



MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

GLUKOZ OKSİDAZ ENZİMİNİN İLETKEN POLİMERLERE
İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU

FULYA CAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANTAKYA / HATAY
HAZİRAN - 2010

**MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GLUKOZ OKSİDAZ ENZİMİNİN İLETKEN POLİMERLERE
İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

FULYA CAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Yrd.Doç.Dr. Gül ÖZYILMAZ danışmanlığında hazırlanan bu tez 10/06/2010 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oy birliği ile kabul edilmiştir.

Yrd.Doç.Dr. Gül ÖZYILMAZ
Başkan

Doç.Dr. A. Tuncay ÖZYILMAZ
Üye

Doç.Dr. İ. Hakkı KARAHAN
Üye

Bu tez Enstitümüz Kimya Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

Doç.Dr. Erdal YILMAZ
Enstitü Müdür v.

Bu çalışma Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 01 Y 0103

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
1.1.Biyosensörler.....	1
1.1.1.Biyosensörlerin Yapısı ve Fonksiyonu.....	1
1.1.2.Biyosensörlerin Temel Bileşenleri.....	3
1.1.3.Elektrokimyasal Esaslı Dönüştürücüler.....	4
1.1.3.1. Amperometri Esaslı Dönüştürücüler.....	4
1.1.3.2. Potansiyometri Esaslı Dönüştürücüler.....	6
1.1.3.3. Yarı İletkenleri Esas Alan Dönüştürücüler.....	7
1.1.3.4. Kondüktometrik Dönüştürücüler.....	7
1.1.4 .Optik Esaslı Dönüştürücüler.....	7
1.1.5. Kalorimetri Esaslı Dönüştürücüler.....	8
1.1.6. Piezoelektrik Esaslı Dönüştürücüler.....	8
1.1.7. Analizlenecek Madde-Biyoaktif Bileşen İlişkisine Göre Biyosensör Sınıflaması.....	9
1.1.8. Biyosensörlerde Biyoaktif Bileşen İmmobilizasyon Yöntemleri.....	12
1.1.8.1. Adsorpsiyon.....	12

1.1.8.2. Tutuklama.....	13
1.1.8.3. Kovalent Bağlama.....	13
1.1.8.4. Çapraz bağlama.....	14
1.1.9. İdeal Bir Biyosensörün Özellikleri.....	14
1.1.10. Biyosensörlerin Uygulama Alanları.....	17
1.2. İletken Polimerler.....	20
1.2.1. İletken Polimerlerde İletkenlik Teorisi.....	23
1.2.2. İletken Polimerlerin Elektrokimyasal Sentezi ve Biyosensör Uygulamaları.....	25
1.2.3. Polipirol.....	27
1.2.3.1. Polipirolün Kimyasal ve Elektrokimyasal Sentezi.....	28
1.3. Glukoz ve Önemi.....	32
1.4. Glukoz Oksidaz.....	33
1.4.1. GOD'nin Genel Özellikleri.....	34
1.4.2. GOD'nin Reaksiyon Mekanizması.....	34
1.4.3. Glukoz Oksidaz Elektrotu ile Glukoz Tayini.....	38
1.5. Voltametrik Yöntemler.....	40
1.5.1. Doğrusal Taramalı ve Dönüşümlü Voltametri.....	41
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	43
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	51
3.1. Materyal.....	51
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	51
3.1.2. Elektrokimyasal Ölçümler İçin Kullanılan Elektrotlar.....	51
3.1.3. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	52

3.2. Yöntem.....	52
3.2.1. Elektrotların Hazırlanması ve Temizlenmesi.....	52
3.2.2. Sentez Ortamının Hazırlanması ve Glukoz Oksidazın İmmobilizasyonu.....	53
3.2.3. Kaplanmış Elektrotların SEM Görüntülerinin ve Dijital Fotoğraflarının Çekilmesi.....	54
3.2.4. Glukoz Biyosensörünün Elektrokimyasal Karakterizasyonu.....	55
3.2.5. Glukoz Biyosensörünün Biyokimyasal Karakterizasyonu.....	55
3.2.5.1. Potansiyelin Etkisi.....	55
3.2.5.2. pH Etkisi.....	55
3.2.5.3. Glukoz Derişiminin Etkisi.....	55
3.2.5.4. Glukoz Biyosensörünün Tekrar Kullanım Kararlılığının Belirlenmesi.....	56
3.2.5.5. Glukoz Biyosensörünün Raf Ömrünün Belirlenmesi.....	56
3.2.6. Glukoz Biyosensörünün Ticari Sıvı ve İçeceklerdeki Glukoz Tayini.....	56
4.ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	58
4.1. Enzim Elektrotlarının Oluşturulması.....	58
4.1.1. pTSA Ortamında.....	58
4.1.2. NapTS Ortamında.....	62
4.2. Pt, Pt / PPy ve Pt / PPy – GOD Elektrotlarının Dijital Fotoğrafları ve SEM Görüntüleri.....	67
4.2.1. pTSA Ortamında.....	67

4.2.2. NapTS Ortamında.....	69
4.3. Glukoz Biyosensörünün Elektrokimyasal Karakterizasyonu.....	70
4.3.1. Pt/PPy-GOD _{pTSA} ve Pt/PPy-GOD _{NapTS} Elektrotların DTV	
Eğrileri.....	70
4.3.2. Pt/PPy-GOD _{pTSA} ve Pt/PPy-GOD _{NapTS} Elektrotların DV	
Eğrileri.....	72
4.4. Glukoz Biyosensörünün Biyokimyasal Karakterizasyonu.....	75
4.4.1. Potansiyelin Etkisi.....	75
4.4.2. pH'ın Etkisi.....	76
4.4.3. Substrat Derişiminin Etkisi.....	76
4.4.4. Biyosensörün Tekrar Kullanılabilirliği.....	79
4.4.5. Biyosensörün Raf Ömrü.....	82
4.4.6. Ticari Sıvı ve İçeceklerde Glukoz Tayini.....	83
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	85
KAYNAKLAR.....	87
TEŞEKKÜR.....	91
ÖZGEÇMİŞ.....	92

ÖZET

**GLUKOZ OKSİDAZ ENZİMİNİN İLETKEN POLİMERLERE
İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

Bu çalışmada yüzey alanı $0,18 \text{ cm}^2$ olan platin levha üzerine dönüşümlü voltametri tekniği ile para toluen sülfonik asit (pTSA) ve sodyum para toluen sülfonat ortamında (NapTS) polipirol (PPy) sentezlenmiş ve sentez ortamında bulunan glukoz oksidaz (GOD) enziminin eş zamanlı olarak immobilize edilmesi ile glukoz biyosensörü tasarlanmıştır. Pt/PPy-GOD_{pTSA} ve Pt/PPy-GOD_{NapTS} enzim elektrotların SEM görüntüleri ve dijital fotoğrafları elde edilmiş ve GOD içermeyen elektrotlar için elde edilen görüntüler ile karşılaştırılarak enzimin immobilizasyonu teyit edilmiştir. Elektrotlar farklı glukoz derişimlerinde dönüşümlü voltametri ve doğrusal taramalı voltametri teknikleri ile karakterize edilmiştir. Elde edilen Pt/PPy-GOD_{pTSA} ve Pt/PPy-GOD_{NapTS} enzim elektrotları için optimum potansiyel değerleri sırasıyla 0,7 ve 0,6 V; optimum pH değerleri ise sırasıyla 4,5 ve 7,0 olarak bulunmuştur. Glukoz derişimine bağılı olarak (0,05-30 mM) gözlenen akım değerlerinde her iki elektrot için 1mM glukoz derişimine kadar doğrusal bir artış gözlenmiş, ancak daha yüksek glukoz derişimlerinde akım değerlerindeki artış azalmıştır. Lineweaver-Burk eğrisinden Pt/PPy-GOD_{pTSA} ve Pt/PPy-GOD_{NapTS} için K_M değerleri sırasıyla 5,2 ve 1,7 mM, I_{max} değerleri ise 14,2 ve 25,4 μA olarak hesaplanmıştır. Glukoz biyosensörünün depolama kararlılığı sulu tampon ortamında bekletilerek ayrı ayrı ölçülmüştür. Genel olarak Pt/PPy-GOD_{NapTS} elektrodunun depolama kararlılığının daha yüksek olduğu, ancak 30 gün sonunda her iki elektrodun aktivitelerinin neredeyse tamamını kaybettikleri gözlenmiştir. Pt/PPy-GOD_{pTSA} ve Pt/PPy-GOD_{NapTS} elektrotların tekrar kullanım kararlılıkları 5, 10 ve 20 mM glukoz çözeltilerinde belirlenmiş ve 50 ardışık ölçüm sonrasında Pt/PPy-GOD_{NapTS} elektrodunun daha yüksek kararlılık gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca Pt/PPy-GOD_{pTSA} elektrodunun tekrar kullanım kararlılığı glukoz derişimi arttıkça azalırken Pt/PPy-GOD_{NapTS} elektrodunun tekrar kullanım kararlılığı glukoz derişiminden etkilenmemiştir. Ayrıca tasarlanan biyosensörler ile malt ieeği, gazoz, şarap, bal ve üzüm suyu olmak üzere 5 sıvıda glukoz tayini yapılmış ve Pt/PPy-GOD_{NapTS} elektrodunun Pt/PPy-GOD_{pTSA} elektroda göre daha doğru sonuçlar verdiği gözlenmiştir.

2010, 105 sayfa

Anahtar Kelimeler: Glukoz oksidaz, immobilizasyon, glukoz biyosensörü, polipirol, sodyum p-toluen sülfonat, p-toluen sülfonik asit, dönüşümlü voltametri, platin elektrot

ABSTRACT

IMMOBILIZATION OF GLUCOSE OXIDASE ON CONDUCTIVE
POLYMERS AND CHARACTERIZATION

In this study, polypyrrole (PPy) was synthesized on Pt electrode which has 0.18 cm^2 surface area, using p-toluene sulphonic acid (pTSA) and sodium p-toluene sulphonate (NapTS) medium by cyclic voltammetry technique and glucose biosensor was designed by simultaneously immobilization of glucose oxidase (GOD) which already in the electrolyte solution. SEM images and digital photos of Pt/PPy-GOD_{pTSA} ve Pt/PPy-GOD_{NapTS} enzyme electrodes were get and compared with those of GOD free electrodes and it was confirmed that GOD was successfully immobilized. Electrodes were characterized in glucose solutions at varied concentrations using Cyclic Voltammetry and Linear Sweep Voltammetry Techniques. Optimal potentials were determined as 0.7 and 0.6 V; optimal pH values were determined as 4.5 and 7.0 for Pt/PPy-GOD_{pTSA} and Pt/PPy-GOD_{NapTS} electrodes, respectively. Current values were determined depending on glucose concentration (0.05-30 mM) and it was observed that current values proportionally increased by increase in glucose concentration upto 1 mM and then increment decreased at higher glucose concentration for both electrodes. K_M values were calculated as 5,2 ve 1,7 mM and I_{\max} values were determined as 14,2 ve 25,4 μA for Pt/PPy-GOD_{pTSA} ve Pt/PPy-GOD_{NapTS}, respectively using Lineweaver-Burk plots. Storage stabilities of glucose biosensors were measured by storing in buffer solutions. In general, Pt/PPy-GOD_{NapTS} electrode showed beter stability, but at the end of the 30 days, it was observed that both electrodes nearly lost all of their activities. Operational stabilities of Pt/PPy-GOD_{pTSA} and Pt/PPy-GOD_{NapTS} electrodes were determined in 5, 10 ve 20 mM glucose solutions and after 50 repeatedly uses it was observed that Pt/PPy-GOD_{NapTS} electrode was more stable. Moreover, operational stability of Pt/PPy-GOD_{pTSA} electrode decreased by increase in glucose concentration while Pt/PPy-GOD_{NapTS} electrode did not influenced by substrate concentration. Biosensors were also used to determine the glucose levels of commercial beverages such as malt dirink, fizzy drink, wine, honey and grape juice and it was observed that results of Pt/PPy-GOD_{NapTS} were more satisfied than those of Pt/PPy-GOD_{pTSA} electrode.

2010, 105 pages

Key Words: Glucose oxidase, immobilization, glucose biosensor, Polypyrrol, sodium p-toluene sulfonate, p-toluene sulfonic acid, cyclic voltammetry, platinum electrode

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CAT: Katalaz

DNA: Deoksiribonükleik asit

DTV: Doğrusal Taramalı Voltametri

DV: Dönüşümlü Voltametri

FAD: Flavin Adenin Dinükleotid

GOD: Glukoz Oksidaz

I: Akım

I_{MAX} : Maksimum Akım

K_M : Michaelis-Menten Hız Sabiti

NAD: Nikotinamid adenin dinükleotid

NapTS: Sodyum para Tolun Sülfonat

PPy: Polipirol

PTSA: Para Toluen sülfonik asit

[S]: Substrat Derişimi

SEM: Taramalı Elektron Mikroskobu

UV: Ultravioleto-visible

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 1.1. Biyosensör Grupları ve Kapsadıkları Analiz Alanları.....	18
Çizelge 1.2. Yaygın olarak kullanılan bazı iletken polimerler.....	23
Çizelge 4.1. Bazı içeceklerin glukoz derişimlerinin glukoz kiti ve Pt/PPy-GOD elektrotları ile belirlenmesi ve karşılaştırılması.....	84

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Bir biyosensörün genel gösterimi.....	1
Şekil 1.2. Bir biyosensörün şematik gösterimi.....	2
Şekil 1.3. Bir biyosensör olarak burun.....	2
Şekil 1.4. Amperometrik esaslı bir biyosensörün şematik gösterimi.....	5
Şekil 1.5. Enzim sensörünün çalışma ilkesi.....	5
Şekil 1.6. Potansiyometrik esaslı bir biyosensörün şematik gösterimi.....	6
Şekil 1.7. Enzim alan etki transistörünün şematik gösterimi.....	7
Şekil 1.8. Optik esaslı enzim sensörünün şematik gösterimi.....	8
Şekil 1.9. Termal enzim sensörünün şematik gösterimi.....	8
Şekil 1.10. Piezoelektrik esaslı enzim sensörünün şematik gösterimi.....	9
Şekil 1.11. Biyoaffinite esaslı biyosensörlerin şematik gösterimi.....	10
Şekil 1.12. Biyokatalitik esaslı biyosensörler.....	11
Şekil 1.13. İmmobilize hücre esaslı biyosensörler.....	11
Şekil 1.14. Transmembran esaslı biyosensörler.....	12
Şekil 1.15. Bir biyosensör için kalibrasyon eğrisi. (Eğride doğrusal bir cevap aralığı (○), tayin sınırının altındaki derişimlerde ve daha yüksek derişimlerde doğrusal olmayan davranış (●) görülmektedir. Hassasiyet doğrusal cevap aralığının eğimi olarak tanımlanır).....	15
Şekil 1.16. Konjugasyon hatalarının poliasetilen üzerinde gösterimi.....	24
Şekil 1.17. Polipirolün elektrokimyasal sentez yoluyla oluşumu.....	26
Şekil 1.18. Pirol ve rezonans formlarının yapısı.....	28
Şekil 1.19. Pirolün elektrokimyasal polimerizasyonu için önerilen reaksiyon mekanizması. A) Elektrofilik aromatik süstitüsyon ve B)	

Radikal birleşmesi.....	30
Şekil 1.20. Nötral (katkılanmamış) polipirol yapısı.....	31
Şekil 1.21. Polipirolün yükseltgenmiş yapısı (bipolaron).....	31
Şekil 1.22. Polipirolün yükseltgenme-indirgenme mekanizması.....	32
Şekil 1.23. GOD nin etki mekanizması.....	35
Şekil 1.24. GOD enziminin yapısındaki FAD grubu.....	35
Şekil 1.25. İzoalloksazin halkasının indirgenmesi.....	36
Şekil 1.26. İndirgenmiş izoalloksazin halkasının O ₂ ile tekrar yükseltgenme mekanizması.....	37
Şekil 1.27. GOD immobilize POAF'ün PPy-Pt nanokompozit filmi üzerine kaplanmasıyla oluşturulmuş glukoz sensörü ve işleyiş mekanizması.....	39
Şekil 1.28. Doğrusal taramalı voltametrde (a) gerilim taramasının zamanla değişimi ve (b) elde edilen voltogram.....	41
Şekil 1.29. Dönüşümlü voltametrde (a) gerilim taramasının zamanla değişimi ve (b) elde edilen voltammogram.....	42
Şekil 3.1. Tek hücreli üç elektrot sisteminin şematik gösterimi.....	53
Şekil 3.2. Sentezde kullanılan CHI 660b cihazı.....	54
Şekil 4.1. Platin elektrotun 0,20 M pTSA (---); 0,20 M pTSA + 0,10 M pirol (Δ) ve 0,20 M pTSA + 0,10 M pirol + 2,0 mg/ml GOD (■) çözeltisi içerisinde elde edilen birinci dönüşümlü voltammogram eğrileri (tarama hızı: 50 mV/s).....	59
Şekil 4.2. Platin elektrotun monomersiz 0,20 M pTSA sulu çözeltisi içerisinde elde edilen dönüşümlü voltammogram eğrileri (tarama hızı: 50 mV/s).....	60

- Şekil 4.3. Platin elektrotun 0,20 M pTSA + 0,10 M pirol çözeltisi içerisinde elde edilen dönüşümlü voltammogram eğrileri (tarama hızı: 50 mV/s).....61
- Şekil 4.4. Platin elektrotun 0,20 M pTSA + 0,10 M pirol + 2,0 mg/ml GOD çözeltisi içerisinde elde edilen dönüşümlü voltammogram eğrileri (tarama hızı: 50 mV/s).....62
- Şekil 4.5. Platin elektrotun 0,20 M NapTS (---); 0,20 M NapTS+ 0,10 M pirol (Δ) ve 0,2 M NapTS + 0,10 M pirol + 2,0 mg/ml GOD (\blacksquare) çözeltisi içerisinde elde edilen birinci dönüşümlü voltammogram eğrileri (tarama hızı: 50 mV/s).....63
- Şekil 4.6. Platin elektrotun 0,20 M NapTS sulu çözeltisi içerisinde elde edilen dönüşümlü voltammogram eğrileri (tarama hızı: 50 mV/s).....64
- Şekil 4.7. Platin elektrotun 0,20 M NapTS + 0,10 M pirol çözeltisi içerisinde elde edilen dönüşümlü voltammogram eğrileri (tarama hızı: 50 mV/s).....65
- Şekil 4.8. Platin elektrotun 0,20 M NapTS + 0,10 M pirol + 2,0 mg/ml GOD çözeltisi içerisinde elde edilen dönüşümlü voltammogram eğrileri (tarama hızı: 50 mV/s).....66
- Şekil 4.9. Çıplak platin elektrotun fotoğrafı.....68
- Şekil 4.10. Pt/PPy_{pTSA} (a) ve Pt/PPy-GOD_{pTSA} elektrotlarının (b) SEM görüntüleri.....68
- Şekil 4.11. Pt/PPy_{pTSA} (a) ve Pt/PPy-GOD_{pTSA} elektrotlarının (b) dijital fotoğrafları...69
- Şekil 4.12. Pt/PPy_{NapTS} (a) ve Pt/PPy-GOD_{NapTS} elektrotlarının (b) SEM görüntüleri...69
- Şekil 4.13. Pt/PPy_{NapTS} (a) ve Pt/PPy-GOD_{NapTS} elektrotlarının (b) dijital fotoğrafları..70
- Şekil 4.14. Pt/PPy-GOD_{pTSA} elektrotuyla elde edilen doğrusal taramalı voltammogram eğrileri (tarama hızı: 1mV/s. 0 mM (----), 5 mM (●), 10mM (Δ), 20 mM (\square) glukoz çözeltileri).....71

