



**POLİSTİREN DESTEKLİ FARKLI KOL UZUNLUKLARINA SAHİP
FERROSENİN BİYOKATALİZ ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Esin ANTEPLİ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK 2015

Esin ANTEPLİ tarafından hazırlanan “POLİSTİREN DESTEKLİ FARKLI KOL UZUNLUKLARINA SAHİP FERROSENİN BİYOKATALİZ ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Nurşen SARI

Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

Başkan : Prof. Dr. Nurcan KARACAN

Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

Üye : Prof. Dr. Hamza YILMAZ

Kimya Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

Tez Savunma Tarihi: 20 / 01 / 2015

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....
Prof. Dr. Şeref SAĞIROĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Esin ANTEPLİ

20/01/2015

POLİSTİREN DESTEKLİ FARKLI KOL UZUNLUKLARINA SAHİP FERROSENİN
BİYOKATALİZ ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Esin ANTEPLİ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2015

ÖZET

Bu çalışmada, glukoz tayini için üç adet yeni ferrosen şapkalı nanoküreler ((PS-N-Fc), (PS-N-C-C-N-Fc) ve (PS-N-C-C-C-N-Fc)) hazırlandı. Nanokürelerin yapılarını aydınlatmak için FT-IR, GPS ve element analizlerinden yararlanıldı. Ferrosen şapkalı nanokürelerin yüzey yapısındaki değişiklikler SEM/EDX ile belirlendi. β -Glukoz oksidaz (GOx), hazırlanan ferrosen şapkalı nanoküreler üzerine adsorpsiyon yöntemine göre immobilize edildi. Serbest ve immobilize GOx enzim üzerine sıcaklık, pH, tekrar kullanım, depolama kararlılığı ve kinetik parametreler araştırıldı. (PS-N-Fc), (PS-N-C-C-N-Fc) ve (PS-N-C-C-C-N-Fc)'e immobilize edilen enzim için, optimum pH belirlenmiş olup, bunlar sırası ile pH=7,0, pH=8,0 ve pH=8,0 dir. (PS-N-Fc) nanoküreye tutturulan enzimin optimum sıcaklığı 60 °C olarak belirlenirken, (PS-N-C-C-N-Fc) ve (PS-N-C-C-C-N-Fc) nanoküreye tutturulan enzimin optimum sıcaklığı 40 °C olarak belirlendi. Lineweaver-Burk eğrileri çizildi, Vmax ve Km değerleri hesaplandı. (PS-N-Fc), (PS-N-C-C-N-Fc) ve (PS-N-C-C-C-N-Fc)'e immobilize edilen enzim için, sırasıyla 0,274 mM.dak⁻¹; 2,47 mM, 76,92 mM.dak⁻¹; 4,61 mM ve 71,43 mM.dak⁻¹; 3,75 mM olarak hesaplandı.

Bilim Kodu : 201.1.005
Anahtar Kelimeler : Ferrosen, enzim immobilizasyonu, β -Glukoz oksidaz, modifiye polimer
Sayfa Adedi : 69
Danışman : Prof. Dr. Nurşen SARI

INVESTIGATION OF BIOCATALYSIS PROPERTIES OF POLYMERIC SUPPORT
ATTACHED FERROCENE WITH DIFFERENT ARM LENGHTS

(M. Sc. Thesis)

Esin ANTEPLİ

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

January 2015

ABSTRACT

In this study, three novel ferrocene-tagged materials ((PS-N-Fc), (PS-N-C-C-N-Fc) and (PS-N-C-C-C-N-Fc)) are designed for glucose determination. Structure of all ferrocene-tagged material have been characterized by using spectral analysis such as FT-IR, GPS and elemental analysis. The changes in the surface structure of modified polymers were examined with SEM/EDX analysis. Glucose oxidase were immobilized onto ferrocene-tagged materials with using the adsorption method. The influence of temperature, pH and reusability, storage capacity on the free and immobilized glucose oxidase were investigated. The immobilized glucose oxidase on (PS-N-Fc), (PS-N-C-C-N-Fc) and (PS-N-C-C-C-N-Fc) showed an optimum pH values that were pH=7,0, pH=8,0 and pH=8,0. Optimum temperature for (PS-N-Fc) showed at 60 °C, for (PS-N-C-C-N-Fc) and (PS-N-C-C-C-N-Fc) at 40 °C also. Kinetic parameters were calculated for (PS-N-Fc), (PS-N-C-C-N-Fc) and (PS-N-C-C-C-N-Fc) 0,274 mM.min⁻¹; 2,47 mM, 76,92 mM.min⁻¹ ; 4,61 mM and 71,43 mM.min⁻¹ ; 3,75 mM respectively.

Science Code : 201.1.005

Key Words : Ferrocene, immobilization of enzyme, β -Glucose oxidase, modified polymer

Page Number : 69

Supervisor : Prof. Dr. Nurşen SARI

TEŞEKKÜR

Öncelikle çalışmam boyunca benden desteğini, bilgisini ve tecrübelerini esirgemeyen çok değerli hocam Prof. Dr. Nurşen SARI'ya gösterdiği sabır, samimiyet ve anlayış için teşekkürlerimi sunarım.

Yardımlarını ve tecrübelerini benden hiçbir zaman esirgemeyen sayın hocalarım Prof. Dr. Bekir SARI, Doç. Dr. Fatma ARSLAN ve Doç. Dr. Hayrettin TÜMTÜRK'e teşekkürlerimi sunarım.

Maddi, manevi desteği ile her zaman bana güvenen ve yanımda olan canım annem Türkan ANTEPLİ'ye, canım ablam Elif UYSAL'a sonsuz teşekkürler. Canım babam biliyorum ki beni görüyor ve benimle gurur duyuyorsun.

Her zaman, her konuda ve her durumda yanımda olup elimi tutan, hayatımın geri kalanını birlikte geçirmeyi tüm kalbimle istediğim insan Murat GÜMÜŞ'e sonsuz teşekkürler. İyi ki varsın.

Laboratuvarında, katıldığımız kongrelerde birlikte geçirdiğimiz güzel zamanlar ve bana yardım etmekten hiç vazgeçemedikleri için sevgili hocalarım, canım ablalarım Nurdan KURNAZ YETİM ve Elvan HASANOĞLU ÖZKAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Samimiyeti ile beni mutlu eden, sorunlarıma çözüm getirmekten çekinmeyen arkadaşlarım Aysu ÇETİN ve Doğukan DOYDUK'a teşekkür ederim.

Son olarak, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Müdürlüğü'ne yüksek lisans tezime sağladıkları katkılardan dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	x
RESİMLERİN LİSTESİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Organometaller Hakkında Genel Bilgi.....	3
2.2. Ferrosen.....	4
2.3. Schiff Bazı İçeren Polimerler	13
2.4. İmmobilizasyon.....	16
2.5. β -Glukoz oksidaz (GOx) Enzimi	18
3. MATERYAL VE METOT	23
3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar	23
3.1.1. Kimyasal maddeler.....	23
3.1.2. Cihazlar	24
4. DENEYSEL BÖLÜM.....	25
4.1. Ferrosen Takılı Schiff Bazı İçeren Polimerlerin Hazırlanması.....	25
4.1.1. Tek karbon kollu ferrosen – polimer desteğin (PS-N-Fc) hazırlanması.....	25
4.1.2. İki karbon kollu ferrosen – polimer desteğin (PS-N-C-C-N-Fc) hazırlanması.....	25
4.1.3. Üç karbon kollu ferrosen – polimer desteğin (PS-N-C-C-C-N-Fc) hazırlanması.....	26
4.2. İmmobilizasyon İçin Stok Enzim Çözeltilisinin Hazırlanması	26
4.3. Sentezlenen Destek Polimerlere β -Glukoz oksidaz Enziminin İmmobilize Edilmesi	27
4.4. İmmobilize β -Glukoz oksidaz Enziminin Aktifliğine pH Etkisi.....	27
4.4.1. pH tamponlarının hazırlanması	27

Sayfa

4.5. İmmobilize β -Glukoz oksidaz Enziminin Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi	28
4.6. İmmobilize β -Glukoz oksidaz Enziminin Aktifliğine Substrat Derişiminin Etkisi	28
4.6.1. Derişim çalışmalarında kullanılan stok glukoz çözeltisinin hazırlanması	28
4.7. Serbest β -Glukoz oksidaz Enziminin Aktifliğine Substrat Derişiminin Etkisi...	28
4.8. İmmobilize β -Glukoz oksidaz Enziminin Tekrar Kullanılabilirliği	29
4.9. İmmobilize β -Glukoz oksidaz Enziminin Depolama Kararlılığı	29
5. SONUÇ	31
5.1. Farklı Kol Uzunluğunda Ferrosen Takılı Polimerlerin Karakterizasyonu	31
5.1.1. PS-N-Fc polimerinin karakterizasyonu	34
5.1.2. PS-N-C-C-N-Fc polimerinin karakterizasyonu	36
5.1.3. PS-N-C-C-C-N-Fc polimerinin karakterizasyonu	38
5.2. İmmobilize β -Glukoz oksidaz Enzimi İle İlgili Çalışmalar	40
5.2.1. İmmobilize β -Glukoz oksidazın aktifliğine pH etkisi	40
5.2.2. İmmobilize β -Glukoz oksidazın aktifliğine sıcaklık etkisi	41
5.2.3. Serbest ve immobilize β -Glukoz oksidaz enziminin aktifliğine substrat derişiminin etkisi	43
5.2.4. İmmobilize β -Glukoz oksidaz Enziminin Tekrar Kullanılabilirliği	46
5.2.5. İmmobilize β -Glukoz oksidaz Enziminin Depolama Kararlılığı	49
6. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	53
6.1. Karakterizasyona ait değerlendirmeler	53
6.2. İmmobilizasyon çalışmalarına ait değerlendirmeler	53
6.3. Öneriler	55
KAYNAKLAR	57
EKLER.....	63
EK-1. 2012 Yılında Yayımlanan Makalemizin İlk Sayfası	64
EK-2. IV. Ulusal Anorganik Kimya Kongresi Kitapçık Kapak Sayfası Görüntüsü.....	65
EK-3. IV. Ulusal Anorganik Kimya Kongresi Posterli Sunum Özeti	66
EK-4. V. Biyoteknoloji Kongresi Bilimsel Program Kapak Sayfası Görüntüsü	67
EK-5. V. Biyoteknoloji Kongresi Posterli Sunum Özeti	68
ÖZGEÇMİŞ	69

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 5.1. Modifiye edilen polimerlerin M_w , M_n ve element analiz yüzdeleri.....	32
Çizelge 5.2. Modifiye edilen polimerlerin belirgin FT-IR frekansları (cm^{-1}).....	34
Çizelge 5.3. Sentezlenen polimerlere immobilize edilen β -Glukoz oksidaz için seçilen optimum pH ve sıcaklık değerleri.....	43
Çizelge 5.4. İmmobilize enzim ve serbest enzim için kinetik parametreler	46

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Fulvalen bileşiğinin yapısı	3
Şekil 2.2. Pauson ve Kealy'nin Ferrosen Sentezi	4
Şekil 2.3. Ferrosen'in yapısı	4
Şekil 2.4. Ferrosen'in Konformasyonları.....	5
Şekil 2.5. Ferroserone adıyla satışı sunulmuş bileşik.....	6
Şekil 2.6. Ferrosenil penisilin türevi bileşik	6
Şekil 2.7. Ferroquin Bileşiği	7
Şekil 2.8. İmmüno-elektrot sistemindeki elektron alışverişi	7
Şekil 2.9. Ferrosen-Lidokain konjuge yapısı	8
Şekil 2.10. Kun Shang ve arkadaşlarının çok katmanlı nano tüpler, ferrosen ve poli(amido amin) ile hazırladığı çalışma elektrodu	9
Şekil 2.11. Zhang ve arkadaşlarının bağışıklık türlerinin işaretleyicisi olarak hazırladığı ferrosen içeren çip	9
Şekil 2.12. Kitin(a) ve Çitosan(b)'ın Yapısı	10
Şekil 2.13. Qui ve arkadaşlarının hazırladığı, yapısında ferrosen içeren Hepatit B'ye duyarlı sensör şeması.....	11
Şekil 2.14. Shim ve arkadaşlarının ferrosen türevi ile grafit karbon üzerinde β -Glukoz oksidaz enziminin immobilizasyonu.....	11
Şekil 2.15. Elektrokimyasal yöntemle sentezlenmiş ferrosen türevi polimerin Kurtz Mikrobalans Yöntemini kullanarak CO ile etkileşimi	12
Şekil 2.16. GenMarkDx şirketinin desteklediği, eSensor® XT-8 adındaki DNA sensörünün çalışma prensibi.....	13
Şekil 2.17. Poliakrilamit ve aldehitten yola çıkılarak sentezlenen Schiff bazı içeren polimerin sentez rotası.....	14
Şekil 2.18. Aldehit ve Poli(akrilamit) yapıları.....	14
Şekil 2.19. Nartop ve Sarı'nın sentezlediği Schiff bazı içeren polimerin yapısı	15
Şekil 2.20. Nartop ve arkadaşlarının sentezlediği Schiff bazı içeren polimerlerin sentez rotası.....	16
Şekil 2.21. Enzim immobilizasyon yöntemleri.....	17
Şekil 2.22. <i>Aspergillus niger</i> mantarı	19
Şekil 2.23. Zhongju Song ve çalışma grubunun tümör tanısı için tasarladığı immünotest sistemi	20

Şekil	Sayfa
Şekil 2.24. Zhongju Song ve çalışma grubunun tümör tanısı için tasarladığı immünotest sisteminde gerçekleşen tepkimeler.....	20
Şekil 2.25. CS-Fc/GO/GOx modifiye elektrot sistemi ve GOx tarafından katalizlenen glukoz oksidasyonunun şematik gösterimi	21
Şekil 2.26. Modifiye edilen polimere enzimin bağlanma şeklinin şematik gösterimi....	22
Şekil 4.1. PS-N-Fc destek polimerinin sentezinde izlenen yol.....	25
Şekil 4.2. PS-N-C-C-N-Fc destek polimerinin sentezinde izlenen yol.....	26
Şekil 4.3. PS-N-C-C-C-N-Fc polimerinin sentezinde izlenen yol.....	26
Şekil 5.1. (Aminometil)polistirene ait FT-IR spektrumu.....	33
Şekil 5.2. PS-N-Fc polimerinin ön görülen yapısı.....	34
Şekil 5.3. PS-N-Fc polimerine ait FT-IR spektrumu	35
Şekil 5.4. PS-N-C-C-N-Fc polimerinin ön görülen yapısı.....	36
Şekil 5.5. PS-N-C-C-N-Fc polimerine ait FT-IR spektrumu	37
Şekil 5.6. PS-N-C-C-C-N-Fc polimerinin ön görülen yapısı.....	38
Şekil 5.7. PS-N-C-C-C-N-Fc polimerine ait FT-IR spektrumu	39
Şekil 5.8. PS-N-Fc polimere immobilize edilen β -Glukoz oksidazın aktifliğine pH etkisi	40
Şekil 5.9. PS-N-C-C-N-Fc polimere immobilize edilen β -Glukoz oksidazın aktifliğine pH etkisi.....	41
Şekil 5.10. PS-N-C-C-C-N-Fc polimere immobilize edilen β -Glukoz oksidazın aktifliğine pH etkisi.....	41
Şekil 5.11. PS-N-Fc polimere immobilize edilen β -Glukoz oksidazın aktifliğine sıcaklık etkisi	42
Şekil 5.12. PS-N-C-C-N-Fc polimere immobilize edilen β -Glukoz oksidazın aktifliğine sıcaklık etkisi	42
Şekil 5.13. PS-N-C-C-C-N-Fc polimere immobilize edilen β -Glukoz oksidazın aktifliğine sıcaklık etkisi	42
Şekil 5.14. pH 7’de serbest β -Glukoz oksidazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi	43
Şekil 5.15. pH 8’de serbest β -Glukoz oksidazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi	44
Şekil 5.16. PS-N-Fc isimli polimere immobilize edilen β -Glukoz oksidazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi.....	44
Şekil 5.17. PS-N-C-C-N-Fc isimli polimere immobilize edilen β -Glukoz oksidazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi.....	45

Şekil	Sayfa
Şekil 5.18. PS-N-C-C-C-N-Fc isimli polimere immobilize edilen β -Glukoz oksidazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi.....	45
Şekil 5.19. PS-N-Fc polimere immobilize edilen β -Glukoz oksidazın tekrar kullanılabilirliği ve kullanım sayısı arttıkça meydana gelen renk değişimi.....	47
Şekil 5.20. PS-N-C-C-N-Fc polimere immobilize edilen β -Glukoz oksidazın tekrar kullanılabilirliği ve kullanım sayısı arttıkça meydana gelen renk değişimi.....	48
Şekil 5.21. PS-N-C-C-C-N-Fc polimere immobilize edilen β -Glukoz oksidazın tekrar kullanılabilirliği ve kullanım sayısı arttıkça meydana gelen renk değişimi.....	49
Şekil 5.22. PS-N-Fc polimere immobilize edilen β -Glukoz oksidazın depolanması süresince gösterdiği bağlı aktiflik	50
Şekil 5.23. PS-N-C-C-N-Fc polimere immobilize edilen β -Glukoz oksidazın depolanması süresince gösterdiği bağlı aktiflik	50
Şekil 5.24. PS-N-C-C-C-N-Fc polimere immobilize edilen β -Glukoz oksidazın depolanması süresince gösterdiği bağlı aktiflik.....	51
Şekil 6.1. İmmobilize olmuş β -Glukoz oksidaz ile yapılan deneylerde ortamda gerçekleřtięi dűřűnűlen reaksiyonlar	55

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 5.1. Sentezlenen PS-N-Fc, PS-N-C-C-N-Fc ve PS-N-C-C-C-N-Fc polimerlerinin görüntüleri	31
Resim 5.2. PS-N-Fc polimerinin SEM (100 ve 500 büyötmeli) görüntüsü.....	35
Resim 5.3. PS-N-Fc polimerinin EDX spektrumu.....	36
Resim 5.4. PS-N-C-C-N-Fc polimerinin SEM (100 ve 500 büyötmeli) görüntüsü	37
Resim 5.5. PS-N-C-C-N-Fc polimerinin EDX spektrumu	38
Resim 5.6. PS-N-C-C-C-N-Fc polimerinin SEM (100 ve 400 büyötmeli) görüntüsü ..	39
Resim 5.7. PS-N-C-C-C-N-Fc polimerinin EDX spektrumu	40

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

$\text{\AA}$	Angstrom (1.0×10^{-10} m değerinde uzunluk ölçü birimi)
K_m	Michaelis-Menten sabiti
V_{max}	Maksimum hız
ν (cm^{-1})	Gerilme titreşimi

Kısaltmalar

Açıklamalar

Fc	Ferrosen
FT-IR	Fourier Dönüştürümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GOx (GOD)	β -Glukoz oksidaz enzimi
GPC	Jel Geçirgenlik Kromatografisi
$^1\text{H-NMR}$	Proton Nükleer Manyetik Rezonans
ICP-MS	İndüktif Olarak Eşleştirilmiş Plazma-Kütle Spektrometrisi
M_n	Sayıca Ortalama Mol Kütlesi
M_w	Kütlece Ortalama Mol Kütlesi
PDI	Heterojenlik İndeksi
PS-N-C-C-C-N-Fc	Ferrosenkarboksaldehit ve 1,3-diaminopropan ile modifiye edilen AMEBA resin polimeri
PS-N-C-C-N-Fc	Ferrosenkarboksaldehit ve etilendiamin ile modifiye edilen AMEBA resin polimeri
PS-N-Fc	Ferrosenkarboksaldehit ile modifiye olan (Aminometil)polistiren polimeri
SEM/EDX	Taramalı Elektron Mikroskobu/Enerji Dağılım X-ışını Kırınımı
TGA/DTA	Termogravimetrik Analiz/Diferansiyel Termal Analiz

1. GİRİŞ

19. yüzyıldan itibaren bilim insanlarının, sentezlenen organometalik moleküllerin yapısını aydınlatmak istemesi, özellikle spektrofotometre cihazları üzerine olan gelişmeler, bu bileşiklerin çeşitlenmesine hız kazandırmıştır. Organometalik bileşiklerin “metal-karbon bağı içeren bileşikler” olarak tanımlanmasından günümüze kadar, çok geniş çalışma alanı haline gelecek olan “organometaller kimyası” başlığı altında yeni bir bilim dalının oluştuğu görülmektedir.

Ferrosen, bu yeni bilim dalının alt alanı olan “sandviç bileşikleri” sınıfının ilk üyesidir. Pauson ve Kealy’nin fulvalen bileşiğini sentezlemeye çalışması sırasında keşfedilmiştir. Yapıdaki Fe atomunun üstün elektrokimyasal özelliği sayesinde, redoks reaksiyonlarındaki katkısı, hem organik hem de inorganik yapıda olması ve çok iyi termal kararlılığa sahip olması gibi özellikler nedeniyle, ferrosenin araştırmacılar için cazip bir molekül olduğu kaynaklardan görülmektedir.

Ferrosenin üstün özellikleri sayesinde, endüstriyel alanda, biyosensör hazırlanmasında, tedavi amaçlı ilaç sentezlerinin çeşitlenmesi gibi geniş kullanım alanına sahip olması, sunulan tezin çıkış noktasını oluşturmuştur. Hem endüstriyel, hem sağlık, hem de fen bilimi alanında dikkat çekebileceğini düşündüğümüz ferrosen içerikli materyali hazırlamak ve biyokataliz özelliğini incelemek tezin amacını oluşturmuştur.

Sunulan tezin ilk bölümünde, farklı kol uzunluklarına sahip ferrosen, nanoküre yapısındaki polimerlerle tepkimeye sokularak, enzim immobilizasyonuna elverişli destek materyaller sentezlenmiştir. Sentezlenen polimerlerin yapısı çeşitli analiz yöntemleriyle aydınlatılmıştır (GPC, Element Analizi, FT-IR, SEM-EDX). İkinci bölümünde ise adsorpsiyon yöntemine göre β -Glukoz oksidaz enzimi immobilize edilmiş, serbest enzim ve immobilize olmuş enzimin biyokataliz özellikleri araştırılmıştır.

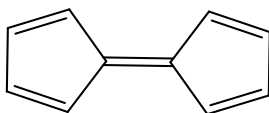
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Organometaller Hakkında Genel Bilgi

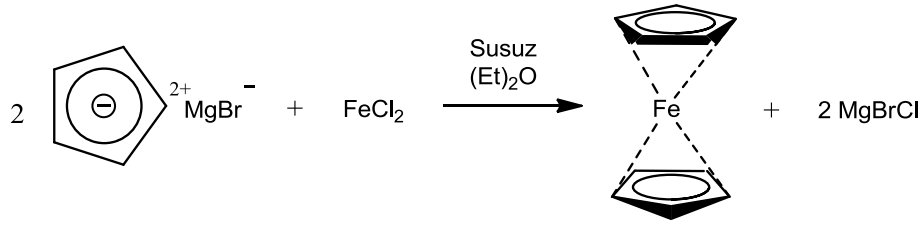
Organik kimya ve anorganik kimya arasında olan ve her iki bilimi de kullanan organometaller kimyası, bir ya da daha fazla metal-karbon bağı içeren bileşiklerin kimyası olarak tanımlanmaktadır. 20. yüzyılın başlarından itibaren gelişme gösteren bu alana, metal ve karbon atomu arasında hem σ hem de π bağı içeren bileşikler, bir veya daha çok sayıda metal-metal bağı içeren bileşikler ve organik kimyada bilinmeyen veya alışılmışın dışında yapıdaki moleküller dahil edilmektedir [1]. Metal-karbon bağının özelliği iyonik karakterden kovalent karaktere kadar geniş bir aralıkta değişkenlik göstermesidir. Organik kısım bağı karakterinde bir rol üstlense de başlıca etken, bileşiğin yapısındaki metal atomudur [2].

