T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DANSİL GRUBU TAŞIYAN KALİKS[4]ARENLERİN SENTEZİ VE LİPAZ KATALİZLİ ENANTİYOSEÇİMLİ TEPKİMELERDE KULLANILMASI

Sevilay ÇETİNGÜNEY

ÖZET
YÜKSEK LİSANS
DANSIL GRUBU TAŞIYAN KALIKS[4]ARENLERIN SENTEZI VE LIPAZ KATALIZLI ENANTIYOSEÇIMLI TEPKIMELERDE KULLANILMASI.

Sevilay ÇETİNGÜNEY

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa YILMAZ

2016, 83 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Mustafa YILMAZ

Doç. Dr. Özlem ŞAHİN

Doç. Dr. Mustafa DURMAZ

Bu çalışmada dansil grubu taşıyan iki farklı yapıda kaliks[4]aren sentezlenerek lipaz immobilizasyonunda katkı materyali olarak kullanıldı. Bunun için literatürde belirtilen metoda göre *p-ter*-bütilkaliks[4]arenin diester türevi (**2)** sentezlendikten sonra aminoetildansil amit türevi **(3)** ile etkileştirilerek kaliks[4]arenin didansilamit türevi **(SH)** sentezlendi. Ayrıca kaliks[4]aren bileşiği N-(3-bromopropil)ftalimit ile tepkimeye sokularak **5** numaralı *p-ter*-bütilkaliks[4]aren ftalimid türevi elde edildi. Elde edilen bu bileşik uygun koşullarda hidrazin ile reaksiyona sokularak 1,3-konumunda aminoproksi grupları taşıyan kaliks[4]aren bileşiğine **(7)** dönüştürüldü. Sentezlenen bu bileşik (**6**), dansilklorür ile uygun şartlar altında etkileştirilerek aminoproksidansil grubu taşıyan kaliks[4]aren bileşiği (**SA**) sentezlendi.

Sentezlenen bileşiklerin yapıları spektroskopik teknikler (FTIR, ^{1}H-NMR) ile aydınlatılatıldıktan sonra, uygun koşullarda sol-jel metoduna göre Fe_3O_4 manyetik nanopartiküller varlığında lipaz immobilizasyonunda katkı maddesi olarak kullanıldılar. Elde edilen immobilize lipazlar rasemik flurbiprofen metil esterinin enantiyoseçimli tepkimelerinde kullanıldılar.

Anahtar Kelimeler: Kaliksaren, sol-gel, enantiyoseçimli, flurbiprofen, lipaz

ABSTRACT
MS THESIS

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

Sevilay ÇETİNGÜNEY

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCEOF SELÇUK UNIVERSITY

THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN CHEMISTRY

Advisor: : Prof. Dr. Mustafa YILMAZ

Year, 83 Pages

Jury

Prof. Dr. Mustafa YILMAZ

Doç. Dr. Özlem ŞAHİN

Doç. Dr. Mustafa DURMAZ

In this study deals with the synthesis of two new fluorescent calix[4]arenes bearing dansyl groups. The synthetic derivatives were utilized as additive material for lipase immobilization. In this regard different schemes were designed that contains first synthesis of p-tert-butyl calix[4]arene (**1**) and calix[4]arene ester derivative (**2**). The compound **2** was reacted with the 1,3-proplydiamine modified dansyl chloride (**3**) to furnish compound (**SH)**. In second Scheme compound **1** was reacted with 3-bromopropyphathamide to synthesize compound **5** and then was hydrolyzed to convert into amine calix[4]arene derivative (**6**). Amine derivative *p-ter*-tutylcalix[4]arene was reacted with dansyl chloride the give fluorescent properties to compound (**SA**).

After characterization with FTIR and ^{1}H-NMR techniques, compounds were used as additive for lipase immobilization in the presence of Fe_3O_4 nanoparticles by sol gel method under optimize conditions. The results of catalytic activity and enantioselectivity of the encapsulated lipases in the hydrolysis reaction of racemic flurbiprofen methyl ester.

Keywords: Calixarene, sol-gel, enantioselectivity, flurbiprofen, lipase

ÖNSÖZ

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

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri koordinatörlüğü tarafından BAP 15201094 nolu yüksek lisans tez projesi olarak desteklenmiştir.

Öncelikle bu çalışma boyunca bana yol gösteren, sayesinde pek çok pratik bilgi edinip kendime çok şey katabildiğim, her zaman ılımlı ve eğitici çok değerli, danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa YILMAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmayı yürütebilmem için sağladığı destekten dolayı Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarımda bana her konuda yardımcı olan ve tezimin hazırlanmasında emeği geçen Doç. Dr. Elif ÖZYILMAZ, ve doktora öğrencisi Mehmet OĞUZ'a ile NMR Uzmanı Kadir TANRIVERDİ teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımı gerçekleştirmem için bana laboratuar imkanı sağlayan Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölüm Başkanlığına ve Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde görev yapan hocalarıma teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca beni maddi, manevi destekleyen, akademik kariyer yapmamı belki benden daha çok isteyen, eşlerini, benzerlerini bulamayacağım inanılmaz aileme; sevgili annem Asiye ÇETİNGÜNEY'e, babam Mehmet ÇETİNGÜNEY'e ve kardeşlerime ve manevi desteğini esirgemeyen sevgili arkadaşım Yiğit GALYUNOĞLUN'a sonsuz teşekkür ediyorum.

Onlarsız teşekkürü tamamlayamayacağım elbette ki başta ananeme ve dedeme, teşekkür edemediğim her şey için sonsuz teşekkürler…

Sevilay ÇETİNGÜNEY

KONYA-2017

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI ..... **i**

TEZ BİLDİRİMİ ..... **ii**

DECLARATION PAGE ..... **ii**

ÖZET ..... **iii**

ABSTRACT ..... **iv**

ÖNSÖZ ..... **v**

İÇİNDEKİLER ..... **vi**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **x**

1. GİRİŞ **1**

1.1. Kaliksarenler 2

1.1.1. Kaliksarenlerin Adlandırılması 5

1.1.2. Kaliksarenlerin Sentezi 6

1.1.2.1. Kaliksarenlerin Çok Basamaklı Sentezi 6

1.1.2.2. Kaliksarenlerin tek basamaklı sentezi 7

1.1.3. Kaliksarenlerin konformasyonları ve Reaksiyon mekanizmaları 9

1.1.3.1. Kaliksarenlerin Reaksiyon mekanizmaları 9

1.1.3.2. Kaliks[4]arenlerin komformasyonu arasındaki ilişki 14

1.1.4. Kaliksarenlerin Fiziksel Özellikleri 16

1.1.4.1. Erime Noktası 16

1.1.4.2. Çözünürlük 16

1.1.5. Kaliksarenlerin Kullanım Alanları 16

1.1.5.1.Kaliksarenlerin sensör çalışmalarında kullanılması 17

1.1.5.2. Molekül veya İyon Taşıma Çalışmalarında Kullanılması 19

1.1.5.3. Kolon Dolgu Materyali Olarak Kullanılması 20

1.1.5.4. Faz Transfer Katalizör olarak kullanılması 22

1.1.5.5. Kiral akiral katalizör çalışmalarında kaliksarenlerin kullanılması ... 23

1.1.5.6. Enzim İmmobilizasyonu Çalışmalarında Kullanılması 25

1.2. Enzimler ve Genel Özellikleri 25

1.2.1. Lipazlar 26

1.2.1.1. Candida rugosa Lipaz (CRL) 27

1.2.2. Lipazların Genel Özellikleri 28

1.2.2.1. Optimum pH 28

1.2.2.2. Optimum sıcaklık 28

1.2.2.3. Lipazın aktivasyonu ve inhibisyonu 28

1.2.2.4. İzoelektrik nokta(pI) 28

1.2.2.5. Aktivite 29

1.2.3. Enzim İmmobilizasyonu 29

1.2.4. İmmobilizasyon Yöntemleri 30

1.2.4.1.Taşıyıcıya Bağlama Yöntemleri 31

1.2.4.2. Kovalent bağlanma 32

1.2.4.3. Adsorpsiyon 32

1.2.4.4. İyonik Bağlama 33

1.2.4.5. Çapraz Bağlama Yöntemleri 33

1.2.4.6. Tutuklama Yöntemleri 34

1.2.4.7. Sol-jel tutuklama 34

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI 36

3. MATERYAL VE YÖNTEM 43

3.1. Enstrümental Teknikler 43

3.2. Kimyasal Sentezler 43

3.2.1. 5, 11, 17, 23-Tetra-ter-bütil-25,26,27,28-tetrahidroksikaliks[4]aren (Gutsche ve ark., 1990) 43

3.2.2. 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,27-dimetoksikarbonilmetoksi- 26, 28 - dihidroksi kaliks [4] aren (Rodrigues ve ark., 1991) 44

3.2.3. 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,27dihidrazinamitkarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi-kalik s[4]aren (Bakunina ve ark., 2000) 45

3.2.4. Kaliks[4]aren'in didansil hidrazit türevinin (SH) sentezi: 46

3.2.5. 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,27-bis(3-ftalimidopropoksi)-26,28-dihidroksi kaliks[4]aren (4) (Chrisstoffels ve ark., 1999) 47

3.2.6. 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,27-bis(3-aminopropoksi)-26,28-dihidroksi kaliks[4]aren (7) (Chrisstoffels ve ark., 1999) 47

3.2.7. Kaliks[4]aren'in diamin türevinin(5) dansil klorür ile etkileştirilmesi (SA) sentezi: 48

3.2.8. Manyetik Fe3O4 nanopartikülünün sentezi (Wang ve ark., 2005) 49

3.2.9. Sol-gel metoduna göre Lipaz İmmobilizasyonu (Reetz ve ark., 2003) 49

3.2.9.1. Protein miktarı (Bradford, 1976) 50

3.2.9.2. Aktivite Tayini (Peiris ve ark., 2003; Wu ve ark., 2004) 51

3.2.9.3. Optimum pH tayini 52

3.2.9.4. Optimum sıcaklık tayini 52

3.2.10. HPLC çalışmaları 52

3.2.10.1. Enantioseçimli Tepkimelerin Genel Prosedürü (Bracale ve ark., 2002) 52

3.2.10.2. Konfokal Mikroskobu ile görüntüleme 53

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA 54

4.1. Sol-Jel Tekniğine göre Lipaz İmmobilizasyonu 66

4.1.1.Optimum pH 68

4.1.2. Optimum sıcaklık 69

4.1.3.Termal Kararlılık 70

4.1.4.Tekrar Kullanılabilirlik 71

4.2. İmmobilize Lipazların Enantiyoseçimli Tepkimelerde Kullanılması 72

4.2.1. Farklı sıcaklıklarda dönüşümler 75

4.2.2. Tekrar kullanılabilirlik 76

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 77

6. KAYNAKLAR 79

7. ÖZGEÇMİŞ 85

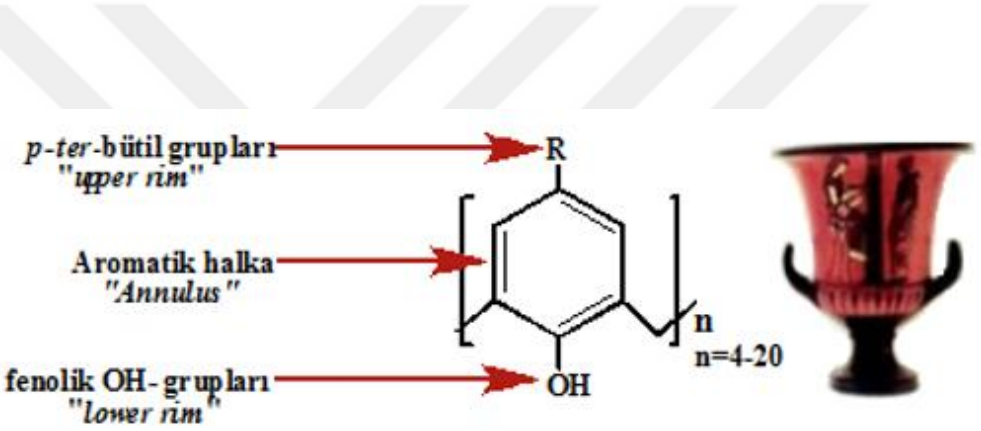
SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar

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

1. GİRİŞ

Supramoleküler kimyanın öncüsü olan bilim adamları, Supramoleküler kimyayı en kısa tanımıyla, konuk-konak durumunda olan iki organik molekül arasında kovalent olmayan etkileşimleri olarak tanımlamaktadır. Ev sahibi ve misafir ilişkisi gibi görünen bu durumda konak görevini gören moleküller büyük yapıda ve bu moleküller enzim ya da sentetik halkalı bir organik molekül olmaktadır. Konuk moleküller ise anyon, katyon ya da iyon çiftlerinden oluşmaktadır. Kimya biliminin sonsuz dünyasında bu tanım yavaş yavaş sade bir hal almıştır. Daha içerikli bir tanım gerekirse, onak moleküller, içerisinde yakınsak gruplar bulunduran, Lewis bazı olan verici atomlardır. Konuk moleküller ise ıraksak gruplar bulunduran, Lewis asiti yapısında moleküller ya da metal katyonlarından oluşmaktadır.

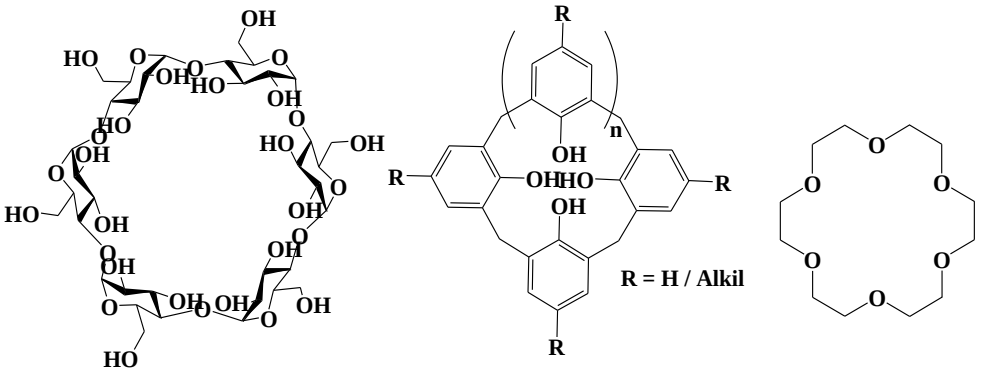


Şekil.1.1. Kaliksarenler

Kovalent olmayan bağlar için; hidrojen bağları, iyon-iyon etkileşimleri, solvasyon, van der Waals, dipol-dipol, hidrofobik, pi-pi, anyon-pi, katyon-pi etkileşimleri gibi örnek verilebilir. Bu bağlarda her birinin kuvveti farklı farklı ve dolayısıyla oluşan moleküle sağladığı özellikler de farklı olacaktır. Böylece makro moleküllerin oluşmasını sağlayan supramoleküller doğadan izole edilebilmekte ya da laboratuvarlarda sentezlenebilmektedir.

Supramoleküller kimya bize tek başına bazı özelliklere sahip olmayan moleküllerin birleşerek yeni özelliklere sahip olması avantajını sağlamaktadır. Bu avantajlardan birkaçı ışığa karşı tutum sergileme ve moleküler tanıma olarak

sayılabilir. Bu moleküller küçük kimyasal molekülleri bir kapan gibi tutabilir ve bu küçük moleküllerin tayininde kullanılabilirler.



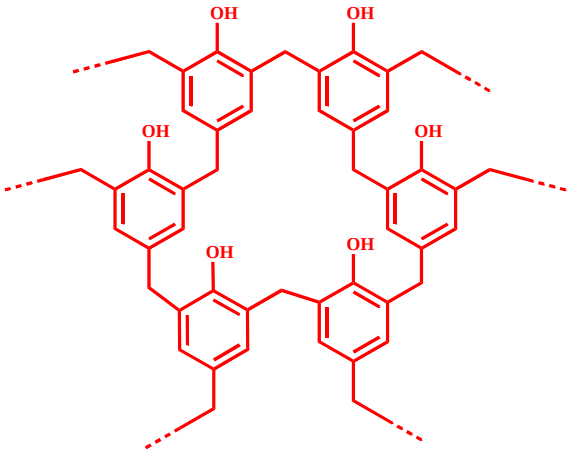
Siklodekstrin *Kaliksaren* *Taç (crown) Eter*

Şekil.1.2. Siklodekstrin, kaliks[n]aren, taç (crown) eter'in gösterimi

Bu devasa moleküllerin en önemlileri kalikserenler, siklodekstirinler ve taç eterlerdir. Son zamanlarda kalikserenlere ilgi hayli artmış ve üçüncü kuşak supramoleküller olmalarını sağlamıştır. Çünkü bu bileşikler halkalı yapıya sahip olup, çok kolay ve pahalı olmayan bir yoldan sentezlenebilmektedirler. Kaliksarenler anyon, katyon, nötral moleküllerle seçimli kompleks yapabilmektedirler.

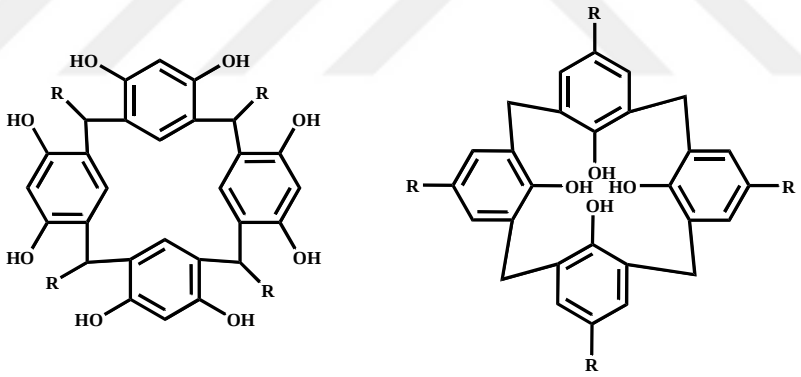
1.1. Kaliksarenler

Kaliksarenler bir kimyacı olan Alman asıllı Adolph Van Baeyer tarafından 1872 yılında *p*-ter bütil fenol ile formaldehitin bazik ortamdaki tepkimesi ile elde edilmiştir. Bazı enstrümantal araçların eksikliği yüzünden yapısal olarak aydınlatılamamıştır 20. yüzyılın ortalarında Leo Baekeland kendi adını verdiği bir reçine elde etmiştir ve Baekeland isimli reçinenin patentini alarak ilk kez ticari amaç güdülebilmiştir. Leo Baekeland, Baekeland adını verdiği bu reçineyi fenol ile formaldehitin reaksiyonu ile elde etmiştir. Baekeland katı ve esnek yapıda bir reçinedir.(Baekeland, 1908).



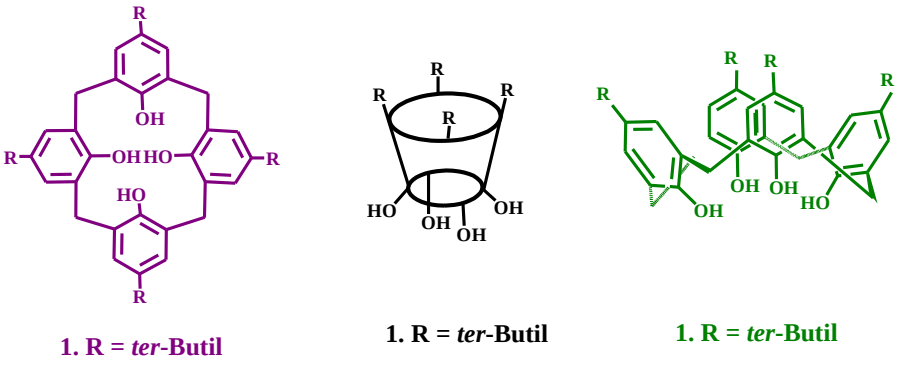
Şekil. 1.3. Fenolik reçine (Baekeland, 1908)

Bakalit'in elde edilişinden 40 yıl sonra p-ter-bütil fenol ve formaldehitin NaOH 'lı ortamda 200 °C 'de ısıtılarak reaksiyonu sonucu; e.n. 340 °C olan büyük molekül ağırlıklı bir madde elde edilmiş ve bu başarının sahipleri, Avusturya asıllı kimyacı Alois Zinke ve arkadaşlarıdır. (Zinke ve Ziegler, 1944), Aynı yıllarda Heinz Vagel ve Niederl rezersinol ve asetaldehitden halkalı tetramer bir molekül sentezlemişlerdir.



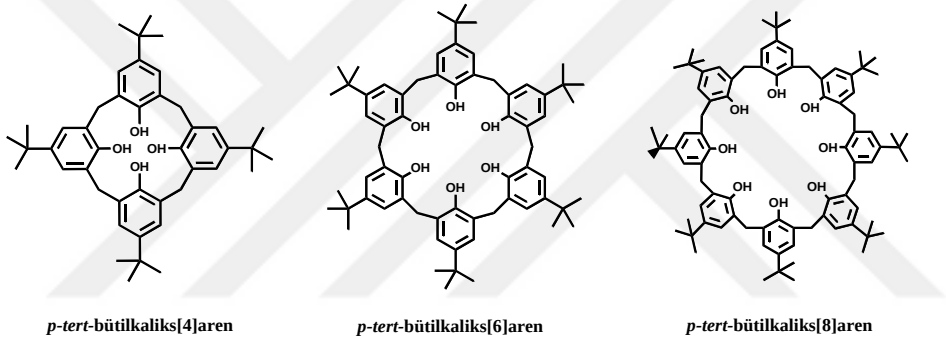
Şekil. 1.4. Niederl ve Vogel ' in ileri sürdüğü halkalı tetramer yapıdaki bileşik.; Zinke ve Ziegler'in ileri sürdüğü halkalı tetramer yapıdaki bileşik.

İlk olarak kaliksaren kelimesi 1975'de David Gutsche tarafından dile getirilmiş ve günümüzde, fenolik yapıların birbirine metilen köprüleri ile *o*-pozisyonundan bağlandığı halkalı oligomer yapılar olarak tanımlanmıştır.(Böhmer ve ark., 1991; Stewart ve Gutsche, 1999)



Şekil 1.5. Kaliks[4]arenlerin farklı gösterimleri

Kaliksarenler fenolik OH gruplarının sayısına göre adlandırılırlar(n=1, 2, 3……, 20).



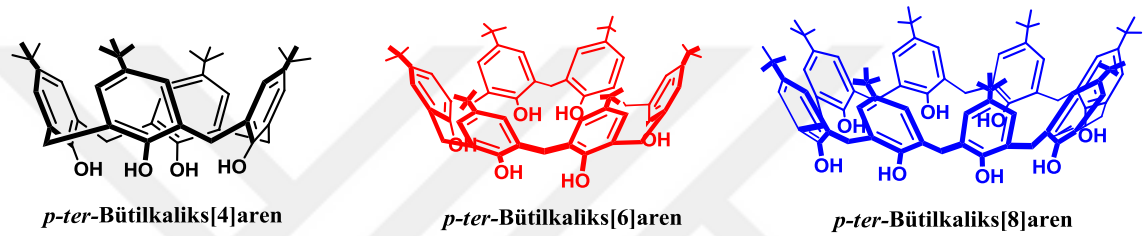
Şekil. 1.6. Kaliks[n]arenlerin yapısı

Günümüzde kaliksarenler 3. nesil bileşikler olarak adlandırılır. Bu bileşiklerin başında siklodekstrinler ve taç eterler gelir (Gutsche, 1988; Gutsche, 2008). Kaliksarenlerin kendilerine has özelliklerine bakılacak olursa; hem fenolik birimlerin *p*-konumundan hemde fenolik OH gruplarından fonksiyonlandırılabilirler. Erime noktaları yüksektir (Gutsche ve ark., 1981). Bazı çözücülerde çözünebilmeleri NMR Spektrometresi ile yapılarının yapıları kolayca aydınlatılmaktadırlar.

1.1.1. Kaliksarenlerin Adlandırılması

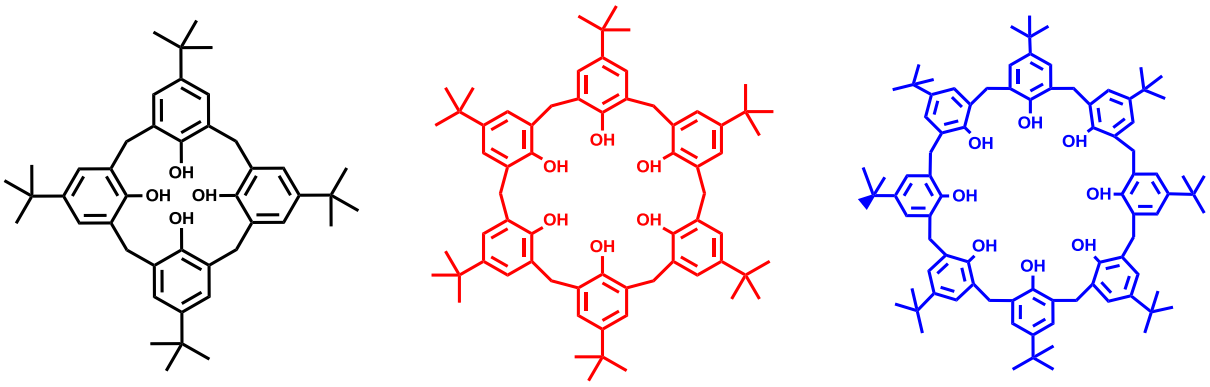
Kaliks[n]aren kelimesi Yunancada ‘Chalice ’, taç anlamında ve halka anlamına gelen ‘aren’ kelimesinin birleşmesiyle oluşmuştur. Büyük parantez arasında bulunan n harfi ise tekrar eden fenolik halkanın sayısını göstermektedir.(Gutsche ve Muthukrishnan, 1978)

Makrosiklik bileşikler olan kaliksarenlerin (IUPAC) sistemine göre adlandırılması zor olmaktadır. Bu yüzden kaliksarenler ile çalışan bir çok araştırmacı tarafından adlandırılması denenmiştir.



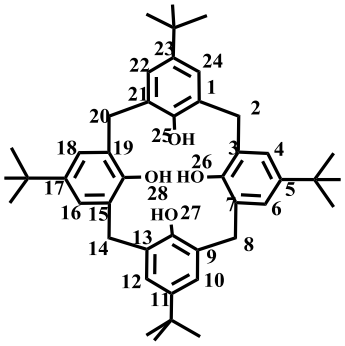
***p-ter*-Bütilkaliks[4]aren** **p-ter-Bütilkaliks[6]aren** ***p-ter*-Bütilkaliks[8]aren**

Şekil. 1.7. *p-ter*-Bütilkaliks[4]aren (halkalı tetramer), *p-ter*-Bütilkaliks[6]aren (halkalı hekzamer) ve *p-ter*-Bütilkaliks[8]aren (halkalı oktamer)

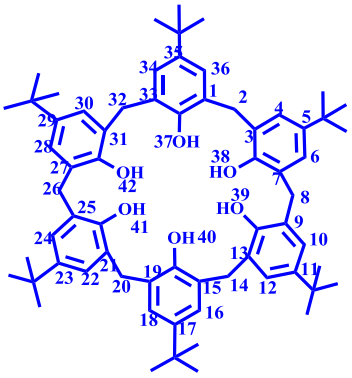


***p-tert*-bütilkaliks[4]aren** ***p-tert*-bütilkaliks[6]aren** ***p-tert*-bütilkaliks[8]aren**

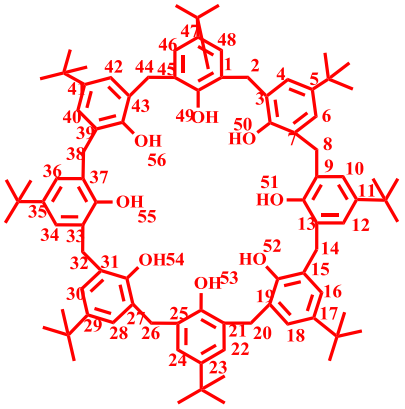
Şekil. 1.8. Kaliks[n]arenlerin yapısı



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



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



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

Şekil. 1.9. *p-ter*-Bütilkaliks[4]aren, *p-ter*-bütilkaliks[6]aren ve *p-ter*-bütilkaliks[8]aren' in numaralandırılması

Şekilde görüldüğü gibi kaliksarenler isimlendirilmiş ve bu isimlendirme numaralar aracılığıyla yapılmıştır. Yunancada vazo anlamını taşıyan ‘’kaliks’’ supramoleküler kimyada halkalı anlamını taşıyan ‘’aren’’ ve tekrar eden fenolik birimleri sayısını ifade eden ‘’n’’ ‘in birleşmesiyle kaliksarenler oluşmuştur. Bu sebepten dolayı isimlendirmenin daha kısa olması için fenolik birimin sayısının ve fenolün substitue bölümünü ifade eden adlandırma kullanılmıştır. Bu amaç ile *p-ter*-bütil fenol ile formaldehitten meydana gelmiş dört üyeli halkalı tetramer ,*p-ter*-bütil kaliks[4]aren olarak adlandırılmaktadır.

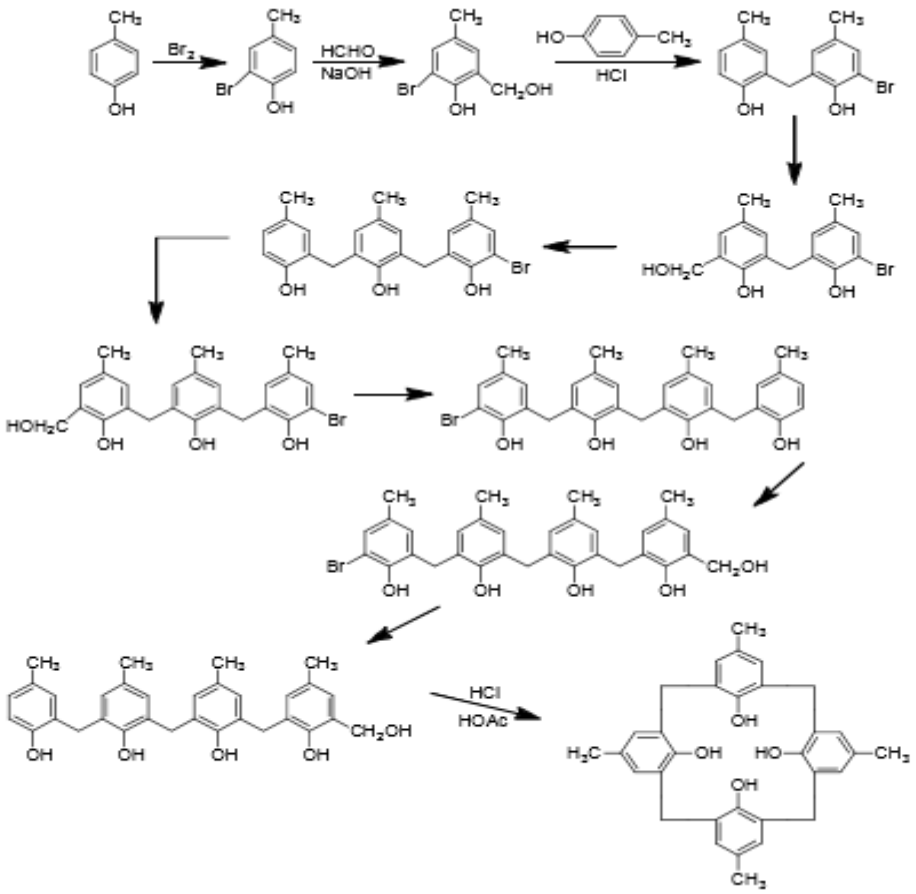
1.1.2. Kaliksarenlerin Sentezi

1.1.2.1. Kaliksarenlerin Çok Basamaklı Sentezi

Kaliksarenler konuk-konak kimyasında önemli bir yere sahiptir. Sentezlenebilmeleri bakımından pratik, yüksek verimli ve tek basamaklı sentezlenebilmeleri bir çok çalışmalarda avantaj sağlayabilmektedir (Aksoy ve Öztürk, 2011).

Hayes ve Hunter 1956 yılında yapmış oldukları çalışmada kaliksarenlerin çok basamaklı olarak sentezini gerçekleştirmiştir. Kammerer ve Happel bu çalışmayı daha sistematik hale getirerek genişletmiştir (Gutsche ve ark., 1979).