- Şekil 4.15. Pt/PPy-GOD_{NapTS} elektrotuyla elde edilen doğrusal taramalı voltammogram eğrileri (tarama hızı: 1mV/s. 0 mM (----), 5 mM (●), 10mM (Δ), 20 mM (□) glukoz çözeltileri).....71
- Şekil 4.16. Pt/PPy-GOD_{pTSA} elektrotuyla elde edilen birinci dönüşümlü voltammogram eğrileri (tarama hızı: 5mV/s. 0 mM (----), 10mM (Δ), 20 mM (■) glukoz çözeltileri).....72
- Şekil 4.17. Pt/PPy-GOD_{pTSA} elektrotuyla elde edilen onuncu dönüşümlü voltammogram eğrileri (tarama hızı: 5mV/s. 0 mM (----), 10 mM (▲), 20 mM (□) glukoz çözeltileri).....73
- Şekil 4.18. Pt/PPy-GOD_{NapTS} elektrotuyla elde edilen birinci dönüşümlü voltammogram eğrileri (tarama hızı: 5mV/s. 0 mM (----), 10 mM (▲), 20 mM (□) glukoz çözeltileri).....74
- Şekil 4.19. Pt/PPy-GOD_{NapTS} elektrotuyla elde edilen onuncu dönüşümlü voltammogram eğrileri (tarama hızı: 5mV/s. 0 mM (----), 10 mM (▲), 20 mM (□) glukoz çözeltileri).....74
- Şekil 4.20. Potansiyelin biyosensör cevap akımına etkisi pTSA (Δ), NapTS (▲).....75
- Şekil 4.21. pH'ın biyosensör aktivitesine etkisi (●) Pt/PPy-GOD_{NapTS} ve Pt/PPy-GOD_{pTSA} (o).....76
- Şekil 4.22 Pt/PPy-GOD_{pTSA} elektrotu ile ölçülen akım değerlerinin glukoz derişimine bağlı olarak değişimi.....77
- Şekil 4.23. Pt/PPy-GOD_{NapTS} elektrotu ile ölçülen akım değerlerinin glukoz derişimine bağlı olarak değişimi78
- Şekil 4.24. Farklı glukoz derişimlerinde Pt/PPy-GOD_{NapTS} elektrotunun tekrar kullanım kararlılığı (◇ : 5 mM, ● : 10 mM, Δ : 20 M).....80
- Şekil 4.25. Farklı glukoz derişimlerinde Pt/PPy-GOD_{pTSA} elektrotunun tekrar kullanım kararlılığı(◇ : 5 mM, ● : 10 mM, Δ : 20mM).....80
- Şekil 4.26. Biyosensörün depolama kararlılığı (▲) Pt/PPy-GOD_{NapTS}; (o) Pt/PPy-

GOD _{pTSA}	82
Şekil 4.27. Kit ile hazırlanan standart glukoz eğrisi.....	83

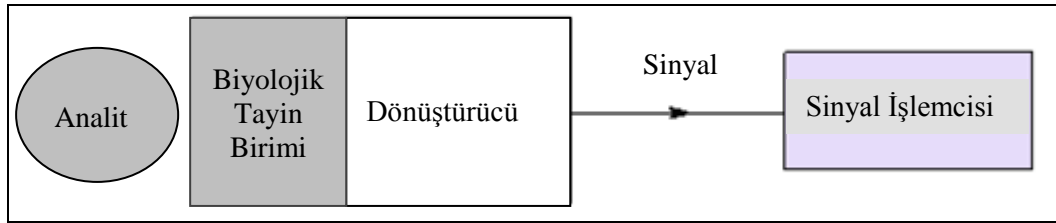
1. GİRİŞ

1.1. Biyosensörler

1.1.1. Biyosensörlerin Yapısı ve Fonksiyonu

Biyosensörlerin tarihi 1950 yılının ikinci yarısında L.C. Clark'ın Cincinnati Hastanesi'nde (Ohio, ABD) ameliyat sırasında kanın O₂ miktarını bir elektrot ile izlemesiyle başlar.

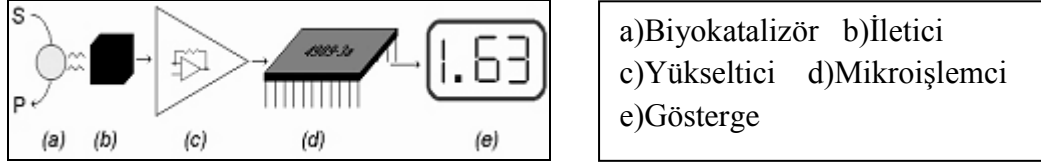
Biyosensörler (biyoalgılayıcılar), bünyesinde biyolojik bir algılayıcı bulunan ve bir fizikokimyasal dönüştürücüyle birleştirilmiş analitik cihazlar olarak tanımlanmaktadır. Bir biyosensörün amacı, bir veya bir grup analitin (analiz edilecek madde) miktarıyla orantılı olarak sürekli sayısal elektrik sinyali üretmektir. Şekil 1.1. bir biyosensörün genel yapısını göstermektedir.



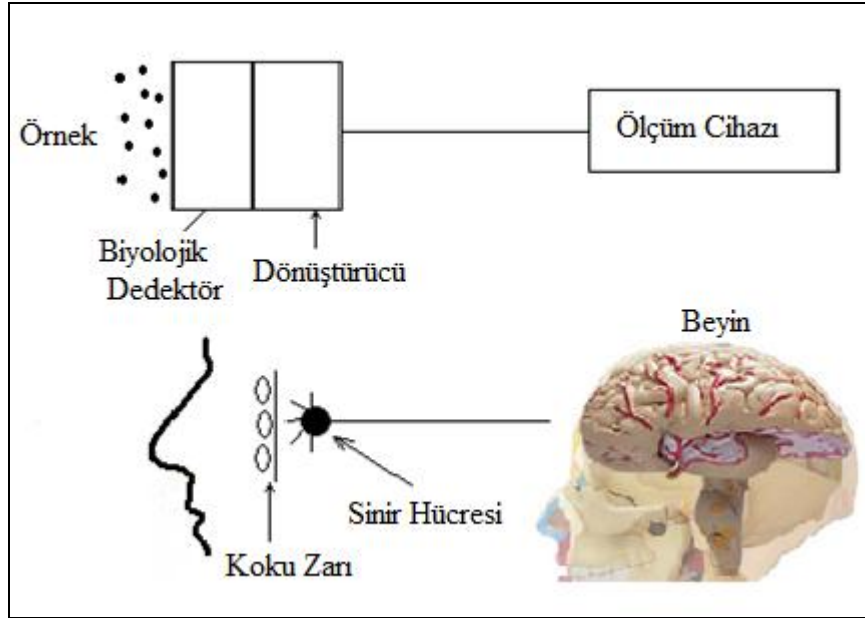
Şekil 1.1. Bir biyosensörün genel gösterimi (Özcan, 2008)

Biyosensör sistemleri üç temel bileşenden oluşmaktadır. Bunlar; seçici tanıma mekanizmasına sahip "biyomolekül/biyoajan", bu biyoajanın incelenen maddeyle etkileşmesi sonucu oluşan fizikokimyasal sinyalleri elektronik sinyallere dönüştürebilen "dönüştürücü" ve "elektronik" bölümlerdir. Bu bileşenlerden en önemlisi, tayin edilecek maddeye karşı son derece seçimli fakat tersinir bir şekilde etkileşime giren, duyarlı biyolojik ajandır (Telefoncu, 1999). Örneğin burnumuzla tayin ettiğimiz koku aslında çok düşük miktarlardaki kimyasallardır. Kimyasallar koku zarlarından geçerek analite duyarlı biyolojik bir bileşen olan koku keselerine ulaşırlar ve tayin edilirler. Şekil 1.3. genelleştirilmiş bir biyosensör sistemiyle koku alma sistemimizi karşılaştırmalı olarak göstermektedir. Burun delikleri yardımıyla toplanan koku örnekleri, koku zarları (biyolojik bileşen) tarafından algılanır. Koku zarının cevabı koku sinir hücreleri (dönüştürücü) tarafından elektriksel sinyale dönüştürülür ve değerlendirilmek üzere

sinirler yardımıyla beyne iletilir. Beyin bu sinyali koku dediğimiz hisse dönüştürdüğünden bir mikroişlemci olarak davranır (Özcan, 2008). Şekil 1.2.'de bir biyosensörün şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 1.2. Bir biyosensörün şematik gösterimi



Şekil 1.3. Bir biyosensör olarak burun

Böylece, bir dönüştürücüyle bağlantılı biyolojik bir algılama biriminin beraberce oluşturduğu cihaz biyosensör olarak tanımlanmaktadır. Dönüştürücü, genellikle özel bir kimyasalın veya kimyasal türünün derişimiyle orantılı büyüklüğe sahip ölçülebilir elektronik bir sinyali gözlenebilen fiziksel veya kimyasal bir birime dönüştürür. Sonuçta biyolojik sistemlerin hassasiyeti ve spesifikliğı ile mikroişlemcilerin sahip olduğu bilgisayarlı hesaplama üstünlüğü bir araya gelmektedir (Eggins, 1996).

1.1.2. Biyosensörlerin Temel Bileşenleri

Biyosensörler, genel olarak analizlenecek madde ile seçimli bir şekilde etkileşime giren biyoaktif bir bileşenin, bu etkileşim sonucu ortaya çıkan sinyali ileten bir iletici sistemle birleştirilmesi ve bunların bir ölçüm sistemiyle kombinasyonu sonucu oluşturulurlar. Biyosensörlerin temel bileşenlerini şöyle sıralayabiliriz:

Analitler; analizlenecek madde ve yapılar genel olarak analit olarak adlandırılırlar. Bunlara anorganik ve organik maddeler, metal iyonları, substratlar, aktivatörler, inhibitörler, makromoleküller, enzimler, koenzimler, hormonlar, antikorlar, antijenler, nükleik asitler, virüsler, mikroorganizmalar gibi örnekler verilebilir.

Biyoaktif Yapılar (Biyokomponentler); biyosensörlerde kullanılan ve analizlenecek madde ile spesifik bir şekilde etkileşime giren biyoaktif bileşenler, komplekslik hiyerarşisine göre basitten karmaşığa doğru bir sıralama yapıldığında; iyonoforlar, antikorlar, enzimler, nükleik asitler, lipozomlar, biyomembranlar (örneğin membran algılayıcıları), hücre organelleri (örneğin mitokondri), tüm hücreler, doku kesitleri ve homojenatları ve organlar (örneğin koku alma organı) olarak sınıflandırılabilirler.

Biyosensörlerin yapısında görev alan biyoaktif yapılar çoğu kez biyoalgılayıcı olarak adlandırılırlar. Bunların içinde en yaygın kullanılanlar enzimler ve antikorlardır. Enzim – substrat ve antikor – antijen arasındaki etkileşimin ilk adımı analitlerin protein moleküllerine bağlanmasıdır. Hidrolazlar dışındaki enzimler kosubstrat yokluğunda yalnız enzimi substrata bağlarlar. Aynı durum inhibitör ve diğer efektörler için de geçerlidir. Kosubstrat varlığında ise substratın kimyasal dönüşümü gerçekleşir. Son yıllarda geliştirilmiş olan katalitik antikorlar yalnız antijenlere bağlanmakla kalmaz bunlar kimyasal bir dönüşümü de katalizlerler.

Biyolojik membranlar içine yerleşmiş kimyasal algılayıcı ise hücre metabolizması tarafından yönlendirilir ve biyolojik aktif maddeler tarafından kontrol edilirler. Bu durum toksinler, ilaçlar ve hormonların seçimli tayini için mükemmel bir olanak sağlar.

Protein yapılı makromoleküllere ilaveten nükleik asitler ve karbonhidratlar da genom zincir analizleri ve hücre yüzeyi karakterizasyonu gibi özel alanlarda kullanılan biyosensörlerin yapısına girmektedir.

Dönüştürücüler (Çeviriciler - Transduserler); dönüştürücüler, algılayıcıların biyolojik reaksiyonunu ölçülebilir fiziksel bir sinyale dönüştürürler. Biyokimyasal reaksiyona göre dönüştürücü seçilir. Elektrotlar amperometrik ve potansiyometrik ölçümlerde kullanılır ve burada hedef maddedir (O₂ elektrotunda çözülmüş O₂, pH elektrotunda H⁺ iyonu gibi). Optik sensörlerde hedef ışık, piezoelektrik sensörlerde ise kristalin salınım rezonansının kütle yüklenimi sebebiyle değişmesidir. Bunların dışında transistörler ve termistörler de dönüştürücü olarak kullanılmaktadır (Anonymous, 2010). Genel olarak dönüştürücüler başlıca dört alt gruba ayrılırlar:

1.Elektrokimyasal dönüştürücüler

2.Optik dönüştürücüler

3.Piezo-elektrik dönüştürücüler

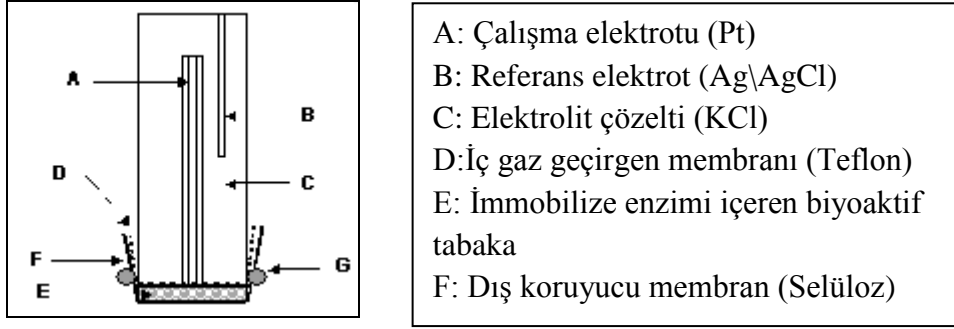
4.Kalorimetrik esaslı dönüştürücüler

1.1.3. Elektrokimyasal Esaslı Dönüştürücüler

1.1.3.1. Amperometri Esaslı Dönüştürücüler

Amperometri genel anlamda belli bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümünü esas alır. Söz konusu akım yoğunluğu çalışma elektrotunda yükseltgenen ya da indirgenen elektroaktif türlerin derişiminin bir fonksiyonu olarak tanımlanır. İkinci elektrot referans elektrot olarak iş görür. Kalibrasyondan sonra, akım yoğunluklarından ilgili türlerin derişimlerinin belirlenmesinde yararlanılır.

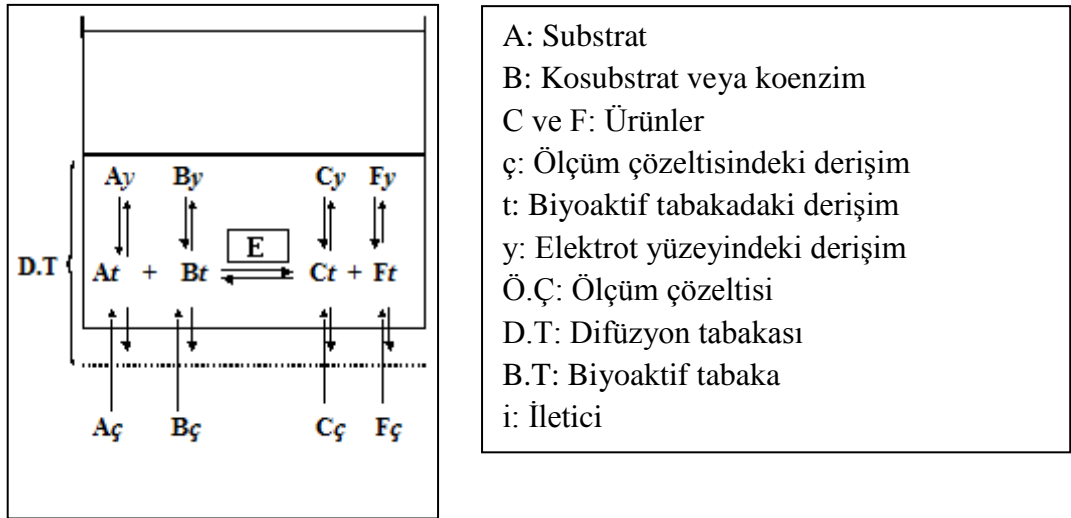
Tayin edilecek madde yükseltgeninceye (veya indirgeninceye) kadar hücreye uygulanan gerilime bağlı olarak elde edilen akımda ani bir değişim ile bir pik oluştuğu gözlenir. Pik akımının yüksekliği doğrudan elektroaktif türün derişimiyle orantılıdır. Uygun yükseltgenme (veya indirgenme) gerilimi biliniyorsa o gerilim değeri uygulanarak akım değerinin değişimi de izlenebilir. Bu şekilde yapılan analizler amperometrik analiz olarak bilinir.



Şekil 1.4. Amperometrik esaslı bir biyosensörün şematik gösterimi

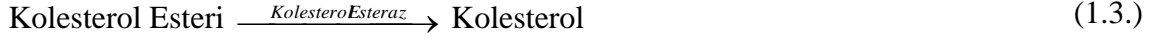
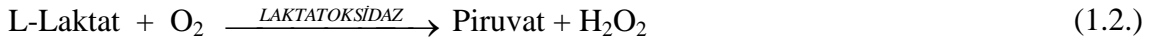
İletici sistem olarak bir amperometrik sensörün kullanılmasının potansiyometrik sensörden en büyük farkı, ürünlerde sinyal oluşturan türün elektrot yüzeyinde tüketilmesidir.

Bir biyosensörün biyoaktif tabakasındaki reaksiyonlar oldukça kompleks bir kinetiğe sahiptirler.