Organometalik kimya alanındaki ilk araştırma 1912 yılında, Nobel ödüllü bir araştırma olan organomagnezyum halojenürlerin sentezi olup, günümüzde Grignard reaktifleri olarak bilinmektedir. Grignard reaktiflerinin birçok kullanım alanı olmakla birlikte, özellikle alkol, aldehit, keton gibi organik bileşiklerin sentezinde kullanılmaktadır [3].

1950-1960 yılları arasında elektronik spektrumların analizi üzerine önemli gelişmeler sayesinde, Zeise tuzu ve ferrosen gibi keşiflerin organometalik kimyanın kuramsal temellerini belirlemede önemli bir katkı sağladığı görülmektedir. 1951 yılında, İngiliz kimyacı Pauson ve öğrencisi Kealy, bir Grignard reaktifi olan siklopentadienilmagnezyum bromür ile demir(II) klorürü etkileştirerek fulvalen (Şekil 2.1) sentezlemeye çalışmış fakat bunun yerine ferroseni sentezlediklerini (Şekil 2.2) ifade etmişlerdir [4].



Şekil 2.1. Fulvalen bileşiğinin yapısı

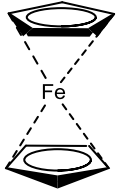


Şekil 2.2. Pauson ve Kealy'nin Ferrosen Sentezi

Organometal olan ferrosen ile (aminometil)polistirenin modifiye edilmesi ve enzim immobilizasyonu üzerine olan araştırmalarımızdan dolayı, ferrosen ve onun bazı uygulamaları hakkında genel bilgi aşağıda sunulmuştur (Bölüm 2.2).

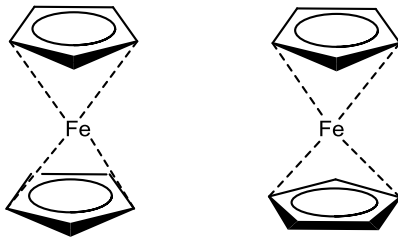
2.2. Ferrosen

Ferrosen (Şekil 2.3), molekül formülü $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{Fe}$ olan, su, kuvvetli asit ve bazlardan etkilenmeyen, erime noktası 174°C ve bozunma sıcaklığı 400°C 'un üzerinde olduğu bilinen turuncu renkli katı bir maddedir [5].



Şekil 2.3. Ferrosen'in yapısı

Ferrosenin yapısında bulunan düzgün beşgenler (siklopentadienler) ile demir atomu arasında bir etkileşim söz konusudur. 1951 yılında Almanya'da Fischer ve Phab [6], Amerika'da ise Wilkinson, Rosenblum, Whiting ve Woodward [7]'in yaptıkları çalışmalardan, ferrosenin iki farklı konformasyon yapısına sahip olduğu ve ferrosendeki siklopentadienil halkalarının, demir atomu ile etkileştiği ve halkalara dik bir eksen etrafında serbestçe dönebildiği belirtilmiştir [2, 8]. Bu iki konformasyon ise prizmatik ve anti-prizmatik form (Şekil 2.4) olarak adlandırılmıştır [8].



a. Prizmatik Form b. Anti-prizmatik Form

Şekil 2.4. Ferrosen'in Konformasyonları

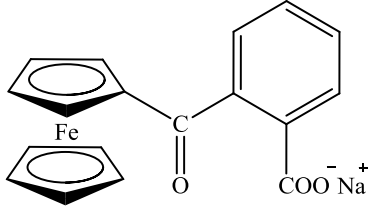
Ferrosen, organometalik bileşikler içerisinde “sandviç bileşikleri” olarak adlandırılan grubun ilk üyesidir. Sandviç bileşikleri, iki halka arasında metal atomu bulunduran bileşikler olarak tanımlanmaktadır [4]. Sandviç bileşiklerinde metal iyonu her iki halkadaki karbon atomları ile etkileşim içerisinde olduğundan, bu bileşikler son derece kararlı yapıdadır [9].

Ferrosen içeren bileşiklerin, hem organik hem de inorganik özellik göstermesi, yüksek termal kararlılık, çözücülerde iyi çözünme, sentezlerinin nispeten kolay olması, indirgenme yükseltgenme özelliğinin olması, merkezindeki demir atomu sayesinde kimyasal ve elektrokimyasal özellikler göstermesi, ferrosen ve türevlerine olan ilgiyi arttırmıştır [10, 11].

Ferrosen türevleri, elektrokimyasal özellikleri sayesinde sensör yapımında [12], kompozit roket yakıtlarında itici güç olarak [13], polimerik materyallerin mekanik özelliklerini iyileştirmede [14], hem aromatik karakteri hem de termal kararlılığı sebebiyle sıvı kristallerin hazırlanmasında [15], yüksek termal kararlılık, geri dönüşümlü redoks davranışı özellikleri ile de malzeme biliminde [16] kullanılmaktadır. Aynı zamanda ferrosen türevlerinin antitümör, antibakteriyel, antimalariyel, antifungal, antiproliferatif, antitüberküloz ve antimikrobiyal gibi geniş spektrumda biyolojik aktiviteye sahip olmasından dolayı gelecek yıllarda birçok hastalığın tedavisinde etkin madde olarak kullanılabileceği düşünülmektedir [9].

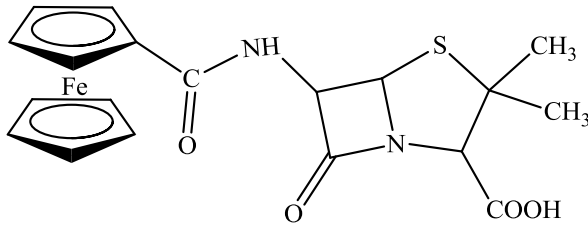
Yukarıda bahsedilen özelliklerden dolayı, ferrosen türevleri üzerine olan çalışmaların yaygın bir şekilde hâlâ devam ettiği görülmektedir. D. R. van Staveren ve N. Metzler-Nolte isimli araştırmacıların sentezledikleri ferrosen içerikli tuzun “ferroserone” adı

altında satışa çıkarıldığı ve demir eksikliği tedavisinde kullanıldığı görülmektedir (Şekil 2.5) [17].



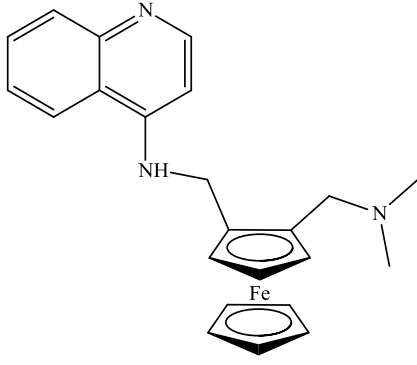
Şekil 2.5. Ferroserone adıyla satışa sunulmuş bileşik

Edwards E. I. ve arkadaşları ise çok bilinen bir antibiyotik olan penisilin ile ferrosen türevi içeren bileşiği (Şekil 2.6) sentezlemiş, bu bileşiğin β -laktamaz enzimini inhibe edici özelliğe sahip olduğunu rapor etmişlerdir [18].



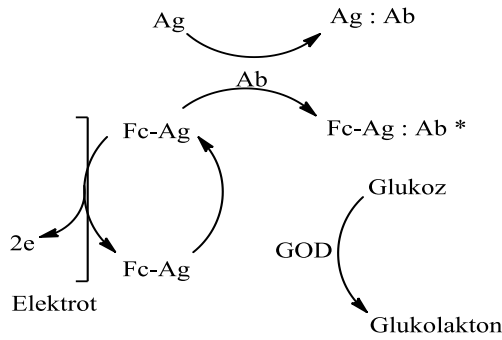
Şekil 2.6. Ferrosenil penisilin türevi bileşik

Araştırmacı Christophe Biot 2004 yılında, daha önce sentezlenmiş kloroquin (CQ) bileşiğine adapte olmuş ve direnç göstermeye başlamış malarya paraziti (plasmodium falciparum)'ne karşı yeni bir strateji arayışına girmiştir. Nitekim standart ilaçlara organometalik bileşiklerin eklenmesi stratejisi ile sentezlediği ve ferroquin (FQ)(Şekil 2.7) adını verdiği bileşik, umut verici biçimde anti-malaryal etki göstermiş, böylece kloroquine karşı direnç kazanmış olan parazitlerin büyümesini önlemek mümkün olmuştur [19].

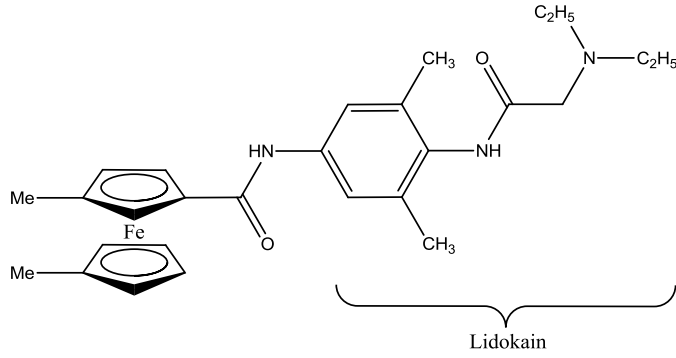


Şekil 2.7. Ferroquin Bileşiği

Katalin Di Gleria ve çalışma arkadaşlarına ait 1988 yılındaki çalışmada, antijen-antikor etkileşimine dayanan bir immüno-elektrot sistemini geliştirdikleri belirtilmiştir. Bu sistemde, antikor hazırlanmasında, oksijensiz ortamda glukozun glukolaktone yükseltgenebilmesi için elektron alışverişini (Şekil 2.8) sağlamak amacıyla ferrosen kullanılabileceğini belirtmiştir. Antijen ise elektrot sistemindeki ferrosen ile etkileştirilen lidokain olmuştur (lidokain; kalp ritmi düzenleyicisi olarak kullanılmaktadır) (Şekil 2.9) [20].



Şekil 2.8. İmmüno-elektrot sistemindeki elektron alışverişi (Ag : Antijen, Ab : Antikor, Fc-Ag : Ferrosen-Antijen Konjuge Yapısı, GOD : β -Glukoz oksidaz)



Şekil 2.9. Ferrosen-Lidokain konjuge yapısı

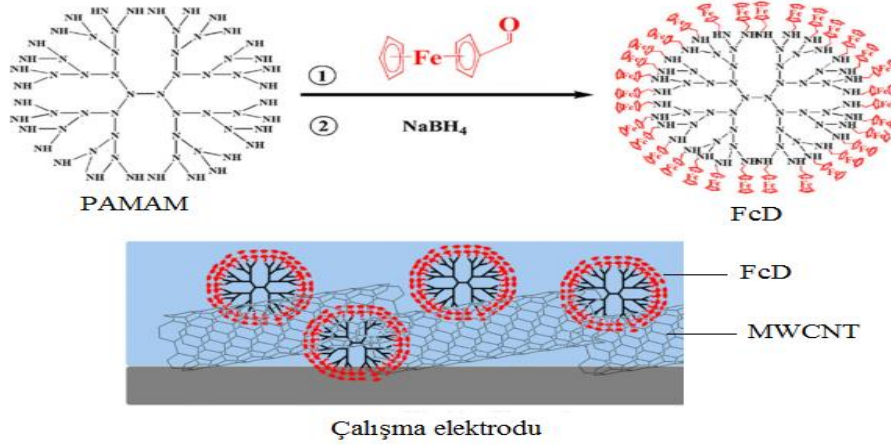
Halojen serilerinden biri olan brom atomunu içeren bir ferrosen türevi olan 1,1'-dibromoferrosen'i 1976 yılında sentezleyen Boev ve Dombrovskii [21] isimli araştırmacıların, ferrosenin çeşitli tepkimeleri üzerine günümüze kadar devam eden araştırmalarını sürdürdüğü görülmektedir. Boev ve Dombrovskii, ferrosenin, asetal ve katallarla olan reaksiyonlarını inceledikleri gibi [22], merkürasyon tepkimeleri üzerine [23], araştırmalarını genişlettikleri görülmektedir.

Polimerleşme başlatıcısı olarak ferrosen içeren makromoleküllerin ilk kullanılışı 1980 yılında Simionescu ve arkadaşları tarafından [24], ilk Schiff bazı içeren ferrosenli polimerlerin sentezinin ise 1981 yılında Korshak ve arkadaşları tarafından yapıldığı literatürlerden görülmektedir [25].

Destek materyal olarak iletken polimerler kullanarak ferrosen içeren enzim elektrotların hazırlanması üzerine olan araştırmaların Mizutani ve Asai isimli araştırmacılar tarafından başlatıldığı görülmektedir [26].

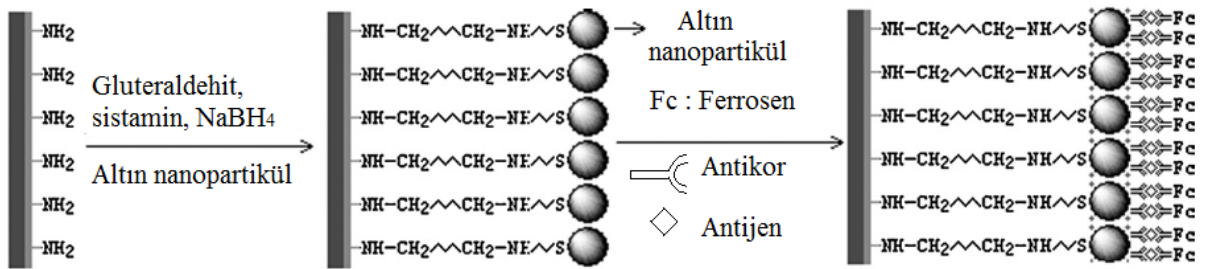
İçme sularının dezenfekte edilmesinde, klor ve bazı bileşiklerinin kullanıldığı bilinmektedir. Dezenfekte için kullanılan bu yöntemin bazı toksik etkilere sebep olduğu da bilinmektedir. Son yıllarda dezenfeksiyon için elektrokimyasal yöntemlerin kullanıldığı (elektrokimyasal yükseltgeme, elektrokoagülasyon, elektroflotasyon gibi), böylece suyun zararlı mikroorganizmalardan temizlenebildiği ifade edilmektedir. Özellikle elektrokimyasal yükseltgeme yönteminin daha etkili olması üzerine, ferrosen ve bileşiklerinin yaygın bir şekilde kullanıldığı görülmektedir. Nitekim, Kun Shang ve arkadaşları çok katmanlı nano tüp (MWCNT), ferrosen (Fc) ve poli(amido amin) (PAMAM) ile aşağıda gösterildiği gibi bir çalışma elektrodu (Şekil 2.10) hazırlayarak,

düşük potansiyelde *E. Coli* ve *S. aureus*'a karşı bir dezenfeksiyonu yapmanın mümkün olduğunu ifade etmişlerdir [27].



Şekil 2.10. Kun Shang ve arkadaşlarının çok katmanlı nano tüpler, ferrosen ve poli(amido amin) ile hazırladığı çalışma elektrodu

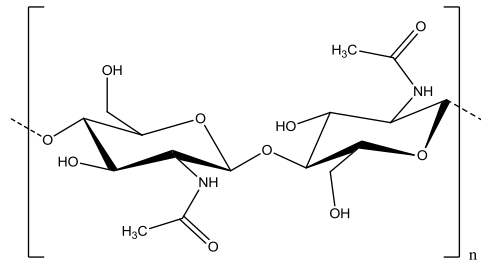
Redoksça aktif özelliğinden dolayı ferrosen ve türevlerinin antikor olarak kullanılması ve hazırlanmasının daha kolay olduğunu söyleyen Laforge ve arkadaşlarını takiben, ferrosenmonokarboksilik asidin bağışıklık türlerinde bir işaretleyici (markır) olarak kullanılabileceği Zhang ve arkadaşları tarafından belirtilmiştir. Zhang ve arkadaşları bağışıklık türlerinin işaretleyicisi olarak hazırlanan ferrosen içerikli çipi (Şekil 2.11) hazırlarken nanoboyutlu altın zerrelere dayanmışlardır [28, 29].



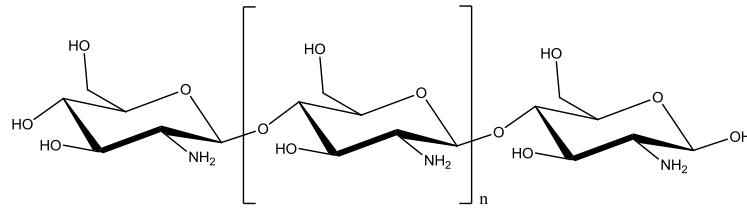
Şekil 2.11. Zhang ve arkadaşlarının bağışıklık türlerinin işaretleyicisi olarak hazırladığı ferrosen içeren çip

Kitin'in (Şekil 2.12a) deasetillenmesi sonucunda elde edilen çitosan'ın (Şekil 2.12b) biyobozunur olması ve toksik etkiye sahip olmaması nedeniyle immobilizasyon çalışmalarında yaygın bir şekilde kullanıldığı görülmektedir. Ancak elektron transferinin

önemli olduğu immobilizasyon çalışmalarında, çitosan'ın elektron transfer etkisinin düşük olmasından dolayı, elektron transferini sağlayabilecek araçlara (medyatör) ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla, ferrosen türevlerinin iyi bir elektron aracısı olduğunu ifade eden araştırmacıların [30, 31] β -Glukoz oksidaz gibi bir enzimin aktif merkezinin indirgenebilmesinde, redoks çalışma potansiyelinin (E_M^0) +0.1V ve +0.4V arasında olması gerektiğini ifade etmişlerdir.



(a)



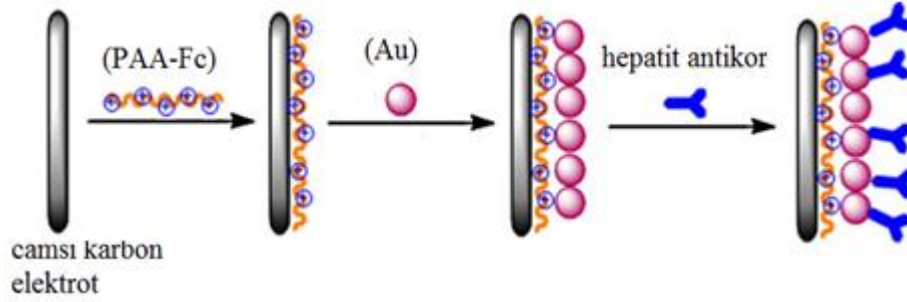
(b)

Şekil 2.12. Kitin(a) ve Çitosan(b)'in Yapısı

Kaynak araştırmalarımıza göre üreaz [32], trosinaz [33], β -Glukoz oksidaz [34] ve ksantin oksidaz [35] gibi enzimlerin immobilizasyonu yapıldığında, elektron transferini sağlamak için ferrosen türevlerinin (vinilferrosen ya da ferrosenkarboksaldehit gibi) ağırlıklı olarak kullanıldığı görülmektedir.

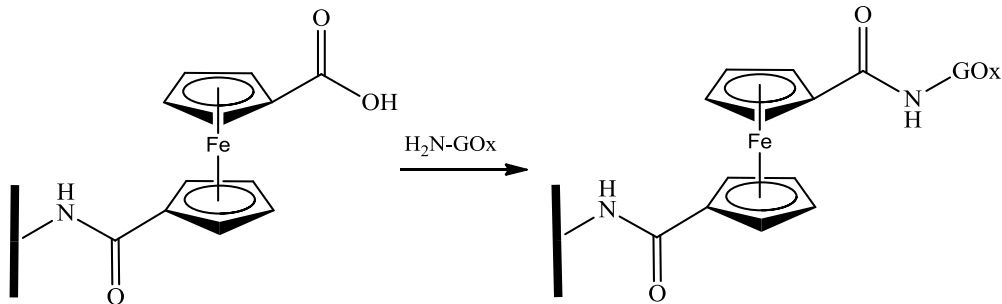
1989 yılında bir araştırmacı tarafından elektron sağlayıcı bir kaynak olarak ferrosen ve türevlerinin zeolit ile beraber kullanılarak enzime yüklenmesiyle, daha iyi sonuçların elde edilebileceği öngörülmüştür. 1989 yılında Moller'in [36], ferrosenin (beşli halka boyutu 6.6Å), zeolitteki 12 üyeli halka içine yerleşebileceğini öne sürmüştür. Çünkü zeolitteki bu halkanın iç çapının yaklaşık olarak 7.5Å'luk bir pencereye sahip olduğunu belirtmişlerdir [37].

Poli(allilamin) ile ferrosenkaboksaldehitin tepkimesi sonucunda ferrosen fırçalı polimerleri hazırlayarak, bunları nanoboyut yapısındaki altın ile etkileştiren Qui ve arkadaşları Hepatit B'ye duyarlı sensör elde ettiklerini ifade etmişlerdir (Şekil 2.13) [38].



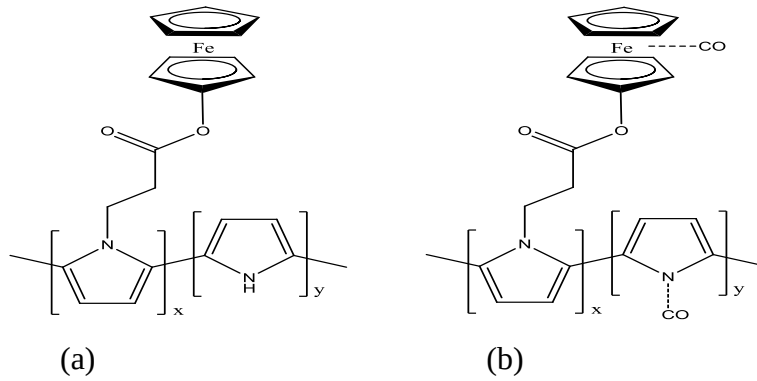
Şekil 2.13. Qui ve arkadaşlarının hazırladığı, yapısında ferrosen içeren Hepatit B'ye duyarlı sensör şeması

20. yüzyıldan itibaren yakıt tüketiminin hızla artmasıyla, mevcut enerji kaynakları azalmaya başlamıştır. Buna bağlı olarak, alternatif enerji kaynaklarının bulunması önemli bilimsel bir araştırma alanı haline gelmiştir. Özellikle, biyolojik yakıtların geliştirilmesi üzerine dikkat çekicidir. Kimyasal yakıtların geliştirilmesi yerine, biyoyakıt üzerine araştırmaların çeşitlendiği görülmektedir. Çünkü biyoyakıt sisteminde, biyolojik moleküller (mikroorganizmalar ya da enzimler gibi) kullanılmakta, böylelikle aşırı sıcaklık ve basınç şartlarından kaçıp, çevre sıcaklığı ve basıncı altında çalışma imkanı doğmaktadır. Böyle olumlu şartları taşıyan enzim esaslı bir biyoyakıtı geliştirdiklerini söyleyen Shim ve arkadaşları, grafit karbon üzerine 1,1-ferrosendikarboksilik asit ve β -Glukoz oksidaz enzimini immobilize etmişlerdir (Şekil 2.14) [39].



