

**İNVERTAZ VE POLİFENOL OKSİDAZ
ENZİMLERİYLE OLUŞTURULAN KARBON
FİBER ENZİM ELEKTROTLARI**

**2019
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA BÖLÜMÜ**

Gözde KARABACAK

**İNVERTAZ VE POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMLERİYLE OLUŞTURULAN
KARBON FİBER ENZİM ELEKTROTLARI**

Gözde KARABACAK

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

**KARABÜK
Şubat 2019**

Gözde KARABACAK tarafından hazırlanan “İNVERTAZ VE POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMLERİYLE OLUŞTURULAN KARBON FİBER ENZİM ELEKTROTLARI” başlıklı bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

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

A. Elif BÖYÜKBAYRAM

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 30/01/2019

Ünvanı, Adı SOYADI (Kurumu)

İmzası

Başkan : Doç. Dr. Hasan ÇABUK

Üye : Doç. Dr. Şaban UYSAL

Üye : Dr. Öğr. Üyesi A. Elif BÖYÜKBAYRAM

H. Çabuk
Ş. Uysal
A. Elif BÖYÜKBAYRAM

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

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

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

F. ERSÖZ



“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.”

Gözde KARABACAK

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

İNVERTAZ VE POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMLERİYLE OLUŞTURULAN KARBON FİBER ENZİM ELEKTROTLARI

Gözde KARABACAK

Karabük Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı:

Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Elif BÖYÜKBAYRAM

Şubat 2019, 72 sayfa

Bu çalışmada yeni bir elektrot malzemesi olarak karbon fiber kullanıldı. İnvvertaz ve polifenol oksidaz enzimleri elektrot malzemesi olarak karbon fiberin kullanıldığı elektrotlara immobilize edilerek karbon fiber enzim elektrotları oluşturuldu. Bu elektrotlar laboratuvarında hazırlanan karbon fiber elektrotlar üzerine elektrokimyasal polipirol polimerizasyonu esnasında enzimin immobilizasyonu ile elde edildi. İmmobilize enzimin kinetik parametreleri, V_{max} (maksimum reaksiyon hızı) ve K_m (substratın enzim ilgisi) tayin edildi. Bu değerler invvertaz enzimi için sırasıyla $0,779 \pm 0,120$ $\mu\text{mol/dak.elektrot}$ ve $27,20 \pm 6,70$ mM olarak, polifenol oksidaz enzimi için 0.017 ± 0.004 $\mu\text{mol/dak.elektrot}$ ve $176,00 \pm 26,60$ mM olarak bulundu. Reaksiyon koşullarının enzim aktivitesine etkisi incelendi; immobilize invvertazın optimum sıcaklığı ve pH'ı, 40 °C ve pH 6,0 olarak, polifenol oksidazın ise 60 °C ve pH 7,0 olarak tespit edildi. Doğrusal çalışma aralığı, invvertaz ve polifenol oksidaz için sırasıyla 0,0034 M - 0,0500 M ve 0,035 M - 0,400 M'dir. Aktivite ölçümlerinin ardışık

stabilitesi ve raf ömrü saptandı. İmmobilize invertazın aktivitesi 37 ardışık ölçümden sonra %70 olarak belirlendi, bu değer immobilize polifenol oksidaz için de 19 ardışık ölçümden sonra %70'dir. Raf ömrü çalışmasında, invertaz elektrodu için 42 gün sonra aktivite %25 kayıpla %75 olarak gözlemlendi. Polifenol oksidaz elektrotları için 40 gün raf ömrü ölçümleri yapıldı. Aktivitenin gitgide arttığı ve 40. günde daha bir yüksek değere ulaştığı görüldü. Gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) değerleri invertaz immobilize elektrotlar için 0,0034 M, 0,01126 M, polifenol oksidaz immobilize edilmiş elektrotlar için 0,0353 M, 0,1170 M olarak tespit edildi. Sonuçlar daha önceden yapılmış çalışmalarda bulunan platin elektrot ve polipirolda immobilize edilmiş enzim çalışmalarıyla karşılaştırıldı. Enzim elektrotları gerçek numunelerde denendi. Siyah çayın suda ekstraksiyonuyla elde edilen numunelerde polifenol analizi yapıldı.

Anahtar Sözcükler : İletken polimer, pirol, elektrokimyasal polimerizasyon, karbon fiber elektrot, enzim elektrodu, invertaz, polifenol oksidaz, enzim immobilizasyonu

Bilim Kodu : 201.1.04

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

CARBON FIBER ENZYME ELECTRODES FABRICATED BY INVERTAZ AND POLYPHENOL OXIDASE ENZYMES

Gözde KARABACAK

Karabük University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Thesis Advisor:

Dr. Ayşe Elif BÖYÜKBAYRAM

February 2019, 72 pages

In this study, carbon fiber was used, as a new electrode material. 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 in the conductive polypyrrole polymer matrix during electrochemical polymerization of pyrrole 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 0.779 ± 0.120 $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{electrode}$ and 27.20 ± 6.70 mM, for polyphenol oxidase 0.017 ± 0.004 $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{electrode}$ and 176.00 ± 26.60 mM respectively. The influence of conditions on enzyme activity was investigated; optimum temperature and pH were found as 40 °C and pH 6.0 for immobilized invertase, 60 °C and pH 7.0 for immobilized polyphenol oxidase. Linear working ranges were 0.0034 M - 0.0500 M and 0.035 M - 0.400 M for invertase and polyphenol oxidase respectively. Stability in

consecutive measurements and shelf life were obtained. For invertase electrode, 70% activity was observed after 37 consecutive measurements, this is again 70% for polyphenol oxidase electrode after 19 consecutive measurements. In shelf life investigation, it was observed that 25% of activity was lost and 75% retained after 42 days for invertase electrode. For polyphenol oxidase electrode 40 days shelf life study was performed. It was seen that activity increased steadily and reached a high value at 40th day. Detection limit (LOD) and quantitation limit (LOQ) values were 0.0034 M and 0.01126 M for electrodes of immobilized invertase, 0.0353 M and 0.1170 M for electrodes of immobilized polyphenol oxidase. The results were compared with the previous studies in which enzyme was placed in polypyrrole coated platinum electrodes. Enzyme electrodes were tried by measurements of real samples. It was performed analysis of polyphenolics in the samples that were obtained by water extraction of black tea.

Keywords : Conducting polymer, pyrrole, electrochemical polymerization, carbon fiber electrode, enzyme electrode, invertase, polyphenol oxidase, enzyme immobilization

Science Code : 201.1.041.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalıőmasının planlanmasında, araőtırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalıőmamı bilimsel temeller ışığında őekillendiren sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Elif BÖYÜKBAYRAM'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar olanaklarından faydalanmamızı sağlayan Prof. Dr. őadi ően'e tüm çalışma boyunca bize sağladığı destekten ötürü teşekkürü bir borç bilirim.

Tez yazım sürecimde tecrübelerini paylaőıp beni destekleyen Fizik bölümü doktora öğrencisi Serkan OGUZ'a ve bu süreçte sabırla her yardımına koőan Sakin KORKMAZ'a tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Sevgili aileme; annem Sevgi KARABACAK, babam Cemal KARABACAK ve kardeőim Erol KARABACAK'a maddi ve manevi hiçbir yardımı esirgemedен yanımda oldukları için tüm kalbimle teşekkür ederim.

Bu yüksek lisans projesi KBÜBAP-18-YL-097 proje numarasıyla Karabük Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiőtir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL.....	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	3
KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. İLETKEN POLİMERLER	3
2.1.1. Polimerlerde İletkenlik Teorisi	3
2.1.1.1. Band Teorisi	4
2.1.1.2. İletken Polimerlerde Doplama	6
2.1.1.3. İletken Polimerlerde Hopping	8
2.1.2. İletken Polimerlerin Sentezi.....	9
2.1.2.1. Kimyasal Sentez.....	9
2.1.2.2. Elektrokimyasal Sentez	9
2.1.3. İletken Polimerlerin Kullanım Alanları	11
2.2. ENZİMLER.....	12
2.2.1. Enzimlerin Adlandırılması.....	13
2.2.2. Enzimlerin Sınıflandırılması.....	14
2.2.3. Enzim Aktivitesi	14
2.2.3.1. Substrat Konsantrasyon Etkisi	14

	<u>Sayfa</u>
2.2.3.2. Enzim Konsantrasyon Etkisi	15
2.2.3.3. Sıcaklık Etkisi	16
2.2.3.4. pH Etkisi	16
2.2.3.5. İnhibitör Etkisi	17
2.2.4. Enzim Kinetiği.....	18
2.2.5. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri.....	22
2.2.5.1. Bağlama.....	23
2.2.5.2. Hapsetme.....	24
2.2.6. İnvvertaz	24
2.2.7. Polifenol Oksidaz (PPO).....	25
2.3. KARBON FİBER.....	28
2.3.1. Karbon Fiberin Kullanım Alanları.....	29
2.3.2. Karbon Fiber Enzim Elektrotları	31
BÖLÜM 3	34
DENEYSEL BİLGİLER.....	34
3.1. KİMYASAL MALZEMELER.....	34
3.2. CİHAZLAR.....	34
3.2.1. Potansiyostat	34
3.2.2. UV-Visible Spektrometresi.....	35
3.2.3. FT-IR	35
3.2.4. SEM	35
3.2.5. pH metre	35
3.2.6. Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı.....	36
3.2.7. Vorteks Tüp Karıştırıcı	36
3.2.8. Çalkalamalı Su Banyosu.....	36
3.3. YÖNTEM.....	36
3.3.1. Somogyi-Nelson Yöntemi	36
3.3.1.1. Nelson Reaktifi.....	37
3.3.1.2. Arsenomolibdat Reaktifi	37
3.3.2. Besthorn's Hydrazone Yöntemi.....	37
3.3.3. Elektrokimyasal Polipirol Sentezi	38

	<u>Sayfa</u>
3.3.4. Polipirol Matrisine Enzim İmmobilizasyonu.....	39
3.3.5. Karbon Fiber Elektrotların Hazırlanması	40
3.3.6. Enzim Aktivitesinin Tayini.....	41
3.3.7. Kinetik Parametrelerin Tayini	43
3.3.8. Optimum pH Tayini.....	44
3.3.9. Optimum Sıcaklık Tayini.....	44
3.3.10. Kararlılık Tayini	44
3.3.11. Raf Ömrü Tayini.....	44
3.4. NUMUNE ANALİZLERİNİN YAPILIŞI.....	44
BÖLÜM 4.....	46
DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	46
4.1. POLİPİROLÜN ELEKTROPOLİMERİZASYONU VE FTIR ANALİZİ	46
4.2. SEM ANALİZİ.....	48
4.3. ENZİM ELEKTROTLARININ AKTİVİTE TAYİNİ VE KİNETİK PARAMETRELERİNİN SAPTANMASI	51
4.3.1. İnvvertaz Enzim Elektrotları.....	51
4.3.2. Polifenol Oksidaz Enzim Elektrotları	54
4.3.3 Enzim Aktivitesine pH'ın Etkisi.....	56
4.3.4. Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi	57
4.3.5. Enzim Elektrotlarının Çalışma Kararlılığı	59
4.3.6. Enzim Elektrotlarının Raf Ömrü.....	60
4.4. KALİBRASYON GRAFİKLERİ.....	62
4.5. ÇAY NUMUNELERİNİN ANALİZİ.....	63
BÖLÜM 5.....	65
GENEL SONUÇ.....	65
KAYNAKLAR	66
ÖZGEÇMİŞ	72

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Polimer molekülünde bağ ve antibağ orbitallerinin oluşumu.	5
Şekil 2.2. Band yapıları a) iletken, b) yarı iletken ve c) yalıtkanlar için.	6
Şekil 2.3. Polaron, bipolaron yapıları ve band diyagramı. a) nötr polimer b) polaron yapısı c) bipolaron yapısı.....	7
Şekil 2. 4. Poliasetilenin soliton, polaron ve bipolaron yapıları.	8
Şekil 2. 5. Yükün taşınması, a) zincir üzerinde yükün taşınması, b) zincirler arasında yükün taşınması, c) zincir blokları arasında yükün taşınması.	8
Şekil 2. 6. Heterosikliklerin elektropolimerizasyon mekanizması (X= N-H, S, O)...	10
Şekil 2. 7. Enzimin aktivasyon enerjisine etkisi.	13
Şekil 2. 8. Enzim substrat kompleksinde öne sürülen “anahtar-kilit modeli.	13
Şekil 2. 9. Substrat konsantrasyonunun reaksiyon hızına etkisi.	15
Şekil 2. 10. Enzim konsantrasyonunun reaksiyon hızına etkisi.	15
Şekil 2. 11. Sıcaklığın reaksiyon hızına etkisi.	16
Şekil 2. 12. pH'ın reaksiyon hızına etkisi.	17
Şekil 2. 13. Enzim-inhibitör ilişkisi.	17
Şekil 2. 14. Substrat konsantrasyonuna karşı reaksiyon hızı grafiği.....	18
Şekil 2. 15. Lineweaver-Burk grafiği.....	22
Şekil 2. 16. Enzim immobilizasyon yöntemleri.	23
Şekil 2. 17. Sükrozun hidroliz reaksiyonu.	24
Şekil 2. 18. Polifenol oksidaz kataliz reaksiyonu.	26
Şekil 2. 19. Kataliz sırasında, PPO'nun aktif alanının, okside ve deoksijen formları arasındaki döngüsel geçişleri. Mavi, kırmızı ve yeşil renkli daireler sırasıyla bakır, oksijen ve histidini temsil eder.	27
Şekil 2. 20. PPO enziminin reaksiyon mekanizması.....	28
Şekil 2. 21. PAN esaslı karbon fiber.	29
Şekil 2. 22. Karbon fiber elektrot.....	32
Şekil 2. 23. Kimyasal transdüser olarak enzim elektrodu.....	32

Şekil 3.1. Somogyi-Nelson Yöntemi.	37
Şekil 3.2. Besthorn's Hydrazone Yöntemi.	38
Şekil 3.3. Elektropolimerizasyon hücresi.	39
Şekil 3.4. Karbon fiber enzim elektrodu.	41
Şekil 3.5. Sükrozun hidroliz reaksiyonu.	42
Şekil 3.6. PPO'nun krezolaz ve katekolaz aktiviteleri: Monofenolün orto- hidroksilasyonu ve oluşan <i>o</i> -difenolün <i>o</i> -kinona oksidasyonu.	42
Şekil 3.7. Oluşan <i>o</i> -kinonların MBTH reaktifiyle renkli bileşik oluşturması.	43
Şekil 4.1. Polipirolün Ag/AgCl'e karşı dönüşümlü voltamogramı.	47
Şekil 4.2. Polipirolün FTIR spektrumu.	48
Şekil 4.3. Kaplama yapılmamış karbon fiberlerin SEM görüntüleri.	49
Şekil 4.4. Polimerle kaplanmış karbon fiberlerin SEM görüntüleri.	50
Şekil 4.5. Pt/Ppy/INV elektrodunun Michaelis-Menten grafiği.	51
Şekil 4.6. Pt/Ppy/INV elektrodunun Lineweaver-Burk grafiği.	52
Şekil 4.7. CF/Ppy/INV elektrodunun Michaelis-Menten grafiği.	52
Şekil 4.8. CF/Ppy/INV elektrodunun Lineweaver-Burk grafiği.	53
Şekil 4.9. CF/Ppy/PPO elektrodunun Michaelis-Menten grafiği.	54
Şekil 4.10. CF/Ppy/PPO elektrodunun Lineweaver-Burk grafiği.	55
Şekil 4.11. CF/Ppy/INV elektrot aktivitesine pH etkisi.	56
Şekil 4.12. CF/Ppy/PPO elektrot aktivitesine pH etkisi.	57
Şekil 4.13. CF/Ppy/INV elektrot aktivitesine sıcaklık etkisi.	58
Şekil 4.14. CF/Ppy/PPO elektrot aktivitesine sıcaklık etkisi.	59
Şekil 4.15. (a) CF/Ppy/INV elektrodunun, (b) CF/Ppy/PPO elektrodunun çalışma kararlılığı.	60
Şekil 4.16. CF/Ppy/INV elektrodunun raf ömrü.	61
Şekil 4.17. CF/Ppy/PPO elektrodunun raf ömrü.	61
Şekil 4.18. CF/Ppy/INV elektrodunun kalibrasyon grafiği.	62
Şekil 4.19. CF/Ppy/PPO elektrodunun kalibrasyon grafiği. (a) Katekol derişimi molarite ile hazırlandı (b) Katekol derişimi mg/mL ile hazırlanmıştır. ...	63

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 4.1. Serbest ve immobilize invertaz enziminin kinetik parametreleri	53
Çizelge 4.2. Serbest ve immobilize PPO enziminin kinetik parametreleri.	55
Çizelge 4.3. Çay numunelerinde enzim elektroduyla mg/ml katekol eşdeğeri olarak saptanan total polifenol miktarları.	64



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

AsF ₅	:	Pentafloroarsenik
AlCl ₃	:	Alüminyum klorür
FeCl ₃	:	Demir klorür
SO _x	:	Kükürt oksit
NO _x	:	Azot oksit
K _m	:	Michaelis-Menten sabiti
V _{max}	:	Maksimum reaksiyon hızı
LOD	:	Gözlenebilme sınırı (Limit of Dedection)
LOQ	:	Tayin sınırı (Limit of Quantation)
mg	:	Miligram
mL	:	Mililitre
µm	:	Mikrometre
µL	:	Mikrolitre
µmol	:	Mikromol
nm	:	Nanometre
°C	:	Santigrat derece
g	:	Gram
mg	:	Miligram
sn	:	Saniye
Å	:	Ångström
V	:	Volt

KISALTMALAR

CF	: Karbon Fiber
CV	: Cyclic Voltamogram (Dönüşümlü Voltametri)
CF/Ppy/INV	: Karbon fiber elektrot üzerinde polipirol polimeri içine immobilize edilmiş invertaz enzim elektrodu
CF/Ppy/PPO	: Karbon fiber elektrot üzerinde polipirol polimeri içine immobilize edilmiş polifenol oksidaz enzim elektrodu
DB	: Değerlik Bandı
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
İB	: İletkenlik Bandı
PA	: Poliasetilen
PAN	: Poliakrilonitril
PPO	: Polifenol oksidaz
Pt/Ppy/INV	: Platin elektrot üzerinde polipirol polimeri içine immobilize edilmiş invertaz enzim elektrodu
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
UV	: Ultraviyole

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Elektrotların gitgide küçülmesi mikroelektrotların enzim immobilizasyonu için kullanımına olan ilgiyi artırmıştır. In vivo klinik araştırmalar ve küçük numune hacimleri için mikroelektrot kullanımına ihtiyaç vardır. Karbon fiber elektrotlar düşük maliyetleri, üretim kolaylığı ve dayanım özellikleriyle mikroelektrot olarak ilgi çekmektedir. Ultramikro ve nanoelektrot olarak geliştirilme potansiyeline sahiptir ve mikro düzeydeki numune hacimleri için çok uygundur [1]. Karbon fiberlerin mikroelektrot [2] ve hatta nanoelektrot [3] olarak kullanıma uygunluğu, ucuz olması, yüksek yüzey alanına sahip olması, yüzey modifikasyonlarına uygunluğu [4] karbon fiberi elektrot malzemesi olarak oldukça kullanışlı kılmıştır.

Bu çalışmada mikro elektrot kullanan biyosensörlere [2,5] bir ön çalışma olarak polimer modifiyeli karbon fiber enzim elektrotları hazırlandı. Enzim olarak model enzim invertaz kullanıldı. Yanısıra polifenollerin analizi için kullanılan polifenol oksidaz enzimi çalışıldı. Enzimler spesifik katalizörlerdir ve enzimin beraberinde getirdiğı, substratına spesifik olma avantajının yanısıra elektrokimyasal yöntemlerle beraber yarattığı hassasiyet yüksekliğı enzim elektrotlarının analiz amacıyla yaygın olarak çalışılmasına neden olmuştur.

İnvertaz enzimi model enzim olmasının yanı sıra çok yaygın kullanılan endüstriyel bir enzimdir. İnvertaz gibi endüstriyel enzimlerin pek çok doğal veya sentetik organik polimerde [6] ve anorganik malzemelerde immobilize edilmesi geniş bir araştırma alanıdır. Enzimler hem pahalı hem kolaylıkla aktivitesini kaybedebilen malzemelerdir. Bu nedenle serbest olarak kullanımından ziyade immobilizasyon yapılarak enzimin geri kazanımı ve tekrar tekrar kullanımını önemlidir. İmmobilize edilen enzim reaksiyon ortamından geri alınabilir ve bu maliyeti düşürmede önemli bir etkidir. Ayrıca enzimin reaksiyon ortamından geri alınabilmesi ile daha temiz üretim elde edilir. Bu

çalışmada invertaz enzimi immobilize edilerek sukroz tayininde ve invert şurup elde edilmesinde kullanılabilir enzim elektrotları elde edilmiştir.

Polifenol oksidaz hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunan bir enzimdir ve fenolik bileşiklerin analizinde kullanılabilen önemli bir biyomateryaldir. Yapılan son çalışmalar, bitkilerdeki antioksidan etkili maddeler ve fenolik bileşiklerin sağlıklı yaşam üzerindeki etkilerine odaklanmıştır. Bitkiler, doğal antioksidan bileşiklerin başlıca kaynağını oluşturmaktadır. Son yıllarda çevre kirliliği, kentsel yaşam koşulları ve tüketime hazır gıdaların fazlalığı insanların antioksidanlara olan ihtiyacını artırmıştır. Toplumda hastalıklardan en iyi korunma yöntemi olarak bağışıklık sistemine yardımcı ve aktive edici özelliği olan antioksidanların kullanımı, fenolik madde içeriği fazla gıdaların tüketimiyle mümkündür ve vücutta birçok rahatsızlığın oluşmasına engel olabilecek potansiyele sahiptir. Taşıdığı önem itibarıyla antioksidan özellikli fenolik bileşiklerin etki mekanizmalarının ve canlılar üzerindeki etkilerinin tespit edilmesi, sebze, meyve ve bitkilerde bulunan fenolik içeriğin tayini önemlidir [7]. Bu çalışmada çay numunelerindeki fenolik içeriğin tayini amacıyla polifenol oksidaz immobilizasyonu yapılmıştır.

Çalışmanın amacı yeni karbon fiber enzim elektrotları oluşturmaktır. Yeni tip karbon fiber elektrotların hazırlanması ve bu elektrotlar üzerine pirol monomerinin elektrokimyasal yöntemle polimerizasyonu hedeflenmiştir. Polimerizasyon döngüsel voltametri ile takip edildi. Polimerin FTIR'la yapı tayini yapıldı ve morfolojisi SEM fotoğraflarıyla incelendi. Bu polimerizasyon esnasında ortama eklenmiş olan invertaz ve polifenol oksidaz enzimleri ayrı çalışmalarla polimer molekülleri arasında immobilize edildi. Bu şekilde oluşturulan enzim elektrotlarının önce aktivite tayinleri ile karakterizasyonu daha sonra pH, sıcaklık, dayanıklılık testleriyle optimizasyonu yapıldı. Böylece oluşturulan yeni tip karbon fiber enzim elektrotlarının incelenmesinin ardından numune analizleriyle çalışma tamamlandı.

BÖLÜM 2

KURAMSAL TEMELLER

2.1. İLETKEN POLİMERLER

Polimerler, önceleri oda sıcaklığında çok düşük iletkenliğe sahip yalıtkan organik maddeler olarak bilinmekteydi. Bundan dolayı uzun yıllar elektriksel açıdan yalıtkan malzeme olarak kullanılmışlardır. Polimerlerin doğrudan elektronlar üzerinden elektriği ileterek iletkenlik kazanabileceği ilk kez poliasetilen (PA) ile yapılan çalışmalarla anlaşılmıştır.

Sentezlenen ilk iletken polimer olarak bilinen poliasetilen siyah bir toz madde olarak bilinmekte iken Natta ve meslektaşları Ziegler tipi katalizör kullanarak asetilenin polimerizasyonu ile ilgili sistemi geliştirdi. 1963 yılında ise Karl Ziegler ve Giulio Natta'ya yüksek polimerlerin kimyası ve teknolojisi alanındaki keşiflerinden dolayı ortaklaşa bir Nobel ödülü verildi. Hideki Shirakawa, 1974 yılında Ziegler-Natta katalizörü olarak bilinen $Ti(O-n-But)_4$ kullanarak yeterli iletkenliğe sahip olmayan gümüş renginde poliasetilen filmler elde etmiştir. 1977 yılında H. Shirakawa, A.J. Heeger ve A.G. MacDiarmid poliasetilen filmlerin iyot, klor ya da flor buharına tutulduğunda iletkenliklerinin 10^9 kat arttığını yani polimerin yükseltgenerek iletkenliğinin 10^5 S/m dolayına çıktığını tespit etmişlerdir. Polimerlerin elektriksek iletkenlik sistemiyle ilgili bu keşifler onlara 2000 yılında kimya alanında Nobel ödülü kazandırmıştır [8,9].

