

**TİYOFEN VE 3,4- ETİLENDİOKSİTİYOFEN DONÖR GRUPLARININ  
BENZOTİYADİAZOL AKSEPTÖR GRUBUYLA YAPTIĞI DAD TİPİ  
İLETKEN POLİMERLERDE ENZİM İMMOBİLİZASYONU**

**Sevda AYDAR**

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

**KARABÜK  
Haziran 2012**

Sevda AYDAR tarafından hazırlanan “TİYOFEN VE 3,4-ETİLENDİOKSİTİYOFEN DONÖR GRUPLARININ BENZOTİYADİAZOL AKSEPTÖR GRUBUYLA YAPTIĞI DAD TİPİ İLETKEN POLİMERLERDE ENZİM İMMOBİLİZASYONU” başlıklı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Yrd. Doç. Dr. Ayşe Elif BÖYÜKBAYRAM  
Tez Danışmanı, Kimya Anabilim Dalı

WELSP.

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 29/06/2012

Ünvanı, Adı SOYADI (Kurumu)

Başkan: Prof. Dr. Baki HAZER (BEÜN)

Üye : Prof. Dr. Mahmut KÖSE (BEÜN)

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ayşe Elif BÖYÜKBAYRAM (KBÜ)

Üye : Yrd. Doç. Dr. Çiğdem KADI (KBÜ)

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ali Hakan ARKIN (KBÜ)

İmzası

  
.....  
  
.....

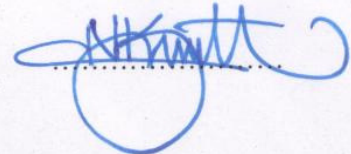
WELSP.

  
.....  
  
.....

29/06/2012

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

Doç. Dr. Nizamettin KAHRAMAN  
Fen Bilimleri Enstitü Müdürü

  
.....

*“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.”*

Sevda AYDAR

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### TİYOFEN VE 3,4- ETİLENDİOKSİTİYOFEN DONÖR GRUPLARININ BENZOTİYADİAZOL AKSEPTÖR GRUBUYLA YAPTIĞI DAD TİPİ İLETKEN POLİMERLERDE ENZİM İMMOBİLİZASYONU

Sevda AYDAR

Karabük Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı:

Yrd. Doç. Dr. Ayşe Elif BÖYÜKBAYRAM

Haziran 2012, 60 Sayfa

Bu çalışmada DAD (Donör-Akseptör-Donör) tipi iletken polimerlere enzim immobilizasyonu gerçekleştirildi ve model enzim olarak invertaz enzimi kullanıldı. Akseptör grubu olarak benzotiyadiazol, donör grubu olarak 3,4- etilendioksitiyofen (EDOT) ve tiyofen (Th) kullanıldı. 4,7-di(tiyofen-2-il)benzo[c][1,2,5]tiyadiazol( $M_1$ ), 4,7-di(2,3-dihidro-tiyeno[3,4-b][1,4]dioksin-5-il)benzo [1,2,5]tiyadiazol( $M_2$ ), 4-(2,3-dihidrotiyeno[3,4-b][1,4]dioksin-5-il)-7-(tiyofen-2-il)benzo[c][1,2,5]tiyadi-azol( $M_3$ )'ün polimerleri ve  $M_3$  homopolimerine benzer yapıda olan  $M_1$  ve  $M_2$ 'den hazırlanan kopolimer potansiyodinamik olarak hazırlandı. İvertaz DAD tipi polimer ve polipirol'den oluşan kompozit arasına immobilize edildi. İmmobilize invertazın karakterizasyonu spektrofotometrik metotla 540 nm'de yapıldı. Kinetik parametreler; maksimum reaksiyon hızı ( $V_{max}$ ) ve Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ) hesaplandı. DAD tipi homopolimerler ( $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$ ) içindeki immobilize invertazın  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri

sırasıyla  $0.85 \mu\text{mol dak}^{-1}$ , 22.6 mM;  $0.96 \mu\text{mol dak}^{-1}$ , 31.8 mM;  $0.95 \mu\text{mol dak}^{-1}$ , 22.7 mM olarak bulundu.  $M_1$  ve  $M_2$  kopolimerinin ise  $0.83 \mu\text{mol dak}^{-1}$ , 12.1 mM olarak saptandı.  $P_3$  homopolimerinin enzim aktivitesi,  $P_1$  ve  $P_2$  homopolimerlerinin aktivite değerleri arasında bulundu. Her bir enzim elektrodun optimum sıcaklık değerleri 30–50 °C arasında, optimum pH değerleri 5.0 olarak saptandı. Elektrotların 4 °C’de 40 günlük depolamada aktifliklerini % 20–40 oranında kaybettiği gözlendi.

**Anahtar Sözcükler :** İletken polimerler, DAD tipi polimer, elektrokimyasal polimerizasyon, enzim immobilizasyonu, sensör, invertaz.

**Bilim Kodu :** 201.1.041

## **ABSTRACT**

**M.Sc. Thesis**

### **IMMOBILIZATION OF INVERTASE IN DAD TYPE POLYMERS: BENZOTHIADIAZOLE ACCEPTOR, 3,4-ETHYLENEDIOXYTHIOPHENE AND THIOPHENE DONOR UNITS**

**Sevda AYDAR**

**Karabük University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Chemistry**

**Thesis Advisor:**

**Assist. Prof. Dr. Ayşe Elif BÖYÜKBAYRAM**

**June 2012, 60 pages**

Conductive polymers with donor-acceptor-donor (DAD) type units; benzothiadiazole acceptor unit and 3,4-ethylenedioxythiophene (EDOT) and thiophene (Th) donor units, were investigated for immobilization of invertase. The polymers were prepared potentiodynamically from their monomers,  $M_1$  (Th-benzothiadiazole-Th),  $M_2$  (EDOT-benzothiadiazole-EDOT),  $M_3$  (Th-benzothiadiazole-EDOT) and a copolymer, which is a homolog to homopolymer of  $M_3$ , was prepared from  $M_1$  and  $M_2$ . Invertase was trapped between a two layer-composite; DAD polymer and polypyrrole. The characterization of immobilized invertase was performed using spectrophotometric method at 540 nm. Kinetic parameters,  $V_{max}$ , maximum reaction rate and  $K_m$ , Michaelis-Menten constant values of immobilized invertase in DAD type homopolymer ( $P_3$ ),  $0.95 \mu\text{mol min}^{-1}$  and 22.7 mM respectively, are found between those of homopolymers  $P_1$  and  $P_2$  better than the

copolymer. Polymers and copolymer exhibited a broad optimal temperature profile between 30 and 50 °C compare to free enzyme. Optimum pH (5.0) is same asfor free invertase. The electrodes were found to be stable with 100 % activity during one day for fourty consecutive measurements. As to the self-life 25 % of the initial activity was lost in the first ten days, then the electrodes were stable with 75% activity for a fourty day storage at 4 °C.

**Keywords** : Conducting polymer, DAD type polymer, electrochemical polymerization, enzyme immobilization, sensor, invertase.

**Science Code** : 201.1.041

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim ve çalışmalarım boyunca yardım ve desteğini bir an olsun esirgemeyen danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Ayşe Elif BÖYÜKBAYRAM ‘a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Deneylerimin tamamlanmasında büyük desteği olan sayın Prof. Dr. Levent TOPPARE’ye teşekkürü bir borç bilirim.

Karabük Üniversitesi Kimya Bölümü tüm öğretim üyelerine, araştırma görevlilerine ve yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarım Duygu KAPTAN ve Elif YILMAZ’a yardım ve desteklerinden ötürü teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında gülyüzünü esirgemeyen ve her konuda içtenlikle yardımcı olan Dr. F. Bilge EMRE ‘ye, Uzm. Kim. Sema DEMİRCİ’ ye, Fulya EKİZ başta olmak üzere tüm grup üyelerine teşekkür ederim.

Hayatım boyunca ilgi, destek ve sevgilerini esirgemeyip benim için her türlü fedakârlıkta bulunan ve yanımda olan çok sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



## 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
1.1. İLETKEN POLİMERLER .....	3
1.1.1. Band Teorisi .....	3
1.1.2. İletken Polimerlerin Uygulama Alanları .....	8
1.1.3. İletken Polimerlerin Elektrokimyası .....	10
1.1.3.1. Elektrolitik Koşullar .....	11
1.1.3.2. Polimerlerin Elektrokimyasal Polimerizasyon Mekanizması. ....	12
1.1.4. Elektrokimyasal Polimerizasyon Teknikleri .....	12
1.1.4.1. Elektroliz .....	13
1.1.4.2. Dönüşümlü Voltametri .....	14
1.1.5. Donör-Akseptör-Donör Teorisi .....	15
1.2. ENZİMLER .....	17
1.2.1. Enzimlerin Yapısı .....	17
1.2.2. Enzimlerin Katalitik Özellikleri .....	19
1.2.3. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler .....	20
1.3. ENZİM TEPKİMELERİNİN KİNETİĞİ .....	23
1.4. ENZİMLERİN İMMOBİLİZASYONU .....	27
1.4.1. İmmobilizasyon Yöntemleri .....	28

## **Sayfa**

1.4.1.1. Taşıyıcıya Bağlanma .....	28
1.4.1.2. Çapraz Bağlama .....	31
1.4.1.3. Hapsetme.....	32
1.4.2. İmmobilizasyon Avantajları .....	33
1.4.3. Enzim Aktivitesine İmmobilizasyonun Etkisi.....	34
1.4.4. İmmobilize Enzimlerin Uygulama Alanları. ....	35
1.5. ENZİM SENSÖRLERİ .....	35
1.6. BİYOSENSÖRLER.....	36
1.7. İNVERTAZ.....	37
BÖLÜM 2. ....	40
DENEYSEL ÇALIŞMALAR .....	40
2.1. KULLANILAN REAKTİFLER .....	40
2.1.1. Nelson's Reaktifinin Hazırlanması .....	40
2.1.2. Arsenomolibdat Reaktifinin Hazırlanması.....	40
2.2. KULLANILAN CİHAZLAR.....	41
2.2.1. Potansiyostat.....	41
2.2.2. UV- VIS Spektrofotometre.....	41
2.3. YÖNTEM .....	41
2.3.1. DAD Yapılı Monomerlerin Sentezi .....	41
2.3.2. Oksidatif Elektropolimerizasyon .....	43
2.3.3. Farklı Film Kalınlıklarının Elde Edilişi .....	44
2.3.4. İnvertaz İmmobilizasyonu .....	44
2.3.5. Enzim Aktivitesi Tayini .....	44
2.3.6. Kinetik Parametrelerin Tayini .....	45
2.3.7. Optimum pH ve Sıcaklık Tayini.....	45
2.3.8. Çalışma Kararlılığı ve Raf Ömrü Tayini.....	45
BÖLÜM 3. ....	46
DENEYSEL SONUÇLAR.....	46
3.1. İMMOBİLİZE ENZİMİN KİNETİK PARAMETRELERİ .....	46
3.2. POLİMER KALINLIĞININ ENZİM AKTİVİTESİNE ETKİSİ.....	48

	<b><u>Sayfa</u></b>
3.3. ENZİM AKTİVİTESİNE pH'NIN ETKİSİ.....	48
3.4. ENZİM AKTİVİTESİNE SICAKLIĞIN ETKİSİ .....	50
3.5. ENZİM ELEKTROTLARIN ÇALIŞMA KARARLILIĞI VE RAF ÖMRÜ.....	51
 BÖLÜM 4. ....	 53
SONUÇ .....	53
 KAYNAKLAR.....	 54
ÖZGEÇMİŞ.....	60

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b><u>Sayfa</u></b>
Şekil 1.1. Band yapıları, a)İletken, b)yarı iletken ve c)yalıtkanlar için .....	3
Şekil 1.2. Bazı konjuge polimer sistemlerinde bandların oluşumu.....	4
Şekil 1.3. Sıcaklığın, iletken polimerlerin ve metallerin iletkenlikleri üzerine etkisi.....	5
Şekil 1.4. PPy'ün polaron ve bipolaron yapıları ve band diyagramı .....	6
Şekil 1.5. Poliasetilenin soliton, polaron ve bipolaron yapıları .....	7
Şekil 1.6. Yükün taşınması, a) zincir içinde yükün taşınması, b)zincirler arası yükün taşınması,c) parçacıklar arasında yükün taşınması .....	8
Şekil 1.7. Heterosikliklerin elektropolimerizasyon mekanizması .....	13
Şekil 1.8. Dönüşümlü voltametrde potansiyel taraması ve akım potansiyel eğrisi.....	15
Şekil 1.9. Enzimlerin anahtar-kilit modeli.....	19
Şekil 1.10. Enzim konsantrasyonunun tepkime hızına etkisi.....	21
Şekil 1.11. Substrat konsantrasyonunun tepkime hızına etkisi .....	21
Şekil 1.12. pH'nın enzim aktivitesine etkisi .....	23
Şekil 1.13. Enzim katalizli reaksiyonun aktivasyon enerji diyagramı.....	24
Şekil 1.14. Substrat konsantrasyonu- reaksiyon hızı grafiği.....	26
Şekil 1.15. Lineweaver-Burk grafiği.....	27
Şekil 1.16. Enzim immobilizasyon yöntemleri.....	28
Şekil 1.17. Kovalent bağ ile enzim immobilizasyonu.....	29
Şekil 1.18. Çapraz bağlı enzim immobilizasyonu.....	32
Şekil 1.19. Enzimlerin hapsetme yoluyla immobilizasyonu .....	33
Şekil 1.20. Enzim sensörünün genel şematik gösterimi.....	36
Şekil 1.21. Biyosensörün yapısı ve çalışma prensibi .....	36
Şekil 1.22. Sükrozun hidroliz reaksiyonu.....	37
Şekil 1.23. Maya invertazı için katalitik mekanizma.....	39
Şekil 2.1. M <sub>1</sub> , M <sub>2</sub> ve M <sub>3</sub> monomerlerinin sentez aşamaları.....	42
Şekil 2.2. M <sub>1</sub> , M <sub>2</sub> ve M <sub>3</sub> monomerlerinin yapıları .....	42
Şekil 2.3. P <sub>1</sub> , P <sub>2</sub> , P <sub>3</sub> ve Kopolimer yapıları .....	43

## **Sayfa**

Şekil 3.1. P <sub>3</sub> ve Kopolimer için Michaelis-Menten grafiği.....	47
Şekil 3.2. Tarama sayısının enzim aktivitesine etkisi .....	48
Şekil 3.3. pH'nın immobilize invertazın aktivitesine etkisi.....	49
Şekil 3.4. Sıcaklığın immobilize invertazın aktivitesine etkisi .....	50
Şekil 3.5. İnvirtaz elektrotlarının çalışma kararlılığı .....	52
Şekil 3.6. İnvirtaz elektrotlarının raf ömrü.....	52

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b><u>Sayfa</u></b>
Çizelge 1.1. Soliton, polaron ve bipolaronların özellikleri .....	7
Çizelge 3.1. İmmobilize ve serbest invertazın kinetik parametreleri .....	44

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### SİMGELER

AgCl	: Gümüş klorür
Asp- 23	: Aspartik asit
Au	: Altın
Br <sub>2</sub>	: Brom
° C	: Santigrat
CuSO <sub>4</sub>	: Bakır sülfat
dak	: Dakika
E <sub>g</sub>	: Band aralığı (Band gap)
g	: Gram
Glu- 204	: Glutamik asit
HBr	: Hidrobromik asit
Hg <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	: Civa (II) klorür
Hg(SO <sub>4</sub> ) <sub>(s)</sub>	: Civa sülfat
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	: Sülfirik asit
K <sub>m</sub>	: Michaelis- Menten sabiti
M <sub>1</sub>	: 4,7-di(tiyofen-2-il)benzo[c][1,2,5]tiyadiazol
M <sub>2</sub>	: 4,7-di(2,3-dihidro-tiyeno[3,4-b][1,4]dioksin-5-il)benzo [1,2,5]tiyadiazol
M <sub>3</sub>	: 4-(2,3-dihidrotiyeno[3,4-b][1,4]dioksin-5-il)-7-(tiyofen- 2-il)benzo[c][1,2,5]tiyadiazol
M	: Molarite
mL	: Mililitre
µmol	: Mikromol
n-BuLi	: n-Bütil lityum
NaHCO <sub>3</sub>	: Sodyum bikarbonat
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	: Sodyum sülfat

NaCO <sub>3</sub>	: Sodyum karbonat
[(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O]	: Amonyum heptamolibdat tetrahidrat
[Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O]	: Sodyum arsenat dibazik-7- hidrat
PPy	: Polipirol
Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	: Bis(trifenilfosfin)palladyumklorür
P <sub>1</sub>	: Poli(4,7-di(tiyofen-2-il)benzo[c][1,2,5]tiyadiazol)
P <sub>2</sub>	: Poli(4,7-di(2,3-dihidro-tiyeno[3,4-b][1,4]dioksin-5-il)benzo[1,2,5]tiyadiazol)
P <sub>3</sub>	: Poli(4-(2,3-dihidrotiyeno[3,4-b][1,4]dioksin-5-il)-7-(tiyofen-2-il)benzo[c][1,2,5]tiyadiazol)
Pt	: Platin
SnBu <sub>4</sub> Cl	: Tetrabütülin klorür
THF	: Tetra hidrofuran
V	: Enzim aktivitesi
V	: Volt

## KISALTMALAR

ACN	: Asetonitril
CV	: Cyclic voltammetry (Dönüşümlü Voltametri)
DAD	: Donör- Akseptör- Donör
DCM	: Diklorometan
HOMO	: Highest occupied molecular orbital, En yüksek dolu moleküler orbital
ITO	: Indium tin oxide
IUB	: International Union Biochemists
IU	: International Unit
İB	: İletkenlik bandı
LUMO	: Lowest unoccupied molecular orbital, En düşük boş moleküler orbital
PTSA	: Paratoluen sülfonik asit
SDS	: Sodyum dodesilsülfat
TBAPF <sub>6</sub>	: Tetrabütülamonyum hekzaflorofosfat



UV : Ultraviyole  
VB : Valans bandı

## BÖLÜM 1

### GİRİŞ

Monomerler, birbirlerine kovalent bağlarla bağlanarak büyük moleküller oluşturabilen küçük mol kütleli kimyasal maddelerdir. Polimerler ise, çok sayıda monomerin kimyasal bağlarla birbirlerine bağlanarak oluşturduğu yüksek mol kütleli moleküllerdir. Ayrıca polimerler; ucuz, hafif, mekanik özellikleri yeterli, kolay şekillenebilen, dekoratif amaçlar için kullanıma uygun, kimyasal açıdan inert olan ve korozyona uğramayan maddelerdir [1].

Karbon tabanlı polimerler 40 yıl öncesine kadar sert yalıtkanlar, plastikler olarak dikkate alındığından elektrik iletkenliği için uygun değillerdi. Plastiklerden sadece yalıtkan materyaller olarak yararlanılmaktayken, bu bakış açısı zamanla değişti ve polimerin yeni bir sınıfı olarak iletken polimerler veya elektro aktif polimerler ortaya çıktı. Bu polimerler günümüzde elektronik sanayinde birçok özelliği sebebiyle yaygın olarak kullanılmaktadır [2].

İlk sentezlenen iletken polimer olan poliasetilen, Hideki Shirakawa'nın 1974'te Ziegler-Natta katalizörü  $Ti(O-n-But)_4$  ile metalik görünümlü fakat yeterli iletkenliğe sahip olmayan gümüş renkli trans poliasetilen film elde etmesine kadar siyah bir toz olarak bilinirdi [3]. 1977 yılında H. Shirakawa, A.J. Heeger ve A.G. MacDiarmid, bu poliasetilen filmleri iyot, klor veya flor buharına tutarak yükseltgeyip, iletkenliğin  $10^9$  kat arttığını ve  $10^5$  S/m düzeyine çıktığını göstermişlerdir. Bu değer en iyi yalıtkan materyallerden biri olan teflonun iletkenliği ( $10^{-18}$  S/cm)'den çok yüksektir ve metallerin iletkenlik değerine yakındır [4]. Shirakawa, Heeger ve MacDiarmid bu çalışmalarından dolayı 2000 yılında Kimya Nobel ödülünü almışlardır.

İletken polimerler, son yıllarda elektrokimyasal uygulama alanlarının genişliği nedeniyle oldukça ilgi çekmiştir. Piller, akıllı camlar, biyokimyasal sensörler, ışık

emiyon cihazları (LED), elektrokromik cihazlar, koruyucu güç kabloları, fotovoltaiik çalışmalar gibi alanlarda kullanılmaktadır [5,6].

Biyosensörler (biyoalgılayıcılar), bünyesinde biyolojik bir algılayıcı bulunan ve bir fizikokimyasal çevirici ile birleştirilmiş analitik cihazlardır. Bir biyosensörün amacı, bir veya bir grup analitin (analiz edilecek madde) miktarı ile orantılı olarak sürekli sayısal elektrik sinyali üretmektir. Enzimler, mikroorganizmalar, organeller, doku kesitleri, antikorlar, nükleik asitler ve biyolojik membranlar içine yerleşmiş kimyasal reseptörler biyoalgılayıcı (biyokomponent-biyoreseptör) olarak kullanılırlar. Biyosensörlerde biyoaktif tabakada biyomolekül olarak enzim kullanılmasıyla enzim sensörleri elde edilmektedir. Yüksek spesifitelerinden dolayı enzimler en yaygın kullanılan biyoalgılayıcılarıdır.