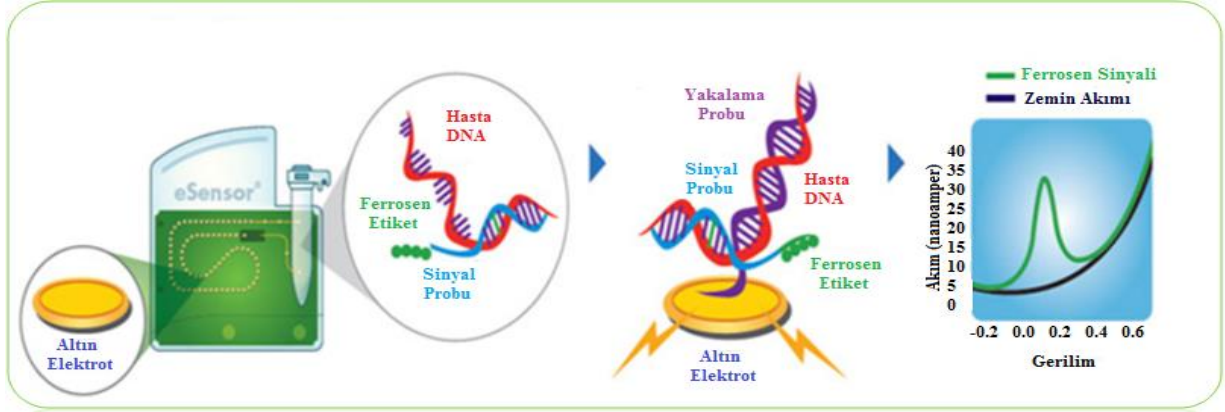
Şekil 2.14. Shim ve arkadaşlarının ferrosen türevi ile grafit karbon üzerinde β -Glukoz oksidaz enziminin immobilizasyonu

Bilindiği gibi, renksiz, kokusuz ve zehirli bir gaz olan CO (karbonmonoksit) konsantrasyonu yaklaşık 100 ppm'den daha fazla olduğunda insan için ölümlerle sonuçlanabilecek bir durumu oluşturmaktadır [40]. Bu nedenle, CO'ye duyarlı materyallerin hazırlanması ve geliştirilmesi çok önemlidir. Kaynaklar incelendiğinde, CO'ye duyarlı materyaller üzerine oldukça yaygın çalışmaların olduğu görülmektedir. Bu araştırmalardan biri de ferrosen içeren CO-duyarlı elektrotların geliştirilmesidir. Bunun için önce 1-(2-karboksietil)pirol sentezlenmiş, sonra ferrosenkarboksaldehit ile monomer elde edilmiş; daha sonra elektrokimyasal yöntem ile şekil 2.15a'da verilen polimerik yapı hazırlanmıştır. CO molekülünün tayini için, Kurtz Mikrobalans Yöntemini kullandıklarını ifade eden araştırmacıların, hazırladıkları polimerik yapının şekil 2.15b'deki gibi CO molekülü ile etkileşimde olabileceğini belirtmişlerdir [41].



Şekil 2.15. Elektrokimyasal yöntemle sentezlenmiş ferrosen türevi polimerin Kurtz Mikrobalans Yöntemini kullanarak CO ile etkileşimi (a) Elektrokimyasal yöntemle sentezlenen ferrosen içerikli polimerik yapı (b) Ferrosen içerikli polimerin CO ile etkileşimi

Ferrosenin üstün elektrokimyasal özelliğinden yararlanılan bir başka çalışma ise GenMarkDx şirketi tarafından desteklenen, eSensor® XT-8 ismiyle piyasaya sunulan cihaz olduğu görülmektedir. Bu cihaz, multipleks moleküler tanıların yapılması için işlenebilir bir sinyal üretmesi ve yenilikçi bir teknolojiye kapı açması bakımından, ödül almış bir DNA sensöründen ibarettir. Aşağıdaki şemada bu DNA sensörünün çalışma prensibi gösterilmektedir (Şekil 2.16) [42].

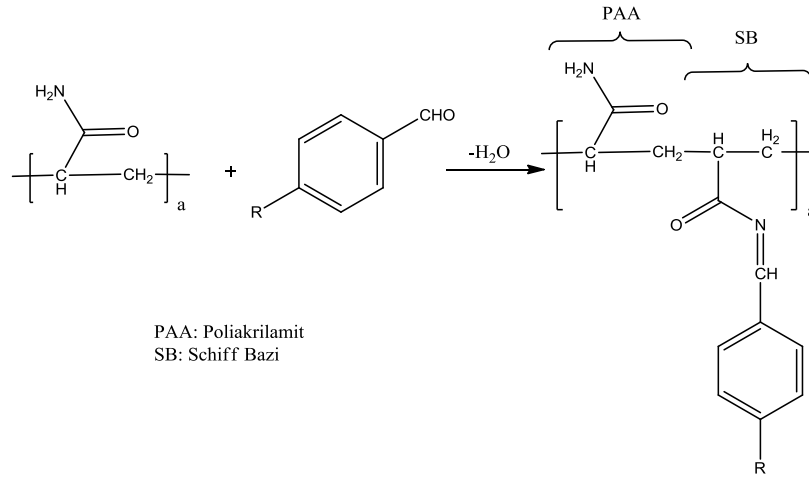


Şekil 2.16. GenMarkDx şirketinin desteklediği, eSensor® XT-8 adındaki DNA sensörünün çalışma prensibi

2.3. Schiff Bazı İçeren Polimerler

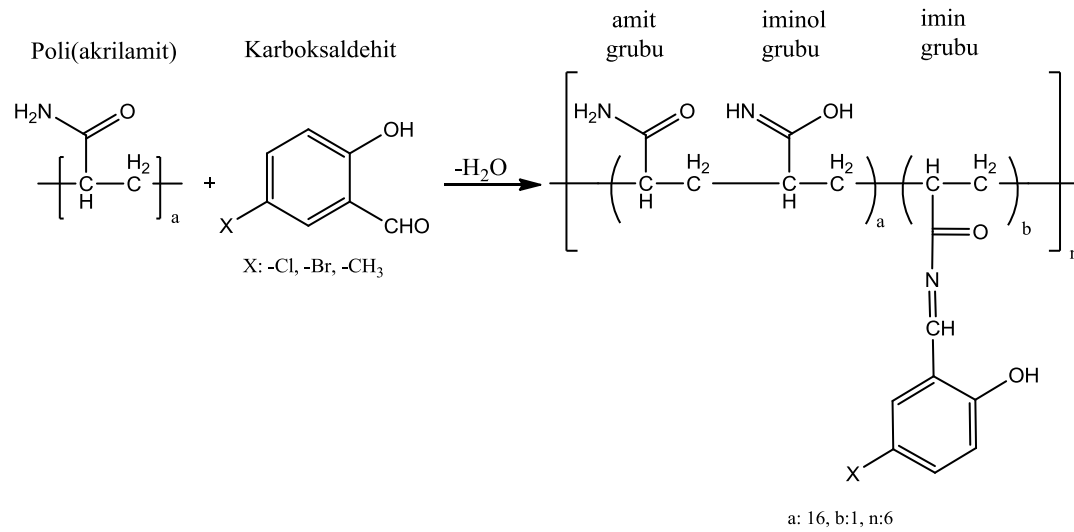
Schiff bazı içeren polimerler, metal ile kompleks oluşumu için gerekli ligand atomlara sahip olmasından dolayı, polimerik şelatlar oluşturabilirler. Bu özellikleri sebebiyle, metallerin [43] ve diğer kompleks yapıcı maddelerin ortamdan ayrılmasında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [44]. Araştırma grubumuz tarafından da hazırlanan, Schiff bazı içeren polimerler üzerine araştırmalar giderek çeşitlenmekte, bu polimerlerin farklı özellikleri incelenmektedir.

Araştırma grubumuz tarafından, ilk kez 2006 yılında poliakrilamit polimerinin çeşitli aldehitler ile (4-metoksibenzaldehit ve 4-klorobenzaldehit) kondenzasyonundan, polimerik-Schiff bazları (Şekil 2.17) ve onların Co(II) ve Ni(II) kompleksleri sentezlenmiştir. Laboratuvarımızda, polimerik-Schiff bazlarının ve onların metal kompleksleri hazırlanıp bu bileşikler, molar iletkenlik, magnetik duyarlılık, elektronik ve FT-IR spektral yöntemler ile karakterize edilmiş; polimer-metal komplekslerinin ana polimere göre daha yüksek bir termal kararlılığa sahip olduğu gözlemlenmiştir [45].



Şekil 2.17. Poliakrilamit ve aldehitten yola çıkılarak sentezlenen Schiff bazı içeren polimerin sentez rotası

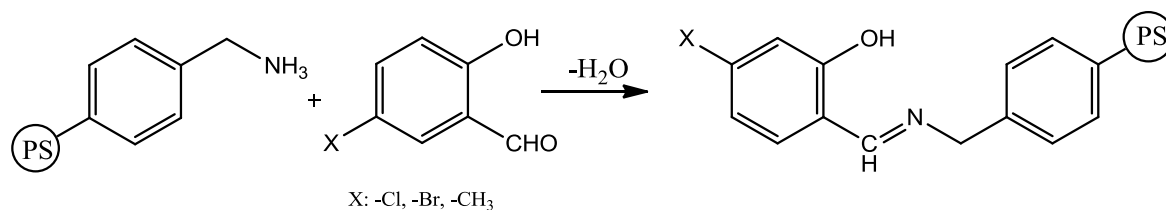
Yukarıdaki çalışmayı takiben, yine poli(akrilamit)’ten faydalanan Özcan ve Sarı, aldehit olarak, 5-kloro-2-hidroksibenzaldehit, 5-bromo-2-hidroksibenzaldehit ve 5-metil-2-hidroksibenzaldehit’ten (Şekil 2.18) faydalanmışlardır.



Şekil 2.18. Aldehit ve Poli(akrilamit) yapıları

Böylece 3 yeni Schiff bazı içeren polimer elde edildikten sonra, bu Schiff bazlarının Cu(II) ve Ni(II) komplekslerini sentezleyerek, Schiff bazı takılı poli(akrilamit)’in Ni(II) ve Cu(II) iyonlarına olan seçiciliği üzerine olan değerlendirmeyi yapmışlar ve bunun için ICP-MS tekniğinden faydalanmışlardır [46].

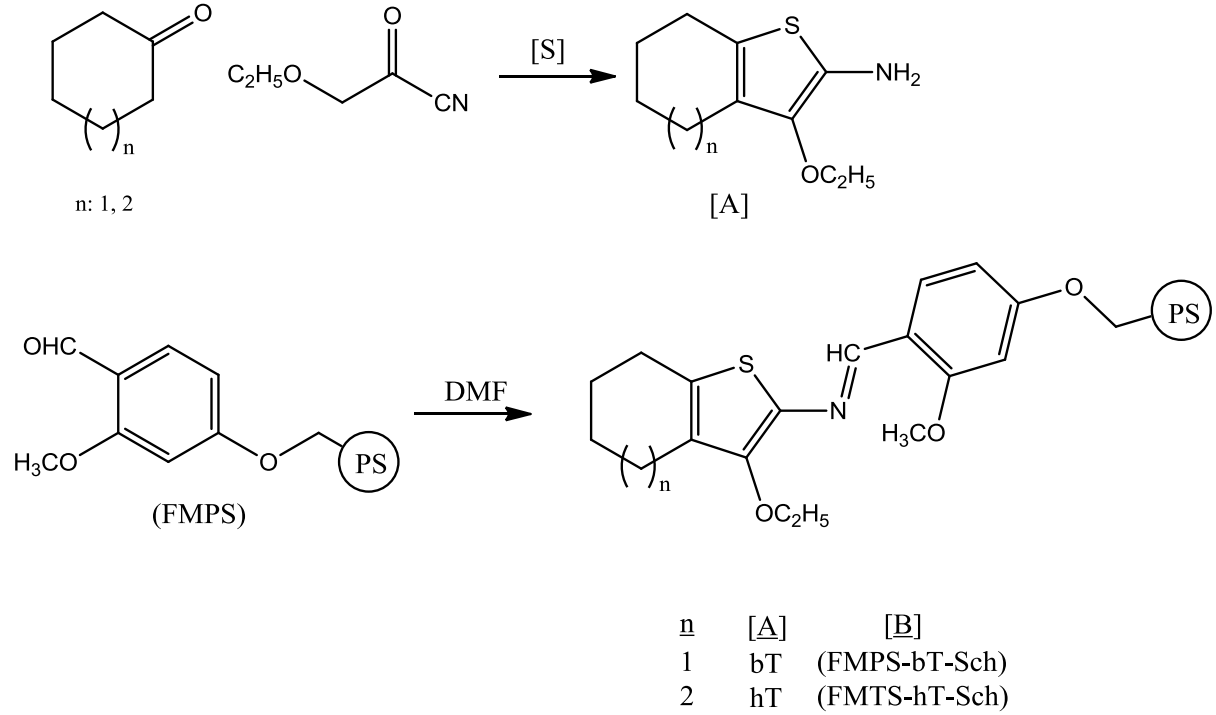
Yeni Schiff bazı takılı polimerlerin sentezi için, poli(stiren)'den faydalanan Nartop ve Sarı, (aminometil)polistiren ile 2-hidroksi-5-bromobenzaldehit, 2-hidroksi-5-metilbenzaldehyt ve 2-hidroksi-5-klorobenzaldehit'ten faydalanarak Şekil 2.19'daki gibi bir yapı önerdikten sonra Mn(II) ve Ni(II) iyonlarına olan seçiciliğini araştırdıkları gibi, *M. luteus* (ATCC-9341)'a karşı antibakteriyel özelliklerini de kuyucuk-difüzyon yöntemi ile araştırmışlardır. Sentezlenen tüm modifiye polimerlerin yapıları, element analizi, magnetik ölçüm, FT-IR, UV-GB, TGA/DTA ve $^1\text{H-NMR}$ ile karakterize edilmiştir [47].



Şekil 2.19. Nartop ve Sarı'nın sentezlediği Schiff bazı içeren polimerin yapısı

Yeni poli(stiren) oligomer tabanlı Schiff bazlarını sentezlemek için, (4-formil-3-metoksifenoksimetil)polistiren (FMPS) ile sikloalkilaminotiyofen türevlerinden faydalanarak, bunların Cu(II) ve Ni(II) iyonları ile olan komplekslerini sentezleyip (Şekil 2.20) karakterize eden Nartop ve arkadaşları, sentezlenen tüm maddelerin antibakteriyel aktivitelerini araştırmışlardır. *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* H, *Brucella abortus*, *Shigella dysenteria* type 10, *Micrococcus luteus* ve *Candida albicans*'a olan etkilerini inceleyen araştırmacılar, çalışılan bileşiklerin çoğunun bakteri ve mayalara karşı etkili olduğunu belirtmişlerdir [48].

(Aminometil)polistiren ve dört süstitüe salisilaldehitin (2-hidroksibenzaldehit, 5-floro-2-hidroksibenzaldehit, 5-floro-3-kloro-salisilaldehit ve 5-floro3-metil-salisilaldehit) kondenzasyonu sonucunda, karbinolamin ve azometin yapıları polimerlerin oluştuğunu ifade eden Bozkır ve arkadaşları, bu polimerlerin Cr(III) ve Ni(II) koordinasyon polimerlerini hazırlamışlardır.



Şekil 2.20. Nartop ve arkadaşlarının sentezlediği Schiff bazı içeren polimerlerin sentez rotası

Yapılarını ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR analizi ile belirleyen araştırmacılar, ayrıca, SEM-EDX ile yüzey yapılarını analiz ederek nanoküre özelliğe sahip polimerlerde bu yapının korunduğunu ifade etmişlerdir [49].

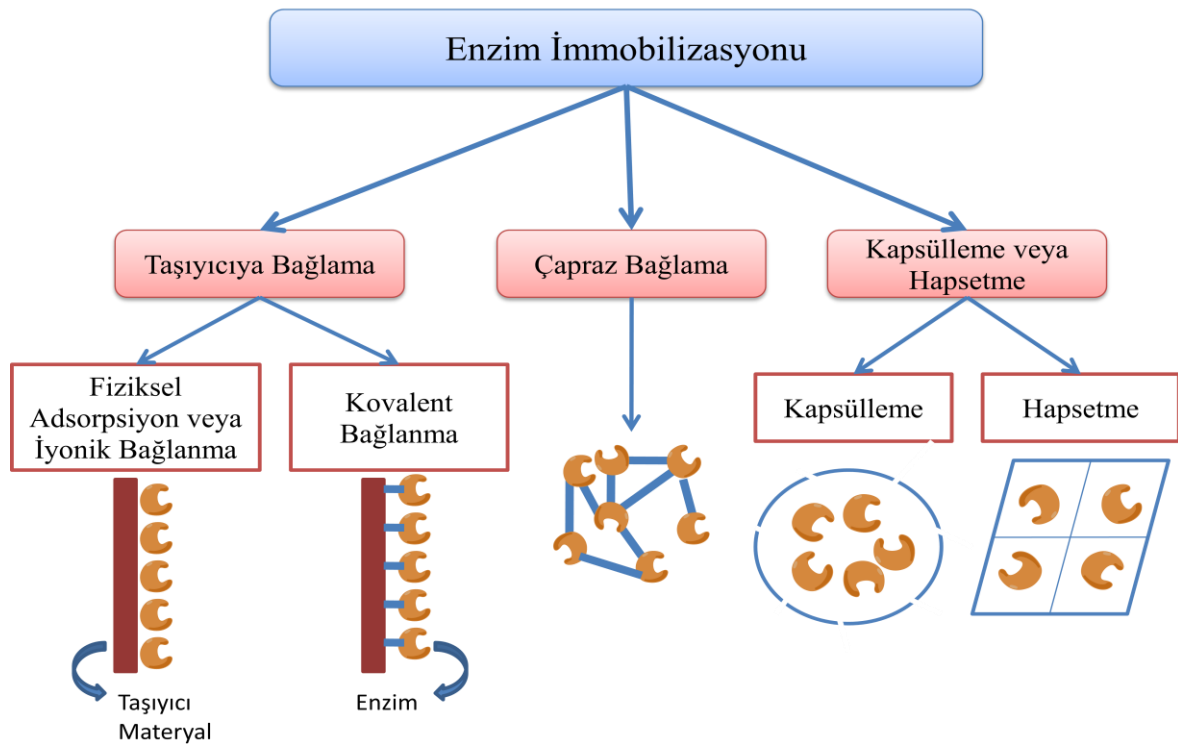
2.4. İmmobilizasyon

Enzim immobilizasyonu, enzime dayalı endüstriyel süreçlerde, biyokütle kaynaklı katalitik reaksiyonlarda ve çevre dostu enerji elde edilmesinin başarılı bir şekilde gerçekleşmesi için adeta “anahtar bir teknoloji” yöntemi olarak ifade edilebilir. İmmobilizasyon yöntemleri, enzimin yeniden kullanımı için basit ayırma ve kullanım kolaylığını sağlarken, enzimin etkinliği ve seçiciliğini de korur.

Enzimler, kimyasal reaksiyonlar için özel katalizörlerdir. Genellikle enzimler, oda şartlarına yakın ılımlı ortamlarda etki gösterirler. Enzimler, kimyasal dönüşüm süreçlerinde, gıda ve ilaç üretiminde, çevresel iyileştirme faaliyetlerinde ve biyoyakıt hücrelerin gelişiminde önemli bir yere sahiptir [50].

Genel olarak enzimler, klasik kimyasal katalizörler ile karşılaştırıldıklarında kararlılıkları daha düşüktür ve pahalıdırlar. Bu tip sorunların üstesinden gelinebilmesi, enzimlerin çözünemeyen katı destekler üzerine immobilizasyonu ile mümkündür. Şimdiye kadar enzimlerin immobilizasyonu için katı destek olarak, çeşitli polimerlerin ya da inorganik materyallerin seçildiği rapor edilmiştir [51].

Enzimlerin immobilizasyonunda üç temel yöntemden bahsetmek mümkündür. Bunlar; a) bir taşıyıcıya bağlama, b) kapsülleme veya hapsetme, c) çapraz bağlama (taşıyıcısız) olarak gruplandırılabilir (Şekil 2.21).



Şekil 2.21. Enzim immobilizasyon yöntemleri

Enzimin destek materyale bağlanması fiziksel, iyonik ya da kovalent bağlanma yoluyla olabilir. Fiziksel bağlar, endüstriyel koşullar altında enzimi destek üzerinde tutmak için çok zayıftır. İyonik bağlar nispeten daha güçlüyken, kovalent bağlanma enzim için en güçlü bağlanma biçimidir [52]. Ancak, güçlü kovalent bağlar enzimin yüzeyden ayrılmasına engel olur. Bu da enzimin geri dönüşümsüz olarak aktifliğini yitirmesine sebep

olabilir. Enzim ve destek materyal arasındaki etkileşim, spesifik kimyasal, biyokimyasal, mekanik ve kinetik özelliklere sahip olmasını sağlar.

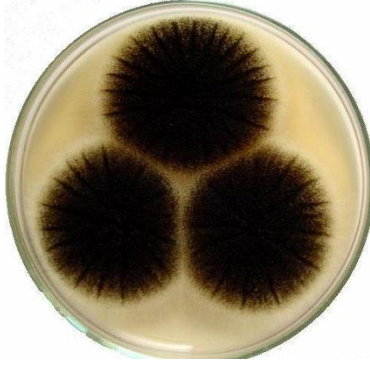
Bifonksiyonel reaktifler kullanılarak, taşıyıcı materyaller olmadan, enzim kristallerinin birbirine çapraz bağlanması mümkündür. Taşıyıcı kullanılan sistemlerde enzimin aktivitesinde azalma görülürken, enzimlerin çapraz bağlandığı sistemlerde düşük de olsa verimli olduğu rapor edilmiştir [53]. Bunun yanı sıra çapraz bağlı enzimler, düşük enzim aktivitesi, zayıf mekanik kararlılık ve jelatinimsi yapıda olmak gibi dezavantajlara da sahiptir. Çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit kullanıldığı ve böylece enzim immobilizasyonu üzerine yapılan ilk çalışmanın 1964'te yapıldığı görülmektedir [54].

Kapsülleme ve hapsetme yöntemlerindeki prensip, organik bir polimer, jel bir kafes ya da içi boş bir mikrokapsül içine enzimin hapsedilmesidir. Enzimin hapsedildiği polimerik ağ yapı, enzimi çevre ile doğrudan temastan korurken, gaz kabarcıklarının ve hidrofobik çözücülerin etkisini en aza indirir. Fakat enzimin polimere düşük verimle yüklenme olasılığı bu yöntemin en büyük dezavantajı olarak kabul edilmektedir [55].

İmmobilizasyonda, kovalent bağlanma nispeten daha karmaşıktır ve bağlanan enzimin denatürasyon ihtimalinden dolayı bazı potansiyel riskler taşımaktadır [52].

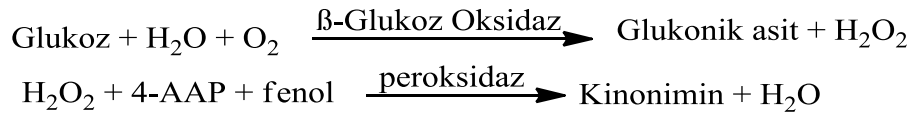
2.5. β -Glukoz oksidaz (GOx) Enzimi

β -Glukoz oksidaz enzimi (sistemik adı: EC 1.1.3.4 β -D-glukoz: O₂ oksidoredüktaz), β -D-glukozun oksidasyonunu katalizleyen [56], oksidoredüktaz enzim sınıfına dahil, glikoprotein yapısında, çoğunu mannoz oluşturmak üzere karbohidrat içeriği % 16 olan ve kanda şeker tayini için sıkça kullanılan bir enzimdir. Enzimin prostetik grubu FAD (flavin adenin dinükleotit)'tir. Her bir mol β -Glukoz oksidaz, iki mol FAD içermektedir. İlk β -Glukoz oksidaz aktivitesi 1928'de Müller tarafından *Aspergillus niger* (Şekil 2.22) adlı mantardan karakterize edilmiştir [57].