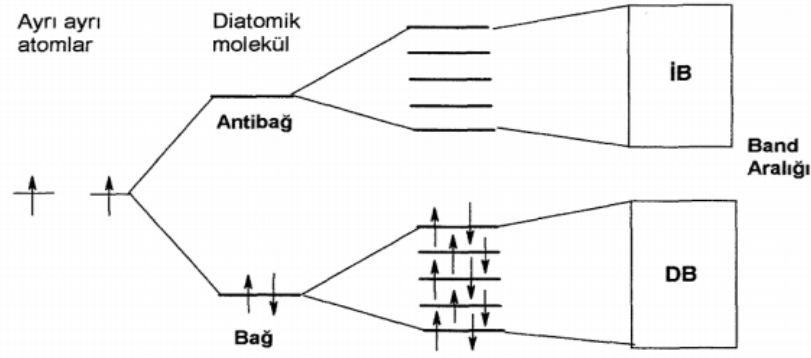
2.1.1. Polimerlerde İletkenlik Teorisi

İletken polimerler zincirlerinde bulunan tekli ve çiftli bağların art arda sıralanmaları sonucu oluşan π konjugasyonuna sahiptirler. Polimerlerin ana zincirinde bulunan

konjuge çift bağlar sayesinde elektronlar, zincir boyunca taşınarak elektronik iletkenlik sağlanır. Yüksek düzeyde iletkenlik için konjugasyon yeterli değildir. Bu nedenle iletkenliği sağlayacak olan elektronlar, polimer yapısına verilerek veya alınarak polimer örgüsünde artı yüklü boşluklar oluşturulur. Artı yüklü bir boşluğa başka bir yerden atlayan elektron, geldiği yerde de artı yüklü boşluk oluşturacaktır. Bu işlemlerin ardı ardına zincir boyunca tekrar edilmesiyle elektrik iletilmiş olur [8].

2.1.1.1. Band Teorisi

Bağ oluşumu sırasında bağ orbitali denilen iki elektronun bulunduğu bağ enerji düzeyi ve antibağ orbitali denilen boş halde bulunan antibağ enerji düzeyi olmak üzere iki yeni enerji düzeyi ortaya çıkar. Bağ orbitalindeki elektronlar, ısı veya ışık etkisiyle yeterli enerji alarak daha yüksek enerjili antibağ orbitaline çıkabilirler. Birden fazla elektronu olan daha karmaşık moleküller arasında bağ oluşumunu da bu şekilde açıklamak mümkündür. Moleküle yeni bir atom katıldığında molekülün elektronik yapısında yeni bir bağ ve anti bağ enerji düzeyi oluşur. Bu durum, Şekil 2.1'de orta büyüklükte bir molekül için gösterilmiştir. Molekül büyüklüğü arttıkça bağ orbitallerinin sayısı artar. Dolayısıyla orbital enerji düzeyleri arasındaki fark azalır. Bir noktada birbirinden net ayrılmış enerji düzeyleri yerine sürekli görünümdeki bir enerji bandı oluşur. Bu banda değerlik bandı veya valans bandı denilir (Şekil 2.2). Valans bandı içerisinde bulunan elektronlar kolayca yerlerini değiştirerek band içerisinde hareket edebilirler. Sayıları sonsuza yaklaşan antibağ orbitalleri de iletkenlik bandı adı verilen başka bir enerji bandı oluşturur. Valans bandı ve iletkenlik bandı arasındaki aralığa band eşiği veya band aralığı, bu aralığın geçilmesi için gerekli enerjiye ise band eşik enerjisi adı verilir. Maddelerin yalıtkan, yarı iletken, iletken şeklinde elektriksel iletkenlikleri açısından gruplandırılmasında band eşik enerjisinin büyüklüğü etkilidir [10].

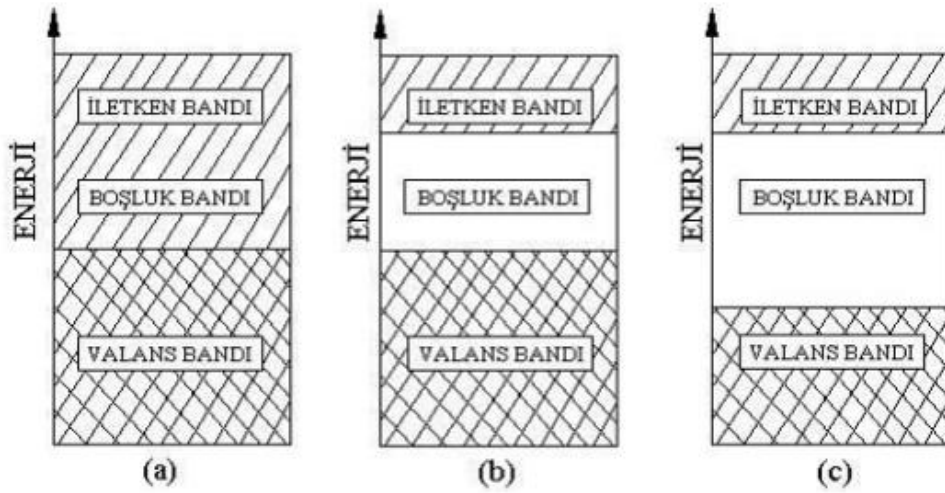


Şekil 2.1. Polimer molekülünde bağ ve antibağ orbitallerinin oluşumu [12].

Yalıtkanlar: Elektriksel iletkenlikten, valans bandında, iletkenlik bandında veya bağ eşiğindeki yeni bir enerji düzeyinde bulunan çiftleşmemiş elektronlar sorumludur. Bu tür serbest elektronlar, sisteme uygulanan potansiyele bağlı olarak uygun yönde hareket ederler. Valans bandı enerji düzeyleri tamamen elektronlarca dolu olduğunda elektronların bir yöne akımını sağlamak zordur. Böyle bir sistemde ısı veya ışık uyarısıyla serbest elektronlar oluşturulabilir. Yeterli enerjiye ulaşan valans bandının en üst düzeyindeki elektronlar, band eşiğini geçerek iletkenlik bandının en alt düzeyindeki enerji seviyesine yerleşirler ve iletkenliği sağlarlar. Yalıtkanlarda bağ eşiği bu geçişe izin vermeyecek kadar geniştir [8].

Yarı İletkenler: Yarı iletkenlerde band eşik aralığı, yalıtkanlardan daha küçüktür ve iletkenlikleri 10^{-6} - 10^2 S/cm aralığında değişir. Bu düzeydeki elektriksel iletkenlik düşük gibi gözükse de yeterli elektrik akımı sağlayacak büyüklüktedir. Ana zinciri üzerinde ardı ardına tek ve çift bağ sıraları içeren konjüge polimerler yarı iletkenlik gösterebilirler. Yarı iletken polimerlerde valans bandı ve iletkenlik bandı arasındaki enerji seviyesi yeterince düşük olduğunda, ısı veya ışık etkisiyle serbest elektronlar iletkenlik bandının en düşük enerji düzeyine geçebilirler. Bu elektronlar iletkenlik bandı içerisinde hareket ederek yük taşıyıcı işlevi yapar ve zincir boyunca ilerleyerek artı yüklü yöne doğru yönelir. Bu sırada valans bandı içerisinde kalan artı yük boşluğu, polimer zinciri üzerinde elektrona ters yönde hareket eder. İletkenlikleri sıcaklık ya da ışık yoğunluğunun artışıyla yükselir [8].

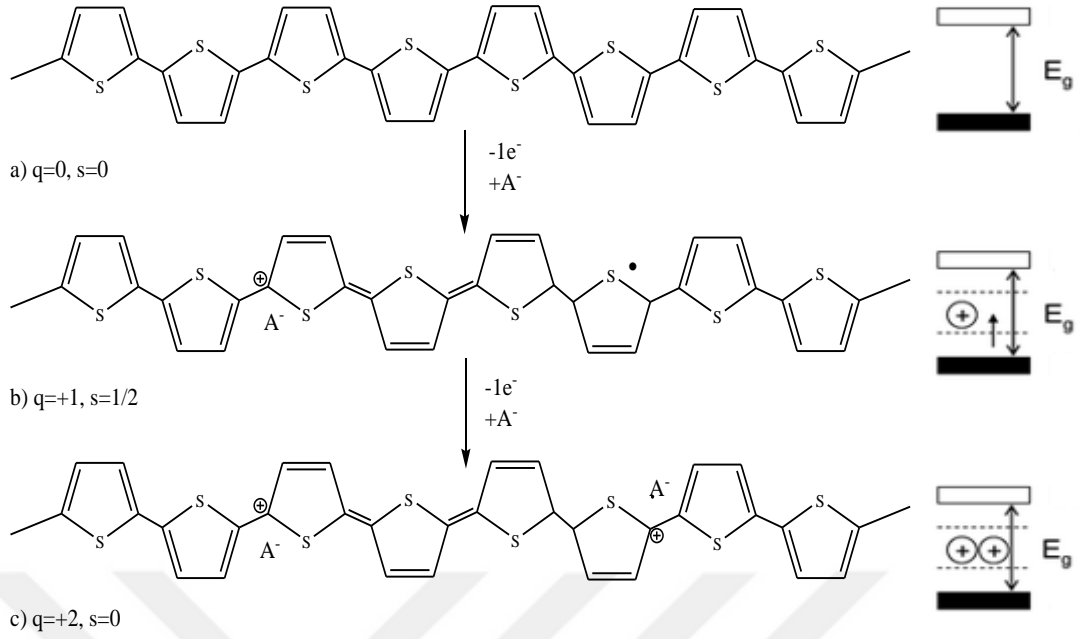
İletkenler: Çoğu metal atomu tek elektrona sahiptir ve yanındaki bir başka metal atomuyla da kovalent bağ yapamaz. Bu yüzden metallerin valans bandı kısmen dolu, iletkenlik bandı ise boştur. Metal elektronları, yüksek olasılıkla valans bandın düşük enerjili orbitallerinde bulunurlar. Aynı band içerisinde veya aynı band ile örtülmüş iletkenlik bandında geçebilecekleri daha üst enerji düzeyli boş yerler her zaman vardır. Elektron iletimini kısmen dolu valans ya da iletkenlik bandı üzerinden veya band eşiği geçişiyle sağlarlar [8].



Şekil 2.2. Band yapıları a) iletken, b) yarı iletken ve c) yalıtkanlar için [10].

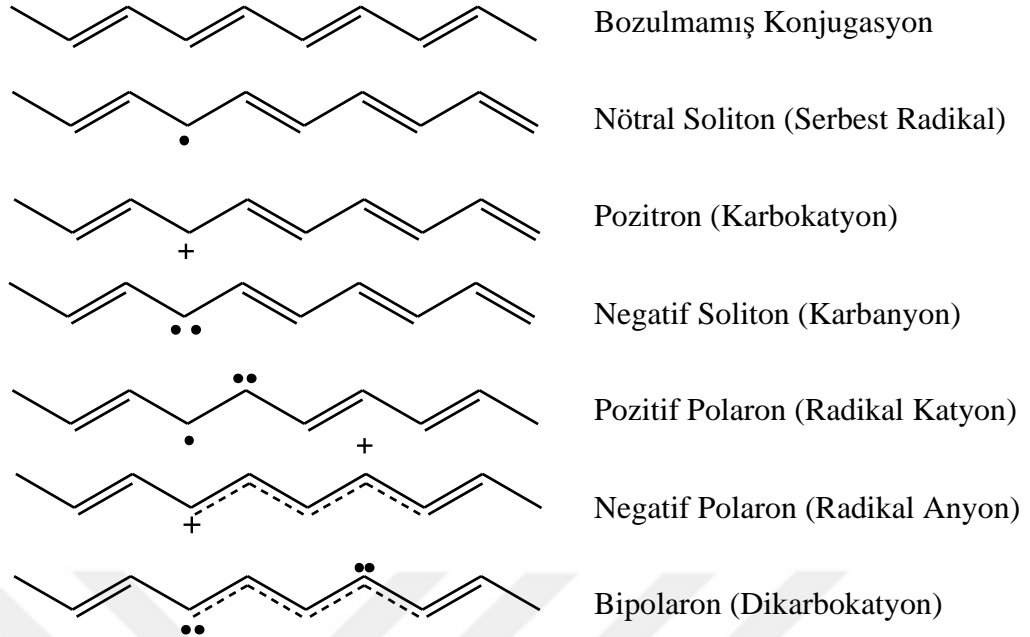
2.1.1.2 İletken Polimerlerde Doplama

Polimerin valans bandında bulunan elektronlar yükseltgen bir reaktifte koparılarak polimer, pozitif yükle yüklenir ise p- tipi doplama; eğer bu işlem indirgen bir reaktif ile boş iletkenlik bandına bir elektron verilerek gerçekleşiyorsa n- tipi doplama olarak adlandırılır. Bu doplama işlemiyle iletkenlik sağlanarak yük taşıyıcılarının sayısı artırılır. Doplama boyunca dopant moleküller, polimer atomlarıyla yer değiştirmez, dopantlar yalnızca elektronların enerji kabuklarından geçişine yardımcı olurlar. İletken polimerlerin iletkenliğini açıklamada band teorisi yeterli olmadığından, bu konuda Şekil 2.3'te olduğu gibi nötr polimer, polaron, ve bipolaron yapılarından yararlanır. Polimerin iskelet yapısına doplama yapmak üzere verilen elektrik yükü, polimerin elektronik durumunda bir değişime neden olur [11].



Şekil 2.3. Polaron, bipolaron yapıları ve band diyagramı. a) nötr polimer b) polaron yapısı c) bipolaron yapısı [12].

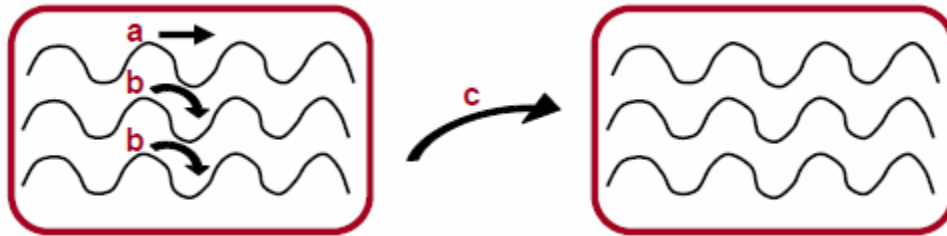
Konjuge bağlara sahip yüksüz polimerin (Şekil 2.3 (a)) yükseltgenmesiyle çift bağ parçalanır ve polimer zinciri üzerinde pozitif yüklü bir radikal oluşur (Şekil 2.3 (b)). İletken polimer zinciri üzerinde oluşan bu yük taşıyıcılara ‘polaron’ ya da ‘radikal kation’ denir. Polarondan gelen iki radikalın birleşmesi yeni bir π bağı oluşturur. Polarondan gelen iki radikalın yükseltgenmesiyle ise ‘bipolaron’ adında yeni bir spinsiz pozitif boşluk oluşur (Şekil 2.3 (c)). Burada iki radikal birleşip yeni bir π bağı meydana getirir. Bipolaronda çiftleşmemiş elektron yoktur ve bu sayede serbest elektronlara gerek kalmadan iletkenlik sağlanır [11]. Polaronlar ve bipolaronlar karşı iyonların hareket yeteneğine göre zincir boyunca hareket edebilirler. İyonların yeterince hareketli olabilmeleri için yeterli miktarda karşı iyon, doplanma ile sağlanmalıdır. Şekil 2.4’te gösterildiği gibi poliasetilenin kontrollü şekilde doplanmasıyla bir elektron koparılır ve nötr ya da yüklü bir ‘soliton’ elde edilir. Yapılar içinde oluşturulan soliton, polimer zinciri üzerindeki yük dağılımını karbenyum (karbokatyonu) kararlı kılar. Benzer şekilde, bir elektron vericiyle veya n-doplama maddesi ile polimer muamele edilirse, orta seviyedeki enerji boşluklarına bir elektron ilave edilerek negatif bir soliton oluşturulur [13].



Şekil 2.4. Poliasetilenin soliton, polaron ve bipolaron yapıları.

2.1.1.3. İletken Polimerlerde Hopping

Zincir üzerindeki yük taşıyıcılarının yanında, farklı polimer zincirleri arasında elektrik yükün aktarımı ise atlama (hopping) ile sağlanır. Bir nötral soliton, kendine yakın bir zincirdeki yüklü solitonla etkileşir ve yüklü solitonun elektronu nötral solitona atlar. Hopping kuralında elektronik yükün hareketliliği, polimer zinciri boyunca, zincirler arası transferle ve bloklar arası transferle sağlanır (Şekil 2.5) [14].



Şekil 2.5. Yükün taşınması, a) zincir üzerinde yükün taşınması, b) zincirler arasında yükün taşınması, c) zincir blokları arasında yükün taşınması [13].

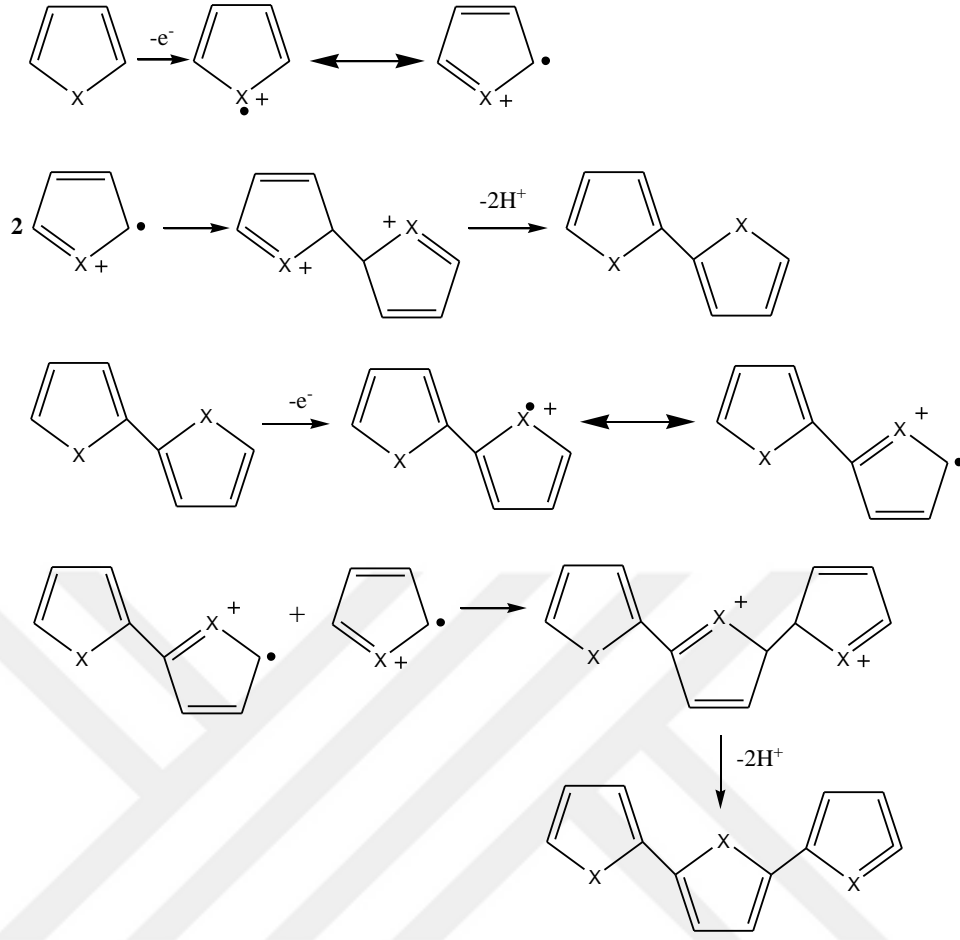
2.1.2. İletken Polimerlerin Sentezi

2.1.2.1. Kimyasal Sentez

Kimyasal yöntemde, uygun bir çözücüde çözülen monomer bir yükseltgenme veya indirgenme aracı olarak kullanılan bir kimyasal madde ile etkileştirilerek polimerleştirilir. Bu yöntemin yükseltgenme basamağının kontrol edilememesi ve oluşan ürünün saf olmaması gibi dezavantajları, istenilen miktarda ve makul bir maliyetle ürün elde etmek gibi avantajları vardır. Kimyasal yöntemde, kullanılacak olan doping maddesi ve katalizörün elde edilecek iletken polimerin elektriksel iletkenliği üzerinde önemli etkisi bulunmaktadır [15]. Toshima tarafından yapılan poli(p-fenilen)'in sentezi çalışmasında doping maddesi olarak CuCl_2 ve katalizör olarak AlCl_3 'ün kullanılması ile elde edilen polimer elektriksel iletkenlik göstermemiştir. Ancak doping maddesi olarak AsF_5 veya Li gibi maddelerin kullanılması ile $0,3 \text{ S.cm}^{-1}$ - 500 S.cm^{-1} arasında değişen iletkenlik gözlenmiştir. Konjuge polimerlerin tümü kimyasal yöntemle sentezlenebilmektedir. Başka bir çalışmada, çözücü olarak metanol, doping maddesi olarak 2,5 M FeCl_3 kullanılarak pirolün kimyasal yöntemle polimeri hazırlanmış ve iletkenliğinin 190 S.cm^{-1} 'e ulaştığı belirlenmiştir [16].

2.1.2.2. Elektrokimyasal Sentez

Pirol, tiyofen, anilin, furan gibi rezonans kararlılığındaki aromatik moleküllerin elektrokimyasal yükseltgenmesiyle elektronik iletken polimerler elde edilir. Elektropolimerizasyon, çözücü/elektrolit ortamına monomer koyularak ve ortama potansiyel uygulayarak gerçekleştirilir. Nötral polimer ile radikal katyonun reaksiyonu veya radikal katyon/radikal katyon reaksiyonuyla polimerizasyon meydana gelir. Şekil 2.6'da anotta gerçekleşmiş olan, heterosiklik bileşiklerin polimerleşme mekanizması verilmiştir [17].



Şekil 2.6. Heterosikliklerin elektropolimerizasyon mekanizması (X= N-H, S, O).

Elektrot üzerinde monomerin uygun bir potansiyel ile yükseltgenip bir radikal kation oluşturmasıyla elektrokimyasal aşama başlar. Elektron transfer reaksiyonu, monomerin difüzyonundan daha hızlıdır ve elektrot yüzeyi çevresindeki çözelti yüksek radikal konsantrasyonuna sahiptir. Bu ilk aşamayı iki radikal kationun birbirine bağlanmasıyla gerçekleşen bağlanma reaksiyonu (coupling) takip eder. Radikal-radikal bağlanma durumunda, dihidro dimer kation, bir dimer üzerinden iki hidrojenin ayrılmasıyla meydana gelir. Bu antiaromatik durum kimyasal aşamayı temsil eder. Potansiyel uygulandığı için dimer, monomerik bir radikalle tekrar bir bağlanma reaksiyonuna maruz kalır. Radikal-monomer bağlanma reaksiyonundan, iki protonunu ve diğer elektronunu kaybeden nötral bir dimer meydana gelir. Dimerler ve oligomerler, monomerin radikal kationuyla bağlanma reaksiyonuna girerler ve protonlarını kaybedip antiaromatik olurlar. Elektrokimyasal ve kimyasal aşamalar ardı

ardına bu şekilde devam eder. Oligomerler elektrolit çözeltisi içinde çözünmeden kalana kadar bu reaksiyon elektrot yüzeyinde devam eder [18].

Elektrokimyasal polimerizasyonda dönüşümlü voltametri (CV) teknikleri kullanılabilir. Dönüşümlü voltametri, monomerin yükseltgenme potansiyeli, film üzerinde büyümesi, polimerin redoks davranışı ve yüzey konsantrasyonu (polimer tarafından harcanan yük) ile ilgili bilgileri sağlar. Spesifik alanda, 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 sonra tersi yönde (anodik-katodik) taramaya devam edilir. 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 arasındaki ölçülen akım artar. Bunun sonucunda elektrot yüzeyi ile çözelti arasında oluşan derişim farkı, çözülden 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 potansiyelle 'yükseltgeme veya indirgeme pik potansiyeli' denir [13].

2.1.3. İletken Polimerlerin Kullanım Alanları

İletken polimerler, elektrokimyasal yöntemlerle sentezlenebildikleri, elektriksel iletkenlik göstermeleri ve yalıtkan polimerlerle birlikte kullanılabilmelerinden dolayı çok geniş kullanım alanlarına sahiptirler. İletken polimerlerin düşük akımlar üretmeleri, tersinir doplama özelliklerinden dolayı şarj edilebilir ve uzun ömürlü olmaları nedeniyle kalp pili gibi pillerde elektrot olarak kullanılırlar.

