

**T.C.
NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**POLİSTİREN DESTEKLİ SCHIFF BAZI VE METAL
KOMPLEKSİ ÜZERİNE ENZİM İMMOBİLİZASYONU**

**Tezi Hazırlayan
Murat GÜLEÇ**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Dilek NARTOP**

**Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Ocak 2016
NEVŞEHİR**

Doç. Dr. Dilek NARTOP danışmanlığında **Murat GÜLEÇ** tarafından hazırlanan “**Polistiren Destekli Schiff Bazı ve Metal Kompleksi Üzerine Enzim İmmobilizasyonu**” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

13/01/2016

JÜRİ

İmza

Başkan : Doç. Dr. Aslıhan KARATEPE

Üye : Yrd. Doç. Dr. Nalan ÖZDEMİR

Danışman : Doç. Dr. Dilek NARTOP

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun **21.01.2016**...tarih ve **02.21**..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

1002/2016
Doç. Dr. Şahlan ÖZTÜRK
Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİM SAYFASI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada yer alan bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu ve bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.


Murat GÜLEÇ

TEŞEKKÜR

Tez danışmanım ve değerli hocam Doç. Dr. Dilek NARTOP'a emeklerinden ve desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim. Ayrıca ders döneminde emeği geçen hocalarım sayın Prof. Dr. Fatma KARİPCİN ve sayın Doç. Dr. Aslıhan KARATEPE'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuar çalışması sırasında bana kapılarını açan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Nurşen SARI'ya, ayrıca deneyler esnasında yardımlarını esirgemeyen kıymetli hocalarım Arş. Gör. Nurdan KURNAZ YETİM ve doktora öğrencisi Elvan HASANOĞLU ÖZKAN' a çok teşekkür ederim.

Ankara'da beni misafirperverliği ile çok mutlu ve mahçup eden Emine halama ve Nuri enişteme teşekkür ederim.

Ders döneminde ve tez aşamasında desteğini esirgemeyen kıymetli eşim Zeynep'e, ayrıca Sibel YAVUZ'a, çocuklarım Yavuz Efe'ye ve Elif'e çok teşekkür ederim.

Murat GÜLEÇ
Nevşehir, Ocak 2016

POLİSTİREN DESTEKLİ SCHIFF BAZI VE METAL KOMPLEKSİ ÜZERİNE ENZİM İMMOBİLİZASYONU

(Yüksek Lisans Tezi)

Murat GÜLEÇ

**NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ,
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Ocak 2016**

ÖZET

Tez çalışması kapsamında, öncelikle, (aminometil)polistiren (AMP), tereftaldehit (TA) ve 2-amino-4-metilfenol'ün ($\text{CH}_3\text{-AF}$) kondenzasyon reaksiyonu sonucu yeni bir polimer tabanlı Schiff bazı ve bu ligantın Pt(IV) kompleksi sentezlendi. Bileşiklerin yapıları element analizi, FT-IR, $^1\text{H-NMR}$, TGA ve SEM analizleri ile karakterize edildi. İkinci olarak, modifiye olmuş 2 polimere glukoz oksidaz (GO_x) enziminin immobilizasyonu adsorpsiyon yöntemi ile gerçekleştirilerek, serbest ve immobilize GO_x enzimi üzerine sıcaklık ve pH parametrelerinin etkisi incelendi. (AMP-TA-MAF) ve (AMP-TA-MAF-Pt)'e immobilize edilen glukoz oksidaz enziminin optimum pH değeri 8 olarak belirlendi. (AMP-TA-MAF) ve (AMP-TA-MAF-Pt)'e immobilize edilen enzimin iki optimum sıcaklık değeri ise sırasıyla $30\text{ }^\circ\text{C}$ / $70\text{ }^\circ\text{C}$ ve $40\text{ }^\circ\text{C}$ / $70\text{ }^\circ\text{C}$ olarak bulundu.

Anahtar Kelimeler: (Aminometil)polistiren, tereftaldehit, immobilizasyon, glukoz oksidaz

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Dilek NARTOP

Sayfa Adeti: 45

**ENZYME IMMOBILIZATION ON
POLYSTYRENE BASED SCHIFF BASE AND ITS METAL COMPLEX**

(M. Sc. Thesis)

Murat GÜLEÇ

**NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ UNIVERSITY,
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
January 2016**

ABSTRACT

In this study, firstly, a new polymer-based Schiff base and its Pt(IV) complex were synthesized by means of condensation reacting (aminomethyl)polystyrene (AMP), terephthaldehyde (TA) and 2-amino-4-methylphenol. The structures of the compounds were characterized by elemental analysis, of FT-IR, ¹H-NMR, TGA and SEM analysis. Secondly, glucose oxidase enzyme (GOx) were immobilized on the modified polymers with using the adsorption method. The effect of pH and temperature parameters on the free and immobilized GOx enzyme was examined. The optimum pH value for immobilized glucose oxidase enzyme on (AMP-TA-MAF) and (AMP-TA-MAF-Pt) were determined as 8. The optimum temperature values for immobilized enzyme on (AMP-TA-MAF) and (AMP-TA-MAF-Pt) were found two optimum temperature 30 °C / 70 °C and 40 °C / 70 °C, respectively.

Keywords: (Aminomethyl) polystyrene, terephthaldehyde, immobilization of glucose oxidase

Supervisor of Thesis: Assoc. Prof. Dr. Dilek NARTOP

Page Number: 45

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
TEZ BİLDİRİM SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
RESİMLER LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	xiii
1.BÖLÜM	
GİRİŞ	1
2.BÖLÜM	3
KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1.Schiff Bazları	3
2.2.Polimerler	4
2.3. Polimer İçeren Schiff Bazları	5
2.4. Enzim	5
2.4.1 Glikoz oksidaz enzimi	7
2.5. Enzim immobilizasyonu	9
2.5.1. Enzim immobilizasyon yöntemleri	9
2.5.1.1. Kimyasal yöntemler	10
2.5.1.2. Fiziksel yöntemler	12
2.6. Literatür Araştırması	14
3. BÖLÜM	18
MATERYAL VE METOT	18
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	18

3.2. Cihazlar	18
3.2.1. pH metre	18
3.2.2. Çalkalamalı su banyosu	18
3.2.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	18
3.2.4. Ultraviyole-görünür bölge spektrofotometresi (UV-GB).....	19
3.2.5. Infrared spektrofotometresi (FT-IR)	19
3.2.6. Nükleer manyetik rezonans spektrofotometresi (¹ H-NMR)	19
3.2.7. Termal Analiz Cihazı (TGA)	19
4. BÖLÜM	20
DENEYSEL BÖLÜM	20
4.1. Polimer Tabanlı Schiff Bazının Hazırlanması (Genel Yöntem)	20
4.1.1. (AMP-TA-MAF) polimerinin sentezi	20
4.2. Polimer Tabanlı Schiff Bazı Kompleksinin Hazırlanması (Genel Yöntem).....	20
4.2.1. (AMP-TA-MAF-Pt) polimerinin sentezi	21
4.3. (AMP-TA-MAF) ve (AMP-TA-MAF-Pt) Polimerlerinin İmmobilizasyon Çalışması	21
4.3.1. İmmobilizasyonda kullanılan tampon çözeltilerin hazırlanışı	21
4.3.2. β-glukoz oksidaz enziminin immobilizasyonu	22
4.3.3. Serbest β-glukoz oksidaz enzim aktifliği üzerine pH etkisi	22
4.3.4. İmmobilize edilen β-glukoz oksidaz aktifliği üzerine pH etkisi	23
4.3.5. Serbest β-glukoz oksidaz enzim aktifliği üzerine sıcaklık etkisi	23
4.3.6. İmmobilize edilen β-glukoz oksidazın aktifliği üzerine sıcaklık etkisi	23
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	24
5.1. Sonuçlar	24
5.1.1. Polimer Tabanlı Schiff Bazlarının Karakterizasyonu	24
5.1.1.1 (AMP-TA-MAF) polimeri	25
5.1.1.2 (AMP-TA-MAF-Pt) polimeri	27
5.1.2. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Karakterizasyonu	28

5.1.2.1. Serbest β -glukoz oksidaz enzimi	28
5.1.2.1.1. pH etkisi	28
5.1.2.1.2. Sıcaklık etkisi	29
5.1.2.2. İmmobilize edilen β -glukozoksidaz enzimi	29
5.1.2.2.1. pH etkisi	29
5.1.2.2.2. Sıcaklık etkisi	30
5.2. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Öneriler	32
KAYNAKLAR	36
ÖZGEÇMİŞ	45

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 5.1 Bileşiklerin bazı fiziksel ve analitik özellikleri	24
--	----

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Schiff bazının oluşum mekanizması	3
Şekil 2.2. Enzimin tepkime kinetiğine etkisi	6
Şekil 2.3. Enzim mekanizması	6
Şekil 2.4. Substrat konsantasyonu ile reaksiyon hızı ilişkisi	7
Şekil 2.5. Glukozun GOx katalizörlüğünde O ₂ ve H ₂ O reaksiyonu	8
Şekil 2.6. Kovalent bağlanma kimyasal yöntemi ile enzim immobilizasyon gösterimi.....	11
Şekil 2.7. Çapraz bağlanma yöntemi ile enzim immobilizasyon gösterimi	11
Şekil 2.8. Adsorpsiyon yöntemi ile enzim immobilizasyon gösterimi	12
Şekil 2.9. Enzimin taşıyıcı içerisinde tutuklanması	13
Şekil 2.10. Enzimin kapsül içinde hapsedilmesi	13
Şekil 5.1. (AMP-TA-MAF) polimerinin IR spektrumu	25
Şekil 5.2. (AMP-TA-MAF) polimerinin ¹ H-NMR spektrumu	26
Şekil 5.3. (AMP-TA-MAF-Pt) polimerinin IR spektrumu	27
Şekil 5.4. Serbest GOx enzim aktivitesi üzerine pH etkisi.....	28
Şekil 5.5. Serbest GOx enzim aktivitesi üzerine pH:5'deki sıcaklık etkisi.....	29
Şekil 5.6. (AMP-TA-MAF) polimeri enzim aktivitesi üzerine pH etkisi.....	30
Şekil 5.7. (AMP-TA-MAF-Pt) polimeri enzim aktivitesi üzerine pH etkisi	30
Şekil 5.8. (AMP-TA-MAF) polimeri enzim aktivitesi üzerine pH:8' deki sıcaklık etkisi.....	31
Şekil 5.9. (AMP-TA-MAF-Pt) polimeri enzim aktivitesi üzerine pH:8' deki sıcaklık etkisi.....	32
Şekil 5.10. Modifiye polimerler için öngörülen yapılar	32
Şekil 5.11 (AMP-TA-MAF) modifiye polimeri ile Glukoz oksidaz enzimi arasındaki öngörülen hidrojen bağ oluşumu.....	34

Şekil 5.12. (AMP-TA-MAF-Pt) modifiye polimeri ile Glukoz oksidaz enzimi
arasındaki öngörülen koordine kovalent bağ oluşumu34

RESİMLER LİSTESİ

Resim 5.1. Sentezlenen modifiye polimerlerin katı hal görüntüleri	24
Resim 5.2 (AMP) polimeri (a) ve (AMP-TA-MAF) polimeri (b) SEM görüntüsü ..	26
Resim 5.3. (AMP-TA-MAF-Pt) polimerinin SEM görüntüsü	28
Resim 5.4. (AMP-TA-MAF) polimerinin pH:8 için iki optimum sıcaklıktaki ürün görüntüleri.....	31
Resim 5.5. (AMP-TA-MAF-Pt) polimerinin pH:8 için iki optimum sıcaklıktaki ürün görüntüleri.....	32
Resim 5.6. Glukoz oksidaz enziminin iki boyutlu görüntüsü	33

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ν	Gerilme titreşimi
λ	Dalga Boyu
β	Beta
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
UV-GB	Ultraviyole-Görünür Bölge
IR	Infrared (Kırmızı ötesi)
TGA	Termogravimetrik Analiz
SEM	Taramalı Elektron Misroskobu
AMP	(Aminometil)polistiren
(AMP-TA-MAF)	(Aminometil)polistiren-Tereftaldehit-2-amino-4- metilfenol
(AMP-TA-MAF-Pt)	(Aminometil)polistiren-Tereftaldehit-2-amino-4- klorfenol- Platin(IV)

1. BÖLÜM

GİRİŞ

Enzimler, ılımlı koşullarda reaksiyonu hızlandıran biyomoleküllerdir [1]. Glukoz oksidaz (GOx) ise kararlılığı ve dayanıklılığı nedeniyle büyük ilgi gören önemli bir enzimdir [2]. GOx enzimi *Penicillium adametzii*, *Penicillium funiculosum* ve *Aspergillus niger*'dan elde edilir [3]. Enzimleri doğal yapılarında biyokimyasal, biyomedikal, biyoteknolojide kullanmak avantajlı değildir [4]. Bu yüzden enzimler uygun bir desteğe bağlanır. Burada amaçlanan, enzimlerin verim, depolama ve kullanım kolaylığı sağlamasıdır [5]. Böylece enzimler kararlılıklarını koruyarak tekrar kullanılabilirler. İmmobilizasyon olarak adlandırılan bu işlemde, enzimler çeşitli fiziksel ya da kimyasal yöntemlerle aktivitelerini koruyarak, tekrar ve sürekli kullanımını sağlamak amacıyla organik veya inorganik taşıyıcılara tutturulurlar [6].