Kammerer ve Happel'in yöntemine göre *p*-krozolün orta konumundan herhangi biri bromla muhafaza edilir. Daha sonra arilleme ve hidroksimetilleme yapılarak düz tetramer sentezlenir. Oluşan tetramer hidrojenlenir ve debromlanır. Sonra seyreltilmiş asitli reaksiyon kabında halkalaşma tepkimesiyle *p-ter*-bütilkaliks[4]aren oluşumu gözlenir.



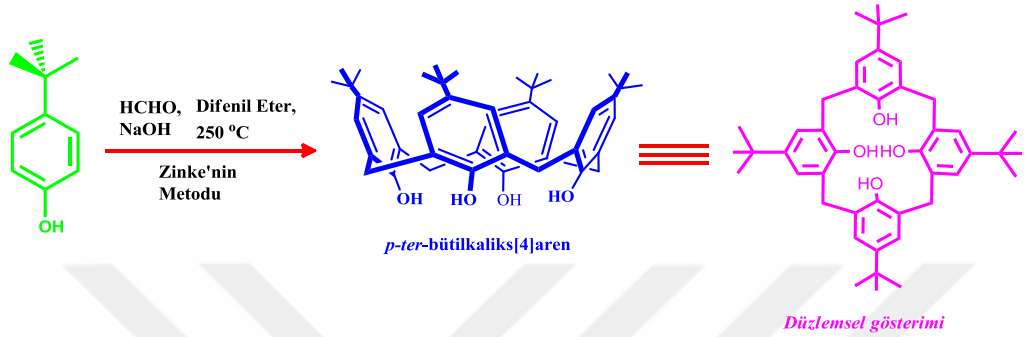
Şekil. 1.10. *p-ter*-bütilkaliks[4]aren' in çok basamaklı sentezi

Bu metodun tercih edilmeme nedeni ise çok basamaklı, uzun zaman alması yorucu olması ve verimin düşük olmasıdır.

1.1.2.2. Kaliksarenlerin tek basamaklı sentezi

(Gutsche, 1989) geliştirdiği metoda göre *p-ter*-bütilfenol, % 37 formaldehit çözeltisi ve fenol' e bağlı olarak 0.045 eşdeğer orana karşılık gelen miktarda NaOH

karışımı önce 110-120 ^{o}C arasında 2 saat ısıtılır. Oluşan ürün sonra difenil eterle 2 saat geri soğutucu altında kaynatılarak reaksiyon karışımının oda sıcaklığına gelmesi için bir süre beklenilir. Ürün süzülerek etil asetat ile yıkanır ve daha sonra su ile ve pH 'ı nötr olana kadar yıkanır. Saf ürün toluende kristallendirilerek elde edilmiştir. 342-344 ^{o}C' de eriyen beyaz renkli *p-ter*-bütilkaliks[4]aren sentezlenir.



Şekil. 1.11. *p-ter*-Bütilkaliks[4]aren' in tek basamaklı sentezi

Gutsche bu tek basamaklı sentezi gerçekleştirmeden önce p-köşesinde farklı gruplar olan fenolleri aktif metal hidroksitleri ile tepkimeye sokmuş ve fenol gruplarından sadece birinin saf ürün verdiğini görmüştür. Bu fenol grubu ise p-tert-bütilfenoldür. *p-ter*-bütilfenol'ün avantajları; diğer fenol gruplarından birden çok ürün elde edilirken, *p-ter*-bütilfenolden saf ve tek ürün elde edilir ve p-tert-bütilfenol molekülünde bulunan *ter*-bütil grubuna pratik olarak ve dealkilleme ile giderilir.

Gutsche ve arkadaşları kaliksaren sentezi yapılırken baz konsantrasyonlarını ve baz türlerinin ürün verimi üzerine etkisini incelemiş ve kaliksarenlerin fenolik birim sayısının baz miktarına göre değişimini gözlemiştir. katalitik miktarda baz kullanarak halkalı tetramer ve oktameri, stokiyometrik miktarda baz kullanarak ise halkalı hekzameri elde etmiştir (Dhawan ve ark., 1987; Gutsche, 1991).

Halkalı tetramer yapı sentezi için NaOH tercih edilirken, ortam şartları aynı olduğu durumlarda halkalı hekzamer yapı için ise genellikle RbOH olmak üzere KOH ve CsOH da tercih edilmektedir. Halkalı hekzamer sentezi için RbOH bazı kullanıldığında verimin en yüksek olduğu görülmüştür. Bu durum oksijen atomlarının birbirine uzaklığı yani katyon çapı ve "template" etki ile açıklanabilir. Oksijen atomuları arasındaki uzaklık halkalı oktamer > Halkalı hekzamer >halkalı tetramer olmak üzere sıralanabilir.

Tablo 1.0. Alkali metal hidroksitlerinin tetramer ve hekzamer verimi üzerine etkileri

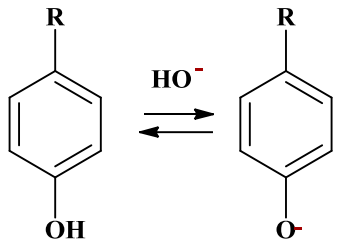
Alkali Hidroksit	*Katyon Çapı (Å)*	*% Hekzamer*	*% Tetramer*
LiOH	1.36	-	60
NaOH	1.94	-	23
KOH	2.66	56	-
RbOH	2.94	70	-
CsOH	3.34	40	5

Verilen halkalı yapıların oksijenle arası mesafeleri ve alkali metallerin hidroksitlerinin iyon çapları karşılaştırıldığında KOH ve RbOH hekzamerin boşluklarına kolayca yerleşebilir (Gutsche ve ark., 1981)

Bunlardan ayrı olarak çözücü, sıcaklık, baz konsantrasyonu, katyon çapı kaliksarenlerin verimine etki etmektedir.

1.1.3. Kaliksarenlerin konformasyonları ve Reaksiyon mekanizmaları

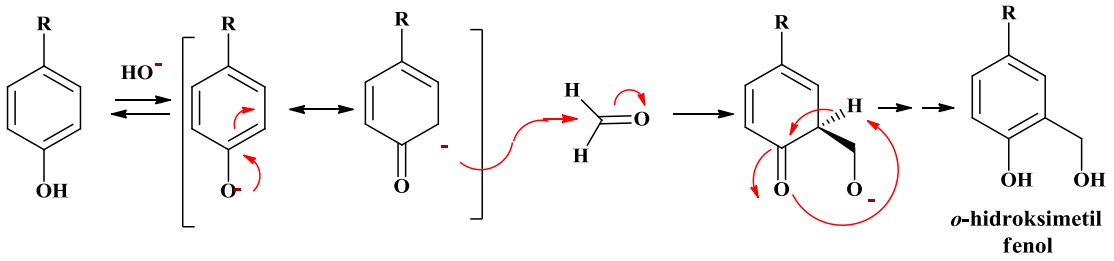
1.1.3.1. Kaliksarenlerin Reaksiyon mekanizmaları



Şekil. 1.12. Fenoksit iyonu oluşumu

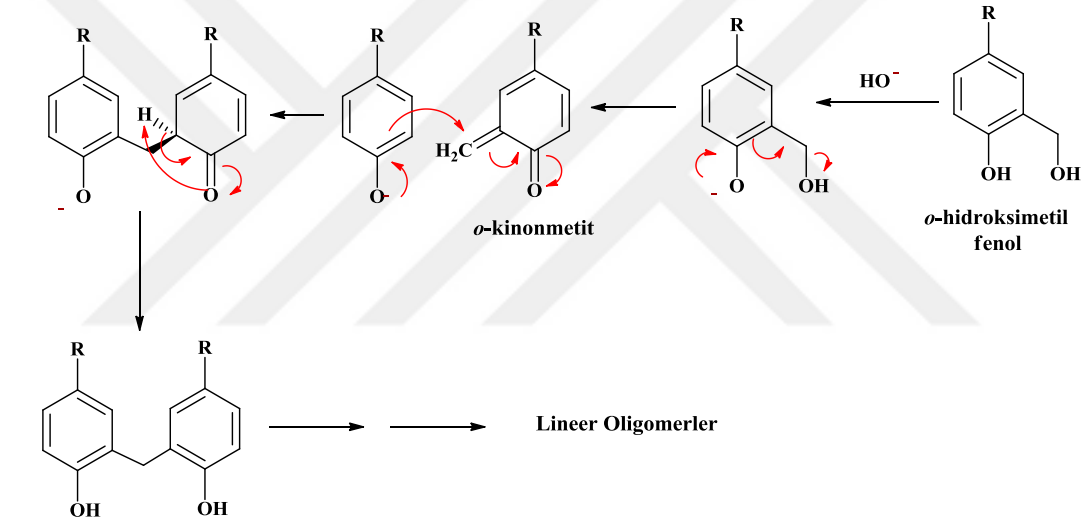
Şekildeki reaksiyonda ilk başta fenolik birimin oksijeni ile aktif metal hidroksitlerinden birinin OH grubunun reaksiyonu fenoksit oluşumu ile başlar. Daha sonra oluşan fenoloksit nükleofili formaldehitin karbonil grubu ile reaksiyon oluşturur.

Reaksiyon durdurularak, oluşan ürün bu basamakta elde edilebilir (Gutsche ve ark., 1989).



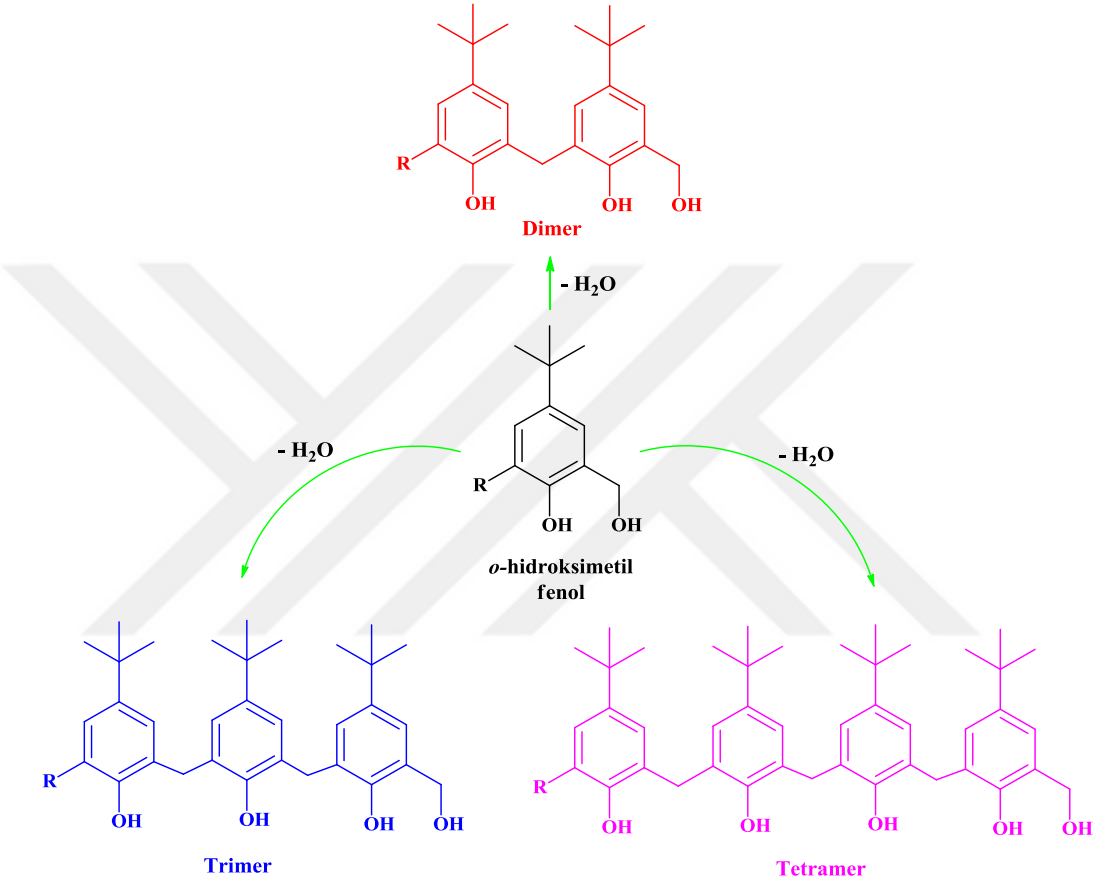
Şekil. 1.13. Hidroksimetilfenol oluşumu

İkinci basamakta ise izole edilen hidroksi metil fenolün aktif metallerin hidroksitleri varlığında *o*-kinonmetil ara ürüne dönüşümü ve bu ara ürünün fenoksit nükleofiliyle tepkimesi ile diarilmetil bileşiğinin izole edilmesi şeklinde sonuçlanabilir.



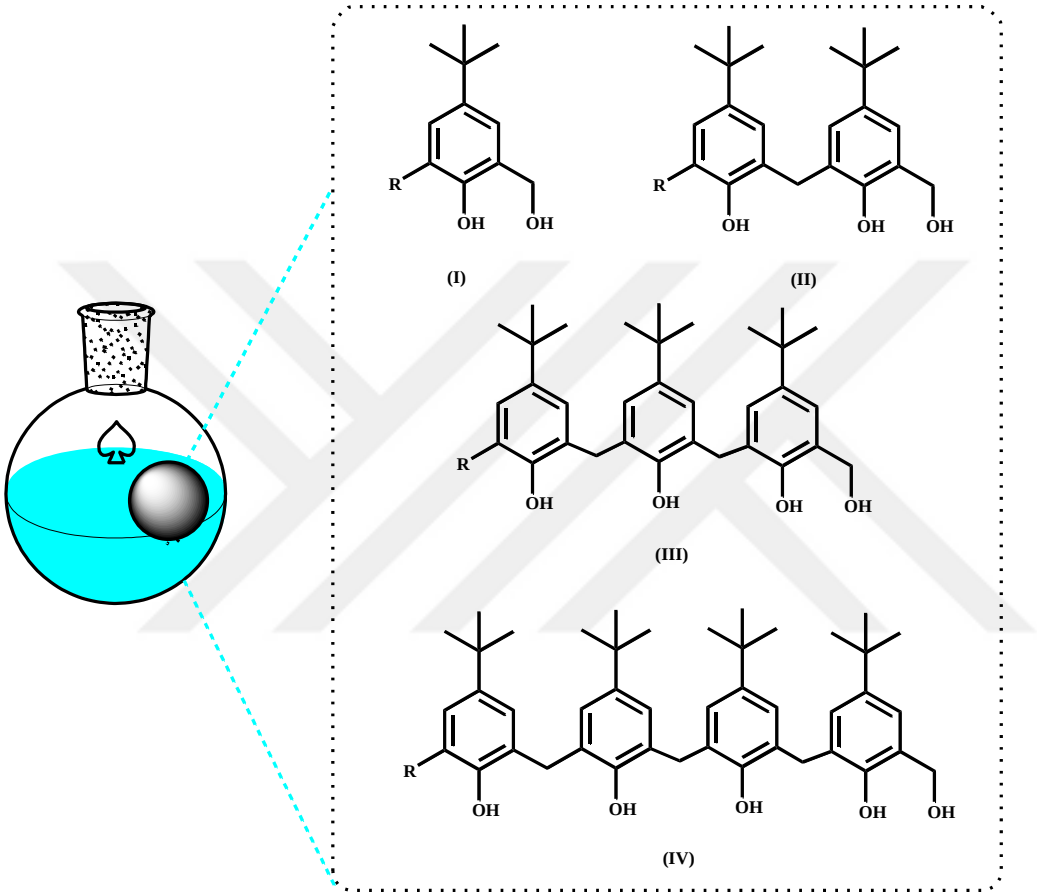
Şekil. 1.14. Diarilmetil bileşiklerinin oluşumu

Üçüncü basamakta oluşan hidroksi metil fenoller ve hidrasyona uğratılarak ,içerisinde dimer, trimer ve tetramer bulunan bir karışım meydana gelir (Şekil 1.14) ve ortamda 4 farklı ara ürün bulunur.



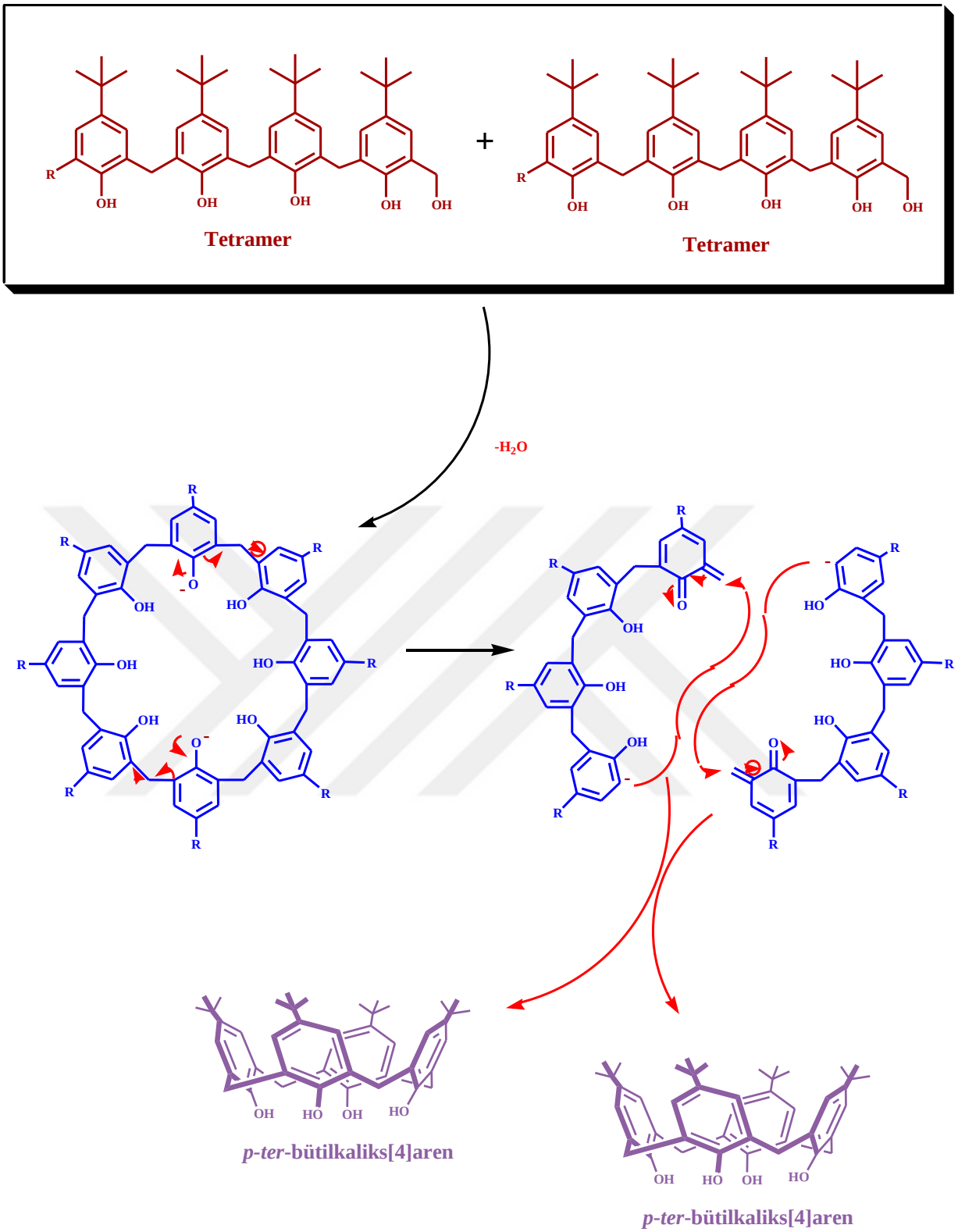
Şekil. 1. 15. Dimer, trimer ve tetramer oluşumu

Dördüncü basamak da ise ortamda ara ürün olarak bulunan dört bileşik de yüksek sıcaklık ve bazı koşullarda halkalı yapılı kaliksarenlere dönüşürler (Dhawan ve ark., 1987). Bu dönüşüm molekül içi hidrojen bağlarının varlığıyla gerçekleşir.



Şekil. 1.16. Ara ürün karışımları

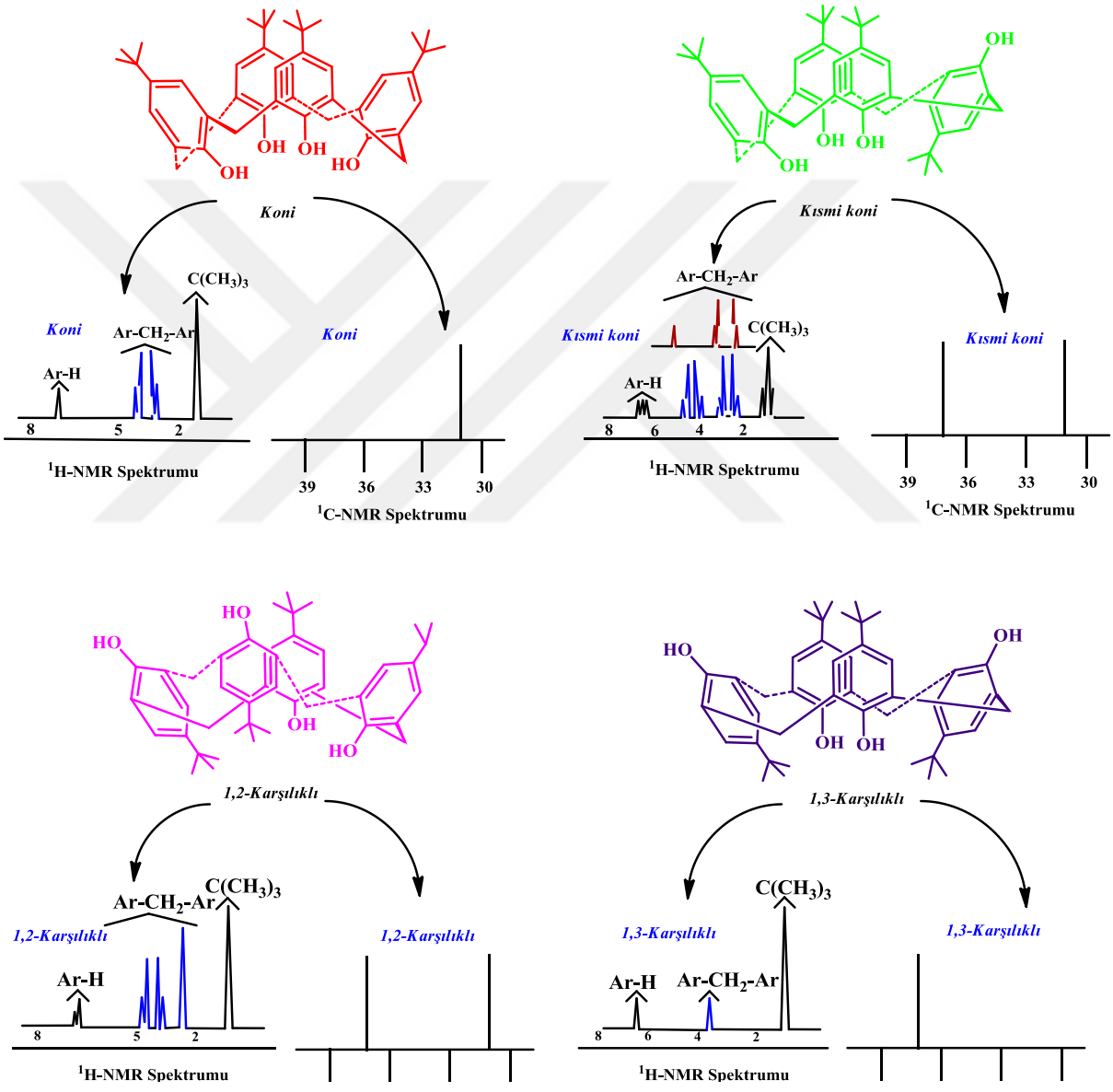
Ara ürünlerin yüksek sıcaklık ve uygun şartlar altında kaliksarenlere dönüşümü için bileşiğin merkez ekseninde dönme olmalıdır. Yarım ay şeklindeki bu ürünlere 'yalancı kaliksaren' denilmektedir (Dhawan ve Gutsche, 1983). Oluşan ürün türlerinden bazılarının ise moleküller arası enerjilerinin diğerlerine göre düşük olduğu gözlemlenmiştir. Oluşan bu ürünlere ise 'yarı kaliksaren' denilmiştir (Dhawan ve Gutsche, 1983).



Şekil.1.17. Lineer tetramerlerin halkalı kaliksarenlere dönüşmesi

1.1.3.2. Kaliks[4]arenlerin konformasyonu arasındaki ilişki

Yapısında aril halkaları bulunduran kaliks[4]arenler bu halkalarının yer değiştirmesiyle farklı konformasyonlarda bulunabilirler. Birbirinden farklı 4 konumu bulunan kaliks[4]arenlerin bu konformasyonları, 1,2- karşılıklı, 1,3-karşılıklı, kısmi koni ve konidir (Gutsche ve ark., 1989).



Şekil. 1.18. *p-ter*-Bütilkaliks[4]aren' in konformasyonları ve ^{1}H-NMR ve ^{13}C-NMR spektrumları

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

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

Kaliks[4]arenlerin konformasyonları birçok faktöre bağlı olabilir. Bu faktörler çözücü, sıcaklık, molekül büyüklüğü, substituentlerin tipidir.

Kaliks[4]arenlerin köprü Ar-CH_2-Ar grubunun ^{1}H-NMR spektrumları incelenerek konformasyonları tespit edilir.

Fenolik-OH grubundan foksiyonlandırılmayan kaliks[4]arenlerin kristal yapıları koni konformasyonundadır. Bunun nedeni ise üzerinde bulundurduğu OH gruplarının molekül içi hidrojen bağı yapabilmesidir (Gutsche ve ark., 1989)

Kaliksarenlerin konformasyonlarının oluşma sürecinde çözücü türünün büyük etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Apolar çözücülerden bazılarının kullanılmasıyla birlikte kaliksarenlerle etkileşimi sonucu dönüşüm hızı azalmıştır. Bazı polar çözücülerin ise molekül içi hidrojen bağını etkileyerek bu dönüşümün hızlı olmasını sağlamıştır. Çözücülerin kaliksarenle kompleks oluşturduğu bu durumla anlaşılabilmektedir (Gutsche ve ark., 1981).

Metilen hidrojenlerinin aromatik halka arasında bulunanlarının yüksek sıcaklıkta ve düşük sıcaklıkta sırasıyla singlet pik ve dublet pik verdiği görülmüştür.

Sıcaklığın değişiminin bir etkisi olarak *p-tert*-bütilkaliks[4]arenlerin konformasyonlarının farklılaşması örnek verilebilir.

1.1.4. Kaliksarenlerin Fiziksel Özellikleri

1.1.4.1. Erime Noktası

Kaliksarenlerin OH gruplarının yaptığı hidrojen bağları erime noktalarını belirler. *p-tert*-bütilkaliks[4]aren, *p-tert*-bütilkaliks[6]aren ve *p-tert*-bütilkaliks[8]aren'in erime noktaları sırasıyla 344°C, 380°C, 412°C dir. Kaliksarenlerin erime noktasına etki eden bir başka faktör ise taşıdıkları fonksiyonel gruplardır.

1.1.4.2. Çözünürlük

Kaliksarenler sınırlı sayıda organik çözücüde çözünebilirler. Bu organik çözücüler kloroform, piridin, karbondisülfürdür para- köşelerine uzun zincirli alkil grupları ,eter ve ester türevlerinin bağlanması ile birlikte organik çözücülerde çözünürlükleri artmaktadır. Karışım halinde bulunan kaliksaren türevleri çözünürlük farkı ve sürekli ekstraksiyon ile ayrıştırılabilirler (Gutsche ve ark., 1989).

1.1.5. Kaliksarenlerin Kullanım Alanları

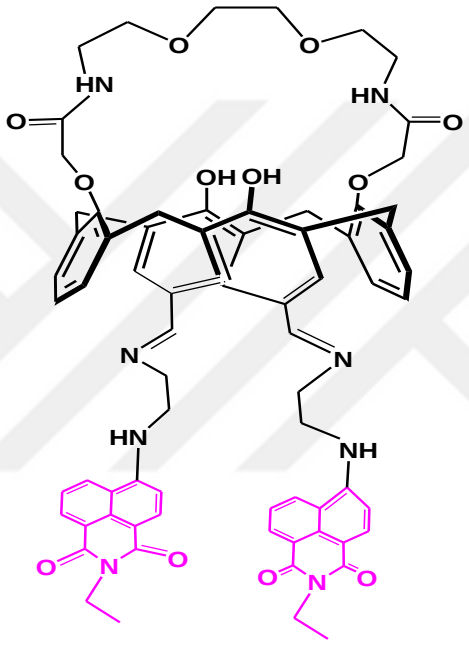
Kaliksarenlerin, bir çok uygulama alanları bulunmaktadır. Bunlardan bazıları ;

- Sensör (iyon seçici elektrot) çalışmalarında
- Molekül veya iyon taşıma çalışmalarında
- Kolon dolgu maddesi olarak kromotografi çalışmalarında
- Faz transfer katalizörü çalışmalarında
- Kiral ve akiral katalizör olarak kullanılmaktadır.
- Enzim immobilizasyonunda

Kullanılan bu uygulama alanlarıyla ilgili bazı örnekler aşağıda verilmiştir.

1.1.5.1.Kaliksarenlerin sensör çalışmalarında kullanılması

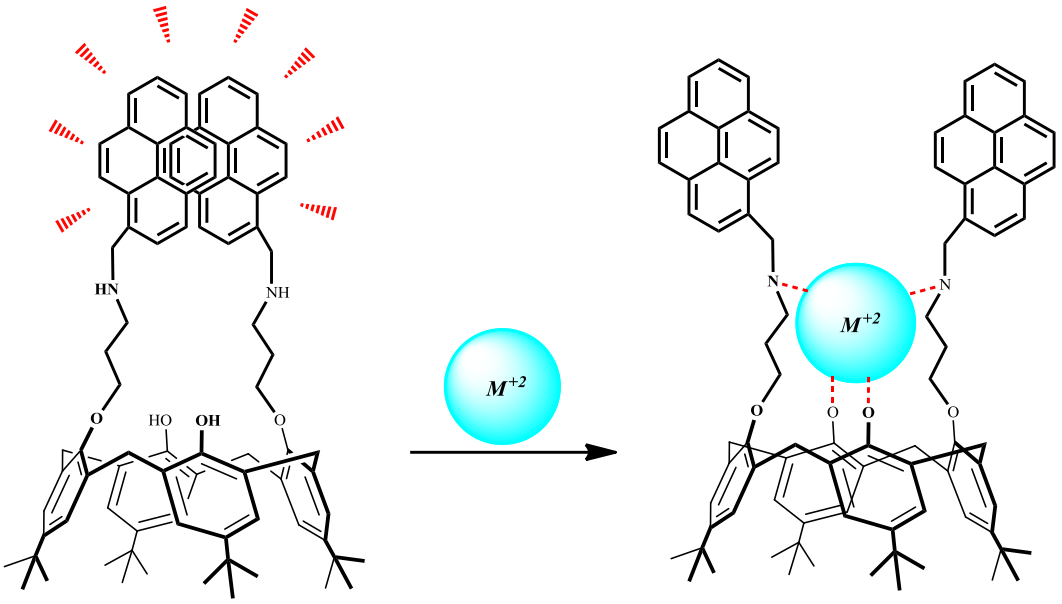
(Sahin ve ark., 2012; Sahin ve Yilmaz, 2012) naftilimit sübstitüe kaliks[4]aren yapısını sentezlemiş ve sentezlenen yapının metal iyonlarına karşı davranışını floresans özelliği sayesinde gözlemlemişlerdir. Sentezledikleri bileşiğin Zn^{+2}, Li^{+}, Ni^{+2}, Mg^{+2}, Ba^{+2}, Pb^{+2}, Cu^{+2} ve Na^{+} metal iyonları arasında duyarlılığını kıyaslamış ve en çok Cu^{+2} iyonuna karşı duyarlı olduğu ortaya konulmuştur. (Şekil 1.19) .



