

**ENZİMLERİN ÇEŞİTLİ İLETKEN
POLİMER MATRİSLERİNDE TUTUKLANMASI
VE SENSÖR OLARAK KULLANILMALARI**

PROJE NO : TBAG-2221 (102T216)

**PROF.DR. LEVENT TOPPARE
ARŞ.GÖR. ALİ ÇIRPAN
ARŞ.GÖR. SENEM KIRALP
ANIL LEVENT**

**NİSAN 2003
ANKARA**

İÇİNDEKİLER

Önsöz

Özet

Abstract

Şekil Listesi

Tablo Listesi

I. Giriş

II. Kopolimerler

II A. 3-metil tienil metakrilat / Polipirol veya Politiyofen Kopolimerleri

II B. (S)-2-metilbutil 2-(3-tienil) asetat / Polipirol veya Politiyofen

Kopolimerleri

III. Uygulamalar

III. A. Enzim Tutuklanması

III. A. I. PMTM/PPy matrisinde invertase tutuklanması

III. A. II. Tiyofen-3-il-asetik asid kolesteril ester (CM)/PPy

kopolimer matrisinde kolesterol oksidaz tutuklanması

IV. Literatür

V. TBAG-2221 Kapsamında yapılan bilimsel yayınlar

Önsöz

Bu proje 2002 yılında TÜBİTAK Temel Bilimler Araştırma grubunun katkılarıyla gerçekleştirilmiştir. Bu projede kullanılan monomer ve yalıtkan polimerlerin hazırlanmasında İTÜ Kimya Bölümünden Prof. Dr. Yusuf Yağcı'ya değerli katkılarından dolayı teşekkür ederiz. Proje de çalışan ODTÜ araştırma görevlilerinden Ali Çırpan ve Anıl Levent'e teşekkür ederiz.

zellikler taşıyan sistemler oluşturma kolaylığı, tek aşamalı oluşu enzimin aktivitesini kaybetmeksizin sulu sistemlerde kolaylıkla uygulanabilirliği gibi stnlkler sağlamaktadır. Filmlerin yüzeysel morfolojileri Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) kullanılarak incelendi.

ABSTRACT

Electrochemical polymerization of pyrrole and thiophene through the thiophene moieties of several insulating polymers and monomers (their polymers) were performed. As a result, copolymers of insulating polymers and monomers with pyrrole or thiophene were achieved. Immobilization of several enzymes in conducting copolymer matrices achieved by electropolymerization method. The enzyme electrode should have repetitive and prolonged use without reduction in efficiency and performance. The objective of the proposed research is to synthesize conducting copolymers constituting polypyrrole and polythiophene as matrices for the immobilization of enzymes. These monomers were polymerized by constant current and constant potential electrolyses methods. Immobilization of the enzyme occurred in-situ during copolymerization. We have developed a process that successfully incorporates enzymes into conducting copolymer matrices by electropolymerization. Electropolymerization is an efficient enzyme immobilization method used in biosensor development. Conducting copolymers of polythiophene or polypyrrole can be grown electrochemically on an electrode surface, and it is demonstrated that electrochemical polymerization is an easy and attractive approach for the immobilization of enzymes at electrode surface. Some of these electropolymers can also serve as mediator, decreasing the work potential and thereby avoiding interference from other species. Often, the thickness of the growing polymer film is controlled by measuring the charge transferred during the electrochemical polymerization process. The main advantages of entrapment of enzymes into conducting polymer films during the electrochemical

polymerization process are the extremely simple one-step procedure and the control of the spatial distribution of the immobilized enzyme. The effects of process variables on the structure, properties and mechanism of bioactivity were determined. It was desirable to monitor the retention of bioactivity over a wide range of time, temperature and other environmental conditions. The surface morphologies of the films were investigated by using Scanning Electron Microscopy(SEM).

Şekil Listesi	Sayfa
Şekil 1. PMTM sentezi	12
Şekil 2. PMTM nin elektrokimyasal kopolimerleşmesi	14
Şekil 3. PMTM nin galvanostatik polimerleşme tepkimesi	15
Şekil 4. (a) PMTM2 ve (c) GPMTM1D nin DSC termogramları	16
Şekil 5. (a) PMTM2 ve (c) GPMTM1D nin TGA termogramları	17
Şekil 6. MBTA sentezi	18
Şekil 7. poliMBTA'nın pirol ve tiyofen ile elektrokimyasal kopolimerleşmesi	20
Şekil 8. Dönüşümlü Voltametri (a) MBTA, (b) MBTA+Thiophene sistemi (c) saf tiyofen	21
Şekil 9. poliMBTA'nın çözelti yüzeyinin SEM fotoğrafı	22
Şekil 10. poliMBTA/PPy'nin çözelti yüzeyinin SEM fotoğrafı	23
Şekil 11. Taramalı elektron mikroskop (a) EE2'nin çözelti yüzeyi (b) EE4'nin çözelti yüzeyi (c) EE ün çözelti yüzeyi	26
Şekil 12. EE2 ve EE3 ün kullanım ömürleri	27
Şekil 13. CM/PPy kopolimerinin elektrokimyasal sentezi	28
Şekil 14. Kolesterolün renklendirilme reaksiyonları	30
Şekil 15. PPy/PTS/COD, CM/PPy/PTS/COD elektrotlarının kullanım ömürleri	31
Şekil 16. Taramalı elektron mikroskopun (a) PPy/PTSA/COD filminin çözelti yüzeyi,(b) PPy/PTSA/COD filminin elektrot yüzeyi, (c) CM/PPy/PTSA/COD filminin çözelti yüzeyi, (d) CM/PPy/PTSA/COD filminin elektrot yüzeyi	32

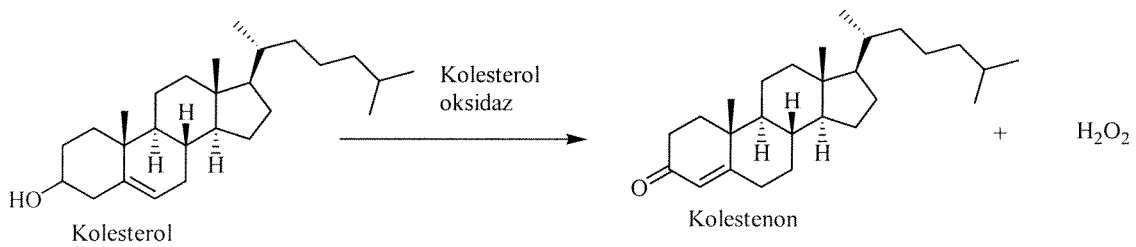
Tablo Listesi	Sayfa
Tablo 1. PMTM içeren kopolimerler filmlerinin iletkenlikleri	15
Tablo 2. MBTA bazlı kopolimerler filmlerinin iletkenlikleri	21
Tablo 3. PMTM/PPy/SDS ve (PMTM/PPy)/SDS sistemlerinde tutuklanmış invertaz aktiviteleri	25
Tablo 4. Tutuklanmış invertaz enziminin kinetik parametreleri	27
Tablo 5. Serbest ve tutuklanmış COD'un kinetik parametreleri	31

I. Giriş

İletken polimerler geniş kullanım alanlarından dolayı günümüzde büyük önem kazanmışlardır. Elektrik ileten polimerler günümüzde pillerde (Peres, 1992), elektrokromik aygıtlarda (Diaz, 1981), gaz ayırma membranlarında (Pellegrino, 1996) ve enzim tutuklama matrislerinde (Toppare, 1997;1999) kullanılmaktadır. Diğer yandan iletken polimerlerin çözünürlüklerinin ve termal özelliklerinin neredeyse olmaması bu malzemelerle iletken/yalıtkan karışımların hazırlanmasında çok çeşitli zorlukların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu sorunun çözümünün elektrokimyasal yöntemlerle olabileceğini göstermek amacıyla grubumuz bir yalıtkan polimer kaplı platinin elektrot olarak kullanımını önermiştir (Toppare, 1990;1997;1999). Bu yöntemle bir takım fonksiyonel gruplu yalıtkan polimerlerin iletken polimerlerle karışımlarının hazırlanabileceği bulunmuştur. Bir başka tür polimerlerde ise polimerler arası tepkimelerin gerçekleşebileceği tespit edilmiş ve bunların kopolimerlerinin hazırlanabilmesi için etkin yöntemlerin olabileceği ispatlanmıştır. Buna ek olarak tekrar polimerleştirilebilir polimerlerin hazırlanması ile iletken kopolimerlerinin yapısı aydınlatılabilmiş ve enzimleri tutuklama kapasiteleri araştırılmıştır. Elektrokimyasal yöntemle iletken kopolimer sentezinin çok çeşitli avantajları vardır; i) reaksiyonların oda sıcaklığında yapılıyor olması, ii) polimer filmlerin direkt olarak elektrot yüzeyinde üretilmesi, iii) film kalınlıklarının kontrol edilmesi ve iv) homojen filmlerin hazırlanabilmesidir. Enzim tutuklaması, enzimlerin katalitik aktivitelerinin kalıcı olabilmeleri ve enzimin defalarca kullanılabilmesi için bir matris içinde ya da yüzeyinde fiziksel ya da kimyasal

olarak hapsedilmeleridir. Tutuklanmış bir enzim sisteminin bir biyosensör olarak kullanılabilmesi için, enzimin aktivitesini koruması, kararlı olması, belli substratlara spesifik olması, kullanılacağı ortamın pH, sıcaklık, iyonik kuvvet gibi parametrelerine uygunluk göstermesi gibi koşulları sağlaması gerekmektedir. Enzim içeren bir çözeltide monomerin oksidasyonu sonucunda elektrokimyasal olarak polimerleşmesi alternatif tutuklama yöntemlerinden biridir. Diğer tutuklama yöntemleriyle kıyaslandığında, elektrokimyasal yöntem çabuk sonuç vermesi, farklı monomer veya destek elektrolit kullanılarak yepyeni özellikler taşıyan sistemler oluşturma kolaylığı, tek aşamalı oluşu, enzimin aktivitesini kaybetmeksizin sulu sistemlerde kolaylıkla uygulanabilirliği gibi üstünlükler sağlamaktadır.