İmmobilizasyonda, kullanılan destek oldukça önemlidir. Destek, katalizör kullanımını en aza indirmek, katalizörün etkinliğini artırmak ve daha iyi bağlanmasını sağlamak için kullanılır [7]. Kullanılacak desteğin bazı özelliklere sahip olması gerekmektedir. Hidrofilik olmalı, yüksek yüzey alanı olmalı, gözenekli olmalı, mekanik ve kimyasal olarak kararlı olmalıdır [8]. Ayrıca desteğin boyutu ve yüzey morfolojisi de immobilizasyon için çok önemlidir [9]. Mekanik ve termal kararlılığından dolayı Schiff bazları içeren polimerlerin destek olarak kullanılmaları tercih edilir. Bu polimerlerin dayanıklılığını artırmak için, çeşitli metal iyonları da kullanılır.

İmmobilizasyonun önemli bir diğer basamağı ise seçilen metottur. Mevcut çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemlerden en çok tercih edileni kovalent bağlanmadır. Enzimin aktivitesini artırabilmesi, bağların güçlü olması, enzim-substrat etkileşmesinin kolay olması kovalent bağlanmanın tercih nedenlerinden bazılarıdır [10].

Schiff bazları içeren polimerlerin enzim immobilizasyonunda, destek olarak kullanılmaları avantajlıdır [11,12]. Bu polimerlerin dayanıklılığını artırmak için, çeşitli metal iyonları da kullanılabilir. Buradan yola çıkarak, tez kapsamında, polimer destekli Schiff bazı ve metal kompleksi üzerine enzim immobilizasyon etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir.

Çalışmada, birinci adım olarak, (aminometil)polistiren, tereftaldehit ve 2-amino-4-metilfenol'ün katılma-ayırılma reaksiyonu sonucu polimer destekli Schiff bazı ile Pt(IV) kompleksi sentezlendi. İkinci adım olarak ise bu modifiye edilmiş polimerler üzerine kovalent bağlanma ile glukoz oksidaz enziminin immobilizasyonu gerçekleştirildi. Son adım olarak ise immobilize enzim ile serbest enzim üzerine sıcaklık ve pH parametrelerinin etkisi incelendi.

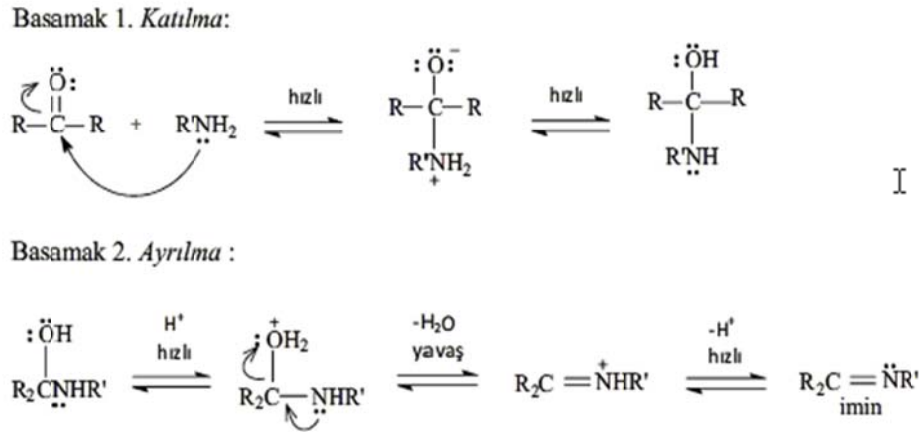
2. BÖLÜM

KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Schiff Bazları

Schiff bazları ilk defa 1864 yılında Hugo Schiff tarafından primer aminler ile karbonil bileşiklerinin reaksiyonundan sentezledi [12]. Bu bileşiklerin ortak özelliği azometin (imin) grubu içermesi ve genel formüllerinin $R-HC=N-R$ olmasıdır [13].

Schiff bazı oluşum reaksiyonu, iki basamaklıdır. Birinci basamakta, primer aminle karbonil grubu kondenzasyonu ile karbonil amin ara bileşiği oluşur. Yani nükleofilik aminin pozitif yük taşıyan karbonil karbonuna katılması, sonra azotun kaybettiği protonun oksijene bağlanmasıdır. İkinci basamakta ise ara bileşikten su çıkışı yani protonlanmış OH grubu su olarak ayrılır ve Schiff bazı oluşur [14].



Schiff bazları organik bileşiklerin önemli bir üyesi olup, çok fazla ilginç özelliklere sahiptirler. Bu özellikleri nedeniyle tıpta, tarımda, petrol, ilaç alanlarında ve malzeme bilimlerinde kullanılır [15]. Schiff bazları önemli bir ligand sınıfıdır. Geçiş metal iyonları ile çok dişli ligand olarak bağlanarak koordinasyon polimerlerini oluştururlar [16]. Schiff bazları ve metal kompleksleri ters olarak

oksijen bağlanma ile elektrokimyasal indirgeme reaksiyonları ve oksitlenme reaksiyonları için katalizör olarak kullanılırlar [17]. Çeşitli geçiş metal kompleksleri ile bazı Schiff bazlarının azot, oksijen donör atomları biyolojik sistemlerde önemli rol oynarlar ve verimli bir şekilde diazot ve dioksijenin indirgenmesini katalizlerler. Ayrıca Schiff bazlarının makrosiklik türevleri fotosentez gibi temel biyolojik fonksiyonlara sahiptirler. Bu özelliklerinden ötürü memelilerde ve diğer solunum sistemlerinde oksijen taşırlar [18]. İnorganik kimyada kararlı metal kompleksleri oluşturmaları sebebiyle Schiff bazları aynı zamanda biyoinorganik kimyanın gelişimi ile yakından ilgili olup, mantar ve bakterilere karşı aktiviteleri önemlidir [19, 20]. Schiff bazı türevleri antibakteriyel, antifungal, antikanser ve sıtmaya karşı etkilidirler [21]. Ayrıca Schiff bazları, yapılarında bulunan atom ve atom gruplarından ötürü renkli madde özelliği taşımaları sebebiyle tekstilde boya pigmenti olarak kullanılırlar [22].

2.2. Polimerler

Monomerlerin birbirlerine kovalent bağlar ile bağlanması sonucu meydana gelen büyük moleküller polimer olarak adlandırılırlar. Polimerleri oluşturan küçük moleküller monomer adını alır. Çok sayıdaki monomerlerin polimerizasyon tepkimesi ile polimerler oluşurlar [23].

Polimerler elastik özellik gösteren polimerler (elastomer), benzer lif yapısından oluşan polimerler (elyaf), ince tabaka haline getirilebilen elastik özellik gösteren polimerler (plastik) şeklinde gruplar içerirler [24].

Polimerler, sentezlenme yöntemlerine göre, kondenzasyon (basamaklı) polimerizasyonu, katılma (zincir) polimerizasyonu ve koordinasyon polimerizasyonu şeklinde genel olarak üç ana gruba ayrılırlar. Katılma polimerizasyonu ise radikalik katılma polimerizasyonu ve iyonik katılma polimerizasyonu (anyonik katılma/katyonik katılma) olmak üzere gruplandırılır [23].

2.3. Schiff Bazı İçeren Polimerler

Yapısında (-CH=N-) bulunan polimerler, polimerik-Schiff bazları (poliiminler) olarak adlandırılırlar. 1957 yılından beri yaygın olarak incelenmişlerdir [25]. Bu polimerler genellikle kondenzasyonla bir diimin ve hidrazin ile bir dialdehit ya da diketondan sentezlenir. İlk polimerik-Schiff bazı, 1923 yılında tereftalik aldehit ile benzidin veya o-anisidinin kondenzasyon reaksiyonu ile elde edilmiştir. Polar (C=N) bağından kaynaklanan güçlü zincir-zincir etkileşiminden dolayı polimerik-Schiff bazlarının çoğu çözünür değildir [26]. Bu yüzden enzim immobilizasyonunda destek maddesi olarak kullanılırlar. pH sensörleri, ışık yayan diyotlar diğer kullanım alanları arasındadır. Metal iyonları ile komplekslerinin elde edilmesi ile bu tür polimerlerin kullanım alanları daha da genişletilmiştir. Kompleksleşmede metal iyonlarının seçimi, ligandın diyazni, karşı iyonlar ve çözücüler etkilidir [27]. Metal iyonları bağlandıkları polimerlere termal kararlılık ve geliştirilmiş kimyasal direnç sağlarlar [28]. Optik, elektriksel ve katalitik özellik katarlar [29]. Boya ve katalizörlerde kullanılırlar [30]. Bu tür polimerlerden sıvı kristal olanları düşük çözünürlük, yüksek erime sıcaklığına sahiptirler [16]. Antimikrobiyal, antifungal ve antikanser özelliğe sahiptirler ve sıtmaya karşı etkilidirler [21]. Güneş enerji konvertörlerinde ve SO_x ve NO_x'i çevreden uzaklaştırmada kullanılmaları da önemli uygulamaları arasındadır [16].

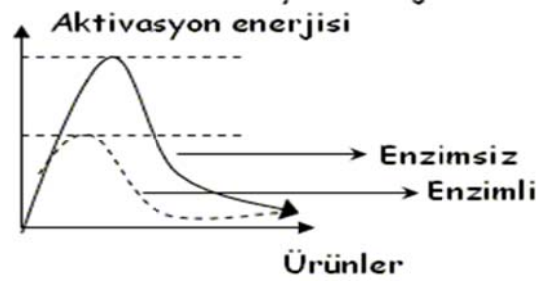
2.4. Enzim

Enzimler kimyasal reaksiyonları katalize eden, hızlandıran proteinlerdir [31]. Bunu reaksiyonun aktivasyon enerjisini düşürerek yaparlar ve reaksiyon verimi %100 dür. Reaksiyon hızını minimum 10⁶ hızlandırır ve reaksiyon sonunda harcanmadan çıkarlar. Enzimler 4000'den fazla biyokimyasal tepkimeyi katalizlemektedirler [11].

Her enzimin aktivitesinin maksimum olduğu pH ve sıcaklık vardır. Bu değer in altında veya üstünde aktiviteleri düşer. Örneğin enzimler 0-40°C arasında reaksiyon hızını artırır. Sıcaklık 40°C nin üzerine çıktığında enzimin yapısı zarar görür ve

aktivitesi düşer. Sıcaklık 60°C nin üzerine çıktığında ise enzim tamamen bozulmuş olur [31].

Büyük molekül ağırlığına sahip biyolojik katalizör olan enzimler, tepkimenin termodinamiğini etkilemeyip, tepkimenin kinetiğini etkilerler [12].



Şekil 2.2. Enzimin tepkime kinetiğine etkisi

Endüstride kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilir. Bunun nedeni olarak, mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin, bitkisel ve hayvansal enzimlere göre katalitik etkilerinin yüksek olması, olumsuz yan ürünler oluşturmamaları, ucuz olmaları ve fazla miktarda elde edilmeleri söylenebilir [31].

Her enzimin bağlandığı özel bir substratı vardır. Substrat, enzimin kimyasal olarak tanıdığı ve bağlandığı maddedir. Örneğin trombin enzimi arginin ve glisin arasında olan peptit bağının kırılmasını katalize ederek bu reaksiyonu hızlandırır. Enzimin substrata bağlandığı bölgelerine ise aktif bölge denir. Bu bölgelerde enzim-substrat uyumu ilk temasta hemen olmaz. Uyum substrattaki bazı bağlar kullanılarak gerçekleştirilir [32].



Şekil 2.3. Enzim mekanizması

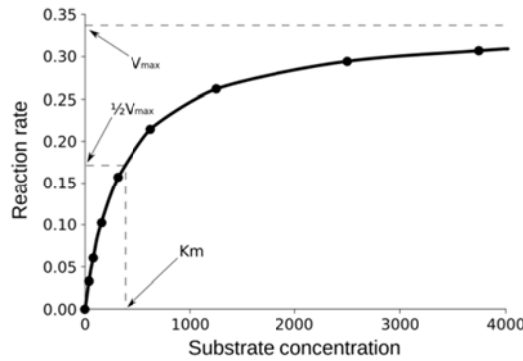
Düşük substrat konsantrasyonunda reaksiyon hızı substrat konsantrasyonuna bağlantılı olarak artar. Substrat konsantrasyonu artırıldığı zaman reaksiyon artış hızında azalma olur. Burada substrat konsantrasyonu daha da artırılırsa hız sabit kalır. Bunun sebebi enzimlerin tamamının substrat ile birleşmesidir. Bu olaya doyma adı verilir. Enzimlerin reaksiyon hızını artırmasının sebepleri olarak aşağıdakiler söylenebilir:

-Enzim substrata bağlanarak, parçalanacak bağa yakın durarak ara ürünün oluşumunu kolaylaştırır.

-Bazı enzimler substrat ile zayıf kovalent bağ oluşturarak reaksiyonu hızlandırırlar.

-Enzimin proton alıcı veya verici özelliği varsa asit veya baz reaksiyonlarını katalizler.

-Enzim substrattaki parçalanacak bağın zayıflamasını sağlayarak bağın şeklini bozar. Bu yüzden bağ daha kolay kopar ve reaksiyon hızlanır [33].



Şekil 2.4. Substrat konsantrasyonu ile reaksiyon hızı ilişkisi

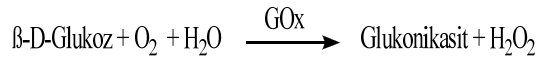
Enzimin hangi substratla çalışılacağını saptayan apoenzim kısmıdır. Apoenzim enzimlerin protein kısmı olup substrat ile ilişkilidir. Enzimlerin protein olmayan ve biyolojik aktiviteleri gerekli kısımları ise koenzimdir. Koenzim bir metal iyonu olabileceği gibi protein olmayan organik moleküller de olabilir [24].

