

**İNVERTAZ VE OKSİDOREDÜKTAZ TİPİ ENZİM  
KULLANILARAK OLUŞTURULAN POLİMER  
BAZLI ENZİM ELEKTROTLARI İLE ANALİTİK  
TAYİN UYGULAMALARI**

**2019  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA**

**Elif DOĞAN**

**İNVERTAZ VE OKSİDOREDÜKTAZ TİPİ ENZİM KULLANILARAK  
OLUŞTURULAN POLİMER BAZLI ENZİM ELEKTROTLARI İLE  
ANALİTİK TAYİN UYGULAMALARI**

**Elif DOĞAN**

**Karabük Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalında  
Yüksek Lisans Tezi  
Olarak Hazırlanmıştır**

**KARABÜK  
Haziran 2019**

Elif DOĞAN tarafından hazırlanan “İNVERTAZ VE OKSİDOREDÜKTAZ TİPİ ENZİM KULLANILARAK OLUŞTURULAN POLİMER BAZLI ENZİM ELEKTROTLARI İLE ANALİTİK TAYİN UYGULAMALARI” başlıklı bu tezin YÜKSEK LİSANS Tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Dr. Öğr. Üyesi A. Elif BÖYÜKBAYRAM  
Tez Danışmanı, Kimya Anabilim Dalı

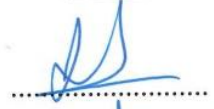
  
.....

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 27/06/2019

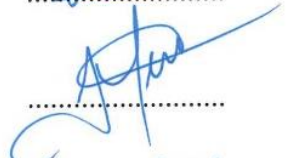
Ünvanı, Adı SOYADI (Kurumu)

İmzası

Başkan : Doç. Dr. Hakan Tahtacı (KBÜ)

  
.....

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Jülide YENER DİBEK (BEÜ)

  
.....

Üye : Dr. Öğr. Üyesi A. Elif BÖYÜKBAYRAM (KBÜ)

  
.....

...../...../2019

KBÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu, bu tez ile, Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Filiz ERSÖZ  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdür V.

  
.....



*“Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim.”*

Elif DOĞAN

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### İNVERTAZ VE OKSİDOREDÜKTAZ TİPİ ENZİM KULLANILARAK OLUŞTURULAN POLİMER BAZLI ENZİM ELEKTROTLARI İLE ANALİTİK TAYİN UYGULAMALARI

Elif DOĞAN

Karabük Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı:

Dr. Öğr. Üyesi A. Elif BÖYÜKBAYRAM

Haziran 2019, 71 sayfa

Bu çalışmada yeni bir elektrot malzemesi olarak karbon fiber kullanıldı. Politiyofen ve polipirolden oluşan kompozit malzemenin PTh-PPy kaplanmasıyla literatürde olmayan yeni enzim elektrotları oluşturuldu. İnvvertaz ve polifenol oksidaz enzimleri elektrot malzemesi olarak karbon fiberin kullanıldığı elektrotlara tutuklanarak karbon fiber enzim elektrotları hazırlandı. Bu elektrotlar laboratuvarında hazırlanan karbon fiber elektrotlar üzerine elektrokimyasal olarak PTh-PPy kompozitinin polimerizasyonu sırasında enzimin tutuklanmasıyla oluşturuldu. Tutuklanan enzimin kinetik parametreleri,  $V_{max}$  (maksimum reaksiyon hızı) ve  $K_m$  (substratın enzim ilgisi) belirlendi. Bu değerler invvertaz enzimi için sırasıyla  $2,471 \pm 0,150$   $\mu\text{mol/dak.}$  elektrot ve  $30,60 \pm 5,30$  mM olarak, polifenol oksidaz enzimi için  $0.056 \pm 0.012$   $\mu\text{mol/dak.}$  elektrot ve  $842,00 \pm 37,50$  mM olarak belirlendi. Reaksiyon koşullarının enzim aktivitesine etkisi incelendi. Tutuklanmış invvertazın optimum pH'ı ve sıcaklığı,

pH 5,0 ve 60°C olarak, polifenol oksidazın ise pH 8,0 olarak bulundu. Enzim elektrotlarının çalışma kararlılığı ve raf ömrü saptandı. Tutuklanmış invertazın ve polifenol oksidazın aynı gün içinde yapılan ardışık ölçümlerden sonra aktivitelerini koruduğu görüldü. Raf ömrü çalışmasında, invertaz elektrodu için 25 gün sonra aktivite %60 olarak gözlemlendi. Öte yandan bu elektrodun 2. ve 15. günleri arasında  $95,66 \pm 2,92$  bağıl aktivite değeriyle kullanılabilmesi saptandı. Polifenol oksidaz elektrotları için 45 gün raf ömrü ölçümleri yapıldı. Aktivitenin 5. günden sonra arttığı ve 45. güne kadar bu aktivitenin korunduğu görüldü. Elektrodun bu aralıkta  $87,96 \pm 6,12$  bağıl aktivite ile kullanılabilmesi tespit edildi. Polifenol oksidaz enzim elektrotları gerçek örneklerde kullanıldı ve siyah çayın sıcak suda ekstraksiyonuyla elde edilen örneklerde polifenolik madde analizi yapıldı. Gözlenebilirlik sınırı (LOD) polifenol oksidaz tutuklanmış elektrotlar için 0,037 mg/mL olarak tespit edildi. Bu analizler Folin-Ciocalteu yöntemiyle teyit edildi.

**Anahtar Sözcükler** : Karbon fiber elektrot, iletken polimer, pirol, tiyofen, kompozit, elektrokimyasal polimerizasyon, enzim elektrodu, enzim tutuklaması, invertaz, polifenol oksidaz

**Bilim Kodu** : 201.1.041

## **ABSTRACT**

**M. Sc. Thesis**

### **ANALYTICAL APPLICATIONS WITH POLYMER BASED ENZYME ELECTRODES FABRICATED BY INVERTASE AND OXIDOREDUCTASE TYPE ENZYMES**

**Elif DOĞAN**

**Karabük University**

**Graduate School of Natural and Applied Sciences**

**Department of Chemistry**

**Thesis Advisor:**

**Dr. A. Elif BÖYÜKBAYRAM**

**June 2019, 71 pages**

In this study, carbon fiber was used, as a new electrode material. New enzyme electrodes, which have not been mentioned in literature before, were fabricated by coating composite material of polythiophene and polypyrrole PTh-PPy. Carbon fiber enzyme electrodes were prepared by immobilization of invertase and polyphenol oxidase enzymes on the electrodes of carbon fiber. The electrodes were obtained by immobilization of enzyme during electrochemical polymerization of PTh-PPy composite onto laboratory-made carbon fiber electrodes. Kinetic parameters of immobilized enzyme,  $V_{max}$  (maximum reaction rate) and  $K_m$  (substrate affinity) were determined.  $V_{max}$  and  $K_m$  values for invertase were  $2.471 \pm 0.150$   $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{electrode}$  and  $30.60 \pm 5.30$  mM, for polyphenol oxidase  $0.056 \pm 0.012$   $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{electrode}$  and  $842.00 \pm 37.50$  mM respectively. It was examined the effect of conditions on activity of immobilized enzyme. Optimum pH and temperature of immobilized invertase were

found as pH 5.0 and 60°C, for polyphenol oxidase it was determined as pH 8.0. Operational stability and shelf life of enzyme electrodes were investigated. It was observed that both electrodes of immobilized invertase and polyphenol oxidase kept their activity after consecutive activity measurements in the same day. In shelf life study, invertase electrode activity was measured as %60 after a 25-day period. It was found that this enzyme electrode can be used between the day of 2 and 15 with relative activity of  $95.66 \pm 2.92$  %. For polyphenol oxidase electrode activity measurements were performed for a 45-day period. It was seen that the electrode activity increased after the day of 5 and it was kept until the day of 45. Thus this electrode can be utilized between the day of 6 and 45 with relative activity of  $87.96 \pm 6.12$  %. Polyphenol oxidase enzyme electrodes were used for real samples. It was performed analysis of polyphenolics in the samples that were obtained by hot water extraction of black tea. Detection limit (LOD) was obtained as 0.037 mg/mL for polyphenol oxidase electrodes. The results were confirmed by Folin-Ciocalteu method of analysis.

**Key Words :** Carbon fiber electrode, conducting polymer, electrochemical polymerization, pyrrole, thiophene, composite, enzyme electrode, enzyme immobilization, invertase, polyphenol oxidase

**Science Code :** 201.1.041



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla yakın desteğini esirgemeyen, bu çalışmanın yürütülmesinde bana yön veren danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi A. Elif BÖYÜKBAYRAM'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmanın tamamlanmasında sağladıkları olanaklarla bana yardımcı olan sayın Prof. Dr. Şadi Şen'e ve Dr. Öğr. Üyesi Jülide YENER DİBEK'e tüm içtenliğimle saygılarımı sunarım.

Yüksek Lisans eğitimim sayesinde tanıdığım çok kıymetli arkadaşlarım, Duygu KAPTAN, Sevda AYDAR ve Ayşe ZENGİN'e her türlü destek ve yardımlarından dolayı sonsuz sevgilerimi sunarım.

Karabük Üniversitesi'ne Bilimsel Araştırma Projeleri kapsamında sağladığı destekten dolayı teşekkür ederim. (Proje No: KBÜBAP-13/2-YL-034)

Hayatım boyunca ilgi, destek ve sevgilerini esirgemeyip benim için her türlü fedakârlıkta bulunan ve yanımda olan canım aileme bugünlere gelmemi sağladıkları için tüm kalbimle teşekkür ederim.

Ve sevgili eşim Recep DOĞAN'a hayatımın her anında olduğu gibi tez çalışmam boyunca da bana verdiği destek, moral ve güç için, başarabileceğime her zaman beni inandırdığı ve sabırla beklediği için sonsuz teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL.....	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER .....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xiv
BÖLÜM 1 .....	1
GİRİŞ .....	1
BÖLÜM 2 .....	3
KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. İLETKEN POLİMERLER .....	3
2.1.1. İletken Polimerlerin Sentezi .....	5
2.1.1.1. Kimyasal Sentez.....	5
2.1.1.2. Elektrokimyasal Sentez.....	5
2.1.2. İletken Polimer Tipleri.....	6
2.1.3. İletken Polimerlerde İletkenlik Mekanizması ve Band Teorisi .....	6
2.1.4. Elektrokimyasal Polimerizasyon .....	10
2.1.4.1. Elektrolitik Koşullar.....	12
2.1.4.2. Elektrokimyasal Polimerizasyon Mekanizması .....	12
2.1.5. Pirool ve Tiyofen .....	15
2.1.5.1. PTh–PPy Kompoziti .....	16
2.2. ENZİMLER.....	17
2.2.1. Enzimlerin Yapısı .....	17
2.2.2. Enzimlerin Aktivitesi.....	19
2.2.3. Enzim Tepkimelerinin Kinetiği .....	21
2.2.4. Enzim Tutuklaması .....	26
2.2.4.1. Taşıyıcıya Bağlanma Metodu .....	26

	<b><u>Sayfa</u></b>
2.2.4.2. Çapraz Bağlama .....	28
2.2.4.3. Hapsetme .....	28
2.2.4.4. Tutuklamanın Yararlılığı .....	29
2.2.4.5. Tutuklamanın Enzim Aktivitesine Etkisi .....	29
2.2.5. İnvvertaz .....	29
2.2.6. Polifenol Oksidaz .....	31
2.2.6.1. PPO Reaksiyon Mekanizması .....	33
2.2.6.2. PPO'nun Kullanım Alanları ve Polifenollerin Tayininin Önemi .....	34
2.3. KARBON FİBER .....	35
2.3.1. Karbon Fiber Enzim Elektrotları .....	36
2.4. ÖRNEK ANALİZİ .....	36
<b>BÖLÜM 3 .....</b>	<b>38</b>
<b>DENEYSEL ÇALIŞMALAR .....</b>	<b>38</b>
<b>3.1. KİMYASAL MALZEMELER VE CİHAZLAR .....</b>	<b>38</b>
3.1.1. Kimyasal Malzemeler .....	38
3.1.2. Nelson Reaktifi .....	38
3.1.3. Arsenomolibdat Reaktifi .....	39
3.1.4. Potansiyometre .....	39
3.1.5. UV – VIS Spektrofotometre .....	39
3.1.6. SEM .....	39
3.1.7. pH metre .....	40
3.1.8. Manyetik Isıtıcı Karıştırıcı .....	40
3.1.9. Vorteks Tüp Karıştırıcı .....	40
3.1.10. Çalkalayıcı Su Banyosu .....	40
<b>3.2. KULLANILAN METOTLAR .....</b>	<b>41</b>
3.2.1. Somogyi-Nelson Yöntemi .....	41
3.2.2. Besthorn's Hydrazone Yöntemi .....	41
3.2.3. Elektrokimyasal Polimer Sentezi .....	42
3.2.4. Kompozit Matrise Enzim Tutuklanması .....	43
3.2.5. Elektrotların (CF) Hazırlanması .....	43
3.2.6. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi .....	44

	<b><u>Sayfa</u></b>
3.2.7. Kinetik Parametrelerin Tayini .....	45
3.2.8. Optimum pH'ın Belirlenmesi .....	45
3.2.9. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi .....	45
3.2.10. Kararlılığın Belirlenmesi .....	46
3.2.11. Raf Ömrünün Belirlenmesi.....	46
3.3. ÇAY ÖRNEKLERİNDE FENOLİK MADDE TAYİNİ .....	46
3.3.1. CF/PTh–PPy/PPO Enzim Elektroduyla Analiz .....	46
3.3.2. Folin-Ciocalteu Yöntemiyle Analiz .....	47
BÖLÜM 4 .....	48
DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA.....	48
4.1. ELEKTROPOLİMERİZASYON ve SEM ANALİZLERİ.....	48
4.2. ENZİM ELEKTROTLARININ AKTİVİTE ÖLÇÜMLERİ VE KİNETİK KARAKTERİZASYONU .....	50
4.2.1. İnvertaz Enzim Elektrotları.....	51
4.2.2. Polifenol Oksidaz Enzim Elektrotları.....	53
4.3. ENZİM ELEKTROTLARININ OPTİMİZASYONU .....	54
4.3.1. CF/PTh–PPy/INV Elektrot Aktivitesine pH Etkisi .....	54
4.3.2. CF/PTh–PPy/INV Elektrot Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi.....	55
4.3.3. CF/PTh–PPy/INV Elektrotlarının Çalışma Kararlılığı ve Raf Ömrü .....	56
4.3.4. CF/PTh–PPy/PPO Elektrot Aktivitesine pH Etkisi .....	57
4.3.5. CF/PTh–PPy/PPO Elektrotlarının Çalışma Kararlılığı ve Raf Ömrü.....	58
4.4. ÇAY ÖRNEKLERİNİN ANALİZ SONUÇLARI .....	59
4.4.1. CF/PTh–PPy/PPO Elektrodunun Kalibrasyon Grafiği.....	59
4.4.2. Örnek Ölçümleri .....	60
BÖLÜM 5 .....	64
SONUÇ .....	64
KAYNAKLAR .....	65
ÖZGEÇMİŞ .....	71

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 2.1. Biyosensörlerin yapısı.....	4
Şekil 2.2. Çok kullanılan bazı konjuge polimerler.....	6
Şekil 2.3. Bazı konjuge polimer sistemlerinde band oluşumu .....	7
Şekil 2.4. Band yapıları a) iletken, b) yarı iletken ve c) yalıtkanlar için. ....	7
Şekil 2.5. İletken polimerlerde doplama. ....	8
Şekil 2.6. PPy'ün polaron, bipolaron yapıları ve band diyagramı .....	9
Şekil 2.7. Poliasetilenin soliton, polaron ve bipolaron yapıları .....	10
Şekil 2.8. Elektrokimyasal polimer sentezi için 3 elektrotlu düzenek. ....	11
Şekil 2.9. Heterosiklik bileşiklerin elektropolimerizasyon mekanizması.....	13
Şekil 2.10. Dönüşümlü voltametri de akım potansiyel eğrisi. ....	14
Şekil 2.11. Py'ün oksidatif polimerizasyon ile PPy'e dönüşümü .....	15
Şekil 2.12. Enzimlerin anahtar-kilit modeli. ....	18
Şekil 2.13. Enzim ve substrat derişiminin tepkime hızına etkisi. ....	19
Şekil 2.14. Optimum pH ve sıcaklık. ....	20
Şekil 2.15. Enzim katalizli reaksiyonun aktivasyon enerji diyagramı .....	21
Şekil 2.16. Substrat derişimine karşı reaksiyon hızı grafiği.....	22
Şekil 2.17 Lineweaver-Burk grafiği.....	26
Şekil 2.18. Enzim tutuklama yöntemleri.....	26
Şekil 2.19. Enzim tutuklama yöntemleri: a) hapsedme b) çapraz bağlanma .....	28
Şekil 2.20. Sükrozun hidroliz reaksiyonu. ....	30
Şekil 2.21. Tirozinaz enziminin katalizlediği reaksiyonlar: a) Krezolaz aktivite, b) Katekolaz aktivite. ....	31
Şekil 2.22. PPO enziminin reaksiyon mekanizması.....	33
Şekil 3.1. Somogyi-Nelson yönteminin işlem basamakları [20].....	41
Şekil 3.2. Besthorn's Hydrazone yönteminin işlem basamakları [20].....	42
Şekil 3.3. Polimerizasyonun gerçekleştirildiği elektrokimyasal hücre. ....	43
Şekil 3.4. Karbon fiber enzim elektrodu. ....	44
Şekil 3.5. Folin-Ciocalteu metodunun işlem basamakları [20].....	47

## **Sayfa**

Şekil 4.1. Politiyofenin polimerleşme voltamogramı. ....	49
Şekil 4.2. Polipirolün polimerleşme voltamogramı. ....	49
Şekil 4.3. Kaplama öncesi ve sonrası karbon fiber SEM görüntüleri. ....	50
Şekil 4.4. CF/PTh-PPy/INV elektrodunun Michaelis- Menten grafiği. ....	51
Şekil 4.5. CF/PTh-PPy/INV elektrodunun Lineweaver-Burk grafiği. ....	51
Şekil 4.6. CF/PTh-PPy/PPO elektrodunun Michaelis-Menten grafiği.....	53
Şekil 4.7. CF/PTh-PPy/PPO elektrodunun Lineweaver-Burk grafiği.....	53
Şekil 4.8. CF/PTh-PPy/INV elektrot aktivitesine pH etkisi.....	55
Şekil 4.9. CF/PTh-PPy/INV elektrot aktivitesine sıcaklık etkisi. ....	56
Şekil 4.10. CF/PTh-PPy/INV elektrodunun çalışma kararlılığı. ....	56
Şekil 4.11. CF/PTh-PPy/INV elektrodunun raf ömrü. ....	57
Şekil 4.12. CF/PTh-PPy/PPO elektrot aktivitesine pH etkisi.....	58
Şekil 4.13. CF/PTh-PPy/PPO elektrodunun çalışma kararlılığı.....	59
Şekil 4.14. CF/PTh-PPy/PPO elektrodunun raf ömrü. ....	59
Şekil 4.15. CF/PTh-PPy/PPO elektrodunun kalibrasyon grafiği.....	60
Şekil 4.16. CF/PTh-PPy/PPO elektrodu ile yapılan analiz sonuçları.....	61
Şekil 4.17. Folin-Ciocalteu metoduyla hazırlanan kalibrasyon grafiği.....	62
Şekil 4.18. Folin-Ciocalteu metoduyla yapılan analiz sonuçları.....	63

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b><u>Sayfa</u></b>
Çizelge 4.1. CF/PTh–PPy/INV elektrodunun kinetik parametreleri.....	52
Çizelge 4.2. CF/PTh–PPy/PPO elektrodunun kinetik parametreleri. ....	54
Çizelge 4.3. Çay ekstraksiyon örneklerinde CF/PTh–PPy/PPO enzim elektroduyla mg/mL katekol eşdeğeri olarak bulunan total polifenolik madde miktarları.....	60
Çizelge 4.4. Folin-Ciocalteu metoduyla çay ekstraksiyon örneklerinde mg/mL katekol eşdeğeri olarak bulunan total polifenolik madde miktarları. ...	62

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Py	:	Pirol
Th	:	Tiyofen
PPy	:	Polipirol
PTh	:	Politiyofen
CF	:	Karbon fiber
INV	:	İnvertaz enzimi
PPO	:	Polifenol oksidaz enzimi
Pt/PPy/INV	:	Platin, polipirol, invertaz enzim elektrodu
CF/PPy/INV	:	Karbon fiber, polipirol, invertaz enzim elektrodu
CF/PPy/PPO	:	Karbon fiber, polipirol, polifenol oksidaz enzim elektrodu
PTh-PPy	:	Tiyofen ve pirol kompoziti
CF/PTh-PPy/INV	:	Karbon fiber, kompozit, invertaz enzim elektrodu
CF/PTh-PPy/PPO	:	Karbon fiber, kompozit, polifenol oksidaz enzim elektrodu
CV	:	Cyclic Voltamogram (Dönüşümlü Voltametri)
DB	:	Değerlik Bandı
İB	:	İletkenlik Bandı
PA	:	Poliasetilen
PAN	:	Poliakrilonitril
$K_m$	:	Michaelis-Menten sabiti
$V_{max}$	:	Maksimum reaksiyon hızı
LOD	:	Gözlenebilme sınırı (Limit of Detection)
mg	:	Miligram
mL	:	Mililitre
$\mu\text{m}$	:	Mikrometre
$\mu\text{L}$	:	Mikrolitre
$\mu\text{mol}$	:	Mikromol
nm	:	Nanometre



g	:	Gram
mg	:	Miligram
kDa	:	Kilodalton
sn	:	Saniye
V	:	Volt
Å	:	Angstrom
°C	:	Santigrat derece



## BÖLÜM 1

### GİRİŞ

Karbon malzemeler içinde karbon fiberler mikro ve nanoelektrot olarak ilgi çekmektedir. Karbon fiber elektrotlar ucuz olması ve geniş bir yelpazede yüzey modifikasyonlarına uygunluğu sebebiyle çok kullanışlı biyouyumlu mikro ve nano substratlardır. Diğer elektrotlara göre çok daha yüksek yüzey alanına sahiptir, aynı zamanda kimyasal olarak inerttir, ucuzdur ve biyouyumlu olmasıyla biyosensör uygulamaları için uygun bir elektrot malzemesidir. Bu avantajları karbon fiber elektrotların elektroanalitik uygulamalarda mikro ve nanoelektrot olarak geniş bir kullanım potansiyeline sahip olmasını sağlar. Karbon fiber elektrotların kullanım alanlarından biri enzimle modifiye edilerek enzim elektrotları oluşturulmasıdır. Enzim elektrodu, tutuklanmış olan enzimin aktivitesi sayesinde elektrokimyasal bir işlemin gerçekleştiği minyatür bir kimyasal transdüserdir. Enzimin buradaki rolü, belli bir substrat molekülüne olan biyolojik ilgisi nedeniyle seçiciliğin oluşturulmasıdır. Yani tutuklanan enzimle o enzimin substratlarının spesifik analizi mümkündür.

İnvertaz enzimi bilimsel araştırmalarda sık kullanılan bir model enzimdir. Hazırlanan enzim elektrotlarının veya biyosensörün performansı hakkında bilgi sahibi olmak amacıyla model enzim olarak kullanılır. Polifenol oksidaz enzimi ise polifenolik maddeleri oksitleyen bir enzimdir. Tutuklandığı biyosensör polifenolik maddelerin analizinde kullanılır. Polifenolik maddeler çeşitli endüstriyel kaynaklardan doğaya verilen ve çevre kirliliği yaratan zararlı maddeler olmaları sebebiyle çevre sularında yapılan polifenolik madde analizleri önemlidir. Bu analizler için ucuz, basit, hızlı ve kolay kullanılabilir pratik yöntemler üzerinde çalışılmaktadır. Bu yöntemlerden biri de halen geliştirilme çalışmaları devam eden enzim elektrotlarıyla analizdir.

Siyah bir toz olarak bilinen poliasetilen ilk sentezlenen iletken polimerdir. Hideki Shirakawa tarafından 1974'te ilk defa Ziegler-Natta katalizörü  $Ti(O-n-But)_4$  ile meta-

lik görünümlü gümüş renkli ama düşük iletkenliğe sahip trans poliasetilen elde edilmiştir. H. Shirakawa, A.J. Hegeer ve A.G. MacDiarmid, 1977 yılında bu poliasetilen filmleri halojen buharına tutarak yükseltgeyip, iletkenliğin  $10^5$  S/m düzeyine çıktığını ve  $10^9$  kat arttığını göstermişlerdir. Bu veri metallerin iletkenlik değerine yakındır ve en iyi yalıtkan materyallerden sayılan teflonun iletkenliğinden ( $10^{-18}$  S/cm) çok daha yüksektir. Shirakawa, Hegeer ve MacDiarmid 2000 yılında bu çalışmalarından dolayı Kimya Nobel ödülünü almışlardır. Bugün pozitif özellikleri sebebiyle iletken polimerler birçok alanda ve özellikle elektronik sanayinde yaygın olarak kullanılmaktadır [1-3].

Elektroaktif iletken polimerler pek çok elektrot malzemesine uygulanır. Yük taşıma özelliği ve biyouyumluluklarıyla biyoanaliz alanında yaygın olarak kullanılır ve bu çalışmada karbon fiber mikroelektrotlara kaplanmıştır. Enzim elektrotlarında kullanılmalarının sebebi aktif enzimi tutuklama kapasiteleridir. Bunun yanı sıra stabil yapıları nedeniyle enzim elektrodunun ömrünü uzatır, tekrarlanabilirliğini artırır ve hassasiyetini yükseltir. Bu avantajlarıyla iletken polimerler son zamanlarda oldukça ilgi çekmiş ve pek çok farklı malzemedeki elektrotun yüzeyine kaplama uygulamaları yapılmıştır. Bu kaplanan elektroaktif filmler enzim veya proteinlerin tutuklanması için kullanılır. Elektropolimerizasyon, polimerleştirme aşamasında enzimin yüzeye tutunmasının kolaylığı sebebiyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Enzim sensörü elde edilirken tutuklama esnasında enzimin herhangi bir fiziksel değişikliğe uğramadan direkt elektrot yüzeyine tutunması gerçekleştirilir [4, 5].

