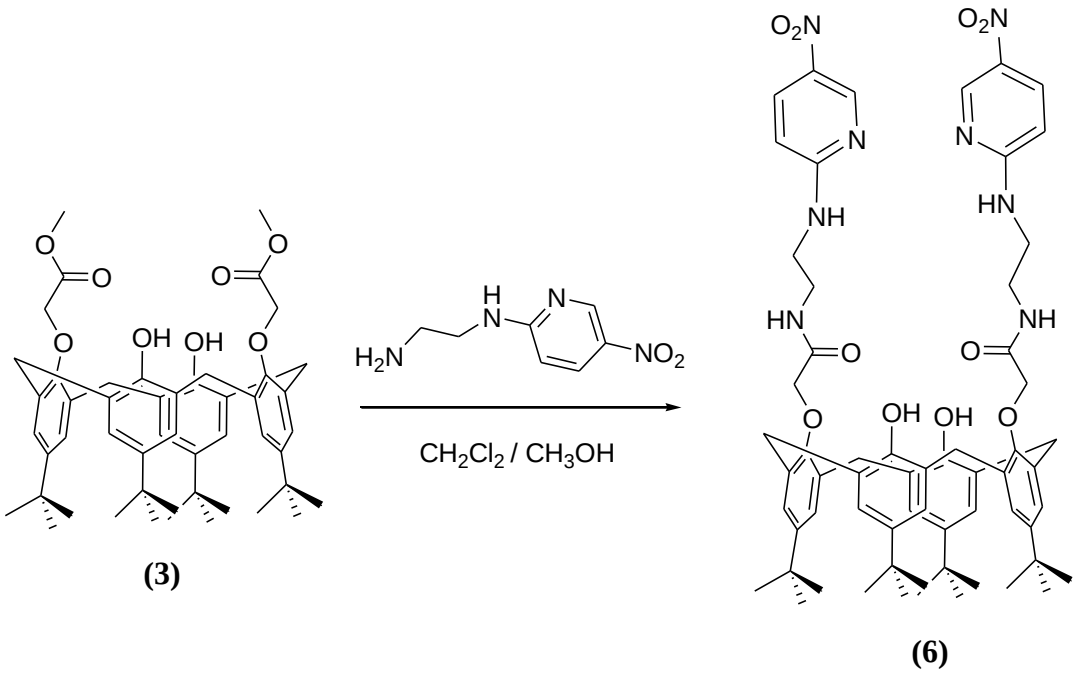


Şekil. 3.5. 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,27-(4-(4-nitrofenil)-1-ditiyosemikarbazit)karbonilmetoksi-26,28-dihidroksi-kaliks[4]aren **(5)**

0.5 g (0.6304 mmol) 5,11,17,23-tetra-ter-bütil-25,27 dihidrazinamitkarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi–kaliks[4]aren' in CH_2Cl_2 (10 mL) deki karışımına 4-nitrofenil izotiyosiyanat (0.91 g, 5.0432 mmol) ilave edilir. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 4.5 saat karıştıktan sonra çökelen ürün süzülür, CH_2Cl_2 ile yıkanır ve vakum altında kurutulur. Verim: 0.6 g (% 82.5). E.N= 184-187 ^oC. FTIR : ν_{max} (ATR): 3448, 2955, 2869, 1708, 1332 cm^{-1}; ^1H NMR (400 MHz DMSO-d6): δ 1.10 (s, 18H, *t*-Bu), 1.18 (s, 18H, *t*-Bu), 3.43 (d, 4H, *J*=12.8 Hz, $ArCH_2Ar$), 4.35 (d, 4H, *J*=12.8 Hz, $ArCH_2Ar$), 4.73 (s, 4H, OCH_2), 7.12 (brs, 8H, ArH), 7.88-7.92 (m, 4H, ArH), 8.17-8.20 (m, 6H, NH ve ArH), 10.01-10.64 (m, 6H, NH ve OH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO): δ 31.32 (-CH_3, Bu^t), 31.82 (-CH_3, Bu^t), 34.05 (-*C*, Bu^t), 34.38 (Ar-CH_2-Ar), 34.45 (-*C*, Bu^t), 73.57 (ArO-CH_2-), 112.82, 122.55, 124.31, 124.95, 125.38, 125.88, 126.29, 126.85, 127.51,

127.81, 133.04, 133.34, 141.81, 145.83, 147.67 ve 150.20 (Ar*C*), 169.01 (*C*=O), 181.04 (*C*=S). $C_{62}H_{72}N_8O_{10}S_2$ için analitik hesaplanan: C; 64.56, H; 6.29, N; 9.71, S; 5.56. Bulunan: C; 64.35, H; 6.33, N; 9.82, S; 5.44.

3.2.6. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,27-bis(2-nitropiridil-2-ilamin)etilaminkarbonil-metoksi)-26,28-dihidroksikaliks[4]aren (6) (Sayin 2015)



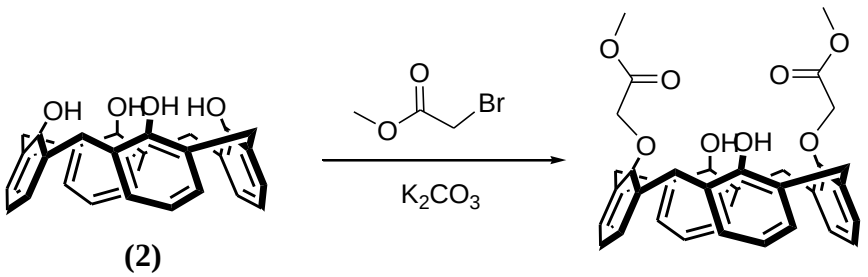
(3) **(6)**

Şekil. 3.6. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,27-bis(2-nitropiridil-2-ilamin)etilaminkarbonil-metoksi)-26,28-dihidroksikaliks[4]aren **(6)**

Diester türevi **3** (1 g, 1.261 mmol)' ün 18 mL CH_2Cl_2/CH_3OH (2/1, v,v) den oluşan çözücü karışımı içindeki çözeltisine 2-(2-aminoetilamin)-5-nitropiridil ilave edildi. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 34 saat karıştırıldı. Reaksiyon İTK ile takip edildi ve tamamlandıktan sonra karışımın çözücüleri evaporatör ile uzaklaştırılarak kalan katı ham ürün nötral pH a kadar saf su ile yıkandı ve kurutuldu. Daha sonra kolon kromatoğrafisi (SiO_2, CH_2Cl_2/CH_3OH, 10/1) ile saflaştırılarak %52 verimle bileşik **6** elde edildi. E.N.; 274-275 ^oC. FTIR (ATR) cm^{-1} : 3450 (-OH), 3380 (-NH), 1670 (C=O), 1481 (N-O asimetrik gerilme), 1291 (N-O simetrik gerilme). ^1H NMR (400 MHz, DMSO): δ 1.06 (s, 18H, Bu^t) , 1.14 (s, 18H, Bu^t) , 3.28 (d, 4H, *J* = 13.2 Hz, $ArCH_2Ar$), 3.35-3.58 (m, HOD çakışık, 10H, -CH_2- and Ar-NH), 3.91 (d, 4H, *J* = 13.2

Hz, $ArCH_2Ar$), 4.47 (s, 4H, OCH_2), 6.99 (s, 4H, ArH), 7.08 (s, 4H, ArH), 7.46 (brs, 2H, OH), 8.11 (brs, 2H, ArH), 8.25 (s, 2H, ArH), 8.79 (brs, 2H, ArH), 8.94 (brs, 2H, NH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO): δ 31.26 (-CH_3, Bu^t), 31.80 (-CH_3, Bu^t), 34.04 (Ar-CH_2-Ar), 34.47 (-*C*, Bu^t), 34.49 (-*C*, Bu^t), 38.05 (-N-CH_2), 72.40 (ArN-CH_2), 74.83 (O-CH_2), 125.74 (Ar*C*), 125.90 (Ar*C*), 126.29 (Ar*C*), 127.17 (Ar*C*), 127.53 (Ar*C*), 133.16 (Ar*C*), 133.29 (Ar*C*), 134.59 (Ar*C*), 141.99 (Ar*C*), 146.96 (Ar*C*), 147.91 (O-*C*Ar), 150.04 (O-*C*Ar), 168.49 (N-*C*Ar, Pyr), 169.72 (*C*=O). $C_{62}H_{76}N_8O_{10}$ için analitik hesaplanan: C, 68.11; H, 7.01; N, 10.25. Bulunan (%): C, 68.26; H, 6.97; N, 10.32.

3.2.7. 25,27-Dimetoksikarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi-kaliks[4]aren (7) (Unob, 1998)

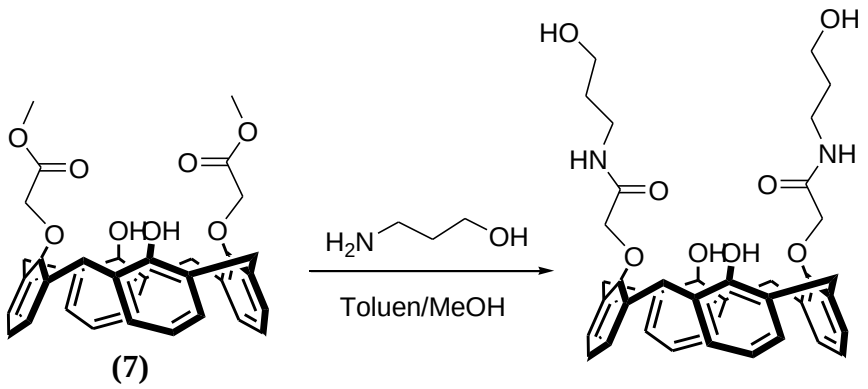


(2) **(7)**

Şekil. 3.7. 25,27-Dimetoksikarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi-kaliks[4]aren **(7)**

Kaliks[4]aren (12.72 g, 30.00 mmol), K_2CO_3 (4.45 g, 32.00 mmol), $BrCH_2CO_2CH_3$ (9.64 g, 63.00 mmol) ve aseton (600 mL)' dan oluşan karışım 24 saat geri soğutucu altında kaynatılır. Çözücüler kuruluğa kadar evaporatöratasyon ile uzaklaştırılır ve kalan katı metanol ile etkileştirilerek saflaştırılır. Verim: %72 (12.36 g). E.N.; 213-215 ^oC. FTIR (ATR) cm^{-1}: 1758 (C=O). ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 3.40 (d, 4H, *J* = 13.2 Hz, $ArCH_2Ar$), 3.88 (s, 6H, -OCH_3), 4.47 (d, 4H, *J* = 13.2 Hz, $ArCH_2Ar$), 4.75 (s, 4H, OCH_2), 6.66 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz, ArH), 6.74 (t, 2H, *J* = 8.0 Hz, ArH), 6.91 (d, 4H, *J* = 7.6 Hz, ArH), 7.06 (d, 4H, *J* = 7.6 Hz, ArH), 7.57 (s, 2H, -OH).

3.2.8. 25,27-Bis(3-hidroksipropil)amitkarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi-kaliks[4]aren (8)

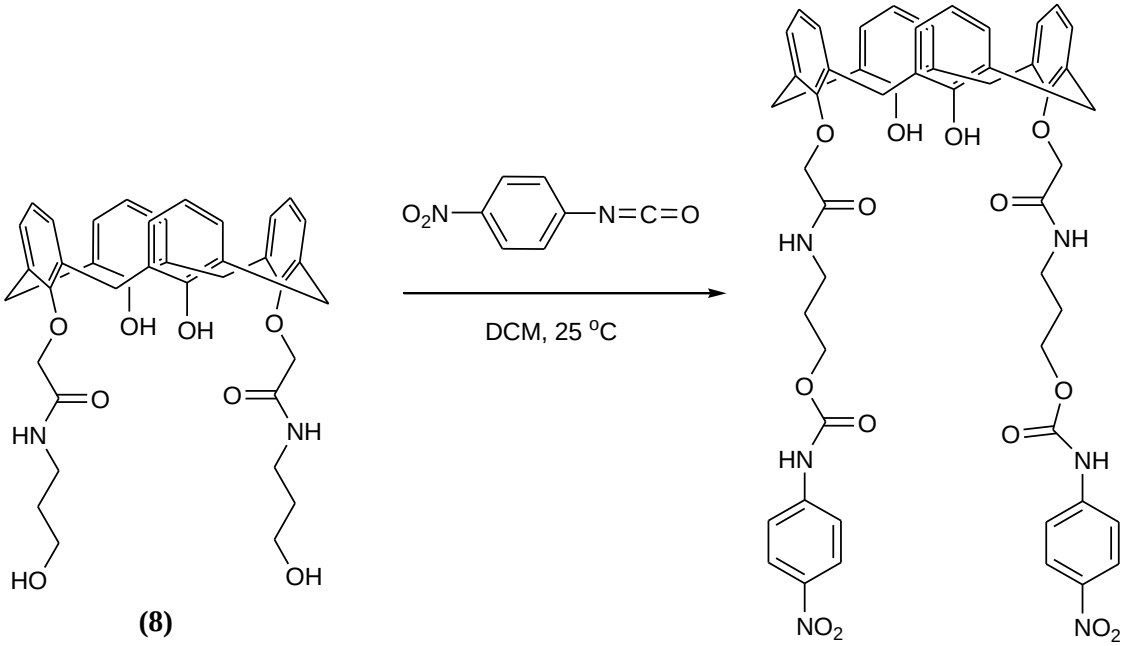


(7) **(8)**

Şekil. 3.8 25,27-Bis(3-hidroksipropil)amitkarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi-kaliks[4]aren **(8)**

Diester türevi 7 (1.5 g, 2.638 mmol) ve 3-hidroksipropilamin (1.59 g, 21.104 mmol)' nin 30 mL toluen/MeOH (1/1, v,v) çözücü sistemindeki karışımı 2 saat geri soğutucu altında kayanatılır. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığına getirilir ve çözücüler evaporatasyon ile uzaklaştırılır. Elde edilen ürün nötral pH a kadar saf su ile yıkanır ve kurutulur. Ham ürün MeOH den kristallendirilerek saflaştırılır. Verim: %76. E.N.: 244-246 ^{o}C. FTIR (ATR) cm^{-1}: 1661 (C=O). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1.71 (brs, 2H, -OH), 1.83 (p, 4H, *J*= 6.4 Hz, -CH_2-), 3.54 (d, 4H, *J*= 13.2 Hz, ArCH_2Ar), 3.62 (q, 4H, *J*= 6.4 Hz, -CH_2-O), 3.69 (t, 4H, *J*= 6.0 Hz, -CH_2-N), 4.17 (d, 4H, *J*= 13.2 Hz, ArCH_2Ar), 4.65 (s, 4H, ArO-CH_2), 6.48 (t, 2H, *J*= 7.6 Hz, ArH), 6.89 (t, 2H, *J*= 7.2 Hz, ArH), 7.02 (d, 4H, *J*= 7.6 Hz, ArH), 7.14 (d, 4H, *J*= 7.6 Hz, ArH), 8.15 (s, 2H, Ar-OH), 9.03 (t, 2H, *J*= 5.6 Hz, -NH). $C_{38}H_{42}N_2O_8$ için analitik hesaplanan: C, 69.71; H, 6.47; N, 4.28. Bulunan (%): C, 69.77; H, 6.30; N, 4.36.

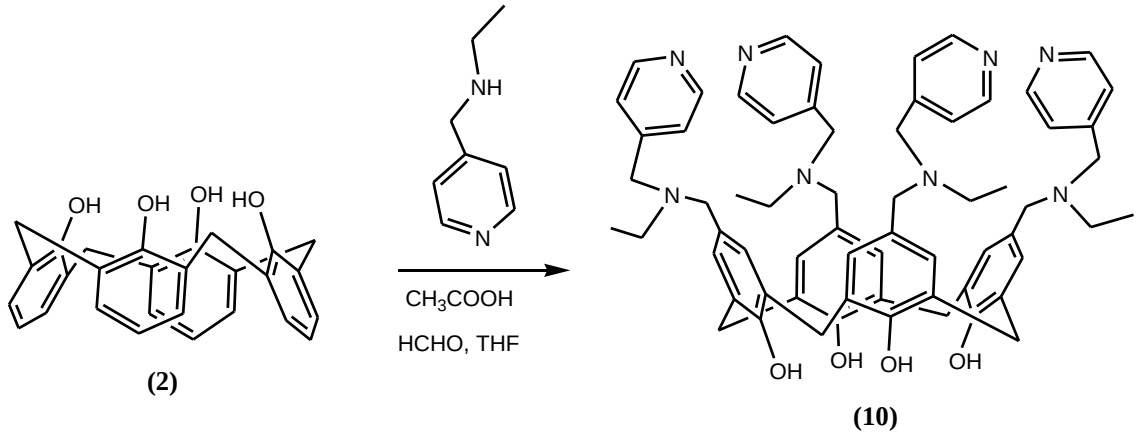
3.2.9. 25,27-Bis(3-(*p*-nitrofenilkarbamat)propil)amitkarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi-kaliks[4]aren (9)



Şekil. 3.9 25,27-Bis(3-(*p*-nitrofenilkarbamat)propil)amitkarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi-kaliks[4]aren **(9)**

25,27-Bis(3-hidroksipropil)amitkarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi-kaliks[4]aren (8) (0.2 g, 0.305 mmol) ve 4-nitrofenil izosiyanat (0.5 g, 3.05 mmol) ın 10 mL DCM çözücü sistemindeki karışımı 4 saat boyunca geri soğutucu altında kaynatılır. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığına getirilir ve çözücüler evaparatörde uzaklaştırılır. Elde edilen ürün nötral pH a kadar saf su ile yıkanır ve vakumda kurutulur. Ham ürün MeOH' de kristallendirilerek saflaştırılır.Verim: 0.24 g (%81). E.N.;253-255 ^{o}C. FTIR (ATR) cm^{-1}: 1734 (C=O, karbamat), 1664 (C=O, amit), 1495 (N-O asimetrik gerilme), 1297 (N-O simetrik gerilme). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO): δ 1.93-1.99 (m, 4H, -CH_2-), 3.44-3.49 (m, 8H, ArCH_2Ar ve O-CH_2), 4.20-4.24 (m, 8H, ArCH_2Ar ve N-CH_2), 4.57 (s, 4H, ArO-CH_2), 6.59 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, ArH), 6.81 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, ArH), 7.05 (d, 4H, *J* = 7.6 Hz, ArH, kaliks), 7.13 (d, 4H, *J* = 7.6 Hz, ArH, kaliks), 7.64 (d, 4H, *J* = 9.2 Hz, ArH), 8.14 (d, 4H, *J* = 8.8 Hz, ArH), 8.33 (s, 2H, -NH), 8.59-8.61 (m, 2H, -NH), 9.64-9.73 (m, 2H, -OH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO): δ 28.99 (-*C*H_2-), 30.93 (N-*C*H_2-), 35.82 (Ar-*C*H_2-Ar), 63.18 (O-*C*H_2-), 74.64 (ArO-*C*H_2-), 119.96 (Ar*C*), 125.39 (Ar*C*), 125.58 (Ar*C*), 126.20 (Ar*C*), 126.84 (Ar*C*), 127.81 (Ar*C*), 129.20 (Ar*C*), 129.60 (Ar*C*), 134.04 (Ar*C*), 141.97 (Ar*C*-N), 146.16 (Ar*C*-NO_2), 146.11 (O-*C*Ar), 152.27 (O-*C*Ar), 153.58 (*C*=O, karbamat), 168.35 (*C*=O, amit). $C_{52}H_{50}N_6O_{14}$ için analitik hesaplanan: C, 63.54; H, 5.13; N, 8.55. Bulunan (%): C, 63.46; H, 5.07; N, 8.62.