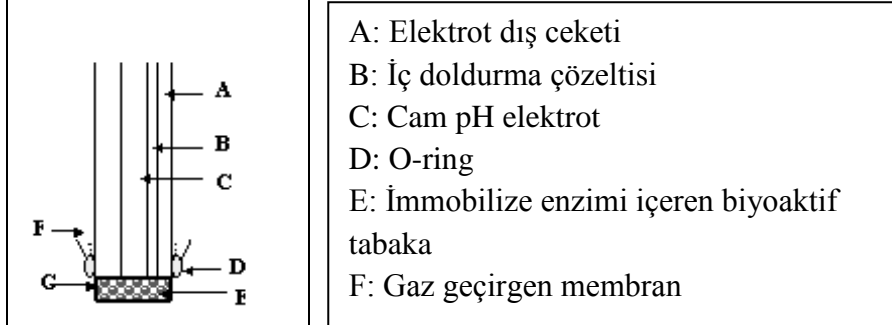
Şekil 1.5. Enzim sensörünün çalışma ilkesi

Amperometri esaslı ve biyoaktif bileşen olarak enzimlerin kullanıldığı bazı biyosensörlere ilişkin örnekler aşağıda verilmiştir.



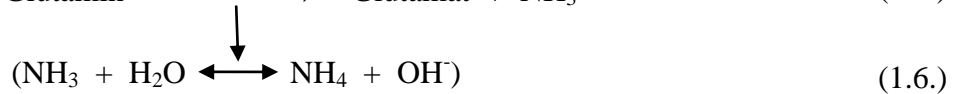
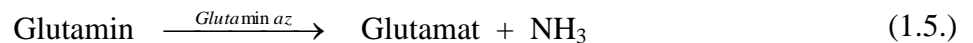
1.1.3.2. Potansiyometri Esaslı Dönüştürücüler

Potansiyometri bilindiği gibi en genel anlamda bir çalışma ve referans elektrot arasındaki potansiyel farkının ölçümünü esas alır. Elektrot potansiyelinin belirlenmesi doğrudan analit derişimini tanımlar. Potansiyometrik biyosensörlerde kullanılan temel sensörler pH ya da tek değerlikli iyonlara duyarlı cam elektrotlar, anyon ya da katyonlara duyarlı iyon seçimli elektrotlar ve karbondioksit ya da amonyağa yönelik gaz duyarlı elektrotlardır.



Şekil 1.6. Potansiyometrik esaslı bir biyosensörün şematik gösterimi

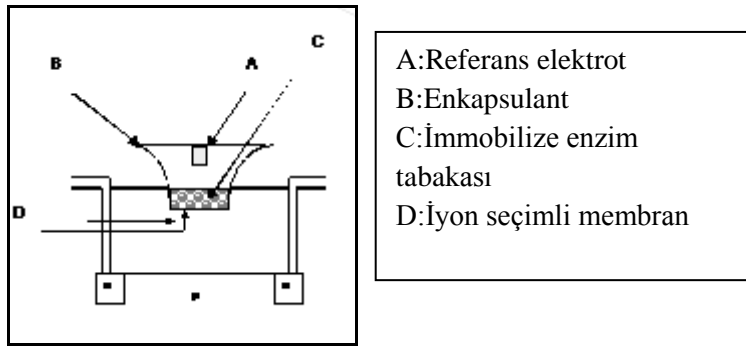
Potansiyometri esaslı ve biyoaktif bileşen olarak enzimlerin kullanıldığı bazı biyosensörlere ilişkin olarak amonyum duyar sensör örneği verilmiştir:



1.1.3.3. Yarı İletkenleri Esas Alan Dönüştürücüler

Temel sensör olarak metal oksit yarı iletken alan etki transistörlerini (MOSFET) ya da iyon duyar alan etki transistörlerini (ISFET) esas alan bu tür enzim sensörleri, enzim ile alan etki transistörlerinin birleştirilmesini ifade edecek şekilde enzim alan etki transistörleri (ENFET) olarak adlandırılırlar.

MOSFET'lerin, gazların ölçümüne uygun hale getirilmesiyle oluşan gaz duyar sensörlerde (GASFET) adsorblanan gaz moleküllerinin disosiyasyonu ve oluşan yükün oksit tabakasına transferi temel ilkeyi oluşturur. Bu durum tabanın dielektrik sabitini değiştirerek ve drain akımda bir modifikasyona yol açarak ölçüme imkân verir.



Şekil 1.7. Enzim alan etki transistörünün şematik gösterimi

1.1.3.4. Kondüktometrik Dönüştürücü

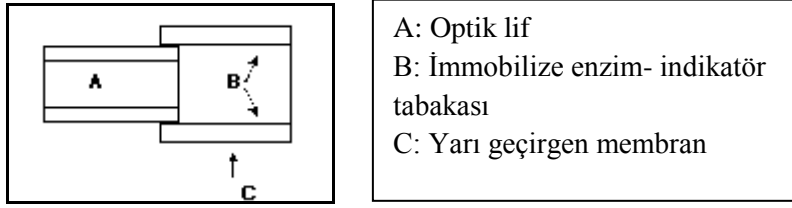
Pek çok reaksiyon sonucu çözeltinin iletkenliğinde bir değişim olmaktadır. Bu değişim tespit edilerek analiz yapılır.

1.1.4. Optik Esaslı Dönüştürücüler

Optik biyosensörler iletici sistem olarak optik lifler üzerine uygun bir yöntemle uygun bir biyomolekülün immobilize edilerek hazırlanan ölçüm aygıtlarıdır.

Etkileşim sonucu meydana gelen kimyasal ya da fizikokimyasal bir değişimin ölçümünü esas alırlar. Sinyal, ışık yansımaları, saçılımı ya da yayımı sonucu meydana gelir. Örneğin optik lifin üzerine enzim immobilizasyonu ile hazırlanan optik esaslı

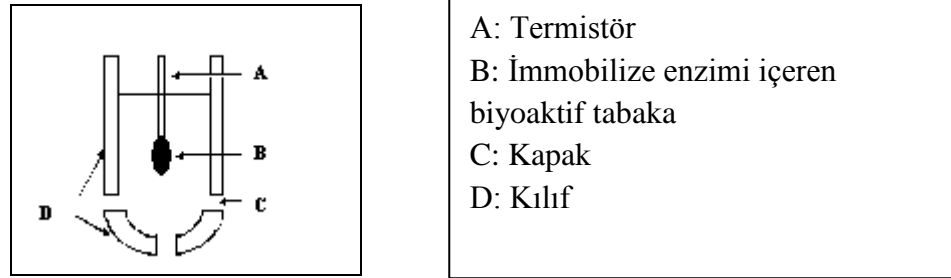
enzim sensörleri temelde absorpsiyon, fluoresans, biyoluminesans gibi temel ilkeler çerçevesinde işlev görürler.



Şekil 1.8. Optik esaslı enzim sensörünün şematik gösterimi

1.1.5. Kalorimetri Esaslı Dönüştürücüler

Kalorimetri esaslı enzim sensörleri, termal enzim sensörleri, enzim termistörleri ya da entalpimetrik enzim sensörleri gibi değişik isimlerle tanımlanırlar. Temel ilkeleri bir enzimatik reaksiyondaki entalpi değişiminden yararlanarak substrat derişimini belirlemekten oluşur. Genel olarak enzimatik reaksiyonların ekzotermik doğasından yararlanılır. Enzimatik reaksiyon sonucu meydana gelen sıcaklık değişimi ile substrat derişimi arasındaki doğrusal ilişkiden sonuca ulaşılır. Oldukça küçük sıcaklık değişimleri termal olarak yalıtılmış ortamlarda termistör veya termofiller yardımıyla izlenir.



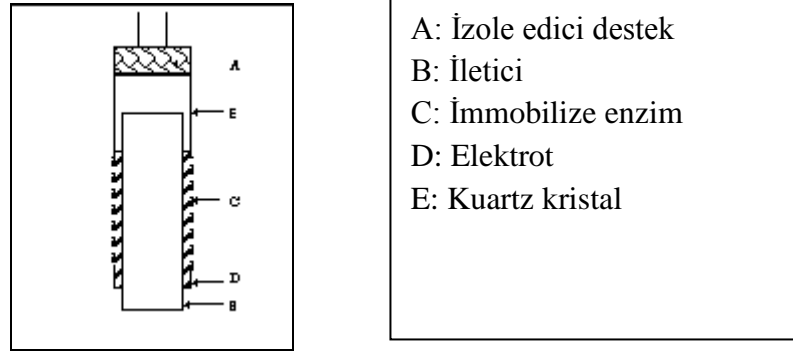
Şekil 1.9. Termal enzim sensörünün şematik gösterimi

1.1.6. Piezoelektrik Esaslı Dönüştürücüler

Piezoelektrik sensörler en genel anlamda karakteristik rezonans frekansındaki farklanmayı belirleyerek bir piezoelektrik kristal yüzeyinde toplanan örneğin kütlelerinin ölçülmesi esasına göre çalışan gravimetrik aygıtlardır. Sensör seçimliliği, kristal

yüzeyindeki madde ile spesifik bir etkileşime sahip analitin birikimiyle ilişkilidir. Sensör yüzeyinde bir madde adsorblandığı veya biriktiği zaman piezoelektrik kristalin rezonans frekansındaki farklanmanın ölçülmesiyle sonuca ulaşılır.

Bir piezoelektrik sensörün üzerinde enzim immobilizasyonu ile gerçekleştirilen piezoelektrik enzim sensörlerinde, enzim moleküllerine substratların bağlanmasından dolayı meydana gelen kütle değişimlerinin, piezoelektrik kuartz diskin vibrasyonunda sebep oldukları farklanmadan yararlanılarak madde miktarına ulaşılır.



Şekil 1.10. Piezoelektrik esaslı enzim sensörünün şematik gösterimi

1.1.7. Analizlenecek Madde - Biyoaktif Bileşen İlişkisine Göre Biyosensör Sınıflaması

Biyosensörleri çalışma prensiplerine göre biyoaffinite sensörleri ve biyokatalitik sensörler olmak üzere iki grupta incelemek mümkündür.

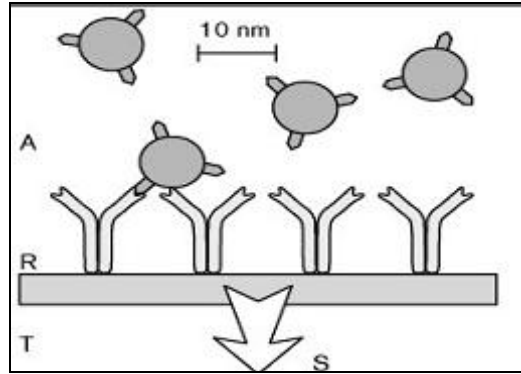
Biyoaffinite sensörlerde; Enzim, glikoprotein, antijen ve hormon gibi biyomoleküllerin moleküler düzeyde tanımlanmasında matrikse bağlı boya, lektin, antikor veya hormon algılayıcıları kullanılır. Matrikse bağlı molekül ile hedef molekülün birleşmesiyle kompleks oluşumu sonucu tabaka kalınlığı, refraktif indeks, ışık absorpsiyonu ve elektriksel yük gibi fizikokimyasal parametrelerin büyüklüğünü değiştirir ve bu değişimler optik sensörler, potansiyometrik elektrotlar veya transistörler tarafından saptanır.

Enzimler, mikroorganizmalar, organeller, doku kesitleri, antikorlar ve nükleik asitler ve biyolojik membranlar içine yerleşmiş kimyasal algılayıcılar sensörlerde

biyokomponent (biyoalgılayıcı) olarak kullanılırlar. Biyoalgılayıcılar analizlenecek maddeyi dönüşüme uğratarlar ve bu dönüşüme eşlik eden değişimler dönüştürücü tarafından algılanır. Yüksek spesifikliklerinden dolayı enzimler en yaygın kullanılan biyoalgılayıcılardır. Uygun bir enzimin bulunamaması veya enzimin kararsız olması ve birden çok sayıda maddenin tayini durumlarında hücre sistemleri ve tercihen mikroorganizmalar kullanılır. Mikroorganizmalar değişik algılayıcı davranışlar gösterirler ve biyolojik oksijen gereksinimi (BOD), toksisite ve mutajenite testlerinde başarı ile kullanılırlar.

Enzimler ve hücreler metabolitlerin (küçük moleküllü maddeler), antikolar ve nükleik asitler ise makromoleküllerin ve patojen mikroorganizmaların tayininde kullanılan biyosensörlerin bileşenidirler.

Teorik olarak algılayıcı ve dönüştürücülerin birçok kombinasyonunun mümkün olmasına rağmen bu kombinasyonlar bir elektrik sinyali oluşturamazlarsa biyosensör fonksiyon göstermez. Örneğin; dönüştürücü olarak bir termistörün kullanılması durumunda substratın dönüşüm reaksiyonu sonucu entalpide bir değişim olmaz ise biyosensör çalışmaz (Telefoncu, 1999).



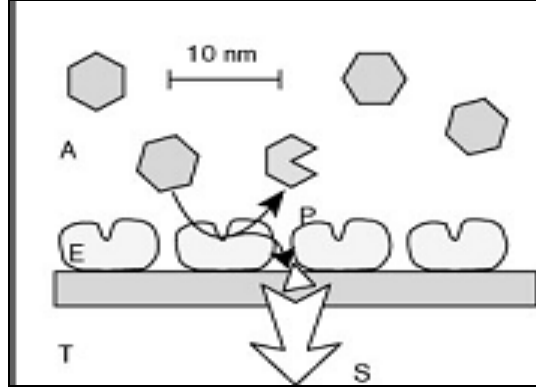
Şekil 1.11. Biyoaffinite esaslı biyosensörlerin şematik gösterimi

Biyokatalitik Esaslı Biyosensörler; enzimler (saf enzimler, organeller, doku kesitleri veya mikroorganizmalar) tarafından gerçekleştirilen moleküler değişimlere analitlerin kimyasal dönüşümü eşlik eder. Bu sebeple bu tür sensörler katalitik veya metabolizma sensörleri olarak tanımlanırlar (Şekil 1.12.).

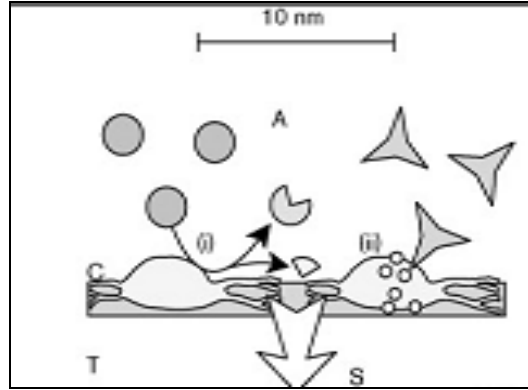
İletici sistem üzerinde enzim immobilizasyonu ile enzimin substratı, inhibitörü,

aktivatörü veya koenzimi olan çeşitli kimyasal maddelerin tayini yapılır. Bunlar da kendi aralarında:

■ **İmmobilize Hücre Esaslı Biyosensörler;** iletici sistem üzerinde hücrelerin immobilizasyonu ile o hücreler tarafından metabolize edilen çeşitli maddelerin tayini yapılır (Şekil 1.13.).

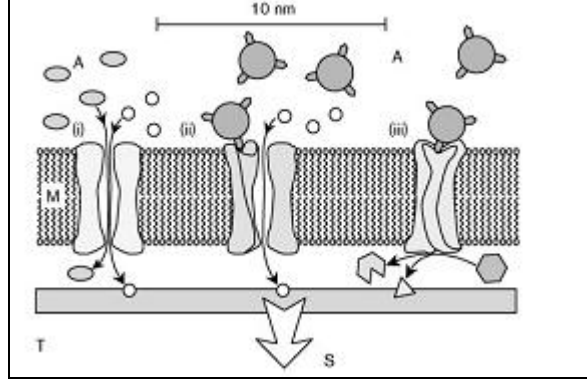


Şekil 1.12. Biyokatalitik esaslı biyosensörler



Şekil 1.13. İmmobilize hücre esaslı biyosensörler

■ **Transmembran Esaslı Biyosensörler;** çeşitli moleküllere spesifik algılayıcı veya farklı membran proteinlerini içeren hücre membranlarının iletici sistem üzerine immobilizasyonu ile söz konusu moleküllerin seçimli bir şekilde tayinleri yapılabilir (Şekil 1.14.).



Şekil 1.14. Transmembran esaslı biyosensörler

1.1.8. Biyosensörlerde Biyoaktif Bileşen İmmobilizasyon Yöntemleri

Biyosensörler farklı özellikteki iki elemanın (çevirici ve biyoalgılayıcı) kombinasyonu ile oluşurlar. Uygun biyoalgılayıcı ve dönüştürücü seçildikten sonra bunların birbirine bağlanması aşılması gereken en önemli sorundur. Bu bağlama işlemi biyoalgılayıcının immobilizasyonu olarak tanımlanır. Bağlama işleminde çok değişik yöntemler kullanılabilir. Hangi yöntemin kullanılacağı seçilen dönüştürücü ve biyoalgılayıcıya göre belirlenir. İmmobilizasyon biyoalgılayıcının stabilizasyonu ve tekrar kullanımını açısından büyük avantaj sağlar.

Algılayıcıların dönüştürücüler üzerinde immobilizasyonu fiziksel (adsorpsiyon, jel içinde polimer matrikste tutuklama, elektrot yüzeyinde biriktirme vb.) veya kimyasal (kovalent bağlama, yıkıcı veya çoklu fonksiyonel reaktifler ile çapraz bağlama) yöntemler ile gerçekleştirilir (Telefoncu, 1999).

1.1.8.1. Adsorpsiyon

İmmobilizasyonda kullanılan en eski yöntemlerden biridir. Genel olarak, enzim veya biyoalgılayıcı çözeltisine yüzeyi membran veya film ile kaplanmış dönüştürücü daldırılır ve bir süre beklenir. Membran veya film immobilize edilecek algılayıcıya göre hidrofilik veya hidrofobik karakterde seçilebilir. Enzimler durumunda, daha çok hidrofilik membranlar kullanılır. En çok kullanılan adsorbanlar; selüloz asetat membranları, polistiren, polivinilklorür ve silikadır.

Sorpsiyon tersinir bir olay olduğundan adsorpsiyon ile immobilizasyon güvenilir bir yöntem değildir ama yine de biyosensörlerde başarılı uygulamaları vardır.

1.1.8.2. Tutuklama

Enzimler makromoleküler yapılı proteinler olup polimer jel matrikslerde ve daha basit olarak diyaliz membranlarında tutuklanabilirler. Bu yöntem enzimler yanında organeller, hücreler ve antikorlar için de uygulanabilir. Tutuklama için en yaygın kullanılan film veya matriksler nişasta, poliakrilamid, silikon lastiği, polivinil klorür ve polivinil alkoldür. Elektrokimyasal polimerizasyon diğer bir tutuklama yöntemidir. Doku kültürleri, organeller ve mikroorganizmaların immobilizasyonunda daha çok polimer jellerde tutuklama yöntemi kullanılır. Polimer matriksi biyokatalizatörün kaçışını engellerken küçük substratlar ve ürün moleküllerinin geçişine engel olmaz. Anilin, pirol, o-dianisidin gibi monomer çözeltileri içerisine enzim eklendiğinde elektropolimerizasyon sırasında polimer gözeneklerine enzim molekülleri tutuklanacaktır.