Kolesterol oksidaz gerek kararlı bir enzim oluşu gerekse oldukça spesifik olması, kandaki ve serumdaki kolesterol tayininde kullanılması açısından önemli bir enzimdir. Kolesterol oksidaz kolesterolün kolestenona yükseltgenmesini katalizleyen enzimdir. Daha önceki çalışmalarda, kandaki ve serumdaki kolesterol tayininde tutuklanmış kolesterol oksidaz kullanılmıştır (Carpentier, 1995; Crumblis,1993). Kolesterol oksidaz enziminin çeşitli matrislerde farklı yöntemlerle tutuklanmasına ilişkin çalışmalar yapılmıştır (Hall, 1996; Kumar, 2000).

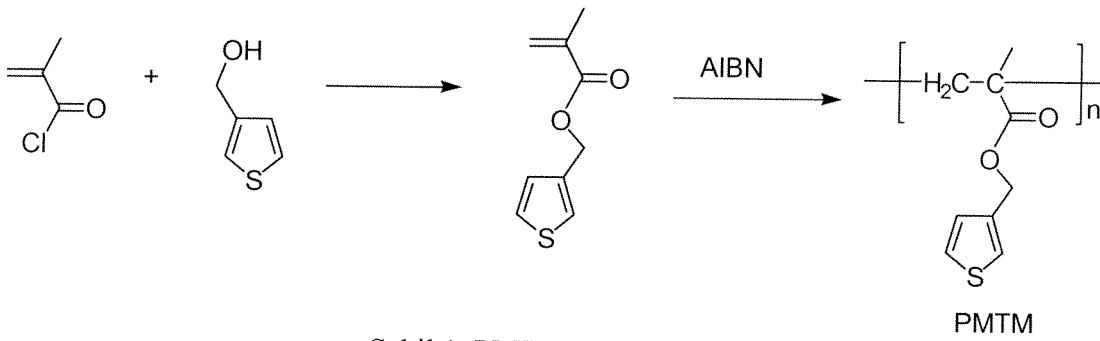


Kolesterol tayini için tutuklanmış kolesterol ile yapılmış sensörler vardır. Bu sensörler genellikle hidrojen peroksit duyarlı, amperometrik tayine dayalı kolesterol sensörleridir (Gobi, 2001; Bongiovanni, 2001).

II. Kopolimerler

II A. 3-metil tienil metakrilat / Polipirol veya Politiyofen Kopolimerleri

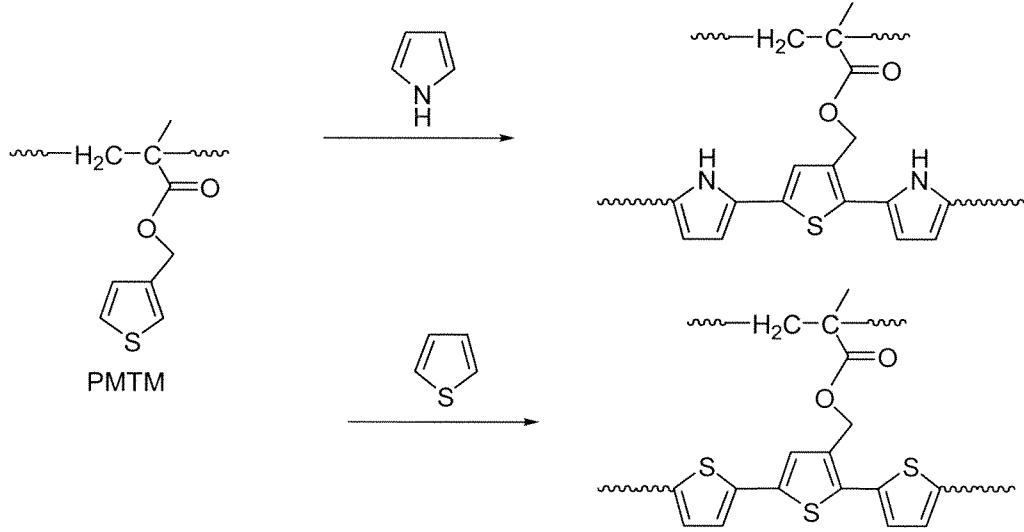
Enzim tutuklama matrisi olarak kullanılan poli(3-metil tienil metakrilat)(PMTM)/polipirol (PPy) ve PMTM/politiyofen(PTh) iletken kopolimerleri elektrokimyasal yöntemle sentezlenmiştir. 3-metil tienil metakrilat (MTM) monomerinin kimyasal yöntemle sentezi için 3-tiyofen methanol ve metakrolil klorür kullanılmıştır.



Daha sonra (PMTM) serbest radikal polimerleşme yöntemi ile sentezlenmiştir. Polimerleşmenin sonunda oluşan polimer metanolde çöktürülerek elde edilmiştir. (Şekil 1)

PMTM nin pirol varlığında iletken aşırı kopolimerleri elektrokimyasal yöntemle üretilmiştir. Bu amaç için, daha önceden PMTM ile kaplanmış platin (Pt) çalışma elektrodu, Pt karşıt elektrot ve gümüş(Ag) tel referans olarak kullanılarak, 3 lü elektroliz hücresinde pirol, distile su veya asetonitril ortamında, destek elektrolit olarak p-toluen sulfonik asid (PTSA), sodium dodesil sulfat (SDS) veya tetrabutylammonyum tetrafloroborat (TBAFB) sistemlerinde, öncelikle sabit potansiyel elektroliz yöntemi (1.0 V vs Ag/Ag⁺) ile gerçekleştirilmiştir. Elektrolizden sonra çalışma elektrodunda toplanan polimer elektrot yüzeyinden kazınarak çıkartılmış ve birkaç saat diklorometanda yıkamak suretiyle, aşılınmayan PMTM nin ortamdaki çözünerek uzaklaştırılması sağlandı.

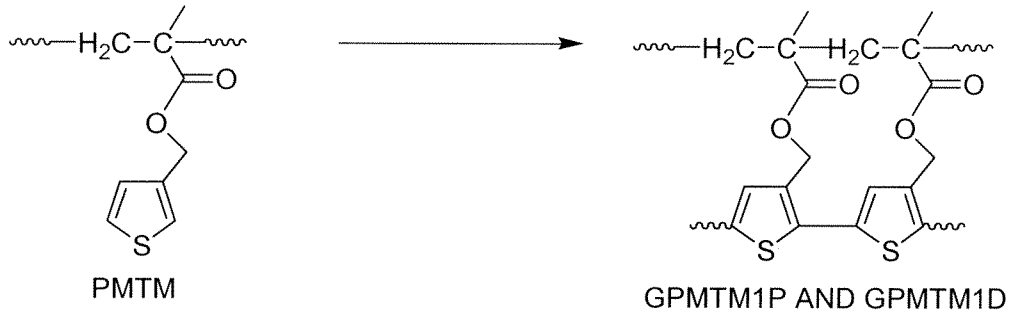
PMTM nin tiyofen varlığında aşırı kopolimerlerin üretimi için ise, PMTM kaplı platin çalışma elektrotu, 0.02 M tiyofen ve 0.05 M TBAFB içeren asetonitril içeren elektroliz hücresine konulmuştur.. Elektrolizler sabit gerilim elektrolizi ile 1.9 V da 60 dakika süreyle azot atmosferinde yapılmıştır. Tiyofen varlığında elektrolizler farklı elektroliz ortamlarında da gerçekleştirilmiştir. İkinci yöntem olarak, 40 mg PMTM ve 0.02 M tiyofen diklorometan ortamına eklenerek sabit gerilim elektrolizi ile (1.9V 30 dakika) 0°C yapılmıştır. Her iki şekilde de filmler elektrot yüzeyinden kazınıp PMTM nin çözünmesinde yıkayıp vakumda kurutulmuştur. (Şekil 2)



Şekil 2 PMTM nin elektrokimyasal kopolimerleşmesi

PMTM nin kimyasal homopolimerleşme tepkimeleri diklorometanda yapılmıştır. PMTM solüsyonuna başlatıcı olarak daha önceden nitrometanda çözülmüş FeCl_3 eklenmiştir. Bir gün reaksiyon zamanından sonra siyah ürün metanolde çöktürülmüştür. Sonra sabit ağırlığa gelene kadar vacumda kurutulmuştur.

PMTM nin galvonastatik (sabit akım) homopolimerleşme tepkimeleri propilen karbonate ve diklorometan da yapılmıştır. TBAFB (0.2 M) destek elektrolit olarak kullanılmıştır. Propilen karbonat ortamında PMTM kaplı electrode, diklorometanda ise PMTM çözülmüş solüsyon kullanılmıştır. Elde edilen filmler kazınıp vacumda kurutulmuştur. (Şekil 3)