Polimerin indirgenme-yükseltgenme reaksiyonu sonucu oluşan kimyasal sinyaller elektrik sinyaline çevrilerek diyot, transistör gibi elektronik cihazlar yapılmıştır. Ayrıca akıllı pencere ve araba camları, ileri teknoloji gözlükler ve askeri kamuflaj

elbiseleri gibi elektrokromik prensiple çalışan malzemelerin yapımında da kullanılır. Bunların yanı sıra pH, gaz ve nem sensöründe, korozyon inhibitöründe, fotoelektrokimyasal hücrelerde, ışık saçan diyotlar (LED-OLED), alan etkili transistörler, fotovoltaiik hücreler ve süperkapasitörlerde de kullanılır [13].

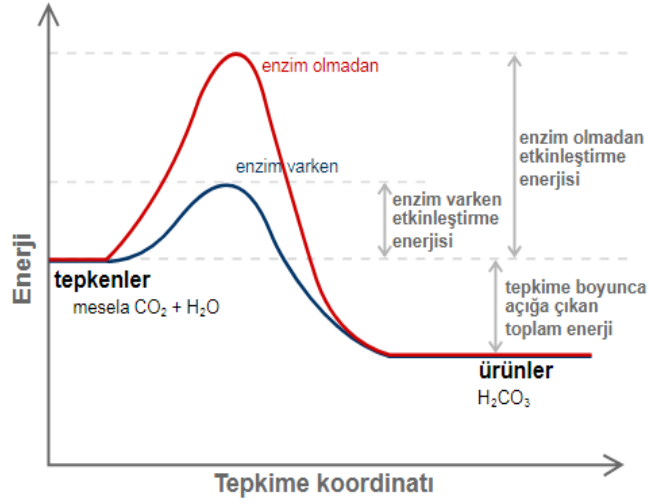
İletken polimerlerin önemli bir kullanım alanı da biyosensörler ve enzim elektrotlarıdır. Biyolojik elementin seçiciliği ve analitin konsantrasyonu ile orantılı sinyal üreten dedektörün birleşimiyle oluşan analitik bir cihaz olan biyosensörler yüksek seçicilik, hızlı cevap süresi, basit dizaynları ve ucuz olmaları gibi avantajlarından dolayı enzim sensörü olarak pek çok maddenin analizinde kullanılma potansiyeline sahiptir [19,20].

2.2. ENZİMLER

Enzimler, organik moleküllerin yapımı ve yıkımı gibi kimyasal tepkimelerin neredeyse tamamını 10^{10} ile 10^{12} civarında bir oranda hızlandıran, tepkime esnasında tüketilmeyen ve tepkime sonunda bir değişime uğramadığından dolayı tekrar kullanılabilen protein yapılı biyokatalizörlerdir [21].

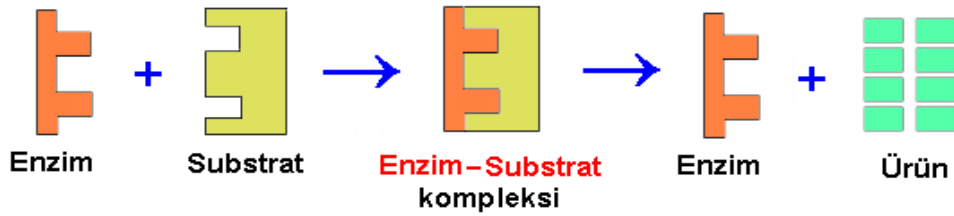
Enzimler sadece canlılar tarafından sentezlenir ve diğer kimyasal katalizörlerden en önemli farkı özgül olmalarıdır. Katalizledikleri tepkimeye katılan molekölü yani substratını katalizlemesi mutlak özgülüğü, bir enzimin belirli bir substrat grubuna olan etkinliğı grup özgülüğünü, belirli bir bağa karşı olan etkinliğı ise bağ özgülüğünü ifade eder. Bu özgülük özelliğı istenmeyen tüm yan tepkimelerin ve ürünlerin engellenmesini, seçilen tepkimenin gerçekleşerek daha yüksek verim alınmasını sağlar. Böylece istenilen ürün daha az basamakla üretilebileceğinden, enerji gereksiniminin azlığından ve ılıman koşullarda çalışılabildiğinden maliyet de azalır.

Bir kimyasal reaksiyonun başlaması için gereken minimum enerjiye aktivasyon enerjisi denir. Aktivasyon enerjisinin düşürülmesine yönelik alternatif bir yol ise Şekil 2.7.'de görüldüğü gibi enzimler sayesinde gerçekleşir [21].



Şekil 2.7. Enzimin aktivasyon enerjisine etkisi.

Enzimler substratlarını uygun doğrultuda yönlendirerek belirli aminoasit dizilerinden oluşan aktif bölgelerine bağlanmasını sağlarlar. Böylece aktifleşmiş kompleks veya geçiş kompleksi diye adlandırılan enzim-substrat kompleksi oluşur. Bu oluşum mekanizmasına dair ilk hipotez, Emil Fischer tarafından öne sürülen anahtar-kilit modelidir (Şekil 2.8.).



Şekil 2.8. Enzim substrat kompleksinde öne sürülen “anahtar-kilit modeli.

2.2.1. Enzimlerin Adlandırılması

- Katalizledikleri substrat grubunun sonuna –az eki getirilerek adlandırılırlar.
Örnek: Protein → Proteaz
- Katalizledikleri reaksiyonun sonuna –az eki getirilerek adlandırılırlar.
Örnek: Glikoz Oksidaz → Glikozun Oksitlenmesi [21].

2.2.2. Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimler kompozisyonları göz önüne alındığında ikiye ayrılır.

- **Basit Enzimler**: Sadece proteinden meydana gelmiş olan enzimlerdir. Basit enzimlerin katalitik etkiyi gösteren kısmı polipeptit zinciridir. Pepsin, üreaz enzimi örnek olarak gösterilebilir.
- **Bileşik Enzimler**: Protein içeren kısmıyla birlikte çok daha küçük organik bir molekül veya metal içeren enzimlerdir. Enzimlerin yalnızca proteinden oluşan kısmına “apoenzim”, katalitik etki göstermesini sağlayan protein yapıda olmayan gruba “kofaktör” denir. Kofaktörler Ca^{2+} , Mg^{+} gibi bir metal iyonundan oluşabileceği gibi “koenzim” adı verilen organik bir gruptan da oluşabilirler [21,22].

Günümüzde enzimler Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından 6 temel sınıfa ayrılmıştır. Bunlar: oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlardır [21].

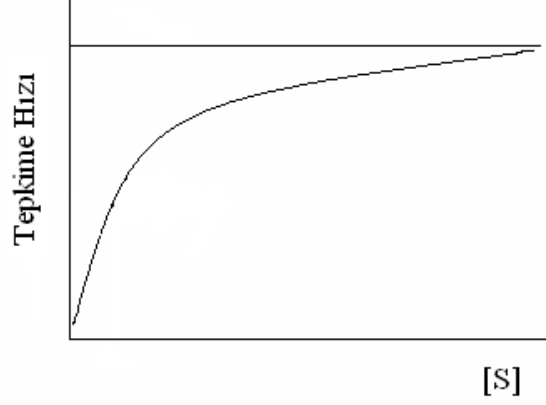
2.2.3. Enzim Aktivitesi

Bir enzimin aktivitesi, optimum koşullarda birim zamanda harcanan veya ürüne dönüştürülen substrat miktarına göre tanımlanır. Birimi, IU'dir. 1 IU enzim aktivitesi, optimum koşullar sağlandığında 1 dakikada 1 μ mol substratı katalizleyen enzim miktarıdır. Enzimatik reaksiyonların hızına etki eden birçok etken vardır. Bunlardan bazıları substrat konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, sıcaklık, pH ve inhibitör etkisidir [21].

2.2.3.1. Substrat Konsantrasyon Etkisi

Enzim katalizli reaksiyonlarda optimum koşullarda reaksiyon hızı artan substrat konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak artar. Enzim moleküllerinin tamamı enzim-substrat kompleksi oluşturduğunda ise reaksiyon hızı maksimuma ulaşır (V_{max}).

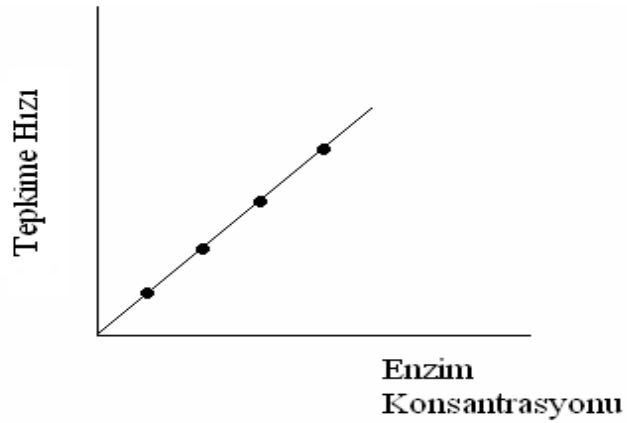
Substrat konsantrasyonu artmaya devam etmesine rağmen reaksiyon hızında bir artış gözlenmez. Bu da enzimin substrata doymuş olduğunu gösterir (Şekil 2.9.) [21].



Şekil 2.9. Substrat konsantrasyonunun reaksiyon hızına etkisi [13].

2.2.3.2. Enzim Konsantrasyon Etkisi

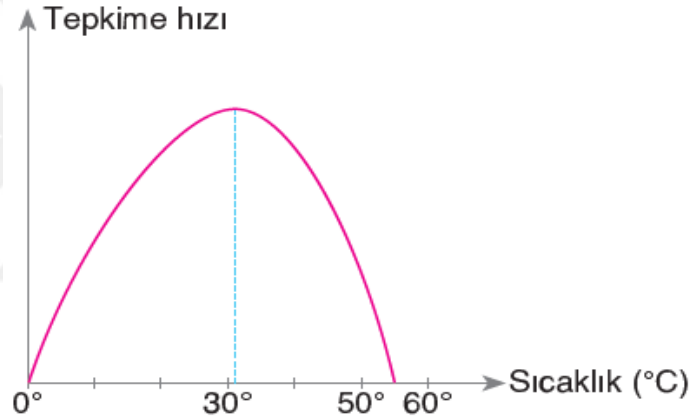
Ortamda bol substrat olduğunda reaksiyonun hızı enzim konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak artar. Enzim miktarı ne kadar fazla ise reaksiyon hızı da o kadar fazla olur (Şekil 2.10.) [21].



Şekil 2.10. Enzim konsantrasyonunun reaksiyon hızına etkisi [13].

2.2.3.3. Sıcaklık Etkisi

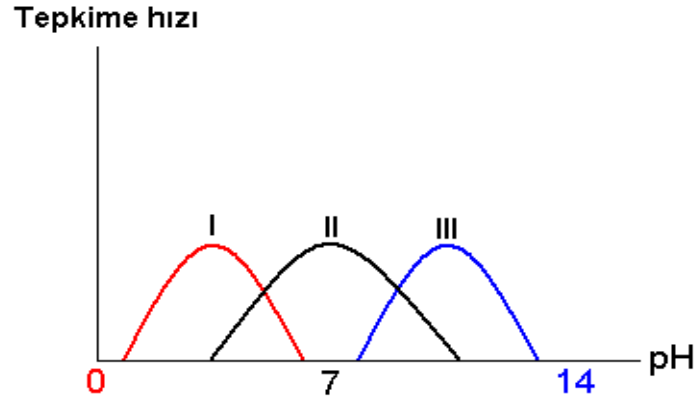
Sıcaklık arttıkça reaksiyona giren moleküllerin çarpışma hızı da artar. Reaksiyonların hızı her 10 °C sıcaklık artışıyla birlikte 1 ile 3 kat arasında artış gösterir. Fakat bu artış belirli bir değere kadar devam eder. Bu değer şekil 2.11'deki gibi o reaksiyonun optimum sıcaklığıdır. Sonrasında moleküllerde meydana gelen bazı değişiklikler ya reaksiyonu yavaşlatır ya da tamamen durdurur. Enzimlerin protein yapılı oluşu sıcaklık değişimleriyle üç boyutlu yapılarında bozulmaya yani denatürasyona neden olur. Bu denatürasyon düşük sıcaklıklarda geri döndürülebilir yani sıcaklık artışıyla aktivitelerini tekrar kazanabilirler fakat yüksek sıcaklıklarda geri döndürülemezdir. Bu durumda aktivite tamamen kaybolur [21].



Şekil 2.11. Sıcaklığın reaksiyon hızına etkisi.

2.2.3.4. pH Etkisi

Enzimler asidik ve bazik grup içeren amfoter moleküllerdir. Ortamın pH'ı bu grupların yüklerini değiştirerek enzim yüzeyindeki yük dağılımını ve net yükü etkiler. Böylece enzimin aktivitesinde bir değişim meydana gelir. Enzimlerin maksimum aktivite gösterdiği pH'a optimum pH denir. Şekil 2.12'de görüldüğü gibi bu pH değeri her enzim için farklı bir değerdir [13,21].



Şekil 2.12. pH'nin reaksiyon hızına etkisi.

2.2.3.5. İnhibitör Etkisi

Reaksiyon hızını düşüren veya durduran maddelere inhibitör denir. Şekil 2.13'teki gibi bazı inhibitörler enzimle ara bileşik oluşturarak reaksiyon hızını düşürür bazıları da enzimin aktif bölgesine bağlanarak enzim etkinliğini durdururlar [9].

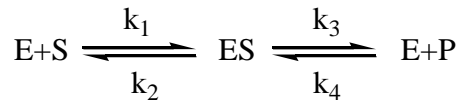


Şekil 2.13. Enzim-inhibitör ilişkisi [23].

Bunların dışında su miktarı, ürün derişimi, zaman gibi enzim aktivitesini etkileyen pek çok etken daha vardır.

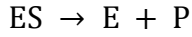
2.2.4. Enzim Kinetiği

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) dönüştürerek serbest enzim ve ürün ortaya çıkar [24].

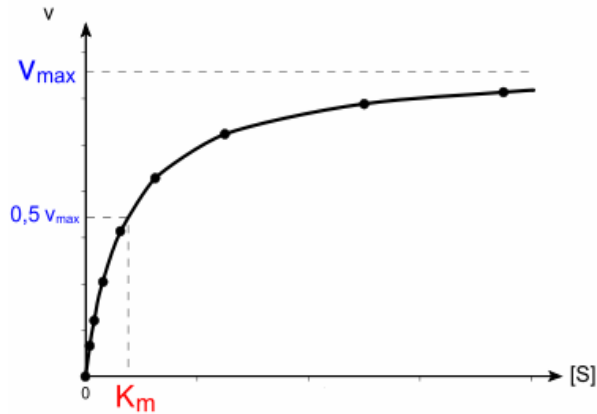


Burada; k_1 , k_2 , k_3 , k_4 bu reaksiyonun hız sabitlerini göstermektedir. k_1 ile ES kompleksi oluşmakta, k_2 ile ES kompleksi enzim ve substrata ayrılmakta, k_3 ile ES kompleksi enzim ve ürünü oluşturmaktadır, k_4 ise ES kompleksini oluşturmaktadır.

Serbest enzim ve ürünün ES kompleksine dönüşme hızı (k_4) çok düşük olduğundan ihmal edilerek bu tepkime aşağıda gösterildiği gibidir [24].



Substrat konsantrasyonuna bağlı olarak reaksiyon hızı grafiğe aktarıldığında Şekil 2.14'teki hiperbolik eğri elde edilir.



Şekil 2.14. Substrat konsantrasyonuna karşı reaksiyon hızı grafiği [13].

Reaksiyon hızına karşı substrat konsantrasyonu grafiğinde de görüldüğü gibi hız substrat konsantrasyonu 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 [24].



[ES]'nin oluşma 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 yaklaşım kuramına göre [ES]'nin oluşma hızı [ES]'nin tükenme hızına eşit olduğundan dolayı Eşitlik 2.3 elde edilir [24].

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

Eşitlik 2.3 ifadesi çözüldürse Eşitlik 2.4 elde edilir.

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

Reaksiyona giren E ve S maddelerinin konsantrasyonları [ES]'ye bölüldüğünde 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) [24].

Eşitlik 2.5 ifadesi Eşitlik 2.4 ifadesinde yerine yazılarak elde edilecek olan 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).

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

Reaksiyonu sonucunda 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 konantrasyonudur. 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 [24].

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 denkleminin dönüştürülmesi için tersine çevrilir ve çarpanlarına ayrılırsa Lineweaver-Burk denklemi elde edilir (Eşitlik 2.14) [24].

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

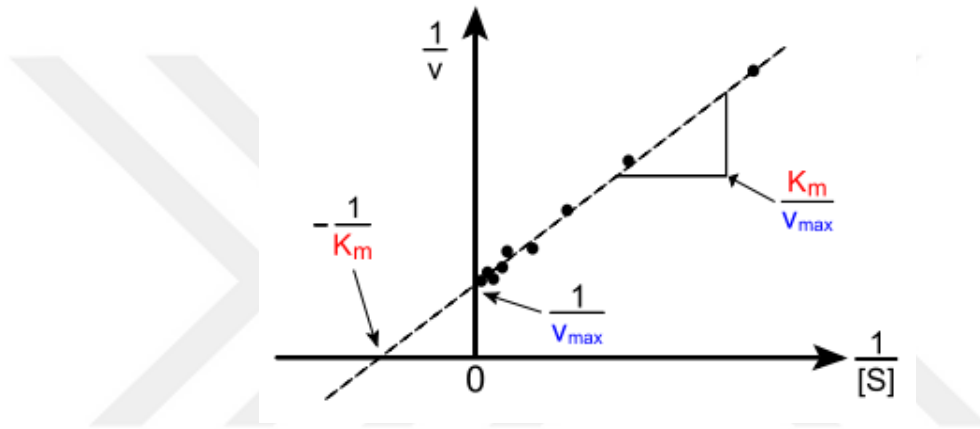
Düz bir çizgi denklemini veren ifade Eşitlik 2.15 ile gösterilir.

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

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 2.15).

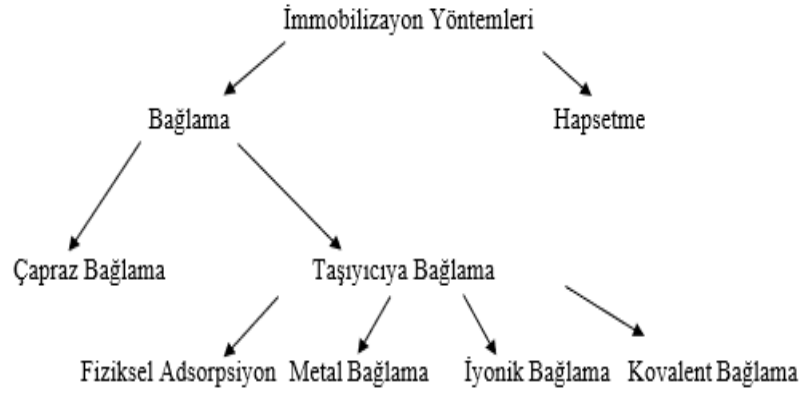


Şekil 2.15. Lineweaver-Burk grafiği [13].

2.2.5. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzim immobilizasyonu serbest haldeki enzimin taşıyıcı bir maddeye immobilize edilmesi veya bağlanması işlemidir [22]. Bu işlem sonucunda enzimler üründen kolayca ayrılarak tekrar kullanılabilir. Bu da ürünün kirletilmesini önlemek için yapılan işlemlerin gerekliliğini ortadan kaldırarak zamandan ve maliyetten tasarruf etme gibi avantajlar sağlar. Ayrıca serbest enzimlere göre daha kararlı ve uzun yarılanma ömrüne sahip olmaları, farklı optimum koşullardaki enzimlerin aynı süreçte birlikte ve daha uzun süre kullanılabilmesi gibi pek çok avantajları daha vardır [21].

Enzim immobilizasyon yöntemleri Şekil 2.16'da görüldüğü gibi bağlama ve hapsedme olarak ikiye ayrılır.



Şekil 2.16. Enzim immobilizasyon yöntemleri.

2.2.5.1. Bağlama

Bu işlemde enzimle fonksiyonel gruplar arasında yeni bağlar oluşturularak enzim modifiye edilir. Bağlama; çapraz bağlama ve taşıyıcıya bağlama şeklinde iki yolla olur. Taşıyıcıya bağlama fiziksel adsorpsiyon veya metal, iyonik, kovalent bağ oluşturularak gerçekleşir.

Çapraz Bağlama: Enzim moleküllerinin fonksiyonel grup içeren gluteraldehit gibi bir çapraz bağlayıcıyla reaksiyonu sonucu çoklu kovalent bağlarla çapraz bağlanarak suda çözünmeyen kompleksler oluşturması yöntemidir [21]. Bu yöntemde enzimin yapısına kovalent bağlarla başka yapıların bağlanması veya aktif bölgenin çapraz bağlı yapının merkezinde kalarak substrata ulaşamaması sebebiyle enzim aktivitesinde azalma görülebilir.

Taşıyıcıya Bağlama: Bu yöntem enzimlerin adsorpsiyon, metalik, iyonik veya kovalent bağ ile destek malzemesine bağlanmasıyla oluşur. Bu destek malzemeleri silika, gözenekli cam gibi inorganik maddeler, zayıf aktiviteye sahip -OH grubu içeren poliakrilamid gibi organik veya selüloz gibi biyolojik desteklerdir [21].

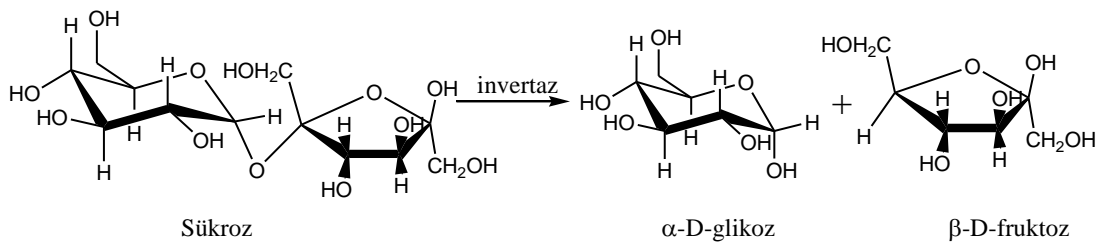
2.2.5.2. Hapsetme

Substratın içeri, ürünün dışarı difüzyonu için uygun olan gözenekli bir polimer ya da membrana enzimin yerleştirilmesi işlemidir. Hapsetme yöntemi, diğer yöntemlere göre daha küçük substrat ve ürün molekülleri için uygundur [21,25].

Hapsetme metodunun çapraz bağlama ve kovalent bağdan farkı, enzimle matris arasında bağ bulunmamasıdır. Bu sayede hapsetme metodu geniş bir uygulanabilirlik alanı kazanır. Fakat arada bağ olmaması sebebiyle matris gözeneklerinden enzim kaybı söz konusu olabilir. Kimyasal polimerizasyon reaksiyonuyla immobilizasyonda, reaksiyon şartları zordur ve bu durum enzimin aktivite kaybına neden olabilir. Enzimlerin fiziksel immobilizasyonunda elektrokimyasal polimerizasyon metodu daha hızlı, güvenilir, ekonomik ve basit olduğundan ilgi çeken bir metottür. Monomer ve enzimin uygun sulu çözeltilerinin bir elektrot yüzeyine uygun potansiyelde kaplanmasıyla uygulanır. Bunların yanında elektrokimyasal polimerizasyonla immobilizasyon, elektrot yüzeyi ve enzim arasında kimyasal bağların oluşumu nedeniyle enzim iskeletinin deformasyonuna ve enzimatik reaksiyonun aktivitesinin azalmasına neden olabilir [25]. Bu çalışmada ise polimere elektrokimyasal hapsetme yöntemi ile enzim immobilizasyonu yapılmıştır.

2.2.6. İvertaz

Hidroliz enzimlerinin alt grubu olan karbohidrazlardan invertaz (β -fruktofuranosidaz, E.C. 3.2.1.26), sükrozun α -1,4-glikozidik bağının parçalanmasıyla eş molar glikoz ve fruktoza hidrolizini (Şekil 2.17) katalizleyen spesifik bir enzimdir.

