



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MANYETİK *p*-SULFOKALİKS[8]AREN OKTAKARBOKSİLİK ASİT TÜREVİNİN SENTEZİ VE LİPAZ İMMOBİLİZASYONUNDA KULLANILMASI

Rüstem MEHDİZADE

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

KONYA -2019

TEZ BİLDİRİMİ

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

DECLARATION PAGE

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

Rüstem MEHDİZADE

06/05/2019

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MANYETİK *p*-SULFOKALİKS[8]AREN OKTAKARBOKSİLİK ASİD TÜREVİNİN SENTEZİ VE LİPAZ İMMOBİLİZASYONUNDA KULLANILMASI

Rüstem MEHDİZADE

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Elif ÖZYILMAZ
2019, 79 Sayfa

Prof. Dr. Elif ÖZYILMAZ

Prof. Dr. Ahmet KOÇAK

Dr.Öğr.Ü. Özlem ALTINTAŞ YILDIRIM

Kaliksarenler halkalı bir nanosepet yapısında olmalarından dolayı iyon ve moleküllerin taşınmasında kullanılmaktadırlar. Son yıllarda kaliksarenler amino asit, protein ve enzimlerin taşınmasında kullanılabileceği gözlenmiştir. Bu türden molekül taşıma işlemlerinde karşılaşılan en önemli problemlerden biri ayırma işlemindeki zorluklardır. Bu projede *p*-sulfokaliks[8]aren oktakarboksilik asid türevi magnetik demir oksit nanopartiküllerine immobilize edildi. Sentezlenen bileşiğin ve nanopartiküllerin yapısı spektroskopik (FTIR, NMR) ve diğer tekniklerle (VSM, TEM) ile aydınlatıldı. Daha sonra hazırlanan suda çözünen manyetik nanopartiküller ilk kez lipaz immobilizasyonunda kullanıldı. İmmobilize lipazların optimum pH, sıcaklık, termal kararlılık ve kinetik gibi parametreleri incelendi.

Anahtar Kelimeler: Kaliks[8]aren, manyetik nanopartiküller, lipaz, immobilizasyon

ABSTRACT

MS THESIS

SYNTHESIS OF MAGNETIC p-SULFOCALIX[8]ARENE OCTACARBOXYLIC ACID DERIVATIVE AND ITS USE IN LIPASE IMMOBILIZATION

Rüstem MEHDİZADE

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY

Advisor: Prof. Dr. Elif ÖZYILMAZ

2019, 79 Pages

Prof. Dr. Elif ÖZYILMAZ
Prof. Dr. Ahmet KOÇAK
Dr.Öğr.Ü. Özlem ALTINTAŞ YILDIRIM

Calixarenes are used in the transportation of ions and molecules due to their nanobasket structures. In recent years, it has been observed that calixarenes can be used for the binding studies with amino acids, proteins and enzymes. One of the most important problems encountered in this type of molecule carrying process is the separation process. In this project, *p*-sulfocalix[8]aren octacarboxylic acid derivative was immobilized onto magnetic iron oxide nanoparticles. The structure of the synthesized compound and nanoparticles were elucidated by spectroscopic (FTIR, NMR) and other techniques (TEM, VSM). The prepared magnetic nanoparticles soluble in water first time were used in lipase immobilization. Optimal pH, temperature, thermal stability and kinetic of lipase immobilized nanoparticles were investigated.

Keywords: Calix[8]arene, magnetic nanoparticles, lipase, immobilization

ÖNSÖZ

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü Prof. Dr. Elif ÖZYILMAZ yönetiminde yapılarak Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü' ne Yüksek Lisans Tezi olarak sunulmuştur.

Bu çalışma S.Ü. bilimsel araştırma projeleri koordinatörlüğü tarafından BAP 18201080 nolu yüksek lisans tez projesi olarak desteklenmiştir. Bu çalışmayı yürüte bilmem için sağladığı destekten dolayı Selçuk Universitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca bana laboratuvar imkanı sağlayan Biyokimya Bölümü Öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Elif ÖZYILMAZ' a, ve Kimya Bölümü Öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Mustafa YILMAZ' a ve Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümün'de görev yapan çok değerli hocalarıma teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarımda bana her konuda yardımcı olan ve tezimin hazırlanmasında emeği geçen başta Prof. Dr. Elif ÖZYILMAZ olmak üzere, doktora öğrencisi Mehmet OĞUZ' a Doç. Dr. Arzu UYANIK' a ve diğer yüksek lisans öğrenci arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Rüstem MEHDİZADE
KONYA-2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **ix**

1. GİRİŞ **1**

1.1. Kaliksarenler ve Tarihçesi 1
1.1.1 Kaliksarenlerin Adlandırılması 3
1.1.2. p-ter-Bütil-kaliks[n]arenlerin sentezi 4
1.1.3. Kaliks[n]arenlerin bazik ortamdaki sentez mekanizması 7
1.1.4. Kaliksarenlerin Fonksiyonlandırılması 10
1.1.5. Kaliksarenlerin Fiziksel Özellikleri 11
1.1.6. Kaliksarenlerin Kullanım Alanları 13
1.2 Enzimler ve Genel Özelikleri 21
1.2.1 Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması 22
1.2.2 Lipazlar 24
1.3. Enzim İmmobilizasyonu 35
1.3.1. İmmobilizasyon Yöntemleri 35

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **38**

3. MATERYAL VE YÖNTEM **45**

3.1 Enstrümental teknikler 45
3.2. Kimyasal Sentezler 45
3.2.1. p-terbütilkaliks[8]aren (Gutsche 1990) 45
3.2.2. p-terbütilkaliks[8]aren oktakarboksilik ester türevi (Arnaud-Neu ve ark. 1989) 46
3.2.3. p-sülfokaliks[8]arenin oktakarboksilik asid türevi (Collins ve ark. 1991) 47
3.2.4. *p*-Sulfokaliks[8]aren oktakarboksilik asid türevi (Shinkai 1987) 48
3.2.5. Fe_3O_4 manyetik nanopatiküllerin hazırlanması (Giardine ve ark., 2005) 48
3.2.6. Lipaz immobilizasyonu 49
3.2.7. Lipaz Aktivitesinin Tayini 50
3.2.8. Protein miktarı (Bradford 1976) 50
3.2.9. Optimum pH Tayini 51
3.2.10. Optimum Sıcaklık Tayini 51
3.2.11. Termal kararlılık 51
3.2.12. Tekrar kullanılabilirlik 52
3.2.13. Enzim Kinetiği 52

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA **53**

4.1. Lipaz İmmobilizasyonu 60
4.1.1. İmmobilize lipazların aktivitesine pH'ın etkisi 62
4.1.2. İmmobilize lipazların aktivitesine sıcaklığın etkisi 63
4.1.3. Termal kararlılık 65
4.1.4. Tekrar Kullanılabilirlik 65
4.1.5. Enzim kinetiği 66
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 68

6. KAYNAKLAR 69

7. ÖZGEÇMİŞ 79

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

δ	Kimyasal kayma degeri
g	Gram
mg	Miligram
n	Mol
M	Molarite
M_A	Molekül ağırlığı
mL	Mililitre
mmol	Milimol
-p-	Para
ter-	Tersiyer
eq	Equvalent
o	Derece

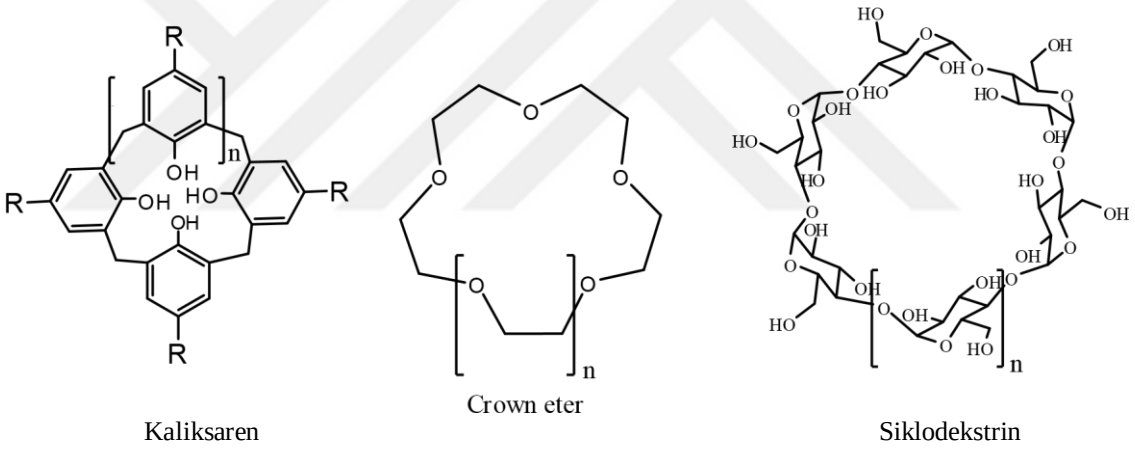
Kısaltmalar

CRL	Candida rugosa
E.N.	Erime noktası
p-NPP	*p*-nitrofenil palmitat
DMF	Dimetil formamid
DCM	Diklrometan
THF	Tetrahidrofuran
EtAc	Etilasetat
Büt	Tersiyer bütil
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
IR	İnfrared spektrometresi
ITK	İnce tabaka kromotografisi
UV	Ultraviole visible spektroskopisi
s	Singlet
d	Dublet
t	Triplet
m	Multiple

1. GİRİŞ

Leo Hendrick Baekeland 1907 yılında "bakalit"i sentezlemesinden sonra 70'li yıllara kadar büyük yapılı organik bileşikler daha fazla ilgi görmeye başladı ve bu bileşikler üzerinde daha fazla çalışılmaya başlandı ve 1978 yılında "Supramoleküler Kimya" terimi ortaya çıktı. Supramoleküler kimyada yaygın olan siklodekstrinler birinci kuşak taç eterler ikinci ve Kaliksarenler ise üçüncü kuşak supramoleküller olarak tanımlanırlar.

Kaliksarenler, taç eterler ve siklodekstrinler gibi halkalı yapıya sahiptirler. Bu nedenden dolayı katyon, anyon ve nötral bileşiklerle seçimli kompleks yapabilmektedirler. Tüm bu benzeri özelliklerinden dolayı halkalı yapıda olan kaliksarenler üçüncü kuşak supramoleküller olarak tanımlanırlar (Şekil 1.1) (Deligöz,1994).

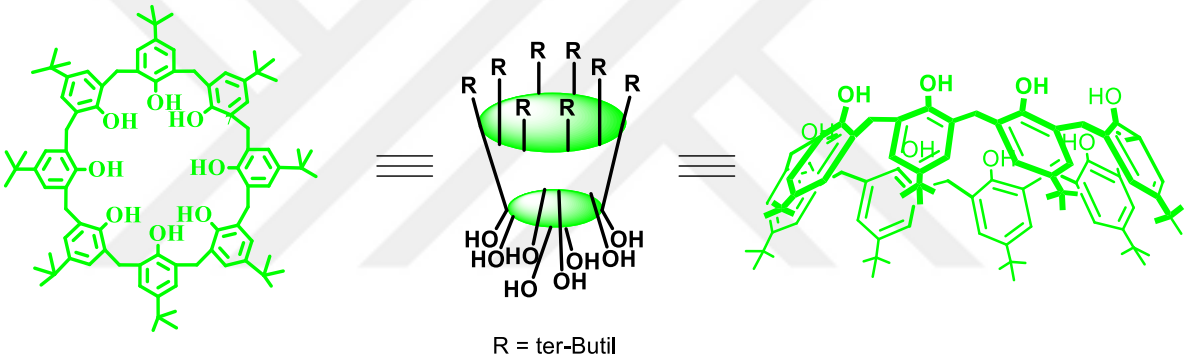


Şekil 1.1. Kaliks[n]aren, siklodekstrin ve crown eter supramoleküllerinin yapısı.

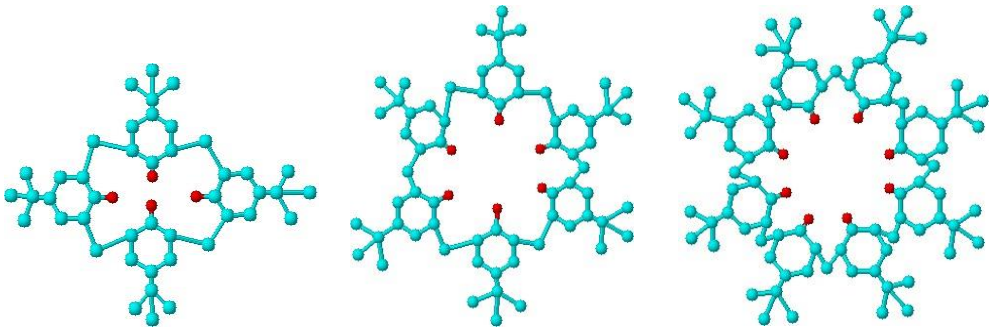
1.1. Kaliksarenler ve Tarihçesi

Fenol-formaldehit reçineleri ilk 1872 yılında Adolph Von Baeyer tarafından sentezlenmiştir. 20. Yüzyılda Leo Hendrick Baekeland gerçekleştirdiği çalışmada katı esnek bir reçine elde etmiştir. Bu reçineyi, fenol ile formaldehit reaksiyonundan hazırlamıştır. (Baekeland 1908). Reçine sonralar Bakelite olarak bilinmeye başlamıştır. Baekeland hazırladığı reçinenin patentini almış ve birçok araştırmacının da dikkatini çekmiştir.

Leo Baekelandin gerçekleştirdiği bu çalışmadan yaklaşık 40 yıl sonra Avusturyalı kimyacı Alois Zinke ve arkadaşları p-ter-bütil fenol ve formaldehiti NaOH varlığında 200 ^{o}C ye kadar ısıtarak hazırladıkları ürünün büyük molekül ağırlığına sahip erime noktası yaklaşık 340 ^{o}C olan tetramerik yapıda olduğunu savunmuşlardır (Zinke 1944). Kaliksaren çalışmalarda üst düzeylerde tanınan David Gutsche ve arkadaşları 1980 yılından yaptıkları çalışmalarda elde edilen ürünün yalnız tetramer yapıda değil, tetramer, hekzamer, oktamer ve halkalı oligomer karışımı olduğunu ispatlamışlardır. Daha sonra Gutsche ve arkadaşları halkalı yapıda olan tetramer, hekzamer, oktameri ayrı ayrı saf olarak elde etmeyi başarmışlardır (Gutsche 1990) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Halkalı oktamerin değişik yapılardaki gösterimi



4 *6* *8*

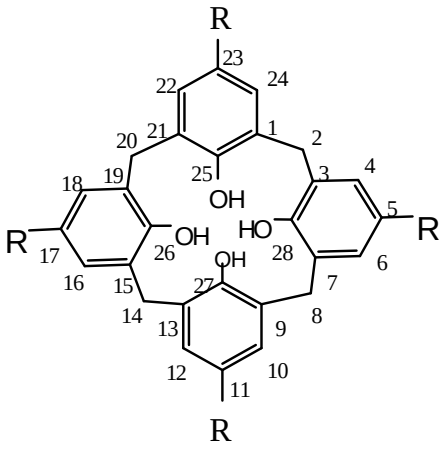
Şekil 1.2.1. *p-ter*-Bütilkaliks[n]arenlerin model yapılar

1.1.1 Kaliksarenlerin Adlandırılması

Kaliksarenler sınıf olarak metasiklofan sınıfı bileşiklerindendir ve isimlerini yunanca taç anlamına gelen "Chalice" ve organic kimyada aromatik halkayı ifade eden "aren" sözcüklerinin birleşmesinden oluşmuştur. Kaliksarenlerin IUPAC'a göre isimlendirilmesi kolay olmadığı için, kaliksaren üzerine çalışan başta Gutsche olmak üzere birçok araştırmacı tarafından isimlendirme yapılmıştır ve bu bileşikleri daha kolay ve pratik olarak adlandırmış ve IUPAC' a kabul ettirmiştir (Gutsche,1989). Bu sınıf bileşiklerde molekülün fenolik birimlerinin sayısını parantez içinde yazılan "n" harfi gösterir.

Kaliksaren türevlerinin çoğalması adlandırmayı sistemli halde kullanmak zorunda bıraktı, aromatik halka üzerinde bulunan sübstitüentlerin yerlerini belirlemek için numaralandırma sistemi kullanıldı. İkinci olarak fenolün sübstitue kısmıyla beraber fenolik birimin sayısını ifade eden isimlendirme sistemi kullanıldı.

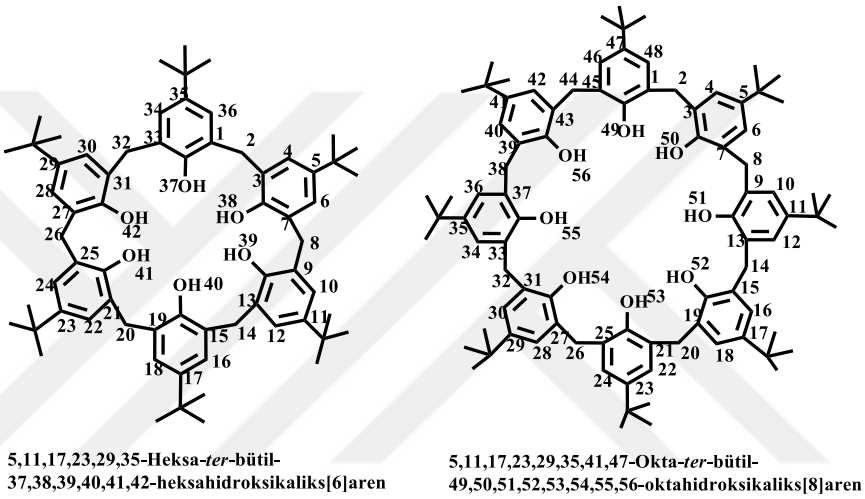
Gutsche, p-alkil fenolden oluşan tetramer yapıdaki kaliksareni 5,11,17,23-tetraalkil-25,26,27,28-tetrahidroksi Kaliks[4]aren olarak isimlendirmiştir. Daha kısa söylersek p-alkil kaliks[4]aren gibi isimlendirebiliriz (Gutsche 1989). (Şekil 1.3).



5,11,17,23-tetraalkil-25,26,27,28-tetrahidroksi-kaliks[4]aren

Şekil 1.3. Kaliks[4]arenlerin numaralandırması ve adlandırılması.

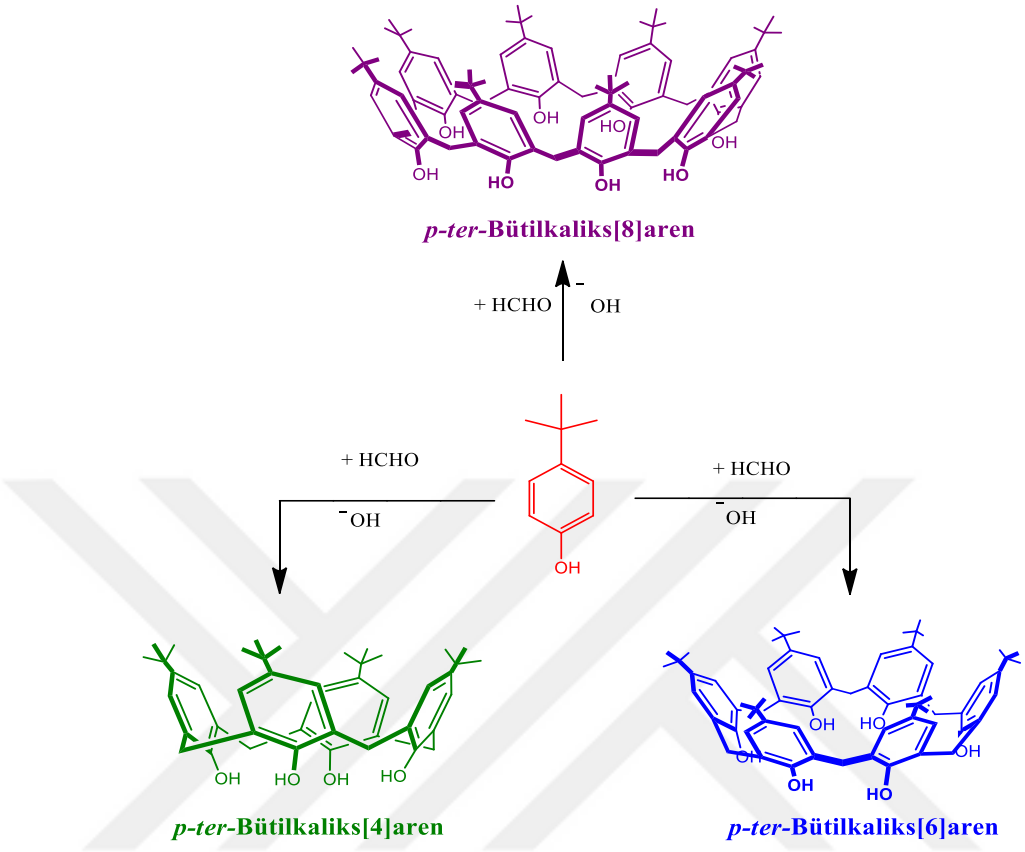
Yine, Gutsche, p-alkil fenolden oluşan hekzamer yapıdaki kaliksareni 5,11,17,23,29,35-Heksa-ter-bütil-37,38,39,40,41,42-Heksahidroksi-Kaliks[6]aren, oktamer yapıdaki kaliksareni ise 5,11,17,23,29,35,41,47-Okta-ter-bütil-49,50,51,52,53,54,55,56-Oktahidroksi-Kaliks[8]aren olarak isimlendirmiştir. Daha kısa hali ise uygun olarak p-alkil kaliks[6]aren ve p-alkil kaliks[8]aren gibi isimlendirilmektedir (Gutsche 1989). (Şekil 1.3.1).



Şekil 1.3.1 Kaliks[6]aren ve Kaliks[8]arenlerin numaralandırması ve adlandırılması.

1.1.2. p-ter-Bütil-kaliks[n]arenlerin sentezi

Gutsche ve grupu diğer kaliksarenlerle kıyaslarsak, kaliks[4]aren ve türevleri ile ilgili daha fazla çalışmalar yapmışlardır. Bunun nedeni bu tür kaliksarenlerin yüksek verimle ve kolay sentezlenebilmesidir. Gutsche ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda p-ter-bütil fenol kullanılarak en iyi sonucun elde edildiğini kanıtlamışlardır (Gutsche 1990). Ayrıca Gutsche'nin dört (Gutsche ve Iqbal 1990), altı (Gutsche 1990), sekiz (Munch ve Gutsche 1990) sentezlenmekle, p-ter-bütilkaliksarenler için tek basamakta sentez yönteminin yayınlanmasıyla da literatürde kaliksaren ve türevlerinin artmasına destek sağlamışlardır (Gutsche ve Iqbal 1990). (Şekil 1.4).

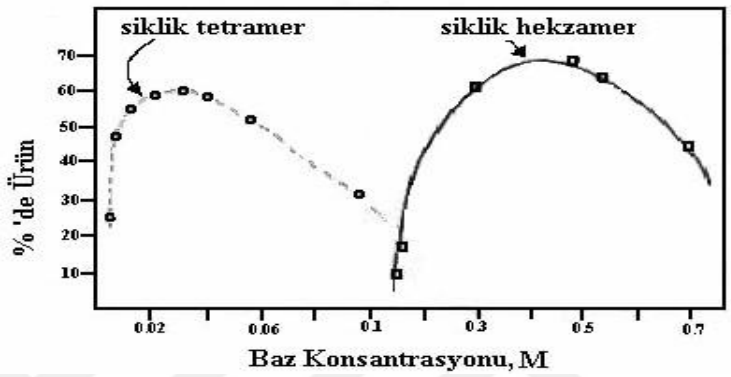


Şekil 1.4. *p-ter*-Bütil kaliks[4]aren, *p-ter*-Bütil kaliks[6]aren, *p-ter*-Bütil kaliks[8]arenlerin sentezi

1.1.2.1. p-ter-bütil-kaliks[n]arenlerin bazik ortamdaki sentezi

Araştırmacılar kaliksarenlerin sentezi ile ilgili yaptıkları çalışmalarda *p-ter*-bütil kaliks[4]arenin hazırlanmasında baz miktarının ortalama 0.03-0.04 eşdeğer oranda olması gerektiğini bulmuşlardır. Baz miktarı bu eşdeğer orandan fazla veya eksik kullanılırsa verimde düşme görülür. Bazın eşdeğer miktarından daha fazlası ilave edilirse halkalı tetramerin miktarı azalarak sıfıra kadar düşebilir. Eğer daha da fazla baz alınacak olursa ürün olarak siklik tetramer yerine halkalı hekzamer elde edilecektir. Sentezlenecek oligomere göre önceden uygun miktarda baz kullanılmalıdır. Hekzamer için stokiyometrik oranda, tetramer ve oktomer için ise katalitik miktarda baz kullanılmalıdır (Gutsche 1981; Dhawan 1987).

Gutsche 1981'de halkalı tetrameri (p-ter-bütil kaliks[4]aren) sentezlemek için 0.04 eq NaOH; halkalı hekzamer için 0,5 eq KOH; halkalı oktamer için ise 0,05 eq NaOH baz kullanılmasını söyleyebiliriz. (Gutsche 1981). Kaliks[n]aren sentezinde baz konsantrasyonun reaksion verimine etkisisi şekil 1.5'de gösterilmiştir.



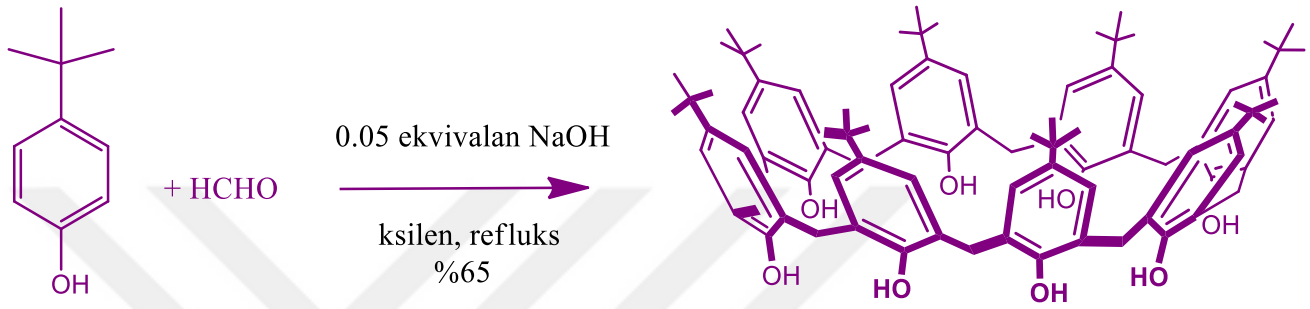
Şekil 1.5. Kaliks[n]aren sentezinde baz konsantrasyonun reaksion verimine etkisi

Kaliksaren sentezinde önemli olan diğer etkenlerden biri de kullanılan bazların türleridir. Atom çaplarını da öngörürsek, kaliksarende bulunan oksijen atomları arasındaki mesafeye göre, kullanılan bazın atom çapının da ne kadar önemli olduğu anlaşılır. Tetramer, hekzamer ve oktomerin sentezlerinde kullanılan baz türleri de farklılık göstermektedir. Hekzamer üzerinde yapılan araştırmalarda LiOH ve NaOH bazları kullanıldığında hiç ürün oluşmadığı, KOH ve CsOH bazları kullanıldığında ise hekzamer halkasının oluştuğu görülmektedir. En yüksek verim ise RbOH bazı kullanıldığında elde edilmiştir. Bu durum "template etki" ile açıklanmaktadır. Bu etkinin açıklaması kaliksarenler üzerinde bulunan fenolik oksijen atomları arasındaki mesafenin ölçülmesi alakalandırılmaktadır.

Kaliksarenlerde bulunan fenolik oksijenler arasındaki mesafe p-ter-bütil kaliks[4]aren'de 0.8 Å, p-tert–bütil kaliks[6]aren'de 2.0-2.9 Å, p-tert–bütil kaliks[8]aren 'de ise 4.5 Å olarak bulunmuştur. "Template Etki"sine göre, uygun olarak, halkalı tetramer ve oktomerin sentezi için LiOH ve NaOH tercih edilirken, halkalı hekzamerde ise RbOH ve CsOH tercih edilmektedir.