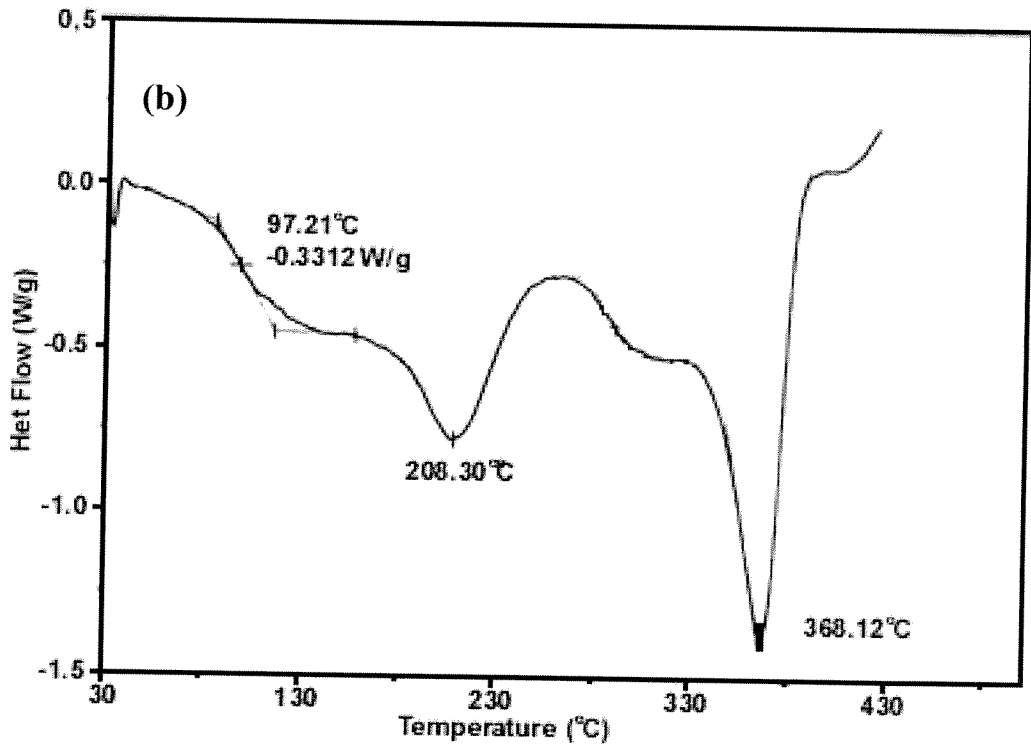
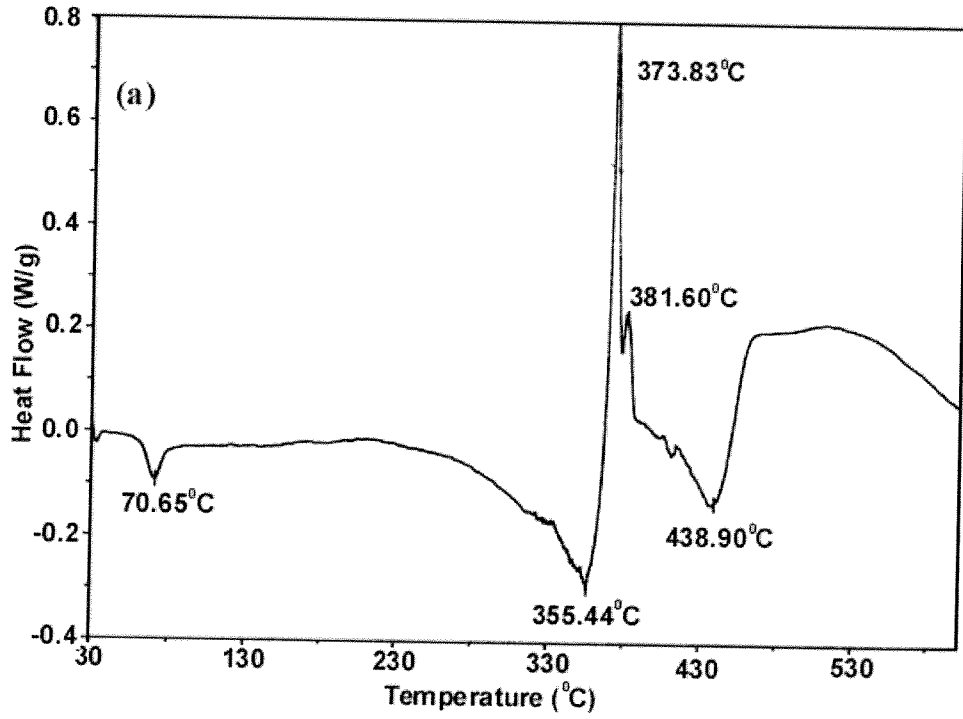
Şekil 3 PMTM nin galvanostatik polimerleşme tepkimesi

İletkenlik ölçümleri 4-probe tekniğiyle ölçülmüştür. Pirollü kopolimerlerin iletkenlikleri, 0.6 S/cm ile 3.0 S/cm arasında değişmektedir. Tiyofenli aşu kopolimerlerinin iletkenlikleri de yaklaşık 10^{-3} S/cm dir. Filmlerin elektrot ve çözelti yüzeyleri aynı iletkenlikte bulunmuştur. Bu sonuç ise, üretilen filmlerin homojen olduğunun göstergesidir.(Tablo 1)

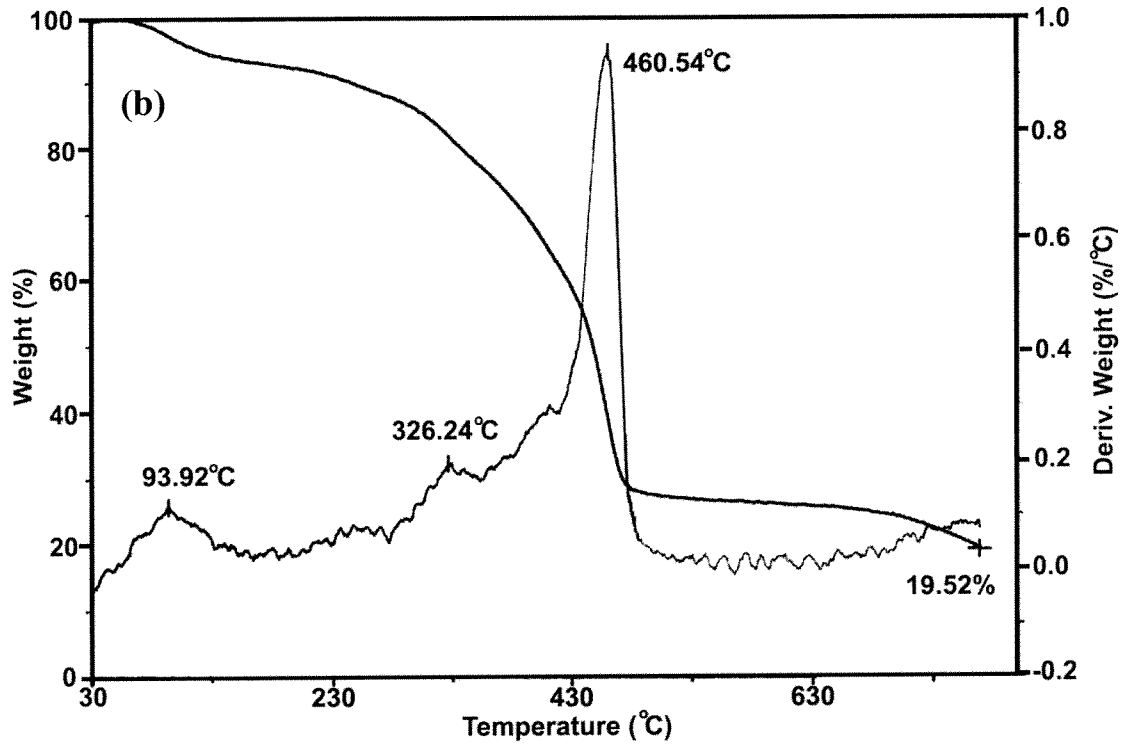
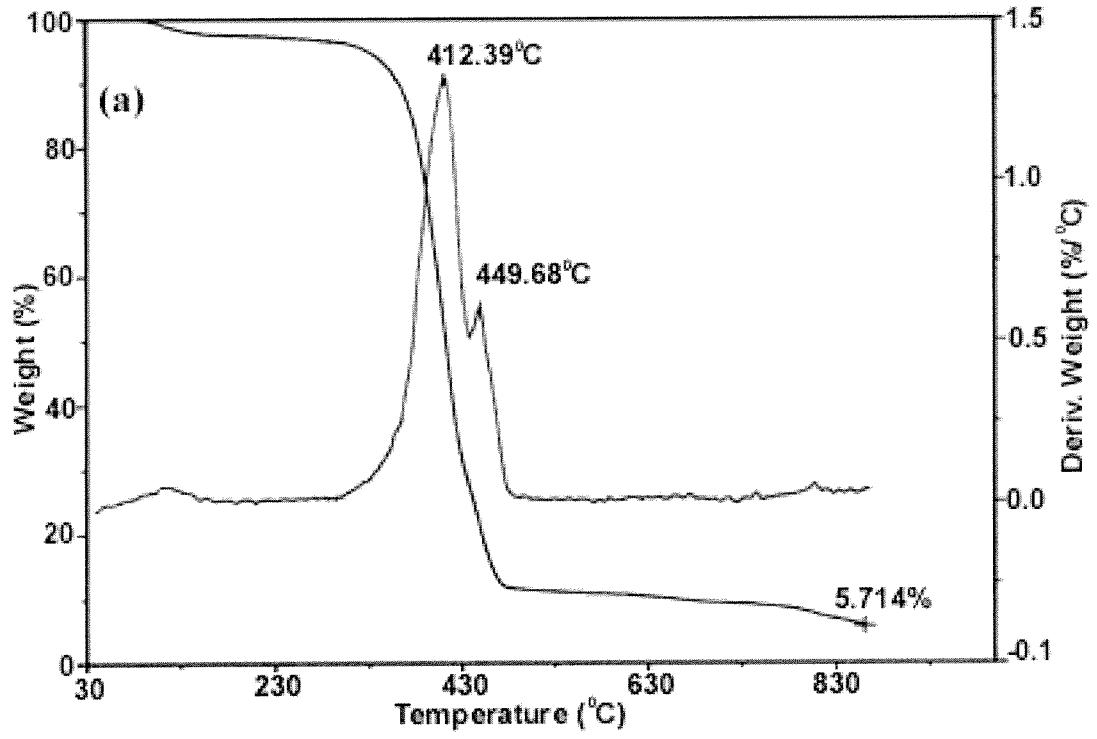
Tablo 1. PMTM içeren kopolimerler filmlerinin iletkenlikleri

Örnek	İletkenlik (S/cm)
PMTM2/PPy (PTS ⁻ doped)	3.0
PMTM2/PPy (SDS ⁻ doped)	0.8
PMTM2/PPy (BF ₄ ⁻ doped)	0.6
PMTM2/PTh (BF ₄ ⁻ doped)	6×10^{-3}

Şekil 4 ve 5 te PMTM nin homo polimerlerinin ve tiyofen ya da pirolle üretilen kopolimerlerinin daha kararlı oldukları görülmüştür. PMTM nin camsı geçiş sıcaklığından sonra erimeden direk bozunduğu DSC ve TGA analizleri sonucunda anlaşılmıştır.