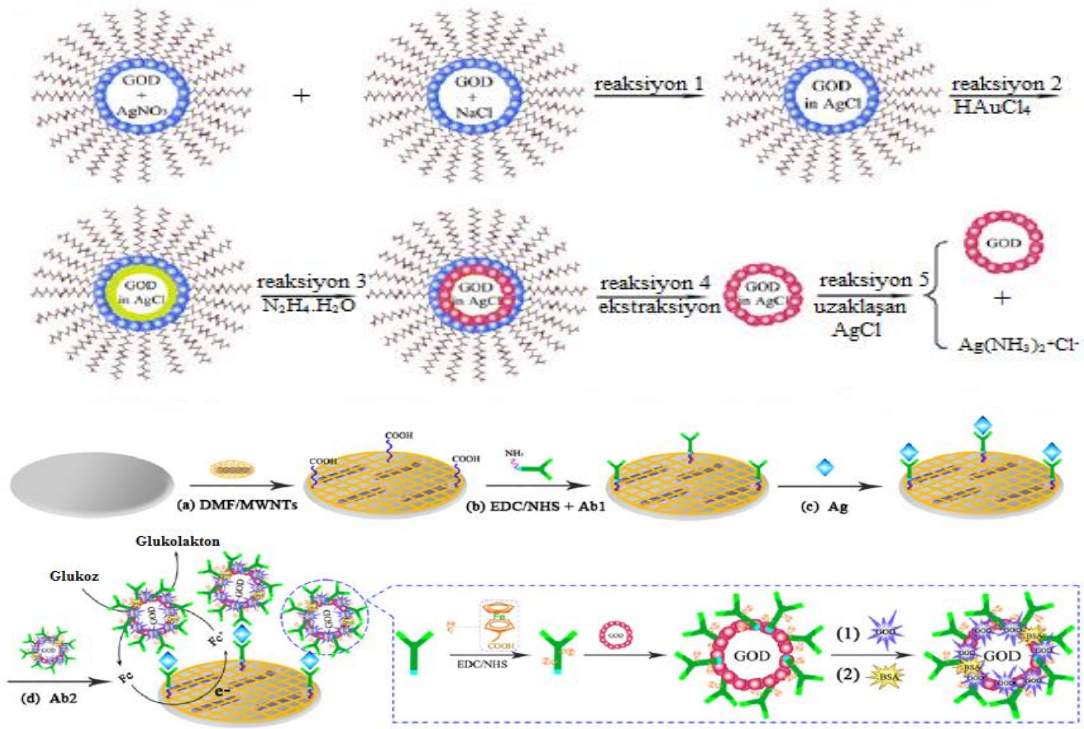
Şekil 2.22. *Aspergillus niger* mantarı

Glukoz yükseltgenmesi pH 4-7 aralığında gerçekleşir ve maksimum yükseltgenmenin pH 5,5'ta görüldüğü rapor edilmiştir. β -Glukoz oksidaz aşağıda verilen tepkimeyi katalizler ve oluşan glukolakton, sulu ortamda başka herhangi bir enzime ihtiyaç duymadan glukonik asite indirgenebilir. Oluşan H_2O_2 renksizdir. UV-GB Spektrumunun alınabilmesi için, 4-AAP (4-Aminoantipiren) ve fenol eklenerek peroksidaz enzimi varlığında renkli kinonimin bileşiğini oluşturur. Oluşan kinonimin bileşiği, 504 nm'de kendine özgü absorbands gösterir.

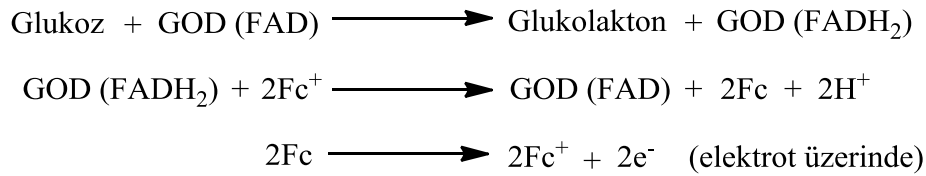


β -Glukoz oksidaz enziminin immobilizasyon çalışmaları üzerine özet bir araştırma aşağıda sunulmuştur.

Zhongju Song ve çalışma grubu 2011 yılındaki çalışmalarında, altın nanopartiküller içerisine β -Glukoz oksidaz enzimini kapsülasyon yöntemi ile immobilize etmişlerdir. Daha sonra ferrosen ile işaretlenmiş olan antikorlar ve antijenlerin etkileşiminden faydalanarak, yüksek hassasiyete sahip tümör tanısı ve klinik tarama sağlayabilmek için bir immünotest sistemini (Şekil 2.24) geliştirmişlerdir. Geliştirilen bu yöntemde elde edilen sonuçlar ile referans olarak alınan değerlerin birbiri ile uyumlu olduğunu gözlemişlerdir. Ayrıca, bu metodun bazı proteinlerin tanısı için de uygulanabileceği belirtilmiştir [58].

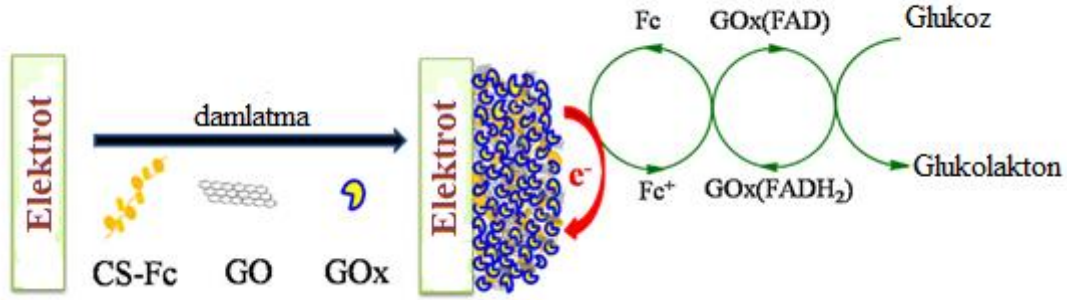


Şekil 2.23. Zhongju Song ve çalışma grubunun tümör tanısı için tasarladığı immünotest sistemi



Şekil 2.24. Zhongju Song ve çalışma grubunun tümör tanısı için tasarladığı immünotest sisteminde gerçekleşen tepkimeler

Jian-Ding Qiu ve çalışma grubunun 2011 yılında yapmış olduğu bir çalışmada glukoz biyosensörü yapımı için, yeni bir çitosan-ferrosen/grafen oksit/β-Glukoz oksidaz (CS-Fc/GO/GOx) nanokompozit filmini hazırlamışlardır (Şekil 2.25). Araştırmacılar, bu filmle biyosensörlerin hızlı cevap yeteneği, iyi tekrarlanabilirlik, yüksek kararlılık gösterdiği ve pratik biyosensör tasarımlarında enzim immobilizasyonu için uygun malzemeler olduklarını belirtilmişlerdir [34].



Şekil 2.25. CS-Fc/GO/GOx modifiye elektrot sistemi ve GOx tarafından katalizlenen glukoz oksidasyonunun şematik gösterimi

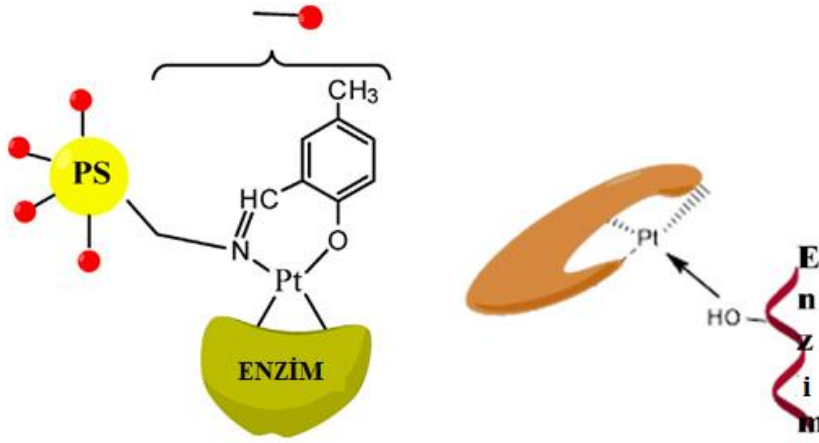
Anette Isaksen ve Jens Adler-Nissen 1997 yılında yapmış oldukları bir çalışmada, antioksidant içermeyen mayonezin raf ömrü 1 gün iken, GOD-CAT-Glukoz (β -Glukoz oksidaz-Katalaz-Glukoz) içeren mayonezin raf ömrünün 132 güne kadar çıktığını bildirmişlerdir. Özellikle konserve yiyeceklerde GOD-CAT kullanıldığı durumlarda raf ömrünün uzadığı bildirilmiştir. Anette Isaksen ve Jens Adler-Nissen önerdikleri GOD-CAT'ın etki mekanizmasının, ortamda bulunan O_2 'nin GOD tarafından uzaklaştırılmasına dayandığını, böylece yiyeceklerin daha uzun süre oksitlenmeden saklanabildiğini öne sürmüşlerdir [59].

Sarı ve arkadaşları 2012 yılında, platin içeren bir katı destek materyali hazırlamışlar ve bu desteğe β -Glukoz oksidaz enzimini immobilize etmişlerdir. Böylece, immobilize enzim ile serbest enzimin aktifliğine etki eden faktörleri karşılaştırmışlardır. Bu çalışma sonucunda immobilize enzimin, serbest enzime göre gözle görülür üstünlükler sağladığı bildirilmiştir. Serbest enzim yerine immobilize enzimin tercih edildiği sistemlerde; enzimin geri kazanım kolaylığı, daha geniş pH aralığında çalışabilmesi, serbest enzimin bozulduğu sıcaklıklarda immobilize enzimin aktiflik gösterebildiği ve immobilizasyon sayesinde düşük miktarda enzim kullanılarak çok basamaklı işlemlerin gerçekleştirilebileceğini belirtmişlerdir [60].

Dönmez ve arkadaşlarının 2014 yılındaki bir çalışmasında, L-glisin ve Pt(IV) içerikli nanopolimerik bir destek materyal hazırlanmış, bu polimerik materyal ile karbon-pasta elektrot sistemi modifiye edilmiş ve glukoz duyarlı biyosensör sistemi tasarlanmıştır. β -Glukoz oksidaz enzimini elektrot sistemine immobilize eden araştırmacılar Pt(IV) içerikli

materyalin hazırlanmasının nedeni olarak, soy metalin kendine has katalitik aktiviteye sahip olmasından dolayı tercih etiklerini belirtmişlerdir. Bu çalışma sonucunda, çeşitli alanlarda glukoz tayini yapmaya elverişli, duyarlılığı yüksek ve cevap süresi kısa bir glukoz sensörünü tasarladıklarını ifade etmişlerdir [61].

Çalışma grubumuza ait yeni bir çalışmada Özkan ve arkadaşları β -Glukoz oksidaz enziminin, Pt(II) ve Pt(IV) ile modifiye edilmiş nanoküre yapıları materyal üzerine tutunmasını sağlamışlar (Şekil 2.26), iyon yükünün, enzim tutulması üzerindeki etkilerini araştırmışlardır.



Şekil 2.26. Modifiye edilen polimere enzimin bağlanma şeklinin şematik gösterimi

Modifiye edilen destek polimere koordine kovalent bağlarla bağlanmış enzimin yüksek konformasyonel kararlılığa sahip olduğu ve aktif merkezinin korunduğu hatta immobilize enzimin tekrar kullanılabilirliğinin çok iyi olduğu bildirmişlerdir. Böyle bir stratejinin yalnızca endüstriyel alanda geniş kullanıma sahip β -Glukoz oksidaz enzimi için değil, çeşitli enzimler için de önemli bir yere sahip olabileceğini belirtmişlerdir [62].

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

3.1.1. Kimyasal maddeler

Aşağıda listelenen kimyasal maddelerin tümü Sigma-Aldrich üretici firmasından temin edilmiştir.

(Aminometil)polistiren: (100-200 mesh, 0.5-1.0 mmol/g N yüklenmiş, % 1 çapraz bağlı)

(4-formil-3-metoksifenoksimetil)polistiren (ameba resin): 100-200 mesh, 1.0-1.5mmol/g yüklenmiş, divinilbenzen ile % 1 çapraz bağlı)

Ferrosenkarboksaldehit (214,04 g/mol)

Etilendiamin (60,10 g/mol)

1,3-diaminopropan (74,12 g/mol)

Glukoz (180,16 g/mol)

β -Glukoz oksidaz (*Aspergillus niger*'den izole edilmiş, 192 U/mg)

Fenol (94,11 g/mol)

4-Aminoantipiren (4-AAP, 203,24 g/mol)

Peroksidaz enzimi (HRP, 50-150 U/mg)

Sodyum dihidrojen fosfat (120 g/mol),

Sodyum hidrojen fosfat (142 g/mol),

fosforik asit (106,09 g/mol),

Sodyum asetat (82,02 g/mol),

Sodyum borat (Boraks, 201,24 g/mol),

Sodyum hidroksit (40 g/mol),

N,N-dimetilformamit (DMF),

Aseton

3.1.2. Cihazlar

pH metre : Hazırlanan tampon çözeltilerin pH'sını belirlemek için Jenway 3010 pH metre kullanıldı.

Ultraviyole – Görünür Bölge spektrofotometresi : Shimadzu UV-1800 model, UV Spektrometresi ile UV-GB spektrumları alındı.

Çalkalamalı, sıcaklık kontrollü su banyosu : Wisebath WSB-18 model su banyosu ile çalışmalarda hem sıcaklık kontrolü hem de karıştırma işlemi sağlandı.

Element analizi : Element analizleri LECO-CHNS-9320 model element analizi cihazı ile Bozok Üniversitesi Kimya Bölümü'nde yapıldı.

FT-IR (Fourier Transform Infrared) spektrometri cihazı : Sentezlenen tüm polimerlerin FT-IR spektrumları, Mattson-1000 FT-IR model cihaz ile Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi'nde alındı.

SEM/EDX (taramalı elektron mikroskobu/enerji dağılım X-ışını kırınımı) : PS-N-Fc ve PS-N-C-C-N-Fc polimerlerinin SEM/EDX'leri QUANTA 400F Field Emission cihazı ile ODTÜ merkez laboratuvarında yapıldı. PS-N-C-C-C-N-Fc polimerinin SEM analizi ise JEOL JSM-6060LV Scanning Electron Microscope cihazı kullanılarak Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü Laboratuvarında yapıldı.

GPC (Jel Geçirgenlik Kromatografisi) : Sentezlenen polimerlerin GPC analizleri Bozok Üniversitesi'nde yapıldı.

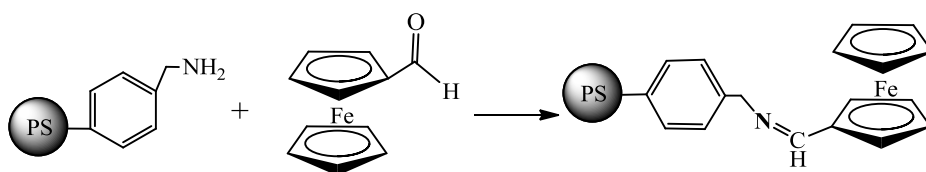
4. DENEYSEL BÖLÜM

4.1. Ferrosen Takılı Schiff Bazı İçeren Polimerlerin Hazırlanması

Ferrosen içeren polimerler geri soğutucu altında 50°C’da, azot atmosferinde sentezlendi. Geri soğutucuya bağlı cam balona polistiren esaslı polimerler DMF’de çözülerek konuldu. Geri soğutucu altında kaynatma ve karıştırma işlemleri yapılırken damlatıcı musluğu açılarak DMF’de çözülmüş ferrosenkarboksaldehit çözeltisi, balondaki polimer çözeltisi üzerine yaklaşık 5 dakikalık bir süre içinde damlatıldı. Aldehit çözeltisinin ilavesinden sonra 2 saat geri soğutucu altında kaynatma ve karıştırma işlemlerine devam edildi. İki saatin sonunda temiz bir behere alınan karışım asetonla yıkanarak reaksiyona girmemiş olan reaktifler ortamdan uzaklaştırıldı ve etüvde kurutuldu.

4.1.1. Tek karbon kollu ferrosen – polimer desteğin (PS-N-Fc) hazırlanması

1 g (Aminometil) polistiren (1 g/0,5-1,0 mmol/g NH₂ yüklü) iki boyunlu cam balona alınarak 10 mL DMF’de çözüldü. 0,1070 g (1 mmol) ferrosenkarboksaldehitin 10 mL DMF içinde oda sıcaklığında çözülerek hazırlanan çözeltisi, damlatma hunisine konularak bölüm 4.1’deki genel yöntemde açıklanan yöntemle göre tepkime ortamına eklendi. Sentezlenen (PS-N-Fc) polimeri etüvde kurutuldu.

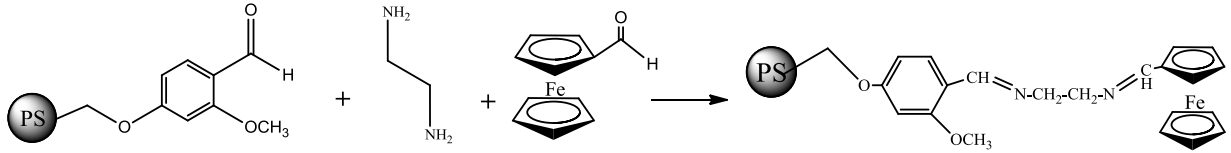


Şekil 4.1. PS-N-Fc destek polimerinin sentezinde izlenen yol

4.1.2. İki karbon kollu ferrosen – polimer desteğin (PS-N-C-C-N-Fc) hazırlanması

1 g Ameba resin (1 g/0,9 mmol/g -CHO yüklü) iki boyunlu cam balona alınarak 10 mL DMF’de çözüldü. 0,054 mL etilendiamin (1 mmol) ve 0,1712 g (1 mmol) ferrosenkarboksaldehitin 10 mL DMF içinde oda sıcaklığında çözülerek hazırlanan

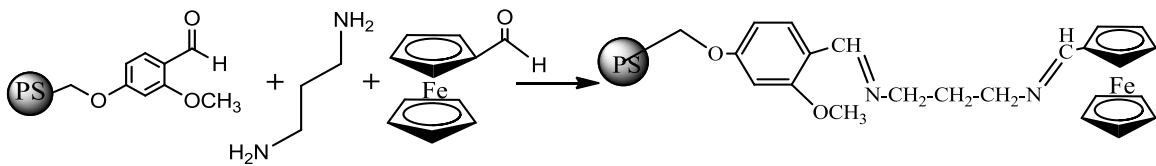
çözeltisi, damlatma hunisine konularak bölüm 4.1'deki genel yöntemde açıklanan yöntemle göre tepkime ortamına eklendi. Sentezlenen (PS-N-C-C-N-Fc) polimeri etüvde kurutuldu.



Şekil 4.2. PS-N-C-C-N-Fc destek polimerinin sentezinde izlenen yol

4.1.3. Üç karbon kollu ferrosen – polimer desteğin (PS-N-C-C-C-N-Fc) hazırlanması

1 g Ameba resin (1 g/0,9 mmol/g -CHO yüklü) iki boyunlu cam balona alınarak 10 mL DMF'de çözüldü.



Şekil 4.3. PS-N-C-C-C-N-Fc polimerinin sentezinde izlenen yol

0,067 mL 1,3-diamino propan (0,8 mmol) ve 0,1712 g (1 mmol) ferrosenkarboksaldehitin 10 mL DMF içinde oda sıcaklığında çözülerek hazırlanan çözeltisi, damlatma hunisine konularak bölüm 4.1'deki genel yöntemde açıklanan yöntemle göre tepkime ortamına eklendi. Sentezlenen (PS-N-C-C-C-N-Fc) polimeri 4 saat etüvde kurutuldu.

4.2. İmmobilizasyon İçin Stok Enzim Çözeltisinin Hazırlanması

Sentezlenen polimerlere immobilizasyonu düşünülen β -Glukoz oksidaz enziminin stok çözeltisini hazırlamak için 0,0135 g β -Glukoz oksidaz 100 mL saf suda çözülerek, +4°C'da muhafaza edilmiştir.

4.3. Sentezlenen Destek Polimerlere β -Glukoz oksidaz Enziminin İmmobilize Edilmesi

(PS-N-Fc), (PS-N-C-C-N-Fc) ve (PS-N-C-C-C-N-Fc) kodlu polimerlere β -Glukoz oksidazın immobilizasyonu için iki boyunlu balona, çalışılan polimerlerden 0,5'er gram alınarak 5 mL DMF eklendi. Geri soğutucu altında 30 dk 50°C 'da ısıtıldı. Balon içinde bulunan bölüm 4.2.'de verilen stok enzim çözeltisinden 15 mL eklendi ve 24 saat geri soğutucu altında oda sıcaklığında karıştırma işlemine devam edildi. Tepkime sonunda, katı maddeler asetonla yıkandı, safsızlık ve tutulmayan enzim uzaklaştırıldı. Bunu takiben süzgeç kağıdından süzülüp etüvde kurutuldu.

4.4. İmmobilize β -Glukoz oksidaz Enziminin Aktifliğine pH Etkisi

İmmobilize β -Glukoz oksidaz enziminin aktifliğine pH etkisini araştırabilmek için immobilizasyonun gerçekleştirildiği polimerlerden 20 mg deney tüplerine alındı. Üzerlerine pH tamponların her birinden 4'er mL ve 20 mg glukoz eklendi. 15 dk oda koşullarında karıştırma işleminden sonra, 4-Aminoantipiren (10 mg), fenol (20 mg) ve peroksidaz enzimi (0,5 mg) eklenerek UV-GB spektrofotometresi yardımıyla 504 nm'de absorbans değerleri okundu.

4.4.1. pH tamponlarının hazırlanması

pH 3 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$) tamponu : 6,24 g (40 mmol) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (sodyum dihidrojenfosfat) 250 mL su içerisinde çözüldü. Üzerine % 85'lik H_3PO_4 çözeltisinden pH 3 olana kadar damla damla eklendi.

pH 4 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$) tamponu : 6,24 g (40 mmol) NaH_2PO_4 (sodyum dihidrojenfosfat) 250 mL su içerisinde çözüldü. Üzerine %85'lik H_3PO_4 'ten pH 4 olana kadar damla damla eklendi.

pH 5 ($\text{CH}_3\text{COO}^-\text{Na}^+/\text{CH}_3\text{COOH}$) tamponu : 100 mL 0,25 M asetik asit üzerine 0,25 M sodyum asetatın pH 5 olana kadar damla damla eklenir.

pH 6-7-8-9 (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄) tamponu : 100 mL 0,25 M Na₂HPO₄ üzerine 0,25 M NaH₂PO₄ 'tan pH 6 için pH 6 olana kadar, pH 7 için pH 7 olana kadar, pH 8 için pH 8 olana kadar, pH 9 için ise pH 9 olana kadar damla damla eklenir.