1 (eq) *p-ter*-bütil fenol, 0.05 (eq) NaOH varlığında 1.5 (eq) % 37'lik paraformaldehit ile 100-110 ^{o}C de 1.5 - 2 saat etkileştirilir. Oluşan viskoz karışım ksilen ile

süspanse edilerek, N_2 gazı altında 220 ^oC'de 4 saat geri soğutucu altında etkileştirilmektedir. Elde edilen sıvı ürün soğutularak oda sıcaklığına kadar düşürülür. Çöken katı ürün süzülerek ayrılır. Daha sonra sırasıyla toluene, dietil eter ve aseton ile yıkanır. Oluşan beyaz kristallerin erime noktası 416-418^oC' dir (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. *p-ter*-bütilkaliks[8]aren'in sentezi

Sonuç olarak çizelge 1.1'de kaliks[n]arenlere sıcaklık, katalizör ve eklenen baz miktarının etkisi gösterilmiştir.

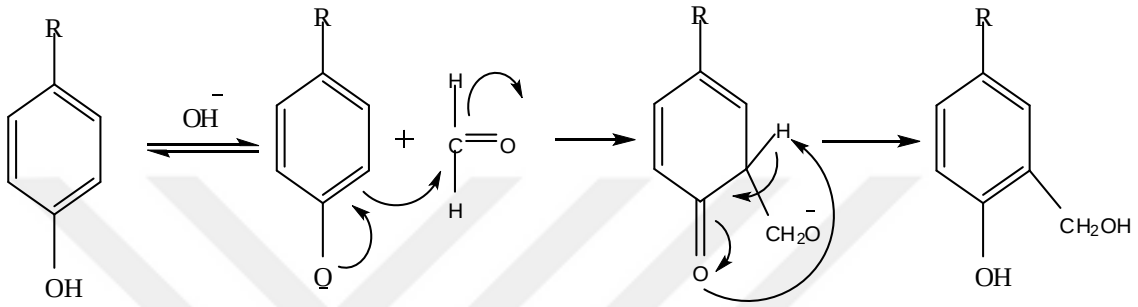
Çizelge1.1 Kaliksarenlere sıcaklık, katalizör ve eklenen baz miktarının etkisi

Kaliks [n]aren	Sıcaklık (°C)	Çözücü	Katalizör	Miktar	Oksijen Atomları Arası Mesafe
4	256	Difenileter	NaOH	Katalitik	0,8 A°
6	139	Ksilen	KOH	Stokiyometrik	2,0-2,9 A°
8	138	Ksilen	NaOH/KOH	Katalitik	4,5 A°

1.1.3. Kaliks[n]arenlerin bazik ortamdaki sentez mekanizması

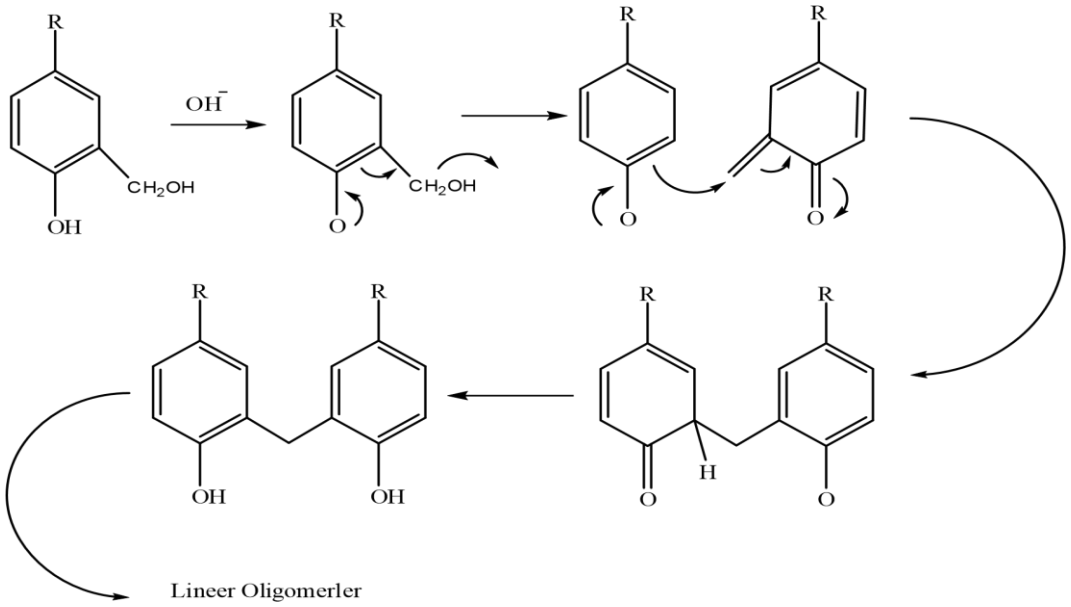
Kaliksarenlerin bazik ortamdaki sentezlerinde ilk olarak kullanılan bazın etkisiyle fenoksit iyonunun oluşumudur. Bu iyonlar nükleofil olarak davranmaktadır. Oluşan

fenoksit iyonu aromatik halka ile rezonansa girerek *orto* pozisyonunu elektronca daha zengin hale getirir ve bu sayade *orto* pozisyonundaki elektron çifti formaldehitle etkileşir ve karbonil grupunda bulunan karbona saldırarak hidroksimetilfenollerin oluşmasıyla devam eder (Şekil 1.7).



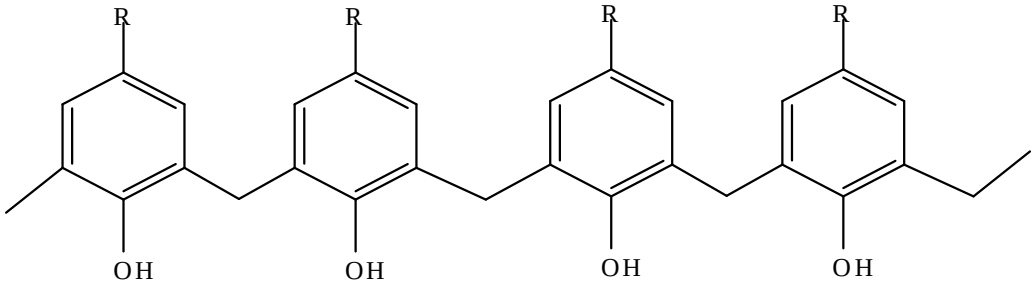
Şekil 1.7. Hidroksimetilfenolün oluşumu

Reasksiyon zamanı hidroksimetilfenoller o-kinon metit ara ürünlerine dönüşürler. Daha sonra ara ürün olan o-kinon metit ortamda bulunan diğer fenoksit iyonuyla bağ yaparak lineer dimer, trimer, tetramer bileşikleri oluşturur (Şekil 1.8).



Şekil 1.8. Lineer Oligomerlerin Oluşum mekanizması

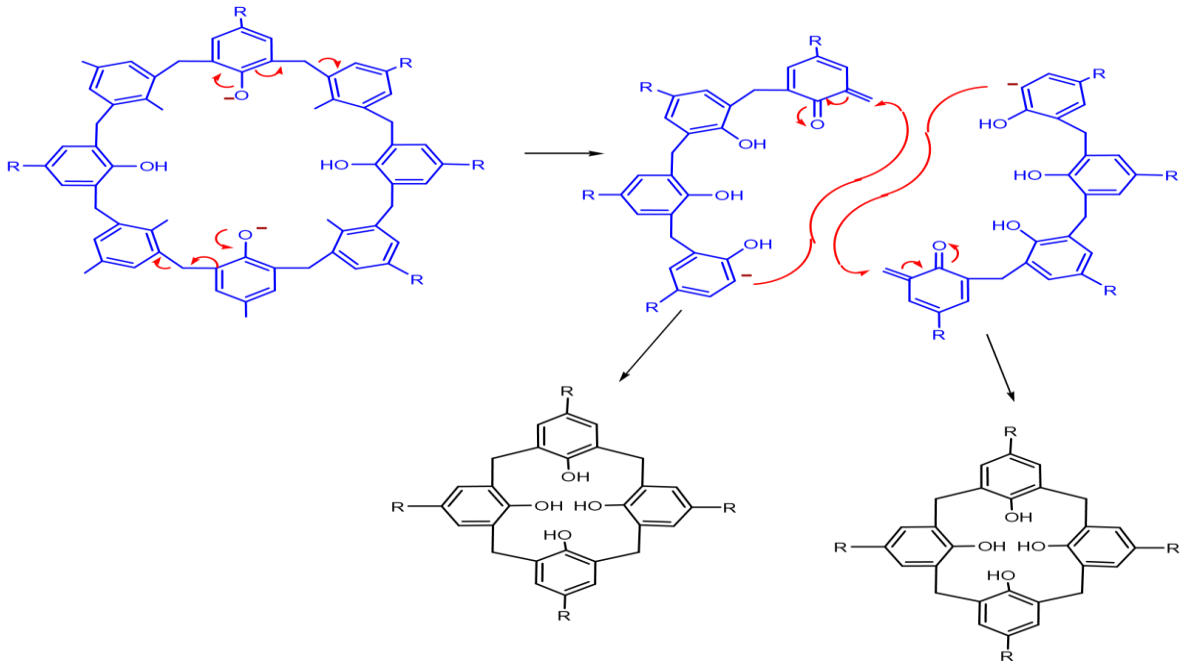
Reaksiyon sonunda tetramerik oligomerler oluşur (Şekil 1.9).



Şekil 1.9. Lineer tetramerin oluşumu

Yüksek sıcaklıkta ve bazik ortamda fenol-formaldehit karışımından oluşan ara ürünler kaliksaren ve türevlerine dönüşür.

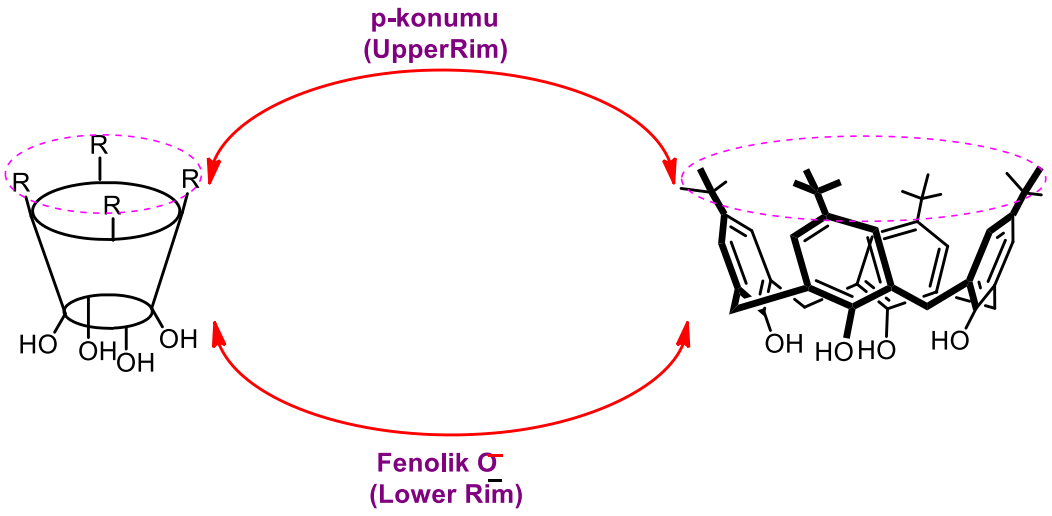
Gutsche ve Dhawan'ın gözlemlediği sonuçlara göre yüksek sıcaklıkta *p-ter*-bütilkaliks[6]aren veya *p-ter*-bütilkaliks[8]aren'in ortalama % 75' nin parçalanıp küçük moleküllere yani, *p-ter*bütilkalisk[4]aren' e dönüşmekteler (Gutsche 1986, Dhawan 1987). **(**Şekil 1.10).



Şekil 1.10. Kaliks[8]aren' in parçalanarak kaliks[4]aren' e dönüşümü

1.1.4. Kaliksarenlerin Fonksiyonlandırılması

Fenol türevi kabul edilen halkalı bileşikler kaliksarenler, hemen hemen fenolik bileşiklerin verdiği tüm tepkimeleri vermektedir. Diğer halkalı yapıdaki taç eterler ve siklodekstrinlerle kıyaslarsak, kaliksarenlerin bu özelliği sentezlerde daha fazla tercih edilmesini sağlamaktadır. Kaliksarenler anyon, katyon ve nötral bileşikler ile seçimli olarak kompleks oluşturmasından dolayı birçok araştırmacıların ilgi odağı haline gelmiştir. Kaliksarenlerin çözücülerdeki çözünürlüğünün az olması bilinmektedir. Onların farklı fonksiyonel gruplarla fonksiyonlandırılması çözücülerdeki çözünürlüğünün artmasını sağlamaktadır. Kaliksarenlerin yukarı ve aşağı kısmını ayırarak farklı adlandırmışlar, fenolik –OH gruplarının bulunduğu dar kısma "lower rim", aril halkalarının para posizyonunun bulunduğu geniş kısma ise "upper rim" ismini vermişler. Böylelikle, kaliksarenler kolaylıkla fenolik halkaların *para* pozisyonlarından ve fenolik oksijen üzerinden sınırsız fonksiyonlandırılabilirler (Şekil 1.11.).



Şekil 1.11. Kaliksarenlerin "lower rim" ve "upper rim" bölgesi

1.1.5. Kaliksarenlerin Fiziksel Özellikleri

1.1.5.1. Erime noktası

Yaklaşık olarak halkalı tetramer *p-ter*bütilkaliks[4]aren'in erime noktası 342-344ºC, halkalı hekzamer *p-ter*bütilkaliks[6]aren'in erime noktası 380-381ºC, halkalı oktamer *p ter*bütilkaliks[8]aren'in erime noktası ise 411-412ºC'dir. Kaliksarenlerde erime noktasına etki eden önemli faktörlerden biri hidrojen bağlarıdır. Kaliksarenlerde bulunan hidrojen bağları erime noktasını belirlemektedir. Bu yüzden taşıdıkları fonksiyonlara göre kaliksarenlerin erime noktası değişmektedir.

Kaliksarenlerin eter ve ester türevlerinin erime noktaları türevi oldukları kaliksarenlerden daha düşüktür. Örneğin; *p-ter*bütilkaliks[4]aren'in erime noktası ortalama 342ºC olduğu halde, *p-ter*-bütilkaliks[4]aren'in tetra ester türevinin erime noktası ortalama 149-151°C arasındadır. Yine aynı şekilde *p-ter*bütilkaliks[6]aren'in erime noktası 380-381ºC, *p-ter*bütilkaliks[8]aren'in erime noktası ise 411-412ºC olmasına rağmen, heksa ester ve okta esterleri uygun olarak 235-236ºC ve 189-190 ºC'dir. (Arnaud-Neu, 1989)

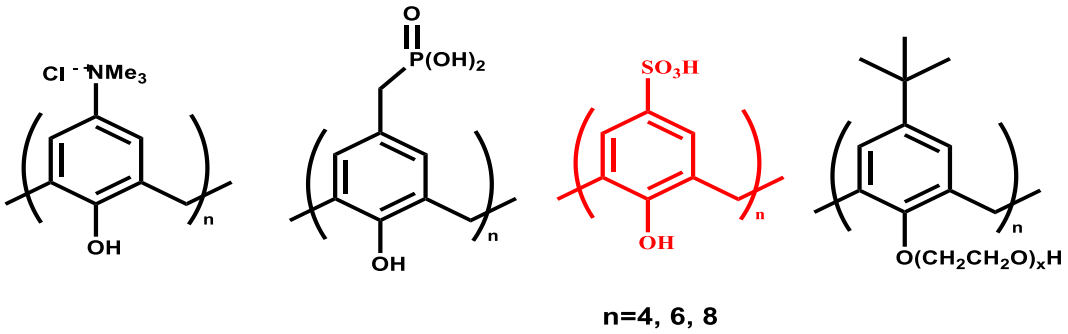
Çizelge 1.2 Kaliksaren ve türevlerinin erime noktaları.

Kaliksarenlerin erime noktaları	A	B	C	D	E	F
A- kaliks[4]aren	342-344º C	—	—	—	—	—
B- kaliks[6]aren	—	380-381º C	—	—	—	—
C- kaliks[8]aren	—	—	411-412º C	—	—	—
D- kaliks[4]aren tetraester	—	—	—	149-151° C	—	—
E- kaliks[6]aren heksaester	—	—	—	—	235-236°C	—
F- kaliks[8]aren oktaester	—	—	—	—	—	189-190 °C

1.1.5.2. Çözünürlük

Kaliksarenlerin organik çözücülerinin çözünürlükleri oldukça farklı etki göstermektedir. Genel olarak kaliksarenler kloroform, karbondisülfür ve pridinde yeteri kadar iyi çözünmektedirler. Uzun zincirli alkil grupları *para*- köşelerinden bağlandığında kaliksarenlerin çözünürlükleri artmaktadır. Örneğin eter ve ester türevlerinin bağlanması kaliksarenlerin organik çözücülerdeki çözünürlüklerini arttırır. Karışım halindeki kaliksarenler, sürekli ekstraksiyon ya da türevlendirme ile ayrıştırılabilir. Örneğin; iki karışım *p*-fenilkaliks[6]aren ve *p*-fenilkaliks[8]aren sürekli ekstraksiyon yöntemi ile birbirlerinden kolaylıkla ayrıştırılabilirler (Gutsche 1989).

Kaliksarenlerin genel olarak suda çözünmediği araştırmacılar tarafından kabul olunmuştur. Suda çözünmezlik kaliksarenlerin sulu çözeltilerdeki substrat-bağlanma için kullanımını engeller. Kaliksarenlerin daha geniş bir şekilde kullanılabilmesi için suda çözünebilen kaliksaren türevlerinin sentezlenmesi gerekmekteydi. İlk suda çözünebilen kaliksarenler Ungaro ve arkadaşlarının isimleriyle bağlıdır. Ungaro ve arkadaşları 1984 yılında suda çözünebilen *p-ter*-bütilkaliks[4]aren'in tetrakarboksilik asit türevini sentezlemiştir (Arduni 1984). Shinkai ve arkadaşları ise 1984 ve 1989 yıllarında uygun olarak *p*-sülfonatokaliks[6]aren, hem enzim mimik aktivitesi gösteren hem de anyonik moleküleriyle kuvvetli bağ yapabilen ilk katyonik kaliksaren türevini sentezleyerek suda çözünen kaliksarenler elde etmeyi başardılar. (Shinkai 1989). İlk suda çözünen kaliksarenlerden sonraki süreçte araştırmacılar suda çözünen kaliksaren türevleri ile ilgili yoğun araştırmalar yaparak birçok sonuç elde etmişlerdir (Şekil 1.12).



Şekil 1.12. Suda çözünen kaliksarenler

1.1.6. Kaliksarenlerin Kullanım Alanları

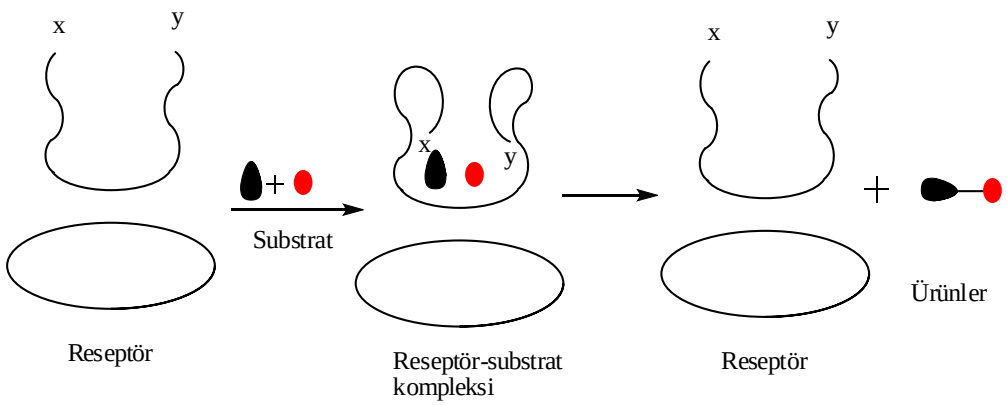
- ✓ Enzim-Mimik çalışmalarında kullanılımı
- ✓ Kaliksarenlerin molekül ya da iyon taşıyıcı olarak kullanılması
- ✓ Sensör (iyon seçici elektrot [ISE]) ve membran tekniklerinde kullanılımı
- ✓ Kolon dolgu maddesi olarak kromotografide (durgun faz olarak) kullanılımı
- ✓ Monolayer olarak kullanılımı
- ✓ Enzim immobilizasyonunda kullanılımı

1.1.6.1. Enzim-Mimik olarak kullanılan kaliksarenler

Kaliksarenler enzim-mimik özelliği kazanabilecek şekilde uygun fonksiyon gruplar ile fonksiyonlandırılırsa enzimin aktif bölgesi oluşturarak substratların katalitik olarak ürünlere dönüşmesini sağlayabilirler (Şekil 1.13).

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

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

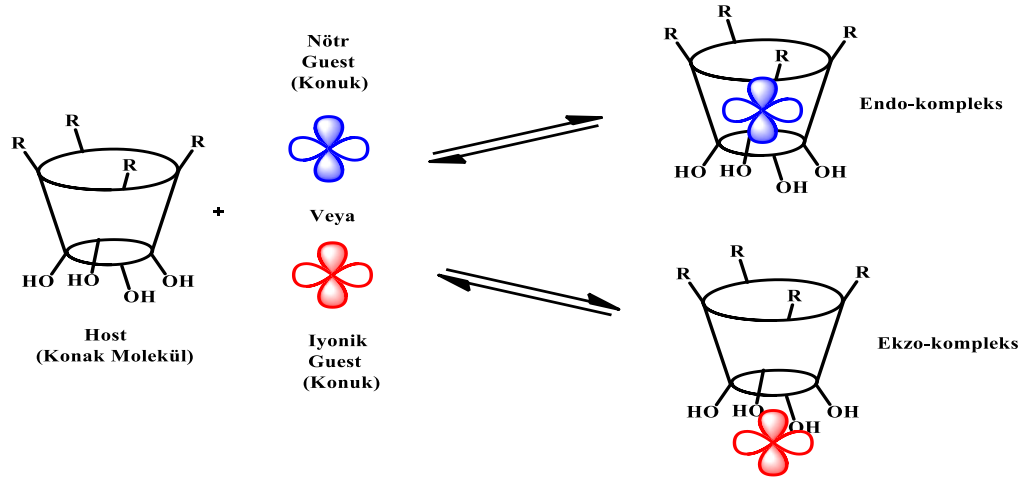


Şekil 1.13. Fonksiyonlandırılmış kaliksarenler üzerinde enzim modellerinin şematik gösterimi.

Enzim-mimik yapısının esas maksadı enzimin kaliksaren-bazlı aktif bölgelere sahip sentetik bir model oluşturarak, kaliksaren-bazlı enzimin taşıdığı fonksiyonel gruplar sayesinde substratlarla onları ürünlere katalitik olarak dönüştürmek için etkileşim kurmaktır.

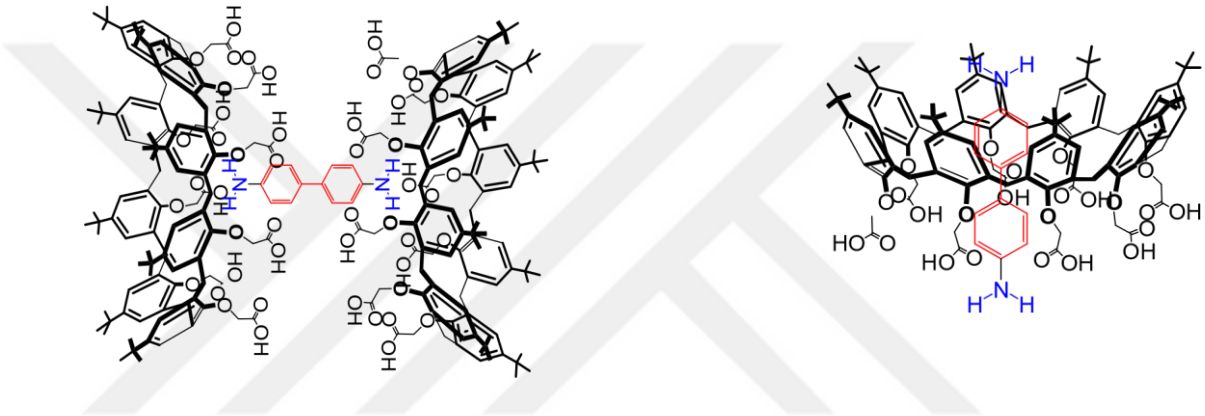
1.1.6.2. Molekül veya iyon taşıyıcı kaliksarenler

Bidiğimiz gibi kaliksarenler halkalı yapıda ve sepet gibi boşluklara sahip bileşiklerdir. Bu yapılarından dolayı farklı yapılara sahip birçok organik bileşik ve iyonlarla kolaylıkla kompleks yaparak iyon taşıma yeteneğine sahiplenmekteler. Bu yeteneğe sahip kaliksarenler molekül ve iyonlarla yaptıkları kompleksler endo- ve ekzo-kompleks şeklindedirler (Şekil 1.14).



Şekil 1.14. Endo ve ekzo komplekslerin görünümü

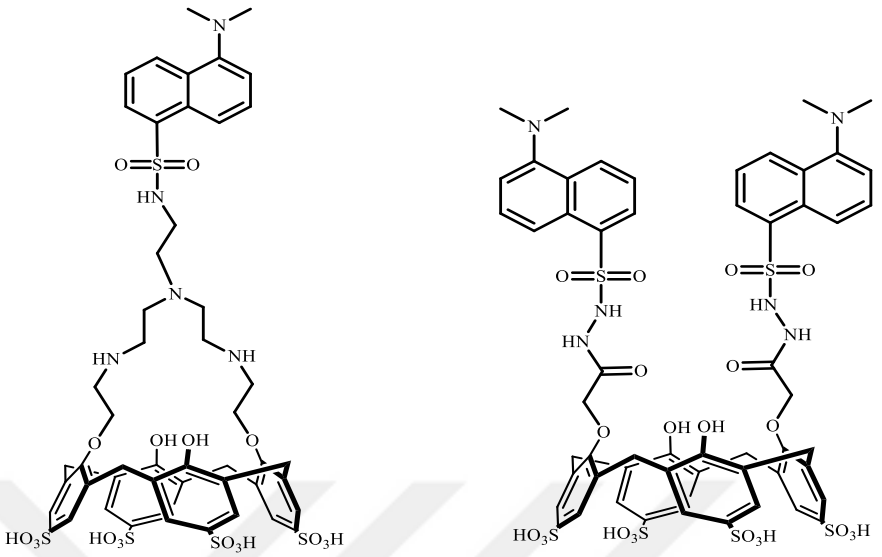
Kaliksarenlerin sık kullanılan diğer alanı taşıyıcı bileşikler olarak sulu çözeltideki toksik moleküllerin uzaklaştırılmasında kullanılmasıdır. Yilmaz ve grubu yaptıkları bir çalışmada p-ter-bütilkaliks[n]aren (n=6,8)' in ester ve asit türevlerinin bazı kanserojen aromatik bileşikler için iyi bir taşıyıcı olduklarını ve bulunan sonuçlara göre p-terbütilkaliks[8]aren-oktakarboksilik asit bileşiği tüm pH'larda aromatik aminlerle güçlü bir etkileşime girmektedir (Şekil. 1.15.)



Şekil. 1.15. p-ter-Bütilkaliks[8]aren-oktakarboksilik asidin benzidin ile kompleksleşme modeli

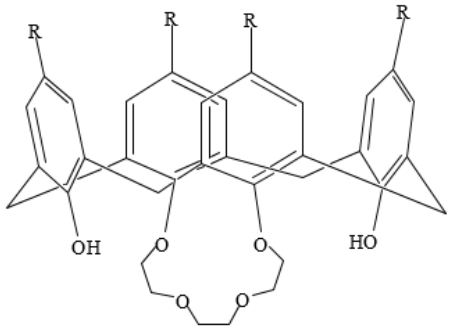
1.1.6.3. Kaliksarenlerin sensör ve membran tekniklerinde kullanılması.

Yılmaz ve grubu (Oguz ve ark., 2017) suda çözünebilen sülfo kaliks[4]aren dansil türevlerini sentezlemiş ve canlı hücrede Hg^{+2} sensörü olarak kullanmışlar. (Şekil 1.16).