3.2.10. 5,11,17,23-tetra-4-(etilaminometil)piridil-25,26,27,28-tetrahidroksi kaliks[4]aren (10) (Mermer 2012)

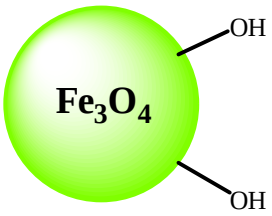


(2) **(10)**

Şekil. 3.10 5,11,17,23-tetra-4-(etilaminometil)piridil-25,26,27,28-tetrahidroksi kaliks[4]aren **(10)**

2.350 mmol kaliks[4]arenin 75 mL THF içerisindeki çözeltisine 3.8 mL glasiyel asetik asit, 11.751 mmol 4-(etilaminometil)piridin ve 1.3 mL % 37'lik formaldehit ilave edilir. Reaksiyon karışımı 16 saat oda sıcaklığında karıştırılır. Sonra sonrası oluşan katılar süzülerek uzaklaştırılır. Süzüntü vakum altında uzaklaştırılarak oluşan katı kısım 30 ml suda çözülür. Daha sonra sulu çözeltiye %10 luk K_2CO_3 çözeltisi ile edilerek pH 8.0 yapılır. Çökelek süzülüp vakum altında kurutulur. Ham ürün CH_2Cl_2/Et_2O ile etkileştirilerek saflaştırılır. Oluşan sarı renkli çökelti süzülür ve etüvde kurutulur. Verim: %71.1 (1.7 g), E.n. > 350 ^oC. ^1H NMR (400 MHz, DMSO): δ=1.02 (t, 12H, *J*= 7.2 Hz, CH_3), 1.75-1.92 (m, 8H, CH_2), 3.26-3.44 (m, 20H, CH_2, $ArCH_2Ar$), 4.18-4.25 (m, 4H, $ArCH_2Ar$), 6.97 (s, 8H, Ar-H), 7.27 (brs, 10H, Ar-H, OH), 8.49 (d, 8H, *J*= 5.6 Hz, Ar-H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO): δ 12.06 (-*C*H_3), 33.31 (Ar-*C*H_2-Ar), 47.02 (N-*C*H_2-), 55.91 (N-*C*H_2-Pyr), 57.19 (N-*C*H_2-Ar), 123.70 (Ar*C*), 127.85 (Ar*C*), 130.57 (Ar*C*), 149.47 (Ar*C*, Pyr), 149.74 (Ar*C*, Pyr), 149.95 (O-*C*Ar). Analitik Hesaplanan: $C_{64}H_{72}N_8O_4$: C, 75.56; H, 7.13; N, 11.01 % Bulunan: C, 75.32; H, 8.02; N, 11.10 % .

3.2.11. Manyetik Fe_3O_4 nanopartikülünün sentezi (Zeng, 2005)



1 M $FeCl_2$ ve 1,75 M $FeCl_3$ çözeltileri 1:1 oranında alınır ve 250 mL'lik üç boyunlu reaksiyon balonunda geri soğutucu altında N_2 atmosferinde 60^oC ye kadar ısıtılır. Reaksiyon ortamı 60 ^oC'ye ulaştığında % 25 NH_4OH ile pH ~ 10-11'e ayarlanır. Ortam bazik olduğunda demir oksit partiküllerinin oluşması ile birlikte reaksiyon ortamı koyu kahverengi renge dönüşür. Bu aşamadan sonra reaksiyon 80^oC de 1 saat daha geri soğutucu altında ısıtılır. Reaksiyon sonunda manyetik nanopartiküller bir mıknatıs yardımıyla su içerisinden alınır 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 edilir. FTIR: (Fe_3O_4) Fe-O bandı 578 cm^{-1}'de görüldü.

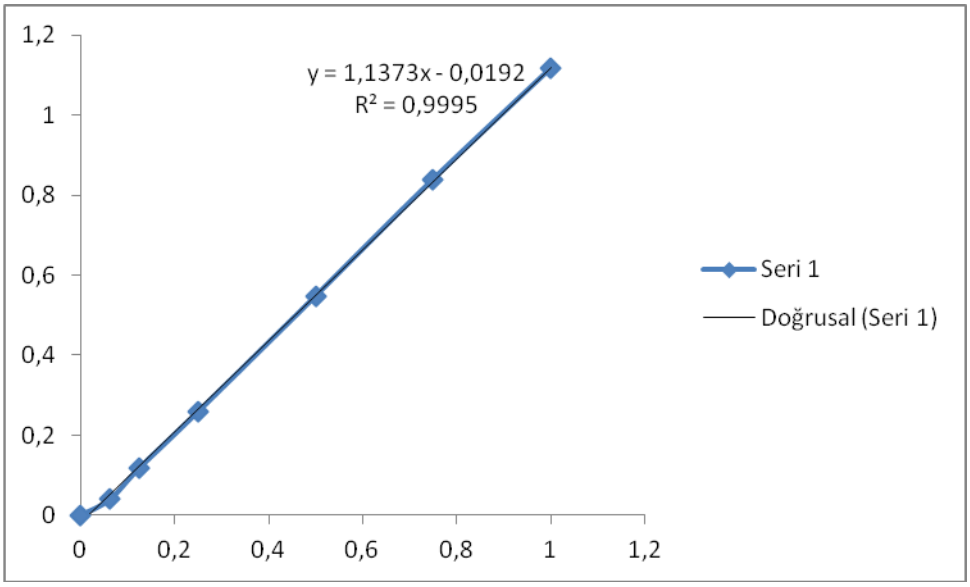
3.2.12. Sol-gel metoduna göre Lipaz İmmobilizasyonu

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

245 mg *Candida rugosa* lipazı, 1,56 mL fosfat tamponu içerisinde (0,05 M, pH 7,0) karıştırıldı. Karışım üzerine 0,1 g kaliksaren, 0,1 g Fe_3O_4, 400 µL polivinil alkol (%4 w/v), 200 µL NaF çözeltisi (0,1 M) ve 400 µL isopropil alkol ilave edilerek karıştırılıp homojenize edilir. Daha sonra 460 µL tetrametoksisilan (TMOS, 0,5 mmol) ve 3144 µL oktil trietoksisilan (2,5 mmol) konularak karıştırılır. 1-2 dk sonra jel oluşumu başlar. Oluşan bu jelatimsi karışım bir gece +4^oC de bekletilerek 10 mL distile su ve 10 mL izopropil alkol ile yıkandı. Yıkama çözeltileri Bradford metoduna göre protein tayininde kullanıldı. Daha sonra karışım liyofilizatörde kurutuldu.

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

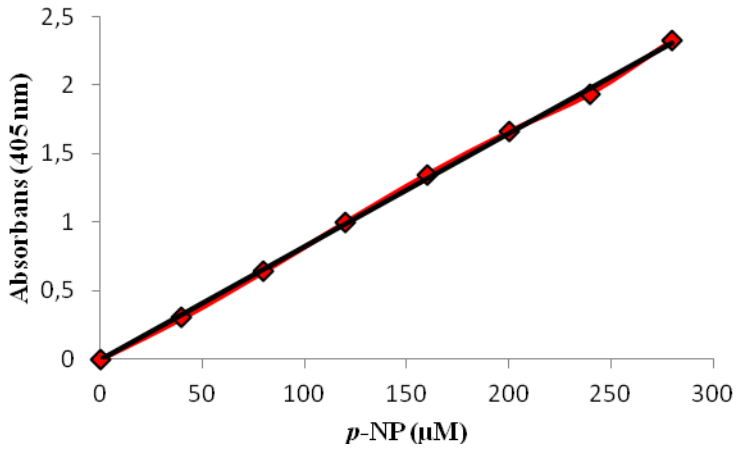
Serbest ve immobilize lipaz içerisindeki protein miktarı Bradford metoduna göre bulunur. Bunun için standart olarak Bovin serum albumin (BSA)'in belirli konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlanarak bu çözeltilerin 0,1 mL'si 3 mL Bradford reaktifi (Coomassie Brilliant Blue G-250) ile etkileştirilip 595 nm dalga boyundaki absorbansları ölçülür. Standart olarak, absorbans-protein miktarı (mg/ml) grafiği çizilir ve yapılan protein çalışmalarında bu grafik referans alınır (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. Standart protein miktarı (mg/ml)- absorbans grafiği (λmax =595 nm)

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

1 mL pH 7,0 fosfat tampon çözeltisi içerisindeki serbest lipaz veya immobilize lipaz karışımına 1 mL *p*-NPP çözeltisi (2-propanol içerisinde hazırlanılır) ilave edilerek oda sıcaklığında 5 dk karıştırılır. Ardından reaksiyon 2 mL 0,5 N Na_2CO_3 ilavesiyle durdurulur. Karışım santrifüj edilerek, enzimatik aktivite UV-visible spektrofotometresinde, açığa çıkan *p*-nitrofenol'ün (*p*-NP) 405 nm dalga boyundaki absorbansı ölçülür. Bu absorbans değeri standart olarak çizilen *p*-NP (mol/litre) kalibrasyon grafiğinde yerine konularak açığa çıkan *p*-NP'ın miktarı spektrofotometrik olarak tespit edilir. Lipazın 1 Unit (U)'i, dakikada 1 µmol *p*-NPP hidroliz etmek için gerekli olan lipaz miktarıdır. Bu verilerden yararlanılarak serbest ve immobilize lipazların aktiviteleri belirlenir (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Standart *p*-NP (*p*-nitrofenol)- absorbans grafiği (*λmax=405 nm*)

- **Optimum pH tayini**

Serbest ve immobilize enzim, farklı pH değerlerinde (pH 4,0-9,0) 50 mM sodyum fosfat tamponunda bir saat inkübe edildikten sonra standart ölçüm koşullarında aktivite ölçümleri yapıldı

- **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 soğutulur. Daha sonra aktivite tayin etme metoduna göre ölçümler yapılır.

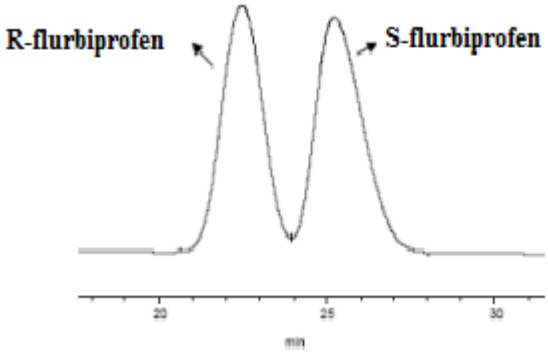
3.2.13. HPLC çalışmaları

- **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 ve 48 saat 35 ^{o}C de çalkalamalı inkübatör içerisinde karıştırılır ve

karışım üzerine 2 mL izooktan konularak ekstraksiyon yapılır. İzoktan fazında tepkimeye giren numune, HPLC cihazına verilerek (R/S)-Flurbiprofen metil esterinin (R)- Flurbiprofen ya da (S)- Flurbiprofen'e enantiyomerik olarak dönüşümü belirlenir.

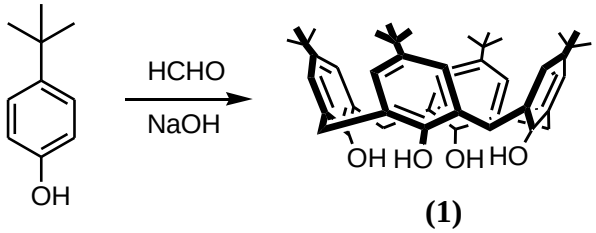
Bunun için kiral bir kolon olan Chiralcel OD-H kolon, n- hekzan / 2-propanol /trifloroasetikasit 100/0,1/0,1 oranında taşıyıcı fazında 1 ml/ dk akış hızında gerçekleştirilmiş ve UV dedektörde (λ = 254 nm) okunur.



Şekil.3.13. (R/S-flurbiprofen) bileşiğin HPLC diyagramı

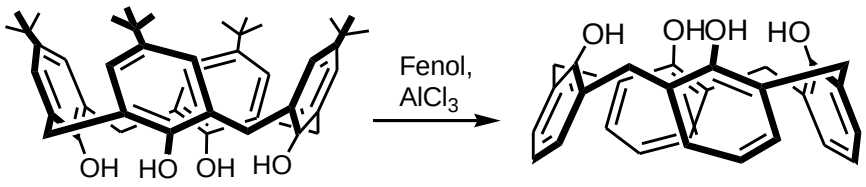
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Supramoleküler kimyada makrosiklik bileşiklerin, kullanımının geniş ve yaygın olması nedeniyle, her geçen gün önemi artmaktadır. Son yıllarda bu bileşiklerden en çok kullanılanlardan birisi kaliksarenlerdir. Bunun sebebi kaliksarenlerin diğer bileşiklere göre daha yüksek verim ile kolay sentezlenebilmesidir, ayrıca daha kolay ve yaygın modifiye edilebilmektedir. Bu çalışmada amaç, pridil ve nitro grubu taşıyan kaliks[4]aren türevlerinin hazırlanıp, bir profen türü olan rasemik flurbiprofen metil esterinin enantiyoseçimli tepkimelerin çalışmasında kullanılmasıdır. Seçilen profen türevinin enantiyoseçimliliği üzerine pridil ve nitro grupları taşıyan kaliksaren bileşiklerinin etkisi araştırılacaktır.



(1)

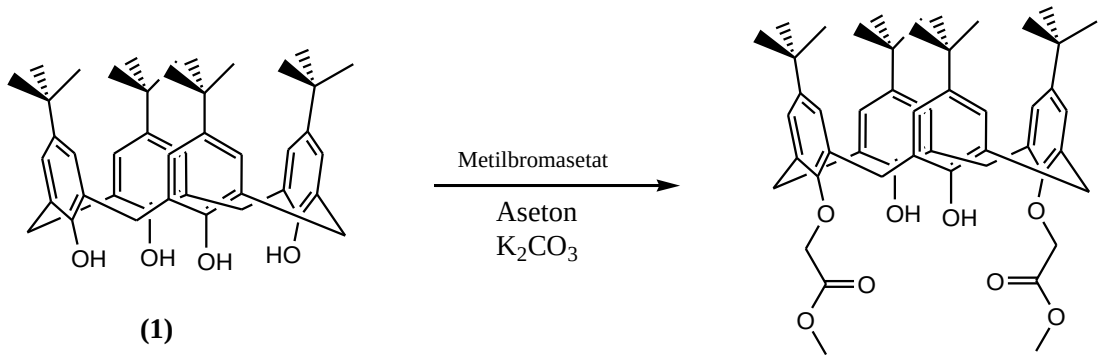
Başlangıç maddesi olan *p-ter*-bütilkaliks[4]aren **1** literatüre (Gutsche 1990) göre sentezlendi. ^{1}H-NMR spektrumunda δ: 3.45 ppm'de ve δ: 4.25 ppm'de görülen dublet 4 protonun ArC**H$_2$**Ar grubuna ait olduğu gözlendi. Bu sonuçlar *p-ter*-bütilkaliks[4]aren'in oluştuğunu göstermektedir.



(1) **(2)**

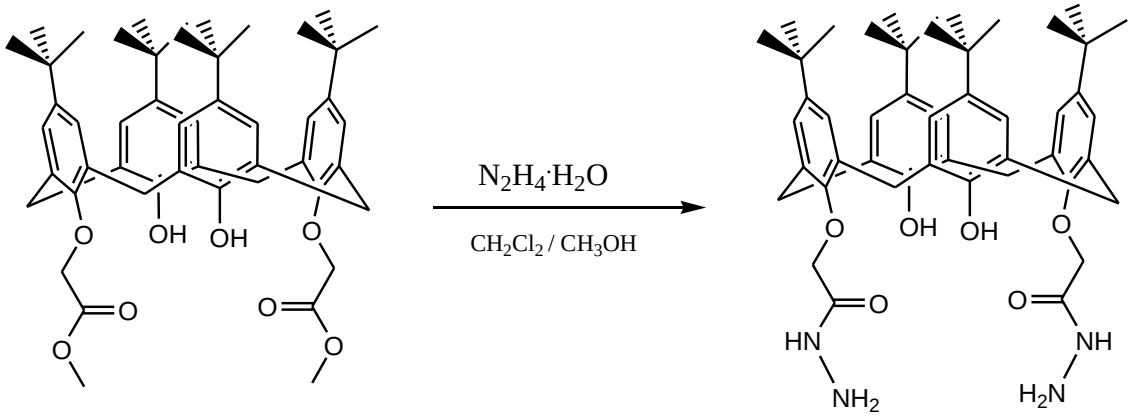
Daha sonra kaliks[4]aren **2'** in dealkillenmesi diğer bir başlangıç maddesi olarak literatüre (Gutsche, 1990) göre sentezlendi. ^{1}H-NMR spektrumunda 3.35 ppm ve 4.23 ppm'de görülen bir çift dublet pikinin Ar**CH$_2$**Ar grubuna ait olduğu gözlendi. Ayrıca t-

bütil grubuna ait 1.20 ppm'de görülen singlet pikin (s, 36H, Bu^t) kaybolduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar Kaliks[4]aren **2'** nin sentezinin oluştuğunu doğrulamaktadır.



(1) **(3)**

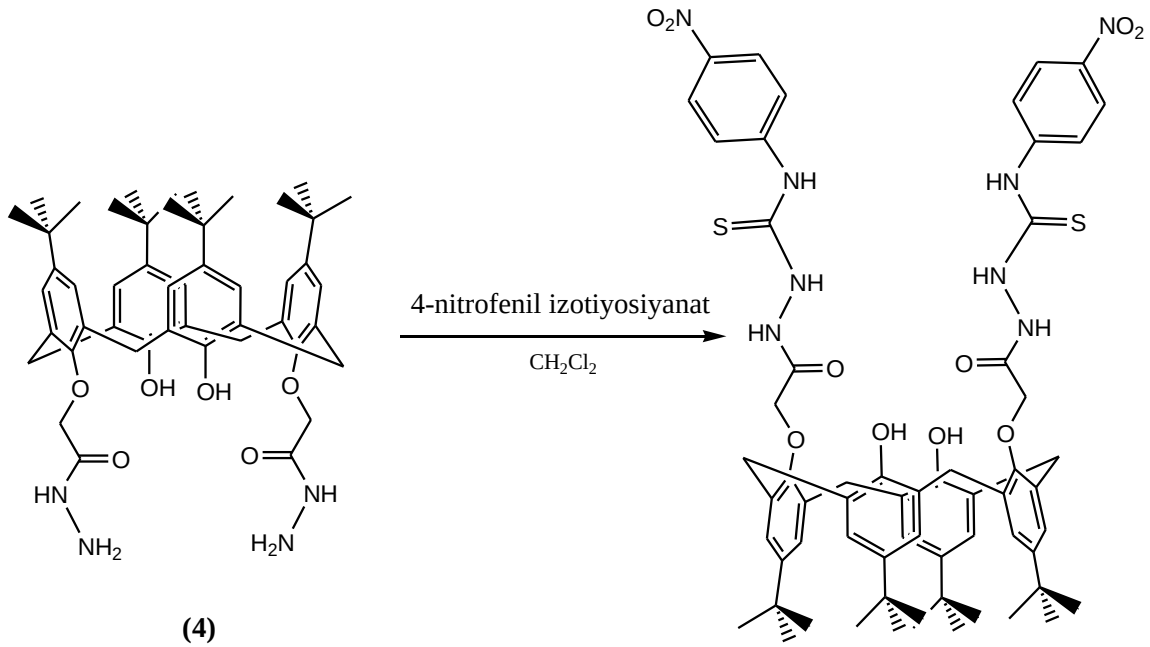
Sentezlenen *p-tert*-bütilkaliks[4]aren ile metilbrom asetat uygun miktarlarda alınarak K_2CO_3 varlığında kuru aseton içerisinde literatüre göre (Collins 1991) etkileştirilerek *p-tert*-bütilkaliks[4]aren diester türevleri sentezlendi. Bileşik **3**'ün ^{1}H-NMR spektrumunda δ: 3.85 ppm'de görülen singlet 6 protonun OC**H$_3$** grubuna, δ: 4.78 ppm'de görülen singlet 4 protonun OC**H$_2$**CO grubuna ait olduğu gözlendi. Bu sonuçlar diester türevinin oluştuğunu göstermektedir.