1.1.8.3. Kovalent Bağlama

Enzimler doğrudan dönüştürücüye veya önceden uygun bir film veya tabaka ile kaplanmış dönüştürücüye kovalent olarak bağlanabilirler. Enzimler aktive edilmiş dönüştürücü yüzeylerine bağlanabileceği gibi önceden uygun bir materyale kovalent bağlanarak immobilize edilen enzim preparatı dönüştürücü yüzeyinde bir film veya tabaka oluşturularak da biyosensör hazırlanabilir. Enzimlerin kovalent bağlanmasında dikkat edilecek önemli nokta, bağlanmanın enzim aktivitesi için esansiyel olan aminoasitler üzerinden gerçekleşmemesi ve bu grupların bağlanma sırasında sterik olarak rahatsız edilmemesidir. Kovalent bağlama enzim molekülü üzerindeki fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleşir.

Biyoalgılayıcıların kovalent bağlama ile immobilizasyonu biyosensöre pH, iyon şiddeti ve sıcaklık değişimlerine karşı yüksek bir direnç ve defalarca kullanıma uygun stabilite kazandırır. Ama biyolojik aktif molekülde kısmi bir aktivite kaybına sebep olurlar.

1.1.8.4. Çapraz bağlama

Bu yöntem biyosensör hazırlanmasında daha çok tutuklama ve kovalent bağlama yöntemlerinin kombinasyonu şeklinde uygulanır. Çapraz bağlayıcı reaktif olarak en yaygın kullanılan maddeler glutaraldehit, hexametilen diizosiyanat, diflorodinitrobenzen, bismaleimidohexan, disüksinil suberattır. Bifonksiyonel reaktifler enzimler yanında organeller, hücreler ve antijenlerin immobilizasyonunda da uygulanır.

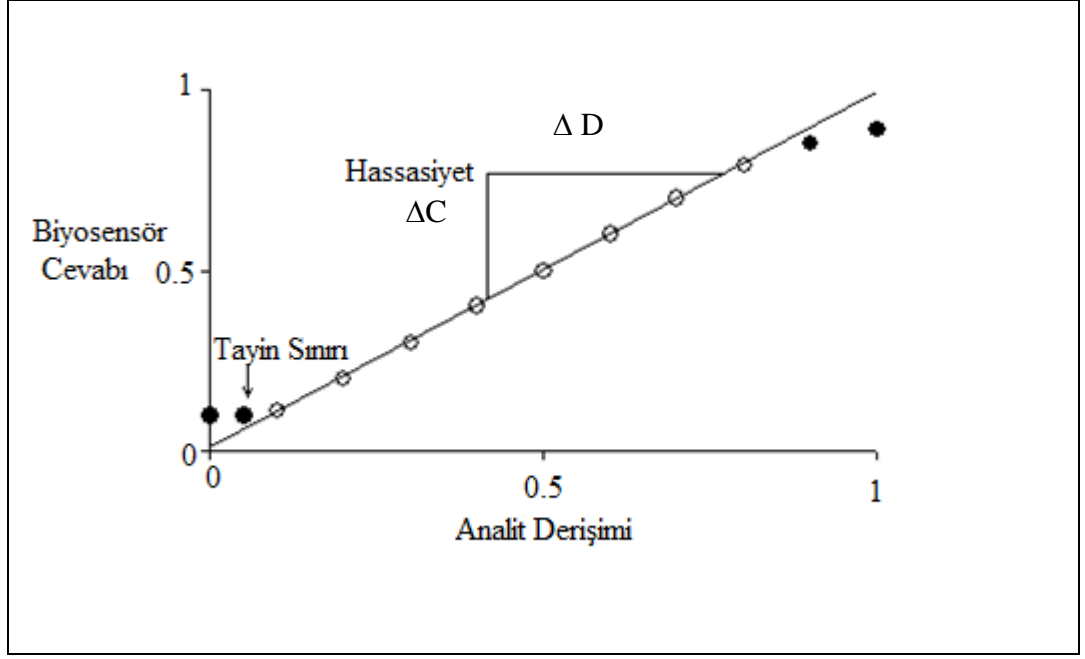
1.1.9. İdeal Bir Biyosensörün Özellikleri

Elektrokimyasal, optik veya diğer biyosensör türlerini en uygun bir şekilde tasarlayabilmek için ölçüm sisteminin bazı temel fiziksel özelliklere sahip olması gerekmektedir. Bu özellikler şöyle sıralanabilir (Buerk, 1993):

- **Hassasiyet**

Hassasiyet, genellikle özel bir kimyasalın derişimindeki değişime (ΔD) bağlı olarak biyosensör cevabında meydana gelen değişimin (ΔC) ölçüsü olarak ($\Delta C/\Delta D$) tanımlanır (Şekil 1.15.). Analit çoğunlukla bir biyosensör tarafından doğrudan tayin edilmez. Pek çok durumda biyosensör ölçüm yaparken, bir kimyasal reaksiyondaki ilgili reaktifin veya ürünün derişimindeki değişimi tespit eder. Bu yüzden biyosensörün analit ile ilgili hassasiyeti (kimyasal reaksiyon stokiyometrisine uygun olarak) doğrudan tayin edilen tür ile ilgili olmaktadır.

Bazı biyosensör türlerinde, ölçümler biyosensörün dinamik cevabı üzerinden elde edilmektedir. Bu durumda hassasiyet derişim değiştikçe zamanla sinyalde meydana gelen değişim olarak ($\Delta C/\Delta D \cdot \Delta t$) tanımlanabilir.



Şekil 1.15. Bir biyosensör için kalibrasyon eğrisi (Eğride doğrusal bir cevap aralığı (○), tayin sınırının altındaki derişimlerde ve daha yüksek derişimlerde doğrusal olmayan davranış (●) görülmektedir. Hassasiyet doğrusal cevap aralığının eğimi olarak tanımlanır.).

Belli bir analite yönelik olarak hazırlanan bir biyosensörün etkin hassasiyetini belirlemek için pek çok etken vardır. Bunlar arasında sensörün fiziksel boyutu, zarların kalınlığı, örnekten algılayıcı bölgeye kimyasal türlerin kütle transferi ve biyosensörün aktivitesini düşüren farklı işlemler yer almaktadır. İdeal olarak, bir biyosensörün hassasiyeti kullanım ömrü boyunca değişmemeli ve elektronik bir cihazla dönüştürücünün çıkış sinyalinin belirlenebilmesine yetecek kadar yüksek olmalıdır.

- **Kalibrasyon Gereksinimi**

İdeal bir biyosensör, bilinen derişimlerdeki analiti içeren standart çözeltiler yardımıyla kolayca kalibre edilebilmelidir. Kalibrasyon eğrileri hassasiyeti belirlemek için çok sayıda veriye ihtiyaç duymamalıdır. İstenilen aralığın dışında kalan güvenilir olmayan ekstrapolasyonlardan kaçınmak için kalibrasyonda elde edilecek veri aralığı, ölçüm yapılacak değerleri içermelidir. İdeal olarak, ard arda yapılacak ölçümler için biyosensör hassasiyetinin belirlenmesinde bir kez kalibrasyon yapılması yeterli olmalıdır. Bununla beraber, uygulamada zamanla hassasiyette meydana gelebilecek

değişimleri belirlemek amacıyla düzenli aralıklarla kalibrasyon yapmak gerekebilmektedir.

- **Doğrusallık**

Tamamen doğrusal olarak davranan bir biyosensör, ölçüm ortamında sıfır derişim değerinden analitin fiziksel olarak çözünebildiği en yüksek derişim değerini aşan bir aralıkta değişmeyen bir hassasiyete sahip olmalıdır. Uygulamada Şekil 1.15.'de (o) ile gösterilen doğrusal bölge daha dar bir analit derişimi aralığıyla sınırlanmaktadır. Doğrusal bölgenin herhangi bir yerindeki iki noktadan kalibrasyon yapılabilmelidir.

Kalibrasyon grafiği biyosensör cevabını değerlendirebilecek kadar yeterli doğrulukta elde edilebiliyorsa, pratik kullanım açısından bir biyosensörün doğrusal olmasına gerek yoktur. Bir düzeltme yapılarak doğrusal olmayan cevaplar doğrusal bir şekle dönüştürülebilir. Bazı biyosensörler yarı logaritmik hassasiyete ($\Delta C/\Delta \ln D$) sahiptirler. Bunlar doğrusal olmayan sensörler olarak sınıflandırılmalarına rağmen yarı logaritmik bir ölçek üzerinde yeniden düzenlenerek cevapları doğrusal olarak ifade edilebilir.

- **Tayin Sınırı**

İdeal olarak, bir biyosensör tarafından tayin edilebilen en düşük analit derişimi (Şekil 1.15.) sadece ölçüm için kullanılan elektronik cihazın çözünürlüğü tarafından sınırlandırılmalıdır. Uygulamada ise, diğer etkenler tayin sınırını etkiler. Örneğin, potansiyometrik ölçümlerde kullanılan elektrokimyasal dönüştürücülere diğer iyonlar ve ölçümü sınırlayan yüzey reaksiyonları girişim yapabilir.

- **Taban Sinyali**

Genellikle, bir biyosensörün sinyali göz önünde bulundurulması gereken bazı taban gürültülerine sahiptir. Akım kaçakları, elektronik cihazdaki veya biyosensörde farklı metallerin temasından kaynaklanan küçük gerilim farklılıkları gibi pek çok elektrokimyasal etken taban gürültüsüne neden olabilir. Taban sinyali elektriksel bir gürültü değildir. Bu nedenle doğrusal bir sistem için doğru sinyal (S) basitçe şöyle ifade edilir.

$$S = S_{\text{ölçülen}} - S_{\text{taban sinyali}} \quad (1.7.)$$

- **Seçicilik**

İdeal bir biyosensör sadece analit derişimindeki değişime cevap verir ve diğer kimyasal türlerin varlığından etkilenmez. Aksi takdirde analit derişiminin tayininde hata meydana gelir. Gerçekte ise girişim yapan türlerin varlığı analit için belirlenen cevabı etkilemektedir. Girişim yapan türlerin derişimini kontrol etmek mümkün olmadığında biyosensördeki karışık sinyallerden kaçınmak amacıyla başka bir tür kimyasal dönüştürücü ile ölçüm yapılmalıdır.

- **Kullanım Ömrü**

Bir biyosensörde kullanılan biyolojik elementler çoğu zaman sistemin en az kararlı olan bileşeni olmaktadır. Bir biyosensörün önemli bir özelliği normal işlem koşulları altında hassasiyetini koruyabildiği kadar uzun bir kullanım ömrüne sahip olmasıdır. Bu kullanım ömrü yapılan toplam ölçüm sayısına veya ölçülen analitin derişiminin büyüklüğüne bağlı olabilir. Daha yüksek derişimler hassasiyetin daha hızlı bir şekilde düşmesine neden olabilir. Ayrıca analit derişimine bağlı olmaksızın analiz ortamında aktivasyonu engelleyecek diğer kimyasal türler bulunabilir. Bir diğer önemli özellik ise biyosensörün saklanması ve kullanılması arasında geçen zamanın uzunluğudur. Biyosensörün bir buzdolabı ortamında muhafaza edilmesi gerektiği gibi biyolojik bileşenin biyoaktivitesini koruyabilmesi için özel bir kimyasal ortamda saklanması da gerekebilmektedir.

1.1.10. Biyosensörlerin Uygulama Alanları

Biyosensörler tıp, gıda, eczacılık, çevre kirliliği, savunma ve birçok endüstriyel aktivitede özellikle otomasyon, kalite kontrolü, durum tespit ve enerji saklanması çok önemli rol oynarlar. Bugüne kadar 180'den fazla farklı madde için biyosensör hazırlanmış olup bunlardan ancak 25 kadarı ticari olarak üretilmektedir. Biyosensörler için olası uygulama alanları şunlardır:

- Biyomedikal sektör
- Proses kontrolü:
 - ✓ Biyoreaktör kontrol ve analitiği
 - ✓ Gıda üretim ve analizi
- Tarım ve veterinerlik
- Bakteriyal ve viral tanı
- İlaç analizi
- Endüstriyel atık su kontrolü
- Çevre koruma ve kirlilik kontrolü
- Maden işletmelerinde toksik gaz analizleri
- Askeri uygulamalar

Biyosensörler; gıda maddeleri, metabolitler, vitaminler, antibiyotikler ve ilaçlar gibi organik maddeler ile enzim, virüs ve mikroorganizmaların tayininde kullanılırlar. Bunların dışında BOD, toksisite ve mutajenite testlerinde de başarı ile uygulanmaktadırlar .

Biyosensör grupları ve kapsadıkları analiz alanları aşağıdaki tabloda gösterilmektedir.

Çizelge 1.1. Biyosensör Grupları ve Kapsadıkları Analiz Alanları

BİYOSENSÖR GRUBU	KAPSADIĞI ANALİZ ALANI
Enzim Sensörleri	Küçük organik moleküller ve anorganik maddeler (metabolitler, ilaçlar, gıda maddeleri, vitaminler, antibiyotikler, pestisitler vb.)
Mikrobiyal Sensörler	Küçük organik moleküller ve anorganik maddeler + BOD, Toksisite, Mutajenite
DNA-Sensörleri	Virüsler, patojen mikroorganizmalar
İmmuno Sensörler	Virüsler, patojen mikroorganizmalar + Ksenobiyotikler

Hiç kuşkusuz biyomedikal sektör biyosensörler için en iyi pazardır. Bu alanda uygulama olanağı bulan ilk biyosensörler enzim sensörleridir. Ticari olarak üretilen ilk biyosensör ise şeker hastalığı teşhisi için kan ve idrarda glukoz tayinini mümkün kılan glukoz oksidaz elektrotudur. Bunu renal fonksiyon testleri için geliştirilen üre ve kreatinin elektrotları ile kas gücünü ölçmeye yönelik laktat elektrotu izlemiştir. İnsan vücuduna implante edilebilen biyosensörler de geliştirilmiş olup bunlar biyolojik sıvılar vücut dışına alınmadan ve tüketilmeden analiz imkanı verirler ki, özellikle ameliyat sırasında bu bilgilerin kesintisiz sağlanması çok önemlidir. Biyosensörlerin, ilaçların vücuttaki düzeylerinin ayarlanması ve kontrolünde kullanılması yakın bir gelecekte gerçekleştirilebilecektir. Yapay pankreas çalışmaları buna güzel bir örnektir.

Son yıllarda analizatörlere enzim elektrotları monte edilmiş ve yoğun bakım ünitelerinde kullanılmaya başlanmıştır. Elektrolitlerin bileşimi, kan gazları ve anahtar metabolitler diyagnostik açıdan çok değerli bilgiler verir. Biyosensörlerin gelecekte önemli uygulamalarından biri superoksit ve nitrik oksit gibi kısa ömürlü ve hormonlar ve nörotransmitterler gibi düşük derişimli maddelerin *in vivo* tayinidir.

Biyoteknoloji ve gıda endüstrisinde başta glukoz olmak üzere birçok monosakkarit, amino asit, organik asit (laktik asit), üre ve alkol tayinlerinde enzim sensörleri kullanılmaktadır. Ayrıca gıdalardaki yabancı maddeler (pestisitler, toksinler ve yabancı hormonlar vb.) yanında aroma ve tazelik gibi kompleks parametreler için de biyosensörler hazırlanabilir. Günümüzde gıda zehirlenmelerinin gittikçe artması toksik ve mikrobiyal kontaminantların daha hızlı tayinini zorunlu kılmaktadır. Biyosensörler yardımı ile bu tayin iki şekilde başarılıdır.

I. Antijen–antikor reaksiyonu veya DNA hibridizasyonu vasıtası ile mikroorganizmaların doğrudan tayini (İmmuno sensörler + DNA sensörleri).

II. Mikrobiyal kontaminasyonun gıdanın metabolik değişimi üzerinden indirekt tayini (Enzim sensörleri).

İlaçların kötü amaçla kullanımı ve uyuşturucu ile mücadelede biyosensörler kullanılabilir. Uyuşturucu arayan köpeklerin yerini biyosensörler alabilir. Böylece özellikle gümrüklerde, karakollarda zaman kazanılacaktır.

Toprak, hava ve su kirliliğinin kontrolünde mikrobiyal sensörler ve enzim sensörleri kullanılmaktadır.

Savaş durumunda kimyasal ve bakteriyolojik silahlara karşı korunma olasılığı çok zordur. Çünkü bunların algılanması kolay değildir. Ancak biyosensörler sayesinde bu algılama mümkün olabilmektedir. Birçok kimyasal savaş maddesinde organofosfor bileşikleri bulunur ve bunlar da kolinesteraz enzim sensörleri ile belirlenir. Bakteriyolojik silahlardaki virüs, bakteri ve toksik ajanlar diğer bazı biyosensörler ile saptanabilmektedir.

Biyosensör piyasası günden güne gelişmektedir. Biyosensörlerin yakın gelecekte 1,4 milyar dolarlık bir piyasaya ulaşacağı bunun % 45'i tıp, % 22'si gıda, % 17'si çevre koruma ve biyoteknoloji, kalan % 16'sının ise diğer sektörlere yönelik olacağı beklenmektedir (Telefoncu, 1999).

1.2. İletken Polimerler

Polimerler, uzun zincirli moleküllerdir. Bunlara makromolekül de denmektedir. Monomer denen çok sayıda daha basit birimlerin birbirine eklenmesiyle yapılırlar. Polimerlerin hem organik hem de inorganik dünyada son derece geniş bir yayılım alanı vardır. Selüloz, nişasta, proteinler veya nükleik asitler organik polimerlerin tipik örneklerindedir. Elmas, kuartz, feldispat gibi bazı maddeler de inorganik polimerlere birer örnek teşkil ederler. Bu maddelere ilave edilmesi gereken polietilen, poliüretan, polikarbonat vb. gibi önemli sayıda birçok sentetik polimerler de vardır.

Otuz yıl öncesine kadar bütün karbon tabanlı polimerlere çok iyi bir yalıtkan olarak bakılıyordu. Plastiklerin elektriği iletme fikri o yıllarda pek rağbet görmedi. Gerçekten plastik malzemeler bu yalıtkan özelliği ile elektronik endüstrisinde yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Bununla birlikte, bu dar bakış açısı yeni keşfedilen ve kendine özgü iletkenliği olan elektroaktif polimerlerle birlikte çok süratli bir şekilde değişmiştir. Polimerlerin bu sınıfı henüz başlangıç safhasında olmasına rağmen, 1930 – 1950 yılları arasında, plastiklerin endüstrideki öneminden çok daha fazla önem kazanmaktadır.