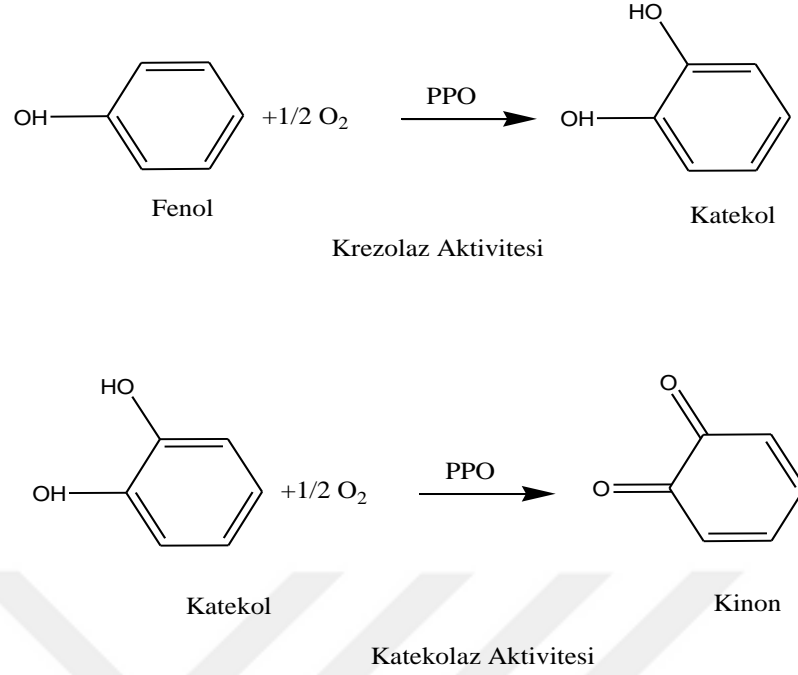


Şekil 2.17. Sükrozun hidroliz reaksiyonu [26].

β -fruktofuranosidaz oldukça dağınık şekilde bitki, hayvan ve mikroorganizmalar içinde bulunur. Enzimin sükrozu hidroliz edebilen iki tipi vardır. β -fruktofuranosidaz ve α -glukosidaz (α -Dglukositglukohidrolaz EC 3.2.1.20). İnvertz genel olarak ekmek mayası ve bira mayasından elde edilir. Mayadan elde edilen invertazın biri hücre duvarına lokalize olmuş dış enzim, diğeri ise sitoplazmik membranın içinde bulunan ve dış invertaza göre daha küçük olan iç enzim olmak üzere iki tipi vardır. Dış invertaz, enzimin hücre dış çeperinden yaklaşık olarak 500-1000 Å uzaklıktaki bölgede bulunur ve molekül ağırlığı 270.000 Dalton'dur ve hemen hemen mannozdan oluşmuştur. İç invertaz ise 135.000 Dalton'dur ve dış invertaza göre daha az karbonhidrat içerir. İmmobilize invertazın ticari kullanımının az olmasına rağmen, sükroz şurubu yüksek oranda hazırlandığı için immobilize invertaz, endüstriyel maliyeti azaltmada tercih edilebilir. Bunların yanında immobilizasyonda mükemmel çalışma kararlılığı göstermesi, diğer enzimlere göre daha kolay elde edilebilmesi, ucuz olması ve çeşitli taşıyıcılara immobilize edilebilmesi sebebiyle, deneysel çalışmalarda model enzim olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [13].

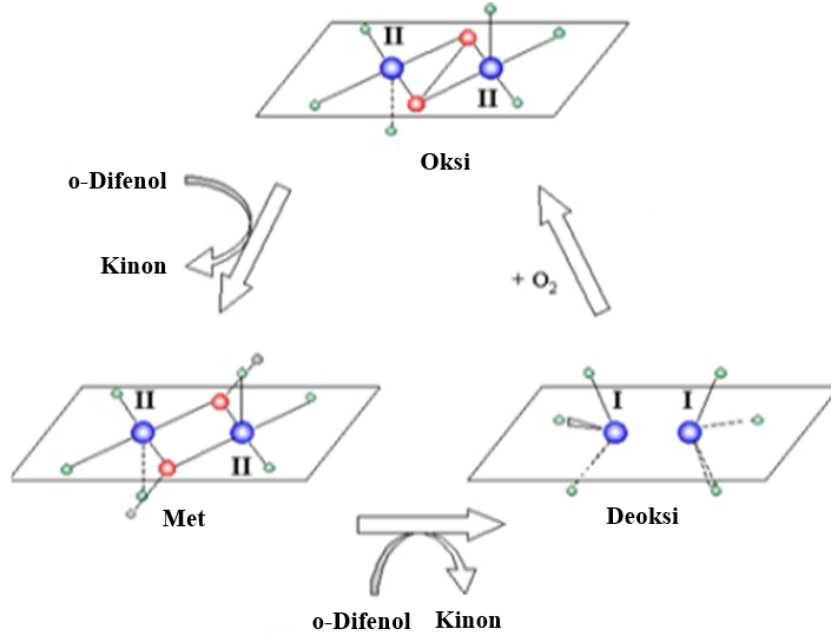
2.2.7. Polifenol Oksidaz (PPO)

Polifenol oksidaz (PPO, ayrıca tirozinaz olarak da bilinir; EC 1.14.18.1) 1856 yılında Schoenbein tarafından mantarlarda bulunan bir enzimdir. Polifenol oksidazlar bakır içeren oksidoredüktazlardır ve moleküler oksijen varlığında fenolik bileşiklerin hidroksilasyonunu ve oksidasyonunu katalizlerler. Substratlarına göre polifenol oksidazlar; tirozinaz, katekol oksidaz ve lakkaz olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Tirozinaz (EC. 1.14.18.1), monofenollerin *o*-difenollere hidroksilasyonunu (monofenolaz ya da krezolaz aktivitesi) ve *o*-difenollerin *o*-kinonlara oksidasyonunu (difenolaz ya da katekolaz aktivitesi) katalizler (Şekil 2.18.). Katekol oksidaz (EC. 1.10.3.1) sadece *o*-difenollerin oksidasyonunu katalizler. Lakkaz (EC. 1.10.3.2) ise hem *o*-difenolleri hem de *p*-difenollere karşılık gelen kinonların oksidasyonunu katalizlerler. Lakkaz ve katekol oksidaz hidroksilasyon reaksiyonlarını katalizleyemezler.



Şekil 2.18. Polifenol oksidaz kataliz reaksiyonu.

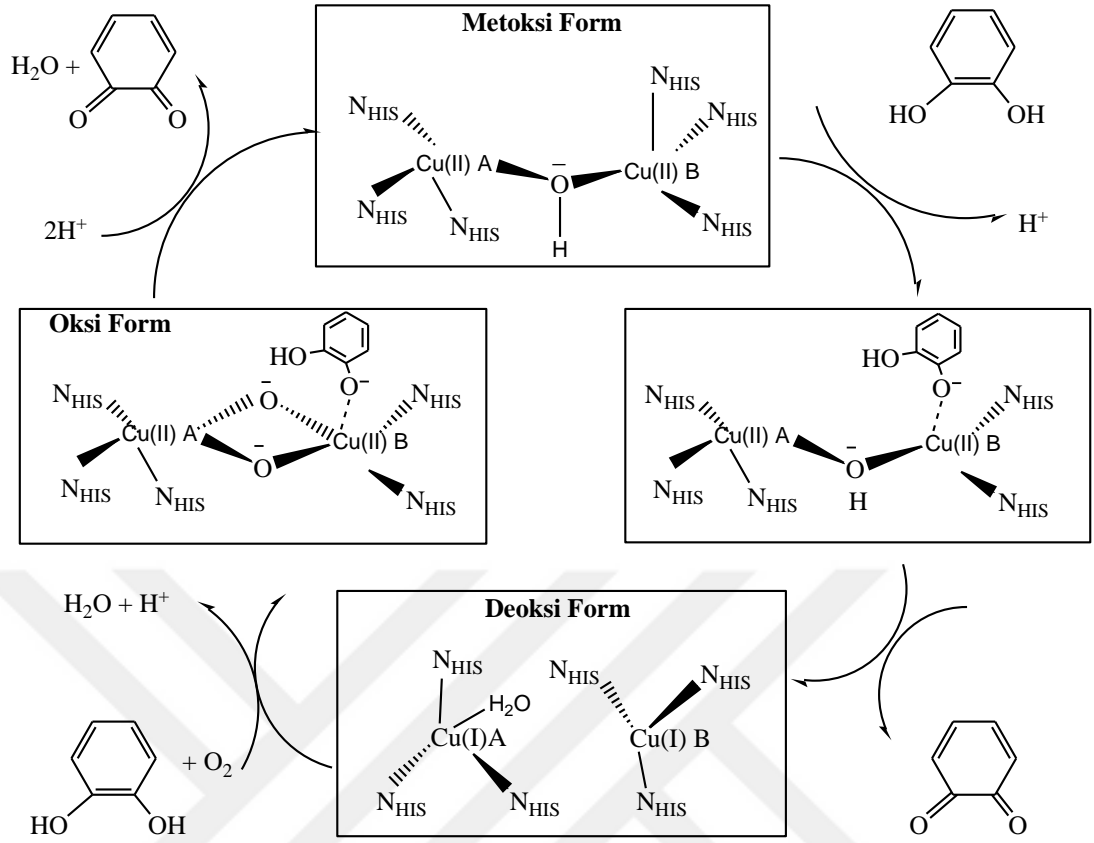
PPO'nun aktivite için koenzime ihtiyacı yoktur. Tüm fenolik bileşikleri substrat olarak kullanan, grup spesifikliği gösteren enzimlerdir. Genel olarak PPO, oksijen varlığında fenolik substratları oksitler. PPO'nun aktif siteleri, döngüsel bir şekilde metoksi, oksi ve deoksi formları arasında geçişlere uğrar (Şekil 2.19). Her döngüde iki katekol molekülü oksitlenir. Bir molekül oksijen suya indirgenir ve iki kinon ürünü oluşur. Dioksijen (O_2), indirgenmiş enzim formunda (indirgenmiş deoksi form) CuA'ya bağlanan çözücü molekülün (H_2O) yerini alır ve enzimin bakır metal merkezine bağlanır [27].



Şekil 2.19. Kataliz sırasında, PPO'nun aktif alanının, oksii ve deoksi formları arasındaki döngüsel geçişleri. Mavi, kırmızı ve yeşil renkli daireler sırasıyla bakır, oksijen ve histidini temsil eder [27].

UV spektroskopi sonuçları moleküler oksijenin önce peroksit olarak bağlandığı ve sonrasında da katekolun bağlandığı fikrini destekler. Katekol molekülünün iki hidroksil grubundan biri deprotonasyona uğrar ve katekol CuB'ye bağlanır (oksi form) (Şekil 2.20). Substrattan peroksite iki elektron aktarımının ardından peroksit grubu protonlanmış olur ve O-O bağı kopar.

Substratın koordinasyona girmemiş ikinci hidroksil grubu bir proton vererek su kaybını ve *o*-kinon ürün oluşumunu sağlar. Köprü yapan grubun çözücü ile protonlanması aktif site hidroksil köprüsü, iki bakırlı (metoksi form) duruma getirir. Bir başka katekol molekülü ko-substrat olarak işlev görür ve hidroksil köprüsü Cu (II)'yi Cu (I) formuna indirger. Önerilen reaksiyon yolunun bu adımı, tirozinazın *o*-difenol oksidaz aktivitesi hakkındaki verilerle desteklenmektedir (Şekil 2.20). Aktif bölgenin Cu (I) -Cu (I) formu tekrar katalitik çevrimi tekrarlar [27].



Şekil 2.20. PPO enziminin reaksiyon mekanizması [27].

2.3. KARBON FİBER

Karbon fiber grafit fiber olarak da bilinen çelikten 5 kat güçlü, 2 kat daha sert fakat çok daha hafif bir malzemedir. Üretilen karbon fiberlerin yaklaşık %90'ı poliakrilonitrilden (PAN), kalan %10'u rayon veya petrolden yapılıdır. Karbon fiberlerin yapılması için işlem kısmen kimyasal ve kısmen mekaniktir. Prekürsör, uzun tel veya lif formuna getirilir ve daha sonra oksijenle temas etmesine izin verilmeden çok yüksek sıcaklığa ısıtılır. Oksijen olmadığı için lif yanmaz. Bunun yerine, yüksek sıcaklık, karbon yapıdaki diğer atomların dışarı atılmasını sağlayacak şekilde fiberdeki atomların şiddetli titreşmesine neden olur. Bu sürece karbonizasyon denir ve geride az sayıda karbon olmayan atom içeren uzun ve sıkı bir şekilde birbirine geçmiş karbon atomlarından oluşan bir lif bırakır [29].

İnorganik bir materyal olan karbon lifleri nem, açık hava, baz ve zayıf asitlerden oda sıcaklığında etkilenmemektedir. Ancak yüksek sıcaklıklarda oksidasyondan fazlasıyla

etkilenmektedir [28]. Silizan, boralizan, SiCN, SiBCN, SiCO, silikon veya fenolik reçineler ile karbon liflerinin sıvı fazda kaplanması ile SiC kompozitlerin bağlanması ve metal matrikslerin lif ile güçlendirilme işlemi düşük maliyet ile elde edilebilmektedir [30].

Kimyasal olarak nispeten inert olan karbon fiber (CF) olağanüstü mekanik ve elektriksel özelliklere sahiptir. Elektrofizyolojik ve elektrokimyasal özellikleri mikrometre ölçeğinde biyosensör uygulamalarında mükemmel bir elektrot olarak işlev görmesini sağlar. CF mikroelektrotlar 1979'dan beri nöron aksiyon potansiyellerini kaydetmek için kullanılmıştır [31]. CF'ler grafit monofilamentlerdir ve mikroelektrotlar içerisinde, en iyi özelliklere sahip tungsten elektrotlarına benzer üstün özelliklere sahiptirler. CF mikroelektrotların in vivo çalışmalara uygunluğu da bu elektrotların önemini oldukça artırmaktadır. [32].

2.3.1. Karbon Fiberin Kullanım Alanları

Karbon lifleri kompozit yapılardan inşaat sektörüne, peyzajdan tıba kadar oldukça değişik alanlarda kullanılmaktadır. Düşük yoğunluğu ve yüksek mukavemet değerleri sayesinde oldukça fazla kullanım alanı bulmaktadır. Karbon filament ve kablolar yüksek mekanik dayanımları nedeniyle epoksi, poliester, poliamid ve fenol reçineleri gibi sentetik maddeler ile kompozit yapımında kullanılmaktadır (Şekil 2.21).



Şekil 2.21. PAN esaslı karbon fiber [33].

Yoğunluğu $0,05-0,20 \text{ g/cm}^3$, ısı iletkenliği $20 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de $6 \cdot 10^{-5} - 3 \cdot 10^{-4} \text{ W/m.K}$ olan karbon keçeleri ısı yalıtım maddesi olarak kullanılmaktadırlar. Karbon kumaşlar elektrik

fırınlarında 3000 °C'a kadar elektrik izolasyonunda kullanılmaktadır. Ses hızının üstünde uçan uçakların fren disklerinde takviye maddesi olarak karbon dokumalar kullanılabilir. Termik olarak sağlam olan fren diskleri yüksek ısı iletim ve ısı kapasiteleriyle en ufak bir tesirde bile çok iyi bir fren tesiri göstermektedir. Yarış arabalarındaki yakıt tanklarında daha hafif olması nedeniyle kullanılmaktadır. Karbon fiber kompozitler, binek araç ağırlığını %50 oranında azaltabilir; bu da, aracın performansını veya yolcularının güvenliğini tehlikeye atmadan yakıt verimliliğini yaklaşık %35 oranında artırır. Karbon lifleri havacılıkta Boeing ve Airbus tipi uçaklarda, uluslararası uzay istasyonlarında, uydularda, uçak motor kaplamalarında ve Boeing delta programları gibi uzatılabilir taşıma araçlarında kullanılmaktadır [28].

Daha yüksek yüzey alanına ve daha yüksek absorpsiyon ve desorpsiyon oranına sahip oldukları için, aktive edilmiş karbon lifleri su arıtmada, SO_x, NO_x ve toksik gazların tutulmasında ve son zamanlarda metan depolamada ve polarize elektrot olarak kullanılmaktadır. Diğer taraftan agresif gaz ve sıvılar için filtre, katalizör taşıyıcısı, yakıt kabı, akümülatör için elektrot olarak kullanılmaktadır. Karbon fiber membranlar birçok endüstriyel ve medikal uygulamada da kullanılmaktadır. Kimyasal işlemlerde, atık su tutma, ilaç sektöründe, yapay insan organları gibi uygulamalarda membranlar kullanılmaktadır [34].

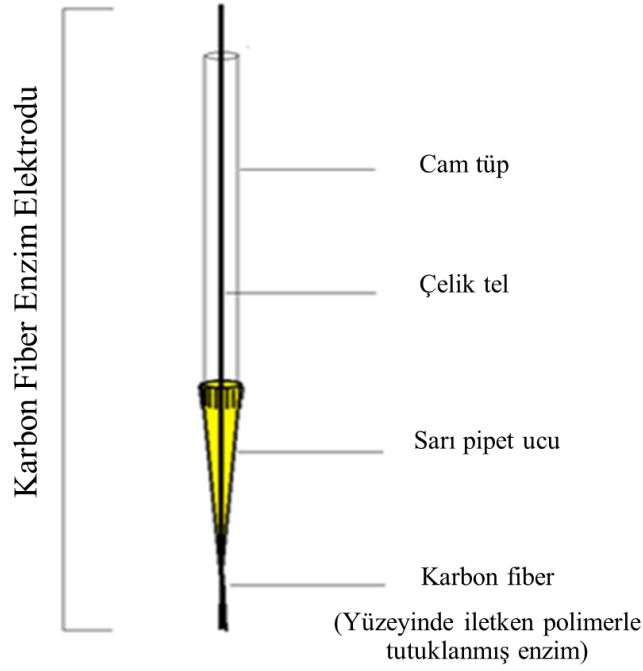
Karbon lifi ve termoplastik bir reçine ile oluşan kompozit malzemeler notebook parçalarında ve elektronik parçalarda kullanılabilir. Karbon lifi ile kuvvetlendirilmiş polimer, sensör olarak kullanılmaktadır. Normal karbon lifine göre mükemmel mekanik dayanım, sertlik ve elektrik iletkenliğe sahiptir [35]. Karbon lifi ile kuvvetlendirilmiş polimer reçine esaslı kompozitler vakum pompası ve kompresör pervanesi olarak da kullanılmaktadır [36]. Karbon lifi bitki yetiştirme için hazırlanan kaplar içine yerleştirilerek de ziraat alanında kullanılmaktadır. Karbon lifleri ile kuvvetlendirilmiş polimerden yapılmış kirişler yüksek dayanıma, modüle ve yüksek korozyon dayanımına sahiptir. Karbon lifi ile kuvvetlendirilmiş polibütilentereftalat çeşitli kemik yapılarında kullanılmaktadır. İmplantasyon sırasında kemik kayıplarını azaltmak için kemik içerisine yerleştirilmektedir. Toksik olmaması ve vücuda minimum zararı nedeniyle bu uygulamalarda önemli bir kullanım alanı bulmaktadır.

Karbon fiberlerden üretilen karbon fiber mikroelektrotlar, biyokimyasal sinyalleme için saptanması için amperometride veya hızlı taramalı döngüsel voltametri kullanılır [37]. Ayrıca X-ray ekipmanlarında, enerji depolama bataryalarında, yer merkezli antenlerde, rüzgar değirmenlerinde pervane ve endüstride kullanılmak üzere silindirik üretilmesinde kullanılmaktadır.

2.3.2. Karbon Fiber Enzim Elektrotları

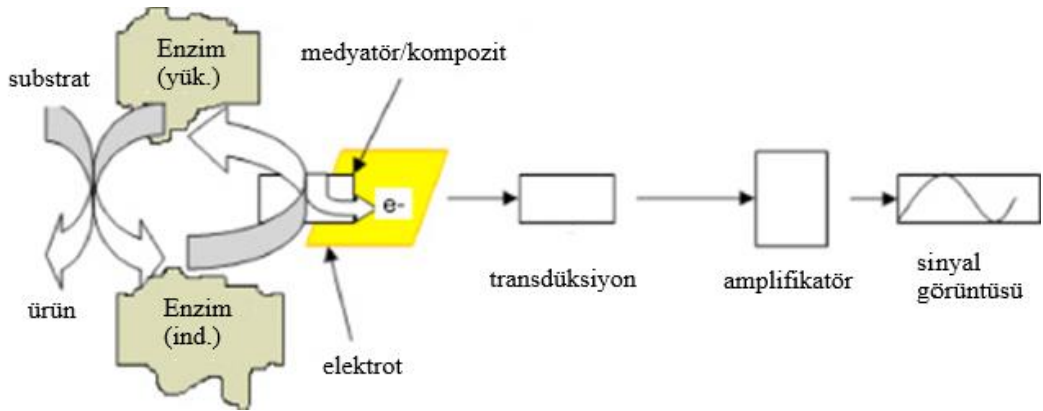
Enzim elektrotları temel olarak enzim ve elektrot malzemesinden oluşur (Şekil 2.22). Elektrot materyali seçilirken malzemenin iletken ve sert bir malzeme olması göz önünde bulundurulur. Bu nedenle elektrot malzemesi genel olarak altın (tabaka veya tel), platin (tabaka veya tel) ve karbon (kağıt, çubuk, pasta, metalize karbon, camı karbon, karbon fiber, nanotüp film) olarak seçilir. Hangi enzimin kullanılacağı ise hangi analitin tayin edileceğine göre belirlenir. Enzim elektrodunun performansı büyük oranda kullanılan kompozit malzemelere bağlıdır. Bu kompozit malzemeler, iletken polimerler, fonksiyonel polimerler, metal kompleksleri, sol-gel malzemeler, nano malzemelerdir (karbon nano tüp, nanopartiküller).

Karbon temelli mikro ve nano malzemeler elektrot malzemesi olarak son zamanlarda yaygın olarak çalışılmaktadır. Bu malzemeler kimyasal olarak inerttir, ucuzdur, yüksek yüzey alanına ve sıra dışı elektriksel iletkenliğe sahiptir [38-41]. Karbon malzemeler içinde karbon fiberler mikro ve nano elektrot olarak ilgi çekmektedir. Karbon fiber diğer elektrotlara göre çok daha yüksek yüzey alanına sahiptir ve yüzey modifikasyonuna çok uygun bir malzemedir. 8µm çaplı 10.000 filamentin oluşturduğu 1 cm uzunluğundaki karbon fiberin yüzey alanı 25 cm² dir [42]. Karbon fiber elektrotların diğer önemli özellikleri ucuz olmaları ve biyoyumluluklarıdır [43]. Bu avantajlarıyla karbon fiber elektrotlar elektroanalitik uygulamalarda mikroelektrot ve nanoelektrot olarak geniş bir kullanım potansiyeline sahiptir. Potansiyometrik, voltametrik çalışmalar çeşitli hücre tiplerini, iki veya üç elektrotlu hücreleri, akışlı sistemleri, in-vivo ve in-vitro çalışmaları içerir [44-48].



Şekil 2.22. Karbon fiber elektrot.

Karbon fiber elektrotların kullanım alanlarından biri enzimle modifiye edilerek enzim elektrotları oluşturulmasıdır. Bu elektrotlar enzimden elektron aktarımını kolaylaştıran yüzey yapılarıyla enzimatik biyosensörler için kullanışlı bir malzeme olurlar. Enzim elektrodu, immobilize edilmiş olan enzimin aktivitesi sayesinde elektrokimyasal bir işlemin gerçekleştiği minyatür bir kimyasal transdüserdir ve genel yapısı Şekil 2.23'te görülmektedir [49].



Şekil 2.23. Kimyasal transdüser olarak enzim elektrodu.

Enzimin buradaki rolü, belli bir substrat molekülüne olan biyolojik ilgisi nedeniyle seçiciliğin oluşturulmasıdır. Yani immobilize edilen enzimle o enzimin substratının/substratlarının spesifik analizi mümkündür.



BÖLÜM 3

DENEYSEL BİLGİLER

3.1. KİMYASAL MALZEMELER

İnvertaz (β -fruktofuranosidaz, tip V) (EC 3.2.1.26) ve sodyum dodesil sülfat (SDS) Sigma'dan temin edildi. Pirol monomeri Merck'ten alındı, 4 °C'de saklandı. Nelson reaktifinin hazırlanmasında, sodyum karbonat (Riedel de Haen), sodyum potasyum tartarat (Fluka), sodyum bikarbonat (Merck), sodyum sülfat (Merck), bakır sülfat penta hidrat (Carlo Erba) ve arsenomolibdat reaktifinin hazırlanmasında, amonyum heptamolibdat tetrahidrat (Merck), sodyum hidrojen arsenat (Riedel de Haen) kullanıldı. Sükroz Merck'den satın alındı. Asetat tamponun hazırlanmasında, sodyum asetat (Merck) ve asetik asit (Carlo Erba), sitrat tamponun hazırlanmasında sitrik asit (Sigma-Aldrich) ve sodyum hidroksit (Merck) kullanıldı. MBTH çözeltisi hazırlanmasında ise 3-Metil-2-benzodiazolinon hidrazon hidroklorür monohidrat (Aldrich) ve etanol (Carlo Erba) kullanıldı. Aseton ve katekol Sigma-Aldrich sülfürik asit ise Merck firmasından temin edildi.