Politiyofen ve polipirol sahip oldukları sıradışı özellikleriyle iletken polimerler içinde ayrıcalıklı bir yere sahiptir. Bu iki polimerden oluşan PTh-PPy kompoziti ise iki polimerin de özelliklerine sahip olan daha gözenekli bir yapı oluşturur. Yüzey alanı artarak daha çok enzim tutuklanmasına elverişli hale gelir. Bu durum biyosensörün hassasiyetini artırır ve tayin sınırını düşürür.

## BÖLÜM 2

### KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

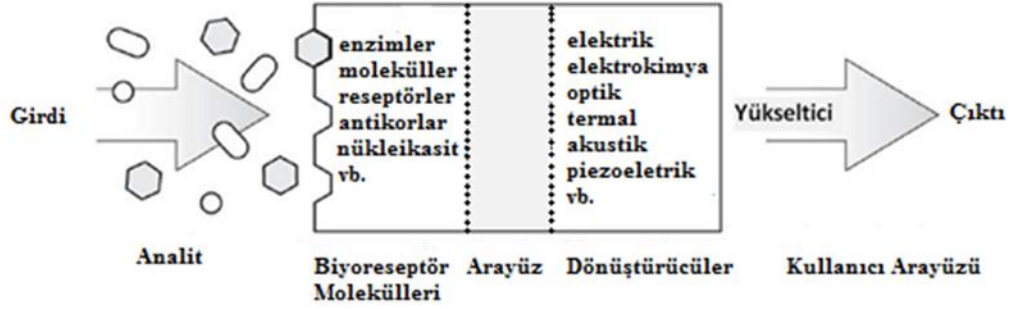
#### 2.1. İLETKEN POLİMERLER

İletken polimerler metallerin optik, magnetik ve elektronik özelliklerini gösteren organik maddeler olup belli miktarda mekanik özellik gösterirler. Bu özellikler polimerlerin dolaşma şekline göre değişiklik gösterebilir. Bu organik maddeler genellikle hidrojen (H) ve heteroatomlar olan azot (N) ve kükürt (S) atomlarından oluşur. İletken polimerler zincirlerindeki tekli ve çiftli bağların art arda dizilmesiyle  $\pi$ -konjügasyonu içeren bir yapıya sahip olurlar. Konjuge yapıların içerdiği rezonans sayesinde polimerde ana zincir boyunca yükün hareketliliği ve lokalizasyonu sağlanır. Bu yapıya sahip polianilin, polipirol, politiyofen gibi birçok iletken polimer sentezlenmekte ve yaygın olarak pek çok alanda kullanılmaktadır [6].

Günümüzde iletken polimerler üzerinde yapılan çalışmalar giderek gelişmektedir. Uygulama alanlarından bazıları aşağıdadır:

- Gaz sensörleri: Gazlar polimer filmlerin iletkenliklerini etkiler. Bunun sebebi kuvvetli indirgen ve yükseltgen özelliğe sahip olmalarıdır. Bu özellikler kullanılarak farklı gaz sensörleri yapılmaktadır.
- pH sensörleri: Üç elektrotlu sistemde pH'ın bazı iletken polimer çözeltilerinin iletkenliğini değiştirdiği gözlenmiş ve bu sistemin pH sensörü olarak kullanılabileceği saptanmıştır.
- Biyosensörler: İletken polimerler bu alanda hem kimyasal hem de biyolojik amaçlı kullanılmaktadır. Biyolojik sensörler, biyokimya ve mikro elektronik bilim dallarının birlikte kullanılmasıyla oluşturulan cihazlardır. Cihazlar, basit bir görüntüye sahip olmakla birlikte bulanık yapılı biyolojik akışkanlar için uygundur. Şematik olarak biyosensör (Şekil 2.1), uygun bir enerji sağlayıcı

- cihaz ve onunla temasta olan biyolojik bir bileşenin kullanılmasıyla oluşturulur [6,7]. Numuneden alınan kimyasal sinyaller elektriksel sinyallere dönüştürülerek dedektörde okunur [7].



Şekil 2.1. Biyosensörlerin yapısı [8].

- Şarjlı piller: Polimerlerin tersinir doplama özelliklerinden dolayı şarjlı pillerde elektrot olarak kullanılmaktadır.
- Elektronik aletler: İletken polimerler kullanılarak diyot gibi elektronik alet ve cihazlar yapılmaktadır. Bu tür cihazlarda, redoks tepkimelerindeki kimyasal sinyaller elektrik sinyaline dönüştürülerek okunmaktadır.
- Fotoelektrokimyasal hücreler: Günümüzde güneş enerjisinin organik güneş pilleri yardımıyla elektrik enerjisine dönüştürülmesi popüler uygulama alanlarından biridir.
- Korozyon inhibitörü: Korozyon havayla temas sonucunda oluşan elektrokimyasal bir olaydır. Yüzeylerde polimer kaplama yapılarak ve uygun koşullar sağlanarak korozyon engellenmeye çalışılmaktadır.
- Elektrokromik aletler: Elektrokromik cihazlarda kullanılan iletken polimerler elektrokimyasal şarj ve deşarj işlemi esnasında tersinir olarak renk değiştiren malzemelerdir. Örneğin PAN'ın (polianilin) yükseltgenmiş formu iletkenliği yüksek ve renkli bir yapıdır fakat indirgenmiş formu optikçe aktif olup saydam yapıdadır ve iletkenliği düşüktür [6].

### **2.1.1. İletken Polimerlerin Sentezi**

İletken polimerleri sentezlemek için, kimyasal ve elektrokimyasal polimerizasyon yöntemleri kullanılmaktadır. İletken polimer sentezinde önemli olan kullanılan monomerin konjuge bağ yapısının bozulmamasıdır. Çünkü sentezlenen polimerde de çoklu konjuge bağ yapısının olması istenir. Ana zincirdeki yükün delokalizasyonu ve hareketi konjuge bağ yapısı boyunca sağlanır [6].

#### **2.1.1.1. Kimyasal Sentez**

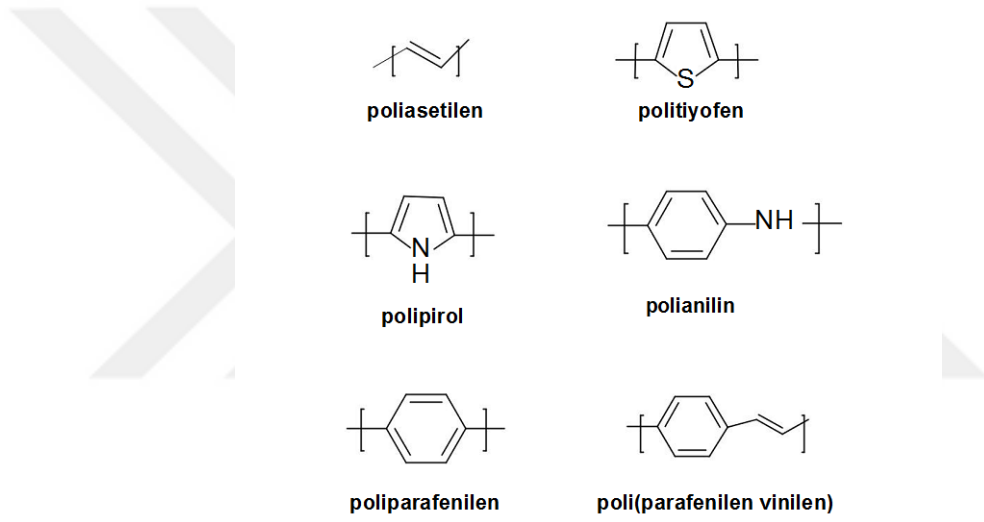
Kimyasal sentez yönteminde, monomer katalizör desteğiyle uygun bir çözücüde çözülür ve bir indirgenme veya yükseltgenme aracı ile (genel olarak bir tuz, asit ya da baz kullanımıyla) polimerleştirilir. Bu sentez yönteminin en büyük avantajı istenilen miktarda ürün elde edilebilmesidir. Dezavantajı ise yükseltgenme basamağının kontrol edilememesi ve sentezlenen ürünün safsızlıklar içermesidir [6].

#### **2.1.1.2. Elektrokimyasal Sentez**

Elektrokimyasal sentez yönteminde, polimerleşme hücresine uygun bir çözücü ve destek elektrolitle birlikte konulan monomerden, uygulanan elektroliz sonucunda çözeltide ya da elektrot yüzeyinde polimer elde edilmektedir. Polimerleşme hücresi genellikle üç elektrotlu sistemden oluşur; çalışma elektrodu, karşı elektrot ve referans elektrot. Hücre içine konulan sulu veya susuz ortamdaki monomer çözeltisinin, dönüşümsel voltametri (CV) ile veya sabit potansiyelde ya da sabit akımda polimerleşme işlemi gerçekleştirilmektedir. Polimerleşme işlemi yapılırken dikkat edilmesi gereken kısım, monomerin yükseltgenme veya indirgenme potansiyelinde destek elektrolitin ve çözücünün redoks reaksiyonuna girmemesidir. Bu polimerleşmenin kontrol edilebilir potansiyel veya akım uygulaması (sabit potansiyel ve sabit akım elektroliz), başlama ve sonlanma basamaklarının kontrol altında tutulabilmesi gibi avantajları vardır. Bundan dolayı kimyasal senteze göre daha saf, kirlilikten ve olası yan ürünlerden arınmış polimerler elde edilebilir [6].

### 2.1.2. İletken Polimer Tipleri

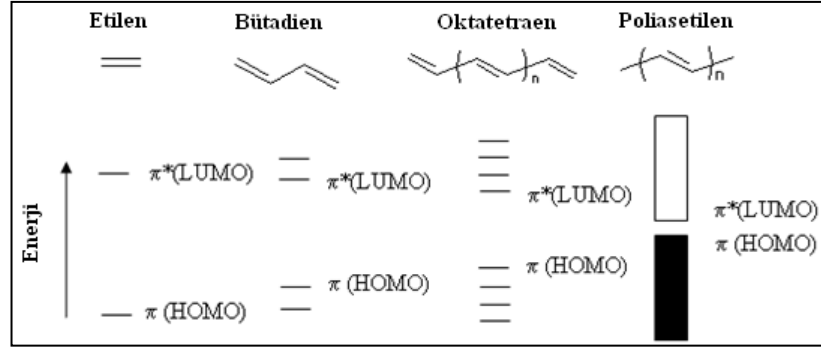
Poliasetilenin keşfi ve karakterizasyonundan sonra iletken polimerlere olan ilgi artmış ve sonrasında poliasetilenin yük transferi tepkimelerinde yükseltgen ve indirgen reaktiflerle doplanması sonucunda doplanan polimerin iletkenliğinin yükseldiği saptanmıştır [1, 6]. Konjuge polimerlerde iletkenlik ve elektroaktiflik poliasetilenden sonra hızla yayılarak pek çok diğer konjuge iletken hidrokarbon ve aromatik heterosiklik polimer çalışmasına yol açmıştır. Çok kullanılan bazı konjuge polimerlerin yapısı şekil 2.2’de görülmektedir [1, 9-13].



Şekil 2.2. Çok kullanılan bazı konjuge polimerler.

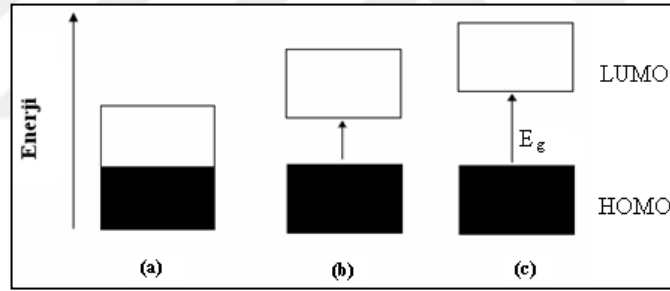
### 2.1.3. İletken Polimerlerde İletkenlik Mekanizması ve Band Teorisi

Polimerlerde iletkenlik mekanizması band teorisi ile açıklanır. Bu teoriye göre atomlar yan yana gelerek polimer oluşturmaya başladığında atomların enerji seviyeleri de bir araya gelerek enerji bantları oluşturmaya başlar (Şekil 2.3). Bu teorideki maddeler iletken, yarı iletken ve yalıtkan olarak tanımlanmaktadır.



Şekil 2.3. Bazı konjuge polimer sistemlerinde band oluşumu [14].

İletkenlerde, örneğin metallerde band teorisinde herhangi bir band aralığı tanımı olmadığı için, iletkenlik bandına geçecek olan elektronlar herhangi bir zorlukla karşılaşmaz (Şekil 2.4 (a)). İletken polimerler yarı iletken grubuna dahil edilirler ve iletkenlikleri metallere ile yalıtkanlar arasında yer alan iletkenlik değerlerine sahiptir (Şekil 2.4 (b)).

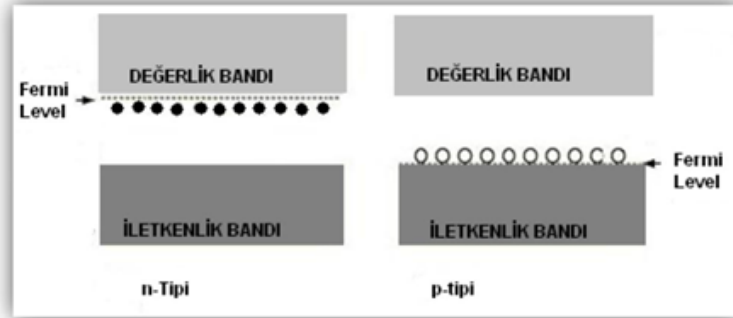


Şekil 2.4. Band yapıları a) iletken, b) yarı iletken ve c) yalıtkanlar için [15].

Polikonjuge polimerler doplanmadıklarında yalıtkan davranış gösterirler. Ancak indirgen ya da yükseltgen bir madde ile karıştırıldıktan sonra elde edilen tuzları, metallere ile kıyaslanabilecek seviyede iletkenliğe sahiptir. Öte yandan geniş bir band aralığına sahip olan yalıtkan maddelerin valans elektronları iletkenlik bandına ulaşamazlar (Şekil 2.4 (c)). İletkenlik bandı ve değerlik bandı arasındaki, maddenin iletken, yarı iletken veya yalıtkan olmasını belirleyen parametre iki band arasındaki enerji aralığıdır (band eşik enerjisi, E<sub>g</sub>). Yarı iletkenlerde yalıtkanlara göre band eşik enerjisi daha düşüktür. Isı, ışık, magnetik etki, elektriksel gerilim ya da voltaj uygulamaları gibi dış etkenler varlığında değerlik bandındaki elektronların bir kısmı serbest hale geçerek iletkenlik bandına yerleşir ve yapı iletkenlik kazanmış olur.

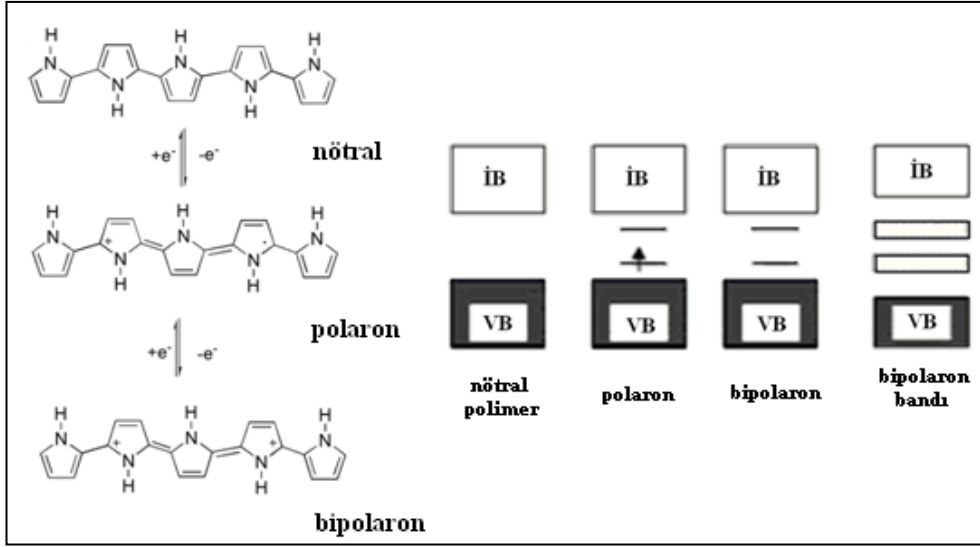


Polimerlerin iletken özellik gösterebilmesi için sadece konjugasyon yeterli değildir. Doplama adı verilen uygulama ile polimere elektron verilir ya da polimerden elektron uzaklaştırılır. Bu şekilde konjuge polimerlerdeki değerlik ve iletkenlik bandlarının tam dolu ya da tam boş olmaması sağlanır ve yapıya iletkenlik kazandırılır. Doplama işlemi dopant adı verilen maddelerin varlığında polimerin yükseltgenme veya indirgenmesidir. Polimerin yükseltgenmesi ile polimer elektron kaybeder ve değerlik bandında (+) yüklü boşluklar (pozitif yük taşıyıcılar) oluşur. Polimerin indirgenmesinde ise polimer elektron kazanır ve iletkenlik bandına (-) yüklü elektronlar (negatif yük taşıyıcılar) yerleşir. Yapılan bu doplama işlemi ile yük taşıyıcılarının sayısı artırılır. Doplama yükseltgenme işlemiyle gerçekleşiyorsa p-tipi doplama, indirgenme işlemiyle gerçekleşiyorsa n-tipi doplama olarak adlandırılır (Şekil 2.5). Dopantın türü, polimer sentezlenirken polimerin iletkenliğini etkilemesinden dolayı oldukça önemlidir [16].



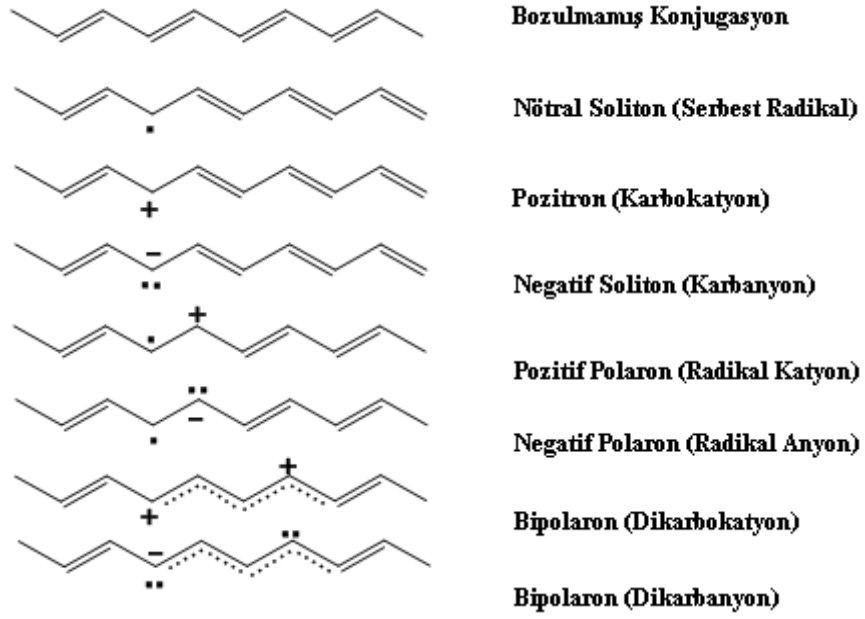
Şekil 2.5. İletken polimerlerde doplama [17].

Band teorisi iletken polimerlerin iletkenliğini açıklamada yeterli değildir. Polimerin iskelet yapısına doplama yapmak için verilen elektrik yükü polimerin elektronik yapısını değiştirir ve polaron, bipolaron ve soliton yapıları oluşur.



Şekil 2.6. PPy'nin polaron, bipolaron yapıları ve band diyagramı [17].

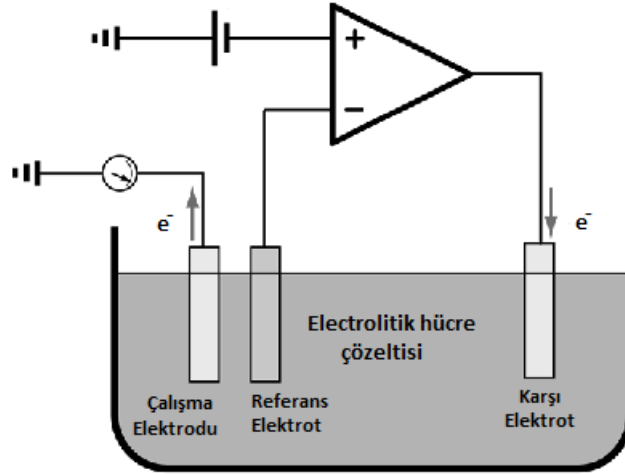
Konjuge bağların bulunduğu polimerin yükseltgenmesiyle çift bağ kırılır, elektron kaybedilir ve polimer zincirinde pozitif yüklü radikal katyon oluşur. Polaron ismi verilen bu yapıda radikal katyonlar yük taşıyıcılığı yapar. Polaronun serbest radikalinin yükseltgenmesiyle bipolaron yapısı oluşur. Burada iki radikalın birleşmesiyle yeni bir  $\pi$  bağı meydana gelir. Bipolaronda eşleşmemiş elektron yoktur ve bu sayede serbest elektronlara gerek kalmadan iletkenlik sağlanır (Şekil 2.6). Polaronlar ve bipolaronlarda karşı iyonların (dopant iyonlarının) hareket yeteneğine bağlı olarak zincir boyunca hareket vardır. Doplanma ile iyonların yeterince hareketli olabilmeleri için yeterli miktarda karşı iyon sağlanmalıdır (Şekil 2.7) [16].



Şekil 2.7. Poliasetilenin soliton, polaron ve bipolaron yapıları [18].

#### 2.1.4. Elektrokimyasal Polimerizasyon

Elektrokimyasal sentez iletken polimerlerin elde edilmesi için alternatif bir yoldur ve sentetik prosedürü oldukça kolaylaştırır. İletken polimerleri elektrokimyasal yolla elde etme işlemi 1968'lerden öncesine, "pirol siyahı" nın pirol ve sülfürik asit içeren sulu çözeltiye daldırılmış platin elektrot üzerinde tortu halinde elde edilmesine dayanır [19]. Günümüzde elektrokimyasal polimerizasyon Şekil 2.8'de görüldüğü gibi monomer, uygun çözücü ve dopant elektrolitin bir arada bulunduğu bir çözelti içerisinde 3 elektrotlu düzenek (çalışma elektrodu, karşı elektrot ve referans elektrot) ile uygulanır. Bu düzenekte, çalışma elektrodu polimerizasyonun gerçekleştiği elektrottur. Elektrolit çözeltisi uygun bir çözücü içinde çözünmüş monomer ve dopant iyonlarından (elektrolit) oluşur. Çözelti içerisinde akım geçirilir ve pozitif yüklü çalışma elektrodu üzerinde polimer birikmeye başlar. Diğer monomerlerle tepkimeye girecek olan radikal katyonları oluşturmaya yönelik yükseltgenme işlemi sırasında, çalışma elektrodunun yüzeyi radikal katyonlarla kaplanır ve birleşen radikal katyonlar, elektrot yüzeyinde çözünmez polimer zincirlerini meydana getirirler [20].



Şekil 2.8. Elektrokimyasal polimer sentezi için 3 elektrotlu düzenek.

Elektrokimyasal polimerizasyon oksidatif ve redüktif olmak üzere iki şekildedir ve elektrokimyasal doplama ile yapılır. Oksidatif elektropolimerizasyonda doplama için sisteme pozitif potansiyel uygulanır. Oksitlenme sonrasında dopant polimer içindeki pozitif yüklü kısma etki ederek yük dengesini devam ettirir. Bu esnada elektrot yüzeyine polimer kaplanır. Redüktif elektropolimerizasyon ise benzer şekilde monomer çözeltisine negatif potansiyel uygulanmasıyla gerçekleştirilir. Polimer zincirindeki negatif yüklü noktalara elektrolitin katyonu yerleşir. Polimerde oluşan anyonların taşınmasıyla da iletkenlik gerçekleşir [20].

Elektrokimyasal polimerizasyonun diğer polimerizasyon tekniklerine göre bazı avantajları vardır [21].

- Metot tekrarlanabilir ve basittir.
- Reaksiyon oda sıcaklığında gerçekleşebilir.
- Kopolimer yapmak mümkündür ve kolaydır.
- Polimer filmler direkt elektrot yüzeyinde oluşabilir.
- Homojen filmler elde edilebilir.
- Film kalınlığı, potansiyel veya akım değiştirilerek kontrol edilebilir.
- Kısa sürede fazla polimer sentezlenebilir.
- Farklı destek elektrolitler kullanılarak özellikleri farklı polimerler elde edilebilir.