Elektropolimerizasyon, çeşitli destek elektrolitlerin ve monomerlerin kullanımıyla yeni özelliklerin kolayca elde edilebilirliği ve yük geçiş miktarının ayarlanması açısından önemli bir yöntemdir. Ayrıca bu yöntem polimerleştirme aşamasında enzimin polimere kolayca tutuklanması sayesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemle immobilizasyon yapılırken, enzimin polimerleştirme sırasında enzimin herhangi bir şekil ve boyut değişimine uğramadan direk olarak elektrot yüzeyine kaplanmasıyla enzim sensörü elde edilir. Elektropolimerizasyonla film kalınlığı kontrol edilebilir ve homojen filmler elde edilebilir [7,8].

Bu çalışmada donör grubu olarak 3,4-etilendioksitiyofen (EDOT) ve tiyofen (Th), akseptör grubu olarak benzotiyadiazol grubu içeren Donör-Akseptör-Donör (DAD) tipi iletken polimerlere invertaz immobilizasyonu gerçekleştirildi. Polimerler,  $M_1$  (Th-benzotiyadiazol-Th),  $M_2$  (EDOT-benzotiyadiazol-EDOT) ve  $M_3$  (Th-benzotiyadiazol-EDOT) monomerlerinin homopolimeri ( $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$ ) ayrıca  $M_1$  ve  $M_2$  monomerlerinin kopolimeri potansiyodinamik yöntemle hazırlandı. İvertaz, DAD tipi polimer ve polipirol den oluşan iki tabaka arasına immobilize edildi. İmmobilize invertazın karakterizasyonu spektrofotometrik metotla 540 nm'de yapıldı. Kinetik parametreler;  $V_{max}$ , maksimum reaksiyon hızı ve  $K_m$ , Michaelis-Menten sabiti belirlendi. Enzim elektrotlarının raf ömürleri ve çalışma kararlılıkları tayin edildi.

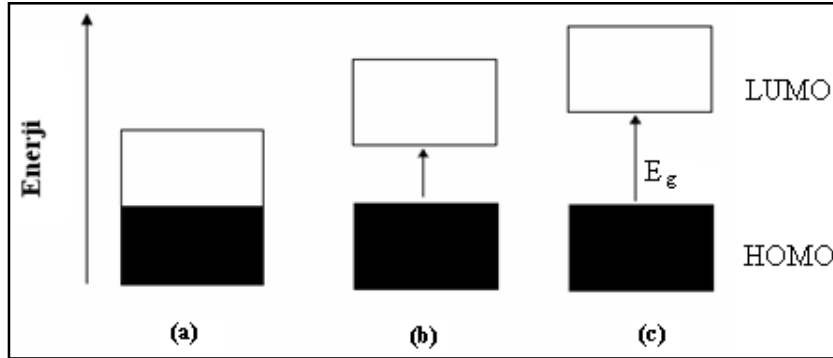
## 1.1. İLETKEN POLİMERLER

İletken polimerler metallerin elektriksel, elektronik, magnetik ve optik özelliklerini gösteren organik maddelerdir ve belli ölçüde mekanik özellik gösterirler. Bu özellikler, polimerlerin doplanma şekline göre değişir. Bu organik maddeler genel olarak H ve heteroatom olan N ve S atomlarından oluşur. İletken polimerlerin genel özelliği polimer zincirlerinde tek ve çift bağların art arda dizilmesiyle  $\pi$ -konjugasyonuna sahip olmalarıdır. Bu konjuge yapıların rezonansı sayesinde, polimerde ana zincir boyunca yükün delokalizasyonu ve hareketliliği sağlanır, bu sayede elektronik iletken polimerler hazırlanır.

### 1.1.1. Band Teorisi

Polimerlerde elektronik iletkenlik band teorisi ile açıklanır. Kuantum mekanizması, bir atomun elektronlarının ancak belli enerji düzeylerinde olabileceğini öngörür. Ancak kristal kafesin içindeki atomların elektronik seviyeleri değişebilir. Atomlar birbirlerine yaklaştıkları zaman enerji seviyeleri bandlar oluşturur. Band teorisinde maddeler; iletken, yarı iletken ve yalıtkan olarak tanımlanır.

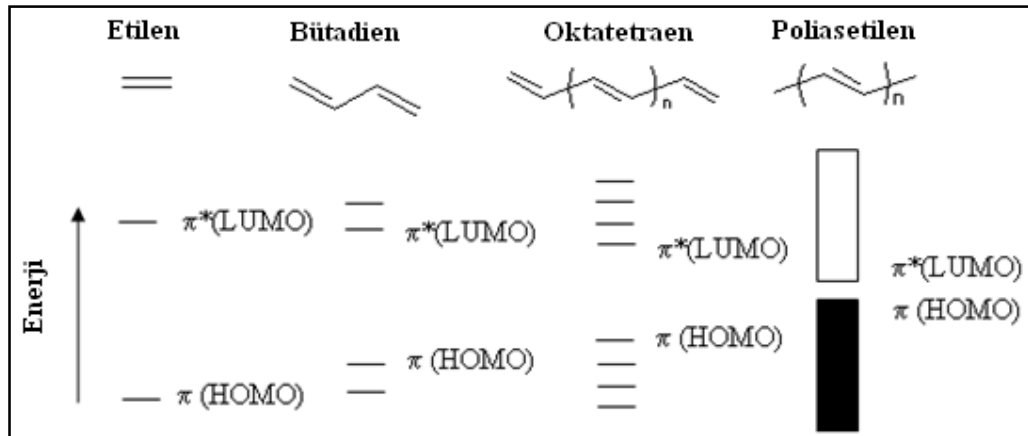
Metallerde band aralığı yoktur (Şekil 1.1.a)). Dolayısıyla iletkenlik bandına geçme eğilimindeki elektronlar için herhangi bir engel yoktur. Yarı İletkenler metallerle yalıtkanlar arası bir iletkenliğe sahiptir, iletken polimerlerde bu gruba girer.



Şekil 1.1. Band yapıları a) iletken, b) yarı iletken ve c) yalıtkanlar için.

Polikonjuge polimerler normal hallerinde yalıtıcıdır ve yükseltgen veya indirgen madde ile muamele edilerek tuzları hazırlandığında, metallere yarışacak düzeyde iletken hale geçerler. Yalıtıcı maddeler ise çok geniş band aralığına sahip oldukları için elektronlar iletkenlik bandına geçemezler [9].

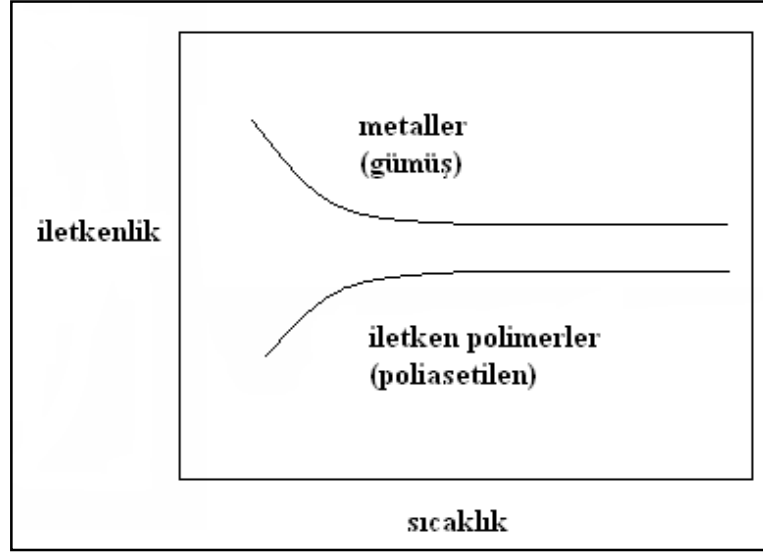
En yüksek dolu enerji bandı, değerlik (valans) bandı (HOMO) olarak, en düşük boş enerji bandı ise iletkenlik bandı olarak adlandırılır (LUMO) (Şekil 1.2). Değerlik bandı ve iletkenlik bandı arasındaki enerji aralığı (band eşik enerjisi) ( $E_g$ ) maddenin iletkenlik, yarı iletkenlik veya yalıtıcılık özelliğini belirleyen parametrelerdir. Yük taşıyıcıları, değerlik bandının (Fermi enerji seviyesi) en yakınındaki boş enerji seviyesine taşınarak iletkenliğe katkıda bulunurlar. Eğer bir maddede enerji bandlarının biri elektronlarla tamamen dolu ise ve kendisinden sonra gelen boş enerji bandı ile arasındaki enerji farkı büyük ise elektronlar iletkenlik bandına geçebilmek için yeterli enerjiye sahip değildir ve bu nedenle madde yalıtıcıdır.



Şekil 1.2. Bazı konjuge polimer sistemlerde bandların oluşumu.

Yarı iletkenlerde band eşik enerjisi yalıtıcılardan daha küçük olduğundan voltaj, ısı, ışık, magnetik etki ya da elektriksel gerilim gibi dış etkiler uygulandığında değerlik bandındaki elektronların bir kısmı serbest hale geçerek iletkenleşirler ve iletkenlik bandına geçerler. Uygulanan bu dış etki ya da etkiler ortadan kaldırıldığında ise yarı iletkenler, yalıtıcı hale geri dönerler. Bu özellik yarı iletkenlerin elektronikte yoğun olarak kullanılmalarını sağlamıştır [10].

Sıcaklığın arttırılmasıyla metallerin iletkenliği azalır, iletken polimerlerin iletkenliği ise artar (Şekil 1.3). Bazı metaller yeterince düşük sıcaklıklarda süper iletken davranıŖa geçerler [1].



Şekil 1.3. Sıcaklığın, iletken polimer ve metallerin iletkenlikleri üzerine etkisi [1].

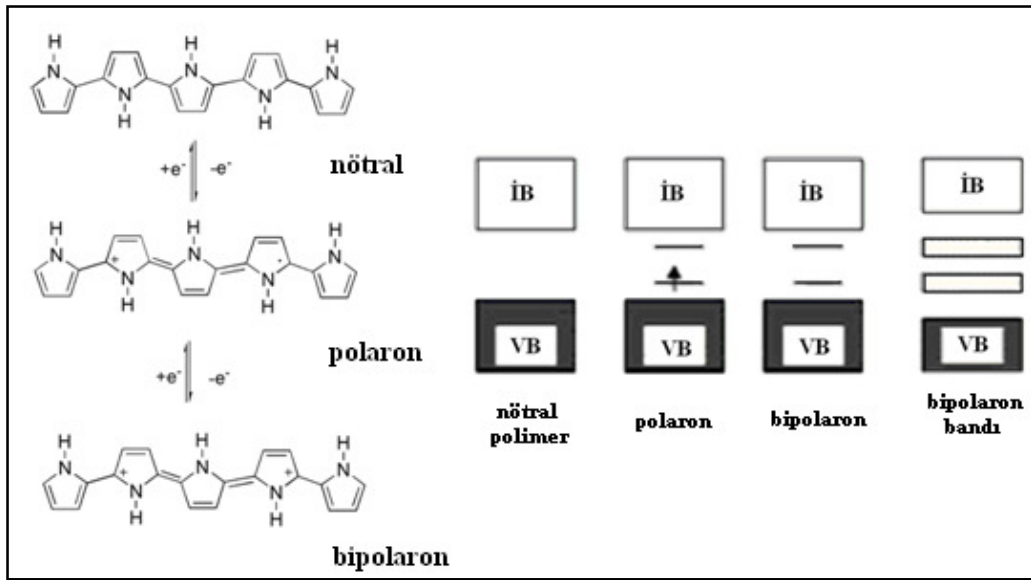
Konjugasyon, iletkenlik için polimerlerde tek başına yeterli değildir. Bu yüzden, konjuge polimerlerde doplama işlemiyle değerlik ve iletkenlik tabakalarının tam dolu ya da tam boş olmaması sağlanarak iletkenlik artırılabilir [11]. Polimere iletkenliği sağlayacak olan elektronların verilmesi veya polimerden elektronların uzaklaştırılması olarak 'doplama' denir [12]. Doplama amacıyla kullanılan kimyasal maddelere ise 'dopant' denir. Polimer sentezinde kullanılan dopant türü polimerin iletkenliğine büyük ölçüde etki eder [1].

İletken polimerlerde yük taşınması, polimer zinciri boyunca yük hareketi ve komşu zincire yük atılması (hopping) olmak üzere iki ana mekanizma üzerinden ilerler [13].

Doplama (polimer zinciri boyunca yük hareketi) işlemiyle iletkenlik şu şekilde sağlanır. Polimerde değerlik bandındaki elektronlar ya yükseltgen bir reaktifle koparılır ve pozitif yüklenir veya indirgen bir reaktif ile boş iletkenlik bandına bir elektron verilir. Eğer yükseltgeme işlemiyle gerçekleşiyorsa p- tipi doplama, indirgeme işlemiyle gerçekleşiyorsa n- tipi doplama olarak isimlendirilir. Doplama

ile yük taşıyıcılarının sayısı artırılır. Doping süresince dopant moleküller, polimer atomlarıyla yer değiştirmez, dopantlar yalnızca elektronların enerji kabuklarından geçişine yardımcı olurlar [10].

İletken polimerlerin iletkenliğini açıklamada band teorisi yeterli olmadığından, bu konuda polaron, bipolaron ve solitonlardan yararlanılır. Polimerin iskelet yapısına doplama yapmak üzere verilen elektrik yükü, polimerin elektronik durumunda bir değişime neden olur.



Şekil 1.4. PPy'nin polaron ve bipolaron yapıları ve band diyagramı.

Konjuge bağlara sahip polimerin yükseltgenmesiyle çift bağ parçalanır ve polimer zinciri üzerinde pozitif yüklü bir radikal oluşur. İletken polimer zinciri üzerinde oluşan bu yük taşıyıcılara 'polaron' ya da 'radikal katyon' denir. Polarondan gelen iki radikalın birleşmesi yeni bir  $\pi$  bağı oluşturur.

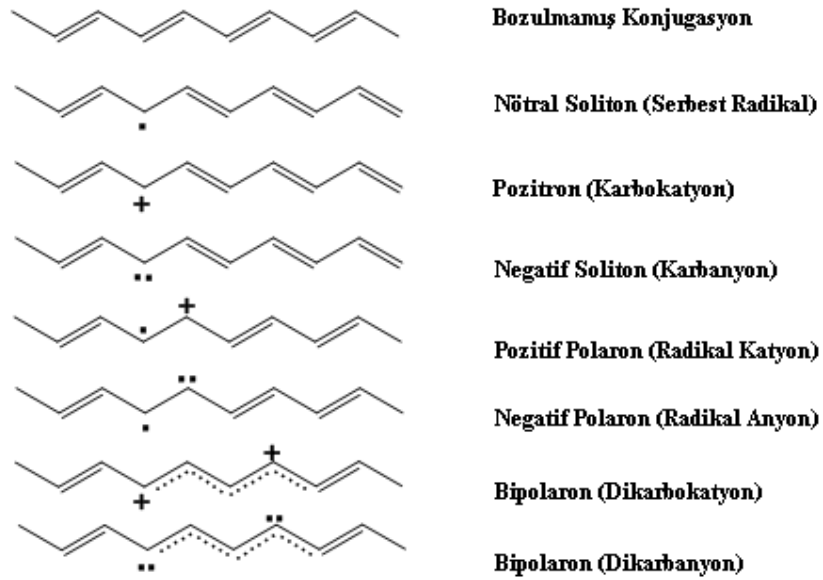
Polaronun serbest radikalinin yükseltgenmesiyle ise 'bipolaron' adında yeni bir spinsiz boşluk oluşur. Burada iki radikal birleşip yeni bir  $\pi$  bağı meydana getirir. Bipolaronda çiftleşmemiş elektron yoktur ve bu sayede serbest elektronlara gerek kalmadan iletkenlik sağlanır (Şekil 1.4) [10].

Polaronlar ve bipolaronlar karşı iyonların hareket yeteneğine göre zincir boyunca hareket edebilirler. İyonların yeterince hareketli olabilmeleri için yeterli miktarda karşı iyon, doplanma ile sağlanmalıdır.

Çizelge 1.1.Soliton, polaron ve bipolaronların özellikleri [14].

Yapı	Spin	Yük
Soliton	nötral 1/2	0
Soliton	yüklü 0	+e veya -e
Polaron	yüklü 1/2	+e veya -e
Bipolaron	yüklü 0	+2e veya -2e

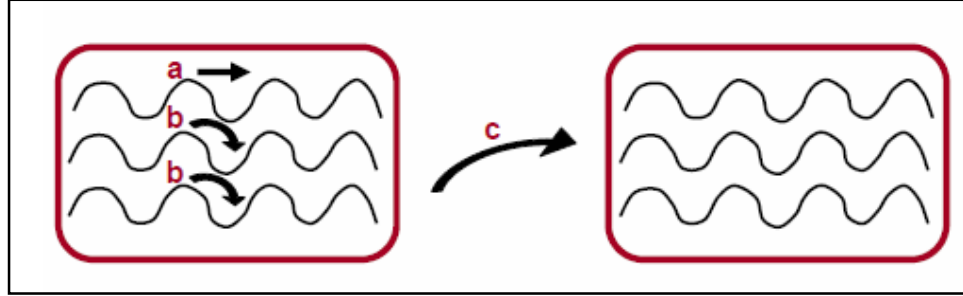
Poliasetilenin kontrollü şekilde doplanmasıyla bir elektron koparılır ve nötral ya da yüklü bir 'soliton' elde edilir. Yapılar içinde oluşturulan soliton, polimer zinciri üzerindeki yük dağılımını karbenyum (karbokatyonu) kararlı kılar. Benzer şekilde, bir elektron vericiyle veya n-doplama maddesi ile polimer muamele edilirse, orta seviyedeki enerji boşluklarına bir elektron ilave edilerek negatif bir soliton oluşturulur (Şekil 1.5).



Şekil1.5. Poliasetilenin soliton, polaron ve bipolaron yapıları.



Zincir üzerinde ki bu yük taşıyıcılarının yanında, farklı polimer zincirleri arasındaki 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 1.6) [14].



Şekil 1.6. Yükün taşınması, a) zincir üzerinde yükün taşınması, b) zincirler arasında yükün taşınması, c) parçacıklar arasında yükün taşınması.

### 1.1.2. İletken Polimerlerin Uygulama Alanları

İletken polimerler üzerine yapılan çalışmalar, son yıllarda oldukça gelişmiştir. İletken polimerler yalıtkan polimerlerle birlikte kullanılarak teknolojiye birçok uygulama alanı bulmuştur. Bunlardan bazıları şunlardır;

Şarj olabilen pil yapımlarında: İletken polimerler tersinir doplama özelliklerinden dolayı şarj olabilen pillerde elektrot olarak kullanılmaktadır.

pH sensörlerinde: Bazı iletken polimerlerin çözeltilerinin iletkenliğine pH etkisi, üç elektrotlu bir sistemde incelenmiş ve bu sistemin bir pH sensörü olarak kullanılabileceği gösterilmiştir.

Gaz sensörlerinde: Gazlar kuvvetli indirgen ve yükseltgen özellik gösterebildikleri için, polimer filmlerin iletkenliklerini etkiler. İletken polimerlerin bu özellikleri kullanılarak çeşitli gaz sensörleri yapılmıştır.

Biyosensörlerde: İletken polimerlerin kullanıldığı sensörlerin birçoğu hem kimyasal hem de biyolojik amaçlıdır. Biyolojik sensörler, analitik, biyokimya ve mikro elektronik bilim dallarının birbiriyle uyumlu kullanılması ile oluşturulan cihazlardır. Bu cihazlar, bulanık biyolojik akışkanlar için kullanışlı olup, basit bir görünüşe sahiptir. Genel olarak bir biyosensör, uygun bir enerji iletim cihazı ile yakın temasta olan biyolojik bir bileşenin kullanılması ile oluşur. Analiz çözeltisi ve biyolojik bileşenin biyokimyasal reaksiyonuyla oluşan sinyaller, dedektörde elektrik sinyaline çevrilerek okunur [15].

Elektronik aletlerde: İletken polimerler kullanılarak, diyot, transistör gibi elektronik alet ve cihazlar da yapılmıştır. Bu cihazlarda, polimerin indirgenme ve yükseltgenmesine bağlı olan kimyasal sinyaller, elektrik sinyaline çevrilerek okunabilmektedir.

Fotoelektrokimyasal hücrelerde: Son yıllarda, güneş enerjisinin fotoelektrokimyasal hücreler tarafından kimyasal ya da elektrik enerjisine dönüştürülmesi ilgi çekici uygulama alanlarından birisi olmuştur.

Elektrokromik aletlerde: Elektrokromik cihazlar, şarj ve deşarjın elektrokimyasal işlemi esnasında tersinir renk değiştiren materyaller olarak adlandırılırlar. PAN (polianilin) filmlerinin yükseltgenmiş yapıları renklidir ve iletkenliği yüksektir. Buna karşılık indirgenmiş yapıları optikçe saydamdır ve düşük iletkenlik gösterirler.

İyon seçici elektrot yapımlarında: İletken polimerlerin, elektrokimyasal yöntemle çeşitli yöntemle çeşitli elektrotlar üzerinde sentezlenmelerinin yanında, inert elektrotlar üzerinde film halinde kaplanarak çeşitli organik, inorganik ve biyolojik molekül ve iyonlara karşı seçimli geçirgen olmaları, çok sayıda modifiye elektrot yapımlarına imkân vermiştir.

Korozyon inhibitörü olarak: Korozyon elektrokimyasal bir olaydır ve elektrik akımının etkisiyle olur. İç yüzeylerde akım olmadığında uygun çevre sağlanarak korozyon azaltılabilir [14].

