

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PLATİN NANOPARTİKÜL KAPLI İNDİRGENMİŞ
GRAFEN OKSİTİN
BİYOSENSÖR UYGULAMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bilge AKKAYA

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Mahmut ÖZACAR

Mart 2018

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PLATİN NANOPARTİKÜL KAPLI İNDİRGENMİŞ GRAFEN
OKSİTİN
BİYOSENSÖR UYGULAMASI

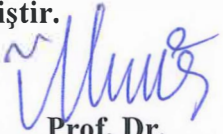
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bilge AKKAYA

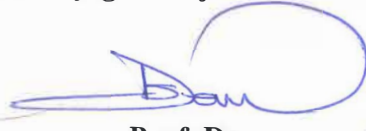
Enstitü Anabilim Dalı

KİMYA

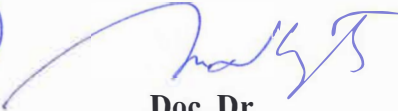
Bu tez 07.02.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği / oyçokluğu ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr.
Mahmut ÖZACAR

Jüri Başkanı


Prof. Dr.
Sibel ZOR

Üye


Doç. Dr.
Mehmet NEBİOĞLU

Üye

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Bilge AKKAYA

07.02.2018

TEŐEKKÖRLER

Yüksek lisans eğitimin boyunca değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım tecrübelerini esirgemeyen tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Mahmut ÖZACAR'a sonsuz teşekkür ederim.

Her konuda araştırmanın planlanmasından yazılmasına kadar tüm aşamalarında yardımlarını esirgemeyen aynı zamanda titizlikle beni yönlendiren Arş. Gör. Bekir ÇAKIROĞLU'na teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmamda manevi katkılarını hep yanımda hissettiğim ailemle ve çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen babam İbrahim AKKAYA, eniştem Abdurrahman ERKİL ve arkadaşım Serkan BAŐARAN'a teşekkür eder, destek ve emeklerinden dolayı sonsuz saygı ve hürmetlerimi sunarım.

Ayrıca bu çalışmanın maddi açıdan desteklenmesine imkan sağlayan Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) komisyon Başkanlığına (Proje No: 2017-50-01-079) teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ÖZET.....	ix
SUMMARY.....	x
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.	
ENZİMLER VE ENZİM İMMOBİLİZASYONU.....	3
2.1. Enzimler.....	3
2.2. Enzimlerin Sınıflandırılması.....	4
2.2.1. Oksidoredüktazlar.....	4
2.2.2. Transferazlar.....	4
2.2.3. Hidrolazlar.....	4
2.2.4. Liyazlar.....	5
2.2.5. Lipazlar.....	5
2.2.6. İzomerazlar.....	5
2.3. Glukoz Oksidaz Enziminin Özellikleri ve Glikoz Tayininin Önemi	5
2.4. Enzim İmmobilizasyonu.....	7
2.5. Enzim İmmobilizasyonunun Avantajları.....	8
2.6. İmmobilizasyon Yöntemleri.....	8
2.7. Geri Dönüşümsüz İmmobilizasyon Yöntemleri.....	9

2.7.1. Kovalent bağ oluşturulması.....	9
2.7.2. Çapraz bağlama yöntemleri.....	10
2.7.3. Tutuklama yöntemleri.....	12
2.7.4. Taşıyıcıya bağlama yöntemi.....	12
BÖLÜM 3.	
BİYOSENSÖRLER.....	14
3.1. Biyosensörün Tarihçesi.....	14
3.2. Biyosensörün Sınıflandırılması.....	16
3.2.1. Enzim biyosensörleri.....	16
3.2.2. Doku biyosensörleri.....	18
3.2.3. Elektrokimyasal biyosensörler.....	18
3.2.3.1. Amperometrik/Volimetrik biyosensörler.....	18
3.2.3.2. Potansiyometrik biyosensörler.....	19
3.2.4. Optik biyosensörler.....	20
3.2.5. Kalorimetrik biyosensörler.....	21
3.2.6. Piezoelektrik biyosensörler.....	22
BÖLÜM 4.	
GRAFEN OKSİT VE Pt NANOPATİKÜLLERİN SENTEZİ.....	23
4.1 Grafen ve Grafen Oksit Sentezi	24
4.2. Pt Nanopartiküllerin Sentezi.....	24
BÖLÜM 5.	
DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	26
5.1. Giriş.....	26
5.2. Materyal ve Metodlar.....	27
5.3. Pt Nanopartikülleri Kaplı İndirgenmiş Grafen Oksit Nanokompozit Sentezi.....	28
5.4. iGO-Pt Np-GO _x ile Modifiye Edilmiş CKE'nin Hazırlanması.....	29
5.5. iGO-Pt Np-GO _x /CKE Elektrodun PNIPAAm ile Kapsaması.....	29

BÖLÜM 6.

ARAŞTIRMA BULGULARI.....	30
6.1. Elektrotların Hazırlanması ve TA ile Elektron Transeri	31
6.2. GO _x 'in iGO-Pt/CKE Üzerindeki Elektrokimyası.....	33
6.3. Pt Np-iGO/CKE Tabanlı Glikoz Biyosensörünün Performansı	36
6.4. Biyolojik Arayüzey ile Acılıp kapanabilir Biyosensörünün Performansı.....	39
6.5. Tekrarlanabilir Modifiye Elektrodun Stabilitesi.....	42
6.6. İnsan Serumunda Glikoz Analizi Çalışması.....	43

BÖLÜM 7.

TARTIŞMA VE GENEL DEĞERLENDİRME.....	43
KAYNAKLAR.....	44
ÖZGEÇMİŞ.....	47

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

AT	Asetat tamponu
CKE	Camsı karbon elektrodu
DV	Dönüşümlü voltametri
DKV	Diferansiyel kesikli voltametri
E^0	Potansiyel
EES	Elektrokinyasal empedans spektroskopisi
E_{pa}	Pik Potansiyeli
E.Ü	Enzim ünitesi
FAD	Flavin adenin dinükleotid
FT	Fosfat tamponu
FTIR	Fourier kızılötesi dönüşüm
GSS	Geçerli standart sapma
GO_x	Glikoz oksidaz
I_{pa}	Anodik pik akımları
I_{pc}	Katodik pik akımları
K_m	Michaeli-Menten sabiti
LCST	Düşük kritik çözelti sıcaklığı
M_A	Molekül Ağırlığı
μm	Mikrometre
N_p	Nanopartikül
iGO	İndirgenmiş grafen oksit
R_{ct}	Elektron transfer direnci
TEM	Tünellemeli elektron mikroskobu
UV	Morötesi görünür bölgesi
ÜNB	Üçüncü nesil biyosensör
XRD	X-ışını kırınım bölgesi

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Glukozun yapısı.....	1
Şekil 2.1.	Glukoz oksidaz enziminin katalizlediği reaksiyon.....	6
Şekil 2.2.	Glukoz oksidaz enziminin yapısında bulunan FAD grubu.....	7
Şekil 2.3.	Geri dönüşümsüz enzim immobilizasyonu.....	9
Şekil 2.4.	Enzimin desteğe immobilizasyonu.....	10
Şekil 2.5.	Glutealdehit ile çapraz bağlanma.....	11
Şekil 2.6.	Çapraz bağlama ile enzim immobilizasyonu.....	11
Şekil 2.7.	Enzimin bir taşıyıcıyı içerisinde tutuklanması.....	12
Şekil 2.8.	Enzimin taşıyıcıya bağlanması.....	13
Şekil 3.1.	Biyosensörün şematik olarak gösterimi.....	15
Şekil 3.2.	Enzim biyosensörünün genel çalışma ilkesi.....	17
Şekil 3.3.	Potansiyometrik biyosensörün gösterimi.....	20
Şekil 3.4.	Optik biyosensörlerin şematik olarak gösterimi.....	21
Şekil 3.5.	Kalorimetrik biyosensörlerin gösterimi.....	21
Şekil 3.6.	Piezoelektrik biyosensörün gösterimi.....	22
Şekil 4.1.	Hummer metodu ile GO _x sentezi.....	24
Şekil 5.1.	TGM'nin şematik gösterimi ve glikozun biyolojik olarak algılanması için açma-kapama biyosensörü.....	29
Şekil 6.1.	(A) iGO'nun TEM görüntüsü, (B)IR spektrumları, (C) Grafitin TGA eğrileri, (D)GO, iGO, iGO-Pt Np zeta potansiyelleri.....	32
Şekil 6.2.	(A) Oksijenleştirilmiş GO _x /GCE, (B)Çözeltinin CV yanıtların üzerindeki pH etkileri, (C) iGO-Pt Np-GO _x /GCE CV'nin tepkileri üzerindeki tarama hızı etkisi, (D) DPV tekniği kullanarak yapılan glikoz ölçümleri.....	34

- Şekil 6.3. (A) iGO-Pt Np-GO_x/GCE'nin CV eğrileri, (B)Glikoz konsantrasyon grafiğine karşı katodik tepe akımı, (C)PNIPAAm-iGO-Pt Np-GO_x/GCE'nin CV konsantrasyonları, (D)Açma-kapama biyosensörü için glikoz konsantrasyon grafiğine karşı katodik tepe akımı..... 37
- Şekil 6.4. PNIPAAm-iGO-Pt Np-GO_x'in (A)UV-vis spektrumları, (B)Nyquist grafiği, (C)Farklı sıcaklık ve pH değerlerindeki CV tepkileri, (D)İki farklı değeri arasında amperometrik akıların bağımlılığı..... 41



TABLULAR LİSTESİ

Tablo 6.1. Glikoz tayini için literatürde bildirilen iGO-Pt Np-GOx/CKE ve diğer direkt electron transfer temelli biyosensörlerin karşılaştırılması.....	39
---	----



ÖZET

Anahtar Kelimeler: Pt nanopartikülleri, Grafen oksit, Tannik asit, glikoz oksidaz, biyosensör

Bu tez çalışmasında, Platin nanopartikülleri (Pt Np) kaplı ve tannik asit ile indirgenmiş grafen oksit nanokompozitinin modifiye camısı karbon elektrotta kaplanması ve glikoz oksidazın direkt elektron transfer reaksiyonuna dayalı yeni bir biyosensör geliştirilmiştir. GO ve Pt⁴⁺ indirgenmesi, doğal indirgeyici tannik asit (TA) kullanılarak kolay ve düşük maliyetli bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Glukoz oksidaz (GOx), nanokompozit kaplı elektrot üzerine immobilize edilmiştir. TA'in kimyasal ve elektrokimyasal olarak kinonlara oksitlenmesi üzerine geliştirilmiş elektron transferi elde edildi ve üçüncü nesil bir biyosensör, indirgenmiş grafen oksit (iGO) ve TA arasındaki π - π etkileşimi ve GOx -TA etkileşimleri arasındaki Schiff baz bağı destekli hidrojen bağı kullanılarak elde edilmiştir. GOx-iGO-Pt Np/GCE'nin redoks pikleri, 56 mV'luk bir tepe ayrımı (ΔE_p) ile -0.462'luk bir formal potansiyelde açıkça gözlenmiş ve GOx ile modifiye edilmiş elektrot arasında direkt elektron transferinin olduğu gözlenmiştir. Modifiye edilmiş elektrot, 1.21 μ M'luk bir ölçüm limiti ve 27.51 μ Am/Mcm²'lık bir duyarlılıkla 2 ila 10 mM'luk glukoz yükseltgenmesine doğrusal tepki gösterdi. Pt Np kaplanması, indirgeme akımı üzerinde sinerjik etki göstererek duyarlılık değerini arttırmış ve elde edilen biyosensör, düşük çalışma potansiyeli nedeniyle üstün bir seçicilik göstermiştir. Elde edilen biyosensör kullanılarak içeceklerde glukozun miktarı belirlenmiştir.

BIOSENSOR APPLICATION OF THE PLATINUM NANOPARTICLE COATED REDUCED GRAPHENE OXIDE

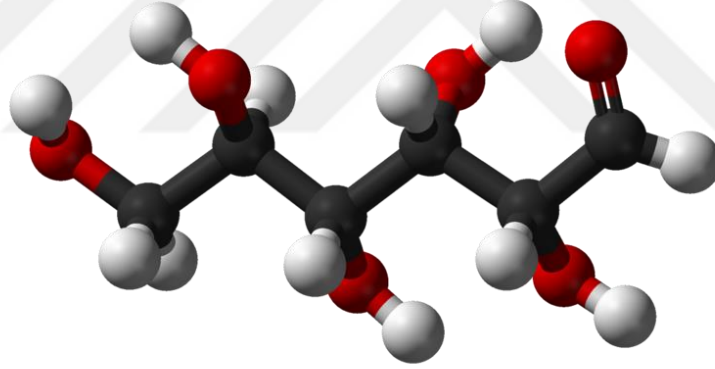
SUMMARY

Keywords: Pt nanoparticles, graphene oxide, tannic acid, glucose oxidase, biosensor

In this study, we reported a novel biosensor based on direct electron transfer reaction of glucose oxidase at Pt nanoparticles deposited and tannic acid-reduced graphene oxide nanocomposite modified glassy carbon electrode. GO and Pt⁴⁺ reduction were carried out in a facile and low-cost way by using natural reducing agent, TA. GOx was immobilized on the nanocomposite drop-casted electrode. Upon the oxidation of TA to quinone chemically and electrochemically, enhanced electron transfer was obtained, and a third generation biosensor was fabricated by using π - π interaction between graphene oxide and TA, and Schiff-base assisted hydrogen bonds between GOx-TA interactions. The redox peaks of GOx-rGO-Pt Np/GCE was clearly observed at a formal potential of -0.462 V with a peak separation (ΔE_p) of 56 mV, which reveals that the direct electron transfer has been observed between GOx and the modified electrode. The modified electrode displayed very good linear response to glucose oxidation from 2 to 10 mM with a LOD of 1.21 μ M and a sensitivity of 27.51 μ AmM⁻¹cm⁻². Pt Np deposition increased the sensitivity value by showing synergistic effect on the reduction current, and the constructed biosensor exhibited a superior selectivity owing to low working potential. The fabricated biosensor was used for the determination of glucose in beverages.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Glikoz ($C_6H_{12}O_6$, MA: 180,16), $146\text{ }^{\circ}C$ erime noktasına sahip olan altı karbondan oluşmaktadır, beyin ve hiç mitokondrisi olmayan hücrelerin enerji kaynağıdır, doğada serbest ya da birçok maddeyle birlikte bol miktarda bulunur. Ayrıca vücudumuzda, az miktarda lenf bezlerinde ve kanda bulunmaktadır. Glikoz, L ve D konformasyonlarında bulunabilmekte, fakat vücudumuzda sadece D-glikozu tanınabilmektedir. Şekil 1.1.'de gelişmiş canlı organizmaların yaşamı için önemli karbonhidrat olan glikoz'un yapısı gösterilmiştir [1].



Şekil 1.1. Glikozun yapısı [2]

Glikoz, hücrelerin enerji kaynağıdır. Bununla birlikte protein sentezinde ve lipit metaolizmasında da kullanılan bir şekerdir. Kandaki glikoz seviyesi bazı hormonlarla (insülin ve glukagon) dengede tutulmaktadır. Sağlıklı bir insanın kanındaki glikoz derişimi 4,4-6,6 mM seviyesindedir, insülin hormonunun yeterli miktarda üretilmediği durumlarda, bu derişimin üstüne çıkmaktadır [3]. Glikozun kandaki derişiminin yüksek olması diabet hastalığına yol açmaktadır. Bu hastalarda, kalp yetmezliği, sinir hasarı ve yaraların geç iyileşmesi gibi rahatsızlıklar görülebilmektedir.

Glikoz oksidaz (GOx), kan şekeri testi ve amperometrik enzim elektrotları için önemlidir. Amperometrik biyosensörün özellikleri, immobilize edilen enzimin aktif merkezi ile uygun bir çalışma potansiyelinin uygulandığı bir elektrot yüzeyi arasındaki elektron transfer sürecinin kinetiğine bağlıdır. Hızlı cevap özelliklerine sahip ve yüksek duyarlıklı amperometrik biyosensör geliştirmenin önemli koşulu, elektroda, biyobileşenden hızlı elektron transferinin olmasıdır [4].

GOx enziminde protetik grup (aktif merkez) olarak Flavin Adenin Dinükleotid (FAD) bulunmaktadır. Glikozun moleküler oksijen ile yükseltgenip glukono- δ -lakton (glukono-1,5-lakton) ve hidrojen peroksidin (H_2O_2) oluştuğu reaksiyonla katalizleyen glukoz oksidaz enzimi, sulu ortamda herhangi bir enzime ihtiyaç duymaksızın hidroliz olarak glukonik aside dönüşmektedir.