Elektron Paramanyetik Rezonans (EPR) iletken polimerlerin yapısını araştırmak için sıkça kullanılan metotlardan biridir. Sadece paramanyetik merkezleri açığa vurma özelliğinden dolayı, EPR tekniği bu tarz incelemeler için gayet uygun bir yöntemdir. Makromoleküllerin iki elektronlu kimyasal bağlarının kırılmasıyla oluşturulan bozukluklar paramanyetik serbest radikallerdir. Bunlar, mekanik öğütme, çeşitli kimyasal ajanların etkisi, iyonize edici ışınlama, gama ve ultraviyole ışınlaması gibi

birçok yöntemlerle oluşturulabilirler. Bu teknikle, polimerlerde serbest radikallerin araştırılması, molekül zincirlerinin kırılmasıyla irtibatlı olan yaşlanma, kimyasal ajanların etkisi veya ışınlamaya maruz kalma gibi farklı süreçlerin anlaşılmasında çok kullanışlıdır. Genellikle, serbest radikaller, zayıf bir spin - yörünge etkileşmesine sahip olmalarından dolayı, serbest elektronunkine yakın g-faktörü ile karakterize edilirler. Aynı zamanda, serbest radikallerin EPR spektrumları genellikle iyi çözülmüş aşırı ince veya süper aşırı ince yapı yarılmaları gösterir. Bu yarılmalar, araştırılan radikallerin kimyasal yapılarını yansıtarak onların daha iyi tanınmasına imkân verirler. Diğer yandan, polimerler, hatta yüksek mertebede düzenli olanları bile, tipik kristal katılar değildir, fakat camsı (amorf) duruma benzer bazı özellikler gösterirler. Çok uzun bir geçmişi olmayan naylon, lastik, plastik ve polivinilklorür (PVC) bugün çok yaygın olarak kullanılan maddeler arasına girmiştir. Çevremizde gördüğümüz, günlük hayatta kullandığımız pek çok şey, plastikten, yani polimerlerden yapılmıştır. Polimerler (poly = çok, meros = parça, ünite), birbirine benzer küçük molekül birimlerinin zincir şeklinde birbirine eklenerek meydana getirdiği dev moleküllerdir. Çok sık kullandığımız naylon poşetlerden, araba lâstiklerine; çocuk oyuncaklarından, kışın giydiğimiz botların tabanlarının yapımına kadar, pek çok sahada polimerler kullanılmaktadır.

Polimerler, yani plastikler, metallerin aksine yalıtkan ve elektriği iletmeyen maddeler olarak bilinmekteydi ve bu özelliği ile de elektrik tellerinin kaplanmasında kullanılmaktaydı. Çünkü böylece elektrik tellerinin canlılarla ve birbirleriyle kısa devre teması önlenir. Ancak, bütün bunlarla birlikte Alan J. Heeger, Alan G. MacDiarmid ve Hideki Shirakawa isimli bilim adamları yaptıkları buluşlarıyla bir polimer olan poliasetilenin (poliasetilen) hemen hemen bir metal gibi iletken olabileceğini gösterdiler. Bu buluşla polimerlerin hep yalıtkan olma imajı da değişmiştir.

Poliasetilen, Shirakawa ve arkadaşları tarafından 1974'te, Ziegler Natta (K. Ziegler ve G. Nata; Nobel 1966 kimya ödülü) katalizini kullanarak, asetilenden gümüş renkli, parlak görümlü bir film hazırlayana kadar siyah bir toz olarak bilinirdi. Fakat o metalik görünümüne rağmen henüz bir iletken değildi. Bununla birlikte, 1977'de, Shirakawa, MacDiarmid ve Heeger klor, brom veya iyot buharı ile yükseltgenmeye giren polimer filmlerinin, orijinal hallerinden, 10^9 kez daha iletken olduklarını buldular. Polimerlerin halojenlerle muamelesi yarı iletkenlerdekine benzer biçimde "katkılama"

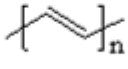
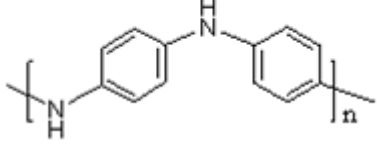
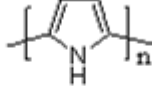
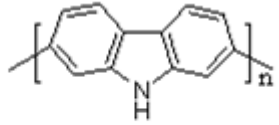
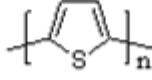
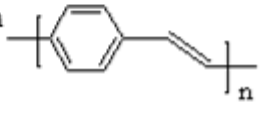
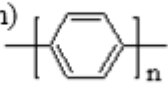
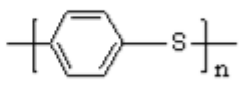
(doping) olarak isimlendirilmiştir. Poliasetilenin “katkılı” hali metre başına 10^{-5} siemens’lik bir iletkenliğe sahiptir. Bu da daha önce bilinen polimerlerinkinden epeyce yüksek bir değerdir. Bir kıyaslama yapacak olursak, iyi bir yalıtkan olan teflonun iletkenliği 10^{-16} S/m iken ve gümüş ile bakırınki 10^{-8} S/ m'dir.

İletkenlik konusunda en önemli adım 1979’da Diaz’ın pirolü elektrokimyasal yöntemle yükseltgeyerek polipirolü üretmesiyle atılmış oldu. Polipirol anot üzerinde üretilebiliyordu ve güçlü bir film olarak yüzeyden çıkarıldığında iletkenliği 100 S/cm’ye ulaşabiliyordu. Benzer şekilde elektroyükseltgenme yöntemiyle iletken politiyofen anot üzerinden üretildi. Karbazol ve indol gibi aromatik bileşiklerden de elektrokimyasal yöntemlerle polimerler üretildi. Anilin elektroyükseltgenmesi ile anot yüzeyinde toz halinde iletken polianilin üretilebiliyordu.

Bazı iletken polimerler kimyasal yöntemlerle de üretilebilmektedir. Pirol, Br_2 veya AsF_5 ile yükseltgendiğinde iletken polipirol elde edilmiştir.

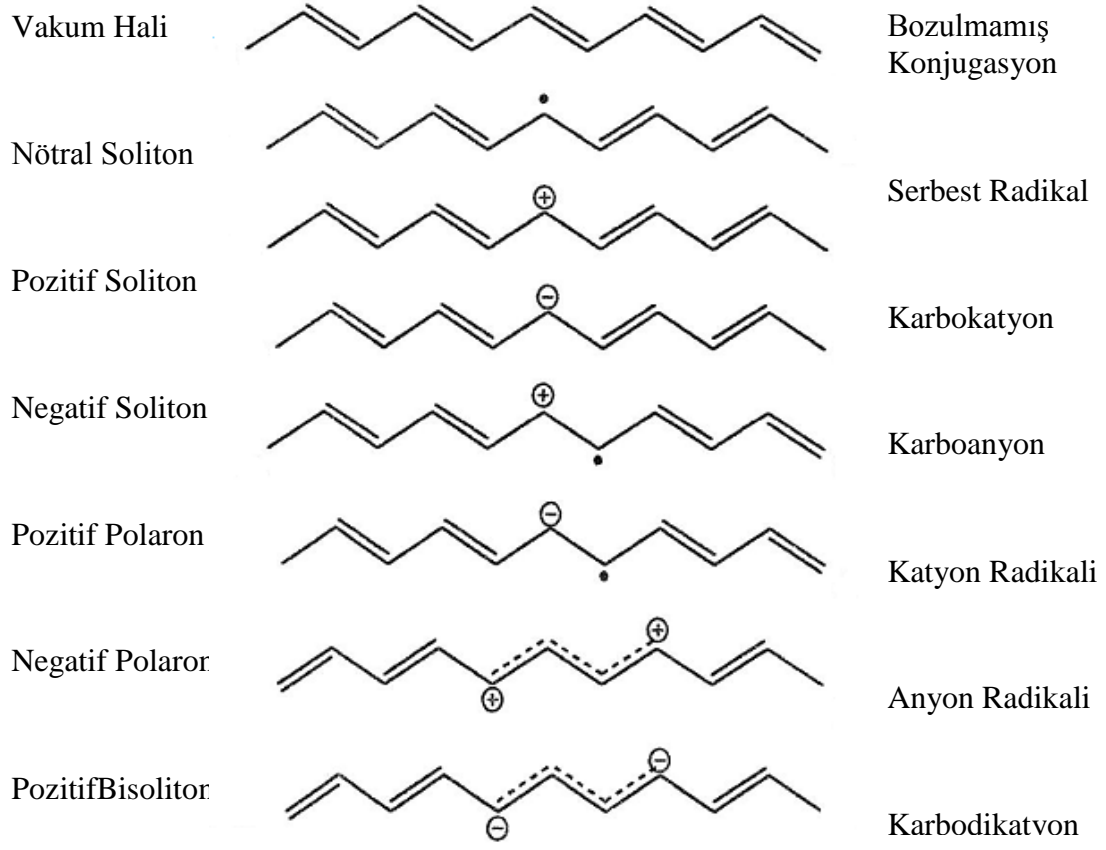
İletken bir polimerin temel özelliği polimerin omurgası (ana zincir) boyunca konjuge (ardışık sıralanmış) çift bağların olmasıdır. Konjugasyonda, karbon atomları arasındaki bağlar birbiri ardı sıra değişen tek ve çift bağlar şeklinde dizilmişlerdir. Her bir bağ kuvvetli bir kimyasal bağ olan “sigma” (σ) bağı içerir. İlâveten, her çift bağda daha zayıf (% 30) ve daha az lokalize olmuş bir “pi” π bağı vardır. Bunlara rağmen, konjugasyon, polimer maddeyi iletken yapmak için yeterli değildir. Fakat bunlara dopant maddeleri girtilerek iletkenliği artırılabilir. Dopantların yaptığı şey malzeme içerisinde elektron ve “hole” lerin sayısını arttırmaktır. Bir elektron eksikliğinin olduğu konuma bir hole denir. Böyle bir “hole” komşu bir konumdan atlayan bir elektronla doldurulduğunda yeni bir hole oluşturulur ve bu durumun böyle devam etmesiyle yükün uzun bir mesafeye göç etmesi sağlanır.

Çizelge 1.2. Yaygın olarak kullanılan bazı iletken polimerler

İletken Polimer (İletkenlik S/cm)	Yapı	İletken Polimer (İletkenlik S/cm)	Yapı
Poliasetilen (1000)		Polianilin (1-100)	
Polipirol (40-100)		Polikarbazol (10-100)	
Politiyofen (10-100)		Poli(parafenilen)vinilen (3)	
Poli(parafenilen) (100-500)		Poli(parafenilen)sulfür (1-100)	

1.2.1. İletken Polimerlerde İletkenlik Teorisi

Poliasetilen, polianilin ve polipirol gibi konjuge polimerlerin optik absorpsiyon çalışmaları sonucunda, bu polimerlerin değerlik bandını iletkenlik bandından ayıran yasak enerji aralığının yarı iletkenlerde olduğu gibi 1,4-3 eV arasında olduğu anlaşılmıştır. Bir yarı iletkende elektronun, değerlik bandından iletkenlik bandına çıkması ile sistemin yapısı değişmez. Konjuge çift bağ yapısına sahip polimerlerde ise elektronik uyarma, örgünün relaksasyonuna neden olmaktadır. Polimerlerde iki tür yapısal relaksasyon olduğu kabul edilmektedir. Birincisi polimer zinciri boyunca oluşan tek düze relaksasyon, ikincisi ise lokal olarak yapısal deformasyona neden olan relaksasyondur. Bunların sonucunda polimer zinciri üzerinde serbest radikal (soliton) olarak isimlendirilen farklı spin 1/2 yük konfigrasyonuna sahip hata merkezleri oluşturulabilmektedir. Şekil 1.16.'da oluşabilecek hata türleri, poliasetilenin yapısı üzerinde iletkenlik teorilerinde kullanılan katı hal fiziği terimleri (solda) ile kimyasal isimlendirmeler (sağda) birlikte verilerek gösterilmiştir (Roth ve Bleier, 1987).



Şekil 1.16. Konjugasyon hatalarının poliasetilen üzerinde gösterimi

Katkılama sonucu oluşan solitonun enerji düzeyi, poliasetilenin yasak enerji aralığının ortasında yer alır. Poliasetilen ve diğer konjuge polimerlerde katılama ile polaronik hatalar da oluşur ve polaronun elektronik enerji düzeyleri yasak enerji aralığında simetrik olarak, iletkenlik ve değerlik bandına yakın konumlarda bulunur. Katkı maddesinin fazla eklenmesi durumunda veya elektrokimyasal olarak katılama miktarının dolayısıyla polaronların derişimi daha da artırılırsa, polaronlar kendi aralarında etkileşerek bipolaronları oluştururlar. Soliton türü hataların sadece zincir boyunca aktarımının mümkün olmasına karşılık bipolaronik hataların bir zincir üzerinden diğerine atlayabilecekleri belirtilmiştir.

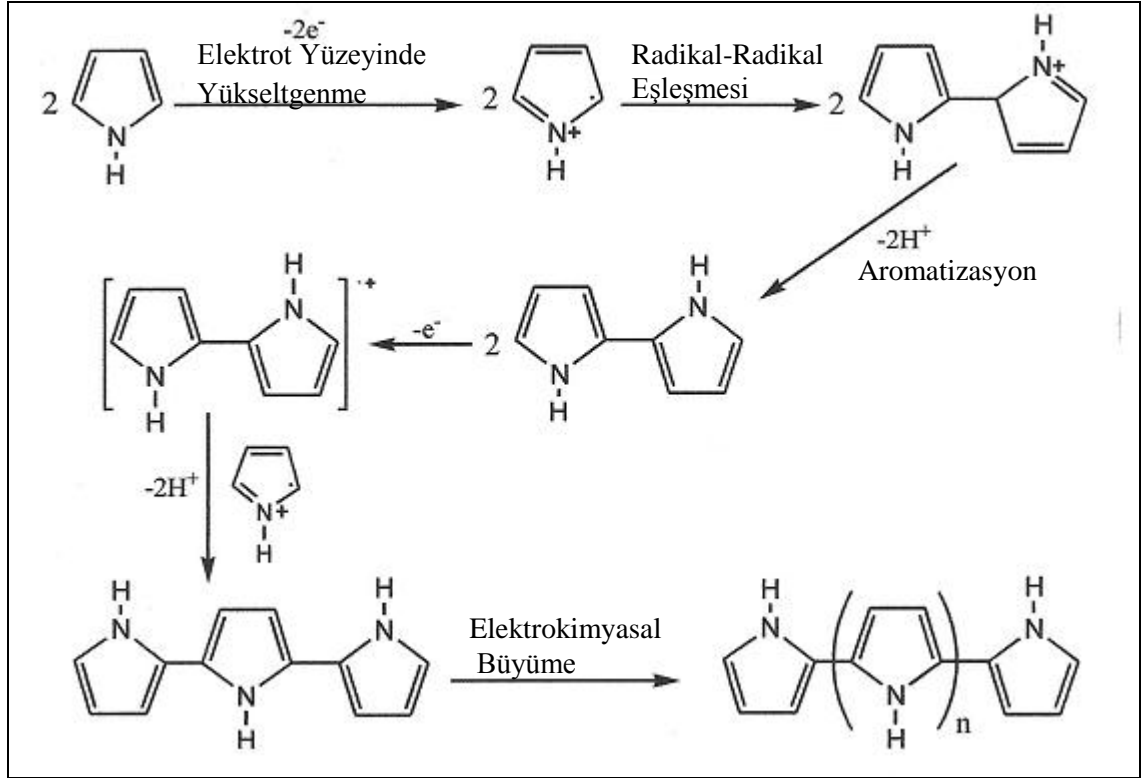
Sonuç olarak katılama ile yasak enerji aralığındaki enerji düzeylerine yerleşen soliton, polaron ve bipolaron gibi yapılar polimerlere iletkenlik kazandırmaktadır (Aydın, 2002).

1.2.2. İletken Polimerlerin Elektrokimyasal Sentezi ve Biyosensör Uygulamaları

Elektrokimyasal polimerleşme, üç elektrotlu bir hücrede monomer ve destek elektrolitini içeren uygun bir çözücüde gerçekleştirilir. Elektropolimerleşme, ince filmler elde etmek için potansiyostatik (gerilim kontrollü), kalın filmler elde etmek için galvanostatik (akım kontrollü) yürütülebileceği gibi (Deshpande ve Amalnerkar, 1993) dönüşümlü voltametrik (gerilim taramalı) olarak da gerçekleştirilebilir. Elektrokimyasal sentezler çalışma, referans ve karşıt elektrottan oluşan bir hücrede gerçekleştirilir. Çalışma elektrotu olarak altın, platin, titanyum, nikel, indiyum katkı-kalay oksit kaplı cam (ITO), camsı karbon, karbon vb. malzemeler kullanılmakta ve bu elektrotların yüzeyinde elektropolimerleşme gerçekleştirilmektedir.

Elektrokimyasal polimerleşme ile iletken polimer oluşturabilecek monomerler nispeten düşük yükseltgenme gerilimine sahiptirler ve elektrofilik süstitüsyon reaksiyonu gösterme eğilimindedirler. Elektropolimerleşme ile iletken polimer oluşumunu polipirol örneği üzerinden Şekil 1.17.'de incelemek mümkündür.

İlk olarak elektrot yüzeyinde pirol kation radikali oluşur. Bunu proton çıkışıyla dimerizasyon takip eder. Dimer monomerden biraz daha kolay yükseltgenir ve bu yüzden sonraki eşleşme reaksiyonlarına izin vermek için yeniden yükseltgenir. Polimerin yükseltgenme gerilimi daima monomerinkinden daha düşüktür. Polimer elektrokimyasal olarak iletken bir hale iyonlaşır ve neticede destek elektrolitin karşı iyonu ile eşleşerek elektriksel nötrallik sağlanır. Elektrokimyasal polimerleşme işlemi sırasında elektrolitik çözücüde anyonlar gibi negatif yüklü moleküller de bulunabilir. Pozitif yüklü polimer iskeletine pek çok biyolojik tür katılabilir veya polimer içinde tutuklanabilir. Elektrokimyasal polimerleşme sırasında katılma işleminin eşzamanlı olarak gerçekleşmesi de mümkündür (Özcan, 2008).



Şekil 1.17. Polipirolün elektrokimyasal sentez yoluyla oluşumu

İletken polimerler biyolojik türler için uygun bir immobilizasyon ortamı olarak kullanılır. Bu malzemelerin redoks özelliklerinden dolayı son yıllarda kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır. Özellikle polipirol nispeten daha kararlı olması, kolay hazırlanması ve iyi iletkenliğinden dolayı sensör çalışmalarında en umut verici iletken polimerdir (Ahuja ve ark., 2007).

İletken polimerler elektron transferini kolaylaştıran ferrosen gibi medyatörlerle birlikte de kullanılabilir. Medyatörler iletken polimerlerin yapısında yer aldığı anda amperometrik sensörlerin cevabı ve hassasiyeti üzerinde önemli işlevler üstlenir (Xue ve ark., 2005). Medyatörlerin etkisiyle hızlı elektron transferi sayesinde biyosensör üretiminde kullanılan ince polimerik filmlerin duyarlılığında önemli iyileşmeler olmaktadır (Mao ve ark., 2003).

1.2.3. Polipirol

Önemli iletken polimerlerden biri olan polipirol, kimyasal ya da elektrokimyasal yolla sentezlenebilir.