### 1.1.3. İletken Polimerlerin Elektrokimyası

Elektrokimyasal polimerizasyon, bir elektrot yüzeyinde gerçekleşen reaksiyonlar sonucu oluşan ürünlerin başlattığı polimerizasyon olarak tanımlanabilir ve bu yöntemle elektrot zincir büyümesini katalitik olarak başlatır.

Elektrokimyasal polimerizasyonda monomer, uygun bir çözücü ve destek elektrolit ile birlikte elektroliz hücresine konularak elektroliz edildiğinde elektrot yüzeyinde veya çözeltide polimer oluşur. Elektroliz hücreleri genellikle çalışma, karşı ve referans elektrottan oluşur [7].

Elektrokimyasal doplama işleminde, monomer SDS, PTSA gibi bir elektrolit çözeltisine bir karşı elektrotla yerleştirilir. Oksidatif elektropolimerizasyonla doplama için sisteme pozitif potansiyel uygulanır. Okside polimerde anyon kısım polimer içindeki pozitif yüklü kısma nüfuz ederek yük dengesini devam ettirir. Bu sırada polimer elektrot yüzeyine kaplanır.

Redüktif elektropolimerizasyon, oksidatif elektropolimerizasyona benzer şekilde, monomer çözeltisine negatif potansiyel uygulayarak gerçekleştirilir. Polimer üzerindeki negatif yüklü noktalara elektrolitin katyonu yerleşir. Polimerde oluşan anyonların taşınmasıyla da iletkenlik oluşur.

İletken polimerlerin elektrokimyasal polimerizasyonunun avantajları [16,17]:

- Reaksiyon oda sıcaklığında gerçekleşebilir,
- Film kalınlığı, potansiyel veya akım değiştirilerek kontrol edilebilir,
- Polimer filmler direk elektrot yüzeyinde oluşturulabilir,
- Homojen filmler üretmek mümkündür,
- Polimerin doplanması ortama eklenen karşı iyonla kendiliğinden başarılıdır,
- Kopolimer yapmak mümkündür,
- Molekül ağırlığı dağılımı kontrol edilebilir,
- Metod tekrarlanabilir ve basittir,

- Kısa sürede fazla miktarda polimer sentezlenebilir,
- Farklı destek elektrolitler kullanılarak özellikleri farklı polimerler sentezlenebilir.

### **1.1.3.1. Elektrolitik Koşullar**

Elektropolimerizasyonun verimi, çözücü, elektrolit, elektrodun yapısı, monomer konsantrasyonu gibi etkenlere bağlıdır.

Elektrokimyasal reaksiyonlar için kullanılan çözücülerin nükleofilik karakteri düşük olmalıdır. Eğer çözücünün nükleofilik karakteri artarsa film oluşumu azalır. Çözücü, iyonik iletkenlik ve geniş potansiyel aralığında kararlı olabilmek için yüksek dielektrik sabitine sahip olmalıdır.

Kullanılan elektrot sentez sırasında oluşan polimerin özelliklerine ve polimerizasyon sürecine etki eder. Polimerler genellikle inert iletkenler olan platin, altın gibi maddelere veya ITO gibi optik olarak transparan olan elektrotlara kaplanır.

Elektrolitin seçiminde en önemli kriterler, çözünebilirliği, ayrışma derecesi ve nükleofilitesidir. Kullanılan elektrolitin yapısı oluşan filmin yapısına önemli şekilde etki eder. Destek elektrolit iyonları elektrokimyasal polimerizasyonda monomer birimleriyle etkileşir ve bu sayede polimer doplanır. Elektrolit olarak genellikle perklorat, tetrafloroborat ve hekzaflorofosfat anyonlarıyla, lityum ve tetraalkil amonyum tuzları kullanılmaktadır.

Elektropolimerizasyon sırasında uygulanan potansiyel aşırı olmamalıdır. Yüksek potansiyel polimer omurgası üzerinde konjugasyonun bozulmasına ve iletkenliğin düşmesine neden olur.

Sıcaklık, filmin mekanik özelliklerinin yanı sıra polimerizasyon kinetiğini ve iletkenliği de etkiler. Genel olarak, polipirolün yüksek sıcaklığa maruz kalmasıyla moleküler yapısında değişimler görülür. Bu değişimler, polimerin sentez sırasında karşı iyonla etkileşimini zorlaştırır [18].

### **1.1.3.2. Polimerlerin Elektrokimyasal Polimerizasyon Mekanizması**

Pirol, tiyofen, anilin, furan gibi rezonans kararlılığındaki aromatik moleküllerin elektrokimyasal yükseltgenmesiyle elektronik iletken polimerler elde edilir. Elektropolimerizasyon, çözücü-elektrolit ortamına uygun bir monomer koyularak ve ortama potansiyel uygulayarak gerçekleştirilir. Nötral polimer ile radikal katyonun reaksiyonu veya radikal katyon/radikal katyon reaksiyonuyla polimerizasyon meydana gelir [19]. Şekil 1.7’de anotta gerçekleşmiş olan, heterosiklik bileşiklerin polimerleşme mekanizması verilmiştir.

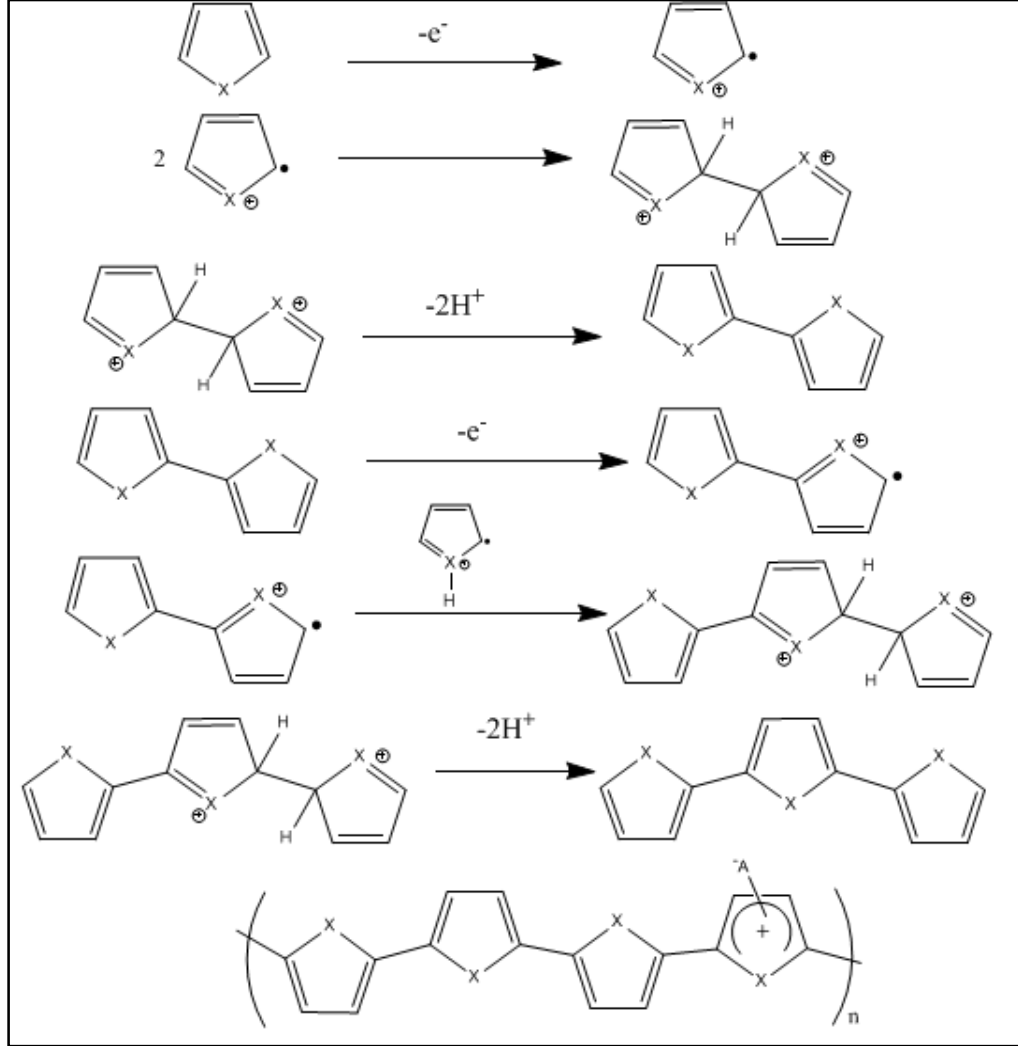
Elektrot üzerinde monomerin uygun bir potansiyel ile yükseltgenip bir radikal katyon oluşturmasıyla elektrokimyasal aşama (E) başlar. Elektron transfer reaksiyonu, monomerin difüzyonundan daha hızlıdır ve elektrot yüzeyi çevresindeki çözelti yüksek radikal konsantrasyonuna sahiptir. Bu ilk aşamayı iki radikal katyonun birbirine bağlanmasıyla gerçekleşen bağlanma reaksiyonu (coupling) takip eder. Radikal-radikal bağlanma durumunda, dihidro dimer katyon, bir dimer üzerinden iki hidrojenin ayrılmasıyla meydana gelir [16]. Bu antiaromatik durum kimyasal aşamayı (C) 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 katyonuyla bağlanma reaksiyonuna girerler ve protonlarını kaybedip antiaromatik olurlar. Elektrokimyasal ve kimyasal aşamalar ardı ardına bu şekilde devam eder ve bu reaksiyonlar ECE (E: elektrokimyasal, C: kimyasal) mekanizması olarak adlandırılır. Oligomerler elektrolit çözeltisi içinde çözünmeden kalana kadar bu reaksiyon elektrot yüzeyinde devam eder (Şekil 1.7).

### **1.1.4. Elektrokimyasal Polimerizasyon Teknikleri**

İletken polimer sentezinde, film kalınlığının ve morfolojisinin kontrollü olması ve homojen polimerlerin oluşması sebebiyle elektrokimyasal yöntem kimyasal yöntem

tercih edilir. Elektrokimyasal polimerizasyonda elektroliz ve dönüşümlü voltametri (CV) teknikleri kullanılabilir.



Şekil 1.7. Heterosikliklerin elektropolimerizasyon mekanizması (X= N-H, S, O).

#### 1.1.4.1. Elektroliz

Sabit Akım Elektrolizi (Galvanostatik): Sabit akım elektrolizinde, bir zaman periyodu için anot ve katot arasında belirli büyüklükte akım geçer. Filmin kalınlığı polimerizasyon sırasında kolayca kontrol edilebilir. Eğer potansiyelin izlenmesi arzu edilmezse, çalışma ve karşı elektrot yeterlidir. Hücre bir ya da iki bölmeli hücreden oluşabilir. İki bölmeli hücreler delikli bir diyagram tarafından ayrılır. Bunun amacı

elektroliz ürünlerinin karışmasını önlemektir. Basit bir metottur, fakat çözücü, elektrolit ve monomer sistemlerinin istenmeyen indirgenme ve yükseltgenme değerlerine ulaşması sonucu, istenmeyen ürünler meydana gelebilir.

Sabit Potansiyel Elektrolizi (Potansiyostatik): Sabit potansiyel elektrolizinde, potansiyel sabit tutulurken akımın değişimine izin verilir. Bu yöntem sabit potansiyel altında gerçekleştiği için istenmeyen radikal veya iyonların oluşumu engellenir. Sabit potansiyel elektrolizinde, üç elektrotlu elektroliz hücresi kullanılır.

Üç elektrotlu sistem, çalışma, karşı ve referans elektrottan meydana gelir. Çalışma elektrodu, elektroaktif maddenin elektrokimyasal dönüşümünün gerçekleştiği elektrottur. Karşı elektrot devreyi tamamlar. Çalışma elektrodu ve referans elektrot arasındaki potansiyel, potansiyostat tarafından istenilen değere ayarlanır. Uygun referans elektrot kullanılarak çalışma elektrodunda istenilen potansiyel sabit tutulur. Elektroliz hücresindeki referans elektrottan geçen aşırı akıma engel olmak için sabit potansiyel elektrolizinde üçlü elektrot sistemi kullanılır.

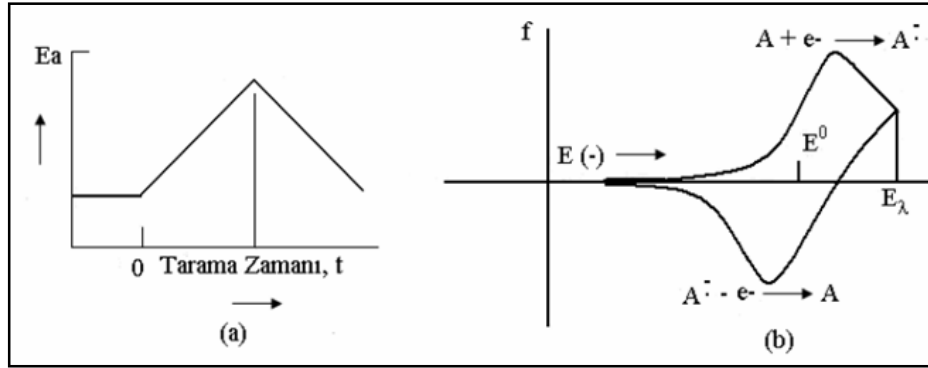
#### **1.1.4.2. Dönüşümlü Voltametri (CV)**

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 [20].

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 (Şekil 1.8) [18].

Çalışma elektroduna uygulanan potansiyel elektroliz hücresi içinde bulunan elektroaktif 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, çözültiden elektrot yüzeyine kütle aktarımına neden olur. Kütle aktarım hızı, elektronların aktarım hızından düşük olduğundan akımda düşüş gözlenir ve bir pik elde edilir. Oluşan bu pikin tepe noktasına karşılık gelen potansiyele ‘yükseltgeme veya indirgeme pik potansiyeli’ denir [21].



Şekil 1.8. Dönüşümlü voltametri potansiyel taraması ve akım potansiyel eğrisi: a) dönüşümlü potansiyel taraması, b) tarama sonucunda elde edilen voltamogram.

Dönüşümlü voltametri yönteminde çalışırken, maddenin elektrot yüzeyinde kaplama yapmaması için tarama yapılırken her işlem sonunda elektrot temizlenmelidir. Çalışma ve karşı elektrot olarak; platin (Pt), altın (Au), grafit, referans elektrot olarak; Ag, AgCl(s), Hg, Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(s), Hg(SO<sub>4</sub>)(s) kullanılabilir. Ayrıca, destek elektrolit olarak kullanılacak anyonların yükseltgenme potansiyeli, monomerin yükseltgenme potansiyelinden yüksek olmalıdır. Anyonun yükseltgenme potansiyeli monomerden düşük ya da monomere eşit olduğu takdirde destek elektrolit anyonları reaksiyona katılır ve bu yüzden reaksiyon istenmeyen yönde ilerleyebilir [21].

### 1.1.5. Donör-Akseptör-Donör Teori

Düşük enerji aralığı (band gap) olan polimerler, indirgendiğinde renklenebilen polimerlerdir ve okside hallerindeki yüksek geçirgenlik sayesinde elektrokromik uygulamalarda tercih edilirler. Düşük band gap'li polimer elde etmenin yollarından biri de donör-akseptör-donör (DAD) yaklaşımıdır. Polimerlerin bu tipi, donör ve



akseptör arasında konjuge yapıya olanak sağlar ve oluşan rezonansla düşük band gap'li polimerler elde edilir. Ayrıca düşük band gap, iletken polimerlerin nötral iletkenliğini artırdığından bu polimerler için oldukça önemlidir [22].

Donör-akseptör (DA) yapılarıdaki temel düşünce, polimerin HOMO/LUMO enerji seviyelerine heterosiklik grupların yardımındadır. DA uygulamalarında, düşük yükseltgeme potansiyelinden dolayı, donör grubun en yüksek dolu moleküler orbitali (HOMO) ile akseptör grubun en düşük boş moleküler orbitali (LUMO)'nin etkileşimi söz konusudur. Doplama prosesinde, polimer zincirinde elektronca zengin (donör) ve elektronca fakir (akseptör) gruplarının etkileşimiyle band gap düşürülür [23]. Polimerde, akseptör birimlerine yakın elektron ilgisi ve donör birimlerine yakın iyonlaşma potansiyeli beklenir. Donör ve akseptör parçaları arasındaki etkileşim fazlaysa, elde edilen polimerin band gap'i düşüktür ve ayrıca farklı polimerlerin HOMO/LUMO enerji seviyeleri de farklıdır [24].

Akseptör grubu olarak benzotiyadiazol, benzokinoksalin, siyanovinil, tienopirazin, benzotriazol, benzoselenadiazol gibi gruplar kullanılmaktadır. Bu moleküllerin izoelektronik yapılarındaki 2-pozisyonuna N, C, S, Se gibi farklı atomların gelmesiyle optik ve elektrokimyasal özelliklerinde kısmen değişimler gözlenir. Donör grubu olarak ise tiyofen, EDOT (3,4- etilendioksitiyofen), pirol gibi elektron yoğunluğu yüksek gruplar kullanılmaktadır [22,24].

Donör-akseptör konjuge polimerler, ışık emisyon cihazları (LED) [25], lazerler, elektrokromik cihazlar (ECD) [6,23], güneş pili (Solar Cell) [26] ve diğer uygulamalar için bipolar (çift kutuplu) yük taşıyıcı maddeler olduğu için ve fotovoltaj cihazlar [27,28] için ise ışınla uyarılarak yük transferi ve ayrılmasını sağlayan maddeler olduğu için tercih edilirler. Biyosensörlerde ise matris olarak kullanılan iletken polimerin DAD tipi iletken polimer olmasıyla elektron transfer hızı, dolayısıyla iletkenliği artırılmış ve sinyal süresi kısa daha hassas biyosensörler elde edilmiş olur.

## 1.2. ENZİMLER

Enzimler, canlı hücreler tarafından sentezlenen, ileri derecede organize olmuş protein yapılı biyolojik katalizörlerdir. Tepkimede tüketilmezler ve tepkime sonunda kendisinde net bir değişiklik olmaksızın yeniden elde edilirler. Bu sayede enzimler tekrar tekrar kullanılabilirler [29-31].

Enzim alanında yapılan ilk çalışmalar sindirim enzimi ile ilgilidir. 1825 yılında Jön Jacob Berzelius, buğdaygillerden elde edilen enzim karışımını, nişastayı parçalamada kullanmıştır. Sonuçta, sülfürik asite göre daha hızlı bir parçalama gerçekleştiği gözlenmiştir [32].

Enzimler binlerce yıldır bilinçsizce de olsa insanlar tarafından peynir, bira ve ekmek yapımında kullanılmış olup, günümüzde de endüstriyel ve medikal amaçlar için oldukça yaygın kullanıma sahiptir. Ülkemizde enzimlerin kullanım alanları şu şekilde sıralanabilir.

Bilimsel araştırmalarda: Enzimler; hidroliz, sentez, analiz, biyodönüşüm, afinite ayırımında araştırma aracı olarak,

Kozmetik uygulamalarda: Cilt için koruyucularda ve takma diş temizliğinde,

Tıbbi tanılarda ve kimyasal analizlerde: Kan şekeri, üre, kolesterol testlerinde; Eliza sistemlerinde ve enzim elektrotlarında,

Endüstriyel uygulamalarda: Maya ve şarap yapımında; süt işletmelerinde; meyve ve sebze suyu üretiminde; deri sanayinde; küspe ve kağıt imalatında; şeker ve tatlı imalatında; fruktoz üretiminde; deterjan ve temizleyici maddelerde; aminoasit sentezinde; atık su işlemede; pamuktan haşıl sökmede kullanılmaktadırlar.

### 1.2.1. Enzimlerin Yapısı

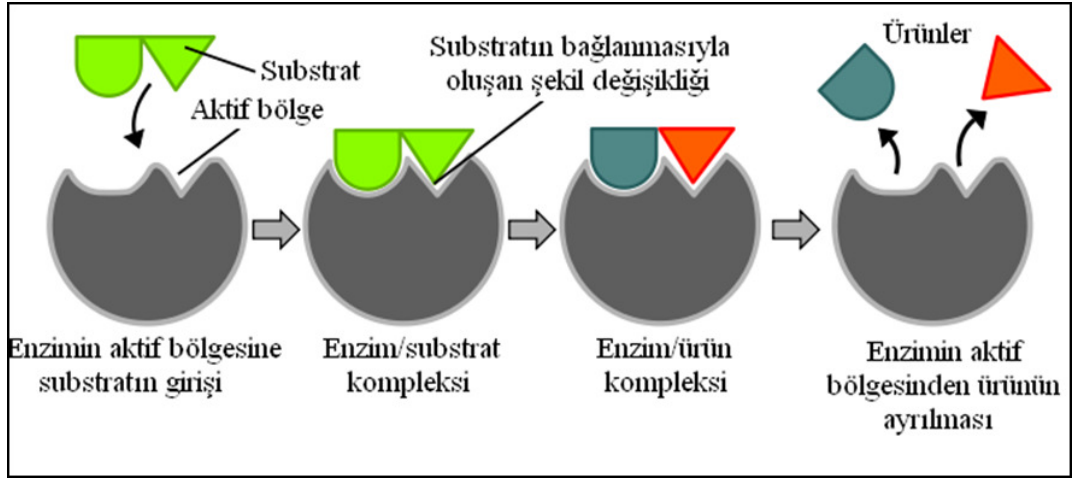
Enzimler protein yapılı maddelerdir ve her enzimde proteini oluşturan aminoasitlerin sayısı, dizilişi ve moleküllerin konformasyonu belirli bir düzen içindedir. Bu düzen sayesinde enzimler, tepkimeleri özgül olarak katalizler. Yani katalizör maddeler, pek çok kimyasal tepkimede rol oynayabilirken enzimler genellikle tek bir tepkimeyi katalizler.