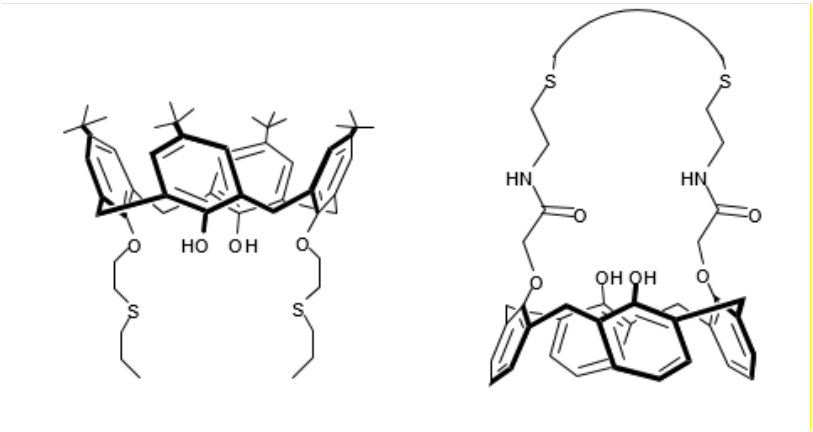
Şekil. 1.16. Sülfo kaliks[4]aren dansil türevleri

Yılmaz ve arkadaşları metal iyonlarının ekstraksiyon çalışmalarında iyon seçici bir elektrot olarak kullanılan kaliks-crown bileşiğini sentezlemişlerdir. Şekil 1.25'de hidrojen elektrot olarak kullanılan kaliksaren türevi görülmektedir (Şekil 1.17) (Demirel, A., 2004).



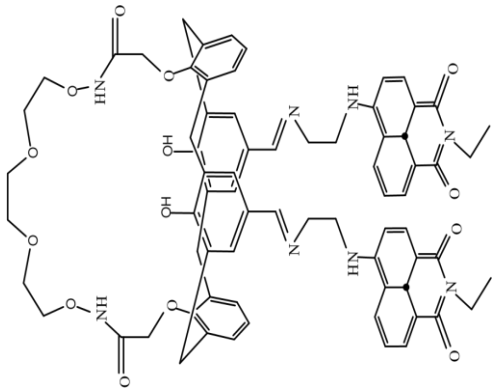
Şekil 1.17. Hidrojen elektrot olarak kalikscrown bileşiği

Wang ve ekibi, kaliks[4]areni fenolik-O üzerinden iki farklı fonksiyonel grupla etkileştirerek bunları film haline getirmişlerdir. Yapılan çalışmada filmlerin Ag^{+} ve Cu^{+2} iyonlarına karşı oldukça duyarlı olduğunu bulmuşlardır (Şekil 1.18) (Wang 2001).



Şekil. 1.18. Ag^{+} ve Cu^{+2} kaliksaren-sensörleri.

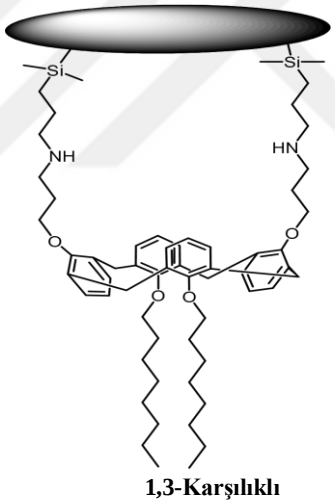
Sahin ve Yilmaz yaptıkları bir çalışmada yüksek floresans özeliği olan naftalimit kaliks[4]aren türevi sentezleyerek, seçimli metal iyonları arasında Cu^{+2} iyonuna karşı floresans etkisinin olduğunu belirlemişler. Bundan ilaveten, farklı metal iyonları (Na^{+}, Li^{+}, Mg^{+2}, Ni^{+2}, Ba^{+2}, Ca^{+2}, Cu^{+2}, Pb^{+2}, Zn^{+2}) ve anyonlarının (F^{-}, Cl^{-}, Br^{-}, $H_2PO_4^{-}$, NO_3^{-} , I^{-}, HSO_4^{-} , CH_3COO^{-}) floresans özelliklerini de incelemişlerdir. Sentezlenmiş naftalimit kaliks[4]aren türevi metal iyonları arasında sadece Cu^{+2} ile emisyon etkisine bakılmış ve en yüksek flöresans özellik gösterdiğini görmüşlerdir (Şekil 1.19) (Sahin ve Yilmaz 2012).



Şekil 1.19. Naftalimit kaliks[4]aren türevi

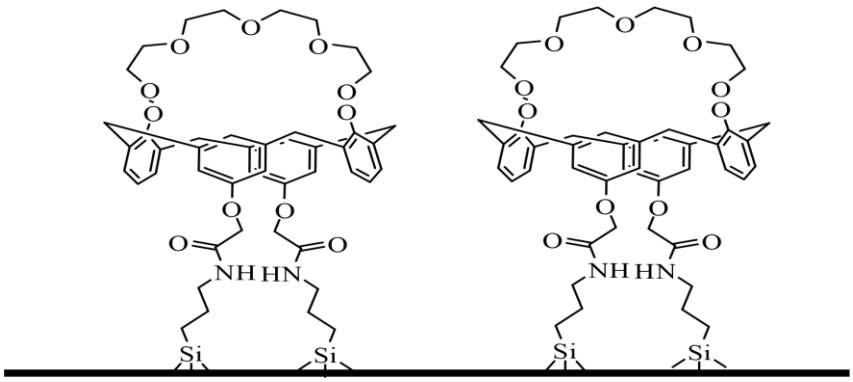
1.1.6.4. Kolon dolgu maddesi olarak kaliksarenlerin kromatografide kullanılması.

Erdemir ve Yilmaz, yapmış olduğu çalışmalarında 1,3 karşılıklı pozisyonunda olan 25,27-dioktiloksi26,28-bis-[3-aminopropiloksi]-kaliks[4]areni sentezlezlemişler. Daha sonra ise hazırladıkları 25,27-dioktiloksi26,28-bis-[3-aminopropiloksi]-kaliks[4]arena γ-kloropropilsilikajelle immobilize etmişler ve kaliksaren bazlı bir kolon dolgu maddesi hazırlamışlardır. Hazırlanan bu kolon bazı birçok bileşiklerin ayrılmasında kullanılmıştır. Örneğin, aromatik hidrokarbonların, fenolik bileşiklerin, aromatik aminlerin ve ilaçların ayrılma çalışmasında kullanılmıştır (Şekil. 1.20) (Erdemir ve Yilmaz 2010).



Şekil. 1.20. Kaliksaren bazlı kolon dolgu maddesi.

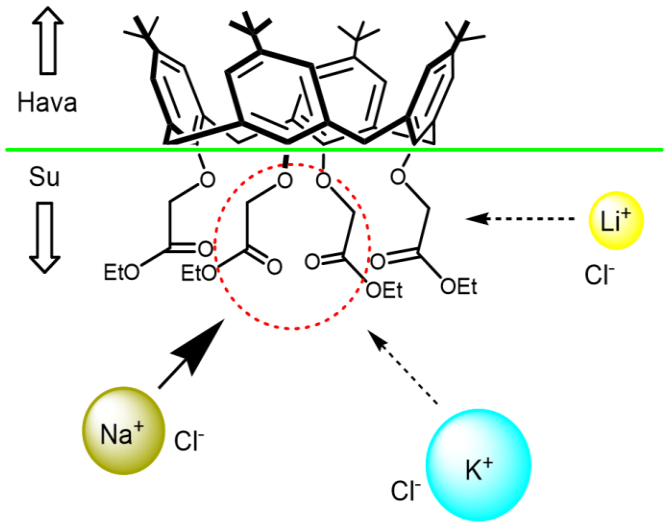
Yine Erdemir ve Yilmaz yaptıkları diğer bir çalışmada silikaya bağlanan yeni kaliks[4]crown-5 sentezlemiş ve aromatik aminler, fenoller ve bazı ilaçların ayrılmasında kullanmışlardır. Yaptıkları bu çalışmalarda aromatik aminler, fenoller ve ilaçlarda yüksek oranda seçimlilik gösterdiğini bulmuşlardır (Şekil 1.21), (Erdemir ve Yilmaz 2011).



Şekil 1.21. Silikaya bağlı kaliks[4]crown-5

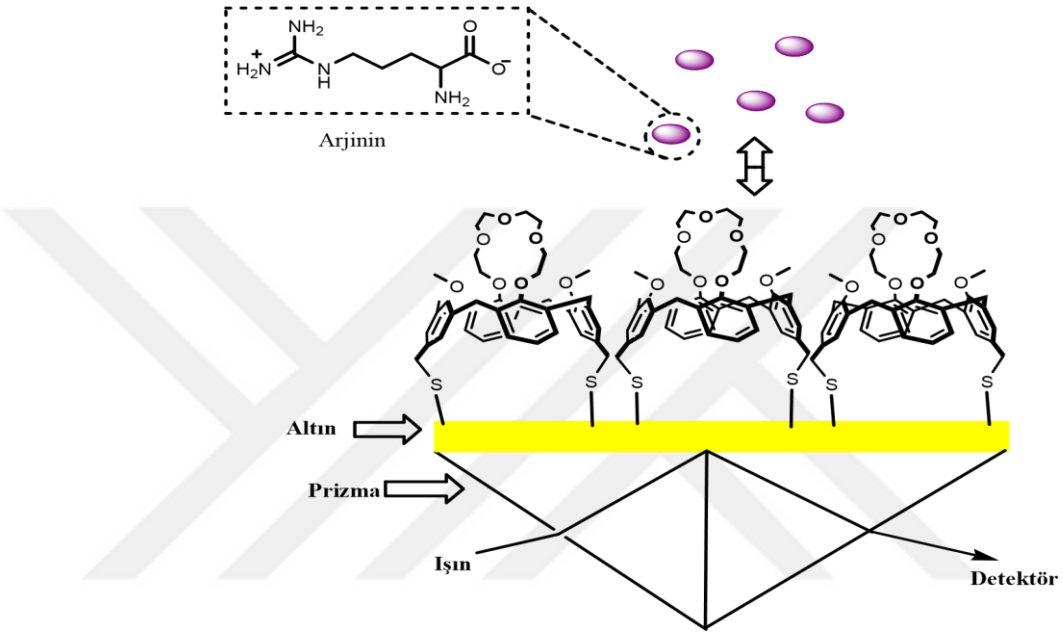
1.1.6.5. Monolayer olarak kaliksarenler

Ishikawa ve grubu kaliksarenlerin nötral suda kararlı monolyerler oluşturamadığını söylemişler. Bu kaliksarenlerin yapılarının kristal halde olduklarından dolayıdır, ancak bu bileşiklerin ester türevlerinin kararlı monolayer yapabildiklerini bilmişler. Buna ilaveten, bu monolayerlerin ilk kez alkali metal katyonlarına karşı tepkilerini incelemişlerdir. Sonuçlara göre hazırlanan bu monolayerin hava-su arasında konumlanarak seçimli metal-iyon kompleksleşmesi yapabildiklerini açıklamışlar (Şekil. 1.22.) (Ishikawa 1989).



Şekil. 1.22. Su-hava arasında konumlanan kaliks[4]aren-tetraesterin Na^+ ileseçimli kompleks oluşturması

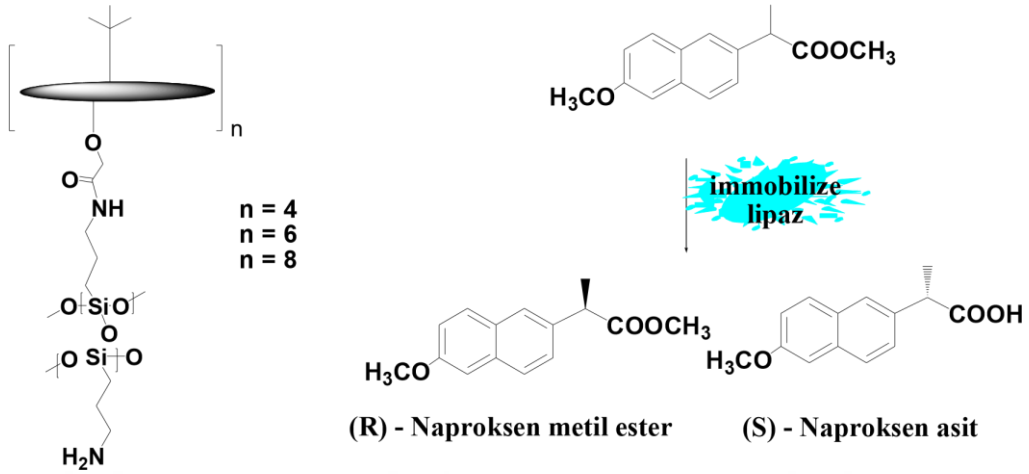
Chen ve ekibi, tiyol grubu taşıyan bir kaliks[4]crown eter bileşiğini sentezledikten sonra, altın yüzeyine immobilize etmişlerdir. Altın yüzeyindeki bu monolayer arjinin isimli bileşikle etkileşime girerek arjininin tanınmasında kullanılabileceğini açıklamışlardır (Şekil. 1.23.) (Chen 2011).



Şekil. 1.23. Arjinin sensörü

1.1.6.6. Enzim immobilizasyonunda kullanılımı

Erdemir ve arkadaşları, kaliks[n]aren-bazlı silika polimerlerini sentezleyerek bu polimerlerdeki serbest -NH_2 gruplarıyla lipaz enzimine kovalent bağla immobilizasyonu yaptılar. Lipaza kaliksaren immobilize ettikten sonra naproksen metil esterinin enantiyoseçimli tepkimesinde kullanıldı. Daha sonra serbest lipazla kıyaslayarak aktivitesinin ve dönüşümünün çok yüksek olduğu tespit edildi. Aktivite ve dönüşümünden başka, kaliksaren-immobilize lipazın serbest lipaza göre daha kararlılı ve enzimin tekrar kullanımının arttırıldığı bildirildi.(Şekil 1.24.) Erdemir ve Ark. (2009, 2012).

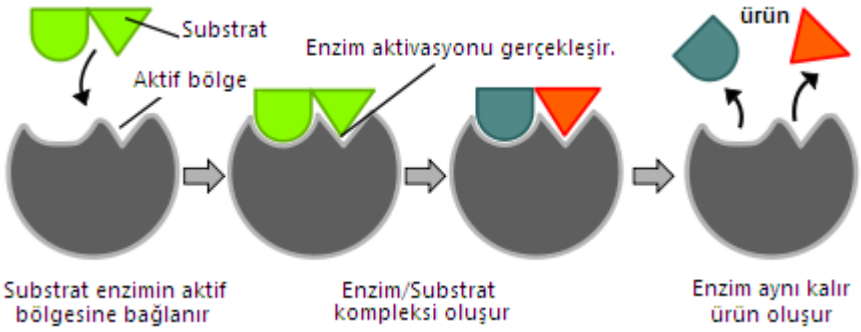


Şekil 1.24. kaliks[n]arenlerin lipaz immobilizasyonu

1.2 Enzimler ve Genel Özelikleri

Ortalama son otuz yılda birçok sanayi dalında uygulama alanı bulan enzimler, günümüzde yeni kullanım alanlarının ortaya çıkmasıyla giderek önem kazanmaya devam etmektedir (Telefoncu, 1986). Enzimler tarafından katalizlenerek yapılan reaksiyonlar kimyasal metotlara göre daha ucuz ve de daha basit olduklarından dolayı daha fazla kullanılmaktadır. Enzimler başta gıda, deterjan, eczacılık, tekstil ve kozmetik gibi birçok sanayi dalında yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir. (Jaeger, 1994; Jaeger 1999; Pandey1999)

Enzimlerin etki ettiği maddeye substrat olarak tanımlanmaktadır. Enzimin substratla bağlanan kısmı protein kısımdır. Enzim ile substratı arasında anahtar-kilit adlandırılan yüzey uyumu vardır. Bu nedenle enzimler tüm substratlara değil, sadece belirli substratlara etki ederler. Reaksiyon zamanı enzim substrata geçici olarak aktif merkezden bağlanarak Enzim substrat kompleksi oluşturur. Son aşamada ise substrat ürüne dönüşürken, enzim katalizatör olduğu için serbest kalmaktadır.



Şekil 1.25 Enzimlerin katalizatör olarak kullanımı

1.2.1 Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması

Günümüze kadar bilinen enzimlerin sayısı 700'den fazladır. Enzimler aktif veya inaktif farklılıklarına göre isimlendirilir. Enzim inaktif durumda ise substratının sonuna "jen" sözcüğü eklenerek örneğin pepsinojen şeklinde adlandırılır. Enzim aktif durumda olduklarında ise çözdükleri ve parçaladıkları substratın sonuna "ase=az" sözcüğü eklenerek ve katalizlediği reaksiyonun çeşidine göre isimlendirilir. Örneğin, selüloza katalizleyen enzim selülaz olarak isimlendirilir. Bundan başka, enzimleri substratın sonuna litik sözcüğü ekleyerek proteolitik gibi de adlandırabiliriz. Enzimlerin sayısının çok hızlı bir şekilde artması sebebiyle, enzimlerin sistematik adlandırılması ve sınıflandırılması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Günümüzde de kabul edilen adlandırılma ve sınıflandırılma sisteminin temeli International Union of Biochemistry (Uluslararası Biyokimya Birliği) tarafından 1964 yılında yayınlanan raporla oluşturuldu. Böylelikle, enzimler 6 ana sınıf olarak ayrıldı, bu altı sınıf da katalizlenen reaksiyon farklılığına göre alt sınıflara ayrılmaktadır:

Enzim sınıfı 1: Oksidoredüktazlar

Bu enzimler oksidasyon (yükseltgenme) ve redüksiyon (indirgenme) reaksiyonlarını katalizlemekteler. Yükseltgenme dediğimizde, bileşiğe oksijen vermekle veya bileşikten hidrojen ayırmakla "+" değerin artması anlaşılmaktadır. İndirgenme dediğimizde ise, bileşikten oksijen atomunu ayırmakla veya bileşiğe hidrojen atomu vermekle "+" değerin azalması anlaşılmaktadır.

Oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarını düzenleyen enzimler de 2 gruba ayrılmıştır.

- Dehidrogenazlar: Hidrojen taşıyan ve aktaran enzimlerdir. (Elektron kazandırıcı tepkimeleri etkilerler.)
- Oksidazlar: Elektron veren ve aktaran enzimlerdir. (Elektron kaybeden tepkimeleri etkilerler.)

Enzim sınıfı 2: Transferazlar

2.sınıf olan transferazlar, hidrojen dışında bir atomun veya atom grubunun (metil, karboksil, glikozil, amino, fosfat grupları) bir molekülden diğerine transferini sağlayan enzimlerdir. Örneğin, transaminaz, fosforilaz vb.

Enzim sınıfı 3: Hidrolazlar

Bu sınıf enzimler, su katılmasıyla bağların parçalandığı hidroliz tepkimelerinde kullanılan enzimlerdir. Hidrolazlar ester, peptit, asitanhidrit ve glikozidik gibi bağlara etki etmektedir. Bu enzimler genellikle iki grupa - C-N ve C-O bağlarına etki etmekteler. C-N bağlarına etki eden enzimler proteazlar (proteolitik enzimler), C-O bağlarına etki eden enzimlerse esterazlar ve karbohidrazlar olarak adlandırılır.

Enzim sınıfı 4: Liyazlar

4.sınıf enzimler olan liyazlar, oksidasyon yapmadan ve su molekülü çıkarmadan C-C, C-O, C-N ve C-S bağlarını kıran enzimlerdir. Örneğin aldolazlar ve dekarboksilazlar C-C bağlarını kolaylıkla ayırmaktalar.

Enzim sınıfı 5: İzomerazlar

İzomerazlar sınıfında yer alan razemaz, epimeraz izomerleri katalizleyerek molekül içinde değişiklik yaparak onun uzayda yapısını değiştiren enzimlerdir.

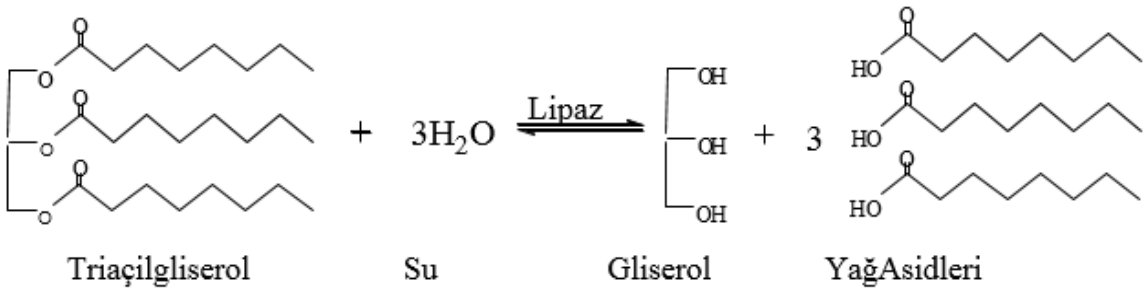
Enzim sınıfı 6: Ligazlar (Sentetazlar):

Ligazlar substrat moleküllerinin birbirine bağlanmasını sağlayan enzimlerdir. Keza, ligazlar, fosfatların yüksek enerjisinden yararlanarak karbon atomu ile C, O, S, N atomları arasında bağ oluşturan enzimlerdir.

Sistematik adlandırma sisteminde her bir enzim EC (enzim komisyon) tarafından verilen dört rakamdan oluşan kod numarasına ve tepkimeye girdiği reaksiyonu tanıtan sistematik isme sahiptir. Örneğin; ATP:glukoz fosfotransferazın EC kod numarası olan 2.7.1.1"de 2 - sınıf adını (transferaz); 7 - alt sınıfı (fosfotransferaz); 1 - akseptörün grubunu (−CH−OH); 1 - akseptör substratı (glukoz) göstermektedir (Nelson, 2004)

1.2.2 Lipazlar

Bazı bitkilerde, insan ve hayvansal organizmalarda ve mikroorganizmalarda bulunan ve hidrolazlar sınıfından olan lipazlar (triaçilgliserolaçilhidrolaz, EC 3.1.1.3) karboksilik ester bağlarını katalizlerler. Ayrıca lipazlar karboksilik esterleri, digliseridlere, monogliseridlere, serbest yağ asitlerine ve gliserole parçalarlar (şekil 1.26) (Houde, 2004)



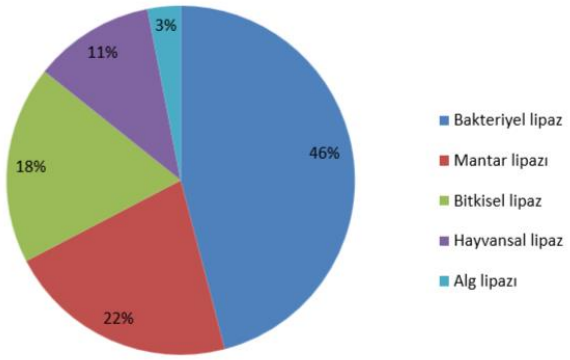
Şekil 1.26. Lipazların katalizlediği hidroliz reaksiyonu

Sonuç olarak lipazlar suda çözünebilen bileşiklerdir, bu nedenle de lipaz enzimleri suda çözünmeyen substratlar için önemli rol oynamaktadırlar. (Beisson, 2000) Ayrıca, lipazların yüksek sıcaklık ve pH'da ve organik çözücülere karşı yüksek oranda kararlılık göstermeleri lipazlara olan ilgini ve araştırma çalışmalarını artırmıştır. (Paiva, 2000; Villeneuve, 2000)

1.2.2.1 Lipaz Kaynakları

Lipaz kaynakları 5 gruba ayrılabilir; bakteriler, mantarlar, bitkiler, hayvanlar ve algler. Mikrobiyal lipazlar ticari olarak diğer kaynaklardan daha önemli yer tutmaktadır. Bunun nedeni mikrobiyal lipazların ucuz üretim maliyeti, daha fazla ulaşılabilirliğinin ve yüksek stabilitesinin olmasıdır. Bakteriyel lipazları hayvansal ve bitkisel kaynaklardan elde edilen lipazlarla kıyaslarsak ilk lipazlar daha fazla çalışılmıştır. Endüstride kullanılan temel kaynak lipazların dağılımı şekil 1.28'de gösterilmiştir. Organizmaların büyüme ve

gelişmesi karbon, azot, fosfor ve birçok mineral tuzlara bağlı olduğu halde, lipazlarda ise genellikle trigliserid, safra tuzları ve gliserol gibi indükleyicilere bağlıdır. Endüstride önemli role sahip olan ve ilk çalışılan lipaz Pseudomonas'tan elde edilen lipazdır. (Öztürk, 2002)



Şekil 1.27. Endüstride kullanılan lipazların biyoçeşitliliği

Bazı lipazlar ve üretim kaynakları çizelge 2.3.de gösterilmektedir.