Kimyasal yöntemde, örneğin Fe^{+3} gibi bir yükseltgen kullanılırsa, toz halinde polimer elde edilir. Erimez ve çözünmez olduğu için kimyasal yöntemlerle elde edilen toz halindeki polipirolün işlenmesi söz konusu değildir, presleme gibi yöntemlerle ancak belli şekillere sokulabilir.

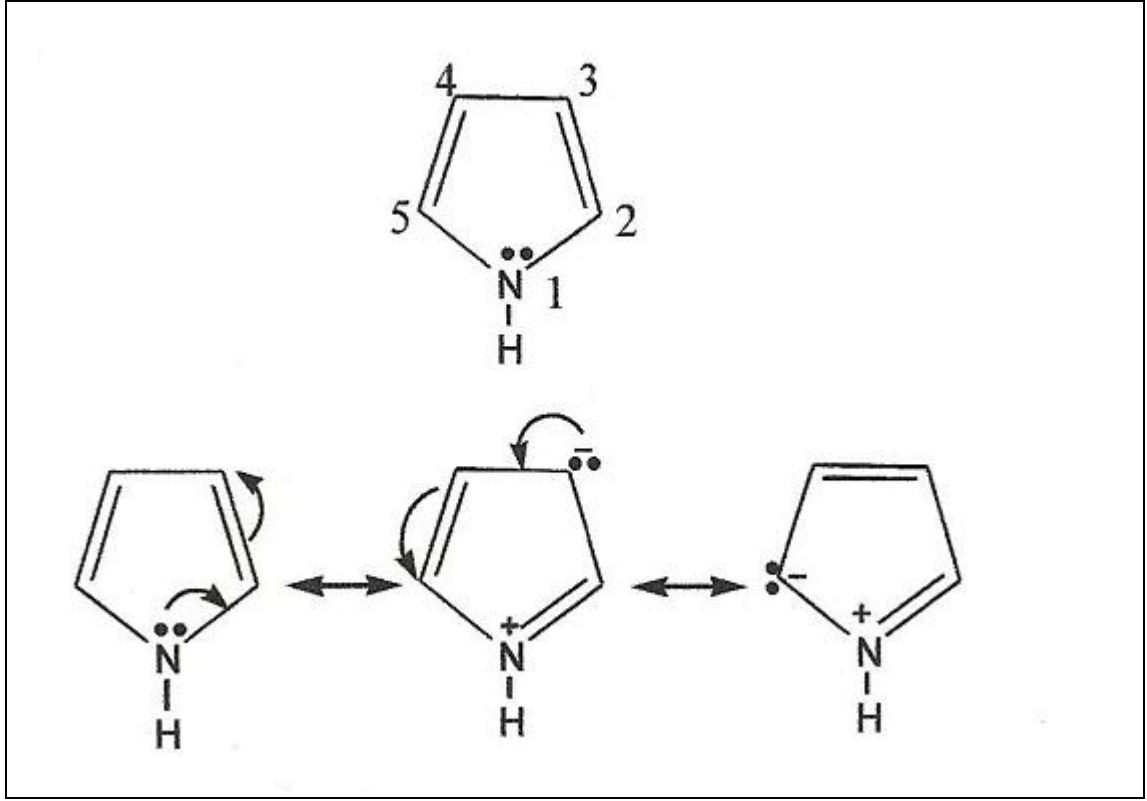
Polipirol filmler, pirolün elektrokimyasal polimerizasyonu ile hazırlanır. Levha ya da tambur şeklindeki elektrotlar kullanılarak farklı boyutlarda ya da sürekli polipirol filmler elde edilir. Polipirol filmlerin mekanik özellikleri diğer iletken polimerlerden iyidir, atmosfer koşullarında kararlıdır.

Laboratuvar koşullarında polipirol filmler basit bir elektroliz hücresi ve platin levha elektrotlarla küçük boyutta elde edilebilir. Asetonitril gibi bir organik çözücüye 1,0 M pirol ve 0,10 M destek elektrolit (örneğin, tetrabutil amonyum tetraflorborat anyonu dopant olarak görev yapar) konur ve 1,0 V potansiyelde platin levha elektrot kullanılarak elektroliz edilir. İletken karakterinden dolayı elektrot yüzeyinde oluşan polipirol film, pirolün ileri polimerizasyonunu engellemez. Elektroliz zamanı değiştirilerek film kalınlığını kontrol etmek olasıdır.

Pirol, yukarıda verilen sentez koşullarında yükseltgenerek anotta radikal katyon verir. Radikal katyonlar birleşerek pirol kalıntısına karşı bir dopant anyonunun bulunduğu iletken polipirole dönüşürler. Dopant anyon türü, kullanılan destek elektrolite bağlıdır. Sülfirik asit gibi asitlerin sulu çözeltilerinden de elektrokimyasal yöntemle polipirol sentezlenebilir. Polipirolün iletkenliği 100 S/cm düzeyindedir ve değişik formlarda ticari polipirol üretimi yapılmaktadır.

Azot üzerindeki çiftleşmemiş elektronlar (2 adet), halkada bulunan π elektronları (4 adet) ile birleştiğinde benzen gibi düzlemsel ve aromatik (6 elektronlu) bir sistemi oluşturur. Pirol ve türevleri halkada yüksek elektron yoğunluğuna sahip olan bileşiklerdir. Dolayısıyla bu bileşikler elektrofilik katılma ve yer değiştirme reaksiyonlarına karşı son derece aktif iken nükleofilik reaksiyonlara karşı daha az aktiftirler. Azot üzerindeki elektronlar halkaya verilir ve halkanın elektrofile karşı aktifliği artar. Pirol genellikle elektrofilik süstitüsyon reaksiyonunu, 2 veya 5

pozisyonundan gerçekleştirir. Piyrol monomerinin yapısı ve rezonans formları Şekil 1.18.'de verilmiştir.



Şekil 1.18. Piyrol ve rezonans formlarının yapısı

1.2.3.1. Polipiyrolün Kimyasal ve Elektrokimyasal Sentezi

Polipiyrol (PPy) çevresel kararlılığı, kolay sentezlenmesi ve yüksek iletkenliğinden dolayı ticari uygulamalarda diğer iletken polimerler içerisinde en fazla tercih edilendir. PPy ilk kez 1916 yılında kimyasal polimerizasyonla sentezlenmiş ve piyrol siyahı olarak adlandırılmıştır. PPy, piyrol ya da sübtitüe piyrol monomerlerinin yükseltgenmesi ile elde edilmektedir. Yükseltgenme genellikle ya kimyasal bir yükseltgen varlığında çözelti içerisinde kimyasal polimerizasyon ile ya da dışarıdan gerilim uygulanarak iletken elektrot yüzeyinde elektropolimerizasyon yöntemi ile gerçekleştirilmektedir. Bunun yanı sıra fotokimyasal başlatıcı ve enzim - kataliz polimerizasyon yöntemleri de yükseltgenme işlemi için kullanılmasına rağmen, kimyasal ve elektrokimyasal polimerizasyon yöntemlerine göre daha az tercih

edilmektedir. Kullanılan çeşitli sentez yöntemlerine bağlı olarak farklı formlarda polipirol materyalleri elde edilmektedir. PPy elektrokimyasal sentez ile çalışma elektrotu üzerinde film olarak, kimyasal polimerizasyon yöntemi ile genellikle toz halinde ve enzimatik polimerizasyon sonucunda ise sulu dispersiyonlar formunda oluşmaktadır. Ayrıca farklı sentez yöntemleri ile elde edilen polimerler farklı kimyasal ve elektriksel özelliklere sahip olmaktadır (Wallace ve ark., 2003).

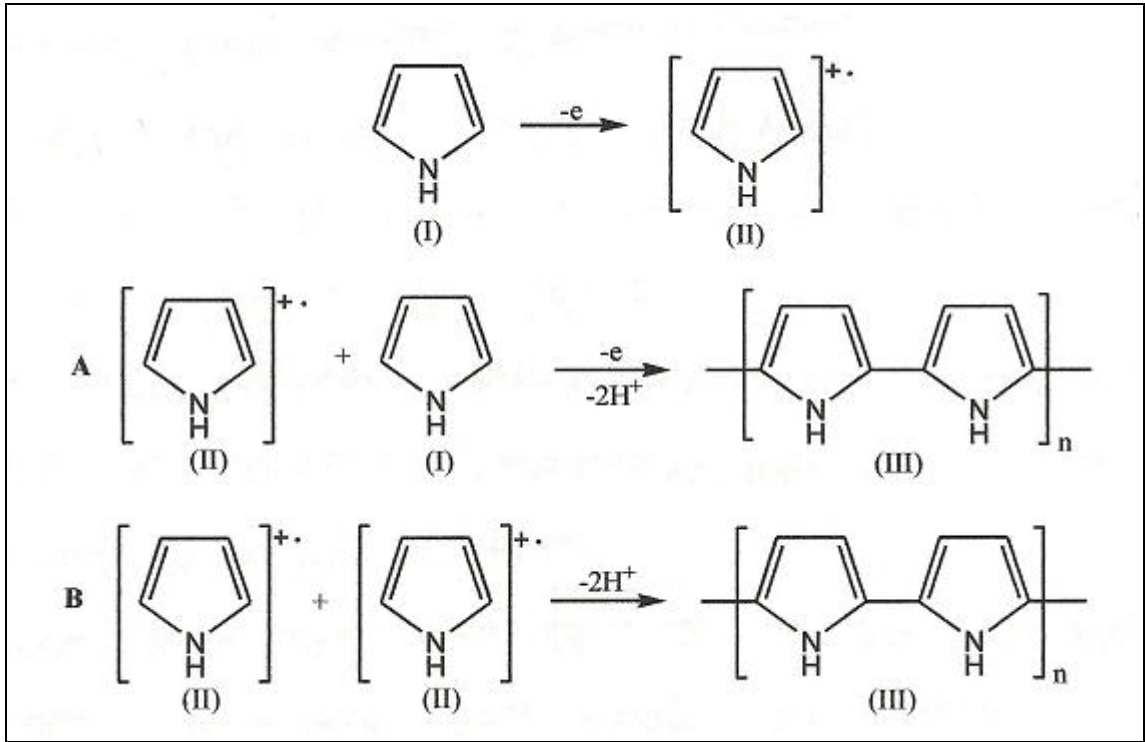
Kimyasal polimerizasyonda yükseltgen olarak genellikle $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, H_2O_2 bileşikleri ve Fe^{+3} , Cu^{+2} , Cr^{+6} , Ce^{+4} , Ru^{+3} ve Mn^{+7} geçiş metalleri kullanılmaktadır (Wang ve ark., 2001). Yükseltgen olarak $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ kullanıldığında anyonik katkı maddelerinin ilavesi ile oluşan polimer miktarında çok az bir artış gözlenirken buna karşılık iletkenliği büyük ölçüde azalmaktadır. $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, sodyum dodesilbensülfonat ve sodyum alkilsülfonat gibi anyonik katkı maddelerini içeren sulu çözeltinin kullanıldığı kimyasal polimerizasyon yöntemi ile elde edilen polipirolün, hem miktarının hem de iletkenliğinin arttığı gözlenmiştir (Kudoh, 1996). Ayrıca polimerizasyon işleminde kullanılan çözücünün de polimerin iletkenliğine etkisi büyüktür. Aynı polimerizasyon koşullarında çözücü olarak dimetilformamit ve aseton kullanıldığında çok düşük iletkenliğe sahip polipirol elde edilirken; benzen, tetrahidrofur, kloroform ve asetonitrilde iletkenliğin 20 S/cm den küçük, su, metanol, etanol, pentanolde ise 90 S/cm den büyük olduğu görülmüştür (Chandrasekhar, 1999).

Kimyasal polimerizasyon yöntemi nano yapıda polipirol sentezi için oldukça uygundur. Kimyasal olarak sentezlenen polipirol nano-kompozitleri, afinite kromatografisi çalışmalarında kullanılmaktadır. Bunun yanında kimyasal polimerizasyon, polipirolün herhangi bir yüzey üzerinde oluşturulması için kullanışlı bir yöntem değildir. Ayrıca polipirol yaygın olarak kullanılan çözücülerde neredeyse hiç çözünmez. Bu nedenle polipirol çözünürlüğünü artıran uygun reaktifler ile katkılanır. Çözünmüş polipirolün çözeltilerden alınması polimerin koloidal partikül formunda olması durumunda mümkündür. Fakat elektrokimyasal polimerizasyonla elektrot yüzeyinde oluşan filmlerin aksine kimyasal polimerizasyon ile elde edilen polipirolün yüzeydeki tutunmasının zayıf olması, polipirol esaslı sensörlerin tasarımı için bu yöntemin kullanımını kısıtlamaktadır. Kimyasal polimerizasyonun bu dezavantajları elektrokimyasal polimerizasyon yöntemi kullanılarak giderilebilir (Ramanavicius ve ark., 2006).

Sonuç olarak polipirol hazırlanmasında kullanılan sentez yöntemi uygulama alanlarına bağlı olarak seçilmelidir.

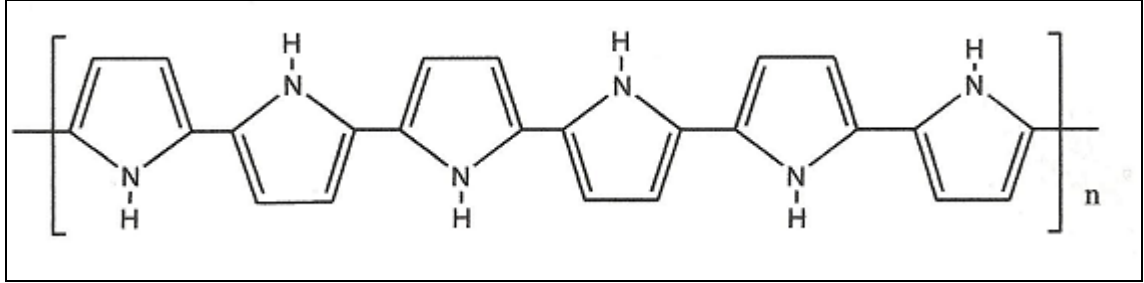
Pirolün elektrokimyasal polimerizasyonu, ilk kez Diaz ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu alandaki araştırmalarda genellikle asetonitril, propilen karbonat vb. gibi aprotik organik çözücüler kullanılmıştır. Bunun yanında pirolün protik ortamlardaki elektrokimyasal polimerizasyonu da bilinmektedir (Takakubo, 1987).

Genies ve arkadaşlarının (Genies ve ark., 1983; Imanishi ve ark., 1988) önerdiği polimerizasyon mekanizmasına göre, pirol monomeri (I) bir elektron vererek katyon radikale (II) yükseltgenmektedir. Daha sonra, elektrofilik aromatik substitüsyon reaksiyonu (A) veya radikal birleşme (coupling) reaksiyonu ile (B) meydana gelen yapıdan iki protonun eliminasyonu sonucu bir dimer (III) oluşmaktadır. Aromatik dimer ve daha büyük molekül ağırlığına sahip oligomerler, aynı reaksiyon mekanizması gereğince polimeri oluşturmaktadır. Her iki polimerizasyon mekanizması da radikal katyon ara ürünü üzerinden gerçekleşmektedir. Genies ve arkadaşları tarafından pirolün elektrokimyasal polimerizasyonu ile PPy oluşumu için önerilen bu mekanizma Şekil 1.19.'da verilmiştir.



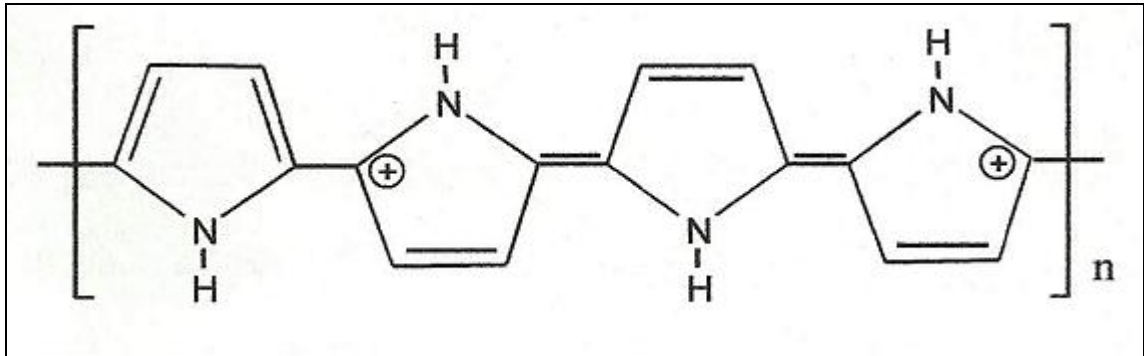
Şekil 1.19. Pirolün elektrokimyasal polimerizasyonu için önerilen reaksiyon mekanizması. A) Elektrofilik substitüsyon ve B) Radikal birleşmesi

Pirolün elektrokimyasal polimerizasyonu sonucu meydana gelen nötral polimerin yapısı Şekil 1.20.'de gösterilmiştir (Mizoguchi ve ark., 1997).



Şekil 1.20. Nötral (katkılanmamış) polipirol yapısı

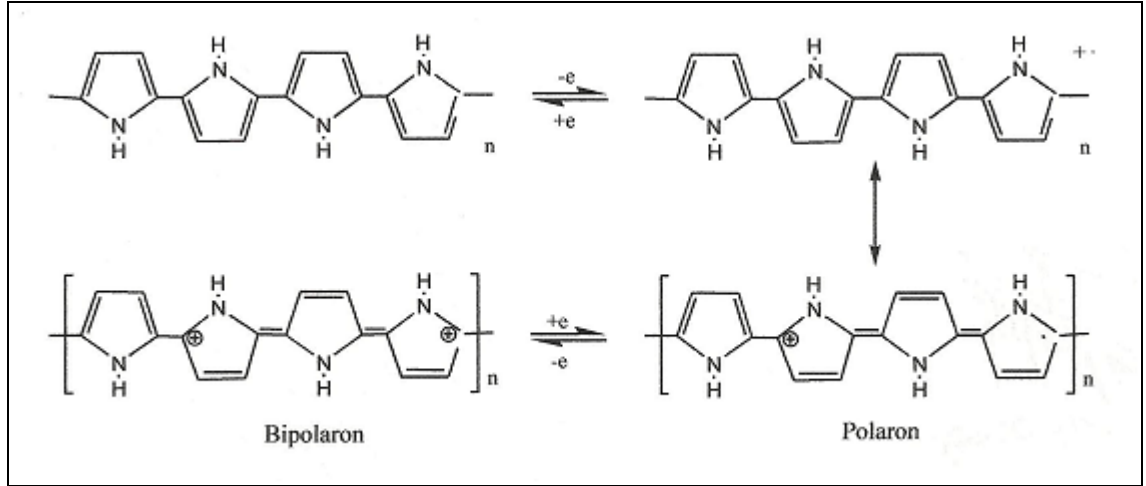
PPy filmi nötral halde yalıtıcıdır. Ancak filmin yükseltgenden sonra ortaya çıkan yapısı yüksek iletkenlik gösterir (Czerwinski ve ark., 1987). Polipirolün elektronik olarak iletken hali Şekil 1.21.'de verilmiştir (Samuelson ve Druy, 1986).