Şekil 4. (a) PMTM2 ve (b) GPMTM1D nin DSC termogramları

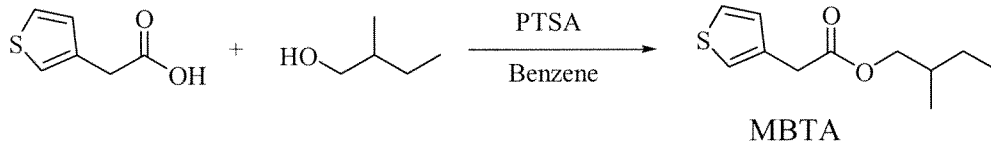


Şekil 5. (a) PMTM2 ve (b) GPMTM1D nin TGA termogramları

PMTM nin pirol ve tiyofen varlığında aşırı kopolimerlerinin sentezleri farklı destek elektrolit ve farklı solventler de başarıyla gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, PMTM nin kimyasal ve sabit akım da homo polimerleri de yapılmıştır. Bu polimerlerin, iletkenliklerinden hiç bir şey kaybetmediği ve termal özelliklerinin iyileştirildiği gözlenmiştir. Kullanılan farklı dopantlarda farklı termal özellikler ve farklı yüzey morfolojileri gözlenmiştir.

II B. (S)-2-metilbutil 2-(3-tienil) asetat / Polipirol veya Politiyofen Kopolimerleri

İlk önce (S)-2-metilbutil 2-(3-tienil) asetatın (MBTA) monomer sentezi için (S)-(-)-2-metilbutanol ve tiyofen-3-asetik asit kullanılmıştır. (Şekil 6)



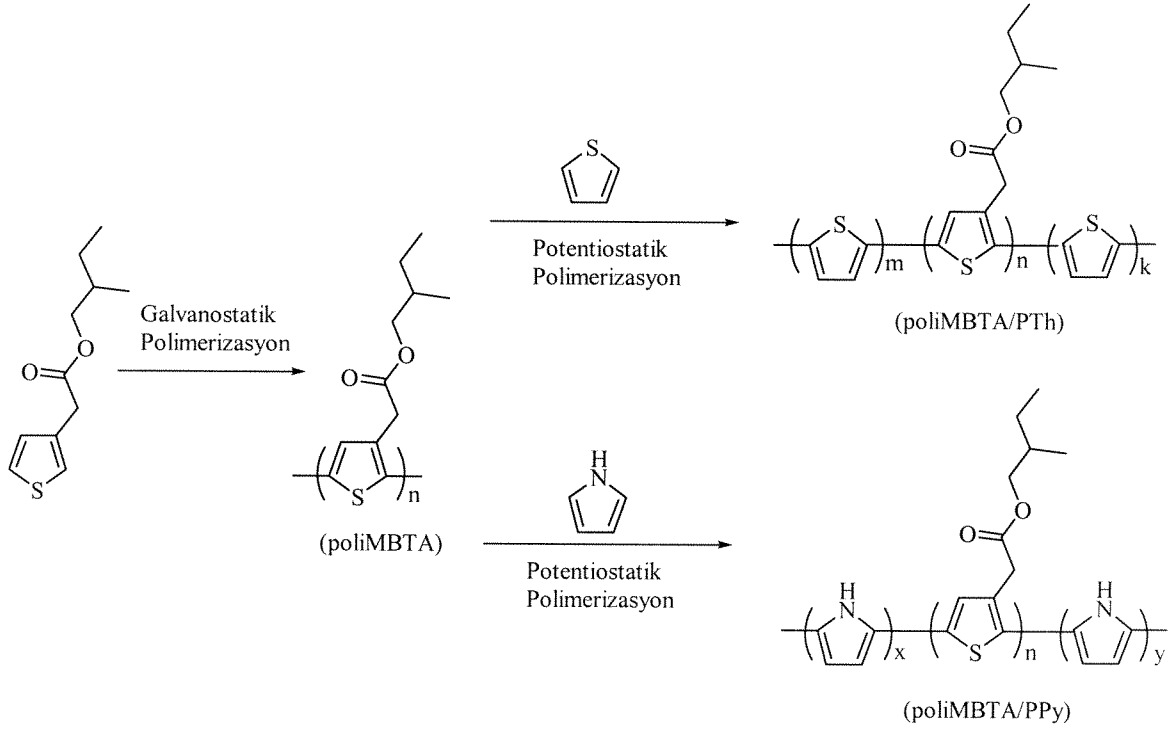
Şekil 6. MBTA sentezi

MBTA nın homo-polimerleri sabit akım yöntemi ile diklorometan (15mL) de sentezlenmiştir. TBAFB (0.2 M) destek elektrolit olarak kullanılmıştır. Diklorometanda MBTA çözülmüş solisyon kullanılmıştır. Elde edilen filmler kazınıp vacumda kurutulmuştur. PoliMBTA kısmen asetonitrilde ve diklorometanda çözünebiliyor. Böylelikle NMR çıktısı alınabildi.

Ayrıca MBTA nın PTh ile olan iletken kopolimeri de sabit gerilim yöntemiyle (elektrokimyasal yöntemle) sentezlenmiştir. Bu amaç için, platin (Pt)

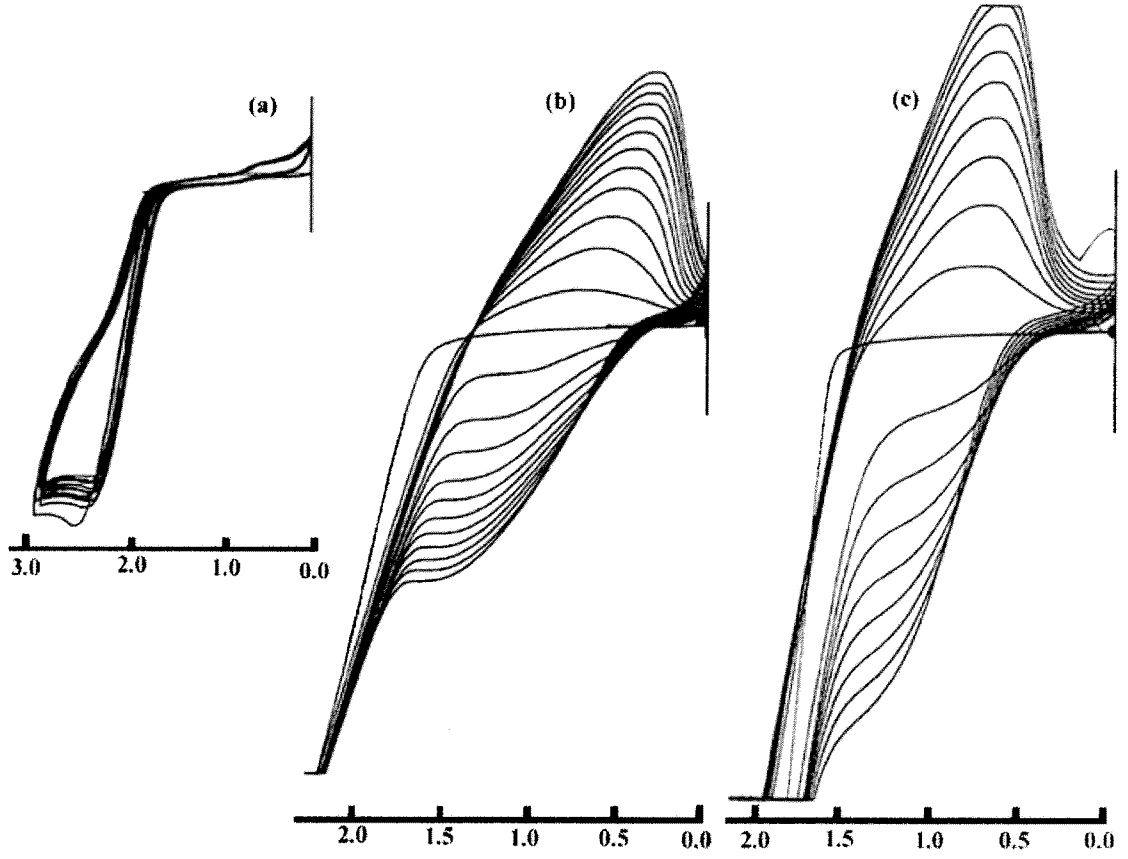
çalışma elektrodu, Pt karşıt elektrot ve gümüş(Ag) tel referans olarak kullanılarak, 3 lü elektroliz hücresinde tiyofen, asetonitril ortamında, destek elektrolit olarak tetrabutylamonyum tetrafloroborat (TBAFB) sisteminde, (1.9 V vs Ag/Ag⁺) ile gerçekleştirilmiştir.

Poly(MBTA) nin pirol varlığında iletken blok kopolimerleri elektrokimyasal yöntemle üretilmiştir. Bu amaç için, daha önceden elektrokimyasal (sabit akım) yöntemiyle poly(MBTA) kaplanmış platin (Pt) çalışma elektrodu, Pt karşıt elektrot ve gümüş(Ag) tel referans olarak kullanılarak, 3 lü elektroliz hücresinde pirol, distile su veya asetonitril ortamında, destek elektrolit olarak p-toluen sulfonik asid (PTSA) veya tetrabutylamonyum tetrafloroborat (TBAFB) sistemlerinde, öncelikle sabit potansiyel elektroliz yöntemi (1.1 V vs Ag/Ag⁺) ile gerçekleştirilmiştir. Poly(MBTA) nin tiyofen varlığında blok kopolimerlerin üretimi için ise, daha önceden elektrokimyasal (sabit akım) yöntemiyle poly(MBTA) kaplanmış platin çalışma elektrotu, 0.02 M tiyofen ve 0.05 M TBAFB içeren asetonitril içeren elektroliz hücresine konulmuştur. Elektrolizler sabit gerilim elektrolizi ile 1.9 V da 60 dakika süreyle azot atmosferinde yapılmıştır. Elektrolizden sonra çalışma elektrodunda toplanan polimer elektrot yüzeyinden kazınarak çıkartılmış ve birkaç saat diklorometanda yıkamak suretiyle, Poly(MBTA) nin ortamdan çözünerek uzaklaştırılması sağlandı.(Şekil 7)



Şekil 7. poliMBTA'nın pirol veya tiyofen ile elektrokimyasal kopolimerleşmesi

Monomerin redox davranışı dönüşümlü voltametri (CV) ile incelenmiştir. Çalışma ve karşıt elektrot olarak Pt tel ve referans elektrod olarak Ag / Ag⁺ kullanılmıştır. Daha sonra pirol ve tiyofen varlığında da CV çalışmaları asetonitril-TBAFB çözücü-destek elektrolit sisteminde yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda monomerin +2.4 V da yükseltgenme piki görülmüştür. (Şekil 8a) Sürekli tarama yapınca bu pikin küçüldüğü gözlenmiştir. Ama tiyofen varlığında artan anodik ve katodik pikler sırasıyla +1.5 V ve +0.3 V olduğu gözlemlendi. (Şekil 8b) Saf tiyofenin yükseltgenme ve indirgenme pikleri ise sırasıyla +1.25 V ve +0.7 V dur. (Şekil 8c) Piklerin kayması MBTA ile tiyofen arasında bir etkileşme olduğunun ispatıdır. Diğer taraftan saf polipirol ile MBTA/Py voltametrileri arasında hiç bir fark gözlenmemiştir. Bunun sebebiyse MBTA ile Pirolün oksidasyon piklerinin birbirinden çok farklı olmasıdır.