(3) **(4)**

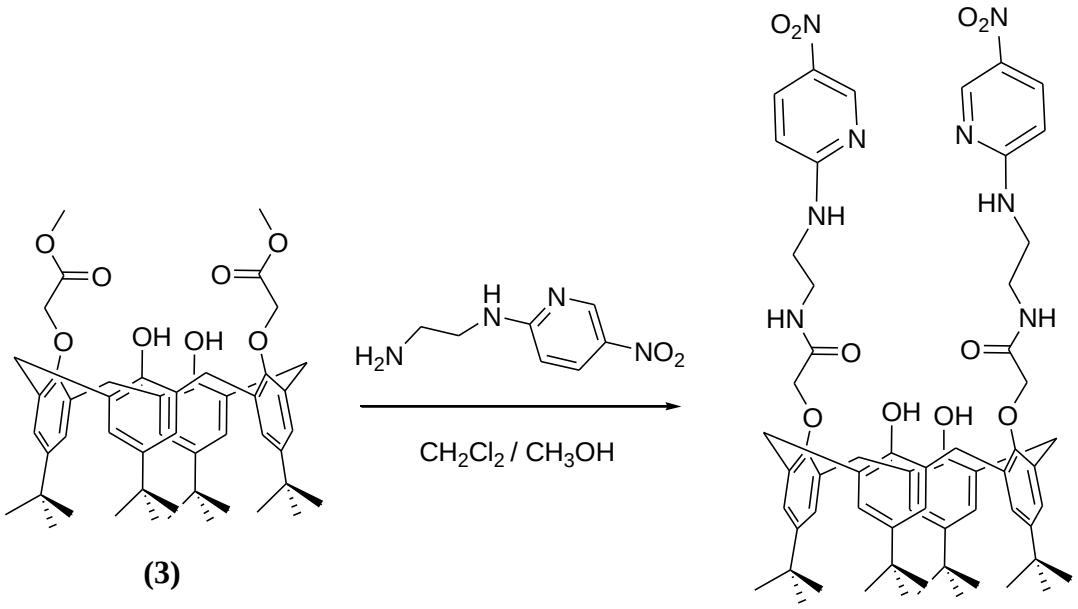
Bileşik **3**'ün hidrazin mono hidrat ile diklormetan/metanol (2:1) içerisinde oda sıcaklığında etkileştirilerek %53 verimle *p-tert*-bütilkaliks[4]arenin diamid **4** (Alekseeva 2000) türevine dönüştüğünü ^{1}H-NMR spektrumunda 3.85 ppm'de görülen 2 adet OCH_3 singlet pikin kaybolduğu, 2.15 ppm'de görülen (N-NH_2) amin ve 9.6

ppm'de görülen (-NH-N) amid grubuna ait piklerin oluşumundan anlıyabiliriz. Ayrıca bu bileşiğin FTIR spektrumunda 1750 cm^{-1} deki ester karbonil bandının 1684 cm^{-1} deki amid karbonil bandına dönüşümü ile takip edilerek başlangıç maddelerinin ürüne dönüşümü gözlendi.



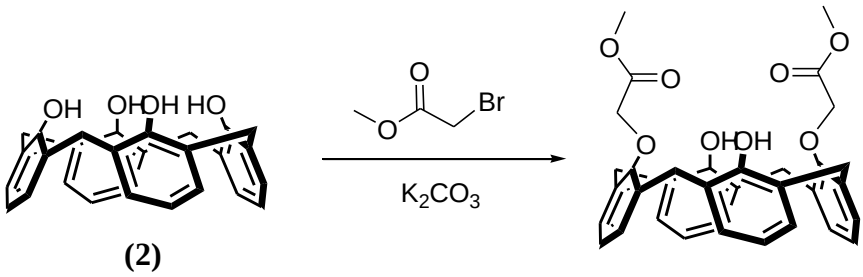
(4) **(5)**

Daha sonra bileşik **4'** ün CH_2Cl_2 içerisinde 4-nitrofenil izotiyosiyanat etkileştirilerek bileşik **5** sentezlendi. Bu bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumunda 8.17-8.20 ppm'de nitro grubuna bağlı olduğu halkaya ait protonlar (m, 6H, NH ve ArH) ve ^{13}C NMR spektrumunda 169.01 ppm'de (*C*=O), 181.04 (*C*=S) piklerin gözlemlenmesi bize bileşiğin sentezlendiğini kanıtlamaktadır.



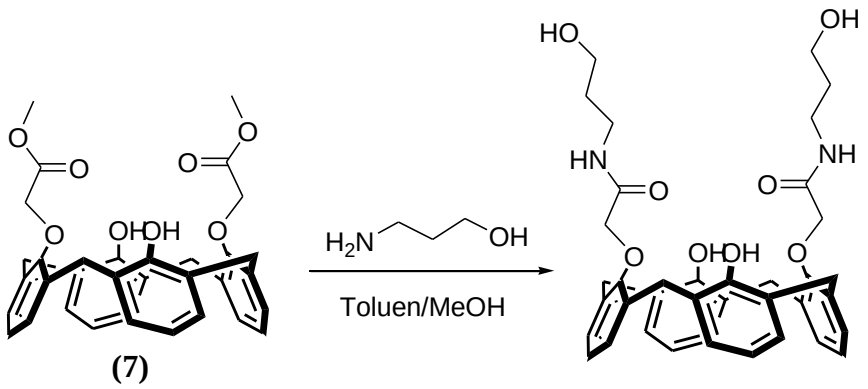
(3) **(6)**

p-tert-bütilkaliks[4]aren diester **3** bileşiği 2-(2-aminoetilamin)-5-nitropiridil ile etkileştirilerek literatüre göre (Sayin 2015) bileşik **6** sentezlendi. Bu bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumunda 8.94 ppm'de nitro grubuna bağlı olduğu halkaya ait protonlar ve FTIR spektrumunda 3450 cm^{-1} de -OH, 3380 cm^{-1} de -NH, 1670 cm^{-1} de C=O bandlarının oluşması bileşiğimizin olduğunu doğrulamaktadır.



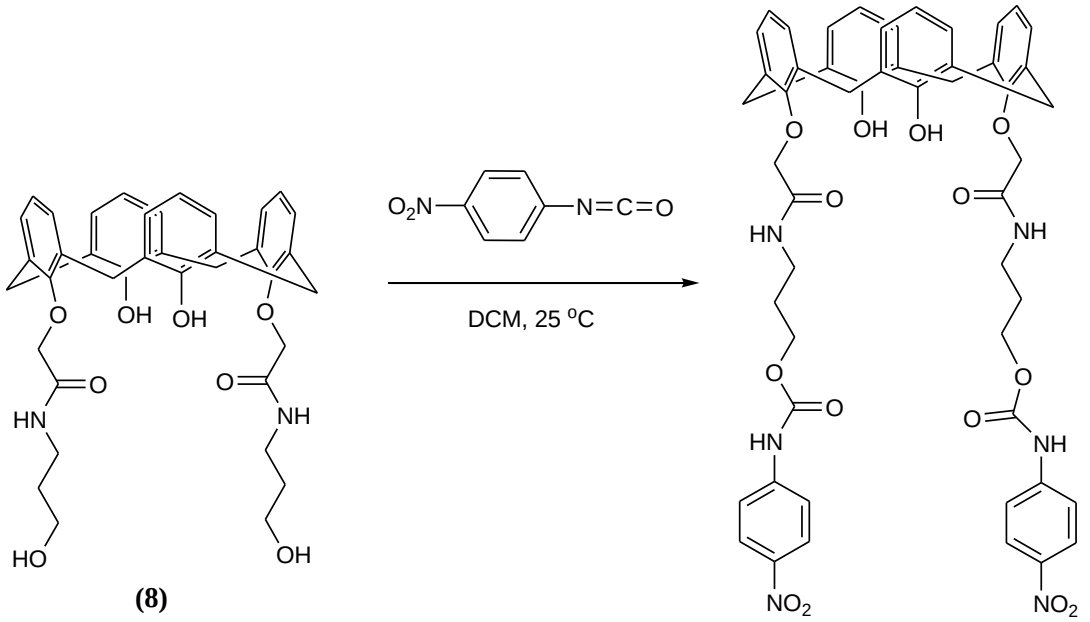
(2) **(7)**

Bileşik **7**, K_2CO_3 varlığında $BrCH_2CO_2CH_3$ ile Kaliks[4]arenin etkileşmesiyle literatüre göre (Unob, 1998) sentezlenmektedir. Bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumunda 3.88 ppm'de görülen metil grubuna ($-OCH_3$) ait sinyalin olması diester türevinin oluştuğu doğrulanmaktadır. Ayrıca FTIR spektrumunda 1758 cm^{-1} de C=O bandının görülmesi maddemizin sentezlendiğini doğrulamaktadır.



(7) **(8)**

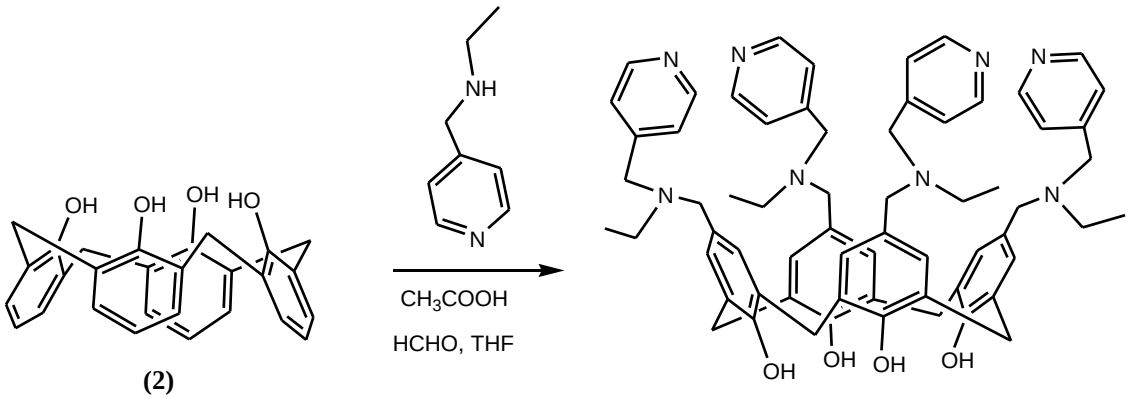
Bileşik **7** toluen/metanol ortamında 3-hidroksipropilamin ile tepkimeye sokularak bileşik **8** sentezlendi.Bu bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumunda 3.69 ppm'de görülen triplet piklerin -CH_2-N protonlarına ve 9.03 ppm' de görülen triplet piklerin ise amit (-NH) protonlarına aittir.Ayrıca FTIR spektrumunda 1661 cm^{-1} C=O pikinin görülmesi bileşiğinin olduğunu doğrulamaktadır.



(8) **(9)**

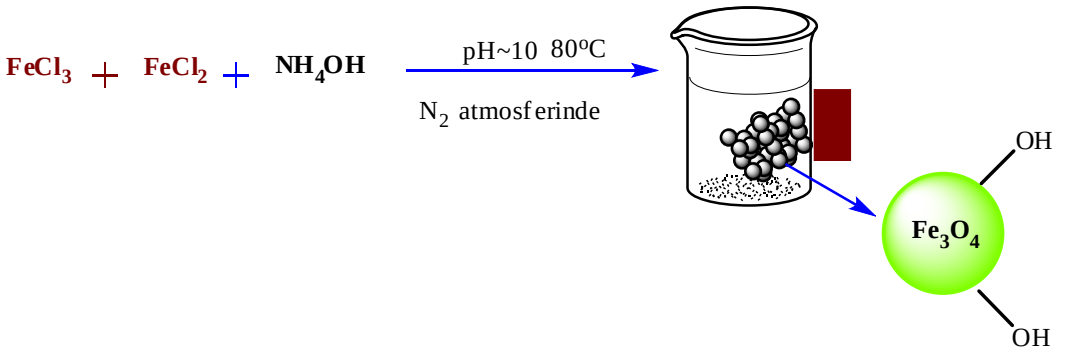
8 nolu bileşik 4-nitrofenilizosiyonat ile tepkimeye sokularak **9** nolu bileşik sentezlendi. Bu bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumunda 8.33 ppm'de nitro grubuna ait sinyallerin ve ^{13}C NMR spektrumunda 153.58 ppm karbamat(*C*=O) ve 168.35 ppm amit (*C*=O), piklerinin gözlemlenmesi bileşiğimizin oluştuğunu doğrulamaktadır.

Ayrıca FTIR spektrumunda 1734 cm^{-1} de karbamat, 1664 cm^{-1} de amit bandlarının oluşmasıyla bileşik doğrulandı.



(2) **(10)**

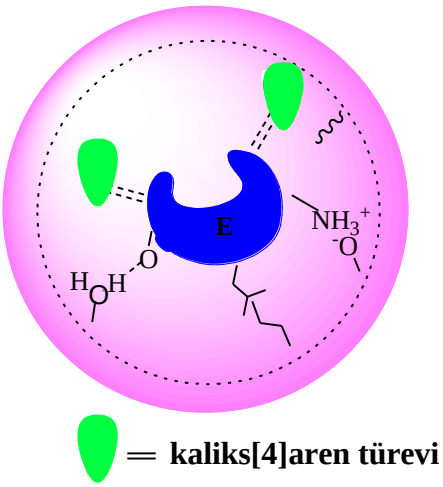
Bileşik **10** literatüre göre **(Mermer 2012)** sentezlendi. Bu bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumunda 1.02 ppm'de metil protonlarına ait 12 protonun gözlenmesi ve ^{13}C NMR spektrumunda pridin halkasına ait karbonların 149.47, 149.74 ppm'de gözlenmesi bileşik **10**' nun oluştuğunu doğrulamaktadır.



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

4.1. Sol-Jel Tekniğine göre Lipaz İmmobilizasyonu

Bu çalışmada kullanılan *Candida Rugosa* lipaz, sol-jel tutuklama metoduna göre Fe_3O_4 varlığında **5, 6, 9** ve **10** nolu bileşikler kullanılarak immobilize edildi. İmmobilize enzimin lipaz aktivitesi, spesifik aktivitesi ve aktivite verimi aşağıda verilen eşitliklerden hesaplandı.



Şekil 4.1. Sol-jel metodu ile lipaz immobilizasyonu gösterimi

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

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

$$\text{Aktivite verimi (\%)} = \frac{\text{Immobilize lipazin spesifik aktivitesi}}{\text{Serbest lipazin spesifik aktivitesi}} \times 100$$

Bileşik 5, 6, 9, ve 10 ile Fe_3O_4 nanopartiküllerinin varlığında lipaz aktivitesi

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
5	17.7	48	83	**4.7**
6	21.8	78	117	**5.4**
9	20.9	66	77	**3.7**
10	28.2	85	74	**2.6**

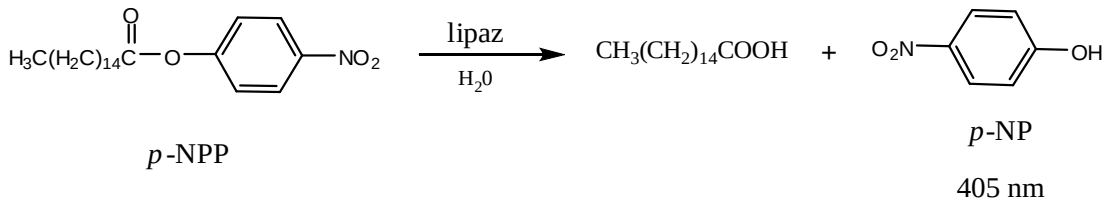
[a]Destek maddeleri kullanmadan tutuklanmış serbest lipaz

Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi immobilize bileşiklerin spesifik aktiviteleri kaliksaren türevlerinin kullamılmadığı zaman serbest enzimin 3,3 gözlenirken, **5** için 4.7, **6** için 5.4, **9** için 3.7 ve **10** için 2.6 olarak gözlendi. Bu sonuçlara baktığımızda 5, 6, nolu bileşikler $–NO_2$ grubu taşımakta ancak birbirine çok yakından benzememektedir. 5 nolu bileşik ayrıca tiyoüre grubu bulundurmaktadır. Bu grubun N-H protonlarının çok iyi hidrojen bağı yaptığı bilinmektedir. 6 nolu bileşikte hem $–NO_2$ hem de pridil halkası bulundurmaktadır. Ayrıca nitro grubunun bağlı olduğu halka kaliks[4]aren birimine –NH- grubu ile bağlıdır. Özellikle bu yapının çok iyi kompleks yapabileceği görülmektedir. Lipaz enziminin –COOH, -SH ,imidazol ve lisin grupları ile kompleksleşerek enzimin konformasyonunun korunmasında ve aktivitesinin artırılmasına yardımcı olabilecektir. 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 gruplarla 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. Diğer kaliksaren türev (9) bunun için daha az uygun bir türev iken, (10) ise kısmen suda çözündüğünden etkili olmamıştır ve enziminin aktif merkezlerini ve konformasyonunu daha iyi korumadığını göstermektedir.

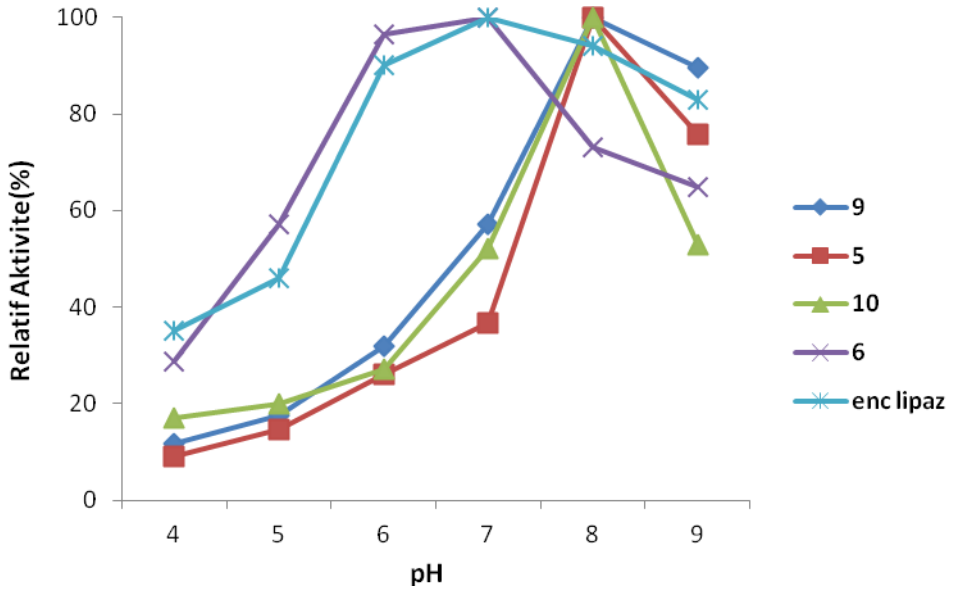
Optimum pH

Enzim aktivitesinde pH'ın büyük bir 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 gözlemlemek amacı ile farklı pH'larda (pH=4-9) gerçekleştirilen tepkimelere ait relatif aktivite değerlerinin pH ile değişim grafiği çizildi. Bu çalışmalarda hidrolitik aktivite tayini pH=7.0 de *p*-nitrofenilpalmitatın hidrolizi ile gerçekleştirildi. Hidroliz sonucu oluşan *p*-nitrofenol'ün miktarı spektrofotometrik tayin edilerek enzimin aktivitesi hesaplandı Serbest lipazın optimum pH'sı 7.0 olarak bulundu (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. *p*-Nitrofenilpalmitatın hidrolizi

Grafik incelendiğinde **6** nolu bileşiğin optimum pH'ı 7.0 iken, **5, 9** ve **10,** nolu bileşiklerin optimum pH'ı 8.0 olarak bulundu (Şekil 4.3).