#### 2.1.4.1. Elektrolitik Koşullar

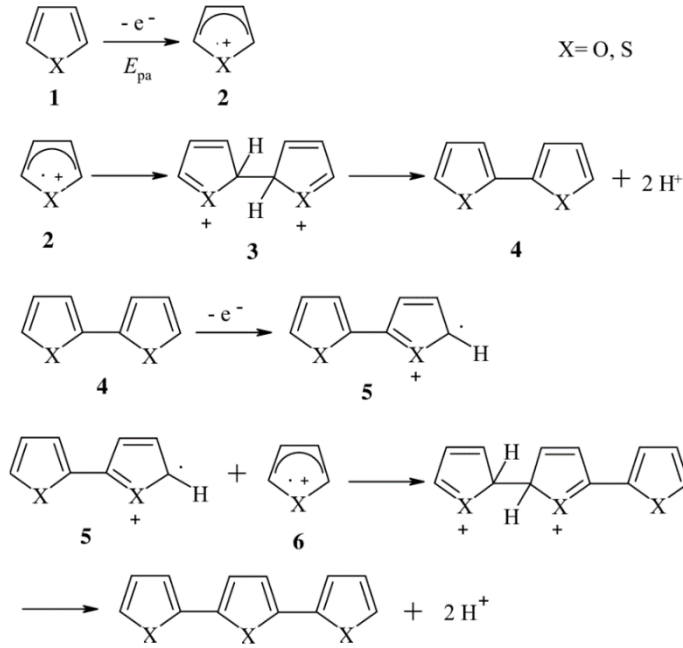
Elektropolimerizasyon sürecinde sıcaklık, seçilen elektrot, çözücü sistemi, elektrolit, monomer derişimi gibi bir dizi önemli değişken dikkate alınmalıdır. Polimerizasyon kinetiğini ve iletkenliğini, filmin mekanik özelliklerini etkileyen önemli bir faktör sıcaklıktır. Genellikle polipirolün yüksek sıcaklık ile etkileşimi moleküler yapısında değişikliğe yol açar. Bu değişimler, polimerin sentezi sırasında karşı iyonla etkileşimini zorlaştırır. Tercih edilen elektrot, sentez sırasında oluşan polimerin özelliklerine ve sürece etki eder. Elektrot olarak daha çok altın, platin gibi inert iletkenler ya da indiyumtinoksit (ITO) gibi optik olarak geçirgen olanlar tercih edilir. Çözücülerin nükleofilik karakteri düşük olmalıdır. Aksi takdirde film oluşumu azalır. Ayrıca çözücü iyonik iletkenlik ve geniş potansiyel aralığında kararlı olabilmek için yüksek dielektrik sabitine sahip olmalıdır. Elektrolit olarak genellikle perklorat, tetrafloroborat ve hekzaflorofosfat anyonlarıyla, lityum ve tetraalkil amonyum tuzları tercih edilir. Destek elektrolit iyonları elektropolimerizasyonda monomer birimleriyle etkileşir ve bu sayede polimer doplanır. Elektrolit seçilirken dikkat edilen özellikler çözünebilirliği, ayrışma derecesi ve nükleofilitesidir [16, 20].

#### 2.1.4.2. Elektrokimyasal Polimerizasyon Mekanizması

Anilin, tiyofen, pirol, furan gibi rezonans kararlılığındaki aromatik moleküllerin elektrokimyasal yükseltgenmesiyle elektronik iletken polimerler elde edilir. Monomerlerin elektrokimyasal polimerleşmesi anodik ya da katodik olarak gerçekleştirilebilir. Elektrokimyasal yükseltgeme, birçok avantajından dolayı kimyasal yükseltgeme ve elektrokimyasal indirgeme polimerizasyonuna göre daha çok tercih edilir.

Elektrokimyasal polimerizasyon ECE (elektrokimyasal-kimyasal-elektrokimyasal reaksiyon) mekanizmasına göre yürür (Şekil 2.9). İlk basamakta monomer yükseltgenerek radikal katyon oluşturur (E). Elektron transferinin monomerin çözücüden elektrot yüzeyine difüzyonuna göre daha hızlı olması nedeniyle oluşan yüksek derişimdeki radikaller sürekli olarak elektrot yakınında bulunurlar. Bu ilk aşamayı iki radikal katyonun birbirine bağlanmasıyla gerçekleşen bağlanma

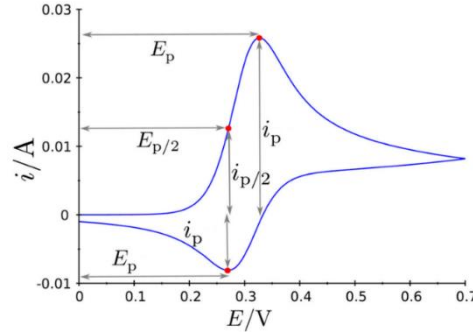
reaksiyonu takip eder. Bağlanma, iki radikal katyonun eşleşme reaksiyonu ile ya da monomer ile radikal katyonun süstitüsyon reaksiyonu ile gerçekleşebilir. Radikalik süstitüsyon reaksiyonu mekanizmasında radikalik katyon, monomer ile reaksiyona girer, daha sonra elektron ve proton kaybederek nötral dimer oluşturur. Oluşan bu dimer yükseltgenerek radikalik hale gelir ve ortamdaki monomere bağlanarak trimer yapısını meydana getirir. Bağlanmanın bu şekilde devam etmesi ile polimer zinciri uzar. Radikal–radikal eşleşmesi ise, iki radikalın bağlanarak dihidro dimer katyonu oluşturması ve devamında protonların kaybedilmesi ile tekrar aromatik dimer yapının elde edilmesi basamaklarından oluşur. Potansiyel uygulandığı için dimer, monomerik bir radikalle tekrar bağlanma reaksiyonuna maruz kalır. Radikal-monomer bağlanma reaksiyonundan, iki protonu ve diğer elektronunu kaybeden nötral bir dimer meydana gelir [21].



Şekil 2.9. Heterosiklik bileşiklerin elektropolimerizasyon mekanizması [22].

Dimerler ve oligomerler, monomerin radikal katyonuyla bağlanma reaksiyonuna girerler ve protonlarını kaybedip antiaromatik olurlar. Elektrokimyasal ve kimyasal aşamalar ardı ardına bu şekilde devam eder. Elektrolit çözeltisinde oligomerler çözünmeden kalana kadar bu reaksiyon elektrot yüzeyinde devam eder.

Elektrokimyasal polimerizasyon teknikleri, Sabit Akım Elektrolizi (Galvanostatik), Sabit Potansiyel Elektrolizi (Potansiyostatik) ve Dönüşümlü Voltametridir. Sabit akım elektrolizinde, bir zaman periyodu için anot ve katot arasında belirli büyüklükte akım geçer. Sabit potansiyel elektrolizinde, potansiyel sabit tutulurken akımın değişimine izin verilir. Dönüşümlü voltametri ise potansiyel belli bir voltaj aralığında değiştirilerek akım takip edilir ve polimerizasyon gerçekleşir. Bu yöntem aynı zamanda monomerin yükseltgenme potansiyeli, film üzerinde büyümesi, polimerin redoks davranışı ve yüzey derişimi (polimer tarafından harcanan yük) ile ilgili bilgileri sağlar. Spesifik olarak, polimer ile çözücü molekülleri ve iyonlar arasındaki etkileşim, yük taşıma prosesi ve yük taşıyıcılarının oranı hakkında CV'den yararlanılabilir. Bir elektrodun potansiyeli, çalışma elektrodu ve karşı elektrot arasında doğrusal olarak değiştirilmek suretiyle akım-gerilim ilişkisinin incelenmesi sonucunda, elektrot tepkimelerinin aydınlatılmasında kullanılır. Bu teknikte önce belli bir potansiyel aralığında tarama yapılır ve akım ölçülür, daha sonra tersi yönde (anodik-katodik) taramaya devam edilir (Şekil 2.10) [16, 23].



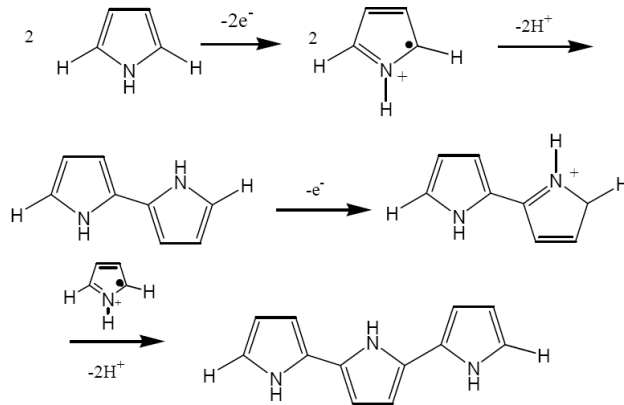
Şekil 2.10. Dönüşümlü voltametri akım potansiyel eğrisi [24].

Çalışma elektroduna uygulanan potansiyel, elektroliz hücresi içinde bulunan elektro aktif maddenin yükseltgenme veya indirgenme potansiyeline ulaştığında elektrot yüzeyindeki madde hızla tükenir. Çalışma ve karşı elektrot arasında ölçülen akım artar. Bunun sonucunda elektrot yüzeyi ile çözelti arasında oluşan derişim farkı, çözeltiden elektrot yüzeyine kütle aktarımına neden olur. Kütle aktarım hızı, elektronların aktarım hızından düşük olduğundan akımda düşüş gözlenir ve bir pik elde edilir.

Oluşan bu pikin tepe noktasına karşılık gelen potansiyele ‘yükseltgeme veya indirgeme pik potansiyeli’ denir [16, 23].

### 2.1.5. Pirol ve Tiyofen

Pirol (Py) ve tiyofen (Th) kaynama noktaları sırasıyla 130°C ve 84°C, yoğunlukları 0,948 g/cm<sup>3</sup> ve 1,050 g/cm<sup>3</sup> olan kokulu ve renksiz sıvılardır. Aromatik bileşiklerdir ve mineral asitleri ile çabucak polimerleşirler. Polipirol (PPy) ve politiyofen (PTh) dikkat çekici özelliklere sahip iletken polimerlerdir. Elektrokimyasal ya da kimyasal olarak monomerlerinin oksidatif polimerizasyonu ile hazırlanabilir. PPy ve PTh'nin elektrokimyasal polimerizasyonu, uygun bir çözücü içinde çözülmüş monomerin üç elektrotlu sistemde uygun bir elektrolit (dopant) varlığında belli bir potansiyel uygulanarak veya dönüşümlü voltametrde o monomerin polimerleşme voltaj aralığında potansiyel uygulanmasıyla gerçekleştirilir. Asetonitril çözeltisi içerisinde farklı elektrolit çözeltileri (tetrabutil amonyum perklorat, tetraetil amonyum tetrafloroborat ve tetrabutil amonyum hekzaflorofosfat) kullanılarak PPy ve PTh sentezi gerçekleştirilmiştir. PPy'ün bir avantajı suda çözünür olması dolayısıyla suda polimerizasyonunun mümkün olmasıdır ve bu özellik enzim tutuklamalarında önemlidir. Şekil 2.11'de örnek olarak PPy'ün elektrokimyasal polimerizasyonu verilmiştir ve PTh de aynı mekanizmaya sahiptir [10, 25].



Şekil 2.11. Py'ün oksidatif polimerizasyon ile PPy'e dönüşümü [26].



Monomerden bir elektron koparılması ile radikal katyon oluşur ve ardından diğer bir katyon ile birleşerek bipirol meydana getirir. Bu süreç uzun zincirler oluşana kadar tekrarlanır. PTh ve PPy`ün son hali uzun konjuge zincirlerdir. Bu polimerler nötral durumda iletken değildir ve yalnızca yükseltgendiğinde iletkenlik kazanır. Yükseltgenmiş durumla ilişkili olan yük, pek çok monomer birimi üzerinden delokalize olur ve radikal katyon (polaron) ve dikatyon (bipolaron) içeren zincirler oluşturur. PTh ve PPy`ün fiziksel yapısı, kimyasal polimerizasyon sonucu elde edilen ve çözünmeyen yapısı nedeniyle işlenebilme zorluğu bulunan toz veya elektrokimyasal polimerizasyon sonucu elde edilen çözünmez filmidir. Py ve Th`nin elektropolimerizasyonunun başarısı yük delokalizasyonundan kaynaklanan kararlılığından ve elektrooksidasyonun kolay gerçekleşmesinden kaynaklanır. PPy üretimi ile ilgili AFM çalışmaları, zaman ve elektrolitin oluşan filmin morfolojisine etki ettiğini göstermektedir [27]. SEM çalışmaları polimerin düzgün ve homojen bir yüzeye sahip olduğunu göstermiştir. Destek elektrolitinin reaksiyon kinetiğini de etkilediği gözlenmiştir. Doplanmış PPy çevresel ortamlarda oldukça kararludur fakat nötral PPy`ün hava ve su ortamında kararsız olduğu belirtilmiştir. Temel çözeltilerde polimer hidroksit iyonları ile asidik çözeltilerde diğer anyonlar ile doplanmıştır [28].

PTh`in iletkenliği, yalıtkan formunda  $10^{-10}$  S  $\text{cm}^{-1}$  den iletken formunda  $10^2$  S  $\text{cm}^{-1}$  e kadar değişen bir aralıktadır. PPy`ün aksine hem dopingli hem de dopingsiz formlarında neme ve açık havaya karşı dayanıklıdır. Derin kırmızı renk ( $\lambda_{\text{max}} = 460$  nm) ve yüksek iletkenlik ( $\sigma = 10^{-5}$  S  $\text{cm}^{-1}$ ) polimerin yüksek konjugasyona sahip olduğunu gösterir. Tiyofen temelli polimerler havada 350 °C`ye kadar, vakum altında veya inert atmosferde daha yüksek sıcaklıklara kadar kararludur. Derişik asit çözeltilerinde de oldukça kararludurlar [10].

#### **2.1.5.1. PTh–PPy Kompoziti**

PPy ve PTh`in avantajları; kolay sentezlenmeleri, yapılarının kolaylıkla modifiye edilebilmesi, elektrokimyasal davranışlarının kontrol edilebilirliği, PPy`ün doplanmış, PTh`in doplanmış ve doplanmamış hallerinin, yüksek çevresel dayanımıdır. PTh ve PPy`ün düşük çözünürlüğü ve eriyebilirliği ise araştırmacıları farklı sübstütientler bağlayarak özelliklerini iyileştirmeye yöneltmiştir. Burada iki polimerin kompoziti

yapılarak olumlu özelliklerinin biraraya geldiği bir malzeme hedeflenmiştir. Daha dayanıklı ve kararlı olan kompozit içinde enzimin aktivitesini daha uzun süre muhafaza etmesi beklenmektedir. Bu sonuç daha dayanıklı olması nedeniyle kompozite PTh eklenmesi ile sağlanmaya çalışılmaktadır. PPy'ün kullanılma sebebi ise PTh'in aksine suda çözünürlüğünün olması ve bu sayede enzim tutuklamasını mümkün kılmasıdır. İki polimerin avantajlarının biraraya getirilmesi amacıyla bu kompozit oluşturulmaktadır [29].

## **2.2. ENZİMLER**

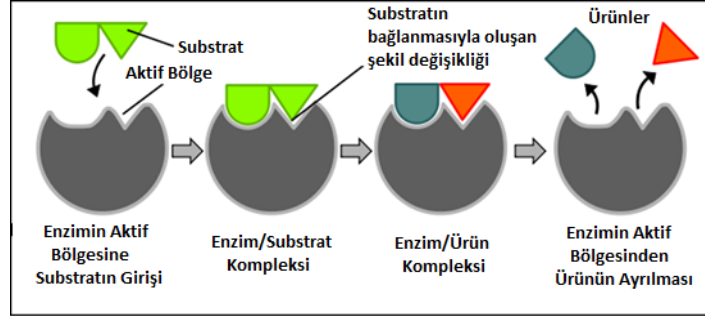
Enzimler canlı hücreler tarafından sentezlenen, protein yapısında olan biyolojik katalizörlerdir. Enzim alanındaki ilk çalışmalar sindirim enzimi ile ilgilidir. 1825 yılında Jön Jacob Berzelliuss, nişastayı parçalamak için buğday familyasından elde edilen enzim karışımını kullanmıştır ve enzimlerin sülfürik asite göre daha hızlı parçalama yaptığı gözlenmiştir. Günümüzde medikal alanlarda ve endüstride oldukça geniş kullanıma sahip olan enzimler, binlerce yıldır ekmek, bira, peynir gibi yiyeceklerin yapımında insanlar tarafından kullanılmıştır. Bugün yaygın olarak kozmetik uygulamalarda, endüstriyel alanlarda, süt işletmelerinde, meyve ve sebze suyu üretiminde, deri sanayinde, maya ve şarap yapımında, şeker ve tatlı imalatında, aminoasit sentezinde, atık su işletmelerinde, fruktoz üretiminde kullanılmaktadır. Bilimsel araştırmalarda ise hidroliz, analiz, sentez, biyodönüşüm, afinite ayırımında araştırma konusu olarak önemli yer tutar. Ayrıca tıbbi alanda, kan şekeri, üre, kolesterol testlerinde kullanılmaktadır [30, 33].

### **2.2.1. Enzimlerin Yapısı**

Enzimlerde protein kısmını oluşturan aminoasitlerin sayısı, dizilişi ve moleküllerin konformasyonu belirli bir düzen içindedir. Bu düzen enzimlerin tepkimelere özgü olmasını sağlar. Yani enzimler genellikle tek bir tepkimeyi katalizlerken anorganik katalizörler pek çok kimyasal tepkimede rol alabilirler.

1984 yılında Emil Fischer tarafından enzim ile substratın ilişkisine dair bir model önerilmiştir. Anahtar-kilit uyumuna benzetilen bu modelde substrat enzimin belirli bir

bölgesine etki eder (Şekil 2.12). Ancak bu teori spesifikliği açıklasada, geçiş durumunun kararlılığını açıklamada yeterli olamamıştır. Koshland, indüklenmiş uyum modeliyle 1959 yılında anahtar-kilit teorisine katkıda bulunmuştur. Teori enzimin aktif alanının sert, katı (rigid) bir yapıda olduğunu kanıtlar [30].



Şekil 2.12. Enzimlerin anahtar-kilit modeli [29].

Bitki, hayvan dokuları ve mikroorganizmalardan elde edilen çok sayıdaki enzim, yapısı ve kontrol ettikleri tepkime mekanizmalarına göre sınıflandırılırlar ve "International Union of Biochemist (IUB)" tarafından altı sınıfa ayrılmıştır. Bu sınıflandırmaya göre enzimler, sırasıyla tepkime türü, spesifik tepkime, substrat veya substratları niteleyen dört basamaklı bir numara ile tanımlanır [31].

- Oksidoredüktazlar, moleküller arası hidrojen ve oksijen atomu ya da elektronların transfer olduğu redoks reaksiyonlarını katalizler.
- Transferazlar, moleküller arasında bir atom veya atom grubunun transfer olduğu reaksiyonları katalizler.
- Hidrolazlar, geri dönüşümlü hidrokatalitik reaksiyonları katalizler.
- Liyazlar, eliminasyon reaksiyonlarını katalizler.
- İzomerazlar, izomerizasyon reaksiyonlarını katalizler.
- Ligazlar, iki molekülün kovalent bağ oluşturma reaksiyonlarını katalizleyen küçük enzim gruplarıdır.

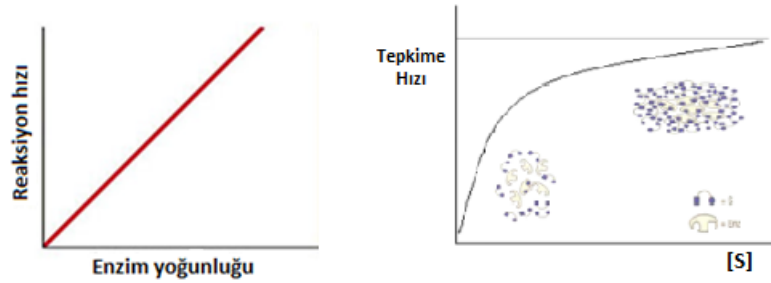
### 2.2.2. Enzimlerin Aktivitesi

Enzim ile gerçekleşen bir tepkime de rol oynayan başlıca faktörler;

- Enzim derişimi
- Substrat derişimi
- pH
- Sıcaklık
- Zaman
- İnhibitor etkisi
- Reaksiyon ürünüdür.

Bu faktörlerin enzim reaksiyonları üzerinde olan etkileri, farklı koşullar altında enzim tepkime hızı hesaplanarak belirlenir.

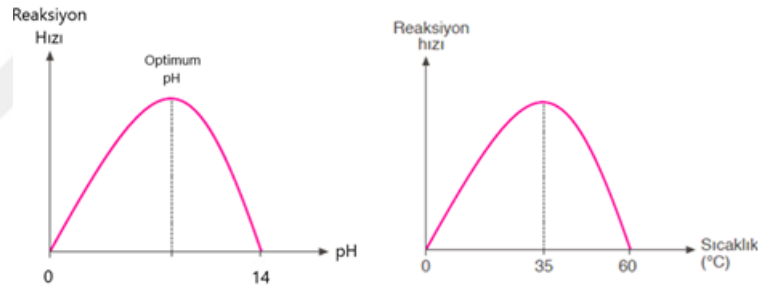
Enzim derişimi: Enzimin aktive edebileceği substrat miktarı ne kadar fazla ise enzimatik reaksiyonun hızı da enzim derişimi ile doğru orantılı şekilde artar. Enzim ne kadar fazla ise birim zamanda oluşacak ürün de o kadar fazla olur. Enzim molekülünün yapısı bozulana kadar substratı aktive etmeye devam eder (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. Enzim ve substrat derişiminin tepkime hızına etkisi.

Substrat derişimi: Belirli bir derişimde enzim içeren bir tepkimenin hızı substrat miktarının artmasıyla doğru orantılı bir şekilde artar. Ancak bu artış enzimin substrata karşı doymasına kadar devam eder. Bundan sonra substrat derişiminin arttırılması tepkimenin hızını etkilemez (Şekil 2.13). Bu aşamada enzim tepkime hızı maksimum hıza ( $V_{max}$ ) ulaşmıştır. Enzim moleküllerinin yarısı enzim-substrat kompleksi halinde iken gözlenen tepkime hızı, maksimum tepkime hızının yarısıdır. Bu maksimum hızın yarısını veren substrat derişimine Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ) denir.  $K_m$  değeri enzimin substrata olan afinitesini gösterir.  $K_m$  değeri ile afinite ters orantılıdır [30].

pH ve Sıcaklık: Her enzim sadece belirli bir pH aralığında aktivite göstermektedir. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH'ya o enzimin optimum pH'sı denir (Şekil 2.14). Enzimler protein yapılı olduklarından amin ve karboksil grupları ortamın pH derecesine göre az veya çok miktarda iyonlaşırlar. Bu iyonlaşmaya bağlı olarak yapıların kararlılıklarında farklılıklar gözlenir ve enzimin aktif bölgesinde bir değişim meydana gelmesine sebep olur. Optimum pH'nın her iki tarafında da enzim reaksiyonu yavaşlamaktadır. Bu sebeple enzim çalışmalarında pH'yı optimumda tutmak için tampon kullanılmaktadır. Enzim-kataliz reaksiyonlarının hızı sıcaklıkla birlikte artar. Sıcaklığın her 10°C artmasına karşılık enzim reaksiyonu bir kat daha hızlanır. Ancak belli bir sıcaklık değerine ulaşıldığında enzim molekülleri yapısal bazı değişikliklere uğrar ve reaksiyon ya yavaşlar ya da tamamen durur. Bitkisel kaynaklı enzimler 50-60 °C'de optimum sıcaklığa erişirken, hayvansal kaynaklı enzimler 40-50 °C arasında optimum sıcaklığa erişir (Şekil 2.14) [30, 31].



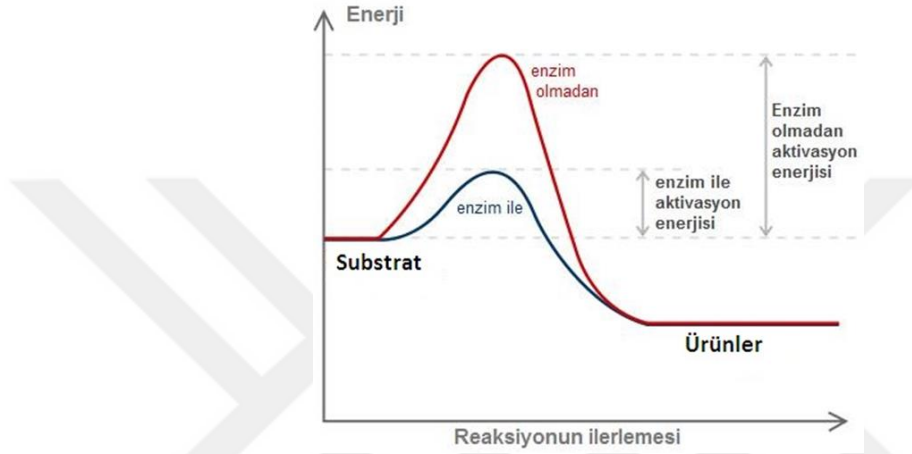
Şekil 2.14. Optimum pH ve sıcaklık.

İnhibitör etkisi: Tepkime ortamında bulunan ve reaksiyonun hızını olumsuz etkileyen maddelere inhibitör denir. İnhibitörler tersinir ve tersinmez olarak ikiye ayrılır. Tersinmez inhibitörler enzim molekülünün konformasyonunu değiştirerek ya da enzimin aktif bölgesine doğrudan bağlanarak aktif bölgeyi tamamen bozabilir. Tersinir inhibitörler ise enzimle ara bileşik oluşturarak Michaelis-Menten sabitini ya da maksimum tepkime hızını azaltıcı etki yaparlar [32].

Reaksiyon ürünü: Ürün konsantrasyonunun giderek artması bir yerden sonra geriye dönük kontrol mekanizmasıyla reaksiyonun durdurulmasına sebep olur ve tepkime hızını düşürücü etki yapar.

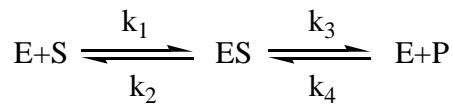
### 2.2.3. Enzim Tepkimelerinin Kinetiği

Enzim kinetiği, enzim katalizli reaksiyonların davranışlarını ve bu davranışları etkileyen faktörleri inceler [30, 33]. Enzim geçici olarak substrata bağlanıp onlara etki eder ve bu sayede reaksiyonun gerçekleşebilmesi için gerekli olan aktivasyon enerjisini düşürüp reaksiyonların hızlanmasını sağlar (Şekil 2.15).