3.2. CİHAZLAR

3.2.1. Potansiyostat

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. Pirolün döngüsel voltametriyi GAMRY Instruments Interface 1000 Potentiostat/Galvanostat/ZRA ile alındı.

3.2.2. UV-Visible Spektrometresi

İmmobilize 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.

3.2.3. FT-IR

Karabük Üniversitesi Demir Çelik Enstitüsü MARGEM laboratuvarlarında bulunan Bruker ALFA FTIR spektrometre cihazı kullanıldı. Pirol platin elektrot yüzeyinde polimerleştirildi. Oluşan polipirol polimeri film şeklinde çıkarılarak filmin FTIR analizi yapıldı. Tarama 700 ve 4000 cm^{-1} arasında yapıldı.

3.2.4. 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 kaplanmış karbon fiber elektrodun 1000 ve 10000 arasında büyütme fotoğrafları alındı.

3.2.5. pH metre

Hanna Instruments HI 221 marka pH metre kullanılmıştır. Bu cihaz elektrik sinyali üreten bir elektrot kullanılarak sinyali, pH birimine çeviren potansiyometrik bir ölçüm sağlar. Sinyal potansiyel olarak ölçülür. 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.

3.2.6. Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı

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

3.2.7. Vorteks Tüp Karıştırıcı

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

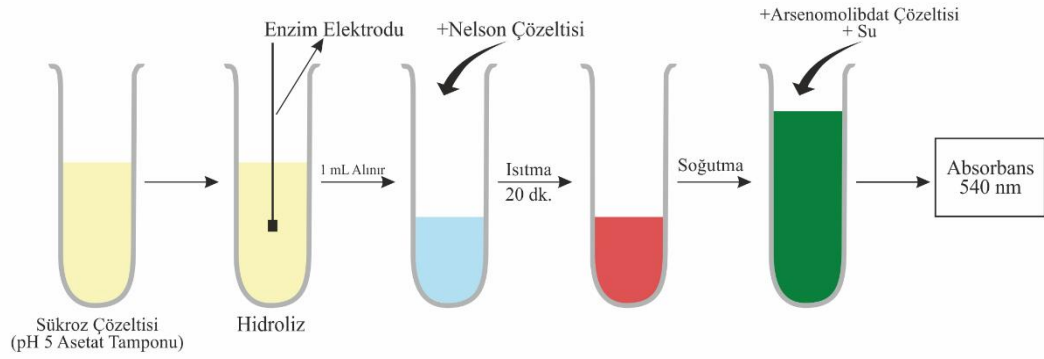
3.2.8. Çalkalamalı Su Banyosu

Ölçümler Nuve ST 30 marka çalkalamalı su banyosu ile yapılmıştır. 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.

3.3. YÖNTEM

3.3.1. Somogyi-Nelson Yöntemi

Çeşitli derişimlerde sükröz çözeltileri hazırlanır ve Somogyi-Nelson yöntemi [50-52] literatürdeki işlem basamaklarıyla uygulanır (Bkz. 3.3.7). Çözeltilere belli sürelerde enzim elektrodu daldırılır. Ürün oluşumundan sonra Nelson reaktifi eklenir. Kaynar su banyosunda ısıtma yapılır ve arsenomolibdat reaktifi eklenir. Oluşan renkli komplekslerin absorbanları 540 nm'de ölçülerek enzim aktiviteleri tayin edilir (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Somogyi-Nelson Yöntemi.

3.3.1.1. Nelson Reaktifi

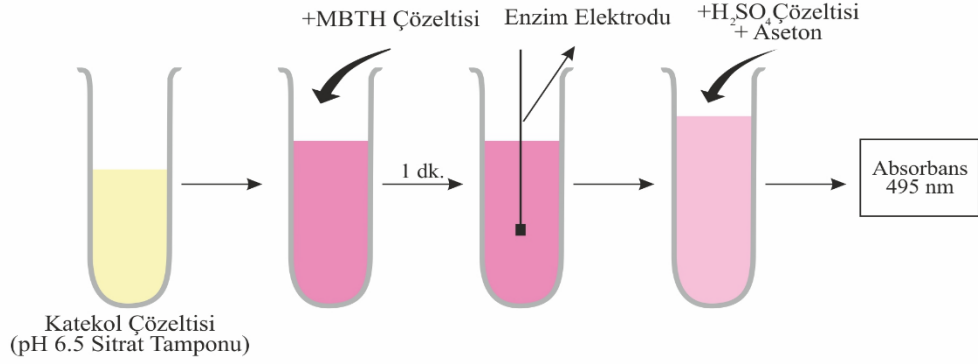
Nelson reaktifi A'nın hazırlanışı: 25 g susuz Na_2CO_3 , 25 g sodyum potasyum tartarat, 20 g NaHCO_3 ve 200 g susuz Na_2SO_4 , 700 mL distile suda çözülür ve 1000 mL'ye seyreltilir. Nelson reaktifi B'nin hazırlanışı: 15 g CuSO_4 , 100 mL distile suda çözülür ve üzerine konsantre H_2SO_4 damlatılır. Aktivite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

3.3.1.2. Arsenomolibdat Reaktifi

25 g amonyum heptamolibdat tetrahidrat $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$, 450 mL distile suda çözülür ve üzerine 21 mL konsantre sülfürik asit eklenir. 3 g sodyum arsenat dibazik-7-hidrat $[\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}]$, 25 mL distile suda çözülür ve bu çözelti molibdat çözeltisine eklenir. Elde edilen çözelti 24-48 saat 37°C 'de karanlıkta saklanır ve enzim aktivite tayininde kullanılır.

3.3.2. Besthorn's Hydrazone Yöntemi

Çeşitli derişimlerde katekol çözeltileri hazırlanır ve Besthorn's Hydrazone yöntemi [53] literatürdeki işlem basamaklarıyla uygulanır (Bkz. 3.3.7). Çözeltilere önce MBTH reaktifi eklenir. Belli sürelerde enzim elektrodu daldırılır. Ürün oluşumundan sonra H_2SO_4 ve aseton eklenir. Oluşan renkli komplekslerin 495 nm'de absorbansları ölçülerek enzim aktiviteleri tayin edilir (Şekil 3.2.).

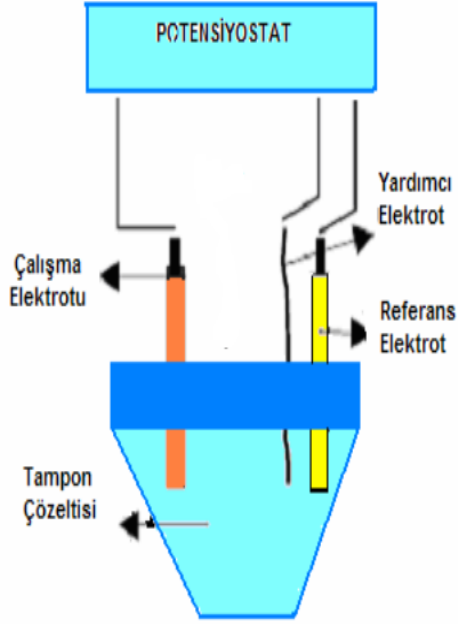


Şekil 3.2. Besthorn's Hydrazone Yöntemi.

Bu yöntemde kullanılan MBTH reaktifi 3-Metil-2-benzodiazolinon hidrazon hidroklorür monohidrat ($C_8H_9N_3S.HCl.H_2O$)'ın 3,0 mg/mL etil alkolde çözülmesiyle hazırlanır.

3.3.3. Elektrokimyasal Polipirol Sentezi

Elektropolimerizasyon hücresi tampondan oluşan solüsyona, monomer, enzim ve elektrolit eklenerek hazırlanır (Şekil 3.3). Burada invertaz için asetat tamponu, polifenol oksidaz için sitrat tamponu, elektrolit olarak sodyum dodesil sülfat ve monomer olarak pirol kullanıldı. Malzemelerin derişimleri daha önce platin elektrotlarla yapılan çalışmalardan yararlanılarak belirlendi. Hazırlanan elektropolimerizasyon hücresi üç elektrot sistemiyle kullanıldı. Çalışma elektrodu olarak karbon fiber elektrot, karşıt elektrot olarak platin elektrot, referans elektrot olarak gümüş (Ag/Ag^+) elektrot yerleştirildi, sistem potansiyostata bağlandı ve 1 Volt uygulanarak polimerizasyon gerçekleştirildi. Bu işlem esnasında enzim çalışma elektroduna doğru yönelen monomer molekülleriyle birlikte taşınarak çalışma elektrodunu kaplayan polimer içinde immobilize edilmiş oldu.



Şekil 3.3. Elektropolimerizasyon hücresi [54].

3.3.4. Polipirol Matrisine Enzim İmmobilizasyonu

Bu çalışmada enzim immobilizasyonu hapsetme yöntemiyle yapıldı. Enzim immobilizasyonunda adsorpsiyon, kovalent bağlanma, çapraz bağlanma, hapsetme yöntemleri kullanılır. Adsorpsiyon yöntemi enzimin ortama daha kolay akmasına ve kaybedilmesine sebep olur ve enzim elektrodu aktivitesini kısa bir süre sonra kaybeder. Çapraz bağlama ve kovalent bağlamada ise enzimin yapısına kovalent bağlarla başka yapıların bağlanması enzim aktivitesinde azalmaya sebep olur. Hapsetme yöntemi diğer yöntemlere göre daha avantajlıdır. Enzimin diğer yöntemlere göre daha uzun süre stabil kalmasını ve daha yüksek sinyal alınmasını sağlar. Burada polimerizasyon esnasında enzim polimer matrisine hapsetme yoluyla immobilize edildi [55,56].

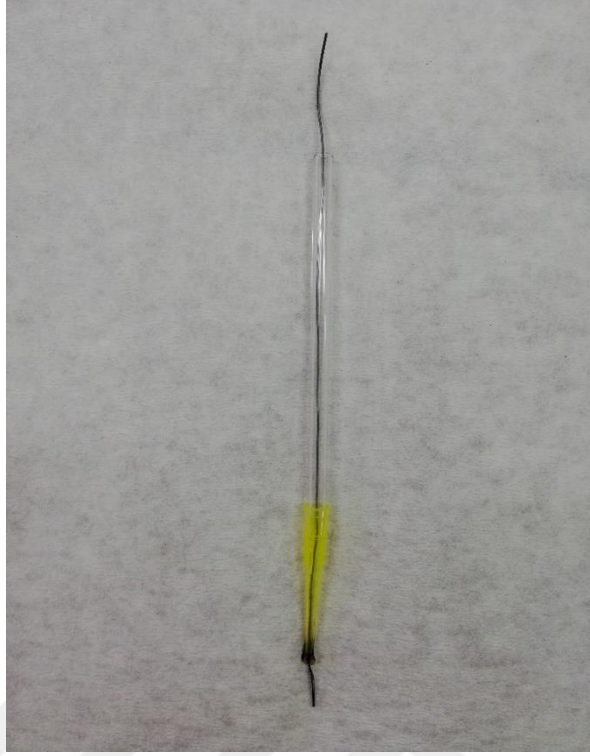
İnvertazın immobilizasyonu karbon fiber üzerine pirolün sabit potansiyel polimerizasyonu ile yapıldı. Enzim moleküllerinin immobilizasyonu, pirolün polimerizasyonu sırasında enzim moleküllerinin elektrot yüzeyine göç eden pirol ve destek elektrolit tarafından elektrot yüzeyine taşınmasıyla gerçekleştirildi. Elektroliz

çözeltisi 0,05 M asetat tamponu (pH 5,0) içinde 0,6 mg/mL invertaz, destek elektrolit olarak 0,6 mg/mL sodyum dodesilsülfat (SDS) ve 5 µL/mL pirolle hazırlandı. Bu işlemden sonra her bir enzim elektrodu, kalan destek elektrolitin ve bağ yapmayan enzimlerin uzaklaştırılması için distile su ile birkaç kez yıkandı. Kullanılmadığı zaman +4 °C'de asetat tamponunda saklandı.

Aynı işlem polifenol oksidaz enzimiyle 0,05 M sitrat tamponu (pH 6,5) kullanılarak gerçekleştirildi. Polifenol oksidaz enzimi derişimi 0,4 mg/mL (2687 U/mg katı), SDS 1 mg/mL ve pirol 5 µL/mL olacak şekilde ayarlandı. Kullanılmadığı zaman +4 °C'de pH 6,5 sitrat tamponunda saklandı.

3.3.5. Karbon Fiber Elektrotların Hazırlanması

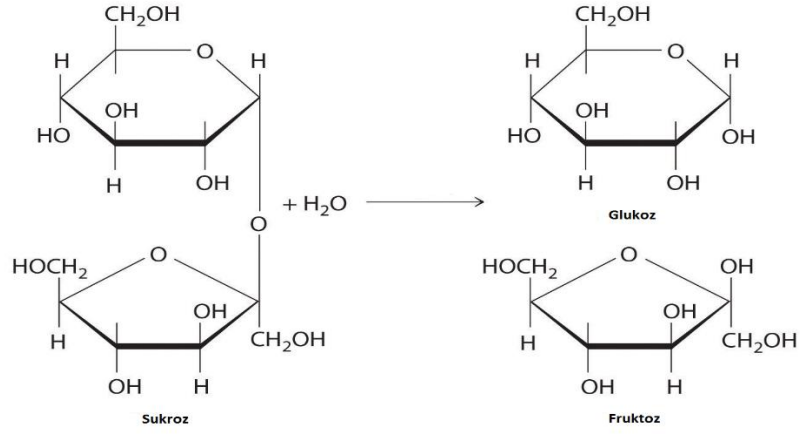
50 µm çaplı Torayca T300 marka 3K karbon fiberler elektrot ucu olmak üzere kesilerek hazırlandı. Elde edilen çelik teller 10 cm uzunluğunda kesildi. Çelik tel ve karbon fiber uç teflon bant ile birbirine uç uca birleştirildi [57,58]. Elektrot karbon fiber ucundan polimer pipet ucuna geçirildi (1-200 µL eppendorf) 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 yerleştirilerek elektrot hazırlanmış oldu (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Karbon fiber enzim elektrodu.

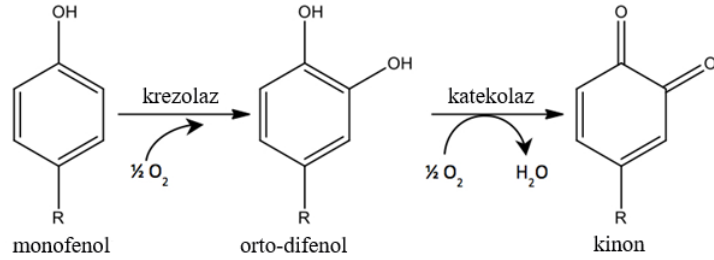
3.3.6. Enzim Aktivitesinin Tayini

İnvertaz enziminin katalizörlük yaptığı reaksiyonda enzimin substratı sükrozdur. Substrat analizinde Somogyi-Nelson yöntemi kullanıldı [50-52]. Bu yöntemde çeşitli derişimlerde sükroz çözeltileri pH 5,0 asetat tamponu içinde hazırlandı. İnvertaz enzim elektrodu aynı derişimdeki çözeltilere 0, 2, 4, 6 dakika daldırıldı ve sükrozun glukoz ve fruktoza hidrolizinin gerçekleşmesi sağlandı (Şekil 3.6.). Elektrot çıkarıldıktan sonra, çözeltiden 1 mL alınıp üzerine reaksiyonu sonlandırmak için 1 mL Nelson reaktifi eklendi. Tüpler, 20 dakika kaynar su banyosuna kondu ve ardından oda sıcaklığına soğutuldu. Tüplere 1 mL arsenomolibdat reaktifi ve 7 mL distile su sırayla eklenip karıştırıldı. Çözeltilerde oluşan glukoz, eklenen reaktiflerle renkli bileşik oluşturduğundan spektrofotometrik olarak 540 nm'de absorbans ölçümleri yapıldı. Absorbansa karşı zaman grafikleri çizildi ve grafiklerin eğimlerinden reaksiyon hızı saptandı. Böylece her derişim için invertaz enzim elektrodu aktiviteleri belirlendi.



Şekil 3.5. Sükrozun hidroliz reaksiyonu.

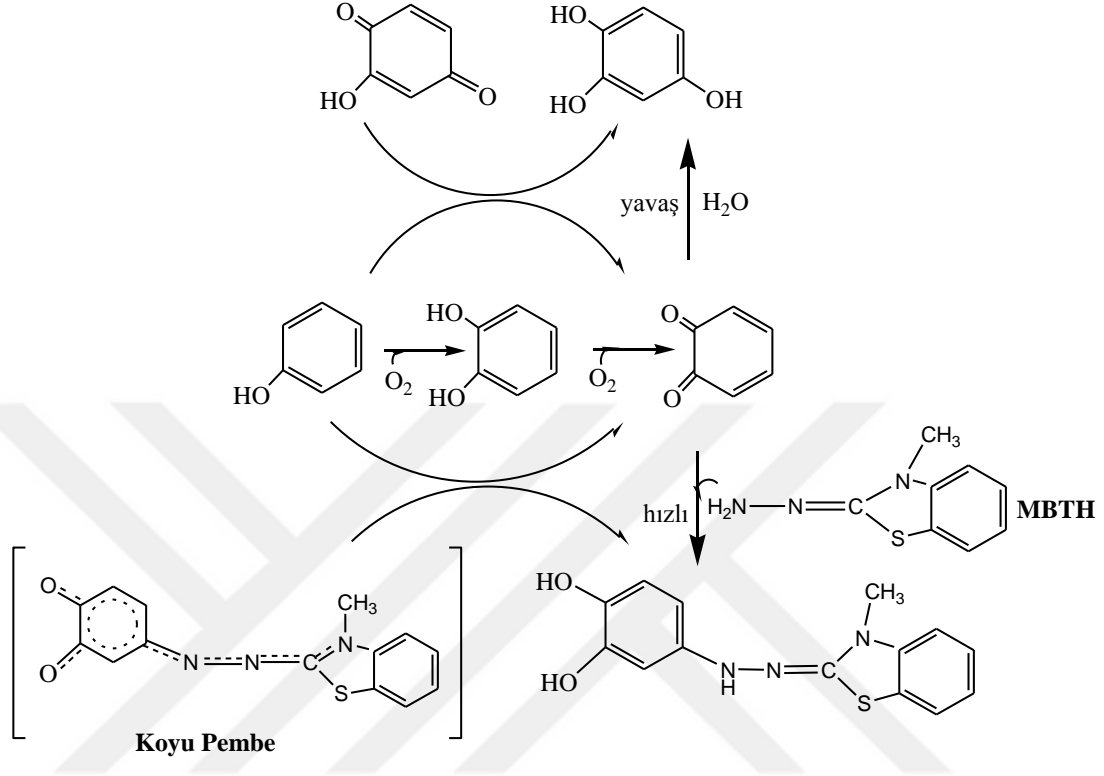
Polifenol oksidaz enzimi aktivite ölçümleri için temel olarak invertaz aktivite ölçümleriyle benzer bir işlem sırası takip edildi. Kullanılan enzim, reaktifler, tampon, oluşan renkli bileşik ve absorbans ölçüm dalga boyu farklıdır. Burada metot olarak Besthorn's Hydrazone yöntemini temel alan polifenol oksidaz enzim prosedürü uygulandı ve enzimin substratlarından biri olan pirokatekol kullanıldı (Şekil 3.6.).



Şekil 3.6. PPO'nun krezolaz ve katekolaz aktiviteleri: Monofenolün orto-hidroksilasyonu ve oluşan *o*-difenolün *o*-kinona oksidasyonu.

Pirokatekolün çeşitli derişimlerdeki çözeltileri pH 6,5 sitrat tamponu içinde hazırlandı ve polifenol oksidaz enzim elektrodu farklı derişimlerdeki çözeltilere birer ml MBTH reaktifi eklendikten sonra 0, 5, 10, 15 dakika daldırılarak Şekil 3.7'de görülen fenollerin *o*-kinon'a dönüşümü reaksiyonu, daha sonra ise kinonların MBTH ile kompleks oluşumu gerçekleştirildi (Şekil 3.7). Çözeltilere 1 ml sülfürik asit, 1 ml aseton eklenerek karıştırıldı ve 495 nm'de absorbans ölçümleri yapıldı. Absorbansa

karşı zaman grafikleri çizildi ve grafiklerin eğimlerinden reaksiyon hızı saptandı. Böylece her derişim için polifenol oksidaz enzim elektrodu aktiviteleri belirlendi.



Şekil 3.7. Oluşan *o*-kinonların MBTH reaktifiyle renkli bileşik oluşturması [59].

3.3.7. 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 [60-62]. Bu grafiklerden Michaelis-Menten yöntemiyle [63] 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.

3.3.8. Optimum pH Tayini

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

3.3.9. Optimum Sıcaklık Tayini

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.

3.3.10. Kararlılık Tayini

Arka arkaya 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.

3.3.11. Raf Ömrü Tayini

İnvertaz için 42, PPO için 40 günlük bir süre 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.

3.4. NUMUNE ANALİZLERİNİN YAPILIŞI

Çay ekstraksiyon numuneleri ÇAYKUR 42 no'lu Tirebolu çayından hazırlandı. 5 g çay 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 analiz edildi.

Farklı derişimlerde standart katekol çözeltileri tampon içinde hazırlandı. CF/Ppy/PPO enzim elektrodu her derişim için çözeltilere 10 dakika daldırılarak Besthorn's Hydrazone metodu uygulandı. 495 nm'de absorbans ölçümleri yapılarak kalibrasyon grafiği oluşturuldu. 1:3 tamponla seyreltilmiş çay numunelerine de elektrot 10 dakika daldırılarak aynı metot uygulandı. 495 nm'de absorbans ölçümleri yapıldı ve numunelerdeki total polifenol miktarı mg katekol eşdeğeri olarak belirlendi.



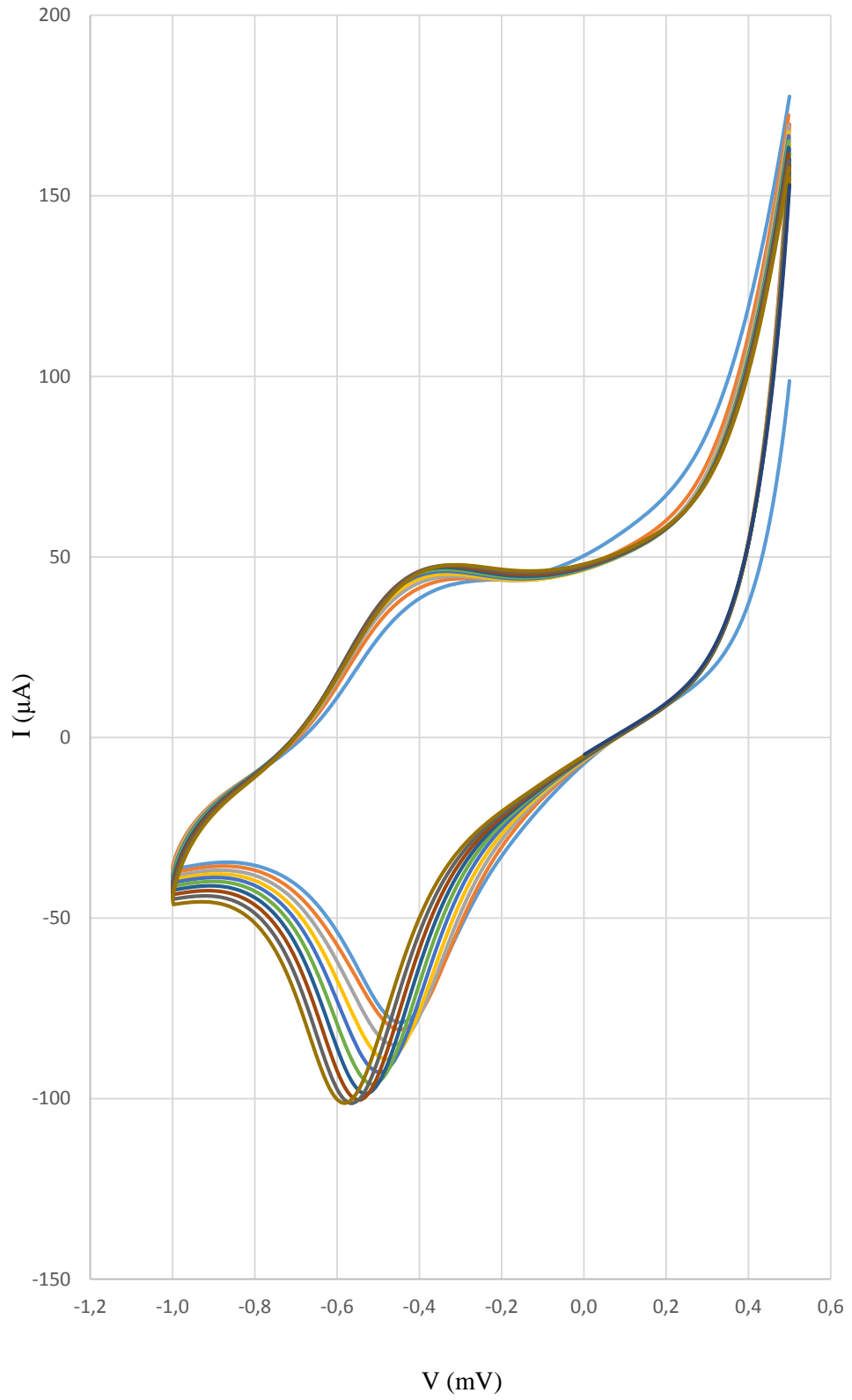
BÖLÜM 4

DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada enzim immobilizasyonu invertaz ve polifenol oksidaz enzimlerinin polipirol matrisine immobilize edilmesi ile gerçekleştirildi. Karbon fiber enzim elektrotlarının hazırlanması ve karakterizasyonu yapılarak optimum koşullar, doğrusal çalışma aralığı, aktivite ölçümlerinin ardışık stabilitesi ve raf ömrü belirlendi. Kalibrasyon grafiği oluşturularak LOD ve LOQ elde edildi ve geliştirilen karbon fiber enzim elektrotları çay numuneleri analizine uygulandı.