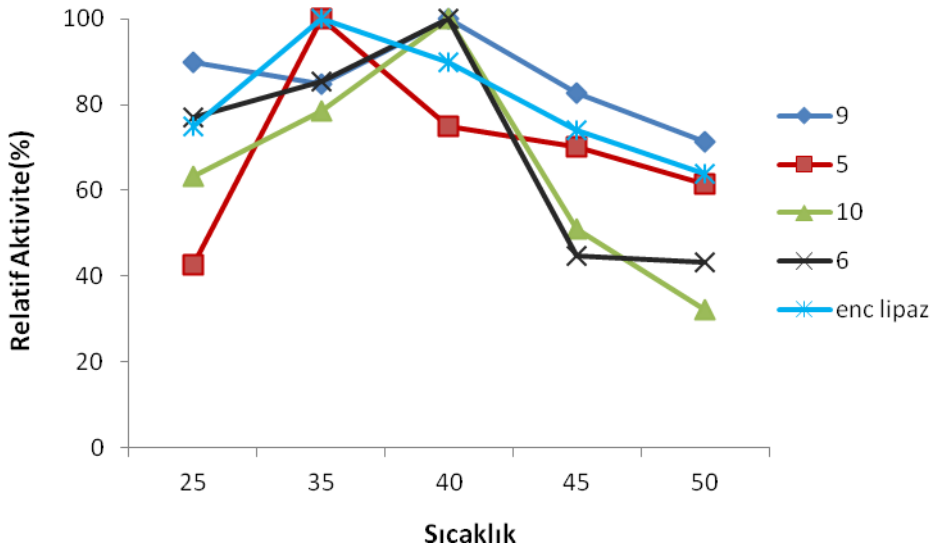
Şekil 4.3. 9, 10, 6 ve 5 nolu bileşikleri için lipaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

İmmobilizasyon ile pH'ın farklılık göstermesi lipazın konformasyonundaki değişiklik, kullanılan polimerin yapısı, immobilizasyon metodu ve lipaz yüzeyindeki yük yoğunluğu ile ilgili olduğunu söyleyebiliriz (Liu, 2005; Wu, 2006).

Optimum sıcaklık

Serbest ve immobilize edilen lipazların aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisinin ne olduğunu incelemek amacı ile farklı sıcaklık değerlerinde (25–50^{o}C), 50 mM fosfat tamponunda (pH 7,0) 20-25 dk aralıklarla serbest ve immobilize enzimin aktiviteleri ölçülerek optimum sıcaklık değerleri belirlendi. Aktivite ölçümleri pH 7'de gerçekleştirilip serbest lipazın optimum sıcaklığı 35°C olarak bulundu.

Grafik incelendiğinde **5** nolu bileşik için optimum sıcaklık 35^{o}C iken, **6, 9, 10,** nolu bileşik için 40^{o}C olarak bulundu. Bu sonuçlar 6, 9, 10 bileşiklerinin yüksek sıcaklıkta enzimin aktivitesinin korunmasını sağlamıştır. (Şekil 4.4).



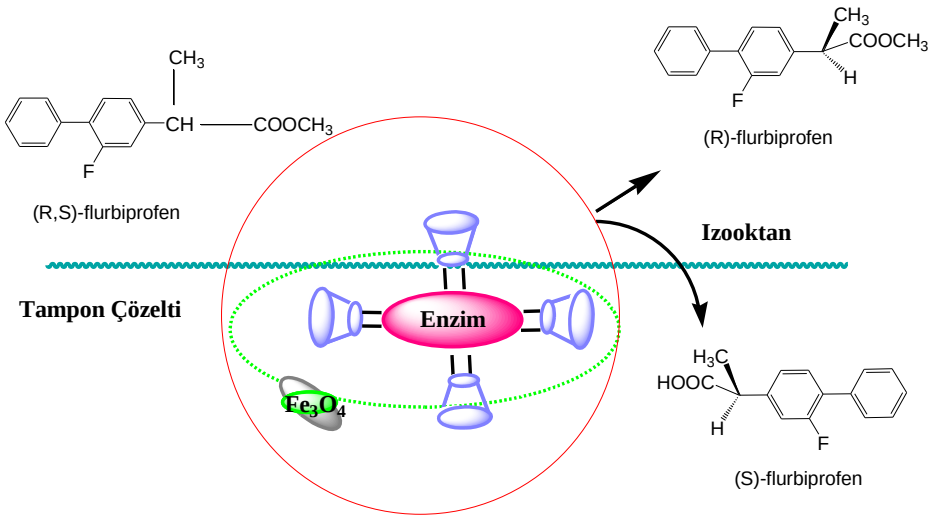
Şekil 4.4. 5, 6, 9 ve 10 nolu bileşikleri için lipaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

4.2. İmmobilize Lipazların Enantiyoseçimli Tepkimelerde Kullanılması

Sol-jel tutuklama metoduna göre immobilize edilen lipazların enantiyoseçimlilik oranını belirlemek için hazırlanan **5, 6, 9** ve **10** bileşikleri ile rasemik Flurbiprofen metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizi yapıldı.

Tepkime HPLC ile izlendi, elde edilen maddelerin enantiyomerik kompozisyon analizi ve enantiyomerik fazlalıkları (%ee) yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde (HPLC) kiral kolonlar ile belirtildi. 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.

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



Şekil 4.5. (R/S)-flurbiprofen metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizi

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

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

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 immobilize lipaz kullanarak rasemik flurbiprofen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizi

	***X* (%)**	***ee*$_s$ (%)**	***ee*$_p$ (%)**	***E***
Lipaz$_{tut}$	36	56	>98	174
5 (pH=8)	40	67	>98	199
5 (pH=7)	35	53	>98	168
6 (pH=8)	46	85	>98	270
6 (pH=7)	40	67	>98	199

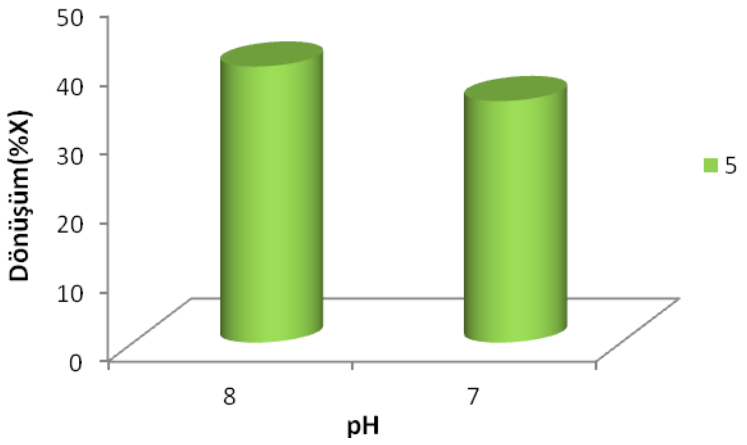
9 (pH=8)	43	75	>98	224
9 (pH=7)	39	65	>98	194
10 (pH=8)	33	49	>98	161
10 (pH=7)	28	39	>98	145

Çizelge 4.2'de görüldüğü gibi serbest enzimin enantiyoseçimliliği (E) 174 olarak gözlenirken, bileşik **5**, **6**, **9** ve **10** için optimum pH=8 ve pH=7' de enantiyoseçimlilikleri (E) ayrı ayrı belirtildi. Bu sonuçlara baktığımızda pH=8 de en iyi sonucu bileşik **6** da alırken en kötü sonucu bileşik **10** da aldık. Bunun sebeblerinden birisi **10** nolu bileşik kısmen suda çözündüğünden yeteri kadar enkapsilasyon ortamında kalamamaktadır diğeri ise bu bileşiğin enzimin aktif merkezlerine bağlanması ile aktivitesini düşürmesidir. Bunlardan dolayı bileşik **10** nun katkı materyali olarak kullanıldığı immobilize lipaz en düşük enantiyoseçimliliğini göstermiştir.

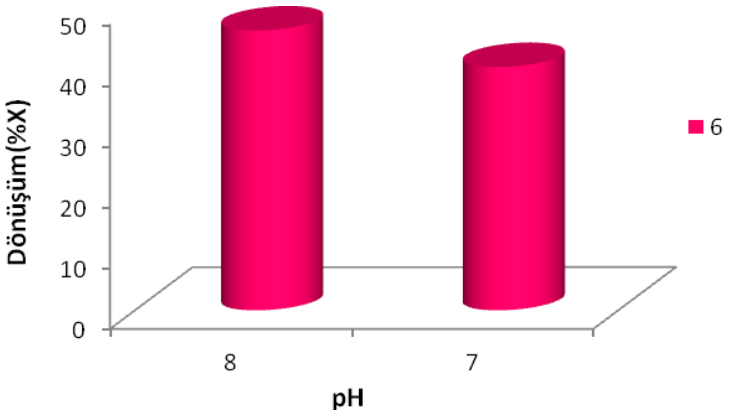
Farklı pH ve sıcaklıklarda dönüşümler

(R,S)-flurbiprofen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizi pH=7 de ve optimum pH (pH=8) da farklı katkı maddeleri varlığında (**5, 6, 9, 10)** tutuklanmış lipazlar ile inkübe edilerek belirlendi.

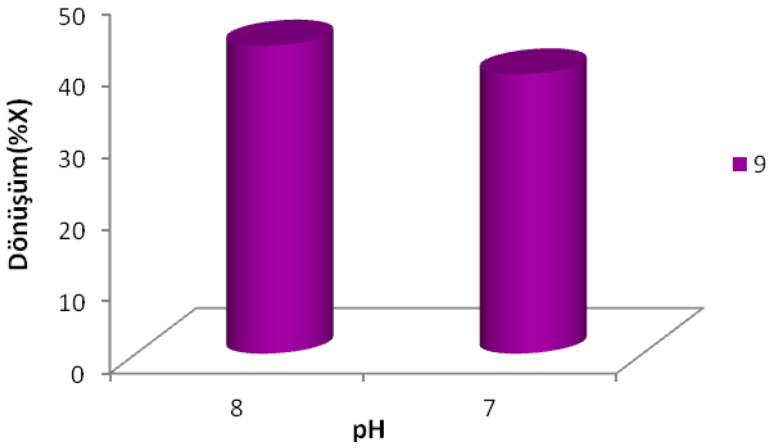
Bu şekilde tutuklanmış lipazlar pH=8'de en yüksek enantiyoseçimlilik ve dönüşüm gösterdi.



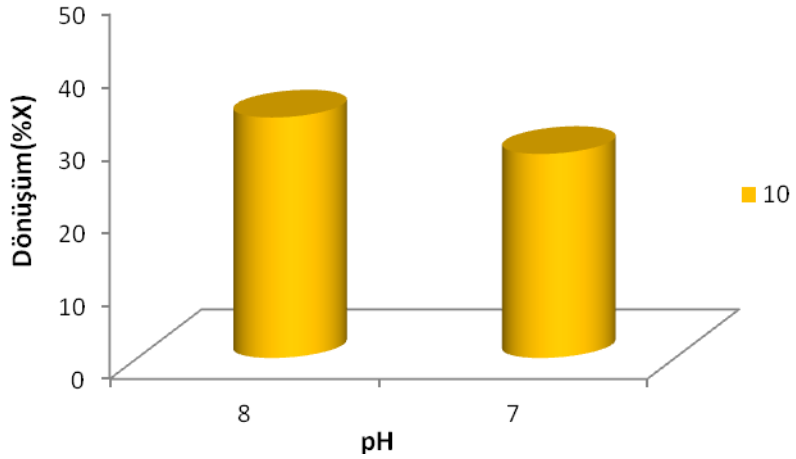
Şekil 4.6. 5 nolu bileşik için (R,S)- flurbibrofen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde dönüşüme karşı pH'nın etkisi



Şekil 4.7. 6 nolu bileşik için (R,S)- flurbibrofen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde dönüşüme karşı pH'nın etkisi



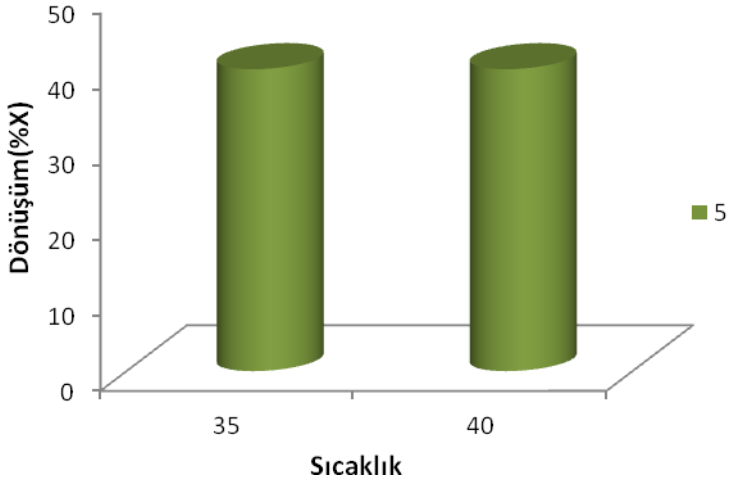
Şekil 4.8. 9 nolu bileşik için (R,S)- flurbibrofen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde dönüşüme karşı pH'nın etkisi



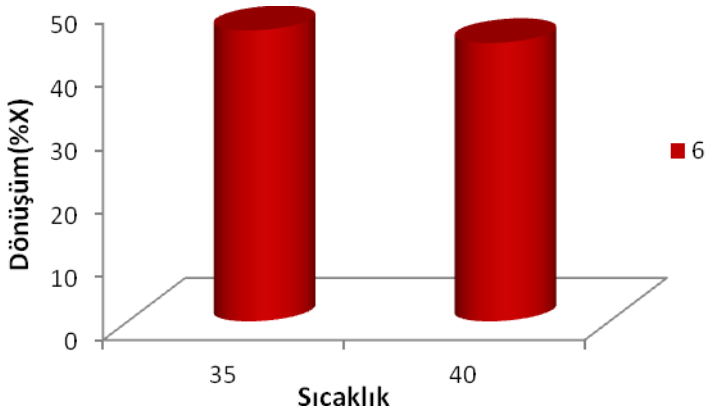
Şekil 4.9. 10 nolu bileşik için (R,S)- flurbibrofen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde dönüşüme karşı pH'nın etkisi

(R,S)- flurbibrofen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizi farklı sıcaklıklarda (35^{o}C, 40^{o}C) farklı katkı maddeleri varlığında tutuklanmış lipazları inkübe ederek belirlendi.

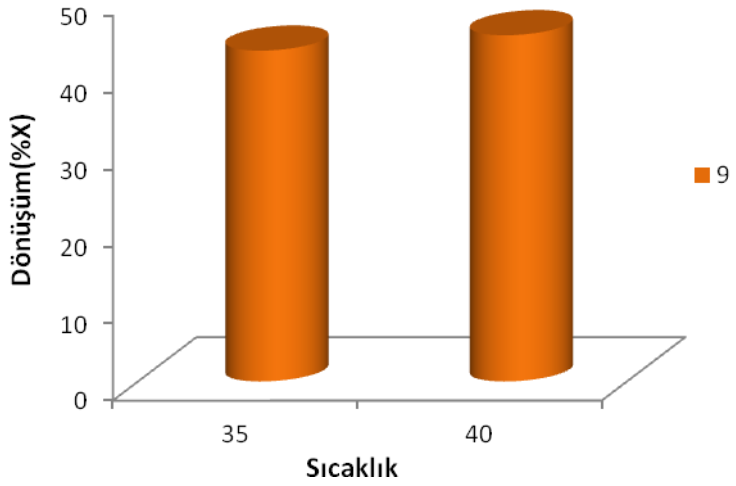
Optimum sıcaklık değerleri enantiyoseçimli hidroliz çalışmalarında en iyi dönüşüm ve enantiyoseçimlilik, **5** nolu bileşik için 35^{o}C ve 40^{o}C sıcaklıkta aynı dönüşüm olurken, **6** nolu bileşik için 35^{o}C, **9** ve **10** nolu bileşikler için 40^{o}C olarak bulundu.



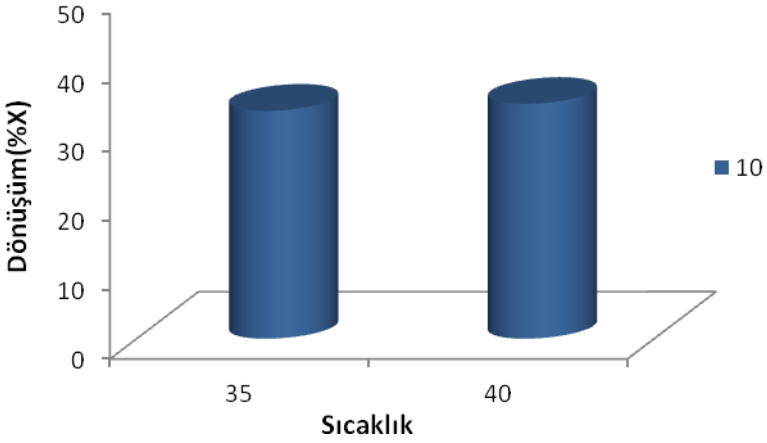
Şekil 4.10. 5 nolu bileşik için (R,S)- flurbiprofen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde dönüşüme karşı sıcaklığın etkisi



Şekil 4.11. 6 nolu bileşik için (R,S)- flurbiprofen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde dönüşüme karşı sıcaklığın etkisi



Şekil 4.12. 9 nolu bileşik için (R,S)- flurbiprofen metil esterin hidrolizin dönüşümüne karşı sıcaklığın etkisi



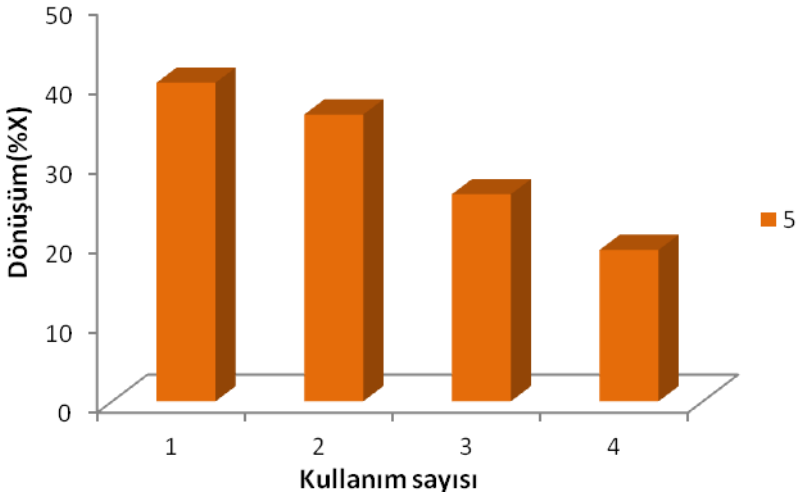
Şekil 4.13. 10 nolu bileşik için (R,S)- flurbiprofen metil esterin hidrolizin dönüşümüne karşı sıcaklığın etkisi

Tekrar kullanılabilirlik

İmmobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği endüstriyel uygulamaları açısından çok önemli bir durum haline gelmiştir. Böylelikle immobilize enzimin bu şekilde tekrar kullanılabilirliği serbest enzime göre daha cazip kılmaktadır. Pridil ve nitro grubu taşıyan kaliks[4] aren türevlerinin (**5, 6, 9, 10**), tutuklanmış lipazların tekrar

kullanılabirlikler belirtmek için 35^{o}C ‘de optimum pH’larda denemeler yapıldı. Tekrar kullanılabilirlik, immobilize lipazların ilk kullanımdan sonra 3 kez (pH 8.0) fosfat tamponu ile yıkanıp tekrar aktivitesine bakılarak yapıldı.

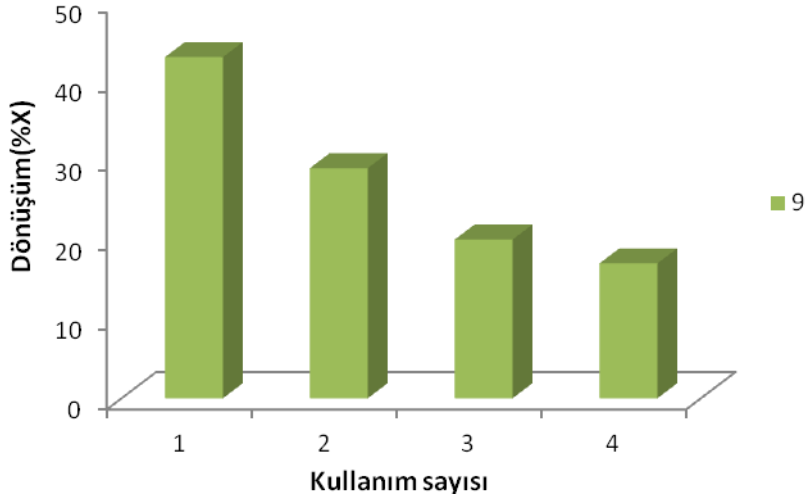
İmmobilize lipazların 4 kullanımdan sonra dönüşümü, **5** nolu bileşik için pH=8’de % 19, **6** nolu bileşik için pH=8’de % 25, **9** nolu bileşik için pH=8’de % 17, **10** nolu bileşik için pH=8’de % 13 olduğu görüldü.