Şekil 1.19. Cu^{+2} iyonuna karşı duyarlı naftilamit sübstitüe kaliks[4]aren bileşiği

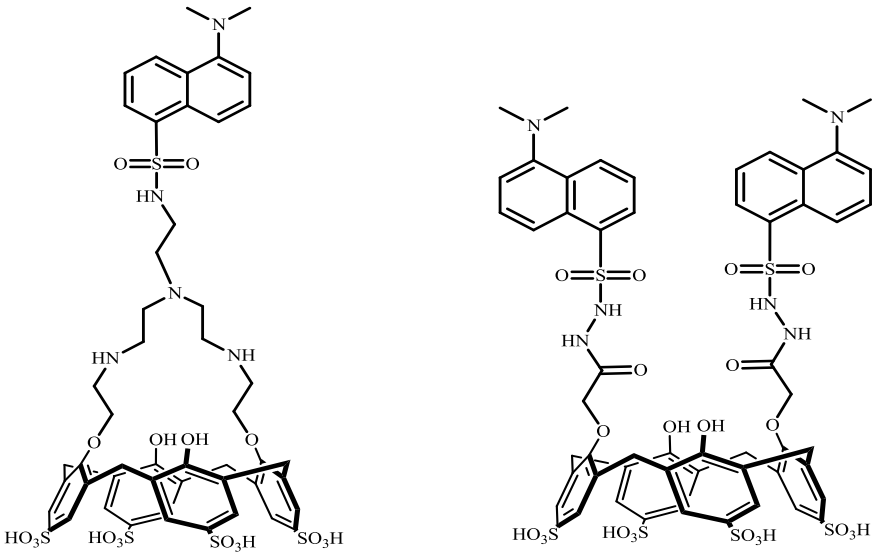
.

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



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

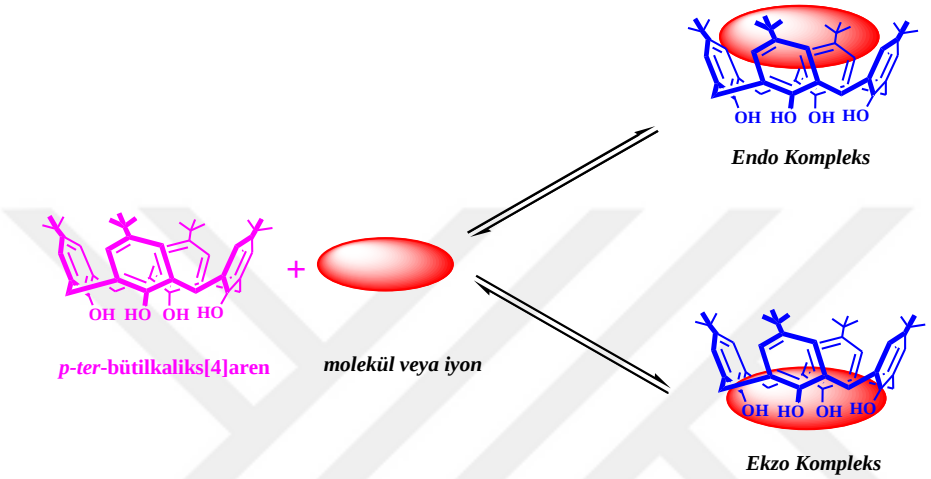
Yılmaz ve grubu (Oguz ve ark., 2017) suda çözünebilen sülfo kaliks[4]aren dansil türevlerini sentezleyerek canlı hücrede Hg^{+2} sensörü olarak kullanmışlar. Bu bileşiklerin canlı hücrede seçimli iyi bir sensör olabileceğini gözlemişlerdir. (Şekil 1.21).



Şekil. 1.21. Sülfo kaliks[4]aren dansil türevleri

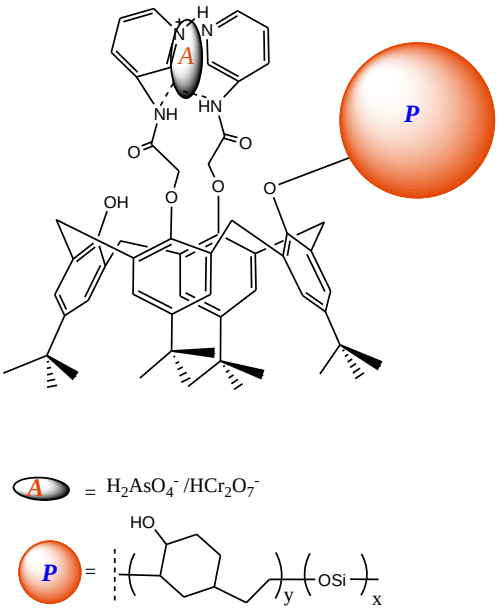
1.1.5.2. Molekül veya İyon Taşıma Çalışmalarında Kullanılması

Kaliksarenler, taç eterlerde olduğu gibi farklı konformasyonda bulunabilmekte ve fenolik birimlerinin sayısına göre boşluk çapları farklılaşmaktadır. Vazoya benzeyen boşlukları sayesinde bir çok iyonla veya organik bileşiklerle kompleks oluşturabilme özelliğine sahiptirler. Endo- ve ekzo- şeklinde kompleksleri bulunur. (Şekil 1.22). Bu kompleksleşmeler ile kaliksarenler, katyon, anyon ve molekül taşıyıcı olarak kullanılmaktadır (Doerfler ve ark., 2001).



Şekil. 1.22. Kaliks[4]arenlerin kompleks oluşum mekanizması

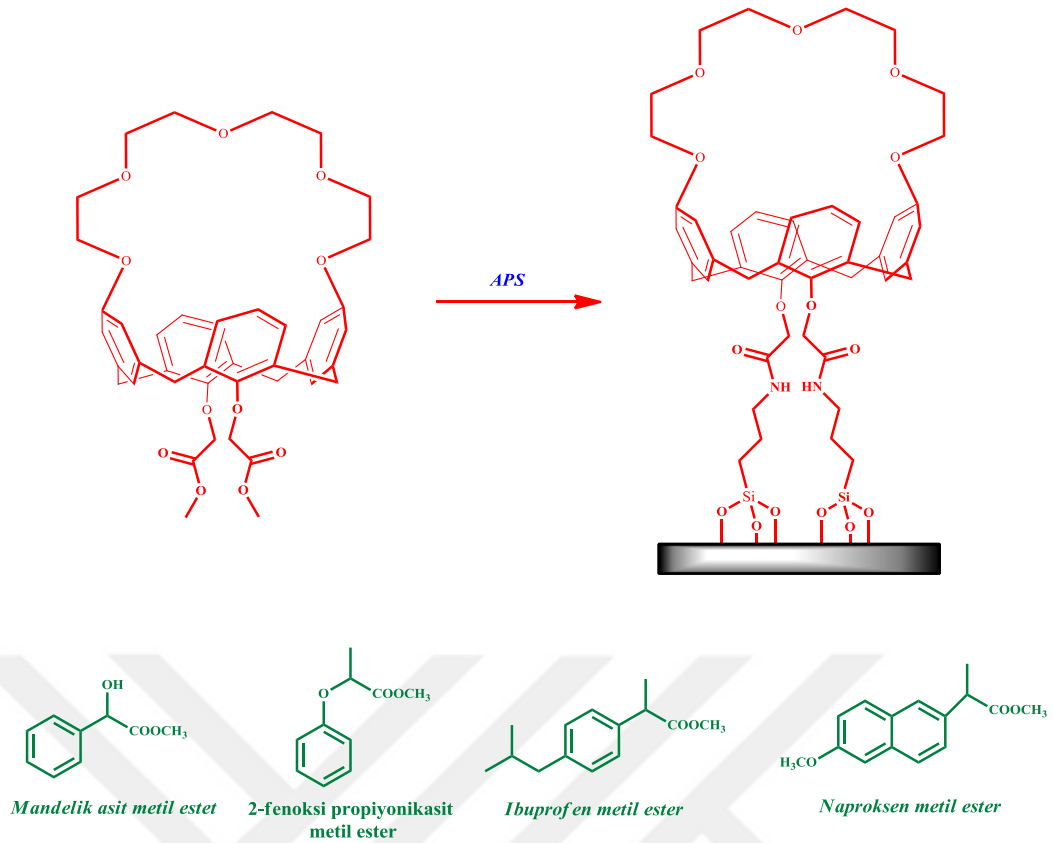
(Sayin, 2010), kaliks[4]aren türevi olan koni konformasyonda pridil gruplarıyla fonksiyonlu bir bileşik sentezlemişler ve silika üzerine kovalent bağ ile immobilize etmişlerdir. Sentezlenen kaliksaren türevi polimerin dikromat ve arsenat anyonlarıyla olan kompleksleşme özellikleri farklı pH aralığında incelenmiştir (Şekil 1.23) .



Şekil 1.23. Kaliks[4]aren dikromat ve arsenat iyonu reseptörü

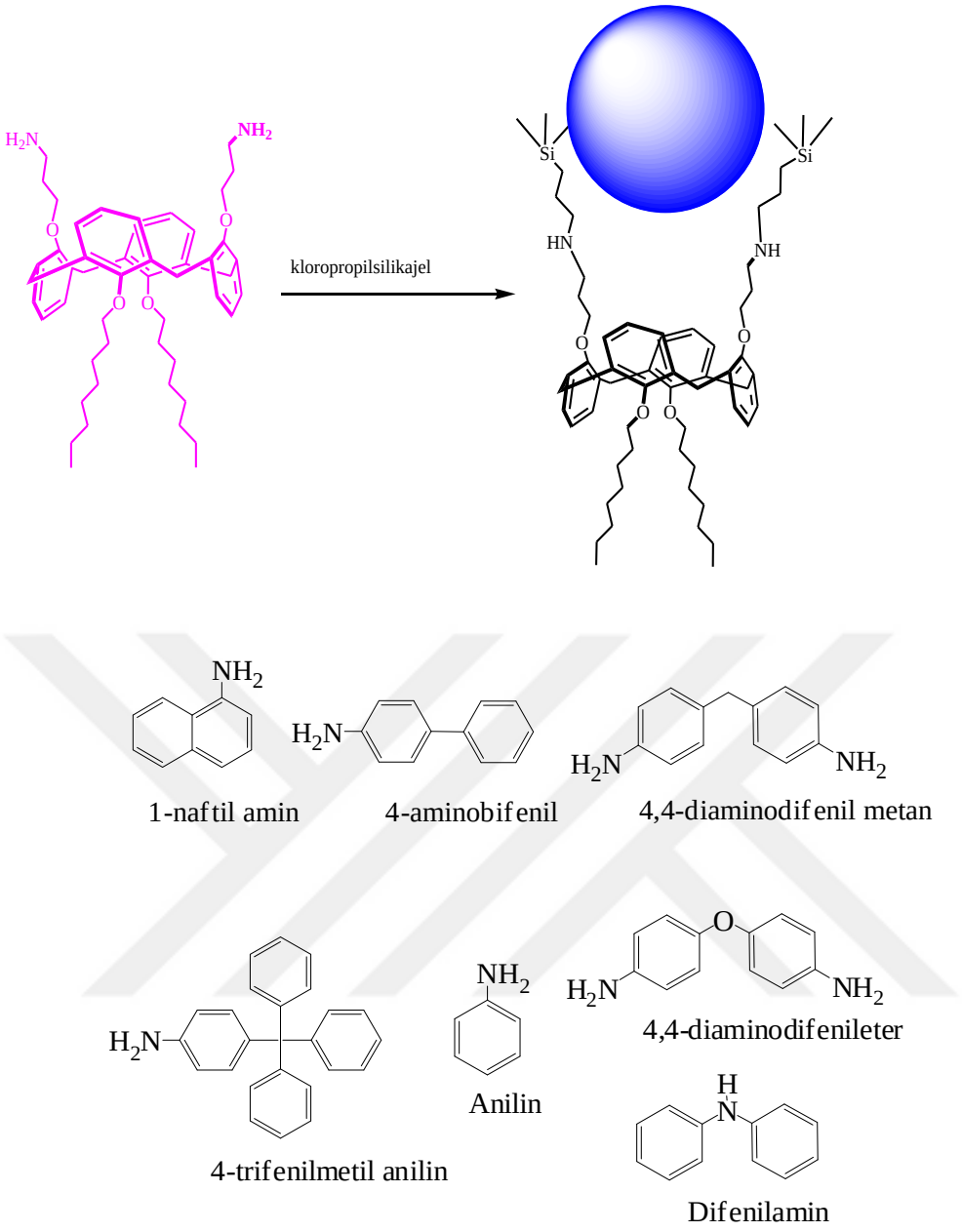
1.1.5.3. Kolon Dolgu Materyali Olarak Kullanılması

(Erdemir ve Yilmaz, 2011), kaliks[4]crown-5 halkalı bileşiği bağlı olan sabit silika fazını hazırlamışlardır. Hazırlanan bu fazı aromatik aminler, fenoller ve ilaçların ayrımı için kullanmışlardır. Yapılan çalışmalar neticesinde bazı aromatik aminler, ilaçlar ve fenollerle hazırlanan kaliksaren bazlı sabit faz ile verimli bir şekilde ayrıldığını gözlemişlerdir.(Şekil 1.24).



Şekil. 1.24. Kaliks[4]crown-5 bileşiği ile bağlanmış silika sabit fazı ve ayırmada kullanılan ilaçlar

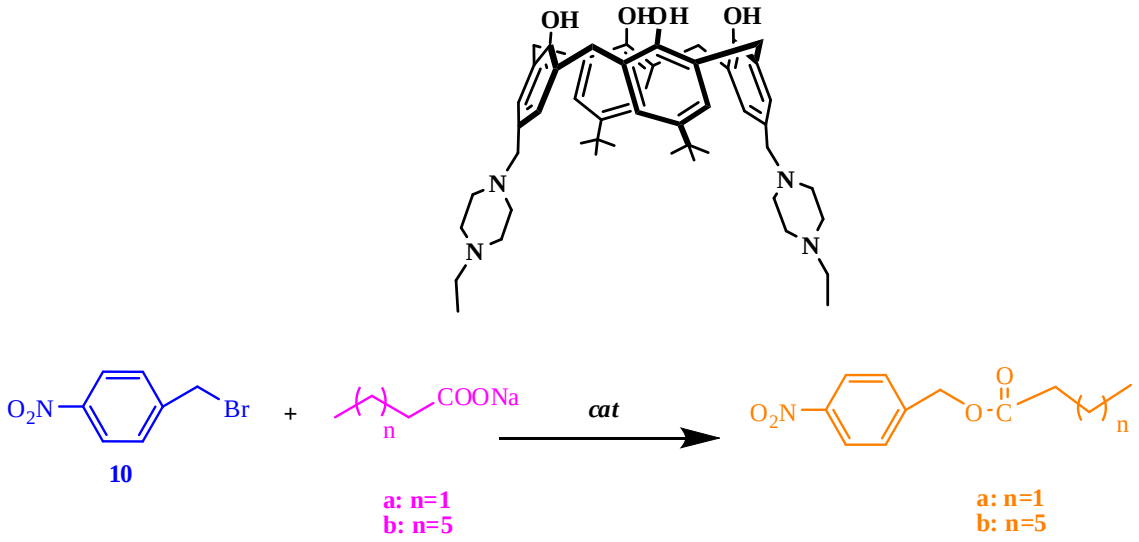
(Erdemir ve Yilmaz, 2010), sentezlenen 1,3-konformasyonuna sahip kaliks[4]aren türevini immobilize ederek kolon dolgu maddesi olarak kullanmışlardır. HPLC de elde edilen bu kolanla bazı aromatik hidrokarbonlar, fenolik bileşikler, aromatik aminler ve bazı ilaç karışımlarını ayırmada kullanmışlardır (Şekil 1.25).



Şekil 1.25. Aminleri ayırmada kloropropilsilikajele immobilize edilmiş kaliks[4]aren türevinin kolon dolgu maddesi olarak kullanılması

1.1.5.4. Faz Transfer Katalizör olarak kullanılması

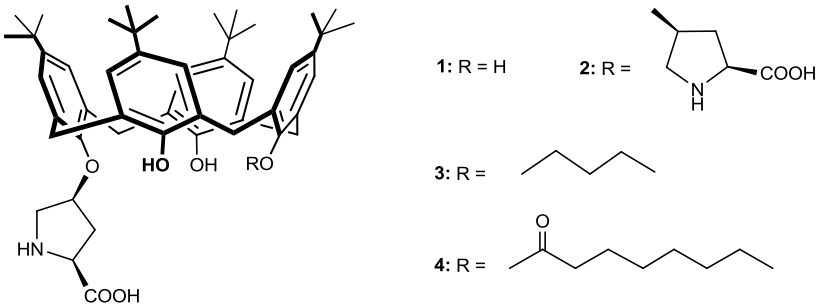
(Akceylan ve Yilmaz, 2011), bu çalışmada faz transfer katalizörü olarak kaliks[4]arenin N-etilpiperazin, diallilamin ve 4-benzilpiperidin bileşiklerinin türevlerini sentezleyerek kullanmışlardır. Katalizör olarak kullanılan kaliks[4]arenin N-etilpiperazin türevinin esterleşme reaksiyonunda en iyi verim elde edilmiştir (Şekil 1.26).



Şekil 1.26. Esterleşme reaksiyonunda kaliks(4)arenin katalizör olarak kullanılması

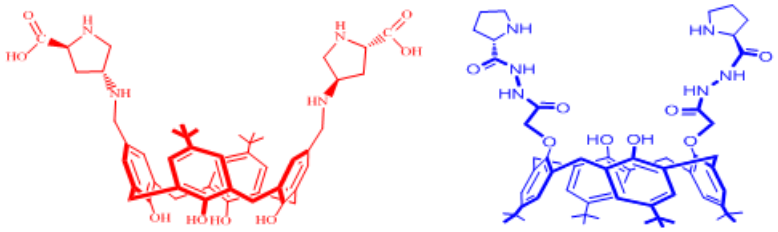
1.1.5.5. Kiral-akiral katalizör çalışmalarında kaliksarenlerin kullanılması

(Li ve ark., 2009), pirolinle türevlendirilmiş kaliks[4]aren bazlı bir seri organokatalizör geliştirmişler ve bu organokatalizör sulu ortamdaki aldol reaksiyonlarını katalizlemek için kullanılmıştır. Uygun koşullar altında yapılan bu çalışmada verim % 99 gibi yüksek bir değer, enantiyoseçimlilik, % 99 ve diastereoseçimlilik 90:10 elde etmişlerdir (Şekil 1.27).



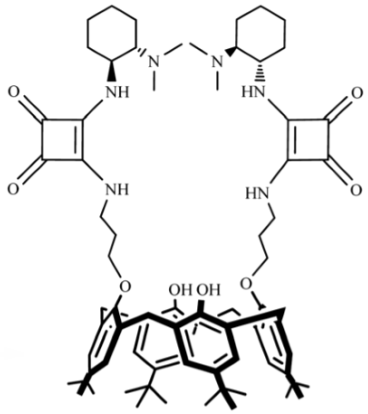
Şekil 1.27. Aldol reaksiyonunda kullanılan pirolin türevi kaliks[4]arenbazlı organokatalizörler ve elde edilen bileşikler

(Aktaş, 2015), kaliks[4]areni hem – *o* bölgesinden hem de fenolik birimlerin para konumundan L-prolin ile fonksiyonlandırdıktan sonra kiral aldol tepkimelerinde kullandılar. Yapılan çalışmada sentezlenen bu iki kiral kaliksaren türevinin sulu çözeltide hem enantiyoseçimlilik hem de diastereoseçimlilik gösterdiğini gözlemlediler.(Şekil 1.27)



Şekil 1.27. L-prolin türevli kaliks[4]arenin organokatalizör olarak kullanılması

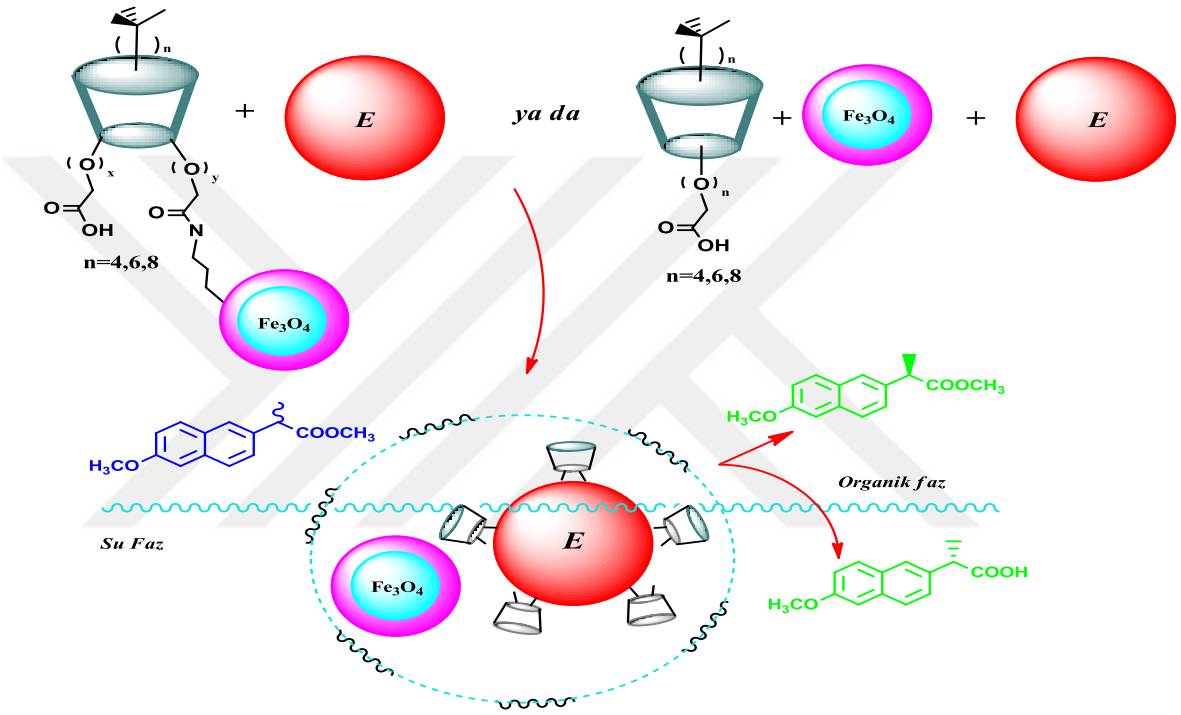
(Vural ve ark., 2016) skuaramid ve tersiyer amin gurubu taşıyan kiral bir kaliks[4]aren türevinin sentezini gerçekleştirdikten sonra organokatalizör olarak asetilasetonun nitroolefinlere Michael katılması reaksiyonunda kullanmışlardır.(Şekil 1.28)



Şekil 1.28. Squaramit türevli kaliks[4]arenin organokatalizör olarak kullanılması

1.1.5.6. Enzim İmmobilizasyonu Çalışmalarında Kullanılması

(Akoz ve ark., 2014) kaliks[4]arenlerin farklı karboksilik asit bileşiklerini , manyetik Fe_3O_4 nanopartüküllere kovalent yoldan bağlayıp ve katkı maddesi olarak sol-gel metodu kullanılarak lipaz enziminin immobilizasyonunu yapmışlar ve bu immobilize enzimleri rasemik naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizinde kullanmışlardır. Sonuç olarak immobilize lipazın (E=224) serbest enzime (E=137) göre daha yüksek enantiyoseçimliliğe ulaştığı görülmüştür (Şekil 1.29).



Şekil. 1.29. Kaliks[n]aren karboksilik asit ve manyetik nanopartiküllerinin lipaz immobilizasyonu

1.2. Enzimler ve Genel Özellikleri

Enzimler canlı hücrelerde biyokatalizör görevi gören proteinlerdir. Katalizörler, kimyasal tepkimelerin kendileri tarafından tüketilmeden veya kalıcı olarak değiştirmeden tepkime hızını arttırırlar.

Biyokatalizörler kimyasal katalizörlere göre daha düşük sıcaklıkta sulu çözeltilerde uygun koşullarda sabit basınç altında katalizleme özelliği gösterir. Kullanılan optimum pH aralığı genellikle 5-8' dir. Biyokatalizörlerde rasemizasyon, bozulma, izomerizasyon gibi bazı reaksiyonlara rastlanmaz. Biyokatalizör reaksiyonları, kimyasal katalizörlere göre 10^8-10^{10} kat fazla hızlı katalizleme özelliğine

sahiptir. Genellikle kimyasal katalizörler % 0,1–10 derişim aralığında kullanılırken, biyokatalizörler ise 10^{-3} - 10^{-4} derişiminde aynı katalitik etkiyi gösterir (AŞÇI ve ark., 1993; Eberhart ve Kennedy, 1995; Gebhardt ve ark., 2000; Guduru ve ark., 2006)

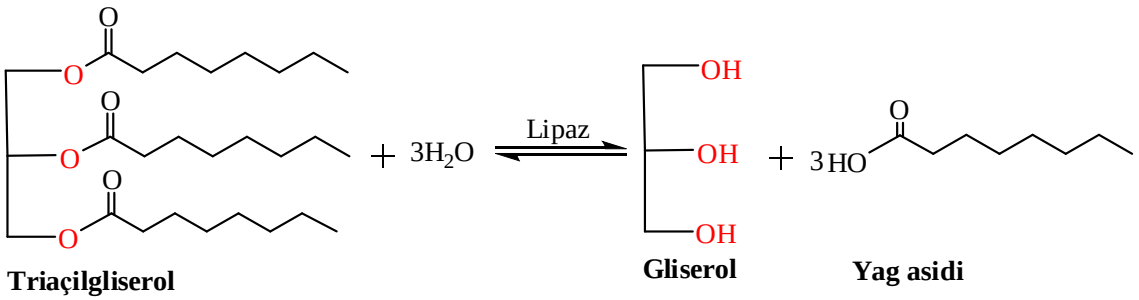
Enzimler canlı ve canlı olmayan ortamlarda da kullanılarak sonuç verdiği için, birçok alanda kullanılırken, endüstride de kullanımı büyük oranda ilgi görmüştür (Tablo 1.3).

Tablo 1.3. Enzimlerin Kullanım Alanları (Telefoncu, 1997)

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

1.2.1. Lipazlar

Lipazlar, insan, bazı bitkilerde, hayvansal organizmalarda ve mikroorganizmalarda yer alan, mono-, di-, triaçil gliserinlerin karboksil ester bağlarının parçalanmasını sağlayan enzimlerdir.



Triaçilgliserol **Gliserol** **Yag asidi**

Şekil 1.30. Lipazların genel şeması

Lipazlar, birçok yerde kullanılması nedeniyle geniş bir prosese sahip olmuştur. Esterleşme, hidroliz ve transesterleşme reaksiyonlarını düşük sıcaklıkta parçalamaları, susuz ortamda aktif ve kararlı olmaları, ucuz, yüksek katalitik güce sahip olmaları, yan ürün oluşturmamaları verilebilir.

Lipazlar özellikleri nedeniyle endüstride geniş bir yer kaplamıştır. Lipazları endüstride ki etkinlikleri aşağıdaki gibi sıralanabilir.

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

Lipaz enziminin farklı fonksiyonlara sahip çeşitleri vardır. Aşağıda birçok enzim çeşiti belirtilmiştir. Maddi anlamda ucuz oluşu ve yüksek aktivite özelliğinden dolayı *Candida rugosa* tercih edilmiştir.

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

1.2.1.1. *Candida rugosa* Lipaz (CRL)

Candida rugosa (CRL), histidin, serin ve glutamin (His-Ser- Glu) amino asitlerinin peptit bağıyla bağlanmasından oluşan tek hücreli ve sporsuz, yüksek verimli lipaz üretimi nedeniyle tercih edilen bir organizmadır. Aktif merkezin kapağı 31 aminoasitten oluşmuştur (Benjamin ve Pandey, 1998; Benson ve Rosa, 2000). Bu kapağın iç yüzeyi yani aktif bölgeyi gören kısmı hidrofobik, dış yüzeyi ise hidrofilik yapıdadır (Hernández ve ark., 2004). Kapak iki farklı konformasyon göstermektedir.

Bu konformasyonlar açık ya da kapalıdır. Kapağın görevi enzimin aktif konumuna substrat yerleşmesini sağlamaktır (Annunziato ve ark., 2003). Kapağın açık olması enzimin aktifliğini ve enantiyoseçimliliği artırırken, kapağın kapalı olması ise enzimin aktivitesinin az ve enantiyoseçimliliğinin düşük olmasına sebep olur.

Aktivitesi yüksek olan *Candida rugosa* lipaz genellikle yağ hidrolizinde, transesterleşmede, esterifikasyon ve enantiyoseçimli biyo dönüşümlerde sıkça kullanılmaktadır (Bezbradica ve ark., 2006; Chou, 2006; Salgado ve ark., 2006)

1.2.2. Lipazların Genel Özellikleri

1.2.2.1. Optimum pH

Bir enzimin yüksek aktivite gösterdiği pH aralığına optimum pH denilmektedir. Genellikle bir çok enzimin pH aralığı 4,5-8,5 tur. Enzimler, yüksek pH aralıklarında yüksek verim göstermezler bu yüzden kulllanılan enzimin optimum pH aralığı tayin edilir.

1.2.2.2. Optimum sıcaklık

Lipazların en yüksek aktivite gösterdikleri sıcaklık aralığı 30-40 ^{0}C dır. Enzimlerin en yüksek aktiflikle çalıştığı sıcaklık skalasına optimum sıcaklık denilir.

1.2.2.3. Lipazın aktivasyonu ve inhibisyonu

Ağır metal iyonlarının ortamda bulunması lipaz aktivitesini azaltıcı (inhibe) yönde etki ederken alkali metal iyonlarının ortamda bulunması ise lipaz aktivitesini arttırmaktadır.

1.2.2.4. İzoelektrik nokta(pI)

Net yükü sıfır olan noktaya izoelektrik nokta denir. İzoelektrik nokta proteinlerin çözünürlüklerini etkilediğinden dolayı önemlidir. İzoelektrik noktadan uzaklaştıkça iyonlaşma artacağından suda çözünürlük artar, izoelektrik noktaya yaklaştıkça ise suda çözünürlük azalır.

1.2.2.5. Aktivite

Birim zamanda dönüştürülen substratın mol sayısına enzim aktivitesi denir. Enzim birimi Unit = 1 μmol/dak. Bir mikromol (1 μmol) substratı uygun şartlarda bir dakika süre ile ürüne çeviren enzim miktarıdır.

İmmobilize edilmiş lipaz aktivitesi:

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

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

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

1.2.3. Enzim İmmobilizasyonu

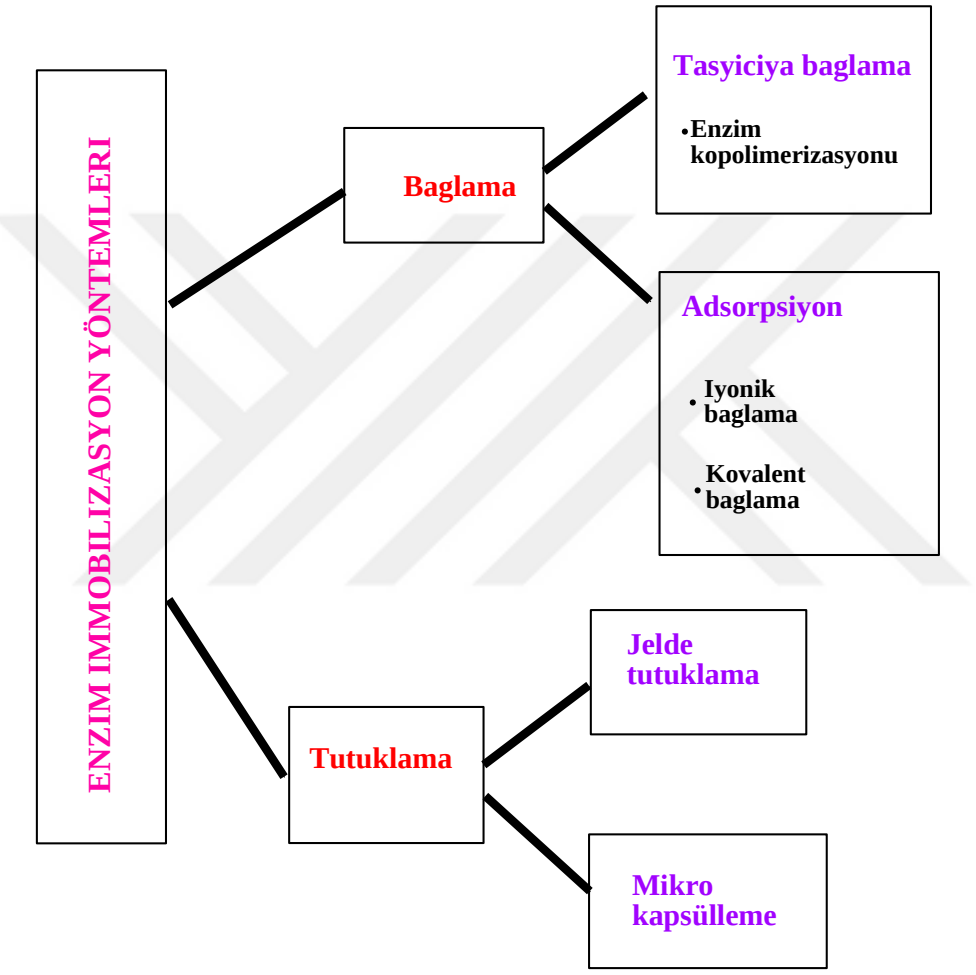
Enzimler, canlı hücrelerde amino asitlerin peptit bağıyla birbirine bağlanması ile sentezlenen protein yapılı maddelerdir. Enzimler suda çözünebilme özelliğine sahiptirler bu yüzden katalizör olarak kullanılan enzimlerin aktivitesinin kaybedilmeden enzimin tekrar kazanımı mümkün değildir. Serbest enzim, istenildiği anda reaksiyon içerisinden ayrılamamaktadır. Bu durum bir çok bilim insanının bu konu hakkında çözümler üretmeye yöneltmiş ve bunun bir sonucu olarak enzim immobilizasyonu ortaya konulmuştur.