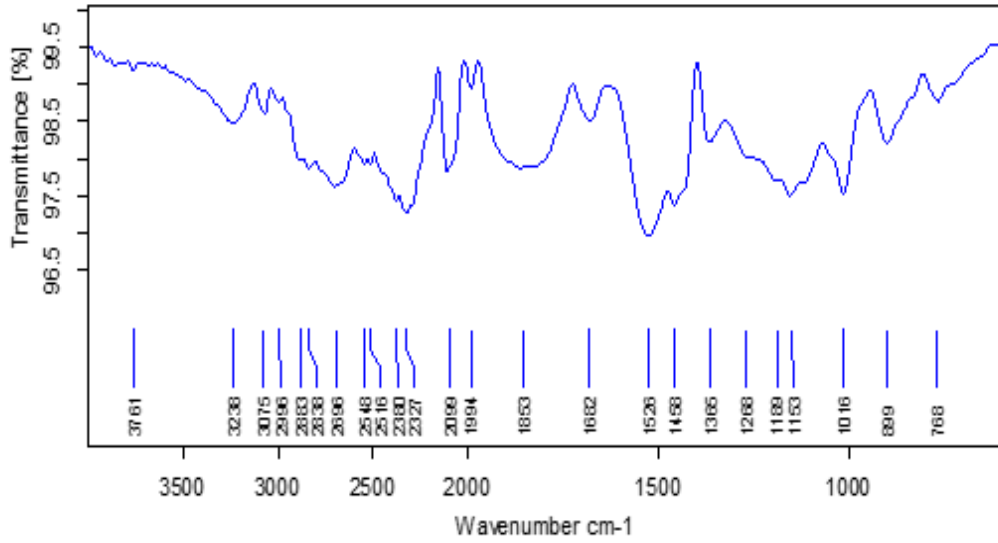
4.1. POLİPİROLÜN ELEKTROPOLİMERİZASYONU VE FTIR ANALİZİ

Polipirolün dönüşümlü voltametri ile elektropolimerizasyonu, 0,6 mg/mL sodyum dodesil sülfat ve 50 µl pirol içeren 10 mL pH 5 tampon çözeltisi içinde gerçekleştirildi. 14 çevrim boyunca +0,5 ile -1,0 V arasında tarandı. Bu aralık polimerin yükseltgenme ve indirgenme piklerinin yer aldığı tarama aralığıdır. Şekil 4.1.'de görüldüğü gibi her çevrimde polimerizasyon ilerledikçe pik akımı artar ve polimerizasyonun oluştuğunu gösterir.



Şekil 4.1. Polipirolün Ag/AgCl'e karşı dönüşümlü voltamogramı.

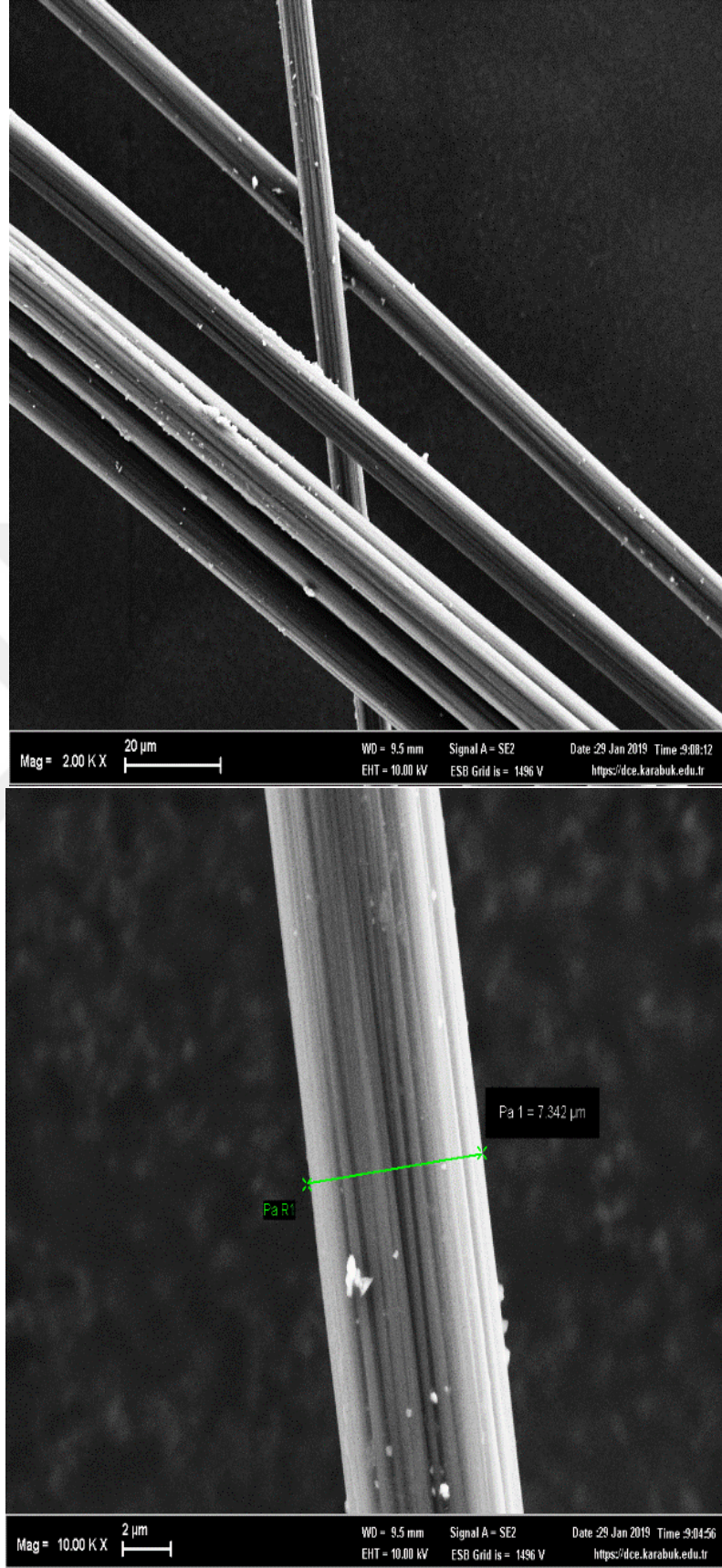
Yapılan elektropolimerizasyonda polipirol elde edilip edilmediğini göstermek amacıyla FTIR spektrumu alındı. Polipirolün karakteristik pikleri Şekil 4.2’de görüldüğü gibi 3238 cm^{-1} orta şiddetteki geniş pik N-H pikini, 1458 cm^{-1} orta şiddette ve 1526 cm^{-1} şiddetli pik ise aromatikliği yani pirol halkasını göstermektedir. Ayrıca parmak izi bölgesinde yer alan 1016 cm^{-1} ve 1153 cm^{-1} pikleri SDS dopant anyonuna aittir [64].



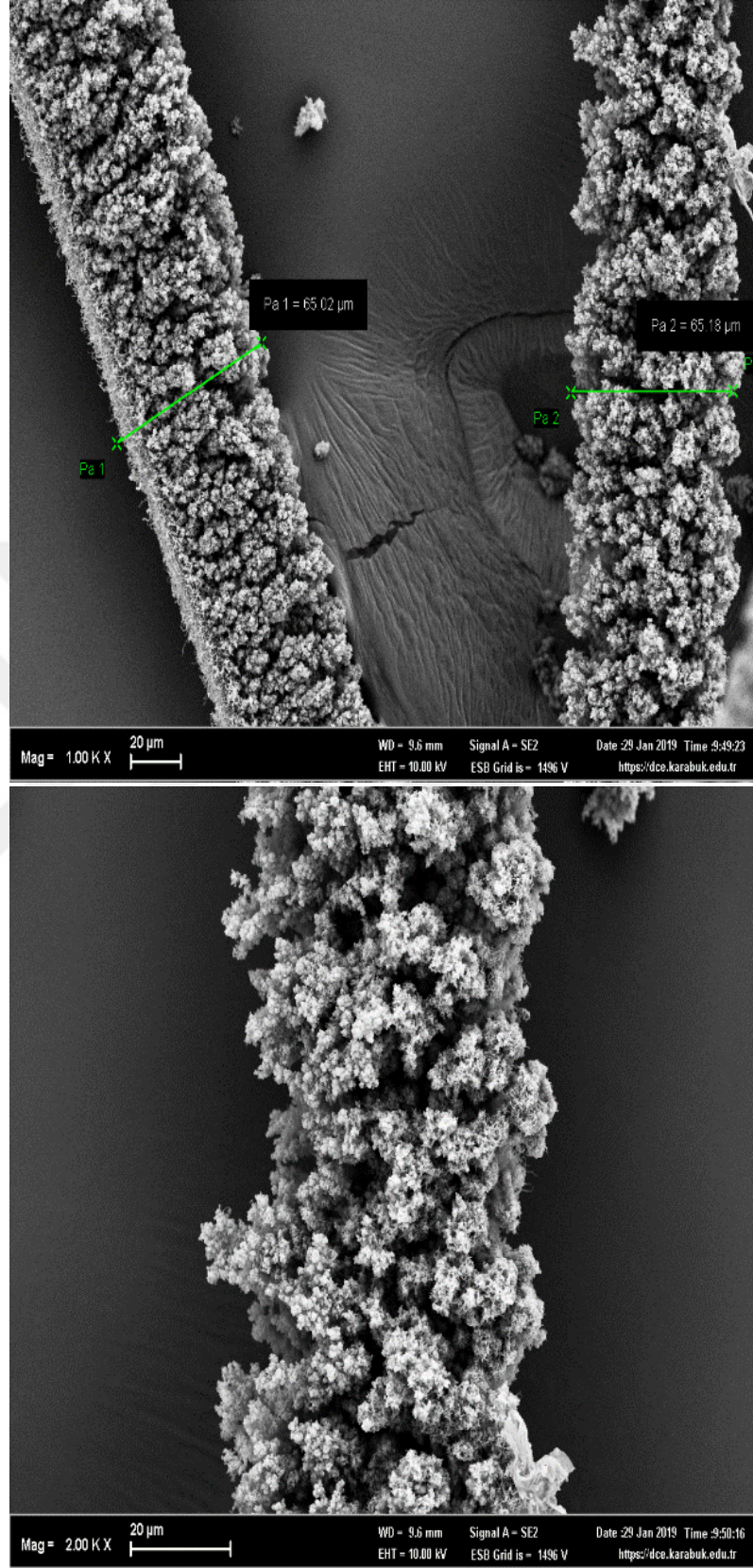
Şekil 4.2. Polipirolün FTIR spektrumu.

4.2. SEM ANALİZİ

Karbon fiberin polimerle kaplanmadan önce 2000 ve 10000 büyütme ile SEM görüntüleri alınmıştır. Şekil 4.3'te görüldüğü gibi karbon fiber kenarları düzgün bir filament halindedir ve çapı $7,342\text{ }\mu\text{m}$ olarak ölçülmüştür. Şekil 4.4'te ise polipirolle kaplanmış karbon fiberin 1000 ve 2000 büyütme ile alınmış SEM görüntüleri görülmektedir. Polimer kaplama polipirolün tipik karnabakar görünümüne sahiptir. Filamentin kalınlığı ise polimer kaplama nedeniyle artmıştır ve ortalama $65,10\text{ }\mu\text{m}$ olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.3. Kaplama yapılmamış karbon fiberlerin SEM görüntüleri.



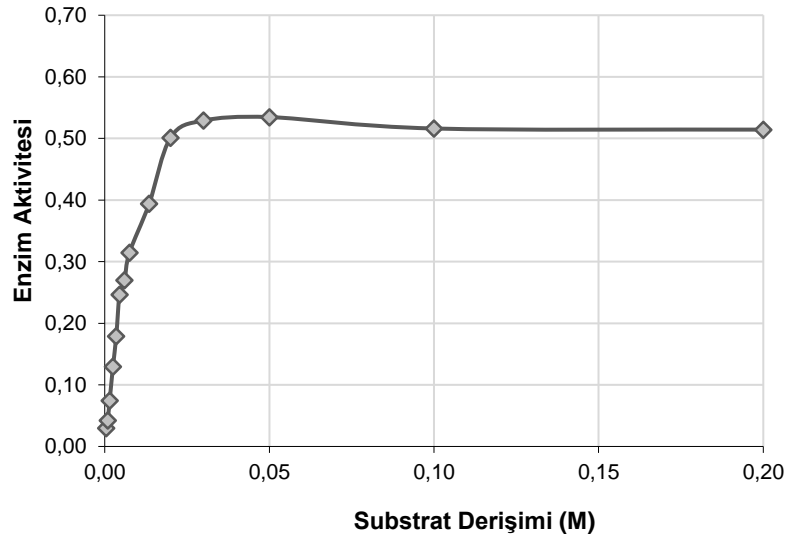
Şekil 4.4. Polimerle kaplanmış karbon fiberlerin SEM görüntüleri.

4.3. ENZİM ELEKTROTLARININ AKTİVİTE TAYİNİ VE KİNETİK PARAMETRELERİNİN SAPTANMASI

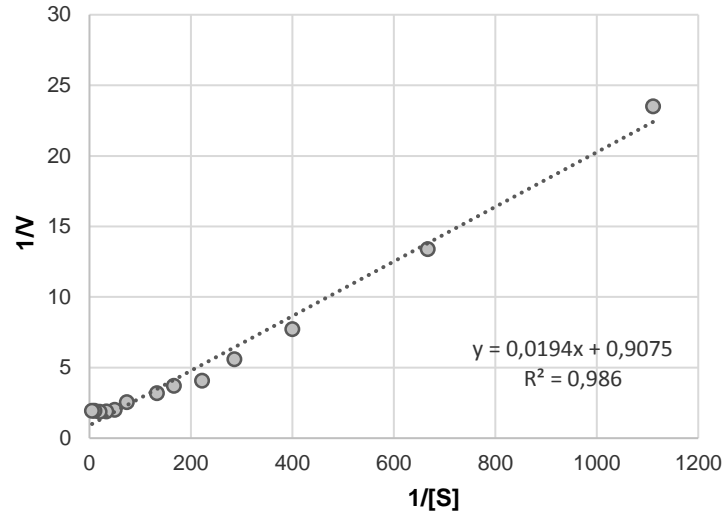
İmmobilize enzimin kinetik parametreleri, maksimum reaksiyon hızı (V_{max}) ve Michaelis-Menten sabiti (K_m), sabit pH ve sabit sıcaklıkta farklı substrat derişimleri hazırlanarak belirlenmiştir. Michaelis-Menten grafikleri oluşturulmuş, bu grafiklerden Lineweaver-Burk yöntemiyle immobilize enzimin (enzim elektrotlarının) kinetik parametreleri tayin edilmiştir [65].

4.3.1. İvertaz Enzim Elektrotları

İvertaz enzim elektrotları, karşılaştırmak amacıyla platin ve karbon fiber elektrot olarak iki şekilde hazırlanmıştır. Platin 1cmx1cm elektrotlara elektropolimerizasyonla polipirol kaplanmış ve invertaz immobilize edilmiştir (Bkz. 3.3.4.). Hazırlanan Pt/Ppy/INV elektrotlarının Michaelis-Menten grafiği Şekil 4.5'te görülmektedir. Bu grafikten Lineweaver-Burk grafiği elde edilmiş (Şekil 4.6.), V_{max} ve K_m sırasıyla $1,065 \pm 0,076 \mu\text{mol/dak.elektrot}$ ve $34,70 \pm 2,48 \text{ mM}$ olarak tespit edilmiştir.

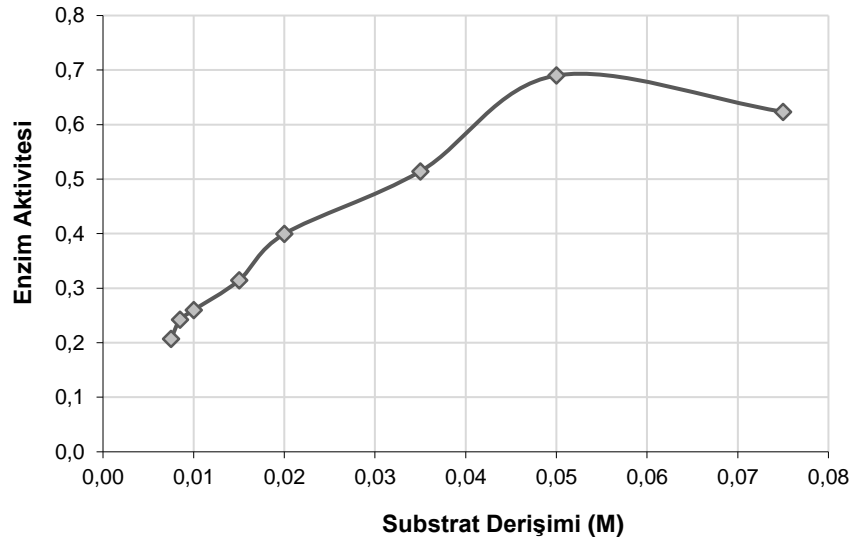


Şekil 4.5. Pt/Ppy/INV elektrodunun Michaelis-Menten grafiği.

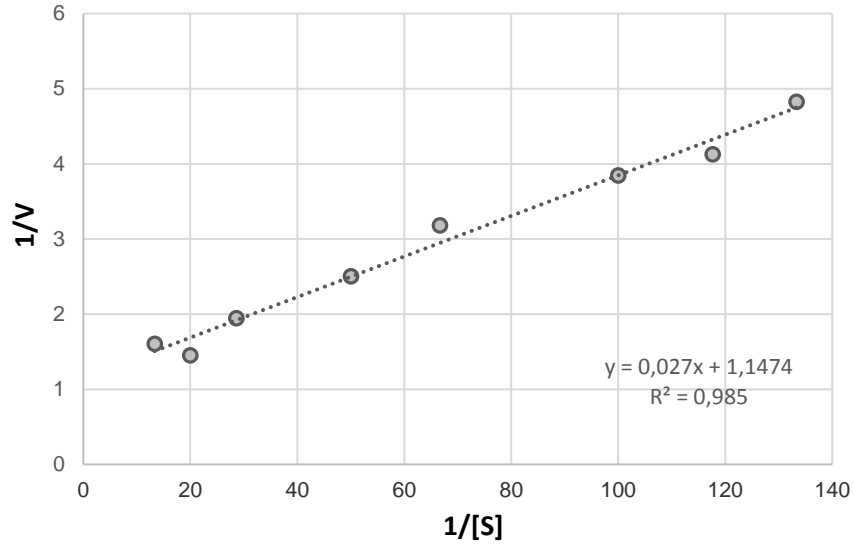


Şekil 4.6. Pt/Ppy/INV elektrodunun Lineweaver-Burk grafiği.

Aynı şekilde hazırlanan CF/Ppy/INV elektrotlarının Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri Şekil 4.7 ve 4.8’de görülmektedir. V_{max} ve K_m sırasıyla, $0,779 \pm 0,120$ $\mu\text{mol/dak.elektrot}$ ve $27,20 \pm 6,70$ mM olarak bulunmuştur.



Şekil 4.7. CF/Ppy/INV elektrodunun Michaelis-Menten grafiği.



Şekil 4.8. CF/Ppy/INV elektrodunun Lineweaver-Burk grafiği.

Serbest enzim aktivitesi immobilize enzime göre yüksektir. Enzim bir matriste immobilize edildiğinde genellikle aktivitesinde azalma görülür. V_{max} değeri azalır, K_m değeri ise artar. Enzimin substrata olan ilgisi ile ters orantılı olan K_m 'in artması, enzimle substratın bir araya gelmelerinin zorlaştığını ifade eder. Bu sonuç immobilize enzimlerde beklenen bir sonuçtur. Serbest enzimin immobilize enzime göre substratla bir araya gelme olasılığı çok daha yüksektir ve bu da enzim aktivitesini ifade eden V_{max} sabitinin yükselmesini sağlar.

Çizelge 4.1. Serbest ve immobilize invertaz enziminin kinetik parametreleri .

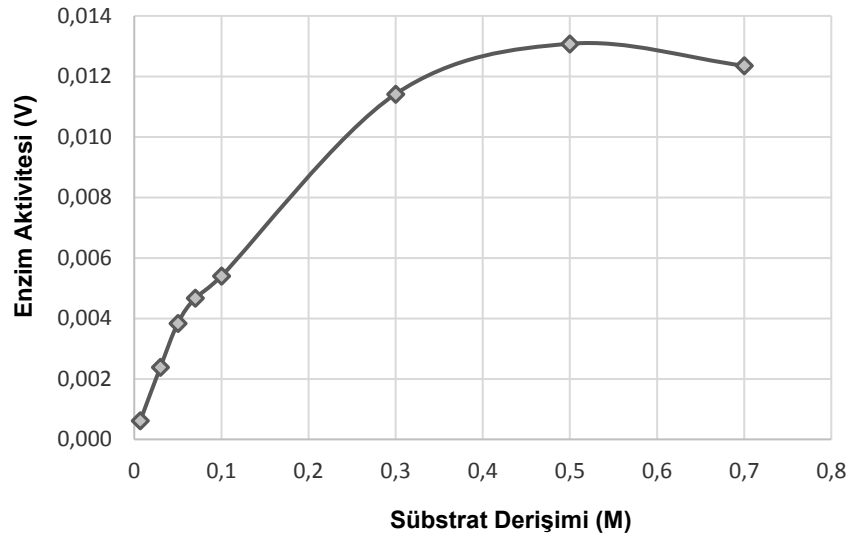
	V_{max}	K_m
Serbest invertaz [13]	82,30 $\mu\text{mol/dak.mL}$	24,30 mM
Pt/Ppy/INV elektrodu	1,065 \pm 0,076 $\mu\text{mol/dak.elektrot}$	24,70 \pm 2,48 mM
CF/Ppy/INV elektrodu	0,779 \pm 0,120 $\mu\text{mol/dak.elektrot}$	27,20 \pm 6,70 mM

Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi serbest enzim V_{max} değeri platin ve karbon fibere immobilize edilmiş enzimin V_{max} değerinden oldukça yüksektir ve bu beklenen bir durumdur. Öte yandan K_m değerleri serbest ve immobilize invertaz için birbirine yakındır ve bu bize enzimin substrata olan ilgisinde azalma olmadığını fakat immobilizasyondan dolayı reaksiyon hızının azaldığını anlatır.