2.4.1. Glukoz oksidaz enzimi

Glukoz oksidaz (GOx) enzimi, böcek ve mantar gibi organizmalarda bulunan dimerik flavoenzim katalizleyicisidir. Biyoteknoloji uygulamaları için Aspergillus ve

Penicilium mantarlarından özütlenir. Aspergillus niger (GOx-an) göre Penicilium amagasakiense (GOx-pa) glikozu daha verimli katalizler. GOx-pa ve GOx-an her ikisi de kırılğan ve kısa operasyonel yaşam ömürlerine sahiptirler [34].

Glukoz oksidaz, β -D-Glukozun Glukonikasite oksidasyonunu katalizler. Bu olay süresince kofaktör flavin adenin dinükleotid (FAD) iki elektron alır ve oksijen molekülünü hidrojen peroksida indirger [35].



Şekil 2.5. Glukozun GOx katalizörlüğünde O₂ ve H₂O reaksiyonu

Bu dönüşüm ile gıda maddelerinden oksijen ve glukozu glukonik asite çeviren işlemlerde kullanılır [36]. Glukoz oksidaz, monomer başına sadece bir kovalent bağı olmayan FAD ile birlikte küresel enzim dimeridir. Denatüre edici şartlar altında proteinden ayrılabilir. Glukoz oksidaz enziminin aktif olduğu optimum sıcaklık 40-50 °C, optimum pH ise 4,5 – 6,0 aralığıdır [12].

Glukoz oksidasyonu sonucu elde edilen diğer ürün hidrojen peroksittir. Ekmek yapımında kullanılan, glukoz oksidaz enzimi ile oluşan hidrojen peroksit, hamuru geliştirici etkiye sahip olup, görünüş özelliklerini, işlenebilirliğini ve stabilizasyonunu artırır [37]. Ayrıca balda yüksek oranda bulunan glukoz oksidaz balın yüzeyinde bulunan oksijen gazını hidrojen peroksida indirgeyerek antimikrobiyal bir kalkan oluşturur. Çeşitli meyve sularında, gazlı içeceklerde, içkilerde, salata soslarında ve mayonezde glukoz oksidaz enzimi çözünmüş oksijeni kendine bağlayarak bu ürünlerin tadının bozulmasını engeller. Glukoz oksidaz enzimi tıbbi amaçlar doğrultusunda biyosensörlerin üretiminde de kullanılır, örneğin kandaki glukozu tayin etmek gibi [38]. Ayrıca biyoyakıt olarak anot hücrelerde de kullanımı söz konusudur [35].

2.5. Enzim İmmobilizasyonu

1850'li yıllarda Louis Pasteur, şekerin maya ile alkole fermantasyon olayının fermentler sayesinde daha hızlı olduğunu belirlemiştir. 1878 yılında Frederick W. Kühne, bu fermentlere enzim adını vermiş ve fermentlerin canlılardan ayıramaz yapıda olduğunu söylemiştir. 1897'de Eduard Buchner, şekerin fermantasyonunu sağlayan enzimlerin canlı hücrelerinden çıkarıldığında da işlevini sürdürdüğünü bulmuştur. 1926'da ise James Summer, üreaz enzimini laboravur ortamında üreterek üreaz kristalleri elde etmiştir. Summer çalışması ile bu alanda önemli bir çığır açmıştır [39].

Enzimleri saflaştırmanın maliyetinin yüksek olması ve enzimlerin istenildiği anda ortamdaki uzaklaştırılmamaları sebebiyle tekrar kullanılamamalarından ötürü enzimlerin reaksiyonlarda serbest bulunmaları yerine enzim immobilizasyonu tercih edilir. *İmmobilizasyon*, hareketi sınırlandırılmış, çözünmez ya da hapsedilmiş anlamına gelir. *Enzim immobilizasyonu* ise, tekrar ve sürekli kullanmak için enzimlerin inorganik veya organik taşıyıcılara fiziksel ya da kimyasal yöntemlerle bağlanması işlemidir [6]. Maliyetinin düşük olması, devamlı üretim yapılabilmesi, tekrar kullanılabilirliği, ürünlerin kolaylıkla ve saf bir şekilde elde edilebilmeleri, enzimin katalitik etkisinin korunmuş olması, immobilize bazı durumlar için enzimlerin daha yüksek aktivite gösterebilmeleri, enzimlerinin kendini parçalaması olasılığının az olması, çevre koşullarına (sıcaklık ve pH gibi) daha dayanıklı olmaları, çok basamaklı reaksiyonlar için uygun olmaları gibi nedenlerden ötürü enzim immobilizasyonu oldukça önemlidir [40, 41]. Enzim immobilizasyonunun önemli dezavantajı katalitik aktivite kaybıdır [42]. İmmobilize enzimin özellikleri hem enzime hem de destek maddesinin sahip olduğu özelliklere bağlıdır [40].

2.5.1. Enzim immobilizasyon yöntemleri

Enzimi sıvı ortamda çözünmez hale getirerek, destek maddesine bağlamak böylece enzimi tekrar kullanmak, enzimi tepkime ortamından uzaklaştırmak ve enzimin

dayanıklılığını artırmak amaçlı yapılan enzim immobilizasyonu için seçilen yöntem çok önemlidir [43].

İmmobilizasyon yönteminin seçiminde maliyet, güvenilirlik, enzimin aktivite ve kararlılığı göz önüne alınarak yöntem seçimi yapılır [44].

Farklı sınıflandırma yöntemleri olmakla birlikte enzim immobilizasyon yöntemleri genel olarak iki şekilde sınıflandırılırlar:

I. Kimyasal yöntemler

- 1) Kovalent bağlama
- 2) Çapraz bağlama
- 3) İyonik bağlanma

II. Fiziksel yöntemler

- 1) Adsorpsiyon ile immobilizasyon
- 2) Hapsetme ile immobilizasyon
 - a) Mikrokapsül ile hapsetme yöntemi
 - b) Kafes tipi hapsetme yöntemi

2.5.1.1. Kimyasal yöntemler

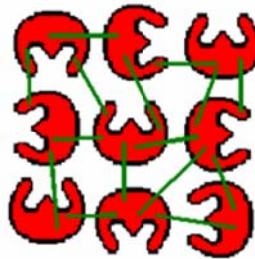
Enzim immobilizasyonu için kullanılacak kimyasal yöntemlerden biri *kovalent bağlama* olup, immobilizasyonda geleneksel bir metottur [41]. Enzimin karboksil, hidroksil, amino gibi fonksiyonel grup içeren desteğe kovalent bağlanması ile immobilizasyon gerçekleşir [45]. Genellikle sulu ortamda ve gerçekleşmesi zor olduğundan ılımlı şartlarda (oda sıcaklığı, nötral pH) meydana gelir. Enzim ve destek arasındaki etkileşim güçlü olup, bazen enzim aktivitesini arttırabilmesi açısından önemlidir [46]. Yöntemin avantajları yanı sıra dezavantajları da mevcuttur. Güçlü bağlar içermesi, enzim sızıntısının çok az olması, enzimin stabil olması immobilizasyon yönteminin avantajlarıdır. Enzimin sterik modifikasyonlarının oluşabilmesi, enzimatik aktivitede azalma olabilmesi, geri dönüşümsüz bağlanma

nedeniyle desteğin yeniden kullanılamaması, destek kimyasal modifikasyon gerekliliği ise kovalent bağlanma ile immobilizasyonun dezavantajlarıdır. Ayrıca bu yöntemde seçilen desteğin ucuz olması, çevreye zarar vermemesi ve yeterli miktarda enzimi taşıyabilmesi gibi özelliklere sahip olması gerekmektedir [47, 48].



Şekil 2.6. Kovalent bağlanma kimyasal yöntemi ile enzim immobilizasyon gösterimi

Enzim immobilizasyon yöntemlerinden diğeri *çapraz bağlama* yöntemidir. Çapraz bağlanma yönteminin oluşumunda kimyasal bağlar etkilidir. Bu enzim immobilizasyon yöntemi, çift işlevli veya çoğul işlevli reaktifler aracılığıyla enzim molekülleri arasındaki moleküller arası çapraz bağların oluşumu ile gerçekleşir [48]. Çapraz bağlanmada kullanılan reaktifler glutaraldehit, klorformat, heterosiklik halojenler, bisoksiranlar, divinilsülfanlar, geçiş metal iyonları ve epiklorhidrinlerdir [49]. Yöntemde çapraz bağlanma maddesi enzimin aktif bölgesine bağlanarak aktivite kaybına neden olabilir [50]. Desteğe ihtiyaç duyulmaması, enzim kararlılığını devam ettirmesi ve sızıntının minimum olması ise yöntemin avantajlarıdır [47].



Şekil 2.7. Çapraz bağlanma yöntemi ile enzim immobilizasyon gösterimi

İyonik bağlanma ise kimyasal yöntemlerden sonuncusudur. Enzim immobilizasyonu suda çözünmeyen ve iyon değiştirme özelliğine sahip desteğe iyonik bağlama ile gerçekleşir. Bazen bu etkileşimle birlikte fiziksel adsorpsiyon da olur. İyonik bağlanma enzimin yapısında ve aktif merkezinde herhangi bir değişikliğe neden

olmaz. Bu yüzden enzim aktivitesi genellikle yükselir [46]. Yöntemde iyon değiştirciler taşıyıcı olarak kullanılır. Sıcaklık ve pH diğer yöntemlerde olduğu üzere çok önemlidir [51].

2.5.1.2. Fiziksel yöntemler

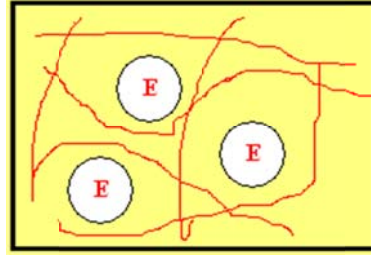
Adsorpsiyon ile immobilizasyon, enzim immobilizasyonu için kullanılabilen fiziksel yöntemlerden biridir. En basit yöntem olup, enzim destek maddesine kimyasal yapısı bozunmadan bağlanır. Genellikle hidrofobik destek kullanılır. Destek ve enzimin fonksiyonel grupları arasında kovalent olmayan etkileşimler meydana gelir. Bu etkileşimler elektrostatik güçler, hidrofobik etkileşimler ve hidrofilik etkileşimlerdir [42]. Adsorpsiyon immobilizasyonu genellikle enzimin aktivitesini koruması sebebiyle kolay bir yöntemdir. pH, sıcaklık, iyonik güçler ve polar çözücüler gibi belli şartlar immobilizasyonu değiştirebilir [52]. Yöntemin dezavantajı enzim ve destek arasındaki bağlanmanın zayıf olmasından ötürü enzimin matristen kopabilmesidir [41]. Ancak bu bağın zayıf olması sebebiyle enzim yapısının değişikliğe uğramaması ise yöntemin bir avantajıdır. İstenmeyen bir durum olan enzim sızıntısı ise şartlar ve gözenek boyutuna dikkat edilerek giderilebilir [53]. Enzim aktivitesini artırmak için ise amonyum sülfat ya da protein ilavesi yapılabilir [54].



Şekil.2.8.Adsorpsiyon yöntemi ile enzim immobilizasyon gösterimi

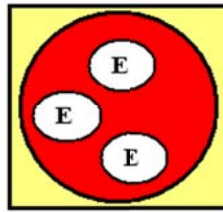
Fiziksel yöntemlerden bir diğeri ise *hapsetme ile immobilizasyon (tutuklama)* yöntemidir. Bu yöntem enzimin kafes veya polimer içerisinde tutularak sürüklenmesinin engellenmesidir. Yöntemin kovalent bağlanma ve çapraz bağlanmadan farklı enzimin çözeltide serbest olmasıdır. Tutuklama ile enzimin süzülmesi minimuma indirgenir, enzimin kararlılığı artırılır ancak enzimin aktif bölgesine substratın bağlanması sınırlı olur. Enzim için uygun bir mikro ortam

kapsül oluşturan malzeme kullanımı ve uygun pH, polarlık ile sağlanır [55]. Basit ve verimli bir yöntem olması, enzim ile polimer arasında güçlü bağlar içermemesi, enzim kaybının çok az olması bu yöntemin de avantajları arasındadır. Dezavantajları ise enzimi saran ortama sızıntı olabilmesi, yüzey jel matris içine iyi nüfuz edilememesi, yüzeylere ve ürünlere madde transferi direncidir [49].



Şekil 2.9. Enzimin taşıyıcı içerisinde tutuklanması

Mikrokapsül ile hapsetme yönteminde enzim yarı geçirgen polimer zar içerisinde tutulur. Yöntemde enzimin 1-100 μm arası boyutlu mikrokapsüllere bağlanması tercihtir. Substrat moleküllerinin küçük olması immobilizasyonun verimliliğini artırır [56]. Enzimin yapısı üzerine olumsuz etkisi olmayan iyi yöntemdir. Dezavantajı ise substratın enzime difüzyonunun sınırlı olmasıdır [51]. Ayrıca genellikle bağlanma fiziksel olduğundan enzim sızıntısı meydana gelebilir [57].