Enzim immobilizasyonu, enzimin kararlılığını ve tekrar kullanılabilirliğini sağlayabilmek için önemli bir yöntemdir (Fan ve ark., 2008) Bazı metotlar kullanılarak suda çözünmez hale getirilebilmiş olan enzimlerin serbest enzimlere göre bazı üstün özellikleri vardır. Bu özellikler aşağıda verilmiştir. (Telefoncu, 1997)

- Ürünlerin , enzimler tarafından kirletilmeden kolaylıkla birbirinden ayrılması sağlanır.
- Serbest enzimlere göre kararlılıkları fazladır.
- Kendi kendini parçalara ayırma (autolysis) enzim imbobilizasyonu ile yok edilmiştir.

- Çevre şartlarından (pH, sıcaklık v.s.) daha az etkilenirler.
- Mekanistik çalışmada kolaylıkla kullanılabilirler.
- Kontrollü ürün oluşumu sağlanır.
- Enzimin bir çok kez kullanımını sağlar.
- Bazı şartlar sağlandığında serbest enzimden daha fazla aktivite elde edilmektedir.

1.2.4. İmmobilizasyon Yöntemleri



Şekil 1.31. İmmobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması

1.2.4.1.Taşıyıcıya Bağlama Yöntemleri

Bu yöntem kullanılırken enzim için uygun şartlara sahip bağlama sistemi seçilmelidir. Bağlanma kimyasal veya fiziksel yolla olabilir. Kimyasal yollardan iyonik ve kovalent fiziksel yollardan ise adsorbsiyon ile olur.

Tablo 1.4. Enzim immobilizasyonunda en yaygın kullanılan taşıyıcılar (Etci, 2011)

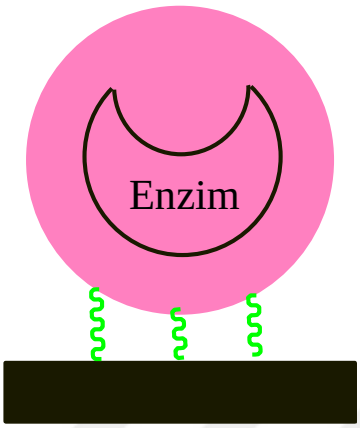
Anorganik	**Doğal poli-merler**	**Sentetik polimerler**
Kil, cam	Selüloz	Polistiren türevleri
Silikajel	Nişasta	Poliakrilamid
Hidroksiapatit	Jelatin	M. anhidrid polimerler
Aktif karbon	Albumin	Siklodekstrin polimerleri
Bentonit	Agar ve agaroz	Vinil ve alil polimerler
Titandioksit	Karragenan	Oxiranlar
Metaller	Dextran	Naylon
Nikeloksit	Kolla gen	Metakrilat
Ponza taşı	Kitin kitosan	İyon değiştirici reçineler

Bağlama yönteminde kullanılacak olan taşıyıcıda aranan özellikler;

- Fiyatının uygun olması
- Tekrarlanabilmesi
- Termal ve kimyasal kararlılık
- Taşıyıcıların kovalent bağlamada kullanılacak ve uygun şartlarda tepkime verecek fonksiyonel gruplarının olması
- Suda kesinlikle çözünmemesi
- Gözenekli yapısı
- Polar karakter
- Mikroorganizmaları inhibe etme
- Mekanik kararlılık ve uygun partikül yapı
- Toksik olmaması

1.2.4.2. Kovalent bağlanma

Taşıyıcaya kovalent bağla enzimin bağlanmasında dikkat edilmesi gerekenler bağlanmanın sterik engeller teşkil etmemesi ve enzim aktivitesi için zorunlu gruplar üzerinden bağlanmanın olmamasıdır (Telefoncu, 1997). Enzimi oluşturan aminoasitlerin taşıdığı fonksiyonel gruplar ile kovalent bağlanma yapılır.



Şekil.1.32. Kovalent bağlama(Fuentes ve ark., 2006)

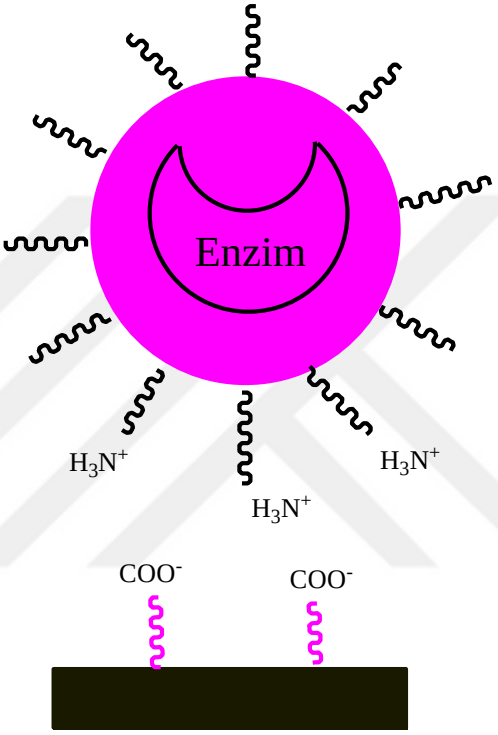
1.2.4.3. Adsorpsiyon

Adsorpsiyon yöntemi, enzim çözeltisi ile suda çözünemeyen bir adsorbanın aynı kapta belli bir süre ekileştikten sonra, iyice yıkanarak ortamdan enzimin fazlasının uzaklaştırılmasıyla yapılır. Enzimin taşıyıcıya bağlanması hidrojen bağı van der Waals kuvvetleri ve elektrostatik etkileşimler yardımıyla olmaktadır. Enzim immobilizasyonunda tercih edilen adsorbanlar; aktif karbon, $CaCO_3$, silikajel, gözenekli cam, nişasta, diatome toprağı, kollodyum, bentonit, gluten, hidroksiapatit ve kalsiyum fosfattır. Adsorbsiyon yönteminin önemli yönleri; enzim immobilizasyonunun kolay yapılabilmesi değişik yükteki ve biçimdeki taşıyıcıları seçme olanağının olması ve immobilizasyon ile birlikte enzim saflaştırılmasının yapılabilmesidir (Hlady ve ark., 1986; Oršolić ve ark., 2004; Etci, 2011)

Adsorbsiyon yönteminin dezavantajları; immobilizasyon işlemi kolaylıkla yapılabilse de uygun koşulların sağlanması çok zaman alır ve zordur. Taşıyıcı ile enzim arasında kuvvetli bir bağlanma saptanamazsa desorpsiyon sonucu enzim serbest hale geçmekte ve aynı zamanda ürünlerde safsızlıklara yol açmaktadır (Akceylan ve Yilmaz, 2011).

1.2.4.4. İyonik Bağlama

İyonik bağlanma yöntemi, enzimin iyonik olarak, iyon değiştirme özelliğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara bağlanmasıdır. İyonik bağlanma uygun koşullarda gerçekleştiğinde enzimin konformasyonunu ve aktif merkezini değişikliğe uğratmaz. Bu yöntemde, enzim ve taşıyıcı arasındaki bağ kovalent bağdaki kadar kuvvetli değildir bu yüzden enzimin bir kısmı taşıyıcıya bağlanamayabilmektedir (Telefoncu, 1997; Carey ve ark., 2006) (Şekil 1.33).



Şekil.1.33. İyonik bağlama

1.2.4.5. Çapraz Bağlama Yöntemleri

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

Enzim immobilizasyonu çapraz bağlama yöntemi ile dört farklı şekilde yapılmaktadır. Bunlar;

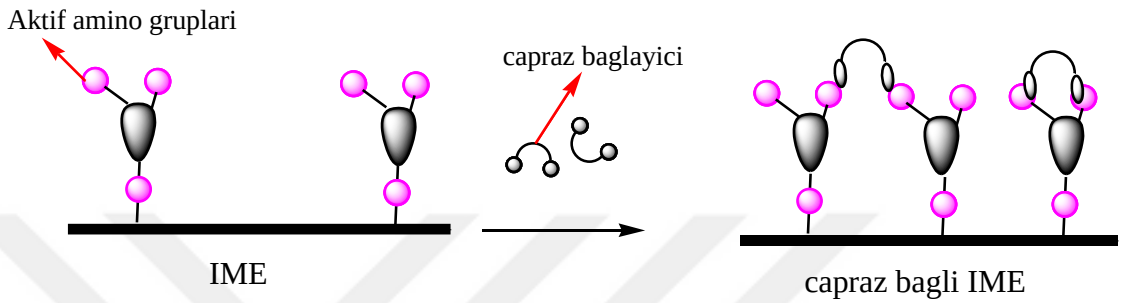
a) Enzimin bifonksiyonel reaktif ile birlikte reaksiyonu

b) Enziminin bifonksiyonel reaktif ve başka bir protein yardımı ile reaksiyonu

c) Enzimin ilk önce suda çözünen bir taşıyıcı ile adsorpsiyonu daha sonra bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu

d) Polimer taşıyıcının bifonksiyonel reaktif tarafından aktive edilmesi ve aktive edilmiş taşıyıcının enzim ile reaksiyonudur.

Genellikle kullanılan çapraz bağlama reaktifleri; glutaraldehit, karbonildiimidazol, klorformat, heterosiklik bisoksiranlar, halojenürler, divinilsulfanlar, p-benzokinonlar, epiklorhidrinler ve geçiş metal iyonlarıdır. Çapraz bağlama reaksiyonu uygun koşullarda gerçekleşemediğinde büyük oranda aktivite kaybı olmaktadır(Telefoncu, 1997; Dündar ve ark., 2006) (Şekil 1.34).



Şekil.1.34. Çapraz bağlı immobilize enzimler (Cao, 2005)

1.2.4.6. Tutuklama Yöntemleri

Tutuklama yönteminde amaç fiziksel ve kimyasal bağlanma olmadan enzim molekülünün belirli bir ortamda tutulması işlemidir. Bu işlemde enzim molekülleri, yarı geçirgen membranlar içinde, polimer matris içindeki kafeslerde, mikrokapsülleme ve misellerde tutulur. Bu yöntemin diğer bağlama immobilizasyonunlarından farklı kılan, enzim molekülünün kimyasal veya fiziksel olarak belirli bir taşıyıcıya bağlanmamasıdır (Telefoncu, 1997) .

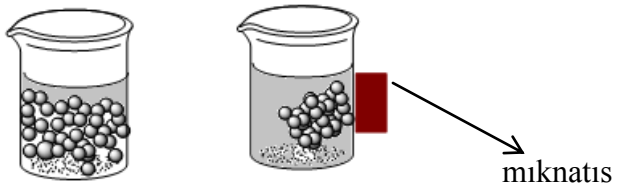
1.2.4.7. Sol-jel tutuklama

Sol-jel tutuklamada, pH, immobilize olmuş enzimin kararlılığı, enzim konsantrasyonu, iyonik kuvvet önemlidir. Bu prosesde bağlayıcı silan bileşikleri olarak alkoksi ve alkil silan bileşikleri kullanılmaktadır. Sol-jel yöntemi, alkoksi silanların asit veya baz katalizi ve enzim varlığında gerçekleştirilir (Brinker ve Scherer, 1990; Hench ve West, 1990)

Heterojen biyokatalizörler, isopropanol, siklodekstrinler, polivinilalkol ve sürfektanlar gibi katkı maddeleri sol-jel tutuklama yönteminin, lipaz immobilizasyonu

üzerinde etkisini artırmaktadır. Bu heterojen biyokatalizörlerin kullanılmasının nedeni; iyonik sıvılarda ve organik çözücülerde transesterifikasyon ve esterifikasyon reaksiyonlarını gerçekleştirmektir (Etci, 2011).

Yöntemin tekrarlanabilirliğine, sol-jel işlemi sırasında manyetik demir oksitin lipaz immobilizasyonunda kullanılması kolaylık sağlamaktadır (Ammer, 1998; P Anderson ve ark., 2006; Reetz ve ark., 2006) (Şekil 1.35).

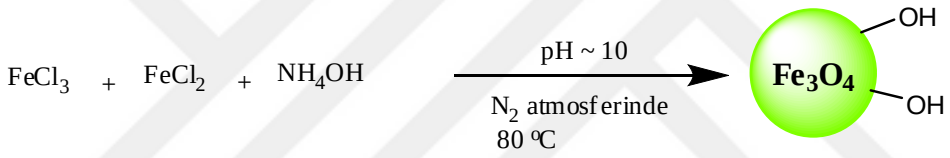


Şekil 1.35. Manyetik Fe_3O_4 nanopartiküller a) manyetik alan olmadığı durum b) manyetik alan altında olduğu durum

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

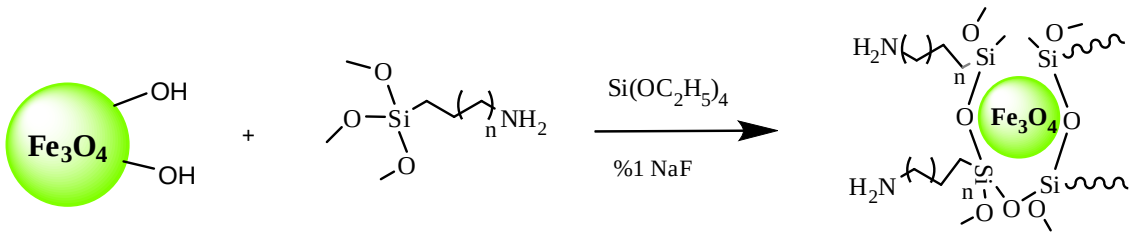
Lipaz enzimi ilk olarak 1956 yılında H. Brandenberger tarafından bulunmuştur. H. Brandenberger kovalent bağlama yöntemi ile iyon değiştirici reçine üzerine immobilize etmiş (Yıldız, 2015), ancak lipazın ester sentezinde ve ester hidrolizinde kullanılması ile ilgili çalışmaları 1964 ‘de Iwai ve arkadaşları tarafından çalışılmıştır (Tepe ve ark., 2005).

(Giardine ve ark., 2005), yaptıkları birtakım deneyler sonucu, $FeCl_2$, ve $FeCl_3$’den yola çıkarak bazik ortamda azot atmosferinde manyetik özellik gösteren Fe_3O_4 manyetik nanopartikületi sentezlemişlerdir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Fe_3O_4 Manyetik nanopartiküllerin sentezi

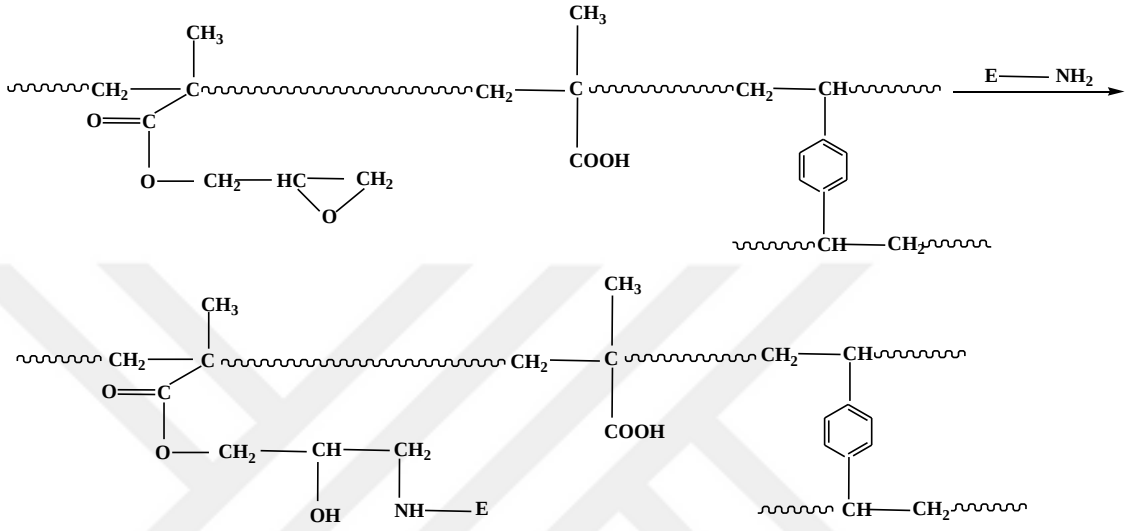
Daha sonra ise amino alkil trimetoksisilan ile bu nano partikülleri etkileştirerek silika-bazlı alkil amino grubu Fe_3O_4 manyetik nanopartikülleri sentezlemişlerdir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Alkil amino-Fe_3O_4 Manyetik nanopartiküllerin sentezi

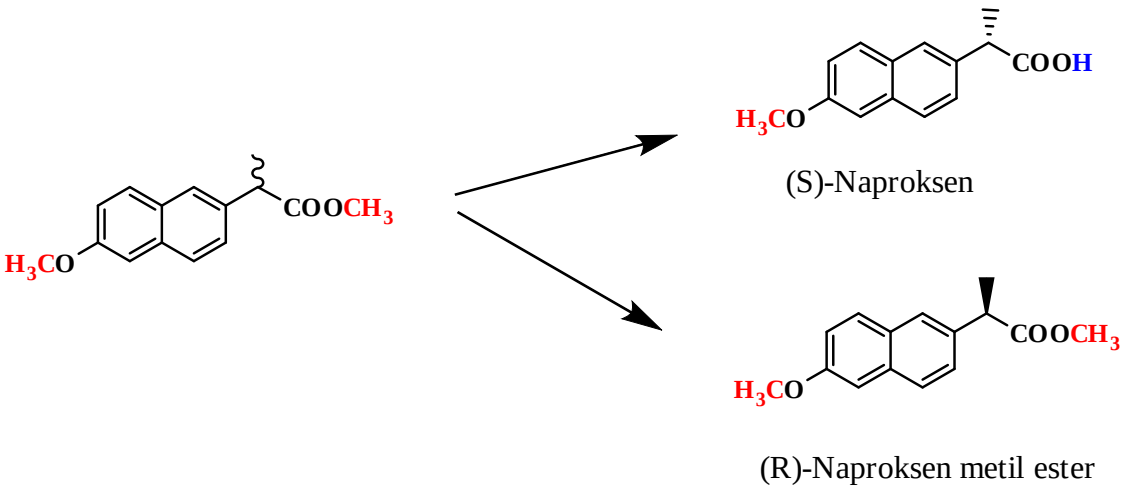
(Kang ve ark., 2009), yapmış oldukları çalışmada oleik asit ile modifiye olmuş Fe_3O_4 nanopartiküllerini sentezledikten sonra metakrilik asit, glisidil metakrilat ve di-vinil benzen ile etkileştirilerek manyetik mikroküreler sentezlemişler ve domuz pankreasından üretilen triaçilgliserolü kovalent bağlarla bu mikroküre yuzeyinde bulunan aktif epoksit gruplarından immobilize edilmiştir. Elde edilen immobilize lipazın

serbest lipaz ile karşılaştırdıklarında çok daha iyi bir termal ve pH kararlılık gösterdiği, manyetik özelliğinden dolayı daha fazla tekrar kullanılabilirliğinin olduğu ve daha yüksek optimum sıcaklığa sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bunların dışında bu immobilize lipaz etkin bir katalizör olarak esterleşme reaksiyonunda kullanılmıştır. (Şekil 2.3.)



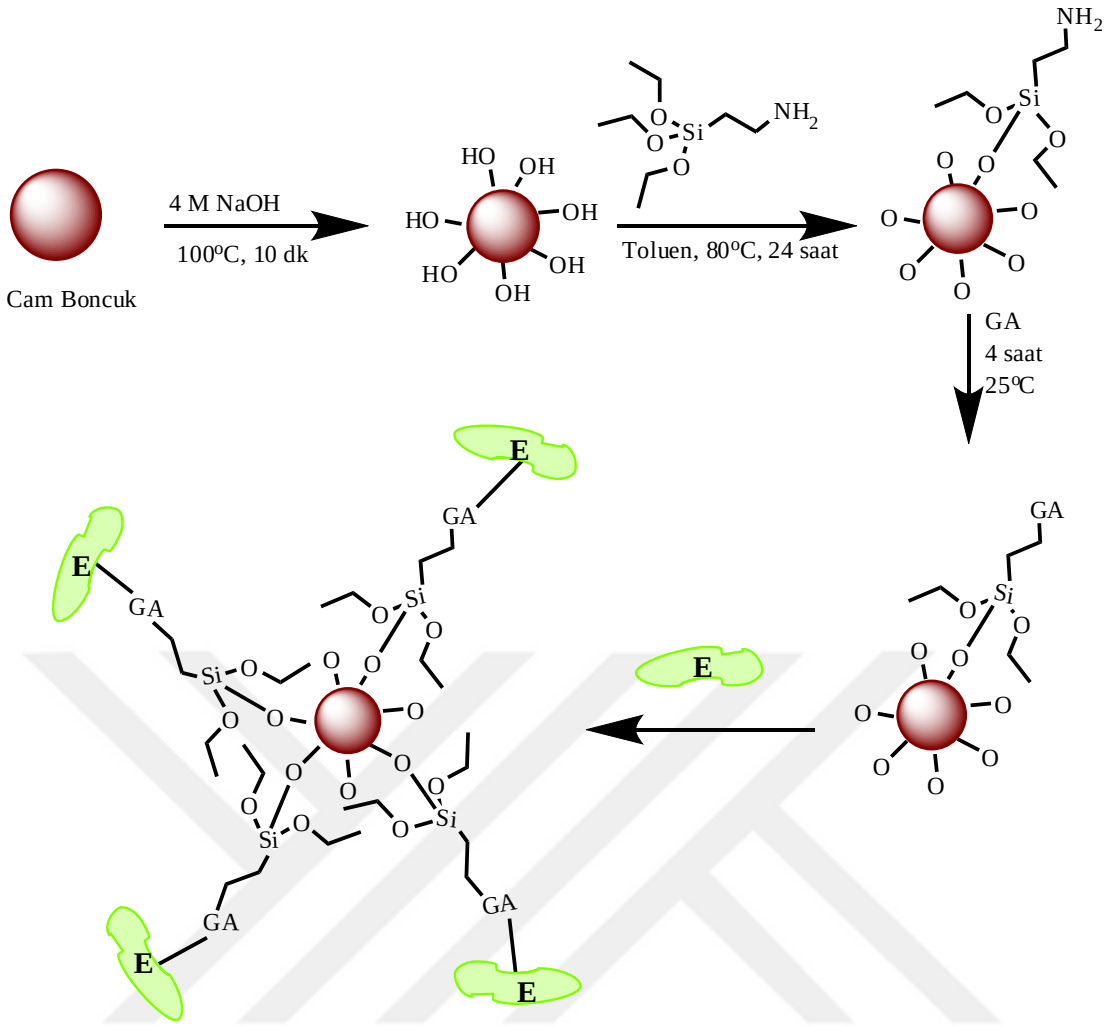
Şekil 2.3. Manyetik mikrokürelerin şekli ve lipazın kovalent immobilizasyon reaksiyonu

(Yilmaz ve ark., 2011b) sol-jel tutuklama metodunu kullanarak *Candida Rugosa* lipaz enzimini, tetraetoksi silan (TEOS) ve oktiltrietoksi silan (OTES) varlığında sporopollenin'e immobilize etmişlerdir. Daha sonra katalitik özellikleri incelenen immobilize lipazı resemik naproksenin enantiyoseçimli çalışmalarında kullanmışlardır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Naproksen metil esteri

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

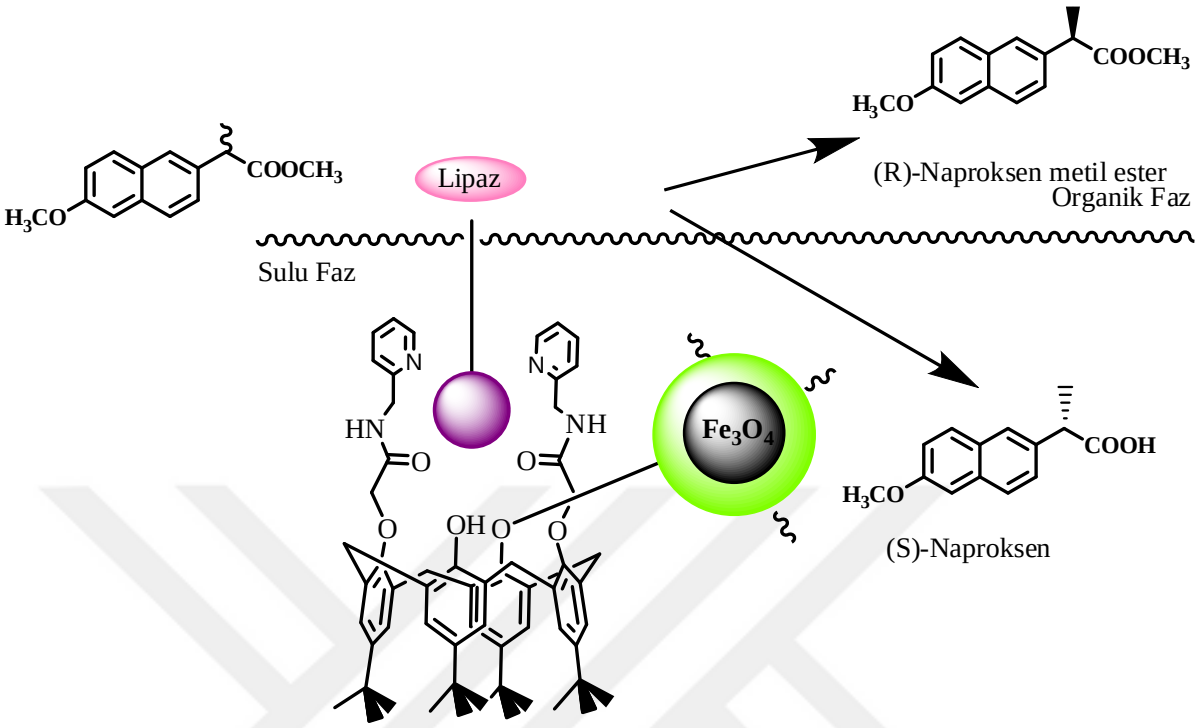


Şekil 2.5. Cam boncuk yüzeyine enzim immobilizasyonu gösterimi

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

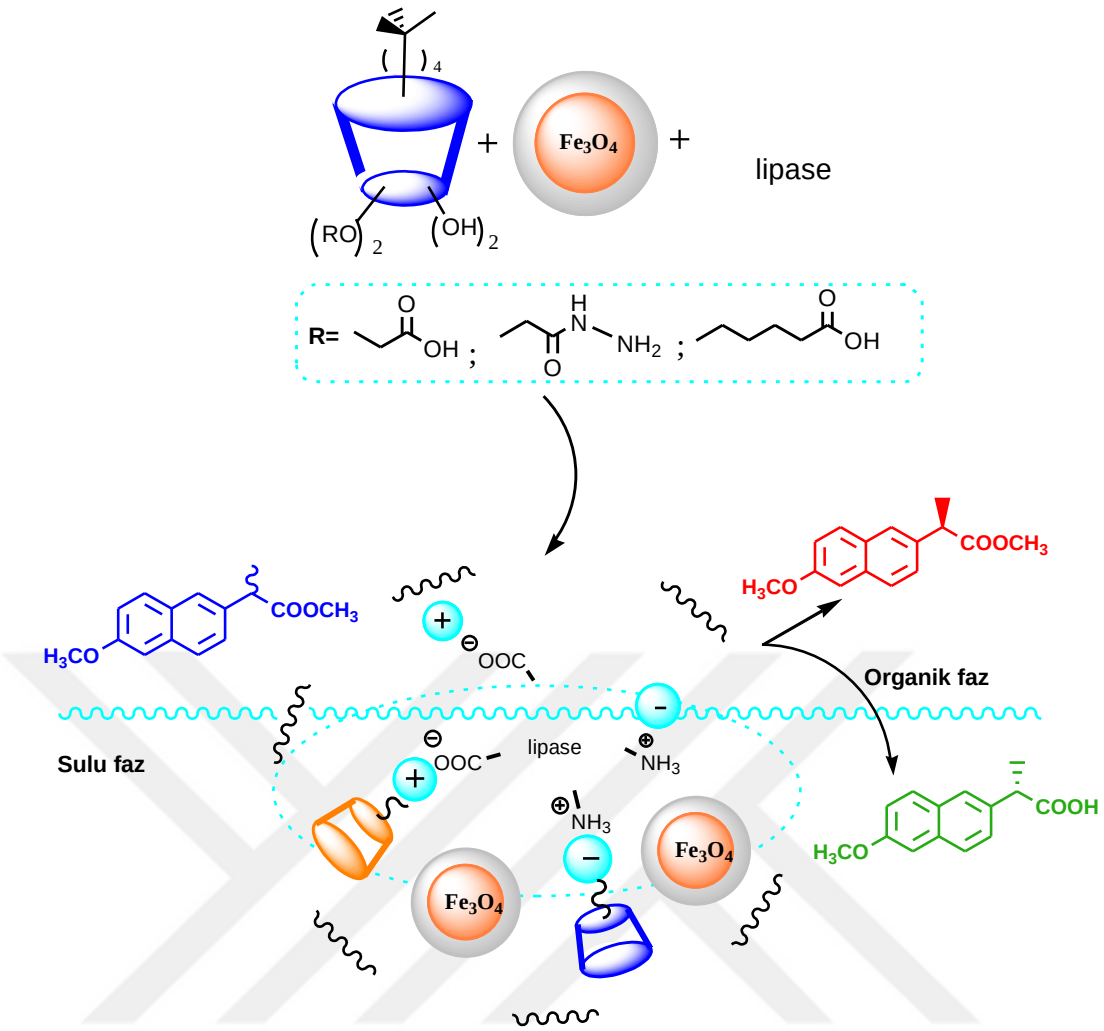
(Ozyilmaz ve Sayin, 2013), yaptıkları bir diğer çalışmada manyetik Fe_3O_4 nanopartükülüne bağlı kaliks[4]aren'in dipridin türevini, *Candida rugosa* lipaz ile immobilize edildikten sonra, *p*-nitro fenil palmitatın (*p*-NPP) hidrolizi ile aktivitesi ölçümleri ve bu immobilize lipaz rasemik naproksen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

hidroliz tepkimelerinde kullanılmıştır. İmmobilize lipazın katalitik akitivitelerinin ve enantiyoseçiciliğinin (E>400) yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 2.6).