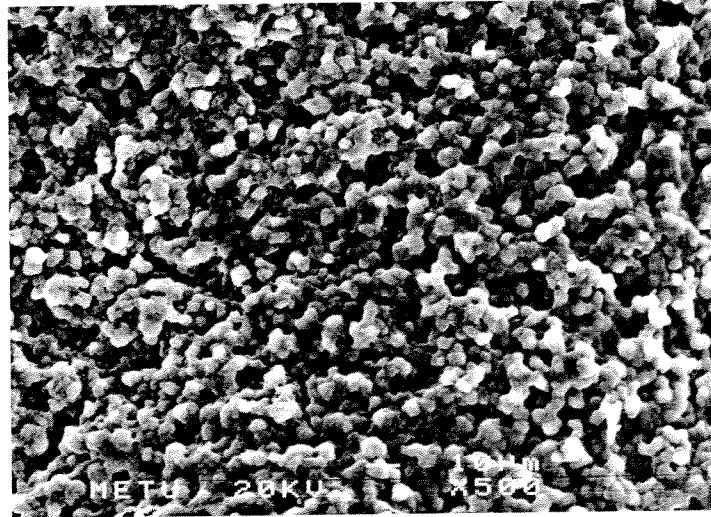
Şekil 8. Dönüşümlü Voltametri (a) MBTA, (b) MBTA+Thiophene sistemi
(c) saf tiyofen

İletkenlik ölçümleri 4-probe tekniğiyle ölçülmüştür. . Filmlerin elektrot ve çözelti yüzeyleri aynı iletkenlikte bulunmuştur. Bu sonuç ise, üretilen filmlerin homojen olduğunun göstergesidir. İletkenlik sonuçları aşağıdaki Tablo 2 de gösterilmektedir.

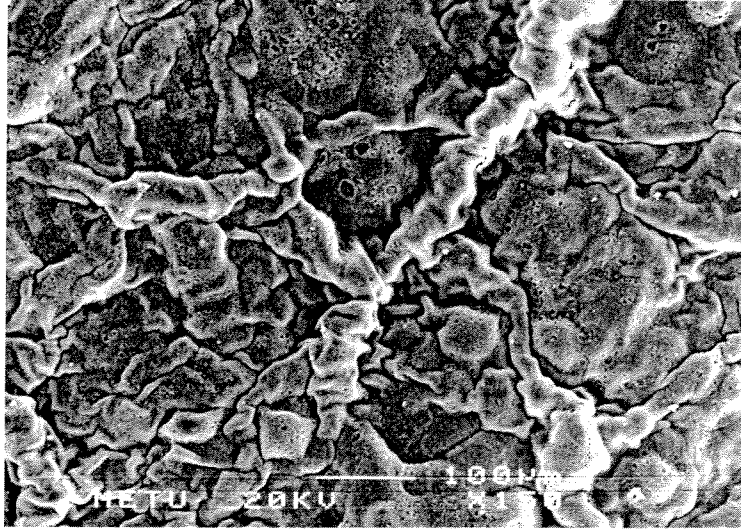
Table 2 MBTA bazlı kopolimerler filmlerinin iletkenlikleri (S/cm)

Polimer	Elektrot Yüzeyi (S/cm)	Çözelti Yüzeyi (S/cm)
PoliMBTA	8×10^{-3}	8×10^{-3}
MBTA/PTh	2×10^{-2}	6×10^{-3}
poliMBTA/PTh	1×10^{-1}	1×10^{-1}
poliMBTA/PPy1	2×10^{-1}	4×10^{-1}
poliMBTA/PPy2	3×10^{-2}	2×10^{-2}

Taramalı electron mikroskobunda (SEM) poliMBTA, poliMBTA/PPy, ve poliMBTA/PTh nin mikro yapıları incelenmiştir. PoliMBTA nın elektrode tarafları düzken, çözelti tarafı tanecikli yapıdadır. (Şekil 9) PoliMBTA/PPy nin asetonitril-TBAFB sisteminde üretilen filmlerin morfolojileri saf PPy ün karnıbahar yapısından ve poliMBTA tanecikli yapısından çok farklıdır.(Şekil 10)



Şekil 9. poliMBTA nın çözelti yüzeyinin SEM fotoğrafı



Şekil 10. poliMBTA/PPy nin çözelti yüzeyinin SEM fotoğrafı

Düşük sıcaklıkta MBTA'nın homo-polimerleşmesi sabit akım elektroliz yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Sonra poliMBTA'nın pirol veya tiyofen varlığında sabit gerilim elektroliz yöntemi ile üretilmiştir. Ayrıca, MBTA'nın tiyofenle kopolimeri sabit gerilimle elde edilmiştir. Daha sonra poliMBTA/PPy matrisinde glukoz oksidaz ve invertaz başarıyla tutuklanmıştır.

III. Uygulamalar

III. A. Enzim Tutuklanması

III. A. I. PMTM/PPy matrisinde invertase tutuklanması

Invertaz enziminin tutuklanması tiyofen ile fonksiyonlandırılmış polimer yapısında elektrokimyasal yöntemle gerçekleştirilmiştir.

Invertaz enziminin tutuklama işlemi poli (3-metil tienil metakrilat) (PMTM), politiyofen (PTh), PMTM/PPy kopolimer matrislerinde

gerçekleştirilmiştir. Enzim tutuklama işlemi, daha önceden PMTM ile önceden kaplanmış Pt elektrodu kullanılarak pirol varlığında +1.0 V da gerçekleştirilmiş, ardından aynı sistemde +0.1 V da filmler indirgenmiştir. İndirgenmiş film kaplı çalışma elektrodu enzim, destek elektrolit (SDS) içeren tampon çözelti içerisine yerleştirilmiş ve +1.0 V da enzim tutuklama işlemi gerçekleştirilmiştir. PMTM/PTh ve saf PTh kaplı elektrotlar ise asetonitril/tetrabutil amonyum tetrafloroborat sisteminde +1.9 voltda üretilmiştir. Ardından bu elektrotlar, 15 mL 0.6 mg/mL destek elektrolit (SDS) ve 0.01 M pirol içeren çözelti içerisine konulmuş ve +1.0 V da elektroliz gerçekleştirilmiştir. Elektrolizler oda sıcaklığında ve azot varlığında gerçekleştirilmiştir. Immobilizasyon işlemi tamamlandıktan enzim elektrotları distile su ve tampon çözelti ile yıkanmış ve böylelikle hapsolmemiş ama yüzeyde kalmış enzimler ortamdan uzaklaştırılmış. Enzim elektrotları 4 °C de tampon çözelti içinde saklanmıştır.

Tutuklanmış ve serbest enzimlerin aktiviteleri spektrofotometrik yöntemler kullanılarak tayin edilmiştir. Enzim elektrotları konsantrasyonu bilinen substrat çözeltisi (sakkaroz) içerisinde belirli zaman aralıklarında sabit sıcaklıkta (25 °C) tepkimeye sokulmuş ve sonuçta elde edilen çözelti arsenomolibdat ile renklendirilmiş ve renkli çözeltilerin spektrofotometrede absorbansları ölçülmüş, ve elde edilen absorbanslar aktivite (1 dakikada elde edilen ürün miktarı) cinsinden rapor edilmiştir.

Pirolün elektrokimyasal polimerleşmesi sırasında enzim molekülleri hem pirol hem de destek elektrolit tarafından taşındığı düşünülmektedir. Enzimin çalışma elektroduna taşınması sırasında hangi parametrenin ise daha belirleyici olduğunu saptamak amacıyla hazırlanan enzim elektrodlarının aktiviteleri

belirlenmiş ve pirol varlığında tutuklama işlemi gerçekleştirilen enzim elektrotlarının aktivitelerin ve tepkime hızlarının, V_{max} , daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Böylelikle enzimin çözültiden çalışma elektroduna taşınması temelde ortamdaki pirol sayesinde sağlanmaktadır.

Ayrıca polimerin indirgenmesi sırasında enzimin hapsedilmiş olduğu elektrot içeresinden ayrılmadığını ya da herhangi bir şekilde bozunmaya uğrayıp uğramadığını belirlemek amacıyla, indirgenmiş elektrotlar ve indirgenmemiş elektrotların aktiviteleri kıyaslanmış ve sonuç olarak da indirgenme işleminin herhangi bir değişime ya da aktivite kaybına yol açmadığı görülmüştür. (Tablo 3)

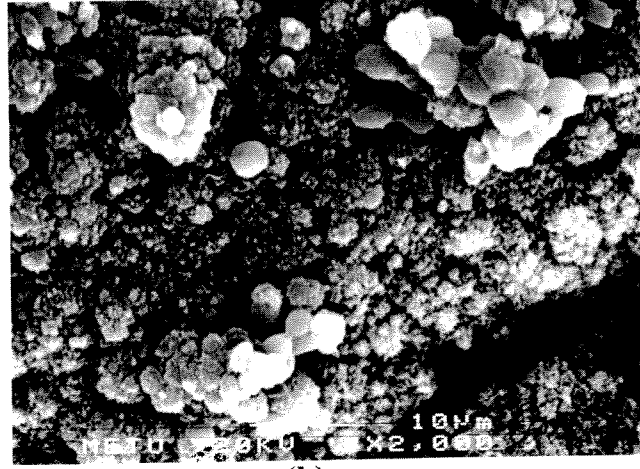
Tablo 3. PMTM/PPy/SDS ve (PMTM/PPy)/SDS sistemlerinde tutuklanmış invertaz aktiviteleri