Reaksiyon aşağıdaki gibidir:



Enzim temelli elektrokimyasal biyosensörlerin geliştirilmesinde grafen ve türevleri, son zamanlarda elektronik özellikleri nedeniyle çeşitli uygulamalarda gelişmiş bir materyal olarak ortaya çıkmıştır. Grafen esaslı malzemeler, elektrik iletkenliği ve düşük maliyetle elde edilebilme özelliği ile ön plana çıkmıştır. ÜNB'in ile grafen türevlerinin elektrik iletkenliği ve biyo uyumluluğu özellikleri kullanılarak yeni nesil bir biyosensör üretilmesi sağlanmıştır [1].

BÖLÜM 2. ENZİMLER VE ENZİM İMMOBİLİZASYONU

2.1. Enzimler

Canlı hücrelerde biyokimyasal olaylar ile dış ortamdaki reaksiyonlara göre daha hızlı, düşük ısıda, belirli pH derecesinde gerçekleşmesini sağlayan biyolojik katalizör olan enzimlerdir [5].

Enzimler; hücrelerde organik madde sentezi, sindirimi, hücre solunumu, kas faaliyetleri gibi önemli reaksiyonları sonucunda oluşmakta ve bu reaksiyonların tümü enzimlerin katalitik etkisi ile katalizlenmektedir.

Enzimlerin miktarı, enzim ünitesi (E.Ü) ve aktivitleri esas alınarak belirlenmektedir. EÜ, genelde optimal şartlarda 1 mikromol substratı, 1 dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

Enzimlerin en önemli özelliği, ürüne dönüştürdükleri substratlara karşı son derece spesifik olmalarıdır, bu şekilde hiçbir yan ürün oluşturmaksızın, hücre içinde reaksiyonların kusursuz bir şekilde yürümelerini sağlamaktadırlar. Enzimlerin diğer bir özelliği ise, laboratuvar ortamında gerçekleşmesi zaman alan reaksiyonların, hücre içi şartlarda birkaç saniye gibi çok kısa bir zamanda meydana gelmesini sağlamalarıdır. İnsanlar binlerce yıl öncesinden bu yana enzimlerden yararlanmışlardır. Örneğin, ekmek yapımı, alkol fermantasyonu gibi işlemler ilk biyoteknolojik çalışmalar olarak bilinmektedir. Bunun yanında, 1783 yılında Spallanzani'nin mide suyunun, eti çözebileceğini belirlemesi ve 1811 yılında Kırchoff'un buğday nişastasının zamanla dekstrin ve diğer bileşene dönüştüğünü belirlemesi, enzimoloji konusundaki ilk çalışmalar olarak gösterilmektedir [5].

2.2. Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimlerin sınıflandırılması, katalizlendikleri tepkimenin tipine göre altı ana sınıfta incelenmiştir.

2.2.1. Oksidoredüktazlar

Oksidoredüktazlar (EC, 5.3.4.1.), Bir elektronun bir molekülden (indirgendem) bir diğere (yükseltgene veya oksidana) aktarılmasını sağlayan enzimdir.

2.2.2. Transferazlar

Transferazlar (EC,2.5.1.8) bir kimyasal grubun (metil, açil, amino, glikozil veya fosfat gibi) bir molekülden bir diğere transferini katalize etmektedirler. Tavsiye edilen grup-transferazlar ya da verici gruptransferazdır [6].

2.2.3. Hidrolazlar

Hidrolazlar (EC 2.5.1.24), substratın hidrolitik olarak ester, peptid, eter, glikoz, asitanhidrit, C-C, C-N, C-O bağlarını parçalanmasını sağlarlar.

- Proteazlar: Protein ve peptitlerin hidrolizini katalizlemektedir.
- Esteraz ve Lipazlar: Ester ya da lipitleri, asit veya alkole hidroliz etmektedir.
- Karbonhidrazlar: Şekerler ya da şekerlerle alkoller arasındaki glikozid bağlarını hidroliz etmektedir.
- Fosfatazlar: Fosforik asit-ester ve anhidritleri hidroliz etmektedir.
- Amilazlar: Çeşitli amid ve peptid bağlarını hidroliz etmektedir.

2.2.4. Liyazlar

Liyazlar (EC, 4.1.99.2) hidrolizden farklı bir yolla geride çift bağ bırakarak bir grubun substrattan ayrılması ya da transferini katalize eden enzimlerdir. Su, amid ve CO₂ moleküllerini ekler veya uzaklaşmaktadır.

2.2.5. Ligazlar

Ligazlar, ATP veya diğer nükleosit trifosfat içindeki pirofosfatın hidrolizi ile eşleşmiş olan iki molekülün birleşmesini katalize etmektedir.

2.2.6. İzomerazlar

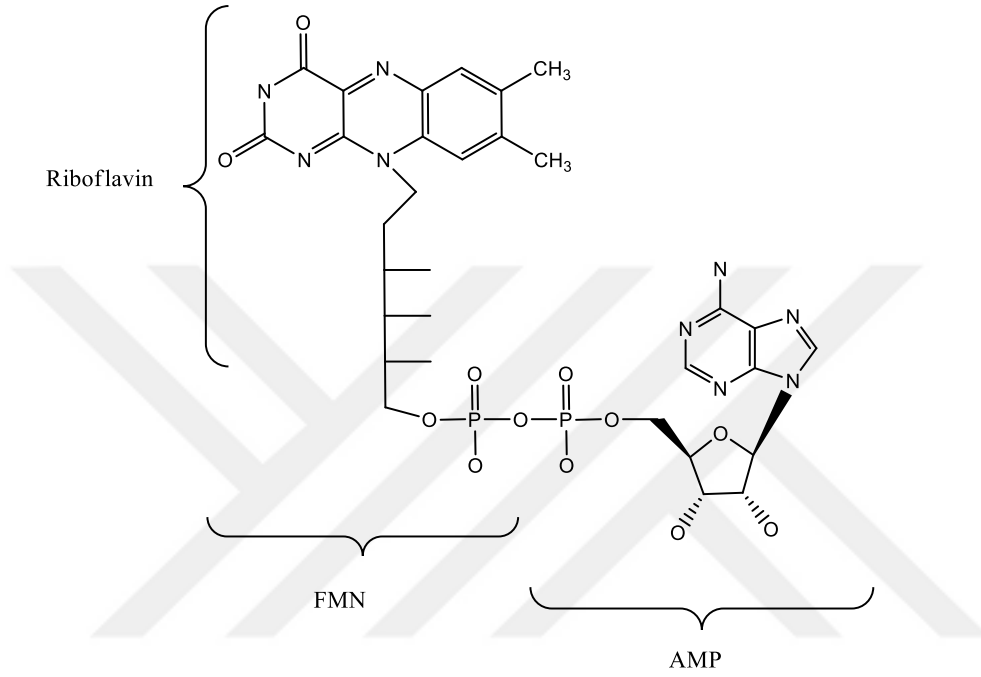
İzomerazlar bir molekülde atomların yeniden düzenlenmesini (geometrik veya yapısal anlamda) katalize etmektedir. Cis-trans izomerazlar, Rasemazlar ve epimerazlar izomerazlara örnek olarak verilebilmektedir.

2.3. Glikoz Oksidaz Enziminin Özellikleri ve Glikoz Tayinin Önemi

GOx; moleküler kütlesine bağlı olarak 120 kDa ile 290 kDa arasında çeşitlilik gösteren, dimerik veya tetramik bir proteindir. Yapısında kofaktör olarak FAD bulunmaktadır. Bir enzim molekülünde iki FAD bağlanma bölgesi bulunmaktadır. Enzim molekülünde FAD olmazsa apoenzim biyolojik aktivite göstermez, fakat apoenzim molekülüne modifiye edilmiş FAD kofaktörü bağlanabilmektedir. Enzim molekülü kaynağına ve türüne bağlı olarak %10-24 aralığında, karbonhidrat bileşimine sahiptir. Karbonhidrat birimlerinin hemen hemen % 80'i mannoz biriminden oluşmaktadır [1].

GOx enziminin aktivitesi ilk defa 1904 de Maksimow tarafından *Asperigillus Niger*'de saptanmıştır. Müller (1928), bu enzimin oksidatif reaksiyon olduğunu belirlemiştir ve

FAD'nin indirgenmesi, ribolavin molekülünden kaynaklanmaktadır. FAD elektron alıcısı gibi konularak glukoza yükseltgenmekte, ardından moleküler oksijeni indirgeyerek hidrojen peroksitine dönüştürmekte ve tekrar tekrar oksitlenmiş formuna dönüşmektedir [8].



Şekil 2.2. Glukoz oksidaz enziminin yapısında bulunan FAD grubu [1]

Günümüz uygulamalarında laboratuvar ortamında, glukoz tayinlerinde analitik reaktif olarak glukoz oksidaz çözeltisi kullanılmaktadır. Nanoteknoloji alanında bu tip biyosensör çalışmaları, ince elektrotlar geliştirildiğinden beri artış göstermektedir. Glukoz tayini, bu biyosensörleri kullanarak vücut sıvılarında, içeceklerde ve diğer bazı gıdasal ürünlerde yapılmaktadır.

2.4. Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler kimyasal reaksiyonları katalizleyen protein esaslı birleşiklerdir. Enzimler birçok defa kullanılabilirken, çözelti içinde yer alması bu durumu zorlaştırmaktadır. Bu gibi durumlarda enzim molekülünün immobilizasyonu sağlanarak ürünler alınabilmekte ve bu enzimler tekrar kullanılabilirler. Enzim

immobilizasyonu, katalitik faaliyeti süren enzimin hareketini engelleyen bir yöntemdir. Enzim immobilizasyonu, enzimin katalitik aktivitesi devam ederken, hareketinin önemli derecede kısıtlayan bir süreçtir [7].

2.5. Enzim İmmobilizasyonunun Avantajları

İmmobilizasyon ile katı destek üzerine tutulmuş bir enzimin, çözelti içerisindeki bir enzime göre avantajları çoktur;

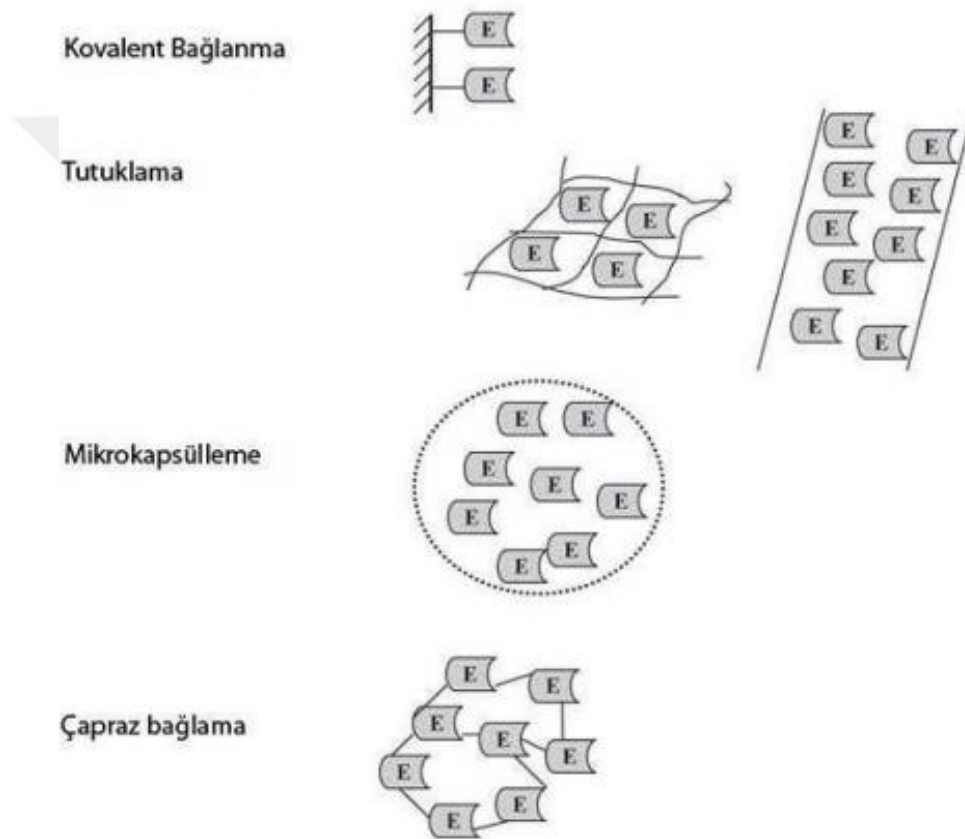
- Enzimin kararlılığını arttırmaktadır.
- Enzimin yarılanma ömrü uzamaktadır.
- Ürünün ayrılmasını kolayca sağlamaktadır.
- Ortamdan enzimin kolayca ayrılmasını sağlamaktadır.
- Sıvı miktarı azalmaktadır.
- Enzim kalıntılarının oluşan ürünlerde bulunmamasıdır. (Örneğin Gıda ve ilaç sektörleri için enzim kirleticileri içermemesi istenmektedir.)
- Sistemde sürekli bir şekilde çalışabilmektedir [8].

2.6. İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzim farklılığına göre immobilizasyon yöntemleri bulunmaktadır. Yöntem tayin edilirken; kullanılan enzimin kimyasal yapısına ve bileşimine, ürün ve substratın karakteristiğine, elde edilecek ürünün kullanılacağı alanlara bakılmalıdır. Ayrıca, immobilizasyonda, enzimin bağlanma bölgesindeki aktif gruplarını ve kimyasal yapısını değiştirmeyecek, enzimde aktivite kaybına neden olmayacak bir yöntem seçilmesi önemlidir [7].

2.7. Geri Dönüşümsüz İmmobilizasyon Yöntemleri

Bu sistemin temeli, enzimlerin taşıyıcıyla kompleks oluşturmasının akabinde biyoaktivitelerini kaybetmemesi esasına dayanır. Dönüşümsüz immobilizasyona örnek olarak kovalent bağlanma, tutuklama, mikrokapsülleme ve çapraz bağlama olarak verilebilir. Bu yöntemlerin şematik gösterimi Şekil 2.3.'deki gösterilmiştir.

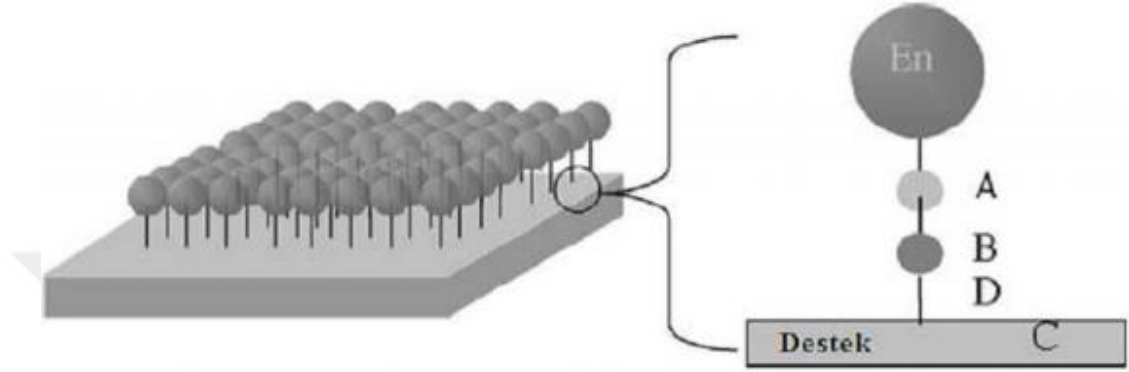


Şekil 2.3. Geri dönüşümsüz enzim immobilizasyonu [7]

2.7.1. Kovalent bağlama

Bu yöntemle proteinlerin immobilizasyonu, enzim bileşiği ile suda çözünmeyen taşıyıcı arasında oluşan bağa dayanır. Kovalent bağlamayla sağlanan avantajların en önemlisi enzim ve taşıyıcı arasındaki bağın sağlam ve kararlı oluşudur. Bu şekilde

enzimin çözeltide hareketi engellenir. Bununla birlikte bağlama aktivite düzeyini arttırmak için aktif bölgedeki amino asit kalıntılarının taşıyıcıya bağlanması önlenmelidir. Şekil 2.4.'de kovalent bağ enzimin yüzeyinde aminoasit kalıntıları ve matriste bulunan fonksiyonel gruplar arasındaki ilişki göstermiştir [8].