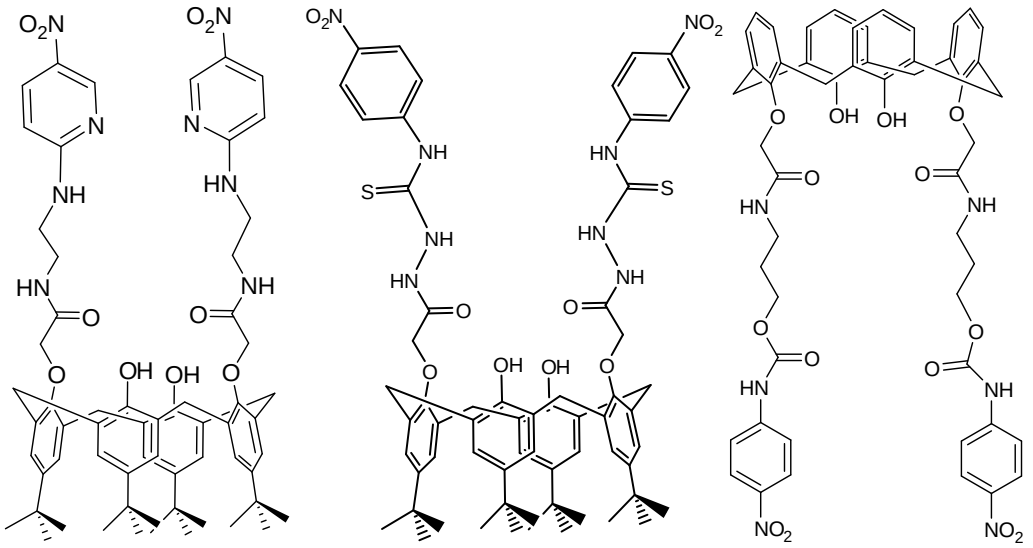
Şekil 2.6. Naproksen metil esterinin ekstraksiyon ile ayrılması

(Sayin ve ark., 2014) yaptıkları bir çalışmada kaliks[4]aren'in hidrazin ve karboksil asit türevlerini hazırlayarak bu bileşikleri ve Fe_3O_4 nanopartikülleri bir katkı maddesi olarak sol-jel prosedürüne göre *Candida Rugosa* lipazın enkapsilasyonunda kullanmışlardır. Enkapsüle edilen bu lipazlar rasemik naproksen metil esterinin enantiyo seçimli hidrolizinde ve aynı zamanda *p*-nitro fenil palmitatın (*p*-NPP) hidrolizinde katalizör olarak kullanmışlardır. Elde edilen sonuçlarda kaliks[n]aren türevleri ve Fe_3O_4 nanopartikül enkapsüle lipazların serbest lipaza göre daha yüksek dönüşüm ve en antiyoseçimlilik gösterdiği gözlemlenmiştir (Şekil 2.7.).



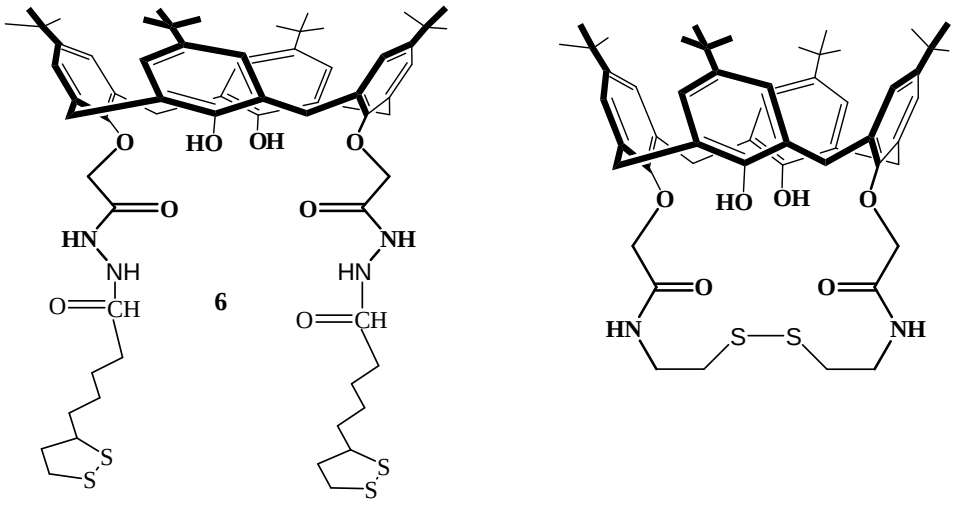
Şekil 2.7. (R/S)-Naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizinin şematik gösterimi

Bu 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 ^{o}C'de en yüksek dönüşüm ve enantiyoseçimliliği gösterdiği anlaşılmıştır.



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

Son yıllarda Yılmaz ve grubu (Yildiz ve ark., 2017) kaliks[4]arenin tiyol türevlerini sol-gel tutuklamama tekniğine göre Fe_3O_4 nanopartiküllerin varlığında *Candida rugosa* lipaz enzimi ile enkapsüle edip, rasemik flurbiprofen metil esterinin enantiyosçimli hidrolizinde kullanmışlardır. Yapılan çalışmada kaliks[4]arenin lipoik asit türevinin pH=7 ve 35 ^{o}C'de 72 saat reaksiyon süresinde en yüksek dönüşüm ve enantiyoseçimliliği gösterdiği anlaşılmıştır



Şekil 2.9. Lipaz immobilizasyonunda kullanılan *p-ter*-Butilkaliks[4]arenin tiyol türevlerini

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Enstrümental Teknikler

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

3.2. Kimyasal Sentezler

Bu çalışmada sentezlenen bazı bileşikler literatürdeki metotlara göre dansil grubu taşıyan kalik[4]aren bileşikleri (**SH ve SA**) ise ilk kez sentezlendi. Bu çalışmada kullanılan **1-6** nolu bileşiklerin sentezi aşağıda sırasıyla yer almaktadır.

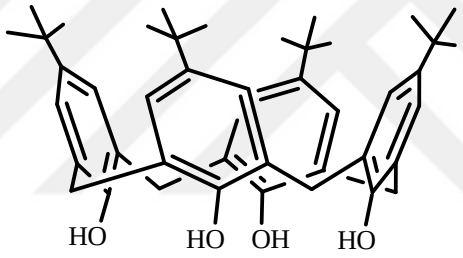
3.2.1. 5, 11, 17, 23-Tetra-*ter*-bütil-25,26,27,28-tetrahidroksikaliks[4]aren (Gutsche ve ark., 1990)

1 L'lik bir balona, 50 g (0.665 mol) *p-ter*-bütilfenol, 31.15 mL (0.83 mol) %37'lik formaldehit ve 0.6 g (0.03 mol) NaOH alınır. Reaksiyon karışımı, mantolu ısıtıcı ile sıcaklığı 110-120 ^{o}C da sabit tutularak ksilol cihazı takılı bir geri soğutucu sisteminde azot gazı altında 1.5-2 saat ısıtılır. Bu esnada reaksiyon karışımı viskoz bir

halden önce turuncu renge daha sonra katı sarı bir kütleye dönüşür. Bu noktada karışım oda sıcaklığına kadar soğutulur ve 400-500 ml difenil eter ile süspanse edilip 1 saat oda sıcaklığında karıştırılır.

Azot girişi ve bir ksilol cihazı takılır, balon ısıtılarak suyun ortamdan uzaklaştırılması ve karışımın berraklaşması sağlanır. Su çıkışı tamamlandığında karışım bir geri soğutucu takılarak 1.5-2 saat kaynatılır. Daha sonra reaksiyon karışımı oda sıcaklığına soğutulur, 400-500 etil asetat ile muamele edilerek 1 saat karıştırılır ve sonra da çökmenin tamamlanması beklenir. Oluşan beyazımsı çökelek süzülüp iki kez 100 mL etil asetatla, bir kez 200 mL asetik asitle ve en son su ile yıkanır. Verim: 33.25

g (%62) E.n.: 342-344^{o}C (lit: 344-346 ^{o}C) ^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.20 ppm (s, 36H, Bu^t), 3.45 ppm (d, 4H, $ArCH_2Ar$), 4.25 ppm (d, 4H, $ArCH_2Ar$), 7.05 ppm (s, 8H, ArH), 10.35 ppm (s, 4H, OH). Anal. Hesapl. $C_{44}H_{56}O_4$: C, 81.44; H, 8.70%. Bulunan: C, 81.59; H, 8.61%.



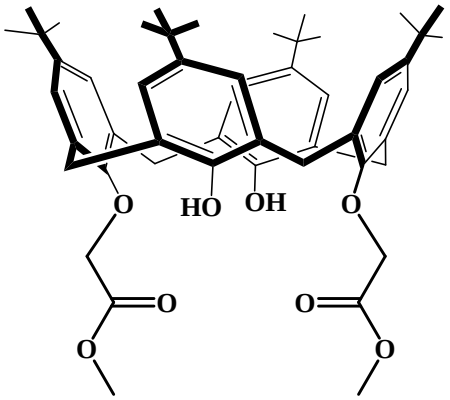
(1)

Şekil 3.1. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,26,27,28-tetrahidroksikaliks[4]aren

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

5 g (7.71) mmol *p-ter*-bütilkaliks[4]aren ve 1.29 g (9.4 mmol) K_2CO_3 250 mL aseton içerisinde 2 saat geri soğutucu altında kaynatıldı daha sonra 1.48 mL (16.19 mmol) metil bromasetat ilave edildi ve 24 saat kaynatılarak karıştırıldı. Soğutulan karışım süzüldü, süzüntü distillendi. Kalan katı etanol içerisinde kristallendirildi. Verim: % 65, E.n: 206-210 ^{o}C. IR: 3436 cm^{-1} (OH), 1755 cm^{-1} (C=O). ^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 0.97 ppm (s, 18H, Bu^t), 1.27 ppm (s,18H,Bu^t), 3.35 ppm (d, J = 13.1, 4H, $ArCH_2Ar$), 3.85 ppm (s, 6H, OCH_3), 4.48 ppm (d, J = 13.1, 4H, $ArCH_2Ar$), 4.75 ppm

(s, 4H, OCH_2CO), 6.81 ppm (s, 4H, ArH), 6.97 ppm (s, 2H, ArOH),7.03 ppm (s, 4H, ArH). Anal. Hesapl. $C_{50}H_{64}O_8$: C, 75.73; H, 8.13%. Bulunan: C, 75.91; H, 8.29%.

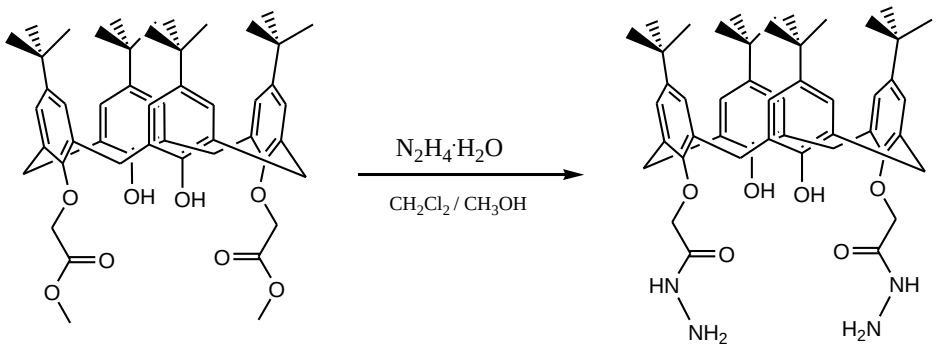


2

Şekil 3.2. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,27-dimetoksikarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi kaliks[4]aren

3.2.3. 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,27dihidrazinamitkarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi-kalik s[4]aren (Bakunina ve ark., 2000)

100 mL'lik tek boyunlu bir balon içerisine 1.5 g (2.08 mmol) **2** nolu bileşik toluen:metanol (20 mL:15 mL) içerisinde çözüldü. Üzerine (24.6 mmol) hidrazinmonohidrat ilave edildi ve 8 saat geri soğutucu altında kaynatıldı. Reaksiyon İTK'den takip edilerek çıkış maddesinin ürüne dönüşümü izlendi (hekzan:etilasetat, 1:2). Ayrıca reaksiyon IR spektroskopisinde 1750 cm^{-1} deki ester karbonil bandının 1684 cm^{-1} deki amid karbonil bandına dönüşümü ile reaksiyonun tamamlandığı anlaşıldı. Reaksiyon sonunda çözücü destillendi. Geriye kalan katı ham ürün saf su ile nötral pH'a kadar yıkandı ve etüvde kurutuldu. Son olarak (DCM:metanol) ile çöktürüldü. Verim: 0.72 g, (%48); E.n: 330-333^oC FTIR:1684 cm^{-1} (N-C=O). ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ 0.97 (s, 18H, Bu^t), 1.24 (s, 18H, Bu^t), 2.15 (s, 4H, -N-NH2) 3.35 (d, 4H, *J*= 12.6 Hz, $ArCH_2Ar$), 4.45 (d, 4H, *J*= 12.6 Hz, $ArCH_2Ar$), 4.78 (s, 4H, OCH_2CO), 6.85(s, 4H, ArH), 7.05 (s, 4H, ArH), 7.60 (s, 2H, OH), 9.6 (s, 2H, -NH-N).

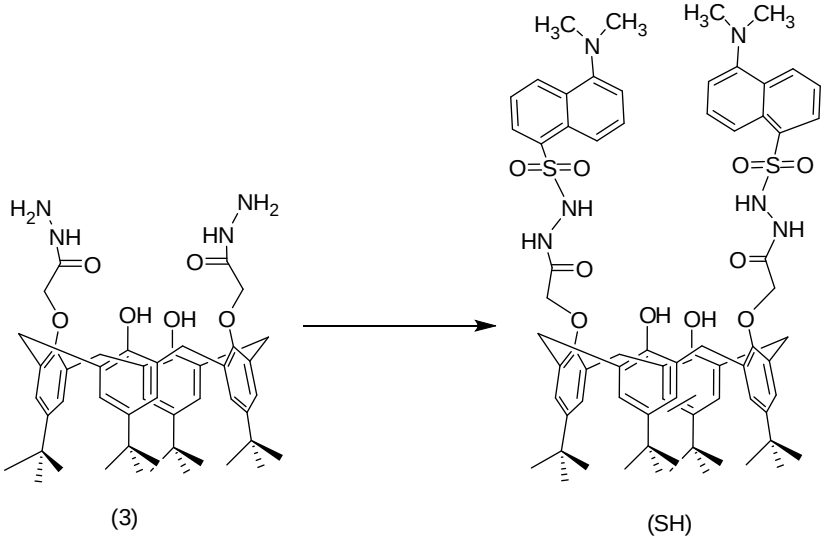


(2) **(3)**

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

3.2.4. Kaliks[4]aren'in didansil hidrazit türevinin (SH) sentezi:

4 g (5.04 mmol) kaliks[4]aren'in dihidrazit türevi alınarak 100 ml kuru diklormetanda çözülür. 1.12 g (11.09 mmol) trietilamin damla damla eklendikten sonra, 2.99 g (11.09 mmol) dansil klorür ün 50 ml diklormetandaki çözeltisi ilave edilir. Karışım yaklaşık 6 saat karıştırılır. Reaksiyon İTK ile izlenir. Reaksiyon sonunda 1M HCl ilave edilerek 3 kez ekstraksiyon yapılır. Organik faz $NaHCO_3$ ile etkileştirilir. Sonra su ile yıkanır . Organik faz $MgSO_4$ ile kurutulduktan sonra , evaparatörde çözücü uzaklaştırılır. Saf (SH) % 88 verimle elde edildi. ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 1.00 (s, 18H, Bu^t), 1.25 (s, 18H, Bu^t), 3.00 (s, 12H, N-CH_3), 3.25 (bd, 4H, ArCH2Ar), 3.10 (d, 4H *J*= 12.6 Hz, ArCH_2Ar) 3.30 (bs, 4H, CH_2-O), 4.15 (bd, 4H *J*= 12.6 Hz, ArCH_2Ar) 6.65-8.90 (m, 20H, ArH

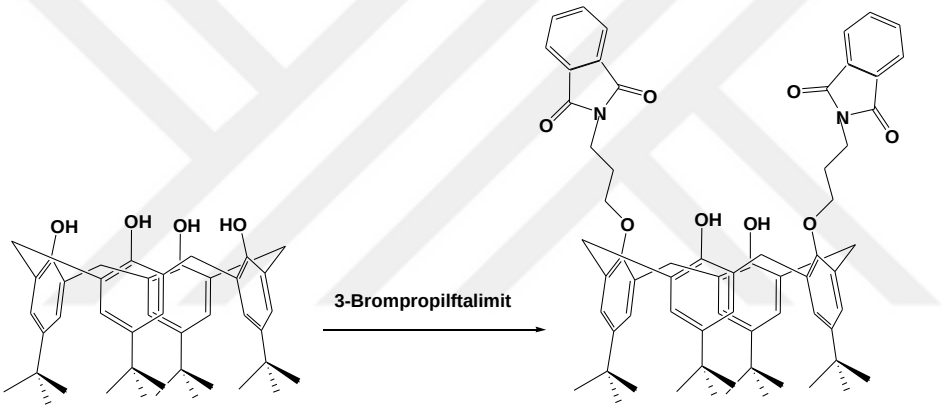


(3) (SH)

Şekil. 3.4. Kaliks[4]aren'in didansil hidrazit türevi (SH)

3.2.5. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,27-bis(3-ftalimidopropoksi)-26,28-dihidroksi kaliks[4]aren (4) (Chrisstoffels ve ark., 1999)

4.5 g (6.9 mmol) *p-ter*-bütil-kaliks[4]aren, 3.88 g (14.47 mmol) *N*-(3-bromopropil)ftalimid, 1.14 g (8.2 mmol) K_2CO_3 ve 2 g (12 mmol) KI 100 mL kuru asetonitril içerisinde 60 saat kaynatıldı. Sonra çözücünün bir kısmı evaporatörde uzaklaştırıldı. Kalan kısım seyreltik HCl eklenerek su ile çöktürüldü. Daha sonra süzülerek metanol ile yıkandı ve bileşik 4 % 78 verimle elde edildi. Erime noktası 300-302 ^oC. ^1H NMR ($CDCl_3$) δ (ppm): 0.98 (s, 18H, Bu^t), 1.3 (s, 18H, Bu^t), 2.45 (q, 4H, *J* =6.4 Hz, -CH2-), 3.35 (d, 4H, *J* =12.3 Hz, $ArCH_2Ar$), 4.1 (t, 8H, *J* =6.4 Hz, OCH_2,NCH_2), 4.3 (d, 4H, *J* =12.3Hz, $ArCH_2Ar$), 6.80 (s, 4H, ArH), 7.05 (s, 4H, ArH), 7.49 (s, 2H, OH), 7.6 (bd, 4H, benzen ArH), 7.75 (bd, 4H, benzen ArH).



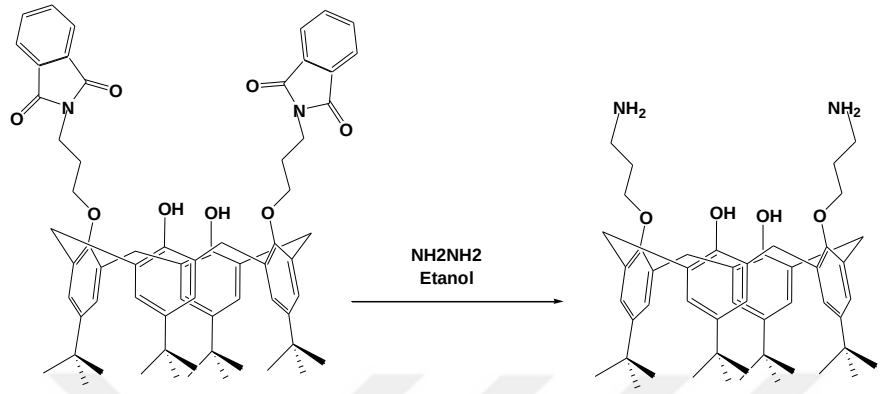
(1) **(4)**

Şekil. 3.5. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,27-bis(3-ftalimidopropoksi)-26,28-dihidroksi kaliks[4]aren (4) sentezi

3.2.6. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,27-bis(3-aminopropoksi)-26,28-dihidroksi kaliks[4]aren (7) (Chrisstoffels ve ark., 1999)

2.5 g (3.27 mmol), 5,11,17,23-tetra-*ter*-bütil-25,27-bis(3-ftalimidopropoksi)-26,28- dihidroksi kaliks[4]aren (4) 200 mL etanol içerisinde çözülerek üzerine 3.1 mL (0.063 mol) $NH_2NH_2.H_2O$ ilave edildi. 9 saat kaynatıldıktan sonra etanol uzaklaştırıldı. Kalan kısım 100 mL CH_2Cl_2 içerisinde çözüldü ve 100 mL su ilave edilerek birkaç damla derişik NH_3 ilave edildi. Organik faz ayrılarak birkaç kez su ile yıkandı ve

$MgSO_4$ üzerinden kurutuldu. Daha sonra çözücü uzaklaştırıldıktan sonra bileşik **5** % 82 verimle elde edildi. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ (ppm): 0.98 (s, 18H, Bu^t), 1.29 (s, 18H, Bu^t), 2.15 (q, 4H, *J* =6.2 Hz, -CH_2-), 3.2 (t, 4H, J=6.2 Hz, CH_2), 3.35 (d, 4H, *J* =13.49 Hz, $ArCH_2Ar$), 4.05 (t, 4H, J=6.2 Hz, CH_2), 4.25 (d, 4H, *J* =13.49 Hz, $ArCH_2Ar$), 6.80 (s, 4H, ArH), 7.05 (s, 4H, ArH).

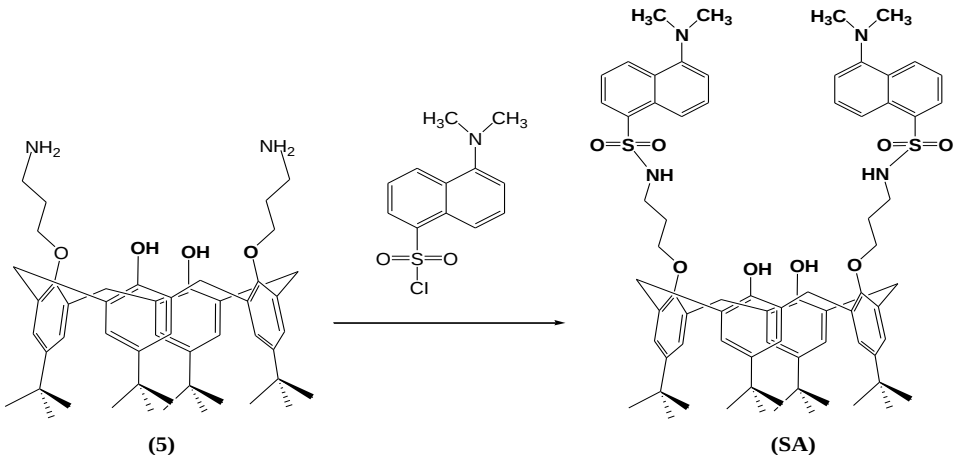


(6) **(7)**

Şekil. 3.6. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,27-bis(3-aminopropoksi)-26,28-dihidroksi kaliks[4]aren (7) sentezi

3.2.7. Kaliks[4]aren'in diamin türevinin(5) dansil klorür ile etkileştirilmesi (SA) sentezi:

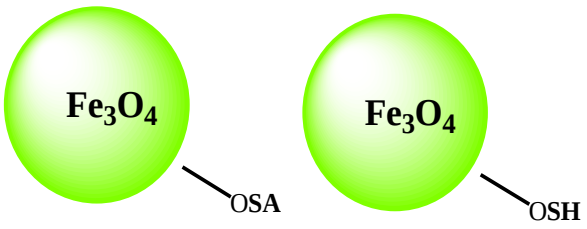
0.544mg (0.611mmol) kaliks[4]aren'in diamin türevi(**5**) alınarak 50 ml kuru diklormetanda çözülür. 0.136 (1.344 mmol) trietilamin damla damla eklendikten sonra, 0.363 mg (1.344 mmol) dansil klorür ün 20 ml diklormetandaki çözeltisi ilave edilir. Karışım yaklaşık 6 saat karıştırılır. Reaksiyon İTK ile izlenir. Reaksiyon sonunda 1M HCl ilave edilerek 3 kez ekstraksiyon yapılır. Organik faz $NaHCO_3$ ile etkileştirilir. Sonra su ile yıkanır. Organik faz $MgSO_4$ ile kurutulduktan sonra , evaparatörde çözücü uçurulur. Saf (SA) % 93 verimle elde edildi. ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 1.00 (s, 18H, Bu^t), 1.40 (s, 18H, Bu^t), 1.90 (bp, 4H, -CH_2-) 2.85 (s, 12H, N-CH_3), 3.20 (t, 4H, CH_2-N), 3.30 (d, 4H *J* = 12.6 Hz, $ArCH_2Ar$) ^{1}H NMR (CDCl3): 3.85 (s, 4H, CH_2-N), 4.20 (d, 4H *J* = 12.6 Hz, ArCH2Ar) 6.80 (s, 4H, ArH), 7.02 (m, 8H, ArH), 7.40-7.55 (m, 4H, ArH), 8.20-8.35 ve 8.50 (m, 8H,ArH, NH).



Şekil. 3.7. Kaliks[4]aren'in diamin türevinin (**7**) dansil klorür ile etkileştirilmesi (SA) sentezi

3.2.8. Manyetik Fe_3O_4 nanopartikülünün sentezi (Wang ve ark., 2005)

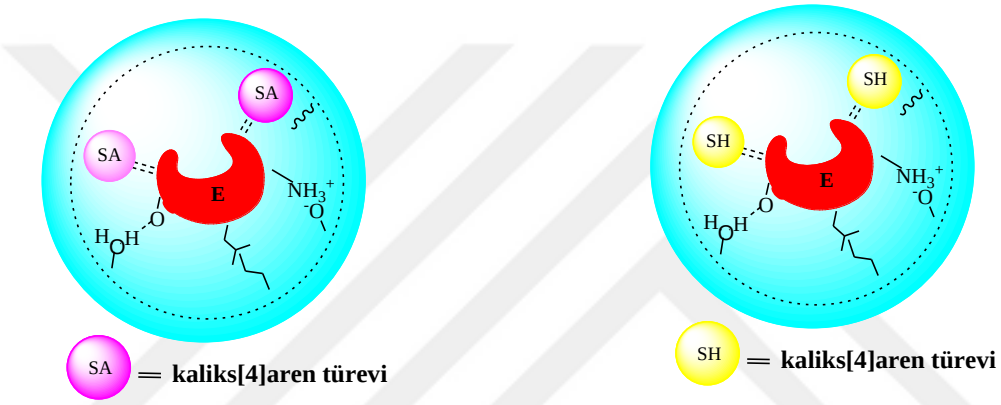
SA veya SH kodlu bileşikler literatürdeki yöntemlere göre sentezlenerek ayrı 0,1 gramları 250 mL'lik üç boyunlu reaksiyon balonunda konulur. Üzerine 1 M $FeCl_2$ ve 1,75 M $FeCl_3$ çözeltileri 1:1 oranında alınır ve geri soğutucu altında N_2 atmosferinde 60 ^oC ye kadar ısıtılır. Reaksiyon ortamı 60 ^oC'ye ulaştığında % 25 NH_4OH ile pH ~ 10-11'e ayarlanır. Ortam bazik olduğunda demir oksit partiküllerinin oluşması ile birlikte reaksiyon ortamı koyu kahverengi renge dönüşür. Karışım geri soğutucu altında N_2 atmosferinde 80 ^oC ye kadar 1 saat daha ısıtılır. Reaksiyon sonunda manyetik nanopartiküller bir mıknatıs yardımıyla su içerisinden alınır ve yine deiyonize su ile pH nötral oluncaya kadar yıkanır. Nanopartiküller vakumlu etüvde 70°C'de 12 saat kurutulur. Koyu kahverengi-sarı Fe_3O_4 -SA ve Fe_3O_4 -SH partikülleri elde edilir. FTIR: Spektrumunda Fe_3O_4 -SA ve Fe_3O_4-SH nano partükülünde 2971-2855 cm^{-1} aralığında alifatik C-H bantları 1657-1653 cm aralığında amit gruplarına ait C=O ve 1546-1454 cm aralığında aromatik C=C bantları 1072, 953 cm^{-1}'de Si-O bantları ile Fe-O grubuna ait bantlar 1. bileşikte 723, 538 cm^{-1}'de, 2. Bileşikte 789, 594 cm^{-1}'de görülmektedir.



Şekil 3.8. Manyetik Fe_3O_4 nanapartiküllerine bağlı SA,SH

3.2.9. Sol-gel metoduna göre Lipaz İmmobilizasyonu (Reetz ve ark., 2003)

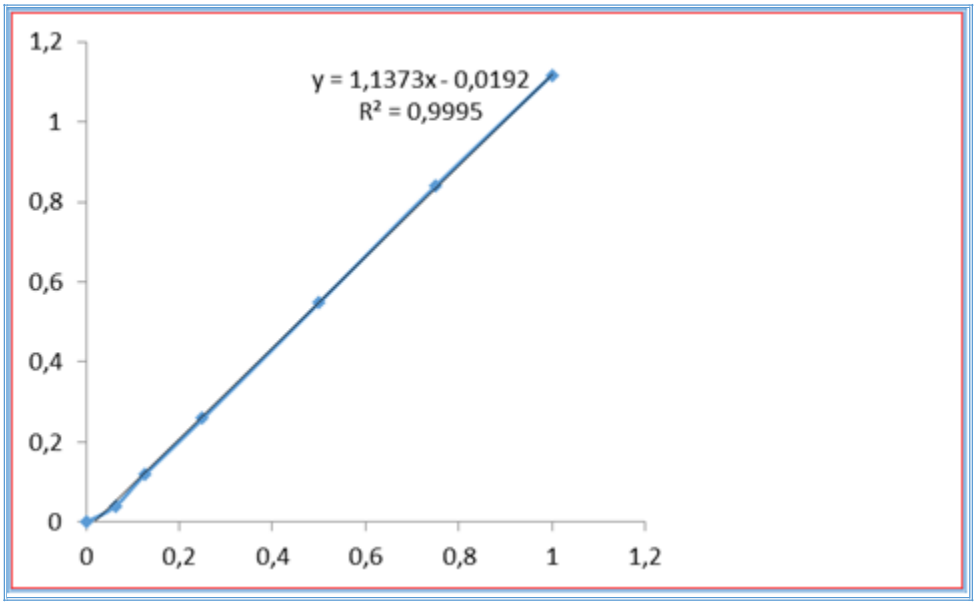
245 mg *Candida rugosa* lipazı, 1,56 mL fosfat tamponu içerisinde (0,05 M, pH 7,0) karıştırıldı. 0,1 g olan Fe_3O_4 -SA ve Fe_3O_4 -SH ayrı kaplarda , 400 µL polivinil alkol (%4 w/v), 200 µL NaF çözeltisi (0,1 M) ve 400 µL isopropil alkol ilave edilerek karıştırılıp homojenize edilir. Daha sonra 460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



Şekil 3.9. Sol-Gel metoduyla tutuklanmış SA,SH

3.2.9.1. Protein miktarı (Bradford, 1976)

Serbest ve immobilize lipaz içerisindeki protein miktarı Bradford metoduna göre bulunur. Bunun için standart olarak Bovin serum albumin (BSA)'in belirli konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlanarak bu çözeltilerin 0,1 mL'si 3 mL Bradford reaktifi (Coomassie Brilliant Blue G-250) ile etkileştirilip 595 nm dalga boyundaki absorbansları ölçülür. Standart olarak, absorbans-protein miktarı (mg/ml) grafiği çizilir ve yapılan protein çalışmalarında bu grafik referans alınır (Şekil 1.1).

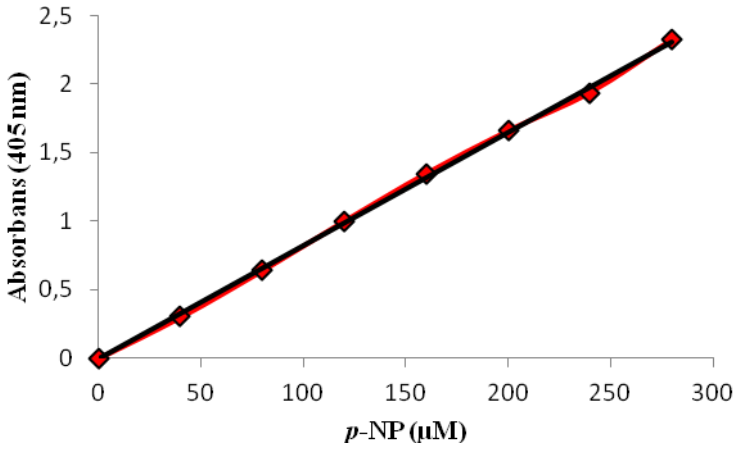


Şekil 3.10. Standart protein miktarı (mg/ml)- absorbans grafiği (λmax =595 nm)

3.2.9.2. Aktivite Tayini (Peiris ve ark., 2003; Wu ve ark., 2004)

1 mL pH 7,0 fosfat tampon çözeltisi içerisindeki serbest lipaz veya immobilize lipaz karışımına 1 mL *p*-NPP çözeltisi (2-propanol içerisinde hazırlanılır) ilave edilerek oda sıcaklığında 5 dk karıştırılır. Ardından reaksiyon 2 mL 0,5 N Na_2CO_3 ilavesiyle durdurulur. Karışım santrifüj edilerek, enzimatik aktivite UV-visible spektrofotometresinde, açığa çıkan *p*-nitrofenol'ün (*p*-NP) 405 nm dalga boyundaki absorbansı ölçülür.