4.5. İmmobilize β -Glukoz oksidaz Enziminin Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi

Sentezlenen polimerlere immobilize edilen β -Glukoz oksidaz enziminin aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek için, optimum pH'da, 30°C - 90°C aralığında çalışıldı. Bölüm 4.4.'de belirtilen çalışma yöntemi kullanılarak sırasıyla 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C'de oluşan ürünün 504 nm'de absorbans değerleri kaydedildi.

4.6. İmmobilize β -Glukoz oksidaz Enziminin Aktifliğine Substrat Derişiminin Etkisi

Sentezlenen polimerlerin (PS-N-Fc, PS-N-C-C-N-Fc ve PS-N-C-C-C-N-Fc), optimum pH'da stok glukoz çözeltileri hazırlandı. İmmobilize olmuş enzim üzerine değişen hacimlerde (derişimleri 50-0,5 mM olacak şekilde) stok glukoz çözeltisi eklendi. Optimum pH'daki tampon çözeltisi ile toplam hacim 5 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan bu çözeltilerin üzerine 4-Aminoantipiren (10 mg), fenol (20 mg) ve peroksidaz enzimi (0,5 mg) sırasıyla eklendi. Optimum sıcaklıktaki çalkalamalı su banyosunda, 30 dk karıştırma işlemi yapıldı. Ardından 504 nm'de absorbans değerleri kaydedildi.

4.6.1. Derişim çalışmalarında kullanılan stok glukoz çözeltisinin hazırlanması

50 mL'lik balon jojeye 0,45 g glukoz eklendi ve belirlenen optimum pH'daki tampon çözeltisi ile 50 mL'ye tamamlandı.

4.7. Serbest β -Glukoz oksidaz Enziminin Aktifliğine Substrat Derişiminin Etkisi

Serbest enzimin optimum sıcaklığı 60°C ve pH 7 tamponu, koşullarını dikkate alarak Bölüm 4.6'daki metot uygulandı.

4.8. İmmobilize β -Glukoz oksidaz Enziminin Tekrar Kullanılabilirliği

Tüp içine 0,0125 g immobilize olmuş enzim konuldu. Optimum pH'daki tampon çözeltisinden 4 mL eklendi. Oluşan heterojen karışım üzerine 0,016 g glukoz eklenerek oda sıcaklığında 15 dk karıştırıldı ve 4-aminoantipiren, fenol, peroksidaz enzimi sırasıyla eklendi. Hazırlanan karışım, belirlenen optimum sıcaklığa ayarlanmış çalkalamalı-sıcaklık ayarlı su banyosunda 15 dk karıştırıldı. Süzüntü kuvars hücreye alınarak 504 nm'deki absorbansları kaydedildi.

4.9. İmmobilize β -Glukoz oksidaz Enziminin Depolama Kararlılığı

Tüp içine 0,0125 g immobilize edilen enzim üzerine, sırasıyla optimum pH tamponu, 0,016 g glukoz, 4-aminoantipiren, fenol ve peroksidaz enzimi eklendi. 5 dk sonra oluşan süzüntü kuvars hücreye alınarak 504 nm'deki absorbansları kaydedildi. Bu işlem 9 ay boyunca tekrarlandı.

5. SONUÇ

5.1. Farklı Kol Uzunluğunda Ferrosen Takılı Polimerlerin Karakterizasyonu

Aşağıda PS-N-Fc, PS-N-C-C-N-Fc ve PS-N-C-C-C-N-Fc kodlu polimerlere ait fiziksel görüntüler verilmiştir (Resim 5.1).



Resim 5.1. Sentezlenen PS-N-Fc, PS-N-C-C-N-Fc ve PS-N-C-C-C-N-Fc polimerlerinin görüntüleri

Sentezlenen polimerlerin karakterizasyonları için GPC, Element Analizi, FT-IR Spektroskopisi ve SEM/EDX Analizi yapıldı. Tüm polimerler için bulunan GPC ve element analiz sonuçları Çizelge 5.1’de verildi.

(PS-N-Fc), (PS-N-C-C-N-Fc) ve (PS-N-C-C-C-N-Fc) polimerlerinin [63, 64] Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC) analiz sonucunda M_w ve M_n değerleri sırası ile (PS-N-Fc) için 878 ve 860 ; (PS-N-C-C-N-Fc) için 874 ve 862 ve (PS-N-C-C-C-N-Fc) için 881 ve 867 olarak belirlendi. (M_w : ağırlıkça ortalama mol kütle; M_n : sayıca ortalama mol kütle).

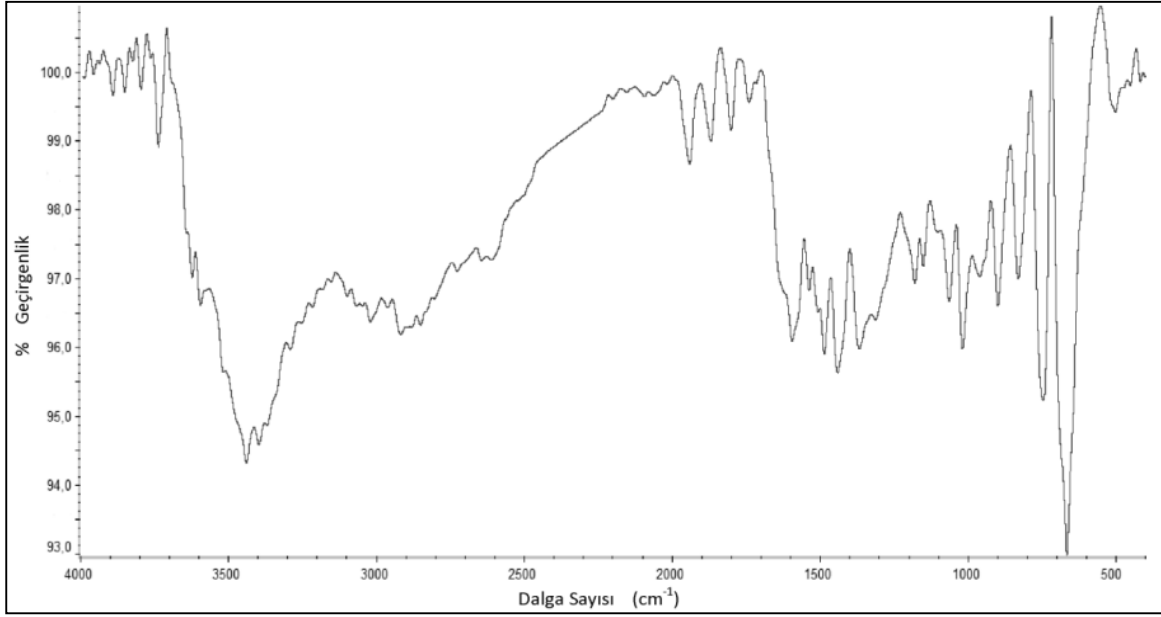
Çizelge 5.1. Modifiye edilen polimerlerin M_w , M_n ve element analiz yüzdeleri

Bileşik (renk)	Önerilen Birim (M_w)	PDI	M_w^*	M_n	Hesaplanan (Bulunan)			
					C	H	N	Fe
PS-N-Fc bordo	$[(C_8H_8)_6(C_{19}H_{17}NFe)]$ $M_w = 939$	1.09	878	860	85,62 (88,31)	6,92 (7,56)	1,49 (1,85)	5,96 (4,57)
PS-N-C-C-N-Fc turuncu	$[(C_8H_8)_5(C_{22}H_{22}N_2O_2Fe)]$ $M_w = 921$	1.15	874	862	80,78 (81,30)	6,73 (6,98)	3,04 (3,59)	6,08 (5,73)
PS-N-C-C-C-N-Fc kahverengi	$[(C_8H_8)_5(C_{23}H_{26}N_2O_2Fe)]$ $M_w = 938$	1.08	881	867	80,60 (81,04)	7,04 (7,27)	2,99 (2,12)	5,97 (5,12)

M_w^* : GPC analiz sonucuna göre kütlece ortalama mol kütlesi

Sentezlenen polimer yapıları için önerilen birime ait kütlece ortalama mol kütlesi (M_w) ile GPC analiz sonucunda bulunan kütlece ortalama mol kütlesi (M_w^*) değerlerinin birbirine yakın olduğu görülmüştür. Bu sonuç, önerilen birimlerin doğruluğunu göstermektedir. PDI olarak gösterilen ve heterojenlik indeksi adı verilen parametre, $\frac{\text{Kütlece Ortalama Mol Kütlesi}}{\text{Sayıca Ortalama Mol Kütlesi}}$ ($\frac{M_w}{M_n}$) oranına eşittir ve polimer zincirlerinin uzunluğu hakkında bilgi verir. Bu oran, polimer zincirlerinin büyüklükleri birbirine yaklaştıkça küçülür. Heterojenlik indeksinin 1 olduğu durumlar “ideal hal” olarak adlandırılır. GPC analizi sonucunda görülen PDI değerlerinin 1’e yakın olması da sentezlenen polimerlerimizin zincir uzunluklarının birbirine yakın olduğuna destek olarak gösterilebilir.

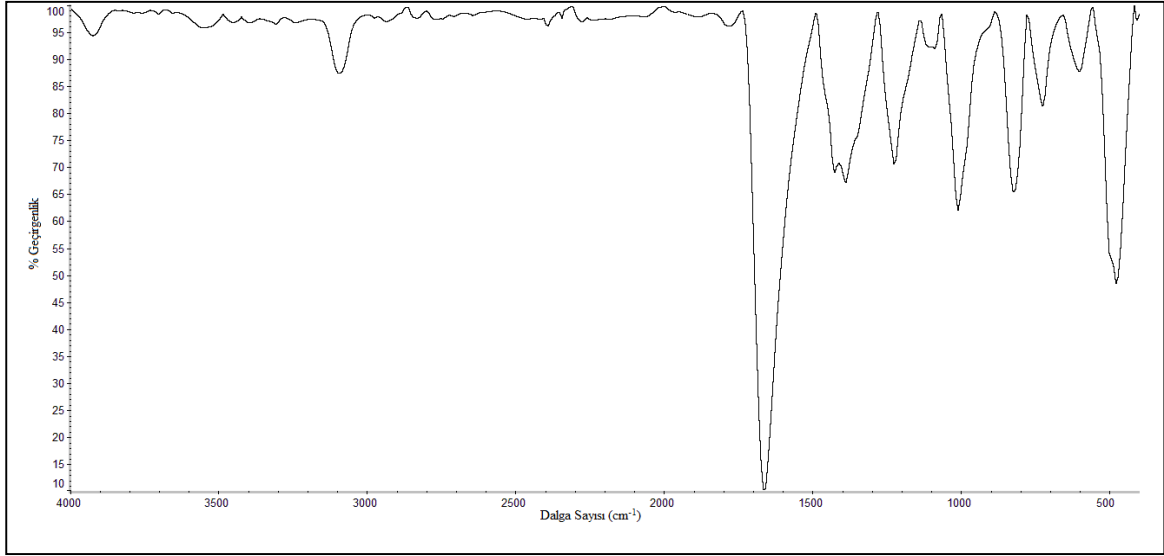
Katılma-ayrılma tepkimesi sonucunda oluşan, ferrosen içeren PS-N-Fc, PS-N-C-C-N-Fc, PS-N-C-C-C-N-Fc kodlu polimerlerin ve (Aminometil)polistiren polimerinin FT-IR spektrumları incelendi.



Şekil 5.1. (Aminometil)polistirene ait FT-IR spektrumu

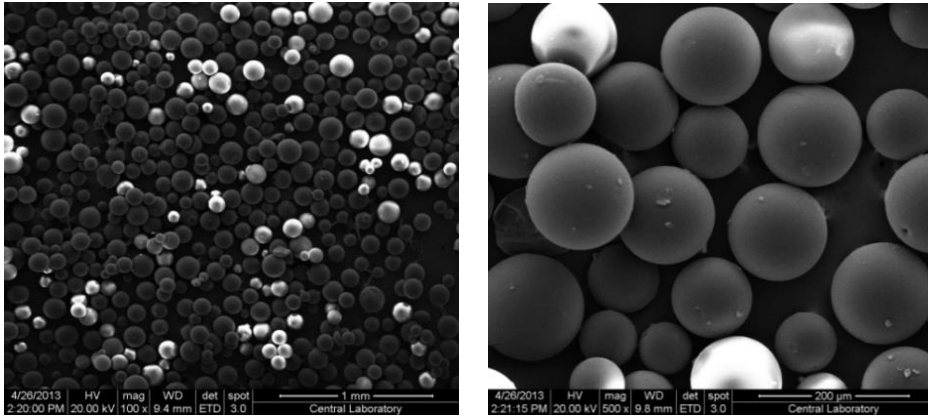
(Aminometil)polistiren'e ait spektrumda, 1543 cm^{-1} 'de $-\text{NH}_2$ grubundaki N-H bağ eğilmelerine, $3440\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ 'de görülen geniş bandın asimetric ve simetric N-H bağ gerilmelerine karşılık geldiği düşünöldü. 2920 cm^{-1} ve 2850 cm^{-1} 'de görölen bantların alifatik C-H, 3060 cm^{-1} ve 3021 cm^{-1} 'deki bantların ise aromatik C-H gerilmelerine ait olduğu söylenebilmektedir.

Polimerlerin FT-IR spektrumlarında, $1637\text{-}1662\text{ cm}^{-1}$ 'de görölen bantların $-\text{HC}=\text{N}-$ bağ gerilmesine, $2827\text{-}2932\text{ cm}^{-1}$ aralığında görölen bantların $\nu_{\text{C-H}}(\text{alifatik})$ bağ gerilmesine, $3028\text{-}3102\text{ cm}^{-1}$ aralığında görölen bantların ise $\nu_{\text{C-H}}(\text{aromatik})$ bağ gerilmelerine karşılık geldiği söylenebilir. Ayrıca orta şiddette $476\text{-}529\text{ cm}^{-1}$ ve $1390\text{-}1397\text{ cm}^{-1}$ aralığına denk gelen bant gerilmelerinin ferrosen'e ait olduğu ve beşli halkalar ile Fe atomu arasındaki bağ gerilmelerini gösterdiği söylenebilir (Çizelge 5.2).

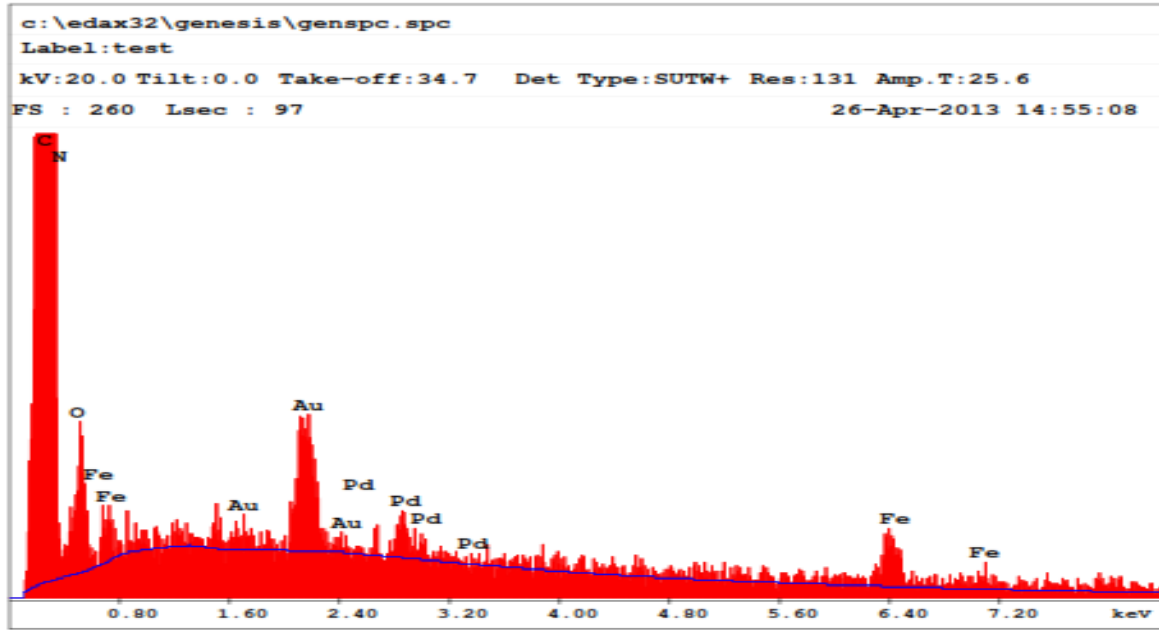


Şekil 5.3. PS-N-Fc polimerine ait FT-IR spektrumu

(PS-N-Fc) polimerine ait SEM fotoğraflarına bakılarak, polimerlerin yüzey morfolojisinden küre yapısının korunduğu, EDX spektrumunda Fe elementinin yer alması nedeniyle de ferrosenkarboksaldehitin kürelere takıldığı yorumu yapıldı.



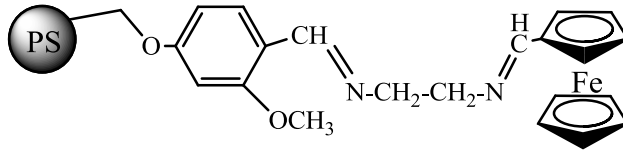
Resim 5.2. PS-N-Fc polimerinin SEM (100 ve 500 büyütme) görüntüsü



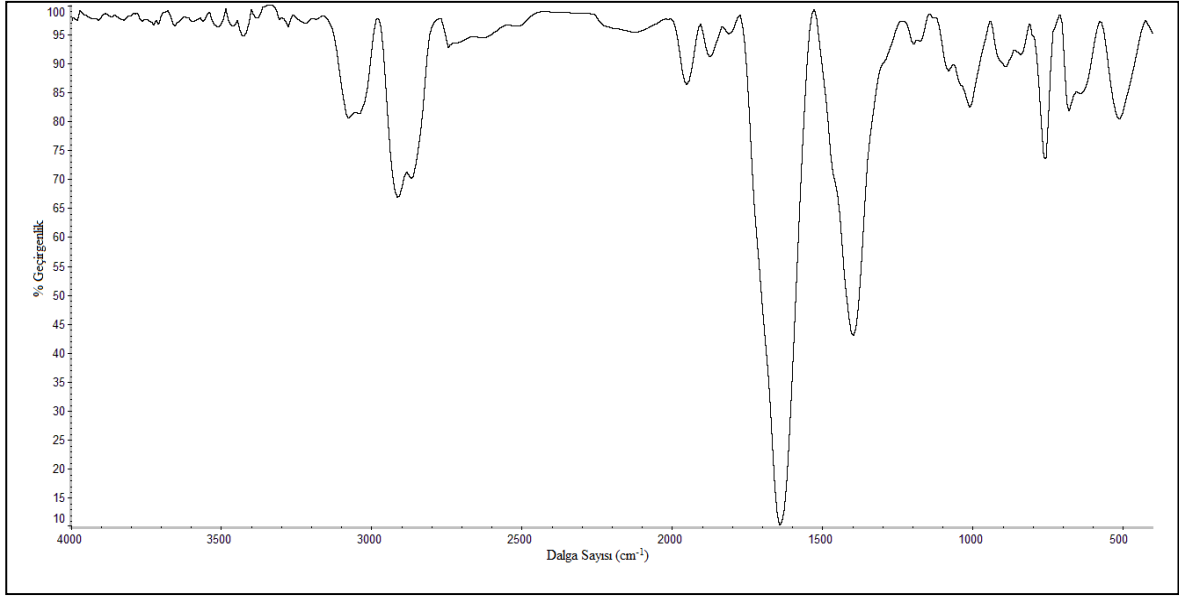
Resim 5.3. PS-N-Fc polimerinin EDX spektrumu

5.1.2. PS-N-C-C-N-Fc polimerinin karakterizasyonu

(4-formil-3-metoksifenoksimetil)polistiren (ameba resin), etilendiamin ve ferrosenkarboksaldehitin katılma-ayrılma tepkimesi sonucunda oluşan ürünün (Şekil 5.4.) FT-IR spektrumunda, 1640 cm^{-1} 'de görülen pikin -HC=N- bağ gerilmelerine, 2922 cm^{-1} görülen pikin $\nu_{\text{C-H}}(\text{alifatik})$ titreşim frekansına, 3080 cm^{-1} de ortaya çıkan pikin ise $\nu_{\text{C-H}}(\text{aromatik})$ titreşim frekansına karşılık geldiği ön görüldü. Orta şiddette 1397 cm^{-1} ve 517 cm^{-1} de görülen piklerin $\nu_{\text{halka-Fc}}$ titreşim frekansına karşılık gelebileceği ön görüldü.

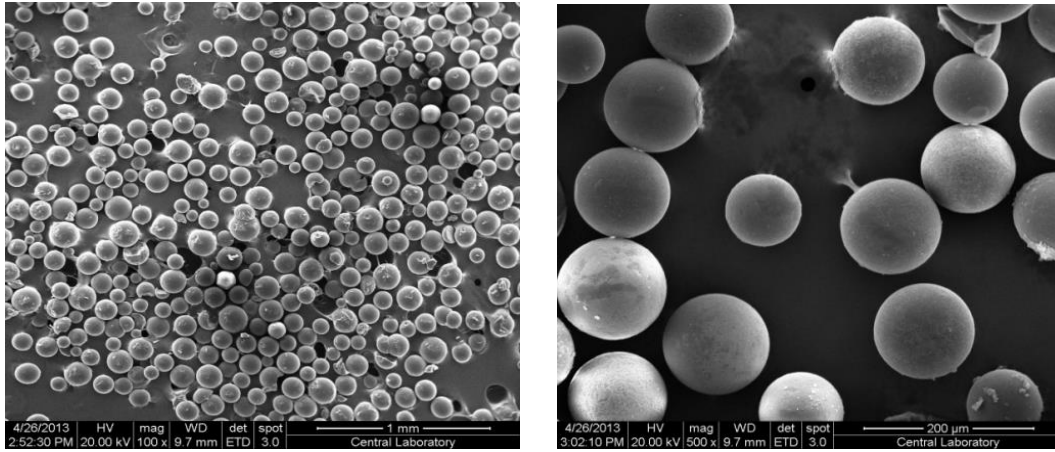


Şekil 5.4. PS-N-C-C-N-Fc polimerinin ön görülen yapısı

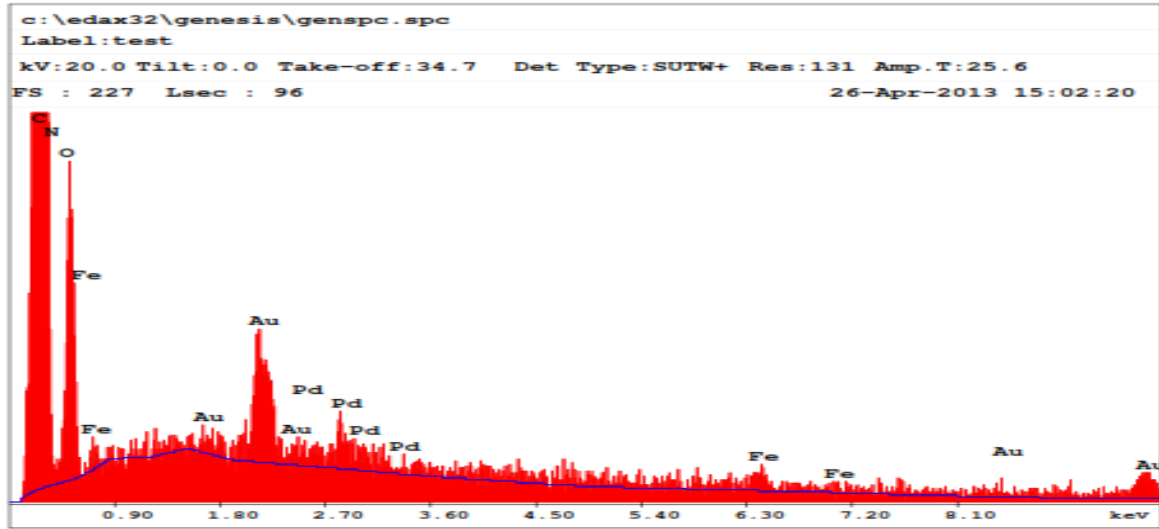


Şekil 5.5. PS-N-C-C-N-Fc polimerine ait FT-IR spektrumu

(PS-N-C-C-N-Fc) polimerinin SEM/EDX fotoğraf ve spektrumu alınarak (Resim 5.3 ve Şekil 5.5) polimerlerin yüzey morfolojisinden küre yapısının korunduğu, EDX spektrumunda Fe elementinin yer alması nedeniyle de ferrosenkarboksaldehitin kürelere takıldığı yorumu yapıldı.