Polimer matrisi	Aktivite ($\mu\text{mol dk}^{-1}$ elektrot)
PMTM/PPy/SDS	2.053
(PMTM/PPy)/SDS	0.188

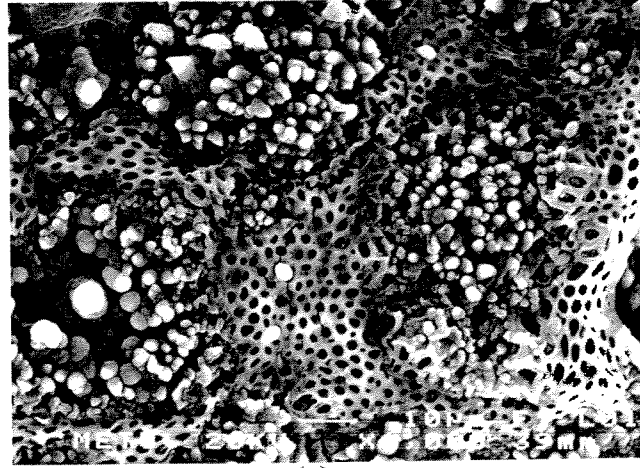
Enzim tutuklaması gerçekleştirilen polimer filmlerinin yüzey morfolojilerinin belirlenmesi amacıyla taramalı electron mikroskopi (SEM) çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Yapısında enzim hapsedilmiş polimerlerin yüzey morfolojileri tamamen değişmiş ve enzimsiz polimerlerde baskın olan “cauliflower” yapıları tamamen bozulmuş, bunların yerine yapıda enzim odacıklarının baskın olarak var olduğu gözlemlenmiştir. Buna karşın, enzim tutuklanmış filmlerin elektroda bakan taraflarında ise önemli farklılıklar gözlemlenmemiştir. (Şekil 11)



(a)



(b)



(c)

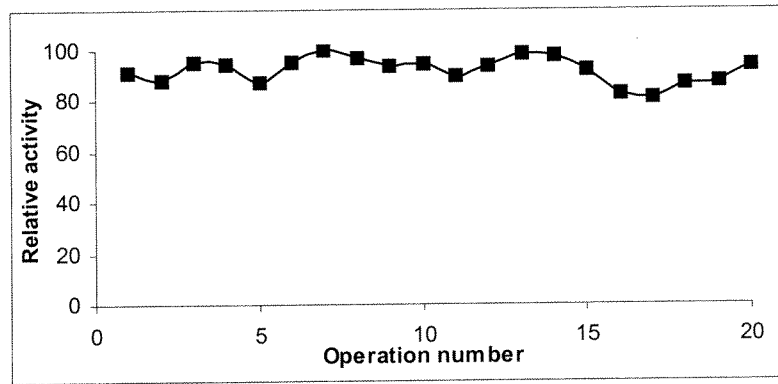
Şekil 11 Taramalı elektron mikroskop (a) EE2 nin çözelti yüzeyi (b) EE4 nin çözelti yüzeyi (c) EE3 ün çözelti yüzeyi.

Enzim elektrotlarının kinetik parametreleri, maksimum tepkime hızı (V_{max}), enzimin substrata olan ilgisi (K_m), Michaelis-Menten kinetiği kullanılarak belirlenmiştir. K_m değerlerinin aşağı yukarı aynı seviyede oldukları buna karşın PMTM/PPy elektrotların (V_{max}) değerlerinin ise diğer elektrotlara kıyasla 3-4 kat daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. (Tablo 4)

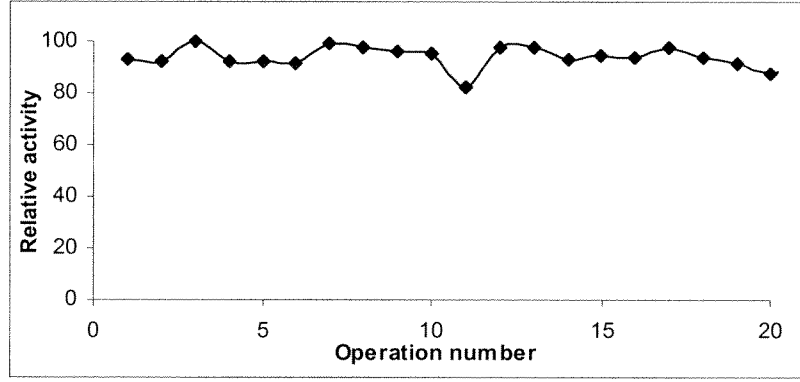
Tablo 4. Tutuklanmış invertaz enziminin kinetik parametreleri

Polymer matrisi	K_M (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol dk}^{-1}$ elektrot $^{-1}$)
(EE1) PPy/invertaz	28.2	4.17
(EE2) PMTM/PPy/SDS/invertaz	30.2	3.15
(EE3) Pt(PMTM/PPy)/SDS/inv	26.2	1.16
(EE4) Pt(PMTM/PTh)/PPy/SDS/inv	22.5	3.17
(EE5) Pt(PTh)/PPy/SDS/inv	27.3	3.88

Enzim elektrotlarının kullanım ömürlerini kıyaslamak amacıyla yapılan testlerde ise yaklaşık 20 defa aktivitelerinden önemli kayba uğramaksızın kullanılabildikleri gözlemlenmiştir. (Şekil 12)



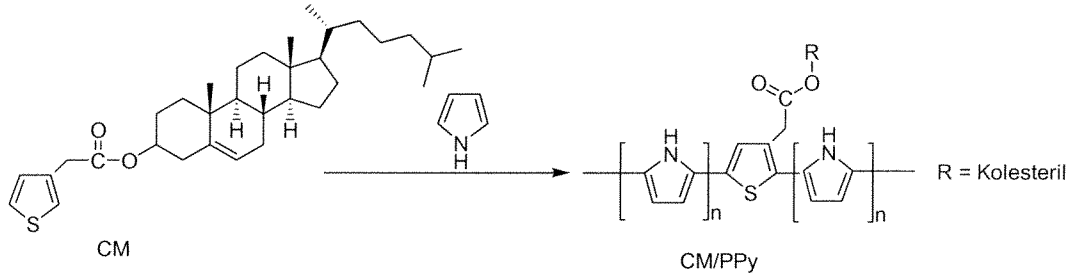
Şekil 12a. EE2 nin kullanım ömrü



Şekil 12b. EE3 ün kullanım ömrü

III. A. II. Tiyofen-3-il-asetik asid kolesteril ester (CM)/PPy kopolimer matrisinde kolesterol oksidaz tutuklanması

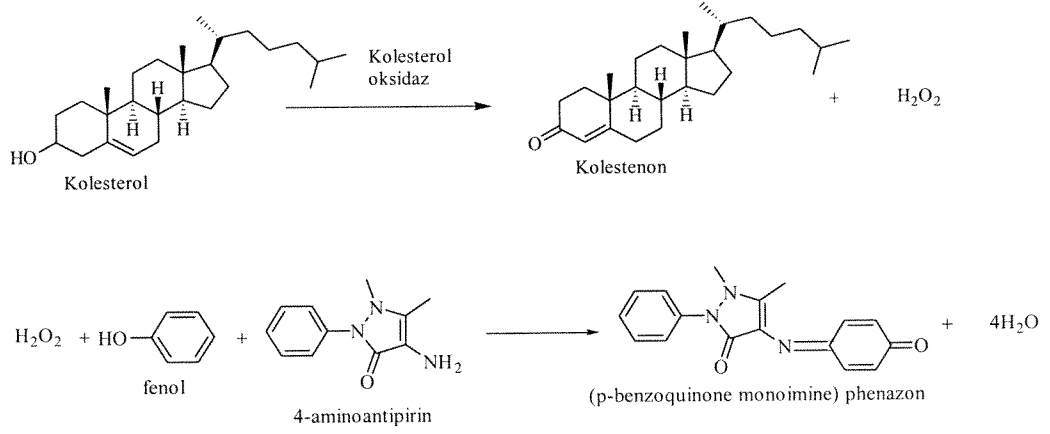
Bu çalışmada kolesterol oxidase enzimi tutuklanması için CM/PPy kopolimeri ve PPy matrisleri kullanılmıştır. CM nin pirol varlığında elektropolimerleşmesi Şekil 13 de görüldüğü gibidir.



Şekil 13. CM/PPy kopolimerinin elektrokimyasal sentezi

Elektropolimerleşme üç bölümlü hücrede, Pt çalışma ve karşıt elektrodları ve gümüş tel ise referans olarak kullanılmıştır. 0.1 M fosfat tamponu (pH=7.0) 10 mL içinde 0.2 M pirol, 6 mg mL⁻¹ PTSA (destek elektrolid), 1 mg mL⁻¹ kolesterol oksidaz (COD) kullanılarak tutuklama işlemi elektrokimyasal olarak yapılmıştır. CM/PPy/COD elektropolimerleşmesi için CM kaplı Pt elektrod anot olarak kullanılmıştır. Elektrolizler oda sıcaklığında azot atmosferinde +1.0 V da yapılmıştır. Tutuklama işleminden sonra çalışma elektrodları çıkarılmış ve bir kaç kez su ile yıkanmıştır destek elektrodları uzaklaştırmak için. Daha sonra aynı elektrot fosfat tamponunda 10 dakika bekletilir ve sonra çözeltinin enzim aktivitesi incelenir tutuklanmayan enzimleri ortamdaki uzaklaştırmak için. Bu işlem fosfat tamponunda aktivitesi görünmeyene kadar devam eder. Enzim tutuklanmış elektrodlar kullanılmadıkları zaman fosfat tamponunda 4 °C saklanırlar.

Tutuklanmış ve serbest enzimlerin aktiviteleri spektrofotometrik yöntemler kullanılarak tayin edilmiştir. Enzim elektrotları konsantrasyonu bilinen substrate çözeltisi (kolesterol) içerisinde belirli zaman aralıklarında sabit sıcaklıkta (25 °C) tepkimeye sokulmuş ve sonuçta elde edilen çözelti fenol ve 4-aminoantipirin ile renklendirilmiş ve renkli çözeltilerin spektrofotometrede absorbanları ölçülmüş, ve elde edilen absorbanlar aktivite (1 dakikada elde edilen ürün miktarı) cinsinden rapor edilmiştir. Tepkimeleri Şekil 14 de görüldüğü gibidir.