Bu absorbans değeri standart olarak çizilen *p*-NP (mol/litre) kalibrasyon grafiğinde yerine konularak açığa çıkan *p*-NP'ın miktarı spektrofotometrik olarak tespit edilir. Lipazın 1 Unit (U)'i, dakikada 1 µmol *p*-NPP hidroliz etmek için gerekli olan lipaz miktarıdır. Bu verilerden yararlanılarak serbest ve immobilize lipazların aktiviteleri belirlenir (Şekil 1.2).



Şekil 3.11. Standart *p*-NP (*p*-nitrofenol)- absorbans grafiği (*λmax=405 nm*)

3.2.9.3. Optimum pH tayini

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

3.2.9.4. Optimum sıcaklık tayini

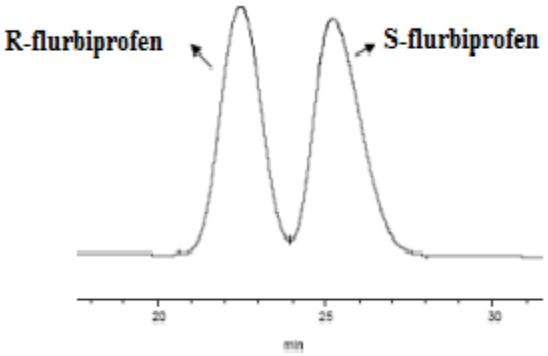
Serbest ve immobilize enzimin aktifliğine, sıcaklığın etkisini incelemek amacı ile serbest ve immobilize enzim farklı sıcaklıklarda (25-50^{o}C) fosfat tamponu içinde 20 dk karıştırılıp soğutulur. Daha sonra aktivite tayin etme metoduna göre ölçümler yapılır.

3.2.10. HPLC çalışmaları

3.2.10.1. Enantioseçimli Tepkimelerin Genel Prosedürü (Bracale ve ark., 2002)

5 mL'lik vial içerisine 2 mL serbest enzim çözeltisi (0,781mg/mL, pH 7.0, 0,05 M fosfat tamponu) ya da serbest lipaz'a eşdeğer unit'de immobilize lipaz konulur. Daha sonra üzerine 100 µL (R/S)-Flurbiprofen metil esterinin izooktandaki çözeltisi (20 mM) ilave edilir ve 48 saat 35 ^{o}C de çalkalamalı inkübatör içerisinde karıştırılır ve karışım üzerine 2 mL izooktan konularak ekstraksiyon yapılır. İzoktan fazında tepkimeye giren numune, HPLC cihazına verilerek (R/S)-Flurbiprofen metil esterinin (R)- Flurbiprofen ya da (S)- Flurbiprofen'e enantiyomerik olarak dönüşümü belirlenir.

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

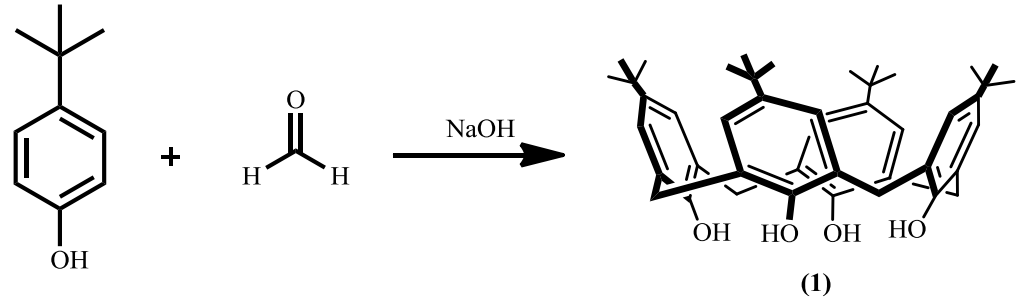


Şekil.3.12. (R/S-flurbiprofen) bileşiğin HPLC diyagramı

3.2.10.2. Konfokal Mikroskobu ile görüntüleme

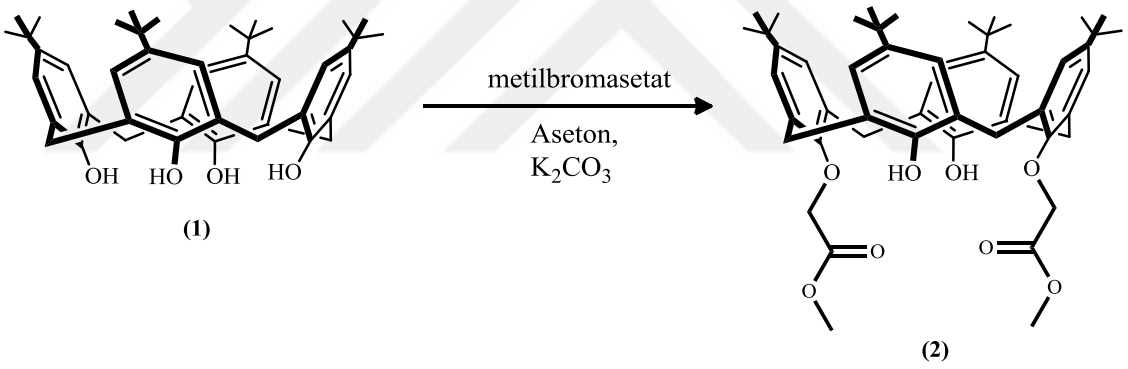
Dansil grubu içeren bileşiklerin genel özelliklerinden biri belirli dalga boylarında floresans ışıması yapabilmeleridir. Fe_3O_4'e immobilize edilmiş sentezlenen SA ve SH dansil türevi kaliksaren bileşikleri ve sol gel metoduyla encapsüle edilmiş SA SH bileşiklerinden her biri 0,2 g tartıldı %60 etil alkole muamele edilerek 310 nm ve 350 nm dalga boyunda oda sıcaklığında konfokal mikroskobu ile görüntüleme yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

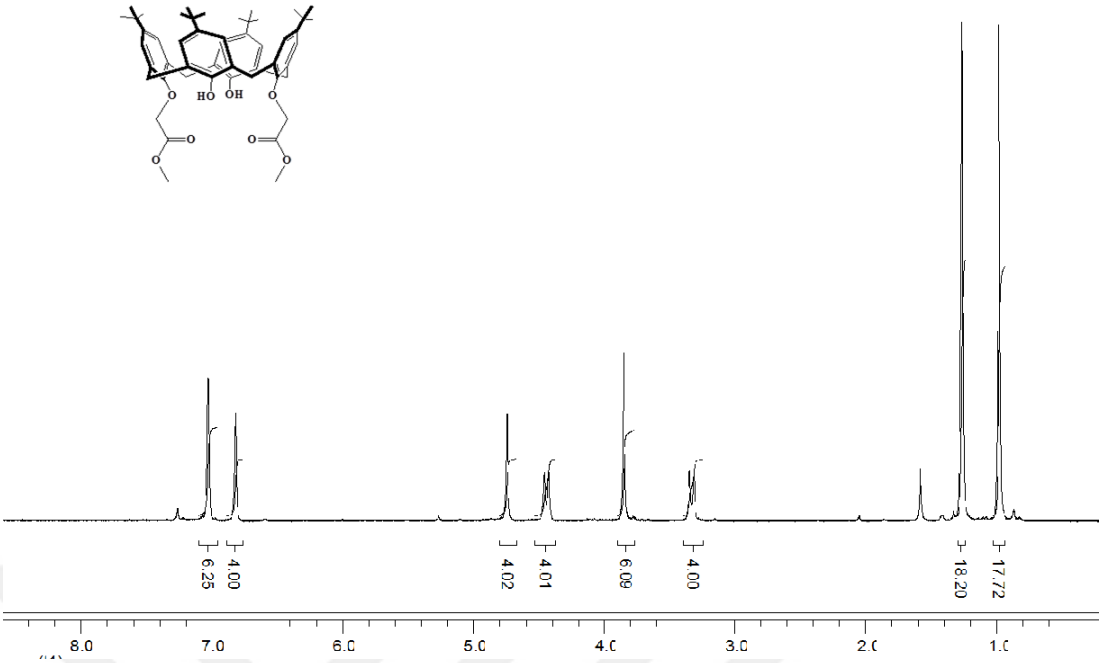


Şekil. 0.1. *p-tert*-bütilkaliks[4]aren (1)

Sentezlenen *p-tert*-bütilkaliks[4]aren, brom alkil ester türevi ile K_2CO_3 varlığında kuru aseton içerisinde literatüre göre (Rodrigues ve ark., 1991) etkileştirilerek *p-tert*-bütilkaliks[4]aren diester türevlerine (**2**) dönüştürüldü.

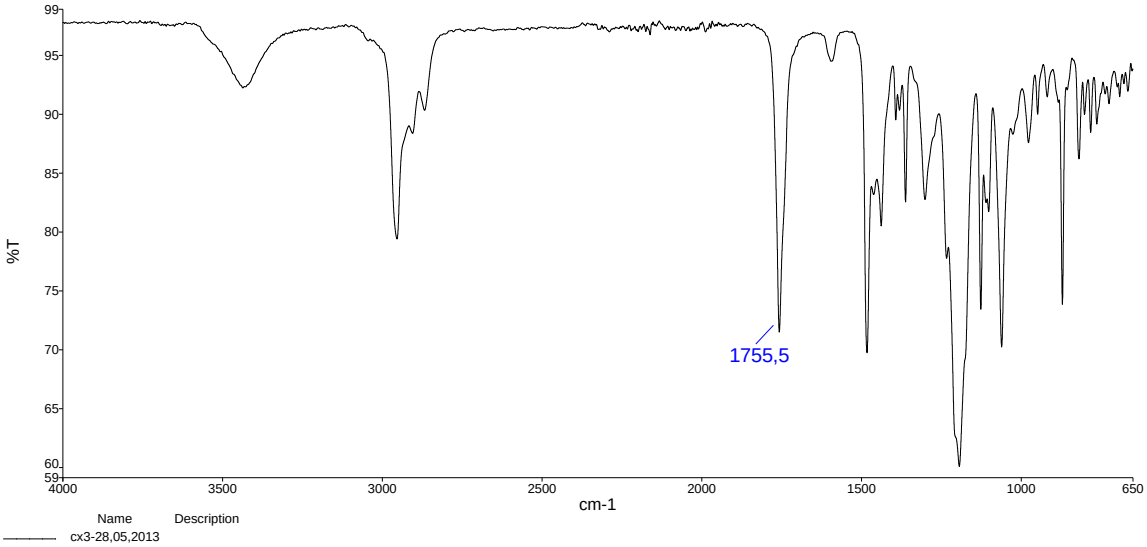


Şekil. 0.2. *p-tert*-bütilkaliks[4]aren diester türevi (2)



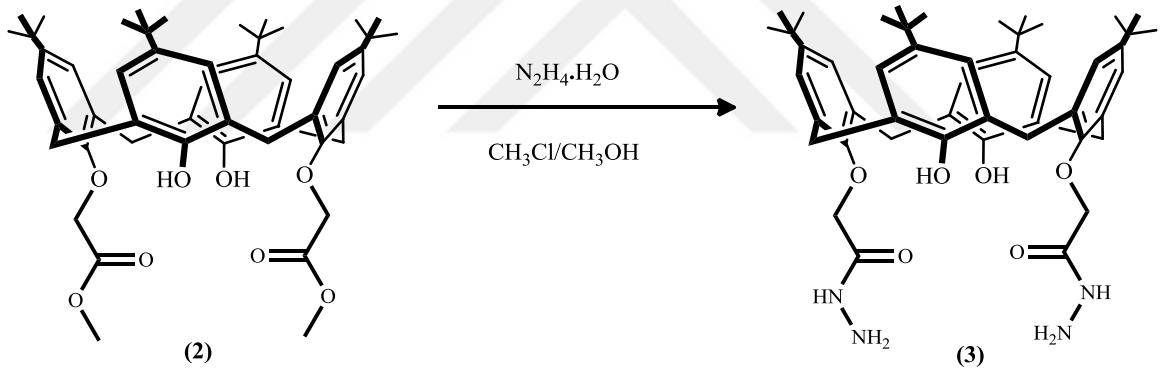
Şekil. 0.3. 5,11,17,23-Tetra-*tert*-bütil-25,27-dimetoksikarbonilmetoksi-26,28-dihidroksikaliks[4]aren (2) ^{1}H-NMR spektrumu

Bileşik **2**'nin; IR spektrumunda görülen 1755 cm^{-1}'deki ester karbonil bandına ait titreşim bağlanmanın gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 4.2). Bu bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumunda δ: 3.85 ppm'de görülen singlet 6 protonun O**CH$_3$** grubuna, δ: 4.75 ppm'de görülen singlet 4 protonun O**CH$_2$**CO grubunu göstermektedir. Bu sonuçlar diester türevinin oluştuğunu doğrulamaktadır (Şekil 4.3,4.4).



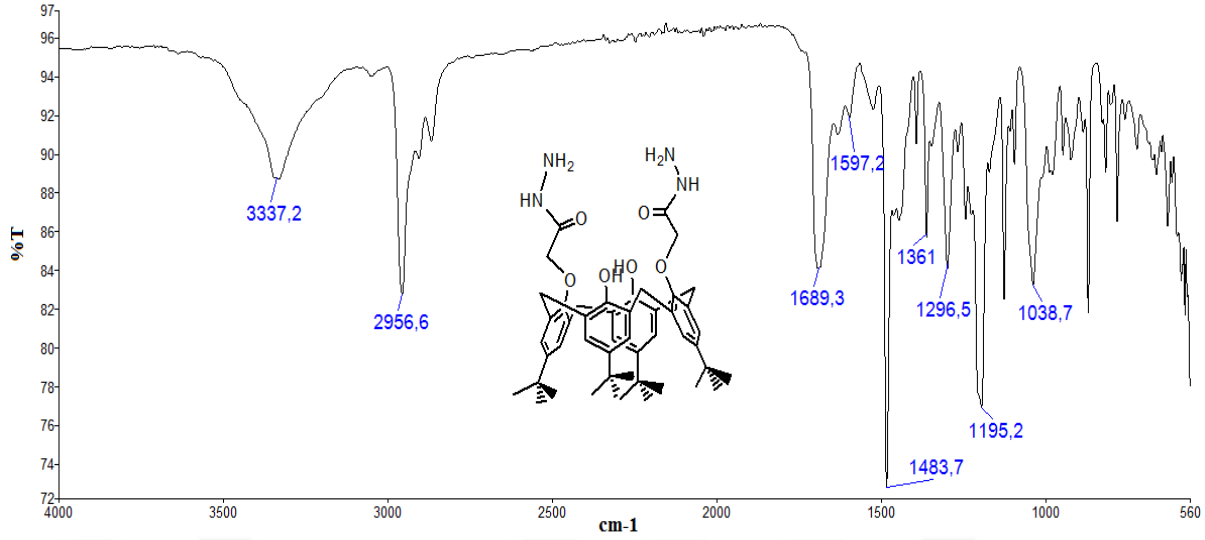
Şekil. 0.4. 5,11,17,23-Tetra-*tert*-bütil-25,27-dimetoksikarbonilmetoksi-26,28-dihidroksikaliks[4]aren bileşiğinin IR spektrumu

Bileşik **2**, hidrazin (N_2H_4) ile kloroform/metanol (3:1) içerisinde geri soğutucu altında 12 saat kaynatılarak % 89 verimle *p-tert*-bütilkaliks[4]arenin dihidrazit **3** (Alekseeva ve ark., 2000) türevine dönüştürüldü.

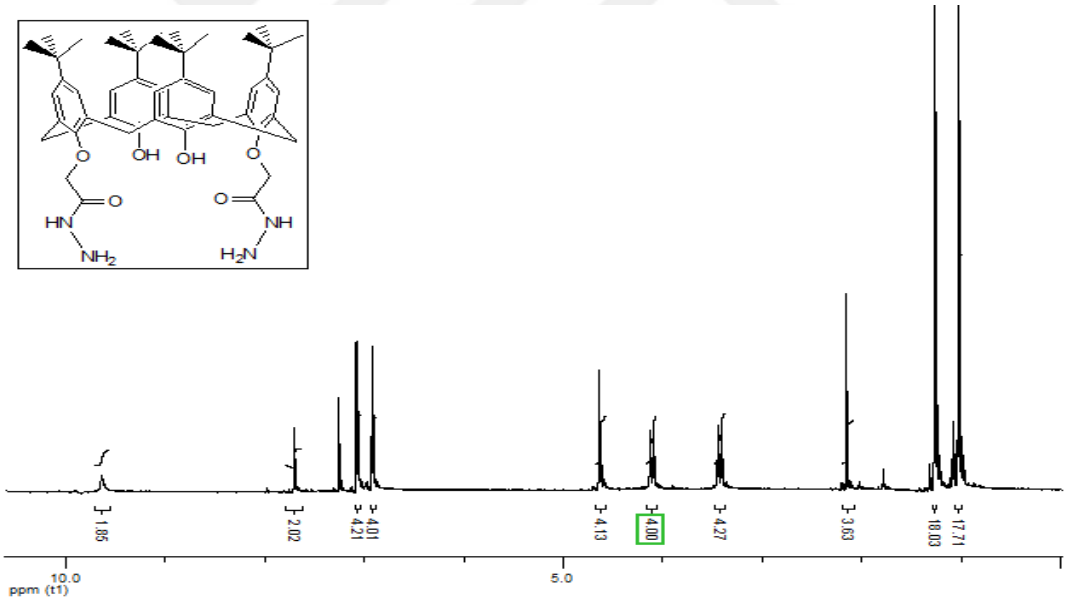


Şekil. 0.5. Kaliks[4]aren 'in diester türevinden 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,27-dihidrazinamitkarbonilmetoksi-26,28-dihidroksikaliks[4]aren sentezi

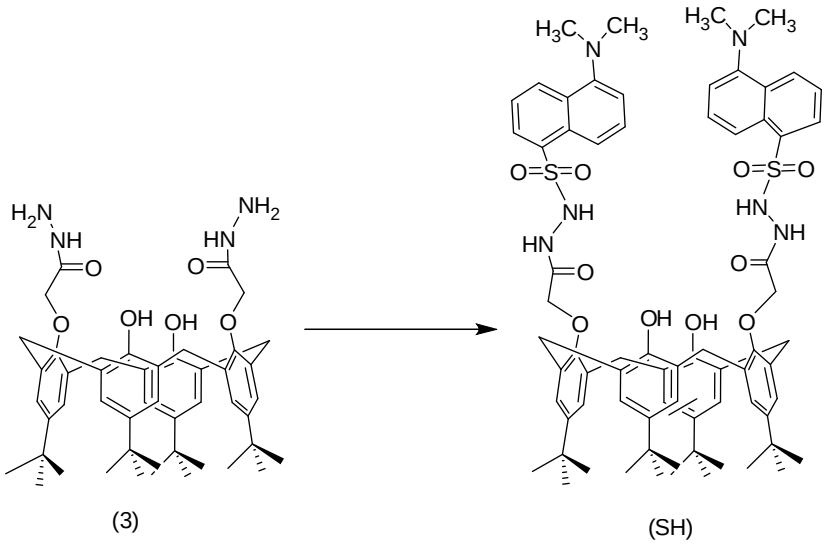
Bu tepkime bu bileşiğin FT-IR spektrumunda 1750 cm^{-1} deki ester karbonil bandının 1684 cm^{-1} deki amit karbonile ait gerilme bandına dönüşümü ile takip edilerek başlangıç maddelerinin ürüne dönüşümü gözlendi (Şekil 4.3.). Ayrıca ^{1}H-NMR spektrumunda 3.85 ppm'de görülen 2 adet OCH_3 singlet pikin kaybolması ve 3.66 ppm'de görülen (N-NH_2) amin ile 9.6 ppm'de görülen (-NH-N) amit grubuna ait piklerin oluşuması ürünün oluşumunu doğrulamaktadır.



Şekil.4.6. 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,27-dihidrazinamitkarbonilmetoksi-26,28-dihidroksikaliks[4]aren bileşiğine ait FTIR Spektrumu

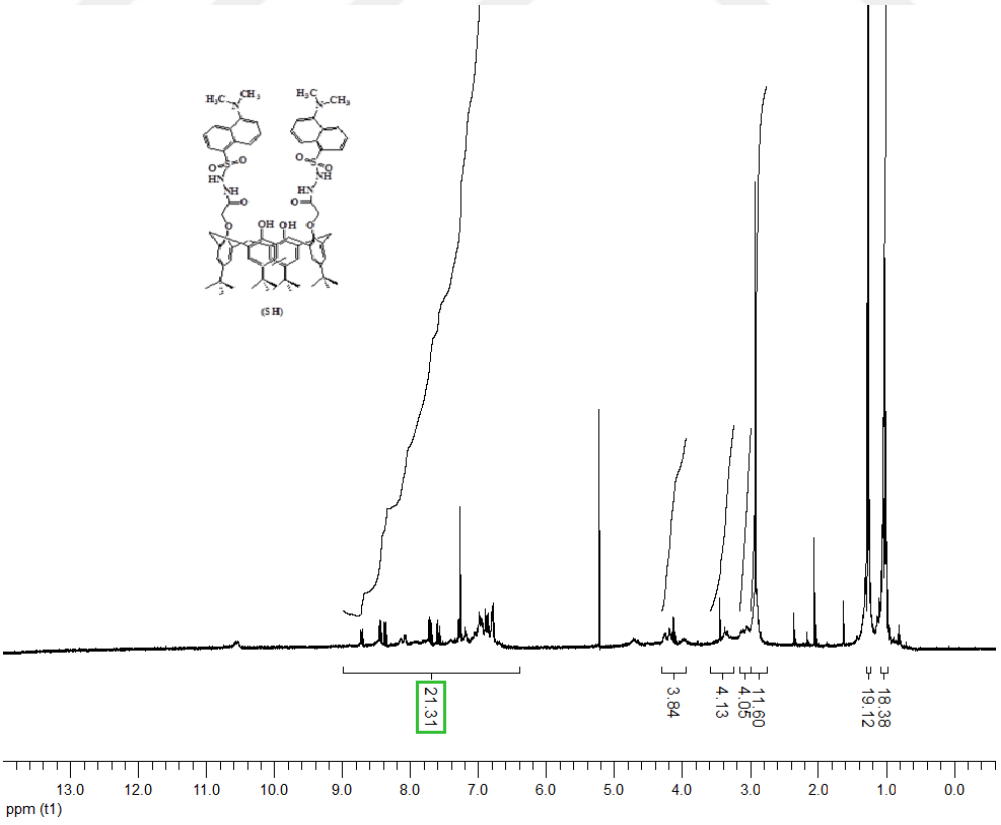


Şekil4.7. 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,27-dihidrazinamitkarbonilmetoksi-26,28-dihidroksikaliks[4]aren bileşiğine ait ^{1}H-NMR-Spektrumu

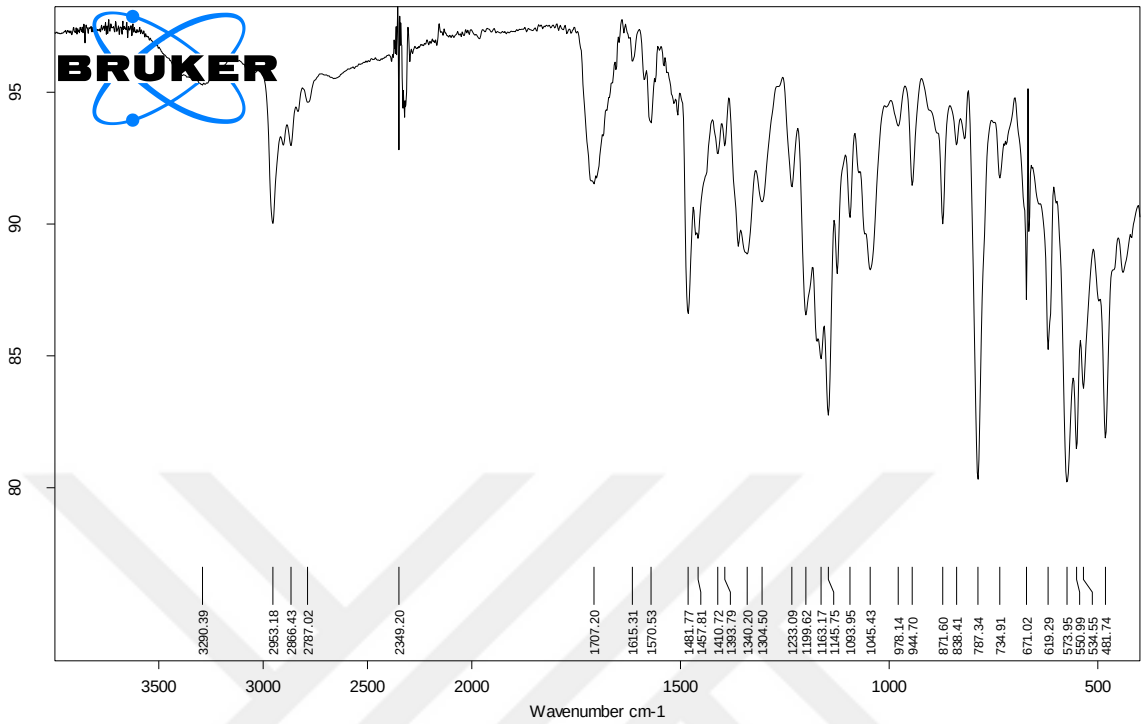


Şekil. 4.8. Kaliks[4]aren'in didansil hidrazit türevi (SH)

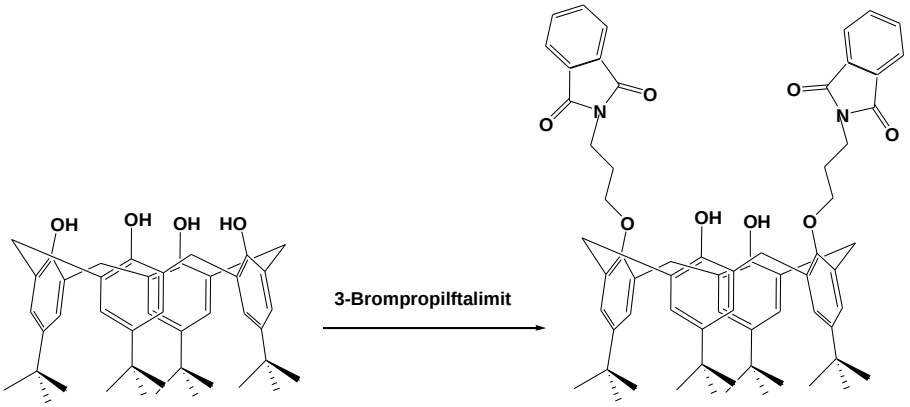
Sentezlenen kaliks[4]aren'in didansil hidrazit (**3)** bileşiği diklormetan içerisinde trietilamin varlığında dansilklörürle etkileştirildi. Reaksiyon ince tabaka kromatografisi ile takip edildi ve kaliks[4]aren'in didansil hidrazit türevi (SH) % 88 verimle elde edildi. Bu bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumunda δ 3.0 ppm"de gözlenen N-CH_3 gruplarına ait 12 protoluk siyal bileşiğin oluştuğunu göstermektedir (Şekil 4.5.).



Şekil. 4.9. Kaliks[4]aren'in didansil hidrazit türevinin (SH) NMR spektrumu



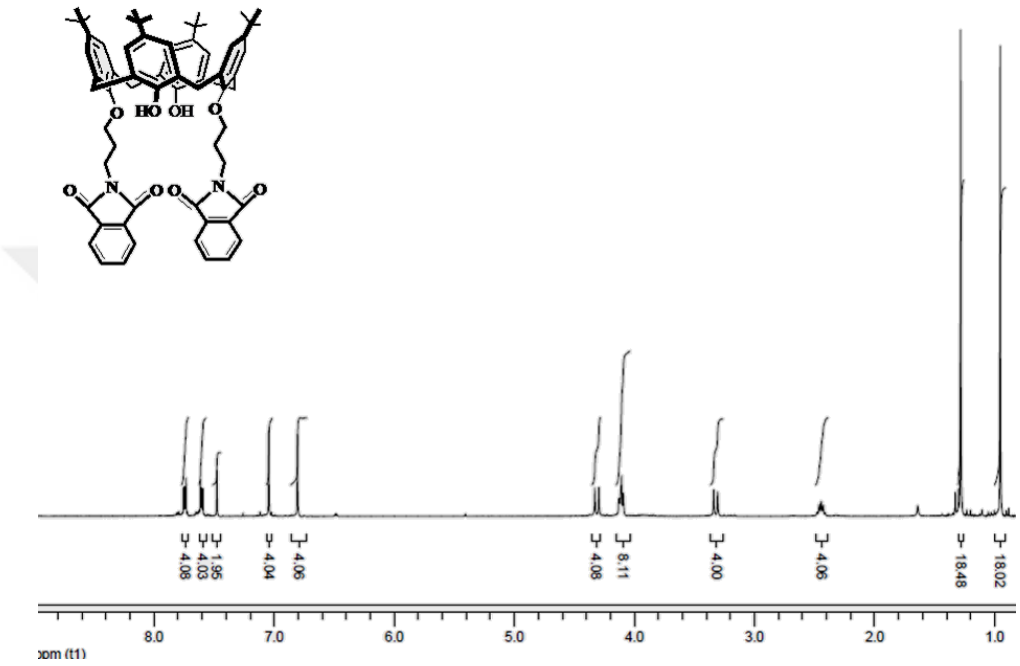
Şekil. 4.10. Kaliks[4]aren'in didansil hidrazit türevinin (SH) IR spektrumu



(1) **(4)**

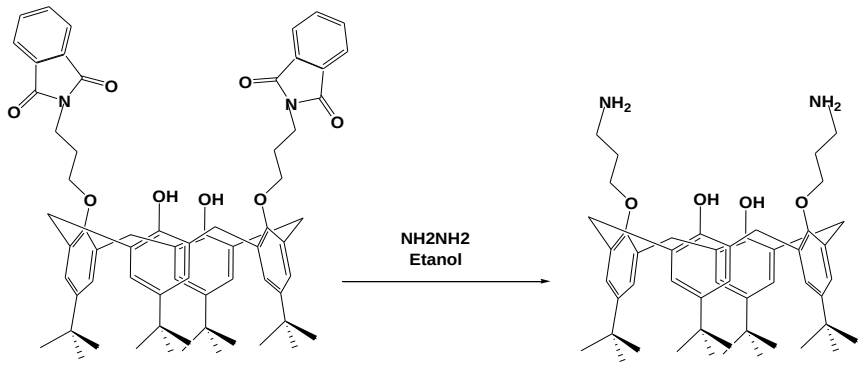
Şekil. 4.11. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,27-bis(3-ftalimidopropoksi)-26,28-dihidroksi kaliks[4]aren (4)

Bu çalışmalarında kullandığımız ikinci bileşiği sentezlemek için ilk olarak kaliksaren, N-(3-bromopropil)ftalimit ile KI ve K_2CO_3 varlığında asetonitril içerisinde etkileştirildi ve bileşik **4** sentezlendi. (Chrisstoffels ve ark., 1999). Bu bileşiğin ^{1}H NMR spektrumunda δ 3.35 ve 4.3 ppm‟deki AB tipi protonlar bileşiğin koni konformasyonunda olduğunu, δ 7.6 ve 7.75 ppm‟deki protonlarda ftalimitteki aromatik halka protonlarını göstermektedir.