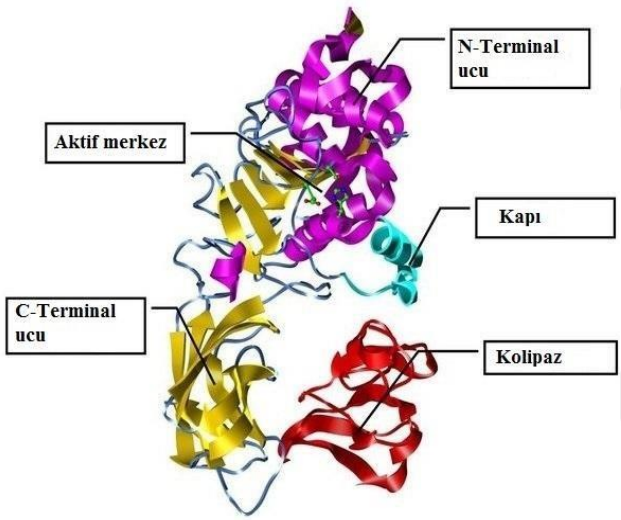
Çizelge 2.3. Çeşitli Mikroorganizmalarda en Uygun Lipaz Üreten Karbon Kaynakları (Yağlar)

Mikroorganizma	En uygun lipaz üreten yağ
Bacillus A30-1 (ATCC 53841),	Mısır yağı ve zeytinyağı
Rhodotorula glutinis	Zeytinyağı ve palmiye yağı
Rhizopus oryzae	Kolza tohumu ve mısır yağının
P. alcaligenes M-1	Sitrik asit ve soya yağı
P. aeruginosa'nın KKA-5	Hint
P. mephitica	Zeytin yağı, yer fıstığı yağı, pamuk yağı ile oleik asit, linoleik asit ve linolenik asit
Ophiostoma piceae	Zeytin, soya fasulyesi, ayçiçeği, susam pamuk, mısır yağı ve yer fıstığı yağı

1.2.2.2. Lipaz Enziminin Üç Boyutlu Yapısı

Lipazların tepkimelerde nasıl kataliz ettiği X-ışını kristallografisi ile belirlenmesine kadar açıklanamıyordu. Böyleki, lipaz sınıfından olan domuz pankreatikin yapısı X-ışını

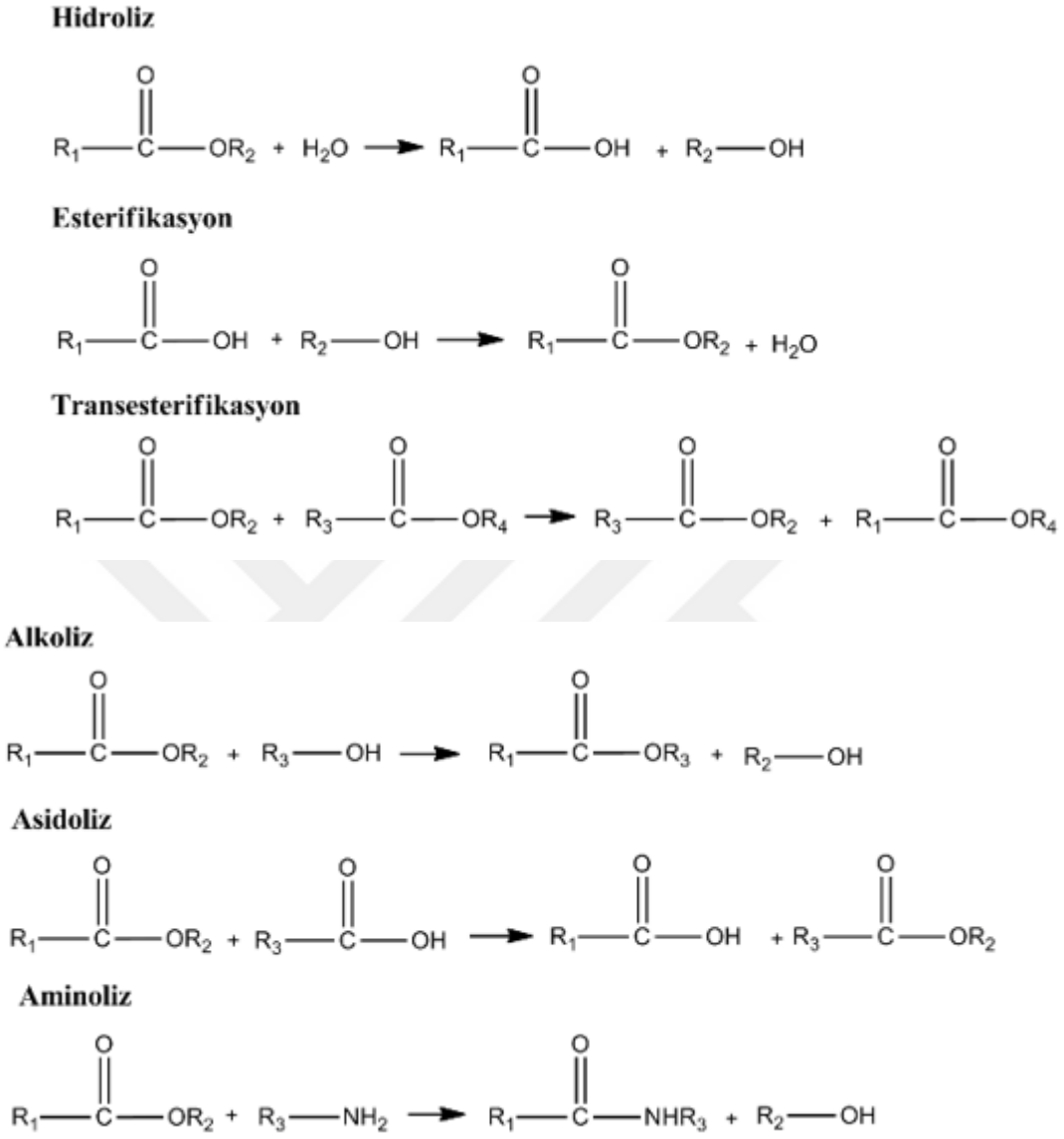
kristallografisi ile belirlendikten sonra reaksiyonlarda lipazların nasıl kataliz etdiği çözülmüştür. Pankreatik lipazın katalizatör rolünü oynamak için yapısı oldukça uygundur. İnsan pankreatik lipazıyla domuz pankreatik lipazı bir birine çok benzemektedir. İnsan pankreatik lipazı 465 amino asit, domuz pankreatik lipazı ise 449 amino asit içermektedir. X-ışını kristallografisi ile belirlenen domuz pankreatik lipaznın 3 boyutlu yapısı şekil 1.28'de gösterilmiştir



Şekil 1.28. X-ışını kristallografisi ile belirlenen domuz pankreatik lipazının 3 boyutlu yapısı

1.2.2.3. Lipazların Katalizlediği Kimyasal Reaksiyonlar

Lipazlar su ortamında hidroliz reaksiyonlarına girmekteler. Bundan başka lipazlar, susuz ortamlarda esterifikasyon, interesterfikasyon, transesterifikasyon, alkoliz, asidoliz ve aminoliz gibi tepkimeleride katalizleme yeteneğine sahipdirler. (Şekil 1.29)



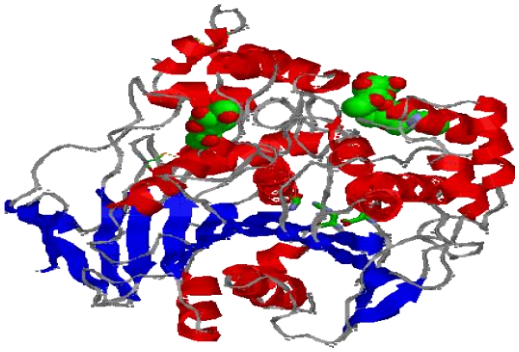
Şekil 1.29. Lipazların sulu ve susuz ortamlarda katalizlediği reaksiyonlar

1.2.2.4. *Candida rugosa* lipaz

Son yıllarda biyoteknolojik proseslerin birçok alanlarında kullanılan ve mikroorganizmalar tarafından üretilen hücredışı lipazlar (EC 3.1.1.3) daha fazla araştırılmaktadır (Benjamin 1997; Benjamin 1998a; Benjamin 1998b) Bu araştırmalar sonucu biyoendüstride önemli paya sahip olan *Candida rugosa* lipaz (CRL) ortaya çıkarmıştır. (Benjamin 1996; Alberghina, 1991)

CRL genellikle lipazların tepkimeye girdiği reaksiyonlarda kullanılmaktadır. Örnek olarak, iç-esterifikasyon, trans-esterifikasyon sterospesifik ve spesifik olmayan hidrolizler gibi reaksiyonlar. (Benjamin, 1998b; Jaeger, 1994; MacRae, 1985) *Candida rugosa* lipazıları yiyecek katkıları olarak, aroma ve lezzetin sentezi için, günlük yiyecek endüstrisinde, deri endüstrisinde, deterjan üretiminde geniş çapta kullanılmaktadırlar. (Ha, 1993; Yunus, 1996; Misset, 1994) Bunlara ilaveten, biyo-böcek zehirleri ve biyofarmakolojilerde kimyasalların eldesinde de *Candida rugosa* lipazıları kullanılmaktadır (Bosetti, 1994; Franssen, 1996) CRL ile birçok amino asit türevi ve karbonhidrat esterlerinin sentezi yapılmıştır (Lalonde 1995; Park, 1996) Bunlardan başka, *Candida rugosa* lipazıları tıp alanında biyosensörler gibi, yağlı tohumlar ve endüstriyel organizmalardan lipitleri ekstrakte ve hidroliz etmek için, lipitli suların, fabrika ve restoran atıklarının biyolojik yoldan arıtmasında sık sık kullanılmaktalar (Haalck, 1991; Schoemaker, 1994; McArdle., 1994; Benjamin, 1998b; Sztajer, 1988)

Kimyasal bileşiklerin 3 boyutlu yapıları X-ışınları kristalografisi ile görüntülenebilmekteler. *Candida rugosa* lipazının kristal yapısını şekil 1.30'da görülmektedir



Şekil 1.30. X-ışını kristallografisi ile belirlenen *Candida rugosa* lipazının 3 boyutlu yapısı

1.2.2.5. Lipazların optimum pH'ı

Lipazlar belirli pH aralığında katalitik olarak tepkimelere girmekteler. Birçok lipazlar için optimum pH 7-9 arasında değişmektedir (Öztürk, 2001) Genellikle

mikrobiyolojik kaynaklı lipazlar yüksek kararlılığı pH 6,0–7,5 aralığında göstermekteler. Örneğin, mikrobiyolojik kaynaklı lipazlardan *Pseudomomas* lipazı daha yüksek aktiviteyi pH 7,0'de göstermektedir. Bakteriyel lipazlardan bazılarının yüksek kararlılıkta olduğu pH'ları Çizelge 1.4.'de gösterilmiştir (Öztürk, 2001; Fadıloğlu, 1996)

Çizelge 1.4. Mikrobiyal lipazların optimum pH'ları

Kaynak	Substrat	Optimum pH
C. cylindracea	Zeytin yağı	5.0-7.0
	Tribiturin	7.0
P. fluorescens	Susam yağı	7.0
Bacillus spp.	Zeytin yağı	5.5-7.2
G. Candidum		
Lipaz I	Zeytin yağı	8.0
Lipaz II	Zeytin yağı	6.0
H. lanuginosa	Zeytin yağı	7.0
P. nitens	Zeytin yağı	6.0

1.2.2.6. Lipazların optimum sıcaklık ve termal kararlılığı

Lipazların optimum sıcaklıkları iki faktör ile etkilenir. İlk faktörde lipazların optimum sıcaklığı onların primer yapısına göre değişmektedir. Lipazlarda hidrofobik özelliğe sahip amino asitlerin yüksek içeriği dışarıdan gelen bir değişiklik ile kolaylıkla denatüre olmayan sıkı bir yapı sağlamaktalar. (Öztürk, 2001) Hücre dışı mikrobiyal lipazlar olan *Aspergillus niger* ve pankreatik lipazları 40-50ºC'de dayanıklıdırlar, sıcaklık yükseldiğinde ise aktivitleri kaybolur. Çizelge 1.5.'de bazı mikrobiyal lipazların optimum sıcaklık ve termal kararlılığı gösterilmiştir (Öztürk, 2001; Fadıloğlu, 1996)

Çizelge 1.5. Hücre dışı mikrobiyal lipazların optimum sıcaklık ve termal stabilitesi

Kaynak	Optimum Sıcaklık (°C)	Stabilite (°C)
P. fluorescens	45	-
P. nitens	40	40 (10 dak.)
Bacillus spp.	60	65 (30 dak.)
C. deformans	40-50	-
G. candidum	40	55 (15 dak.)
S. thermophilus	45	45 (1 hafta)
H. lanuginosa	45-55	65 (60 dak.)
C. viscosum	65	60 (10 dak.)
S. faecalis	40	40 (10 dak.)
C. rugosa	30-35	-

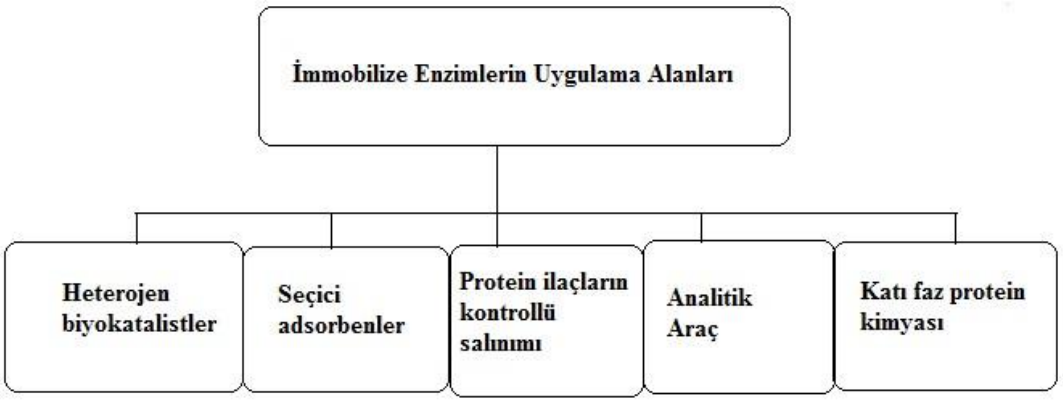
1.2.2.7. Lipazların Kullanım Alanları

Lipazlar gıda, kozmetik, ilaç, deri vb. sanayiler gibi birçok alanlarda kullanıma sahiptir. Bu enziminlerin kullanım alanları çizelge 1.6'da verilmiştir.

Çizelge 1.6. Mikrobiyal lipazların sanayide önemli kullanım alanları

Sanayi Dalı	Etki	Ürün
Unlu mamuller	Lezzet arttırıcı, raf ömrü uzatıcı	Unlu mamuller
İçecek	Aroma geliştirici	İçecekler
Kimya	Enantiyo seçicilik	Kiral kimyasallar
Temizleme	Sentez Hidroliz	Kimyasallar Sörfektanlar gibi temizleme Ajanlarının uzaklaştırılması
Kozmetik	Sentez	Emülsifiye ediciler, Nemlendirme ajanları
Süt ve süt mamulleri	Süt yığının hidrolizi Peynirin olgunlaştırılması Tereyağın modifiye edilmesi	Lezzet ajanları Peynir Tereyağı
Katı ve sıvı yağlar	Transesterifikasyon Hidroliz	Kakao yağı, margarin Yağ asitleri, gliserol, mono ve digliseridler
Soslar	Kalite geliştirilmesi	Mayonez, krema
Sağlıklı gıdalar	Transesterifikasyon	Sağlıklı gıdalar
Deri	Hidroliz	Deri ürünleri
Et ve balık	Lezzet geliştirilmesi ve yağın uzaklaştırılması	Et ve balık ürünleri
Kağıt	Hidroliz	Kağıt ürünleri
Eczacılık	Transesterifikasyon	Özellikle lipitler Sindirim destekçileri

1950'lerden günümüze kadar, immobilize enzimlerin gelişmesinde bir çok araştırmalar yapılmıştır (Silman 1966) Örneğin, maliyetini azaltma amacı ile tekrar kullanılabilen heterojen biyokatalizörler, dayanıklı ve tekrar kullanılabilen araçlar, analitik ve medikal uygulamalar için, seçici adsorbentler protein ve enzimlerin saflaştırılmasında kullanılmışlardır (Cristallini, 1997; Bickerstaff, 1984; Martinek, 1985; Vandamme, 1983; Schulze, 1999; Stetter, 1951; Clark 1962; Campbell, 1951; Watanabe, 1988; Chang, 1977; Klein, 1986; Dunlap, 1974; Kircka, 1986 (Şema 1.1).



Şema 1.1. İmmobilize enzimlerin uygulama sırası

Araştırmalar sonucu günümüzde yaklaşık olarak bilinen 4000 enzimden 200'ü ticari olarak kullanılmaktadır (Sharma 2001) 200'e kadar olan ticari enzimler içerisinde %3'ü lipazların payına düşmektedir biyoteknolojik araştırmalarda çok fazla kullanılmaktadırlar (Ghosh 1996) Bildiğimiz gibi lipazlar, hem sulu hem de susuz çözeltilerde aktivite göstermekteler. (Gupta 2004; Nie 2006) Bu nedenle de sanayide ve tıp dallarında lipazlar önemli rol oynamaktalar (Bjokling 1991) Çizelge 1.7'de biyoteknoloji alanında yaygın olarak kullanılan lipazlardan bazıları gösterilmiştir (Kazlauskas 1998; Schmid 1998)

Çizelge 1.7. Kullanımı yaygın bazı ticari mikrobiyal lipazlar

Tip	KAYNAK	UYGULAMA ALANI	ÜRETİCİ FİRMA
Fungal			
	C. rugosa	Organik sentez	Amano, Biocatalysists, Boehringer Mannheim, Fluka, Genzyme, Sigma
	C. antarctica	Organik sentez	Boehringer Mannheim
	T. lanuginosus	Deterjan katkısı	Boehringer Mannheim, Novo Nordisk
	R. miehei	Gıda işlenmesi	Novo Nordisk, Biocatalysists, Amano
Bakteriyel			
	B. cepacia	Organik sentez	Amano, Fluka, Boehringer Mannheim
	P. alcaligenes	Deterjan katkısı	Genencor
	P. mendocina	Deterjan katkısı	Genoncor
	Ch. Viscosum	Organik sentez	Asahi, Biocatalysists

1.2.2.7.1. Gıda endüstrisinde lipazlar

Lipazlar pek çok alanda kullanıldığı gibi gıda endüstrisinde de önemli paya sahiptir. Günümüzde doğal ürünlere olan talebin artmasıyla gıda sanayinde kimyasal işlemler yerine enzimler daha çok gündemeler. (Benjamin 1998b) Böyleki, lipazlar peynir, tereyağı, kremalar, kahve beyazlatıcıları, şekerler, hamurlar, çorbalar ve unlu mamuller ve s. gibi üretimlerde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Gıda endüstrisinde lipaz enzimlerinin yardımıyla bitkisel ve hayvansal yağları biyokataliz ederek peynirlerinde tat oluşturma veya tat iyileştirme gibi işlemler yapılmaktadır. (MacRae 1994) Günümüzde büyük bir pazara sahip dondurmalar kısa veya orta zincirli yağ asitleri olan esterler içermektedir. Bildiğimiz gibi lipazların katılımı ile ester değiştirme reaksiyonları katalizlenebilmektedir. Dondurmalarda ester değişimi ile katalizlenen kısa veya orta zincirli yağ asitleri içeren esterleri üretmek için birçok araştırmacılar tarafından incelenmiştir (Langrand 1990; Takahata 1993; McCrae 1990)

1.2.2.7.2. Deterjan endüstrisinde lipazlar

Genel lipaz satışının % 32'sini lipazların en önemli ticari uygulamaları başında gelen deterjan enzimlerin payına düşmektedir (McCrae 1990; Akkuş 2006) Lipaz enzimini ilk kez 1913'de Rohm ve Hass şirketinin kurucusu Otto Rohm bir çamaşır deterjanının etkisini artırmak maksadıyla kullanmıştır. Bilindiği gibi deterjanlarda istenmeyen kimyasal maddeler bulunmaktadır, enzimler deterjanlardaki istenmeyen kimyasalların azaltılmasını sağlar. Bundan başka, enzimler sayesinde yıkama sıcaklığı azaltarak enerji tasarrufunu da düşürür (Karaca 2006) Lipazlar kolaylıkla yağları katalizleyerek hidrolizleme yeteneğine sahiptirler. Bu nedenle lipazlar sanayide ve evlerde kullanılan günlük deterjanlarda ilave katkı maddesi olarak vazgeçilmezlerdendir. Ayrıca lipazlarla beraber selulaz, amilaz, proteazlar da deterjan uygulamalarında kullanılmaktadırlar (Pandey 1999).

1.2.2.7.3. Deri endüstrisinde lipazlar

Deri üretiminde post ve deri işleme işlemleri yapılmaktadır. Bu işlemler yapıldığı zaman deri altı yağlarının kaldırılması, kılların ayıklanması ve doldurma işlemleri gerekmektedir. Deri altı yağların hizrolizi ve s. diğer işlemlerin yapılmasında lipaz enzimleri sıkça kullanılmaktadır. (Pandey 1999; Tümtürk 2006)

1.2.2.7.4. İlaç endüstrisinde lipazlar

İlaç endüstrisinde büyük hedeflerinden biri biyoaktif bileşikleri oluşturmaktır. Kullanılan bu biyoaktif maddeler lipazların yardımıyla katalizlenerek yapılmaktadır. İlaçların üretimde kataliz rolünü oynayan lipazların önde gidenlerinden biri de CRL lipazlardır (Çizelge 1.8) (Benjamin 1998) Biyokimyasal inhibitörler, ilaç ara ürünleri, antibiyotikler, sekonder alkoller ve alkoloidlerin enantiyospesifik sentezi için ve birçok ilaçların hazırlanmasında lipazlar kullanılmaktadırlar.

Çizelge1.8.CRL-katalizlenmiş bazı ilaçlar

Hedef	**İlk hali**	**Reaksiyon**	**Referans**
Ibuprofen	Yağ alkolü	Esterifikasyon	Goto ve ark. 1996
Aspirin gibi ilaçlar	Astoksi ve feniletilbenzoatlar	Hidroliz	Cipiciani ve ark. 1996
Asetik asit türevleri	□-bağlı asetik asit ve metil esterler	Hidroliz	Noya ve ark. 1996
Prostaglandin	Çoklu doymamış yağ asitleri	Hidroliz	Wille 1996
Naproksen	Trimetil silil metanol	Esterifikasyon	Stinson 1995, Tsai ve ark. 1996
Ketoprofen	(R,S) kloroetil ketoprofen	Hidroliz	Lalonde 1995
İnhibitör ilaçlar	Trikarboksilik asit Alkenil ester	Esterifikasyon	Seufer-Wasserthal ve ark., 1995
Propaloaminler	Epoksit ve 2propilamin	Esterifikasyon	Kamal ve Rao 1994
Anti-HIV carbovir	Azobisiklo hepten-ones	Esterifikasyon	Nakano ve ark. 1994

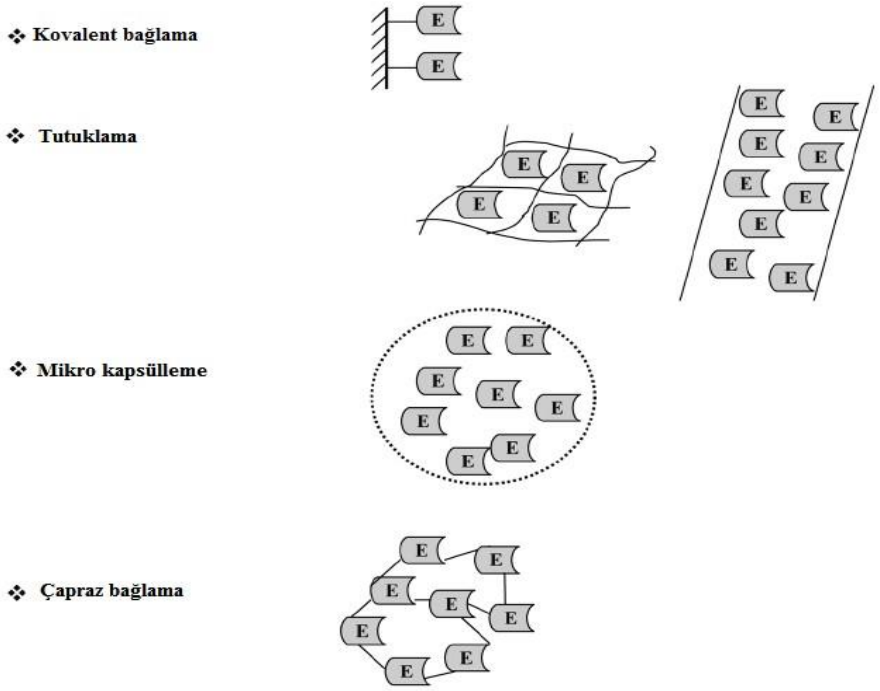
1.3. Enzim İmmobilizasyonu

Lipaz enzimlerinin katılımıyla triaçilgliserole istenilen bir pozisyondan açil grublarının bağlanması yapılabilmektedir. Lipazlarla yapılan hidroliz, düşük sıcaklıkta ve çözücüsüz veya organik çözücülü bir ortamda yapılan işlemdir. Lipazların fiyatlarının yüksek olması nedeniyle onların biyokataliz reaksiyonlarında tekrar kullanılabilirliği ilgi çekmektedir. İmmobilizasyon zamanı lipazlar katalizatör olduklarından dolayı fiziksel olarak reaksiyon ortamından geri kazanılarak tekrar kullanıma sahiptirler. Buna ilaveten lipazların, pH ve sıcaklığa karşı kararlılıkları, kolay geri kazanım, reaksiyon zamanı oluşan maddelerin yaptığı inhibisyonun azalması gibi reaksiyon ortamları için faydalar sağlamaktadır.

1950'lerden beri, immobilize enzimlerin geliştirilmesinde çok sayıda çalışmalar yapılmıştır. Bazılarının patentli olduğu enzim immobilizasyonları hakkında 5000'nin üzerinde yayın bulunmaktadır (Cao 2005). Serbest enzime kıyasla immobilize enzimler çevre koşullarına karşı dayanıklılığı, reaksiyon sonunda kolayca uzaklaştırılabilirliği, birçok kez kullanılabilirliği gibi birçok üstünlüklere sahiptir (Telefoncu 1997).

1.3.1. İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzimler belirli bir taşıyıcıya farklı yöntemlerle immobilizasyonu gerçekleştirebilirler. Örneğin; adsorpsiyon, tutuklama, kovalent bağlama, mikro kapsülleme ve çapraz bağlama (Şekil 1.31). Bu temel yöntemleri kaynak edinerek yüzlerce farklı yöntem geliştirilmiştir (Brena 2006).



Şekil 1.31. Temel enzim immobilizasyon yöntemleri

Kovalent bağlama, en çok kullanılan immobilizasyon yöntemlerindendir. Kovalent bağlama yönteminin bir avantajı, enzim ve destek madde arasında sağlam bağ yapmasıdır. Bu nedenle enzim immobilize zamanı kullanılan çözeltiye salınmaz (Brena 2006) Destek maddesinin enzime bağlanması sırasında önemli olan nokta, kovalent bağlanmanın enzimin aktivite gösterdiği gruplar üzerinden bağlanmaması ve bağlanma sırasındaki sterik engeller yaratarak bu grupların rahatsız edilmemesidir. Enzimlerle taşıyıcılar arasında kovalent bağlama enzimlerdeki amino asitlerin taşıdığı fonksiyonel gruplarla gerçekleşir (Telefoncu 1997)

Adsorpsiyon: En eski ve en basit yöntemlerden olan adsorpsiyon yöntemi yüzey aktif, suda çözünmeyen bir taşıyıcının enzim çözeltisi ile immobilize edilmesi ve enzimin immobilize olunmayan kısmının iyice yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanmaktadır. Adsorbsiyon yöntemiyle immobilizede enzimin maddeye bağlanması Van der Waals kuvvetleri ile gerçekleşmektedir. İmmobilizenin gerçekleşmesi pH, çözgen, iyon şiddeti, enzim-adsorban oranı ve sıcaklık gibi bazı faktörlere bağlıdır (Telefoncu 1997)

Çapraz baglama: Fonksiyonel gruplara sahip küçük moleküllü taşıyıcıların enzim moleküllerine bağlanarak suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlayan yöntemdir. İmmobilizasyonun başarılı olması sıcaklık derecesi, protein ve reaktif konsantrasyonu, pH ve enzim-substrat oranı gibi faktörlerde bağlıdır.

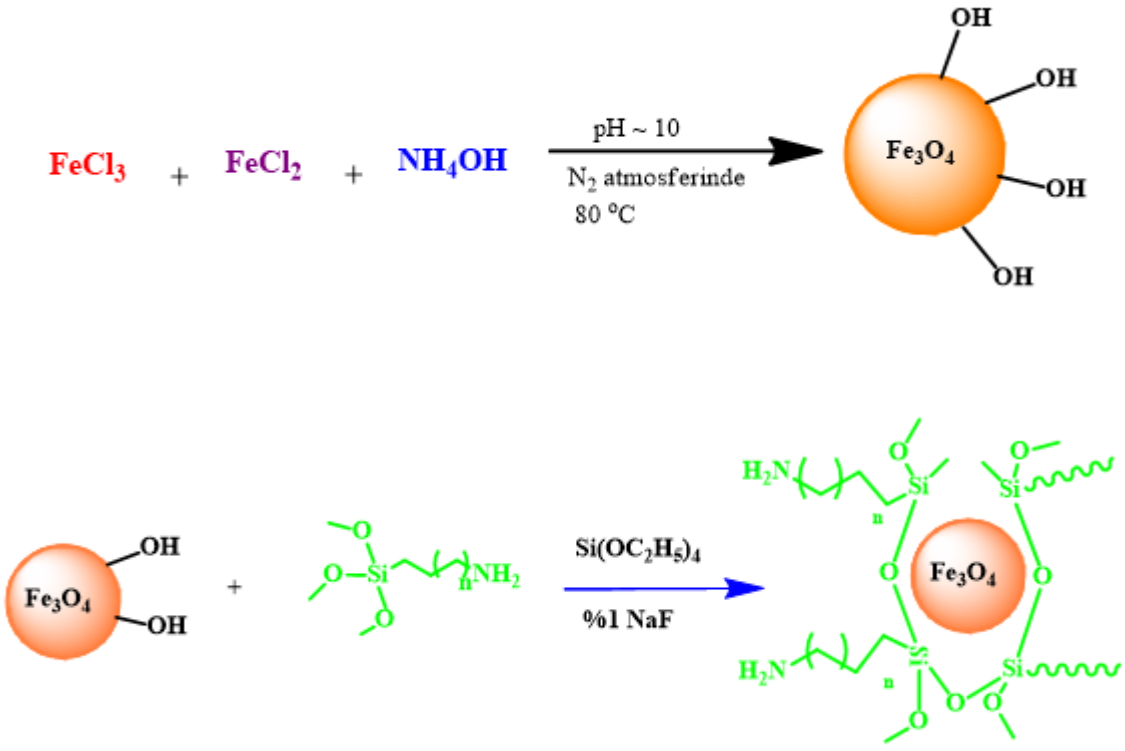
Çapraz bağlanma yönteminde glutaraldehit, klorformat ve karbonildiimizadol, heterosiklik halojenürler, divinilsulfonlar, bioksiranlar, pbenzokinon, transizyon metal iyonları, epiklorhidrinler gibi reaktifler en çok kullanılanlar arasındadır (Telefoncu 1997)

Tutuklama yöntemi: Enzimin ve substratın tutularak polimerik bir matrikse hapsedilmesi halinde gerçekleşen immobilizasyon yöntemidir. Enzimlerden farklı olarak substrat ve oluşan ürünler polimerik matriksin içinden geçebilmekteler. Enzimlerle destek madde arasında kimyasal bağ oluşmadığında tutuklama yöntemiyle kolaylıkla matrikse hapsederek immobilize edilebilinir. (Brena 2006) Bu yöntemde taşıyıcı madde olarak alginat, karagenan, agaroz, poliakrilamid, jelatin, pektin, kitin veya kitosan gibi materiyaller kullanılabilir. (Benjamin 1997)

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

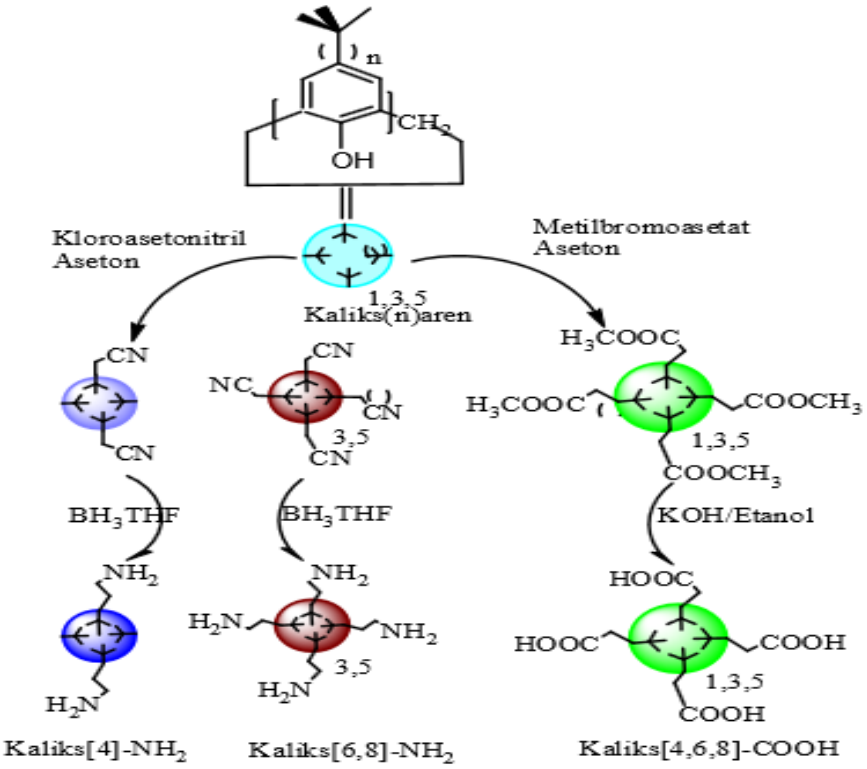
Birçok bilim adamlarının dikkatini çeken supermanyetik nanopartiküller son yıllarda destek maddesi gibi kaliksarenlerin kullanıldığı lipaz immobilizasyon çalışmaları sıkça görülmektedir.