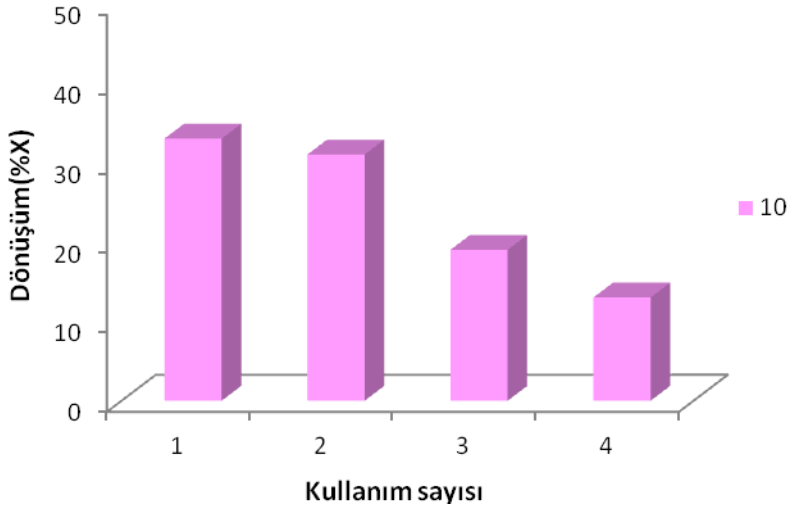
Şekil 4.14. 5 nolu bileşiğin pH=8’de tekrar kullanımı



Şekil 4.15. 6 nolu bileşiğin pH=8’de tekrar kullanımı



Şekil 4.16. 9 nolu bileşiğin pH= 8'de tekrar kullanımı



Şekil 4.17. 10 nolu bileşiğin pH= 8'de tekrar kullanımı

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- Bu çalışmada, Pridil ve nitro grubu taşıyan kaliks[4] aren türevlerinin (bileşik **5, 6, 9, 10**) sentezi yapıldı.
- Bu çalışmada nitro ve piridin gruplarının etkisinin lipaz katalizli enantiyoseçimli tepkimedeki etkilerini anlamak için, nitro, piridin ve her iki grubu bulunduran kaliks[4]aren türevleri sentezlendikten sonra foksiyonlu kaliks[4]arenler Fe_3O_4 varlığında lipaz immobilizasyonunda kullanılarak bir rasemik profen türü olan flurbiprofen metil esterinin enantiyoseçimli tepkimelerinde kullanıldı.
- Sentezlenen nitro, piridin ve her iki grubu bulunduran kaliks[4]aren türevlerinin yapıları spektroskopi teknikler kullanılarak aydınlatıldı.
- Tutaklanan lipazların rasemik flurbiprofen metil esteri ile enantiyoseciçi tepkimelerinde kullanıldılar.
- HPLC tekniği kullanılarak % dönüşüm (X) ve enantiyoseçimlilik (E) değerleri hesaplandı.
- Tutuklanmış kaliksaren türevlerinin optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri belirlendi.
- Bu çalışmada bileşik 5, 9 ve10' nun optimum pH'ı 8 bulunurken bileşik 6'nın pH' ı 7 olduğu tespit edildi.
- Bu çalışmada bileşik 6, 9 ve10' nun optimum sıcaklıkları 40 ^oC iken bileşik 5' in 35 ^oC olduğu tespit edildi.
- Bu çalışmada kaliks[4]arenin türevi (bileşik 6), pH=8 ve 35 ^oC'de en yüksek dönüşüm ve enantiyoseçimlilik gösterdiği anlaşıldı
- Optimum pH ve sıcaklıklarda yapılan tutuklanmış lipazların tekrar kullanılabilirlikleri incelendi.

KAYNAKLAR

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

Akkuş, U.G., Memon, S., Sezgin, M. and Yılmaz, M., 2009, Synthesis of calix(aza)crown and its oligomeric analogue fort he extraction of selected metal cations and dichromate anions. Clean, 37, 109-114.

Akoz, E., Sayın, S., Kaplan, S., Yılmaz, M., 2015, *Bioprocess Biosyst Eng*., 38, 595-604.

Alekseeva, E.A., Bacherikov, V.A. and Gren, A.I. 2000. Synthesis of *p-tert*-butyl calix [4]arene derivatives containing amino acid residues. *Russ. J. Gen. Chem*. 70, 490-492.

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

Baeyer, A., 1872, Ueber die verbindungen der aldehyde mit den phenolen und aromatischen kohlenwasserstoffen. *Ber. dtsch. chem. Ges*., 5, 1094-1100.

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.

Bender, M., Komiyana, L., 1978, Cyclodextrion chemistry, *Springer*, New York.

Bender, M. L.; Komiyama, M., 1978, Cyclodextrin chemistry, *Springer Verlag*, Berlin.

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.

Bozkurt, S., Durmaz, M., Yilmaz, M., Sirit, A., 2008, Calixarene-based chiral phase-transfer catalysts derived from cinchona alkaloids for enantioselective synthesis of α-amino acids, *Tetrahedron Asymm*., 19, 618-623.

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.

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.

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.

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.

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.

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

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.

Erdemir, S., Yilmaz, M., 2010, Preparation of a new 1,3-alternate-calix[4]arene-bonded HPLC stationary phase for the separation of phenols, aromatic amines and drugs, *Talanta*, 82, 1240-1246.

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.

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.

Gutsche, C.D., 1990. Single step synthesis and properties of calixarenes. Eds., Vicens, J., Böhmer, V., Calixarenes: a versatile class of macrocyclic compounds. *Topics in Inclusion Science*, 3, 3-37.

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

Hench, L. L. and West, J. K., (1990), The sol-del process, *Chemical Review*, 90, 33–72.

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.

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.

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

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.

Liu X., Guan, Y., Shen R., Liu H., *Journal of Chromatography B*, 822, 91–97.

Memon, S., Uysal, G. And Yılmaz. M., 2001, Syntheses and binding properties of polymeric calix[4]crown-4. *React. Funct. Polym*., 47, 165-174

Mermer, Ö., Okur, S., Sümer, F., Özbek, C., Sayin, S. and Yilmaz, M. 2012. Gas Sensing Properties of Carbon Nanotubes Modified with Calixarene Molecules Measured by QCM Techniques. *Acta Physica Polonica A*, 121, 240-242.

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

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

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.

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

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

Sahin, O. and Yilmaz, M., 2012, Synthesis and fluorescence sensing properties of a new naphthalimide derivative of calix[4]arene. *Tetrahedron Lett*., 53, 2319-2324.

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.

Sayin, S., Akoz, E., Yılmaz, 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. *Org. Biomol. Chem*., 12, 6634-6642

Sayin, S. and Doğan, V., 2015. Synthesis and properties of novel magnetic nanoparticles grafted with nitropyridine-substituted calix[4]arene derivative as Cr^{6+} extractant. *Turk. J. Chem*., 39, 130-138.

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., 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.

Sayın, S., 2008, Flavin grubu taşıyan calix[4]arene türevinin sentezi, Yüksek Lisans Tezi, *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Afyonkarahisar.

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.

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

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

Szejtle, J., 1988, Cyclodextrin technology, topics in inclusion science, *Kluwer Academic Publishers Dordrecht*, Vol. 1.

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.

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, 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.

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.

Unob, F., Asfari, Z. and Vicens, J. 1998. An Anthracene-Based Fluorescent Sensor for Transition Metal Ions Derived From Calix[4]arene. *Tetrahedron Lett*., 39, 2951–2954.

Wu J.C., Selvam V., Teo H.H., Chow Y., Talukder M.M.R., and Choi W.J.,*Biocatalysis and Biotransformation,* 24(5), (2006) 352-357.

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

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

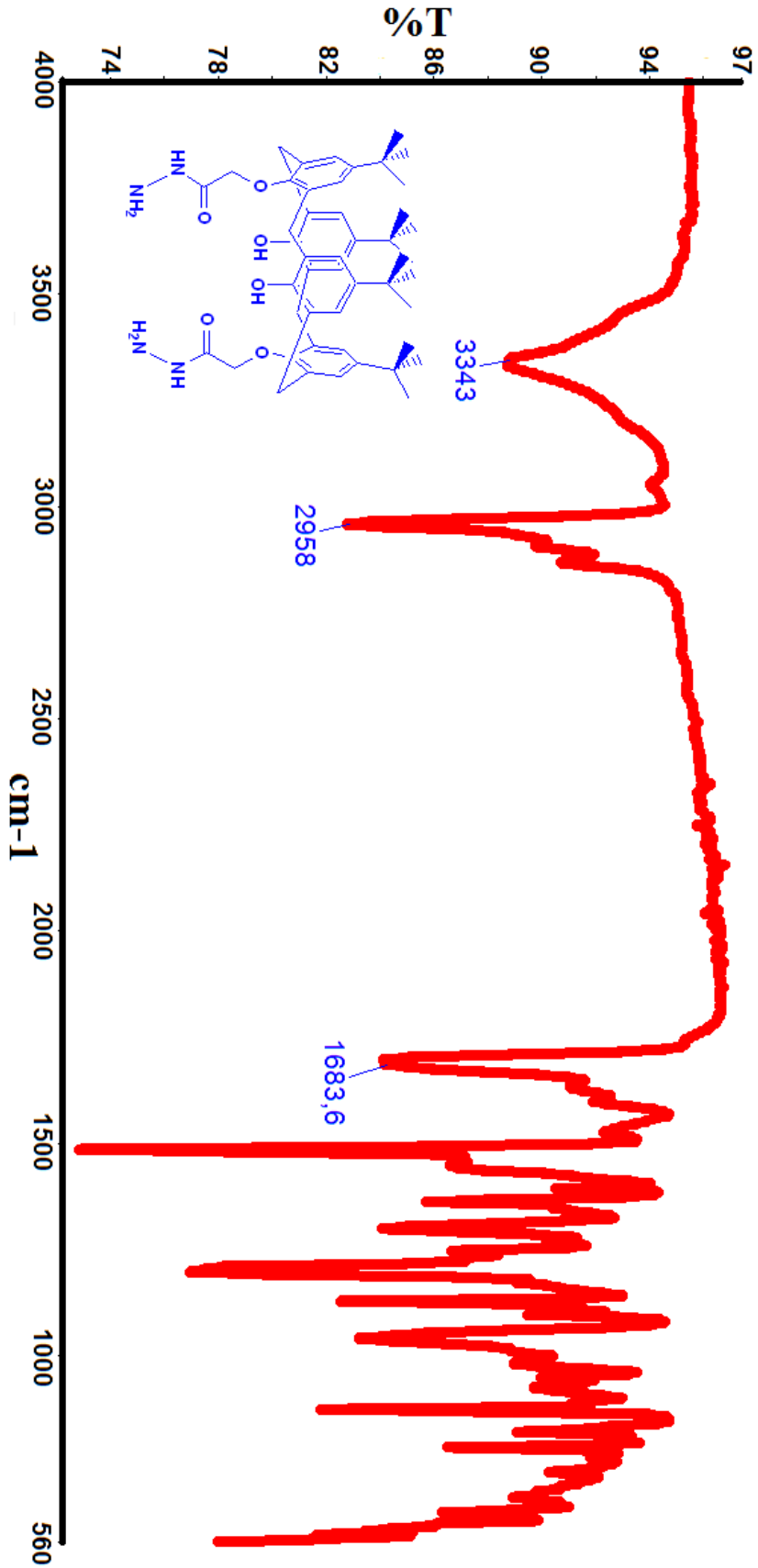
Ozyilmaz, E., Sayin, S., 2013,A magnetically separable biocatalyst for resolution of racemic naproxen methyl ester, *Bioprocess Biosyst Eng*., 36, 1803-1806

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

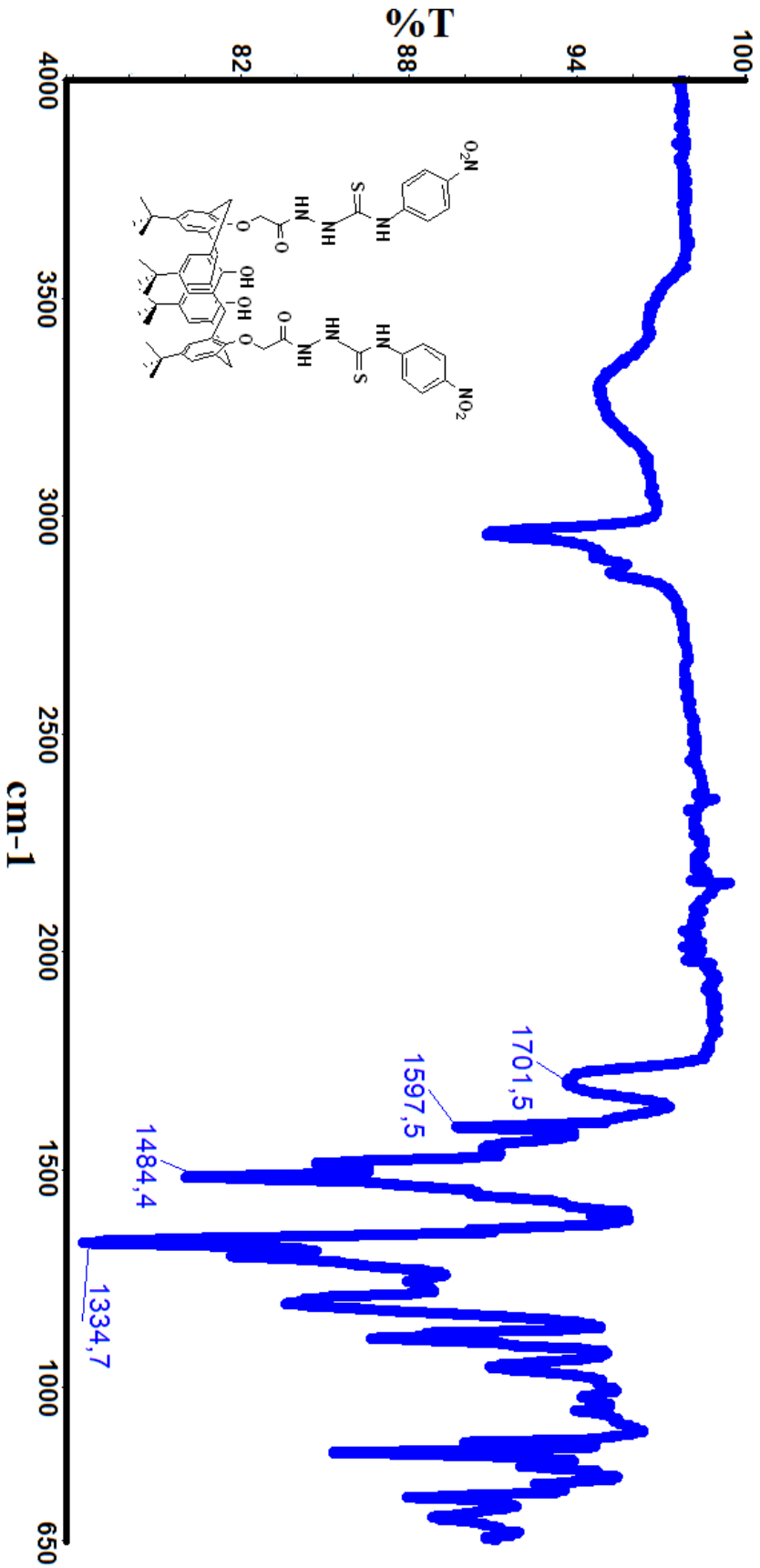
Zinke, A., Ziegler, E., Berlin, 1944., Zur kenntnis des hartungs-prozesses von phenol-formaldehyd-harzen, *X. Mitteilung, Ber*.Dtsch. Chem. Ges., 77 (B), 264-72.