Şekil 1.21. Polipirolün yükseltgenmiş yapısı (bipolaron)

Pirol monomerinin elektrokimyasal polimerizasyonu sonucu elektrot yüzeyini kaplayan polipirol, uygulanan gerilime bağlı olarak bir elektron kaybederek katyon radikali yapısına (polaron) dönüşür. Polaron yapısındaki polimer filminin bir elektron daha kaybetmesi sonucunda di-katyonik yapı (bipolaron) meydana gelir (Johnson ve Kriz, 1997). Polipirolün redoks mekanizması Şekil 1.22.'de gösterilmiştir.

Polipirolün redoks reaksiyonu esnasında filmde renk değişimi (elektrokromik özellik) gözlenmektedir. Polimer indirgenmiş durumda açık kahverengi/sarı renkte iken yükseltgenmiş konumda siyah kadifemsi bir görünüme sahip olmaktadır (Aydın, 2002).



Şekil 1.22. Polipirolün yükseltgenme-indirgenme mekanizması

1.3. Glukoz ve Önemi

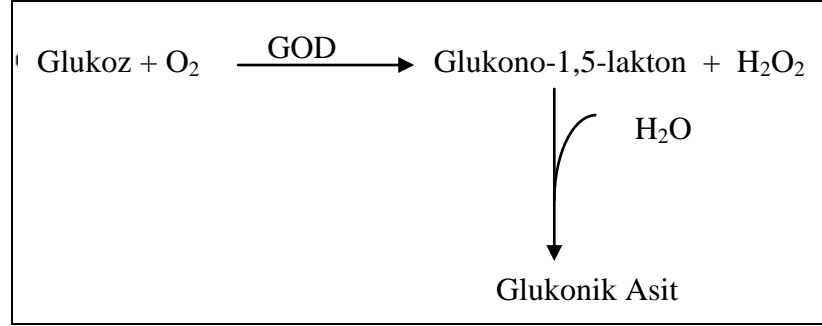
Glukoz derişiminin belirlenmesi gıda işlemleri ve fermantasyonda olduğu kadar klinik, biyolojik ve kimyasal örneklerde de çok önemlidir (Yoshimura ve Hozumi, 1996; Mizutani ve Yabuki, 1997; Xu ve Chen, 2000). Şeker hastalığının izlenmesi ve tıbbi teşhis amacıyla glukoz tayinleri yaygın olarak kullanılmaktadır. 21. yüzyılın en büyük sağlık sorunlarından biri olan şeker hastalığına yakalanan hasta sayısının 2025 yılına kadar 300 milyonu bulacağı tahmin edilmekte (King ve ark., 1998) ve kan şekeri seviyelerinin düzenli olarak ölçülmesi gerekmektedir (Garg ve ark., 2004). Bu nedenle, deri altı dokularında glukoz derişimini sürekli bir değerlendirmeye tabi tutabilmek ve kandaki glukoz seviyesini belirleyebilmek amacıyla duyarlı, seçici, güvenilir ve düşük maliyetli glukoz sensörü üretimi için giderek artan bir çaba sarfedilmektedir (Yasuzawa ve ark., 2000; Sljukic ve ark., 2006).

Elektrokimyasal analizler açısından düşünüldüğünde, glukozun da içinde yer aldığı çoğu karbonhidratın, yaygın olarak kullanılan elektrotlar üzerinde yükseltgenmesi büyük bir aşırı gerilim uygulanmasını gerektirdiği için kolay değildir. Bu yüzden yüksek katalitik aktiviteye sahip ve daha basit işlemler gerektiren alternatif elektrot malzemeleri bulmak için çalışılmaktadır. Bu amaca yönelik en ümit verici yaklaşım modifiye elektrotların kullanımı olarak görülmektedir (Barrera ve ark., 2006). Bir elektrot yüzeyini modifiye etmek, modifiye edilmemiş yüzeyde gerçekleşmeyen bazı kimyasal özelliklerin gerçekleşmesini sağlar ve böylece elektrot yüzeyinin seçiciliğinde

artma meydana gelir (Oni ve ark., 2005). Kimyasal olarak modifiye bir elektrot elde etmek için elektrotlar çoğu zaman iletken veya yarı iletken bir malzemeyle kaplanır veya kimyasal bir modifikasyon ajanı yük transfer reaksiyonları ya da ara yüzey bağlantıları vasıtasıyla yapıya sokulur (Leznoff ve Lever, 1989).

1.4. Glukoz Oksidaz

Glukoz oksidaz (GOD) (EC 1.1.3.4, β -D-glukoz: oksijen oksideredüktaz) glukozun moleküler oksijen ile yükseltgenip glukono-1,5-lakton ve hidrojen peroksidin (H_2O_2) olduğu reaksiyonu katalizler. Lakton sulu ortamda herhangi bir enzime ihtiyaç duymaksızın hidroliz olarak glukonik aside dönüşür. Reaksiyon aşağıdaki gibidir:



GOD aktivitesi ilk defa 1904'de Maksimow tarafından *Aspergillus niger* (*A.Niger*)'de saptanmıştır. Enzimin oksidatif etkisi olduğunu belirleyen Müller (1928), saflaştırılan enzimin sahip olduğu sarı rengin, bünyesindeki prostetik gruptan (flavin adenin dinükleodit, FAD) kaynaklandığını öne sürmüştür. Keilin ve Hartree (1948), oksidasyonun FAD tarafından gerçekleştirildiğini; enzimin açığa çıkardığı H_2O_2 ile antimikrobiyel aktivite gösterip antibiyotik olarak davrandığını belirlemişlerdir. Enzim ticari olarak ilk kez 1952 yılında üretilmeye başlanmıştır. Önceleri enzim kaynağı olarak *Penicullum notatum* ve *Pencillum glaucum* kullanılmış olup, günümüzde *Aspergillus niger* veya *Pencillum amagasakienese* kullanılmaktadır (Özyılmaz, 2005).

1.4.1. GOD'nin Genel Özellikleri

Katalizledikleri reaksiyonlar aynı olsa da, değişik kaynaklardan saflaştırılan GOD molekülleri farklı kimyasal özellikler gösterir. Örneğin *A. Niger*, kaynaklı GOD molekül ağırlıkları 80 kD olan, birbirine disülfid köprüleri ile bağlı 2 eşdeğer alt üniteden meydana gelmiştir. *A. Niger* GOD'sinin her alt üniteye 1 mol FAD içermektedir. GOD molekülünde yaklaşık olarak % 74 protein, % 16 nötral şeker ve % 2 amino şekeri bulunmaktadır. Enzim yapısında bulunan karbonhidratın % 80'ini mannoz oluşturmaktadır. Mannoza, enzimin protein kısmına Ansa amino asit artığının R grubundaki amino azotu, Thr ve Ser amino asit artıklarının R gruplarındaki hidroksil oksijeni üzerinden glukozidik bağ ile bağlanmıştır. Ayrıca enzimdeki FAD molekülü flavin-hipoksantin dinükleotid ile yer değiştirdiğinde GOD aktivitesinde bir değişim gözlenmemektedir. FAD molekülü ile apoprotein arasında kovalent bağ bulunmadığından enzim tamamen denatüre edilerek FAD molekülü enzimden uzaklaştırılabilir. Enzimin yapısında bulunan karbonhidrat tamamen uzaklaştırılsa bile aktivite göstermeye devam eder; ancak termal stabilitesi azalır.

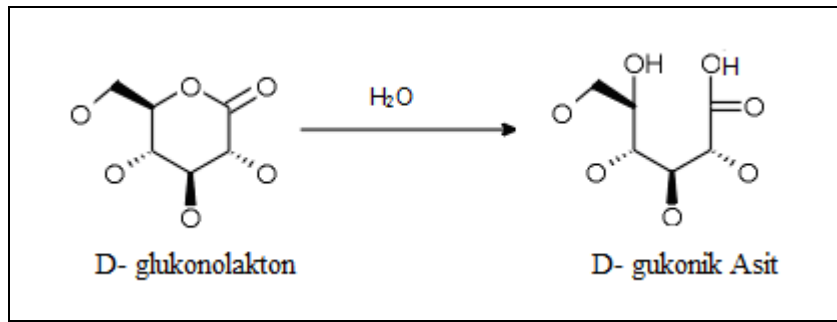
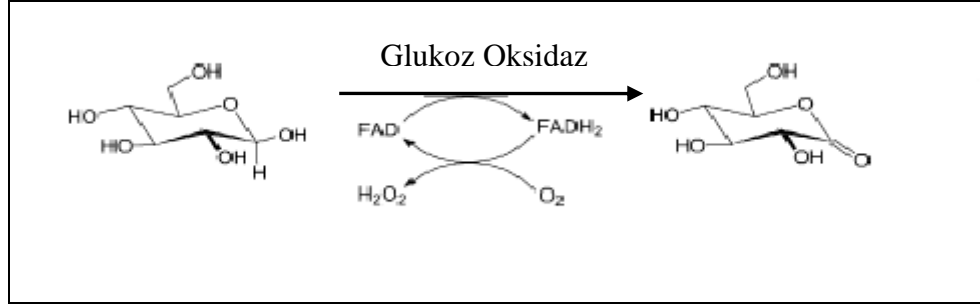
GOD β -D-glukoz için oldukça spesifik olup β -D-glukoz'u α -D-glukoza göre 157 kez daha hızlı okside eder. Ayrıca enzim 2-deoksi-D-glukoz, D-mannoza ve D-galaktoza için çok düşük de olsa aktivite göstermektedir.

GOD'nin başlıca inhibitörleri Ag^+ , Hg^+ ve Cu^{+2} olarak belirlenmiştir (Özyılmaz, 2005).

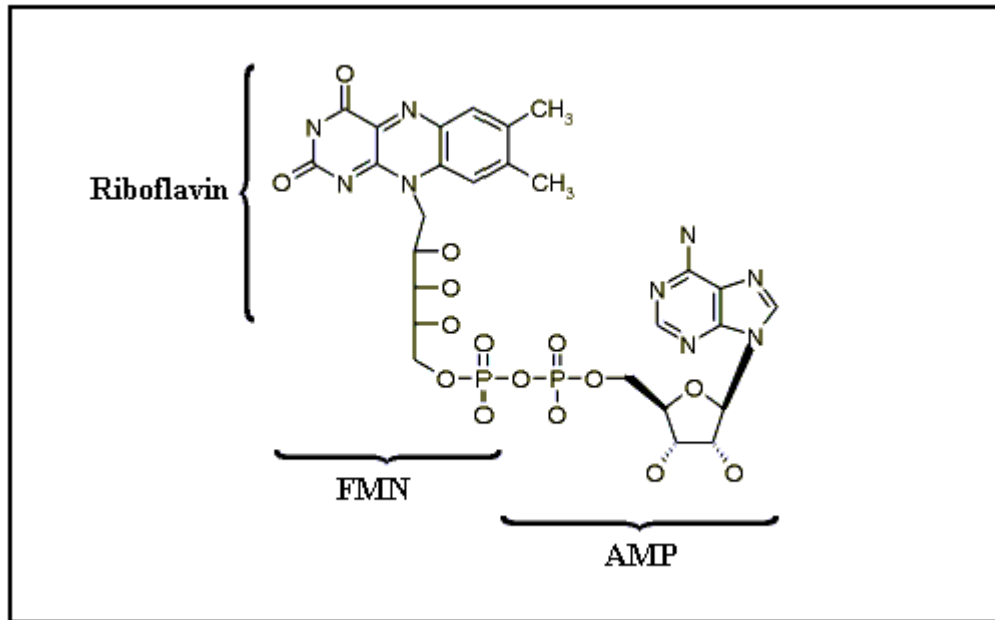
1.4.2. GOD'nin Reaksiyon Mekanizması

GOD enzimi glukozu glukonik aside oksitler. Reaksiyon flavoenzimin önce indirgendiyi ve sonra da yükseltgenmesinin meydana geldiği iki basamak üzerinden yürür. İndirgenme yarı basamağında glukoz iki proton ve elektronu enzime aktararak glukonolaktone dönüşür. Yükseltgenme yarı basamağında ise enzim moleküler oksijen ile yükseltgenir ve hidrojen peroksit oluşur. Reaksiyon mekanizması tam olarak anlaşılamamış olmakla beraber, aktif bölgede bulunan His 516, His 559 ve Glu 412 aminoasit artıklarının redoks reaksiyonda rol aldıkları bilinmektedir. Yarı empirik hesaplamalar sonunda, glukozdan FAD'a 1 hidrür iyonunun verildiği, bunun yanında 1 protonun da aktif bölgedeki His aminoasit atıklarından birine transfer edildiği

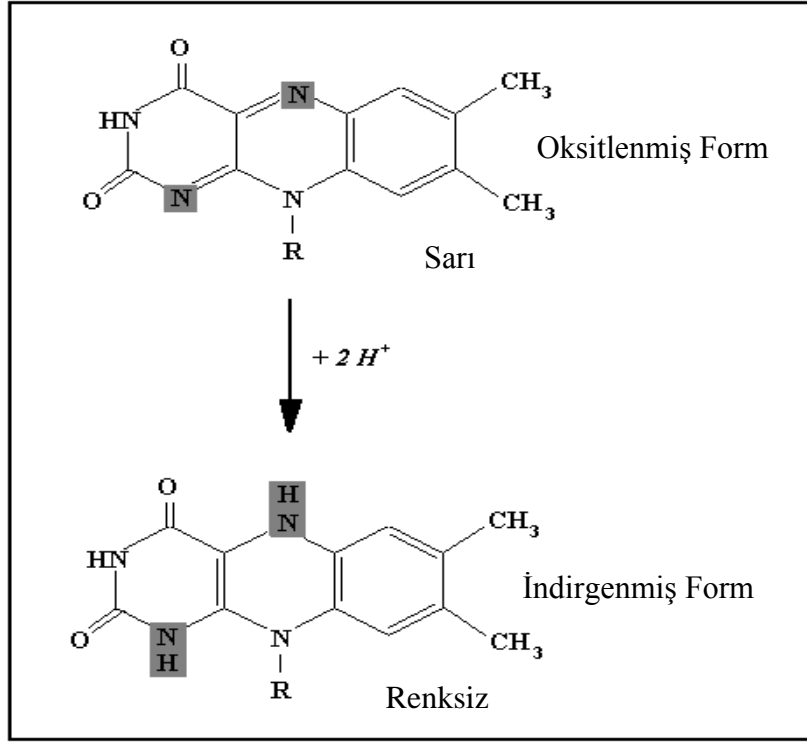
bildirilmiştir. Yapılan kinetik çalışmalar deprotonasyon işleminin düşük pH'da gerçekleşebileceğini göstermektedir (Weibel, 1971).



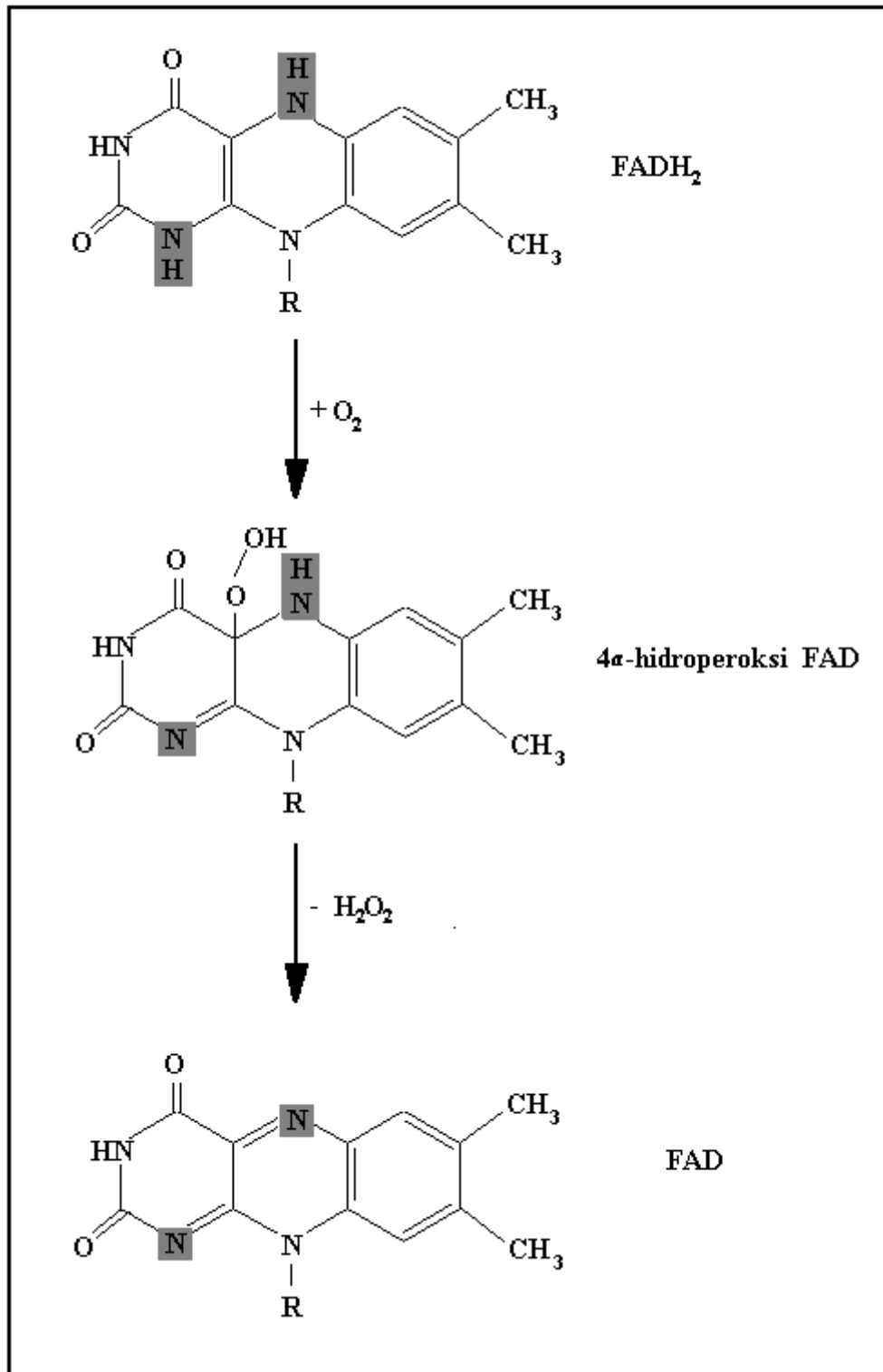
Şekil 1.23. GOD nin etki mekanizması



Şekil 1.24. GOD enziminin yapısındaki FAD grubu



Şekil 1.25. İzoalloksazin halkasının indirgenmesi



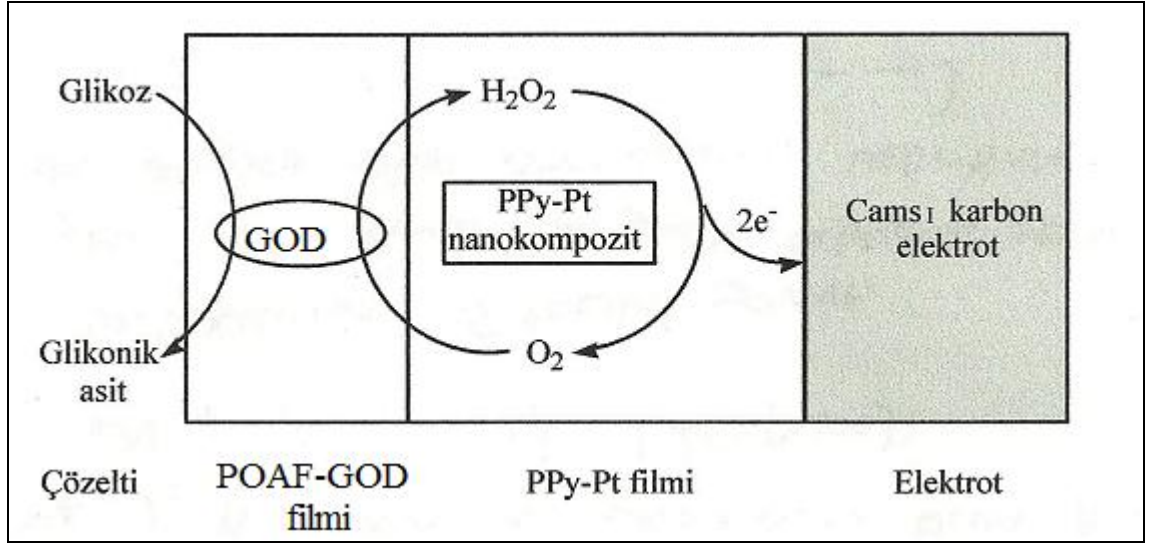
Şekil 1.26. İndirgenmiş izoalloksazin halkasının O₂ ile tekrar yükseltgenme mekanizması

FAD'nin indirgenme özelliği riboflavin molekülünün indirgenmesi esasına dayanır. FAD elektron akseptörü olarak davranıp glukozu yükseltger; ardından moleküler oksijeni indirgeyerek hidrojen peroksida dönüştürür ve kendisi tekrar oksitlenmiş formuna dönüşür.