Giardine ve ark. (2005), çalışmalarında çıkış maddeleri $FeCl_2$ ve $FeCl_3$ olan tuzlardan yola çıkarak Fe_3O_4 manyetik nanopartiküleri sentezlemişlerdir. Daha sonra ise hazırladıkları nanopartiküllerini amino alkil trimetoksisilan bağlayarak silika-bazlı alkil amino Fe_3O_4 manyetik nanopartikülleri sentezlemişlerdir (Şekil 2.1.)



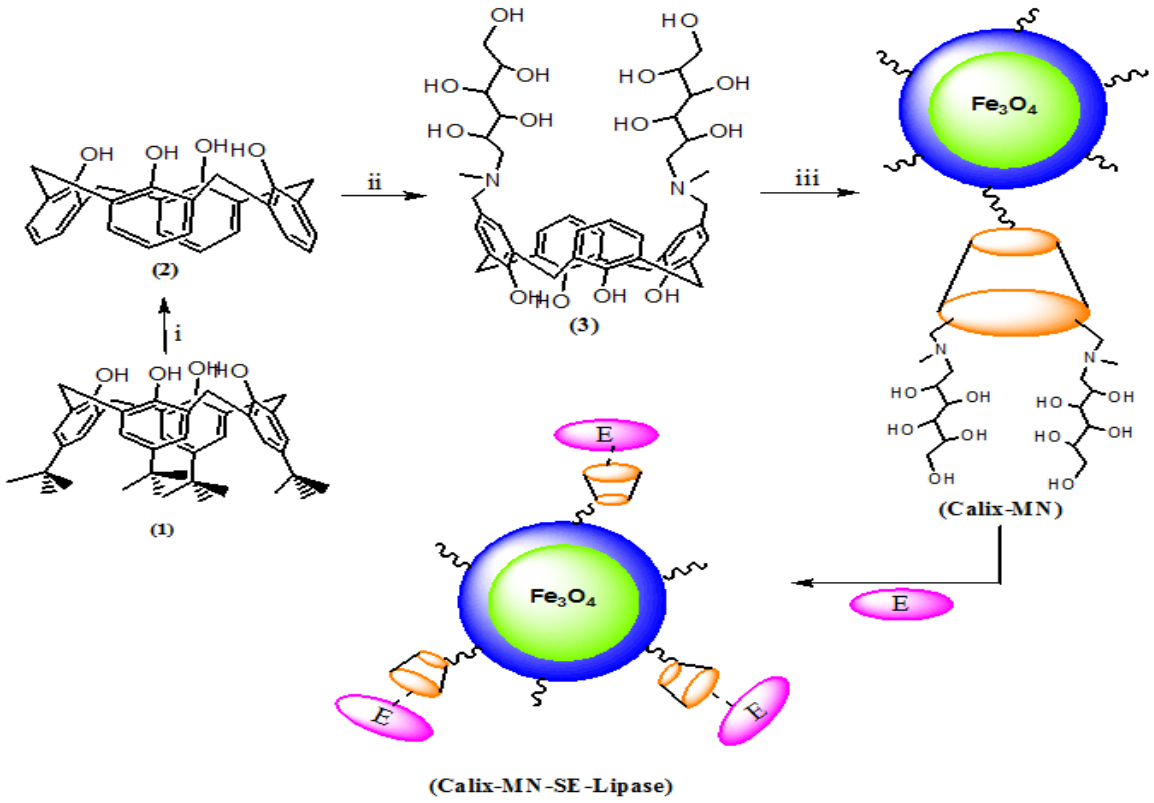
Şekil 2.1. Fe_3O_4 manyetik nanopartüküllerin hazırlanması

Sahin ve ark. (2009) yaptıkları bir çalışmada amino ve karboksil grubu taşıyan kaliks [4, 6 ve 8]aren bileşiklerini hazırlayarak lipaz immobilizasyonunu gerçekleştirmiş ve rasemik naproksenin enantiyoseçimli çalışmalarında kullanmışlardır.



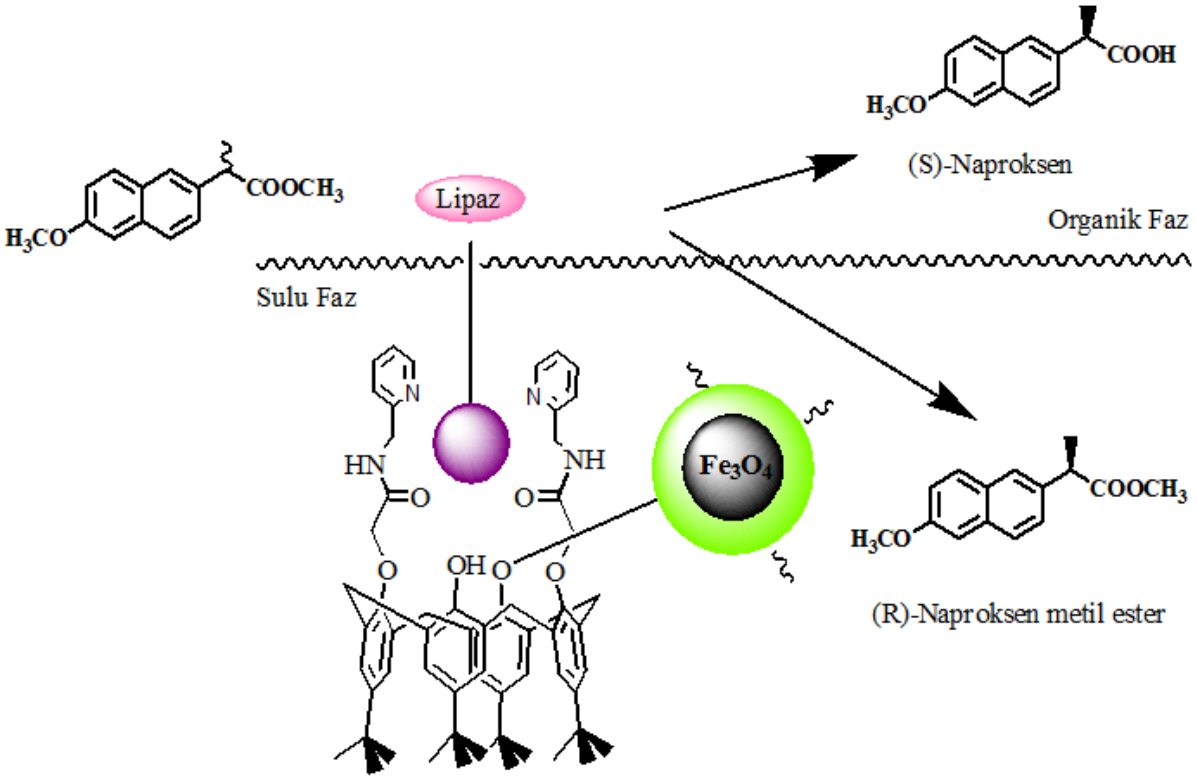
Şekil 2.2. Lipaz immobilizasyonunu ve rasemik naproksenin enantiyoseçimli çalışmalarında kullanılması

Sayın ve ark. (2011); halkalı yapıda olan fenol formaldehit oligomerleri - kaliksaren N-metil glukamin ile fonksiyonlandırarak manyetik Fe_3O_4 nanopartiküllere bağlandıktan sonra ilk kez yapılan sol jel tutuklama metoduna göre enzim immobilizasyonunda kullanılmıştır. Çıkarılan sonuçlardan immobilize enzim rasemik naproksenin enantiyoseçimli hidrolizinde kullanıldığında yüksek oranda dönüşüm ve seçimlilik görülmüştür.



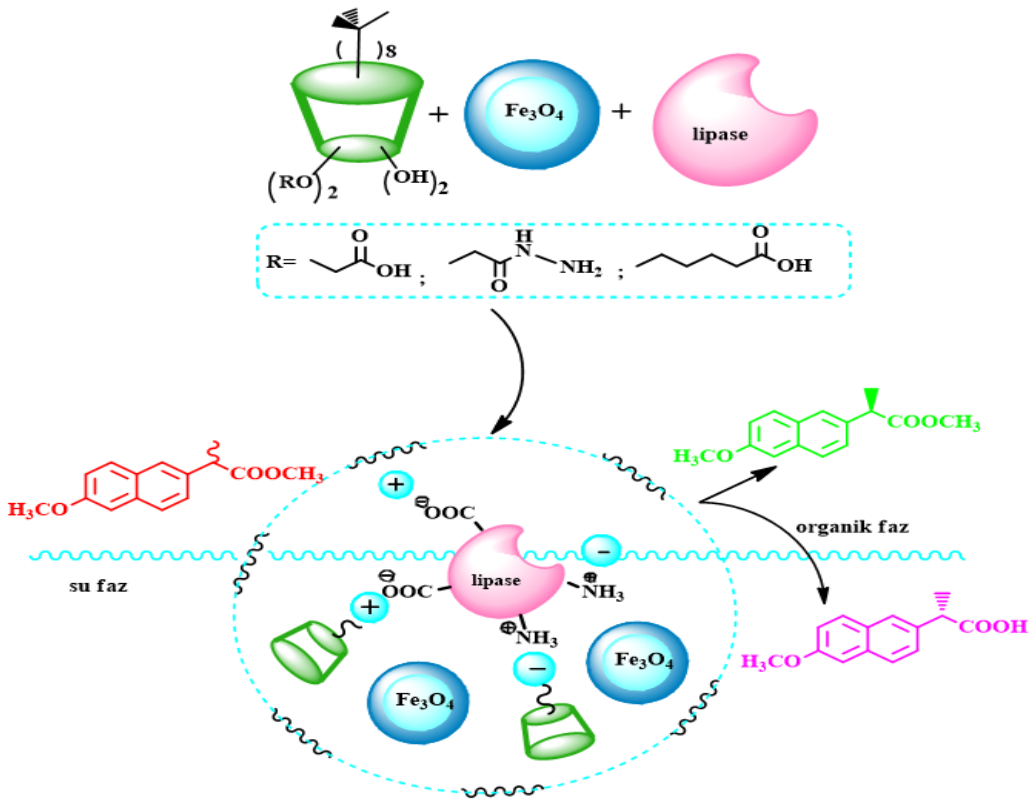
Şekil 2.3. Sol jel tutuklama metoduna göre enzim immobilizasyonu

Ozyilmaz ve Sayin (2013), çalışmasında manyetik Fe_3O_4 nanopartükülüne bağlı olan kaliks[4]aren'in dipridin türevini, *Candida Rugosa* lipaz ile immobilize etmişler. Daha sonra, lipazın aktivitesi tayin edilmiştir. İmmobilize olunmuş lipazın akitivitelerinin ve enantiyoseçiciliğinin (E>400) yüksek sonuçları bulunmuştur.



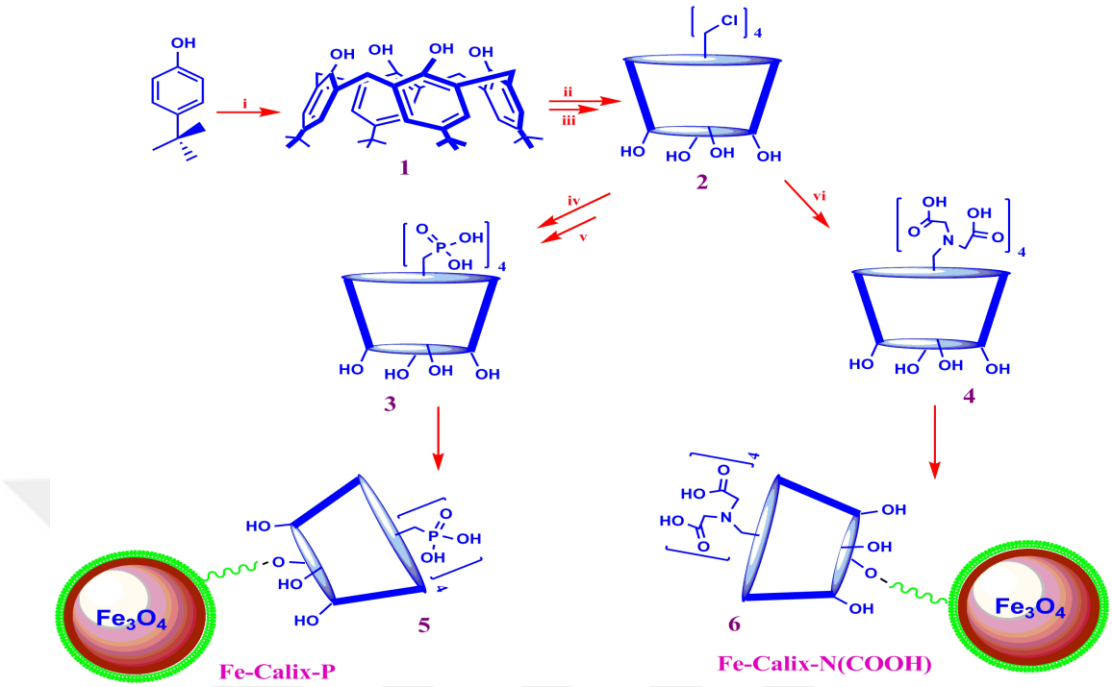
Şekil 2.4. Fe_3O_4 nanopartükülüne bağlı kaliks[4]aren'in dipridin türevinin lipaz ile immobilizasyonu

Aköz ve ark. (2014), kaliks[8]arenin türevine bağlı olan Fe_3O_4 nanopartiküllerini sol-gel yöntemile *Candida Rugosa* lipazına immobilize etmişler ve rasemik naproksen metil esterinin enantiyoseçimli reaksiyonlarda kullanmışlardır.



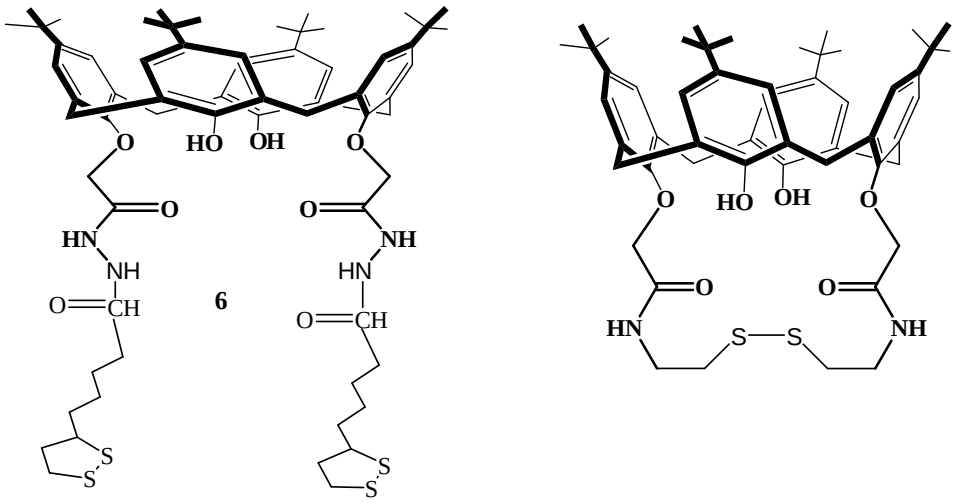
Şekil 2.5. Rasemik naproksen metil esterinin enantiyoseçimli reaksiyon çalışması

Ozyilmaz ve ark., (2016) kaliks[4]arenin fosfonik asit ve iminodikarboksilik asit türevlerini Fe_3O_4 nanopartiküllerine kovalent olarak bağlandıktan sonra, lipaz enzimiyle sol-gel metoduna göre enkapsüle edilip, (R/S)-naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidroliz çalışmalarında kullanılmış. Elde edilen sonuçlara göre, immobilize enzimlerin serbest enzime göre daha yüksek enantiyoseçimlilik gösterdiği (E_{imm} =350 ve E_{imm}=246) ve 5 kullanım sonunda sadece % 6-11 arasında aktivite kaybı olduğu gözlemlenmiştir.



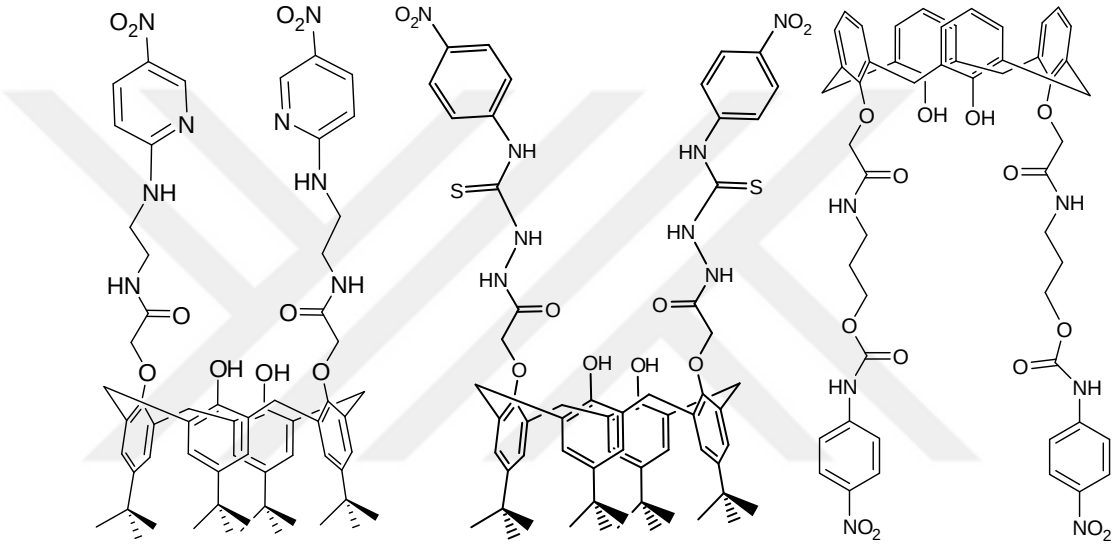
Şekil 2.6. Enantiyoseçimlilik çalışması

Yildiz ve ark. (2017) kaliks[4]arenin tiyol türevlerini sol-gel tutuklama metoduna göre Fe_3O_4 nanopartiküllerin varlığında *Candida rugosa* lipaz enzimi ile immobilize ederek, rasemik flurbiprofen metil esterinin enantiyosçimli hidrolizinde kullanmışlardır. Yapılan çalışmada kaliks[4]arenin lipoik asit türevinin pH=7 ve 35 ^oC'de 72 saat reaksiyon süresinde en yüksek dönüşüm ve enantiyoseçimliliği sonucu gözlemlenmiştir.



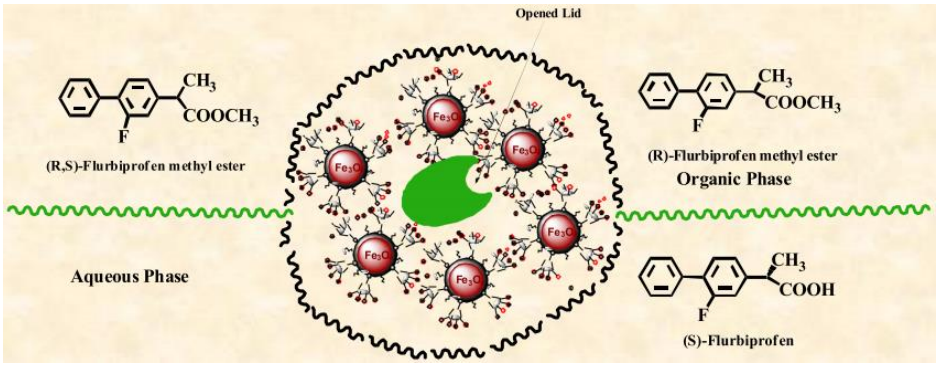
Şekil 2.7. Lipaz immobilizasyonunda kullanılan *p-ter*-Butilkaliks[4]arenin tiyol türevlerini

Bir başka çalışmada (Dogan ve ark., 2017) nitro ve piridil 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 flurbiprofen metil esterinin enantiyoseçimli tepkimelerinde kullanmışlardır. Yapılan araştırmada kaliks[4]arenin nitropridil türevi pH=8 ve 35 ^oC'de en yüksek dönüşüm ve enantiyoseçimliliği gösterdiği anlaşılmıştır.



Şekil 2.8. Lipaz immobilizasyonunda kullanılan *p-ter*-butilkaliks[4]arenin nitro türevlerini

Ozyılmaz ve ark. (2019), manyetik nanopartüküller hazırlayarak floresan kaliksaren türevleriyle immobilize etmişler. Optimum şartları belirleyerek (R,S)-Flurbiprofen metil esterinin enantiomer seçimli hidrolizinde kullanmışlardır.



Şekil 2.9. Floresans kaliksaren türevlerinin enantiomer seçimli hidroliz

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Enstrümental teknikler

^{1}H-NMR spektrumları Varian 400 MHz spektrofotometre ile, FTIR analizleri ATR problu Perkin Elmer 1605 FTIR System Spectrum spektrofotometresi ile, UV-vis. spektrumları Shimadzu 160A UV-Visible spektrofotometresi ile gerçekleştirildi. İTK analizleri DC Alufolien Kieselgel 60 F254 (Merck) ile silika jel tabakasıyla (SiO2, Merck 60 F254) kaplanmış alüminyum plakalar kullanarak takip edildi. Bileşiklerin santrifüj işlemleri Sigma 2-16 PK ile yapıldı. Kullanılan tüm kimyallar Sigma ve Merck firmalarından, saf su ise Millipore Milli-Q Plus cihazıyla saflaştırılarak alındı.

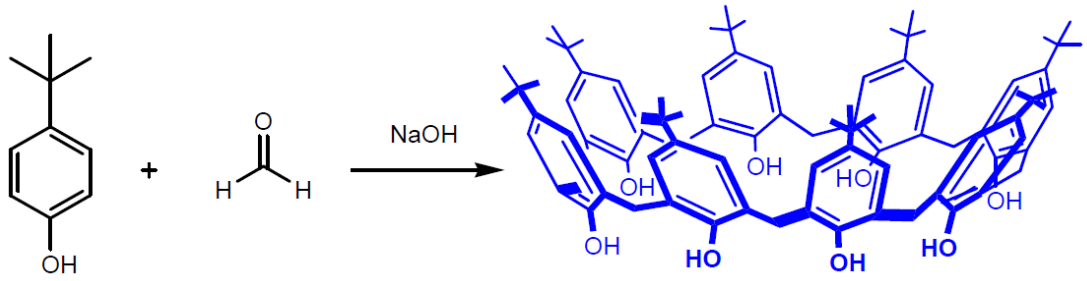
3.2. Kimyasal Sentezler

Bu çalışmada bazı bileşikler literatüre uygun olarak sentezlendi (**1-6**). Suda çözünebilen **(5)** numaralı bileşik ise ilk olarak sentezlenerek lipazla immobilize edildi. Sentezlenen **1-6** numaralı bileşikler sırasıyla aşağıda gösterilmiştir.

3.2.1. p-terbütilkaliks[8]aren (Gutsche 1990)

100 g (0.665 mol) p-ter-Bütil fenol, 35 g (1.1 mol) paraformaldehit ve 10 N (2 mL, 0.02 mol) sulu NaOH çözeltisinden oluşan karışım 3 saat süre ile kaynatıldı. Daha sonra ise karışımın sıcaklığı oda sıcaklığına düşürüldü ve 600 mL ksilen ilave edilerek yaklaşık 4 saat boyunca geri soğutucuda kaynatıldı. Bu sürenin sonunda reaksiyon karışımı soğuytuldu ve karışımın sıcaklığın oda sıcaklığına kadar düşürüldü. Çöken katı madde süzülerek ayrıldı ve ilk toluene daha sonra ise sırasıyla dietil eter ve aseton ile yıkandı. Verim: % 70; E.n.: 416-418 ^{o}C. ^{1}H-NMR (400 MHz, CDCl3): δ 1.26 (s,

72H, But), 3.51 (d, 8H, J= 13.2 Hz, Ar-CH2-Ar), 4.37 (d, 8H, J= 13.2 Hz, Ar-CH2Ar), 7.19 (s, 16H, ArH), 9.64 (s, 8H, -OH).