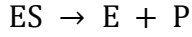


Şekil 2.15. Enzim katalizli reaksiyonun aktivasyon enerji diyagramı [30].

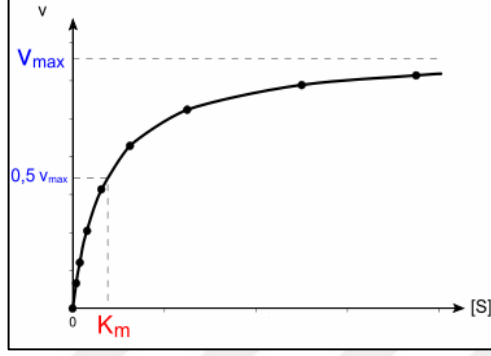
Enzimatik reaksiyonlarla ilgili ilk çalışmalar 1913 yılında Michaelis-Menten tarafından yapılmıştır ve kendi isimleri ile anılan kuramlarıyla bilinirler. Bu kurala göre enzim (E) önce substrat (S) ile birleşerek enzim-substrat (ES) kompleksini oluşturur. Daha sonra bu kompleksi ürüne (P) dönüştürür ve serbest enzim ve ürün ortaya çıkar [33].



Burada  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$ ,  $k_4$  bu reaksiyonun hız sabitlerini göstermektedir.  $k_1$  ile ES kompleksi oluşmakta,  $k_2$  ile ES kompleksi enzim ve substrata ayrılmakta,  $k_3$  ile ES kompleksi enzim ve ürünü oluşturmakta,  $k_4$  ise ES kompleksini oluşturmaktadır. Serbest enzim ve ürünün ES kompleksine dönüşme hızı ( $k_4$ ) çok düşük olduğundan ihmal edilir ve bu tepkime aşağıda gösterildiği gibidir [33].



Substrat derişimine bağlı olarak reaksiyon hızı grafiğe aktarıldığında Şekil 2.16'daki hiperbolik eğri elde edilir.



Şekil 2.16. Substrat derişimine karşı reaksiyon hızı grafiği [29].

Reaksiyon hızına karşı substrat derişimi grafiğinde de görüldüğü gibi hız substrat derişimi ile doğru orantılıdır. Burada [ES]'nin yıkımı iki türlü olur. [ES]'nin bir kısmı  $k_2$  hız sabiti ile tekrar enzim substrata ayrılır. Diğer kısmı ise  $k_3$  hız sabiti ile enzim ve ürüne dönüşür [33].



[ES]'nin oluŐma hızı EŞitlik 2.1. ile ifade edilmektedir.

$$V = k_1 \cdot [E][S] \quad (2.1)$$

[ES]'nin tükenme hızı EŞitlik 2.2.'de verilmiştir.

$$V = k_2 \cdot [ES] + k_3 \cdot [ES] = [ES] (k_2 + k_3) \quad (2.2)$$

Kararlı hal yaklaŐım kuramına göre [ES]'nin oluŐma hızı [ES]'nin tükenme hızına eşittir ve bundan dolayı EŞitlik 2.3 elde edilir [33].

$$k_1 \cdot [E][S] = (k_2 + k_3) [ES] \quad (2.3)$$

Eşitlik 2.3 ifadesi çözülürse Eşitlik 2.4 elde edilir.

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = K_m \quad (2.4)$$

Reaksiyona giren E ve S maddelerinin derişimleri [ES]'ye bölündüğünde standart bir değer elde edilir. Ortamda bulunan total enzimin ( $E_t$ ) bir kısmı serbest halde bir kısmı da [ES] halinde olduğundan

$$[E] = [E_t] - [ES] \quad (2.5)$$

çözümü elde edilir (Eşitlik 2.5) [33].

Eşitlik 2.5'in ifadesi Eşitlik 2.4'de yerine yazıldığında elde edilen yeni eşitlik aşağıdaki gibidir (Eşitlik 2.6).

$$[ES] = \frac{[E_t][S]}{K_m + [S]} \quad (2.6)$$

Belirli şartlarda [ES]'nin E+P' ye eşit olmasından dolayı enzimatik reaksiyonun hızı Eşitlik 2.7 ile ifade edilir.

$$V = k_3 [ES] \quad (2.7)$$

Eşitlik 2.6 ifadesi Eşitlik 2.7'de yerine yazılırsa elde edilecek yeni hız aşağıda gösterildiği gibidir (Eşitlik 2.8).

$$V = k_3 \frac{[E_t][S]}{K_m + [S]} \quad (2.8)$$



Reaksiyonun sonunda enzimin tamamı substrat ile bağlanacağından maksimum hıza erişilmiş olur ve Eşitlik 2.9 ile ifade edilir.

$$V_{\max} = k_3 [E_t] \quad (2.9)$$

Eşitlik 2.9 ifadesi Eşitlik 2.8'de yerine yazılarak Michaelis-Menten Denklemi elde edilir (Eşitlik 2.10).

$$V = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (2.10)$$

$K_m$  enzimin substrata olan ilgisini gösterir ve maksimum hızın yarısını meydana getiren substrat derişimidir. Eğer enzimin substrata olan ilgisi fazla ise  $K_m$  küçüktür. Düşük  $[S]$ 'larda bile enzim substrat ile  $[ES]$  kompleksini yapıyor demektir. Enzimin substrata ilgisi zayıf ise  $K_m$  büyüktür [33].

Michaelis-Menten denkleminde görüldüğü gibi, enzimatik bir reaksiyonun hızı  $[S]$  ve  $K_m$ 'e bağlıdır.

Farklı durumlara bakıldığında;

- $[S]$ ,  $K_m$ 'den çok küçük ise  $K_m$ 'e  $[S]$ 'nin eklenmesi artık onun değerini çok az değiştirir. Onun için  $[S]$  paydadandan kaldırılır (Eşitlik 2.11). Bu durumda hız  $[S]$ 'ye bağlı olacaktır.

$$V = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \cong \frac{V_{\max}[S]}{K_m} \cong K[S] \quad (2.11)$$

- $[S]$ ,  $K_m$ 'den çok büyük ise  $[S]$ 'nin  $K_m$ 'ye eklenmesi  $[S]$ 'nin değerini çok az değiştirir. Onun için  $K_m$  paydadandan kaldırılır (Eşitlik 2.12). Başlangıç hızı  $V_{\max}$ 'a eşittir.

$$V = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \cong \frac{V_{\max}[S]}{[S]} = V_{\max} \quad (2.12)$$

- [S] ile  $K_m$  eşit olduğu zaman Eşitlik 2.13 elde edilir. Bu durumda başlangıç hızı maksimum hızın yarısı olur.

$$V = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \cong \frac{V_{\max}[S]}{[S] + [S]} = \frac{V_{\max}}{2} \quad (2.13)$$

Hiperbolik bir eğri olan Michaelis-Menten Denklemi pratik olması açısından doğru denkleme dönüştürülmesi için tersine çevrilir ve çarpanlarına ayrılırsa Lineweaver-Burk denklemi elde edilir (Eşitlik 2.14) [33].

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{[S]}{V_{\max}[S]} \quad (2.14)$$

Düz bir doğru denklemini veren ifade Eşitlik 2.15 ile gösterilir.

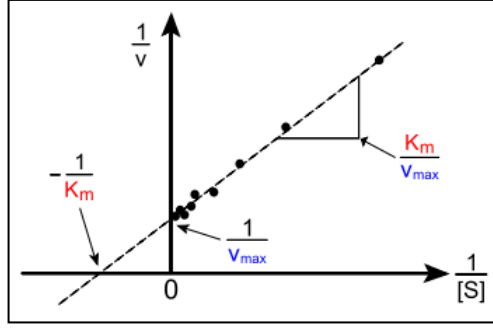
$$y = ax + b \quad (2.15)$$

Eşitlik 2.14'de ifade edilen  $y = \frac{1}{V}$ ,  $a = \frac{K_m}{V_{\max}}$ ,  $x = \frac{1}{[S]}$ ,  $b = \frac{[S]}{V_{\max}[S]}$  benzerliği kullanılarak,

$y = 0$  olduğunda,  $x = \frac{(-b)}{a}$  olduğundan Eşitlik 2.16 elde edilir.

$$x = \frac{(-1)}{K_m} \quad (2.16)$$

Buradan  $K_m$  değeri hesaplanır. Lineweaver-Burk grafiğinin b değerinden ise  $V_{\max}$  elde edilir. Bu şekilde kinetik parametreler tayin edilmiş olur (Şekil 2.17).



Şekil 2.17 Lineweaver-Burk grafiği [29].

#### 2.2.4. Enzim Tutuklaması

Enzim moleküllerinin katalitik aktifliğini koruyarak tekrar tekrar kullanılmasını sağlamak amacıyla, çözünmez katı bir taşıyıcı üzerine fiziksel veya kimyasal olarak bağlanmasına tutuklama denir [20, 30]. Enzim tutuklama yöntemleri üç temel gruba ayrılır; taşıyıcıya bağlanma (carrier binding), çapraz bağlama (cross-link) ve hapsedme (entrappment) (Şekil 2.18). Taşıyıcıya bağlanma ve hapsedme yöntemi kendi içinde farklı şekillerde gerçekleştirilebilir [34].



Şekil 2.18. Enzim tutuklama yöntemleri [29].

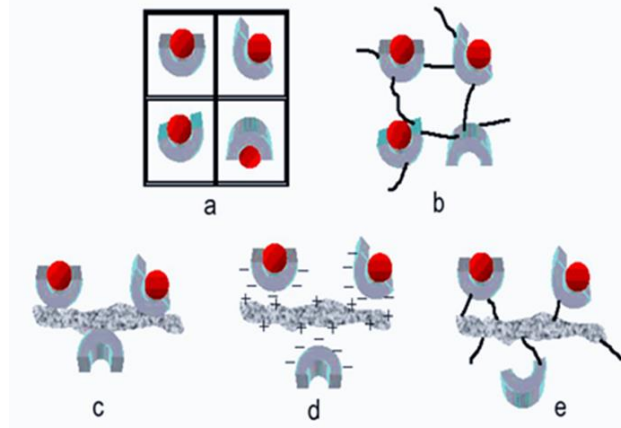
##### 2.2.4.1. Taşıyıcıya Bağlanma Metodu

Taşıyıcıya bağlanma modeli tutuklama yöntemlerinin en eskisidir. Taşıyıcıya bağlanma metodunda kimyasal ve fiziksel kuvvetler sayesinde suda çözünebilir taşıyıcılar üzerinde enzim tutuklaması yapılır. Bu metotta taşıyıcıya bağlı enzim miktarı ve tutuklama sonrası aktivite taşıyıcının yapısına bağlıdır. Taşıyıcının seçimi enzim yapısına bağlı olmakla birlikte, parça boyutuna, yüzey alanına, hidrofilik ve

hidrofobik grupların molar oranına ve kimyasal kompozisyonuna da bağlıdır [29, 34]. Enzimlerin taşıyıcıya bağlanma durumlarına göre bu metot aşağıdaki şekilde sınıflandırılır (Şekil 2.19).

- Fiziksel adsorpsiyon
- İyonik bağ
- Kovalent bağ

Fiziksel adsorpsiyon yöntemi suda çözünmeyen polimer matrisin enzim çözeltisiyle karıştırılarak enzim molekülünün fiziksel olarak bu polimer matrise adsorplanması esasına dayanır. Enzimin adsorpsiyonla matris yüzeyine tutuklanmasında Van der Waals kuvvetleri, iyonik bağlar, hidrojen bağları, elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler etkilidir [29, 34]. Enzimlerin iyonik bağ ile tutuklanması fiziksel adsorpsiyon kadar basit bir metottur. İyonik bağ metodunda tutuklama, taşıyıcı matris ile biyokatalizörlerin karşıt yükleri arasındaki elektrostatik etkileşimle sağlanır. İyonik bağ, kovalent bağdan zayıf olmasına rağmen fiziksel adsorpsiyondan daha kuvvetlidir. Enzim ile suda çözünmeyen bir destek arasında kovalent bağ oluşumu ile enzim tutuklanması da yaygın kullanılan bir metottur. Kovalent bağda atomlar elektron çiftlerini ortak kullanırlar ve bu sayede enzim ve taşıyıcı birbirine sıkıca bağlanabilir. Kovalent bağlamada enzim desteğe kovalent olarak bağlandığından, desorpsiyon yok denecek kadar azdır. Kovalent bağla enzim tutuklanmasında dikkat edilmesi gereken iki nokta: 1) Bağ reaksiyonu enzimatik aktiviteyi düşürmeyecek şekilde ayarlanmalıdır, 2) Enzimin aktif alanı reaktiflerle etkisiz hale gelmemelidir. Enzim molekülleri taşıyıcı yüzeye  $\alpha$ - ve  $\epsilon$ - amino grupları, hidroksil, karboksil, imidazol, sülfidril grupları, fenol halkaları gibi bazı fonksiyonel gruplar üzerinden bağlanır [35].



Şekil 2.19. Enzim tutuklama yöntemleri: a) hapsetme b) çapraz bağlanma c) adsorpsiyon d) iyonik bağlanma e) kovalent bağlanma [36].

#### 2.2.4.2. Çapraz Bağlama

Çapraz bağlama metodunda biyokatalitik birimler (enzimler, organeller, hücreler) iki veya daha çok fonksiyonel grubun yardımıyla birbirlerine bağlanır (Şekil 2.19). Yöntemde molekül içi bağların yanı sıra moleküller arası bağlar da söz konusudur. Çapraz bağlamayla birçok enzim molekülü birbirine bağlandığından, düşük derişimli ve yüksek moleküler ağırlıklı substratlar en içteki katalitik bölgelere ulaşamayacağı için verimin düşmesi söz konusudur. Bu yöntemde, çapraz bağlayıcı olarak kullanılan maddenin enzimin aktif bölgesiyle yapabileceği kimyasal bağ sebebiyle oluşabilecek konformasyonel değişiklikler sebebiyle enzim aktivitesinde düşme gözlenebilir [34].

#### 2.2.4.3. Hapsetme

Hapsetme metodu, kimyasal ya da fiziksel yolla enzimin bir matris içerisine enzimin alıkonması ile oluşturulur (Şekil 2.19). Hapsetme metodunun çapraz bağlama ve kovalent bağdan farkı, enzimle matris arasında hiçbir bağ bulunmamasıdır. Bu sayede hapsetme metodu geniş bir uygulanabilirlik alanı kazanır. Fakat arada bağ olmaması sebebiyle matris gözeneklerinden enzim kaybı söz konusu olabilir. Bu tutuklama metodu kafes ve mikrokapsül tipi olmak üzere ikiye ayrılır [29].

#### 2.2.4.4. Tutuklamanın Yararlılığı

Tutuklamanın temel avantajları:

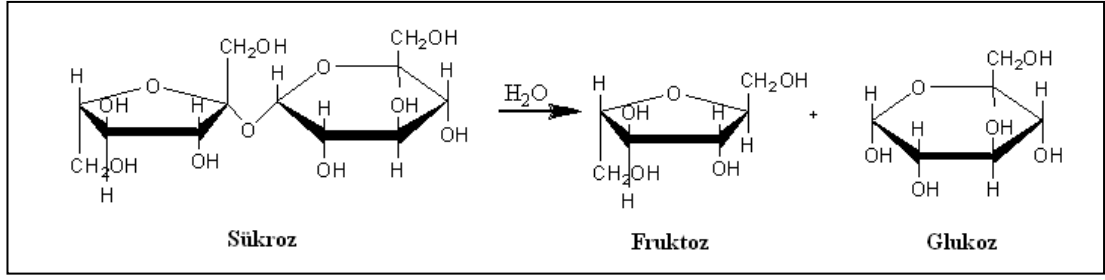
- Tepkimeyi durdurmak için enzimin tutuklandığı matrisin, örneğin enzim elektrodunun tepkime çözeltisinden çıkarılması yeterlidir, dolayısıyla reaksiyonu durdurmak için sisteme inhibitör eklemeye veya sistemi ısıtmamıza gerek kalmaz,
- Enzim elektrodu kesikli ve sürekli proseslerde tutuklama kabiliyetine bağlı olarak uzun süre kullanılabilir,
- Tutuklanmış enzimler ortam koşullarına karşı (pH, sıcaklık vb.) serbest enzimlere göre yüksek kararlılık ve uzun yarılanma ömrü sergiler,
- Tutuklanmış enzimi üründen ayırmak serbest enzime göre daha kolaydır,
- İşlem maliyeti azalır ve işlem süresi kısalmıştır [34, 37].

#### 2.2.4.5. Tutuklamanın Enzim Aktivitesine Etkisi

Tutuklanmış enzimin kinetik özellikleri, çözeltideki serbest enzime göre farklılık gösterebilir. Bu durum enzimi saran mikro çevreye, tutuklama metoduna ve çözünmez taşıyıcının yapısına bağlıdır. Bu nedenler enzim aktivitesinin düşmesine sebep olabilir. Öncelikle kimyasal bir reaksiyon gerçekleştiğinde az da olsa denatürasyon olacağından enzim aktivitesi azalır. Taşıyıcılar enzime yeni bir mikro çevre oluşturacağı için bu durum değişik yollardan enzim aktivitesini engelleyebilir. Tutuklanmış enzimin aktivitesini etkileyen durumlar [34], konformasyonel değişiklik, sterik engel, difüzyon kısıtlama ve inaktivasyon olabilir.

#### 2.2.5. İnvvertaz

İnvvertazın (INV) keşfi 19. Yüzyılın ikinci yarısına dayanır. En erken keşfedilen enzimlerden biridir. Hidroliz enzimlerinin alt grubu olan karbohidrazlardan invvertaz ( $\beta$ -fruktofuranosidaz, E.C. 3.2.1.26), sükrozun  $\alpha$ -1,4-glikozidik bağının parçalanmasıyla eş molar glukoz ve fruktoza hidrolizini (Şekil 2.20) katalizleyen spesifik bir enzimdir ve moleküler ağırlığı 270 kDa'dur. Reaksiyon sonucunda oluşan şeker karışımına invert şeker, olaya ise inversiyon denir [38].



Şekil 2.20. Sükrozun hidroliz reaksiyonu [29].

Ekmek mayasından elde edilen invertaz enziminin optimum pH'sı 4,0–5,5 arasındadır ve bu değer aynı zamanda invertazın en kararlı olduğu pH aralığıdır. Katı haldeki invertaz ısıya oldukça dayanıklıdır. Enzimin optimum sıcaklığı, içinde bulunduğu şeker çözeltisinin konsantrasyonuna bağlı olarak değişir. Ticari invertazın düşük sükroz konsantrasyonlarında optimum sıcaklığı 55 °C iken, konsantre sükroz çözeltisinde optimum sıcaklık 65–70 °C olarak verilir [32].

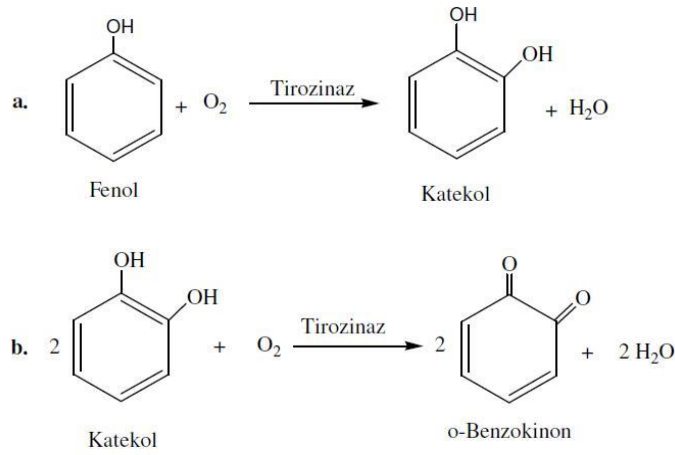
İnvertaz genellikle şekerleme endüstrisinde invert şeker yapımında veya invert şekerden oluşan şurup yapımında kullanılır. Elde edilen fruktozun sükrozdan daha fazla tercih edilmesinin nedeni sükroza göre daha tatlı olması ve yüksek derişimlerde sükrozdan daha az kristalleşmesidir. İvert şeker önceleri geleneksel olarak sükrozun asit hidroliziyle elde edilirken günümüzde bu işlem enzimatik olarak invertaz ile gerçekleştirilir [38]. Çözünebilir invertaz gıda endüstrisinde reçel, yapay bal, krema ve sıvı şekerin endüstriyel üretiminde ve bira sanayinde kullanılmaktadır. Gıda sanayinde invert şeker kullanıldığında, ürünün uzun süre taze ve yumuşak kaldığı görülmüştür. Bu nedenle gıda endüstrisinde invertaz kullanımı her geçen gün artmaktadır [38-40]. İvert şeker üretiminde invertaz serbest olarak kullanılabilirdiği gibi tutuklanmış olarak da kullanılmaktadır. Tutuklanmış invertazın ticari kullanımının az olmasına rağmen, sükroz şurubun yüksek oranda hazırlanmasında, endüstriyel maliyeti azaltmada ve yeniden kullanım özellikleri sayesinde tercih edilir.

İnvertaz enziminin immobilizasyonuyla hazırlanan biyosensör sistemleri çeşitli alanlarda kullanılabilir. İmmobilizasyonda mükemmel çalışma kararlılığı göstermesi, diğer enzimlere göre daha kolay elde edilebilmesi, ucuz olması ve çeşitli taşıyıcılara tutuklanabilmesi sebebiyle, deneysel çalışmalarda model enzim olarak

yaygın bir biçimde kullanılmaktadır [38-42]. Pek çok çalışmada yapılan tutuklamanın performansını kontrol etmek amacıyla bir ön çalışma olarak yer almıştır.

### 2.2.6. Polifenol Oksidaz

Polifenol oksidaz (PPO) (EC 1.10.3.1), tirozinaz, monofenol oksidaz, fenolaz ve katekolaz olarak da isimlendirilir ve moleküler ağırlığı 128 kDa'dur. Enzimatik esmerleşme reaksiyonlarında rol oynayan temel enzimdir. Oksidoredüktaz sınıfının bir üyesi olan ve bakır içeren PPO'lar ilk olarak 1856 yılında Schoenbein'in yapmış olduğu çalışmalar sonucunda keşfedilmiştir [43]. Oksijen varlığında fenolik bileşiklerin oksidasyonunu katalizleyen oksidoredüktaz tipi enzimlerdir ve aktif olmaları için kofaktör olarak bakır gerekir. PPO grubuna ait katekol oksidaz (EC 1.10.3.19), lakkaz (EC 1.10.3.2) ve tirozinaz (EC 1.14.18.1) olmak üzere 3 sınıf enzim bulunmaktadır. Şekil 2.21'de görüldüğü gibi tirozinaz (krezolaz, fenol oksidaz, tirozin-dopa oksidaz) hem monofenol oksidaz hem de difenol oksidaz aktivitesi gösteren bir oksidoredüktazdır.



Şekil 2.21. Tirozinaz enziminin katalizlediği reaksiyonlar: a) Krezolaz aktivite, b) Katekolaz aktivite [20].

Enzim bitkilerde substrat olarak krezolu kullanabildiği için krezolaz olarak da isimlendirilmektedir. Yaygın olarak kullanılan polifenol oksidaz isimlendirmesi ise bitkilerde fenolik bileşiklerin bol bulunmasından dolayıdır. PPO moleküler oksijeni kullanarak iki farklı temel reaksiyonu ardarda katalizler:



1. Monofenollerin orto difenollere hidroksilasyonu (monofenol oksidaz veya krezolaz aktivitesi)
2. *o*-difenollerin *o*-kinonlara yükseltgenmesi (difenol oksidaz, katekol oksidaz veya katekolaz aktivitesi) [44]

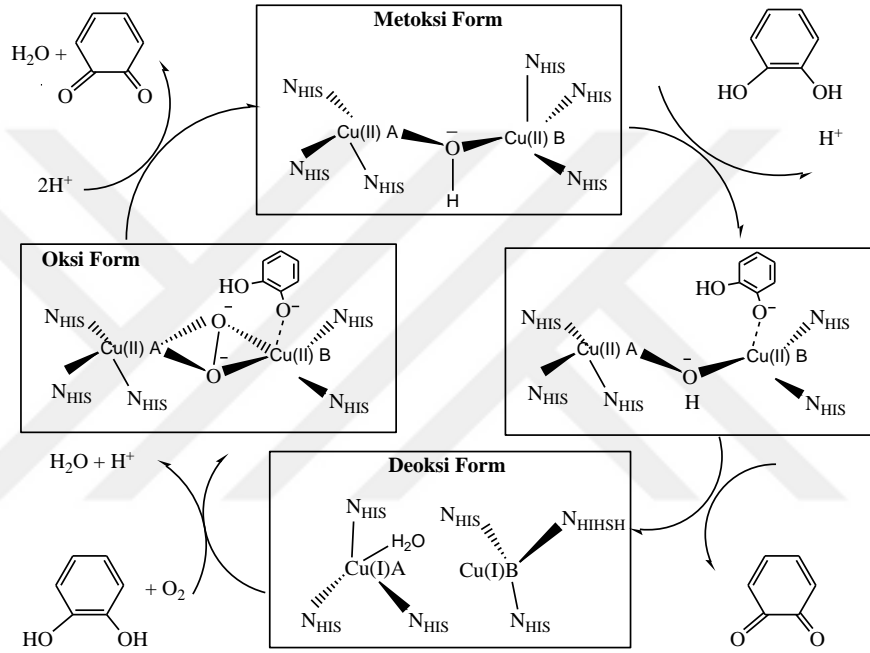
Polifenol oksidaz bitki dokusunda, bazı funguslarda ve insanlar da dahil olmak üzere hayvansal organizmaların saç, deri ve göz pigmentlerinde bulunur. Pek çok sebze, meyve ve baklagilde bulunduğu tespit edilmiştir. Özellikle mantar, şeftali, muz, avokado, elma, patates, üzüm, kahve tohumları ve çay yapraklarında oldukça yüksek miktarda bulunmaktadır [45].