EKLER

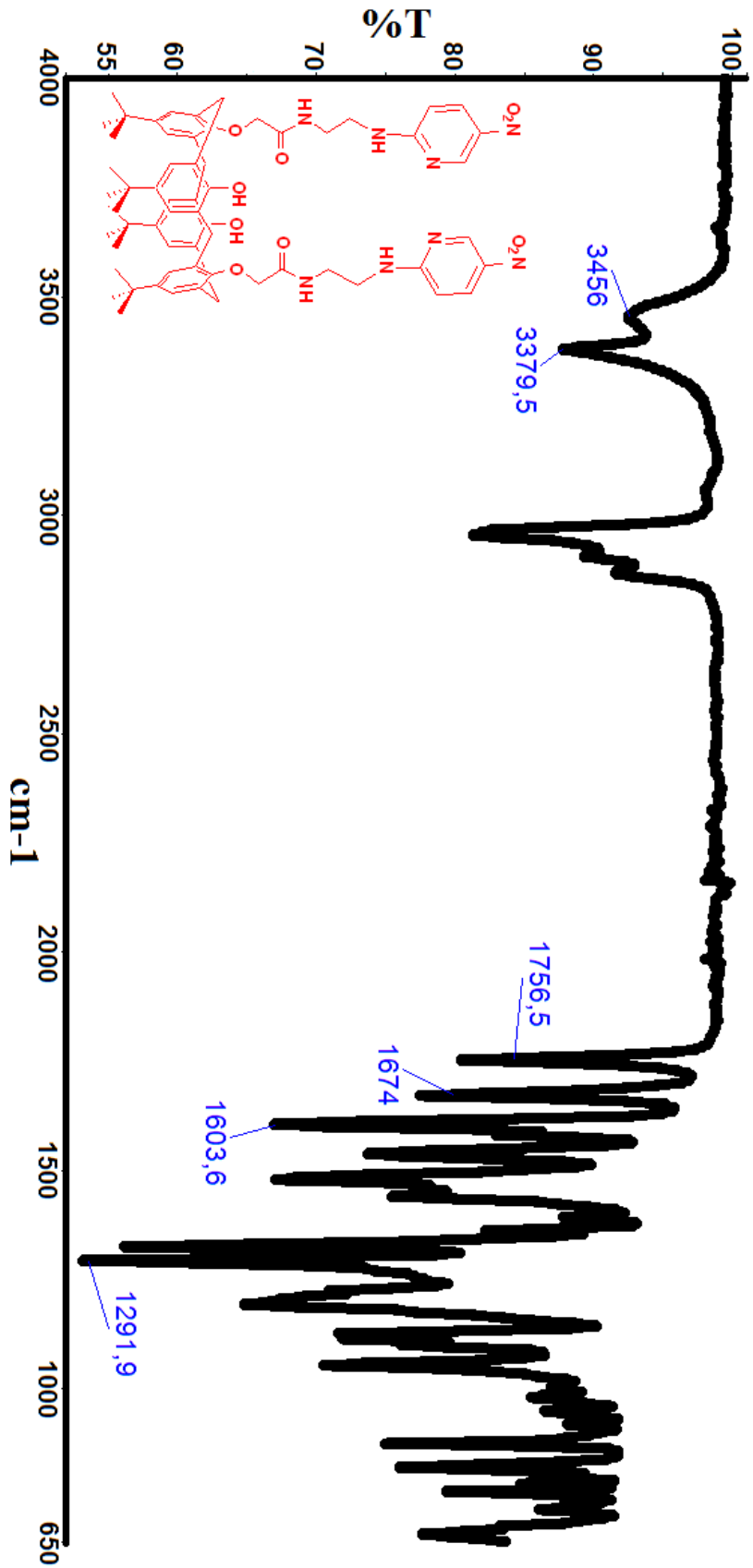
SENTEZLENEN BİLEŞİKLERİN FTIRVE NMR SPEKTRUMLARI



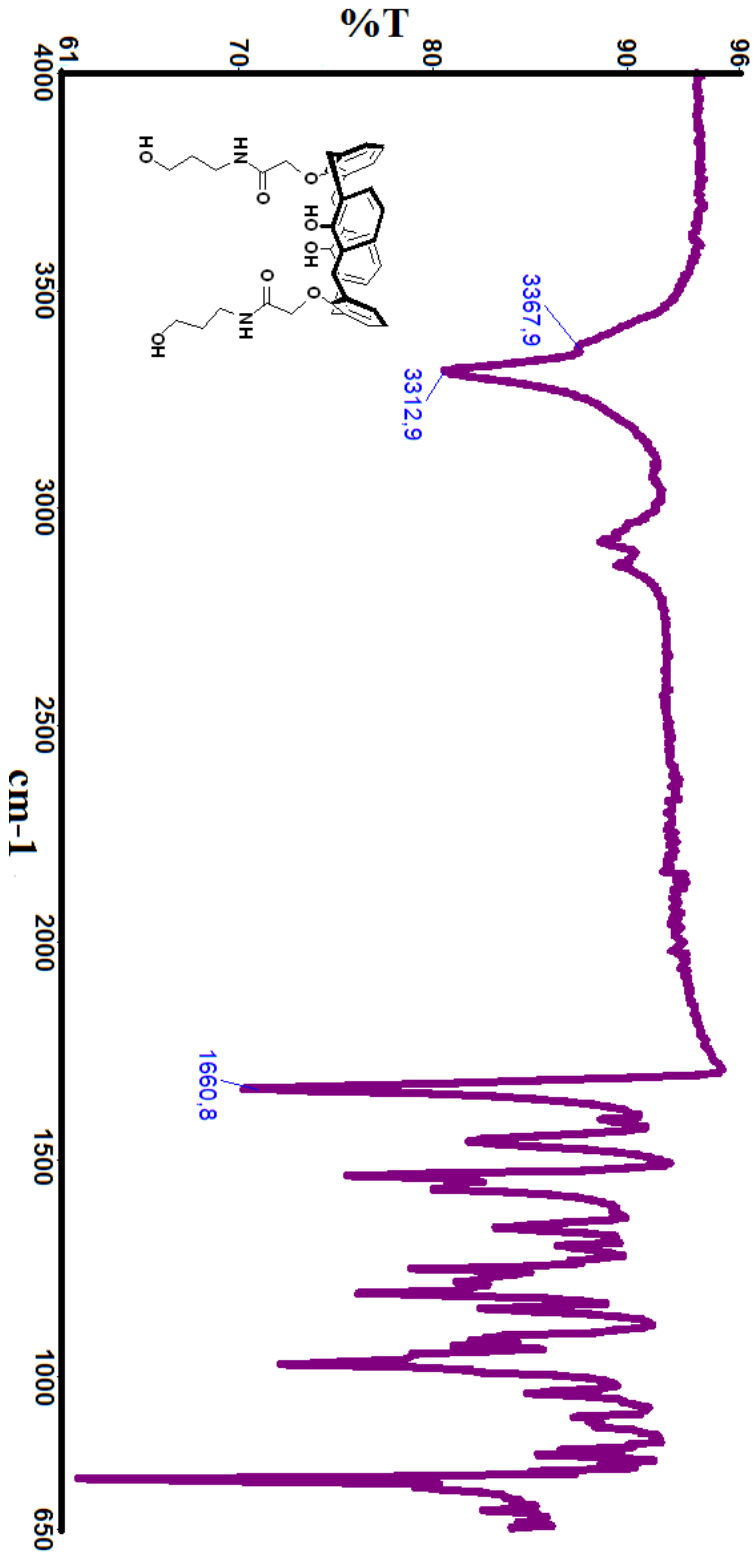
EK-1. 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,27-dihidrazinamitkarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi-kaliks[4]aren **(4)**' in FTIR spektrumu



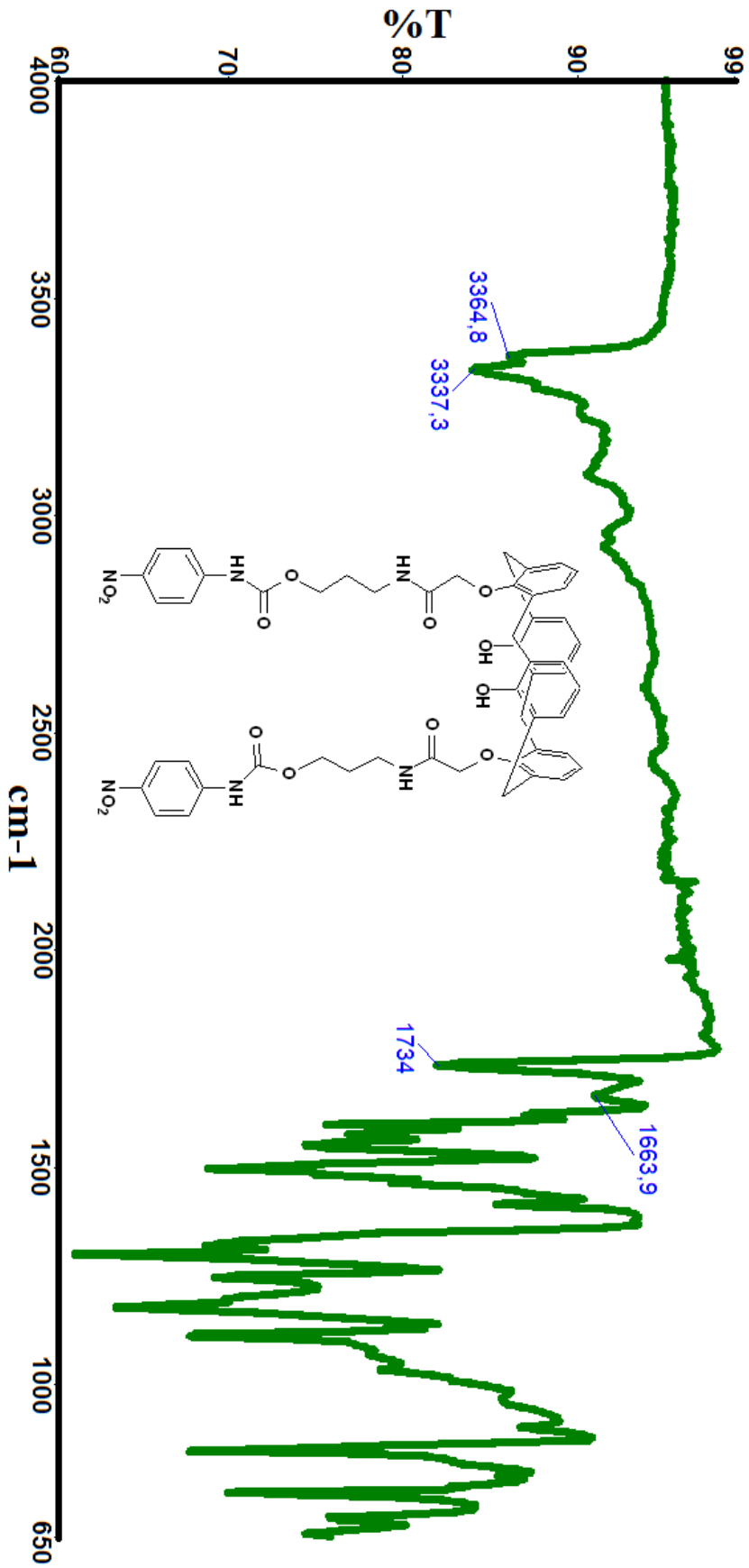
EK-2. 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,27-(4-(4-nitrofenil)-1-ditiyosemikarbazit)karbonilmetoksi-26,28-dihidroksi-kaliks[4]aren **(5)**' in FTIR spektrumu



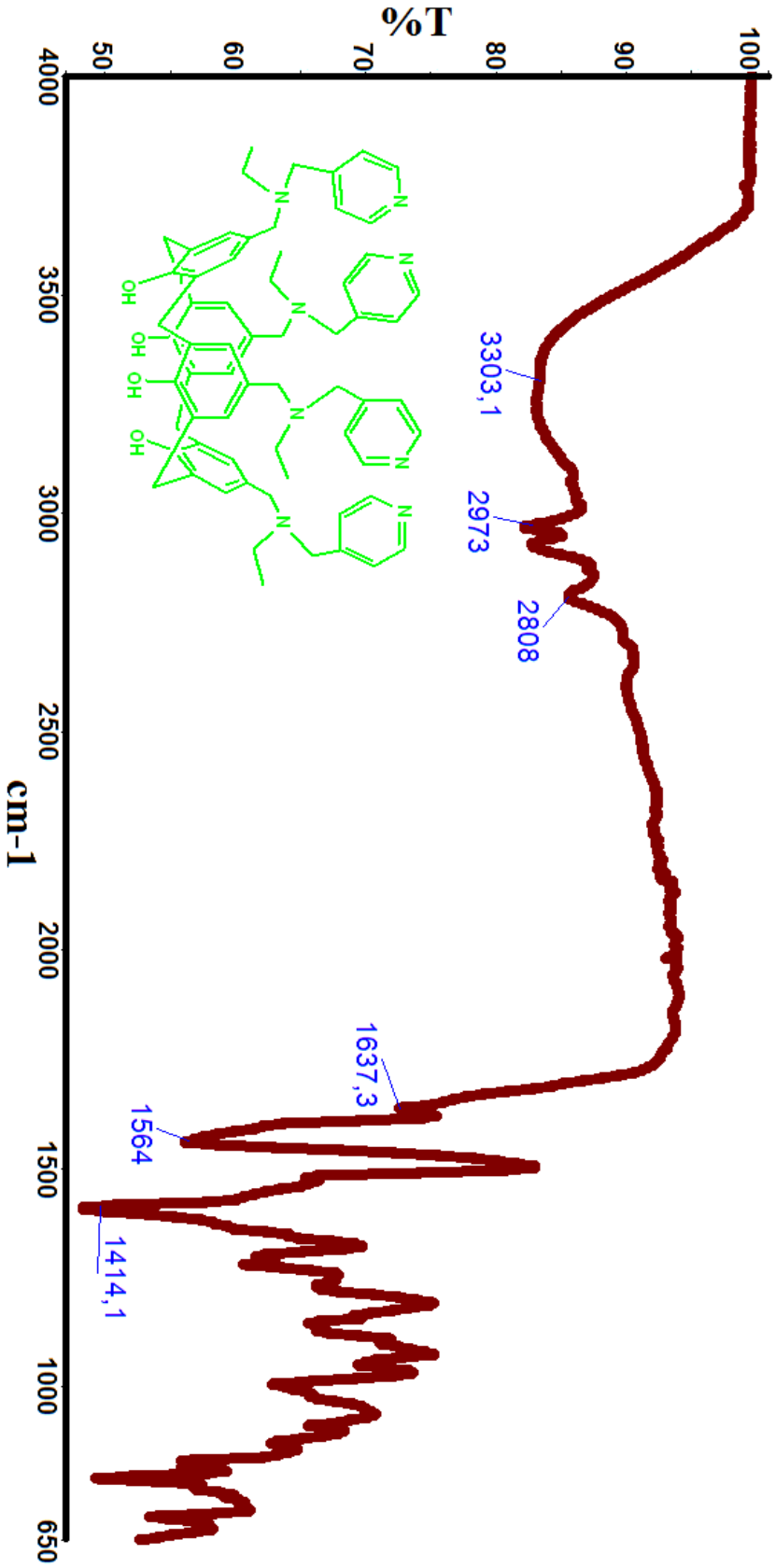
EK-3. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,27-bis(2-nitropiridil-2-ilamin)etilaminkarbonil-metoksi)-26,28-dihidroksikaliks[4]aren **(6)**' in FTIR spektrumu



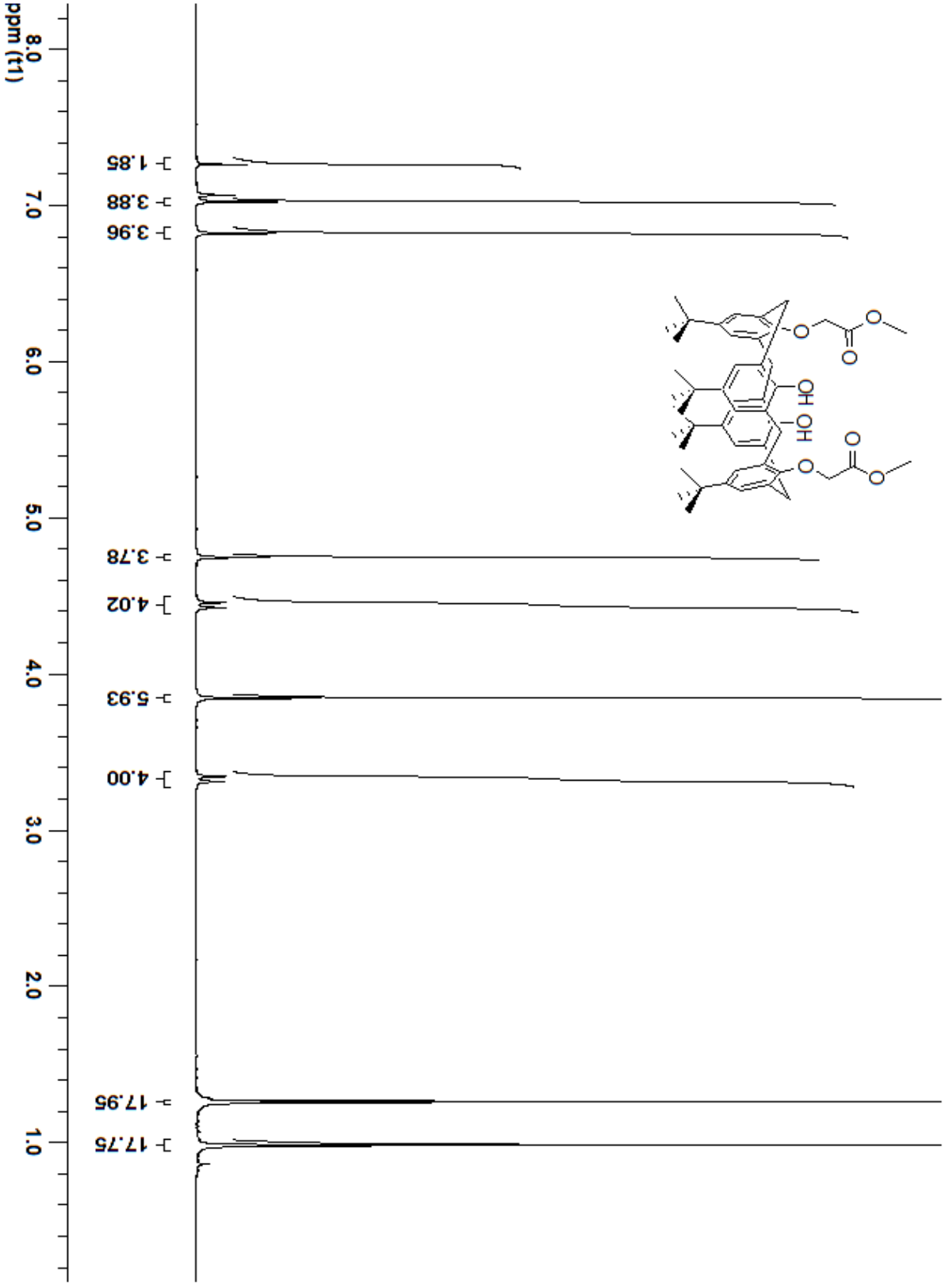
EK-4. 25,27-Bis(3-hidroksipropil)amitkarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi-kaliks[4]aren **(8)**' in FTIR spektrumu



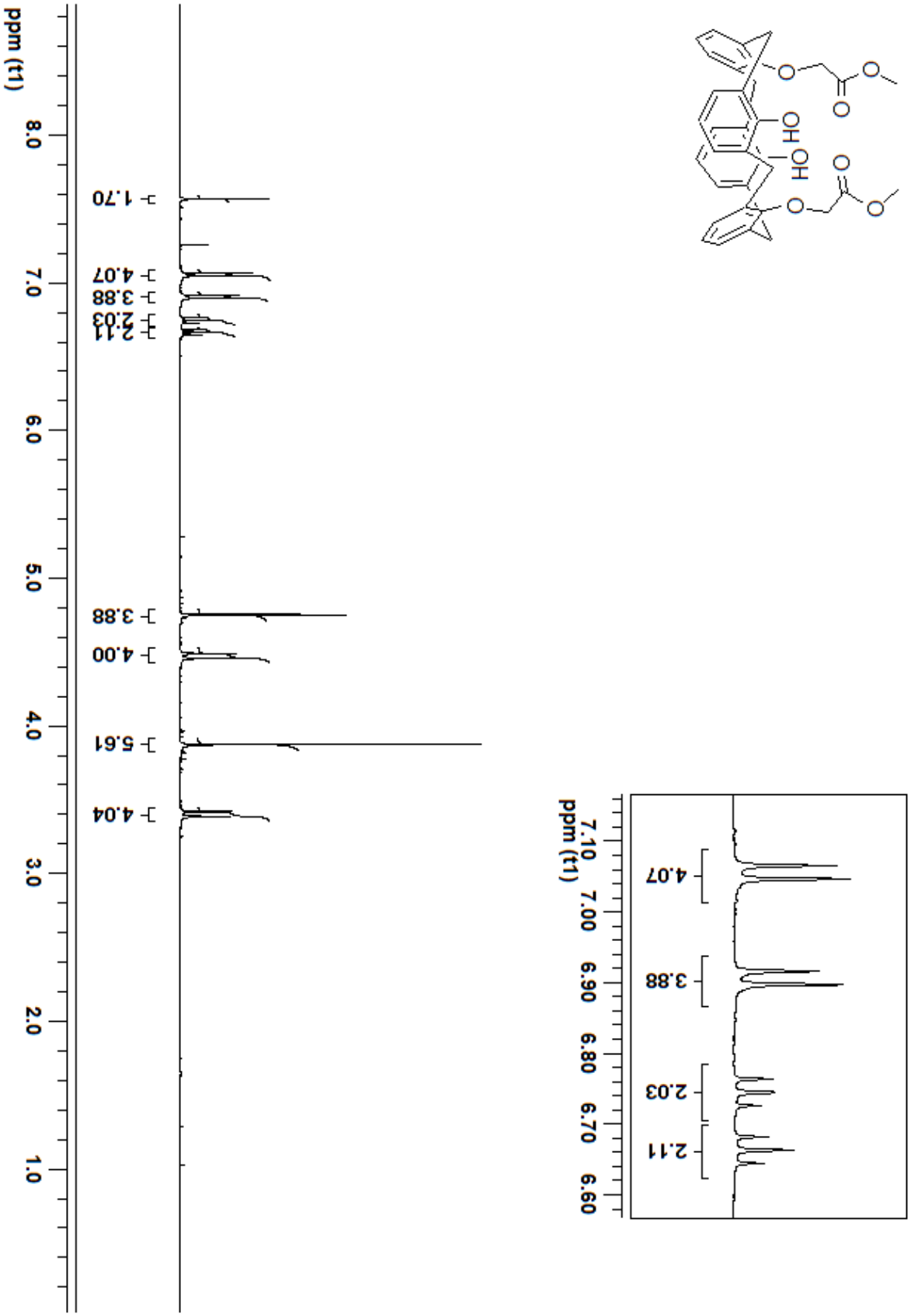
EK-5. 25,27-Bis(3-(*p*-nitrofenilkarbamat)propil)amitkarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi-kaliks[4]aren **(9)**' in FTIR spektrumu