Enzimlerde ısıya dayanıksız protein kısma ‘apoenzim’ adı verilir. Enzim bu durumda inaktif haldedir. Bazı enzimler yalnızca protein yapısıyla aktivite sağlarken, bazı enzimlerin aktif hale geçebilmeleri için protein yapıda olmayan bir aktivatöre ihtiyacı vardır. Apoenzimi aktive eden ve protein yapıda olmayan bu yapılar ‘prostetik grup’ denir. Prostetik grup bir metal iyonu ise ‘kofaktör’ , ısıya dayanıklı organik bir bileşik ise ‘koenzim’ olarak adlandırılır. Oluşan apoenzim-kofaktör bütününe ‘haloenzim’ denir. Apoenzim, enzimin hangi substrata etki edeceğini belirler. Kofaktör ve koenzim ise enzimi aktive eder. Bu prostetik grupların gerekliliği, enzimin verimliliği ve sürekli proseslerde kullanımı için oldukça önemlidir. Klinik vakaların büyük bir kısmı enzimlerin işlevini gerçekleştirmemesinden veya koenzimlerin yetersiz ya da işlevsiz oluşundan kaynaklanmaktadır. Örnek olarak A vitamini görme tepkimelerini katalizleyen enzimin parçası olduğundan, yokluğunda ya da eksikliğinde gece körlüğü ortaya çıkar [29,32,33].

Enzim ile substratın spesifik ilişkisi ilk kez 1894 yılında Emil Fischer tarafından önerildi. Enzim substrat ilişkisi, anahtar-kilit uyumuna benzetildi (Şekil 1.9). Enzimle substrat arasındaki bu stereospesifik uyumun sonucunda, her bir enzim substratın belirli bir miktarına etki eder. Ancak bu teori spesifikliğı açıklasa da, geçiş durumunun kararlılığını açıklamada yetersiz kalmıştır. 1959 yılında Koshland, indüklenmiş uyum modeliyle anahtar-kilit teorisine katkıda bulunmuştur. Bu teori, enzimin aktif alanının sert, katı (rigid) bir yapıda olduğunu reddeder. Enzim, substrata bağlandığında bir uyum elde etmek için bazı yapısal değişiklikler gösterir. Buda enzimin aktif alanının esnek bir yapıda olduğunu kanıtlar [34].

Günümüzde enzimler, 'International Union of Biochemists (IUB)' tarafından altı ana fonksiyonel sınıfa ayrılmıştır. Bu sınıflandırmaya göre enzimler, sırasıyla tepkime türü, spesifik tepkime, substrat veya substratları niteleyen dört basamaklı bir numara ile tanımlanır [33].

- Oksidoredüktazlar
- Transferazlar
- Hidrolazlar
- Liyazlar
- İzomerazlar
- Ligazlar



Şekil 1.9. Enzimlerin anahtar-kilit modeli.

### 1.2.2. Enzimlerin Katalitik Özellikleri

Enzimler, inorganik katalizörlerle karşılaştırıldıklarında, enzim molekülünün belirli bir bölgesinde belirli aminoasitlerin oluşturduğu bir kısım bulunur. Enzimin katalitik aktiviteden sorumlu olan bu kısmına 'aktif bölge' denir [33].

Enzimler, hücrede bulunan substratı değişikliğe uğratarak ürüne dönüştürürler. Dolayısıyla ortamda substrat konsantrasyonu azalması ya da ürün konsantrasyonunun artması enzimin aktivitesini gösterir. Enzimlerin katalitik aktiviteleri, katalizledikleri tepkimenin hızı saptanarak belirlenir ve enzim aktivitesi

enzim birimi olarak ifade edilir. Enzim birimi International Unit (IU) olarak bilinmektedir ve standart koşullarda 1 dakikada 1  $\mu$ mol substratın ürüne dönüşmesi için gerekli olan enzim miktarıdır [35].

Enzimleri kimyasal katalizörlerden ayıran en önemli özelliklerden biri de enzim özgüllüğüdür. Enzimler, genellikle tek bir kimyasal reaksiyonu katalizler. Enzimler, substratlara göre dört çeşit özgüllük sergiler.

- Mutlak Özgüllük: Bir enzimin tek bir substratı katalizlemesi,
- Grup Özgüllük: Bir enzimin belli bir substrat grubuna karşı etkin olması,
- Bağ Özgüllük: Enzimin belli bir bağa karşı özgül olması,
- Stereokimyasal Özgüllük: Enzim için substratın stereokimyasal özelliği önemlidir.

### **1.2.3. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler**

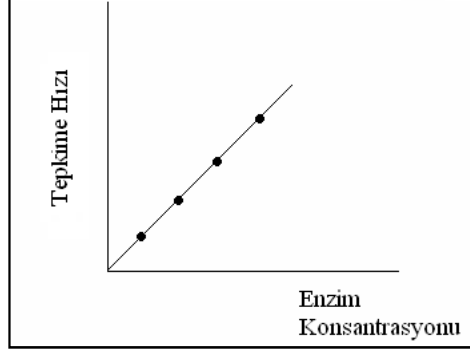
Enzimle katalize edilen bir tepkimede rol oynayan başlıca faktörler;

- Enzim konsantrasyonu,
- Substrat konsantrasyonu,
- Sıcaklık
- pH
- İnhibitör Etkisi
- Reaksiyon ürünü şeklinde sıralanır.

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

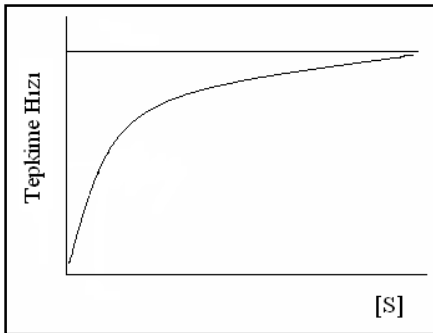
Enzim Konsantrasyonu: Ortamda yeteri kadar substrat varsa enzimatik reaksiyonun hızı enzim konsantrasyonu ile doğrusal olarak artar (Şekil 1.10). Buna sebep de her bir enzim molekülünün bağımsız olarak görev yapmasıdır. Dolayısıyla ortamda ne kadar çok enzim molekülü varsa reaksiyonda o kadar hızlı yürüyecektir. Yalnız

enzim miktarının yüksek olmasına rağmen, ortamda yeteri kadar substrat bulunmazsa reaksiyon sınırlanır.



Şekil 1.10. Enzim konsantrasyonunun tepkime hızına etkisi.

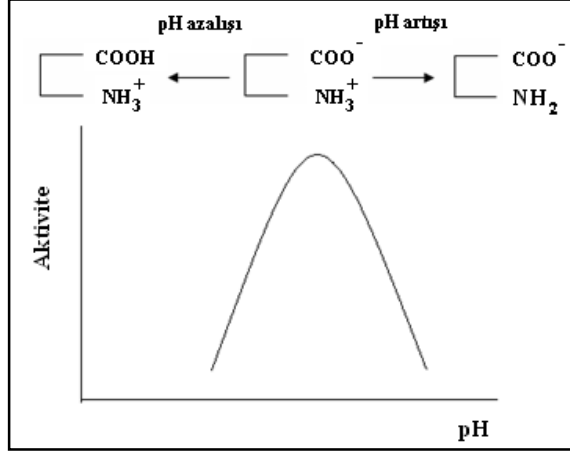
Substrat Konsantrasyonu: Belirli bir miktarda enzim bulunduran reaksiyonun hızı, substrat konsantrasyonuna bağlı olarak artar. Enzim reaksiyonu bu durumda birinci dereceden bir kinetik gösterir. Başlangıçta bu artış doğrusal olarak devam ederken, bir süre sonra substrat konsantrasyonu ne kadar artırılırsa artırılınsın enzim aktivitesinde bir değişiklik gözlenmez. Böyle bir durumda enzim substrata karşı doymuş demektir. Bu durumda ise enzim reaksiyonu sıfırıncı dereceden bir kinetik gösterir. Bu noktada enzim tepkime hızı, maksimum hıza ( $V_{max}$ ) ulaşmıştır (Şekil 1.11). Enzim moleküllerinin yarısı enzim-substrat kompleksi halinde iken yani yarısı çalışırken gözlenen tepkime hızı, maksimum tepkime hızının yarısıdır. Bu maksimum hızın yarısını veren substrat konsantrasyonuna Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ) denir. Bir enzimin  $K_m$  değeri, enzimin substrata olan afinitesini (ilgisini) gösterir. Enzimin substrata olan ilgisi yüksekse  $K_m$  değeri küçüktür [32].



Şekil 1.11. Substrat konsantrasyonunun tepkime hızına etkisi.

Sıcaklık: Birçok kimyasal reaksiyona benzer şekilde, enzim-kataliz reaksiyonlarının hızı da sıcaklıkla birlikte artar. Sıcaklığın her 10 °C artmasına karşılık enzim reaksiyonu bir kat daha hızlanır. Ancak, belli bir sıcaklık değerine ulaşıldığında enzim molekülleri yapısal bazı değişikliklere uğrar ve reaksiyon ya yavaşlar ya da tamamen durur. Hayvansal kaynaklı enzimler genel olarak 40–50 °C arasında optimum sıcaklığa, enzimin en iyi çalıştığı sıcaklığa, erişirken, bitkisel kaynaklı enzimler 50–60 °C’de optimum sıcaklığa erişir. Bu sıcaklıkların üstünde enzim aktivitesi azalma gösterir. Bu durumun sebebi, enzimin protein yapısının ısıya bağlı olarak denatüre olmasıdır [29,32,36].

pH: Enzimlerin katalitik olayları pH’ya bağımlıdır. Enzimler protein yapıları maddeler olduklarından amin ve karboksil grupları ortamın pH derecesine göre az veya çok miktarda iyonlaşırlar. Meydana gelen bu iyonlaşmalar enzimin sekonder (ikincil) ve tersiyer (üçüncül) yapılarının kararlılığını etkiler. Dolayısıyla enzimin aktif bölgesinde bir değişim meydana gelir. Bunun sebebi, enzimlerin yalnızca belirli pH aralığında aktivite göstermeleridir. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH’ya o enzimin optimum pH’sı denir (Şekil 1.12). Optimum pH’nın her iki tarafında da enzim reaksiyonu yavaşlamaktadır. Bu sebeple enzim çalışmalarında pH’yı optimumda tutmak için tamponlar kullanılmaktadır. Birçok enzim çan eğrisi şeklinde bir pH-aktivite grafiği verir. Grafikte negatif ve pozitif yükler arasında aktivitenin maksimum olduğu değer optimum pH’yı verir. Enzimin optimum pH’sının tahmini için, enzimin aktif bölgesinin karakteristiği bilinmelidir. Fakat bu oldukça zordur. Bu yüzden optimum pH genellikle deneysel olarak belirlenir [32,36,37].



Şekil1.12. pH'nın enzim aktivitesine etkisi.

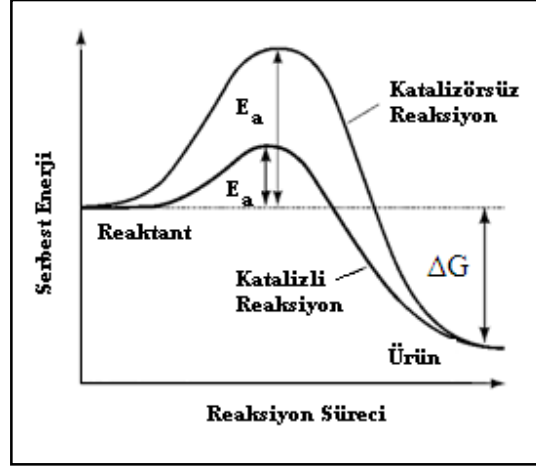
**İnhibitör Etkisi:** Tepkime ortamında bulduklarında, enzimatik tepkimenin hızını yavaşlatan maddelere 'inhibitör' denir. İnhibitörler tersinir ve tersinmez olarak ikiye ayrılır. Tersinmez inhibitörler, enzim molekülünün konformasyonunu değiştirerek veya enzimin aktif bölgesine doğrudan bağlanarak, aktif bölgeyi tamamen bozarlar. Bu maddeler enzimin etkinliğini tümüyle yok ederler. Tersinir inhibitörler ise, enzimle ara bileşik oluştururlar ve Michaelis-Menten sabitini ya da maksimum tepkime hızını azaltıcı etki yaparlar [38].

**Reaksiyon Ürünü:** Ürün konsantrasyonunun giderek artması, belirli konsantrasyon değerlerinden sonra geriye dönük bir kontrol mekanizmasıyla reaksiyonun durdurulmasına neden olduğundan tepkime hızını düşürücü işlev görür.

### 1.3. ENZİM TEPKİMELERİNİN KİNETİĞİ

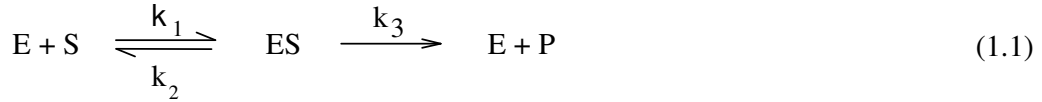
Enzim kinetiği, enzim katalizli reaksiyonların davranışlarını ve bu davranışları etkileyen faktörleri inceleyen enzimoloji dalıdır [39]. Enzimler geçici olarak substrata bağlanıp onlara etki eder ve bu sayede reaksiyonun gerçekleşebilmesi için gerekli olan aktivasyon enerjisini düşürüp reaksiyonların hızlanmasını sağlarlar.





Şekil 1.13. Enzim katalizli reaksiyonun aktivasyon enerji diyagramı.

Tek substratlı enzim kataliz reaksiyonları şu mekanizmaya göre gerçekleşir:



Burada; E enzim, S substrat, ES ara bileşik ve P ürün,  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$  ise ilgili tepkimelerin hız sabitlerini göstermektedir. Tepkimedeki  $k_3$  hız sabitine enzimin etkinlik değeri (turnover sayısı) de denmektedir.  $k_3$ , enzimin saniyede etki ettiği substrat molekülü sayısını gösterir [29]. Turnover sayısı, standart koşullarda, dakikada 1 mol enzim tarafından ürüne dönüştürülen substratın mol sayısı olarak tanımlanır [39].

[E<sub>0</sub>] : Başlangıç enzim derişimi

[E] : Serbest enzim derişimi

[S] : Serbest substrat derişimi

[P] : Ürün derişimi

[ES] : Enzim-substrat ara bileşiği derişimi olarak gösterildiğinde, ara bileşiğin oluşum hızı;

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 [E] [S] - [ES] (k_2 + k_3) \quad (1.2)$$

ürün oluşum hızı ise,

$$v = \frac{d[ES]}{dt} = k_3[ES] \quad (1.3)$$

olarak ifade edilir. Denge durumunda ES ara bileşiğinin oluşum hızı parçalanma hızına eşit olduğundan,

$$v = \frac{d[ES]}{dt} = 0$$

olur. Buradan Eş.1.2'nin düzenlenmesiyle

$$[ES] = \frac{[E][S]}{(k_2+k_3)/k_1} \quad (1.4)$$

denkliği elde edilir. Aynı zamanda enzim kütle denkliği  $[E] = [E_0] - [ES]$  olacağından,  $K_m$  (Michaelis-Menten sabiti);

$$K_m = \frac{k_2+k_3}{k_1} \quad (1.5)$$

olarak tanımlanır ve bu denklem Eş. 1.4'de yerine konup düzenlenirse,

$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{K_m + [S]} \quad (1.6)$$

bulunur. Ürün oluşum hızı ise Eş. 1.3'den

$$v = \frac{k_3[E_0][S]}{K_m + [S]} \quad (1.7)$$

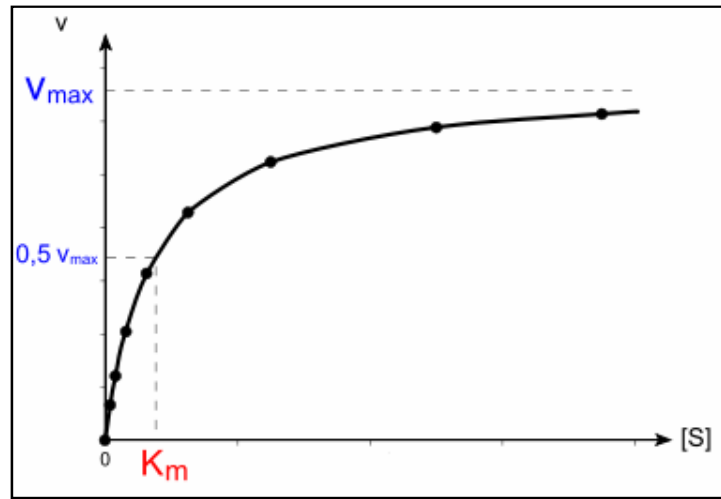
olarak bulunur. Maksimum tepkime hızı enzimin tamamının ara bileşik halinde bulunduğu durumda gözleneceğinden

$$V_{max} = k_3[E_0] \quad (1.8)$$

şeklinde ifade edilir. Sonuç olarak enzimatik tepkime hızı,

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (1.9)$$

eşitliği olarak bulunur. Bu eşitlik Michaelis-Menten eşitliği olarak bilinir ve  $K_m$ 'de Michaelis-Menten sabiti olarak adlandırılır.  $K_m$  değeri, enzim ve substratın birbirine olan ilgisini, afinitesini gösterir. Ayrıca  $K_m$ , maksimum tepkime hızının,  $V_{\max}$ , yarısını sağlamak için gerekli olan substrat derişimi olarak tanımlanır (Şekil 1.14) [34].

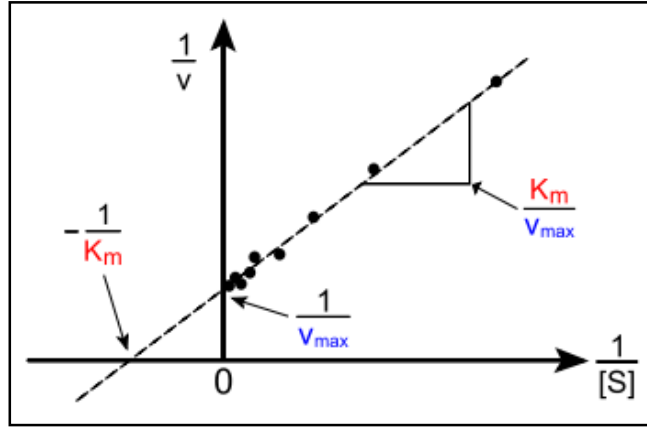


Şekil 1.14. Substrat konsantrasyonu-reaksiyon hızı (V) grafiği.

Michaelis-Menten eşitliği ile belirtilen enzim-kataliz tepkimelerinin grafiği bir hiperbol olduğundan  $K_m$  ve maksimum hız değerlerini bulmak oldukça zordur. Denklemi doğrusallaştırmak için Lineweaver-Burk çeşitli matematiksel dzenlemeler yapmıştır. Bu doğru denklemi,

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

şekindedir. Şekil 1.15'deki doğrunun  $1/[S]$  eksenini kestiği nokta  $-1/K_m$ ,  $1/V$  eksenini kestiği nokta  $1/V_{\max}$ , eğim ise  $K_m/V_{\max}$  dır [40].



Şekil 1.15. Lineweaver-Burk grafiği.

#### 1.4. ENZİMLERİN İMMOBİLİZASYONU

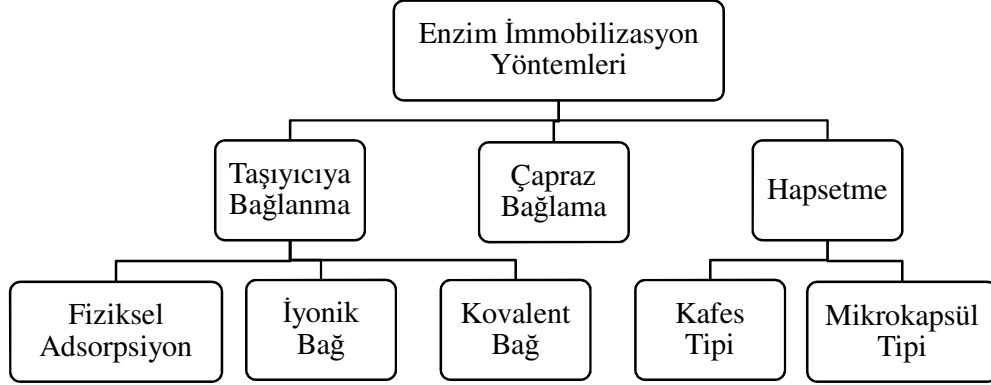
Enzimler çözülebilir maddeler olduklarından, substrat ve ürün karışımından kurtarılıp yeniden kullanılmaları enzimatik proseslerde maliyetli olmaktadır. İmmobilize enzim teknolojisiyle, geleneksel enzimatik proseslerde oluşan bu gibi sorunların üstesinden gelinmektedir [41].

Enzim moleküllerinin katalitik aktifliğini koruyarak tekrar tekrar kullanılmasını sağlamak amacıyla, çözünmez katı bir taşıyıcı üzerine fiziksel veya kimyasal olarak bağlanmasına immobilizasyon denir [29,42].