PPO bitkilerde enzim savunma mekanizmasında rol oynar. PPO'nun katalizlediği reaksiyonlar sonucu oluşan kinon bileşiklerinin bitkilerde patojen ve zararlı böceklerle karşı bir savunma sistemi oluşturduğu bilinmektedir. Meyve ve sebzelerin toplanması ve depolanması sürecinde meydana gelen kararmaların başlıca sebebi bu bileşiklerdir. Bitkide yaralanma oluştuğunda enzim sayesinde bu bölgede kinonlar polimerleşir ve bir kabuk oluşturarak bitkiyi mikroorganizma ve böceklerden korur, aynı zamanda dokuda kararma olur [46]. Enzimatik kararma esas olarak oksijen varlığında fenollerin polifenol oksidazlar sayesinde kinonlara dönüşümüdür. Bu reaksiyonlarda oluşan *o*-kinonlar, renksiz yapılardır ve istenilmeyen renk değişimine neden olmazlar. Ancak oluşan *o*-kinon ve türevlerinden daha sonra dimer oluşmakta ve bunlar daha büyük moleküllü polimerlere dönüşmektedir. Renk bozulmalarının esas nedeni esmer renkli olan bu polimerlerdir [47].

İnsan organizmasında tirozinin PPO ile oksidasyonunun son ürünü melanin pigmentidir. İlk olarak PPO enzimi ile tirozinin hidroksilasyonu gerçekleşir ve dihidroksifenilalanin (DOPA) oluşur daha sonra DOPA dopakinona oksitlenir. Dopakinon kararlı değildir ve melanine polimerleşir. DOPA vücutta sinir iletiminde kullanılan ve önemli bir nörotransmitter olan dopaminin ön maddesidir. Bu nedenle krezolaz aktivite insan sağlığı için önemlidir ve beyinde dopamin eksikliği Parkinson hastalığına sebep olur [48].

### 2.2.6.1. PPO Reaksiyon Mekanizması

PPO, Tip 3 bakır proteini olarak bilinmektedir ve aktivite için koenzime ihtiyacı yoktur. Substrat olarak tüm fenolik bileşikleri kullanan ve grup spesifikliğı gösteren enzimlerdir. Genel olarak PPO, oksijen varlığında fenolik substratları oksitler. Şekil 2.22’de görüldüğü gibi PPO’nun aktif merkezleri dinükleer bakır kompleksi içerir ve her bir bakır iyonu üç histidine bağlıdır [44].



Şekil 2.22. PPO enziminin reaksiyon mekanizması [20].

CuA ve CuB olarak adlandırılan bakır atomlarını içeren aktif merkezler çevrimsel olarak metoksi, oksi ve deoksi formlarına dönüşür. Her bir döngüde iki katekol molekülü kinona oksitlenirken, bir molekül oksijen suya indirgenir ve iki molekül kinon oluşur. Enzimin indirgenmiş (Deoksi) halinde, oksijen molekülü CuA’ya bağlı olan çözücü molekülü (H<sub>2</sub>O) ile yer değiştirir ve enzimin bakır merkezine bağlanır. UV/VIS spektroskopi çalışmaları önce moleküler oksijenin peroksit şeklinde bağlandığını, katekolun daha sonra bağlandığı fikrini destekler. Katekol molekülünün iki hidroksil grubundan biri proton kaybeder ve katekol CuB’ye (Oksi form) bağlanır. Substrattan iki elektronun peroksite aktarımından sonra peroksit grubu protonlanır ve O – O bağı kırılır. Substratın ikinci koordine olmamış hidroksil grubu bir proton verir

ve su çıkışı ile *o*-kinon ürünü oluşur. Köprü yapan grubun çözücü ile protonlanması, aktif merkezi hidroksil köprülü dikuprik duruma getirir (Met form). Bir başka katekol molekülü ko-substrat olarak rol oynar ve hidroksil köprülü Cu (II) formunun Cu (I) formuna geri dönmesini sağlar (Şekil 2.22) [20, 44]. Aktif merkezin Cu (I) – Cu (I) formu tekrar katalitik döngüyü başlatarak çevrimi tekrarlar.

### 2.2.6.2. PPO'nun Kullanım Alanları ve Polifenollerin Tayininin Önemi

PPO enzimi meyve ve sebzelerde kararmaya yol açar ve bu nedenle ürünlerin besin ve pazar değerini düşürür. Zedelenmemiş, sağlıklı meyve ve sebze dokularında polifenoller ve PPO enzimi bitki hücresinin farklı kısımlarında bulunurlar. Meyve ve sebzelerin bütünlüğü bozulmadığı sürece enzimatik kararma oluşmaz. Ancak zedelenmeler sonucu bitki dokusunun bütünlüğü bozulduğunda veya meyve ve sebzelerin ürüne dönüştürülmesi için uygulanan doğrama, rendeleme, parçalama ve ezme gibi uygulamalar sırasında enzim ve substratı bir araya gelerek substratın oksijen varlığında yükseltgenmesine neden olur ve ürünün renginde kararmalar oluşur. Günümüzde gıda sektöründe PPO kaynaklı enzimatik kararmaları önlemek için çeşitli PPO inhibitörleri kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan inhibitörler ürünlerin tadına, kokusuna ve kalitesine etki etmeyen, toksik olmayan ve ekonomik olarak uygun maddeler olmalıdır [49].

Gıdaların işlenmesi, sırasında PPO enzimi sebep olduğu kararmalar ile sorun oluştururken, diğer yandan PPO aktivitesi bazı ürünlerin renk, koku, tat gibi özellikleri üzerinde olumlu katkılar da sağlar. Örneğin siyah çay, kahve, kakao, kuru üzüm, incir, hurma, zeytin gibi ürünlerde enzimatik kararma istenen bir olaydır. Taze çay yaprağı yüksek oranda PPO içerir ve oksijen varlığında kateşinlerin oksidasyonunu katalizler. Oluşan kinon türevleri çaya tadını ve aromasını veren teaflavinlerin ön maddesidir [50]. Siyah zeytinde de fenolik bileşiklerin enzimatik yükseltgenmesi istenilen bir değişimdir. Benzer şekilde kuru üzüm, incir ve hurmaların beğenilen renkleri, enzimatik esmerleşme sonucudur. Kakao ve kahvenin renk ve aroması ile siyah zeytinin renk ve lezzetinde de enzimatik kararmanın rolü vardır [51].

1980'li yıllardan itibaren ülkemizde ve dünyada hızlı bir endüstriyel değişim meydana gelmiştir. Endüstriyel atıkların çevreye verilmesi sonucunda birçok atık türünde artış olmuş, çevre numunelerindeki miktarları artmış ve zararları görülmeye başlanmıştır. Fenol ve fenol türevleri patlayıcı madde, farmasötik, plastik, kağıt, boya, ilaç, pestisit ve antioksidanların üretimi gibi bir çok endüstriyel proseste kullanılırlar. Organik kirleticilerin büyük bir grubudur, atıkların önemli bir kısmını oluşturur ve pek çoğu zehirli maddelerdir. Bu nedenle fenoliklerin tayini önem kazanmıştır.

### **2.3. KARBON FİBER**

Karbon fiber, uygun fiberin pirolizi ile oluşur. İstenen ürünü elde etmek için piroliz kontrol edilmelidir. Karbon fiber, tekstil şartları ve tanımlarına göre %90'dan fazla karbon içeren elyaf olarak tanımlanmaktadır. Eğer lif %99 civarından fazla miktarda karbon içeriyorsa, buna "grafit lifi" denir. Çeşitli morfolojilere ve birçok özelliğe sahip karbon fiberler, birçok farklı öncül fiberden üretilir. Poliakrilonitril (PAN), selülozik lifler (viskoz, suni ipek, pamuk), petrol veya kömür katranı zifti ve bazı fenolik lifler en çok kullanılan öncülerdir. Organik öncül liflerin, karbon lif üretmek için kontrollü pirolize maruz bırakılmaları sonucunda oksijen, azot ve hidrojen elimine edilir ve sonuç olarak karbon lifi oluşur. Bu uygulama kristalliği ve yönelimi artırır ve daha iyi mekanik özellikler elde etmek için lif kusurlarını azaltır [52, 53].

Teknolojinin ilerlemesi ile üstün özelliklere sahip ürünlerin kullanımı yaygınlaşmıştır. Bunun sonucu olarak yeni materyallerin üretilmesi veya mevcut materyallerin özelliklerinin iyileştirilmesi üzerine çalışmalar artmıştır. Bu malzemelerin en önemlilerinden biri de karbon fiberlerdir. Karbon lifleri performans/fiyat oranının değişimi ile hızla kompozit materyallerde kullanılan metallerin yerini almaya başlamıştır. Daha hafif, dayanıklı ve daha etkili ticari ürün olan karbon liflerin kompozisyonları artık sadece uzay araçlarında değil otomotiv, inşaat, kağıt endüstrisi ve medikal kullanımlar gibi pek çok alanda yer almaktadır.

İnorganik bir materyal olan karbon lifleri nem, açık hava, baz ve zayıf asitlerden oda sıcaklığında etkilenmemektedir. Kimyasal olarak oldukça inert olan karbon fiberin olağanüstü mekanik ve elektriksel özellikleri vardır. Elektrokimyasal özellikleri

biyosensör uygulamalarında mükemmel bir elektrot olarak kullanılmasını sağlar. CF mikroelektrotlar 1980'lerden beri nöron aksiyon potansiyellerini ölçmek amacıyla kullanılmıştır. CF'ler grafit monofilamentler ve mikroelektrotlar içerisinde, en iyi özelliklere sahip tungsten elektrotlarına benzer üstün özelliklere sahiptirler. CF mikroelektrotların in vivo çalışmalara uygun olması da bu elektrotların geçerliliğini oldukça artırmaktadır [54, 55].

### **2.3.1. Karbon Fiber Enzim Elektrotları**

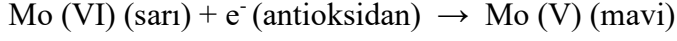
CF mikroelektrotlar özellikle mikronumunelerde (tek damla veya tek hücre içi) yapılan ölçümler için çok uygundur. Enzim, antikor veya protein reseptör moleküllerinin tutuklanması ile elde edilen spesifik elektrotlar ile seçici analizler elde edilir ve bu yöntem, ucuz, basit ve pratik bir yöntemdir. Elektrotların giderek minyatürleşmesine duyulan gereksinim, araştırmaları bu yöne yönlendirmiş ve biyomolekülün minyatürleştirilmiş elektrotlarda tutuklanması önem kazanmıştır. Minyatür sensörler özellikle ex-vivo ve in-vivo klinik uygulamalar için çok uygundur.

Enzim elektrodunun performansı elektrot malzemesine, oluşturulan kompozit malzemeye, enzim tutuklama yöntemine, tutuklama membranının dayanımına, tutuklanan enzimin aktivitesi ve stabilitesine bağlıdır. Aynı zamanda çalışma koşulları da bu performansı etkiler. Elektrodun raf ömrü, kompleks numunelerdeki seçiciliği ve interferant maddelerin varlığındaki performansının geliştirilmesi üzerinde çalışılan diğer konulardır.

### **2.4. ÖRNEK ANALİZİ**

Bu çalışmada oluşturulan karbon fiber enzim elektrotlarıyla çay ekstraksiyon numunelerindeki total polifenol içeriği ölçüldü ve kontrol yöntemi olarak Folin-Ciocalteu yöntemi kullanıldı. Singleton ve arkadaşları tarafından geliştirilen Folin-Ciocalteu metodu toplam fenolik madde içeriğini ölçmek için kullanılır. Bu yöntem, suda ve diğer organik çözücülerde çözülmüş olan fenolik bileşiklerin Folin reaktifi ile alkali ortamda renkli bileşik oluşturması [56] ve bu renk yoğunluğuna göre absorbans ölçümü esasına dayanır. Yönteme adını veren Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) bir

molibdofosfotungstik heteropoliasittir ( $3\text{H}_2\text{O}\cdot\text{P}_2\text{O}_5\cdot 13\text{WO}_3\cdot 5\text{MoO}_3\cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) ve varsayılan aktif merkezi Mo (VI)'dır.



Fenolik bileşikler FCR ile yalnız bazik koşullar altında reaksiyona girerler ve sodyum karbonat çözeltisiyle ortamın pH'ı 10'a ayarlanır. Fenolik bir protonun ayrılması, FCR'yi indirgeme yeteneğine sahip bir fenolat anyonun oluşmasına neden olur ve fenolat ile FCR arasında mavi renkli bileşikler oluşur. FCR, fenolik olmayan pek çok bileşik tarafından da indirgenebilir ve fenolik bileşiklere spesifik değildir. Bu metot gerçekte bir örneğin indirgeme kapasitesini ölçer. Analiz sırasında ortamda bulunan askorbik asit gibi indirgen maddelerle etkileşime uğrayabilir [57].

Bu dezavantaja rağmen metot, kolaylığı, tekrarlanabilirliği ve diğer metotlarla gösterdiği korelasyondan dolayı oldukça sık uygulanmaktadır. Metot sonuçları standart bir fenolik madde, genellikle gallik asit eş değeri olarak verilmektedir.

## BÖLÜM 3

### DENEYSEL ÇALIŞMALAR

#### 3.1. KİMYASAL MALZEMELER VE CİHAZLAR

##### 3.1.1. Kimyasal Malzemeler

Pirol monomeri Merck'ten temin edildi, buzdolabında +4 °C'de saklandı. İnvertaz ( $\beta$ -fruktofuranosidaz) (EC 3.2.1.26) ve sodyum dodesilsülfat Sigma'dan alındı. Nelson reaktifinin hazırlanmasında, sodyum karbonat (Riedel de Haen), sodyum potasyum tartarat (Fluka), sodyum bikarbonat (Merck), sodyum sülfat (Merck), bakır sülfat penta hidrat (Carlo Erba) kullanıldı. Sitrat tamponunun hazırlanmasında sitrik asit (Sigma-Aldrich) ve sodyum hidroksit (Merck) kullanıldı. MBTH çözeltisi hazırlanmasında ise 3-Metil-2-benzodiazolinon hidrazon hidroklorür monohidrat ( $C_8H_9N_3S.HCl.H_2O$ ) (Aldrich) ve etanol (Carlo Erba) kullanıldı. Arsenomolibdat reaktifinin hazırlanmasında, amonyum heptamolibdat tetrahidrat (Merck), sodyum hidrojen arsenat (Riedel de Haen) kullanıldı. Sükroz Merck'den satın alındı ve asetat tamponunun hazırlanmasında, sodyum asetat (Merck) ve asetik asit (Carlo Erba) kullanıldı. Aseton ve katekol Sigma-Aldrich, sülfürik asit Merck firmasından alındı.

##### 3.1.2. Nelson Reaktifi

Nelson reaktifi A'nın hazırlanışı: 25 g susuz  $Na_2CO_3$ , 25 g sodyum potasyum tartarat, 20 g  $NaHCO_3$  ve 200 g susuz  $Na_2SO_4$ , 700 mL distile suda çözülür ve 1000 mL'ye seyreltilir. Nelson reaktifi B'nin hazırlanışı: 15 g  $CuSO_4$ , 100 mL distile suda çözülür ve üzerine derişik  $H_2SO_4$  damlatılır. Aktivite ölçümlerinden önce reaktif A ve B karıştırılır [25/1, (%/v)]. Bu çözelti enzim aktivite tayininde kullanılır.

### 3.1.3. Arsenomolibdat Reaktifi

25 g amonyum heptamolibdat tetrahidrat  $[(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O]$ , 450 mL distile suda çözülür ve üzerine 21 mL derişik sülfürik asit eklenir. 3 g sodyum arsenat dibazik-7-hidrat  $[Na_2HASO_4.7H_2O]$ , 25 mL distile suda çözülür ve bu çözelti molibdat çözeltisine eklenir. Elde edilen çözelti 24-48 saat 37 °C'de etüve konur, daha sonra karanlıkta saklanır ve enzim aktivite tayininde kullanılır.

### 3.1.4. Potansiyometre

Tiyofenin ve pirolün döngüsel voltametriyi GAMRY Instruments Interface 1000 Potentiostat/Galvanostat/ZRA ile alındı. Potansiyostat olarak Wenking POS-88 marka cihaz kullanıldı. Sabit potansiyelde polimerizasyon yapıldı. Çalışma elektrodu ile referans elektrot arasındaki potansiyel sabit bir değerde tutuldu. Çalışma elektrodunun potansiyeli, referans elektrodun elektrik potansiyeline bağlıdır ve referans elektrot yardımı ile gerekli değere ayarlanır.

### 3.1.5. UV – VIS Spektrofotometre

Tutuklanmış enzim aktivitesini tayin etmek amacıyla yapılan ölçümlerde Shimadzu UV-1201V model spektrofotometre kullanıldı. Biyodönüşümden sonra oluşan invertaz ürünlerinin Somogyi-Nelson yöntemi ile renkli kompleksleri oluşturuldu ve 540 nm'de absorbansları ölçüldü. Besthorn's Hydrazone yöntemi ile oluşturulan polifenol oksidaz ürünlerinin renkli komplekslerinin absorbansları ise 495 nm'de ölçüldü ve enzim aktiviteleri bu yöntemlerle belirlendi.

### 3.1.6. SEM

SEM fotoğrafları Karabük Üniversitesi Demir Çelik Enstitüsü MARGEM laboratuvarlarında bulunan Carl ZEISS ULTRA PLUS GEMINI FESEM taramalı elektron mikroskobu ile alındı. Pirol polimerleştirilerek karbon fiber üzerine kaplandı. Boş ve kompozitle kaplanmış karbon fiber elektrodun 1000 ve 10000 arasında büyütme fotoğrafları alındı.



### **3.1.7. pH metre**

Hanna Instruments HI 221 marka pH metre kullanıldı. Bu cihaz elektrik sinyali üreten bir elektrot kullanılarak sinyali, pH birimine çeviren potansiyometrik bir ölçüm sağlar. pH ölçümü yapabilmek için gerekli olan, algılama elektrodunun ürün içindeki hidrojen iyon aktivitesinin logaritmasına oransal olarak sağladığı gerilim ile referans elektrodun ideal olarak ürünün aktivitesinden bağımsız, sabit ve sürekli sağladığı gerilimdir. Elektriksel sinyal bu iki gerilim arasındaki fark ile oluşur. Referans ve algılama elektrodu arasındaki gerilim farkı pH metre tarafından ölçülerek pH değerine çevrilir.

### **3.1.8. Manyetik Isıticılı Karıştırıcı**

Hazırlanan çözeltilerin aynı devir sayısında ve sıcaklıkta homojen bir şekilde karıştırılması MTOPS MS300 HS marka ısıtıcı manyetik karıştırıcı ile bir balık (mıknatıs) yardımıyla ve manyetik alan etkisiyle sağlanmıştır.

### **3.1.9. Vorteks Tüp Karıştırıcı**

Dlab MX-S Marka karıştırıcı sabit hızda kullanıldı. Deney tüplerindeki çözeltilere verimli ve etkili karıştırma sağlayarak homojen bir karışım elde etmek için kullanıldı.

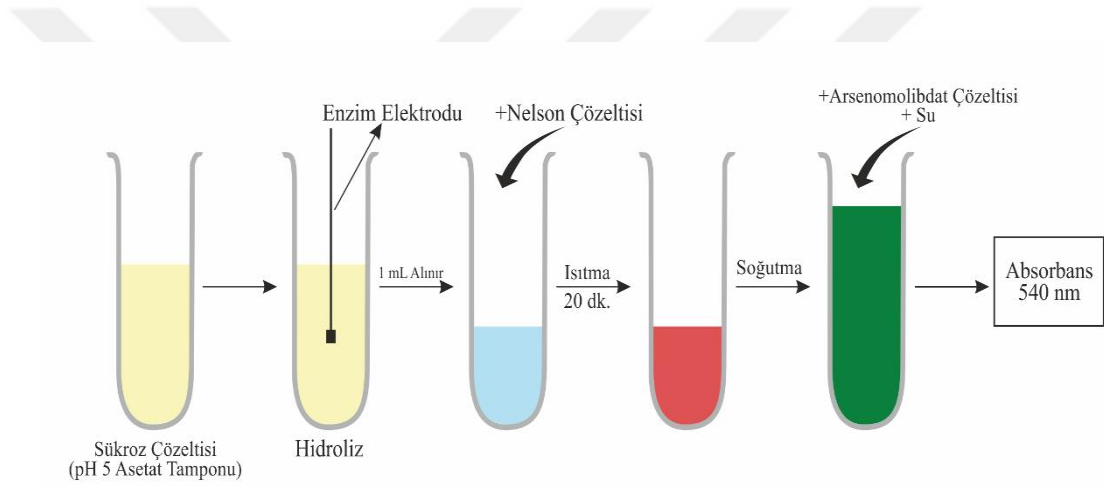
### **3.1.10. Çalkalayıcı Su Banyosu**

Ölçümler Nuve ST 30 marka çalkalamalı su banyosu ile yapıldı. Ölçümler, çözeltiler çalkalamalı su banyosunda 25 °C sabit sıcaklıkta tutularak ve çalkalama ile homojen karışımları sağlanarak gerçekleştirildi. Sıcaklık optimizasyonunda su banyosu 0 °C ve 80 °C arasındaki sıcaklıklara getirilerek aktivite ölçümleri yapıldı ve enzim elektrodunun en iyi çalıştığı sıcaklık saptandı.

## 3.2. KULLANILAN METOTLAR

### 3.2.1. Somogyi-Nelson Yöntemi

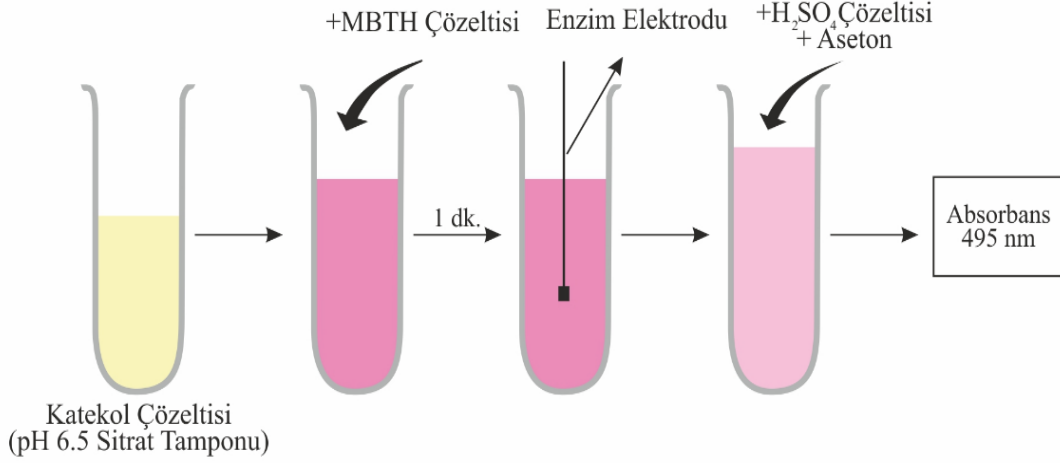
Şekil 3.1’de görüldüğü gibi önce çeşitli derişimlerde süktroz çözeltileri hazırlanır. Çözeltilere belli sürelerde enzim elektrodu daldırılır. Ürün oluşumundan sonra Nelson reaktifi eklenir. Kaynar su banyosunda ısıtma yapılır ve arsenomolibdat reaktifi eklenir. Oluşan renkli komplekslerin absorbsansları 540 nm’de ölçülerek enzim aktiviteleri tayin edilir. Kullanılan Somogyi-Nelson yöntemi [58-60] literatürdeki işlem basamaklarıyla uygulanır (Bkz. 3.3.7).



Şekil 3.1. Somogyi-Nelson yönteminin işlem basamakları [20].

### 3.2.2. Besthorn’s Hydrazone Yöntemi

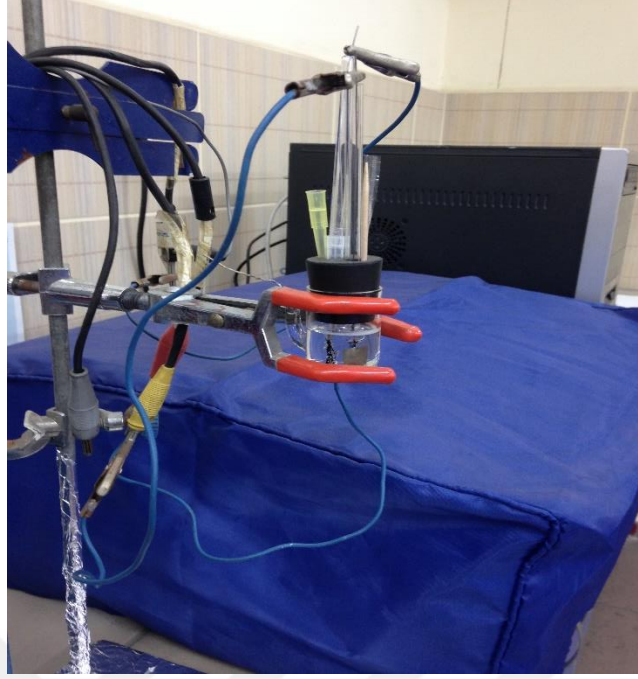
Farklı derişimlerde katekol çözeltileri hazırlanır. Çözeltilere önce MBTH reaktifi eklenir. Sonrasında belirli sürelerde enzim elektrodu daldırılır. Ürün oluşumundan sonra sülfürik asit ve aseton eklenir. Oluşan renkli komplekslerin 495 nm’de absorbsansları ölçülerek enzim aktiviteleri tayin edilir (Şekil 3.2). İzlenen bu Besthorn’s Hydrazone yöntemi literatürdeki işlem basamaklarıyla uygulanır (Bkz. 3.3.7). Bu yöntemde kullanılan MBTH çözeltilisi reaktifin 3,0 mg/mL olacak şekilde etil alkolde çözülmesiyle hazırlanır.



Şekil 3.2. Besthorn's Hydrazone yönteminin işlem basamakları [20].