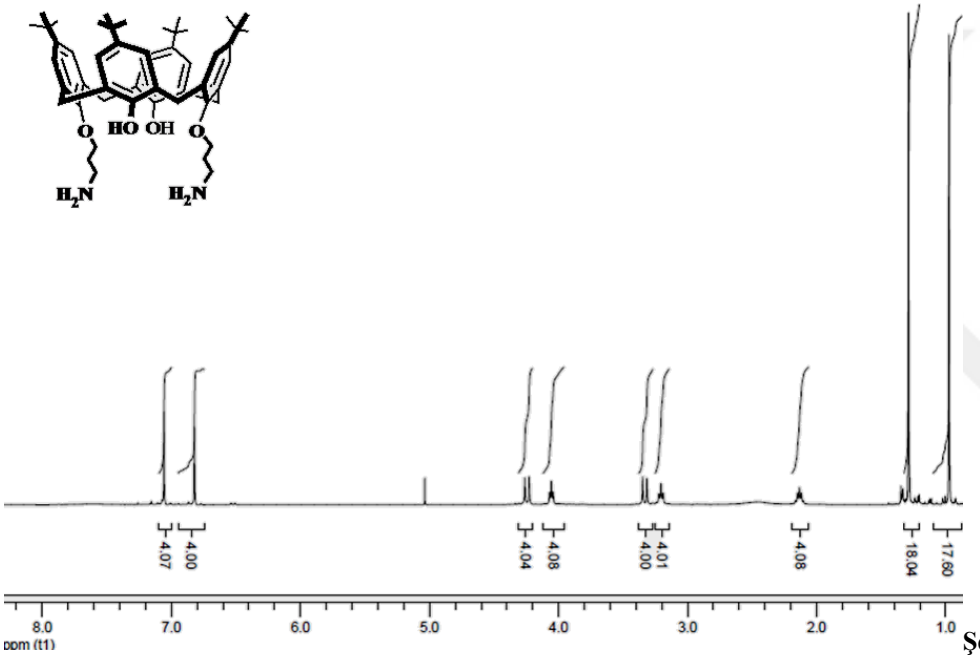
Şekil. 4.12. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,27-bis(3-aminopropoksi)-26,28-dihidroksi kaliks[4]aren (**5**) ^{1}H-NMR spektrumu

p-ter-bütilkaliks[4]arenin ftalimit türevi (**4**) etanol ortamında hidrazin ile hidroliz edilerek *p-ter*-bütilkaliks[4]arenin diamin bileşiğine (**5)** dönüştürüldü (Chrisstoffels ve ark., 1999). **5** numaralı diamin bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumunda (Şekil 4.7) ftalimit gruplarının hidroliz olduğu 7.60-7.64 ppm ve 7.73-7.76 ppm arasındaki multiplet piklerin gözlenmemesinden anlaşılır. 3.32 ve 4.24 ppm de Ar-CH_2-Ar protonlarına ait AB spin sistemindeki bir çift dublet bileşiğin koni konformasyonunda olduğunu gösterir.

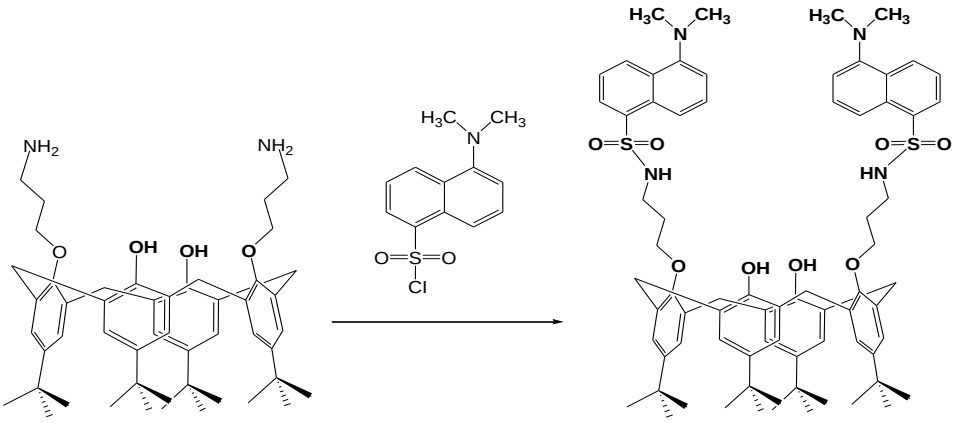


(4) **(5)**

Şekil. 4.13. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,27-bis(3-aminopropoksi)-26,28-dihidroksi kaliks[4]aren (**5**)



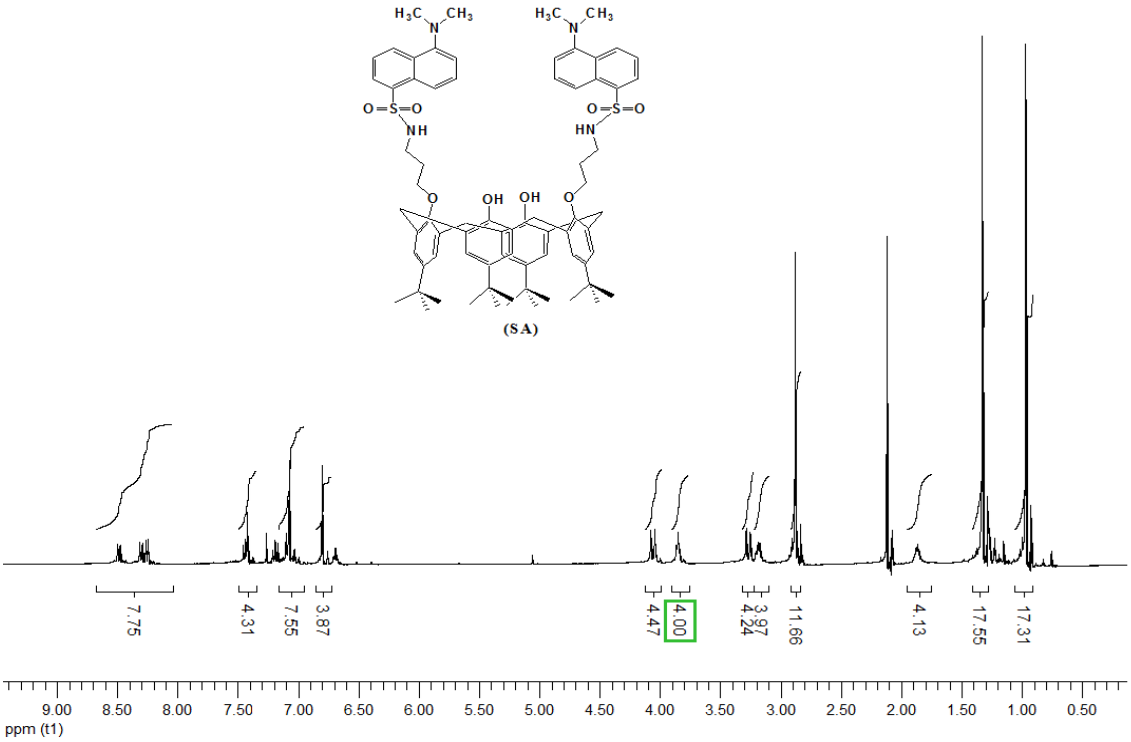
Şekil. 4.14. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,27-bis(3-aminopropoksi)-26,28-dihidroksi kaliks[4]aren in ^{1}H-NMR



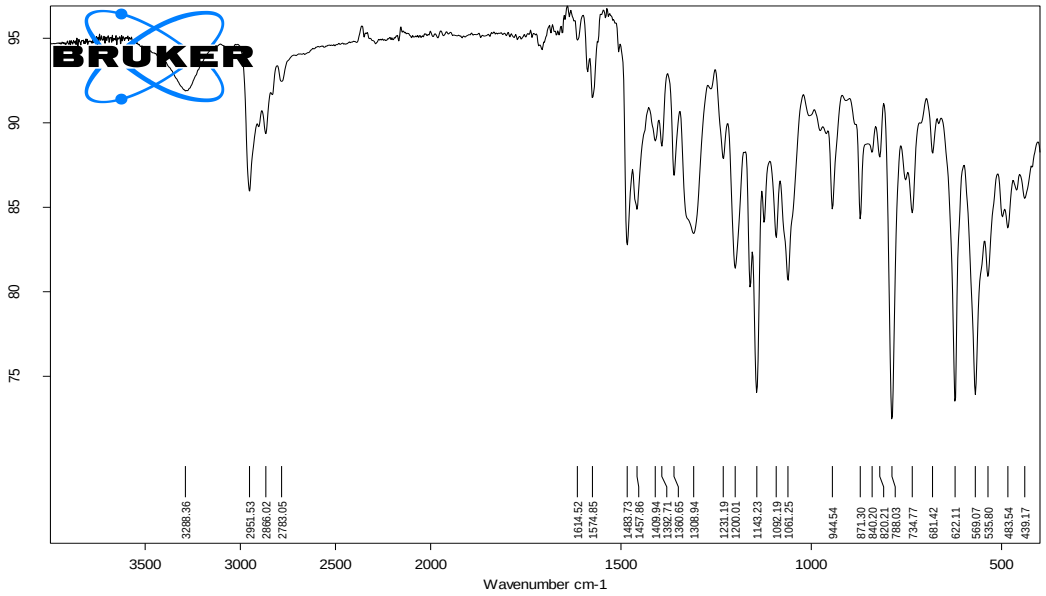
spektrumu .

Şekil. 4.15. Kaliks[4]aren'in diamin türevinin(6) dansil klorür ile etkileştirilmesi (SA)

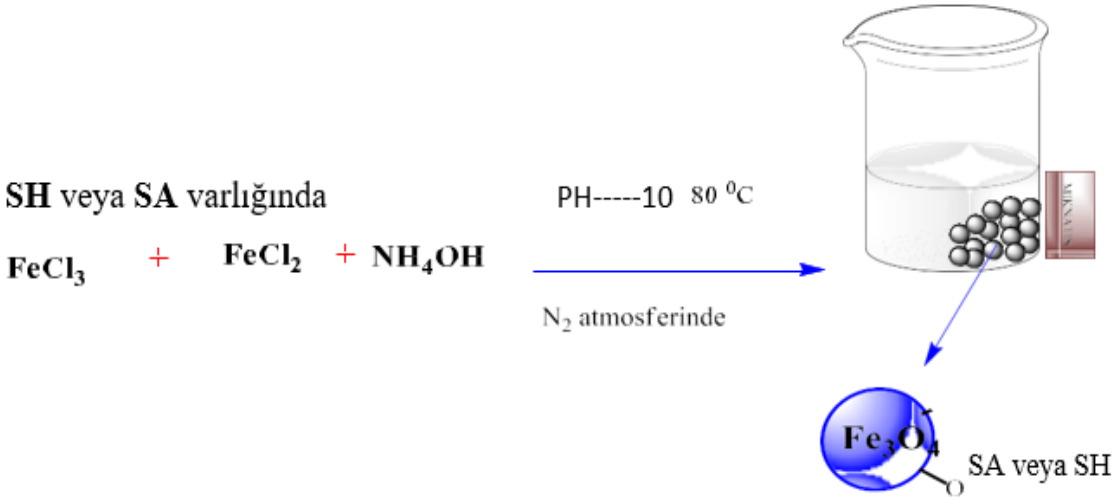
Sentezlenen aminoproksi grubu taşıyan kaliks[4]aren bileşiği (**5**) diklormetan içerisinde trietilamin varlığında dansilklorür ile uygun şartlar altında reaksiyonu sonucu aminoproksidansil grubu taşıyan kaliks[4]aren bileşiği (**SA**) sentezlendi. ^{1}H-NMR spektrumunda δ 2.85 ppm"de gözlenen N-CH_3 gruplarına ait 12 protoluk siyal ile 8.20-8.35 ve 8.50 ppm de dansil grubunun aromatik protonlarına ait sinyaller bileşiğin oluştuğunu göstermektedir (Şekil 4.15.).



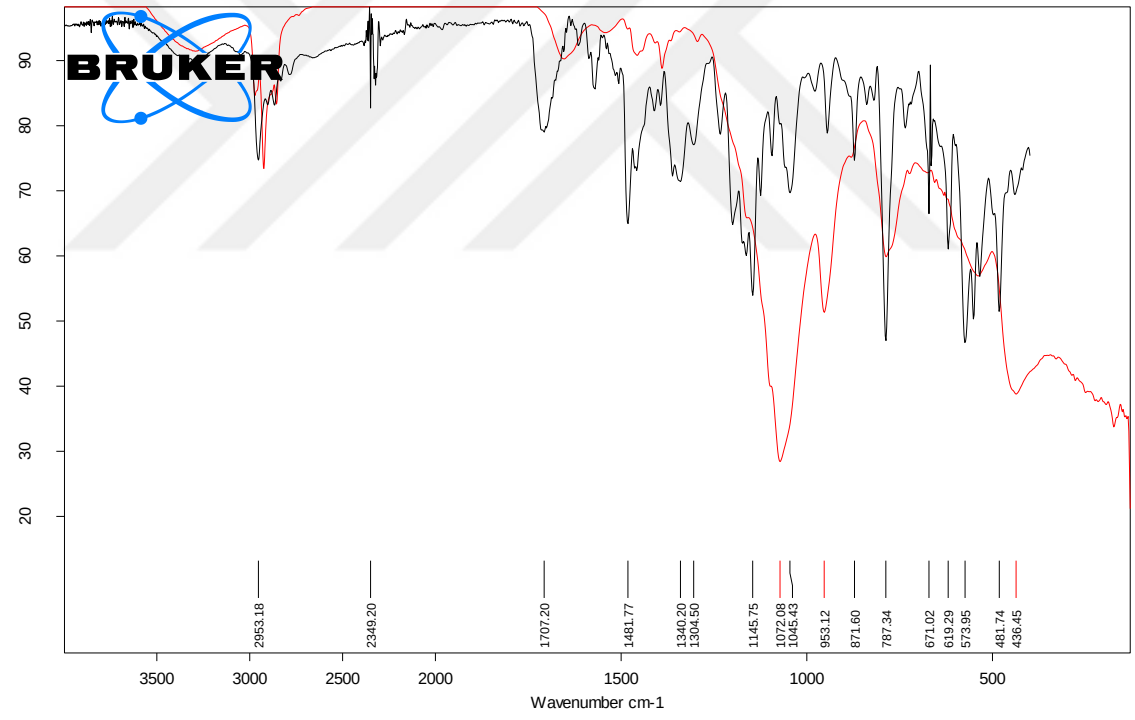
Şekil. 4.16. SA' bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumu



Şekil. 4.17. SA' bileşiğinin IR spektrumu



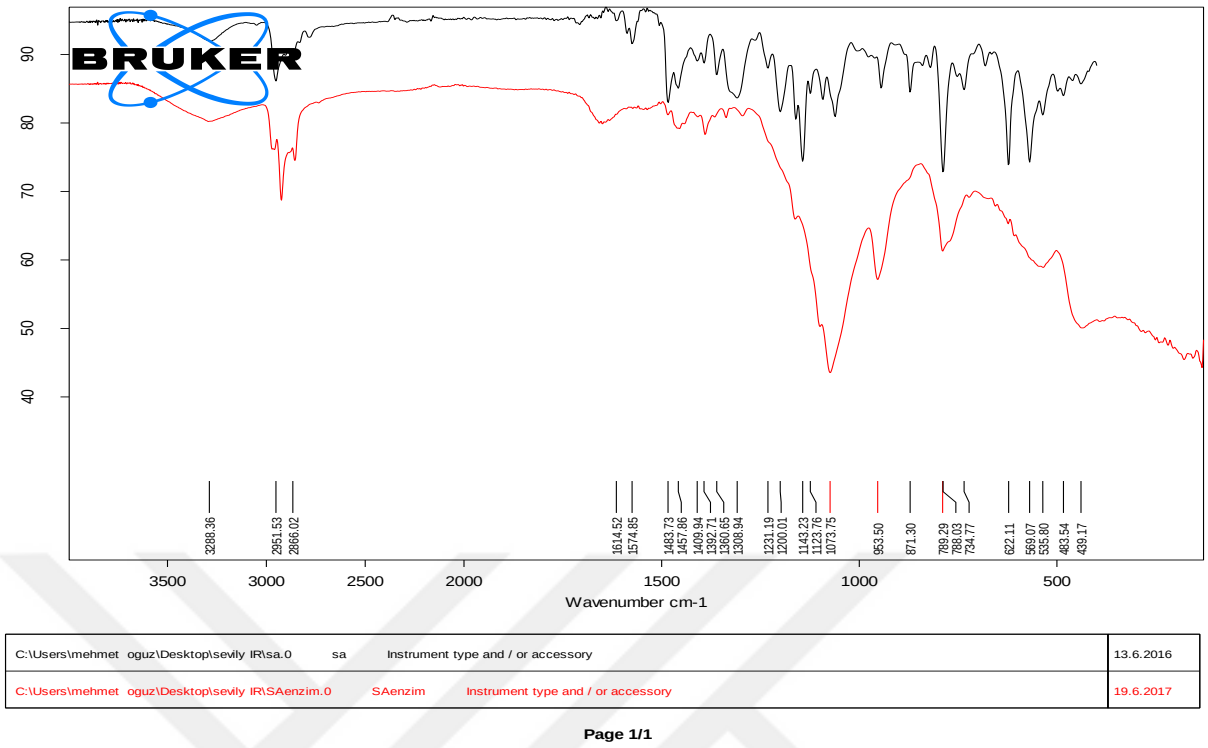
Şekil 4.18. Fe_3O_4 nanopartikülüne bağlı SH ve SA sentezi



C:\Users\mehmet oguz\Desktop\sevily IR\sh.0	sh	Instrument type and / or accessory	13.6.2016
C:\Users\mehmet oguz\Desktop\sevily IR\SHenzim.0	SHenzim	Instrument type and / or accessory	19.6.2017

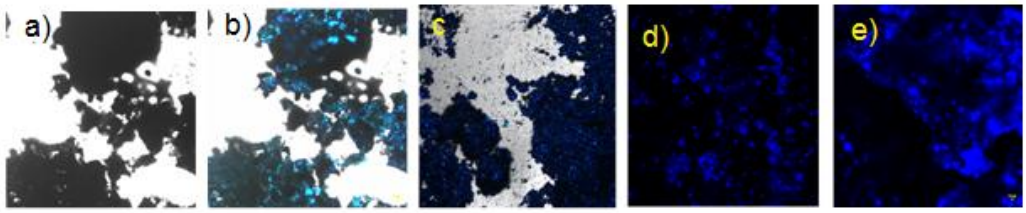
Page 1/1

Şekil. 4.19. SH ve Fe_3O_4-SH-E IR spektrumu



Şekil. 4.20. SA bileşiğinin ve Fe_3O_4-SA-E IR spektrumu

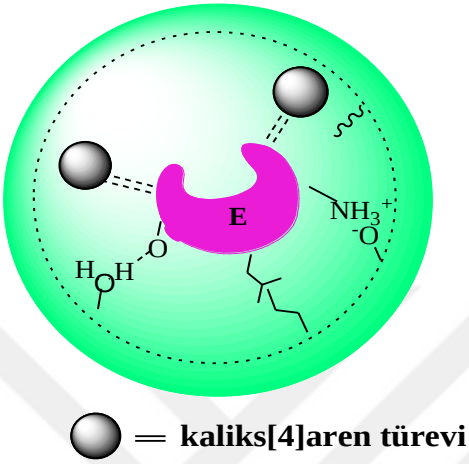
Bu çalışmada sentezlenen SH ve SA bileşikleri $FeCl_2$ ve $FeCl_3$ ile birlikte literatüre göre etkileştirilerek floresans özellikte kaliksaren immobilize manyetik nanopatiküller elde edildi. **Fe_3O_4-SA** ve **Fe_3O_4-SH** nanopartüküllerin FTIR: spektrumunda 2971-2855 cm^{-1} aralığında alifatik C-H bantları 1657-1653 cm aralığında amit gruplarına ait C=O ve 1546-1454 cm aralığında aromatik C=C bantları 1072, 953 cm^{-1}'de Si-O bantları ile Fe-O grubuna ait bantlar Fe_3O_4 -SA da 723, 538 cm^{-1}'de, **Fe_3O_4 -SH** da 789, 594 cm^{-1}'de görülmektedir. Ayrıca bu nanopartikülleri konfokol mikroskobunda incelediğimizde Fe_3O_4 nanopartiküllerine dansil gruplu kaliks[4]arenin immobilize olduğu görülür (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. Konfokal microskop görüntüleri **a) Fe_3O_4 b) Fe_3O_4-SA c) Fe_3O_4-SH d) Fe_3O_4-SA-E e) Fe_3O_4-SH-E**

4.1. Sol-Jel Tekniğine göre Lipaz İmmobilizasyonu

Bu çalışmada kullanılan *Candida Rugosa* lipaz, sol-jel tutuklama metoduna göre **Fe_3O_4 -SA** ve ya **Fe_3O_4-SH** varlığında immobilize edildi. İmmobilize enzimin lipaz aktivitesi, spesifik aktivitesi ve aktivite verimi aşağıda verilen eşitliklerden hesaplandı.



Şekil 4.22. Sol-jel metodu ile lipaz immobilizasyonu gösterimi

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

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

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

Tablo 4.1. Optimum reaksiyon şartlarında serbest ve immobilize lipazların aktivitesi

İmmobilize Lipaz	***Tutuklanan Protein (mg/g)***	***Lipaz Aktivitesi (U/g)***	***Spesifik Aktivite (U/ mg- protein)***
Fe_3O_4-E[a]	15.6	29.2	1.3
Fe_3O_4 –SA-E	19.0	119	6.2
Fe_3O_4-SH-E	29.0	116	4.0

[a]kaliks[4]aren kullanmadan immobilize olmuş lipaz

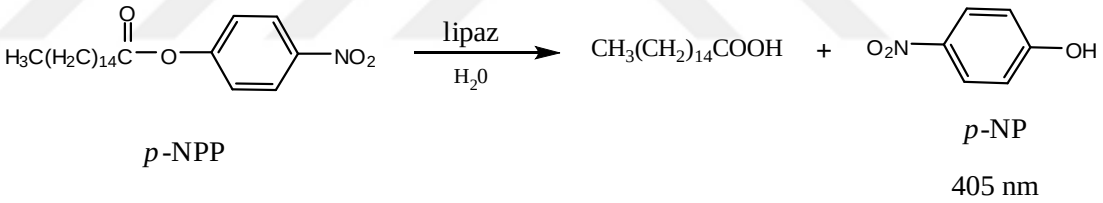
Şekil 4.10 da verilen **Fe_3O_4–SA** ve **Fe_3O_4 –SH** nanopartiküllerinin lipaz ile sol-gel metoduna göre immobilize edildikten sonra alınan konfokol görüntülerine baktığımızda her iki nanopartikülde de dansil gruplarının varlığı görülür. İmmobilize enzimlerin aktivitesi ve spesifik aktivitesini incelediğimizde. Tablo 4.1'de görüldüğü gibi immobilize nanopartiküllerin spesifik aktiviteleri kaliksaren türevlerinin kullanılmadığı zaman 1,3 olarak gözlenirken, **Fe_3O_4 –SA-E** için 6,2, **Fe_3O_4 –SH-E** için 4 olarak gözlendi. Bu sonuçlara baktığımızda **Fe_3O_4-SA-E** ve **Fe_3O_4-SH-E** nanopartiküllerinin dansil grupları protein ve enzim ile etkileşimde etkili oldukları anlaşılmaktadır. Ayrıca bu immobilize enzimlerin aktivitelerinin de çok yüksek olması enzimin konformasyonunun ve aktif merkezlerinin korunduğunu göstermektedir.

Dansil gruları lipaz enziminin –COOH, -SH, imidazol ve lisin grupları ile kompleksleşerek enzimin konformasyonunun korunmasında ve aktivitesinin artırılmasına yardımcı olabilmektedir. Öncelikle *Candida rugosa* enziminin aktif merkezi histidin-serin-glutamin üçlüsünden oluşan ve 31 amino asitten oluşan bir kapağa sahiptir. Kapağın aktif bölgeye kalan kısmı hidrofobik özellikte, diğer yüzeyi ise hidrofilik özelliktedir (Hernández ve ark., 2004). Kapak açık iken enzim aktiftir. Bu kaliksaren türevleri yukarıda verilen kuvvetli hidrojen bağı yapan fonksiyonel gruplara sahip olduğundan enzimin kapağının açık kalmasını sağlayarak enzimin aktivitesinin artmasını sağlamaktadırlar. *Candida rugosa* lipaz enzimi suda ile temas ettiğinde kapağı kapalı ve hidrofilik kısım suya doğu dönüktür. Kullanılan kaliksaren türevleri kapaktaki amino asitlerle

kompleksleşerek kapağın kapanmasını önlemektedirler. **Fe_3O_4-SA** nolu nanopartiküler, **Fe_3O_4-SH** a göre enzimdeki bu fonksiyonel gruplarla daha iyi etkileştiğinden aktivitesi daha yüksek görülmektedir.

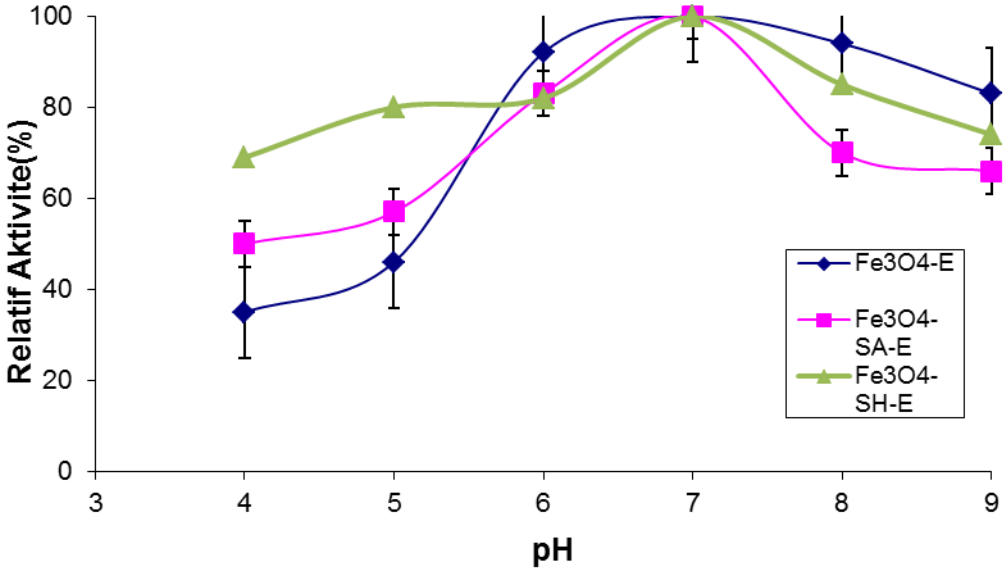
4.1.1.Optimum pH

Enzim aktivitesinde pH'ın büyük bir önemi vardır**.** Bu çalışmada serbest ve immobilize lipazlar için optimum pH belirlendi. 0.05 M fosfat tampon çözeltisi içerisinde serbest ve immobilize edilen lipazlar *p*-nitrofenilpalmitat ile etkileştirilerek hidrolitik aktivitelerine pH'nın etkisini gözlemlemek amacı ile farklı pH'larda (pH=4-9) gerçekleştirilen tepkimelere ait relatif aktivite değerlerinin pH ile değişim grafiği çizildi. Bu çalışmalarda hidrolitik aktivite tayini pH=7.0 de p-nitrofenilpalmitatın hidrolizi ile gerçekleştirildi. Hidroliz sonucu oluşan p-nitrofenol'ün miktarı spektrofotometrik tayin edilerek enzimin aktivitesi hesaplandı Serbest lipazın optimum pH'sı 7.0 olarak bulundu (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. *p*-Nitrofenilpalmitatın hidrolizi

Fe_3O_4-SA ve **Fe_3O_4-SH** nanopartiküllerin varlığında immobilize enzimlerin aktivitelerini farklı pH'larda incelediğimizde optimum pH'nın 7.0 olduğu gözlenir. (Şekil 4.24.).



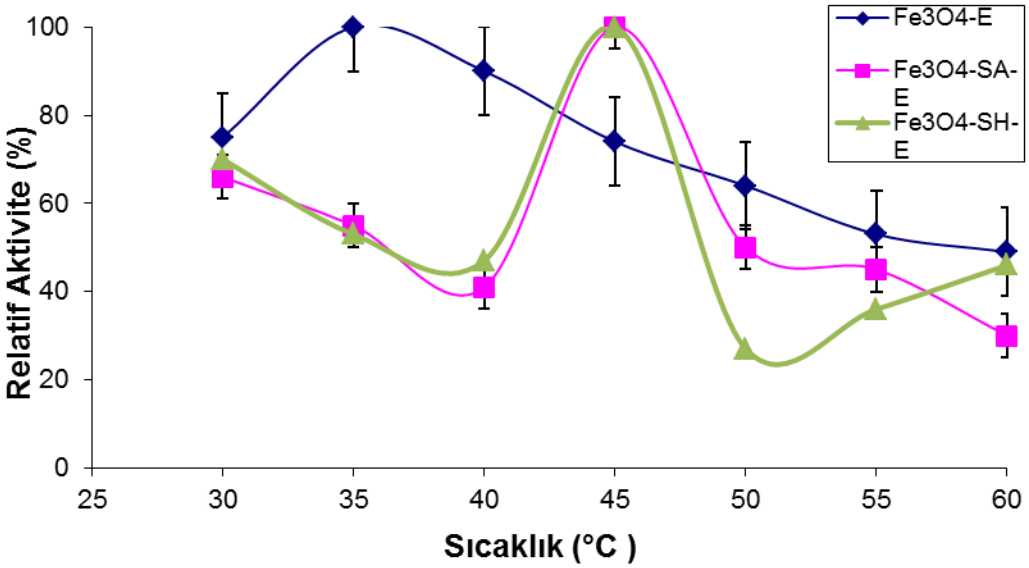
Şekil 4.24. **Fe_3O_4-SA** ve **Fe_3O_4-SH** nolu nanopartiküllerin lipaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

İmmobilizasyon ile pH'ın farklılık göstermemesi lipazın konformasyonundaki değişiklik olmaması ve lipaz yüzeyindeki yük yoğunluğunun değişmemesinden kaynaklandığını söyleyebiliriz (Özgür ve ark., 2005; Berger ve ark., 2006).

4.1.2. Optimum sıcaklık

Serbest ve immobilize edilen lipazların aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisinin ne olduğunu incelemek amacı ile farklı sıcaklık değerlerinde (25–50^oC), 50 mM fosfat tamponunda (pH -7,0) 20-25 dk aralıklarla kaliksaren türevinin yokluğunda ve varlığında yapılan immobilize enzimlerin (**Fe_3O_4-E, Fe_3O_4-SA-E** ve **Fe_3O_4-SH-E)** aktiviteleri ölçülerek optimum sıcaklık değerleri belirlendi. Aktivite ölçümleri pH 7'de gerçekleştirilip kaliksaren türevini kullanılmadığı lipazın (**Fe_3O_4)** optimum sıcaklığı 35°C olarak bulundu.

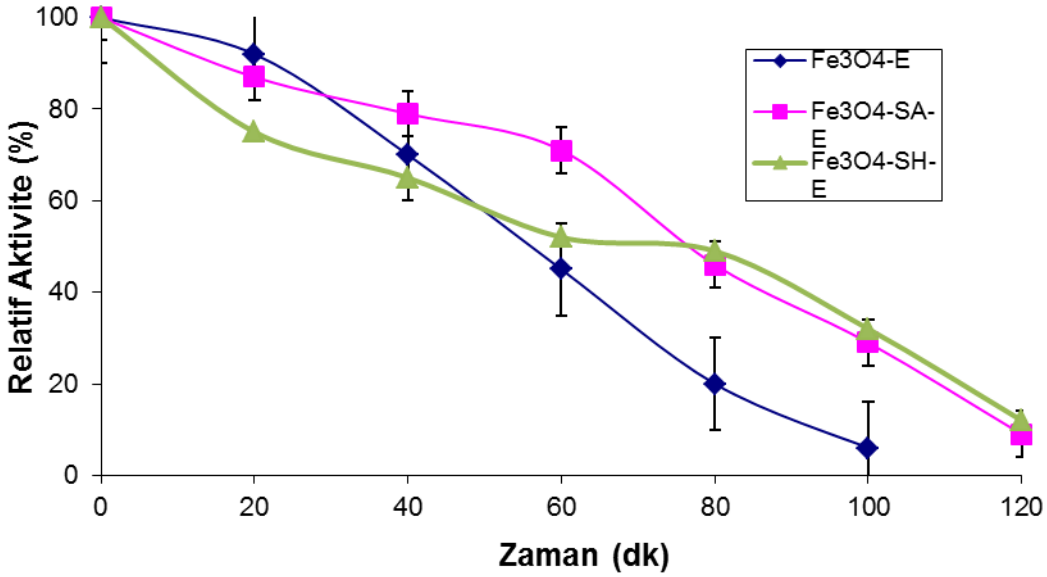
Kaliksaren türevlerinin kullanıldığı immobilize lipazların (**Fe_3O_4-SA** ve **Fe_3O_4-SH)** optimum sıcaklıkları ise 45^oC olarak bulundu. Bu sonuçlar **Fe_3O_4-SA** ve **Fe_3O_4-SH** nanopartiküllerinin yüksek sıcaklıkta enzimin aktivitesinin korunmasını sağlamıştır (Şekil 4.25)



Şekil 4.25. İmmobilize lipazların aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

4.1.3.Termal Kararlılık

Kaliksaren türevlerinin kullanılmadığı (**Fe_3O_4-E)** ve kullanıldığı immobilize lipazların (**Fe_3O_4-SA** ve **Fe_3O_4-SH)** aktivitesi üzerine 60 ^oC de zamanın etkisinin ne olduğunu incelemek amacı ile 60 ^oC 'de 0.01 g tartılan kaliksaren türevleri, 50 mM fosfat tamponunda (pH 7,0) *p*-nitrofenilpalmitat ile etkileştirilerek 20-40-60-80-100-120 dk aralıklarla **Fe_3O_4-E** ve **Fe_3O_4-SA** ve **Fe_3O_4-SH** nin aktiviteleri ölçülerek termal kararlılık değerleri belirlendi.(Şekil.4.26.)