Endüstriyel çalışmalarda kullanılan serbest enzimler sulu çözeltilerde kullanıldığından, enzimlerin işlem sonrası aktivitesini yitirmeden geri kazanılması mümkün değildir. Kaynağına bağlı olmaksızın enzimlerin biyolojik ortamdan saflaştırılarak elde edilmesi oldukça zaman alıcı ve maliyetli bir işlemdir. Reaksiyon ortamında katalizör olarak kullanılan enzimin ürünlerden ayrılmasının zorluğu serbest enzimlere dezavantaj kazandırır. Ayrıca saflaştırma işleminde kullanılan kimyasallar enzim üzerinde inhibitör etkisi yaratabilir ve enzimin yapısını bozabilir. Bu gibi problemlerin çözümü için son yıllarda çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Enzim immobilizasyonu da bu yöntemlerden biridir. Bu sebeple immobilize enzimler çoklu ve tekrarlı kullanımlarıyla serbest enzimlere tercih edilirler. İmmobilizasyon yöntemiyle enzim yiyecek teknolojisi, biyoteknoloji, ilaçbilimi, analitik kimya,

fermantasyon endüstrisi gibi çeşitli işlemlerde, yeniden kullanılmak üzere işlevsel hale getirilir [43,44].

#### 1.4.1. İmmobilizasyon Yöntemleri



Şekil 1.16. Enzim immobilizasyon yöntemleri.

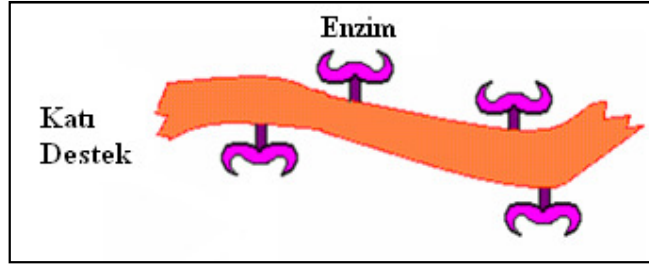
Enzim immobilizasyon yöntemleri taşıyıcı bağ (carrier binding), çapraz bağlama (cross-link) ve hapsetme (entrapment) olarak üçe ayrılır (Şekil 1.16). Taşıyıcıya bağlanma ise fiziksel adsorbsiyon, iyonik bağ, kovalent bağ olmak üzere üç şekilde gerçekleştirilir. Hapsetme yöntemi de kafes tipi ve mikrokapsül tipi olmak üzere iki şekilde yapılabilir [42,45,46].

##### 1.4.1.1. Taşıyıcıya Bağlanma

Taşıyıcıya bağlanma metodu enzimler için immobilizasyon tekniklerinin en eskisidir. Taşıyıcıya bağlanma metodunda kimyasal ve fiziksel kuvvetler sayesinde suda çözünebilir taşıyıcılar üzerine enzim immobilizasyonu yapılır. Bu metotta, taşıyıcıya bağlı enzim miktarı ve immobilizasyon sonrası aktivite taşıyıcının yapısına bağlıdır. Taşıyıcının seçimi enzim yapısına bağlı olmakla birlikte, parça boyutuna, yüzey alanına, hidrofilik ve hidrofobik grupların molar oranına ve kimyasal kompozisyona bağlıdır [47]. Genel olarak, hidrofilik grupların ve bağlı enzim konsantrasyonunun artışı, immobilize enzimlerin yüksek aktivite göstermesini sağlar [16].

Enzimlerin taşıyıcıya bağlanma durumlarına göre bu metot şu şekilde sınıflandırılabilir:

- Fiziksel Adsorpsiyon
- İyonik Bağ
- Kovalent Bağ



Şekil 1.17.Kovalent bağ ile enzim immobilizasyonu.

Fiziksel Adsorpsiyon: Bu metot suda çözünmeyen polimer matrisin enzim çözeltisiyle karıştırılarak enzim molekülünün fiziksel ve kimyasal olarak bu polimer matrise adsorplanması esasına dayanır. Adsorpsiyon, faz ve yüzey sınırlarında kimyasal ve fiziksel kuvvetlerin etkisiyle oluşan yüzeye tutunma olayıdır. Enzimin adsorpsiyonla matris yüzeyine immobilizasyonunda Van der Waals kuvvetleri, iyonik bağlar, hidrojen bağları, elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler etkilidir [48]. Adsorpsiyon verimi, pH, sıcaklık, iyonik kuvvetler, protein ve adsorbanın derişimi gibi deneysel etkenlere bağlıdır.

Bu metotla enzim immobilizasyon işlemi basit ve ucuzdur. Ayrıca oluşan zayıf bağlar sayesinde enzimin aktif bölgesi bozulmaz ve herhangi bir konformasyonel değişikliğe uğramaz. Adsorpsiyonda etkin kuvvetlerin pH, sıcaklık ve iyonik şiddet değişiminden etkilenmeleri sonucu enzim desorpsiyona uğrayarak taşıyıcı matristen kolaylıkla ayrılır. Adsorpsiyon metodu tersinirdir ve bu sayede destek maddesi ve enzim başka amaçlarla tekrar kullanılabilir [49]. Bu avantajların yanında adsorpsiyonun güçlü olmaması sebebiyle yıkama veya işlem süresince enzimin desorpsiyonu söz konusu olması yöntemin dezavantajıdır.

Nelson ve Griffin ilk kez 1916 yılında enzim aktivitesi değişmeksizin invertazı aktif kömür üzerine adsorpsiyonla immobilize ederek sükrözün invert şekere dönüşümünü sağladılar [50].

İyonik Bağ: Enzimlerin iyonik bağ ile immobilizasyonu fiziksel adsorpsiyon kadar basit bir metottur. İyonik bağ metodunda immobilizasyon, taşıyıcı matris ile biyokatalizörlerin karşıt yükleri arasındaki elektrostatik etkileşimle sağlanır. Mitz 1956 yılında bu yöntemi kullanarak katalaz enzimini DEAE-selüloza bağladı. İyonik bağın elde edilmesinde enzim çözeltisinin taşıyıcı parçacıklarla bir süre karıştırılması veya taşıyıcı parçacıklar üzerine enzim çözeltisinin ilavesi yeterlidir. Kullanılan başlıca iyon değiştiriciler DEAE-selüloz ve DEAE-Sephadex'tir. Polisakkaritler ve sentetik polimerler de iyon alış veriş merkezlerine sahip yaygın olarak kullanılan taşıyıcılardır. Bu yöntemle enzim taşıyıcıya kolayca bağlanır ve kovalent bağa göre daha ılımlı şartlar gerekir. Buna rağmen enzimin aktif alanında ve konformasyonunda bir miktar değişme gözlenir. Ancak iyonik bağ metodunda en iyi durumlarda yüksek aktivite gösteren immobilize enzimler elde edilir. Bunların yanında pH'nın fazla değişimi veya substrat çözeltisini yüksek iyonik kuvveti, taşıyıcıdan enzimin sızmasına neden olabilir. Bunun sebebi enzim ve taşıyıcı arasında ki güçlerin kovalent bağdan zayıf olmasıdır. Bu sayede enzimler iyon değiştiricilerden kolaylıkla ayrılabilir ve yeniden kullanılabilirler [13]. İyonik bağ, kovalent bağdan zayıf olmasına rağmen fiziksel adsorpsiyondan daha kuvvetlidir. Buda iki metot arasındaki farkı gösterir. Arıca vd. invertazı, negatif yüklü karbokslik gruplarından yararlanarak karşı yüklü polietilenimin-aşı-poli(GMA-MMA) kürelerine iyonik olarak immobilize etmiştir [51].

Kovalent Bağ: Enzim ile suda çözünmeyen bir destek arasında kovalent bağ oluşumu ile enzim immobilizasyonu yaygın kullanılan bir metottur (Şekil 1.17). Kovalent bağda atomlar elektron çiftlerini ortak kullanırlar ve bu sayede enzim ve taşıyıcı birbirine sıkıca bağlanabilirler. Taşıyıcı ve biyokatalizör arasında ki bağ, bileşenler arasında direk oluşabileceği gibi enzim ve taşıyıcı arasında bağlayıcı ajanların kullanmasıyla da oluşabilir. Bu bağlayıcı ajanlar enzimlere iyi bir hareket serbestliği sağlar, böylece enzim aktivitesi doğrudan taşıyıcıya bağlanmış enzim aktivitesinden daha yüksek gözlenir. Bu metotla enzim immobilizasyonunda reaksiyon tipinin

seçimini iki özellik sınırlar: 1) Bağ reaksiyonu enzimatik aktiviteyi düşürmeyecek şekilde ayarlanmalıdır 2) Enzimin aktif alanı reaktiflerle etkisiz hale gelmemelidir [16]. İmmobilizasyon yöntemi iki basamakta gerçekleşir. Birinci basamak destek maddesinin aktifleştirilmesi, ikinci basamak ise enzimin kovalent bağlanmasıdır. Enzim molekülleri taşıyıcı yüzeye  $\alpha$ - ve  $\epsilon$ - amino grupları, hidroksil, karboksil, imidazol, sülfidril grupları, fenol halkaları gibi bazı fonksiyonel gruplar üzerinden bağlanır. -SH ve  $\epsilon$ -amino grupları taşıyıcının uygun grupları ile doğrudan tepkimeye girebilir. -OH grupları gibi bazı grupların taşıyıcı grupla tepkimeye girmeden önce aktive edilmeleri gerekir [13].

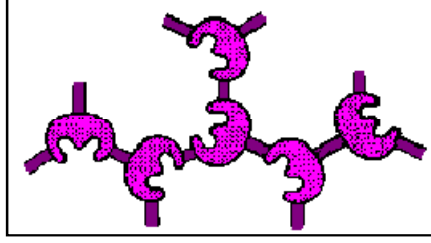
Bu yöntemin en önemli avantajı, enzim ve taşıyıcı arasında oluşan bağın güçlü olması ve bu sayede enzimin yapıdan güç uzaklaşmasıdır. Bununla birlikte kullanılan yöntemin pahalı ve karmaşık olması, deney koşullarında enzimin konformasyonunun ve aktif alanının büyük ölçüde değişmesi bu yöntemin kullanımını kısıtlamaktadır [52].

Dizge vd. iletken polimer matrisine [17], Akgöl vd. magnetik polivinil alkol mikrokapsüllerine invertazı kimyasal olarak immobilize etmiştir [53].

#### **1.4.1.2. Çapraz Bağlama (Cross-Linking)**

Çapraz bağlama metodunda biyokatalitik birimler (enzimler, organeller, hücrelerin tamamı) iki veya daha çok fonksiyonel grubun yardımıyla birbirlerine bağlanır. Bu metotta suda çözünmeyen taşıyıcıların kullanılmasına ihtiyaç yoktur. Yöntemde molekül içi bağların yanı sıra moleküller arası bağlar da söz konusudur. Çapraz bağlamada enzim desteğe kovalent olarak bağlandığından, desorpsiyon yok denecek kadar azdır. Bu yolla üretilen parçacıkların bazı dezavantajları vardır. Şekil 1.18'de çapraz bağlı enzimin yapısı gösterilmektedir.





Şekil 1.18.Çapraz bağlı enzim immobilizasyonu.

Çapraz bağlamayla birçok enzim molekülü birbirine bağlandığından, düşük konsantrasyonlu ve yüksek moleküler ağırlıklı substratlar en içteki katalitik bölgelere ulaşamayacağı için verimin düşmesi söz konusudur [13]. Bu yöntemde, çapraz bağlayıcı olarak kullanılan maddenin enzimin aktif bölgesiyle yapabileceği kimyasal bağ sebebiyle oluşabilecek konformasyonel değişiklikler sebebiyle enzim aktivitesinde düşme gözlemlenebilir. Glutaraldehit en sık kullanılan çapraz bağlayıcıdır ve enzimin elektrot yüzeyinden difüzyonlanması çapraz bağlayıcı reaktifle engellenir [7].

#### 1.4.1.3. Hapsetme

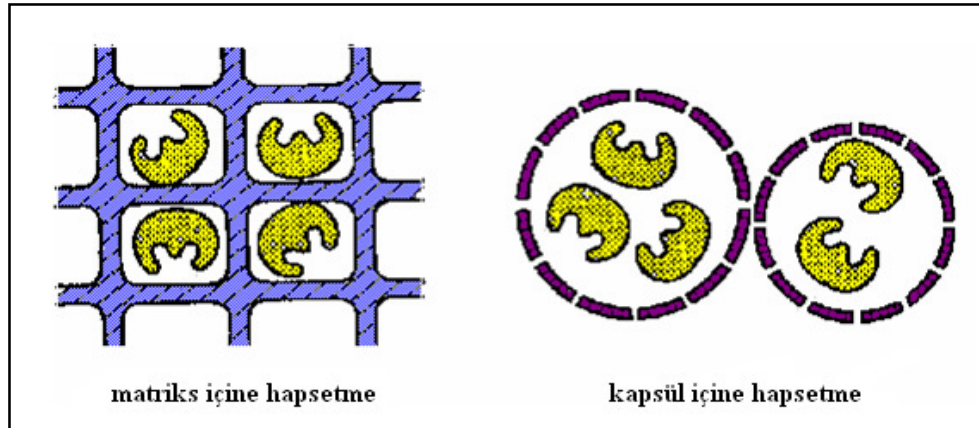
Hapsetme metodunda, enzim polimer matris gözeneklerine veya bir membran içine immobilize edilir. Bu yöntemde enzim sabit dururken, substratın enzime nüfuz etmesine izin verilir. Hapsetme metodunun çapraz bağlama ve kovalent bağdan farkı, enzimle jel matris arasında hiçbir bağ bulunmamasıdır. Bu sayede hapsetme metodu geniş bir uygulanabilirlik alanı kazanır. Fakat arada bağ olmaması sebebiyle matris gözeneklerinden enzim kaybı söz konusu olabilir. 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 metottur. 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 enzim iskeletinin deformasyonuna ve enzimatik reaksiyonun aktivitesinin azalmasına neden olabilir [54].

Işıklı vd., Tunçağıl vd., Çelebi vd. elektrokimyasal polimerizasyon metodunu kullanarak invertazı polimer matrise immobilize etmiştir [44,45,54]. Hapsederek immobilizasyon metoduyla Rebroš et al. polivinil alkol hidrojel kapsüllerine invertazı immobilize etmiştir [55].

Bu immobilizasyon metodu kafes ve mikrokapsül tipi olmak üzere ikiye ayrılır.

**Kafes Tipi:** Bu tip hapsedmede, immobilize edilecek enzimin suda çözünmeyen polimerin boşluğuna girmesi gerekir. Bazı sentetik polimerler; poliakrilamid, polivinil alkol ve doğal polimerler; nişasta, kafes tipi enzim immobilizasyonunda kullanılan bazı matrislerdir.

**Mikrokapsül Tipi:** Yöntem yarı geçirgen polimer bir membranın enzimi içine almasıyla gerçekleştirilir. Enzim mikrokapsüllerinin hazırlanması kontrollü şartlar altında yapılmalıdır (Şekil 1.19) [16].



Şekil 1.19. Enzimlerin hapsedme yoluyla immobilizasyonu.

#### 1.4.2. İmmobilizasyonun Avantajları

İmmobilizasyonun temel avantajları,

- Tepkimeyi durdurmak için enzim elektrodun tepkime çözeltisinden çıkarılması yeterlidir, dolayısıyla reaksiyonu durdurmak için sisteme inhibitör eklemeye

- veya sistemi ani ısıtmamıza gerek kalmaz,
- Kesikli ve sürekli proseslerde immobilizasyon kabiliyetine bağlı olarak uzun süre kullanılabilirler,
  - İmmobilize enzimler ortam koşullarına karşı (pH, sıcaklık vb.) serbest enzimlere göre yüksek kararlılık ve uzun yarılanma ömrü sergilerler,
  - İmmobilize enzimi üründen ayırmak serbest enzime göre daha kolaydır,
  - İşletim maliyeti azalır,
  - İşlem süresi kısalmır,
  - İmmobilize enzim sistemlerinde kimyasal ve fiziksel özellikler seçimli olarak değiştirilerek çeşitli prosesler uygulanabilir [29,44].

Bu avantajların yanında immobilize enzimlerin bazı dezavantajları da vardır.

- İmmobilizasyon prosesi ekipmanları ve immobilizasyonda kullanılan malzemelerin maliyeti fazladır,
- İmmobilizasyon, enzimin optimum pH, sıcaklık değerini, Michaelis-Menten sabitini ( $K_m$ ) ve maksimum reaksiyon hızını ( $V_{max}$ ) immobilizasyonun metoduna ve taşıyıcının yapısına göre etkiler,
- İmmobilize enzimin aktif bölgesi ve reaksiyon ortamı arasında substrat ve ürünün taşınmasında difüzyonel kısıtlamalar oluşur,
- Enzim taşıyıcılarının maliyetinin yüksektir.

İmmobilizasyonun dezavantajları, avantajları yanında göz ardı edilebileceğinden immobilizasyon birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır [29].

### **1.4.3. Enzim Aktivitesine İmmobilizasyonun Etkisi**

İmmobilize enzimin kinetik özellikleri, çözeltideki serbest enzime göre farklılık gösterebilir. Bu durum enzimi saran mikro çevreye, immobilizasyon metoduna çözünmez taşıyıcının yapısına bağlıdır. Bu gibi nedenler enzim aktivitesinin azalmasına neden olabilir [56]. Özellikle kimyasal bir reaksiyon gerçekleştiğinde bir miktarda olsa denatürasyon meydana geleceğinden enzim aktivitesi azalacaktır. Ayrıca, taşıyıcılar enzime yeni bir mikro çevre oluşturacağı için bu durum çeşitli

yollardan enzim aktivitesini engelleyebilir. İmmobilize enzim aktivitesini etkileyen durumlar şu şekilde sıralanabilir [29].

- Bölücülük Etkisi
- Difüzyonel Kısıtlama
- Konformasyonel Değişiklik
- Sterik Engel
- İnaktivasyon

#### **1.4.4. İmmobilize Enzimlerin Uygulama Alanları**

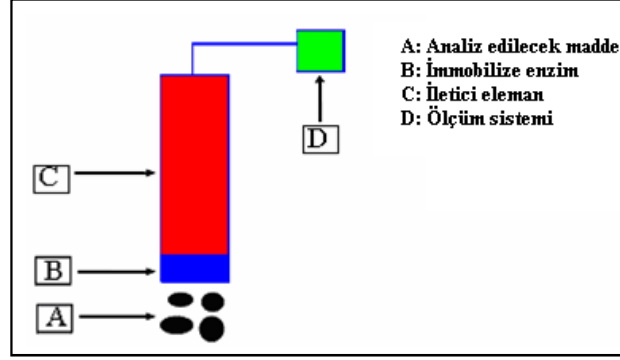
İmmobilize enzimler, yeniden kullanılabilme gibi özelliklerden dolayı birçok alanda kullanım imkânı bulmuştur. İmmobilize enzimler endüstriyel, analitik ve tıbbi alanlarda kullanılmaktadır.

- Endüstriyel Uygulamalar: İmmobilize enzimler ve hücreler; yiyecek, kimya ve ilaç sanayinde yeni yöntemler içinde fazlasıyla kullanılmaktadır.
- Analitik Uygulamalar: Enzim immobilizasyonunda geliştirilen teknikler yardımıyla, enzim elektrotlar ve yeni enzim tabanlı analitik metotlar geliştirilmektedir.
- Terapötik Uygulamalar: İmmobilize enzimler, metabolik hastalıklarda, vücutta salgılanamayan enzimlerin vücuda verilmesinde kullanılır.

#### **1.5. ENZİM SENSÖRLERİ**

Pratik ve ticari uygulamalarda enzim elektrotlarının üstünlüğü göze çarpmaktadır. Bu yüzden biyosensörlerde, biyokatalizör olarak enzimler yaygın olarak kullanılmaktadır. Binlerce enzim, canlı sistemlerle ilgili hemen hemen her türlü maddenin doğrudan ya da dolaylı olarak analizinde kullanılabilir.

En genel anlamda bir enzim sensör; iletici, ince bir enzim tabakası ve ölçüm sisteminden oluşmaktadır. Diğer biyosensörlerden farkı, biyoaktif tabakada biyomolekül olarak enzimlerin kullanılmasıdır [18,45]. Şekil 1.20’de enzim sensörün yapısı gösterilmektedir.

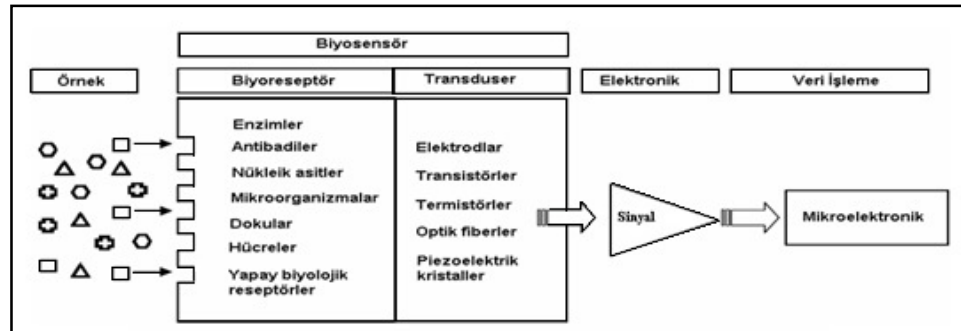


Şekil 1.20. Enzimsensörün genel şematik gösterimi.

## 1.6. BİYOSENSÖRLER

Biyosensörler, analizini yapmayı hedeflediği analitin derişimindeki değişimi; tersinir, sürekli, hızlı ve doğrudan ölçmek için kullanılan analitik bir alettir. Biyosensör, kimyasal ya da biyokimyasal reaksiyonların meydana geldiği duyarlı bir mikro alana optik, elektrik, termal veya kütle transferini sağlayacak parçanın bağlanmasıyla oluşur [18].