### 3.2.3. Elektrokimyasal Polimer Sentezi

Polimerizasyonun gerçekleşeceği hücreye tampon çözelti, monomer, enzim ve elektrolit eklendi. Kullanılan malzemelerin derişimleri daha önce farklı elektrotlar ile hazırlanan çalışmalardan yararlanılarak belirlendi. Polifenol oksidaz enzimi için sitrat tamponu, invertaz için asetat tamponu, monomer pirol ve elektrolit olarak sodyum dodesil sülfat kullanıldı. Çalışma elektrodu karbon fiber, referans elektrot gümüş ve karşıt elektrot olarak platinin seçildiği bu sistem elektropolimerizasyonda üç elektrotlu sistem olarak kullanılır. Sistem potansiyostata bağlandıktan sonra PTh sentezi dönüşümlü voltametri ile 0,0 – +2,4 V arasında, PPy sentezi ise -1,2 – +0,6 V arasında tarama yapılarak polimerizasyon gerçekleştirildi. Polimerizasyon sırasında çalışma elektroduna doğru yönelen monomer molekülleri ile enzim birlikte taşınarak tutuklanmış oldu (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Polimerizasyonun gerçekleştirildiği elektrokimyasal hücre.

#### 3.2.4. Kompozit Matrise Enzim Tutuklanması

Bu çalışmada tercih edilen hapsetme yöntemi diğer metodlara göre daha avantajlıdır. Enzim hapsetme ile tutuklandığında daha uzun süre kararlı ve dayanıklı kalırken daha yüksek sinyaller alınmasını sağlar. İnvvertaz enzimi için hazırlanan elektroliz çözeltisi 0,05 M asetat tamponu (pH 5,0) içerisinde 0,6 mg/mL invertaz, destek elektrolit olarak 0,6 mg/mL sodyum dodesilsülfat ve 5,0  $\mu$ L/mL pirolle hazırlandı. Bu işlemde sonra enzim elektrodu distile su ile birkaç kez yıkanarak +4°C’de asetat tamponunda saklandı. Polifenol oksidaz enziminin tutuklanması ise 0,05 M sitrat tamponu (pH 6,5) kullanılarak gerçekleştirildi. Polifenol oksidaz enzimi derişimi 0,4 mg/mL (2687 U/mg katı), SDS 1,0 mg/mL ve pirol 5,0  $\mu$ L/mL olacak şekilde ayarlandı. Kullanılmadığı zaman +4°C’de pH 6,5 sitrat tamponunda saklandı.

#### 3.2.5. Elektrotların (CF) Hazırlanması

Elektrotlar Torayca T300 marka 50  $\mu$ m çaplı 1K karbon fiberler elektrot ucu olmak üzere hazırlandı. Çelik teller 10 cm uzunluğunda kesildi. Çelik tel ve karbon fiber uç teflon bant ile uç uca birleştirildi [61]. Elektrot karbon fiber ucundan 1-200  $\mu$ L

eppendorf pipet ucuna geçirildi ve pipet ucu ısıtılarak kapatıldı. Karbon fiberin elektrot ucunda kalan kısmı 1 cm olacak şekilde kısaltıldı. Pipet ucunun arka kısmına çelik teli içine alacak şekilde cam tüp geçirilerek elektrot hazırlanmış oldu (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Karbon fiber enzim elektrodu.

### 3.2.6. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Tutuklanmış invertazın aktivitesi Somogy-Nelson metoduyla belirlendi (58, 59). Substrat olarak sükrozun kullanıldığı bu çalışmada sükroz çözeltileri pH 5,0 asetat tamponunda hazırlandı. Eşit derişimli hazırlanan çözeltilere invertaz enzim elektrodu 0, 2, 4, 6'şar dakika daldırılarak sükrozun monosakkaritlerine hidrolizi gerçekleştirildi. Elektrot çıkarıldıktan sonra çözeltiden 1 mL alınıp üzerine Nelson reaktifi eklenerek reaksiyon sonlandırıldı. Tüpler 20 dk kaynar su banyosuna konuldu ve sonrasında oda sıcaklığına soğumaya bırakıldı. Tüplere sırası ile 1 mL arsenomolibdat reaktifi ve 7 mL distile su eklendi. Karıştırıldıktan sonra oluşan renkli çözeltilerin 540 nm'de absorbans ölçümleri yapıldı. Absorbansa karşı zaman grafikleri çizilerek, grafik eğimlerinden reaksiyon hızı saptandı. Her bir derişim için elektrotların aktiviteleri belirlendi.

Polifenol oksidaz enziminin aktivite tayininde Besthorn's Hydrazone yöntemi prosedürü uygulandı. Substrat olarak pirokatekol tercih edildi. Pirokatekolun farklı

derişimlerdeki çözeltileri sitrat tamponu pH 6,5 içerisinde hazırlandı. Çözeltilere 1'er mL MBTH reaktifi eklenerek enzim elektrodu 0, 5, 10, 15 dakika daldırılarak fenollerin *o*-kinonlara dönüşümü sonra da kinonların MBTH ile kompleks oluşumu gerçekleştirildi. Sonrasında 1'er mL sülfürik asit ve aseton eklenerek 495 nm'de absorbans ölçümleri yapıldı. Absorbansa karşı zaman grafikleri çizildi ve grafiklerin eğimlerinden reaksiyon hızı saptanarak, enzim elektrodu aktiviteleri belirlendi.

### **3.2.7. Kinetik Parametrelerin Tayini**

Yapılan ölçümlerle enzim aktivitesi  $V$ 'ye karşı substrat derişimi  $[S]$  grafikleri ve daha sonra Lineweaver-Burk grafikleri ( $1/V$ 'ye karşı  $1/[S]$ ) çizildi. Bu grafiklerden Michaelis-Menten yöntemiyle enzim elektrodunun kinetik parametreleri olan maksimum enzim aktivitesi ( $V_{max}$ ) ve Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ) saptandı ve enzim elektrodunun karakterizasyonu invertaz ve polifenol oksidaz enzimleri için ayrı ayrı yapıldı.

### **3.2.8. Optimum pH'ın Belirlenmesi**

İnvertaz ve polifenol oksidaz enzimleri için ayrı ayrı pH optimizasyonları yapıldı. Bu amaçla, enzim elektrotlarının pH 3,0 ve 10,0 arasındaki pH değerlerinde aktivite ölçümleri yapıldı ve enzim elektrodunun en iyi çalıştığı optimum pH değeri saptandı.

### **3.2.9. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi**

İnvertaz ve polifenol oksidaz enzimleri için ayrı ayrı sıcaklık optimizasyonları yapıldı. Bu amaçla, enzim elektrotlarının 0°C ve 80°C arasındaki sıcaklıklarda aktivite ölçümleri yapılarak enzim elektrodunun en iyi çalıştığı sıcaklık saptandı.

### **3.2.10. Kararlılığın Belirlenmesi**

Ardarda yapılan ölçümlerle enzim elektrotlarının stabilitesinin saptanması hedeflendi. Aynı gün içinde arka arkaya yapılan aktivite ölçümleri ile ölçüm sayısı arttıkça aktivitede değişim olup olmadığına bakıldı. Böylece enzim elektrodunun kararlılığı iki enzim için de ayrı ayrı belirlendi.

### **3.2.11. Raf Ömrünün Belirlenmesi**

PPO için 45 günlük bir süre invertaz için 25 gün boyunca her iki ya da üç günde bir aktivite ölçümleri yapılarak enzim elektrodunun bu süre içinde kararlılığının nasıl değiştiğine bakıldı ve her iki enzim için de raf ömrü belirlendi.

## **3.3. ÇAY ÖRNEKLERİNDE FENOLİK MADDE TAYİNİ**

### **3.3.1. CF/PTh–PPy/PPO Enzim Elektroduyla Analiz**

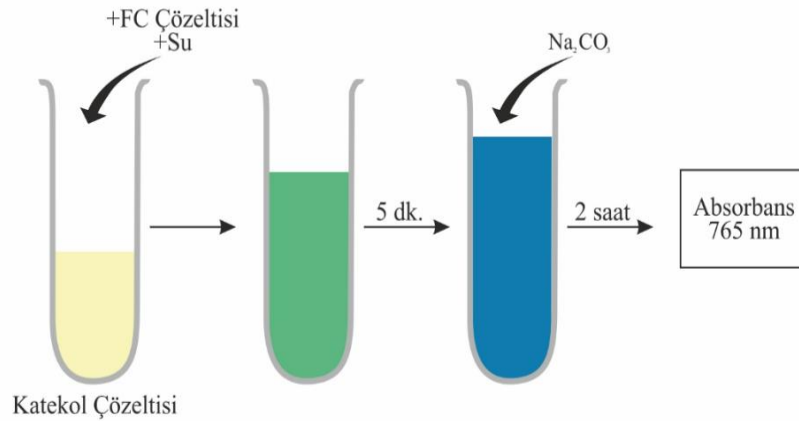
Numune olarak Çaykur Altınbaş çayının toz çayı ve demlik poşeti kullanıldı. Her iki çay ekstraktı da aynı şekilde demlenerek hazırlandı. 5,0 g toz çay veya 1 demlik poşeti (5,0 g) üzerine 200 mL kaynamış su eklenerek numuneler su banyosuna (70°C) yerleştirildi. Demlenme süreleri 10, 20, 30, 40 dakika olarak belirlendi. Her bir demlenme süresinin sonunda ekstraktlardan 5 mL numune alınarak filtre kağıdından süzüldü ve analiz edildi.

Tampon içinde hazırlanan farklı derişimlerdeki katekol standart çözeltileri kullanılarak kalibrasyon eğrisi hazırlandı. Önce CF/PTh–PPy/PPO elektrodu çözeltilere 10'ar dakika daldırıldı, ardından Besthorn's Hydrazone metodu uygulanarak 495 nm'de absorbanları ölçüldü. 5,0 mL alınan çay ekstraksiyon numuneleri ise tamponla 1:3 seyreltildi, aynı şekilde elektrot 10 dk daldırılarak aynı metot uygulandı. Sonuçlar kalibrasyon grafiğinde yerine konarak seyreltilmiş numunelerdeki toplam polifenolik madde miktarı mg katekol eşdeğeri olarak saptandı.

### 3.3.2. Folin-Ciocalteu Yöntemiyle Analiz

Çay ekstraksiyon numuneleri Çaykur Altınbaş çayından hazırlandı. 5,0 g toz çay veya bir demlik poşeti üzerine 200 mL kaynamış saf su eklendi ve 70°C su banyosuna yerleştirilerek demlenmeye bırakıldı. 10, 20, 30 ve 40 dakika demlenme sürelerinde numune alınarak Folin-Ciocalteu yöntemiyle analiz edildi.

Kontrol yöntemi olarak kullanılan Folin-Ciocalteu metodu katekole adapte edilerek kalibrasyon grafiği katekol çözeltileriyle hazırlandı. Şekil 3.5’de görüldüğü gibi önce farklı derişimlerde katekol ara standartları (0,1 ve 2,0 mg/mL arasında 6 derişim olacak şekilde) hazırlandı. Ara standartlardan 40 µL alınarak üzerine 3,16 mL su ve 200 µL Folin-Ciocalteu reaktifi eklendi. Karıştırıldı ve 5 dakika bekleme süresinden sonra 600 µL %20’lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi eklendi, karıştırıldı. Son derişimler 0,065 ve 1,300 mg/mL arasında 6 derişim olarak elde edildi. 2 saat bekleme süresinden sonra çözeltilerin absorbsansları 765 nm’de ölçüldü ve kalibrasyon grafiği oluşturuldu. Aynı işlemler 40 µL çay numunesi alınarak numuneler için de uygulandı ve absorbsans değerleri ölçülerek kalibrasyon eğrisinden numunelerdeki total polifenol miktarı mg katekol eşdeğeri olarak tespit edildi.



Şekil 3.5. Folin-Ciocalteu metodunun işlem basamakları [20].



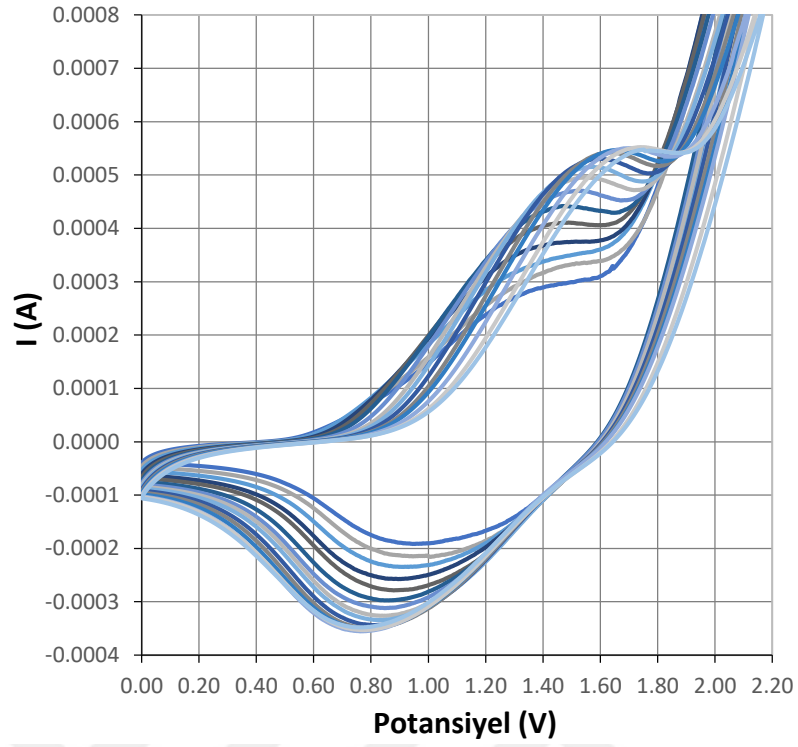
## BÖLÜM 4

### DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

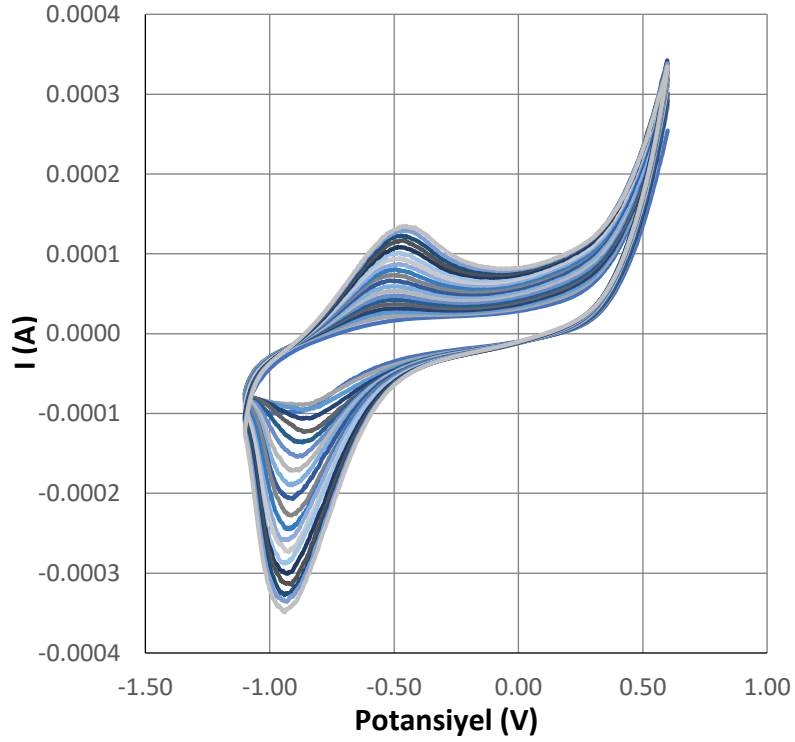
Bu çalışmada invertaz ve polifenol oksidaz enzimleri, politiyofenle polipiroiden oluşan kompozit matrise tutuklandı. Enzim elektrotları karbon fiber üzerine iletken polimerin elektrokimyasal senteziyle oluşturuldu ve enzim matris içine hapsedme yöntemiyle yerleştirildi. Dönüşümlü voltametri ve SEM ile kompozitin oluşumu ve morfolojisi gösterildi. Hazırlanan karbon fiber enzim elektrotlarının kinetik karakterizasyonu yapıldı, optimum koşullar saptandı, stabilite tayini yapıldı. Çalışmanın sonunda elektrotlarla çay numunelerinde toplam polifenolik madde analizi yapıldı. Kalibrasyon grafiği oluşturularak LOD saptandı.

#### 4.1. ELEKTROPOLİMERİZASYON ve SEM ANALİZLERİ

Tiyofenin elektropolimerizasyonu dönüşümlü voltametri ile yapıldı. ACN'de 0,05 M TBABF<sub>4</sub> elektroliti ve 8.10<sup>-2</sup> M tiyofen içeren çözelti kullanıldı. 100 mV/s tarama hızıyla 25 çevrim boyunca 0,0 – +2,4 V tarama aralığında tarandı. Şekil 4.1'de yer alan voltamogramda tiyofenin yükseltgenme ve indirgenme pikleri görülmektedir. Pik akımının her taramada artması polimerizasyonun ilerlediğini gösterir. Daha sonra, sentezlenen PTh filmi üzerine pirolün polimerizasyonu yapılarak iki tabakalı kompozit yapı oluşturuldu. Şekil 4.2'de pirolün sentez voltamogramı görülmektedir. Tarama -1,2 – +0,6 V arasında yapıldı. Her çevrimde artan pik akımları polimerleşmenin gerçekleştiğini gösterir.

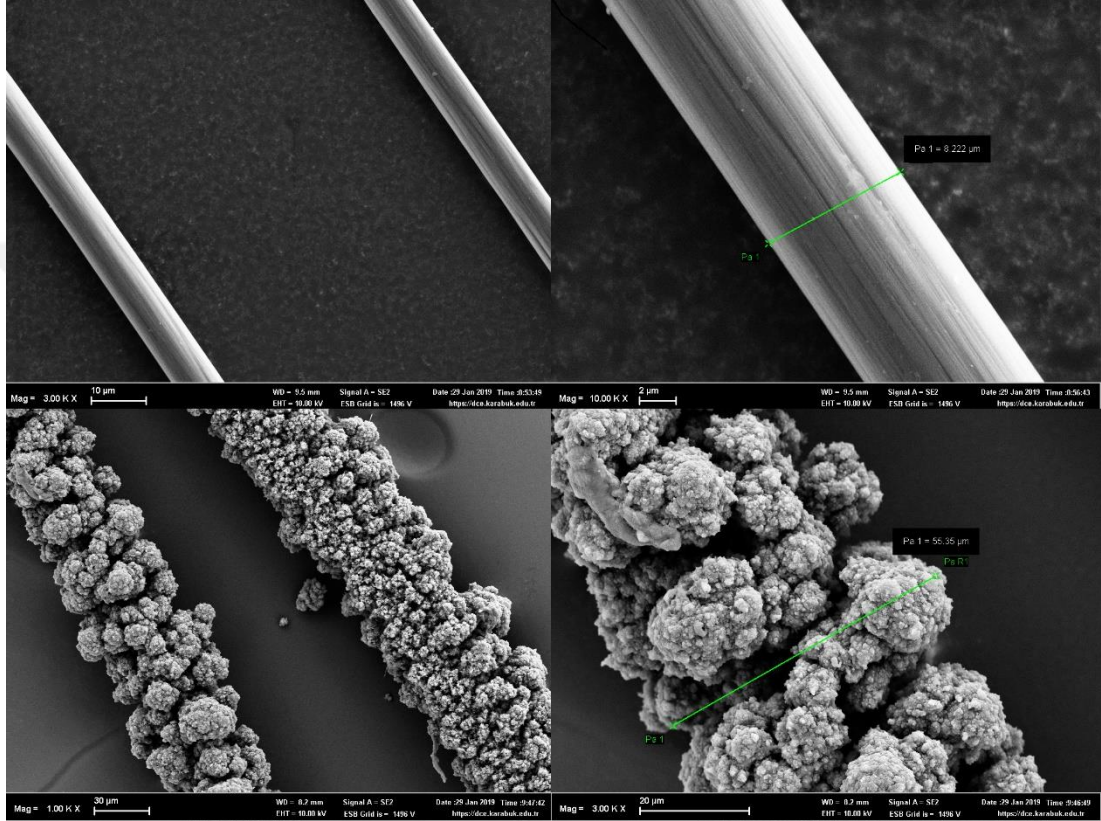


Şekil 4.1. Politiyofenin polimerleşme voltamogramı.



Şekil 4.2. Polipirolün polimerleşme voltamogramı.

Karbon fiberlerin polimerle kaplanmadan önce ve kaplandıktan sonra alınan SEM görüntüleri Şekil 4.3’de görülmektedir. SEM görüntüleri 3000 ve 10000 büyütme ile alınmıştır ve karbon fiberin çapı 8,22  $\mu\text{m}$ ’dir. Kaplanmış karbon fiberin çapı ise 55,35  $\mu\text{m}$  olarak ölçülmüştür. Kompozitle kaplanan karbon fiberin çapı artmıştır ve dış görünüşü polipirolün tipik karnabahar görünümüne sahiptir.



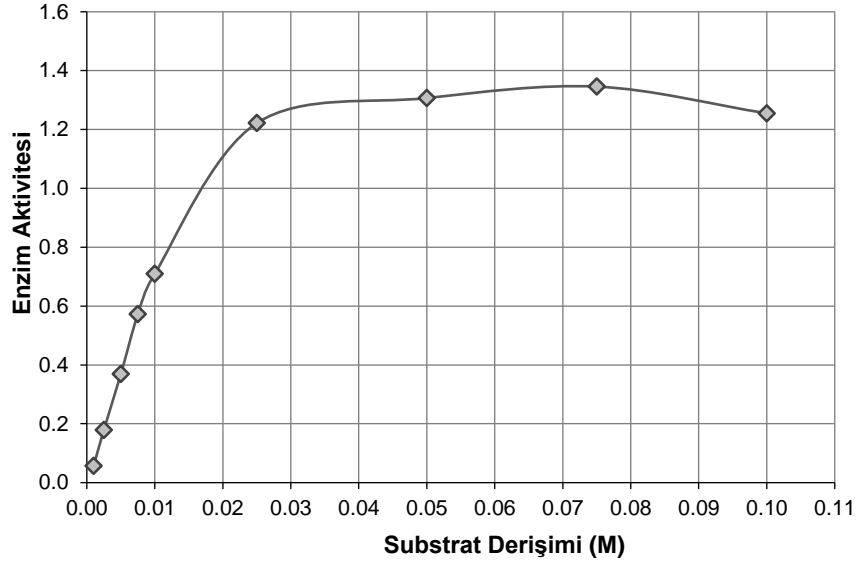
Şekil 4.3. Kaplama öncesi ve sonrası karbon fiber SEM görüntüleri.

## 4.2. ENZİM ELEKTROTLARININ AKTİVİTE ÖLÇÜMLERİ VE KİNETİK KARAKTERİZASYONU

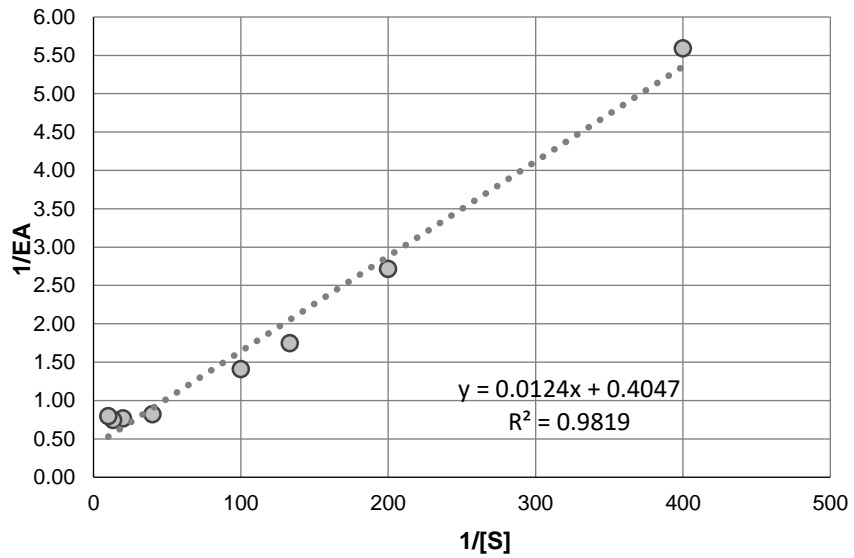
Enzim tutuklanmış karbon fiber elektrotların aktivite tayinleri ile kinetik karakterizasyonları yapılmıştır. Bu amaçla sabit pH ve sabit sıcaklıkta farklı substrat derişimleri ile maksimum reaksiyon hızı ( $V_{\text{max}}$ ) ve Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ) belirlenmiştir. Oluşturulan Michaelis-Menten grafiklerinden Lineweaver-Burk grafikleri elde edilmiş, buradan da enzim elektrotlarının kinetik parametreleri bulunmuştur.

#### 4.2.1. İnvertzaz Enzim Elektrotları

Hazırlanan CF/PTh-PPy/INV elektrotlarının Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri Şekil 4.4 ve 4.5'de görülmektedir.  $V_{max}$  ve  $K_m$  sırasıyla  $2,471 \pm 0,150$   $\mu\text{mol/dak. elektrot}$  ve  $30,60 \pm 5,30$  mM olarak bulunmuştur.



Şekil 4.4. CF/PTh-PPy/INV elektrodunun Michaelis- Menten grafiği.



Şekil 4.5. CF/PTh-PPy/INV elektrodunun Lineweaver-Burk grafiği.

Tutuklanmış enzimin aktivitesi serbest enzime göre daha düşüktür. Enzimin bir matriste tutuklanması aktivitesinde azalmaya sebep olur. Bu nedenle  $V_{max}$  azalır,  $K_m$  ise genellikle artar.  $K_m$  enzimin substrata ilgisini gösterir ve yüksek  $K_m$  düşük substrat ilgisini ifade eder. Bu anlamda  $K_m$ 'in yükselmesi enzimle substratın bir araya gelmelerinin zorlaştığını ifade eder. Enzim tutuklandığında bu beklenen bir sonuçtur. Serbest enzim substratıyla çok daha kolay bir araya gelir ve  $K_m$  değeri daha düşüktür, enzim aktivitesini gösteren  $V_{max}$  ise daha büyüktür.