Şekil 2.10. Enzimin kapsül içinde hapsedilmesi

Kafes tipi hapsetme yöntemi ise çapraz bağlı polimerlerin enzim çözeltisi içerisinde oluşturdukları immobilizasyon çeşitidir. Yöntemde çapraz bağlanma ile oluşturulan kafes içersine enzim hapsedilmektedir. Çapraz bağ yüzdesinin fazla olması substratın enzimin aktif merkezine ulaşamamasına ve enzimde aktivite kaybına sebep olacağı için bağ yüzdesine dikkat edilmelidir. Kolay olması, çok az enzim kullanılması,

polimerleşmenin hızlı ve rahat gerçekleşmesi, çapraz bağlayıcı ve monomer derişimlerinin değiştirilmesi ile farklı gözenek büyüklükte kafes elde edilebilmesi, çapraz bağ oluşumunda kullanılan ışınlarının (gama ve UV) enzimin yapısı ve kararlığı üzerine fazla etkisinin olmaması yöntemin avantajları arasındadır. Dezavantajları olarak ise kafes içerisinden enzimin sızma olasılığının olması, jel oluşumunda ortamın sıcaklığının enzimin kararlılığını olumsuz etkileyebilmesi söylenebilir [58].

2.6. Literatür Araştırması

Glukoz oksidaz enzimi ve enzim immobilizasyonu ile ilgili olarak kısa bir literatür araştırması aşağıda verilmiştir:

Gürel ve arkadaşları tarafından, hidrojeller içindeki 2-hidroksi etil metakril ve N-vinil pyrrolidone üzerine ışınlama (UV) ile GOx enziminin immobilizasyonu sağlanmıştır. Sıcaklık, komonomer konsantrasyonu ve çapraz bağlanma gibi parametreler ile ilgili deneyler yapılmıştır. Tekrar kullanılabilirlik ölçülerek, çok düşük sıcaklıklarda ışınların enzimin aktivitesi üzerine etkisinin olmadığını ispatlanmıştır [59].

Cardiel ve arkadaşları tarafından, iyonik olmayan misel iskeleler üzerine mikroakışkan platform kullanılarak GOx enzimi immobilize edilmiş ve UV, kriyojenik elektron mikroskobu ve taramalı elektron mikroskobu kullanılarak immobilizasyonu doğrulanmıştır. Nanojel-GOx iskelelerin altında farklı glukoz konsantrasyonları sergileyen doğrusal ampermetrik sonuçlar bulunmuştur. GOx enziminin ömrünü ve doğallığını etkilemeyen iyonik olmayan jellerin uygun bir mikro çevre oluşturduğu belirtilmiştir. Ayrıca maliyeti, işlemin basit olması, biyo uyumlu olması gibi iyonik olmayan jellerin önemli özellikleri gösterilmiştir [60].

Bhakta ve arkadaşları tarafından, polistren ince filmler üzerine GOx immobilize edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre nanogeçirgen filmler substratın yüzey alanı içinde ve enzim aktivitesinin artışıyla immobilizasyonda yükseliş gösterdiği

bulunmuştur. Substrat-enzim arayüzeyinin karakterizasyonu, enzimin kararlılığı ve katalitik aktiviteyi geliştirmek için immobilizasyon şartlarının, protein yapısının oldukça önemli olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada polistiren blok polivinilpiridin nanogeçirgen filmlerin aktivitesi $3300 \pm 700 \text{ Um}^{-2}$ olarak elde edilmiştir [61].

Karuppiah ve arkadaşları tarafından, grafit nanolevhalar (GNs) üzerine GOx enzimi immobilize edilmiş ve bu levha ZnO patikülleri basılı karbon elektrot üzerine yatırılmıştır. GNs/ZnO elektron tarama mikroskobu ve elementel analiz ile karakterizasyonu yapılmıştır. Çalışmada, elektrot üzerine immobilize edilmiş GOx , -0,4V düzgün potansiyelde iyi bir şekilde belirlenmiş redoks çifti göstermiştir. GOx enziminin gelişmiş elektrokimyası elektrotta hızlı bir elektron transferi ile heterojen elektron tranfer hız sabiti $3,75 \text{ s}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Hızlı elektron transferinin, ZnO/GNs'nin iletkenliğinin iyi olmasından ve GNs'nin geniş yüzey alanından kaynaklandığı belirtilmiştir. Modifiye elektrot görüntüleri glukozu 0,3-0,4mM konsantrasyonlarında doğrusal bir yanıt olduğu ve $30,07 \mu\text{A mM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ duyarlı olduğu bulunmuştur. Üretilen sensörün yüksek duyarlılığa, tekrarlanabilirliğe ve uzun vadeli kullanıma olanak sağladığını belirtilmiştir [62].

Mani ve arkadaşları tarafından, indirgenme ile grafin kobalt fitalosiyenin (CoPc) hazırlanarak, glukozun emzimatığı araştırılmıştır. CoPc glukozu belirlemede ve GOx enzimi immobilizasyonunda elektrokatalizör görevi yapmaktadır. CoPc'i sabitlemek için grafin kullanılmıştır. Elde edilen bileşiğin kararlılığı elektron tarama mikroskobu ve X-ray çalışmaları ile kontrol edilmiştir. GOx enziminin direk elektron transferi redoks pikleri 0,44V olarak belirlenmiştir. Elektro aktif GOx miktarı ve elektron transfer sabit oranı (ks) sırasıyla $3,77 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ ve $3,57 \text{ s}^{-1}$ dir. Ürettikleri ampermetrik biyosensör glukozu geniş ve doğrusal konsantrasyonda, 10 μM ile 14,8mM yüksek hassaslıkta, $5,09 \mu\text{A mM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ olarak ölçmüştür. Ayrıca insan kanında ve idrarında glukoz tayini için araştırmalar yapılmıştır [63].

Welch ve arkadaşları tarafından, polistiren sülfonat kullanarak poli(3,4-etilendioksitiyofen) ile organik elektrokimyasal transistörler imal edilmiştir. Polimerize edilmiş yüzeyden karmaşık polimer fırçaları glisidil metakrilat ve 2-

hidroksietil metakrilattan elde edilmiştir. Bu fırçalar glukoz oksidaz ile işlevselleştirilmiş ve elektrik performansının uzun süreli olduğu tespit etmiştir [64].

Su ve arkadaşları tarafından, GOx enzimi altın nanopartiküller (AuNPs) ile MoS₂ kullanımı ile cam karbon elektrota elektrokimyasal biyosensör üretmek için immobilize edilmiştir. AuNPs ve MoS₂ kullanılan immobilize enzim elektrottan elektron transferinin hızlı olduğu tespit edilmiştir. Glukoz 10-300µM konsantrasyon aralığında tespit edilmiş ve 2,8µM kadar düşük seviyelerde ölçüm yapılabileceği bulunmuştur [65].

Vogt ve arkadaşları, glukoz biyosensörleri ve biyoyakıt hücreleri için en sık kullanılan enzim GOx (*Aspergillus niger*'dan elde edilen) pH bağımlı redoks potansiyelini pH 4,5 ve 8,5 de UV/vis spektroeletrokimya yöntemleri kullanılarak ölçmüştür. Araştırmada, tüm pH aralığında GOx flavin adenin dinükleotid (FAD) kofaktörü çifte azaltılmış hidrokinonokside değişmiştir. GOx redoks potansiyeli pH' a bağlı olarak pKa 7,2 de GOx flavohidrokinon tespit edilmiştir. Halojenürlerin varlığında pH≤6 değerinde redoks potansiyellerinde azalma gözlemlenmiştir. Nötr ortamda çalışan biyosensör ve biyoyakıt için anot hücresi pH değeri 7,4 ve 7,0 olarak bulunmuştur [66].

Özden ve arkadaşları tarafından, polianilin-GOx Pt elektrot üzerine adsorpsiyon ile 1V potansiyelde hazırlanmıştır. Oksijen ile glukoz tepkisiyle oluşan hidrojen peroksit enzimi elektrotun PBS çözeltisi içerisinde 0,7V potansiyelde ampermetrik ölçümleri yapılmıştır. Polimerizasyon için monomer konsantrasyonları, elektrolit kalınlığı enzim için pH ve sıcaklık gibi parametreler optime edilerek sonuçlar değerlendirilmiştir. Hazırlanan polimerin sensöre tepki süresi 4-5s bulunmuştur, doğrusal ampermetrik ölçüm yapılmıştır. Ayrıca, sensörün askorbik asit, oksalik asit, laktoz, sukroz, ve üre gibi maddelerin varlığında bile başarılı sonuç verdiği belirlenmiştir [67].

Elvan ve arkadaşları, GOx enziminin özelliklerini araştırmak için Pt⁴⁺ ve Pt²⁺ ile yeni nanoküreler hazırlamıştır. Aminometil polisitren (APS), 2-hidroksi-5-

metilbenzaldehit ve Pt^{2+} / Pt^{4+} kullanarak, üzerine GOx enzimini immobilize edip enzimatik özelliklerini araştırmıştır. APS- Pt^{2+} -GOx ve APS- Pt^{4+} -GOx kompleksleri için optimum pH değeri belirlemiştir. Elde edilen immobilize komplekslerin tekrar kullanılabilirliği, depolama kararlılığı, sıcaklık etkisi ve serbest kullanılabilirliğini araştırmıştır. Pt atomu içeren destek üzerine GOx enziminin depolama ve yeniden kullanılabilirliğinin mükemmel derecede olduğunu tespit etmiştir. APS- Pt^{2+} -GOx ilk aktivitesini 32 döngüden sonra %30 dan daha oranda aktivitesini koruduğu bulunmuştur [68].

Seda ve arkadaşları, polistiren- ANH_2 (PSA) modifiye edilmiş nanopartiküller ile bazı salisilaldehit türevlerinin immobilize GOx üzerine enzimatik özelliklerini incelemiştir. Modifiye polistirenlerin karakterizasyonu için, IR spektrumları, jel permeasyon kromatografisi ve taramalı elektron mikroskopisi kullanılmıştır. İmmobilize GOx bütün özelliklerini (PSA-SaIH)-GOx, (PSA-SaICH₃)-GOx ve (PSA)-GOx dan biri hariç hepsinin gösterdiğini bulmuştur. PSA üzerine GOx immobilizasyonunda iki optimum pH diğer immobilize polimerlerde bir optimum pH olduğunu tespit edilmiştir [69].

3. BÖLÜM

MATERYAL VE METOD

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

(Amimometil)polistiren, tereftaldehit, 2-amino-4-metilfenol, glukoz oksidaz (Sigma Aldrich), sodyum dihidrojenfosfat (NaH_2PO_4 , 120 g/mol), fosforik asit (H_3PO_4 106.09 g/mol), sodyum asetat ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$, 82.02 g/mol), disodyum hidrojenfosfat (Na_2HPO_4 , 142 g/mol), boraks ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 201.24 g/mol), sodyum hidroksit (NaOH , 40 g/mol), 4-aminoantipiren (4-AAP) (203,24 g/mol), glukoz(180,16 g/mol), fenol (94,11 g/mol), peroksidaz enzimi (bayır turbu), dimetilformamit (DMF) maddeleri Sigma-Aldrich firmasından satın alınmıştır.

3.2. Cihazlar

3.2.1. pH metre

Tampon çözelti ayarlamada Orion 420A model pH metre kullanılmıştır.

3.2.2. Çalkalamalı su banyosu

ST 402 NÜVE marka sıcaklık kontrollü su banyosu kullanılmıştır.

3.2.3. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Görüntüler QUANTA 400F Field Emission cihazı ile alınmıştır.

3.2.4. Ultraviyole-görünür bölge spektrumu (UV-GB)

Spektrumlar, UV-1800 ENG240V, SOFT model spektrofotometre ile 800-200 nm aralığında saf su içinde alınmıştır.

3.2.5. Infrared spektrofotometresi (FT-IR)

Spektrumlar, Fourier dönüşüm infrared spektrofotometresi ile 4000-400 cm^{-1} aralığında TÜBİTAK MAM Kimya Enstitüsü'nde alınmıştır.

3.2.6. Nükleer manyetik rezonans spektrofotometresi ($^1\text{H-NMR}$)

$^1\text{H-NMR}$ spektrumları (500 MHz, DMSO, 298 K), Bruker AVANCE 500 NMR cihazı ile TÜBİTAK MAM Kimya Enstitüsü'nde alınmıştır.

3.2.7. Termogravimetrik Analiz Cihazı (TGA)

TGA analizleri, TÜBİTAK MAM Kimya Enstitüsü'nde, Perkin Elmer marka termal analiz cihazı ile azot atmosferinde, 10-910 $^{\circ}\text{C}$ sıcaklık aralığında, 10 $^{\circ}\text{C}/\text{dakika}$ ısıtma hızında ölçülerek alınmıştır.

4. BÖLÜM

DENEYSEL BÖLÜM

4.1. Polimer Tabanlı Schiff Bazının Hazırlanması (Genel Yöntem)

Polimer destekli Schiff bazı geri soğutucu altında 70°C sıcaklıkta sentezlendi. DMF’de çözünen (aminometil)polistiren çözeltisi üzerine, DMF’de çözünmüş aldehit ve amin çözeltileri yavaş yavaş ilave edilerek, 4 saat süre ile kaynatma ve karıştırma işlemlerine devam edildi. Reaksiyon sonucu oluşan ve oda sıcaklığında bekletilen karışım, tepkimeye girmeyen kısımların uzaklaştırılması amaçlı aseton ile yıkandı ve 24 saat süre ile etüvde kurutma işlemi yapıldı.

4.1.1. (AMP-TA-MAF) polimerinin sentezi

20 mL DMF’de çözünen 1 g (aminometil)polistiren (1 g, 4,0 mmol/g -NH₂ yüklü) ve 20 mL DMF’de çözünen 0,54 g tereftaldehit ile 10 mL DMF’de çözünen 0,49 g 2-amino-4-metilfenol çözeltileri geri soğutucu altında bölüm 4.1’de belirtilen yöntemle göre sentezlendi ve etüvde kurutuldu.