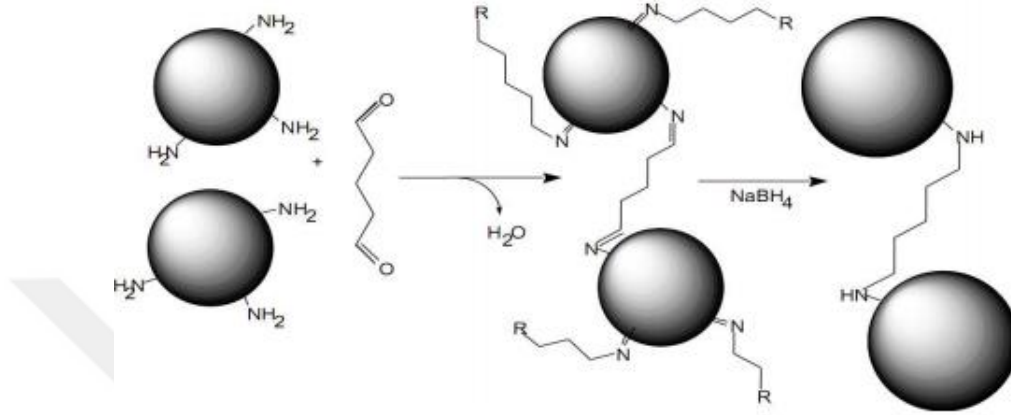
Şekil 2.4. Enzimin desteğe kovalent immobilizasyonu A. Aktif amino asit kalıntısı, B. Desteğin fonksiyonel bağ yapacak grubu, C. Destek, D. Ara kol [7]

İki adımda gerçekleşen kovalent bağlanmada; birinci adım taşıyıcının özel reaktiflerle aktifleştirilmesi, diğer adım enzim molekülünün kovalent bağla oluşturması şeklindedir. Kovalent bağlamada en çok yer alan fonksiyonel gruplar arasında amin (NH_2) grupları (lizin, histidin, arginin), karboksil (COOH) grupları (aspartik asit ve glutamik asit), hidroksil (OH) grupları (serin, treonin ve tirozin) sayılabilmektedir [7].

2.7.2. Çapraz bağlama yöntemi

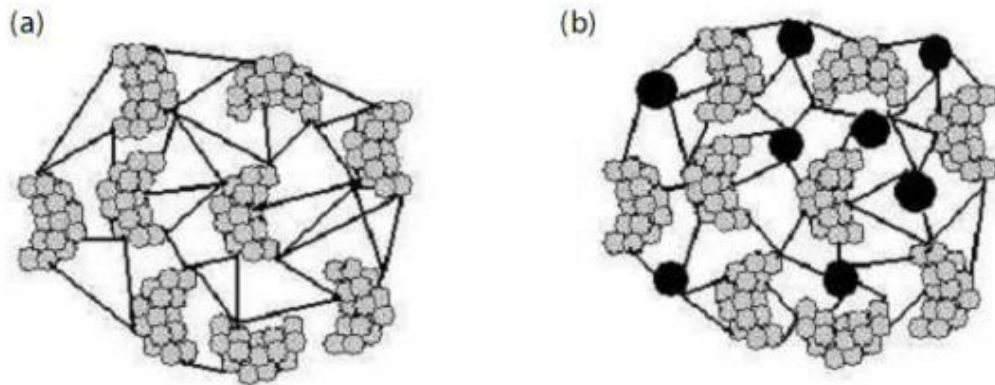
Bu yöntemle; diğer protein moleküllerine ya da çözünmeyen taşıyıcıdaki fonksiyonel gruplara, proteinin moleküller arası çaprazlanmasıyla sağlanmaktadır. Bir enzimin yapısı üzerine çapraz bağlanması uygun olmayan bir yöntemdir, çünkü bu şekilde proteinin bir bölümü taşıyıcı olarak rol almakta ve bu durum enzimatik faaliyetin azalmasını sağlamaktadır. Çapraz bağlanmanın, diğer immobilizasyon yöntemlerinden biriyle düşünülmesi daha faydalı sonuçlar doğurmaktadır. Enzimin kovalent bağlanmayla immobilizasyonu gerçekleştirilirken çapraz bağlanma da uygulandığında

desorsiyon çok az olmaktadır. Adsorblanmış enzimleri stabilize etmek ve poliakrilamit jellerden sızıntıyı önlemek çapraz bağlanmanın sıklıkla kullanıldığı alanlar olmaktadır [8]. Enzimin taşıyıcıya çapraz bağlanması Şekil 2.5.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Gluteraldehit ile çapraz bağlanma [7]

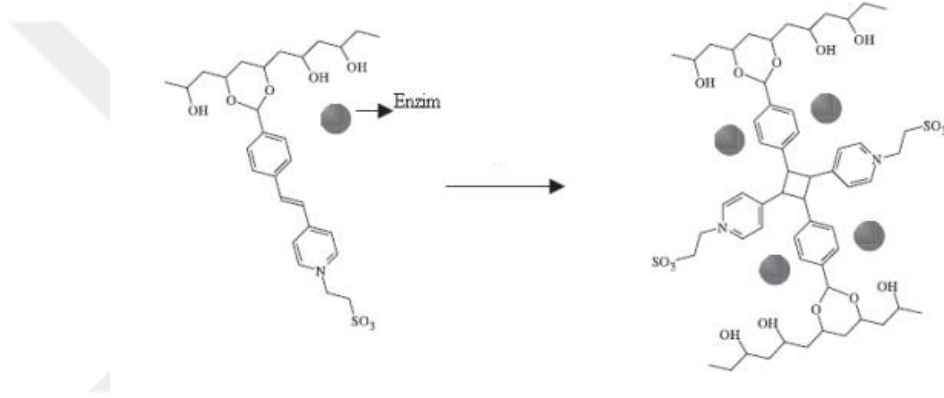
Enzim aktivitesi pH, iyonik şiddet, sıcaklık, reaksiyon süresi, çapraz bağlayıcı madde ve enzim konsantrasyonu gibi etkenlere bağlı olmaktadır. Genellikle lizinin amino grupları aracılığı ile enzimin çapraz bağlanması gerçekleşmektedir. Şekil 2.6.'da enzimlerin çapraz bağlanma yöntemi ile inert moleküllerle immobilizasyonunu gösterilmektedir.



Şekil 2.6. Çapraz bağlama yöntemi ile enzim immobilizasyonu [7]

2.7.3. Tutuklama yöntemleri

Bu yöntemle enzim, polimer matris zar bünyesinde içerisinde hapsedilmektedir. Böylece hem substratın penetrasyona hem de proteinde aynı yerde tutulması sağlanmaktadır. Bu formatın kovalent bağ oluşumundan ve çapraz bağ oluşumundan farkı çözelti bünyesinde enzim bileşiminin serbest kalması, fakat jel matris/membran bünyesinde kalarak aktivitesinin sınırlandırılmasıdır. Bu olgudan dolayı tutuklama yöntemi, geniş uygulanabilirlik alanı kazanmaktadır. Şekil 2.7.'de enzimin tutuklama yöntemi ile immobilizasyonu gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Enzimin bir taşıyıcı içerisinde tutuklanması [8]

2.7.4. Taşıyıcıya bağlama yöntemi

En eski immobilizasyon yöntemi olan taşıyıcıya bağlanma metodu, enzimlerin suda çözünmeyen taşıyıcılara bağlanması şeklindedir. Bağlanan enzimin miktarı ve immobilizasyon akabinde enzimin faaliyeti, tamamen taşıyıcıya bağlı olmaktadır.

Taşıyıcının belirlenmesi, immobilize enzimin etkinliği hususunda ciddi husus arz etmektedir. Taşıyıcı, tipi seçimdeki majör etken, enzimin cinsidir [8]. Harici olarak taşıyıcı belirlenmesinde önem arzeden diğer hususlar aşağıdaki gibidir:

- Geniş yüzey alanı,
- Tanecik boyutu ve şekli,

- Kimyasal bileşimi,
- Hidrofilik grupların hidrofobik gruplara molar oranı,
- Mikrobiyal saldırılara karşı dayanıklılığı,

Şekil 2.8.'de enzimin taşıyıcıya bağlanması gösterilmiştir.



Şekil 2.8. Enzimin taşıyıcıya bağlanması[9]

BÖLÜM 3. BİYOSENSÖRLER

3.1. Biyosensörün Tarihcesi

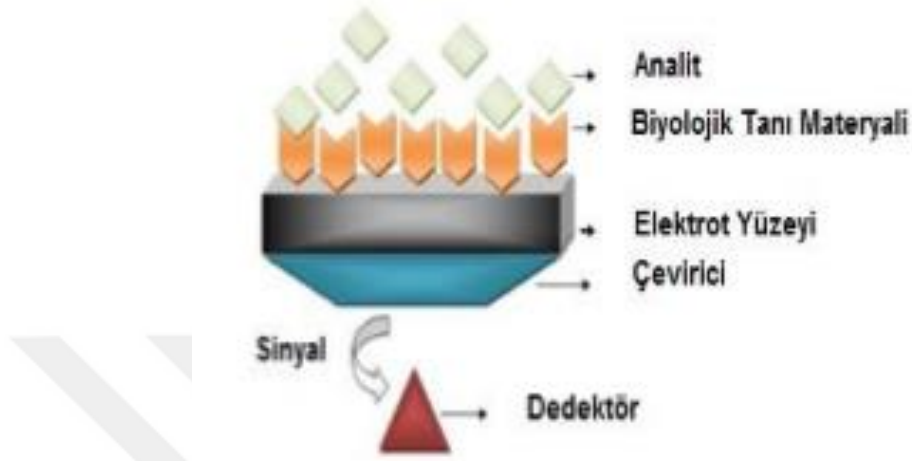
Biyosensörlerin tarihi 1950'lerin ikinci yarısında Clark'ın, Cincinnati Hastanesi'nde (Ohio, ABD) cerrahi operasyon esnasında kanda bulunan O₂ düzeyini bir elektrot yardımı ile izlemesiyle başlamıştır. 1962 yılında; Clark ve Lyonos, GOx enzimi ile O₂ bütünleştirerek kan serumundaki glikoz seviyesini tayin etmişlerdir. Bu şekilde farklı bir sistem meydana gelmiştir. Bu sistem, biyolojik sistemin hassas kimliğini ve fiziksel yapının tayin duyarlılığını birlikte sentezlemiş ve yaygın bir alanda uygulanmıştır [10].

Biyosensörler konusunda diğer önemiyet teşkil eden gelişme, Guibault ve Montalvo öncülüğünde ortaya konan, bünyesinde biyolojik anlamda belirlenmiş molekülün diyaliz membranının ardındaki ana sensörün yakınında tutulduğu potansiyometrik üre elektrodu olarak gösterilmektedir [10].

İlk biyosensörler, birinci nesil biyosensörler, oksijen sarfiyatı veya hidrojen peroksitin sentezinin izlenmesini esas almaktadır. Sonraki biyosensörler, enzim aktif bölgesinden elektroda elektron iletici anlamında medyatörün faaliyetini esas almakta ve günümüz biyosensörleri, enzim ve elektrot arasında gerçekleşen elektron alışverişini esas almaktadır.

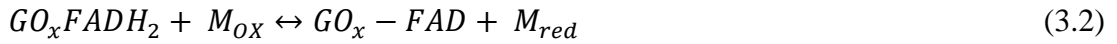
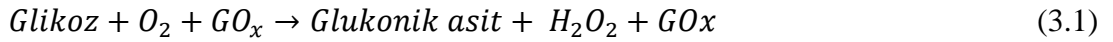
Biyosensörler; bir fizikokimyasal dönüştürücüyle, analit ile biyolojik tanı materyali arasındaki reaksiyon sonucunda ortaya çıkan ürünü ölçülebilir sinyale çevire bilen cihazlardır.

Biyosensörler; gıda sanayi, tarım, tıp, çevresel analizler gibi birçok alanda karşımıza çıkmaktadır. Şekil 3.1.'de bir biyosensörün biyolojik tanı materyali, çevirici ve dedektör olmak üzere üç temel bölümden oluşmuş olduğu gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Biyosensörün şematik olarak gösterimi [1]

Geliştirilen birinci nesil biyosensörde; oksijen elektron alıcı olarak kullanılırken, ikinci nesil biyosensörlerde redoks mediyatörleri elektron alıcı olarak kullanılmaktadır.



$\text{M}_{\text{red}} = \text{M}_{\text{ox}}$ = Redoks çiftleridir.

Redoks mediyatörlerine gereksinim kalmayan üçüncü nesil biyosensörlerde, enzimin redoks merkezi ile elektrot yüzeyi arasında direkt elektriksel iletişimin sağlanması söz konusu olmuştur.

Mikroorganizmalar, antikolar, organeller, biyosensörlerde biyobileşen olarak enzimlerin yanında kullanılabilirlerdir.

Biyosensörlerin bazı üstün özellikleri, geniş bir derişim aralıında ölçüm yapılmasına olanak sağlamala ve yüksek spesifikliğidir. Bunun yanında; sıcaklık, iyon şiddeti, pH gibi parametrelerden etkilenmesi biyosensörlerin bazı dezavantajlarıdır.

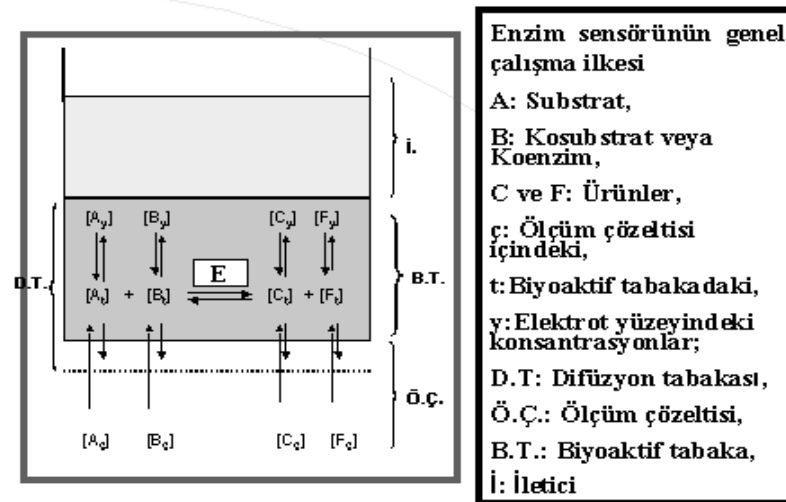
3.2. Biyosensörlerin Sınıflandırılması

3.2.1. Enzim biyosensörleri

Enzimler değişikliğe uğramaksızın, kimyasal reaksiyonları hızlandıran yapılardır. Yine enzimler, biyokimyasal reaksiyonların hücrenel faaliyet ile koordineli bir şekilde oluşmasını gerçekleştiren kimyasal moleküllerdir.

Enzimlerin oldukça yüksek bir özgünlüğü ve afinitesi vardır. İlgili oldukları substratları binlerce kimyasal arasından tanır ve reaksiyonu hızlandırırlar. Enzimler birçok ölçülebilir reaksiyon ürününü (proton, elektron, ışık ve ısı gibi), katıldıkları kimyasal tepkimelerde katıldıklarında meydana getirdiklerinden biyoreseptör olarak da kullanıla bimektedir.

Enzim sensörleri de, biyoaktif tabaka, iletici ve ölçüm sisteminden oluşmaktadır. Şekil 3.2.'de enzim biyosensörünün çalışma ilkesi gösterilmiştir. Diğer biyosensörlerden yegane farkı, aktif bölgede biyomolekül anlamında enzimlerin bulunmasıdır [11].



Şekil 3.2. Enzim biyosensörünün genel çalışma ilkesi [12]

Şekil 3.2.'de görüldüğü gibi enzim barındıran tabaka, enzimin hızlandırdığı reaksiyona uyacak şekilde, bir ileticiyle birleştirilmektedir. İletişim sistemi, biyoaktif tabakada gerçekleşen enzimatik reaksiyon sonucu substrat, koenzim yoğunlaşmasındaki azalış ya da ürün yoğunlaşmasındaki artışı tespit edilebilecek şekilde seçilebilmektedir. Derişimlerin ivedi bir şekilde dengeye ulaşabilmesi için, difüzyon engelini minimize etmek amacıyla, biyoaktif tabaka kalınlığını son derece ince olmalıdır. Bununla birlikte biyoaktif tabakada sabit bir substrat yoğunlaşmasını gerçekleştirebilmek amacıyla ölçüm çözeltisinin iyi bir şekilde karıştırılması gerekir.