Çizelge 4.1. CF/PTh-PPy/INV elektrodunun kinetik parametreleri.

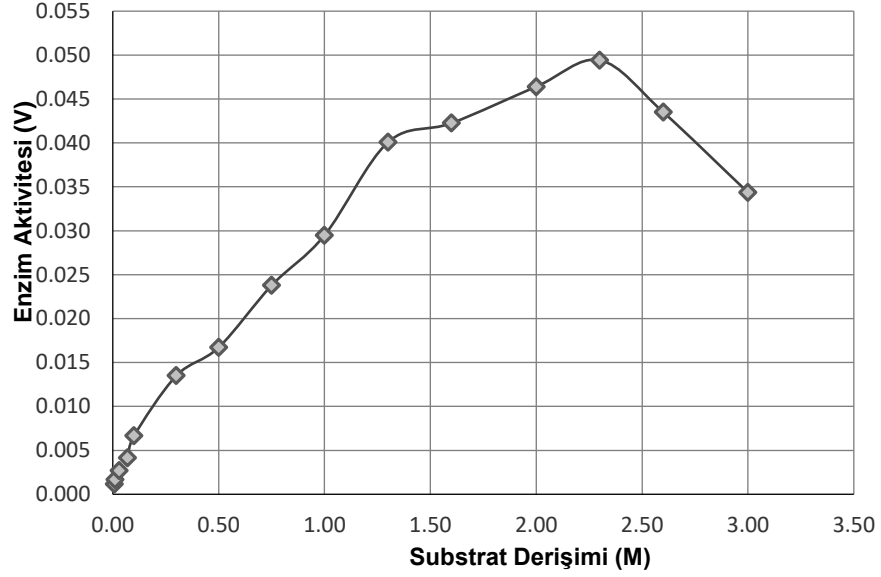
	$V_{max}$	$K_m$ (mM)
Serbest invertaz [62]	82,30 $\mu\text{mol/dak.mL}$	24,30
CF/PPy/INV elektrodu [20]	0,779 $\pm$ 0,120 $\mu\text{mol/dak.elektrot}$	27,20 $\pm$ 6,70
CF/PTh-PPy/INV elektrodu	2,471 $\pm$ 0,150 $\mu\text{mol/dak.elektrot}$	30,60 $\pm$ 5,30

Çizelge 4.1'de serbest ve tutuklanmış enzimin  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri verilmiştir. Serbest enzimin  $V_{max}$ 'ı beklendiği gibi tutuklanmış enzime göre çok daha yüksektir. Serbest ve tutuklanmış enzimin  $K_m$  değerleri ise birbirine yakındır. Tutuklanma enzimin substrata olan ilgisinde kayda değer bir değişim yapmamıştır. Bu da bize enzimin polipirol ve PTh-PPy kompozitinde tutuklandığında substratıyla rahatlıkla buluşabildiğini anlatır.

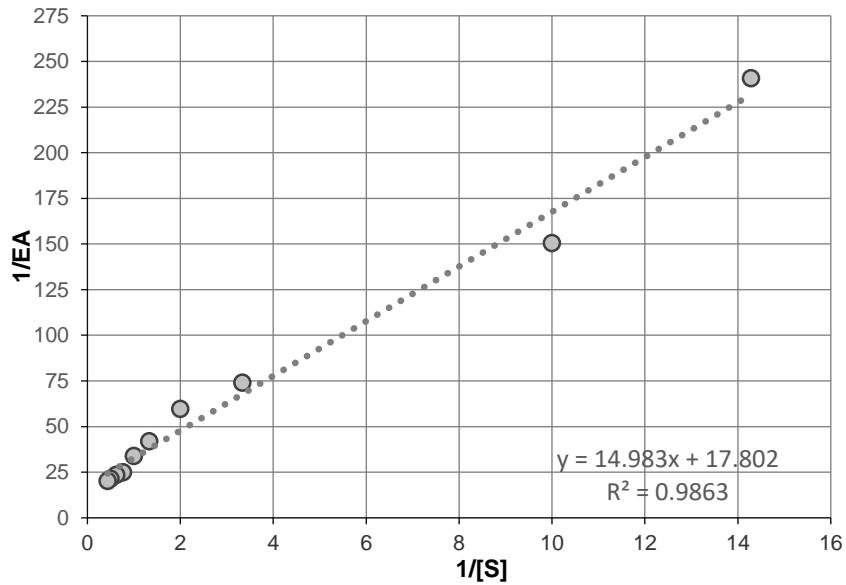
Tutuklanmış invertazın polipirol ve kompozit malzemedeki  $V_{max}$  değerlerini karşılaştırsak, kompozitle hazırlanmış elektrotta  $V_{max}$  daha yüksektir ve polipiroldeki  $V_{max}$  değerinin yaklaşık 3 katıdır. Bu durum yüzey alanı ve kaplanan polimer alanıyla ilgilidir. Elektrodun yüzey alanı yüksekse tutuklanan enzim miktarı da yüksek olacaktır. Polimerin yüzeyi gözenekli bir yapıdır ve yüzey alanı yüksektir. Kompozitte  $V_{max}$ 'ın daha yüksek olması bize bu gözenekli yapıda daha çok enzim tutuklandığını anlatır. Kompozitin  $K_m$  değeri ise polipiroiden yüksektir ve enzimin substrat ilgisinde kompozit matrisle hazırlanmış elektrotta biraz düşüş olduğunu gösterir.

#### 4.2.2. Polifenol Oksidaz Enzim Elektrotları

CF/PTh–PPy/PPO elektrotlarının Michaelis-Menten grafiği Şekil 4.6’da verilmiştir. Bu grafikten Lineweaver-Burk grafiği elde edilmiş (Şekil 4.7),  $V_{max}$  ve  $K_m$  sırasıyla  $0,056 \pm 0,012 \mu\text{mol/dak.elektrot}$  ve  $842,00 \pm 37,50 \text{ mM}$  olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.6. CF/PTh–PPy/PPO elektrodunun Michaelis-Menten grafiği.



Şekil 4.7. CF/PTh–PPy/PPO elektrodunun Lineweaver-Burk grafiği.

Serbest PPO enziminin  $V_{max}$  değeri karbon fibere tutuklanmış enzimin  $V_{max}$ 'ından beklendiği üzere daha büyüktür,  $K_m$  değeri ise daha düşüktür (Çizelge 4.2). Karbon fiber elektrotlara tutuklanan enzimlerin değerleri karşılaştırıldığında kompozite tutuklanan enzimin  $V_{max}$  değerinin daha yüksek olduğu görülür. Tutuklanmış invertazda da gözlemlendiği gibi burada da kompozitin daha gözenekli bir yapıya sahip olması yani yüzey alanının daha yüksek olması ve daha çok enzim tutuklanmış olması söz konusudur. Burada da invertazda olduğu gibi kompozitdeki  $V_{max}$  değeri polipiroldeki  $V_{max}$  değerinin yaklaşık 3 katıdır. Öte yandan kompozitle hazırlanmış elektrodun  $K_m$  değeri çok daha yüksektir ve polipirol elektrodunun  $K_m$  değerinin yaklaşık 5 katıdır. Yani karbon fiber yüzeyde enzimin substratıyla biraraya gelmesi daha zorlaşmıştır. Polifenol oksidaz enzimi moleküler ağırlığı daha düşük bir enzimdir ve invertaza göre daha küçük bir moleküler yapıya sahiptir. Bu nedenle karbon fiber yüzeyindeki gözeneklere daha derin yerleşebilir. Bu durum substratıyla buluşmasını etkiler ve  $K_m$  değerini yükseltir.

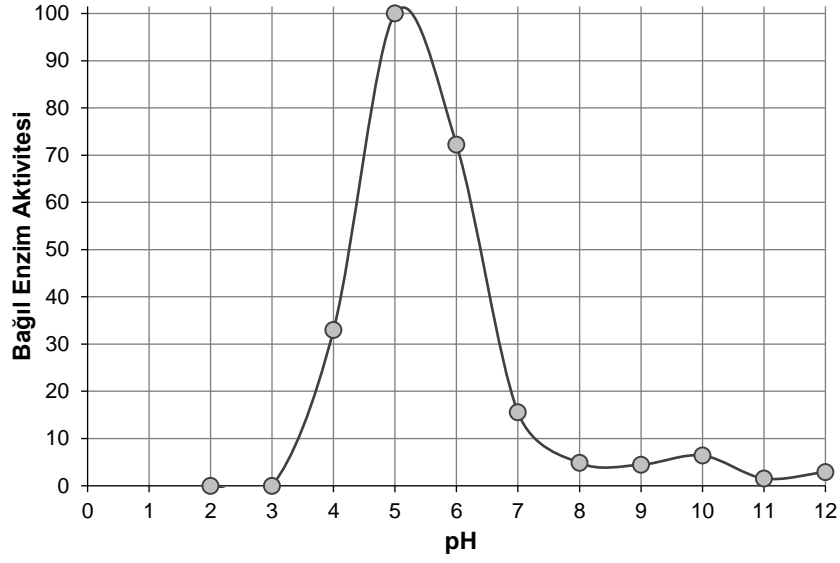
Çizelge 4.2. CF/PTh-PPy/PPO elektrodunun kinetik parametreleri.

	$V_{max}$	$K_m$ (mM)
Serbest PPO [20]	0,073 $\mu\text{mol/dak.mL}$	4
CF/PPy/PPO elektrodu [20]	0,017 $\pm$ 0,004 $\mu\text{mol/dak.elektrot}$	176,00 $\pm$ 26,60
CF/PTh-PPy/PPO elektrodu	0,056 $\pm$ 0,090 $\mu\text{mol/dak.elektrot}$	842,00 $\pm$ 32,03

### 4.3. ENZİM ELEKTROTLARININ OPTİMİZASYONU

#### 4.3.1. CF/PTh-PPy/INV Elektrot Aktivitesine pH Etkisi

pH değişiminin tutuklanmış invertazın aktivitesine etkisi incelenmiştir. Literatürde serbest ve platin elektroda kaplanmış polipirolde tutuklanan invertazın en yüksek aktivite gösterdiği pH değerleri 4,6 ve 5,0 olarak verilmiştir. Burada karbon fiber elektroda kaplanan kompozitde tutuklanan invertazın optimum pH'ı da 5,0 olarak bulunmuştur (Şekil 4.8). Tutuklanan invertazın pH'sı serbest enzime göre biraz bazik tarafa kaymıştır. Bunun nedeni tutuklanmayla birlikte enzimde oluşan konformasyonel değişiklikler olabilir. Bu elektrotların karakterizasyon ve optimizasyonlarında pH 5,0 kullanılmıştır.

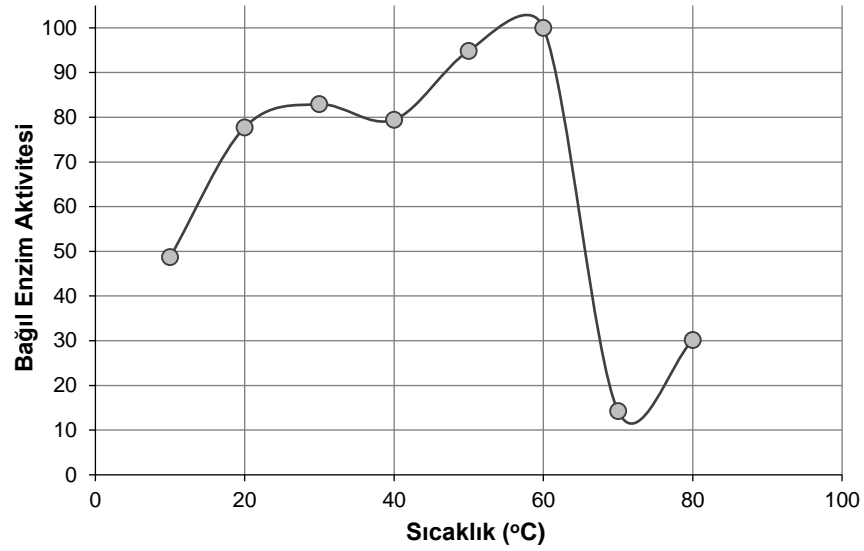


Şekil 4.8. CF/PTh-PPy/INV elektrot aktivitesine pH etkisi.

#### 4.3.2. CF/PTh-PPy/INV Elektrot Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

CF/PTh-PPy/INV enzim elektrotlarının sıcaklık değişimine karşı aktiviteleri incelendi (Şekil 4.9). En yüksek aktivite 60°C’de gözlemlendi. 20°C’den sonra enzim aktivitesi yavaş yükselmiş, 60°C’de maksimum aktivite görüldükten sonra 70°C’de enzim denature olmuş ve aktivite hızlı bir şekilde düşmüştür. Daha önce yapılan çalışmalarda serbest invertazın optimum sıcaklığı 50°C olarak belirtilmiştir. Tutuklanmış enzimde yani CF/PTh-PPy/INV elektrotlarında ise en yüksek aktivite 60°C’de görülmekle birlikte 50°C ve 60°C’deki aktiviteler birbirine çok yakındır ve bu elektrotların 50°C ve 60°C olmak üzere her iki sıcaklıkta da maksimum aktivite ile çalışabileceği söylenebilir. Tüm kimyasal reaksiyonlarda, dolayısıyla enzim reaksiyonlarında da sıcaklık yükseldikçe reaksiyon hızı artar. Fakat bu artış belli bir sıcaklıktan sonra enzimin denaturasyonu nedeniyle düşer. Enzim molekülleri önce tersiyer yapılarını sonra sekonder yani sarmal yapılarını kaybeder. Bu enzimin aktif bölgelerini etkileyen bir durumdur ve enzim aktivitesinin kaybolmasına neden olur.

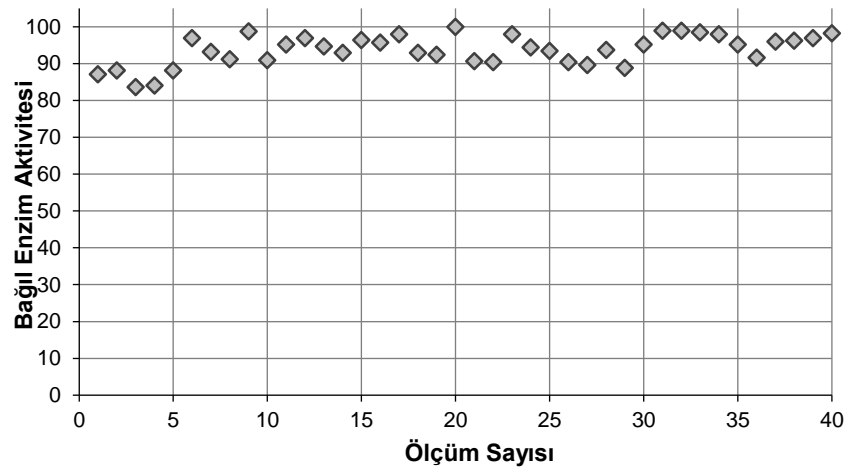




Şekil 4.9. CF/PTh-PPy/INV elektrot aktivitesine sıcaklık etkisi.

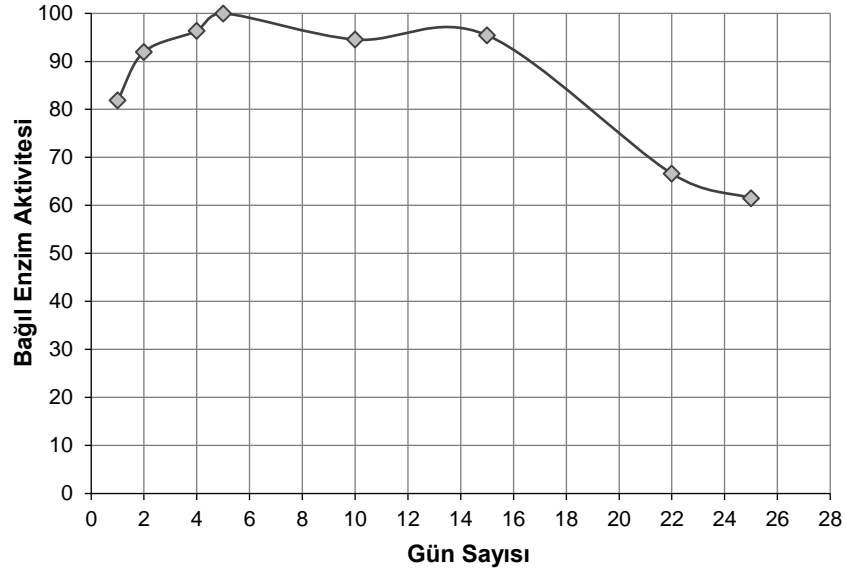
#### 4.3.3. CF/PTh-PPy/INV Elektrotlarının Çalışma Kararlılığı ve Raf Ömrü

CF/PTh-PPy/INV elektrotlarıyla aynı gün yapılan arka arkaya 40 ölçümün sonucu Şekil 4.10'da görülmektedir. 25°C, pH 5,0 ve 1,0 M sükröz derişiminde yapılan ölçümlerde elektrot oldukça kararlı davranmış ve 40 ölçümün sonunda aktivite kaybı olmamıştır. Dolayısıyla bu elektrotlar yani tutuklanmış enzim çoklu kullanım avantajına sahipken, serbest enzim sadece bir kez kullanılabilir.



Şekil 4.10. CF/PTh-PPy/INV elektrodunun çalışma kararlılığı.

İnvertaz enzim elektrotlarının aktivitesini ne kadar süreyle koruduklarını saptamak amacıyla CF/PTh-PPy/INV elektroduyla 25 gün boyunca her 2-3 günde bir aktivite ölçümü yapılmıştır (Şekil 4.11). Ölçümler 25°C, pH 5,0'de ve 1,0 M sükröz çözeltisiyle yapılmıştır. Önce enzim aktivitesi başlangıca göre % 20'lik bir artış göstermiş 25. günün sonunda ise aktivitesi % 60'a inmiştir. Bunun sebebi zamanla enzimin matristen desorpsiyonu olabilir. Zamanla enzimin yapısında oluşabilecek yapısal değişimler veya zamanla polimer matrisin aşınımı bunun olası sebepleridir. Burada tutuklanmış enzimin bulunduğu enzim elektrodu 2. ve 15. günler arasında %  $95,66 \pm 2,92$  değerinde bir bağıl aktivite ile kullanılabilir.

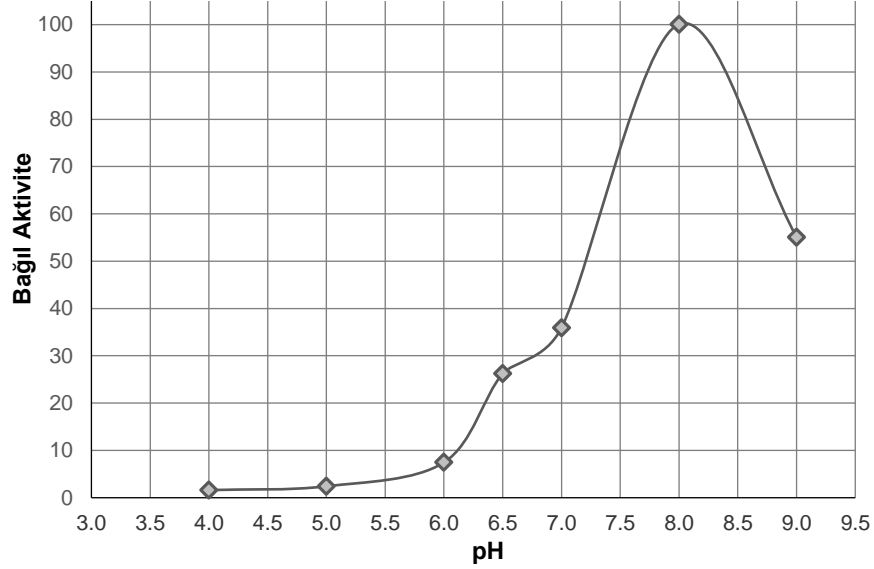


Şekil 4.11. CF/PTh-PPy/INV elektrodunun raf ömrü.

#### 4.3.4. CF/PTh-PPy/PPO Elektrot Aktivitesine pH Etkisi

Tutuklanmış PPO enziminin pH değişimine karşı davranışı incelenmiştir. Önceki çalışmalarda serbest PPO ve platin elektroda kaplanmış polipirolde tutuklanan enzimin optimum pH'ları 5,0 ve 7,0 olarak saptanmıştır. Yine daha önce yapılan CF/PPy/PPO elektrotlarında da en yüksek aktivite pH 7,0'dedir. Bu çalışmada hazırlanan CF/PTh-PPy/INV elektrodunda ise en iyi aktivite pH 8,0'de gözlenmiştir (Şekil 4.12). Bu PTh-PPy kompozitine tutuklanan enzimde optimum pH'ın 8,0 olacağı şekilde PPy'den farklı konformasyonel değişikliklerin oluştuğuna işaret ediyor olabilir. Bir diğer

olası neden enzimin matris içinde pH'nın 5,0 olduğu fakat enzimin içinde bulunduğu mikro çevrenin enzimi bazik taraftaki pH'dan koruduğu şeklinde olabilir.

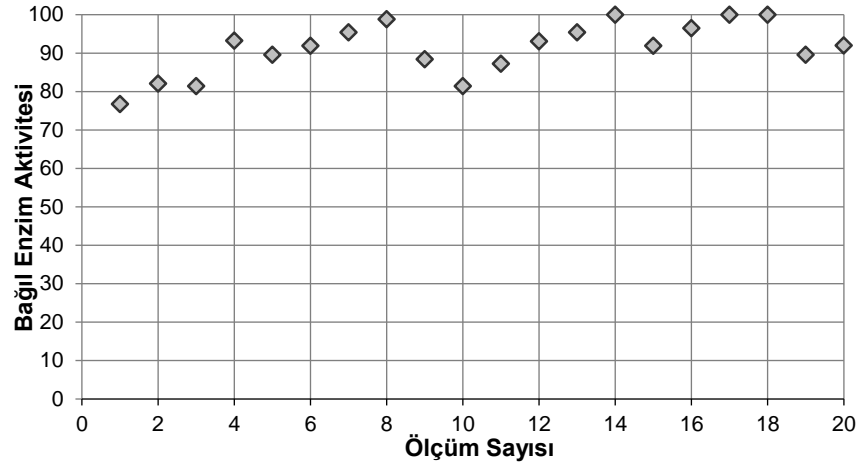


Şekil 4.12. CF/PTh-PPy/PPO elektrot aktivitesine pH etkisi.

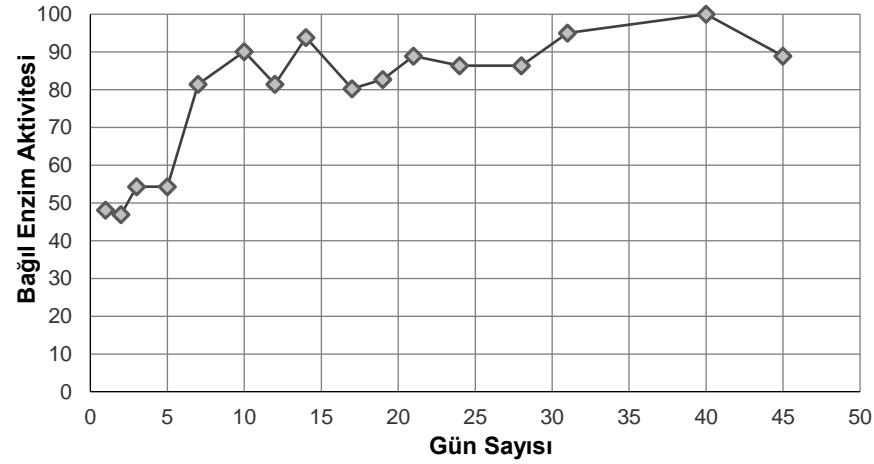
#### 4.3.5. CF/PTh-PPy/PPO Elektrotlarının Çalışma Kararlılığı ve Raf Ömrü

CF/PTh-PPy/PPO elektrotlarıyla arka arkaya aynı gün içinde 20 ölçüm alınmıştır. Ölçümler 25°C, pH 6,5'da ve 0,1 M katekol derişiminde yapılmıştır. Bu elektrotlarla elde edilen sonuçlarda aktivite kaybı olmamakla birlikte standart sapmanın immobilize invertaza göre daha yüksek olduğu daha dalgalı bir seyir gözlenmiştir (Şekil 4.13).

CF/PTh-PPy/PPO elektrotlarının raf ömrü tayini için 45 gün süreyle her 2-3 günde bir aktivite ölçümü alınmış, ölçümler 25°C, pH 6,5'de ve 0,1 M katekol derişiminde yapılmıştır. 5. günün sonunda artış gösteren enzim aktivitesi tutuklanmış invertaza göre daha dalgalı bir grafik göstermiş fakat aktivitesini 45. güne kadar korumuştur. Elektrot 6. ve 45. günler arasında %  $87,96 \pm 6,12$  değerinde bir bağıl aktivite ile kullanılabilir (Şekil 4.14). Elektrodun ilk 5 gün gösterdiği düşük aktivite bu enzimle yapılan diğer çalışmalarda da gözlenmiştir ve sonuçlar enzimin aktif bölgelerinin zamanla aktifleştğini göstermektedir. Tutuklama ile oluşan konformasyon değişikliği sonucunda pasifleşen bölgeler zamanla bu konformasyon değişikliğini telafi etmekte ve tekrar aktifleşmektedir.



Şekil 4.13. CF/PTh-PPy/PPO elektrodunun çalışma kararlılığı.