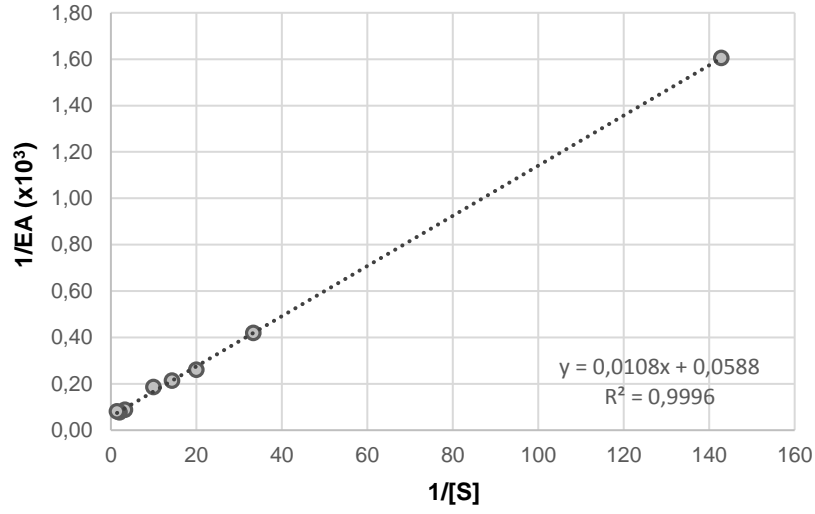
Platin ve karbon fiber elektroda immobilize invertazın kinetik parametreleri karşılaştırıldığında, karbon fiber elektrodun V_{max} ve K_m değerinin daha düşük olduğu görülür. V_{max} değerinin azalması karbon fiber elektrotta daha az enzimin immobilize olduğunu gösterir. Bu durum yüzey alanı ve kaplanan polimer alanıyla ilgilidir. Elektrodun yüzey alanı düşükse kaplanan polimer ve immobilize enzim miktarı da düşük olacaktır. K_m değerinin karbon fiber elektrotta düşük olması bu elektrot ortamında invertaz ve substratı arasındaki ilginin arttığını gösterir. Bu ilgi invertaz enziminin içinde bulunduğu karbon fiber yüzeyindeki boşluklarda substratını daha kolay kabul ettiğini gösterir ve bu durum karbon fiber yapı ile invertaz arasındaki etkileşime işaret eder.

4.3.2. Polifenol Oksidaz Enzim Elektrotları

CF/Ppy/PPO elektrotlarının Michaelis-Menten grafiği Şekil 4.9'da görülmektedir. Bu grafikten Lineweaver-Burk grafiği elde edilmiş (Şekil 4.10.), V_{max} ve K_m sırasıyla $0,017 \pm 0,004 \mu\text{mol/dak.elektrot}$ ve $176,00 \pm 26,60 \text{ mM}$ olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).



Şekil 4.9 . CF/Ppy/PPO elektrodunun Michaelis-Menten grafiği.



Şekil 4.10. CF/Ppy/PPO elektrodunun Lineweaver-Burk grafiği.

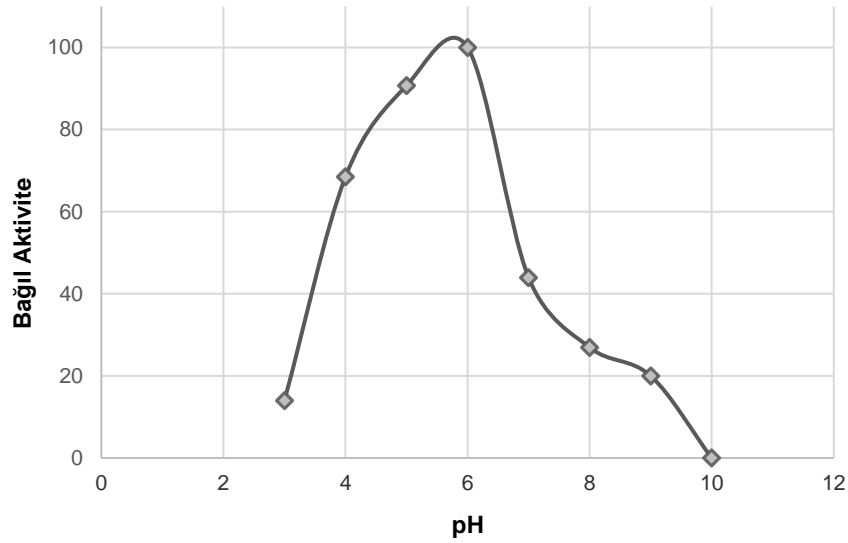
Karbon fiber ve platine immobilize enzimin V_{max} değeri beklendiği üzere serbest enzime göre daha düşüktür, K_m değeri ise daha yüksektir. Karbon fiber ve platine immobilize enzim karşılaştırıldığında ise karbon fiberle hazırlanan enzim elektrotlarının V_{max} değerinin platinle oluşturulan enzim elektrotlarının V_{max} değerinden daha düşük olduğu görülür. Bu bize karbon fiberin yüzey alanının platin elektroda göre daha düşük olduğunu ve daha az enzimin immobilize olduğunu gösterir. Elektrot yüzey alanı küçüldükçe immobilize enzim miktarının azalması ve bunun sonucunda V_{max} değerinin düşmesi doğaldır. Mikro ölçekli elektrotlarda yüzey alanı ve V_{max} küçülmesine rağmen mikro elektrotların diğer önemli avantajları öne geçerek bu elektrotların tercih edilmesine neden olur. Bu elektrotların in vivo çalışmalarda özellikle hücre içi ölçümlerde biyosensör olarak kullanım alanı vardır ve küçük numune hacimleri için gerekli olan mikro boyutlu elektrot ihtiyacına cevap vermektedirler.

Çizelge 4.2. Serbest ve immobilize PPO enziminin kinetik parametreleri.

	V_{max}	K_m
Serbest PPO [66]	0,073 $\mu\text{mol/dak.mL}$	4 mM
Pt/Ppy/PPO [66]	0,031 $\mu\text{mol/dak.elektrot}$	96 mM
CF/Ppy/PPO	0,017 \pm 0,004 $\mu\text{mol/dak.elektrot}$	176,00 \pm 26,60 mM

4.3.3 Enzim Aktivitesine pH'ın Etkisi

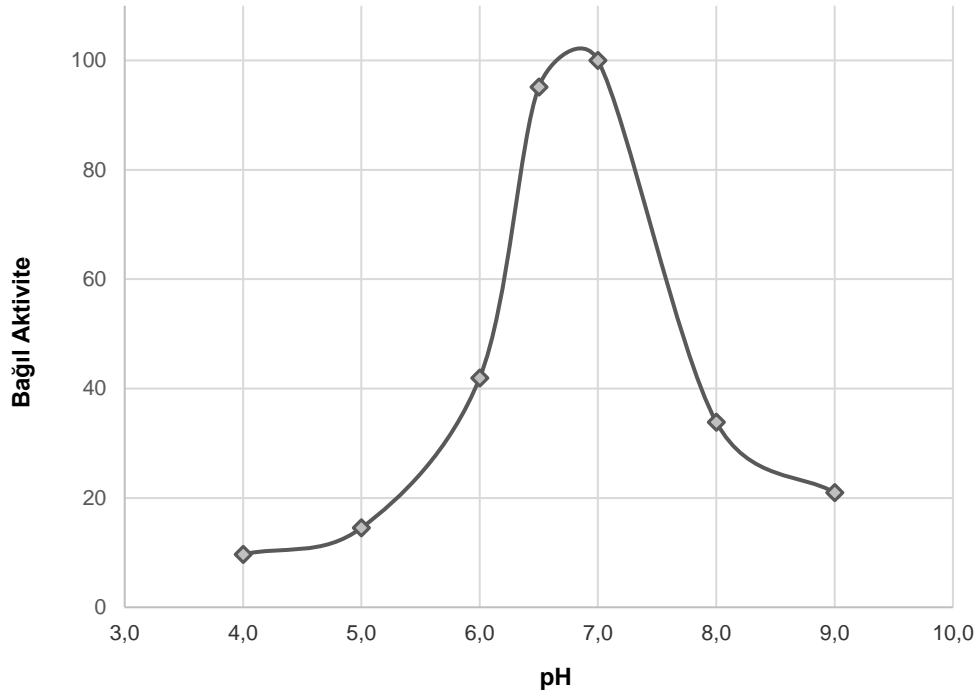
İmmobilize invertazın pH değişimine karşı aktivitesi incelenmiştir. Daha önceki çalışmalarda serbest ve platin destek elektrot üzerinde polipirole immobilize edilmiş invertazın optimum pH'ı sırasıyla 4,6 ve 5,0 olarak belirlenmiştir [67,68]. Bu çalışmada ise karbon fiber destek elektrot üzerinde polipirole immobilize edilmiş invertaz için optimum pH, 6,0 olarak belirlendi (Şekil 4.11). CF/Ppy/INV elektrotları için optimum pH'ın arttığı gözlenmiştir. Bu değişim destek matris karbon fiberin yapısından kaynaklanabileceği gibi immobilizasyon metodu sonucu enzim moleküllerinin konformasyonel değişiminden de kaynaklanabilir. Ayrıca asidik yapıdaki enzimin mikro çevresinin pH'ının ölçüm alınan noktanın pH'ından farklı olmasından da kaynaklanıyor olabilir. Şekil 4.9'da görüldüğü gibi pH 5,0 ve pH 6,0'daki immobilize invertaz aktiviteleri birbirine yakındır ve bu çalışmanın karakterizasyon ve diğer optimizasyon incelemelerinde pH 5,0 kullanılmıştır.



Şekil 4.11. CF/Ppy/INV elektrot aktivitesine pH etkisi.

Serbest PPO ve platin destek elektrotta polipirole immobilize PPO'nun optimum pH'ı önceki çalışmalarda 5,0 ve 7,0 olarak bulunmuştur [67]. Bu çalışmada yapılan CF/Ppy/PPO elektrotlarında optimum pH için Pt/Ppy/PPO ile aynı sonuca varılmıştır. Şekil 4.12'de görüldüğü gibi maksimum aktivite pH 7,0'de görülmekle birlikte pH 6,5 ve pH 7,0'de elde edilen enzim aktiviteleri birbirine çok yakındır ve her iki pH değeri

de kullanılabilir. PPO enzimi için destek elektrot olarak karbon fiberin kullanılması durumunda enzim birbirine çok yakın iki pH değerinde maksimum aktivite göstermiştir. pH 6,5'ta ve pH 7,0'de yüksek aktivite göstermesi enzimin mikro çevresinin yani içinde bulunduğu mikro ortamın pH'ının (pH 5), dışardaki pH yüksek olduğunda bile hala değerini korumakta olduğunu gösterir. Buna göre karbon fiber destek elektrot enzimin içinde bulunduğu mikro ortamın pH'ının belli bir noktaya kadar (pH 7,0) korunmasına katkıda bulunmaktadır. Sonuç olarak CF/Ppy/PPO elektrotları pH 6,5 ve pH 7,0 olmak üzere her iki pH'da da kullanılabilir. Bu çalışmada yapılan karakterizasyon, optimizasyon ve numune incelemelerinde pH 6,5 kullanılmıştır.



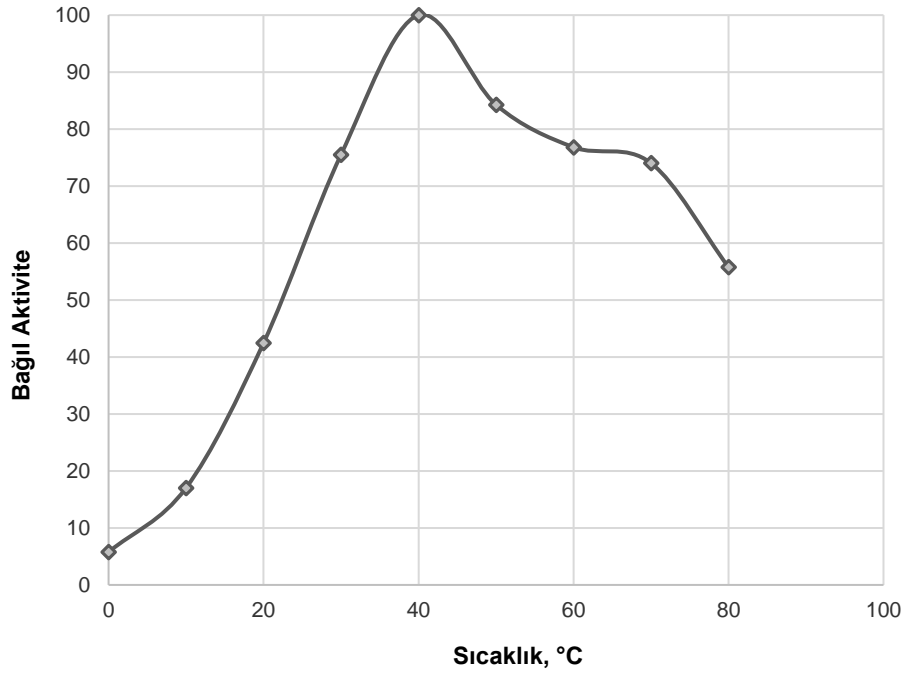
Şekil 4.12. CF/Ppy/PPO elektrot aktivitesine pH etkisi.

4.3.4. Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

CF/Ppy kompozit matrise immobilize edilmiş enzim elektrotlarının sıcaklık değişimine karşı davranışı incelendi. Sıcaklık değişiminin CF/Ppy/INV elektrodunun aktivitesine etkisi Şekil 4.13'te verilmiştir. Immobilize enzimin maksimum aktivitesi 30 °C ve 50 °C arasında gözlenmektedir. Optimum sıcaklık 40 °C olmakla birlikte 30

°C, 40 °C ve 50 °C'daki enzim aktiviteleri birbirine yakındır. Serbest invertaz için ise daha önceden yapılan çalışmalarda optimum sıcaklık 50 °C olarak belirtilmiştir [70]. Optimum sıcaklığın serbest invertaza göre değişimi hapsedme metoduyla enzimde oluşan konformasyonel değişimlerin enzimin maksimum çalışma sıcaklığını da değiştirdiğini gösterir.

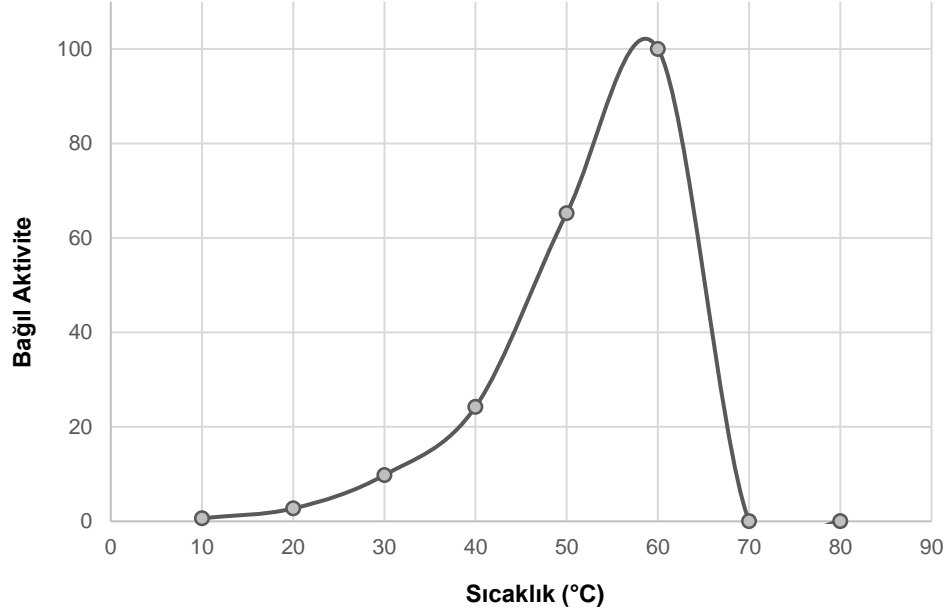
Bütün kimyasal reaksiyonlarda olduğu gibi enzimatik reaksiyonlarda da sıcaklık arttıkça tepkime hızı artar. Ancak belli bir sıcaklık değerinden sonra enzim yapısında meydana gelen denatürasyon nedeniyle aktivite düşüşü gözlenir. Sıcaklık arttıkça enzim moleküllerinin önce tersiyer yapısı, daha sonra sekonder yapısı (alfa sarmal yapı) bozulur. Bu nedenle enzimin aktif merkezi etkilenir ve enzim aktifliğini yitirir [13]. Şekilde görüldüğü gibi polimer matris içindeki invertazın aktivitesi de sıcaklık arttıkça azalmıştır [71,72].



Şekil 4.13. CF/Ppy/INV elektrot aktivitesine sıcaklık etkisi.

Sıcaklık değişiminin CF/Ppy/PPO elektrodunun aktivitesine etkisi Şekil 4.14'te görülmektedir. İmmobilize polifenol oksidaz 60 °C'de maksimum aktivite göstermiştir. 10 °C'dan itibaren artış gösteren enzim aktivitesi 40 °C'den sonra çok yükselmiş, 60

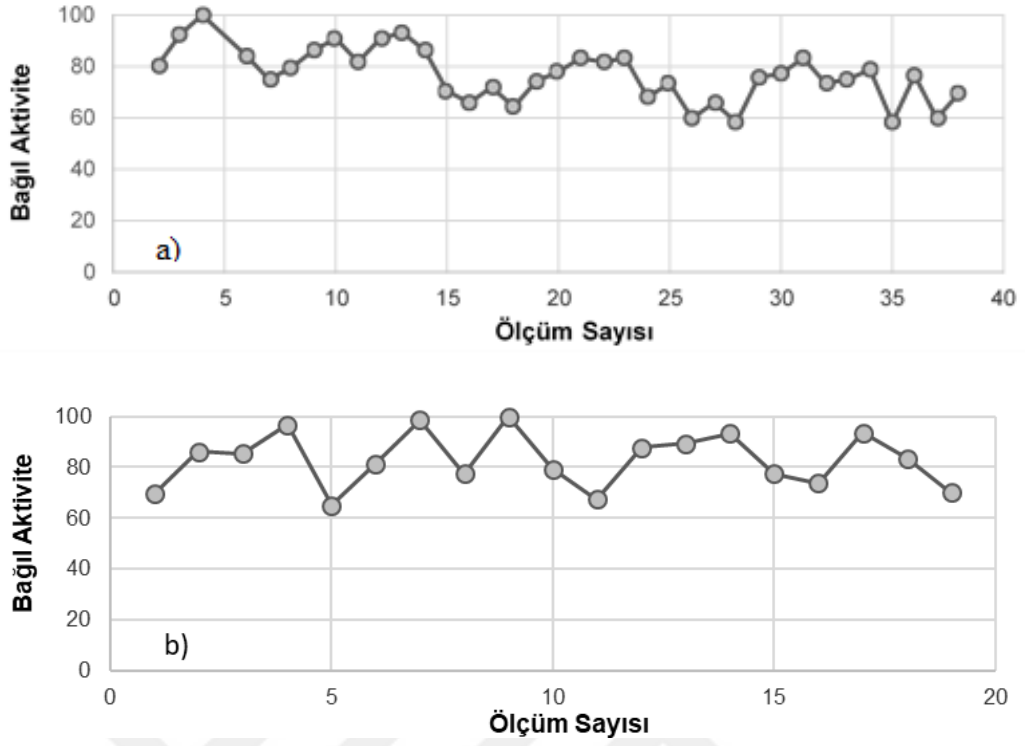
°C’de maksimum yaptıktan sonra enzim denaturizasyona uğramış ve aktivite sıfıra inmiştir.



Şekil 4.14. CF/Ppy/PPO elektrot aktivitesine sıcaklık etkisi.

4.3.5. Enzim Elektrotlarının Çalışma Kararlılığı

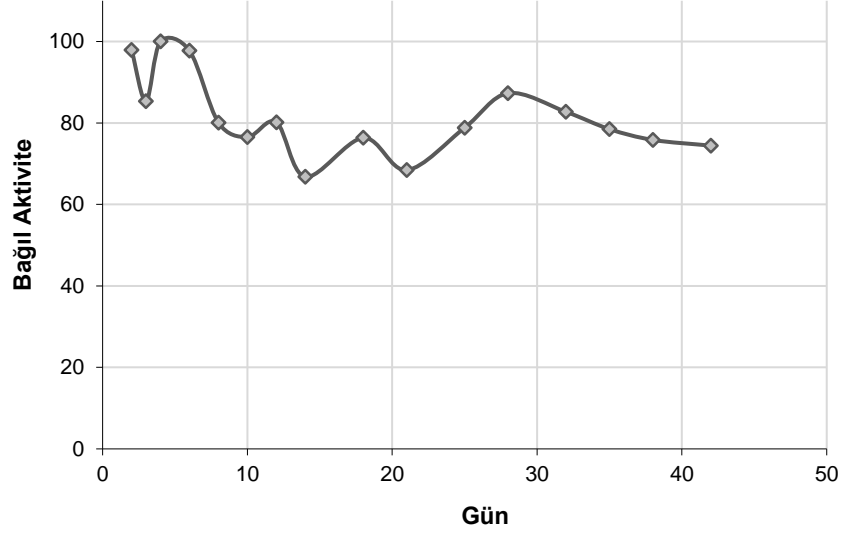
İnvertazın immobilizasyonu ile hazırlanan elektrotlardan aynı gün içinde art arda alınan 37 ölçümle enzim elektrotlarının çalışma kararlılığı belirlendi. Ölçümler 25 °C’de, pH 5,0’te ve 0,7 M sükröz konsantrasyonunda yapıldı. 37 ölçüm sonunda bağıl enzim aktivitesinin %70 olduğu görülmüştür. Dalgalandırma gözlemlenirse de enzim elektrotları kararlılığını sürdürmüştür. Serbest enzim herhangi bir denatürasyon olmaksızın bir kez kullanılabilirken Şekil 4.15’te görüldüğü gibi immobilize enzim çoklu kullanım sağlamaktadır [73]. CF/Ppy/PPO elektrodunun art arda alınan 19 ölçümle çalışma kararlılığına bakıldı. Ölçümler 25 °C’de, pH 6,5’da ve 0,07 M katekol çözeltileriyle yapıldı. 19. ölçümde elektrot aktivitesinin %70’e düştüğü gözlemlendi.



Şekil 4.15. (a) CF/Ppy/INV elektrodunun, (b) CF/Ppy/PPO elektrodunun çalışma kararlılığı.

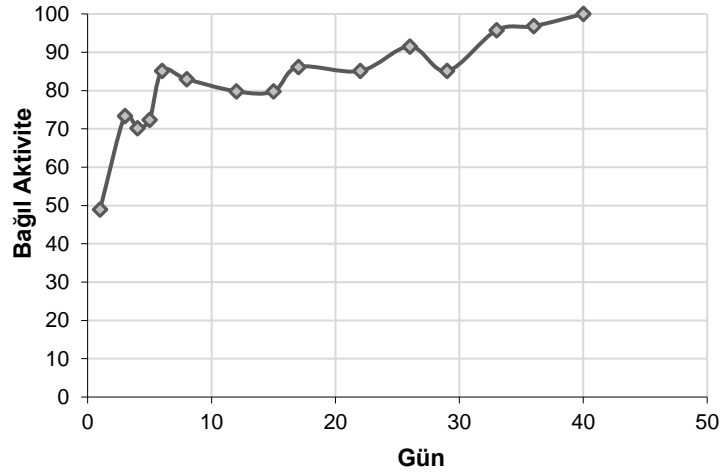
4.3.6. Enzim Elektrotlarının Raf Ömrü

Enzim elektrotlarının ne kadar sürede aktivitelerinin ne kadarını kaybettiklerini belirlemek amacıyla invertaz enzimi için 42 gün, polifenol oksidaz enzimi için 40 günlük bir periyot süresince, ilk hafta her gün, sonraki iki hafta birer gün arayla, daha sonrasında ise ikişer gün arayla olmak üzere aktivite tayini yapılmıştır. İvertaz enzim elektrotları 42. günün sonunda başlangıç aktivitelerinin %25'ini kaybetmiştir ve kalan aktivite %75 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.16). Enzim aktivitelerinde düşüş enzimin desorpsiyonundan, immobilizasyon sırasında olabilecek yapısal değişimlerden veya polimer matrisin aşınımından kaynaklanmış olabilir. Serbest enzimin aktivitesinin tamamını 8 gün içinde kaybettiği önceki çalışmalardan bilinmektedir [73]. Aktivitedeki bu azalış zamana bağlı doğal bir kayıptır fakat immobilizasyon sayesinde önemli ölçüde engellenmiştir.



Şekil 4.16. CF/Ppy/INV elektrodunun raf ömrü.

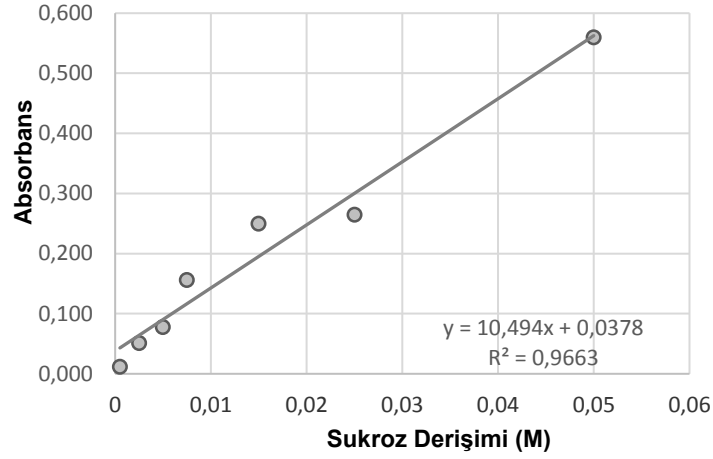
CF/Ppy/PPO elektrodunda ise 40. güne kadar aktivite artışı devam etmiştir (Şekil 4.17). Bu enzimle yapılan çalışmalardan edinilen sonuç immobilize enzimin aktif bölgelerinin zamanla aktifleştiği yönündedir. İmmobilizasyon ile oluşan konformasyon değişikliği sonucunda pasifize olan bölgeler zamanla bu konformasyon değişikliğini telafi etmekte ve tekrar aktifleşmektedir.