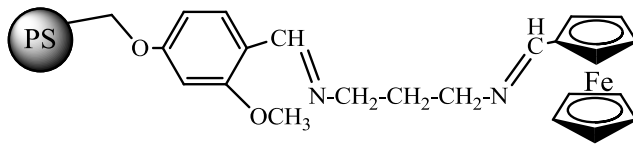
Resim 5.4. PS-N-C-C-N-Fc polimerinin SEM (100 ve 500 büyültmeli) görüntüsü



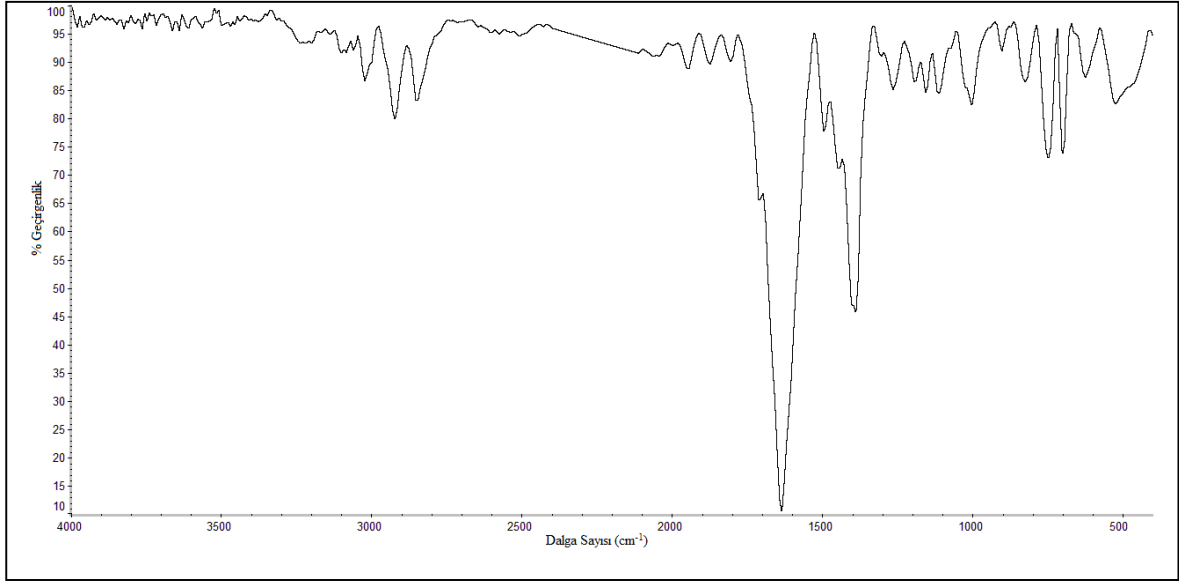
Resim 5.5. PS-N-C-C-N-Fc polimerinin EDX spektrumu

5.1.3. PS-N-C-C-C-N-Fc polimerinin karakterizasyonu

(4-formil-3-metoksifenoksimetil)polistiren (ameba resin), 1,3-diamino propan ve ferrosenkarboksaldehitin katılma-ayrılma tepkimesi sonucunda oluşan ürünün (Şekil 5.7.) FT-IR spektrumunda, 1637 cm^{-1} 'de görülen pikin -HC=N- bağ gerilmelerine, 2924 cm^{-1} ve 2852 cm^{-1} de görülen pikin $\nu_{\text{C-H}}$ (alifatik) titreşim frekansına, 3028 cm^{-1} de ortaya çıkan pikin ise $\nu_{\text{C-H}}$ (aromatik) titreşim frekansına karşılık geldiği ön görüldü. Orta şiddette 1391 cm^{-1} ve 529 cm^{-1} de görülen piklerin $\nu_{\text{halka-Fc}}$ titreşim frekansına karşılık gelebileceği ön görüldü.

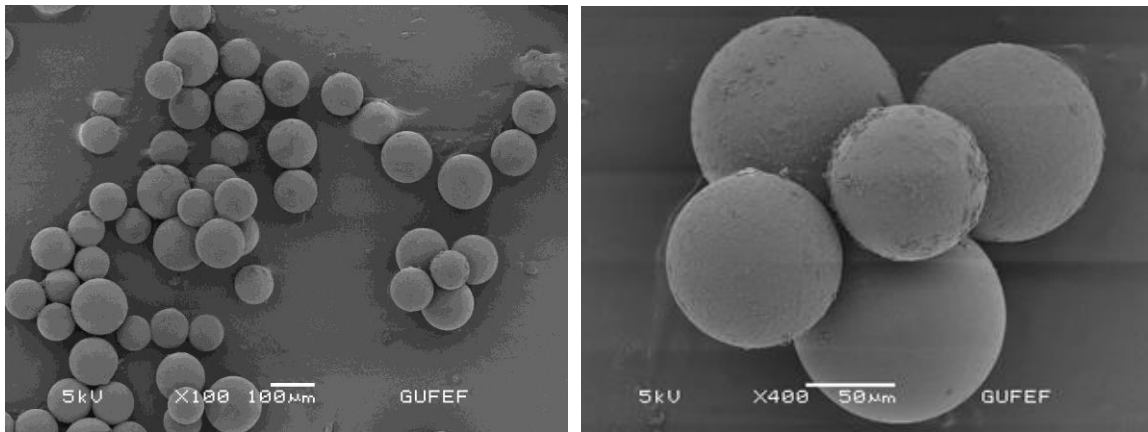


Şekil 5.6. PS-N-C-C-C-N-Fc polimerinin ön görülen yapısı

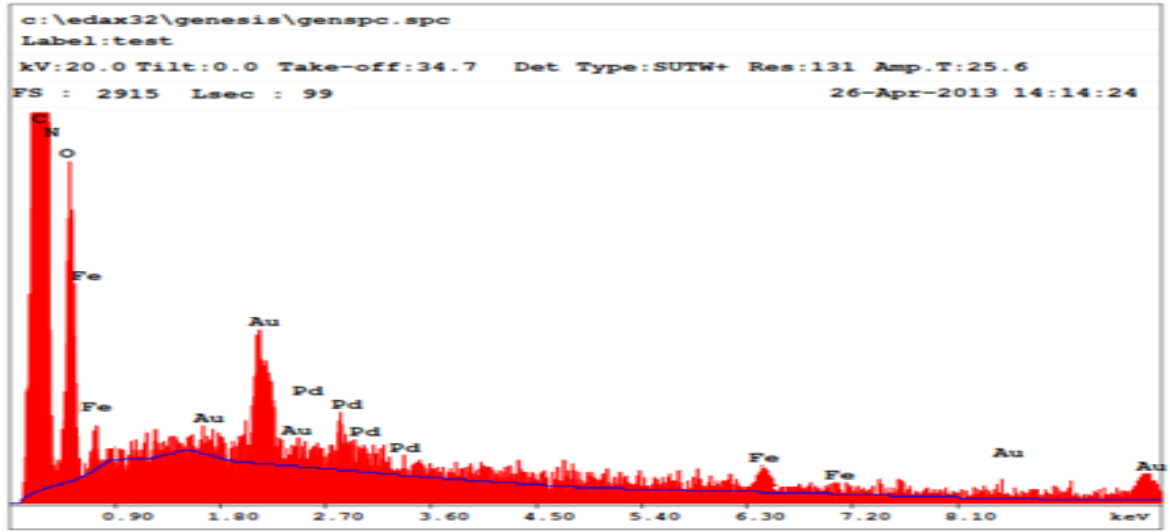


Şekil 5.7. PS-N-C-C-C-N-Fc polimerine ait FT-IR spektrumu

(4-formil-3-metoksifenoksimetil)polistiren, 1,3-diaminopropan ve ferrosenkarboksaldehitin katılma-ayrılma tepkimesi sonucunda oluşan ürünün SEM/EDX fotoğraf ve spektrumu alınarak (Resim 5.4. ve Şekil 5.8.) polimerlerin yüzey morfolojisinden küre yapısının korunduğu, EDX spektrumunda ise Fe elementinin spektrumunda yer alması nedeniyle ferrosenkarboksaldehitin kürelere takıldığı yorumu yapıldı.



Resim 5.6. PS-N-C-C-C-N-Fc polimerinin SEM (100 ve 400 büyültmeli) görüntüsü

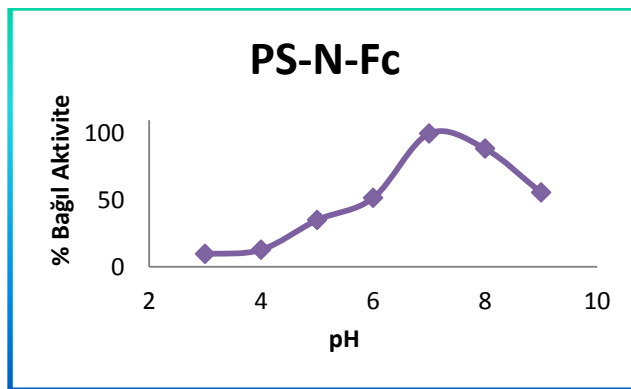


Resim 5.7. PS-N-C-C-C-N-Fc polimerinin EDX spektrumu

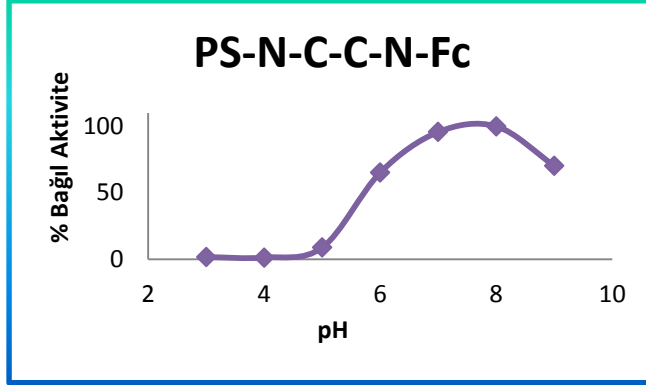
5.2. İmmobilize β -Glukoz oksidaz Enzimi İle İlgili Çalışmalar

5.2.1. İmmobilize β -Glukoz oksidazın aktifliğine pH etkisi

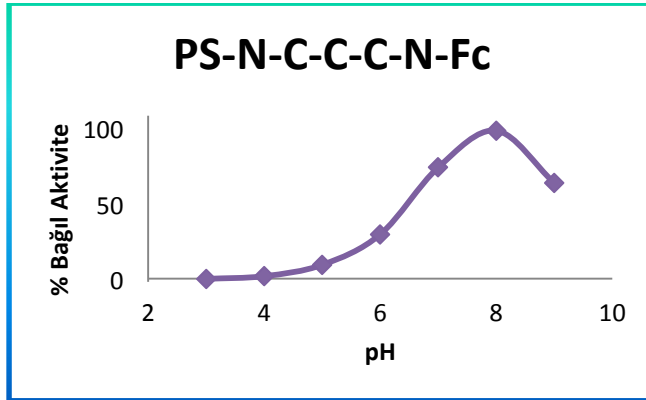
Yapısında ferrosen içeren, farklı kol uzunluklarına sahip polimerlere adsorpsiyon ile immobilize edilen β -Glukoz oksidazın aktifliğine pH etkisi, Bölüm 4.4.'de açıklanan yöntem kullanılarak incelendi ve Şekil 5.8, Şekil 5.9, Şekil 5.10 grafikleri elde edildi.



Şekil 5.8. PS-N-Fc polimere immobilize edilen β -Glukoz oksidazın aktifliğine pH etkisi



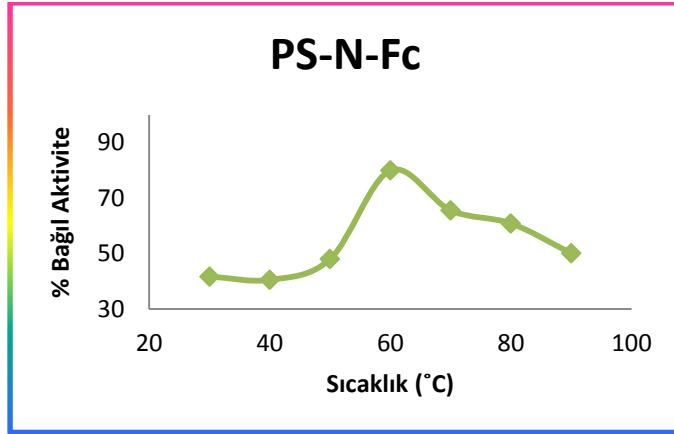
Şekil 5.9. PS-N-C-C-N-Fc polimere immobilize edilen β -Glukoz oksidazın aktifliğine pH etkisi



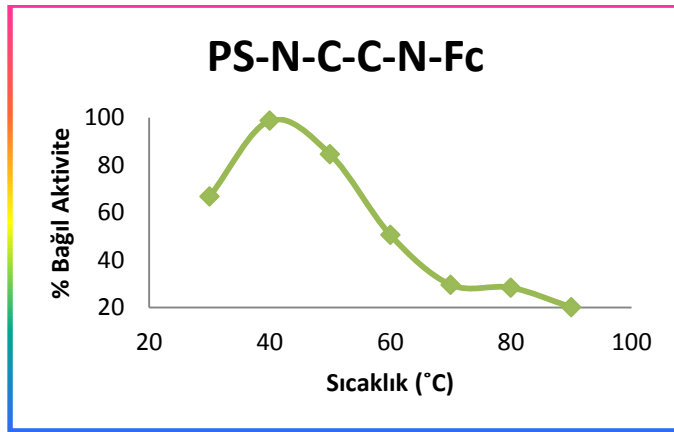
Şekil 5.10. PS-N-C-C-C-N-Fc polimere immobilize edilen β -Glukoz oksidazın aktifliğine pH etkisi

5.2.2. İmmobilize β -Glukoz oksidazın aktifliğine sıcaklık etkisi

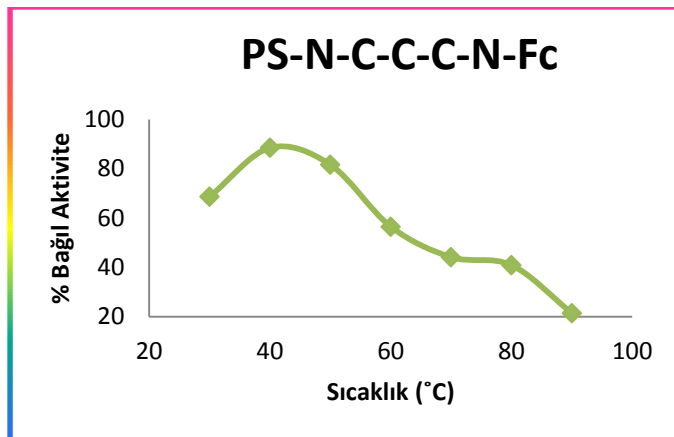
Adsorpsiyon metodu ile sentezlenen polimerlere immobilize edilen β -Glukoz oksidaz enziminin aktifliğine sıcaklığın etkisi Bölüm 4.5’de açıklanan yöntem uygulanarak incelendi ve Şekil 5.11, Şekil 5.12, Şekil 5.13 grafikleri elde edildi.



Şekil 5.11. PS-N-Fc polimere immobilize edilen β -Glukoz oksidazın aktifliğine sıcaklık etkisi



Şekil 5.12. PS-N-C-C-N-Fc polimere immobilize edilen β -Glukoz oksidazın aktifliğine sıcaklık etkisi



Şekil 5.13. PS-N-C-C-C-N-Fc polimere immobilize edilen β -Glukoz oksidazın aktifliğine sıcaklık etkisi

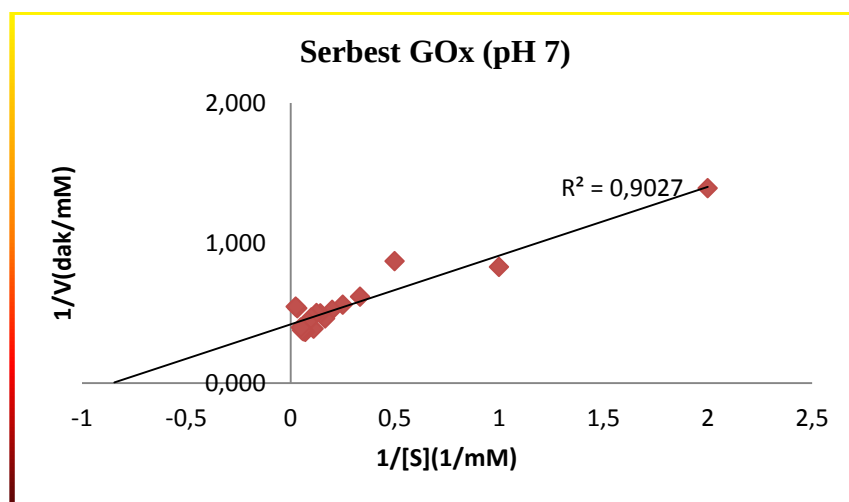
İmmobilize edilen β -Glukoz oksidaz için elde edilen optimum pH ve sıcaklık değerleri aşağıdaki toplu olarak verilmiştir.

Çizelge 5.3. Sentezlenen polimerlere immobilize edilen β -Glukoz oksidaz için seçilen optimum pH ve sıcaklık değerleri

Sentezlenen Polimerler	Optimum Şartlar	
	pH	Sıcaklık
(PS-N-Fc)-GOx	7	60°C
(PS-N-C-C-N-Fc)-GOx	8	40°C
(PS-N-C-C-C-N-Fc)-GOx	8	40°C

5.2.3. Serbest ve immobilize β -Glukoz oksidaz enziminin aktifliğine substrat derişiminin etkisi

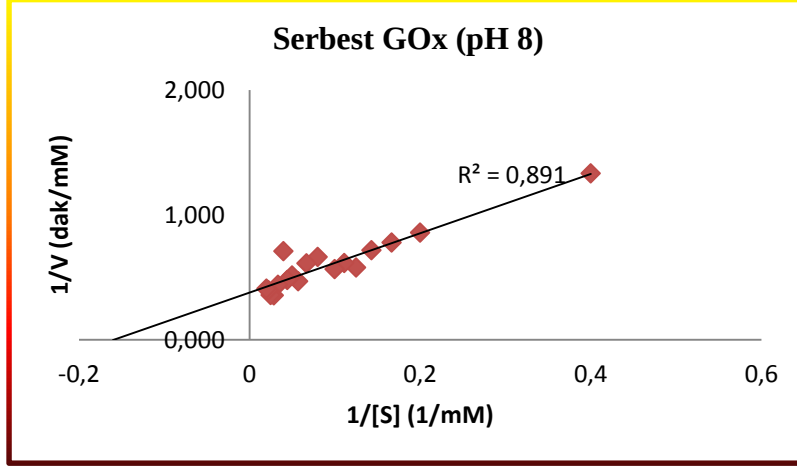
Serbest ve immobilize edilmiş β -Glukoz oksidaz aktifliğine substrat derişiminin etkisi Bölüm 4.6.'da belirtilen yöntem uygulanarak değerler kaydedildi. Bu değerlerden Lineweaver-Burk grafikleri çizildikten sonra K_m ve V_{max} değerleri belirlendi.



Şekil 5.14. pH 7’de serbest β -Glukoz oksidazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi

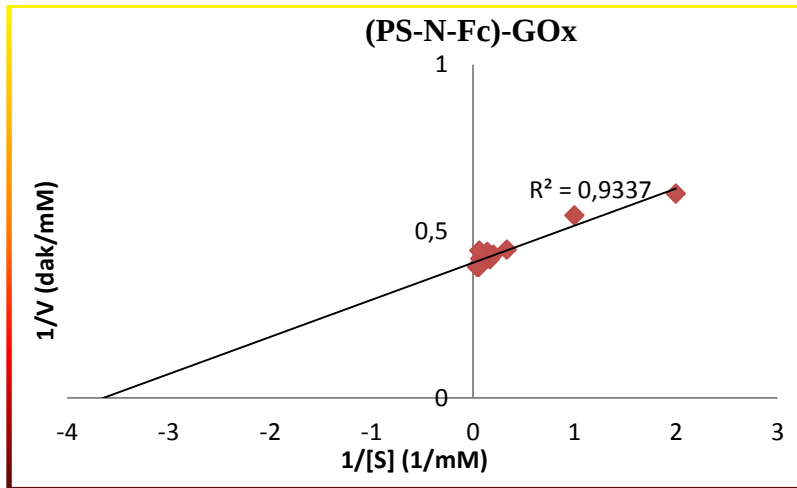
Şekil 5.14’te serbest β -Glukoz oksidaz için pH 7 ve 60°C’da çalışılmış, elde edilen absorbans değerleri ile yapılan hesaplamalar sonucu $1/V-1/[S]$ grafiği çizilerek, doğrunun

x eksenini kestiği noktadan K_m , doğrunun y eksenini kestiği noktadan da V_{max} değeri hesaplanmıştır.



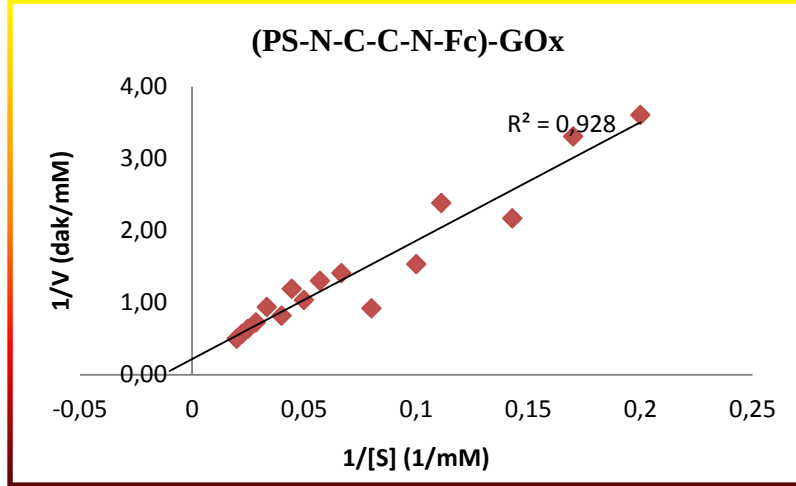
Şekil 5.15. pH 8’de serbest β -Glukoz oksidazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi

Yukarıdaki grafikte serbest β -Glukoz oksidaz için pH 8 ve 40°C’da çalışılmış, elde edilen absorbans değerleri ile yapılan hesaplamalar sonucu $1/V-1/[S]$ grafiği çizilerek, doğrunun x eksenini kestiği noktadan K_m , doğrunun y eksenini kestiği noktadan da V_{max} değeri hesaplanmıştır.