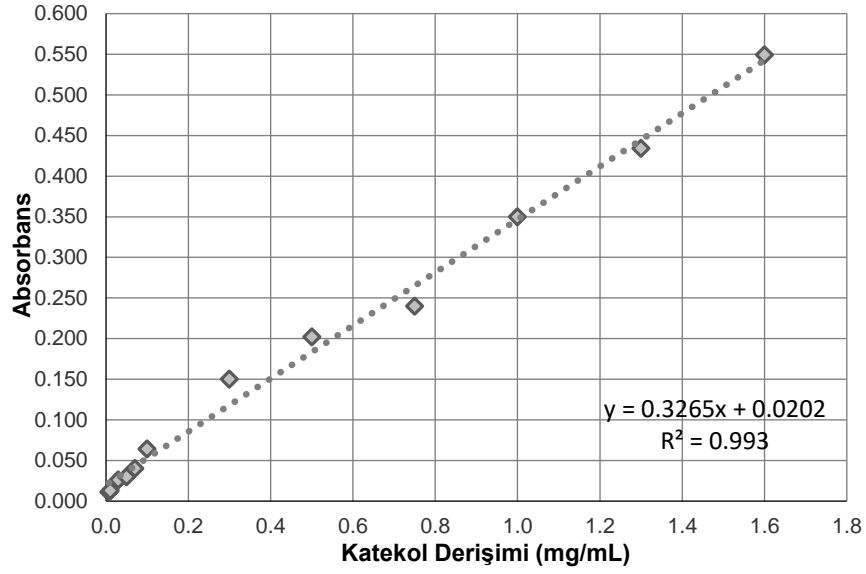


Şekil 4.14. CF/PTh-PPy/PPO elektrodunun raf ömrü.

#### 4.4. ÇAY ÖRNEKLERİNİN ANALİZ SONUÇLARI

##### 4.4.1. CF/PTh-PPy/PPO Elektrodunun Kalibrasyon Grafiği

0,007-1,600 mg/mL arasında hazırlanan katekol standartlarına elektrot 10 dakika daldırılarak Besthorn's Hydrazone metodu uygulanmıştır. Şekil 4.15'de görülen kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Yapılan kör ölçümleri ve kalibrasyon grafiğinden LOD 0,037 mg/mL olarak bulunmuştur.



Şekil 4.15. CF/PTh-PPy/PPO elektrodunun kalibrasyon grafiği.

#### 4.4.2. Örnek Ölçümleri

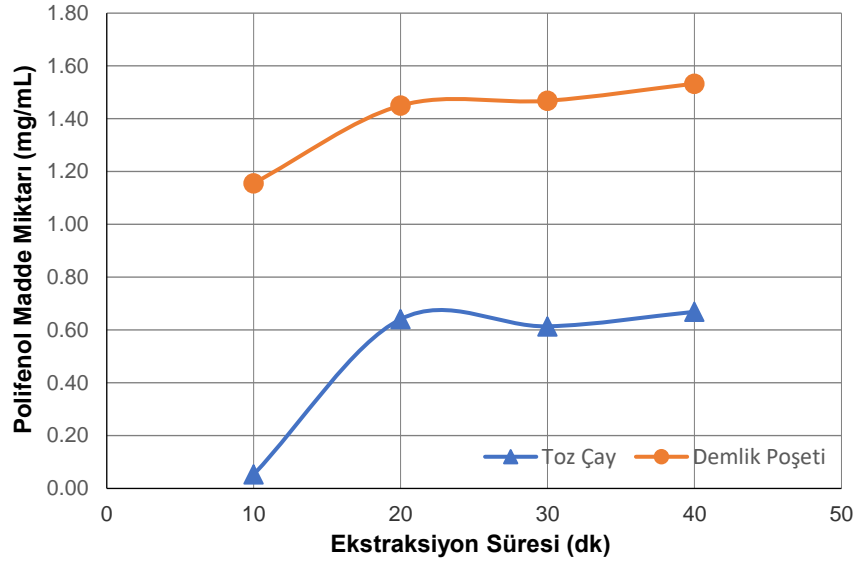
Çay örnekleri Çaykur Altınbaş toz ve demlik poşetinden hazırlanmıştır. 5,0 g toz çay veya 1 demlik poşeti üzerine 200 mL kaynamış su eklenmiş ve demlenmek üzere 70°C su banyosuna yerleştirilmiştir. Bu şekilde hazırlanan çay ekstraktından 10., 20., 30. ve 40. dakikalarda 5,0 mL örnek alınarak enzim elektroduyla analiz edilmiş ve kalibrasyon grafiğinde yerine konarak Çizelge 4.3’de görülen total polifenolik madde miktarları saptanmıştır.

Çizelge 4.3. CF/PTh-PPy/PPO enzim elektroduyla çay ekstraksiyon örneklerinde mg/mL katekol eşdeğeri olarak bulunan total polifenolik madde miktarları.

	Çay Numuneleri Demlenme Süresi (dakika)			
	10	20	30	40
Total Polifenol (mg/mL), Toz Çay	0,053	0,641	0,614	0,669
Total Polifenol (mg/mL), Demlik P.	1,156	1,450	1,468	1,533

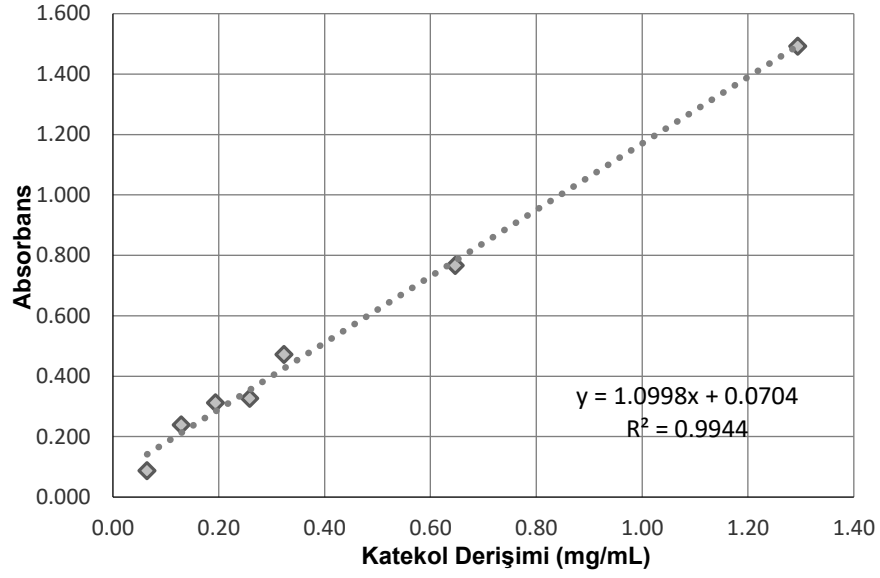
Şekil 4.16’da görüldüğü üzere çay ekstraktındaki polifenolik madde miktarı 20 dakika demlenme süresi beklendiğinde 10 dakika demlenme süresinden daha fazla çıkmış

fakat 30 ve 40 dakika ekstraksiyon sürelerinde artış olmamıştır. Buradan optimum ekstraksiyon süresi 20 dakika olarak belirlenmiştir. Bu şekilde sıcak su ile yapılan ekstraksiyon işleminde 20 dakikada suya geçen polifenol miktarı toz çaydan 0,641 mg/mL, demlik poşetinden suya geçen miktar ise 1,450 mg/mL'dir.



Şekil 4.16. CF/PTh-PPy/PPO elektrodu ile yapılan analiz sonuçları.

Folin-Ciocalteu metoduyla hazırlanan kalibrasyon grafiği ise Şekil 4.17'de görülmektedir.



Şekil 4.17. Folin-Ciocalteu metoduyla hazırlanan kalibrasyon grafiği.

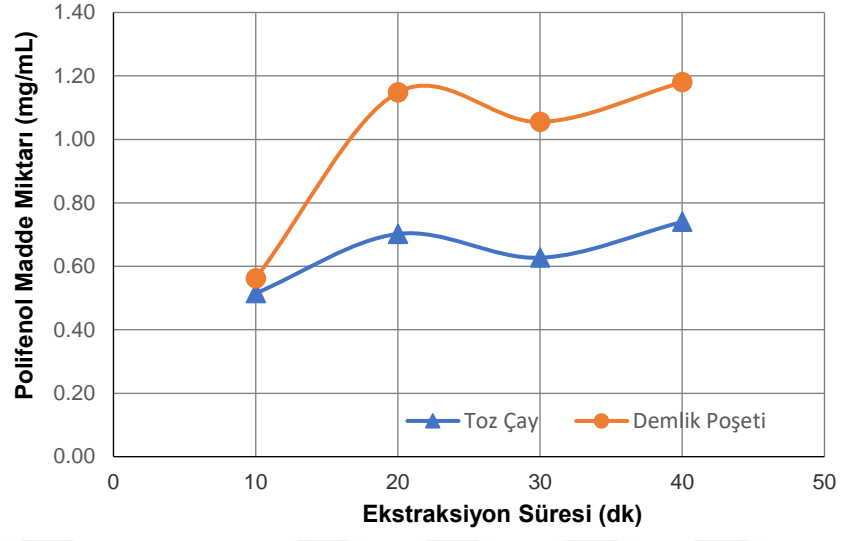
Örnek analizlerinden elde edilen sonuçlar kalibrasyon grafiğinde yerine konarak Çizelge 4.4'de görülen total polifenolik madde miktarları saptanmıştır.

Çizelge 4.4. Folin-Ciocalteu metoduyla çay ekstraksiyon örneklerinde mg/mL katekol eşdeğeri olarak bulunan total polifenolik madde miktarları.

	Çay Numuneleri Demlenme Süresi (dakika)			
	10	20	30	40
Total Polifenol (mg/mL), Toz Çay	0,515	0,702	0,627	0,740
Total Polifenol (mg/mL), Demlik P.	0,562	1,148	1,055	1,180

Çay ekstraktındaki polifenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu metoduyla da 10 dakika demlenme süresine göre 20 dakika demlenme süresinde daha fazla çıkmış fakat 30 ve 40 dakika ekstraksiyon sürelerinde artış olmamıştır.

Buradan optimum ekstraksiyon süresi bu yöntemle de 20 dakika olarak belirlenmiştir (Şekil 4.18). Bu şekilde sıcak su ile yapılan ekstraksiyon işleminde 20 dakikada suya geçen polifenol miktarı toz çaydan 0,702 mg/mL, demlik poşetinden suya geçen miktar ise 1,148 mg/mL'dir.



Şekil 4.18. Folin-Ciocalteu metoduyla yapılan analiz sonuçları.



## BÖLÜM 5

### SONUÇ

Bu tez çalışmasında PTh–PPy kompoziti karbon fiber elektrot üzerine kaplanarak literatürde olmayan yeni enzim elektrotları oluşturuldu. Polimerizasyonun oluşumu dönüşümsel voltametri ile gösterildi. Tutuklanmış invertaz ve polifenol oksidaz enzimlerinin kinetik parametreleri tayin edildi.  $V_{max}$  ve  $K_m$  sırasıyla invertaz için  $2,471 \pm 0,150$   $\mu\text{mol/dak.elektrot}$  ve  $30,60 \pm 5,30$  mM, polifenol oksidaz için  $0,056 \pm 0,012$   $\mu\text{mol/dak.elektrot}$  ve  $842,00 \pm 37,50$  mM olarak saptandı. Reaksiyon koşullarının enzim aktivitesine etkisi incelendi. İvertaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği pH ve sıcaklık pH 5,0 ve 60°C, polifenol oksidaz içinse pH 8,0 olarak bulundu. CF/PTh–PPy/INV ve CF/PTh–PPy/PPO elektrotlarının aktivitesi sırasıyla 40 ve 20 ardışık ölçümle takip edildi. Bu elektrotların bu ölçümlerde aktivitelerini koruduğu saptandı. Raf ömrü incelemeleri sonucunda CF/PTh–PPy/INV elektrodunun 2. ve 15. günler arasında %  $95,66 \pm 2,92$  olarak belirlenen bağıl aktivite ile kullanılabileceği gösterildi. CF/PTh–PPy/PPO elektrodunun ise 6. ve 45. günler arasında %  $87,96 \pm 6,12$  bağıl aktivite değeriyle kullanılabilceği bulundu. CF/PTh–PPy/PPO elektrodu için kalibrasyon grafiği oluşturuldu, LOD değeri 0,037 mg/mL olarak hesaplandı. Bu elektrotla yapılan toplam fenolik madde analizlerinde çay ekstraktında bulunan sonuçlar toz çay için 0,641 mg/mL, demlik poşeti için 1,450 mg/mL şeklindedir ve optimum ekstraksiyon süresi 20 dakikadır. Bu sonuç Folin-Ciocalteau metoduyla da kontrol edilmiştir. Toz çay ve demlik poşeti ekstraktlarında bulunan değerler sırasıyla 0,702 mg/mL ve 1,148 mg/mL'dir.

## KAYNAKLAR

1. Shirakawa, H., Louis, E. J., MacDiarmid, A. G., Chiang, C. K. and Heeger, A. J., “Synthesis of electrically conducting organic polymers: Halogen derivatives of polyacetylene”, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 474: 578-580 (1977).
2. Fried, J.R., “Polymer Science and Technology”, *Prentice Hall PTR*, New Jersey, 367-370 (1995).
3. Akpınar, H., Balan, A., Baran, D., Ünver, E.K. and Toppare, L., “Donoreacceptoredonor type conjugated polymers for electrochromic applications: benzimidazole as the acceptor unit”, *Polymer*, 51: 6123-6131 (2010).
4. Şahmetlioğlu, E., “İletken aşı kopolimerlerin sentezi ve bunların enzim tutuklama matrisi olarak kullanılmaları”, Doktora Tezi, *Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Niğde, 3-49 (2004).
5. Aydar, S., Büyükbayram, A. E., Şendur, M., Toppare, L., “Immobilization of invertase in DAD type polymers: Combination of benzothiadiazole acceptor unit and 3,4- ethylenedioxythiophene and thiophene donor units”, *Journal of Macromolecular Science*, 11: 855-861 (2011).
6. Chandrasekhar, P., “Conducting Polymers, Fundamentals and Applications”, *Kluwer Academic Publishers*, Londra, (1999).
7. Kaya, H.Z., Söylemez, S., Udum, Y.A., Toppare, L., “Application of an efficient amperometric glucose sensing electrode based on a bilayer polymer”, *Journal of the Electrochemical Society*, 165: 939-945 (2018).
8. <https://slidex.tips/download/ders-01-biyosensr-tanm-duyu-sistemi-duyu-sistemi-duyu-reseptrleri-duyu-sistemi-1>
9. Genies, E. M., Bidan, G. and Diaz, A. F., “Spectroelectrochemical Study of Polypyrrole Films”, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 149: 101-103 (1983).
10. Yiğit, S., “Conduction polymer blends of polythiophene”, Doktora Tezi, *Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara (1996).
11. Randriamahazaka H., Noel V., Guillerez S. and Chevrot C., “Interpenetrating organic conducting polymer composites based on polyaniline and poly(3,4-ethylenedioxythiophene) from sequential electropolymerization”, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 585: 157-166 (2005).

12. Wnek, G. E., Chine, J. C., Karasz, F. E. and Lillya, C. P., "Electrically conducting derivative of poly(*p*-phenylene vinylene)", *Polymer*, 20 (12): 1441-1443 (1979).
13. Ivory, D. M., Miller, G. G., Sowa, J. M., Shacklette, L. W., Chance, R. R. and Baughmann, R. H., "Highly conducting charge-transfer complexes of poly(*p*-phenylene)", *The Journal of Chemical Physics*, 71: 1506 (1979).
14. Acar, H., "Potasyum persülfat yükseltgeni kullanılarak iletken polipirol, poliakrilonitril kompozit lif hazırlanması ve karakterizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 14-22(2008).
15. Chiang, C. K., Fincher, C. R., Park, Jr., Y. W., Heeger, A. J., Shirakawa, H., Louis, E. J., Gau, S. C. and MacDiarmid, Alan G., "Electrical conductivity in doped polyasetylene", *Physical Review Letters*, 39 (17): 1098-1101 (1977).
16. Inzelt, G. and Scholz, F., "Conducting Polymers", *Springer*, Budapest, 68-72 (2008).
17. Gul, V. E., "Structure and properties of conducting polymer composites/new concept in polymer science", *VSP B*, Utrecht, The Netherlands, 18-20 (1996).
18. Plochaski, J., *Material Science Forum*; Murch G.E. Ed.; Trans Tech Pub. Ltd., Switzerland, 21: 173-178 (1987).
19. Dall'Olio, A., Dascola, G., Varacco, V. and Bocchi, V., "Electron paramagnetic resonance and conductivity of an electrolytic oxypyrrole (pyrrole polymer) black", *Comptes Rendus de L'Academie des Sciences-Series IIC-Chemistry*, 267: 433-435 (1968).
20. Karabacak, G., "İnvertaz ve polifenol oksidaz enzimleriyle oluşturulan karbon fiber enzim elektrotları", Yüksek lisans tezi, *Karabük Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Karabük (2019).
21. Işık, S., "Immobilization of invertase and glucose oxidase in poly 2-(3-thienyl) acetate / polypyrrole matrices", Yüksek Lisans Tezi, *Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 9-10, 19-20, 22, 24 (2002).
22. Roncali, J., "Conjugated poly(thiophenes): synthesis, functionalization, and applications", *Chemical Reviews*, 92 (4): 711-738 (1992).
23. Emre, F. B., "Kolesterol biyosensörü tasarımında bazı polimerik materyallerin enzim immobilizasyon ortamı olarak kullanımı", Doktora Tezi, *İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Malatya, 3-28 (2007).
24. Bogdan, M., Brugger, D., Rosenstiel, W., Speiser, B., "Estimation of diffusion coefficients from voltammetric signals by support vector and gaussian process regression", *Journal of Cheminformatics*, 6 (1): 1-13 (2014).

25. Acar, H., “Potasyum persülfat yükseltgeni kullanılarak iletken polipirol/poliakrilonitril kompozit lif hazırlanması ve karakterizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 14-22 (2008).
26. Selçuk, S., “İletken zeolit/polipirol kompozitinin hazırlanması, karakterizasyonu ve nem ile sıcaklığa karşı sensör özelliğinin incelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 31-33 (2010).
27. Suarez, M. F. and Compton, R. G., “In situ atomic force microscopy study of polypyrrole synthesis and the volume changes induced by oxidation and reduction of the polymer”, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 462 (2): 211-221 (1999).
28. Vernitskaya, T. V., Efimov, O. N., “Polypyrrole: a conducting polymer; its synthesis, properties and applications”, *Russian Chemical Review*, 66 (5): 443-457 (1997).
29. Aydar, S., “Tiyofen ve 3,4- etilendioksitiyofen donör gruplarının benzotiyadiazol akseptör grubuyla yaptığı dad tipi iletken polimerlerde enzim immobilizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, *Karabük Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Karabük, (2012).
30. Palmer, T., “Enzymes”, *Horwood Publishing*, London, 70, 107, 113-114, 361-366 (2007).
31. Garret, R. H., “Biochemistry”, *Thomson*, Australia, 420-425 (2005).
32. Başçı, N. E., “Sakkarozun invertaz ile hidroliz kinetiğinin ve invertaz deaktivasyonunun incelenmesi”, Yüksek Mühendislik Tezi, *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 15-34 (1985).
33. Özata, A., "Enzimoloji ders notları", *Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi*, 117 (2000).
34. Söylemez, S., “Functionalization and fabrication of polymer based device platform architectures for sensor applications”, Doktora Tezi, *Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, (2018).
35. Ali, J., Najeeb, J., Ali, M. A., Aslam, M. F., Raza, A., “Biosensors: their fundamentals, design, types and most recent, impactful applications: A Review, *Journal of Biosensors and Bioelectronics*, 8 (1): 1-9 (2017).
36. Kaptan, D., “İletken polimer kompozitleri kullanılarak enzim tutuklamalı biyosensör oluşturulması”, Yüksek Lisans Tezi, *Karabük Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Karabük, 23 (2013).
37. Kırılalp, S., “Synthesis of conducting block copolymers and their use in the immobilization of invertase and polyphenol oxidase enzymes”, Doktora Tezi, *Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, (2004).

38. Danışman, T., “İnvertazın poli(HEMA-GMA) membranlarına kovalent olarak tutuklanması ve sürekli sistemlerde sükröz hidrolizi”, Yüksek Lisans Tezi, *Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kırıkkale, 5-23 (2002).
39. Kotwal, S. M, Shankar, V., “Immobilized invertase”, *Biotechnology Advances*, 27: 311-322 (2009).
40. David, A. E., Wang, N. S., Yang, V. C. and Yang, A. J., “Chemically surface modified gel (CSMG): An excellent enzyme-immobilization matrix for industrial processes”, *Journal of Biotechnology*, 125: 395–407 (2006).
41. Gomez, L., Ramirez, H. L., Cabreea, G., Simpson, B. K. and Villalonga, R., “Immobilization of invertase-chitosan conjugate on hyaluronic-acid-modified chitin”, *Journal of Food Biochemistry*, 32: 264-277 (2008).
42. Kartal, M., Kayahan, S. K., Bozkurt, A. and Toppare, L., “Entrapment of invertase in an interpenetrated polymer network of alginic acid and poly(1-vinylimidazole)”, *Talanta*, 77: 659-662 (2008).
43. He, Q. and Luo, Y., “Enzymatic browning and its control in fresh-cut produce”, *Stewart Postharvest Review*, 6 (3): 1-7 (2007).
44. Decker, H., Dillinger, R., Tuczec, F., “How does tyrosinase work? Recent insights from model chemistry and structural biology”, *Angewandte Chemie International Edition*, 39: 1587-1591 (2000).
45. Özçelik, D., “Mantardan (*Agaricus bisporus*) Tirozinaz Enziminin İzole Edilmesi ve Fenol Giderilmesinde Kullanılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 14-17 (2005).
46. Constabel, C.P and Barbehenn, R., “Induced Plant Resistance to Herbivory”, A. Schaller (Ed), *Defensive Roles of Polyphenol Oxidase in Plants*, *Springer Science+Business Media*, Berlin, 253-269 (2008).
47. Yoruk, R. and Marshall, M.R., “Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review”, *Journal of Food Biochemistry*, 27 (5): 361–422 (2003).
48. Canbay, E., Akyilmaz, E., “Design of a multiwalled carbon nanotube–Nafion–cysteamine modified tyrosinase biosensor and its adaptation of dopamine determination”, *Analytical Biochemistry*, 444: 8-15 (2014).
49. Corzo-Martinez, M., Corzo, N., Villamiel, M. and Castillo, M.D., “Food Biochemistry and Food Processing”, B.K. Simpson (Ed), *Browning Reactions*, *John Wiley & Sons*, UK, 56-83 (2012).

50. Yabacı, S.N., “Çay bitkisi polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması ve bazı özelliklerinin belirlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, **Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Adana (2008).
51. Taş, C., “Domat Zeytini Polifenol Oksidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi”, Yüksek lisans tezi, **Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Adana (2009).
52. Fitzer, E., Edie, D.D. and Johnson, D.J., "Carbon fibers-present state and future expectation; Pitch and mesophase fibers; Structure and properties of carbon fibers" in Figueiredo, J.L., Bernardo, C.A., Baker, R.T.K. and Huttinger, K.J., “Carbon Fibers Filaments and Composites”, 1st ed., **Springer**, New York, 3–41, 43–72, 119–146 (1989).
53. Huang, X., "Fabrication and properties of carbon fibers", **Materials**, 2: 2369–2403 (2009).
54. Armstrong-James, M. and Millar, J., "Carbon fibre microelectrodes", **Journal of Neuroscience Methods**, 1 (3): 279–287 (1979).
55. Salazar, P., Martín, M., O’Neill, R. D., and González-Mora, J. L., "Glutamate microbiosensors based on Prussian Blue modified carbon fiber electrodes for neuroscience applications: In-vitro characterization", **Sensors and Actuators B: Chemical**, 235: 117-125 (2016).
56. Slinkard, K. and Singleton, V. L., “Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods”, **American Journal of Enology and Viticulture**, 28: 49–55 (1977).
57. Huang, D. J., Ou, B. X. and Prior, R. L., “The chemistry behind antioxidant capacity assays”, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53 (6): 1841-1856 (2005).
58. Nelson N., “A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose”, **Journal of Biological Chemistry**, 153: 375-80 (1944).
59. Somogyi, M., "Notes on Sugar Determination", **Journal of Biological Chemistry**, 195 (1): 19–23 (1952).
60. Hatanaka, C. and Kobara, Y., "Determination of glucose by a modification of Somogyi–Nelson method", **Agricultural and Biological Chemistry**, 44: 2943–2949 (1980).
61. Sezer, E., Saraç, A. H. S., and Parlak, E. A., "Electrochemical synthesis of EDOT–ECZ–EDOT copolymer on carbon fiber micro-electrodes", **Journal of Applied Electrochemistry**, 33 (12): 1223–1231 (2003).

62. Alkan, S., Toppare, L., Yagci, Y., Hepuzer, Y., “Immobilization of invertase in conducting thiophene-capped poly(methylmethacrylate)/polypyrrole matrices”, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 10 (12): 1223-1235 (1999).



## ÖZGEÇMİŞ

Elif DOĞAN, 1987’de Karabük’te doğdu. İlk ve orta öğrenimini Şirinevler İlkokulu ve Karabük Atatürk Ortaokulu’nda, lise öğrenimini Karabük Demir Çelik Lisesi’nde tamamladı. 2006 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Kimya Bölümünü kazandı, 2010 yılında mezun oldu. Mezuniyetten bir süre sonra Yüksek Lisans programına başladı, çeşitli kurumlarda kimyagerlik ve kimya öğretmenliği görevinde bulundu, halen özel bir kurumda kimya öğretmenliği görevine devam etmektedir.

Adres Bilgileri: Bayır Mahalle Fevzi Fırat Caddesi Ziraat Bankası Lojmanı No:82  
Merkez/KARABÜK

Tel: 05065628046

Email: [elifyd87@gmail.com](mailto:elifyd87@gmail.com)