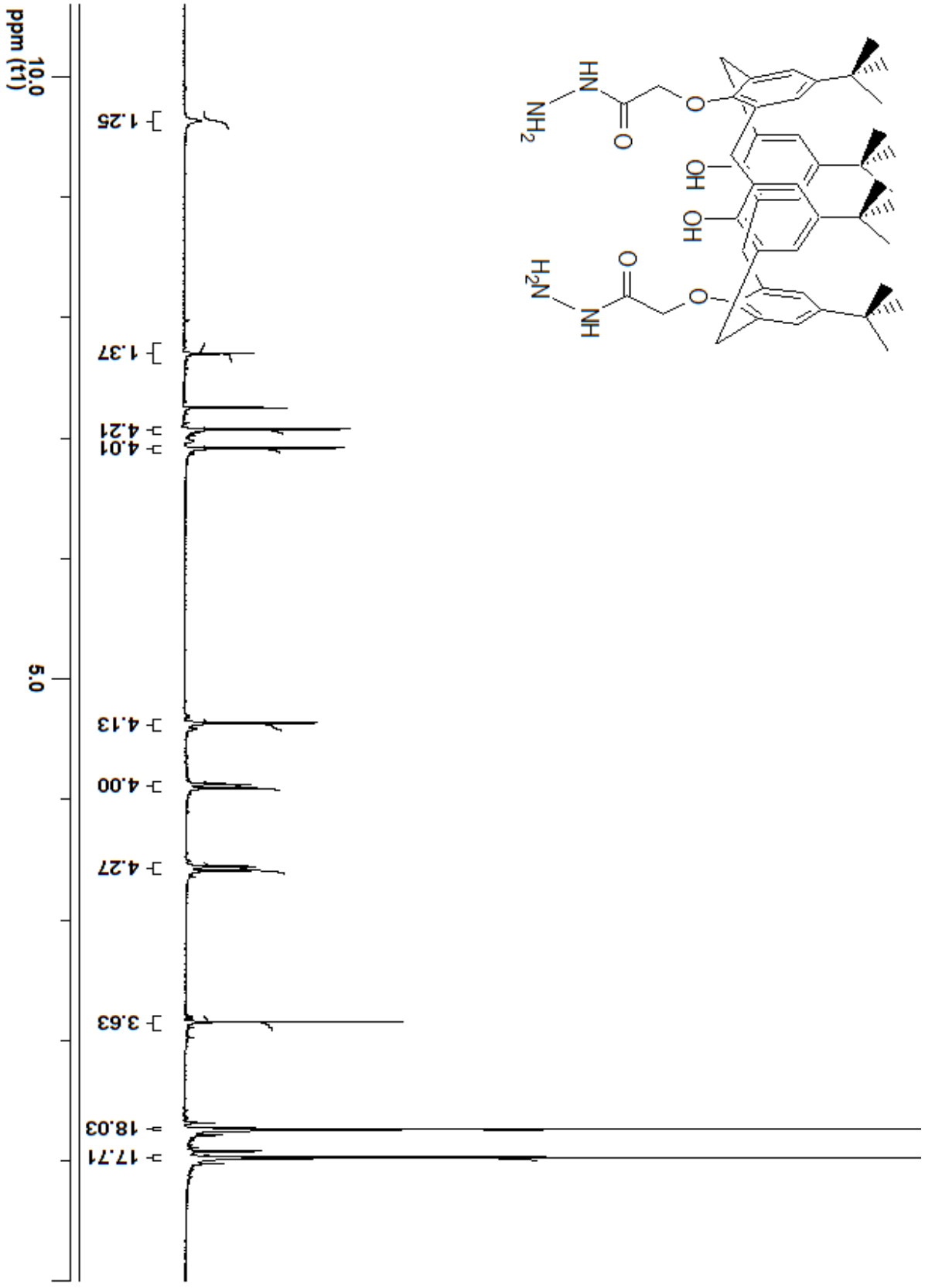
EK-6. 5,11,17,23-Tetra-4-(etilaminometil)piridil-25,26,27,28-tetrahidroksi kaliks[4]aren (**10**)' un FTIR spektrumu



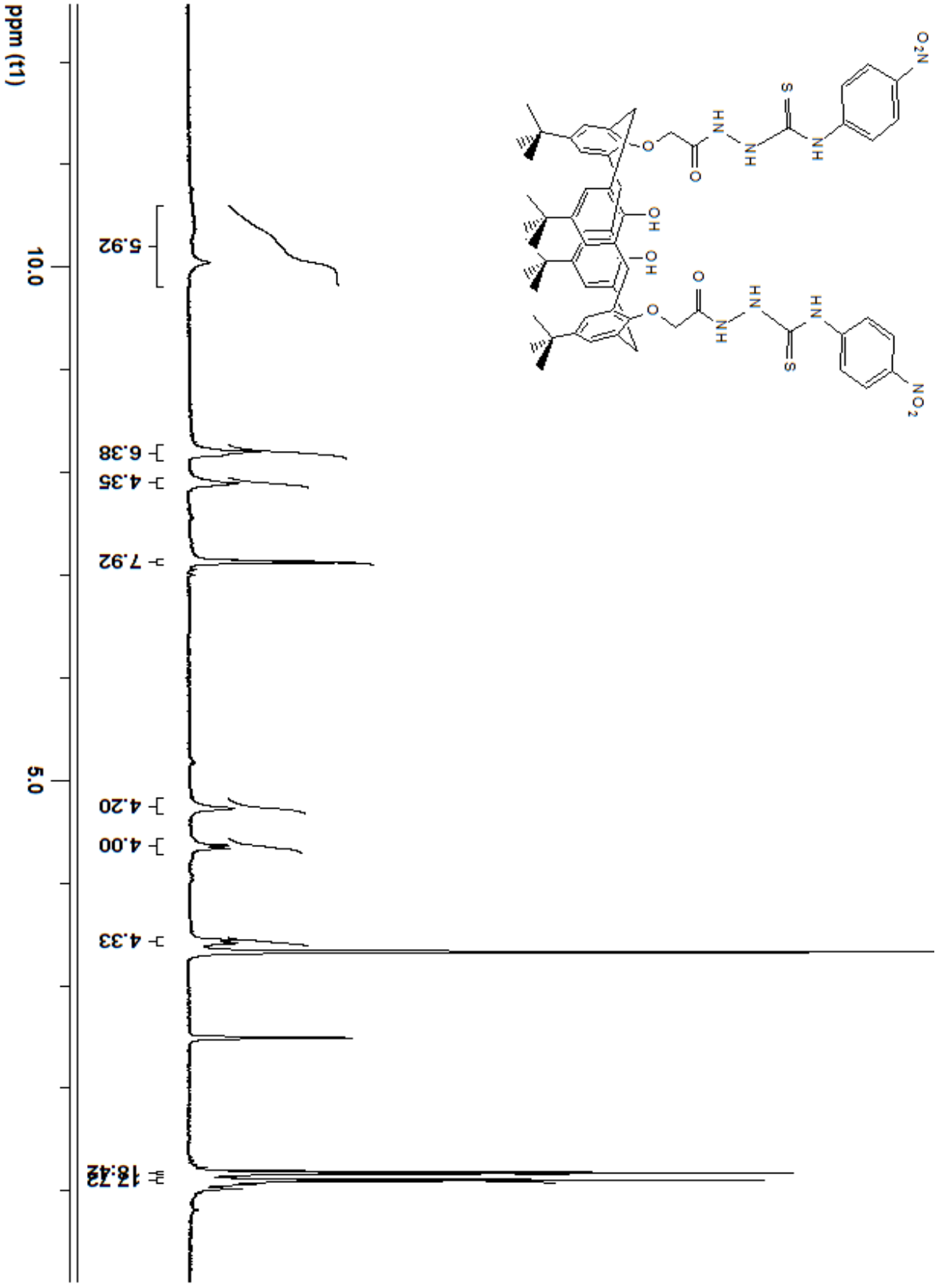
EK-7. 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,27-dimetoksikarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi-kaliks[4]aren **(3)**' in ^{1}H-NMR spektrumu



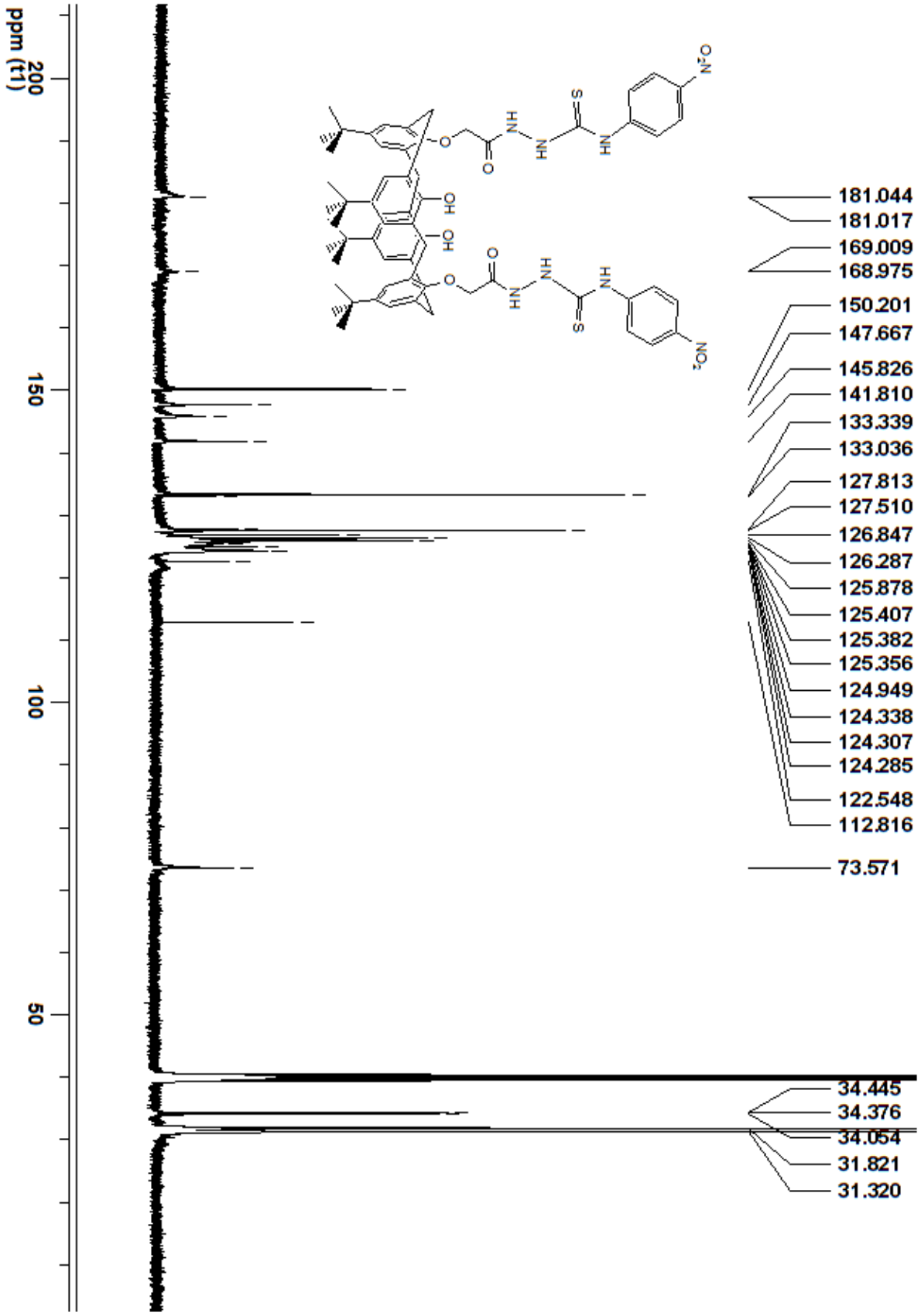
EK-8. 25,27-Dimetoksikarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi-kaliks[4]aren **(7)**' in ^{1}H-NMR spektrumu



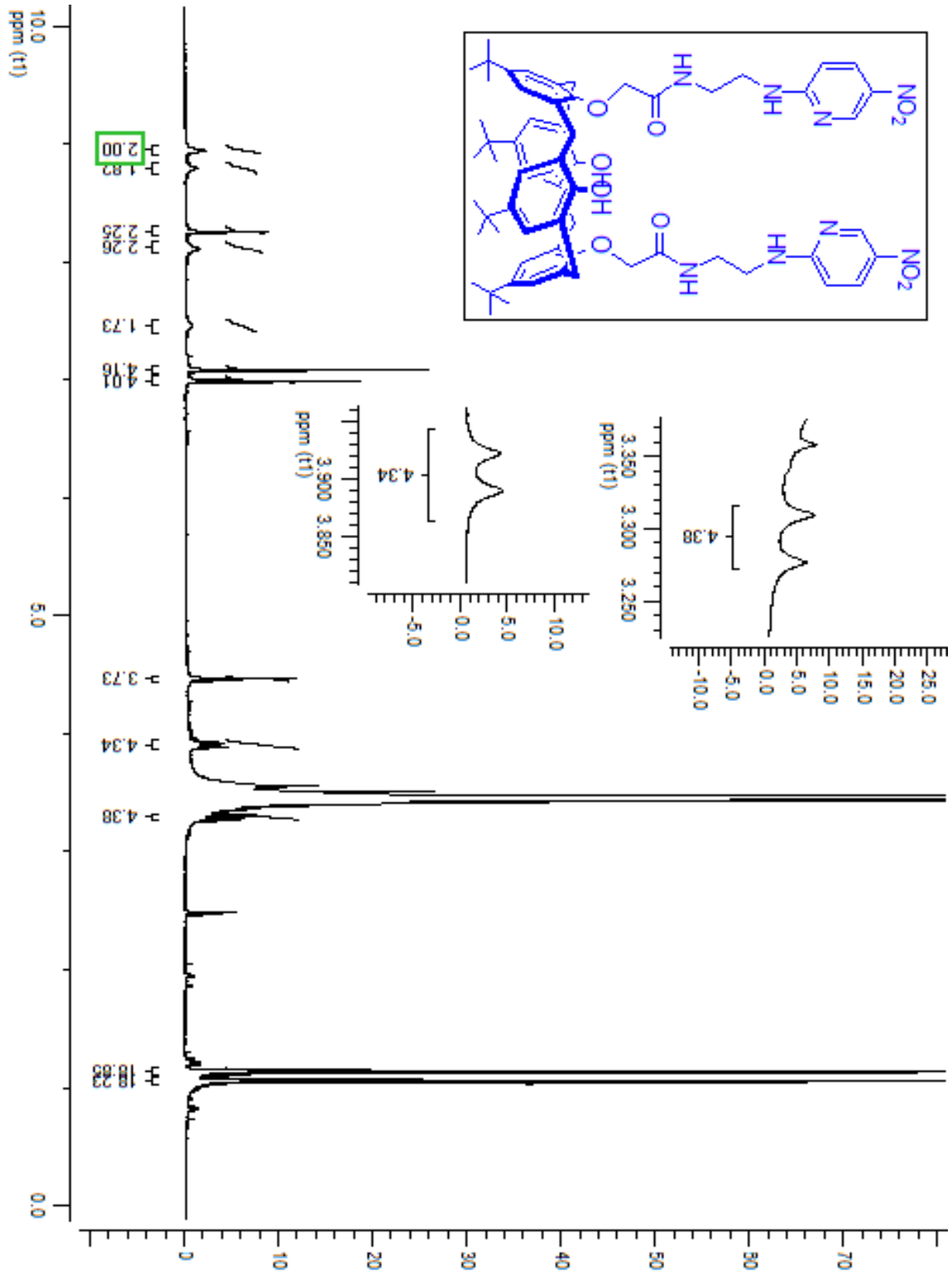
EK-9. 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,27-dihidrazinamitkarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi-kaliks[4]aren **(4)**' in ^{1}H-NMR spektrumu



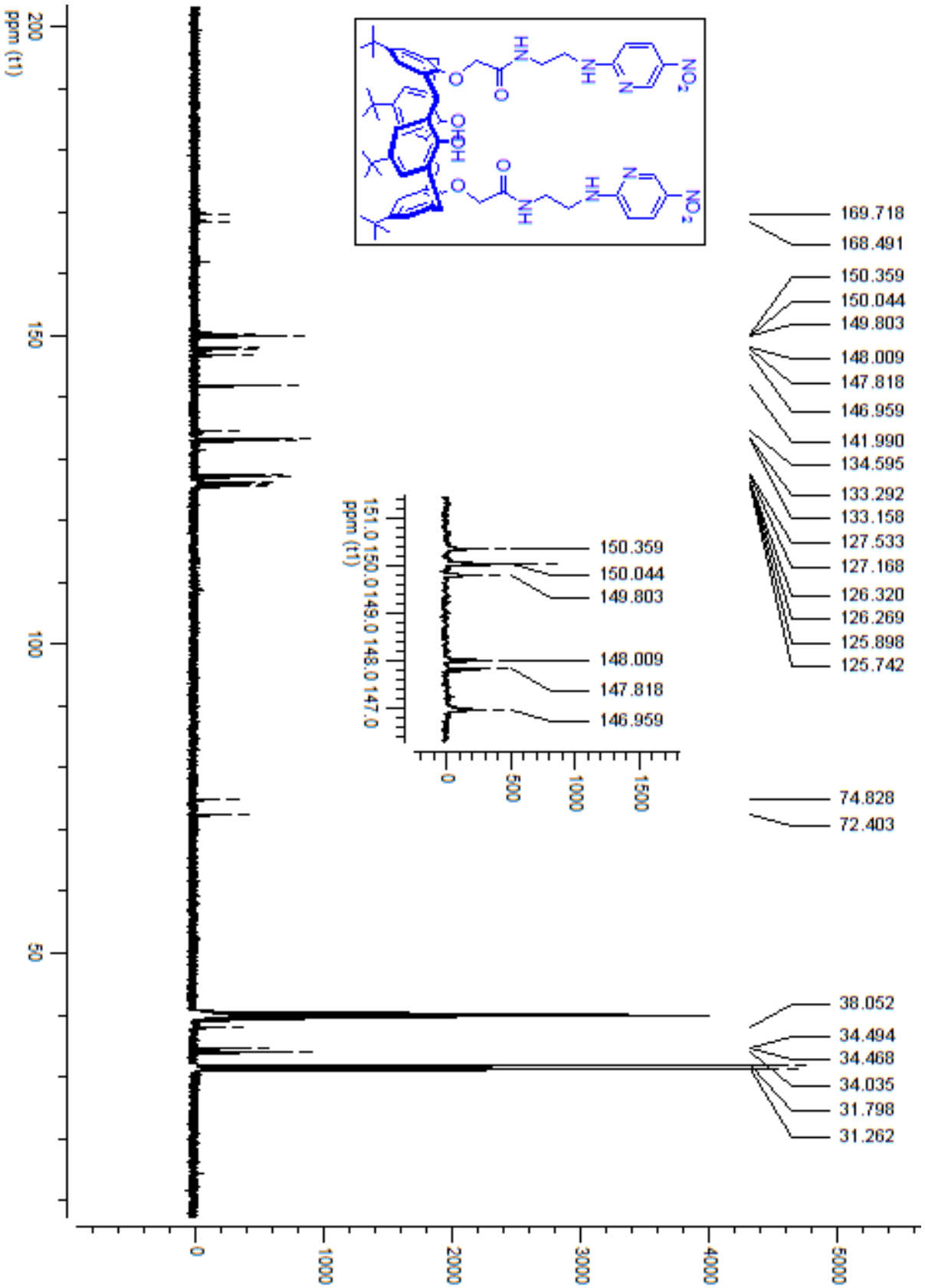
EK-10. 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,27-(4-(4-nitrofenil)-1-ditiyosemikarbazit)karbonilmetoksi-26,28-dihidroksi-kaliks[4]aren **(5)**' in ^{1}H-NMR spektrumu