Protein yapılı olan tüm enzimler, kimyasal reaksiyonları yüksek derecede katalize edebilmektedir. Katalizde ilk basamak, reaksiyonların geçiş durumlarının stabilize edilmesi, hızlandırılması ve nihayetinde enzim substrat bileşiği oluşumudur [11]. Basit formülü ile enzim kataliz mekanizması;



Burada; S=substrat, E=enzim, ES=enzim-substrat bileşiği, P=ürün, K_1 =enzim-substrat bileşiğinin reaksiyon hız sabiti, k_2 =enzim-substrat bileşiğinin diğer ürünlerle ayrışma reaksiyon hız sabitidir.

3.2.2. Doku biyosensörleri

Hayvansal ve bitkisel dokularda ile organeller enzimlerce zengindir. Bu enzimlerin yalıtılmış doku parçaları da biyobileşen olarak kullanılmaktadır.

Doku biyosensörleri, bazı enzimler için doğal ortamda artan kararlılık ve düşük maliyet gibi avantajlar sağlamaktadır. Bunun yanında, dokular, birçok enzimi bünyelerinde içerdiklerinden, analitin, belirlenen enzim dışındaki enzimlerle dönüştürülmesi ile oluşacak hataları önlemek için, diğer enzim sistemlerini inhibe edecek maddeleri ve koşulları biyosensörde kullanılmaktadır [11].

3.2.3. Elektrokimyasal biyosensörler

Enzim yapılı biyosensörlerin genelinde, elektrokimyasal transistörler kullanılmaktadır. Bu transistörler ile potansiyometri veya amperometri ilkelerine göre ölçümler alınabildiğinden, sıklıkla oksidoredüktaz sınıfı enzimler kullanılmaktadır. Elektrokimyasal biyosensörler, amperometrik ve potansiyometrik biyosensörler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır [11].

3.2.3.1. Amperometrik/voltametrik biyosensörler

Akım şiddetinin ölçümünü esas alan amperometri, çalışma elektrodunda indirgenen ya da yükseltgenen elektroaktif türlerin yoğunlaşmasının bir sonucudur. Amperometrik sensörün potansiyometrik sensörden en belirgin farkı, ürünlerden sinyal oluşturan türün elektrot yüzeyinde tüketilmesidir.

Genellikle amperometrik biyosensörler yoğunluğuna bağımlı akımı, biyolojik olarak aktif materyalle kaplı elektrokimyasal elektrot aracılığıyla ölçülmektedir. Amperometrik transformasyon, oksidasyon ve elektroaktif tiplerin bir elektrot

üzerinde indirgenmesi esasına dayanmıştır. Elektriksel akım ve analit yoğunluğu arasındaki ilişkiyi Cottrell denklemi ifade etmektedir [11].

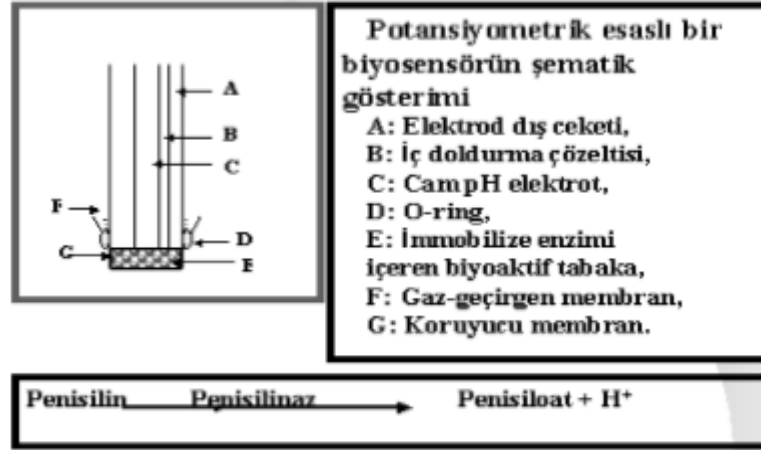
$$i = n.F.A.C_0 \left[\frac{D}{\pi t} \right]^{1/2} \quad (3.4)$$

Burada; i = ölçülecek akım, n = transfer olan elektron sayısı, F = faraday sabiti olup değeri 96487 C, A = elektrot alanı, C_0 = analit konsantrasyonu, D = difüzyon sabiti, t = potansiyel uygulandıktan sonra geçen süredir.

3.2.3.2. Potansiyometrik biyosensörler

Bir elektrokimyasal hücrede ölçülen gerilim değerleri yardımı ile hücre çözeltisindeki türlerin nicel analizine potansiyometri denir.

Potansiyometri, referansla elektrot arasındaki potansiyel farkının ölçülmesini baz almaktadır. Potansiyometrik sensör sıklıkla iyon faaliyetindeki farklılığa cevap veren seçimli elektrottur. İyon seçimli elektrotlar, karmaşık biyolojik matriksteki Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , H^+ veya NH_4^+ gibi iyonları belirlerler. Uygun iyon değiştirici membrana iyonlar bağlandığında elektrot potansiyalinde oluşan hassas değişiklikten hareket ederek söz konusu bu iyonların belirlenmesi gerçekleşir. Bunun haricinde gaz hasassiyetli elektrotların da kullanılması mümkündür. Şekil 3.3.'de potansiyometrik biyosensörün çalışma ilkesi gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Potansiyometrik biyosensörün gösterimi [13]

Potansiyometrik analiz, genel anlamda bir ürünün aktivitesinin ya da elektrokimyasal reaksiyondaki bir reaktifin aktivitesinin geriliminin ölçülmesi ile ilgilidir. [11]

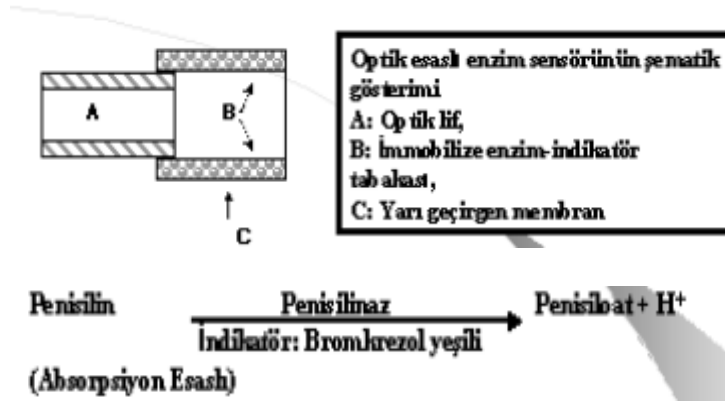
Söz konusu gerilim Nernst denkleminde göre;

$$E = E_0 + \left[R \cdot \frac{T}{nF} \right] \ln a \quad (3.5)$$

Burada; E = V birimi ile ölçülen gerilim, E₀=1 mol⁻¹ için standart gerilim, R=gaz sabiti, T = K biriminde sıcaklık, F=faraday sabiti, n=elektron transfer sayısıdır.

3.2.4. Optik biyosensörler

Optik Biyosensörler, uygun bir biyomolekülün, uygun bir yöntemle, optik lifler üzerine immobilize edilerek hazırlanan ölçüm cihazlarıdır. Şekil 3.4.'de optik biyosensörün çalışma ilkesi gösterilmiştir.

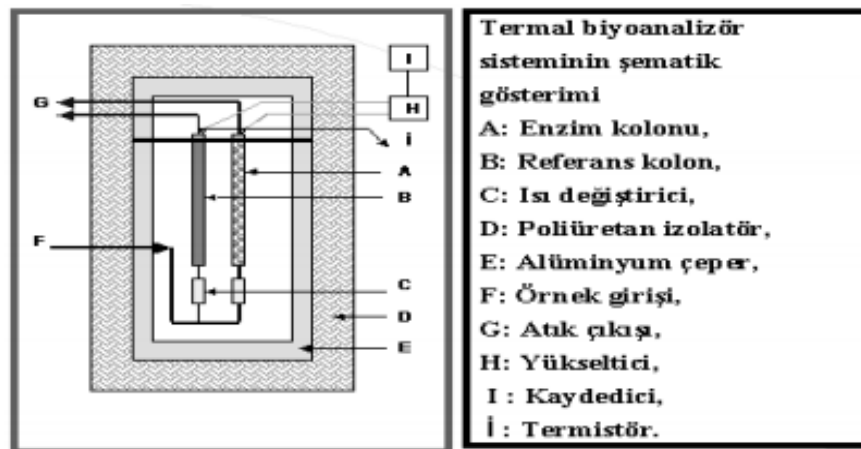


Şekil 3.4. Optik biyosensörlerin şematik gösterimi [13]

Bu ölçüm, enzimatik reaksiyon sonucu oluşan kimyasal ya da fizikokimyasal farklılığın ölçümünü temel alarak; sinyal ışık yansıması, saçılımı ya da yayımı sonucu gerçekleşir. Bundan dolayı optik lifin üzerine enzim immobilizasyonu ile gerçekleştirilen optik esaslı enzim sensörleri temelde absorpsiyon, floresans, biyoluminesans gibi ana hususlar kapsamında iş görmektedirler.

3.2.5. Kalorimetrik biyosensörler

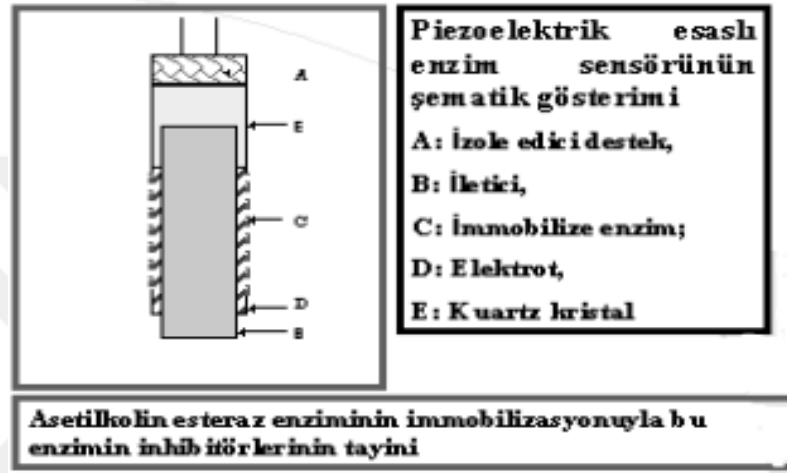
Kalorimetrik biyosensörlerin temel ilkesi, egzotermik reaksiyonlardan yararlanarak reaksiyondaki entalpi değişimi üzerinden substrat yoğunluğunu belirlemektir. Şekil 3.5.'de biyosensörün kısımları gösterilmiştir. Genellikle ekzotermik reaksiyonlardan yararlanmaktadırlar.



Şekil 3.5. Kalorimetrik biyosensörün gösterimi [13]

3.2.6. Piezoelektrik biyosensörler

Piezoelektrik sensörleri, kristal yüzeyinde toplanan örneğin kütlesinin ölçülmesine dayanan gravimetrik cihazlardır. Bu sensörler, kristal yüzeyindeki maddenin ve kendine ait bir etkileşime sahip maddenin birikimiyle ilgilidir. Şekil 3.6.'da piezoelektrik biyosensörünün yapısı gösterilmiştir.



Şekil 3.6. Piezoelektrik biyosensörün gösterimi [13]

Piezoelektrik biyosensörün yüzeyine madde adsorplandığı ya da biriktiği zaman, piezoelektrik kristalin rezonans frekansındaki farklanmanın ölçülmesiyle sonuçta varılmaktadır.

Madde miktarı; yüzeyde enzim immobilizasyonu ile gerçekleşen piezoelektrik enzim sensörlerinde enzim moleküllerine substratların bağlanmasından dolayı meydana gelen kütle değişimidir.

BÖLÜM 4. GRAFEN OKSİT VE Pt NANOPARTİKÜLLERİNİN SENTEZİ

4.1. Grafen ve Grafen Oksit Sentezi

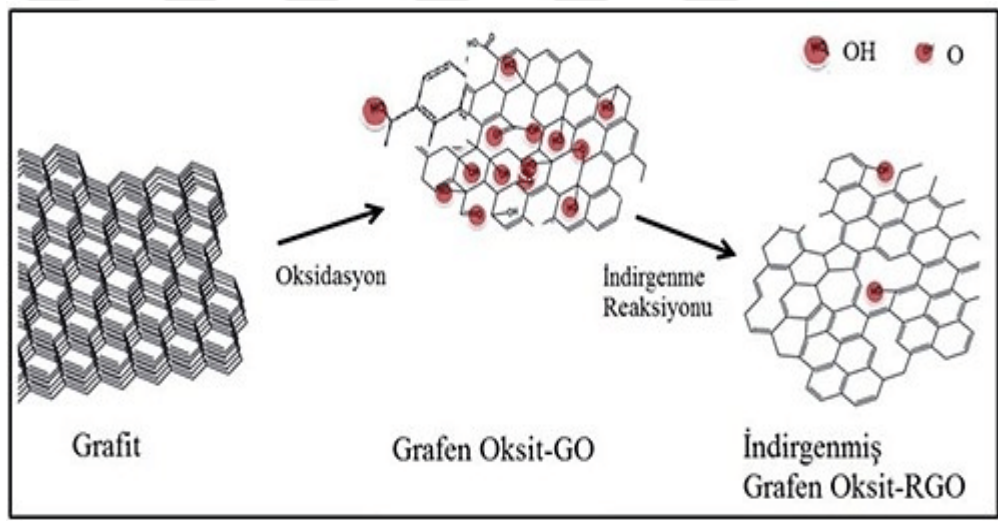
Grafen; bütün karbon allotroplarının temel bileşeni olan bir katmanlı ve bir atom kalınlığında, hegzagonal yapıya sahip, düzenli karbon atomlarıyla sp^2 hibritleşme sonucu meydana gelen, boyutsal anlamda nano bir parçadır. Faaliyet alanları da düşünüldüğünde günümüzde üzerinde yoğun uğraş verilen metaryallerdendir. İki boyutlu, tek atom kalınlığında olması ve kuvvetli bağ yapısından dolayı eşsiz bir yapıya haiz olan grafen; iyi seviyede elektrik, elektrokimyasal, optik termal ve mekanik özelliklere sahiptir. Grafen $5000 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$ termal iletkenliği değeri ile karbon nanotüpler, altın, gümüş ve bakır gibi metallere daha ileri seviyede bir iletkenliğe sahiptir [14].

Grafit oksidin bir varyasyonu olan grafen oksit, oldukça büyük yüzey hacmine (iki boyutlu tekdür) sahipliğinden dolayı, epoksit, hidroksil ve karbon yapıları gibi birçok reaktif grubu barındırması ve yüksek seviyede çözünürlüğünün bulunmasından ötürü biyoaygıtlar, mikrobiyal saptama, hastalık tanısı, ilaç taşıyıcı sistemler gibi biyolojik konularda yaygın kullanım alanına sahiptir. Bunların yanında geniş spesifik yüzey hacmine sahip olmasından ötürü GOx'nun enzim immobilizasyonu hususunda da uygun bir yapı olduğu sonucuna varılmakta ve bu alan ile ilgili her geçen gün çalışmalar sürdürülmektedir. Tüm bunların aksine çok az sayıda çalışmada grafen ve GOx'nun enzimler, proteinler gibi büyük moleküller üzerine etkisi irdelenmiştir. [15]

Farklı boyutlarda, farklı davranışlarda ve farklı yapılarda grafenin geliştirilmesi, polimer kompozit sektöründe karşımıza çıkmaktadır. Grafen yüzeyindeki polar gruplar, polimer matrisler ile sağlanan grafen türevleri, kompozit sentezinde yüzey oluşumuna daha uygun olmaktadır. Bu nedenden ötürü polietilen (PE),

polimetilmetakrilat (PMMA), poliüretan (PU), polivinilalkol (PVA), polibütülen süksinat (PBS), polipropilen (PP), poliakrilonitril (PAN), termopoliüretan ile nanokompozitlerin güçlerini takviye edici amaçlı birçok proje söz konusu olmaktadır [15].

Bilindiği üzere grafitin yapısındaki karbon atomları, iki boyutlu düzlemde birbirine bağlanmış, üst üste yığılmış, yassı levhalar biçimindedir. Karbon atomlarının arasındaki bağlar zayıf olduğundan dolayı, yükseltgenler ve oksidantlar ile ekzotermik reaksiyonlara girmesi, yüksek ısıların ortaya çıkması, zararlı gazların oluşması gibi işlemler neticesinde GOx sentezi gerçekleşmektedir.



Şekil 4.1. Hummer metodu ile GOx sentezi [16]

4.2. Pt Nanopartiküllerin Sentezi

Nanomatyaller, biyomoleküllerle birlikte birçok biyoanalitik uygulamada kullanılmaktadır. Nanomatyallerin elektroanalizlerde kullanılmalarının sağladığı bazı avantajlar şunlardır; Elektrot yüzeyine immobilize edilmeleri düzgün iletkenlik sağlar, moleküler ve biyomoleküler analitlerin duyarlı elektrokimyasal tayinine imkan tanır. Ayrıca, nanopartiküller elektrokimyasal tayinde sinyali artıran etkili işaretleyicilerdir. Metal nanopartiküllerin iletkenlik özellikleri, kontrollü

elektrokimyasal fonksiyonları ile biyomatemal yapılarının tasarlanmasına olanak sağlar.