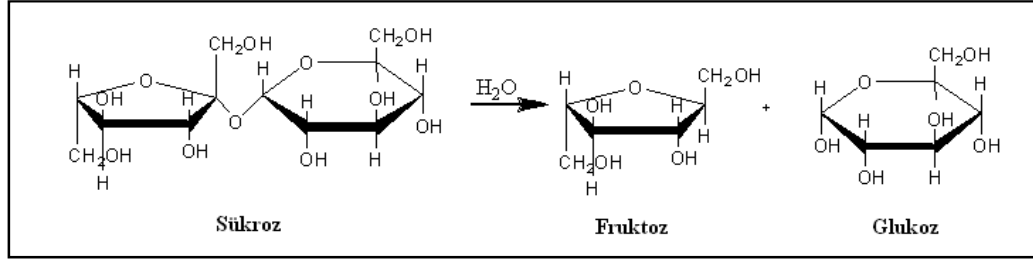
Biyosensörler, ‘biyomolekül / biyoajan’ olarak adlandırılan reseptörler, fiziksel dönüştürücüler ve fizikokimyasal sinyalleri elektronik sinyallere dönüştürebilen bir çevirici sistemden oluşurlar. Biyoreseptörlerde en çok enzimler, dokular, mayalar, antibadi/antijenler ve antikorlar kullanılır [57]. Transducer yani ileticiler, biyoalıcı yardımıyla reseptörlerin biyolojik reaksiyonunu ölçülebilir fiziksel bir sinyale dönüştüren, yani bir enerjinin diğerine dönüşümü sağlayan cihazlardır. Şekil 1.21’de biyosensörlerin yapısı ve çalışma prensibi gösterilmiştir.



Şekil 1.21. Biyosensörlerin yapısı ve çalışma prensibi.

## 1.7. İNVERTAZ

Hidroliz enzimlerinin alt grubu olan karbohidrazlardan invertaz ( $\beta$ -fruktofuranosidaz, E.C. 3.2.1.26), sükrozun  $\alpha$ -1,4-glikozidik bağının parçalanmasıyla eş molar glukoz ve fruktoza hidrolizini (Şekil 1.22) katalizleyen spesifik bir enzimdir [58].

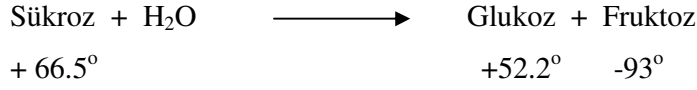


Şekil 1.22. Sükrozun hidroliz reaksiyonu.

$\beta$ -fruktofuranosidaz oldukça dağınık şekilde bitki, hayvan ve mikroorganizmalar içinde bulunur. Enzimin iki tipi vardır,  $\beta$ -fruktofuranosidaz ve  $\alpha$ -glukosidaz ( $\alpha$ -D-glukositglukohidrolaz EC 3.2.1.20). Her ikisi de sükrozu hidroliz edebilir [35]. İvertaz genel olarak ekmek mayası ve bira mayasından elde edilir. Mayadan elde edilen invertazın biri hücre duvarına lokalize olmuş dış, diğeri ise sitoplazmik membranın içinde bulunan ve dış invertaza göre daha küçük olan iç invertaz enzimidir. Dış invertaz, enzimin hücre dış çeperinden yaklaşık olarak 500-1000Å 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 karbohidrat içerir [48].

Ekmek mayasından elde edilen invertaz enziminin optimum pH'sı 4.0–5.5 arasındadır ve bu değer aynı zamanda invertazın en kararlı olduğu pH aralığıdır. Katı haldeki invertaz ısıya oldukça dayanıklıdır. Enzimin optimum sıcaklığı, içinde bulunduğu şeker çözeltisinin konsantrasyonuna bağlı olarak değişir. Ticari invertazın düşük sükroz konsantrasyonlarında optimum sıcaklığı 55 °C iken, konsantre sükroz çözeltilerinde optimum sıcaklık 65–70 °C olarak verilir [38].

Enzim tarafından katalizlenen reaksiyon,

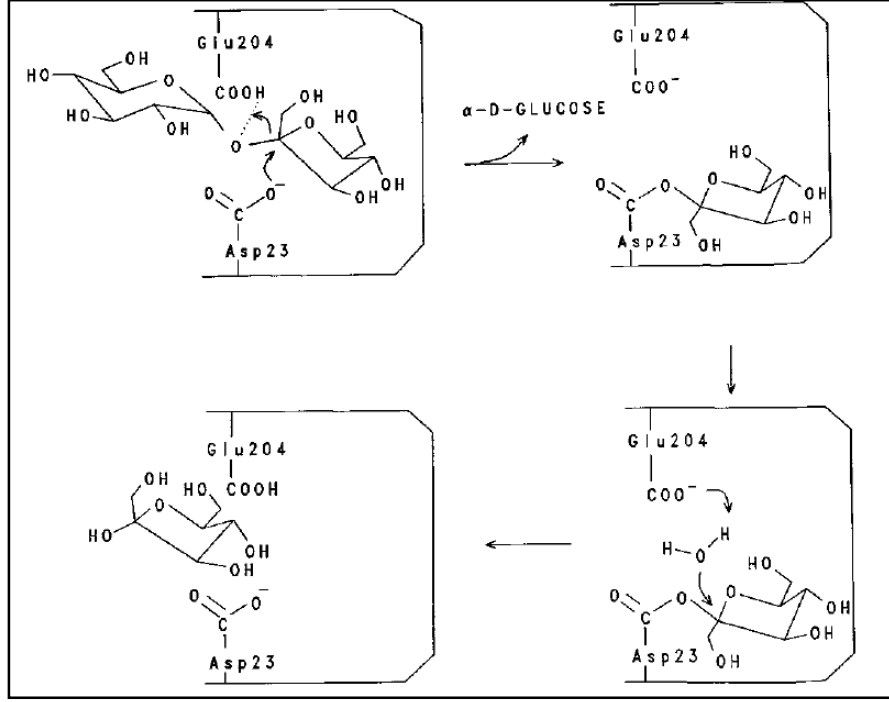


şeklinde gösterilir. Hidroliz tepkimesi sonucunda oluşan karışım, sükroz çözeltisinin optik çevirmesinden farklı bir optik çevirme gösterir. Bileşiklerin altındaki numaralar spesifik optik çevirme açılarıdır. Reaksiyon sonucunda oluşan şeker karışımına invert şeker, olaya ise inversiyon denir [35].

İnvertaz genel olarak şekerleme endüstrisinde invert şeker yapımında veya invert şekerden oluşan şurup yapımında kullanılır. Elde edilen fruktozun sükroza göre daha tatlı olması ve yüksek konsantrasyonlarda sükrozdaki kristalleşmesi nedeniyle fruktoz kullanımı sükroza tercih edilir [41,59]. İntert şeker önceleri geleneksel olarak sükrozun asit hidroliziyle elde edilirken günümüzde bu işlem enzimatik olarak invertaz ile gerçekleştirilir [48]. İntertazdan elde edilen invert şeker karışımı, asit hidroliziyle elde edilen invert şeker karışımına göre renksiz olduğu için bu durum önemli bir üstünlük sağlar. Fakat asit hidrolizinin daha düşük fiyatlı olduğu düşünülürse invertazın immobilize şekilde kullanımı daha verimli olacaktır [49,60].

Çözünabilir invertaz gıda endüstrisinde reçel, yapay bal, krema ve sıvı şekerin endüstriyel üretiminde ve bira sanayinde kullanılmaktadır. Gıda sanayinde invert şeker kullanıldığında, ürünün uzun süre taze ve yumuşak kaldığı görülmüştür. Bu nedenle gıda endüstrisinde invertaz kullanımı her geçen gün artmaktadır [58-60]. İntert şeker üretiminde invertaz serbest olarak kullanılabilirdiği gibi immobilize olarak da kullanılmaktadır. İntertaz enzimi kullanılarak yapılan biyosensör sistemleri çeşitli alanlarda kullanılabilir. İntertaz esaslı biyosensörler ile ağır metal iyonlarının tayini mümkündür. Bu sensör sistemi maya invertazının ağır metallerle özellikle  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Hg}^{+2}$  varlığında ve düşük üre konsantrasyonlarında geri dönüşümlü olarak, yüksek üre konsantrasyonlarında ise geri dönüşümsüz olarak inhibe olması esasına dayanır [39,61].

İnvertaz enziminin çalışması için muhtemel bir reaksiyon mekanizması Şekil 1.23’de gösterilmiştir. Asp-23, nükleofilik bir katılmayla sükrozdaki früktoz molekülüyle bir ara ürün oluşturur. Sükrozun glukoz kısmı ise Glu-204’den bir proton koparıp glukoz olarak ayrılır. Daha sonra reaksiyona su molekülünün nükleofilik katılmasıyla früktoz invertaz enziminden ayrılır.



Şekil 1.23. Maya invertazı için katalitik mekanizma [62].

İmmobilize invertazı ticari kullanımının az olmasına rağmen, sükroz şurubun yüksek oranda hazırlanmasında, endüstriyel maliyeti azaltmada ve yeniden kullanım özellikleri sayesinde tercih edilir. 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 olarak kullanılmaktadır [46,48,63].



## BÖLÜM 2

### DENEYSEL ÇALIŞMALAR

#### 2.1. KULLANILAN REAKTİFLER

İnvertaz ( $\beta$ -fruktofuranosidaz) (EC 3.2.1.26) Sigma'dan temin edildi. Pirol (Merck) kullanılmadan önce saflaştırıldı ve 4°C'de saklandı. Sodyum dodesilsülfat (SDS) Aldrich'den alındı.

Nelson reaktifinin hazırlanmasında, sodyum karbonat (Aldrich), sodyum potasyum tartarat (Merck), sodyum bikarbonat (Merck), sodyum sülfat (Sigma-Aldrich), bakır sülfat penta hidrat (Sigma) ve arsenomolibdat reaktifinin hazırlanmasında, amonyum heptamolibdat tetrahidrat (Sigma), sodyum hidrojen arsenat (Panreac) kullanıldı. Sükroz Sigma'dan satın alındı ve asetat tamponun hazırlanmasında, sodyum asetat (Sigma) ve asetik asit (Carlo Erba) kullanıldı.

##### 2.1.1. Nelson Reaktifinin Hazırlanması

Nelson reaktifi A'nın hazırlanışı: 25 g susuz  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 25 g sodyum potasyum tartarat, 20 g  $\text{NaHCO}_3$  ve 200 g susuz  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 700 mL distile suda çözülür ve 1000 mL'ye seyreltilir. Nelson reaktifi B'nin hazırlanışı: 15 g  $\text{CuSO}_4$ , 100 mL distile suda çözülür ve üzerine konsantre  $\text{H}_2\text{SO}_4$  damlatılır. Aktivite ölçümlerinden önce reaktif A ve B karıştırılır [25/1, (%/v)]. Bu çözelti enzim aktivite tayininde kullanılır.

##### 2.1.2. Arsenomolibdat Reaktifinin Hazırlanması

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.

## **2.2. KULLANILAN CİHAZLAR**

### **2.2.1. Potansiyostat**

PalmSens Electrochemical Biosensor Interface (Palm Instruments BV) iletken DAD polimerlerin potansiyodinamik sentezi için kullanıldı. Polimerlerin sentezi, üç elektrotlu bir hücrede, monomer, elektrolit ve tampon içeren çözeltiye çalışma (Pt) ve karşı (Pt) elektrotlar yerleştirilerek yapıldı. Hücrede Ag tel referans elektrot olarak kullanıldı.

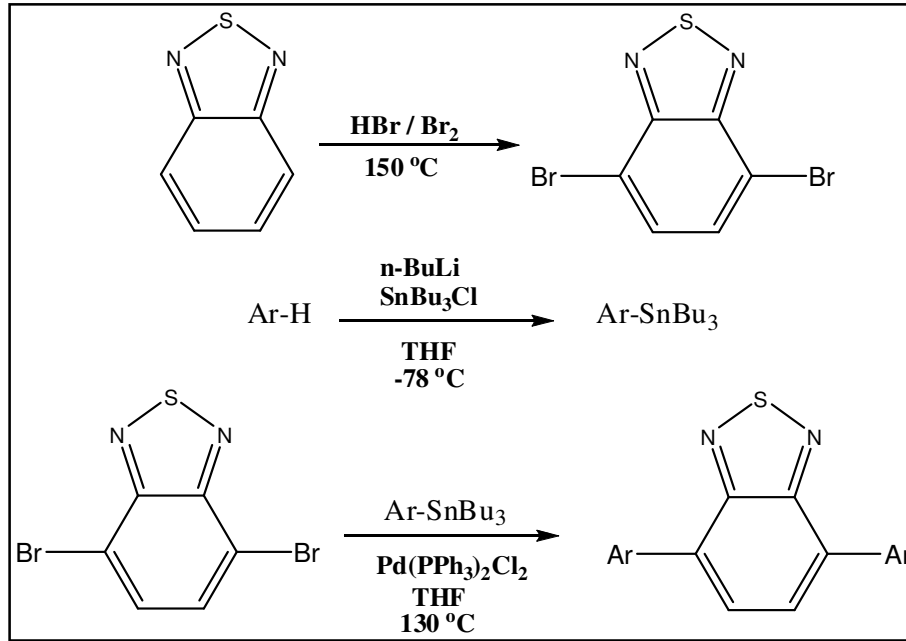
### **2.2.2. UV – VIS Spektrofotometre**

İmmobilize enzim aktivitesini tayinetmek amacıyla Shimadzu UV–1700 model spektrofotometre kullanıldı. Biyodönüşümden sonra oluşan ürünlerin Nelson yöntemi ile renkli kompleksleri oluşturularak 540 nm’de absorbansları ölçüldü ve enzim aktiviteleri bu yöntemle belirlendi.

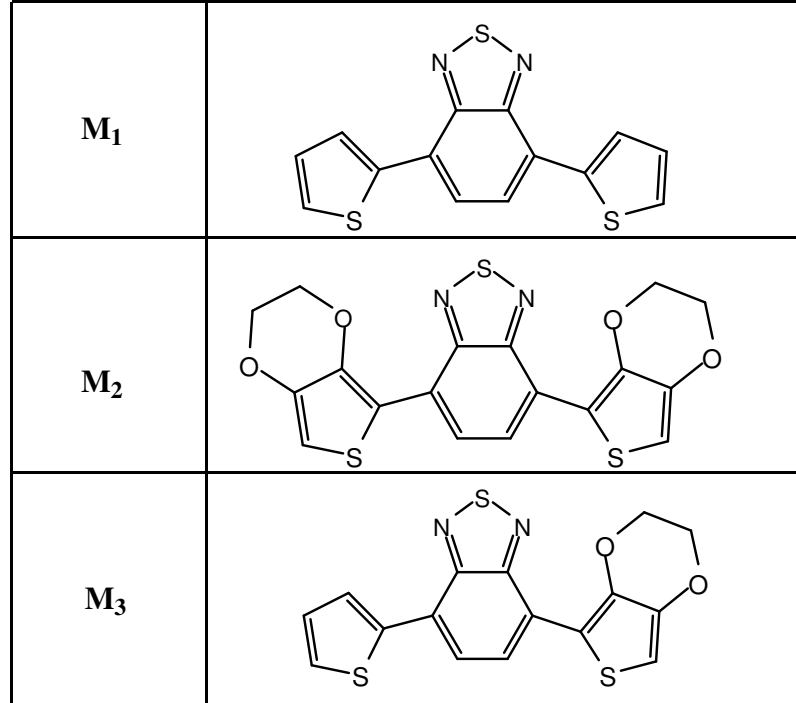
## **2.3. YÖNTEM**

### **2.3.1. DAD Yapılı Monomerlerin Sentezi**

İlk aşamada benzotiyadiazol akseptör grubuyla, HBr/Br<sub>2</sub> karışımı kullanılarak brominasyon reaksiyonu gerçekleştirilir ve akseptör grubunun 4 ile 7 konumundan bromlanması sağlanır. Donör grubu olarak kullanılacak olan Ar<sub>1</sub> (3,4-etilendioksitiyofen, EDOT) veya Ar<sub>2</sub> (tiyofen, Th), n-BuLi varlığında SnBu<sub>3</sub>Cl ile reaksiyona girer ve Ar-SnBu<sub>3</sub> oluşur. Son olarak bromlu benzotiyadiazol ile Ar-SnBu<sub>3</sub>, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> katalizörlüğünde Stille Coupling reaksiyonu ile birbirine bağlanır ve monomerler aşağıda belirtilen tabloya göre sentezlenmiş olur [64].



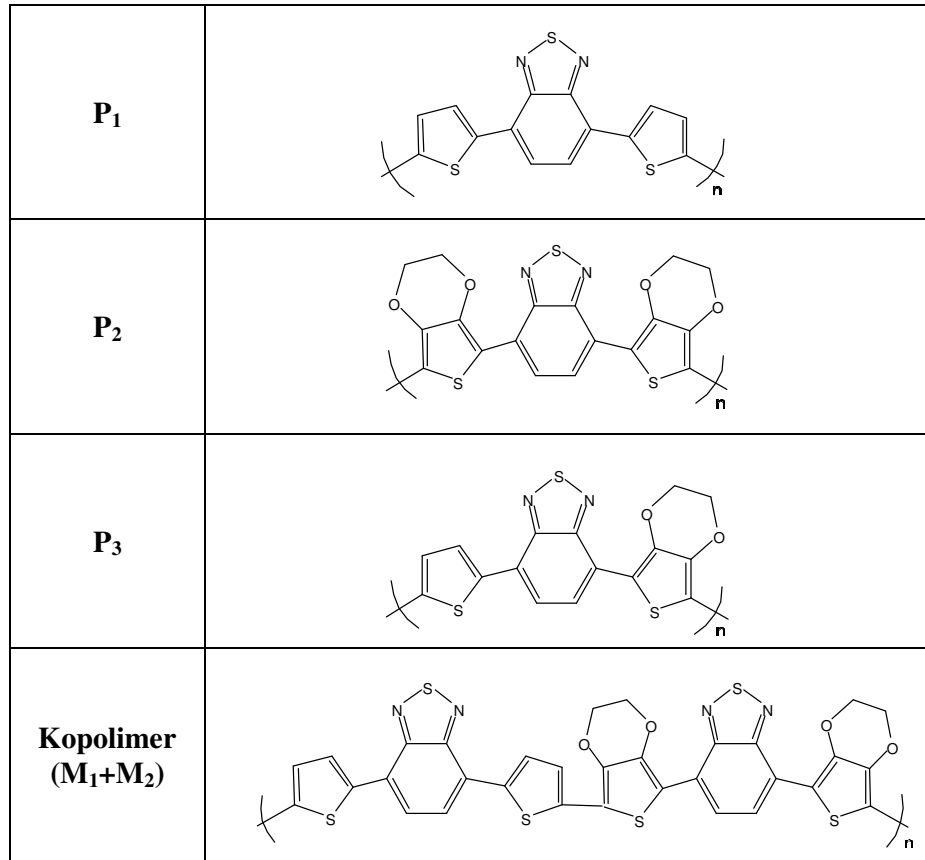
Şekil 2.1.  $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$  monomerlerinin sentez aşamaları.



Şekil 2.2.  $M_1$ ,  $M_2$  ve  $M_3$  monomerlerinin yapıları.

### 2.3.2. Oksidatif Elektropolimerizasyon

Elektrokimyasal polimerizasyon asetonitril (ACN) ve diklorometan (DCM) karışımında (95:5, v/v), 0.1 M tetrabutilamonyum hekzaflorofosfat (TBAPF<sub>6</sub>) ve 0.01 M monomer varlığında 50 mV s<sup>-1</sup> tarama değeri kullanılarak üç elektrotlu hücrede gerçekleştirildi. M<sub>1</sub> ve M<sub>3</sub> monomerleri -0.3 V ve 1.5 V aralığında potansiyodinamik olarak polimerleştirildi. M<sub>2</sub> monomerinin polimerizasyonu ise -0.3 V ve 1.3 V aralığında yapıldı. Kopolimer 1:1 sentezi ise M<sub>1</sub> ve M<sub>2</sub> monomerlerinin 5×10<sup>-3</sup> M derişiminde alınmasıyla, -0.3V-1.5Vpotansiyelaralığında potan-siyodinamik olarak yapıldı [64]. Polimerizasyon sonrası elde edilen filmler elektrolit anyonların ve ortamda kalan monomerlerin uzaklaştırılması için ACN ile yıkandı.



Şekil 2.3. P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> ve Kopolimer yapıları.

### **2.3.3. Farklı Film Kalınlıklarının Elde Edilişi**

Bölüm 2.3.2’de anlatıldığı gibi elektropolimerizasyon için  $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$  ve kopolimer çözeltisi hazırlandı. Verilen potansiyel aralıklarında 10, 20, 30 ve 40 tarama sayısında polimerler oluşturuldu ve film kalınlıklarının enzim aktivitesine etkisi incelendi.

### **2.3.4. İnvirtaz İmmobilizasyonu**

İnvirtazın immobilizasyonu polimer kaplı ve boş Pt elektrot üzerine pirolün potansiyodinamik polimerizasyonu 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  $mL^{-1}$  invertaz, destek elektrolit olarak 0.6 mg  $mL^{-1}$  sodyum dodesilsülfat (SDS) ve 0.07 M pirolden hazırlandı [65]. -0.3 V ve 1.5 V arasında 50  $mV s^{-1}$  tarama değeriyle 20 tarama yapıldı. Bu işlemten sonra her bir enzim elektrot, kalan destek elektrolitin ve bağ yapmayan enzimlerin uzaklaştırılması için distile su ile birkaç kez yıkandı. Kullanılmadığı zaman 4°C’de asetat tamponunda saklandı.