Şekil 4.17. CF/Ppy/PPO elektrodunun raf ömrü.

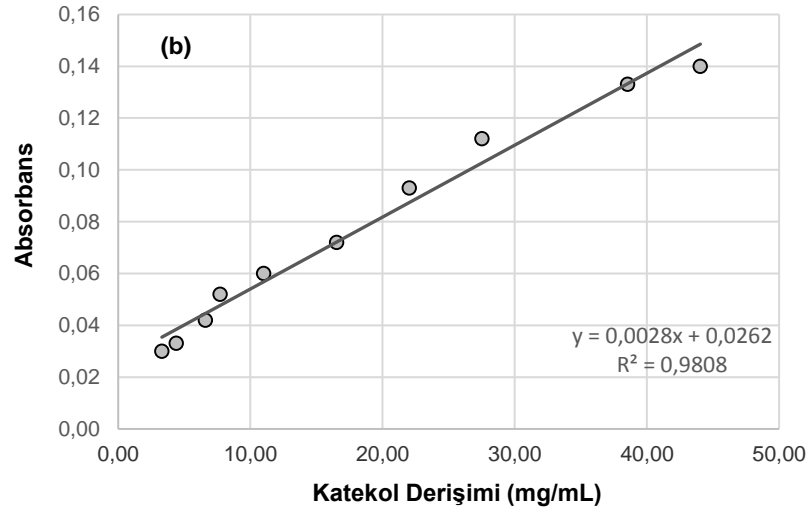
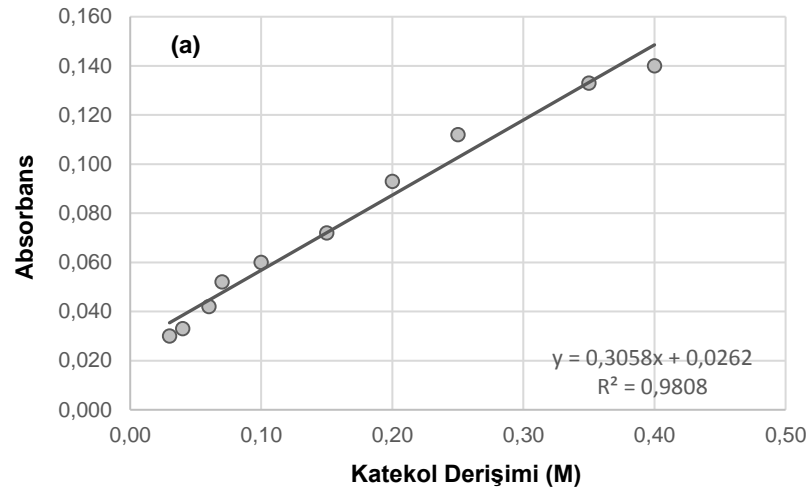
4.4. KALİBRASYON GRAFİKLERİ

Kalibrasyon eğrileri hazırlanırken invertaz enzim elektrodu için pH 5,0 asetat tamponunda hazırlanan sükröz çözeltileri kullanılmıştır. 0,0034 M – 0,0500 M arasında olacak şekilde 7 derişim hazırlanmıştır. CF/Ppy/INV elektrodu çözeltilere 4'er dakika daldırılmış ve bunlardan Somogyi-Nelson yöntemiyle hazırlanan çözeltilerin absorbansları ölçülerek Şekil 4.18'de görülen kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. 15 adet kör ölçümü yapılarak standart sapması hesaplanmış, kalibrasyon eğrisinin eğimi de kullanılarak LOD ve LOQ sırasıyla 0,0034 M ve 0,01126 M olarak saptanmıştır.



Şekil 4.18. CF/Ppy/INV elektrodunun kalibrasyon grafiği.

CF/Ppy/PPO elektrodunun kalibrasyon eğrisi için 0,03-0,40 M (3,3-44,0 mg/mL) derişimleri arasında yer alan 11 katekol çözeltisi pH 6,5 sitrat tamponunda hazırlanmıştır. Elektrot çözeltilere 10 dakika daldırılmış ve Besthorn's Hydrazone yöntemiyle renklendirilen çözeltilerin absorbansları ölçülerek Şekil 4.19'da görülen kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. 15 adet kör ölçümü yapılmış, elde edilen standart sapma ve kalibrasyon eğrisi eğiminden yararlanılarak LOD 0,0353 M (3,89 mg/mL), ve LOQ 0,1170 M (12,41 mg/mL) olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.19. CF/Ppy/PPO elektrodunun kalibrasyon grafiği. (a) Katekol derişimi molarite ile hazırlandı (b) Katekol derişimi mg/mL ile hazırlanmıştır.

4.5. ÇAY NUMUNELERİNİN ANALİZİ

CF/Ppy/PPO enzim elektroduyla hazırlanan kalibrasyon grafiği Şekil 4.19'da görölmektedir. Çaykur Tirebolu çayı 5 g tartılıp üzerine 200 ml kaynar su eklenerek demlenmiş ve bu ekstraktan 10, 20, 30 ve 40. dakikalarda numune alınarak analiz edilmiştir. Alınan bu numunelerde enzim elektroduyla tayin edilen total polifenol içeriği mg/ml katekol eşdeğeri olarak Çizelge 4.3'te verilmiştir. Demlenme süresi arttıkça çay ekstraktındaki polifenol madde miktarı beklendiği üzere artmış fakat 40. dakikada alınan ekstrakta düşme gözlenmiştir. Bu düşüşün sebebi sıcak sudaki

ekstraksiyon 30 dakikadan fazla olduğunda polifenolik maddelerin bozunması olabilir. Bir diğer sebep ekstraksiyon süresi uzadığında çaydan interferans etkisi gösterebilecek maddelerin de ekstrakte edilme olasılığıdır. Sonuçlara göre optimum ekstraksiyon süresi 30 dakika olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. Çay numunelerinde enzim elektroduyla mg/ml katekol eşdeğeri olarak saptanan total polifenol miktarları.

	Çay Numuneleri Demlenme Süresi (dakika)			
	10	20	30	40
Total Polifenol (mg/mL)	0,608	0,798	0,962	0,839

BÖLÜM 5

GENEL SONUÇ

Bu çalışmada yeni karbon fiber enzim elektrotları oluşturuldu. Bu elektrotlar üzerine pirol monomerinin elektrokimyasal yöntemle polimerizasyonu gerçekleştirildi. Polimerizasyon döngüsel voltametri ile takip edildi. Yapılan elektropolimerizasyonda polipirol elde edilip edilmediğini göstermek amacıyla FTIR spektrumu alınarak yapı tayini yapıldı. Polimerizasyon esnasında invertaz ve polifenol oksidaz enzimleri immobilize edilerek V_{max} ve K_m değerleri tayin edildi. İvertaz enzimi için V_{max} değeri $0,779 \pm 0,120$ $\mu\text{mol/dak.elektrot}$, K_m değeri $27,20 \pm 6,70$ mM olarak, polifenol oksidaz enzimi için ise V_{max} değeri $0,017 \pm 0,004$ $\mu\text{mol/dak.elektrot}$, K_m değeri $176,00 \pm 26,60$ mM olarak bulundu. Reaksiyon koşullarının enzim aktivitesine etkisi incelendi; invertaz ve polifenol oksidaz enzimlerinin sırasıyla optimum sıcaklığı 40 °C ve 60 °C olarak, optimum pH'ı pH 6,0 ve pH 7,0 olarak tespit edildi. Doğrusal çalışma aralığı, invertaz için 0,0034 M – 0,0500 M, polifenol oksidaz için 0,035 M – 0,400 M'dir. İmmobilize invertazın aktivitesi 37 ardışık ölçümden sonra %70, polifenol oksidaz için de 20 ardışık ölçümden sonra %70'dir. Raf ömrü çalışmasında, aktivite invertaz elektrodu için 42 gün sonra %25 kayıpla %75 olarak gözlemlendi. Polifenol oksidaz elektrotları için ise aktivitenin 40 gün boyunca giderek arttığı görüldü. LOD ve LOQ değerleri invertaz elektrotları için 0,0034 M, 0,01126 M, polifenol oksidaz elektrotları için 0,0353 M, 0,1170 M olarak tespit edildi. Oluşturulan yeni tip karbon fiber enzim elektrotlarının çalışabilirliği çay numunelerinde yapılan ölçümlerle denendi.

KAYNAKLAR

1. Schuvailo, O. N., Dzyadevych, S. V., El'skaya, A. V., Gautier-Sauvigné, S., Csöregi, E., Cespuglio, R., and Soldatkin, A. P., "Carbon fibre-based microbiosensors for in vivo measurements of acetylcholine and choline", *Biosensors And Bioelectronics*, 21 (1): 87–94 (2005).
2. Sakslund, H., Wang, J., Lu, F., and Hammeric, O., "Development and evaluation of glucose microsensors based on electrochemical codeposition of ruthenium and glucose oxidase onto carbon fiber microelectrodes", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 397: 149-155 (1995).
3. Fei, J., Wu, K., Wang, F., and Hu, S., "Glucose nanosensors based on redox polymer/glucose oxidase modified carbon fiber nanoelectrodes", *Talanta*, 65 (4): 918–924 (2005).
4. Kim, J.-H., Cho, S., Bae, T.-S., and Lee, Y.-S., "Enzyme biosensor based on an N-doped activated carbon fiber electrode prepared by a thermal solid-state reaction", *Sensors And Actuators B: Chemical*, 197: 20–27 (2014).
5. Poorahong, S., Santhosh, P., Ramirez, G. V., Tseng, T.-F., Wong, J. I., Kanatharana, P., Thavarungkul, P., and Wang, J., "Development of amperometric α -ketoglutarate biosensor based on ruthenium–rhodium modified carbon fiber enzyme microelectrode", *Biosensors And Bioelectronics*, 26 (8): 3670–3673 (2011).
6. Adhikari, B. and Majumdar, S., "Polymers in sensor applications", *Progress In Polymer Science*, 29 (7): 699–766 (2004).
7. Deveci, H. A., Nur, G., Kirpik, M. A., Harmankaya, A., and Yıldız, Y., "Fenolik Bileşik İçeren Bitkisel Antioksidanlar", *Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9 (1): 26–32 .
8. Saçak, M., "Polimer Kimyası / Prof. Dr. Mehmet Saçak", 4. Ed., *Gazi Kitabevi*, 525 (2008).
9. Kaptan, D., "İletken polimer kompozitleri kullanılarak enzim tutuklamalı biyosensör oluşturulması", Yüksek Lisans Tezi, *Karabük Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 3 (2013).
10. Aydın, Y., "İletken polimerlerin içerisinde enzim tutuklamasıyla yapılan biyosensörler", Yüksek Lisans Tezi, *Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 7-8 (2012).

11. Acar, H., "Potasyum persulfat yükseltgeni kullanılarak iletken polipirol/poliakrilonitril kompozit lif hazırlanması ve karakterizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 14-22 (2008).
12. Pron, A., Gawrys, P., Zagorska, M., Djurado, D., and Demadrille, R., "Electroactive materials for organic electronics: preparation strategies, structural aspects and characterization techniques", *Chemical Society Reviews*, 39 (7): 2577–2632 (2010).
13. Aydar, S., "Tiyofen ve 3,4-etilendioksitiyofen donör gruplarının benzotiyadiazol akseptör grubuyla yaptığı dad tipi iletken polimerlerde enzim immobilizasyonu", *Karabük Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 5-8 (2012).
14. Esencan, B., "İletken polimer-kil kompozitlerinin sentezi ve bu kompozitlerin adsorpsiyon özelliklerinin incelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Isparta, 8-27 (2006).
15. Toshima, N. and Hara, S., "Direct synthesis of conducting polymers from simple monomers", *Progress In Polymer Science*, 20 (1): 155–183 (1995).
16. Toptaş, N., "Anilin ve poliakrilonitril kullanarak kimyasal polimerizasyon yöntemi ile iletken kompozit lif hazırlanması", Yüksek Lisans tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, (2006).
17. Mortimer, R. J., Dyer, A. L., and Reynolds, J. R., "Electrochromic organic and polymeric materials for display applications", *Displays*, 27 (1): 2–18 (2006).
18. Işık, S., Alkan, S., Toppare, L., Cianga, I., and Yağcı, Y., "Immobilization of invertase and glucose oxidase in poly 2-methylbutyl-2-(3-thienyl) acetate/polypyrrole matrices", *European Polymer Journal*, 39 (12): 2375–2381 (2003).
19. Zhai, J., Cui, H., and Yang, R., "DNA based biosensors", *Biotechnology Advances*, 15 (1): 43–58 (1997).
20. Luong, J. H. T., Bouvrette, P., and Male, K. B., "Developments and applications of biosensors in food analysis", *Trends In Biotechnology*, 15 (9): 369–377 (1997).
21. Yıldız, S., "Enzimler", *Fakülte Kitabevi*, 200 (2007).
22. Özdemir, Y., "Karboksil fonksiyonel gruplara sahip iletken polimerlerin sentezi, karakterizasyonu ve amperometrik sensör uygulamasında kullanılması", Yüksek Lisans Tezi, *Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü*, (2010).
23. İnternet: "Enzimler" <http://dersnotlarin.blogspot.com/2010/12/enzimlerin-yapisi-ozellikleri-ve.html> (2018).

24. Özata, A., "Enzimoloji ders notları", *Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi*, 117 (2000).
25. Tutar, H., "Candida rugosa lipaz enziminin sporopollenin üzerine adsorbsiyonu ve karakterizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, (2009).
26. İnternet: "İnvertaz", <http://www1.lsbu.ac.uk/water/enztech/sucrose.html> (2018).
27. Mishra, B.B., "Studies on polyphenol oxidase (PPO) in Brinjal (eggplant; solanum melongena)", Doktoraz Tezi, *Homi Bhabha National Institute*, (2012).
28. Yaman, N., Öktem, T., Seventekin, N., "Karbon liflerinin özellikleri ve kullanım olanakları", *Tekstil ve Konfeksiyon*, 2: (2007).
29. İnternet: <http://zoltek.com/carbon-fiber/how-is-carbon-fiber-made/> (2018).
30. Zhou, Y., Yang, W., Xia, Y., and Mallick, P. K., "An experimental study on the tensile behavior of a unidirectional carbon fiber reinforced aluminum composite at different strain rates", *Materials Science And Engineering: A*, 362 (1–2): 112–117 (2003).
31. Armstrong-James, M. and Millar, J., "Carbon fibre microelectrodes", *Journal Of Neuroscience Methods*, 1 (3): 279–287 (1979).
32. İnternet: https://en.wikipedia.org/wiki/Carbon_fibers (2018).
33. İnternet: "Karbon fiber", <https://www.polimerica.it/articolo.asp?id=19697>, (2018).
34. Worasuwanarak, N., Hatori, S., Nakagawa, H., and Miura, K., "Effect of oxidation pre-treatment at 220 to 270 °C on the carbonization and activation behavior of phenolic resin fiber", *Carbon*, 41 (5): 933–944 (2003).
35. Schueler, R., Joshi, S. P., and Schulte, K., "Damage detection in CFRP by electrical conductivity mapping", *Composites Science And Technology*, 61 (6): 921–930 (2001).
36. Noisternig JF. and Jungwirth D., "Design and Analysis of Anchoring Systems For a Carbon Fiber Composite Cable", 2nd-Int. Conf. on Advanced Composite Materials in Bridges and Structures, Montreal, August 1996. 16.
37. İnternet: "Karbon Fiber Enzim", <http://www.madehow.com/Volume-4/Carbon-Fiber.html#ixzz5Zeti84iV> (2018).
38. Hong, G., Diao, S., Antaris, A. L., and Dai, H., "Carbon Nanomaterials for Biological Imaging and Nanomedicinal Therapy", *Chemical Reviews*, 115 (19): 10816–10906 (2015).

39. Barsan, M. M., Ghica, M. E., and Brett, C. M. A., "Electrochemical sensors and biosensors based on redox polymer/carbon nanotube modified electrodes: A review", *Analytica Chimica Acta*, 881: 1–23 (2015).
40. Novoselov, K. S., Fal'ko, V. I., Colombo, L., Gellert, P. R., Schwab, M. G., and Kim, K., "A roadmap for graphene", *Nature*, 490 (7419): 192–200 (2012).
41. Zhai, W., Srikanth, N., Kong, L. B., and Zhou, K., "Carbon nanomaterials in tribology", *Carbon*, 119: 150–171 (2017).
42. Jennings, V. J., Dodson, A., and Eastman, R. J., "The use of vitreous carbon and carbon fibre electrodes for the coulometric generation of iodine", *Analytica Chimica Acta*, 76 (1): 143–147 (1975).
43. Fei, J., Wu, K., Wang, F., and Hu, S., "Glucose nanosensors based on redox polymer/glucose oxidase modified carbon fiber nanoelectrodes", *Talanta*, 65 (4): 918–924 (2005).
44. Schuvailo, O. N., Dzyadevych, S. V., El'skaya, A. V., Gautier-Sauvigné, S., Csöregi, E., Cespuglio, R., and Soldatkin, A. P., "Carbon fibre-based microbiosensors for in vivo measurements of acetylcholine and choline", *Biosensors And Bioelectronics*, 21 (1): 87–94 (2005).
45. Poorahong, S., Santhosh, P., Ramírez, G. V., Tseng, T.-F., Wong, J. I., Kanatharana, P., Thavarungkul, P., and Wang, J., "Development of amperometric α -ketoglutarate biosensor based on ruthenium–rhodium modified carbon fiber enzyme microelectrode", *Biosensors And Bioelectronics*, 26 (8): 3670–3673 (2011).
46. Chadchankar, H. and Yavich, L., "Characterization of a 32 μ m diameter carbon fiber electrode for in vivo fast-scan cyclic voltammetry", *Journal Of Neuroscience Methods*, 211 (2): 218–226 (2012).
47. 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).
48. Ren, Q.-Q., Wu, J., Zhang, W.-C., Wang, C., Qin, X., Liu, G.-C., Li, Z.-X., and Yu, Y., "Real-time in vitro detection of cellular H₂O₂ under camptothecin stress using horseradish peroxidase, ionic liquid, and carbon nanotube-modified carbon fiber ultramicroelectrode", *Sensors And Actuators B: Chemical*, 245: 615–621 (2017).
49. Sarma, A. K., Vatsyayan, P., Goswami, P., and Minter, S. D., "Recent advances in material science for developing enzyme electrodes", *Biosensors And Bioelectronics*, 24 (8): 2313–2322 (2009).

50. "Nelson N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153: 375-80, 1944.",
51. Somogyi, M., "Notes on Sugar Determination", *Journal Of Biological Chemistry*, 195 (1): 19–23 (1952).
52. Hatanaka, C. and Kobara, Y., "Determination of glucose by a modification of Somogyi–Nelson method", *Agricultural And Biological Chemistry*, 44: 2943–2949 (1980).
53. Pifferi, P. G. and Baldassari, L., "A spectrophotometric method for the determination of the catecholase activity of tyrosinase by Besthorn's hydrazone", *Analytical Biochemistry*, 52 (2): 325–335 (1973).
54. Topkaya, S.N., "Biyolojik ve Kimyasal Bazı Maddelerin DNA İle Etkileşiminin Elektrokimyasal Biyosensörlerle Algılanması", Yüksek Lisans Tezi, *Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, İzmir (2009).
55. Çelebi, S., İbibikcan, E., Kiralp Kayahan, S., Yigitsoy, B., and Toppare, L., "Immobilization of Invertase in Copolymer of 2,5-Di(thiophen-2-yl)-1-p-Tolyl-1H-Pyrrole with Pyrrole", *Journal Of Macromolecular Science®*, Part A: Pure and Applied Chemistry: 739–744 (2009).
56. Arruda, L. M. and Vitolo, M., "Characterization of invertase entrapped into calcium alginate beads", *Applied Biochemistry And Biotechnology*, 81 (1): 23–33 (1999).
57. Rosenwald, S. E., Nowall, W. B., Dontha, N., and Kuhr, W. G., "Laser interference pattern ablation of a carbon fiber microelectrode: biosensor signal enhancement after enzyme attachment", *Analytical Chemistry*, 72 (20): 4914–4920 (2000).
58. 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).
59. Rodriguezlopez, J. N., Escribano, J., and Garciacanovas, F., "A Continuous Spectrophotometric Method for the Determination of Monophenolase Activity of Tyrosinase Using 3-Methyl-2-benzothiazolinone Hydrazone", *Analytical Biochemistry*, 216 (1): 205–212 (1994).
60. Lineweaver, H. and Burk, D., "The Determination of Enzyme Dissociation Constants", *Journal Of The American Chemical Society*, 56 (3): 658–666 (1934).
61. Engel, P. C. and Ferdinand, W., "The significance of abrupt transitions in Lineweaver–Burk plots with particular reference to glutamate dehydrogenase. Negative and positive co-operativity in catalytic rate constants", *Biochemical Journal*, 131 (1): 97–105 (1973).

62. "Enzyme Kinetics: A Modern Approach. A.G. Marangoni. New York: John Wiley & Sons, Inc., 244 Pp., 89.95, Hardcover. ISBN 0-471-15985-9. | Clinical Chemistry".
63. Bisswanger, H., "Enzyme Kinetics Principles and Methods (3. Baskı)", Almanya Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH. (2002).
64. Ekinci, O., "Immobilization of glucose oxidase and polyphenol oxidase in conducting copolymer of pyrrole functionalized polystyrene with pyrrole", M. Sc. Thesis, *Middle East Technical University*, Ankara (2006).
65. Lineweaver, H. and Burk, D., "The Determination of Enzyme Dissociation Constants", *Journal Of The American Chemical Society*, 56 (3): 658–666 (1934).
66. Büyükbayram, A.E., "Immobilization of intervertase, polyphenol oxidase and glucose oxidase in conducting copolymers of thiophene capped polytetrahydrofuran and pyrrole", Ph. D. Thesis, *Middle East Technical University*, Ankara (2005).
67. Tuncagil, S., Kıralp, S., Varıs, S., and Toppare, L., "Immobilization of invertase on a conducting polymer of 1-(4-nitrophenyl)-2,5-di(2-thienyl)-1H-pyrrole", *Reactive And Functional Polymers*, 68 (3): 710–717 (2008).
68. Alkan, S., Toppare, L., Yagci, Y., and Hepuzer, Y., "Immobilization of invertase in conducting thiophene-capped poly(methylmethacrylate)/polypyrrole matrices", *Journal Of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 10 (12): 1223–1235 (1999).
69. Kıralp, S., "Synthesis of conducting block copolymers and their use in the immobilization of invertase and polyphenol oxidase enzyme", Ph. D. Thesis, *Middle East Technical University*, Ankara (2004).
70. Kizilyar, N., Akbulut, U., and Toppare, L., "Immobilization of invertase in conducting polypyrrolytetrahydrofuran graft polymer matrices", 6 (1999).
71. Cirpan, A., Alkan, S., Toppare, L., Hepuzer, Y., and Yagci, Y., "Immobilization of invertase in conducting copolymers of 3-methylthienyl methacrylate", *Bioelectrochemistry*, 59 (1–2): 29–33 .
72. Gürsel, A., Alkan, S., Toppare, L., and Yağcı, Y., "Immobilization of invertase and glucose oxidase in conducting H-type polysiloxane/polypyrrole block copolymers", *Reactive And Functional Polymers*, 57 (1): 57–65 (2003).
73. Kartal, M., Kayahan, S., Bozkurt, A., and Toppare, L., "Entrapment of invertase in an interpenetrated polymer network of alginate acid and poly (1-vinylimidazole)", *Talanta*, 77 (2): 659–662 (2008)

ÖZGEÇMİŞ

Gözde KARABACAK 1989 yılında Karabük'te doğdu. İlk ve orta öğretimini aynı şehirde tamamladıktan sonra 2009 yılında Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya bölümüne girdi. 2014 yılında mezun olduktan sonra 2016 yılında Karabük Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans programına başladı.

ADRES BİLGİLERİ:

Adres : Şirinevler Mah. Bestekar Sok. Güleç Apt. 18/5 KARABÜK
Tel : 553 250 3478
E-posta : gozde_karabacak@hotmail.com