Altın nanopartiküller (AuNp) diğer metal nanopartiküller arasında en sıklıkla kullanılan nanopartiküllerdir. Altın nanopartiküller özellikle nanobiyoteknoloji alanında uzun yıllardır kullanılmaktadır. DNA analizlerinde ise son yıllarda önem kazanmıştır.

Platin gibi nanoparçacıklar ise elektrik iletkenliği, katalitik aktivite ve biyouyumluluk oranını artırmak için, elektrokatalitik aktivite üzerinde, hidrojen peroksit ile uyumlu bir etkiye neden olmaktadır. Böylelikle enzim hareketsizleştirilmiş, elektrokimyasal biyosensörün duyarlılığı artırılmış, yüzey alanı genişlemiştir.

Son yıllardaki çalışmalarda yeşil kimya konusuna artan bir ilgi olduğu görülmektedir. Bunu gerçekleştirmek için toksik olmayan, çevreyle dost ve yenilenebilir kimyasallar kullanılmaktadır.

BÖLÜM 5.DENEYSEL ÇALIŞMALAR

5.1. Giriş

Kandaki glikozun ölçümü, ilk glikoz biyosensörünün gelişmesinden beri, daha çok iyileşmesi için çalışılmıştır. Enzim temelli elektrokimyasal biyosensörler GOx, indirgenmiş grafen oksit (iGO) gibi grafen ve türevleri kullanılarak hazırlanabilir.

Grafen esaslı malzemeler, elektrik iletkenliği, yüksek yüzey alanı/hacim oranı, biyouyumluluk, düşük bir maliyetle elde edilebilirlik ve güçlü mekanik dayanım göstermektedir [17]. Grafen türevlerinin bu kadar gelişmiş elektroanalitik kabiliyetine rağmen, elektromanyetik uygulamalara ivme kazandırmak için yeni grafen bazlı nanomalzemelerin geliştirilmesine de hala, büyük ilgi duyulmaktadır. Son zamanlarda, ÜNB, oksidoredüktazlar (örn. Glikoz oksidaz) ile elektrot arasındaki elektrokimyaya dayanılarak üretilmektedir [18]. Grafen türevleri, ÜNB’de elektrot malzemesi olarak kullanılmakta ve bu malzeme, yüzey alanı, elektrik iletkenliği, katalitik aktivite ve biyouyumluluk oranını artırmak için geliştirilmiş, enzim performansı ile sonuçlanacak şekilde modifiye edilebilmektedirler. Bu amaçla, platin gibi nanoparçacıklar, elektrokatalitik aktivite üzerinde hidrojen peroksit uyumlu bir etkiye neden olabilmekte, böylece enzim immobilize edilmiş, elektrokimyasal biyosensörün duyarlılığı arttırılmış ve hedef analitlerin hızlı difüzyonuna izin vererek, yüzey alanı genişletilmiştir. Değerli metal nanoparçacıklar (özellikle de Pt Np), oksidoredüktaz biyokatalitik reaksiyonlardan salınan H₂O₂’nin oksidasyonunda ve indirgenmesinde etkili olmakta, böylece gelişmiş elektrokimyasal tepki görülmektedir. Literatürde GOx’nun indirgenme yaklaşımları ve iGO yüzeyini π - π etkileşimleri yoluyla bağlayarak değiştiren doğal polifenoller bulunmaktadır (örn. tannik asit) [19]. Ayrıca polifenoller, protein molekülleriyle genellikle hidrojen bağları oluşturmakta ve böylece TA ile modifiye edilmiş yüzeyler enzim immobilizasyonu için

kullanılmaktadır. TA, protein moleküllerine kovalent Schiff bağları vasıtasıyla da bağlanabilmektedir. Son zamanlarda, açma kapama biyosensörleri sıcaklık ve pH değişimli değiştirilebilir yüzeyler ile dikkat çekmektedirler. Uyarıcıya tepki veren polimer poli (N-izopropilakrilamid) (PNIPAAm), biyosensör uygulamalarında termal duyarlı davranış için geniş ölçüde kullanılmaktadır. Literatürde; TA, PNIPAAm ve diğer poliamitlerle 31-32 °C civarında daha düşük kritik çözelti sıcaklığında (LCST) hidrojen ve hidrofobik bağlarla etkileşim kurmaktadır [20].

Bu çalışmada, GOx immobilizasyonu ve direkt elektrokimyaya dayanan hassas duyarlılıkla glikoz algılaması için yeni bir Pt Np oluşturulmuş, tannik asit ile indirgenmiş grafen oksit nanokompoziti geliştirilmiştir. Biyosensör hassasiyetini arttırmak için Pt Np seçilmiştir. GOx ve Pt⁴⁺ indirgenmesi, doğal indirgeyici madde olarak TA kullanılarak kolay ve düşük maliyetli bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, π - π etkileşimleri vasıtasıyla iGO üzerinde depolanan TA, hidrojen bağı yoluyla GOx immobilizasyonu için biyo uyumlu yüzeyi sağlamıştır. Ayrıca, pH ve sıcaklık kontrollü değiştirilebilir biyosensör yüzeyi, TA-PNIPAAm etkileşimleri kullanılarak elde edilmiştir. Elektrokimyasal ölçümler, dönüşümlü voltametri (DV) ve diferansiyel kesikli voltametri (DKV) teknikleriyle gerçekleştirilmiştir.

5.2. Materyal ve Metotlar

GO eldesi için grafit, H₂SO₄ (% 95.0-97.0), P₂S₂O₈, KMnO₄, Bradford reaktifi ve GOx kullanılmıştır. D(+) Glikoz monohidrat, tannik asit, platin standart çözeltisi (1000 mg/L Pt) ve H₂O₂ çözeltisi (% 30) hazırlanmış ve gece boyunca mutarotasyona bırakılmıştır. NaH₂PO₄, sodyum asetat trihidrat, asetik asit ile fosfat tamponu (PT) ve asetat tampon çözeltisi (ATÇ) hazırlanmıştır. DNSA reaktifi hazırlamak için ise; 2-Hidroksi-3, 5-dinitrobenzoik asit, fenol, sodyum sülfid, sodyum potasyum tartarat tetrahidrat ve NaOH kullanılmış ve kolorimetrik olarak enzim aktivite testi için hazır hale getirilmiştir.

DV, DKV ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EES) ölçümleri bir elektrokimyasal analiz cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Camı karbon elektrodu (CKE), çalışma elektrodu olarak kullanılmıştır. Sırasıyla referans ve karşıt elektrot olarak bir

Ag/AgCl elektrodu (doymuş KCl) Pt elektrot kullanılmıştır. Deneysel çözeltileri, deneylerden önce oksijenin çıkarılması için minimum 20 dakika boyunca temizlenmiştir. EES ölçümleri, açık devre voltajında 0.01 kHz ila 10 frekans aralığında 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ içeren 0.1M KCl çözeltisi içinde gerçekleştirilmiş ve şiddet 5 mV'de tutulmuştur. İmmobilize GOx miktarı Bradford tayinine göre belirlenmiştir. iGO-Pt Np nanokompozit üzerinde immobilize edilmiş, GOx aktiviteleri, DNSA reaktifi kullanılarak ve 546 nm'de absorbans ölçülerek belirlenmiştir.

SEM görüntüleri, elektron mikroskopundan elde edilmiştir. Nanokompozitlerin fonksiyonel grup araştırması; oda sıcaklığında, 400-4000 cm^{-1} aralığında Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR) Spectrum Two cihazı ile yapılmıştır. Zeta potansiyeli ölçümleri, 30 °C'de Nanoplus zeta/nano partikül analiz cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Numunelerin UV-görünür (UV-Vis) spektrumu, UV-Vis spektrofotometre (Shimadzu UV-2600) cihazından elde edilmiştir.

5.3. Pt Nanopartikülleri Kaplı İndirgenmiş Grafen Oksit Nanokompozit Sentezi

iGO sentezlemek için 1 mL GO (0,5 mg/mL), 2 mL 5mg/mL TA sulu çözelti içine kuvvetli bir şekilde karıştırılarak dağıtılmış ve 650 μ L platin standart çözeltisi ve 6 μ L 0,5 M sodyum hidroksit çözeltisi, oda sıcaklığında süspansiyon edilmiştir. GOx'nun indirgenmesi, oluşan karışımın 30 dakika boyunca 90 °C de tutulması ile artırılmıştır. Ardından, GOx santrifüje tabii tutulmuş ve TA'yı uzaklaştırmak için iki kez deiyonize su ile yıkanmıştır. CKE kaplaması için 1 mL deiyonize su ile yeniden dağıtılmıştır. GOx'nun kahverengiden siyah renge dönüşmesi ile GOx'nun TA tarafından indirgenmesi gözlenmiştir.

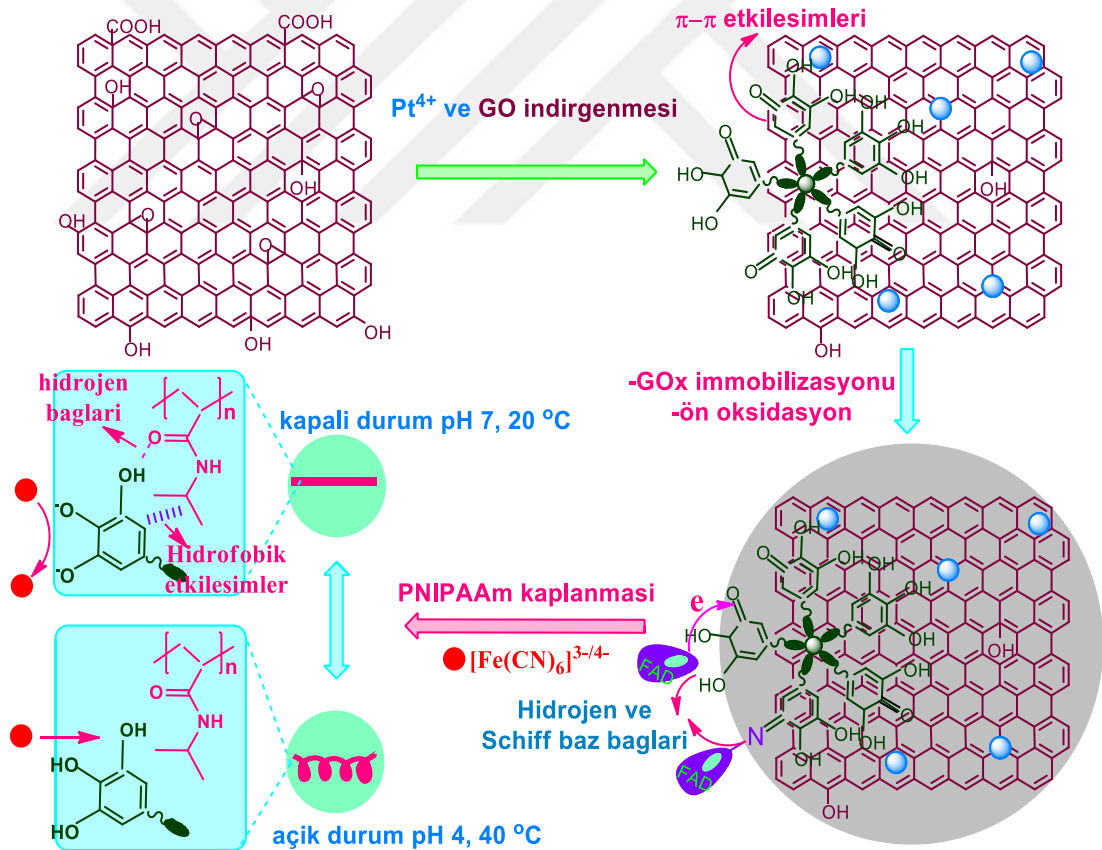
5.4. iGO-Pt Np-GO_x ile Modifiye Edilmiş CKE'nin Hazırlanması

Nanokompozit kaplamadan önce, CKE (3 mm çapında) alüminayla temizlenmiş ve daha sonra durulanmış, deiyonize su ile sonike edilmiştir. Ardından, CKE'lar 8 μ L kompozit damlatarak (0,5 mg/mL) ile modifiye edilmiş ve havada kurutulmuştur. Enzim immobilizasyonu için, nanokompozit kaplı elektrotlar, 4 saat boyunca 250 μ L

GOx çözeltisi (40 mg/mL) içine daldırılmıştır. Son olarak, modifiye edilmiş CKE'den gevşek bağlı GOx'i uzaklaştırmak için FT ile çalkalanmış ve kuru şartlar altında 4 °C'de saklanmıştır.

5.5. iGO-Pt Np-GOx/CKE Elektrodun PNIPAAm ile Kaplanması

CKE üzerinde iGO-Pt Np-GOx nanokompozitin, sıcaklığa ve pH'a karşı duyarlılığını araştırmak için N-izopropilalrilamid (PNIPAAm) ile kaplanmıştır. pH'ı 7,4 olan FT'de 50 µL PNIPAAm (20 mg/mL) çözeltisi, nanokompozit ile modifiye edilmiş CKE üzerine azar azar damlatılmış ve elde edilen biyokonjugat (PNIPAAm-iGO-Pt Np-GOx) oda sıcaklığında 30 dakika kurutulmuştur. Şekil 5.1.'de anlatılan açma kapama biyosensörünün gösterimi verilmiştir.



Şekil 5.1. TGM'nin şematik gösterimi ve glikozun biyolojik olarak algılanması için açma kapama biyosensörü

BÖLÜM 6. ARAŞTIRMA BULGULARI

6.1. Elektrotların Hazırlanması ve TA ile Elektron Transferi

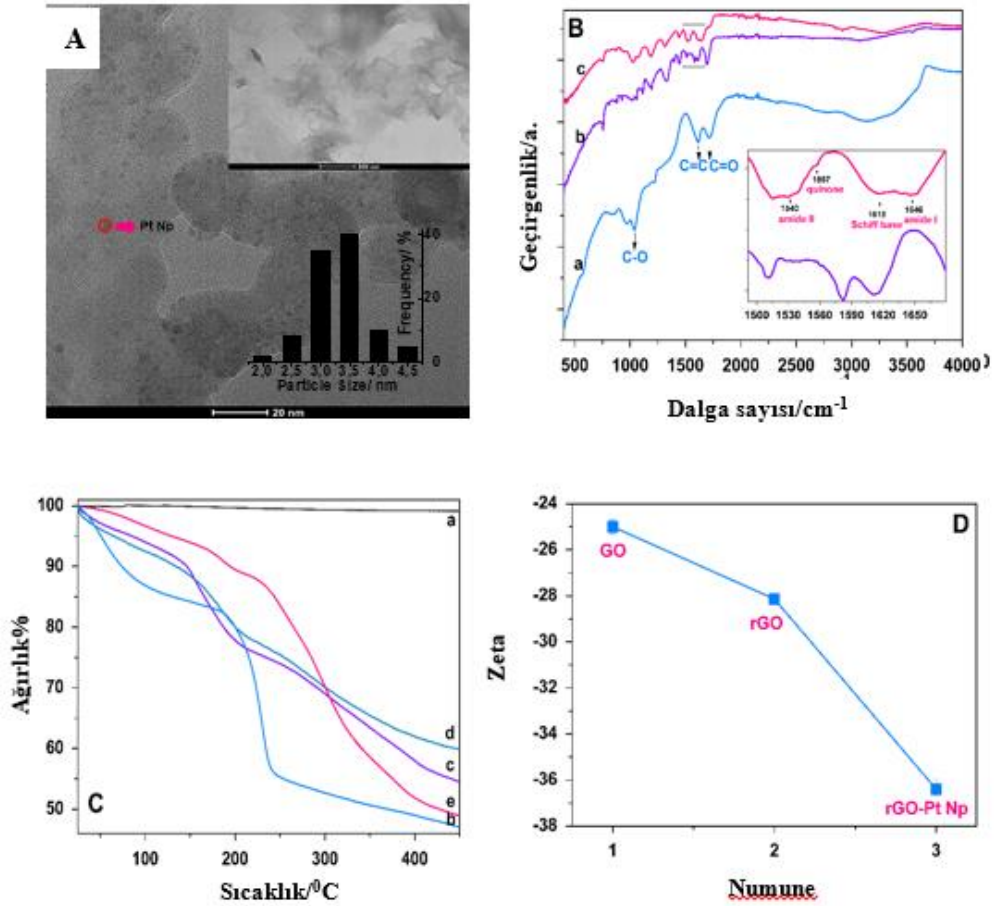
Elektrokimyasal biyosensörler için gerekenler belirlenerek, GO Hummer Metoduna göre sentezlenmiş, kimyasal olarak indirgenmiş ve elektrokimyasal açma-kapama biyosensörü Şekil 6.1.'de gösterildiği gibi elde edilmiştir [21]. GO ve Pt⁴⁺ iyonlarının eş zamanlı indirgenmesi TA ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, TA, TA'nın fenolik grupları ve iGO'nun benzen halkaları arasındaki π - π etkileşimleri vasıtasıyla iGO yüzeyine bağlanmıştır. GOx, iGO-Pt NPs-GOx/CKE'yi enzim çözeltisine batırarak kovalent destekli hidrojen bağları vasıtasıyla TA kaplı iGO üzerinde immobilize edilmiştir. Immobilize edilmiş GOx Bradford Metoduna göre tespit edilmiş ve immobilize GOx miktarı 3.2 ± 0.6 mg enzim/mg nanokompozit olarak bulunmuştur. Ayrıca, DNSA glikoz tayin testi, immobilize edilmiş GOx'un enzim aktivitesini serbest GOx'a kıyasla %140 oranında arttırdığını göstermiştir. Enzimatik aktivite, immobilizasyonla daha elverişli üç boyutlu yapı oluşması nedeniyle artmıştır. İndüktif eşleşmiş plazma (ICP) ölçümlerine göre, nanokompozitin yaklaşık %5'inin platin nanoparçacıklarından oluştuğu bulunmuştur.

iGO ve iGO-Pt NP'lerin morfolojileri taramalı elektron mikroskobu (SEM), tünellemeli elektron mikroskopisi (TEM) ve yüksek çözünürlüklü TEM (HRTEM) ile araştırılmış ve Şekil 6.1 de gösterilmiştir. Şekil 6.1.(A), Pt Np'nin, iGO üzerinde eşit olarak dağıtıldığını ve enzim immobilizasyonu için yüksek yüzey alanı olan iGO'nin TEM görüntülerini göstermektedir. Enerji dağılımlı X-Işını Spektroskopisi (EDS) analizi; Şekil 6.1.'de gösterildiği gibi 2 keV civarında bir Pt zirvesini vererek, Pt Np varlığını doğrulamıştır.