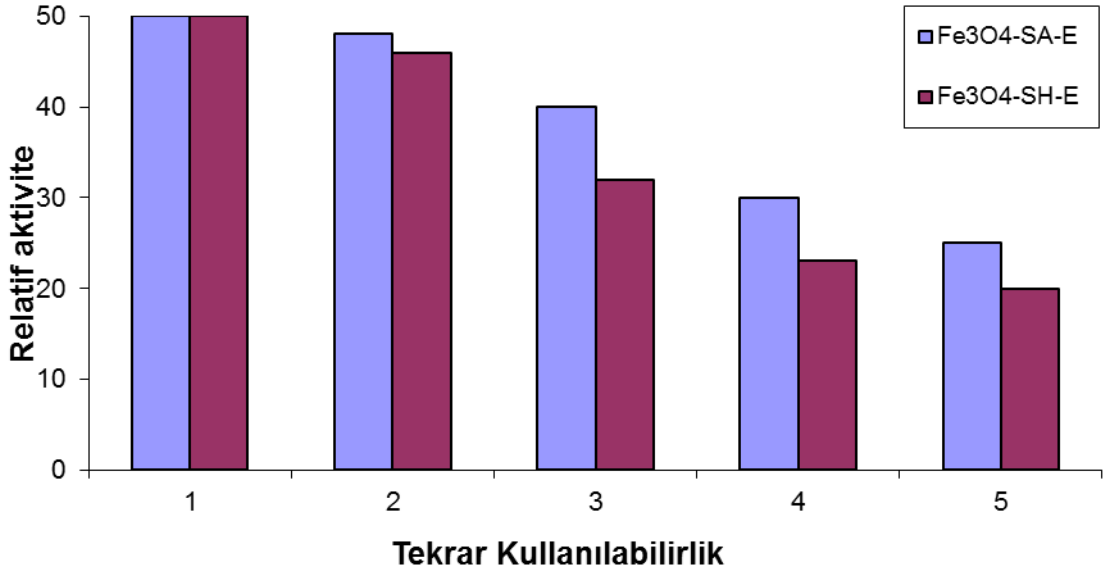
Şekil 4.26. İmmobilize lipazların aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Grafik incelendiğinde Fe_3O_4 80.dk da enzim aktivitesi % 80 azalırken, diğerlerinin(**Fe_3O_4-SA-E** ve **Fe_3O_4-SH-E)** aktivitesi % 40'ın üzerindedir. Bu sonuçlar **Fe_3O_4-SA** ve **Fe_3O_4-SH** nanopartiküllerinin yüksek sıcaklıkta uzun zaman aralığında enzimin aktivitesinin korunmasını sağlamıştır.

4.1.4.Tekrar Kullanılabilirlik

Kaliksaren türevlerinin kullanıldığı immobilize lipazların (**Fe_3O_4-SA-E** ve **Fe_3O_4-SH-E)** aktivitesi üzerine tekrar kullanımın etkisini incelemek amacı ile 0.05 M fosfat tampon çözeltisi içerisinde oda sıcaklığında ve pH 7 de *p*-nitrofenilpalmitat ile 5 kez etkileştirildi. Hidrolitik aktivitelerini incelemek amacı ile gerçekleştirilen tepkimelere ait relatif aktivite değerleri grafiği çizildi (Şekil 4.27).

Bu değerlere baktığımızda 5 kez kullanımdan sonra **Fe_3O_4-SA-E** kullanıldığı durumda dönüşüm %25, **Fe_3O_4-SH-E** için %20 dir. (Şekil 4.27).



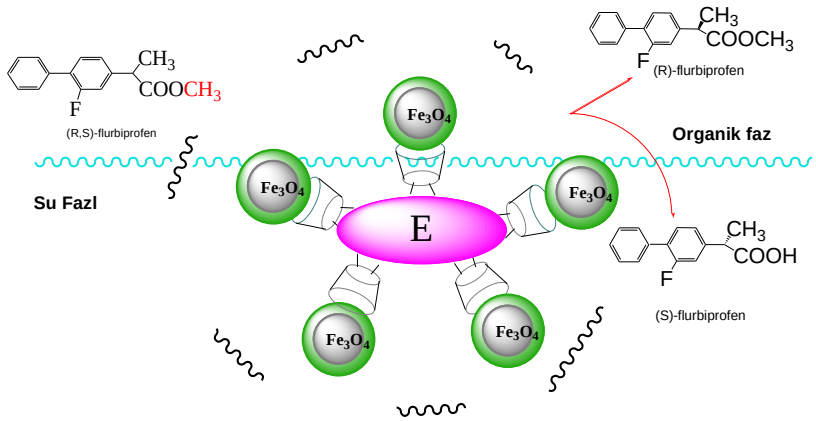
Şekil 4.27. İmmobilize lipazların aktivitesi üzerine tekrar kullanımın etkisi

4.2. İmmobilize Lipazların Enantiyoseçimli Tepkimelerde Kullanılması

Sol-jel tutuklama metoduna göre immobilize edilen lipazların enantiyoseçimlilik oranını belirlemek için hazırlanan immobilize enzimler (**Fe_3O_4-SA-E** ve **Fe_3O_4-SH-E)** rasemik Flurbiprofen metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizinde kullanıldılar.

Tepkime HPLC ile izlendi, elde edilen maddelerin enantiyomerik kompozisyon analizi ve enantiyomerik fazlalıkları (%e e) yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde (HPLC) kiral kolonlar ile belirlendi. Sonuçlar HPLC'de, hekzan/2-propanol/trifloroasetik asit (100/0.1/0.1) mobil fazı kullanılarak 254 nm'de 1 mL/dk akış hızında incelendi.

HPLC'den çıkan sonuçlara göre yapılan hesaplamalar literatürdeki (Taschner ve ark., 1992) formüller kullanılarak yapılmıştır. Enantiyomerik fazlalık (ee), dönüşüm oranı (X), enantiyoseçimlilik (E) gibi değerler aşağıdaki bağıntılar kullanılarak bulunmaktadır.



Şekil 4.28. (R/S)-flurbiprofen metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizi

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

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

ee_s : Kalan substratın enantiyomerik fazlalığı

ee_p : Oluşan ürünün enantiyomerik fazlalığı

C_R :R enantiyomerinin konsantrasyonu

C_S:S enantiyomerinin konsantrasyonu

Tablo 4.2. Serbest ve immobilize lipaz kullanarak rasemik flurbiprofen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizi

	X (%)	ee_s (%)	E
Fe3O4-E (35°) 48saat	32	48	159
Fe3O4-SA-E (35°C) 48 saat	34	50	163
Fe3O4-SH-E (35°C) 48 saat	27	32	135
Fe3O4-E (35°) 96 saat	16	17	117
Fe3O4-SA-E (35°C) 96 saat	14	14	114
Fe3O4-SH-E (35°C) 96 saat	10	10	109
Fe3O4-E (45°) 48 saat	36	55	172
Fe3O4-SA-E (45°C) 48 saat	49	85	270
Fe3O4-SH-E (45°C) 48 saat	48	81	248
Fe3O4-E (45°) 96 saat	20	22	123
Fe3O4-SA-E (45°C) 96 saat	34	50	163
Fe3O4-SH-E (45°C) 96 saat	32	48	159
Fe3O4-E (45°) 144 saat	37	6	105
Fe3O4-SA-E (45°C) 144 saat	19	20	120
Fe3O4-SH-E (45°C) 144 saat	10	10	109

Tablo 4.2'de görüldüğü gibi kaliksaren türevlerinin kullanıldığı immobilize lipazların enantiyoseçimlilikleri pH 7 de 35 ^{o}C de (E) 159 olarak gözlenirken, **Fe_3O_4-SA-E** ve **Fe_3O_4-SH-E** için optimum pH=7' de enantiyoseçimlilikleri sırasıyla 163, 135 olarak bulundu. Bu sonuçlara baktığımızda pH=7 de immobilize enzimler için en yüksek dönüşüm ve enantiyoseçimlilik 45°C de

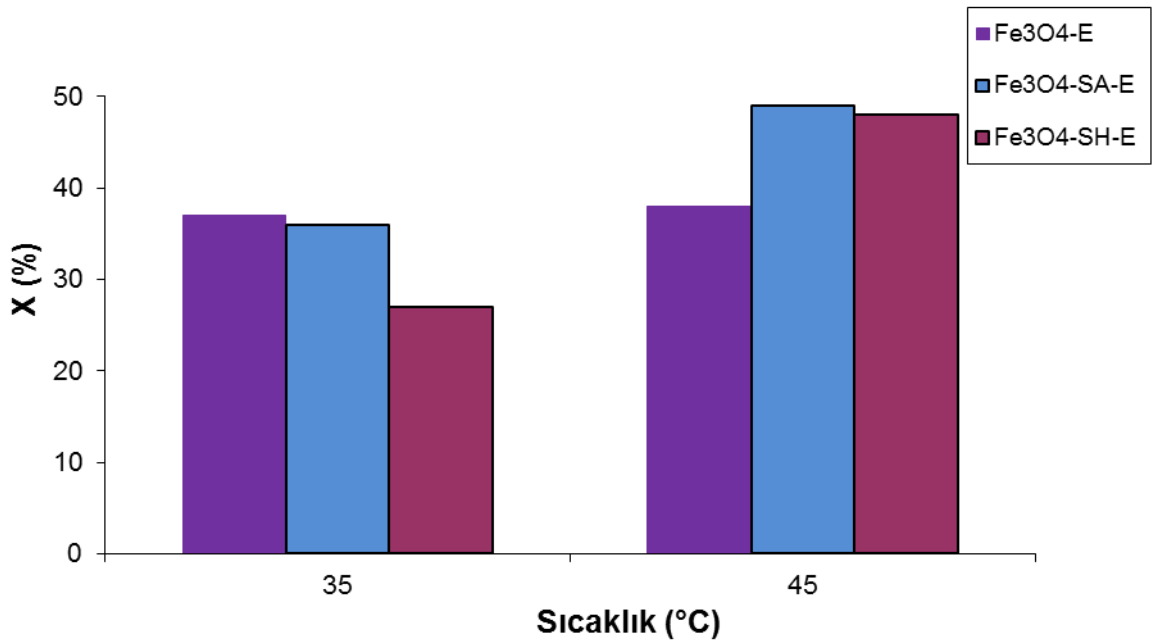
48 saatte alınmıştır. Bu değer **Fe_3O_4-SA-E** içindönüşüm % 49, E=270 ve **Fe_3O_4-SH-E** için dönüşüm % 48, E= 240 olarak bulundu. pH 7'de 45 ^{o}C de süre uzatıldığında (96 saat) dönüşüm ve enantiyoseçimliliğin düştüğü gözlendi.

4.2.1. Farklı sıcaklıklarda dönüşümler

(R,S)-flurbiprofen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizi pH=7 de farklı sıcaklıklarda (35^{o}C, 45^{o}C), farklı katkı maddeleri varlığında (**Fe_3O_4-SA-E** ve **Fe_3O_4-SH-E)** immobilize lipazlar ile inkübe edilerek belirlendi.

Optimum sıcaklık değerleri enantiyoseçimli hidroliz çalışmalarında en iyi dönüşüm ve enantiyoseçimlilik, her iki immobilize enzim için 45^{o}C sıcaklıkta

gözlenmiştir.

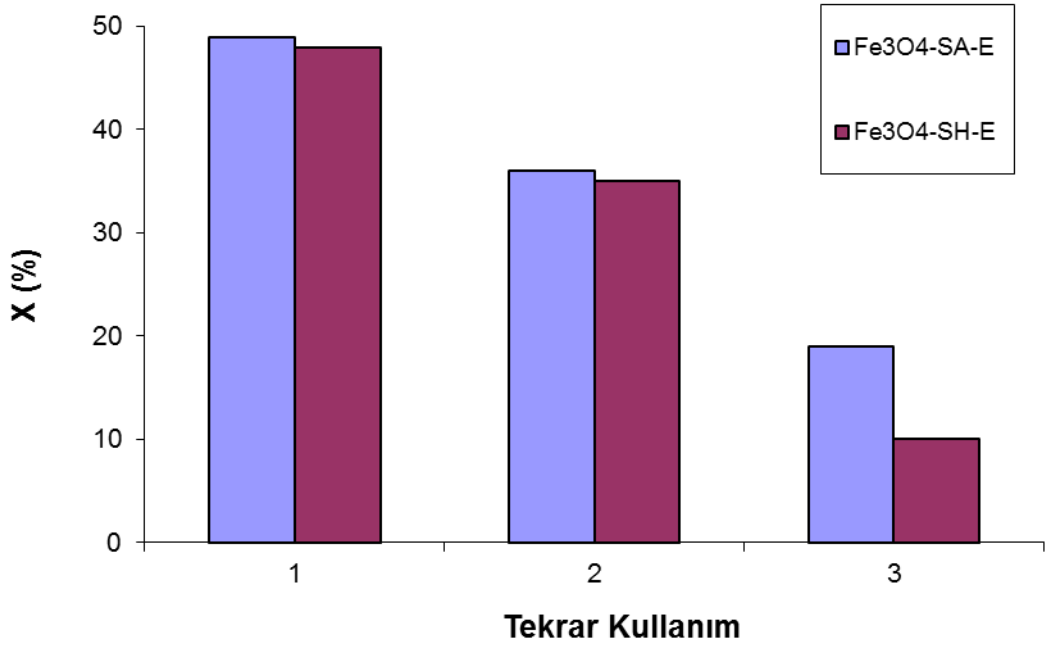


Şekil 4.29. İmmobilize enzimler için rasemik flurbiprofen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde dönüşüme karşı sıcaklığın etkisi

4.2.2. Tekrar kullanılabilirlik

İmmobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği endüstriyel uygulamaları açısından çok önemli bir durum haline gelmiştir. Böylelikle immobilize enzimin bu şekilde tekrar kullanılabilirliği serbest enzime göre daha cazip kılmaktadır. Dansil grubu taşıyan kaliks[4] aren türevlerinin (**Fe_3O_4-SA-E** ve **Fe_3O_4-SH-E**), immobilize edildiği lipazların tekrar kullanılabirlikleri test etmede 45^oC 'de optimum pH'larda denemeler yapıldı. Tekrar kullanılabilirlik, immobilize lipazların ilk kullanımdan sonra 3 kez 0.05M, pH 8.0 fosfat tamponu ile yıkanıp tekrar aktivitesine bakılarak yapıldı.

İmmobilize lipazların 3 kullanımdan sonra dönüşümü, **Fe_3O_4-SA-E** için pH=7'de % 19, **Fe_3O_4-SH-E** için pH=7'de % 10, olduğu görüldü.



Şekil 4.30. İmmobilize enzimlerin pH=7'de, 45^{o}C tekrar kullanımı

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- Bu çalışmada, dansil grupları taşıyan kaliks[4]aren türevi SH ve SA sentezlendi.
- Sentezlenen kaliks[4]aren türevlerinin yapıları spektroskopi teknikler kullanılarak aydınlatıldı.
- Sentezlenen kaliks[4]aren dansil türevleri Fe^{+2}/Fe^{+3} iyonlarının varlığında uygun koşullarda **Fe_3O_4-SA ve Fe_3O_4-SH** nanopartiküllere dönüştürüldükten sonra, sol-gel tutuklama tekniğine göre *Candida Rugosa lipaz* enzimi ile enkapsüle edildiler.
- İmmobilize nanopartiküllerin konfokal mikroskopuyla görüntüleri alındı.
- İmmobilize lipazların aktivite ve spesifik aktiviteleri tayin edildi.
- İmmobilize lipazlar rasemik flurbiprofen metil esterinin

enantiyosecçimli hidroliz tepkimelerinde kullandılar.

- HPLC tekniği kullanılarak % dönüşüm (X) ve enantiyoseçimliliği (E) değerleri hesaplandı.
- İmmobilize lipazların optimum pH ve sıcaklık araştırmaları yapıldı.
- Optimum pH ve sıcaklıklarda yapılan İmmobilize lipazların tekrar kullanılabilirlikleri araştırıldı.
- Bu çalışmada immobilize enzimler (**Fe_3O_4-SA-E ve Fe_3O_4-SH-E)** pH=7 ve 45 ^{O}C'de, 48 saat reaksiyon süresinde en yüksek dönüşüm ve enantiyoseçimliliği gösterdiği anlaşıldı.

6. KAYNAKLAR

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

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

Aksoy, A. ve Öztürk, N., 2011, Supplier selection and performance evaluation in just-in-time production environments, *Expert Systems with Applications*, 38 (5), 6351-6359.

Aktaş, M., 2015, L-prolin grubu taşıyan kaliks [4] aren türevlerinin sentezi ve organokatalizör olarak enantiyoseçici aldol tepkimelerinde kullanılması, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.

Alekseeva, G., Vedernikov, M., Gurieva, E., Prokof'eva, L. ve Ravich, Y. I., 2000, Hole concentration and thermoelectric figure of merit for Pb 1− x Sn x Te: Te solid solutions, *Semiconductors*, 34 (8), 897-901.

Ammer, J. J., 1998, Peer evaluation model for enhancing writing performance of students with learning disabilities, *Reading & Writing Quarterly*, 14 (3), 263-282.

Annunziato, L., Amoroso, S., Pannaccione, A., Cataldi, M., Pignataro, G., D'Alessio, A., Sirabella, R., Secondo, A., Sibaud, L. ve Di Renzo, G., 2003, Apoptosis induced in neuronal cells by oxidative stress: role played by caspases and intracellular calcium ions, *Toxicology letters*, 139 (2), 125-133.

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

Bakunina, I. Y., Shevchenko, L., Nedashkovskaya, O., Shevchenko, N., Alekseeva, S., Mikhailov, V. ve Zvyagintseva, T., 2000, Screening of marine bacteria for fucoidanases, *Microbiology*, 69 (3), 303-308.

Benjamin, S. ve Pandey, A., 1998, Candida rugosa lipases: molecular biology and versatility in biotechnology, *Yeast*, 14 (12), 1069-1087.

Benson, B. F. ve Rosa, J. D., 2000, The Status of Pending Air Carrier Litigation, *J. Air L. & Com.*, 66, 1367.

Berger, C., Song, Z., Li, X., Wu, X., Brown, N., Naud, C., Mayou, D., Li, T., Hass, J. ve Marchenkov, A. N., 2006, Electronic confinement and coherence in patterned epitaxial graphene, *Science*, 312 (5777), 1191-1196.

Bezbradica, J. S., Gordy, L. E., Stanic, A. K., Dragovic, S., Hill, T., Hawiger, J., Unutmaz, D., Van Kaer, L. ve Joyce, S., 2006, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor regulates effector differentiation of invariant natural killer T cells during thymic ontogeny, *Immunity*, 25 (3), 487-497.

Böhmer, V., Harrowfield, J. ve Vicens, J., 1991, Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, *The Netherlands*.

Bracale, A., Spalletti-Cernia, D., Mastronicola, M., Castaldi, F., Mannucci, R., Nitsch, L. ve D'ALESSIO, G., 2002, Essential stations in the intracellular pathway of cytotoxic bovine seminal ribonuclease, *Biochemical Journal*, 362 (3), 553-560.

Bradford, M. M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical biochemistry*, 72 (1-2), 248-254.

Brinker, C. J. ve Scherer, G. W., 1990, Sol-gel sciences, *The Processing and the Chemistry of Sol-Gel Processing*.

Carey, L. A., Perou, C. M., Livasy, C. A., Dressler, L. G., Cowan, D., Conway, K., Karaca, G., Troester, M. A., Tse, C. K. ve Edmiston, S., 2006, Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study, *Jama*, 295 (21), 2492-2502.

Chou, T.-C., 2006, Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies, *Pharmacological reviews*, 58 (3), 621-681.

Chrisstoffels, L. A., de Jong, F., Reinhoudt, D. N., Sivelli, S., Gazzola, L., Casnati, A. ve Ungaro, R., 1999, Facilitated transport of hydrophilic salts by mixtures of anion and cation carriers and by ditopic carriers, *Journal of the American Chemical Society*, 121 (43), 10142-10151.

Dhawan, B. ve Gutsche, C. D., 1983, Calixarenes. 10. oxacalixarenes, *The Journal of Organic Chemistry*, 48 (9), 1536-1539.

Dhawan, B., Chen, S. I. ve Gutsche, C. D., 1987, Calixarenes, 19. Studies of the formation of calixarenes via condensation of p- alkylphenols and formaldehyde, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 188 (5), 921-950.

Doerfler, A., Wanke, I., Egelhof, T., Dietrich, U., Asgari, S., Stolke, D. ve Forsting, M., 2001, Aneurysmal rupture during embolization with Guglielmi detachable coils: causes, management, and outcome, *American Journal of Neuroradiology*, 22 (10), 1825-1832.

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.

Dündar, P. E., Özmen, D., Öztürk, B., Haspolat, G., Akyıldız, F., Çoban, S. ve Çakıroğlu, G., 2006, The knowledge and attitudes of breast self-examination and mammography in a group of women in a rural area in western Turkey, *BMC cancer*, 6 (1), 43.

Eberhart, R. ve Kennedy, J., 1995, A new optimizer using particle swarm theory, *Micro Machine and Human Science, 1995. MHS'95., Proceedings of the Sixth International Symposium on*, 39-43.

Erdemir, S. ve 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 (4), 1240-1246.

Erdemir, S. ve Yilmaz, M., 2011, Preparation and chromatographic performance of calix [4] crown- 5 macrocycle- bonded silica stationary phase, *Journal of separation science*, 34 (4), 393-401.

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

Fan, R.-E., Chang, K.-W., Hsieh, C.-J., Wang, X.-R. ve Lin, C.-J., 2008, LIBLINEAR: A library for large linear classification, *Journal of machine learning research*, 9 (Aug), 1871-1874.

Fuentes, M., Mateo, C., Rodriguez, A., Casqueiro, M., Tercero, J. C., Riese, H. H., Fernández-Lafuente, R. ve Guisán, J. M., 2006, Detecting minimal traces of DNA using DNA covalently attached to superparamagnetic

nanoparticles and direct PCR-ELISA, *Biosensors and Bioelectronics*, 21 (8), 1574-1580.

Gebhardt, K., Bender, R., Bower, G., Dressler, A., Faber, S., Filippenko, A. V., Green, R., Grillmair, C., Ho, L. C. ve Kormendy, J., 2000, A relationship between nuclear black hole mass and galaxy velocity dispersion, *The Astrophysical Journal Letters*, 539 (1), L13.

Giardine, B., Riemer, C., Hardison, R. C., Burhans, R., Elnitski, L., Shah, P., Zhang, Y., Blankenberg, D., Albert, I. ve Taylor, J., 2005, Galaxy: a platform for interactive large-scale genome analysis, *Genome research*, 15 (10), 1451-1455.

Guduru, R., Darling, K., Scattergood, R., Koch, C., Murty, K., Bakkal, M. ve Shih, A., 2006, Shear punch tests for a bulk metallic glass, *Intermetallics*, 14 (12), 1411-1416.

Gutsche, C. D. ve Muthukrishnan, R., 1978, Calixarenes. 1. Analysis of the product mixtures produced by the base-catalyzed condensation of formaldehyde with para-substituted phenols, *The Journal of Organic Chemistry*, 43 (25), 4905-4906.

Gutsche, C. D., Muthukrishnan, R. ve No, K. H., 1979, Calixarenes. II. The isolation and characterization of the calix [4] arene and the bishomooxacalix [4] arene from A pt-butylphenol-formaldehyde condensation product, *Tetrahedron Letters*, 20 (24), 2213-2216.

Gutsche, C. D., Dhawan, B., No, K. H. ve Muthukrishnan, R., 1981, Calixarenes. 4. The synthesis, characterization, and properties of the calixarenes from p-tert-butylphenol, *Journal of the American Chemical Society*, 103 (13), 3782-3792.

Gutsche, C. D., Rogers, J. S., Stewart, D. ve See, K.-A., 1990, Calixarenes: paradoxes and paradigms in molecular baskets, *Pure and applied chemistry*, 62 (3), 485-491.

Gutsche, C. D., 1991, Single Step Synthesis and Properties of Calixarenes, In: Calixarenes: A Versatile Class of Macrocyclic Compounds, Eds: Springer, p. 3-37.

Gutsche, C. D., 2008, Calixarenes: an introduction, Royal Society of Chemistry, p.

Gutsche, G. J., 1988, A History of Russian Literature of the Romantic Period - Brown,We, *Russian Review*, 47 (3), 350-352.

Gutsche, T., Maruyama, M. ve Faessler, A., 1989, Proton-antiproton annihilation into three mesons in flight in the 3P0 model with a planar quark diagram topology, *Nuclear Physics A*, 503 (3-4), 737-765.

Gutsche, W., 1989, History of the Sozialistische-Einheits-Partei-Deutschlands, Vol 1, from the Beginnings to 1917 - German - Laschitza,A, *Beitrage Zur Geschichte Der Arbeiterbewegung*, 31 (2), 264-267.

Hench, L. L. ve West, J. K., 1990, The sol-gel process, *Chemical reviews*, 90 (1), 33-72.

Hernández, J. H., del Pozo, J. T., Canelo, P. M., Puebla, A. R., Tejo, S. P. ve Marcos, J. S., 2004, Incidencia del cáncer de pulmón en la provincia de Ávila. Año 2002 y tendencias en una década, *Archivos de Bronconeumología*, 40 (7), 304-310.

Hlady, V., Reinecke, D. ve Andrade, J., 1986, Fluorescence of adsorbed protein layers: I. Quantitation of total internal reflection fluorescence, *Journal of colloid and interface science*, 111 (2), 555-569.

Kang, X., Wang, J., Wu, H., Aksay, I. A., Liu, J. ve Lin, Y., 2009, Glucose oxidase–graphene–chitosan modified electrode for direct electrochemistry and glucose sensing, *Biosensors and Bioelectronics*, 25 (4), 901-905.

Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G. ve Durbin, R., 2009, The sequence alignment/map format and SAMtools, *Bioinformatics*, 25 (16), 2078-2079.

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.

Oršolić, N., Knežević, A. H., Šver, L., Terzić, S. ve Bašić, I., 2004, Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds, *Journal of Ethnopharmacology*, 94 (2), 307-315.

Ozyilmaz, E. ve 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.

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

P Anderson, R., Dudík, M., Ferrier, S., Guisan, A., J Hijmans, R., Huettmann, F., R Leathwick, J., Lehmann, A., Li, J. ve G Lohmann, L., 2006, Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data, *Ecography*, 29 (2), 129-151.

Peiris, J., Chu, C., Cheng, V., Chan, K., Hung, I., Poon, L., Law, K., Tang, B., Hon, T. ve Chan, C., 2003, Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study, *The Lancet*, 361 (9371), 1767-1772.

Reetz, M. T., Sell, T., Meiswinkel, A. ve Mehler, G., 2003, A New Principle in Combinatorial Asymmetric Transition- Metal Catalysis: Mixtures of Chiral Monodentate P Ligands, *Angewandte Chemie International Edition*, 42 (7), 790-793.

Reetz, M. T., Carballeira, J. D. ve Vogel, A., 2006, Iterative saturation mutagenesis on the basis of B factors as a strategy for increasing protein thermostability, *Angewandte Chemie International Edition*, 45 (46), 7745-7751.

Rodrigues, U., Aguirre, M., Facklam, R. ve Collins, M., 1991, Specific and intraspecific molecular typing of lactococci based on polymorphism of DNA encoding rRNA, *Journal of Applied Microbiology*, 71 (6), 509-516.

Sahin, M., Kocak, N., Sayin, U. ve Yilmaz, M., 2012, ESR Characterization of Two Oxovanadium (IV) Schiff Base Complexes Derived from Tris (2-aminoethyl) amine, *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 49 (8), 603-610.

Sahin, O. ve Yilmaz, M., 2011, Synthesis and fluorescence sensing properties of novel pyrene-armed calix [4] arene derivatives, *Tetrahedron*, 67 (19), 3501-3508.

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

Salgado, H., Gama-Castro, S., Peralta-Gil, M., Díaz-Peredo, E., Sánchez-Solano, F., Santos-Zavaleta, A., Martínez-Flores, I., Jiménez-Jacinto, V., Bonavides-Martínez, C. ve Segura-Salazar, J., 2006, RegulonDB (version 5.0): Escherichia coli K-12 transcriptional regulatory network, operon organization, and growth conditions, *Nucleic acids research*, 34 (suppl 1), D394-D397.

Sayin, C., 2010, Engine performance and exhaust gas emissions of methanol and ethanol–diesel blends, *Fuel*, 89 (11), 3410-3415.

Sayin, S., Akoz, E. ve Yilmaz, M., 2014, Enhanced catalysis and enantioselective resolution of racemic naproxen methyl ester by lipase encapsulated within iron oxide nanoparticles coated with calix [8] arene valeric acid complexes, *Organic & biomolecular chemistry*, 12 (34), 6634-6642.

Stewart, D. R. ve Gutsche, C. D., 1999, Isolation, Characterization, and Conformational Characteristics of p-tert-Butylcalix [9− 20] arenes1, *Journal of the American Chemical Society*, 121 (17), 4136-4146.

Taschner, M. J., Peddada, L., Cyr, P., Chen, Q.-Z. ve Black, D. J., 1992, The Enzymatic Baeyer-Villiger Oxidation, In: Microbial Reagents in Organic Synthesis, Eds: Springer, p. 347-360.

Telefoncu, A., 1997, Enzimoloji: Uslan, *HA, Enzim Kinetiği, Ege Üniversitesi yayınları, İzmir*.

Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M. ve Polissiou, M., 2005, Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of Salvia tomentosa Miller (Lamiaceae), *Food Chemistry*, 90 (3), 333-340.

Vural, U., Durmaz, M. ve Sirit, A., 2016, A novel calix [4] arene-based bifunctional squaramide organocatalyst for enantioselective Michael addition of acetylacetone to nitroolefins, *Organic Chemistry Frontiers*, 3 (6), 730-736.

Wang, L., Yan, R., Huo, Z., Wang, L., Zeng, J., Bao, J., Wang, X., Peng, Q. ve Li, Y., 2005, Fluorescence resonant energy transfer biosensor based on upconversion- luminescent nanoparticles, *Angewandte Chemie International Edition*, 44 (37), 6054-6057.

Wu, L. L., Chiou, C.-C., Chang, P.-Y. ve Wu, J. T., 2004, Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics, *Clinica Chimica Acta*, 339 (1), 1-9.

Yildiz, H., Ozyilmaz, E., Bhatti, A. A. ve Yilmaz, M., 2017, Enantioselective resolution of racemic flurbiprofen methyl ester by lipase encapsulated mercapto calix [4] arenes capped Fe3O4 nanoparticles, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 1-8.

Yıldız, H., 2015, Tiyol grubu taşıyan kaliks (4) arenlerin sentezi ve lipaz katalizli enantiyoseçimli tepkimelerde kullanılması, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.

Yilmaz, E., Can, K., Sezgin, M. ve Yilmaz, M., 2011a, Immobilization of Candida rugosa lipase on glass beads for enantioselective hydrolysis of racemic Naproxen methyl ester, *Bioresource technology*, 102 (2), 499-506.

Yilmaz, E., Sezgin, M. ve Yilmaz, M., 2011b, Immobilization of Candida rugosa lipase on magnetic sol–gel composite supports for enzymatic resolution of (R, S)-Naproxen methyl ester, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 69 (1), 35-41.

Zinke, A. ve Ziegler, E., 1944, Zur Kenntnis des Härtungsprozesses von Phenol- Formaldehyd- Harzen, X. Mitteilung, *European Journal of Inorganic Chemistry*, 77 (3- 4), 264-272.

7. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	**:**	Sevilay ÇETİNGÜNEY
Uyruğu	**:**	T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi	**:**	Konya 15.01.1991
Telefon	**:**	05536054817
Faks	**:**	
e-mail	**:**	sevilaycetinguney@gmail.com

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	Selçuklu Atatürk Lisesi / KONYA	2009
Üniversite	:	Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Selçuklu/KONYA	2014
Yüksek Lisans	:	Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsünde Halen Öğrenci Bulunmaktadır.	
Doktora	:		

YABANCI DİLLER

İngilizce