4.2. Polimer Tabanlı Schiff Bazı Kompleksinin Hazırlanması (Genel Yöntem)

Polimer destekli Schiff bazı metal kompleksi geri soğutucu altında 70°C sıcaklıkta sentezlendi. DMF’de çözünen (aminometil)polistiren çözeltisi üzerine, DMF’de çözünmüş aldehit ve amin çözeltileri yavaş yavaş ilave edilerek, 4 saat süre ile karıştırıldı. DMF’de çözünen PtCl₄ çözeltisinin karışıma ilave edilmesinin ardından 2 saat kaynatma ve karıştırma işlemine devam edildi. Reaksiyon sonucu oluşan ve oda sıcaklığında bekletilen karışım, tepkimeye girmeyen kısımların uzaklaştırılması amaçlı aseton ile yıkandı ve 24 saat süre ile etüvde kurutma işlemi yapıldı.

4.2.1. (AMP-TA-MAF-Pt) polimerinin sentezi

20 mL DMF’de çözünen 1 g (aminometil)polistiren (1 g, 4,0 mmol/g -NH₂ yüklü), 20 mL DMF’de çözünen 0,54 g tereftaldehit ve 10 mL DMF’de çözünen 0,49 g 2-amino-4-metilfenol ile 1,35 g PtCl₄ çözeltileri geri soğutucu altında bölüm 4.2’de belirtilen yöntemle göre sentezlendi ve etüvde kurutuldu.

4.3. (AMP-TA-MAF) ve (AMP-TA-MAF- Pt) Polimerlerinin İmmobilizasyon Çalışması

4.3.1. İmmobilizasyonda kullanılan tampon çözeltilerin hazırlanışı

pH:3 (NaH₂PO₄/H₃PO₄) tamponu:

6,24 g (40 mmol) NaH₂PO₄.2H₂O (sodyum dihidrojenfosfat) 250 mL su içerisinde çözüldü. pH:3 oluncaya kadar, derişik % 85'lik H₃PO₄ çözeltisi damla damla ilave edildi.

pH:4 (NaH₂PO₄/H₃PO₄) tamponu:

6,24 g (40 mmol) NaH₂PO₄.2H₂O (sodyum dihidrojenfosfat) 250 mL su içerisinde çözüldü. pH:4 oluncaya kadar, derişik % 85'lik H₃PO₄ çözeltisi damla damla ilave edildi.

pH:5 (sodyum asetat/asetik asit) tamponu:

pH:5 oluncaya kadar, 100 mL 0,25 M asetik asit üzerine 0,25 M sodyum asetat çözeltisi damla damla ilave edildi.

pH:6-9 (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄) tamponu:

pH:6/7/8/9 oluncaya kadar, 100 mL 0,25 M Na₂HPO₄ üzerine 0,25 M NaH₂PO₄ çözeltisi damla damla ilave edildi.

pH:10 (Na₂B₄O₇/NaOH) tamponu:

pH:10 oluncaya kadar, 100 mL 0,25 M Na₂B₄O₇ üzerine 0,25 M sodyum hidroksit çözeltisi damla damla ilave edildi.

Glukoz çözeltisinin hazırlanışı (40 mM-0,5 mM):

0,0160 g glukoz, çalışılan pH tampon ile 10 mL ye tamamlanarak 40 mM stok glukoz çözeltisi hazırlandı. 20 mM, 18 mM, 16 mM, 14 mM, 12 mM, 10 mM, 8 mM, 6 mM, 4 mM, 2 mM, 1 mM ve 0,5 mM glukoz çözeltileri ise, 40 mM stok glukoz çözeltisinden seyreltilerek hazırlandı.

4.3.2. β-glukoz oksidaz enziminin immobilizasyonu

20 mL DMF'de çözünen 1 g polimer üzerine, 21 mL saf suda çözülmüş 0,3 mg β-glukoz oksidaz enzimi ilave edilerek manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında 2 gün karıştırıldı. İmmobilizasyon reaksiyonu sonucu oluşan polimer süzme ile alındı. Seyreltik aseton ile reaksiyona girmemiş monomer yapıları uzaklaştırma amaçlı yıkama işlemi yapıldı. İmmobilize enzimler +4°C de muhafaza edildi.

4.3.3. Serbest β-glukoz oksidaz enzim aktifliği üzerine pH etkisi

pH:3 ile pH:9 aralığında hazırlanan 4 mL tampon çözeltilerde serbest β-glukoz oksidaz enzimi (10 mg) çözüldü ve üzerine glukoz (16 mg) ilave edildi. Oda sıcaklığında yapılan karıştırma işlemi esnasında 4-aminoantipiren (10 mg), fenol (20 mg) ve peroksidaz enzimi (0,5 mg) eklendi. UV-GB spektrofotometresi ile 498 nm'de, absorbans değerleri okundu. Serbest enzim aktifliği belirlendi.

4.3.4. İmmobilize edilen β -glukoz oksidaz aktifliği üzerine pH etkisi

pH:3 ile pH:9 aralığında hazırlanan tampon 4 mL çözeltilde immobilize enzim (2 mg) çözüldü ve bölüm 4.3.3'de belirtilen işlemler uygulandı. İmmobilize enzim aktifliği belirlendi.

4.3.5. Serbest β -glukoz oksidaz enzim aktifliği üzerine sıcaklık etkisi

Belirlenen optimum pH daki 4 mL tampon çözeltilde serbest β -glukoz oksidaz enzimi (10 mg) çözüldü ve üzerine glukoz (16 mg) ilave edildi. Çalkalamalı su banyosunda farklı çalışma sıcaklıklarında (20°C-90°C) yapılan karıştırma işlemi esnasında 4-aminoantipiren (10 mg), fenol (20 mg) ve peroksidaz enzimi (0,5 mg) eklendi. UV-GB spektrofotometresi ile 498 nm'de, absorbans değerleri okundu. Serbest enzim aktifliği belirlendi.

4.3.6. İmmobilize edilen β -glukoz oksidazın aktifliği üzerine sıcaklık etkisi

Belirlenen optimum pH daki 4 mL tampon çözeltilde serbest β -glukoz oksidaz enzimi (2 mg) çözüldü ve bölüm 4.3.5'de belirtilen işlemler uygulandı. İmmobilize enzim aktifliği belirlendi.

5. BÖLÜM

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

5.1. Sonuçlar

5.1.1. Polimer Tabanlı Schiff Bazlarının Karakterizasyonu

Modifiye edilmiş polimerlerin bazı fiziksel özellik ve analitik verileri Tablo 5.1.'de verilmiştir. Polimer tabanlı Schiff bazlarının ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı (M_w) ve sayıca ortalama molekül ağırlığı ($M_{n,NMR}$) sırasıyla element analiz sonuçları ve 1H -NMR spektrumlarına göre önerilmiştir. Polidispersite indeksi (HI) ise $M_w / M_{n,NMR}$ oranı ile belirlenmiştir.



(AMP-TA-MAF) (AMP-TA-MAF-Pt)

Resim 5.1. Sentezlenen modifiye polimerlerin katı hal görüntüleri

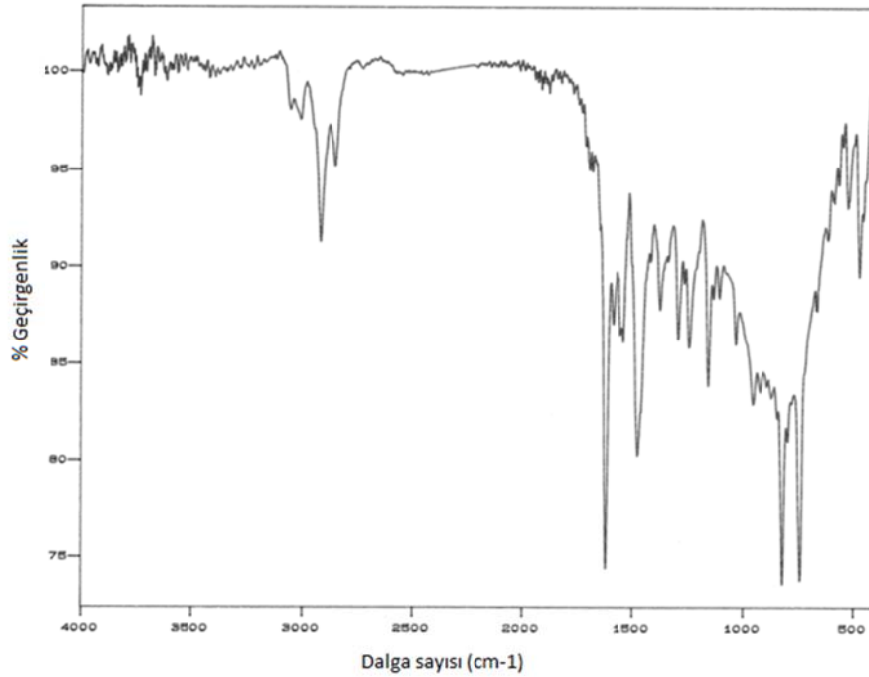
Tablo 5.1. Bileşiklerin bazı fiziksel ve analitik özellikleri

Bileşik	M_w , $M_{n,NMR}$ HI	Kimyasal Formül	Renk μ_{eff} , BM	Element Analizi Bulunan (Hesaplanan) %			
				C	H	N	Pt
(AMP-TA-MAF)	1104 /1082 1,02	$[(C_8H_8)_7(C_{24}H_{22}N_2O)]$	Sarı -	86,93 (88,72)	7,07 (7,21)	2,54 (2,59)	- -
(AMP-TA-MAF-Pt)	1343	$[(C_8H_8)_7(C_{24}H_{21}N_2OCl_3Pt)]$	Kahverengi 0	71,46 (69,44)	5,80 (5,64)	2,08 (2,03)	14,52 (14,10)

5.1.1.1. (AMP-TA-MAF) polimeri

(AMP-TA-MAF) polimerine ait, IR spektrumu Şekil 5.1'de verilmiştir.

1602 cm^{-1} ve 1589 cm^{-1} 'de gözlenen pikler, amin grubu içeren polimere aldehitin katılması sonucu oluşan simetrik $\nu_{(\text{CH}=\text{N})}$ gerilme titreşimleri olarak öngörülmüştür. Aromatik $\nu_{(\text{C}-\text{H})}$ titreşimi 3056 cm^{-1} ve 3010 cm^{-1} 'de, alifatik $\nu_{(\text{C}-\text{H})}$ titreşimi ise 2925 cm^{-1} ve 2850 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. Aromatik $\nu_{(\text{C}=\text{C})}$ titreşimine ait bantlar 1565 cm^{-1} ve 1546 cm^{-1} 'de ortaya çıkmıştır. 3417 cm^{-1} de gözlenen titreşim bandı ise fenolik $\nu_{(\text{OH})}$ piki olarak belirlenmiştir.

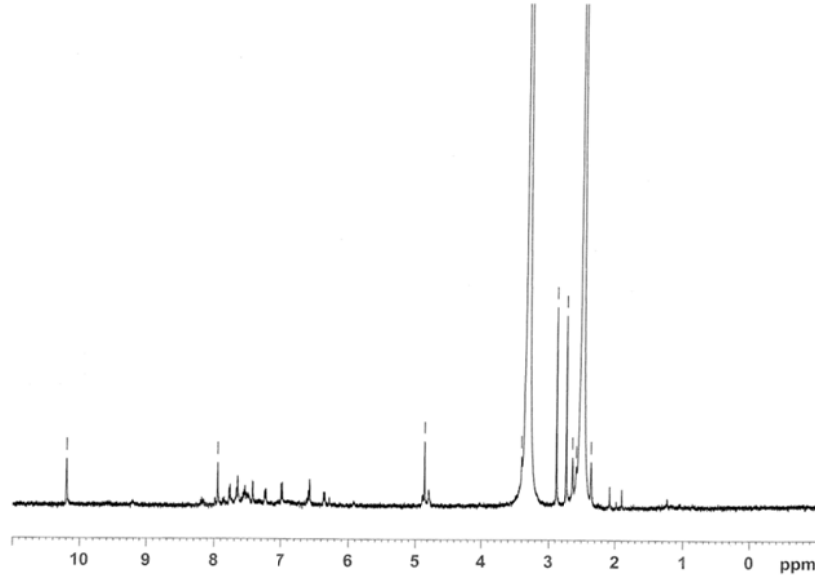


Şekil 5.1. (AMP-TA-MAF) polimerinin IR spektrumu

(AMP-TA-MAF) polimerine ait, ^1H -NMR spektrumu Şekil 5.2.'de verilmiştir.

7,95 ppm'de gözlenen pik imin ($\text{CH}=\text{N}$) protonu olarak öngörülmüştür. İntegrasyon değeri olarak alınan bu pik yüksekliği (1 birim) ile polimerdeki toplam $-\text{CH}-\text{CH}_2$ pik yüksekliğinin karşılaştırılmasıyla, tekrarlayan birim sayısı $-\text{CH}=\text{N} / -\text{CH}-\text{CH}_2$ 1/7 olarak belirlenmiştir. Aromatik protonlara ait pikler 6,30 – 7,80 ppm aralığında ve

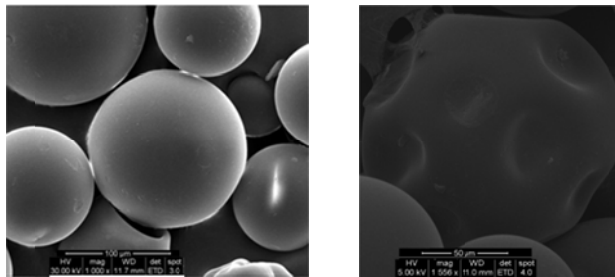
alifatik protonlara ait pikler 1,21 – 3,37 ppm aralığında ortaya çıkmıştır. Aromatik CH₂-N protonuna ait pik ise 4,85 ppm’de görülmüştür. Fenolik OH protonuna ait pik 10,20 ppm’de gözlenmiştir. Aromatik CH₃ protonuna ait pik ise 2,63 ppm olarak belirlenmiştir.