TA, iGO yüzeyine π - π etkileşimleri vasıtasıyla bağlanabilir, TA ile modifiye edilen yüzeye enzim immobilizasyonu enzimin azot içeren grupların ve TA'ların hidroksil grupları arasındaki hidrojen bağları vasıtasıyla gerçekleştirilebilmektedir ve bu, FTIR ile teyit edilebilmektedir. GO sentezi, TA ile indirgenmesi ve yüzeyinin modifikasyonu ve GOx immobilizasyonunu doğrulamak için FTIR analizleri yapılmıştır. 400-4000 cm^{-1} aralığında ölçülen numunelerin FTIR spektrumları Şekil 6.1.'de gösterilmektedir.

GO spektrumunda, 1726 cm^{-1} deki pik COOH gruplarının C=O gerilme titreşimini gösterirken, yaklaşık 1380-3170 cm^{-1} 'lerde merkezli geniş bantlar OH deforme ve gerilme modu ile ilişkilidir ve 1617-1620 cm^{-1} 'lerdeki pikler CO ve C=C gerilme titreşimlerine atfedilebilir. iGO spektrumunda, GO'ya ait piklerin azaldığı, hatta neredeyse kaybolduğu görülmekte ve TA'ya atfedilen pikler ortaya çıkmakta ve bu da GO'nun indirgendiğini ve TA'nın iGO yüzeyinde biriktiğini doğrulamaktadır. iGO spektrumunda, 1712-1613 cm^{-1} 'lerdeki adsorpsiyon pikleri, sırasıyla C=O gerilmesi ve aromatik C-O gerilmesine karşılık gelmektedir. Ayrıca, 1329 cm^{-1} 'deki pikler düzlem-OH bükülmesinden, 1060 cm^{-1} 'deki pik aromatik C-H deformasyon titreşimleri, 1444 cm^{-1} 'de C-O'nun simetrik gerilme titreşiminden kaynaklandığı ve 1512 cm^{-1} piklerde halkalarda C-C gerilmesine atfedilebileceği gözlenmiştir. 1581 cm^{-1} deki pik, GO ve Pt Np indirgemesine bağlı olarak TA hidroksillerinin oksidasyonundan kaynaklanan kinon parçalarının varlığına atfedilebilir. 1540 cm^{-1} 'de amid II ve 1646 cm^{-1} 'de amid I varlığı GOx'in immobilizasyonunu ve immobilizasyon sonrasında ikincil yapının korunmasını doğrulamıştır. iGO spektrumundaki karbonil grubundaki (C=O) gerilme titreşimi, iGO-Pt Np-GOx 'de 1697 cm^{-1} 'den 1713 cm^{-1} 'e kaymıştır ve TA-GOx arasındaki hidrojen bağlarının varlığını göstermektedir. Böylece, enzim esaslı biyosensörün oluşturulması için yeterince enzim immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte, bazı pik noktalarının, iGO-Pt Np-GOx spektrumunda tamamen kaybolduğu görülmektedir. Kinon oluşumu ile GOx, hidrojen bağları ile birlikte Schiff baz bağlarıyla iGO yüzeyine sabitlenmektedir. Nanokompozit modifiye elektrotla, fenolik hidroksilleri oksitlemek için, denemelerden hemen önce, elektron transferini sağlayan kinon parçalarını elde etmek üzere, 0,1-0,5 V potansiyel aralığında taranmıştır. Şekil 6.2.'de GOx ve elektrot

arasındaki elektron transferi sırasında, kinon gruplarının doğrusal elektron potansiyelinde hidrokstillere indirgendiği görülmektedir. Bu olgu TA'nın, elektronları GOx'tan elektroda transfer edebildiğini göstermektedir, ayrıca CV taraması, indirgenmiş hidrokstilleri, kesintisiz elektron transferini gösteren, kinon gruplarına tekrar oksitleyebilmektedir.



Şekil 6.1. (A) iGO'nun TEM görüntüsü (B) iGO'nun FTIR spektrumları (C) Grafitin TGA eğrileri (D) GO, iGO, iGO-Pt Np zeta potansiyelleri

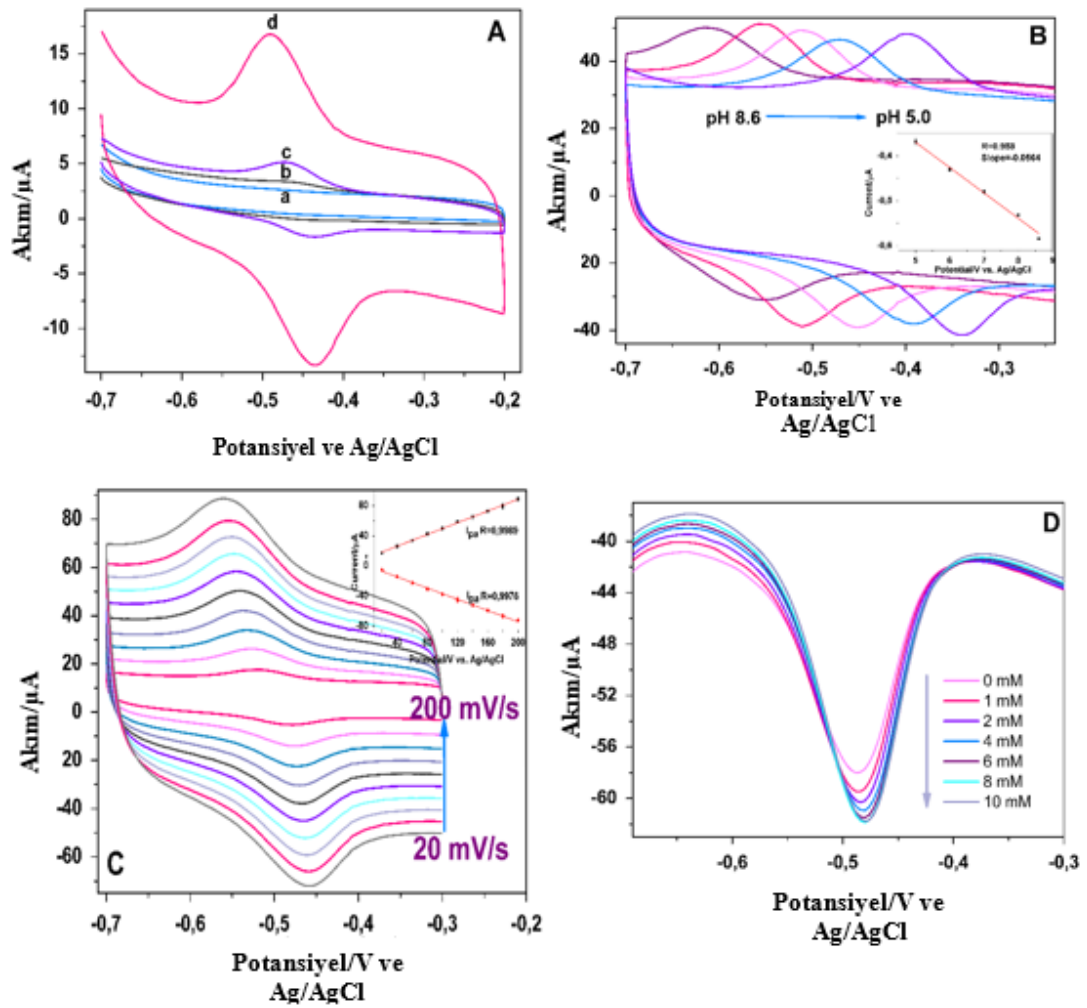
TA birikmesi ve GOx immobilizasyonunu teyit etmek için termogravimetrik analiz (TGA) ölçümleri yapılmıştır. Şekil 6.1.(C)'de, grafit kütlesi, sıcaklık aralığı boyunca, hemen hemen değişmeden kalmıştır. 100°C'nin altındaki GOx eğrisinde; emilen su çıkmış ve oksijen içeren fonksiyonel grupların pirolizi yaklaşık 200 °C'de başlamıştır. iGO'nun kütle kaybı daha da yükselmiş, oksijen içeren fonksiyonel gruplar azalmıştır.

150 °C'de başlayan önemli miktarda kütle kaybı, iGO tabakalarında biriken TA ayrışmasını göstermektedir. GO ve iGO arasındaki kütle kaybı farkı, yoğun TA varlığını göstermektedir. Pt Np birikimi üzerinde, metal içeriğinin artması nedeniyle kütle kaybının azaldığı görülmektedir [22].

Zeta potansiyel ölçümleri, yüzey yükünün değişimi ile TA ve Pt Np çökmesini açıklamak için pH 7'de gerçekleştirilmiştir. Şekil 6D'de GOx'nun zeta potansiyeli -25,1 mV iken, TA ile indirgeme sonrasında nanokompozit, -28,2 mV'lık bir zeta potansiyel değerine artmıştır. Artış, iyonize olmuş ve negatif yüklü TA'dan kaynaklanmakta ve TA'nın iGO yüzeyine bağlandığını göstermektedir. Ayrıca, reaksiyon ortamına Pt⁴⁺ eklenmesiyle; Pt Np oluşumu ile ilişkili nanokompozit yüzey alanının zenginleştirilmesi, yük transfer kompleksi oluşumu Pt Np yüzeyine ilave TA birikmesi nedeniyle zeta potansiyeli daha da artmaktadır [23].

6.2. GO_x'in iGO-Pt Np/CKE Üzerindeki Elektrokimyası

GO_x'in iGO-Pt Np üzerindeki doğrudan elektrokimyası, CV ile araştırılmıştır. Şekil 6.2A, 0,1 M fosfat tamponu (pH 7.4) çözeltisindeki 100 mV/s tarama hızındaki GO_x/CKE, GO_x-GO/CKE, GO_x-iGO/CKE ve GO_x-iGO-Pt Np/CKE'nin CV'lerini göstermektedir. GO_x-iGO/CKE (Şekil 6.2A, satır c) durumunda, FAD'nin elektrokimyasal redoks reaksiyonuyla ilişkilendirilen bir çift redoks pik noktası elde edilmiştir. Bu bulgu, TA birikmesini, GO indirgenmesinin direkt elektron transferi için enzim immobilizasyonuna izin verdiğini doğrulamaktadır. GO_x-iGO Np/CKE'nin CV'lerinde (Şekil 6.2.(A), satır d) -0,434 V anodik pik potansiyeli ve (E_{pa}) ve -0,490 V katodik pik potansiyeli ile tanımlanmış ve geri dönüşümlü bir redoks pik çifti gözlenmiştir. Pik ayrımı (ΔE_p) 56 mV'dir. Katodik ve anodik pik potansiyelinin ortalamasından hesaplanan normal potansiyel (E°) -0,462 V'dur. GO_x-iGO-Pt Np/CKE'nin gelişmiş redoks piki, Pt Np birikmesinden kaynaklanan artan yüzey alanı ve elektrik iletkenliği ile ilişkilendirilmektedir. Bu değer, FAD/ FADH₂ için standart elektrot potansiyeli -0,459'a (Ag/AgCl'ye karşı) yakın olup, GO_x ve nanokompozit arasındaki doğrudan elektron transferini (DET) gerçekleştirebileceği düşünülmektedir.



Şekil 6.2. (A) Oksijenleştirilmiş 0.1 M'de GOx / CKE, (B) Çözeltinin DV yanıtları üzerindeki pH etkisi, (C) iGO-Pt Np-GOx / GCE DV'nin tepkileri üzerindeki tarama hızı etkisi, (D) DPV tekniği kullanılarak yapılan glikoz ölçümleri

Bu sonuç, protein bağlama ajanı olarak TA'nın DET için GOx ve iGO arasındaki mesafenin azalmasını sağladığı ve Pt Np'nin redoks piklerini güçlendirdiğini teyit etmektedir. Yapılan çalışmalarda enzimsiz elektrotlar deneylerin potansiyel aralığında herhangi bir redoks piki göstermemiştir. Şekil 6.2.(B) tarama hızının, GOx-iGO-Pt Np/CKE'nin DET'sinin CV özelliklerine etkisini göstermektedir. Tarama hızı 0,02'den 0,2V/s'ye yükseldiğinde, hem anodik (I_{pa}) hem de katodik (I_{pc}) pik akımları tarama hızı ile lineer olarak artmakta ve redoks reaksiyonunun yüzey kontrollü bir proses olduğunu göstermektedir [24]. Yine de ΔE_p 'in değeri tarama hızlarından

bağımsızdır ve sabit kalmıştır. GOx ve GOx-iGO-Pt Np/CKE arasındaki elektron transfer hızı (k_s), Laviron denklemini ($n\Delta E_p > 0.200$ V) kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\log k_s = \alpha \log(1 - \alpha) + (1 - \alpha) \log \alpha - \log[(RT/nFv)] - \alpha(1 - \alpha)nF\Delta E_p/2.303RT \quad (6.1)$$

Burada α , yük transfer katsayısı ($\sim 0,5$) ve v (V/s) tarama hızıdır. R, T ve F sabitleri, normal anlamlarını ($R=8,314$ J/molK, $T=298$ K, $F=96485$ C/mol) temsil etmektedir. 0,1 V/s tarama hızında, GOx-iGO-Pt Np/CKE için k_s değeri, $1,31$ s⁻¹ olarak tahmin edilmiştir ve bu grafen kuantum noktalarında immobilize GOx için gözlemlenen değerlerle karşılaştırılabilir ($1,12$ s⁻¹) ve karbon nanotüp esaslı elektrotta ($1,44$ s⁻¹) bu sonuç, Pt Np'nin çökeldiğini gösterir [25].

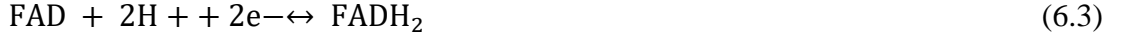
Kompozitin yüzeyinde immobilize edilen elektroaktif GOx'un yüzey miktarı, (Γ , mol/cm²) aşağıdaki formüle göre tahmin edilmiştir [26].

$$Q = nFA\Gamma \quad (6.2)$$

Burada F, Faraday sabiti, Q, katodik pik entegrasyonundan bulunan redoks reaksiyonunda tüketilen yüküdür. Γ , elektroaktif glikoz oksidaz miktarıdır; n ve A, aktarılan elektronların sayısını ifade etmektedir ve formül 6.2'de, CKE (0,071 cm²) karşılık gelir. GOx-iGO-Pt Np/CKE elektrodundaki elektroaktif glikoz oksidaz miktarı $2,72 \pm 0,4 \times 10^{-11}$ mol/cm olarak hesaplanmış ve GOx'in doymuş miktarının daha büyük olduğu tespit edilmiştir [27]. Immobilize GOx miktarı, tek katmanlı miktarındakinden daha fazladır. Bu nedenle GOx, iGO-Pt Np modifiye elektrot üzerinde çok katmanlı bir şekilde immobilize edilmiştir.