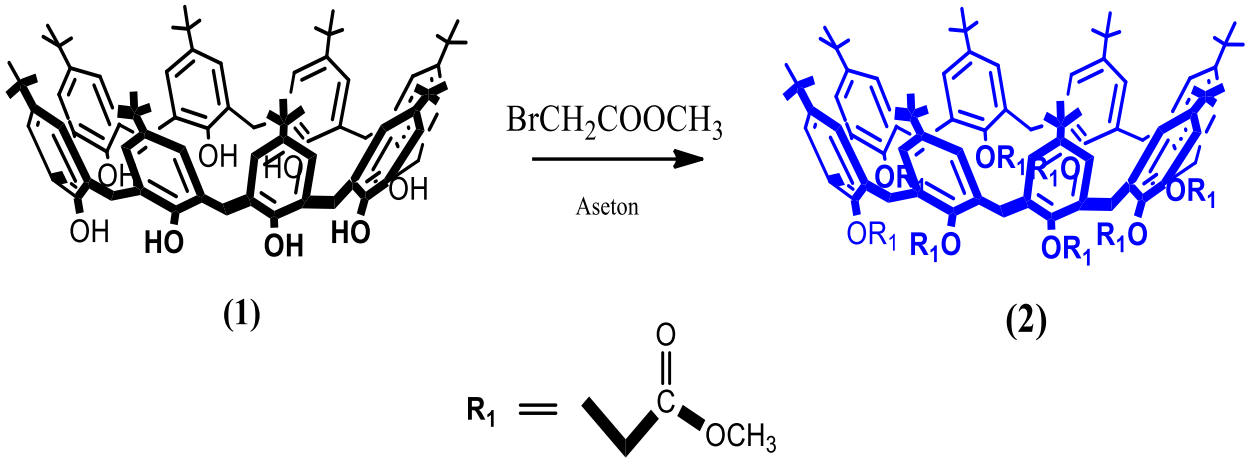


(1)

Şekil 3.1 p-ter-bütilkaliks[8]aren sentezi

3.2.2. p-terbütilkaliks[8]aren oktakarboksilik ester türevi (Arnaud-Neu ve ark. 1989)

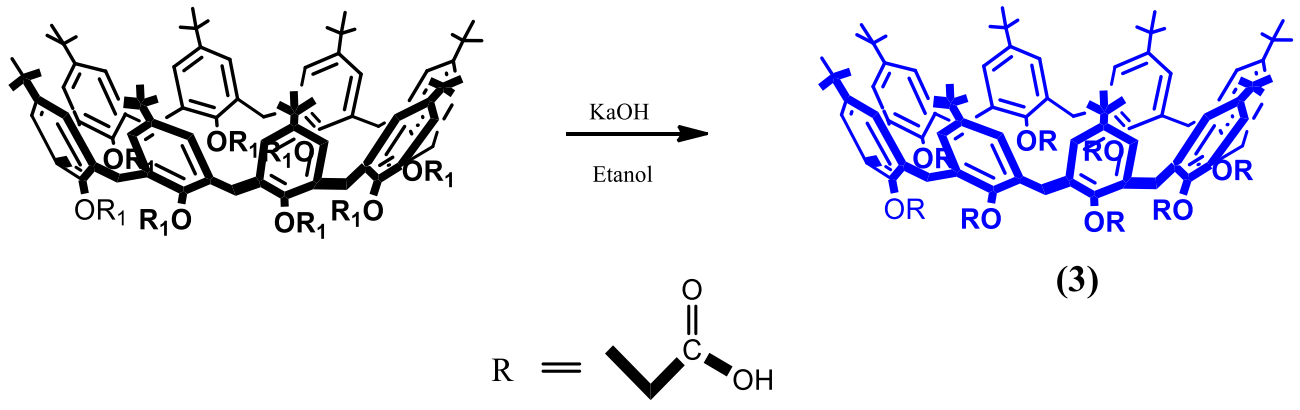
4 g (**1**) numaralı bileşik, 4,5 g K_2CO_3 200 mL aseton çözeltisinden oluşan karışım yarım saat süre ile kaynatıldı. Daha sonra ise karışıma 3,5 mL $BrCH_2COOCH_3$ eklenerek ortalama 24-30 saat boyunca geri soğutucuda kaynatıldı. Bu sürenin sonunda reaksiyon karışımı soğutuldu ve sıcaklık oda sıcaklığına kadar düşürüldü. CH_2Cl_2 ile yıkadıktan sonra çöken katı madde süzülerek ayrıldı ve kalan sıvının bir kısmı uçuruldu. Diğer kısmı etanolda çöktürüldü ve çöken katı madde süzülerek ayrıldı. Verim: % 90; E.n 238-240 °C: 1H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1.10 (s, 72), 3.51 (s, 24), 4.03-4.04 (br s, 32 H), 6.95(s,16H)



Şekil 3.2. *p*-terbütilkaliks[8]aren oktakarboksilik ester türevinin sentezi

3.2.3. p-sülfokaliks[8]arenin oktakarboksilik asid türevi (Collins ve ark. 1991)

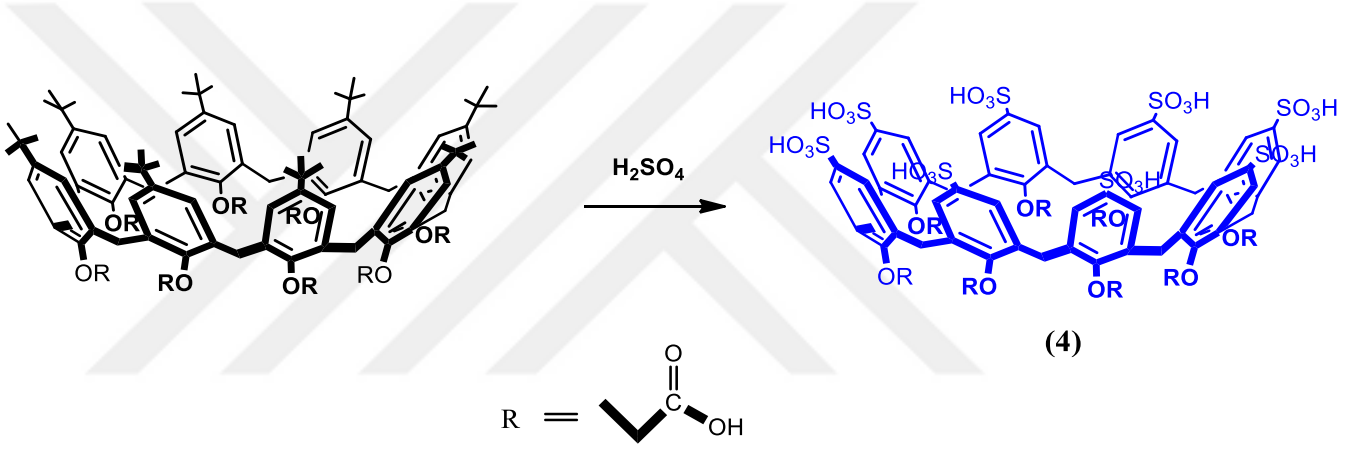
3 g **(2)** numarali bileşik 20 mL NaOH (%15) ve 300 mL EtOH den oluşan karışım geri soğutucu altında kaynama sıcaklığında 24 saat karıştırıldı. Çözücü evaporatorde uzaklaştırılarak katı soğuk distile su ve HCl (1N, 100 mL) çözeltisi ile etkileştirilir. Daha sonra katılar süzülerek 3 numaralı bileşik elde edilir. Verim: %95, E.n: 247 °C. 1H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1.10 (s, 72), 3.51 (s, 16), 7.19 (s, 16)



Şekil 3.3. *p*-sülfokaliks[8]arenin oktakarboksilik asid türevinin sentezi

3.2.4. *p*-Sulfokaliks[8]aren oktakarboksilik asid türevi (Shinkai 1987)

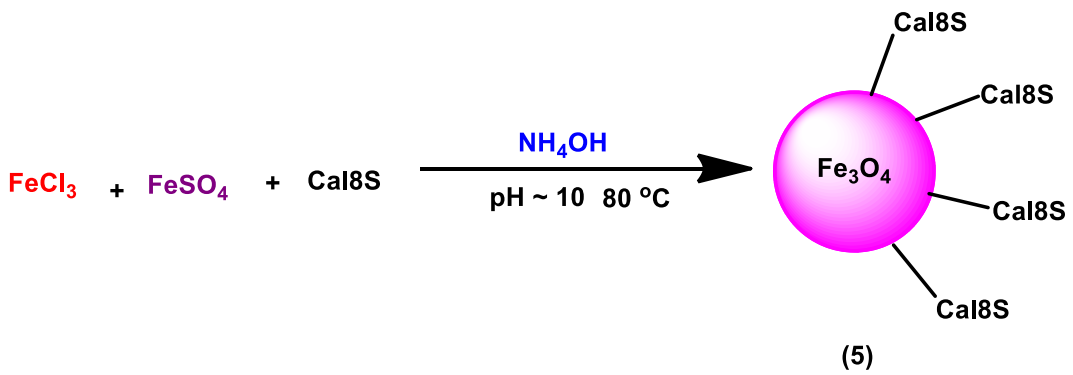
1.5 g (3) numaralı bileşiğe 15 mL H_2SO_4 eklenerek suda çözünene kadar oda sıcaklığında ortalama 4 saat karıştırılır. Daha sonra ise suda çözünen karışım dietiletere damla-damla eklenerek çöktürülür. Bu işlemin sonunda çöken katı madde süzülerek ayrıldı. E.n: >250°C FTIR (ATR) cm^{-1}: 1714 (C=O), 1140, 1106 (SO_2 asimetrik gerilmesi), 1031 (SO_2 simetrik gerilmesi) ve 885 (S-O gerilmesi).



Şekil 3.4. *p*-Sulfokaliks[8]aren oktakarboksilik asid türevinin sentezi

3.2.5. Fe_3O_4 manyetik nanopatiküllerin hazırlanması (Giardine ve ark., 2005)

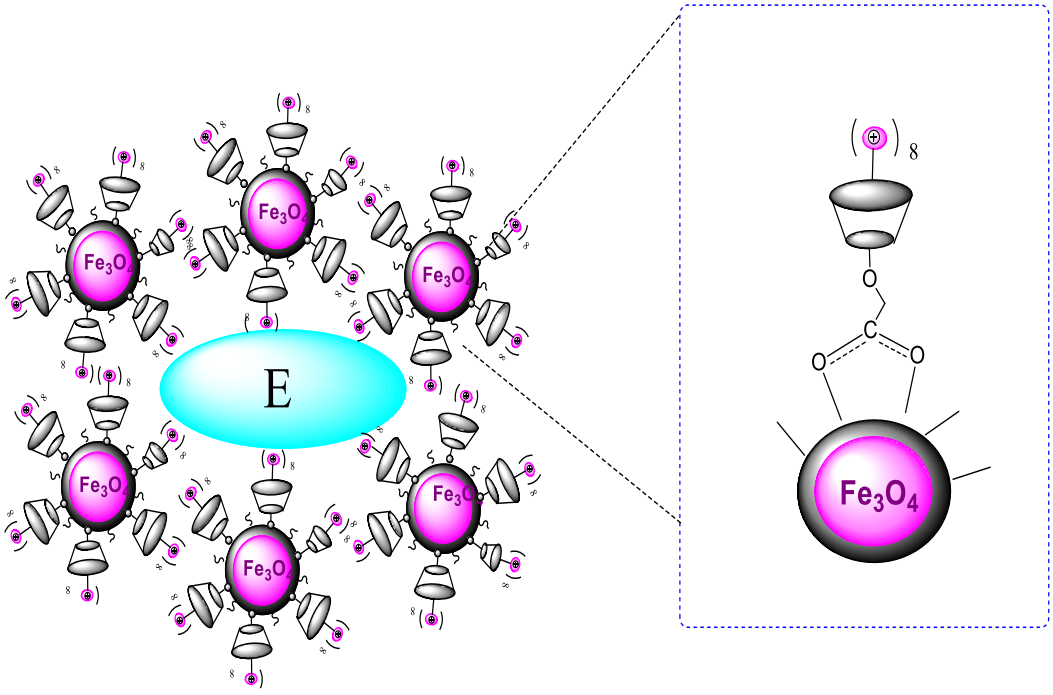
p-Sulfokaliks[8]aren oktakarboksilik asid türevi **(Cal8S)** varlığında, 1 M $FeSO_4$ ve 1,75 M $FeCl_3$ çözeltileri 1:2 oranında alınır ve 15 dk kaynatılır. Daha sonra pH'ı 10 olana kadar %25'lik NH_4OH çözeltisi damla damla eklenerek ve 80°C'da 1 saat karıştırılır. Hazırlanan maddenin manyetik özelliğinden yararlanılarak bir mıktanıs yardımı ile ayrılır. Daha sonra manyetik nanaopartüküller su ile birkaç kez yıkanarak nötral pH'ya yaklaştırılır ve vakum altında kurutulur.



Şekil 3.5. Cal8S varlığında Fe_3O_4 nanopartiküllerin sentezi

3.2.6. Lipaz immobilizasyonu

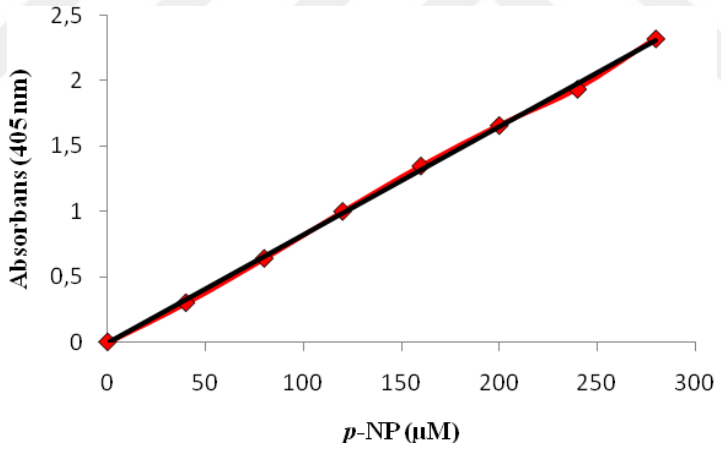
0,78 mL 50 mM fosfat tamponu (pH 7,0) içerisinde 120 mg *Candida rugosa* lipaz ile 0,1 g kaliksaren türevi **(6)**, 30 ºC de inkübatörde 1 saat karıştırılır. Daha sonra harici bir mıknatıs yardımıyla 10 mL saf su ile birkaç kez yıkanır.



Şekil 3.6. Enzim immobilizasyonu **(6)**

3.2.7. Lipaz Aktivitesinin Tayini

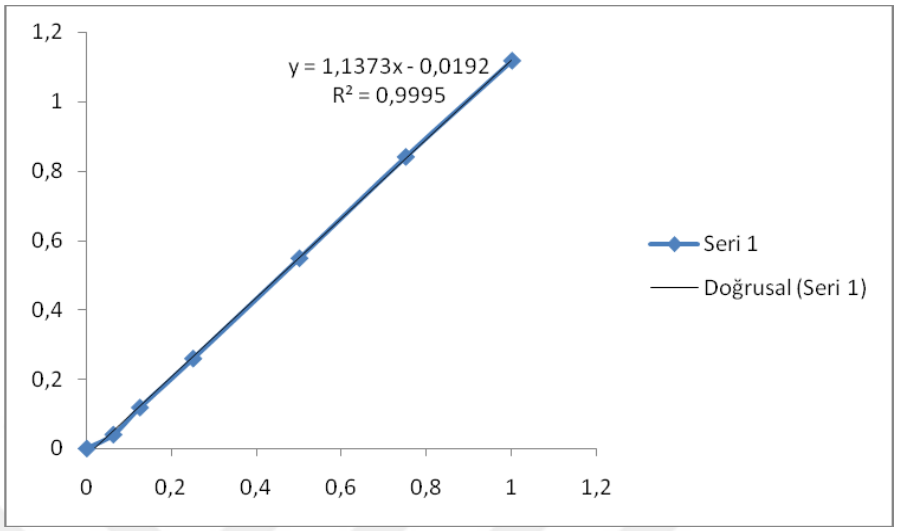
Fosfat tampon çözeltisi (1 mL) (pH 7,0) içerisinde bulunan (10 mg) serbest veya immobilize lipaz karışımına 14,4 mM'lık *p*-NPP'i çözeltisinden 1 ml ilave edilerek oda sıcaklığında 5 dk karıştırılır. Reaksiyonu durdurmak için 2 ml 0,5 N Na_2CO_3 ilave edilir. Daha sonra karışım 5 dk santifüj edilerek, UV-visible spektrofotometresinde ölçülür. Açığa çıkan *p*-NPP'ün 405 nm dalga boyundaki absorbansına göre enzimatik aktivite bulunur. *p*-NP'ın miktarı bulunan absorbans değerini standart *p*-NP (mol/litre) kalibrasyon grafiğinde yerine konularak tespit edilir. (Şekil 3.7) 1 Unit (U) dakikada 1 µmol *p*-NPP hidroliz etmek için gerekli olan lipaz miktarına denir. Grafikten serbest ve immobilize lipazların aktiviteleri belirlenir (Hung ve ark., 2003; Chiou ve Wu 2004).



Şekil 3.7. Standart *p*-NP (*p*-nitrofenol)- absorbans grafiği (*λmax=405 nm*)

3.2.8. Protein miktarı (Bradford 1976)

Serbest ve immobilize lipazların protein miktarı Bradford metoduna göre tayin edilir. Bu metoda göre standart Bovin serum albumin (BSA)'in belirli konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlanır. Daha sonra 0,1 mL'si 3 ml Bradford reagent (Coomassie Brilliant Blue G-250) ile etkileştirilerek 595 nm dalga boyundaki absorbansları ölçülür. Absorbans-protein miktarı (mg/ml) standart grafiği çizilerek yapılan protein çalışmalarında bu grafik referans alınır. (Şekil 3.8.)



Şekil 3.8. Standart protein miktarı (mg/ml)- absorbans grafiği (λmax =595 nm)

3.2.9. Optimum pH Tayini

Serbest ve immobilize enzimin aktiviteleri farklı pH değerlerinde (pH 5–8.0) ölçülerek optimum pH değerleri tayin edilir. Aktivite ölçümleri oda sıcaklığında gerçekleştirilir.

3.2.10. Optimum Sıcaklık Tayini

Serbest ve immobilize enzim farklı sıcaklıklarda (30–60 ºC), fosfat tamponu içinde 20 dk karıştırılarak optimum sıcaklık tayini incelendi. Aktivite ölçümleri pH 7'de gerçekleştirilir.

3.2.11. Termal kararlılık

Enzimler protein yapısındadırlar, bu nedenle enzimler sıcaklık artışlarına hassastırlar. Bu hassaslıktan dolayı enzimatik reaksiyonlarda yüksek sıcaklıklar istenmez. Endüstriyel açıdan potansiyele sahip maddeler hazırlanmak için enzimin termal kararlılığının artırılması gerekmektedir. Bu nedenle immobilize ve serbest lipazın termal

kararlılıkları incelendi ve immobilize ve serbest enzim çözeltilerinin 60 °C'de ve farklı zaman aralıklarında (20-120 dakika) aktiflikleri tayin edildi.

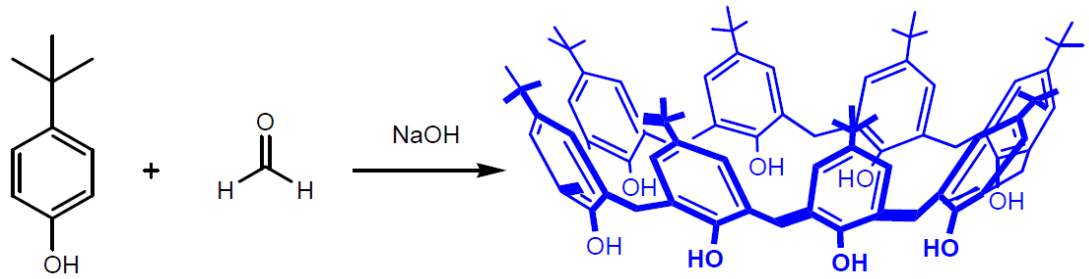
3.2.12. Tekrar kullanılabilirlik

İmmobilize lipazların tekrar kullanım sayısını ölçmek amacı ile belli bir miktar alınan immobilize enzimin aktivitesi tayin edildi. Santifüjlenip yıkanan immobilize enzimler arka arkaya aktiviteleri tayin edilerek tekrar kullanılabilirliği bulundu.

3.2.13. Enzim Kinetiği

Michaelis-Menten eşitliği kullanılarak kinetik parametreler hesaplanabilir. Farklı substrat (*p*-NPP) konsantrasyonlarında (5,0, 2,5, 1,25, 1,0, 0,5 ve 0,25 mM) aktivite ölçümleri yapılır. Lineweaver-Burk grafiği çizilerek Michaelis-Menten kinetik sabitleri olan Km ve Vmaks hesaplanır.

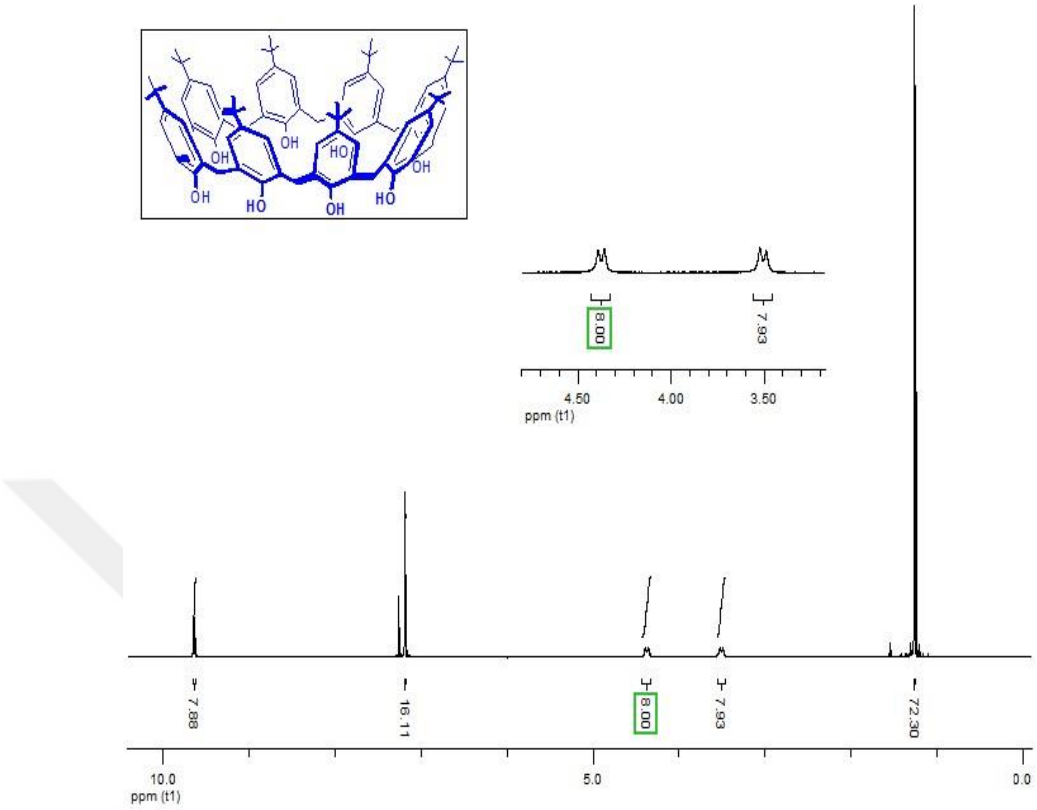
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA



(1)

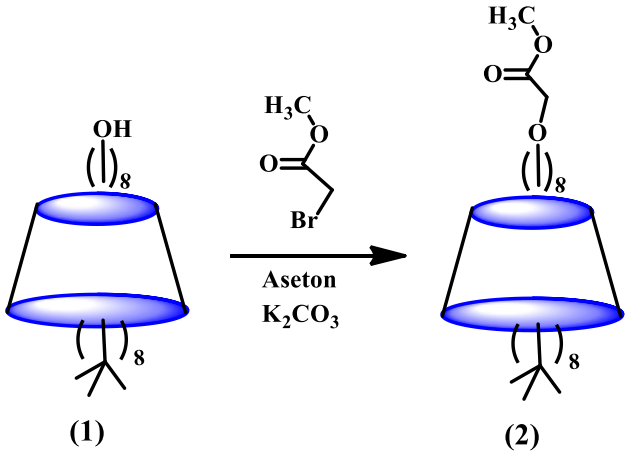
Şekil 4.1. *p-ter*-bütilkaliks[8]aren sentezi

p-sülfokaliks[8]arenin oktakarboksilik asid türevini elde etmek için ilk önce başlangıç maddesi olan *p-ter*-bütilkaliks[8]aren literatüre göre (Gutsche vd. 1990) sentezlendi.



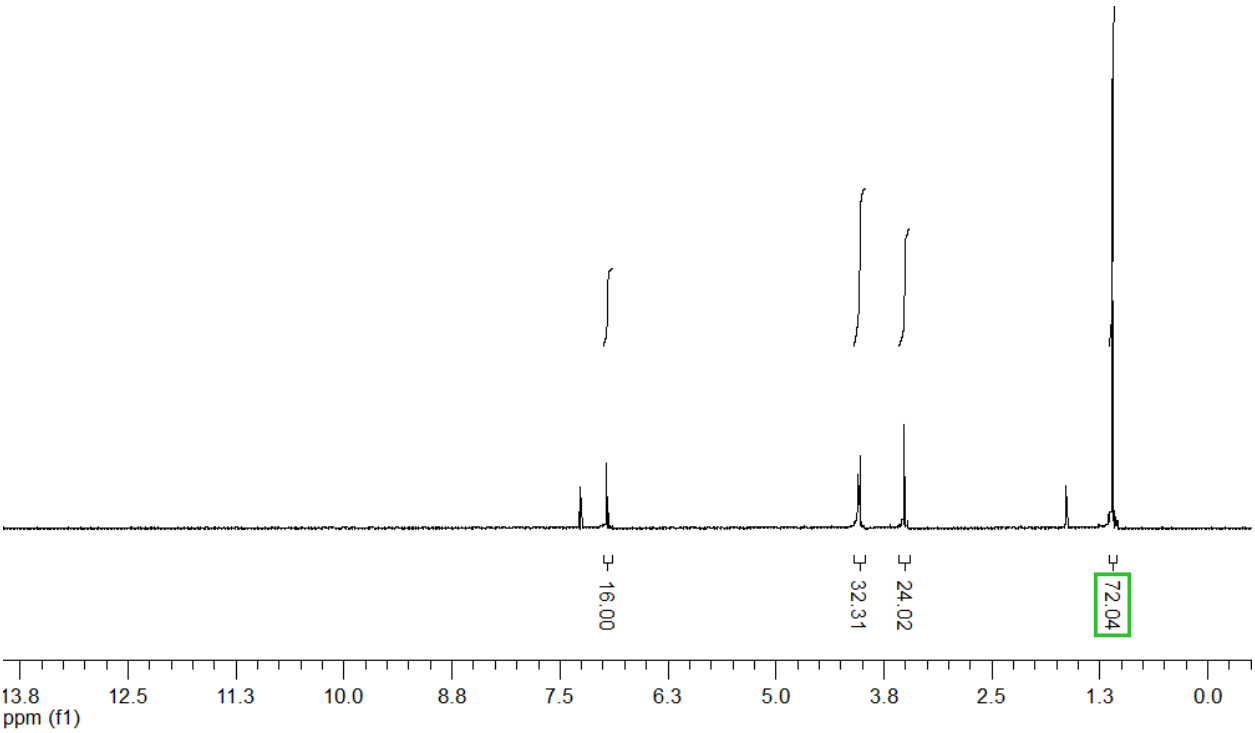
Şekil 4.2. *p-ter*-bütilkaliks[8]aren ^{1}H-NMR spektrumu

Bu bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumunda δ: 1.26 ppm'de görülen singlet 72 protonun **C_4H_9 (***ter*-bütil) grubunu, halkanın oluşmasını ispatlayan δ: 7.19 ppm'de görülen singlet 16 protonun Ar**CH_2**Ar grubunu, δ: 9.64 ppm'de görülen singlet 8 protonun **OH** grubunu göstermektedir. Bu sonuçlar *p-ter*-bütilkaliks[8]arenin oluştuğunu kanıtlamaktadır.



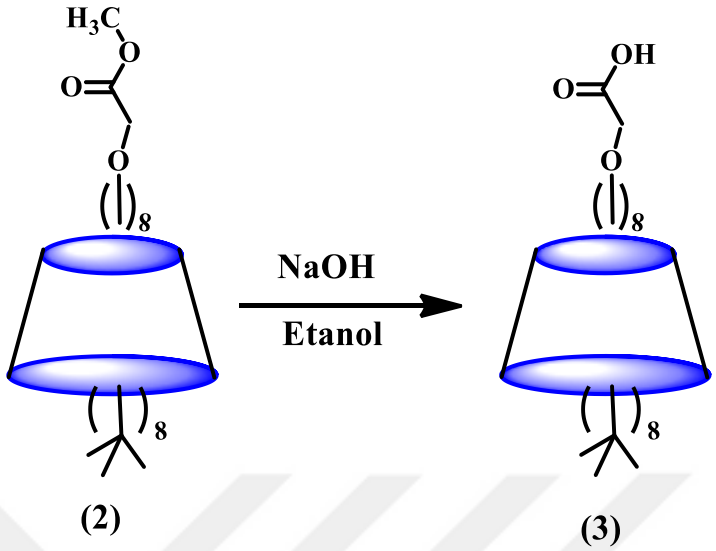
Şekil 4.3. *p-ter*-bütilkaliks[8]aren oktakarboksilik ester türevinin sentezi

p-tert-Bütilkaliks[8]aren, $BrCH_2CO_2CH_3$ ile K_2CO_3 varlığında aseton içerisinde literatüre göre (Arnaud-Neu vd. 1989) etkileştirilerek**,** oktakarboksilik ester türevi **(2)** sentezlendi.