Şekil 14. Kolesterolün renklendirilme reaksiyonları

Enzim elektrotlarının kinetik parametreleri, maksimum tepkime hızı (V_{max}), enzimin substrata olan ilgisi (K_m), Michaelis-Menten kinetiği kullanılarak belirlenmiştir. K_m değerlerinin aşağı yukarı aynı seviyede oldukları buna karşın serbest enzimlerin (V_{max}) değerleri ise diğer elektrotlara kıyasla 100 kat daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. (Tablo 5) Enzimler dar bir alana hapsoldüklerinden için genellikle hızlarında önemli kayıplar olmaktadır. Sebebi ise hapsolan enzimlerin, serbest enzimlerden çok farklı bir mikro çevreye sahip olmalarındandır. Bu farklı çevrede fiziksel ve kimyasal karakterinin değişmesine yol açar. Bunun sonucunda da enzimlerin substrate çözeltisi ile buluşması zorlaşır bu da hızın azalmasına yol açar.

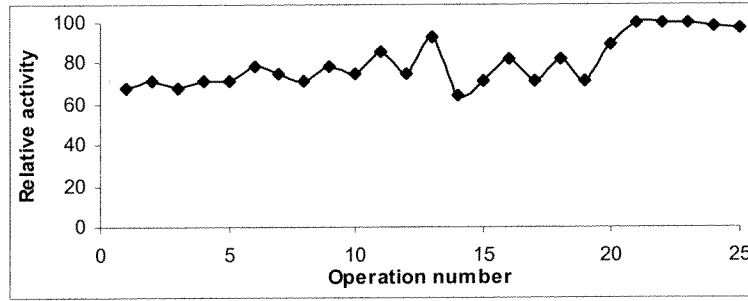
Tablo 5. Serbest ve tutuklanmış COD'un kinetik parametreleri

	V_{max}	K_M (mol L ⁻¹)
Free COD	3.0×10^{-1} ^a	2.6×10^{-4}
PPy/PTSA/COD	4.0×10^{-3} ^b	8.2×10^{-5}
CM/PPy/PTSA/COD	7.0×10^{-3} ^b	7.8×10^{-5}

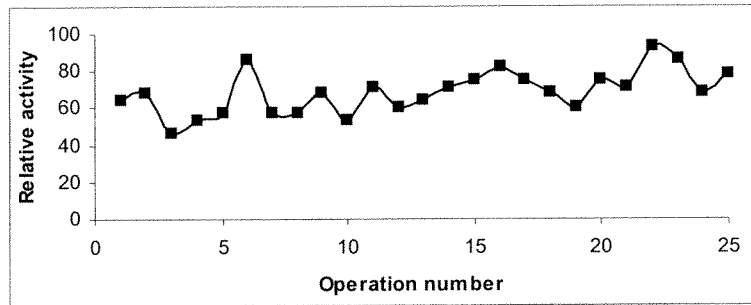
^a μ mol dk⁻¹mL⁻¹

^b μ mol dk⁻¹elektrot⁻¹

Enzim elektrotlarının kullanım ömürlerini kıyaslamak amacıyla yapılan testlerde ise yaklaşık 25 defa aktivitelerinden önemli kayba uğramaksızın kullanılabilir oldukları gözlemlenmiştir. (Şekil 15)

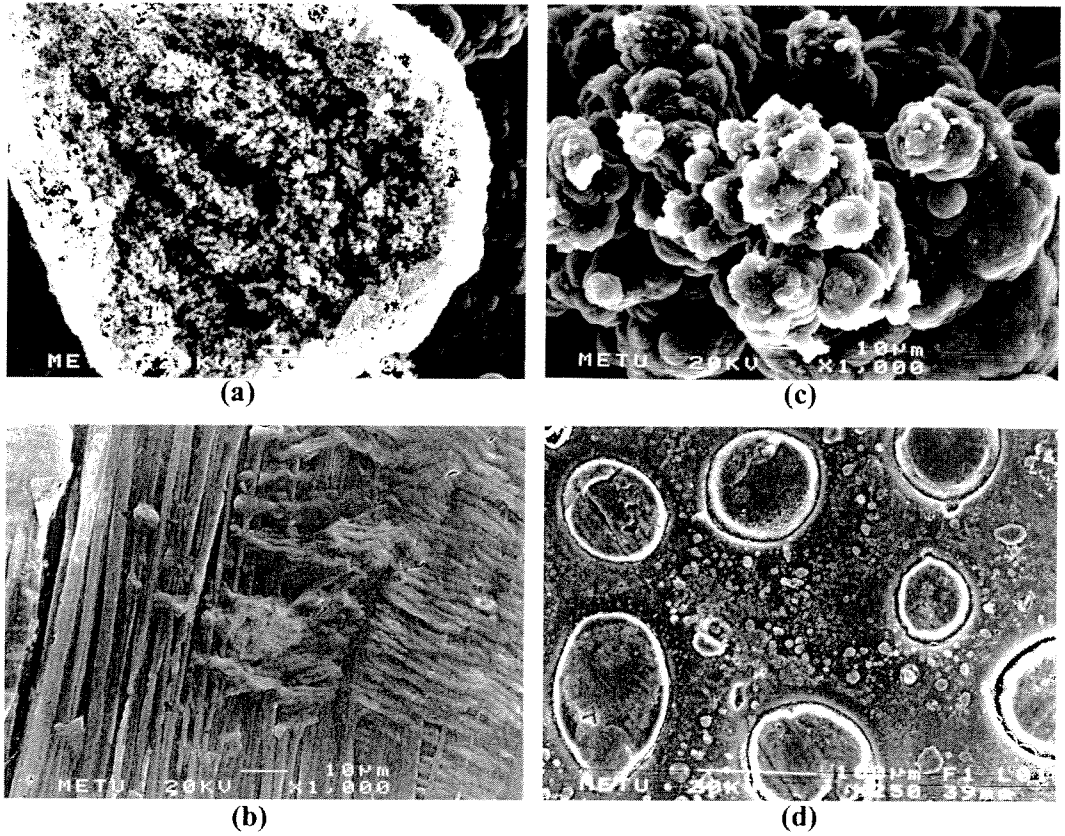


Şekil 15a. PPy/PTS/COD elektrodunun kullanım ömrü



Şekil 15b. CM/PPy/PTS/COD elektrodunun kullanım ömrü

Taramalı elektron mikroskobu ile yüzeyleri incelenerek COD enziminin ne gibi yüzey farklılıklarına yol açtığına bakılmıştır. Filmler analiz edilmeden önce yıkanmasının sebebi hapsolmayan enzimlerin ortamdan uzaklaştırılmasıdır. Bu filmlerin yüzey morfolojileri, COD'suz üretilen filmlerle karşılaştırıldığında da çok farklıdır. Filmlerin çözelti taraflarında görülen karnıbahar yapısının ciddi biçimde COD'la tahrip olduğu gözlenmiştir.(Şekil 16)



Şekil 16. Taramalı Elektron Mikroskopun

(a) PPy/PTSA/COD filminin çözelti yüzeyi

(b) PPy/PTSA/COD filminin elektrot yüzeyi

(c) CM/PPy/PTSA/COD filminin çözelti yüzeyi

(d) CM/PPy/PTSA/COD filminin elektrot yüzeyi

İletken PPy ve CM/PPy matrislerinde COD'un başarılı bir şekilde hapsolması gerçekleştirilmiştir. Enzim elektrodunun kinetik parametreleri, kullanım ömürleri ve yüzey morfolojileri incelenmiştir. Bu çalışma da monomerde kolesteril grubunun olması enzim aktivitesini etkilemediği gözlenmiştir.

IV. Literatür

1. S.Alkan,L.Toppare,Y.Hepuzer,Y.Yağcı.J.Polym.Sci.PartA:Polym. Chem, 37, 4218, (1999).
2. S. Alkan, L. Toppare, Y. Yağcı, Y. Hepuzer, J. Biomater. Sci., Polym. Ed., 10, 1233, (1999).
3. S. Alkan, L. Toppare, Y. Yağcı, Y. Hepuzer, Synth. Met., 123, 95, (2001).
4. Z. Balcı, U. Akbulut, L. Toppare, U. Bakır, Y. Yağcı J. Macr. Sci, Pure and App. Chem., A39(3), 183, (2002).
5. C.Bongiovanni, T.Ferri, A.Poscia, M. Varalli, R. Santucci, A.Desideri, Bioelectrochemistry, 54, 17, (2001).
6. L.Charpentier, N. El. Murr, Anal.Chim.Acta, 318, 89, (1995).
7. A.L.Crumbliss, J.G.Stonehuerner, R.W. Henkens, Biosens.Bioelectron., 8, 331, (1993).
8. A.F. Diaz, J.I. Castillo, T.A. Logan, W.J. Lee, J. Electroanal. Chem., 129, 115, (1981).
9. R.Erginer, L.Toppare, S.Alkan,U.Bakır, Reactive and Funtional Polm., 45(3), 227, (2000).
10. K.V.Gobi, F.Mizutani, Sensors and Actuators B, 4062, 1, (2001).
11. C. E. Hall, D. Datta and E. A. H. Hall, Anal. Chim. Acta, 323, 87, (1996).
12. N. Kızılyar, M.Y. Özden, L.Toppare, Y.Yağcı ,Synth. Met.,104, 45, (1999).
13. N. Kızılyar, L.Toppare, A.Önen, Y.Yağcı , Polym. Bull., 40, 639, (1997).
14. A. Kumar, R. Malhotra, B. D. Malhotra, S. K. Grover, Anal. Chim. Acta., 414, 43, (2000).
15. R.C.D. Peres, M.A. DePoli, J. Power Sources, 40, 299, (1992).

16. N. G. Patel, S. Meier, K. Cammann and G.-C. Chemnitz, *Sensors and Actuators B*, 75, 101, (2001).
17. J. Pellegrino, R. Radebaugh, B.R. Mattes, *Macromolecules*, 29, 4985, (1996).
18. F.Selampınar, U.Akbulut, M.Y. Özden, L.Toppare, *Biomaterials*, 92, 1163, (1997).
19. F.Selampınar, U.Akbulut, T.Yılmaz, A.Güngör, L.Toppare, *J. Polym.Sci., Polym.Chem.*, 35, 3009, (1997).
20. S. Tirkeş, L. Toppare, S. Alkan, U. Bakır, A. Önen, Y. Yağcı *Int J. Bio. Macr.*, 30, 81, (2002).
21. H.L.Wang, L.Toppare, J.E. Fernandez, *Macromolecules*, 23, 1053, (1990).