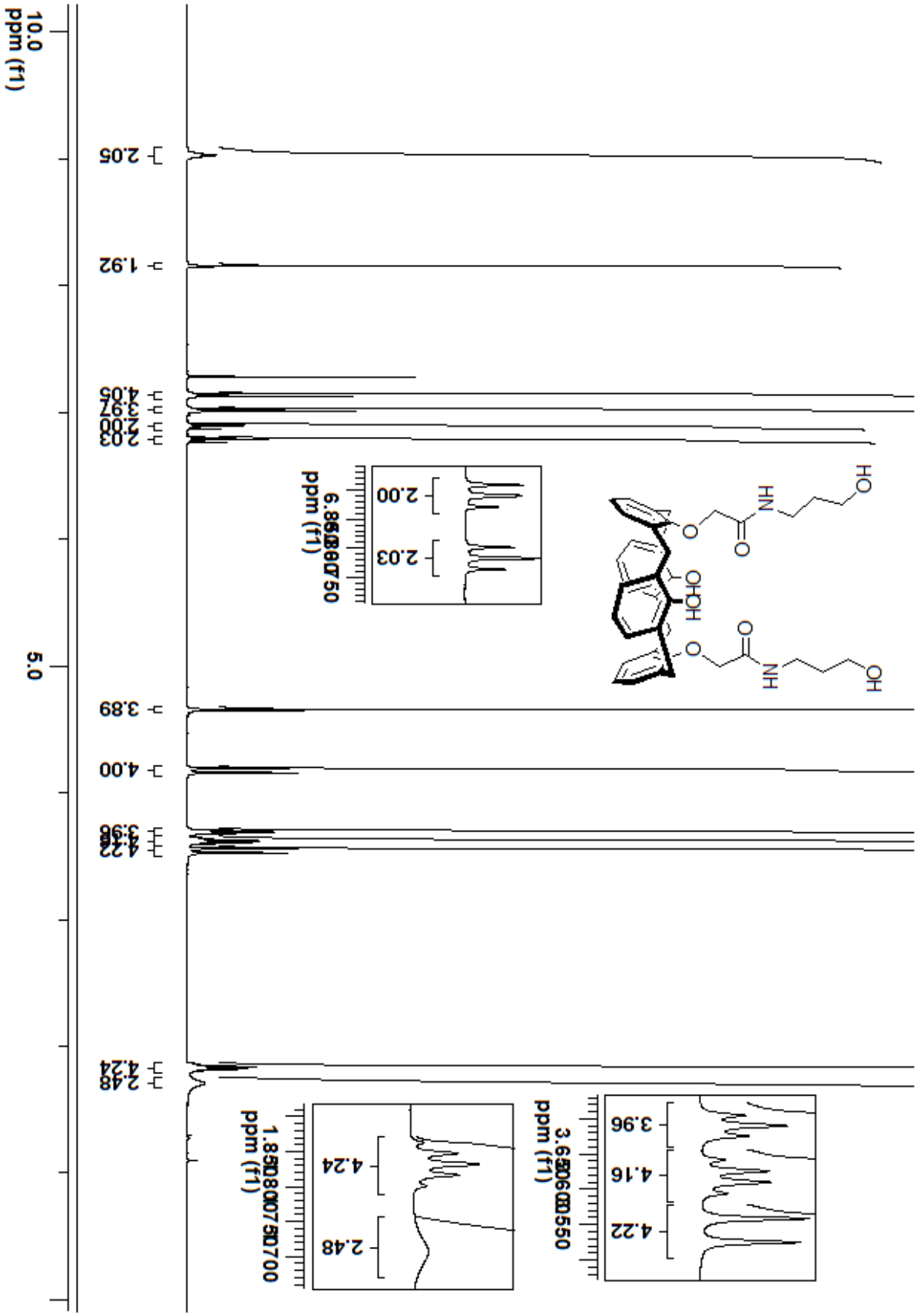
EK-11. 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,27-(4-(4-nitrofenil)-1-ditiyosemikarbazit)karbonilmetoksi-26,28-dihidroksi-kaliks[4]aren **(5)**' in ^{13}C-NMR spektrumu



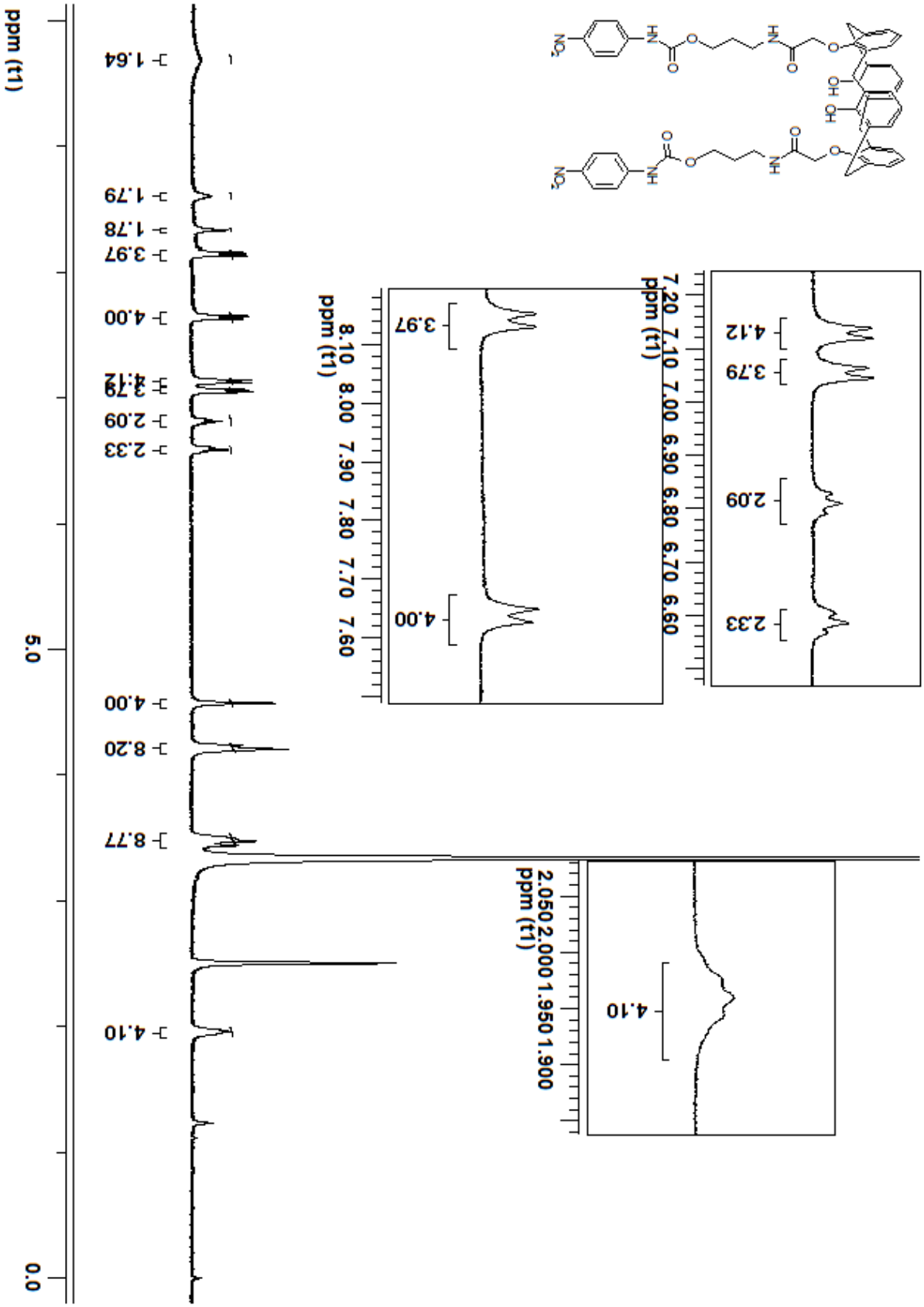
EK-12. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,27-bis(2-nitropiridil-2-ilamin)etilaminkarbonil-metoksi)-26,28-dihidroksikaliks[4]aren **(6)**' in ^{1}H-NMR spektrumu



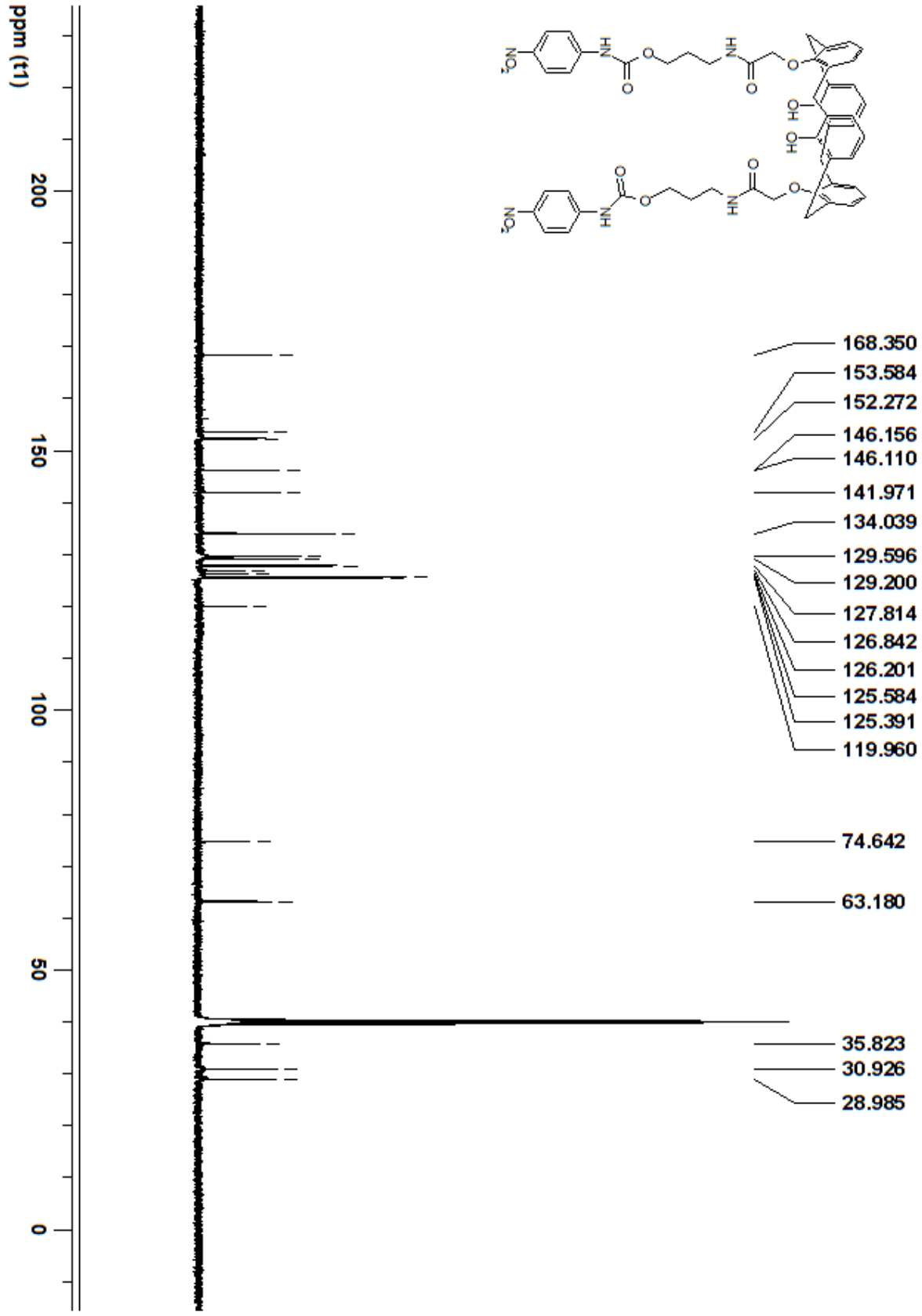
EK-13. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,27-bis(2-nitropiridil-2-ilamin)etilaminkarbonil-metoksi)-26,28-dihidroksikaliks[4]aren **(6)**' in ^{13}C-NMR spektrumu



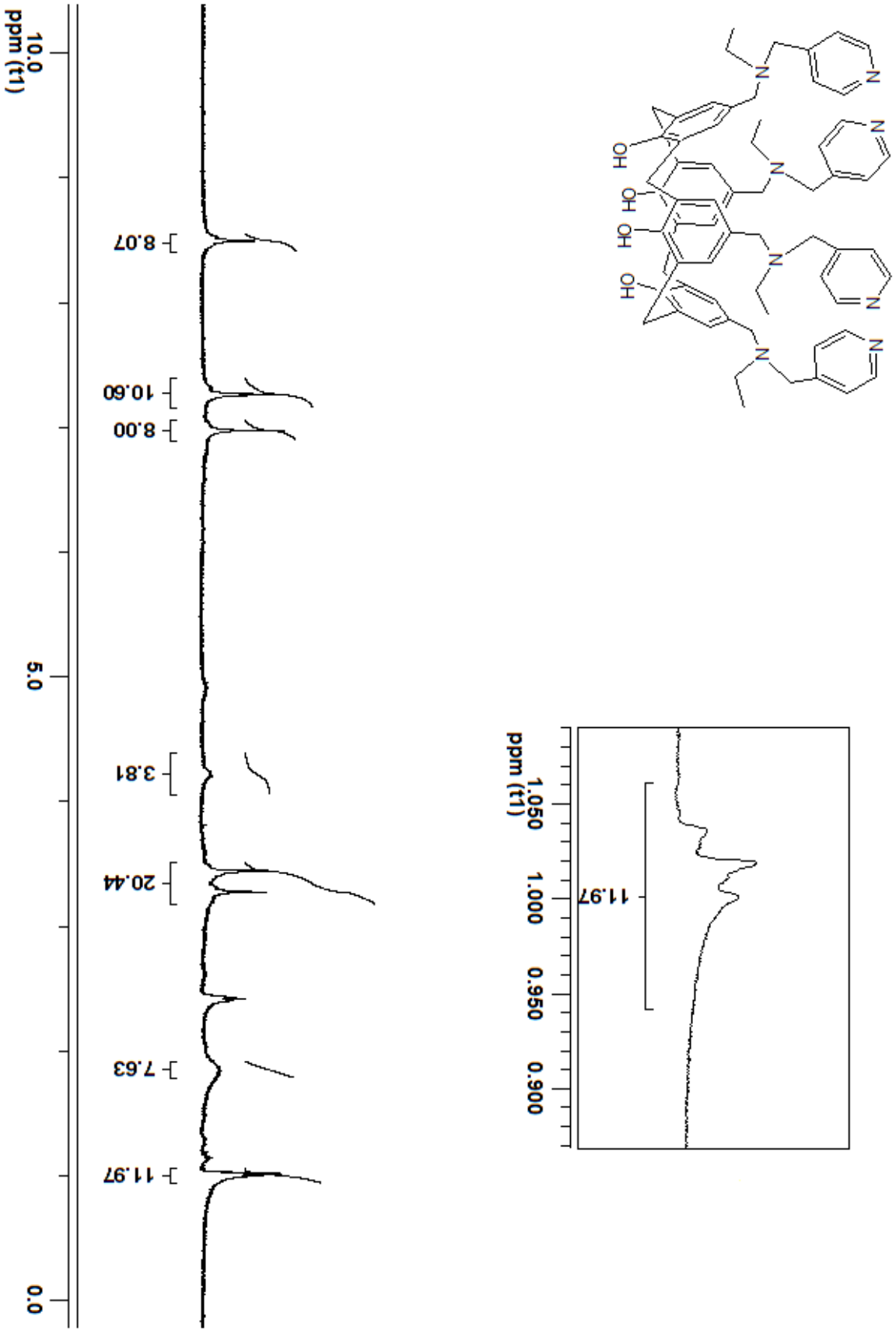
EK-14. 25,27-Bis(3-hidroksipropil)amitkarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi-kaliks[4]aren **(8)**' in ^{1}H-NMR spektrumu



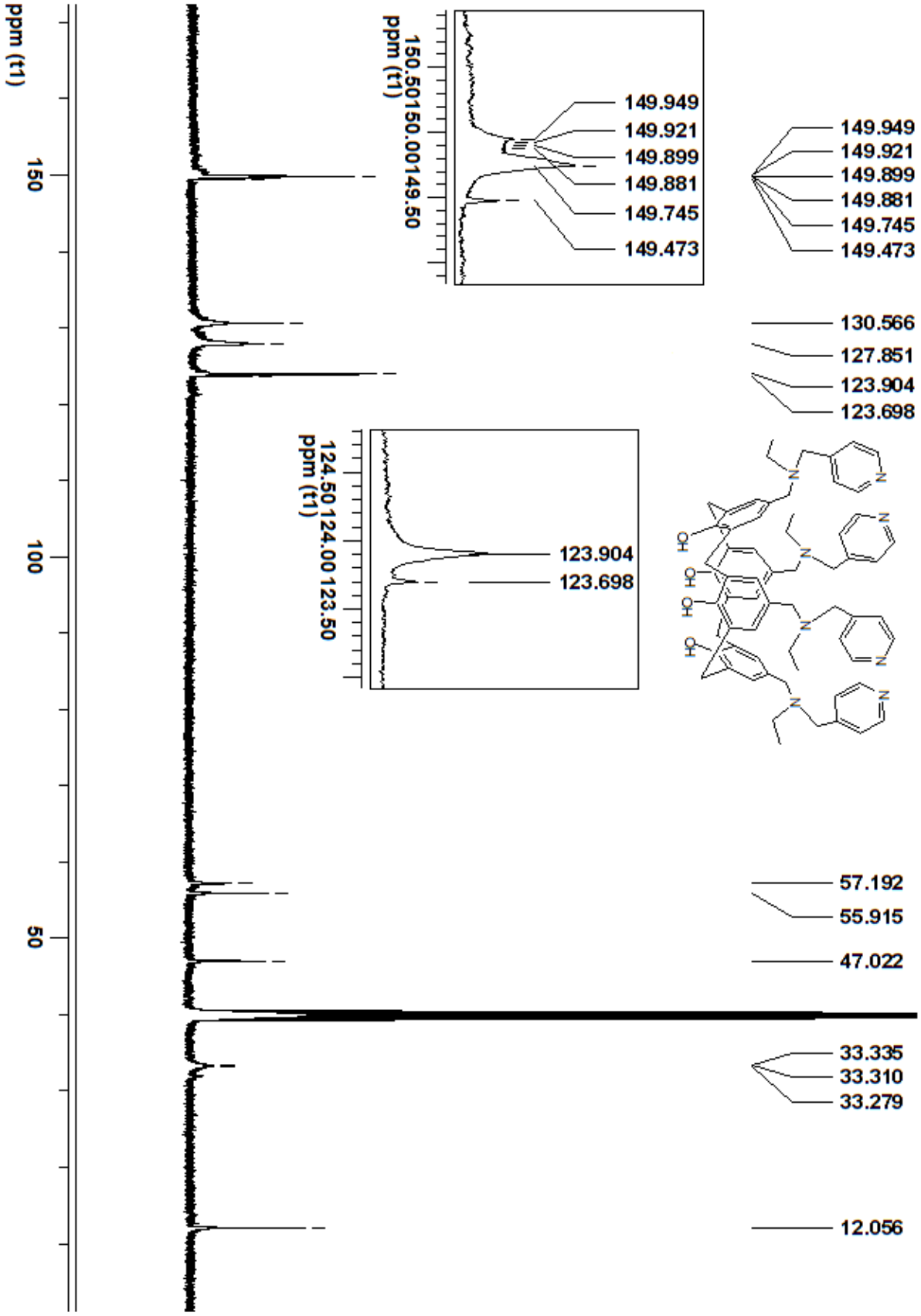
EK-15. 25,27-Bis(3-(*p*-nitrofenilkarbamat)propil)amitkarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi-kaliks[4]aren **(9)**' in ^{1}H-NMR spektrumu



EK-16. 25,27-Bis(3-(*p*-nitrofenilkarbamat)propil)amitkarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi-kaliks[4]aren **(9)**' in ^{13}C-NMR spektrumu



EK-17. 5,11,17,23-Tetra-4-(etilaminometil)piridil-25,26,27,28-tetrahidroksi kaliks[4]aren (**10**)' un ^{1}H-NMR spektrumu



EK-18. 5,11,17,23-Tetra-4-(etilaminometil)piridil-25,26,27,28-tetrahidroksi kaliks[4]aren (**10**)' un ^{13}C-NMR spektrumu

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Vildan DOĞAN
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Sarayönü 10/03/1990
Telefon :
Faks :
e-mail :

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	Konevi Anadolu Selçuklu Lisesi Selçuklu/Konya	2009
Üniversite	:	Selçuk Ünv. Fen Fk. Kimya Böl. Selçuklu/Konya	2013
Yüksek Lisans	:	Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsünde	Devam
Doktora	:		

YAYINLAR

Sayin, S. and Doğan, V., 2015. Synthesis and properties of novel magnetic nanoparticles grafted with nitropyridine-substituted calix[4]arene derivative as Cr^{6+} extractant. *Turk. J. Chem.*, 39, 130-138.