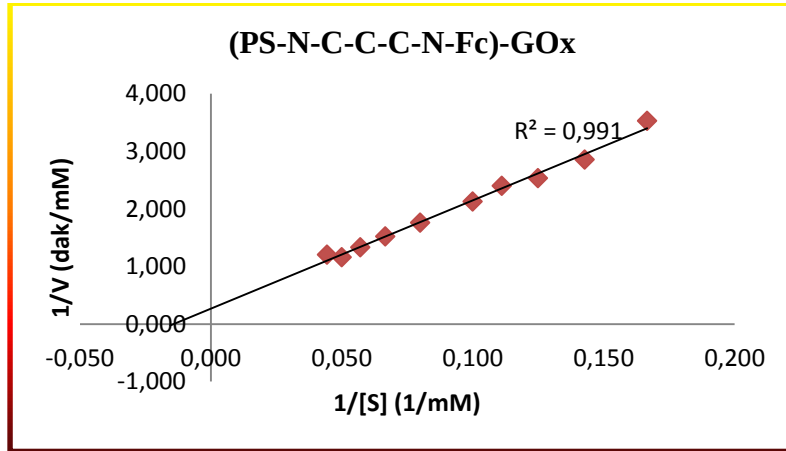
Şekil 5.16. PS-N-Fc isimli polimere immobilize edilen β -Glukoz oksidazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi

Şekil 5.16'da PS-N-Fc polimerine immobilize edilmiş β -Glukoz oksidaz için pH 7 ve 60°C'da çalışılmış, elde edilen absorbans değerleri ile yapılan hesaplamalar sonucu $1/V$ - $1/[S]$ grafiği çizilerek, doğrunun x eksenini kestiği noktadan K_m , doğrunun y eksenini kestiği noktadan da V_{max} değeri hesaplanmıştır.



Şekil 5.17. PS-N-C-C-N-Fc isimli polimere immobilize edilen β -Glukoz oksidazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi

Şekil 5.17'de PS-N-C-C-N-Fc polimerine immobilize edilmiş β -Glukoz oksidaz için pH 8 ve 40°C'da çalışılmış, elde edilen absorbans değerleri ile yapılan hesaplamalar sonucu $1/V$ - $1/[S]$ grafiği çizilerek, doğrunun x eksenini kestiği noktadan K_m , doğrunun y eksenini kestiği noktadan da V_{max} değeri hesaplanmıştır.



Şekil 5.18. PS-N-C-C-C-N-Fc isimli polimere immobilize edilen β -Glukoz oksidazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi

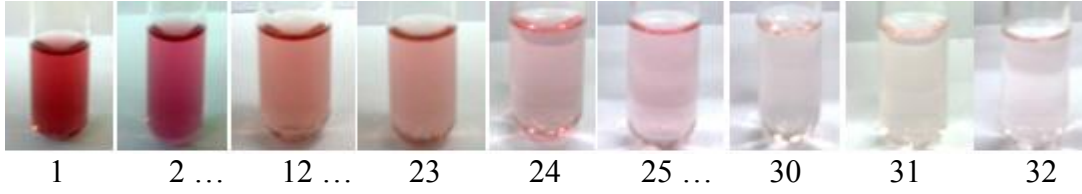
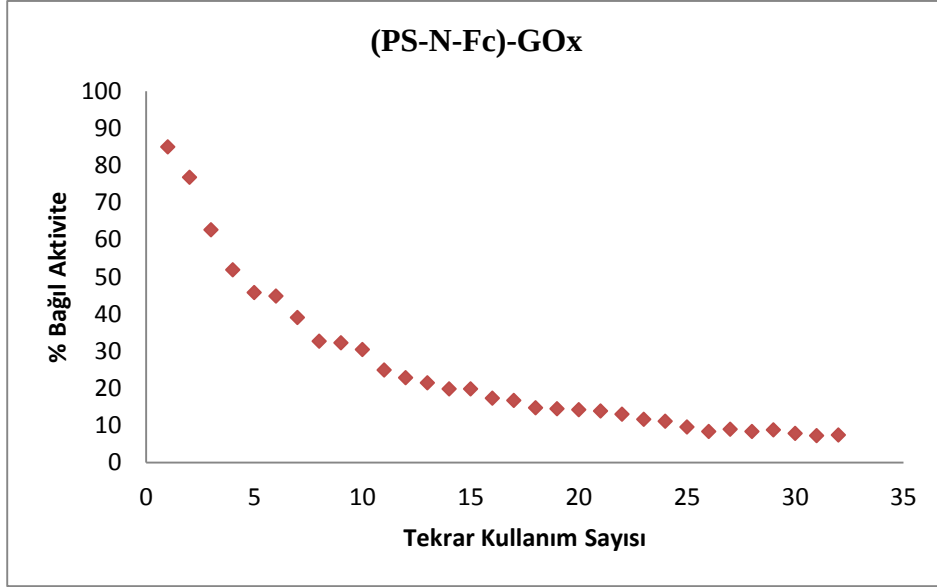
Şekil 5.18’de PS-N-C-C-C-N-Fc polimerine immobilize edilmiş β -Glukoz oksidaz için pH 8 ve 40°C’da çalışılmış, elde edilen absorbans değerleri ile yapılan hesaplamalar sonucu $1/V-1/[S]$ grafiği çizilerek, doğrunun x eksenini kestiği noktadan K_m , doğrunun y eksenini kestiği noktadan da V_{max} değeri hesaplanmıştır. Bulunan tüm sonuçlar Çizelge 5.4’te toplu halde gösterilmiştir.

Çizelge 5.4. İmmobilize enzim ve serbest enzim için kinetik parametreler

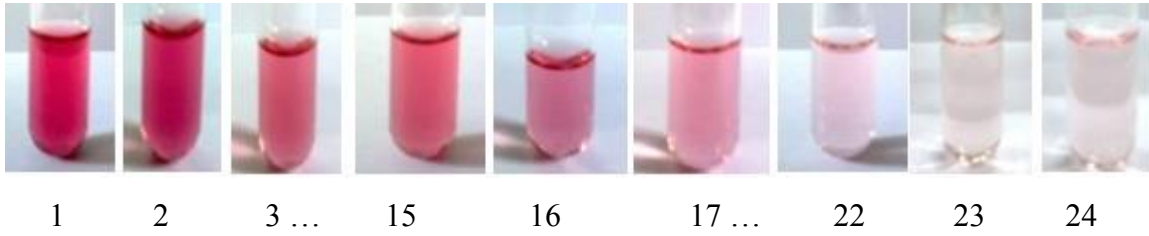
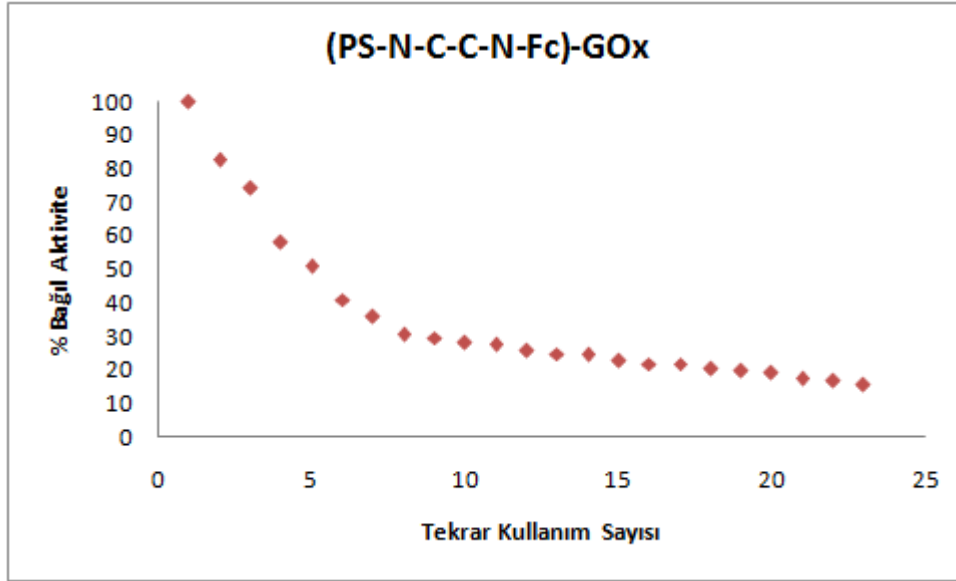
Çalışılan Koşullar	Serbest Enzim	İmmobilize Enzim K_m (mM) ; V_{max} (mM/dak)		
	K_m (mM) V_{max} (mM/dak)	PS-N-Fc	PS-N-C-C-N-Fc	PS-N-C-C-C-N-Fc
pH 7, 60°C	1,34 2,58	0,274; 2,47		
pH 8, 40°C	6,29 2,65		76,92; 4,61	71,43; 3,75

5.2.4. İmmobilize β -Glukoz oksidaz enziminin tekrar kullanılabilirliği

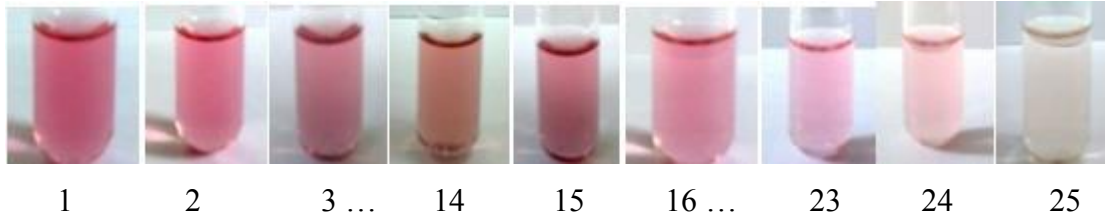
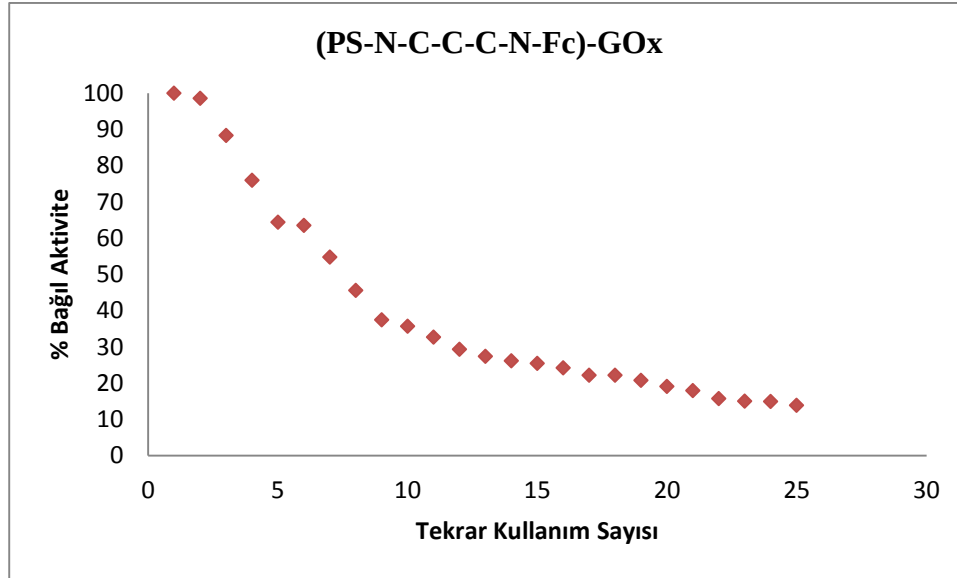
Sentezi yapılan polimerlere immobilize edilen β -Glukoz oksidaz’ın tekrar kullanılabilirliği Bölüm 4.8.’de verilen yöntem kullanılarak belirlenmiştir.



Şekil 5.19. PS-N-Fc polimere immobilize edilen β -Glukoz oksidazın tekrar kullanılabilirliği ve kullanım sayısı arttıkça meydana gelen renk değişimi



Şekil 5.20. PS-N-C-C-N-Fc polimere immobilize edilen β -Glukoz oksidazın tekrar kullanılabilirliği ve kullanım sayısı arttıkça meydana gelen renk değişimi



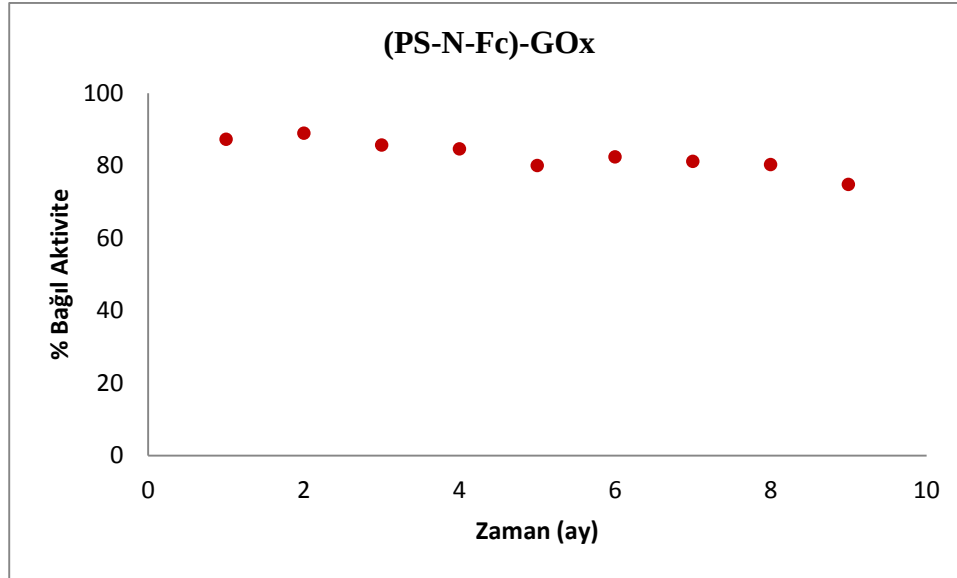
Şekil 5.21. PS-N-C-C-C-N-Fc polimere immobilize edilen β -Glukoz oksidazın tekrar kullanılabilirliği ve kullanım sayısı arttıkça meydana gelen renk değişimi

Çalışılan polimerler içinde (PS-N-Fc) polimere immobilize edilen β -Glukoz oksidazın tekrar kullanılabilirliğinin diğer polimerlerden daha iyi olduğu görüldü.

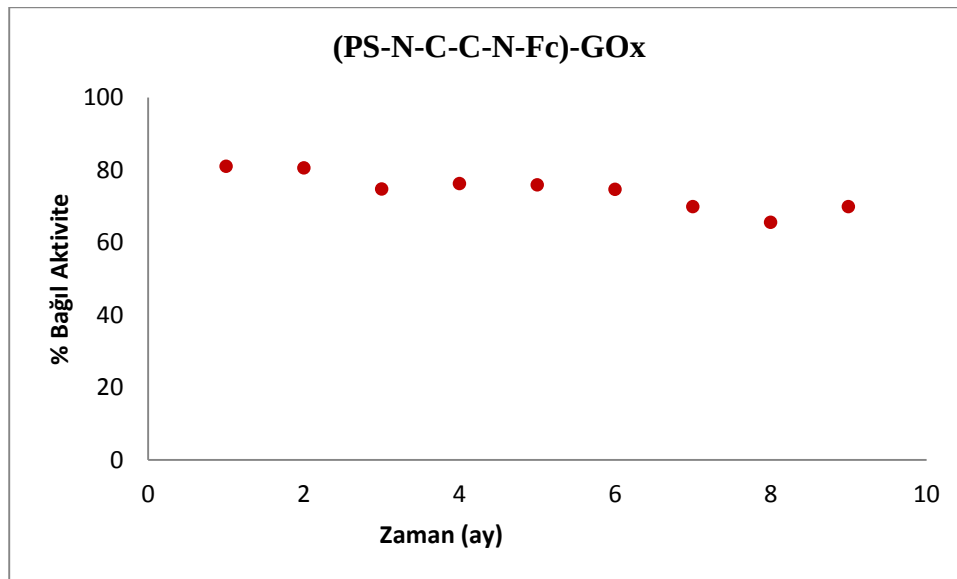
5.2.5. İmmobilize β -Glukoz oksidaz enziminin depolama kararlılığı

β -Glukoz oksidazın oda koşullarında saklanması ve aktivitesini ne kadar süreyle devam ettirdiğini takip etmek için depolama kararlılığı deneyleri Bölüm 4.9.'da belirtilen şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen UV-GB spektrumlarında 504 nm'deki absorbans değerleri dikkate alınarak zamana karşılık % bağlı aktivite grafikleri çizildi. Her ay alınan ölçümlere 9 ay boyunca devam edildi.

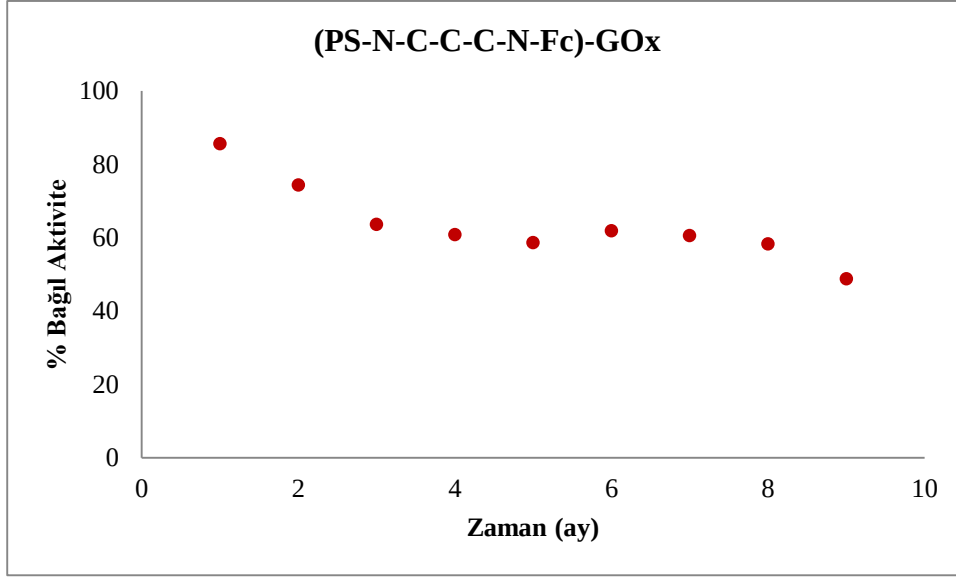
PS-N-Fc kodlu polimere immobilize edilen β -Glukoz oksidazın depolama kararlılığının çalışılan diğer polimerlerden daha iyi olduğu görüldü.



Şekil 5.22. PS-N-Fc polimere immobilize edilen β -Glukoz oksidazın depolanması süresince gösterdiği bağlı aktiflik



Şekil 5.23. PS-N-C-C-N-Fc polimere immobilize edilen β -Glukoz oksidazın depolanması süresince gösterdiği bağlı aktiflik



Şekil 5.24. PS-N-C-C-C-N-Fc polimere immobilize edilen β -Glukoz oksidazın depolanması süresince gösterdiği bağıl aktiflik

6. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Sunulan çalışma iki ana bölümü içermektedir. İlk bölüm polistiren destekli, ferrosen içeren Schiff-bazı polimerlerin sentezi ve karakterizasyonu üzerine olmuştur. İkinci bölüm ise sentezlenen üç yeni polimere β -Glukoz oksidaz enziminin immobilizasyonu ve immobilize enzim için optimum çalışma koşullarının (pH ve sıcaklık) belirlenmesi, kinetik parametrelerinin (K_m ve V_{max}) bulunması, böylece biyokataliz özelliklerinin karşılaştırılması üzerine olmuştur.

Ferrosen içeren Schiff-bazı polimerlerin yapıları element analizi, FT-IR, GPC ve SEM/EDX ile aydınlatılmıştır.

6.1. Karakterizasyona Ait Değerlendirmeler

Ferrosen içeren Schiff-bazı polimerlerin FT-IR spektrumları incelendiğinde, $-HC=N-$ grubuna ait, alifatik C-H gerilmelerine ait, aromatik C-H gerilmelerine ait ve ferrosen yapısındaki beşli halkalar ile Fe atomu arasındaki etkileşime ait karakteristik pikler sentezlenen polimerlerinin yapısının, ön görülen yapılara uygun olduğunu göstermiştir.

SEM görüntülerine bakıldığında polimerlerin yüzey modifikasyonlarında belirgin değişikliklerin olmadığı ve polimerlerin küre yapılarını korudukları görülmüştür. EDX analizlerinde, Fe elementine ait piklerin gözlenmesi, ferrosenkarboksaldehitin polistiren tabanlı polimerlerin yapısına katıldığını desteklemiştir.

6.2. İmmobilizasyon Çalışmalarına Ait Değerlendirmeler

(PS-N-Fc)-GOx, (PS-N-C-C-N-Fc)-GOx ve (PS-N-C-C-C-N-Fc)-GOx kodlu immobilize enzimler için optimum pH değerleri ; (PS-N-Fc)-GOx için 7, (PS-N-C-C-N-Fc)-GOx ve (PS-N-C-C-C-N-Fc)-GOx polimerleri için de 8 olarak bulundu. Bununla birlikte serbest β -Glukoz oksidaz enziminin optimum pH'ı 5 olarak belirlendi.

(PS-N-Fc)-GOx, (PS-N-C-C-N-Fc)-GOx ve (PS-N-C-C-C-N-Fc)-GOx kodlu immobilize polimerler için optimum sıcaklık değerleri ; (PS-N-Fc)-GOx için 60°C, (PS-N-C-C-N-Fc)-GOx ve (PS-N-C-C-C-N-Fc)-GOx polimerleri için de 40°C olarak bulundu. Bununla birlikte, serbest β -Glukoz oksidaz enziminin optimum sıcaklığı 60 °C olarak bulundu.

Serbest β -Glukoz oksidaz için pH 7, 60°C’da Km değeri 1,34 ve pH 8, 40°C’da Km değeri 6,29 bulunmuştur. (PS-N-Fc), (PS-N-C-C-N-Fc) ve (PS-N-C-C-C-N-Fc) kodlu polimerlere immobilize edilen β -Glukoz oksidaz için Km değerleri sırasıyla ; 0,274, 76,92 ve 71,43 olarak bulunmuştur. Km değerlerine bakılarak (PS-N-Fc) kodlu polimere immobilize edilen enzimin substratına olan ilgisinin daha fazla olduğu söylenebilir.

Serbest β -Glukoz oksidaz için pH 7, 60°C’da Vmax değeri 2,58 ve pH 8, 40°C’da Vmax değeri 2,65 bulunmuştur. (PS-N-Fc), (PS-N-C-C-N-Fc) ve (PS-N-C-C-C-N-Fc) kodlu polimerlere immobilize edilen β -Glukoz oksidaz için Vmax değerleri sırasıyla ; 2,47, 4,61 ve 3,75 olarak belirlendi.

Sunulan çalışmada farklı optimum pH’lar gözlenmiştir. Bu durum her polimer için, enzimin aktif bölgelerinde bulunan, farklı amino asit kalıntılarının etkili olmasından kaynaklanabilir.

Aynı optimum pH’ya sahip olan (PS-N-C-C-N-Fc)-GOx ve (PS-N-C-C-C-N-Fc)-GOx immobilize enzimlerin, kol uzunluğu arttıkça Km ve Vmax değerlerinin de arttığı görüldü.