### **2.3.5. Enzim Aktivitesi Tayini**

İmmobilize invertazın aktivitesi, her bir matris için Nelson [66] metoduyla belirlendi. Sükroz çözeltisinin farklı konsantrasyonları (pH 5.0 asetat tamponunda), 25 °C’de 10 dakika su banyosunda bekletildi. Daha sonra enzim elektrodu, spesifik reaksiyon süresi (2, 4 ve 6 dakika) için 4 mL sükroz çözeltisinin içine daldırıldı. Elektrot çıkarıldıktan sonra, çözeltiden 1 mL alınıp üzerine reaksiyonu sonlandırmak için 1 mL Nelson reaktifi eklendi. Tüpler, 20 dakika için kaynar su banyosuna kondu ve ardından oda sıcaklığına soğutuldu. Tüplere 1 mL arsenomolibdat reaktifi ve 1 mL distile su sırayla eklenip karıştırıldı. Karıştırdıktan sonra, absorbanslar, 540 nm’de ölçüldü ve her bir konsantrasyon için enzim aktivitesi tayin edildi. İmmobilize enzim elektrotlar, kullanılmadığı zaman 4 °C’de asetat tamponunda saklandı. İnvirtaz

aktivitesi birimi, pH 5.0'da ve 25 °C'de, sükrozdan, dakikada 1 µmol glukoz elde etmek için gerekli enzim miktarıdır.

### **2.3.6. Kinetik Parametrelerin Tayini**

Enzimatik reaksiyonun maksimum hızı ( $V_{max}$ ) ve Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ), her bir elektrot için Michaelis-Menten metoduyla tayin edildi. Enzim aktivite çalışmalarında, substratın (sükroz) farklı konsantrasyonları için invertaz aktivitesi bulundu. Sükroz konsantrasyonu, enzimin doyduğu noktaya kadar artırıldı ve maksimum enzim aktivitesine ulaşıldı. Daha sonra Lineweaver-Burk grafiğinden yararlanılarak  $V_{max}$  ve  $K_m$  tayin edildi [34,40].

### **2.3.7. Optimum Sıcaklık ve pH**

Sıcaklık optimizasyonu için, substrat konsantrasyonu  $10 K_m$  alındı. pH 5.0 asetat tamponunda sabit tutularak, su banyosu sıcaklığı 0 °C ve 80 °C arasında değiştirildi. Optimum pH, sabit sıcaklıkta (25 °C) ve substrat konsantrasyonunda ( $10 K_m$ ), pH 2.0 ve 12.0 arasında değiştirilerek belirlendi. İvertaz aktivitesi deneyi ile aynı prosedür uygulandı.

### **2.3.8. Çalışma Kararlılığı ve Raf Ömrü**

Filmlerdeki immobilize enzimlerin çalışma kararlılığı deneyleri, pH 5.0 ve 25 °C'de aynı gün içinde 40 aktivite ölçümü yapılarak belirlendi. Sensörlerin raf ömrü ise, aktivite ölçümünün ilk 5 gün ve ardından her 3 günde bir, 40 günlük periyot süresince alınmasıyla yapılmıştır. Elektrotlar, kullanılmadığı zamanlarda 4 °C'de asetat tamponunda (50 mM, pH 5.0) saklandı.

## BÖLÜM 3

### DENEYSEL SONUÇLAR

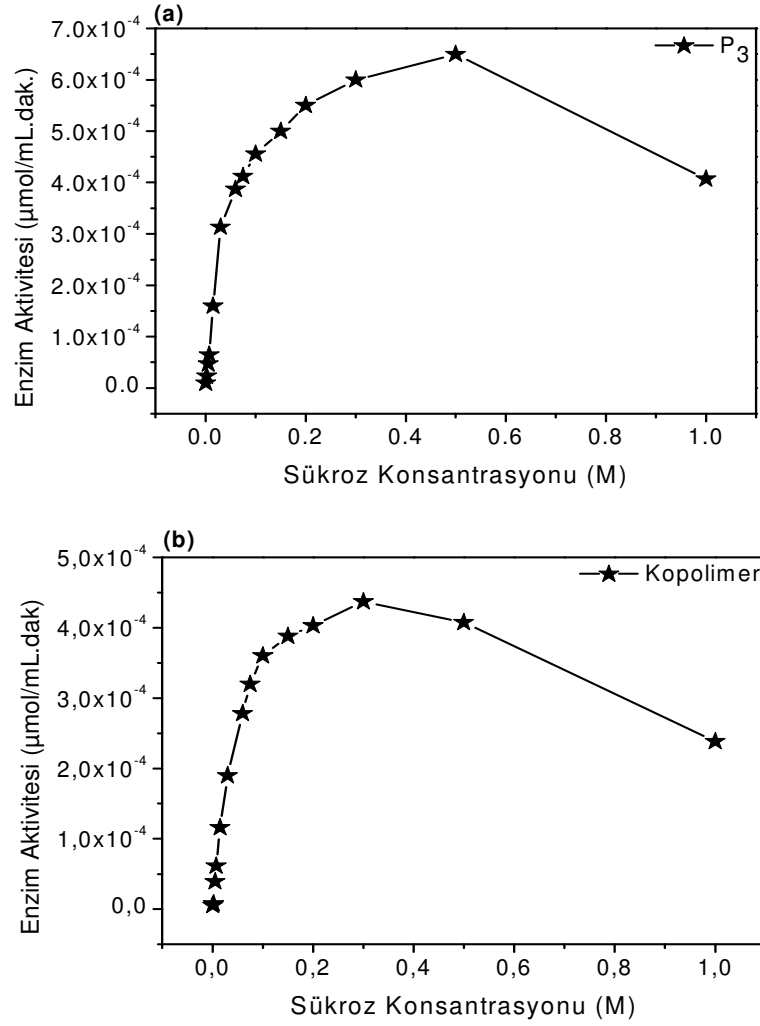
#### 3.1. İMMOBİLİZE ENZİMİN KİNETİK PARAMETRELERİ

İmmobilize enzimin kinetik parametreleri, Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ) ve maksimum reaksiyon hızı ( $V_{max}$ ), sabit pH ve sabit sıcaklıkta farklı substrat konsantrasyonlarında belirlenmiştir (Çizelge 3.1). İnvvertaz enziminin kinetik parametreleri ( $K_m$  ve  $V_{max}$ ) için Lineweaver-Burk yöntemi kullanılmıştır [40]. İmmobilize invertazın  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. İmmobilize ve serbest invertazın kinetik parametreleri [67].

	$V_{max}(\mu\text{mol dak}^{-1})$	$K_m(\text{mM})$
Serbest İnvvertaz	82.3	24.3
PPy	0.77	33.3
P <sub>1</sub> /PPy Kompozit	0.85	22.6
P <sub>2</sub> /PPy Kompozit	0.96	31.8
P <sub>3</sub> /PPy Kompozit	0.95	22.7
Kopolimer (1:1)/PPy Kompozit	0.83	12.1

Çizelge 3.1. incelendiğinde, immobilize invertazın  $K_m$  değerleri bize enzimin substrata olan ilgisinin serbest invertaza göre daha düşük olduğunu gösterir. Fakat bu durum beklenen bir sonuçtur.  $K_m$  değerinde ki bu artış enzimin substrata olan ilgisinin azaldığını ve substratın enzime ulaşımının konformasyonel değişimler sonucunda engellendiğini gösterir. Bu durum substrat ve enzim arasındaki elektrostatik etkileşimden ve iç kütle transfer direnci artışı gibi difüzyonel etkilerden kaynaklanır.



Şekil 3.1. P<sub>3</sub> ve Kopolimer için Michaelis-Menten grafiği.

İmmobilize enzimlerin afinite değerleri kendi içinde karşılaştırıldığında polipirolün afinite değerinin en düşük olduğu görülür.

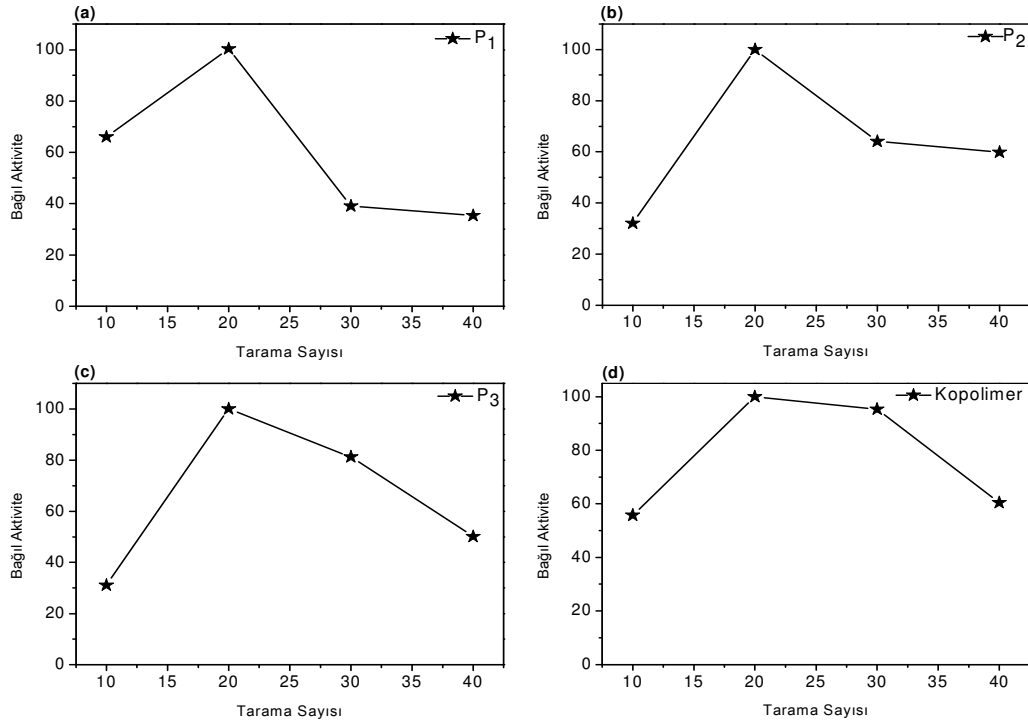
P<sub>3</sub>/PPy kompozit içindeki immobilize invertazın maksimum aktivitesi ve afinitesi, P<sub>1</sub>/PPy ve P<sub>2</sub>/PPy arasında çıkmıştır. P<sub>3</sub>/PPy'e türdeş yapıda olması beklenen kopolimerin enzim aktivitesi ise P<sub>3</sub>/PPy'den daha düşük gözlenmiştir. Enzim-substrat kompleksi oluşumu, iletken polimerdeki gözenekli yapının substrat geçişini engellemesi nedeniyle zordur. Dolayısıyla K<sub>m</sub> değerlerinde ki bu farklılık her bir polimerin gözenek büyüklüğünün farklı olmasından kaynaklanabilir. Serbest enzime



göre  $V_{max}$  değerlerinde ki düşüş ise substratın difüzyonunun kısıtlanması nedeniyle enzime ulaşamamasından kaynaklanmış olabilir. Ayrıca bu durum, oluşan ürünün gözenekli yapı sebebiyle ortama ulaşamamasından kaynaklanmış olabilir [7,44].

### 3.2. POLİMER KALINLIĞININ ENZİM AKTİVİTESİNE ETKİSİ

$P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$  ve kopolimer için yapılan tarama sayısı optimizasyonunun sonuçları aşağıdaki grafiklerde görülmektedir. Tüm matrisler için elde edilen en yüksek enzim aktivitesi 20 tarama ile elde edilen polimer kalınlığında görülmüştür ve tüm uygulamalarda 20 tarama sayısı kullanılmıştır (Şekil 3.2).

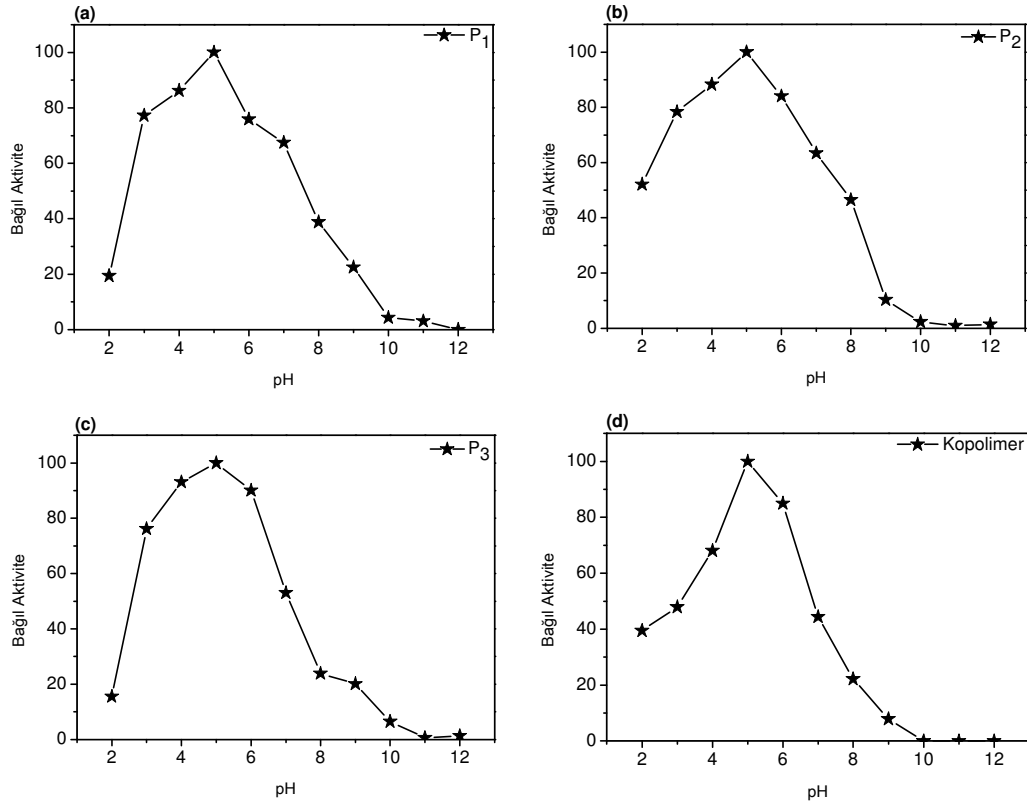


Şekil 3.2. Tarama sayısının enzim aktivitesine etkisi a)  $P_1$ , b)  $P_2$ , c)  $P_3$  d) kopolimer.

### 3.3. ENZİM AKTİVİTESİNE pH' NIN ETKİSİ

Ortam pH'sındaki değişimler enzimin yapısının bozulmasına ve enzimin denatürasyonuna neden olabilir. Bunu engellemek için tampon çözelti kullanılmalıdır [45].

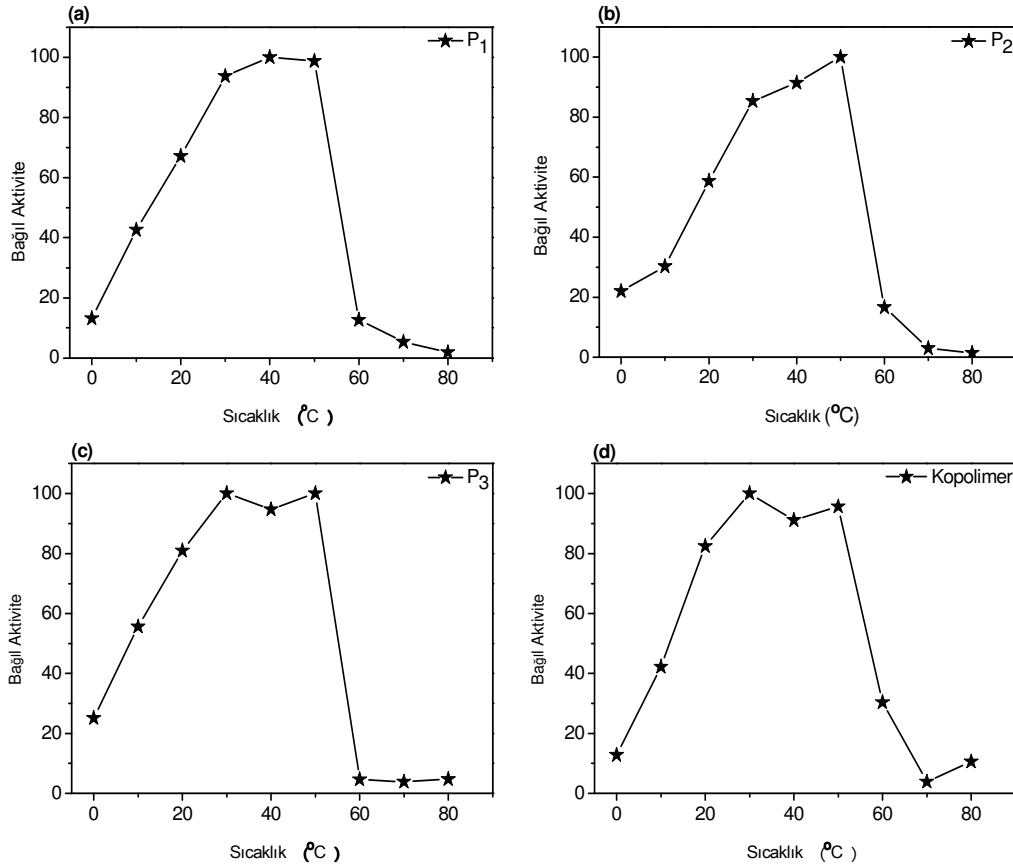
İmmobilize invertazın pH değişimine karşı aktivitesi incelenmiştir. Daha önceden yapılan çalışmada serbest ve polipirol-immobilize invertazın optimum pH'sı sırasıyla 4.6 ve 5.0 olarak belirlenmiştir [54,67]. Bu çalışmada ise her bir kompozit polimer-immobilize invertaz elektrodu için optimum pH, 5.0 olarak belirlendi (Şekil 3.3). Serbest invertaza göre immobilize invertazın pH'sının bazık alana kaydığı gözlenmiştir. Bu değişim destek matrisin yapısından olabileceği gibi immobilizasyon metodu sonucu enzim moleküllerinin konformasyonel değişiminden de kaynaklanabilir. Ayrıca asidik yapıda ki enzimin mikroçevresinin pH'sının ölçüm alınan noktanın pH'sından farklı olmasından kaynaklanmış olabilir.



Şekil 3.3. pH' nın immobilize invertazın aktivitesi üzerinde etkisi a) P<sub>1</sub>, b) P<sub>2</sub>, c) P<sub>3</sub> d) kopolimer.

### 3.4. ENZİM AKTİVİTESİNE SICAKLIĞIN ETKİSİ

P/PPy kompozit polimer matrisine immobilize edilmiş enzim elektrotların sıcaklık değişimine karşı davranışı incelendi. Sıcaklık değişiminin enzim aktivitesine etkisi Şekil 3.4’de verilmiştir. İmmobilize enzimin maksimum aktivitesi 30 °C ve 50 °C arasında gözlenmektedir. Serbest invertaz için ise daha önceden yapılan çalışmalarda optimum sıcaklık 50 °C olarak belirtilmiştir [8]. Kompozit matris kararlılık bakımından optimum sıcaklıkta bir farka neden olmamıştır. P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> ve kopolimer kompozitleri sıcaklık değişimine karşı aynı davranışı göstermişlerdir. Optimum sıcaklığın serbest invertaza göre değişimi hapsetme metoduyla enzimde oluşabilecek fiziksel değişimlerden kaynaklanmış olabilir.



Şekil 3.4. Sıcaklığın immobilize invertazın aktivitesi üzerinde etkisi a) P<sub>1</sub>, b) P<sub>2</sub>, c) P<sub>3</sub> d) kopolimer.

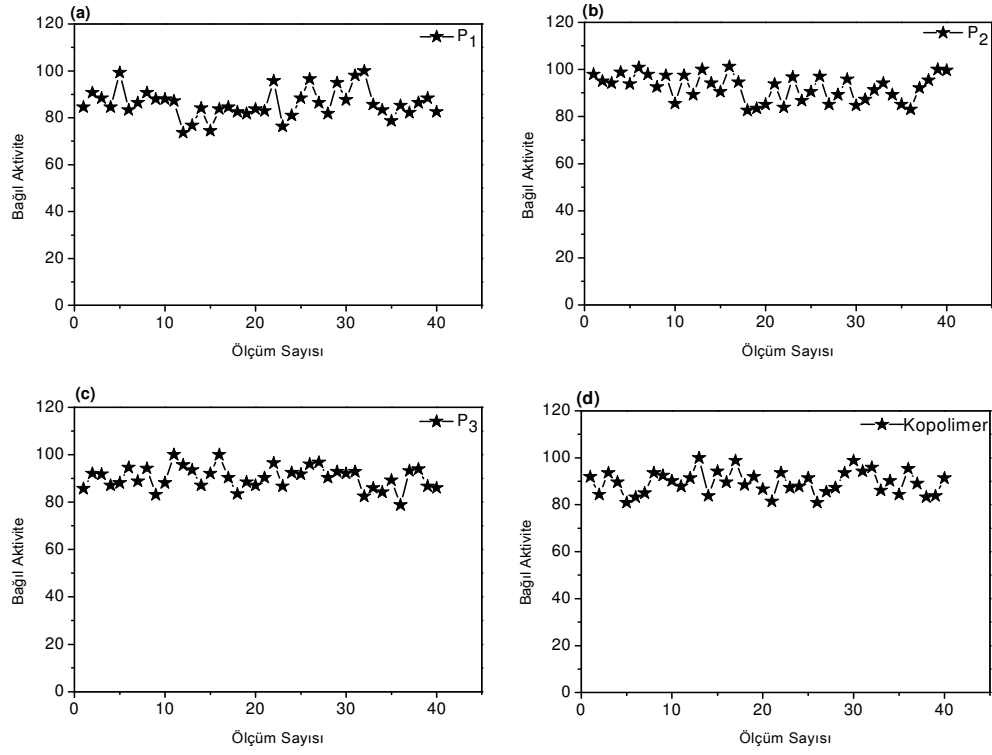
Bütün kimyasal reaksiyonlarda olduğu gibi enzimatik reaksiyonlarda da sıcaklık arttıkça tepkime hızı artar. Ancak belli bir sıcaklık değerinden sonra enzim yapısında meydana gelen denatürasyon nedeniyle aktivite düşüşü gözlenir. Sıcaklık arttıkça enzim moleküllerinin önce tersiyer yapısı, daha sonra sekonder yapısı (alfa sarmal yapı) bozulur. Bu nedenle enzimin aktif merkezi etkilenir ve enzim aktifliğini yitirir [61]. Şekilde görüldüğü gibi polimer matris içindeki invertazın aktivitesi sıcaklık arttıkça azalmaya başladı ve 80 °C’de enzim denatüre oldu. İvertaz enzimi için yapılan optimum sıcaklık çalışması literatürdeki çalışmalarla paralellik içindedir [65,67,68].