Şekil 5.2. (AMP-TA-MAF) polimerinin ¹H-NMR spektrumu

(AMP) ve (AMP-TA-MAF) polimerlerine ait SEM görüntüleri resim 5.2.’de verilmiştir.

(Aminometil)polistiren ile modifiye olmuş polimerin SEM fotoğrafları karşılaştırılmıştır. Modifiye olmuş (AMP-TA-MAF) polimerde çökmeler şeklinde yüzey morfolojisinde değişiklikler gözlenmiştir.



(a)

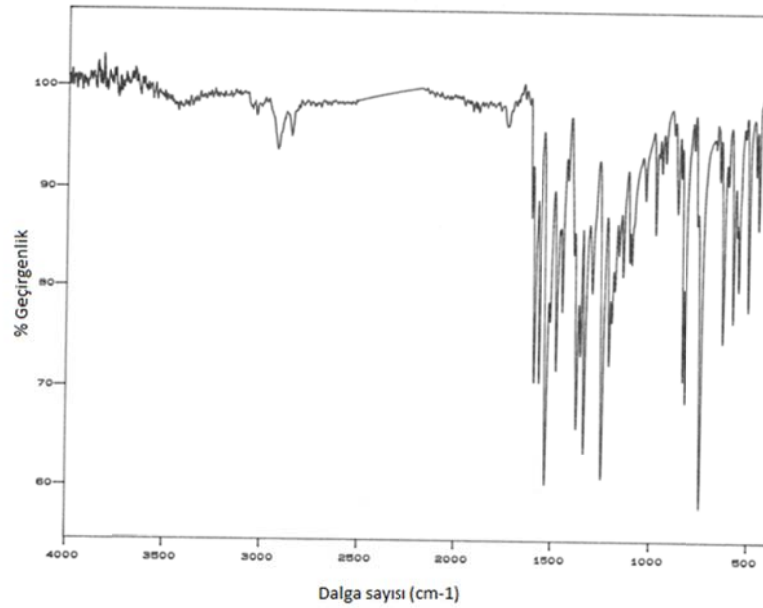
(b)

Resim 5.2. (AMP) polimeri (a) ve (AMP-TA-MAF) polimerinin (b) SEM görüntüleri

5.1.1.2. (AMP-TA-MAF-Pt) polimeri

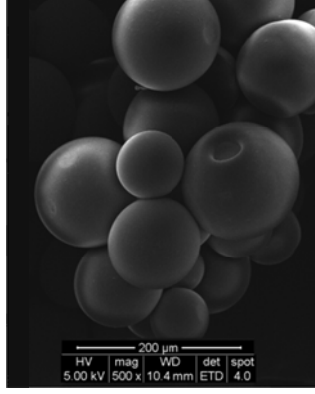
(AMP-TA-MAF-Pt) polimerine ait IR spektrumu Şekil 5.3’de verilmiştir.

Liganda ait 1602 cm^{-1} ve 1589 cm^{-1} ’de gözlenen iki imin pikinin, 1627 cm^{-1} ve 1593 cm^{-1} ’e kayması imin azotları üzerindeki ortaklanmamış elektron çiftleri ile Pt(IV) iyonu arasındaki koordinasyonun göstergesi olarak öngörülmüştür. Aromatik $\nu_{\text{(C-H)}}$ titreşimi 3038 cm^{-1} ’de, alifatik $\nu_{\text{(C-H)}}$ titreşimi ise 2917 cm^{-1} ve 2833 cm^{-1} ’de ortaya çıkmıştır. Aromatik $\nu_{\text{(C=C)}}$ titreşimine ait bantlar 1565 cm^{-1} ve 1533 cm^{-1} ’de gözlenmiştir. Ayrıca 518 cm^{-1} ve 463 cm^{-1} ’de gözlenen yeni bantlar $\nu_{\text{(M-O)}}$ ve $\nu_{\text{(M-N)}}$ gerilme titreşimleri olarak belirlenmiştir. Bu ise iki azot atomu ve bir hidroksil oksijeni üzerinden koordine kovalent bağ oluştuğunun göstergesi olarak yorumlanmıştır.



Şekil 5.3. (AMP-TA-MAF-Pt) polimerinin IR spektrumu

(AMP-TA-MAF-Pt) polimerine ait SEM görüntüsü Resim 5.3.’de verilmiştir. (Aminometil)polistiren ile modifiye olmuş polimerin SEM fotoğrafları karşılaştırılmıştır. Modifiye olmuş (AMP-TA-MAF-Pt) polimerinde çukur görüntü şeklinde yüzeyde farklılıklar gözlenmiştir.



Resim 5.3. (AMP-TA-MAF-Pt) polimerinin SEM görüntüsü

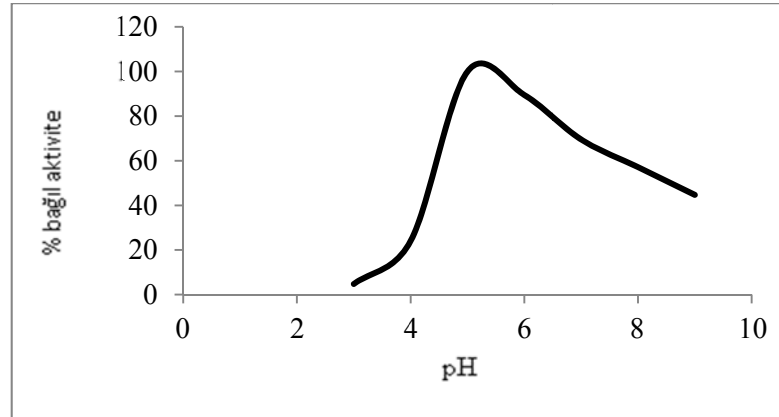
5.1.2. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Karakterizasyonu

5.1.2.1. Serbest β -glukoz oksidaz enzimi

5.1.2.1.1. pH etkisi

Enzimin aktifliğine pH etkisini inceleme amaçlı yapılan işlemler (bölüm 4.3.3) sonucu elde edilen grafik şekil 5.4’de verilmiştir. Grafik, reaksiyonlara ait maksimum aktiflik değerleri ile pH değişimini göstermektedir. Ölçülen absorbans x 100 / maksimum absorbans ile bağıl aktivite (%) belirlenmiştir.

Serbest enzimin optimum pH’ı 5 olarak bulunmuştur [68].

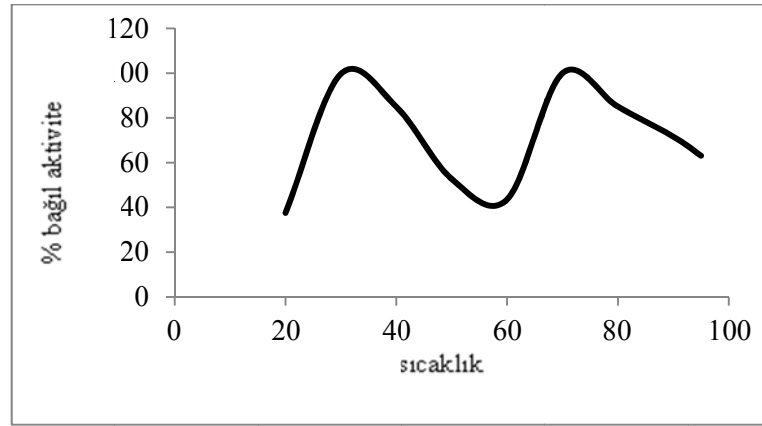


Şekil 5.4. Serbest GOx enzim aktivitesi üzerine pH etkisi

5.1.2.1.2. Sıcaklık etkisi

Enzimin aktifliğine sıcaklığın etkisini inceleme amaçlı yapılan işlemler (bölüm 4.3.5) sonucu elde edilen grafik şekil 5.5’de verilmiştir. Grafik, reaksiyonlara ait maksimum aktiflik değerleri ile sıcaklık değişimini göstermektedir.

Serbest enzim için sırasıyla 30 °C ve 70 °C olarak iki optimum sıcaklık bulunmuştur.



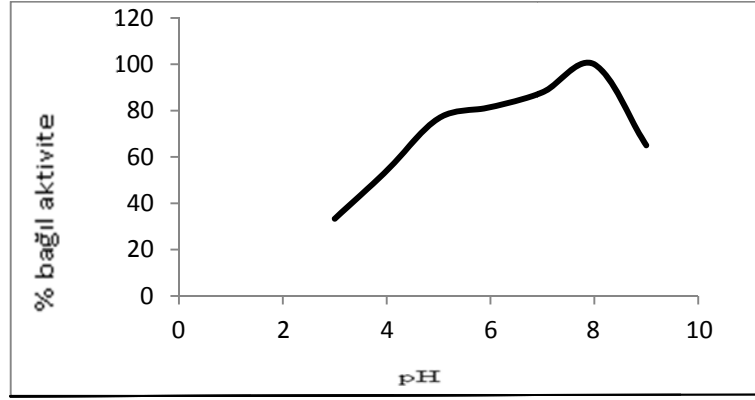
Şekil 5.5. Serbest GOx enzim aktivitesi üzerine pH:5’ deki sıcaklık etkisi

5.1.2.2. İmmobilize edilen β -glukoz oksidaz enzimi

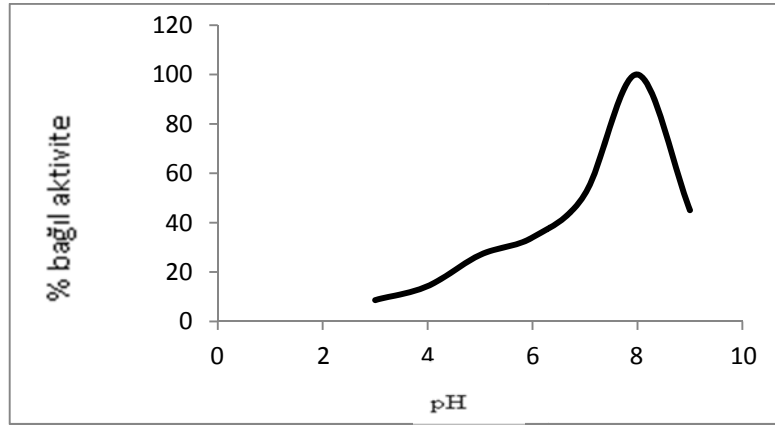
5.1.2.2.1. pH etkisi

Modifiye edilmiş polimer tabanlı Schiff bazı ve Pt(IV) kompleksine immobilize edilen β -glukoz oksidaz enziminin aktifliğine pH etkisini inceleme amaçlı yapılan işlemler (bölüm 4.3.4) sonucu elde edilen grafikler şekil 5.6 ve şekil 5.7’de verilmiştir. Grafikler, reaksiyonlara ait maksimum aktiflik değerleri ile pH değişimini göstermektedir.

(AMP-TA-MAF) ve (AMP-TA-MAF-Pt) kodlu polimerlere kovalent bağlanma ile immobilize edilen enzim için optimum pH değerleri 8 olarak bulunmuştur.



Şekil 5.6. (AMP-TA-MAF) polimeri enzim aktivitesi üzerine pH etkisi



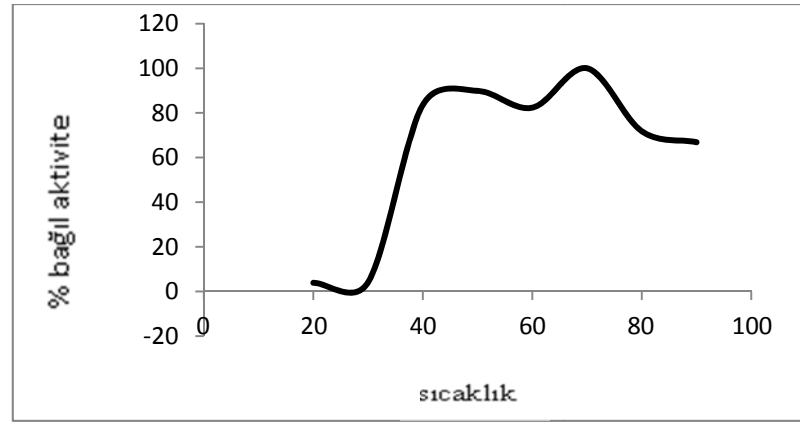
Şekil 5.7. (AMP-TA-MAF-Pt) polimeri enzim aktivitesi üzerine pH etkisi

5.1.2.2.2. Sıcaklık etkisi

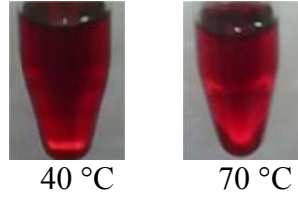
Modifiye edilmiş polimer tabanlı Schiff bazı ve Pt(IV) kompleksine immobilize edilen β -glukoz oksidaz enziminin aktifliğine sıcaklığın etkisini inceleme amaçlı yapılan işlemler (bölüm 4.3.6) sonucu elde edilen grafikler aşağıda verilmiştir. Grafikler, reaksiyonlara ait maksimum aktiflik değerleri ile sıcaklık değişimini göstermektedir.

(AMP-TA-MAF) kodlu polimerlere kovalent bağlanma ile immobilize edilen enzim için sırasıyla 40 °C ve 70 °C olarak iki optimum sıcaklık değeri bulunmuştur (Şekil 5.8).