GOx'in DET'ye iGO-Pt Np/CKE üzerinde etkisi, CV kullanılarak 100 mV/s tarama hızında incelenmiş ve ortam pH'ına güçlü bir bağımlılık gözlenmiştir. pH'daki bir azalma hem E_{pa} hemde E_{pc} 'de olumlu bir kaymaya yol açmakta, bu da hidrojen iyonlarının GOx'un elektrokimyasal tepkimesine girdiğini göstermektedir. Bu, GOx'in elektrokimyasal tepkimesinde hidrojen iyonlarının bulunduğunu ifade etmektedir. Şekil 6B'de gösterildiği gibi, GOx'un normal potansiyeli pH 5,0 ila 8,6 aralığında doğrusal bir orana sahiptir. pH ile normal potansiyel arasındaki eğim değeri

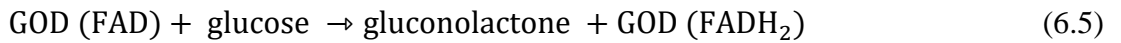
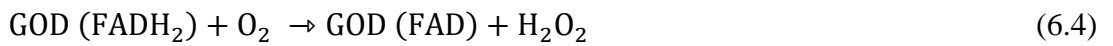
-(56,4±0,4) mV/pH ($R^2=0,988$) olarak bulunmuştur. Gözlenen eğim değeri; (56,4 mV/pH) denklem 6.1'de gösterildiği gibi, GOx'in iki elektronlu tranferi ile iki proton çifti için teorik değere (58,6 mV/pH) çok yakındır [28]. Şekle göre; pH 7,4 deney ortamında, maksimum akım pH 7,0 ila 8,6 arasında ortaya çıkmıştır.



6.3. Pt Np-iGO/CKE Tabanlı Glikoz Biyosensörünün Performansı

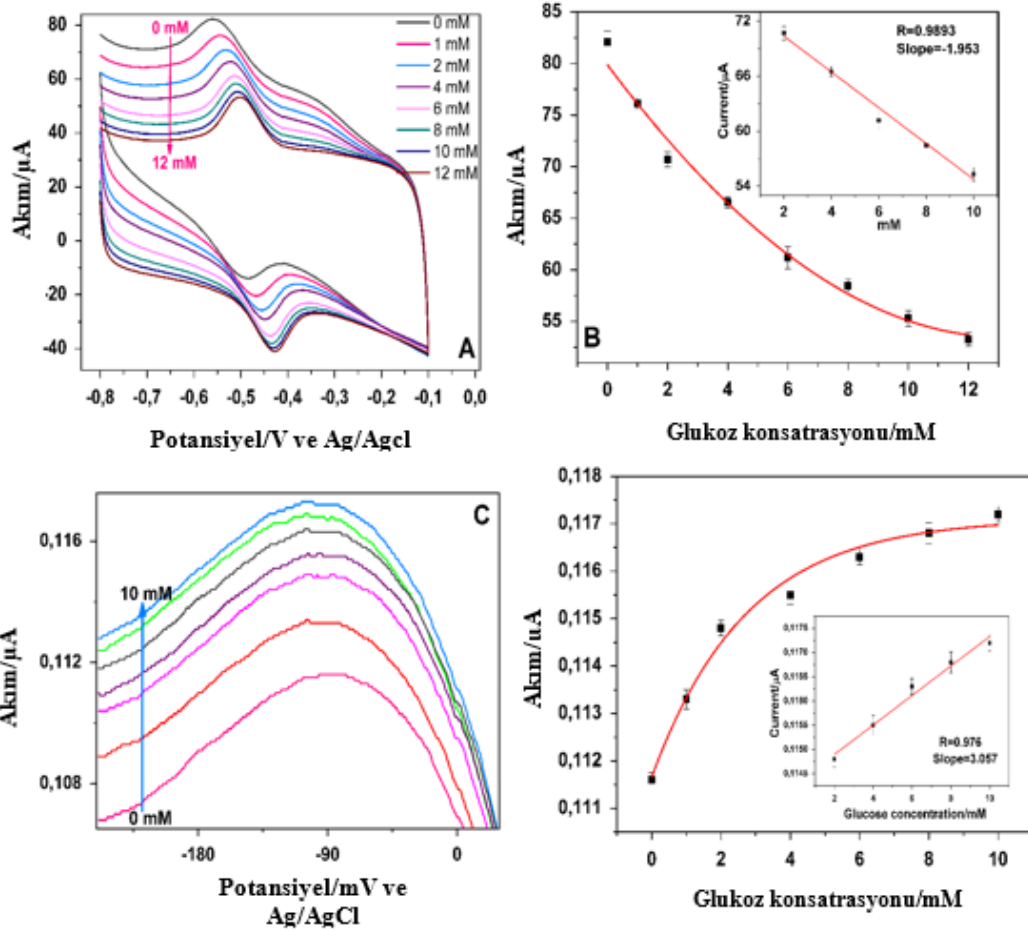
Çevrimsel voltametri ölçümleri 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 mM glikozun varlığında ve yokluğunda GOx-iGO Pt Np/CKE kullanılarak O_2 'e doymuş FT'de (0,1 M, pH 7,4) 100 mV/s tarama hızı ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 6.3.'de gösterildiği üzere FAD/FADH₂'nin redoks reaksiyonuna bağlı olarak iyi tanımlanmış bir çift pik noktası glikozun yokluğunda ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte, O_2 'e doymuş FT (0,1 M, pH 7,4) içine glikoz çözeltilerinin eklenmesi, anodik pik akım yoğunluğunda bir düşüşe yol açmıştır.

Bu verilere göre, GOx-iGO-Pt Np/CKE'nin DET mekanizması yoluyla glikoza doğru biyoelektrokatalitik aktivitesinin denklemi (6.4) ve (6.5):



Denklem 6.3'de O_2 'e doymuş ortamda; hemen hemen tüm GOx molekülleri, eşitlik değerine göre biyokatalitik olarak oksitlenmektedir. Bu nedenle, oksitlenmiş GOx için gerekli elektrokimyasal olarak indirgeyici akım maksimum değerdedir. Glikoz ilave edildikten sonra, GOx'in FAD'inin indirgenme akımı giderek azalmaktadır. Bunun nedeni, glikoz eklenmesiyle GOx (FAD) ve glikoz arasındaki biyokatalitik reaksiyona göre daha fazla GOx (FAD)'nin, GOx'e (FADH₂) dönüşmesidir. Bu nedenle, GOx konsantrasyonu (FAD), glikoz konsantrasyonunun artmasıyla belirli bir konsantrasyon aralığında lineer olarak azalarak, katodik akımın GOx (FAD)'nin azalmasına neden

olmaktadır. Şekil 6.3.'de yer alan grafik, GOx'un 2-10 mM aralığında lineer olarak azaldığını göstermektedir. Sonuçlar; üretilen GOx-iGO-Pt Np/CKE'nin, aracı olmayan üçüncü nesil glikoz biyosensör olduğunu doğrulamaktadır.



Şekil 6.3. (A) iGO-Pt Np-GOx / GCE'nin DV eğrileri. (B) Glukoz konsantrasyon grafiğine karşı katodik pik akımı (C) ABS içindeki PNIPAAm-iGO-Pt Np-GOx/CKE'nin CV konsantrasyonları (D) Açma-kapama biyosensörü için glüköz konsantrasyon grafiğine karşı katodik pik akımı

Doğrusal regresyon denklemi $I_p (\mu A) = 74,289 \pm 0.646, (\mu A) - 1,953 \pm 0.101$ (glüköz konsantrasyonu) ($\mu A m M^{-1}$), $R^2 = 0,989$ olarak ifade edilmektedir. Bu biyosensörde gözlenen doğrusal ölçüm aralığı, Tablo 6.1.'de verilen ÜNB'ye dayalı olarak yapılandırılmış biyosensörler için rapor edilenlere kıyasla, yoğunluk aralığı, 27.51 mAm/Mcm^2 'lik bir hassaslık, korelasyon katsayısı 0.9893 ve düşük saptama limiti $1.21 \mu M$ ($S/N=3$)dir. Geliştirilen biyosensörün duyarlılığı, doğrusal aralığı ve saptama

limiti artırılmış ve Tablo 6.1.'de özetlenen literatür verileri ile karşılaştırılmıştır. Daha önceki çalışmalara kıyasla, iletkenliğinin geliştirilmesi için Au Np'nin kullanıldığı biyosensörün duyarlılığı ve yüzey alanı geliştirilmiştir. DET potansiyelinde FAD için indirgeme akımı üzerine sinerjik etkisiyle Pt Np'nin, salınan H₂O₂'yi azaltabilecektir. Glikoz konsantrasyonu 12 mM'den yüksek olduğunda, katodik pik akımları doğrusallıktan sapma göstermiş ve limit değere ulaşmıştır. Bu da Michaelis-Menten kinetik mekanizmasının özelliklerini göstermiştir. Görünür Michaelis-Menten sabiti (K_m), aşağıdaki gibi Lineweaver-Burk denkleminin elektrokimyasal versiyonunu kullanarak elde edilebilen enzim-substrat reaksiyon kinetiğini açıklamak için önemli bir parametredir [29].

$$1/I_{ss} = 1/I_{max} + (K_m/I_{max}) \cdot (1/C_{glikoz}) \quad (6.6)$$

Burada, I_{ss} substrat ilavesinden sonra kararlı durum akımı, I_{max} doymuş alt tabaka koşullarında maksimum akım ve C_{glikoz} glikozun toplam konsantrasyonudur. GOx-iGO-Pt Np/CKE'nin K_m değeri 3,43 mM olarak hesaplanmış ve Tablo 6.1.'deki GOx immobilize edilmiş biyosensörlerin K_m değeri ile karşılaştırılmıştır. Düşük K_m değeri, iGO-Pt Np/CKE'de GOx'un doğal yapısının korunması nedeniyle enzimatik reaksiyonda glikoza karşı yüksek affiniteye neden olmaktadır.

Tablo 6.1. Glikoz tayini için literatürde bildirilen iGO-Pt Np-GOx/CKE ve diğer direkt elektron transfer temelli biyosensörlerin karşılaştırılması

Modifiye edilmiş elektrot	Lineer aralık (mM)	Duyarlılık ($\mu\text{A mM}^{-1}\text{cm}^{-2}$)	Tayin limiti (μM)	K_m (mM)	Kaynak
rGO-Pt Np-GOx/CKE	2-10	27.51	1.21	3.43	Bu çalışma
EİGO-ÇDCNT-GOx-Nf/CKE ^a	0.01-6.5	7.95	4.7	-	26
GO-DDAB-GOx/CKE ^b	0- 0.6	0.22	20	1.5	40
rGO-CD-GOx/CKE ^c	0.05-3	59.74	12	1.78	41
GNS-PEI-Au NPs-GOx/CKE ^d	0.001-0.1	93	0.32	-	4
GO-CNT-GOx/CKE	2-8	19.31	-	-	42
Cs-PGA-GOx/CKE ^e	0.5-5.5	2.13	0.12	-	43
rGO-PPy-Au NPs-GOx/CKE ^f	0.2-1.2	123.8	-	-	44
G-MWCNTs-AuNPs-GOx/CKE	0.005-0.175	29.72	4.8	2.09	45
GN-Py-GOx/CKE ^g	0- 2	7.29×10^{-5}	50	-	46
GN-PDA-GOx/Au Electrode ^h	0.001-4.7	28.4	0.1	6.77	47

aEİGO: elektrokimyasal olarak indirgenmiş grafen oksit; ÇDCNT: çok duvarlı karbon nanotüp; Nf: nafyon

b DDAB: didodesildimetilamonyum bromür

c CD: β -siklodekstrin

d GNS-PEI: grafen-poli(etilenimin

e Cs-PGA: çitosan- poli(glutamik asit)

f PPy: polipirol

g GN-Py: grafit nanopartikül-piren

h GN-PDA: grafen-polidopamin

6.4. Biyolojik Arayüzey ile Açılıp Kapanabilir Biyoelektrokataliz

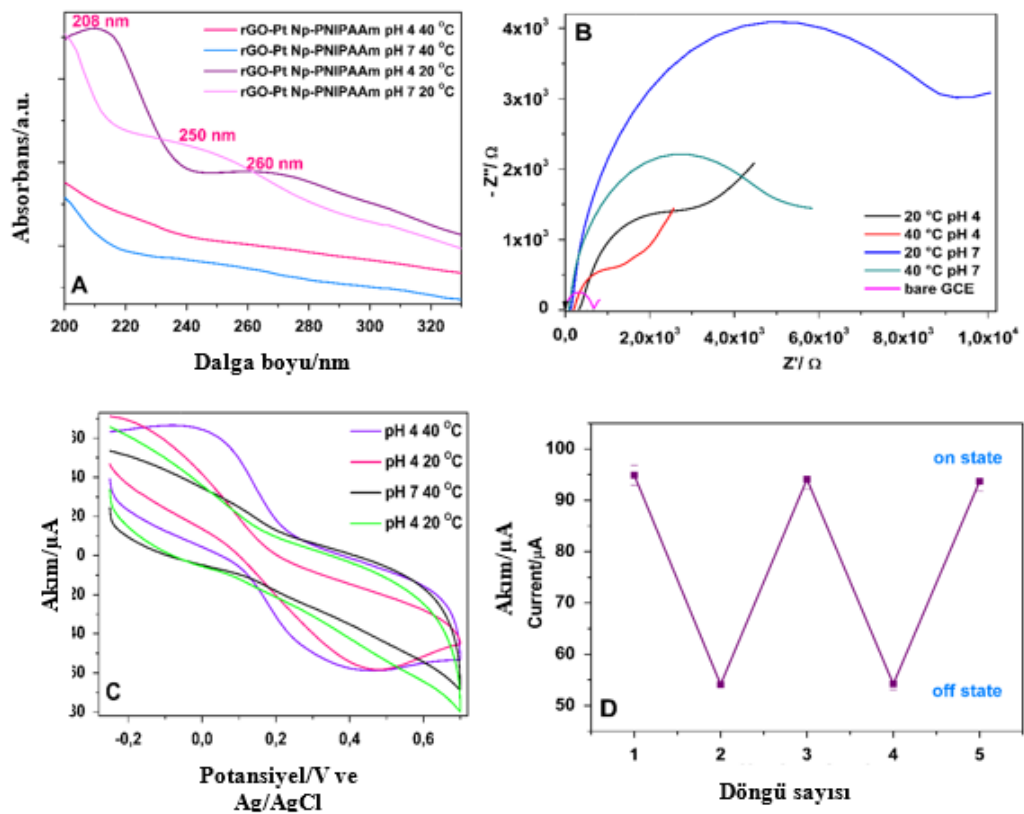
PNIPAAm'in, üretilen biyolojik sensör üzerine çöktürülmesi ile açma kapama biyosensörü elde edilmiştir. Biyokonjugatları içeren PNIPAAm'in elde edilen UV-vis ve FTIR spektrumları değiştirilebilir arayüzlerin pH'a duyarlı bir davranışını ortaya koymuştur. Şekil 6.4.'de, UV bantları sıcaklık değişiminden ziyade pH değişimiyle

oluşmuştur. Şekil 6.4.(A)'da PNIPAAm-iGO-Pt Np-GOx'in UV-vis spektrumu, TA-PNIPAAm etkileşimlerini açıkça göstermektedir. pH 4'te iGO'nun π - π ve n- π geçişleri, hidrofobik bağların hidrojen bağını desteklediğini teyit eden maviye kayması ile gözlenmiştir. Bununla birlikte, bu bantlar pH 7'de kaybolmuştur, bu da PNIPAAm ve TA arasındaki azalan etkileşimleri göstermektedir.