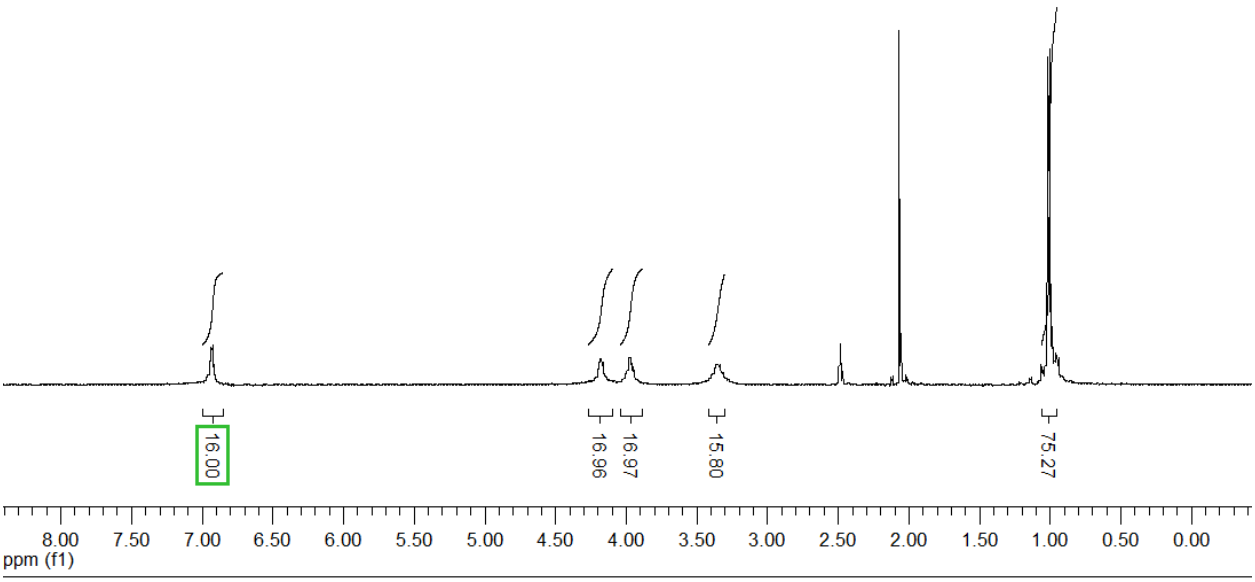
Şekil 4.4. (2) bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumu

Bu bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumunda δ: 3.51 ppm'de görülen singlet 24 protonun O**CH₃** grubunu, δ: 6.95 ppm'de görülen singlet 16 protonun O**CH₂**CO grubunu göstermektedir. Bu sonuçlar oktaester türevinin oluştuğunu ispatlamaktadır.



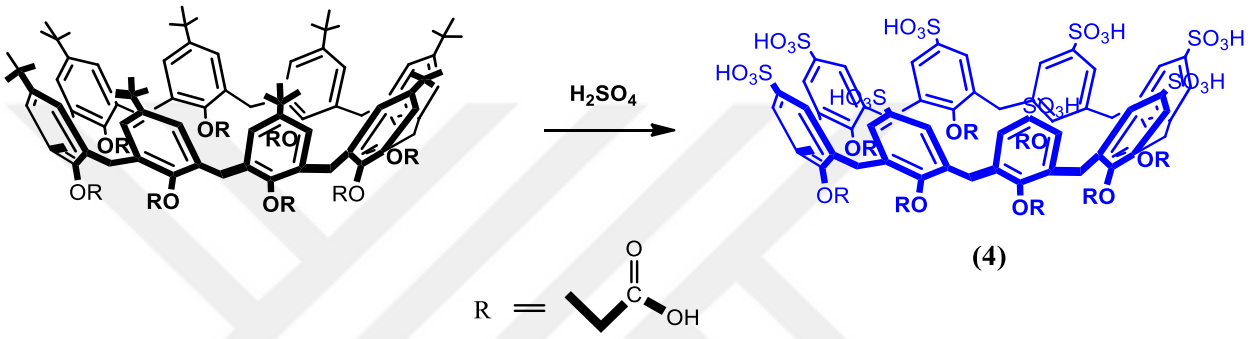
Şekil 4.5. *p-ter*-bütilkaliks[8]aren oktakarboksilikasid türevinin sentezi

p-tert-bütilkaliks[8]aren oktakarboksilik ester türevi, %15 NaOH ile etanol içerisinde literatüre göre (Collins vd.1991) etkileştirerek oktakarboksilikasit türevine dönüştürüldü.



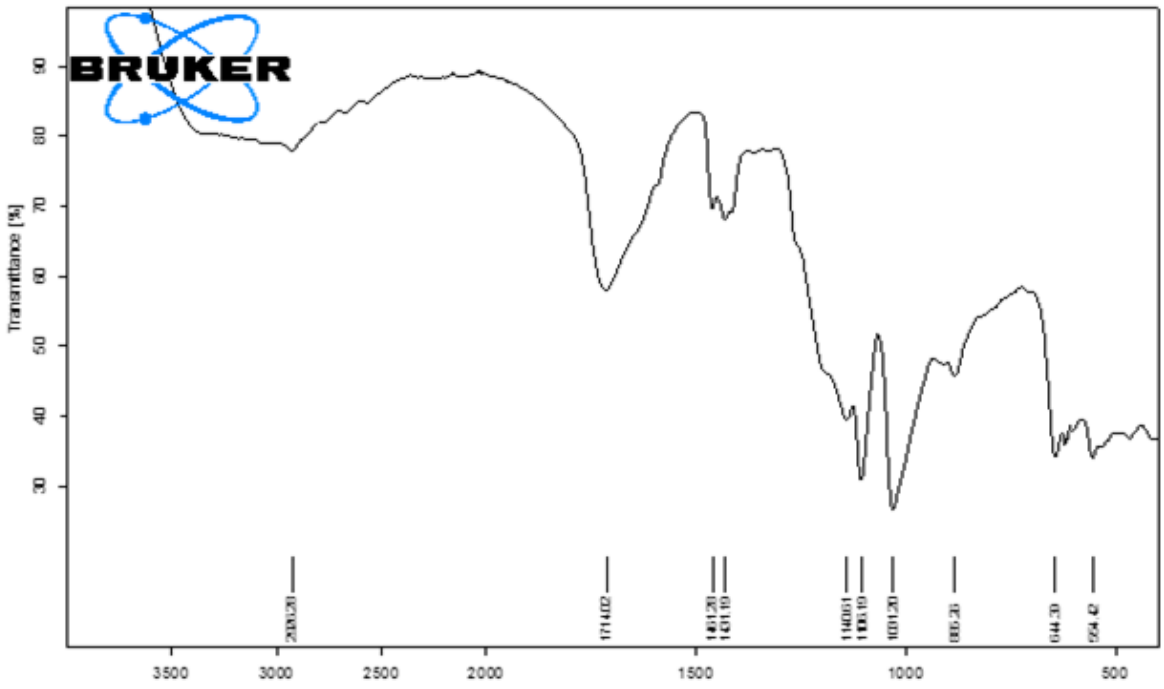
Şekil 4.6. *p-ter*-bütilkaliks[8]aren oktakarboksilikasid türevinin ^{1}H-NMR spektrumu

Bu bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumunda δ: 1.26 ppm'de görülen singlet 72 protonun **C_4H_9 (***ter*-bütil) grubunu, halkanın oluşmasını ispatlayan δ: 7.19 ppm'de görülen singlet 16 protonun Ar**CH_2**Ar grubunu göstermektedir. Bu sonuçlar *p-ter*-bütilkaliks[8]arenin oluştuğunu kanıtlamaktadır.



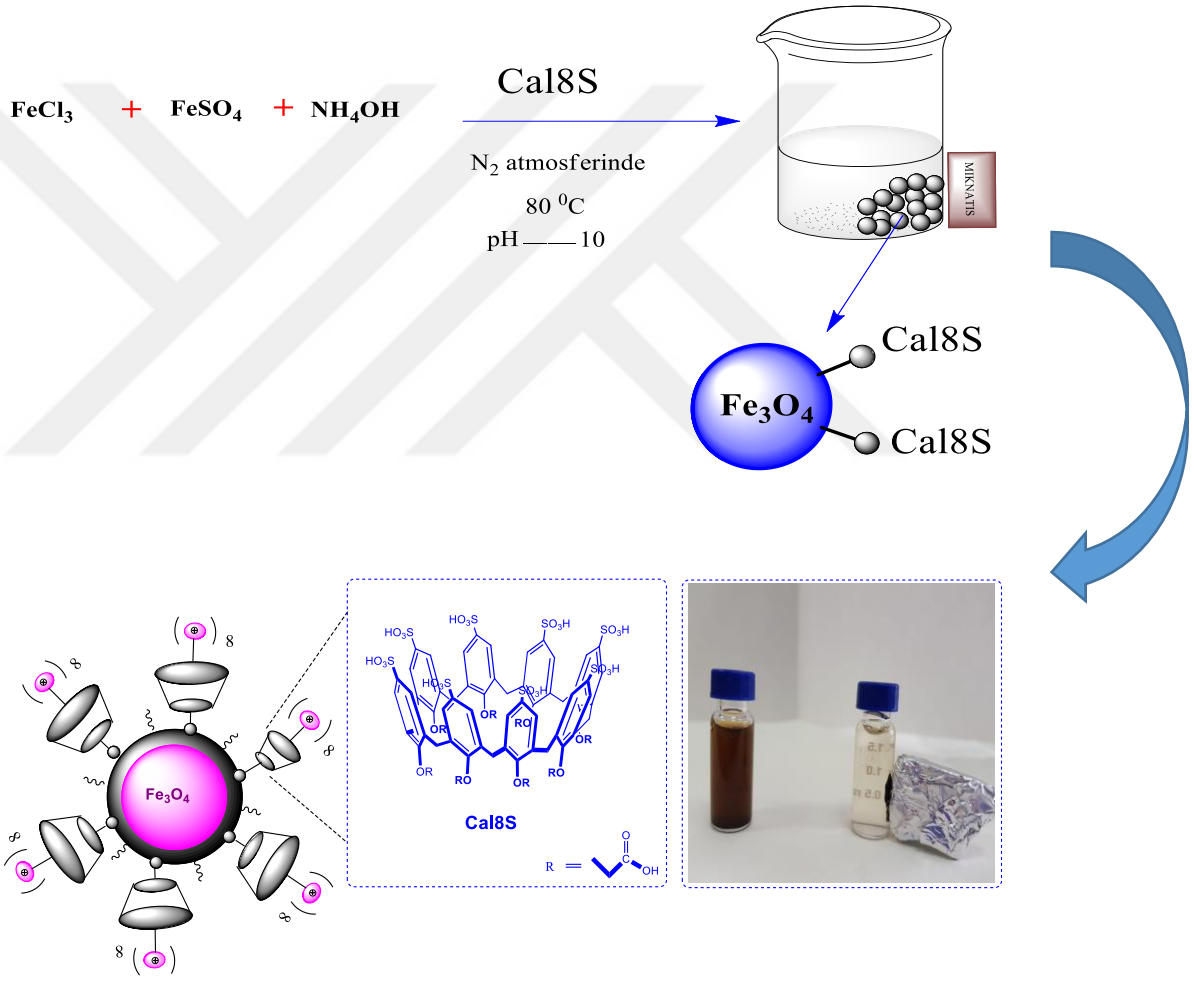
Şekil 4.7. *p*-Sulfokaliks[8]aren oktakarboksilikasid türevinin sentezi

p-tert-bütilkaliks[8]aren oktakarboksilik ester türevine H_2SO_4 eklenerek **(4)** numaralı bileşik elde edildi.



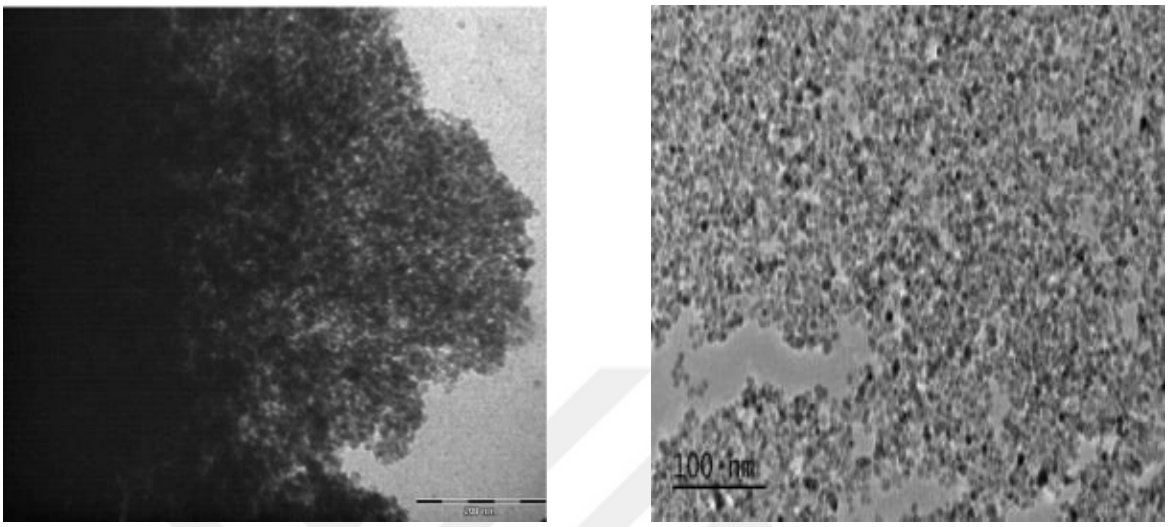
Şekil 4.8. (**4**)' nolu bileşiğin FTIR (ATR) spektrumu

FTIR spektrumunda görülen 1714 cm^{-1} de C=O grubuna ait titreşim bandının karboksilik asit türevine oluştuğunu göstermektedir. Diğer bandlara baktığımızda SO_2 asimetrik gerilmesi (1140 ve 1106 cm^{-1}), SO_2 simetrik gerilmesi (1031 cm^{-1}) ve S-O gerilmesi (885 cm^{-1}) görülmektedir.



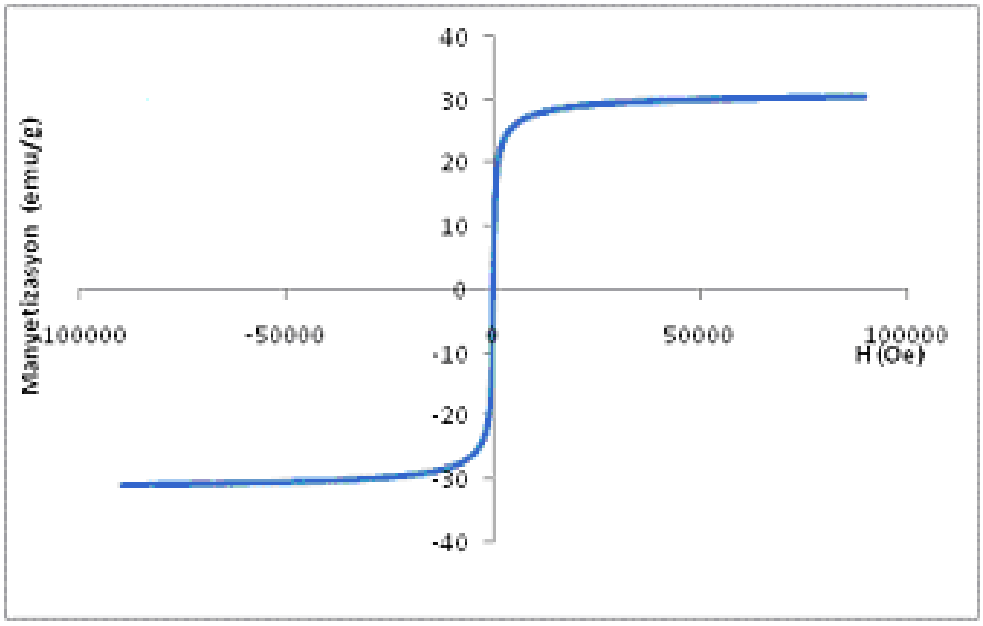
Şekil 4.9. Cal8S varlığında Fe_3O_4 nanopartikülüllerin sentezi

(4) numaralı bileşik elde edildikten sonra uygun koşullarda $FeSO_4$ ve $FeCl_3$ tuzları karışımında Fe_3O_4 nanopartikülüllerine immobilize edildi.



Şekil 4.10. Sırasıyla Saf Fe_3O_4-nanopartiküllerinin ve F_3O_4@Cal8S nanopartüküllerin TEM görüntüleri

F_3O_4@Cal8S **(5)** nanopartiküllerin boyutu ve yerleşimi hakkında bilgi edinmek için bu bileşikler TEM görüntüleri ile aydınlatıldı. (Şekil 4.10). Şekil 4.10'da saf Fe_3O_4-nanopartiküllerin, şekil 4.10'da ise F_3O_4@Cal8S bileşiğinin TEM görüntüleri görülmektedir. Fe_3O_4 nanopartüküllerin boyutu 8±3 nm olduğu için ve manyetik özelliğine göre bir birlerine daha yakın toplanmaktalar. Şekil 4.10'de görüldüğü gibi **(5)** numaralı bileşikte partüküller birbirinden uzaklaşmışlar. Bu uzaklaşmaya sebep kaliks[8]arenlerin (20±4nm) Fe_3O_4 nanopartiküllere bağlanarak partiküller arasındaki manyetik alanı azda olsa düşürülmesidir. Sonuc olarak TEM görüntülerinin böyle farklılığından dolayı Fe_3O_4-nanopartiküllerinin kaliksaren bileşiklerine bağlandıkları söylenebilir

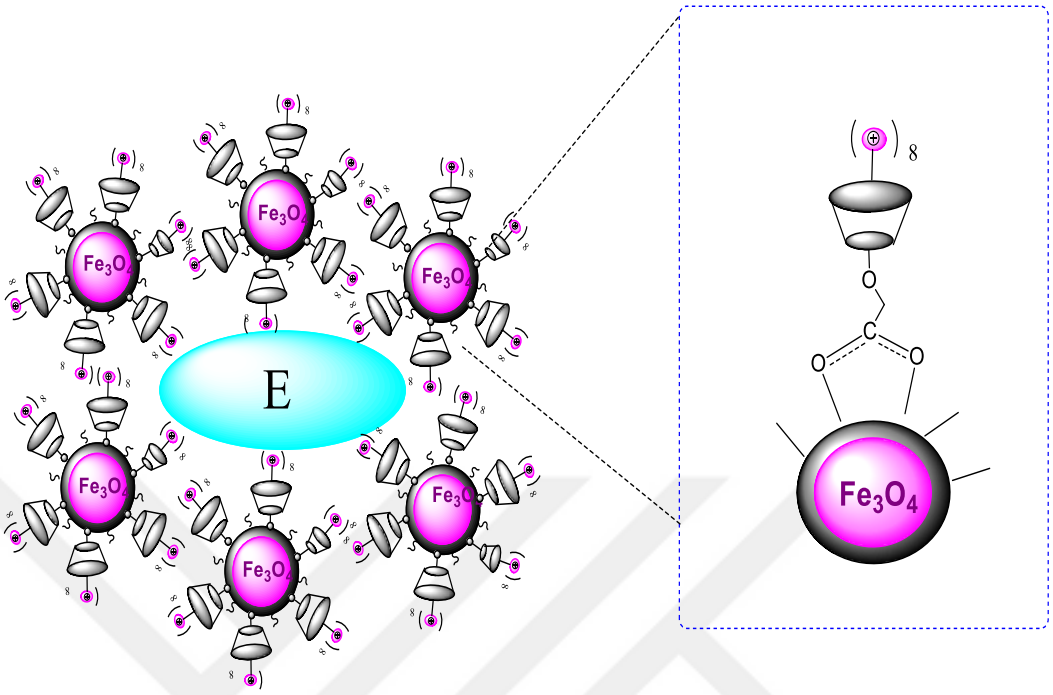


Şekil 4.11. F_3O_4@Cal8S nanopartüküllerin VSM'i

F_3O_4@Cal8S manyetik özellikleri VSM (titreşimli manyetometre) ile incelendi. Maksimum süper manyetikleştirmeleri F_3O_4@Cal8S 30 emu g^{-1} de elde edilir (Şekil 4.11).

4.1. Lipaz İmmobilizasyonu

Lipaz immobilizasyonu bölüm 3.2.6'da belirtildiği gibi immobilize edildi. Bu çalışmada kullanılan *Candida Rugosa* lipaz **5** nolu bileşik ile immobilize edilerek protein ve aktivite tayinleri yapıldı.



(6)

Şekil 4.12. Lipaz immobilizasyonu

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

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

Bu çalışmada **(5)** numaralı bileşik lipaz immobilizasyonunda kullanıldı. Bağlanan protein miktarı, lipaz aktivitesi ve spesifik aktiviteler bulundu.

Çizelge 4.1. Optimum reaksiyon şartlarında serbest ve immobilize lipazın aktivitesi

	Bağlanan protein (mg/g)	Lipaz Aktivitesi (U/g)	Spesifik aktivite (U/mg protein)
Serbest lipaz	-	2.49[a]	35.6
İmmobilize lipaz (Fe_3O_4@Cal8S-E)	25.5	85	3.33

[a]Serbest lipazın aktivitesi mL'de (1 mg/mL) alındı

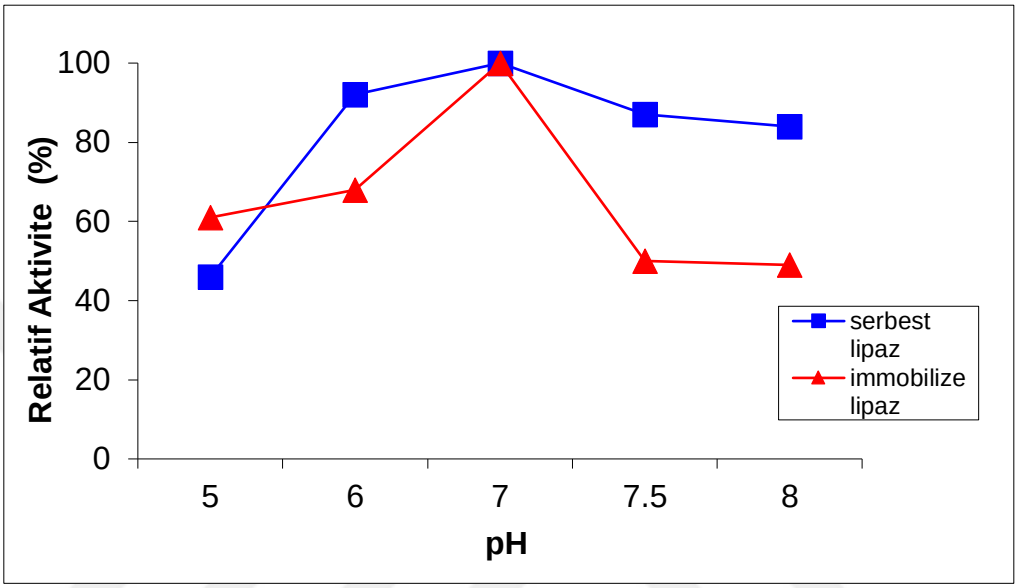
Çizelge 4.1'de optimum reaksiyon şartlarında serbest ve immobilize lipazın aktiviteleri gösterilmiştir. İmmobilize lipaza (Fe_3O_4@Cal8S-E) bağlanan protein miktarı 25.5 mg/g ve aktivitesi 85 U/g'dir.

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. Kapak açık iken enzim aktiftir. Kuvvetli hidrojen bağı yapan fonksiyonel gruplara sahip bileşikler enzimin kapağının açık kalmasını sağlayarak enzimin aktivitesinin artmasını sağlamaktadırlar. *Candida Rugosa Lipaz* enzimi suda çözündüğü zaman kapağı kapalı ve hidrofilik kısım suya doğru dönüktür. Kullanılan kaliksaren türevi kapaktaki amino asitlerle kompleksleşerek kapağın kapanmasını önlemektedirler. Ayrıca, enzimde bulunan aktif fonksiyonel gruplarla kolayca bağ yapma özelliğine sahiptirler.

4.1.1. İmmobilize lipazların aktivitesine pH'ın etkisi

Enzim aktivitesine etki eden önemli parametrelerden biri de pH'dır. Bu çalışmada serbest ve immobilize lipazın aktivitesi pH 5-8 arasında belirlendi. Grafikten de görüldüğü gibi optimum pH değeri hem serbest hem immobilize lipazlar için pH 7.0 olarak tayin edildi (Şekil 4.13). İmmobilizasyon ile pH'ın farklılık göstermemesi lipazın

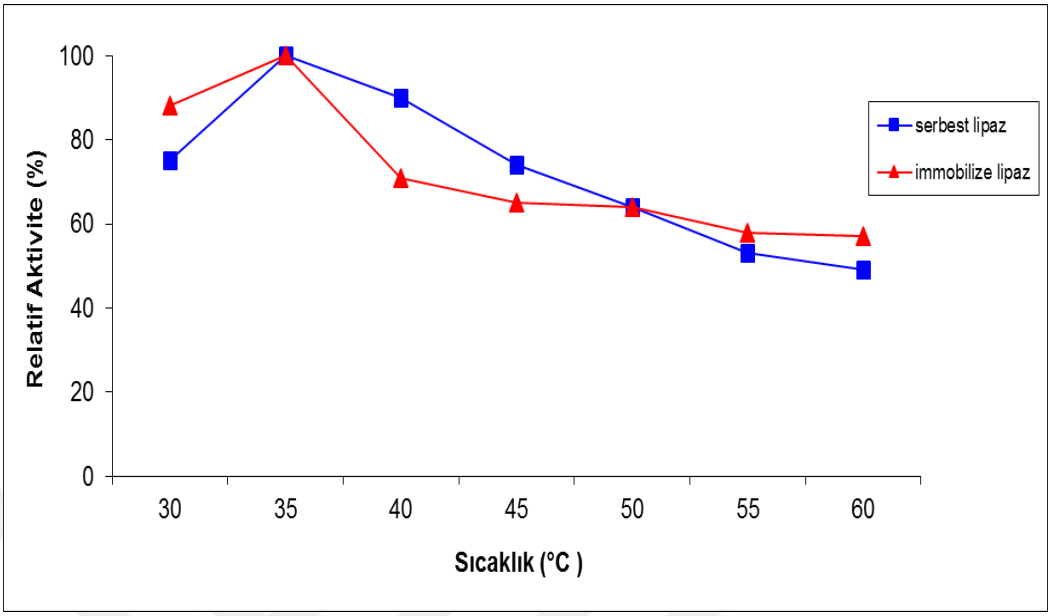
konformasyonundaki değişiklik olmaması ve lipaz yüzeyindeki yük yoğunluğunun değişmemesinden kaynaklandığını söyleyebiliriz (Berger ve ark., 2006)



Şekil 4.13. Serbest ve Fe_3O_4@Cal8S-E nanopartiküllerin lipaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

4.1.2. İmmobilize lipazların aktivitesine sıcaklığın etkisi

İmmobilizasyonun enzim aktivitesini nasıl etkilediğini tayin etmek için önemli parametrelerden diğeri sıcaklık etkisidir. Genellikle immobilizasyonun, serbest enzimlerde gözlenen optimum sıcaklığı daha yüksek değerlere kaydırdığı gözlenmiştir.

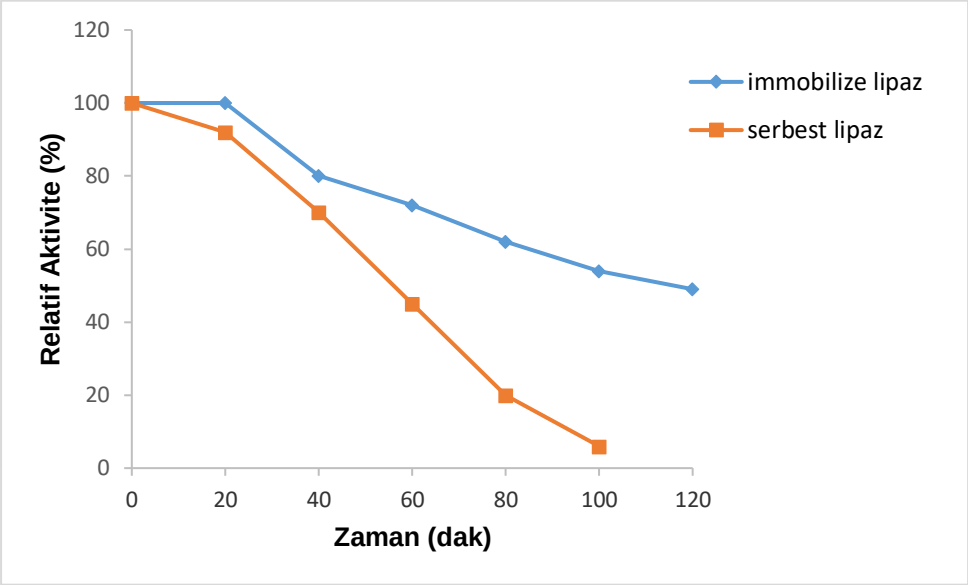


Şekil 4.14. Serbest ve Fe_3O_4@Cal8S-E nanopartiküllerin lipaz aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi

Serbest ve immobilize lipazın *p*-NPP'nin hidrolizinin sıcaklığa bağımlılığı, 30-60 ^oC aralığında çalışıldı Şekil 4.14'de gösterildi.