### **3.5. ENZİM ELEKTROTLARININ ÇALIŞMA KARARLILIĞI VE RAF ÖMRÜ**

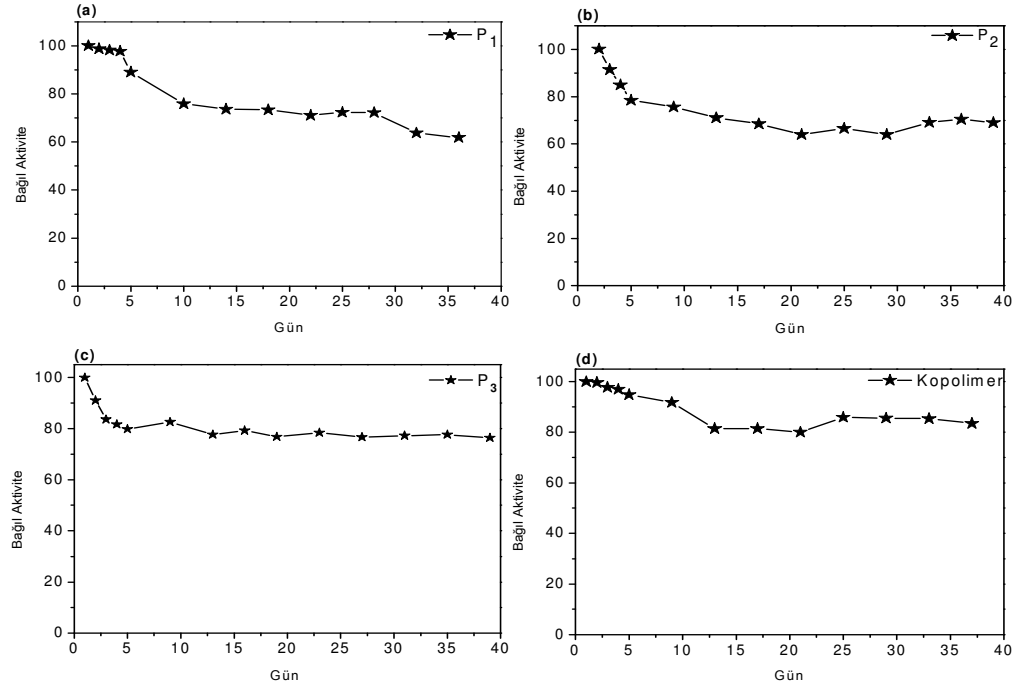
Aynı gün içinde ardı ardına yapılan 40 ölçümle enzim elektrotlarının çalışma kararlılığı, 25 °C’de, pH 5.0’te ve 10K<sub>m</sub> sükröz konsantrasyonunda belirlendi.

İvertazın immobilizasyonu ile hazırlanan P/PPy kompozit elektrotlarının enzim aktivitelerine ardarda alınan 40 ölçümle bakıldığında dalgalanmalar gözlenirse de enzim elektrotları kararlılığını sürdürmüştür (Şekil 3.5). İmmobilize enzim çoklu kullanım sağlarken, serbest enzim herhangi bir denatürasyon olmaksızın bir kez kullanılabilir [63].

Enzim elektrotlarının ne sürede aktivitelerini kaybettiklerini belirlemek amacıyla 40 günlük periyot süresinde, üç günde bir olmak koşuluyla aktivite tayini yapılmıştır. P<sub>1</sub> ve P<sub>2</sub> enzim elektrotları başlangıç aktivitelerinin % 40’ını kaybederken, benzer yapıdaki P<sub>3</sub> ve kopolimer elektrotları başlangıç aktivitelerinin % 20’sini kaybetmiştir (Şekil 3.6). Enzim aktivitelerinde ilk 5 günde ani düşüş enzimin desorpsiyonundan, immobilizasyon sırasında olabilecek yapısal değişimlerden veya destek materyalin aşınımından kaynaklanmış olabilir. Serbest enzimin aktivitesinin tamamını 8 gün içinde kaybettiği önceki çalışmalardan bilinmektedir [63]. Aktivitedeki bu azalış zamana bağlı doğal bir kayıptır ve immobilizasyon sayesinde önemli ölçüde engellenmiştir.



Şekil 3.5.İnvertaz elektrotlarının çalışma kararlılığı a) P<sub>1</sub>, b) P<sub>2</sub>, c) P<sub>3</sub> d) kopolimer.



Şekil 3.6.İnvertaz elektrotların raf ömrü a) P<sub>1</sub>, b) P<sub>2</sub>, c) P<sub>3</sub> d) kopolimer.

## BÖLÜM 4

### SONUÇ

- Dört farklı DAD tipi iletken polimerle enzim sensörü hazırlandı ve aktiviteleri karşılaştırıldı. Optimum sıcaklık, pH değerleri belirlendi. Çalışma kararlılığı ve raf ömrü tayinleri yapıldı.
- P<sub>3</sub> enzim elektrodu P<sub>1</sub> ve P<sub>2</sub> enzim elektrotları arasında bir aktivite gösterdi.
- Homopolimer (P<sub>3</sub>) ve kopolimerin (M<sub>1</sub> ve M<sub>2</sub>) aktiviteleri karşılaştırıldığında homopolimerin aktivitesinin daha yüksek olduğu gözlemlendi. Kopolimerenzim elektrodu ise, homopolimer enzim elektrodundan daha yüksek afinite gösterdi.
- İnvertaz enzimi DAD tipi polimerlere başarılı bir şekilde immobilize edilerek sensörleri hazırlandı.

## KAYNAKLAR

1. Saçak, M., “Polimer Kimyası”, *Gazi Kitabevi*, Ankara, 2, 426, 427, 432 (2010).
2. Kıralp, S., Çamurlu, P., Özkoç, G., Baydemir, T., Erdoğan, S. ve Doğan, M., “Plastikler”, *ODTÜ Yayıncılık*, Ankara, 101 (2006).
3. Shirakawa, H., Louis, E.J., MacDiarmid, A.G., Chiang, C.K. and Heeger, A.J., “Synthesis of Electrically Conducting Organic Polymers: Halogen Derivatives of Polyasetylene”, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 474: 578- 580 (1977).
4. Chiang, C. K., Fincher, C. R., Park, Jr., Y. W., Heeger, A. J. and Shirakawa, H., Louis, E. J., Gau, S. C. and MacDiarmid, Alan G., “Electrical Conductivity in Doped Polyasetylene”, *Phys. Rev. Letters*, 39 (17): 1098- 1101 (1977).
5. Fried, J.R., “Polymer Science and Technology”, *Prentice Hall PTR*, New Jersey, 367-370 (1995).
6. Akpınar, H., Balan, A., Baran, D., Ünver, E.K. and Toppare, L., “Donoreacceptoredonor type conjugated polymers for electrochromic applications: benzimidazole as the acceptor unit”, *Polymer*, 51: 6123-6131 (2010).
7. Şahmetlioğlu, E., “İletken aşı kopolimerlerin sentezi ve bunların enzim tutuklama matrisi olarak kullanılmaları”, Doktora Tezi, *Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Niğde, 3-49 (2004).
8. Kızılyar, N., Akbulut, U., Toppare, L., Özden, M.Y. ve Yağcı, Y., “Immobilization of invertase in conducting polypyrrole/ polytetrahydrofuran graft polymer matrices”, *Synthetic Metals*, 104: 45-50 (1999).
9. Randriamahazaka H., Noel V., Guillerez S. and Chevrot C., “Interpenetrating organic conducting polymer composites based on polyaniline and poly(3,4-ethylenedioxythiophene) from sequential electropolymerization”, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 585: 157-166 (2005).
10. Acar, H., “Potasyum persülfat yükseltgeni kullanılarak iletken polipirol/poliakrilonitril kompozit lif hazırlanması ve karakterizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 14-22 (2008).
11. Khanna P.K., Singh N., Charan S. and Viswanath A.K., “Synthesis of Ag/polyaniline nanocomposite via an in situ photo-redox mechanism”, *Materials Chemistry and Physics*, 92: 214-219 (2005).

12. Trung T., Trung T.H. and Ha C., “Preparation of cyclic voltammetry studies on nickel-nanoclusters containing polyaniline composites having layer-by-layer structures”, *Electrochimica Acta*, 51: 984-990 (2005).
13. Erginer, R., “Immobilization of invertase in pyrrole capped polyazotetrahydrofuran/ polypyrrole and polytetrahydrofuran-block-polystyrene/polypyrrole conducting graft polymer matrices”, Yüksek Lisans Tezi, *Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 4-17 (2000).
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. Emre, F. B., Ekiz, F., Balan, A., Emre, S., Timur, S. and Toppare, L., “Conducting polymers with benzothiadiazole and benzoselenadiazole units for biosensor application”, *Sensors and Actuators B*, 158: 117–123 (2011).
16. Işık, S., “Immobilization of invertase and glucose oxidase in poly 2-(3-thienyl) acetate/ polypyrrole matrices”, Yüksek Lisans Tezi, *Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 9-10, 19-20, 22, 24 (2002).
17. Dizge, N., Günaydın, O., Yılmaz, F. and Tanrıseven, A., “Immobilization of invertase onto poly(3-methylthienyl methacrylate)/ poly(3-thiopheneacetic acid) matrix”, *Biochemical Engineering Journal*, 40: 64-71 (2008).
18. Emre, F. B., “Kolesterol biyosensörü tasarımında bazı polimerik materyallerin enzim immobilizasyon ortamı olarak kullanımı”, Doktora Tezi, *İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Malatya, 3-28 (2007).
19. Mortimer, R. J., Dyer, A. L. and Reynolds, J. R., “Electrochromic organic and polymeric materials for display applications”, *Displays*, 27: 2–18 (2006).
20. Inzelt, G., “Conducting Polymers”, Scholz, F., *Springer*, Budapest, 68-72 (2008).
21. Cesur, E., “Polipirolün asidik çözeltilerde elektrokimyasal olarak eldesi ve karakterizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, *Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Zonguldak, 15-34 (2008).
22. Yiğitsoy, B., Karim, S. M. A., Balan, A., Baran, D. and Toppare, L., “Benzyl substituted benzotriazole containing conjugated polymers: Effect of position of the substituent on electrochromic properties”, *Synthetic Metals*, 160: 2534–2539 (2010).
23. Baran, D., Öktem, G., Çelebi, S. and Toppare, L., “Neutral-state green conjugated polymers from pyrrole bis-substituted benzothiadiazole and benzoselenadiazole for electrochromic devices”, *Macromol. Chem. Phys.*, 212: 799–805 (2011).



24. Balan, A., Baran, D. and Toppare, L., "Benzotriazole containing conjugated polymers for multipurpose organic electronic applications", *Polym. Chem.*, 2: 1029-1043 (2011).
25. Evans, N.R., Devi, L.S., Mak, C.S.K., Watkins, S.E., Pascu, S.I., Kohler, A., Friend, R.H., Williams, C.K. and Holmes, A.B., "Triplet energy back transfer in conjugated polymers with pendant phosphorescent iridium complexes", *J. Am. Chem Soc.*, 128: 6647-6656 (2006).
26. Güneş, S., Baran, D., Günbaş, G., Özyurt, F., Fuchsbauer, A., Sarıçiftçi, N. S. and Toppare, L., "Photovoltaic and photophysical properties of a novel bis-3-hexylthiophene substituted quinoxaline derivative", *Solar Energy Materials & Solar Cells*, 92: 1162– 1169 (2008).
27. Brabec, C.J., Sariciftci, N.S. and Hummelen, "Plastic solar cells", *J. C. Adv. Funct. Mater.*, 11: 15-26 (2001).
28. Baran, D., Balan, A., Celebi, S., Esteban, B.M., Neugebauer, H., Sariciftci, S. and Toppare L., "Processable multipurpose conjugated polymer for electrochromic and photovoltaic application", *Chem. Mater.*, 22: 2978-2987 (2010).
29. Yıldız, S., "Enzimler", *Fakülte Kitabevi*, Isparta, 15-50, 97-108 (2007).
30. Özata, A., "Enzimoloji Ders Notları", *Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları*, Eskişehir, 1-3(2000).
31. Bingöl, G., "Vitaminler ve Enzimler", *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları*, Ankara, 41-45 (1977).
32. Gözükar, E., "Biyokimya, 2", *Nobel Tıp Kitabevleri*, İstanbul, 572-615 (2001).
33. McKee, T., "Biochemistry", *McGraw- Hill*, New York, 163-165 (2003).
34. Palmer, T., "Understanding Enzymes", *Prentice Hall / Ellis Horwood*, London, 70, 107, 113-114, 361-366 (1995).
35. Whitaker, J. R., "Principles of Enzymology For The Food Sciences", *Marcel Dekker, Inc.*, New York, 105, 416-418 (1994).
36. Garret, R. H., "Biochemistry", *Thomson*, Australia, 420-425 (2005).
37. Shuler, M. L., "Bioprocess Engineering", *Prentice Hall*, New Jersey, 74-77, (1992).
38. Başçı, N. E., "Sakkarozun invertaz ile hidroliz kinetiğinin ve invertaz deaktivasyonunun incelenmesi", Yüksek Mühendislik Tezi, *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 15-34 (1985).

39. Turhan,, K. N., “Poli(Phe-Lys) ile modifiye edilen polistiren yüzeylerde invertazın immobilizasyonu ve kinetiğın incelenmesi”, *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 2-24 (1994).
40. Lineweaver, H. and Burk, D., “The determination of enzyme dissociation constants”, *J. Am.Chem. Soc.*, 56: 658-666 (1934).
41. Kotwal, S. M, Shankar, V., “Immobilized invertase”, *Biotechnology Advances*, 27: 311-322 (2009).
42. Palmer, T., “Enzymes”, *Horwood Publishing*, England, 361-370 (2007).
43. Bayramoğlu, G., Yılmaz, M. ve Arica, M. Y., “Immobilization of a thermostable  $\alpha$ -amylase onto reactive membranes: kinetics characterization and application to continuous starch hydrolysis”, *Food Chemistry*, 84: 591–599 (2004).
44. Çelebi, S., İbııkcan, E., Kayahan, S. K., Yiğitsoy, B. and Toppare, L., “Immobilization of invertase in copolymer of 2,5-di(thiophen-2-yl)-1-p-tolyl-1h-pyrrole”, *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 46: 8, 739- 744 (2009).
45. Işıklı, Ş., Tunçağıl, S., Bozkurt, A., Toppare, L., “Immobilization of invertase in a novel proton conducting Poly(vinylphosphonic acid)- poly(1-vinylimidazole) network”, *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 47 (7): 639-646 (2010).
46. Gomez, L., Ramirez, H. L., Cabreea, G., Simpson, B. K. and Villalonga, R., “Immobilization of invertase-chitosan conjugate on hyaluronic-asic-modified chitin”, *Journal of Food Biochemistry*, 32: 264-277 (2008).
47. Kartal, M., “Biosensor based on interpenetrated polymer network of alginate acid and poly (1-Vinylimidazole)”, Yüksek Lisans Tezi, *Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 27-30 (2008).
48. Danışman, T., “İnvertazın poli(HEMA-GMA) membranlarına kovalent olarak tutuklanması ve sürekli sistemlerde sükröz hidrolizi”, Yüksek Lisans Tezi, *Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kırıkkale, 5-23 (2002).
49. Bayramoğlu, G., Karakışla, M., Altıntaş, B., Metin, A. U., Saçak, M. and Arica, M. Y., “Polyaniline grafted polyacrylonitrile conductive composite fiber for reversible immobilization of enzymes: Stability and catalytic properties of invertase”, *Process Biochemistry*, 44: 880- 885 (2009).
50. Nelson, J. M. and Griffin, E. G., “Adsorption of invertase”, *J. Am. Chem. Soc.*, 38: 1109 (1916).
51. Arica, M. Y. ve Bayramoğlu, G., “Invertase reversibly immobilized onto polyethylenimine-grafted poly(GMA-MMA) beads for sucrose hydrolysis”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 38: 131-138 (2006).

52. Arıca, M. Y., “Epoxy-Derived pHEMA membrane for use bioactive macromolecules immobilization: covalently bound urease in a continuous model system”, *Journal of Applied Polymer Science*, 77: 2000–2008 (2000).
53. Akgöl, S., Kaçar, Y., Denizli, A. ve Arıca, M. Y., “Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic polyvinylalcohol microspheres”, *Food Chemistry*, 74: 281- 288 (2001).
54. Tunçağıl, S., Kıralp, S., Varış, S. and Toppare, L., “Immobilization of invertase on a conducting polymer of 1-(4-nitrophenyl)-2,5-di(2-thienyl)-1H-pyrrole”, *Reactive & Functional Polymers*, 68: 710-717 (2008).
55. Rebroš, M., Rosenberg, M., Mlichová, Z. and Křištofíková, L., “Hydrolysis of sucrose by invertase entrapped in polyvinyl alcohol hydrogel capsules”, *Food Chemistry*, 102: 784-787 (2007).
56. Emregül, E., Sungur, S. and Akbulut, U., “Polyacrylamide–gelatine carrier system used for invertase immobilization”, *Food Chemistry*, 97: 591–597 (2006).
57. Evtungyn, G.A., Budnikov, H.C. and Nikolskaya, E. B., “Sensitivity and selectivity of elektrochemical enzyme sensors for inhibitor determination”, *Talanta* 46: 465–484 (1998).
58. David, A. E., Wang, N. S., Yang, V. C. and Yang, A. J., “Chemically surface modified gel (CSMG): An excellent enzyme-immobilization matrix for industrial processes”, *Journal of Biotechnology*, 125: 395–407 (2006).
59. Sahmetlioğlu, E., Yürük, H., Toppare, L., Cianga, I. and Yağcı, Y., “Immobilization of invertase and glucose oxidase in conducting copolymers of thiophene functionalized poly(vinyl alcohol) with pyrrole”, *Reactive & Functional Polymers*, 66: 365–371 (2006).
60. Cadena, P. G., Jeronimo, R. A. S., Melo, J. M., Silva, R. V., Filho, J.L. L. and Pimentel, M.C.B., “Covalent immobilization of invertase on polyurethane, plast-film and ferromagnetic Dacron”, *Bioresource Technology*, 101: 1595–1602 (2010).
61. Hızır, M., “Poli(2-Hidroksietil Metakrilat-İtakonik Asit) taneciklerine kovalent bağlanma ile invertazın immobilizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 10-36 (2006).
62. Reddy, A. and Maley, F., “Studies on identifying the catalytic role of glu-204 in the active site of yeast invertase”, *The Journal of Biological Chemistry*, 271: 13953–13958 (1996).

63. Kartal, M., Kayahan, S. K., Bozkurt, A. and Toppare, L., “Entrapment of invertase in an interpenetrated polymer network of alginic acid and poly(1-vinylimidazole)”, *Talanta*, 77: 659-662 (2008).
64. Sendur, M., Balan, A., Baran, D., Karabay, B. and Toppare L., “Combination of donor characters in a donor–acceptor–donor (DAD) type polymer containing benzothiadiazole as the acceptor unit”, *Org. Electron.*, 11: 1877-1885 (2010).
65. Çirpan, A., Alkan, S., Toppare, L., Hepuzer, Y. and Yagci, Y., “Immobilization of invertase in conducting copolymers of 3-methylthienyl methacrylate”, *Bioelectrochem.*, 59: 29-33 (2003).
66. Nelson, N., “A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose”, *J. Biological Chemistry*, 153: 375-380 (1944).
67. Alkan, S., Toppare, L., Yagci, Y. and Hepuzer, Y., “Immobilization of invertase in conducting thiophene-capped poly(methylmethacrylate)/polypyrrole matrices”, *J. Biomat. Sci-Polym. E.*, 10: 1223-1235 (1999).
68. Gürsel, A., Alkan, S., Toppare, L. and Yağcı, Y., “Immobilization of invertase and glucose oxidase in conducting H-type polysiloxane/polypyrrole block copolymers”, *Reactive & Functional Polymers*, 57: 57–65 (2003).

## ÖZGEÇMİŞ

Sevda AYDAR 1987 yılında Çankırı'da doğdu; ilk ve orta öğrenimini aynı şehirde tamamladı; Çankırı Lisesi'nden mezun olduktan sonra 2005 yılında OMÜ Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'ne girdi; 2009'da mezun olduktan sonra aynı yıl Karabük Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Programına başladı.

### **ADRES BİLGİLERİ**

Adres : Aktekke Mah. Seheryeli Sok.  
Bahar Apt. No: 3 Merkez / KASTAMONU

Tel : 0 (366) 214 27 75  
0 536 614 44 14

E-posta : sevda.aydar@gmail.com