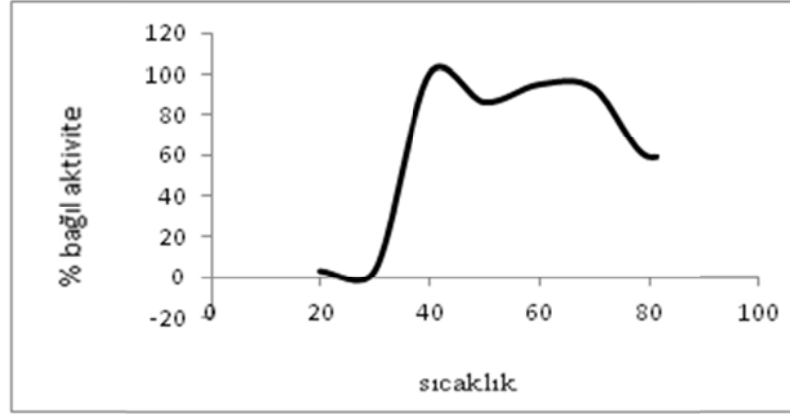
(AMP-TA-MAF-Pt) kodlu polimerlere kovalent bağlanma ile immobilize edilen enzim için ise sırasıyla 40 °C ve 80 °C olarak iki optimum sıcaklık değeri bulunmuştur (Şekil 5.9).



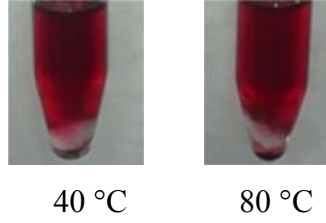
Şekil 5.8. (AMP-TA-MAF) polimeri enzim aktivitesi üzerine pH:8’ deki sıcaklık etkisi



Resim 5.4. (AMP-TA-MAF) polimerinin pH:8 için iki optimum sıcaklıktaki ürün görüntüleri



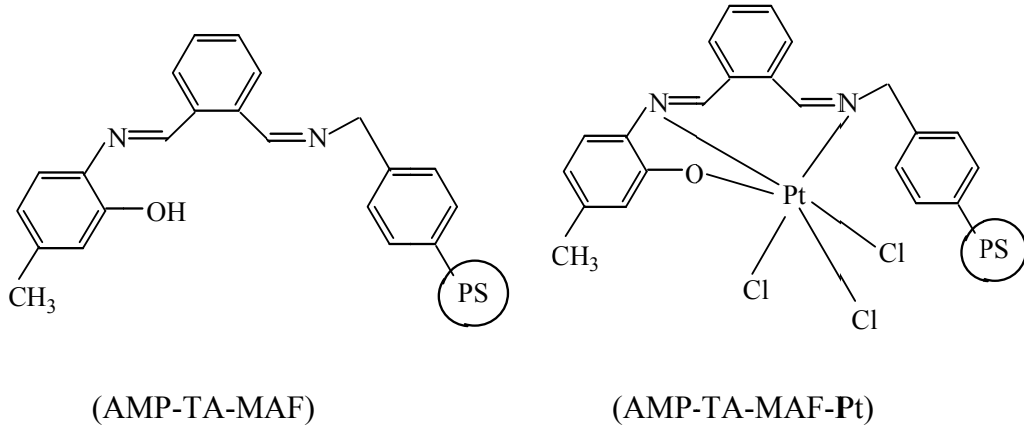
Şekil 5.9. (AMP-TA-MAF-Pt) polimeri enzim aktivitesi üzerine pH:8' deki sıcaklık etkisi



Resim 5.5. (AMP-TA-MAF-Pt) polimerinin pH:8 için iki optimum sıcaklıktaki ürün görüntüleri

5.2. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Öneriler

İki aşamalı olarak gerçekleştirilen tez çalışmasında, ilk olarak bir adet polimer tabanlı Schiff bazı ve bu ligandın Pt(IV) kompleksi sentezlenmiş ve yapıları spektroskopik yöntemler ile karakterize edilmiştir (Şekil 5.10).



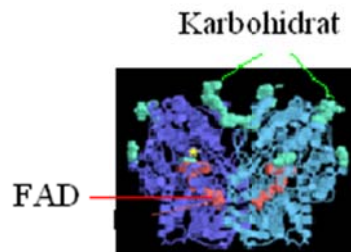
Şekil 5.10. Modifiye polimerler için ön görülen yapılar

İkinci aşama olarak ise modifiye edilen polimerlere β -glukoz oksidaz enziminin immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Serbest haldeki ve polistiren destekli Schiff bazı ile metal kompleksi üzerine immobilize edilmiş haldeki β -glukoz oksidaz enziminin aktivitesine pH ve sıcaklık parametrelerinin etkisi incelenmiştir.

Serbest β -glukoz oksidaz enziminin optimum pH değeri 5 olarak bulunmuştur [68]. Modifiye edilmiş (AMP-TA-MAF) ve (AMP-TA-MAF-Pt) polimerlerine immobilize edilen β -glukoz oksidaz enziminin optimum pH değerleri ise 8 olarak belirlenmiştir.

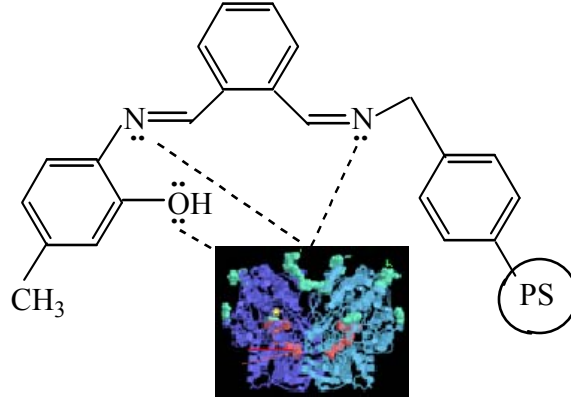
Serbest β -glukoz oksidaz enzimi için iki optimum sıcaklık değeri 30 °C ve 70 °C olarak bulunmuştur. GOx enzimi düşük sıcaklıkta ve yüksek sıcaklıkta aktivite gösterebilmektedir [68]. Modifiye edilmiş (AMP-TA-MAF) polimerine immobilize edilen β -glukoz oksidaz enziminin pH:8'deki iki optimum sıcaklık değerleri 40 °C ve 70 °C olarak belirlenmiştir. Modifiye edilmiş (AMP-TA-MAF-Pt) polimerine immobilize edilen β -glukoz oksidaz enziminin optimum pH:8'deki iki optimum sıcaklık değerleri ise 40 °C ve 80 °C olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, immobilize edilmiş GOx enziminin ısıya karşı daha kararlı olduğu öngörülmüştür.

Glukoz oksidaz enzimi dış kabuğu hidroksil grupları içeren karbonhidrat zincirleri ile kaplı dimerik bir proteindir (Resim 5.6). Bu sebeple çalışmada, enzimin hidrojen bağları oluşturarak immobilize edildiği ön görülebilir [70].



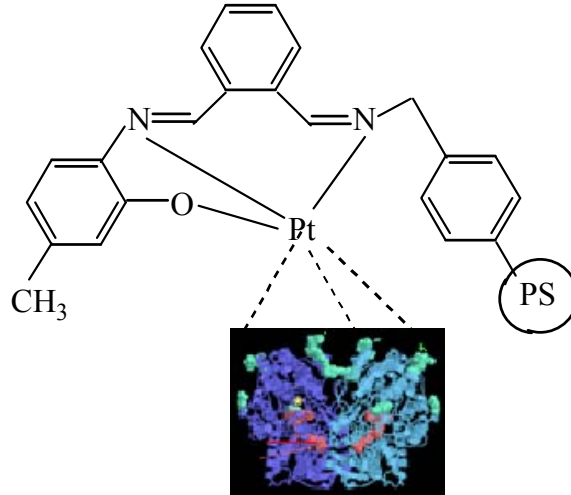
Resim 5.6. Glukoz oksidaz enziminin iki boyutlu görüntüsü

Modifiye (AMP-TA-MAF) polimeri için, enzimin $-OH$, $-NH_2$ ya da $-COOH$ grupları ile polimer yapısındaki imin ($-CH=N-$) azot atomu ve hidroksil ($-OH$) oksijeni arasında hidrojen bağları oluştuğu düşünülür (Şekil 5.11).



Şekil 5.11. (AMP-TA-MAF) modifiye polimeri ile glukoz oksidaz enzimi arasındaki öngörülen hidrojen bağ oluşumu

Modifiye (AMP-TA-MAF) polimeri için ise, enzimin $-OH$ grubu, $-NH_2$ grubu ya da $-COOH$ grubu üzerinden Pt(IV) metaline koordine kovalent bağ ile bağlandığı öngörülür (Şekil 5.12).



Şekil 5.12. (AMP-TA-MAF-Pt) modifiye polimeri ile glukoz oksidaz enzimi arasındaki öngörülen koordine kovalent bağ oluşumu

His516, Glu412 ve His559 glukoz oksidaz enziminin kataliz reaksiyonlarında etkili olan önemli aminoasit yan zincirleridir. Kataliz olayı asidik, bazik ya da nötral

ortamda meydana gelebilir. Asidik ortamda gerçekleşen katalizde enzimin Glu412 kısmı, nötral ortamda His516 kısmı, bazik ortamda ise His559 kısmı etkilidir [12, 71]. (AMP-TA-MAF) ve (AMP-TA-MAF-Pt) polimerlerine immobilize edilen β -glukoz oksidaz enziminin optimum pH değerinin 8 olması His559 kodlu bölgenin aktif rol oynadığı şeklinde yorumlanabilir.

Tez çalışması kapsamında sentezlenen modifiye polimerlere immobilize edilen β -glukoz oksidaz enziminin aktifliğine substrat derişiminin etkisi, immobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği ve depolama kararlılığı gibi parametrelerin etkisinin incelenmesi gerçekleştirilebilir. Ayrıca yeni modifiye polimerlerin sentez ve karakterizasyonu ile bu destek polimerlere immobilize edilebilecek GOx ya da farklı enzimlerin aktifliği üzerine benzer parametrelerin etkilerinin incelenmesi sunulabilecek öneriler olarak söylenebilir.

KAYNAKLAR

1. Zhou, Z., Inayat, A., Schwieger, W., Hartmann, M., “Improved activity and stability of lipase immobilized in cage-like large pore mesoporous organosilicas”, *Microporous and Mesoporous Materials.*, 154, 133-141, 2012.
2. Karimi, A., Aghbolaghy, M., Khataee, A., R., Shoabargh, S., “Use of enzymatic biofenton as a new approach in decolorization of malachite green”, *Scientific World Journal.*, 2012:5, 2012.
3. Ramanavicus, A., Voronovic, J., Semashko, T., Mikhailova, R., Kausaite-Minkstimiene, A., Ramanviciene, A., “Comparison of glucose oxidases from *Pencillium Adametzii*, *Pencillium Funiculosum* and *Aspergillus Niger* in the design of amperometric glucose biosensors”, *The Japan Society for Analytical Chemistry.*, 30,1143-1149, 2014.
4. Kılıç, A., Teke, M., Önal, S., Telefoncu, A., “Immobilization of pancreatic lipase on chitin and chitosan”, *Preparative Biochemistry & Biotechnology.*, 36,153-163, 2006.
5. Dai, Y., Yin, L., Niu, J., “Laccase-carrying electrospun fibrous membranes for adsorption and degradation of PAHs in shoal soils”, *Environ Sci Technology.*, 45, 10611-10618, 2011.
6. Öcal, B., L., “Poli(vinil alkol)-Kalsiyum aljinat, poli(N-izopropilamit)-Kalsiyum aljinat kürelerine β -Galaksidaz immobilizasyonu, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*”, Yüksek lisans tezi, s.10, Ankara, 2007.
7. Das, D., Ghosh, S., Basumallick, I., “Electrochemical studies on glucose oxidation in an enzymatic fuel cell with enzyme immobilized on to reduced graphene oxide surface”, *Electroanalysis.*, 26, 2408-2418, 2014.

8. Tsang, S., C., Yu, C., H., Gao, X., Tam., K., “Silica-encapsulated nanomagnetic particle as a new recoverable biocatalyst carrier”, *J. Phys. Chem.*, 110, 16914, 2006.
9. Manuel, J., Kim, M., Dharela, R., Chauhan, G., S., Fapyane, D., Lee, S., J., Chang, I., S., Kang, S., H., Kim, S., W., Ahn, J., H., “Functionalized polyacrylonitrile nanofibrous membranes for covalent immobilization of glucose oxidase”, *Journal of Biomedical Nanotechnology.*, 11, 143-149, 2015.
10. Carlsson, J., Axen, R., Unge, T., “Reversible, covalent immobilization of enzymes by thiol-disulphide interchange” *European Journal of Biochemistry*, 59, 567-572, 1975.
11. Kayhan, S., “Kondenzasyon metoduyla nanoplatformlara Schiff bazı takılması ve glukoz oksidaz enziminin biokatalizör olarak incelenmesi”, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, s.14, Ankara, 2013.
12. Bağcıer, Z., “Bazı Furfural türevlerinin (Aminometil) Polistiren’e takılması ve enzim immobilizasyon özelliklerinin incelenmesi”, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, s.4-11, Ankara, 2013.
13. Bal, M., Ceyhan G., “Synthesis and X-ray power diffraction, electrochemical and genotoxic properties of a new azo-Schiff base and its metal complexes”, *Turkish Journal of Chemistry.*, 38, 222-241, 2014.
14. Özbülül, A., “Oligofenol esaslı yeni tip oligomer schiff bazlarının sentezi ve karakterizasyonu” *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, s.2-3, Adana, 2006.
15. Marcell, D., L., Thatyana, R., A., ., “Synthesis and antitubercular activity of novel Schiff base derived from D-mannitol”, *Carbohydr. Res.*, 12, 2042-2047, 2009.