EES, modifikasyon işlemi sırasında elektrot yüzeyinin empedans değişiklikleri hakkında bilgi vermektedir. Modifiye edilmiş elektrotların Nyquist çizimleri, elektron transfer işlemine karşılık gelen daha yüksek frekanslarda bir yarı-daire kısmı ve difüzyon işlemine karşılık gelen daha düşük frekanslarda bir lineer parça içermektedir. PNIPAAm-iGO-Pt Np-GOx modifiye edilmiş elektrotlarındaki yük transfer direnci (R_{ct}), dairesel çaptan elde edilmektedir. Şekil 6.4.(B), elektrotların EES eğrilerini göstermektedir. 40°C ve pH 4'te hassas PNIPAAm-iGO-Pt Np-GOx'in R_{ct} değeri (1290 Ω), CKE'nin (675 Ω) değerinden daha büyüktür ve PNIPAAm içeren nanokompozitin iletkenliğinin azaldığını göstermektedir. Aynı pH'da sıcaklık 20°C'ye azaldığı zaman, R_{ct} değeri 2875 Ω 'a yükselmekte, bu da redoks çiftine $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 'e doğru azalan sıcaklık ile biyosensör yüzey iletkenliğinin azaldığını göstermektedir. pH 7'ye yükseltildiğinde, R_{ct} değerleri sırasıyla 40°C ve 20°C'de 5060 Ω ve 9240 Ω 'a yükselmektedir. Bu, pH 7'de TA'nın, pH 4'e kıyasla daha fazla hidroksil iyonu oluşturabileceğini ve negatif yüklü TA'nın R_{ct} değerlerini arttırarak $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ redoks çiftini itebileceğini açıklamaktadır. Sıcaklık duyarlı PNIPAAm-iGO-Pt Np-GOx nanokompozitinin iletkenliğinin çoğunlukla ortamın pH'ına bağlı olduğu gerçeği; CV eğrileri ve UV-vis spektrumu ile teyit edilmektedir.

PNIPAAm içeren nanokompozitlerin karakterizasyon sonuçlarına göre, pH ve sıcaklığa tepki veren açma-kapama biyosensörünün TA-PNIPAAm etkileşimleri kullanılarak oluşturulabileceği teyit edilmiştir. Şekil 6.4(C)'de polimer kaplı biyosensörlerin CV eğrileri gösterilmektedir. Şekle göre, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 'nin en gelişmiş redoks piki 40°C'de ve pH 4'de gözlenmiştir. Bu değer, yüksek sıcaklıkta polimerin büzüşmüş yapısı ile açıklanabilmektedir.

pH 7'de 40°C ve 20°C'de TA'nın negatif yüklü biçimde bulunmasından dolayı TA ile redoks çifti arasında bir itme meydana gelmekte ve redoks pikleri tamamen kaybolmaktadır. Dolayısıyla, biyosensör 40°C ve pH 4 de açık ve 20°C ve pH 7'de kapalı durumda olmaktadır. Polimerle modifiye edilmiş elektrotların açma ve kapama durumlarındaki tekrarlanabilirlik testleri Şekil 6.4.D'de gösterilmiştir. TA ve PNIPAAm arasındaki tersinir bir etkileşim, biyosensörün iyi tekrarlanabilirliğine yol açmaktadır. Açma-kapama biyosensörü kullanılarak yapılan glikoz ölçümleri Şekil 6.3.C'de gösterildiği gibi 40 °C'de ve pH 4'te (açık durumda) gerçekleştirilmektedir. Şekil 6.3.D'de, açma kapama biyosensörü; 0,9893'lük bir R^2 , 1,02 μM 'lik LOD, 2-10 mM'lük doğrusal bir ölçüm aralığı ile 43,06 mA/mMcm^2 'lik bir hassasiyet sergilemektedir. Bu da biyosensörün ölçüm yanıtının ortam pH ve sıcaklığı ile değiştirilebildiğini göstermiştir.



Şekil 6.4. (A) İki farklı sıcaklık ve pH değerinde iGO-Pt Np-PNIPAAm'nin UV-vis spektrumu, (B) GCE ve PNIPAAm-iGO-Pt Np-GOX'in iki farklı sıcaklık değerindeki Nyquist grafiği, (C) Farklı sıcaklık ve pH değerlerinde PNIPAAm-iGO-Pt Np-GOX'in CV tepkileri, (D) İki farklı sıcaklık değeri arasında -0.1 V'de çevrim sayısı ile amperometrik akımların bağımlılığı

6.5. Tekrarlanabilirlik Modifiye Elektrodun Stabilitesi

Biyosensörün tekrarlanabilirliği 5 mM glikoz içeren fosfat tamponu ile (0,1M, pH 7,4) belirlenmiştir. Aynı biyosensör kullanılarak 10 ardışık ölçüm için, geçerli standart sapması (GSS) %4,7 ile iyi bir tekrarlanabilirlik göstermektedir. Bağımsız olarak hazırlanan altı biyosensör için geçerli yanıtın GSS %4,2 olup, fabrikasyon biyosensörün iyi üretilebilirliğini göstermektedir. Biyosensör; pH 7,4, 0,1 M FT içine batırılarak 4 °C’de saklandığında ve 35 günde bir kez kullanıldığında, ilk tepkisinin % 92’sini korumuştur. Üretilen elektrodun stabilitesi; GOx’in biyoaktivitesini koruması için mükemmel bir mikro ortam sağlayan, iGO-Pt Np nanokompozitinin iyi biyoyumluluk özelliğini göstermektedir.

6.6. İnsan Serumunda Glikoz Analizi Çalışması

Kolayca okside olan dopamin (DA), askorbik asit (AA), ürik asit (UA); biyolojik sıvılardaki glikoz ile bir arada bulunmaktadır. Girişim ölçümü, optimal koşullar altında 5 mM glikoz varlığında CV tekniği ile gerçekleştirilmiştir. Glikoz sinyal yoğunluğunun değişimi, elektrolit çözeltisine 1 mM girişim yapan maddelerin (DA+AA+UA) eklenmesiyle, % 3,8’lik bir GSS’ye karşılık gelmekte ve düşük çalışma potansiyelinden kaynaklanan mükemmel seçiciliği göstermektedir.

Geliştirilen biyosensörün pratik uygulamasını klinik analizde araştırmak için, GOx-AuNPs-iGO/CKE; test edilmeden önce, aynı FT ile 10 kez seyreltme haricinde, herhangi bir numune ön muamelesine tabi tutulmadan, insan serum örneklerinde glikoz tayin etmek için kullanılmıştır. Taze insan serum örneği, Sakarya Üniversitesi Mediko Sosyal Merkezi’nde fotometrik kitlerde analiz edilmiştir. Bir serum örneğinde glikoz konsantrasyonunun, spektrofometri ile elde edilen 4,32 mM değeriyle tutarlı olan 4,18 mM değerinde bulunmuştur. Geri kazanım testleri, 0,3 ve 0,7 mM glikoz serum ekleyerek gerçekleştirilmiş ve 103±6,1% ve 96±4,3% seviyesinde iyileşme sağlanmıştır. Sonuçlar; gerçek numunelerde glikoz algılaması için yeterli bir doğruluk sağlanmış ve bu da klinik analizinde, üretilen biyosensörün pratikte uygulanabileceğini kanıtlamıştır.

BÖLÜM 7. TARTIŞMA VE GENEL DEĞERLENDİRME

Bu tez çalışmasında, elektrokimyasal biyosensörler için gerekenler belirlenerek, GO Hummer metoduna göre sentezlenmiş, kimyasal olarak indirgenmiş ve elektrokimyasal açma-kapama biyosensörü elde edilmiştir. Pt Np'nin elektrokatalitik davranışını, TA'nın biyolojik uyumluluğunu, elektron transfer özelliklerini, iGO'nun gelişmiş yüzey alanını birleştiren yeni bir iGO-Pt Np nanokompoziti tek bir yöntemle sentezlenmiştir. GOx ve GOx-iGO-Pt Np/CKE arasındaki elektron transfer hızı (k_s), Laviron denklemi kullanılarak hesaplanmış, bulunan sonuç Pt Np'nin çökeldiğini göstermektedir. Elde edilen nanokompozit, FAD ve modifiye elektrot arasındaki DET'i etkinleştirmiştir [30]. TA ve iGO, daha hızlı elektron kinetikleri ile iletken bir materyaldir.

GOx'in DET'ye iGO-Pt Np/CKE üzerine etkisi, CV kullanılarak incelenmiş ve ortam pH'ına güçlü bir bağımlılık gözlenmiştir. pH'daki bir azalma hem E_{pa} hem de E_{pc} 'de olumlu bir kaymaya yol açmakta, bu da hidrojen iyonlarının GOx ile elektrokimyasal tepkimeye girdiğini göstermektedir. DET'i kullanarak, glikozun elektrokimyasal tespiti ÜNB sistemine dayanılarak ölçülmüş ve geniş doğrusal ölçüm aralığı, yüksek hassasiyet ve kararlılığa sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca, elektrokimyasal biyosensör geliştirmek için yeni bir yaklaşımla üretilen biyolojik sensörün içeceklerde glikoz ölçümü için iyi bir doğruluk ve yüksek seçiciliğe sahip olduğu bulunmuştur. Kimyasal ve elektrokimyasal olarak oksitlenmiş TA, GOx ve elektrot arasındaki elektron transferini sağlamıştır. TA'nın; biyoelektronik ile ilgili alanlarda yeşil indirgeme işlemleri, enzimi immobilize etme ve elektron transferi için uygun-doğal bir ürün olduğu gösterilmiştir. Hızlı, çevre dostu ve düşük maliyetli sentezlenmiş iGO-Pt Np nanokompozit; elektrokimyasal glikoz biyosensörü için uygundur ve diğer enzim esaslı ÜNB'lerin üretimi için de kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- [1] Özyurt, M., “Glukoz Tayini için yeni bir biyosensör Hazırlanması” Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2014.
- [2] Olsan, A., “Glucose and glucose containing syrups”, Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry, VCH Publishers, New York, A. 12: 457-475 (1991).
- [3] Li, Y., Liu, X., Yuan, H. and Xiao D., “Glucose biosensör based on the roomtemperature phosphorescence of TiO₂/SiO₂ nanocomposite, “Biosensors and Bioelectronics, 24:3706-3710 (2009).
- [4] Comba, F. N., Rubianes, M. D. Herrasti, P. and Rivas, G.A., “Glucose biosensing at carbon paste electrodes containing iron nanoparticle”, Sensors and Actuators B, 149:306-309, (2010).
- [5] www.biyoloji.com/enzim.htm., Erişim Tarihi: 18.06.2017.
- [6] <https://www.slideshare.net/>, Erişim Tarihi: 25.07.2017.
- [7] Naslıyan, M.V. “Çeşitli dokulardan aldoz redüktaz enziminin izolasyon ve immobilizasyonu” Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2012.
- [8] Kasovi,C., “Kovalent bağlanma ve fiziksel adsorpsiyon metotları ile protez enziminin immobilizasyonu” İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, 2006.
- [9] Library.cv.edu.tr/tezler/6600.pdf., Erişim Tarihi:18.06.2017.
- [10] Meral,B., Özbek,F., Öney,R., Kimya mühendisliğine Giriş ders kitabı, Biyosensörler Ankara Üniversitesi, Ankara (30-35), (2006).
- [11] Demircioğlu, P., Börekci, İ. “biyosensörler”.
- [12] Biyosensörler/turkce/cesit.html., Erişim Tarihi:10.06.2017.
- [13] Uyar,I., Güven,Ö., Atkay,I., “Biyosensörler” Dokuz Eylül Üniversitesi, Fen Bilimleri Anabilim Dalı.

- [14] M., Tiyeek İ., M. Sabri Ersoy, Alma, M., Dönmez, U., Behzat Yıldırım, Salan, T., Karataş, Ş., Uruş, S., Karakteri, İ., Yıldız, K., “Modifiye Hummers yöntemiyle Grafen Oksit (GO) Sentezi ve Karakterizasyonu” Fen bilimleri Enstitüsü, 2016.
- [15] Bakır,S., Kenan,V., “Oksidaz Aktivitesi Üzerine in vitro Etkisinin incelenmesi” Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı”,2016
- [16] www.google.com., Erişim Tarihi: 19.09.2017
- [17] Topçu A.A., “A green pathway for the production of chemically exfoliated graphene sheet with the assistance of microwave irradiation”, Master of Science, Koç University, Material Science and Engineering, İstanbul, 15, 2012.
- [18] A.O. Osikoya, O. Parlak, N.A. Murugan, E. Dixon Dikio, H. Moloto, L. Uzun, A.p. Turner, A. Tiwari, Acetylene-sourced CVD-synthesised catalytically active graphene for electrochemical biosensing, (2016). Doi:10.1016/j.bios.2016.03.063.
- [19] H. Wu, J. Wang, X. Kang, C. Wang, D. Wang, J. Liui I.A. Aksay, Y. Lin, Glucose biosensor based on immobilization of oxidase in platinum nanoparticles/graphene/chitosan nanocomposite film, *Talanta*. (2009). Doi:10.1016/j.talanta.2009.06.054.
- [20] U.B. Jensen, E.E. Farapontova, D.S. Sutherland, Quantifying protein adsorption and function at nanostructured materials:Enzymatic activity of glucose oxidase at GLAD structured electrodes. *Langmuir* (2012). doi:10.1021/1a3017672.
- [21] K. Atacan, B. Cakiroglu, M. Ozacar, Covalent Immobilization of Trypsin onto Modified Magnetite Nanoparticles and its Application for Casein Digestion, *Int. J. Biol. Macromol.* (2017). Doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.01.023.
- [22] M.C.R. Franssen, P. Steunenbergh, E.L. Scott, H. Zuilhof, J.P.M. Sanders, Immobilised enzymes in biorenewables production, *Chem. Soc. Rev. Chem. Soc.* 42 (2013) 6491-6533. Doi:10.1039/c3cs00004d.
- [23] S. Su, J. Wang, E. Vargas J. Wei, R. Martinez-Zagulian, S. R. Sennoune, M. L. Pantoya, S. Wang, J. Chaudhuri, J. Qiu, Porphyrin Immobilized Nanographene Oxide for Enhanced and Targeted Photothermal Therapy of Brain Cancer, *ACS Biomater. Sci. Eng.*(2016). Doi:10.1021/acsbiomaterials.6b00290.

- [24] .M. Kumar, B.K. Mandal, S. K. Tammina, Green synthesis of nano platinumum using naturally occurring polyphenols, RSC Adv. (2013) Doi:10.1039/c3ra22959a.
- [25] T.Terse-Thakoor, K. Komori, P.Ramnani, I. Lee, A. Mulchandani, Electrochemically Functionalized Seamless Three-Dimensional Graphene – Carbon Nanotube Hybrid for Direct Electron Transfer of Glucose Oxidase and Bioelectrocatalysis, Langmuir. (2015). Doi.10.1021/acs.langmuir.5b03273.
- [26] H.Razmi, R. Mohammas-Rezai, Graphene quantum dots as a new substrate for immobilization and direc electrochemistry of glucose oxidase: Application to sensiteve glucose determination, Biosens. Bioelectron. (2013). Doi:10.1016/j.bios.2012.09.009.
- [27] H-Z Zhao, J.-J. Sun, J. Song, Q.-Z. Yang, Direct elektron tranfer and conformational change of glucose oxidase on carbon nanotube-based electrondes, Carbon N. Y. 48 (2009)1508-1514. Doi:10.1016/J. Carbon.20009.12.046.
- [28] R.Devansenathipathy, V. Mani, S. M. Chem, S.T. Huang, C. T. Huang, C. M. Link, K. Y. Hwa, T.Y. Chen, B.J. Chen, Glucose biosensor based on glucose oxidase imobilized at gold nanoparticles decoreted graphene-carbon, Enzym Microb. Tecnol. Doi:10.1016/J.enzimictec.2015.06.006.
- [29] J.Li, S.N. Tan, H, Ge, Silica sol-gel immobilized amperometric biosensor for hyrogen peroxide, Anal. Chim. Acta. (1996). Doi:10.1016/s0003-260(96)006-6.
- [30] V.Mani, B. Devadas, S.M. Chem, S.M. Chen, Directelectrohemistry of glucose at electtrochemically reduced graphene oxide-multiwalled carbon nanotubes hybrid material modified electrode for glucose biosensor, Biosens. Bioelectron (2013). Doi:10.1016/j.bios.2012.08.045.

ÖZGEÇMİŞ

Bilge AKKAYA, 11.03.1993 tarihinde İstanbul'da doğdu. İlköğretim, ortaöğretim, lise eğitimlerini İstanbul'da tamamladı. 2011 yılında Erenköy kız lisesinden mezun oldu. 2011 yılında başladığı Sakarya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya bölümünden 2016 yılında mezun oldu. 2016 yılında Sakarya Üniversitesi Kimya bölümü Fizikokimya bilim dalında yüksek lisansa başladı.