Bu çalışmada enzimin hidrojen bağları oluşturarak immobilize edildiği söylenebilir. İmmobilizasyonun, β -Glukoz oksidazın dış kabuğundaki karbohidratın –OH grubu ile yapıdaki –NH₂ veya –COOH gruplarının, polimerlerin yapısında bulunan –CH=N- (imin) azot atomu arasında hidrojen bağlarını yaparak oluştuğu (Şekil 6.1) yorumu yapıldı.

Enzim ve polimer arasındaki etkileşimin Şekil 6.1’deki gibi olduğu ön görüldü. Modifiye edilen polimerlerin yapısında bulunan ferrosenin katkısı ile, oluşan elektron alışverişi sayesinde glukoz, glukonik asite yükseltgenir.

KAYNAKLAR

1. Miessler, G. L., Tarr, D. A. (2009). *İnorganik Kimya* (çev. N. Karacan, P. Gürkan). Ankara:Palme Yayıncılık (Eserin orijinali 2004'te yayımlandı), 454-456.
2. Solomons, G., Fryhle, C. (2002). *Organik Kimya* (çev. G. Okay, Y. Yıldırım). İstanbul: Literatür Yayıncılık, Dağıtım, Pazarlama, San. ve Tic. Ltd. Şti. (Eserin orijinali 2000'de yayımlandı), 543-544, 1080-1081.
3. Rheinboldt, H. (1950). *Fifty Years of The Grignard Reaction* (çev. Oesper, R. E.) *J. Chem. Educ.*, Sao Paulo, 476-488.
4. Kaya C. (2011). *İnorganik Kimya*. (Üçüncü Baskı, Cilt 1) Ankara: Palme Yayıncılık, 9-13.
5. Pauson, P. L., Kealy,T. J. (1951). A New Type of Organo-Iron Compound. *Nature*, 168, 1039-1040.
6. Fischer, E.O., Phab, W. Z. (1952). *Naturforsch*, 76, 377.
7. Wilkinson, G., Rosenblum, M., Whiting, M. C., Woodward, R. B., J. (1952). *Am. Chem. Soc.*, 74, 2125.
8. Haaland, A., Nilsson, J. E. (1968). The Determination of Barriers to Internal Rotation by Means of Electron Diffraction. Ferrocene and Ruthrocene. *Acta Chem. Scand.*, 22, 2653-2670.
9. Verap, G. (2013). Bazı Ferrosenil Sübstitüe 1,3,4-oksadiazol Türevlerinin Sentezi. *Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yayınları*, Antalya.
10. Beer, P.D., Bernhard, P. V. (2001). Ferrocene Functionalized Macrocyclic Receptor for Cations and Anions. *J. Chem. Soc.*, 3, 1428-1431.
11. Monte, M. J. S., Santos, L. M. N. B. F., Fulem, M., Fonseca, J. M. S., Sousa, C. A. D. (2006). New Static Apparatus and Wapor Pressure of Reference Materials: Naphthalene, Benzoic Acid, Benzophenone, and Ferrocene. *J. Chem. Eng. Data*, 51, 757-766.
12. Van Staveren, D. R., Metzler-Nolte, N. (2004). Bioorganometallic Chemistry of Ferrocene. *Chem. Rev.*, 104, 5931-5985.
13. Saravanakumar, D., Sengottuvelan, N., Narayanan, V., Kandaswamy, M., Varghese, T. L. (2013). Burning-Rate Enhancement of a High-Energy Rocket Composite Solid Propellant Based on Ferrocene-Grafted Hydroxyl-Terminated Polybutadiene Binder. *J. Appl. Polym. Sci.*, 119, 2517-2524.
14. Toqui, A., Hayashi, T. (1996). Ferrocenes: Homogeneous Catalysis, Organic Synthesis, Material Science. *VCH:Deerfield Beach, FL.*, 47, 245.

15. Malthête, J., Billard, J. (1976). *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 34, 117.
16. Cheng, Z., Zhang, G., Fan, X., Bi, F., Zhao, F., Zhang, W. (2014). Synthesis, Characterization, Migration and Catalytic Effects of Energetic Ionic Ferrocene Compounds on Thermal Decomposition of Main Components of Solid Propellants, *Inorg. Chim. Acta.*, 421, 191-199.
17. Van Staveren, D. R., Metzler-Nolte, N. (2004). *Chem. Rev.*, 104, 5931-5986.
18. Edwards, E. I., Epton, R., Marr, G. (1976). *J. Organomet.*, 107, 351-357.
19. Biot, C. (2004). Anti-Infective Agents. *Curr. Med. Chem.*, 3, 135-147.
20. Katalin Di, G., Allen H., Hill, O., McNeil, C. J., Green, M. J. (1988). Homogeneous Ferrocene-Mediated Amperometric Immunoassay. *Anal. Chem.*, 58, 1203-1205.
21. Boev, V. I., Dombrovskii, A. V. (1976). *Zh. Obsch. Khim.*, 46:3, 626-628.
22. Boev, V. I., Dombrovskii, A. V. (1980). Reaction of Ferrocene with Acetals and Ketals. *Zh. Org. Khim.*, 16:10, 2098-2101.
23. Laskatelev, E. V., Moskalenko, A.I., Boev, V. I. (2004). Mercuration of Salts of 2-and 4-Methyl-Substituted Heterocyclic Cations: A Quantum-Chemical Study. *Russ. J. Gen. Chem.*, 74:2, 266-270.
24. Simionescu, C., Mazilu, I., Tataru, L., Lixandru, T. (1980). Ferrocene Polymers as Polymerization Initiators.2. Polymerization of Some Para-Alkylated Chloroformylated Vinyl Monomers. *Rev Roum Chem.*, 25:2, 277-283.
25. Tataru, L., Vata, M., Mazilu, I., Lixandru, T., Simionescu, C. (1981). New Ferrocene Polymers-Poly(Ferrocenylene Azomethines). *Angew. Makromolek. Chem.*, 101:Dec, 19-27.
26. Mizutani, F., Asai, M. (1988). Ferrocene-Mediated Enzyme Electrode for Glucose with The Use of Conducting Polymer Support. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 61:12, 4458-4460.
27. Shang, K., Qiao, Z., Sun, B., Fan, X., Shiyun A. (2013). *J. Solid State Electrochem.*, 17, 1685-1691.
28. Laforge, F.O., Kakiuchi, T., Shigematsu, F., Mirkin, M.V. (2004). *J. Am. Chem. Soc.* 126, 15380.
29. Zhang, S.B., Zheng, F., Wu, Z.S., Shen, G.L., Yu, R.Q. (2008). *Biosens. Bioelectron.*, 24, 129.
30. Hale, P. D., Boguslavsky, L. I., Inagaki, T., Lee, H. S., Skotheim, T. A., Karan, H. I., Okamoto, Y. (1990). Ferrocene-Modified Siloxane Polymers as Electron Relay

- Systems in Amperometric Glucose Sensors. *Mol. Cryst. Liq. Cryst. Inc. Nonlin. Opt.*, 190:1.
31. Dong, S., Wang, B., Liu, B. (1992). Amperometric glucose sensor with ferrocene as an electron transfer mediator. *Biosens. Bioelectron.*, 7:3, 215–222.
 32. Çevik, E., Şenel, M., Abasıyanık, M. F. (2012). An amperometric urea biosensor based on covalent immobilization of urease on copolymer of glycidylmethacrylate and vinylferrocene. *J. Solid State Electrochem.*, 16, 367–373.
 33. Dursun, F., Korkut Ozoner, Ş., Demirci, A., Görür, M., Yılmaz, F., Erhan, E. (2012). Vinylferrocene copolymers based biosensors for phenol derivatives. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 87, 95–104.
 34. Qiu, J. D., Huang, J., Liang, R. P. (2011). Nanocomposite Film Based on Graphene Oxide for High Performance Flexible Glucose Biosensor. *Sens. Actuator B-Chem.*, 160, 287-294.
 35. Baş, S. Z., Gülce, H., Yıldız, S. (2011). Amperometric Xanthine Biosensors Based on Electrodeposition of Platinum on Polyvinylferrocenium Coated Pt Electrode. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 72, 282-288.
 36. Moller, K., Borvornwattananont, A. (1989). Chemistry of Cyclopentadienyliron Dicarbonyl Dimer and Ferrocene in Zeolite Y Cavities: Anchoring Organometallic Fragments into Microporous Solids. *J. Phys. Chem.*, 93, 4562-4571.
 37. Dong, J. P., Jin, C. L., Xu, J. Q., Yan, H. (2009). Remarkable Electrochemical Responses of Ferrocene/NaY Zeolite Composite Modified Electrode Based on Hydrophobic Ionic Liquid. *Electroanalysis*, 21, 2597-2601.
 38. Qiu, J. D., Huang, J., Liang, R. P. (2011). Biocompatible and Label-free Amperometric Immunesensor for Hepatitis B Surface Antigen Using a Sensing Film Composed of Poly(allylamine)-branched Ferrocene and Gold Nanoparticles. *Microchim Acta*, 174, 97-105.
 39. Shim, J., Kim, G. Y., Moon, S. H. (2011). Covalent Co-immobilization of Glucose Oxidase and Ferrocenedicarboxylic Acid for Enzymatic Biofuel Cell. *J. Electroanal. Chem.*, 653, 14-20.
 40. Gauthier, S., Grass, H., Lory, M., Krämer, T., Thali, M., Bartsch, C. (2012). Lethal Carbon Monoxide Poisoning in Wood Pellet Storerooms-Two Cases and a Review of the Literature. *Ann. Occup. Hyg.*, 56, 755–763.
 41. Darwish, H. M. B., Okur, S. (2014). CO adsorption kinetics of ferrocene-conjugated polypyrrole using quartz microbalance technique. *Sens. Actuator B-Chem.*, 200, 325–331.

42. Sam, S. S., Steinmetz, H. B., Tsongalis G. J., Tafe L. J., Lefferts J. A. (2013). Validation of a Solid-Phase Electrochemical Array for Genotyping Hepatitis C Virus. *Exp. Mol. Pathol.*, 95, 18-22.
43. Reitzle, H., Sawodny, W. (1985). The Synthesis of polymeric Schiff base metal complexes with 4N ligands. *Inorg. Chim. Acta.*, 103, 53-55.
44. Sawodny, W., Riederer, M. (1977). Reversible O₂-Addition to Polymeric Schiff Base Complexes of VII and MnII and Their Use as Oxidation Catalysis. *Angew. Chem. Int. Ed*, 89, 897.
45. Sarı, N., Yüzüak, N. (2006). Synthesis, Characterization of Novel Polymeric-Schiff Bases and Their Complexes. *J Inorg Organomet Polym*, 16:3, 259.
46. Sarı, N., Özkan, S. (2009). Synthesis, characterization, and selectivity studies of poly(acrylamide) incorporating Schiff bases. *Chin. J. Polym. Sci.*, 27, 675-683.
47. Nartop, D., Sarı, N. (2012). Novel Poly(styrene) Attached Schiff Bases for uptake Mn(II) and Ni(II) Ions and as Antimicrobial Agent against *M. Luteus*. *J Inorg Organomet Polym*, 22:5, 772–779.
48. Nartop, D., Sarı, N., Altundaş, A., Öğütçü, H. (2012). Synthesis, characterization and antimicrobial properties of new polystyrene-bound Schiff bases and their some complexes. *J. Appl. Polym. Sci.*, 125, 1796-1903.
49. Bozkır, E., Sarı, N., Öğütçü, H. (2012). Polystyrene Containing Carbinolamine/azomethine Potentially Useful as Antimicrobiyal Agent: Synthesis and Biological Evaluation. *J Inorg Organomet Polym*, 22:5, 1146-1155.
50. Hwang, E. T., Gu, M. B. (2013). Enzyme stabilization by nano/microsized hybrid materials. *Eng. Life Sci.*, 13:1, 49–61.
51. Gubitz, G., Kunssberg, E., van Zoonen, P., Jansen, H., Gooijer, C., Velthorst, N. H., Fei, R. W. (1988). *Chemically Modified Surfaces*(Çev. Leyden, D. E., Collins, W. T.), Londra: Gordon and Breach.
52. Nobuaki, S., Shunsuke, K., Kazuhiro, U., Toshihisa, U., Kai, K. (2014). Preparation of an Enzyme/Inorganic Nanosheet/Magnetic Bead Complex and Its Enzymatic Activity. *J. Mater. Sci.*, 49, 8010–8015.
53. Sheldon, R. A. (2007). Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. *Adv. Synth. Catal.*, 349, 1289–1307.
54. Quijcho, F. A., Richards, F. M. (1964). Intermolecular cross-linking of protein in crystalline state – carboxypeptidase. *A. Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 52, 833–839.
55. Coradin, T., Nassif, N., Livage, J. (2003). Silica-alginate composites for microencapsulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 61, 429–434.

56. Şenel, M., Abasıyanık, M. F. (2010). Construction of a Novel Glucose Biosensor Based on Covalent Immobilization of Glucose Oxidase on Poly(glycidyl methacrylate-co vinylferrocene). *From Electroanalysis*, 22(15), 1765-1771.
57. Hanft, F., Koehler, P. (2006). Studies on the effect of glucose oxidase in bread making. *J. Sci. Food Agric.*, 86, 1699–1704.
58. Song, Z., Yuan, R., Chai, Y., Jiang, W., Su, H., Che, X., Ran, X. (2011). Simultaneous immobilization of glucose oxidase on the surface and cavity of hollow gold nanospheres as labels for highly sensitive electrochemical immunoassay of tumor marker. *Biosens. Bioelectron.*, 26, 2776–2780.
59. Isaksen, A., Adler-Nissen, J. (1997). Antioxidative Effect of Glucose Oxidase and Catalase in Mayonnaises of Different Oxidative Susceptibility. I. Product Trials. *Lebensm. -Wiss. u.-Technol.*, 30, 841–846.
60. Sarı, N., Antepli, E., Nartop, D., Kurnaz Yetim, N. (2012). Polystyrene Attached Pt(IV)–Azomethine, Synthesis and Immobilization of Glucose Oxidase Enzyme. *Int. J. Mol. Sci.*, 13, 11870-11880.
61. Dönmez, S., Arslan, F., Sarı, N., Kurnaz Yetim, N., Arslan, H. (2014). Preparation of carbon paste electrodes including poly(styrene) attached glycine-Pt(IV) for amperometric detection of glucose. *Biosens. Bioelectron.*, 54, 146-150.
62. Hasanoğlu Özkan, E., Kurnaz Yetim, N., Nartop, D., Sarı, N. (Baskıda). Influence of load on the recycling stability of nanospheres attached platinum ion for determination of glucose. *Ind. Eng. Chem. Res.*
63. Kayhan, S. (2012). Kondenzasyon Metoduyla Nanoplatformlara Schiff Bazı Takılması ve β -Glukoz oksidaz Enziminin Biokatalizör Olarak İncelenmesi. *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yayınları*, Ankara.
64. Özdem, N. (2012). Polistren Tabanlı Schiff Bazlarının Sentezi ve İmmobilizasyon Uygulamaları. *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yayınları*, Ankara.

EKLER

Int. J. Mol. Sci. **2012**, *13*, 11870–11880; doi:10.3390/ijms130911870

OPEN ACCESS
International Journal of
Molecular Sciences
ISSN 1422-0067
www.mdpi.com/journal/ijms

Article

Polystyrene Attached Pt(IV)–Azomethine, Synthesis and Immobilization of Glucose Oxidase Enzyme

Nurşen Sarı ^{1,*}, Esin Antepli ¹, Dilek Nartop ² and Nurdan Kurnaz Yetim ^{1,3}

¹ Department of Chemistry, Faculty of Science, Gazi University, Ankara 06500, Turkey; E-Mails: esinantepi@hotmail.com (E.A.); nurdankurnaz@gazi.edu.tr (N.K.Y.)

² Department of Chemistry, Faculty of Arts and Science, Nevşehir University, Nevşehir 50300, Turkey; E-Mail: dileknartop@nevsehir.edu.tr

³ Department of Chemistry, Faculty of Science, Kırklareli University, Kırklareli 39999, Turkey

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: nursens@gazi.edu.tr; Tel/Fax: +90-031-2202-1157.

Received: 16 July 2012; in revised form: 27 August 2012 / Accepted: 3 September 2012 /

Published: 19 September 2012

Abstract: Modified polystyrene with Pt(IV)–azomethine (APS–Sch–Pt) was synthesized by means of condensation and demonstrated to be a promising enzyme support by studying the enzymatic properties of glucose oxidase enzyme (GOx) immobilized on it. The characteristics of the immobilized glucose oxidase (APS–Sch–Pt–GOx) enzyme showed two optimum pH values that were pH = 4.0 and pH = 7. The insertion of stable Pt(IV)–azomethine spacers between the polystyrene backbone and the immobilized GOx, (APS–Sch–Pt–GOx), increases the enzymes' activity and improves their affinity towards the substrate even at pH = 4. The influence of temperature, reusability and storage capacity on the free and immobilized glucose oxidase enzyme was investigated. The storage stability of the immobilized glucose oxidase was shown to be eleven months in dry conditions at +4 °C.

Keywords: Pt(IV)–azomethine; Polystyrene; glucose oxidase enzyme; two optimum pH

1. Introduction

Enzymes are used as biocatalysts in the chemical, pharmaceutical and food industries and as specific ligands in clinical and chemical analyses [1]. Glucose oxidase (GOx) is a commercially

EK-2. IV. Ulusal Anorganik Kimya Kongresi Kitapçık Kapak Sayfası Görüntüsü



EK-3. IV. Ulusal Anorganik Kimya Kongresi Posterli Sunum Özeti



IV. ULUSAL ANORGANİK KİMYA KONGRESİ
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ FEN-EDEBİYAT FAKÜLTESİ KİMYA BÖLÜMÜ

P204

Farklı Kol Uzunluklarına Sahip Ferrosenin Nanoküreli Polimere Takılması ve SEM-EDS/EDX ile Karakterizasyonu

Esin ANTEPLİ, Nurşen SARI

Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü, 06500 Teknikokullar, Ankara,
esinantpl@hotmail.com

Ferrosen türevlerinin nanobilim, iletken polimerler, ilaç kimyası ve biyosensör gibi alanlarda kullanımının artması nedeniyle çeşitli sentezlerin yapıldığı görülmektedir. Farmakolojik olarak tedavide yer almış olan ferroserone adı altında satışa çıkarılan ve demir eksikliği tedavisinde kullanılan ferrosen içerikli ilaç sağlık sektöründe kullanılmaya başlanmıştır. Sanofi-Aventis'deki klinik çalışmalar sonucunda, ferroquin bileşiği 'Malarya sıtma' tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır [1]. Lokal anestezi bir ilaç olan Lidokain'nin vücuttan atılması ile ilgili sürecin takibi için, ferrosenin mükemmel elektrokimyasal özelliğinden faydalanılmaktadır [2]. Diyabetik hastaların kanındaki glukoz düzeyinin belirlenmesinde kullanılan ve bir amperometrik ölçüm tekniği olan 'ExacTech pen' isimli sistem Medisense şirketi tarafından geliştirilmiş olup, ferrosenin grafit elektroda immobilize edilmesi ile bir sensör olarak kullanıldığı görülmektedir [2]. Bütün bu özet bilgilerden görüldüğü gibi, yeni Ferrosen türevlerinin ve uygulamalarının araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Sunulan çalışmanın amacı; farklı kol uzunluklarına sahip Ferrosenin nanoküre yapısındaki polimerle etkileştirilerek, potansiyel iletken polimerler, ilaç kimyası ve biyosensör gibi alanların uygulanmasına dikkat çekmektir. Hazırlanan Ferrosen salkımlı polimerler SEM-EDS/EDX analizi ile değerlendirilerek, element analizi ile desteklenmiştir.

Anahtar kelimeler: Ferrosen, Polistiren, Nanoküre

Kaynaklar

- [1] C. BIOT. *Curr. Med. Chem. Anti-Infective Agents* 3, (2004), 135-147.
- [2] K. DIGIERIA, H. A. O. HILL, C. J. MCNEIL. *Anal. Chem.* 58, (1986), 1203-1205.

EK-4. V. Biyoteknoloji Kongresi Bilimsel Program Kapak Sayfası Görüntüsü

178th OMICS Group Conference

Scientific Program

5th World Congress on

Biotechnology

June 25-27, 2014 Valencia Conference Centre, Spain

OMICS Group Conferences
Accelerating Scientific Discovery



In Collaboration with

BIOVAL FEBiotec

OMICS Group Conferences

5716 Coosa Ave., Suite 110, Westlake Los Angeles, CA 91362-7354, USA
Phone: +1-650-265-9744, Fax: +1-650-618-1414, Toll free: +1-800-216-6499
Email: biotechnology2014@omicsgroup.us

“Organize your Events at OMICS Group Conferences”
Proposals are invited for organizing Symposia/Workshops at OMICS Group Conferences or OMICS Group will sponsor small events at your universities in related areas under the title of your own. These proposals can be sent to respective conference mail ids or to symposia@omicsonline.org

EK-5. V. Biyoteknoloji Kongresi Posterli Sunum Özeti



Influence of nanosphere has different spacer arms on the reuse of Glucose oxidase enzyme

Esin Antepli, Nurşen Sarı

Department of Chemistry, Faculty of Science, Gazi University, Türkiye

Abstract

Since the rising of nanosphere in material science, its potential applications have attracted considerable attentions due to its mechanical, thermal, optical properties. Immobilization of enzymes onto polymeric microsphere is the most useful strategy to improve the operational stability of biocatalysts without catalyst contamination. Glucose oxidase (GOx) is a commercially important enzyme which has application in pharmaceutical industry as a biosensor for the enzymatic determination of glucose in diabetes and the fermentation of liquor, and in the food industry for the removal of glucose and shelf life of various products. To investigate the effect of spacer arms on enzyme immobilization prepared nanosphere-polymeric support and glucose oxidase enzyme (GOx) immobilized on there.

Biography

Esin ANTEPLİ graduated in 2012 Chemistry Department of Gazi University. Her subject of graduation project is "Immobilization of Glucose Oxidase Enzyme" and with this subject she received Publication Promoting Award from TÜBİTAK. She is currently working on a Master's degree at Gazi University under the direction of Assoc. Prof. Dr. Nurşen SARI.

esinantpl@hotmail.com

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ANTEPLİ, Esin
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 18.06.1989
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : 0 (507) 361 51 65
 e-posta : esinantpl@hotmail.com



Eğitim Derecesi

Okul/Program

Mezuniyet Yılı

Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi/Kimya Bölümü	Devam ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi/Kimya Bölümü	2012
Lise	Kaya Bayazıtöğlu Lisesi/Fen Bilimleri	2007

İş Deneyimi, Yıl

Görevi

Devlet Su İşleri – Etüt, Planlama ve Tahsisler Dairesi Başkanlığı
 Su ve Toprak Laboratuvarı Şube Müdürlüğü, Haziran-Ağustos 2012.
 Stajyer öğrenci

Yabancı Dili

İngilizce

Akademik Faaliyetler

- Sarı, N., Antepli, E., Nartop, D., Kurnaz Yetim, N. (2012). Polystyrene Attached Pt(IV) Azomethine, Synthesis and Immobilization of Glucose Oxidase Enzyme. *Int. J. Mol. Sci.*, 13, 11870-11880.
- Gaziosmanpaşa Üniversitesi, IV. Ulusal Anorganik Kimya Kongresi Katılım Sertifikası (Poster ile katılım - Haziran – 2013).
- Omics Publishing Group, “ 5thWorld Congress on Biotechnology “ Katılım Sertifikası (Poster ile Katılım – 25-27 Haziran 2014, Valencia, İspanya).

Hobiler

Tiyatroya gitmek, film izlemek, kitap okumak, alışveriş yapmak



GAZİ GELECEKTİR..