V. TBAG-2221 Kapsamında Yapılan Bilimsel Yayınlar

1- Conducting Graft Copolymers of Poly (3-methylthienyl methacrylate) with Pyrrole and Thiophene

A. ÇIRPAN, S. ALKAN , L. TOPPARE , Y. HEPUZER , Y. YAĞCI

J. Poly. Sci.: Part A: Poly. Chem., 2002, 40, 4131.

2- Immobilization of invertase in conducting copolymers of 3-methylthienyl methacrylate

A. ÇIRPAN, S. ALKAN , L. TOPPARE , Y. HEPUZER , Y. YAĞCI

Bioelectrochemistry, (in press) (2003).

3- Immobilization of cholesterol oxidase in conducting copolymer of thiophene-3-yl acetic acid cholesteryl ester with pyrrole

A.ÇIRPAN, S. ALKAN, L. TOPPARE, I. CIANGA, Y. YAĞCI

Design Mon.Polym. (accepted) (2003).

4- Synthesis and characterization of conducting copolymers of (S)-2-methylbutyl 2-(3-thienyl)acetate with pyrrole and thiophene

A.LEVENT, L. TOPPARE, I. CIANGA, Y. YAĞCI

Macr. Chem. Phys. (submitted) (2003).

5- Immobilization of invertase and glucose oxidase in poly 2-methylbutyl-2-(3-thienyl) acetate / polypyrrole matrices

S. IŞIK, S. ALKAN, L. TOPPARE, I. CIANGA, Y. YAĞCI

Eur. Poly. J. (submitted) (2003).

1- Proje No : TBAG 2221 (102T116)
2- İlgili Araştırma Grubu : Temel Bilimler
3- Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri : Başlangıç: 01/04/2002 Bitiş: 01/04/2005
4- Projenin Adı : Enzimlerin çeşitli iletken polimer matrislerinde tutuklanması ve sensör olarak kullanımları
5- Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar : Prof. Dr. Levent Toppare, Ali Çırpan ve Anıl Levent
6- Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi : ODTÜ Kimya Bölümü 06531 Çankaya/Ankara
7- Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi : TÜBİTAK
8- Özet (Abstract) : ÖZET Çeşitli tiyofen fonksiyonlu yalıtkan polimerlerin ve monomerlerin, pirol ve tiyofen ile elektrokimyasal olarak polimerleştirme çalışmaları yapıldı. Bunun sonucunda yalıtkan polimerlerin ve monomerlerin pirol veya tiyofen ile kopolimerleri elde edildi. Ayrıca elektrokimyasal olarak üretilen polialkil tiyofenler enzim tutuklama matrisi olarak kullanıldı. Tekrarlanabilir, uzun süreli kullanılabilir özellikte ve performansından ödün vermeksizin iletken kopolimer matrislerinde tutuklanmış enzim elektrotları üretildi. Bu elektrotlar kullanılarak kolesterol tayininde kullanılacak biyosensör dizayn edilecektir. Polipirol ve politiyofen ile üretilmiş iletken kopolimerlerin enzim tutuklama matrisi olarak kullanıldı. Enzimin iletken polimer matrisi içerisinde elektropolimerizasyon yöntemi ile başarılı bir şekilde tutuklanması için bir yöntem geliştirildi. Farklı destek elektrolit ya da farklı monomerler kullanarak yapılan elektropolimerizasyonlarda yeni özellikler elde edilmiştir.

Elektropolimerizasyon yöntemi enzim tutuklanmasında çeşitli avantajlara sahiptir; (a) film kalınlığının kontrollü bir şekilde ayarlanması (b) tek basamaklı kolay bir yöntem olması (c) çok tabakalı yapı oluşturulabilmesi gibi. Yöntem çeşitliliklerinin biyoaktivite mekanizması, yapı özellikleri üzerine etkileri araştırıldı. Enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu, zaman, pH, sıcaklık, tepkime ürünleri ve diğer çevresel koşulların biyoaktivite üzerine etkisi gözlemlenerek uygun parametreler tespit edildi. Enzim içeren bir çözeltide monomerin oksidasyonu sonucunda elektrokimyasal olarak polimerleşmesi alternatif tutuklama yöntemlerinden biridir. Diğer tutuklama yöntemleriyle kıyaslandığında, elektrokimyasal yöntem çabuk sonuç vermesi, farklı monomer ve destek elektrolit kullanılarak yepyeni özellikler taşıyan sistemler oluşturma kolaylığı, tek aşamalı oluşu enzimin aktivitesini kaybetmeksizin sulu sistemlerde kolaylıkla uygulanabilirliği gibi üstünlükler sağlamaktadır. Filmlerin yüzeysel morfolojileri Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) kullanılarak incelendi.

ABSTRACT

Electrochemical polymerization of pyrrole and thiophene through the thiophene moieties of several insulating polymers and monomers (their polymers) were performed. As a result, copolymers of insulating polymers and monomers with pyrrole or thiophene were achieved. Immobilization of several enzymes in conducting copolymer matrices achieved by electropolymerization method. The enzyme electrode should have repetitive and prolonged use without reduction in efficiency and performance. The objective of the proposed research is to synthesize conducting copolymers constituting polypyrrole and polythiophene as matrices for the immobilization of enzymes. These monomers were polymerized by constant current and constant potential electrolyses methods. Immobilization of the enzyme occurred in-situ during copolymerization. We have developed a process that successfully incorporates

enzymes into conducting copolymer matrices by electropolymerization. Electropolymerization is an efficient enzyme immobilization method used in biosensor development. Conducting copolymers of polythiophene or polypyrrole can be grown electrochemically on an electrode surface, and it is demonstrated that electrochemical polymerization is an easy and attractive approach for the immobilization of enzymes at electrode surface. Some of these electropolymers can also serve as mediator, decreasing the work potential and thereby avoiding interference from other species. Often, the thickness of the growing polymer film is controlled by measuring the charge transferred during the electrochemical polymerization process. The main advantages of entrapment of enzymes into conducting polymer films during the electrochemical polymerization process are the extremely simple one-step procedure and the control of the spatial distribution of the immobilized enzyme. The effects of process variables on the structure, properties and mechanism of bioactivity were determined. It was desirable to monitor the retention of bioactivity over a wide range of time, temperature and other environmental conditions. The surface morphologies of the films were investigated by using Scanning Electron Microscopy(SEM).

9- Anahtar Kelimeler :

Enzim tutuklama, elektrokimyasal polimerleşme, iletken polimerler

10- Projede Yapılan Çalışmaların Sonuçları ile İlgili Yayınlar (makale, tebliğ) :

1- Conducting Graft Copolymers of Poly (3-methylthienyl methacrylate) with Pyrrole and Thiophene

A. ÇIRPAN, S. ALKAN , L. TOPPARE , Y. HEPUZER , Y. YAĞCI
J. Poly. Sci.: Part A: Poly. Chem., 2002, 40, 4131.

2- Immobilization of invertase in conducting copolymers of 3-methylthienyl methacrylate

A. ÇIRPAN, S. ALKAN , L. TOPPARE , Y. HEPUZER , Y. YAĞCI
Bioelectrochemistry, (in press) (2003).

3- Immobilization of cholesterol oxidase in conducting copolymer of thiophene-3-yl acetic

acid cholesteryl ester with pyrrole

A.ÇIRPAN, S. ALKAN, L. TOPPARE, I. CIANGA, Y. YAĞCI
Design Mon.Polym. (accepted) (2003).

4- Synthesis and characterization of conducting copolymers of (S)-2-methylbutyl 2-(3-thienyl)acetate with pyrrole and thiophene

A.LEVENT, L. TOPPARE, I. CIANGA, Y. YAĞCI
Macr. Chem. Phys. (submitted) (2003).

5- Immobilization of invertase and glucose oxidase in poly 2-methylbutyl-2-(3-thienyl) acetate / polypyrrole matrices

S. IŞIK, S. ALKAN, L. TOPPARE, I. CIANGA, Y. YAĞCI
Eur. Poly. J. (submitted) (2003).

11- Proje Sonuçlarının Gizlilik Durumu :

Gizli

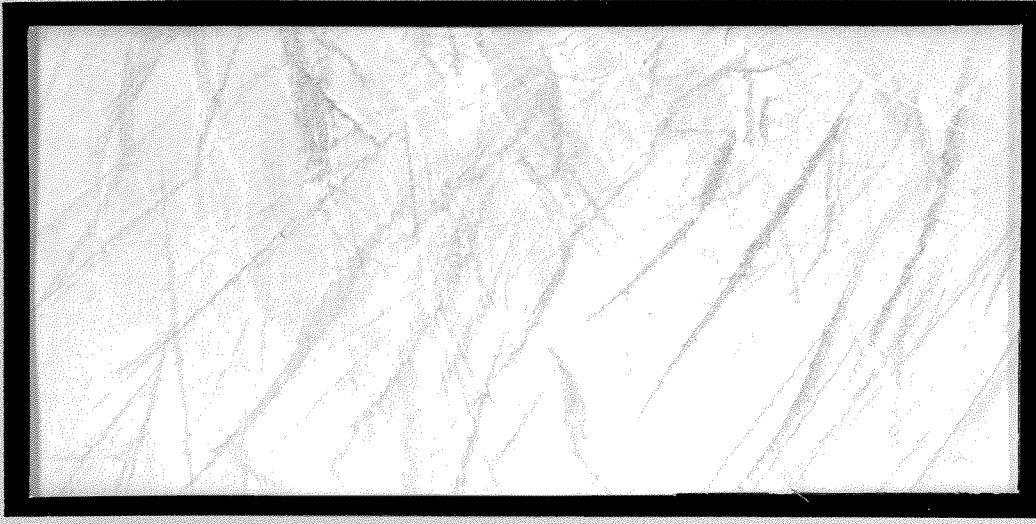
Gizli Değil

2003 - 153



TÜRKİYE BİLİMSEL VE
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY



- Temel Bilimler Araştırma Grubu
Basic Sciences Research Grant Committee