16. Nishat, N., Khan, S., A., Parveen, S., Rasool, R. "Antimicrobial agents: synthesis, spectral, thermal, and biological aspects of a polymeric Schiff base and its polymer metal(II) complexes", *Journal of Coordination Chemistry*, 63, 3944-3955, 2010.
17. Kianfar, A., H., Paliz, M., Roushani, M., Shamsipur, M., "Synthesis, spectroscopy, electrochemistry and thermal study of vanadyl tridentate Schiff base complexes", *Spectrochim. Acta A*, 82, 44-48, 2011.
18. Akbari, A., Alinia, Z., "Synthesis, characterization, and DFT calculation of a Pd(II) Schiff base complex" *Turkish Journal of Chemistry*, 37, 867-878, 2013.
19. Hamil, A., M., Khalifa, K., M., Al-Houni, A., El-Ajaily, M., M., "Synthesis, spectroscopic investigation and antiactivity of Schiff base complexes of cobalt (II) and copper (II) ions" *Rasayan Journal of Chemistry*, 2, 261-266, 2009.
20. Rosu, t., Pasculescu, S., Lazar, V., Chifiriuc, C., Cernat, R., "Copper(II) complexes with ligands derived from 4-amino-2,3-dimethyl-1-phenyl-3-pyrazolin-5-one: synthesis and biological activity" *Molecules*, 11, 904-914, 2006.
21. Kurtoğlu, M., İspir, E. Kurtoğlu, N., Serin, S., "Novel vic-dioximes: Synthesis, complexation with transition metal ions, spectral studies and biological activity", *Dyes Pigments*, 77, 75-80, 2008.
22. Aynacı, E., "Aminometil polistirene takılı Schiff bazı ve O'nun Ni(II) kompleksinin sentezi, karakterizasyonu ve β -Galaktosidaz enziminin immobilizasyon özelliklerinin incelenmesi" *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, s.3-4, Ankara, 2009.
23. Saçak, M., "Polimer kimyası" Gazi kitapevi, s.2-3, Ankar, 2012.

24. Fessenden, j., Fessenden S., “Organik kimya, ” Çeviri Editörü/editörleri, Tahsin Uyar, *Güneş kitap evi*, s.275, 1093, 610-611, Ankara, 1992.
25. Sari, N., Özcan, S., “Synthesis, characterization and selectivity studies of poly(acrylamide) incorporating Schiff bases”, *Chinese Journal of polymer science* , 5, 675-683, 2009.
26. Xiang, T., “Synthesis and characterization of polymeric Schiff bases from 2,5-diformylfuran”, *The Graduate Faculty of University of Akron In Partial Fulfillment of The Requirements For The Degree Master of Science*, s.20, 2012.
27. Khobystov, A.N., Blake, A.J., Champness, N.R., Lemenovskii, A.G., Majouga, N.V. Zyk., Schröder, M., “Supramolecular design of one-dimensional coordination polymers based on silver(I) complexes of aromatic nitrogen-donor ligands” *Coordination Chemistry Reviews*, 222, s.155-192, 2001.
28. Korshak, V.V., Vinogradova, S.V., Artemova, V.A., “Vysokomolekul Sosiden.”, 2, s.492, 1960.
29. Döbereiner, J., W., “Ueber die medicinische und chemische Anwendung und die vortheilhafte Darstellung der Ameisensaure” *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 3 (2), 141-146, 1832.
30. Kumar, S., Dhar, D., N., Saxena, P., N., Kanpur, I., “Applications of metal complexes of Schiff bases-Areview” *Journal of Scientific & Industrial Research*, 68, 181-187, 2009.
31. Kiran, Ö., Çömlekoğlu, U., Dostbil, N., *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9(1), 2006.
32. Starr, C., Taggart, R., “ Genel Biyoloji-1”, Hasenekoğlu, İ., *Atatürk Üniversitesi Yayınları*, s.61 , *Erzurum*, 1999.

33. Keha, E., Küfrevioğlu, İ., “Biyokimya”, *Aktif Yayınevi*, s.101-111 , Erzurum, 2000.
34. Todde, G., Hovmeöller, S. Laaksonen, A., Mocci, F., “Glucose oxidase from penicillium amagasakiense: Characterization of the transition state of its denaturation from molecular Dynamics simulations”, *Proteins*, 82, 2353-2363, 2014.
35. Milton, D. R., Giroud, F., Thumser, A. E., Minteer, D. S., Slade, R.C.I., “Hydrogen peroxide produced by glucose oxidase affects the performance of laccase cathodes in glucose/oxygen fuel cells: FAD-dependent glucose dehydrogenase as a replacament”, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15, 19371-19379, 2013.
36. Rasiah, I. A., Sutton, K. H., Low, F. L., Lin, H-M., Gerrard, A., “Crosslinking of wheat dough proteins by glucose oxidase and the resulting effects on bread and croissants”, *Food Chemistry*, 89, 325-332, 2013.
37. Ertaş, N., Bilgiçli, N., Türker, S., “Aktifsoya unu, glukoz oksidaz ve lipaz enzim katkılarının un, hamur ve ekmek özelliklerine etkisi”, *Gıda kongresi*, s.143-149, Konya, 2005.
38. Gamella, M., Guz, N., Mailloux, S., Pingarron, M. J., Katz, E., “Activation of a biocatalytic electrode by removing glucose oxidase from the surface-application to signal triggered drug release”, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 6,133490-13351, 2014.
39. Sümengen, M., “ Laktik asit bakterilerinden fitaz üretimi ve endüstriyel kullanım olanakları, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü* ”, Yüksek lisans tezi, s.3, Adana, 2011.
40. Uludağ, Y., “ İmmobilize gluukoamilaz ile maltodekstrinden glukoz üretimi”, *Gebze İleri teknoloji Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans tezi, s. Kocaeli, 2000.

41. Nisha, S., Arun Karthick S., Gobi, N., “A review on methods, application and properties of immobilized enzyme”, *Chemical Science Review and Letters*, 1 (3), 148-155, 2012.
42. Mojica, E., S., Lohrasbi, M., Chuang, S.,S., C., “Porous Poly(vinyl alcohol) composite membranes for immobilization of glucose oxidase”,*Springer Science+Business Media*, 57, s. 1490-1497, NewYork, 2014.
43. Akpolat, O., Ayhan, F., Ayhan, H., “Glukoz osidaz enzim agregatları kullanarak β -D-glukozun parçalanma kinetiğinin modellenmesi”, *Türk Biyokimya Dergisi*, 38 (4), 483-493, 2013.
44. Tutar, H., “Candida rugosa lipaz enziminin sporopollenin üzerine adsorbsiyonu ve karakterizasyonu, *Selçu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*”, Yüksek lisans tezi, s.26-30, Konya, 2009.
45. Alagöz, D., “ β -Galaktozidaz ve glukoz izomeraz’ın Eupergit desteğine kovalent immobilizasyonu ve immobilize enzimlerin Laktoz hidrolizi ve glukoz izomerizasyonunda kullanılması, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü*” Yüksek Lisans Tezi, s.4, Adana, 2007.
46. Kocatürk, S., “Enginar polifenol oksidazın alginat ve karragenan jellerde immobilizasyonu ve bazı biyokimyasal özelliklerinin incelenmesi, *Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*”, Yüksek lisans tezi, s.11, Edirne, 2008.
47. Zucca, P., Sanjust, E., “İnorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: Methods and mechanisms”, *molecules*, 19, 14139-14194, 2014.
48. Sato, T., Tosa, T., “Enzymes, immobilization methods”, *Tanabe Seiyaku Co. Ltd.*, 1062-1064,

49. Bayındırlı A.,” Enzimlerin tutuklanması ve gıda sanayinde muhtemel kullanım alanları”, 20 (2), 113-116, 1995.
50. Hamdan, S., “Studies of the preparations and use of sol-jel for enzyme immobilization and analytical applications, *East Tennessee State University in Partial Fulfillment of the requirements for The Degree*”, Master of science in Chemistry, s.18, 2009.
51. Hanefeld, U., Gardossi, L., Magner, E.,“Understanding enzymes”, *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cell, 15-30, The royal Society of Chemistry*, 38, 453-468, 2009.
52. Brena, M., B., Viera, B., F., “Immobilization of Enzymes”, *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells*, 15-30.
53. Gustafsson, H., “Enzyme Immobilization in Mesoporous Silica, *Chalmers University of Technology Department of Chemical and Biological Engineering*”, Master of science in Chemistry, s.10-12, Göteborg, 2012.
54. Nigam, S., Mehrotra, S., Vani, B., Mehrotra R., “Lipase immobilization techniques for biodiesel production: An overview”,*International Journal of Renewable Energy&Biofuels*, 16, 2014.
55. Spahn, C., Minter, S., D.,“Enzyme immobilization in biotechnology”, *Recent Patents on Engineering*, 2, 195-200, 2008.
56. Alptekin, Ö.,“Katalazın eupergit, florisil ve cam desteklere kovalent olarak immobilizasyonu ve karakterizasyonu, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*” Doktora tezi, s.13-15, Adana, 2009.
57. Sheldon, R., A., “Immobilization: The quest for optimum performance” *Adv. Synth. Catal.*, 349, 1289-1307, 2007.

58. Demirkol, N., “Kitosan-poliakrilamid-polisitrakonik asit içeren yarı-ıpn tipi hidrojellerin şişme özellikleri ve lipaz salım davranışları, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*”, Yüksek lisans tezi, s.34-37, Ankara, 2006.
59. Gürel, İ., Arıca, M., Hasırcı, V., “İmmobilization of glucose oxidase and urease in hydrojel matrices”, *Turkish Journal of Chemistry*, 21, 387-393, 1997.
60. Cardiel, J. J., Zhao, Y., Tonggu, L., Wang, L., Chung, J-H., Shen, A. Q., “Flow-induced immobilization of glucose oxidase in nonionic micellar nanogels for glucose sensing”, *Royal Society of Chemistry*, 14, 3912-3916, 2014.
61. Bhakta, S. A., Benavidez, T. E., Garcia, C. D., “Immobilization of glucose oxidase to nanostructured films of polystyrene-block-poly(2-vinylpyridine)”, *Journal of Colloid and Interface Science*, 430, 351-356, 2014.
62. Karuppiyah, C., Palanisamy, S., Chen, S-M., Veeramani, V., Periakaruppan, P., “Direct electrochemistry of glucose oxidase and sensing glucose using a screen-printed carbon electrode modified with graphite nanosheets and zinc oxide nanoparticles”, *Microchim Acta* , 181, 1843-1850, 2014.
63. Mani, V., Devasenathipathya, R., Chen, S., Huang, S., Vasanthaca, V., “Immobilization of glucose oxidase on graphene and cobalt phthalocyanine composite and its application for the determination of glucose”, *Enzyme and Microbial Technology*, 66, 60-66, 2014.
64. Welch, M. E., Doublet, T., Bernard, C., Malliaras, G. G., Ober, C. K., “A glucose sensor via stable immobilization of the GOx enzyme on an organic transistor using a polymer brush”, *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 53, 372-377, 2015.

65. Su, S., Sun, H., Xu, F., Yuwen, L., Fan, C., Wang, L., “Direct electrochemistry of glucose oxidase and a biosensor for glucose based on a glass carbon electrode modified with MoS₂ nanosheets decorated with gold nanoparticles”, *Microchim Acta*, 181, 1497-1503, 2014.
66. Vogt, S., Schneider, M., Schafer-Eberwein, H., Nöll, G., “Determination of the pH dependent redox potential of glucose by spectroelectrochemistry”, *Analytical Chemistry*, 86, 7530-7535, 2014.
67. Özden, M., Ekici, E., Karagözler, A. E., “Electrochemical preparation and sensor properties of conducting polyaniline films”, *Turkish Journal Chemistry*, 23, 89-98, 1999.
68. Hasanoğlu Özkan, E., Kurnaz Yetim, N., Nartop, D., Sarı, N., “Influence of load on the recycling stability of nanospheres attached platinum ion for determination of glucose”, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 25, 180-185, 2015.
69. Kayhan, S., Sarı, N., Nartop, D., “Nanoplatfoms attached Schiff bases by condensation method; investigation of glucose oxidase enzyme as biocatalysts”, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, Early Online, 1-6, 2013.
70. Pazur, J.,H., Kleppe, K., Cepure, A., “A glycoprotein structure for glucose oxidase from *Aspergillus niger*”, *Archives of Biochemistry Biophysics*, 111(2):351-7, 1965.
71. Leskovaca, V., Trivic, S., Wohlfahrt, G., Kandrac, J., Pericin, D., “Glucose oxidase from *Aspergillus Niger*: The mechanism of action with molecular oxygen, quinones, an done-electron acceptors” *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37, 731–750, 2005.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı , Soyadı : Murat GÜLEÇ
Uyruğu : T.C.
Doğum Tarihi ve Yeri : Aybastı / 06.03.1981
Medeni Hali : Evli
Tel : 0 (505) 377 84 91
E-posta : murat_gulec52@hotmail.com
Yazışma Adresi : Derinkuyu Mehmet Ekmekci Anadolu Lisesi
Derinkuyu/Nevşehir.

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi, Kimya Öğretmenliği Bölümü	2003
Lise	Kırşehir Lisesi	1998

YABANCI DİL

İngilizce