Bilindiği gibi sıcaklığın artması ile moleküller arası çarpışma artmakta ve buna bağlı olarak da genellikle tepkimenin hızı artmaktadır. Enzimler protein yapısında oldukları için optimum sıcaklığın üzerinde denatürasyona uğrarlar. Sıcaklığın artması ile enzimin aktifliği azalır. Grafikten görüldüğü gibi, hem serbest, hem de immobilize enzimle yapılan çalışmada optimum sıcaklık 35 ^oC olarak bulundu.

4.1.3. Termal kararlılık

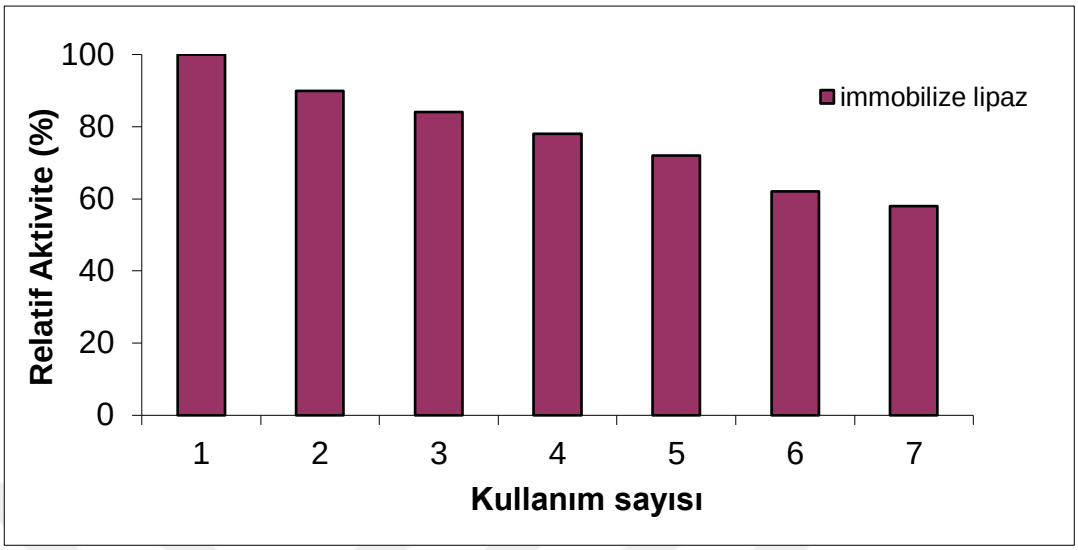


Şekil 4.15. Serbest ve immobilize lipazın termal kararlılığı

Serbest ve immobilize lipaz 60 °C'de 0-120 dakika arası aktiviteteleri ölçüldü. Şekil 4.15'den görüldüğü gibi serbest lipaz aktivitesi 100 dakikanın sonunda % 6, immobilize lipaz aktivitesi ise 120 dakikanın sonunda % 40'a inmektedir. İmmobilize lipaz **(6)** yüksek sıcaklıkta uzun zaman aralığında enzimin aktivitesini korumuştur.

4.1.4. Tekrar Kullanılabilirlik

İmmobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirliği ekonomik açıdan çok önemlidir. Serbest ve immobilize edilen lipazın tekrar kullanımın etkisini incelemek için bir mıknatıs yardımıyla yıkanarak aktivite tayini yapıldı. Oda sıcaklığında ve pH 7 de, 7 kez kullanıldı. Şekil 4.16'da 7 kez tekrar kullanımdan sonra immobilize lipaz aktivitesinin % 60'sinden daha fazlasını sürdürüldüğü gözlendi. İmmobilize enzimin reaksiyon kararlılığının ve tekrar kullanılabilirliğinin artırılması endüstriyel uygulamalarda başarılı sonuçların ortaya çıkabileceğini gösterir.



Şekil 4.16. İmmobilize lipazın aktivitesi üzerine tekrar kullanımın etkisi

4.1.5. Enzim kinetiği

Michaelis-Menten eşitliği kullanılarak enzim kinetiği incelendi ve Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Serbest lipaz ve immobilize lipazın aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek amacı ile kısım 3.2.7'de belirtilen yönteme göre çeşitli substrat derişimlerinde (5,0, 2,5, 1,25, 1,0, 0,5 ve 0,25 mM) gerçekleştirilen reaksiyonlar ve kalibrasyon grafiğinden elde edilen eğim yardımıyla reaksiyon hızları hesaplandı. Çizelge 4.2 de serbest ve immobilize lipazın kinetik parametreleri verildi.

Çizelge 4.2. Serbest ve immobilize lipazın kinetik parametreleri

	V_{max} (U/mg)	K_m (mM)
Serbest lipaz	115,0	0,44
İmmobilize lipaz (Fe_3O_4@Cal8S-E)	126,58	1,85

Çizelge 4.2’den görüldüğü serbest lipazın V_{max}'ı 115 U/mg iken Fe_3O_4@Cal8S-E’dan 126.582 U/mg olarak bulunmuştur. Serbest ve immobilize lipazların K_m değerleri ise sırasıyla 0.44 mM ve 1.83 mM hesaplanmıştır. Km değerinde bir artış gözlenmiştir. Km değerindeki bu değişim, immobilizasyon yöntemi ve destek materyalinin, enzimin substrata olan özgüllüğünü ifade etmektedir. Literatürde Km değerindeki bu artışın, enzimin destek materyale bağlanmasıyla esnekliğini kaybetmesinden kaynaklandığı şeklinde yorumlanmıştır. Ayrıca enzimin destek materyaline bağlanma sırasındaki aktivite kaybı, Km değerinin artmasına neden olmuştur (Soysal, 2015; Wang ve ark.,2015).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- Bu çalışmada, . *p*-Sulfokaliks[8]aren oktakarboksilik asid (**4**) türevleri hazırlandı.
- Sentezlenen kaliks[8]aren türevlerinin yapıları spektroskopi teknikler kullanılarak aydınlatıldı.
- Sentezlenen kaliks[8]aren türevi literatürdekilerden farklı bir metodla Fe_3O_4 nanopartüküllerine immobilize edilerek suda çözünebilen bileşik sentezlendi. (**5**)
- İlk kez suda çözünen Fe_3O_4@Cal8S (**5**) bileşiği *Candida Rugosa lipaz* enzimi ile immobilize edildi.
- İmmobilize lipazın aktivite ve spesifik aktiviteleri tayin edildi.
- İmmobilize lipazın optimum pH, sıcaklık, termal kararlılık ve tekrar kullanılabilirlikleri yapıldı.
- İmmobilize lipazin kinetik alışması yapılarak V_{max} ve K_m değerleri bulundu.

6. KAYNAKLAR

Akceylan, E. and Yilmaz, M., 2011, Synthesis of calix [4] arene alkylamine derivatives as new phase-transfer catalysts for esterification reaction, *Tetrahedron*, 67 (34), 6240-6245.

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

Akoz, M. S., Gumus, V. and Kirkgoz, M. S., 2014, Numerical simulation of flow over a semicylinder weir, Journal of Irrigation and Drainage Engineering, 140 (6), 04014016.

Alberghina, L., Gnandori, R., Longhi, S., Lotti, M., Fusetti, F., and Vanoni, M. 1991. Molecular Cloning of a Lipase and of a Lipase Related Gene from Candida cylindricea. In Alberghina, L., Schmid, R. D. and Verger, R. (Eds), Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering. GBF Monographs 16, 231–235.

Arduini, A., Pochini A., Reverberi, S. and Ungaro, R., p-tert-Butylcalix[4]arene Tetracarboxylic Acid. A. Water Soluble Calixarene in a Cone Structure, J. Chem. Soc., Commun. 981, 1984

Arnaud-Neu, F., Collins, E. M., Deasy M., Ferguson, G., Harris, S. J., Kaitner, B., Lough, A. J. McKervey, Elizabeth, M. A, Barbara M.,. Ruhl L, Schwing-Weill M. J. Seward and E. M., 1989, J. Am. Chem. Soc. 111, 8681-8691.

Baekeland, L., 1908, Verfahren zur Herstellung von Kondensationsprodukten aus Phenolen und Formaldehyd Patent, DRP, 23, 3803.

Bakkal, M., 2006., Tutuklanmış Candida Rugosa Lipazı İle Rasemik Naproksen Metil Esterden (S)-Naproksen Üretiminde Proses Parametrelerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara.

Beisson, F., Tiss A., Riviere, C., Verger, R. 2000, Methods for Lipases Etection and Assay: A Critical Review. Eur. J. Lipid Sci. Technol., 102, 133-153.

Benjamin S**.,** Pandey A. 1998a, Candida rugosa Lipases: Molecular Biology and Versatility in Biotechnology, Yeast 14, 1069–1087.

Benjamin, S., and Pandey, A. 1998b. Candida rugosa and its Lipases-a Retrospect. J. Sci. Ind. Res. 57, 1-9.

Benjamin, S., Pandey, A. 1996, Optimization of Liquid Media for Lipase Production by Candida rugosa. Bioresource Technol. 55, 167–170.

Benjamin, S., Pandey, A. 1997, Enhancement of Lipase Production During Repeated Batch Culture Using Immobilized Candida rugosa. Process Biochem. 32, 257-260.

Benjamin, S., Pandey, A. 1998. Candida rugosa and its Lipases-a Retrospect. J. Sci. Ind. Res. 57, 1-9

Berger, C., Song, Z., Li, X., Wu, X., Brown, N., Naud, C., Mayou, D., Li, T., Hass, J. Ve and Marchenkov, A. N., 2006, Electronic confinement and coherence in patterned epitaxial graphene, *Science*, 312, 1191-1196.

Bickerstaff, G.F. 1984, Application of Immobilised Enzymes to Fundamental Studies on Enzyme Structure and Function. In: Wiseman A. (Ed.) Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology. Ellis Horwood, pp 162–201, Chichester, UK.

Bjokling, F., Godtfredsen, S.E., and Kirk, O. 1991, The future Impact of Industrial Lipases. Trends in Biotechnology, 9, 360-363.

Bosetti, A., Bianchi, O., La-Porta, P., Bettarini, F. and Massimini, S. 1994, Chemo-enzymatic Synthesis of Optically Pure 1,3,4-oxadiazol-2(3H)-ones with Acaricidal Activity. J. Agric. Food. Chem. 42, 2596–2599.

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.

Brena, B. M., and Batista-Viera, F., 2006, Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells, Humana Press Inc., Totowa.

Breslow, R., 1995, Biomimetic chemistry and artificial enzymes: Catalysis by design, Acc. Chem. Res., 28, 146–153.

Campbell, D.H., Luescher, F.L., and Lerman, L.S. 1951, Immologic Adsorbents. I. Isolation of Antibody by Means of a Cellulose-protein Antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 37, 575-57.

Chang, T.M.S. 1977**,** Medical application of immobilised enzymes and proteins, Vols I and II, Plenum Press, New York.

Chen, H., Gu, L., Yin, Y., Koh, K. and Lee, J., 2011, Molecular recognition of arginine by supramolecular complexation with calixarene crown ether based on surface plasmon resonance. Int. J. Mol. Sci., 12, 2315-2324.

Chiou, S.H., and Wu, W.T., 2004, Immobilization of Candida rugosa Lipase on Chitosan with Activation of the Hydroxyl Groups, Biomaterials, 25, 197-204.

Clark, L.C. and Lyons, C., 1962, Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery. Ann. N.Y. Acad. Sci. 102, 29-45.

Cristallini, C.L.L., Cascone, M.G., Polacco, G., Lupinacci, D., and Barbani, N. 1997, Enzyme-based Bioartificial Polymeric Materials: the α- amylase–poly(vinyl alcohol) System. Polym. Int. 44, 510–516.

Deligöz, H., 1994, Yeni Kaliks[n]arenlerin Sentezi ve Baz Özelliklerinin İncelenmesi. Doktora tezi, S.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.

Demirel, A., Dogan, A., Canel, E., Memon, S., Yilmaz, M., and Kilic, E., 2004, Hydrogen Ion-SelectivePoly(Vinyl Chloride) Membrane ElectrodeBased On Ap-Tert-Butylcalix[4]arene-Oxacrown-4, Talanta, 62, 123-129.

Dhawan, B., Chen, S. I., and Gutsche, C. D. 1987, Calixarenes, 19. Studies of the formation of calixarenes via condensation of p-alkylphenols and formaldehyde. Die Makromolekulare Chemie: Macromolecular Chemistry and Physics, 188, 921-950.

Dogan, V., Sayin, S., Uyanik, A. ve Yilmaz, M., 2017, Functional Group Effects of New Calixarene Derivatives on Catalytic and Enantioselective Behavior of Lipase, Polycyclic Aromatic Compounds, 1-14.

Dunlap, B. R. 1974. Immobilised Chemicals and Affinity Ahromatography, Plenum Press, New York.

Elizabeth M., Collins, M., McKervey, A.,Madigan, E., Moran, B., Owens, M., Ferguson G., and Harris S. 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 (1991), 3137

Erdemir, S. and Yilmaz, M., 2012, Catalytic effect of calix[n]arene based sol-gel encapsulated or covalent immobilized lipases on enantioselective hydrolysis of (R/S)-naproxen methyl ester. J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem., 72, 189-196.

Erdemir, S., Bahadir, M. and Yilmaz, M., 2009, Extraction of carcinogenic aromatic amines from aqueous solution using calix[n]arene derivatives as carrier. J. Hazard. Mater., 168, 1170-1176.

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 macrocycle bonded silica stationary phase, Journal of Separation Science, 34, 393-401.

Fadıloğlu, S. 1996. Kinetics of Olive Oil Hydrolysis by Free and Immobilised Candida rugosa Lipase, Ph.D. Thesis, University of Gaziantep

Franssen, M.C.R., Jongejan, H., Kooijmau, H., et al. 1996. Resolution of a Tetrahydrofuran Ester by Candida rugosa Lipase and an Examination of CRL's Stereochemical Preference in Organic Media. Tetrahedron Asymmetry, 7, 497–510.

Ghosh, P.K., Saxena, R.K., Gupta, R., Yadav, R.P., and Davidson, S. 1996, Microbial Lipases: Production and Applications. Science Progress. 79, 119-157.

Giardine, B., Riemer, C., Hardison, R. C., Burhans, R., Elnitski, L., Shah, P., Zhang, Y., Blankenberg, D., Albert, I. and Taylor, J., 2005, Galaxy: a platform for interactive large-scale genome analysis, Genome research, 15 , 1451-1455.

Gupta, R., Gupta, N., and Rathi, P., 2004, Bacterial lipases: an Overview of Production Purification and Biochemical Properties. Appl. Microbiol. Biotechnol. 64, 763-781.

Gutsche, C. D., 1989, Calixarenes, monographs in supramolecular chemistry; Stoddart, J.F., Ed.; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, Vol. 1

Gutsche, C.D. and Iqbal, M., 1990, p-ter-Butylcalix[4]arene. Org. Syn., 68, 234-237.

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.

Gutsche, C.D., Dhawan, B., No, K.H. and Muthukrishnan, R., 1981, Calixarenes. 4. The synthesis, characterization, and properties of calixarenes from p-tertbutylphenol. J. Am. Chem. Soc., 103, 3782-3792.

Gutsche, C.D., Iqbal, M., and Stewart, D., 1986, Calixarenes. 19. Syntheses procedures for ptert-butylcalix[4]arene, J. Org. Chem. 51 (5), 742–745.

Ha, K.J., and Lindsay, R.C. 1993, Release of Volatile Branched-chain and Other Fatty Acid from Ruminant Milk Fats by Various Lipases. J. Dairy Sci. 76, 677-690.

Haalck, L., Kallabis, B., Schoemaker, M., Cammann, K., and Spener, F. 1991, Lipases for Biosensors. Fat. Sci. Technol. 93, 415-416.

Houde, A., Kademi, A., and Leblanc D., 2004, Lipases and Their Industrial Applications: An Overview, Applied Biochemistry and Biotechnology, 118,155-170,

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

Ishikawa, Y., Kunitake, T., Matsuda, T., Otsuka, T. and Shinkai, S., 1989, Formation of calixarene monolayers which selectively respond to metal ions. J. Chem. Soc., Chem. Commun., 736-738.

Jaeger, K.E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., Van Heuvel, M., and Misset, O. 1994. Bacterial lipases. FEMS Microbiol. Rev. 5, 29–63

Jaeger, K-E., Dijkstra, B. W. and Reetz, M.T., 1999, Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases, Annu. Rev. Microbiol. 53, 315- 351.

Karaca, N. 2006, Poli (N,N-Dimetilakrilamit-Ko-Akrilamit) ve Poli(N-İzopropilakrilam_T-Ko-Akrilamit)/Karragenan Polimerler Kullanılarak Lipaz Enziminin İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Kazlauskas, R.J., and Bornscheuer, U.T. 1998, in Biotechnology: Biotranformations with Lipases (Vol. 8), pp 37-191, VCH.

Kircka, L.J., and Thorpe, G.H.G. 1986, Immobilised Enzymes in Analysis. Trends Biotechnol, 4: 253-258.

Klein, M.D., Langer, R. 1986, Immobilised Enzymes in Clinical Medicines: an Emerging Approaches to New Drug Therapies. Trends Biotechnol, 4: 179– 186.

L. Cao and R. D. Schmid, 2005, *Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design*, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Lalonde, J. 1995, The Preparation of Homochiral Drugs and Peptides Using cross-linked Enzyme Crystals. Chim. Oggi. 13, 33–37.

Langrand, G., Rondot, N., Triantaphilides, C. and Baratti, S. 1990, Short Chain Flavour Esters Synthesis by Microbial Lipases. Biotechnol. Lett. 12, 581– 586.

MacRae, A.R., and Staines, H. 1994, Evaluation of Microbial Lipases as Fat Splitting Catalysts. Fat. Sci. Technol. 96, 430.

MacRae, A.R., Hammond, R.C. 1985, Present and Future Application of Lipases. Biotechnol. Genetic Eng. Reviews 3, 193–217

Martinek, K., and Mozhaev, V.V. 1985, Immobilization of Enzymes: an Approach to Fundamental Studies in Biochemistry. Adv. Enzymol. 57, 179–249.

McArdle, R.N., and Culver, C.A. 1994, Enzyme Infusion: a Developing Technology. Food Technol. 48: 85-89.

McCrae, A., Roehl, E.L., and Brand, H.M. 1990, Bioesters. Seifen. Oele. Fette. Wachse, 116: 201-205.

Misset, O., Gerritse, G., Jaeger, K.E. et al. 1994, The Structure–function Relationship of the Lipases from Pseudomonas aeruginosa and Bacillus subtilis. Protein Eng. 7: 523–529.

Nelson, D.L., and Cox, M.M., 2004, Lehninger Principles of Biochemistry, Chapter. W. H. FREEMAN, Fourth Edition.

Nie, K., Xie, F., Wang, F., and Tan, T. 2006. Lipase Catalyzed Methanolysis to Produce Biodiesel: Optimization of the Biodiesel Production. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 43, 142-147

Oguz, M., Bhatti, A. A., Karakurt, S., Aktas, M. ve Yilmaz, M., 2017, New water soluble Hg 2+ selective fluorescent calix [4] arenes: Synthesis and application

in living cells imaging, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 171, 340-345.

Ozgur, Ü., Alivov, Y. I., Liu, C., Teke, A., Reshchikov, M., Doğan, S., Avrutin, V., Cho, S.-J., and Morkoc, H., 2005, A comprehensive review of ZnO materials and devices, Journal of applied physics, 98 (4), 11.

Ozturk, B., 2001, Immobilization of lipase from Candida rugosa on Hydrophobic and Hydrophilic Supports, Yüksek Lisans Tezi, İzmir Institute of Technology, İzmir, Turkey.

Ozyilmaz, E and Sayin, S., 2013, Preparation of new calix [4] arene-immobilized biopolymers for enhancing catalytic properties of Candida rugosa Lipase by Sol–Gel Encapsulation, Applied biochemistry and biotechnology, 170 (8), 1871-1884.

Ozyilmaz, E., Bayrakci M., and Yilmaz, M., 2016, Improvement ofcatalytic activity of Candida rugosa lipase in the presence of calix [4] arenebearing iminodicarbox-ylic/phosphonic acid complexes modifiediron oxidenanoparticles, Bioorganic Chemistry 65, 1-8.

Ozyilmaz, E., Cetinguney, S., and Yilmaz. M, 2019, Encapsulation of lipase using magnetic fluorescent calix[4]arene derivatives; improvement of enzyme activity and stability International Journal of Biological Macromolecules, 133, 1042–1050

Paiva, A.L., Balcao, V.M., and Malcata, F.X. 2000, Kinetics and Mechanisms of Reactions Catalyzed by Immobilized Lipases. Enzyme and Microbial Technology, 27, 187-204.

Pandey, A., Benjamin, S., Soccol C. R., Nigam, P., Krieger, N., and Soccol, U. T., 1999, The Realm of Microbial Lipases in Biotechnology. Biotechnol. Appl. Biochem., 29, 119-131.

Park, O.J., Park, H.G., Yang, J.W. 1996, Enzymatic Transesterification of Monosaccharides and Amino Acid Esters in Organic Solvents. Biotechnol. Lett. 18, 473-478.

Sahin, O., and Yilmaz, M., 2012, Synthesis and fluorescence sensing properties of a new naphthalimide derivative of calix [4] arene, Tetrahedron Letters, 53 (18), 2319-2324.

Sahin, O., Erdemir, S., Uyanik, A., and Yilmaz, M., 2009, Enantioselective hydrolysis of (R/S)-naproxen methyl ester with sol-gel encapsulated lipase in presence of calix[n]arene derivatives. Appl. Catal. A-Gen., 369, 36-41.

Sayin, S., Yilmaz, E. and Yilmaz, M., 2011, Improvement of catalytic properties of Candida Rugosa lipase by sol-gel encapsulation in the presence of magnetic calix[4]arene nanoparticles. Org. Biomol. Chem., 9, 4021-4024.

Schmid, R.D., and Verger, R., 1998, Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications. Angew. Chem. Int. Ed. 37, 1608-1633.

Schoemaker, M., Feldbruegge, R., Trau, D., Gruendig, B., and Spencer, F. 1994, Enzyme Sensors for Triglycerides and Essential Fatty Acids. Fat. Sci. Technol. 96, 420–421.

Schulze, B., Wubbolts, M.G., 1999, Biocatalysis for Industrial Production of Fine Chemicals. Curr Opin Biotechnol, 10, 609–615

Sharma, R., Chisti, Y., and Banerjee, U.C., 2001. Production, Purification, Characterization, and Applications of Lipases. Biotechnology Advances, 19, 627-662.

Shinkai, S., Araki, K., Tsubaki, T., Arimura, T., and Manabe, O., 1987, New syntheses of calixarene-p-sulphonates and p-nitrocalixarenes. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 2297-2299.

Shinkai, S., Shiramama, Y., Satoh, H., Manabe, O., Arimura, T., Fujimato, K., and Matsuda, T., 1989, Selective extraction and transport of UO_2^{2+} with calixarene-based uranophiles, J. Chem. Soc. Perkin Trans. II, 8, 1167–1171.

Silman, I.H., and Katchalski, E. 1966, Waterinsoluble Derivatives of Enzymes, Antigens and Antibodies. Ann. Rev. Biochem. 35, 837–877

Sosyal, A., Bazi Endüstriyel Enzimlerin İmmobilizasyonu İçin Aşi Kopolimerizasyonla Lifsi Bir Destek Maddesinin Geliştirilmes, Doktora Tezi, Kirikkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2015.

Stetter, H. 1951, Enzymatische Analyse, Verlag Chemie, Weinheim.

Sztajer, H and Zboinska, E. 1988, Microbial Lipases in Biotechnology. Acta Biotechnol. 8, 169-175

Takahata, H., Uchida, Y., Ohkawa, Y., and Momose, T., 1993, Enzymatic Resolution of N,Ndialkyl- 3-hydroxy-4-pentanamides, Unsuccessful in Resolution by the Katsuki–Sharpless Asymmetric Epoxidation. Tetrahedron Asymmetry 4, 1041–1042.

Telefoncu, A., Temel ve Uygulamalı Enzimoloji. Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu. 22 Eylül-3 Ekim 1986. Çesme, İzmir-Türkiye, 326p. 1986.

Telefoncu, A. 1997, Enzimoloji, Lisansüstü Yaz Okulu Kitabı, 21-27 Eylül 446p, Kuşadası, Aydın-Türkiye.

Tumturk, H., Karaca, N., Demirel, G and Sahin, F., 2006, Preparation and application of poly(N,N-dimethylacrylamide-co-acrylamide) and poly(Nisopropylacrylamide-co-acrylamide)/κ-Carrageenan hydrogels for immobilization of lipase. Int. J. Biol. Macromol. 40, 281–285.

Vandamme, E. J. 1983, Peptide Antibiotic Production Through Immobilized Biocatalyst Technology. Enzyme Microb. Technol. 5, 403–415

Villeneuve, P., Mudehwa, J. M., and Haas, M. J. 2000, Customizing Lipases for Biocatalysis a Survey of Chemical, Physical and molecular Biological Approaches. J. Molecular Catalysis B: Enzymatic, 9, 113-148.

Wang, H., Liu, Y., Zhao, B. T., Chen, Q. F., and Zhang, H. Y., 2001. Molecular Design of Calixarene 5. Syntheses and Cation Selectivities of Novel Schiff's Base p-tert-Butylcalix [4] arenes. Chinese Journal of Chemistry, 19, 291-295.

Wang, Xiang- Yu, Jiang, Xiao-Ping, Li, Y., Zeng, S. ve Zhang, Ye- Wang, 2015, .Preparation Fe3O4@chitosan magnetic particles for covalentimmobilization of lipase from Thermomyces lanuginosus, International Journal of Biological Macromolecules, 75, 44-50,

Watanabe, S., Shimizu, Y., Teramatsu, T., Murachi, T., and Hino, T. 1988, Application of Immobilized Enzymes for Biomaterials Used in Surgery. Methods Enzymol. 137, 545–551.

Yildiz, H., Ozyilmaz, E., Bhatti, A.A, and Yilmaz, M., 2017, Enantioselectiveresolution of racemic flurbiprofenmethyl ester by lipase encapsulated mercaptocalix[4]arenes capped Fe3O4 nanoparticles, Bioprocess Biosyst Eng. 40, 1189-1196.

Yunus, W.M.Z.W., Salleh, A. B., Basri, M., Ampon, K., and Razak, C.N.A. 1996, Preparation and Immobilization of Lipase on to Poly(methyl acrylate Methyl Methaecrylate-divinyl Benzene) Beads for Lipid Hydrolysis. Biotechnol. Appl. Biochem. 24, 19–23.

Zinke, A., and Ziegler, E., 1944, Zur kenntnis des hartungs-prozesses von phenolformaldehyd-harzen, X. Mitteilung. Ber. dtsch. chem. Ges., 77, 264.

7. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	**:**	Rütsem MEHDİZADE
Uyruğu	**:**	Azerbeycan
Doğum Yeri ve Tarihi	**:**	Bakü 16.10.1993
Telefon	**:**	+994709577433
Faks	**:**	
e-mail	**:**	r.yusifoglu@gmail.com

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	283" nolu Lisesi / BAKÜ	2010
Üniversite	:	Bakü Devlet Üniversitesi, Kimya Bölümü /BAKÜ	2015
Yüksek Lisans	:	Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü	
Doktora	:		

YABANCI DİLLER

İngilizce

Türkçe

KATILDIĞI SEMİNER VE KONGRELER:

4. International Turk Pak Conference On Chemical Sciences (Executive) 2017.

E. Ozyilmaz, **Rustem MEHDIZADE**, "Synthesis of Magnetic *p*-Sulphocalix[8]arene Octacarboxylic Acid Derivative and Its Use InLipase Immobilization" 1. Eurasia Biochemical Approaches &Techonologies (1. EBAT), Side/TURKEY, 2018.