1.4.3. Glukoz Oksidaz Elektrotu ile Glukoz Tayini

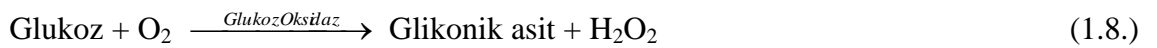
Hidrojen peroksit üretimine neden olan oksidaz enzimi temelli biyosensörler yaygın olarak kullanılmaktadır (Cosnier ve ark., 1999). Son zamanlarda iletken polimerlere biyokatalizörlerin immobilizasyonu ile ilgili çalışmalar dikkate değer bir şekilde artmaktadır. Polipirol, polianilin, politiyofen ve türevlerini içeren iletken polimerler ise elektrokimyasal olarak üretilen enzimatik elektrotların başlıcalarıdır (Retama ve ark., 2004). Bunlardan polipirol ile düşük yükseltgenme gerilimine sahip olması nedeniyle çok ilgilenilmiştir. Elektrokimya açısından önemli olan bu özellik sayesinde pek çok biyolojik sistemle uyumlu olan sulu çözeltilerden film oluşumu mümkün olmaktadır. Pek çok iletken polimer biyosensörü ile glukoz derişiminin belirlenmesi enzimatik reaksiyon sırasında tüketilen oksijenin indirgenme akımının veya açığa çıkan hidrojen peroksitin yükseltgenme akımının izlenmesiyle gerçekleştirilmektedir (Adeloju ve ark., 2001).

Li ve Lin'in (2007), yaptıkları polipirol ve poli-*o*-aminofenol (POAF) modifiye elektrot çalışmalarında bir sensörün çalışma prensibini ve işleyiş mekanizmasını şematik olarak göstermişlerdir (Şekil 1.27.).



Şekil 1.27. GOD immobilize edilmiş POAF'ün PPy-Pt nanokompozit filmi üzerine kaplanmasıyla oluşturulmuş glukoz sensörü ve işleyiş mekanizması

Burada öncelikle H_2O_2 yükseltgenmesini katalizlemek amacıyla polipirol-Pt (PPy-Pt) nanokompozit bir iç tabaka oluşturulmuş ve bu tabaka üzerine biriktirilen poli-*o*-aminofenol filmine glukoz oksidaz enzimi (GOD) immobilize edilmiştir. Glukoz oksidazın tutturulduğu poli-*o*-aminofenol filmi (POAF-GOD) çözeltideki glukoz ile temas ettiğinde oksijen varlığında GOD enziminin etkisiyle glikonik asit ve H_2O_2 oluşmaktadır.



Ardından oluşan H_2O_2 PPy-Pt üzerinde elektrokatalitik olarak yükseltgenmekte ve pik akımları H_2O_2 ile orantılı akım değerlerinin elde edilmesini sağlamaktadır.



Elde edilen bu değerler dolaylı olarak glukoz miktarıyla ilişkilidir. Böylece glukozu duyarlı modifiye bir elektrot elde edilmiştir. Kullanılan enzim glukozu

spesifik cevap verdiğinden tasarlanan elektrot girişim yapan türlerin varlığından en az etkilenecek şekilde hazırlanmıştır.

1.5. Voltametrik Yöntemler

Dengede bulunan elektrot/çözelti sistemi akım veya gerilim uygulanarak bozulduğunda sistemin yeniden dengeye ulaşabilmesi için gösterdiği davranışların incelendiği yöntemlere ‘voltametrik yöntemler’ denir. Bu yöntemlerde elektrotlardan birine elektriksel etki yapılarak sistemin verdiği cevap ölçülür. Bu cevap sistemin özellikleri hakkında bilgi verir. Genel olarak elektrokimyasal yöntemlerde akım, gerilim ve zaman parametreleri bulunur ve bu parametreler yöntemin adını belirler. Örneğin voltametri, kronoamperometri ve kronokulometri gibi yöntemlerde sırası ile gerilim-akım, zaman-akım ve zaman-yük parametreleri arasındaki ilişki anlatılmaktadır.

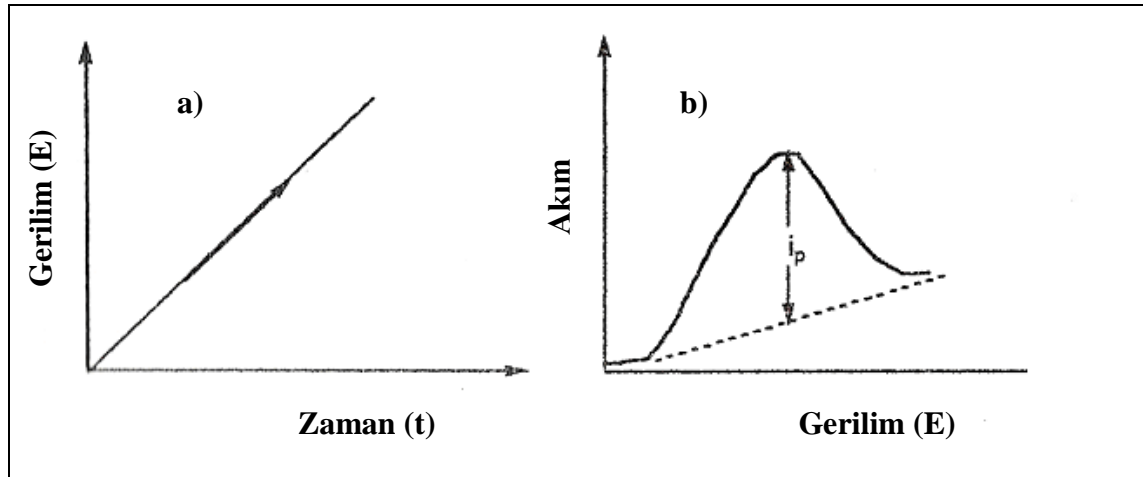
Elektroanalitik yöntemler genel olarak statik ve dinamik yöntemler olmak üzere ikiye ayrılır. Statik yöntem net akımın sıfır olduğu denge durumunu, dinamik yöntem ise denge durumundan uzakta net akımın gözlemlendiğini ifade eder. Elektroanalitik yöntemlerin çok büyük bir kısmı net akımın sıfır olmadığı dinamik yöntemlerdir.

Gerilim kontrollü dinamik metotlar arasında yer alan voltametrik yöntemde deneyler destek elektrolit ve üçlü elektrot sisteminin bulunduğu elektrokimyasal hücrelerde gerçekleştirilmektedir. Destek elektrolit çözelti içinde elektriksel iletkenliği sağlamak amacıyla kullanılır. Bu yöntemde, çalışma (indikatör) elektrotu ile referans (karşılaştırma) elektrotu arasına uygulanan ve değeri zamanla değişen gerilime karşı, çalışma elektrotu ile karşıt (yardımcı) elektrot arasındaki geçen akım ölçülmektedir. Voltametrik yöntemde çalışma elektrotu olarak civa, platin, altın, paladyum, karbon (grafit, karbon pasta, camsı karbon) gibi elektrotlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Referans elektrotun gerilimi deney süresince sabittir ve genellikle referans elektrot olarak Ag/AgCl veya doymuş kalomel (SCE) kullanılmaktadır. Elektrot sistemindeki üçüncü elektrot ise karşıt elektrottur ve yaygın olarak platin kullanılır. Voltametrik yöntemde çalışma elektrotu üzerinde maddelerin indirgenmesi veya yükseltgenmesi sonucunda akım oluşur. İndirgenmeden dolayı oluşan akıma katodik akım, yükseltgenmeden dolayı oluşan akıma ise anodik akım denir. Bu yöntemle herhangi bir maddenin elektrokimyasal davranışının incelenmesi elektrota uygulanabilecek gerilim

aralığının sınırlarına, kullanılan çalışma elektrotuna, kullanılan çözücü ve destek elektrolitin türüne bağlıdır (Özcan, 2008).

1.5.1. Doğrusal Taramalı ve Dönüşümlü Voltametri

Doğrusal taramalı voltametri (DTV) elektroaktif bir madde içeren durgun bir çözeltide bir çalışma elektrotu ile karşılaştırma elektrotu arasına zamanla doğrusal olarak değişen bir gerilim programı uygulanır ve çalışma elektrotu ile karşıt elektrot arasında oluşan akım ölçülür. Elde edilen gerilim-akım cevap eğrisine ‘doğrusal voltammogram’ denir. Doğrusal taramalı voltametri yönteminde önemli bir deneysel değişken olan gerilim tarama hızı, 0,01-1,00 V/s arasında değiştirilebilmektedir. Çalışma elektrotuna uygulanan gerilim elektroaktif maddenin indirgenme veya yükseltgenme gerilimine ulaşınca elektrot yüzeyindeki maddenin çok hızlı tüketilmesi akımda artışa neden olur. Bu işlem elektrot yüzeyi ile çözelti arasında bir derişim farkı doğurur. Bunun sonucu olarak çözeltiden elektrot yüzeyine difüzyonla kütle aktarımı başlar. Difüzyonla kütle aktarımı, elektron aktarım işleminin hızı ile yarışamadığından akımda üstel bir düşüş gözlenir ve bir pik elde edilir (Şekil 1.28.).

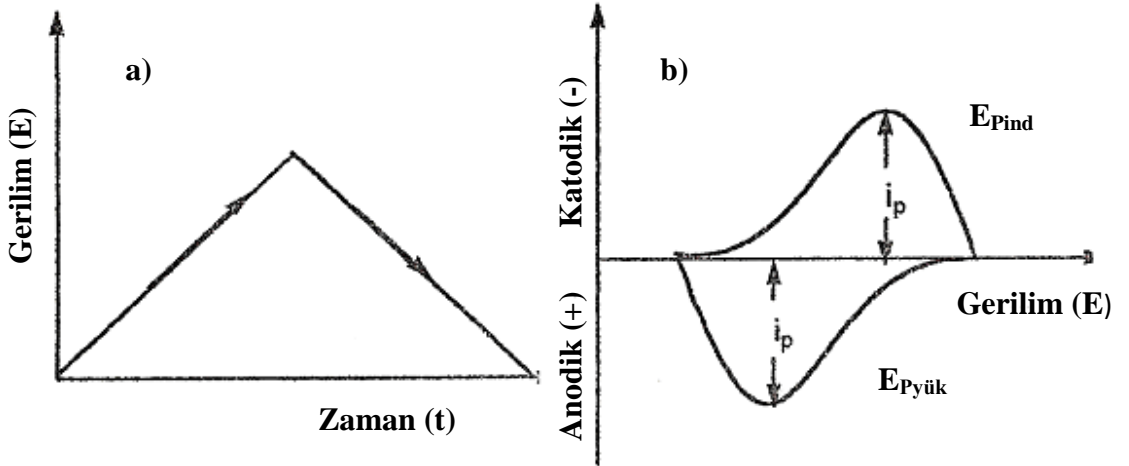


Şekil 1.28. Doğrusal taramalı voltametri (a) gerilim taramasının zamanla değişimi ve (b) elde edilen voltogram

Dönüşümlü voltametri (DV) yöntemi doğrusal taramalı voltametri yönteminin tamamlayıcısı gibi düşünülmektedir. İleri yönde uygulanan gerilim taraması istenen bir değerden sonra ters çevrilerek (Şekil 1.29a) analitin hem yükseltgenme hem de

indirgenme özelliklerinin aynı anda incelenmesi avantajını sağlamaktadır. Bu yöntemde elde edilen cevap eğrisine de ‘dönüşümlü voltammogram’ denir (Şekil 1.29b). Bu yöntemde ileri ve geri yöndeki gerilim tarama hızları aynı tutulabildiği gibi istendiğinde farklı tarama hızları da kullanılabilir. Ayrıca ileri ve geri yöndeki gerilim taraması bir kez yapılabildiği gibi birçok kez de yapılabilir. Bu durumda çok döngülü dönüşümlü voltammogramlar elde edilir.

Dönüşümlü voltammogramların ayrıntılı incelenmesiyle bir sistemin hangi gerilimlerde ve kaç adımda indirgenip yükseltgenebileceğini (reaksiyon mekanizmasını), elektrokimyasal açıdan tersinir-yarı tersinir-tersinmez özelliğini, elektrot tepkimesini izleyen bir çözelti tepkimesinin olup olmadığını, oluşan ürünlerin kararlılığını, elektrot tepkimesine giren maddelerin veya ürünlerin elektrot yüzeyine tutunup tutunmadıklarını anlamak mümkündür (Özcan, 2008).



Şekil 1.29. Dönüşümlü voltametri (a) gerilim taramasının zamanla değişimi ve (b) elde edilen voltammogram

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Vrbova ve Marek, (1990), HCl ile kısmi olarak hidrolizlenmiş naylon ağ üzerine Ugi reaksiyonu ile GOD ve CAT'ı ko-immobilize etmişlerdir. Enzimlerin immobilize edildiği naylon ağı oksijen sensörü ile birleştirerek D-glukoz için spesifik bir biyosensör tasarlamışlardır. Karşılaştırma yapmak amacıyla GOD ve CAT'ı sikloheksil izosiyanyür yokken ve sadece GOD'ı sikloheksil izosiyanyür varlığı ve yokluğunda immobilize ederek sıcaklık ve pH'nın aktivite üzerine etkisini incelemişlerdir. Sikloheksil izosiyanyür varlığında immobilize edilmiş GOD ve CAT sisteminin 6 ay sonrasında aktivitesini % 90 koruduğunu belirlemişlerdir.

Horborn ve ark., (1997), gözenek büyüklüğü kontrollü camı önce silanlayıp glutraldehit ile etkileştirmişler; sonra da GOD ve CAT'ı immobilize etmişlerdir. Immobilize enzimleri akışkan-enjeksiyon esaslı minyatür bir termal biyosensör tasarımında kullanmışlardır. Hiçbir ön işlem uygulanmaksızın tam kanda glukoz derişimini belirlemek amacıyla kullanılan biyosensörde analizi yapılan kana ait hemotokrit değerinin sonuca etkisini incelemişlerdir. 5 dakikalık ölçüm periyodunda en az 100 kan örneğinin analizinin yapılabildiğini ve 0,5-16 mmol\L glukoz derişimi aralığı için lineer cevap alındığını bildirmişlerdir.

Yasuzawa ve ark., (1999), enzim varlığında 3-(1-pirol) propiyonik asitin (PPA) elektropolimerizasyonu ile amperometrik glukoz sensörü hazırlamışlardır. Suda çözünen (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC) ile glukoz oksidaz (GOD) ve polipirol türevlerini kovalent bağlamışlardır. Poli (o-fenildiamin) (PPD) ve nafyon filmler aynı elektrot içinde iç filmler gibi elde etmişlerdir. EDC'nin davranışının elektrot üzerindeki nafyon iç film dışında glukoz cevaplama kararlılığının geliştirilmesinde etkili olduğunu bulmuşlardır. Ortama D-fruktoz veya üre eklenmesi elektrota etki etmemesine karşın; askorbik asit, asetaminofen ve ürik asitin elektrot üzerindeki iç filme etkisinin göz ardı edilmeyeceğini öne sürmüşlerdir.

Garjonyte ve Malinauskas, (2000), GOD'yi Prusya Mavisini (PB) ile polipirol (PPy) veya poli o-fenildiaminin (POPd) her iki monomerinin uygun olan birer tabakası modifiye platin elektrot üzerine immobilize etmişlerdir. Glukozun amperometrik tepkilerini enzimatik reaksiyonlar sırasında oluşan hidrojen peroksitin oluşmasına bağlı olarak ölçmüşler ve Ag\AgCl'ye karşı anodik davranışı 0,60 V, katodik davranışı 0,00

veya 0,20 V'de çalışmışlardır. POPD'nin modifiye elektrot olması durumunda, asetoaminofen veya askorbat gibi girişim etkileriyle zorlayıcı bir şekilde indirgenmenin olmasına neden olduğunu bildirmişlerdir.

Xue ve ark., (2000), iletken polianilin-poliizopren (PANI-PIP) kompozit filmine GOD'yi immobilize ederek H_2O_2 seçici geçirgen bir biyosensör tasarlamışlardır. Pt elektrot önce poliizopren ile kaplandıktan sonra 1 M HCl içindeki 0,02 M anilin içeren çözeltiye daldırılarak 0,65 V sabit potansiyel altında elektrokimyasal olarak polianilin sentezlemişlerdir. PANI-PIP filmi ile kaplı olan Pt elektrotu pH 4,50 olan 0,1 M fosfat tamponuna daldırılıp -0,50 V potansiyel altında film bünyesinde bulunan Cl^- iyonlarını mümkün olduğunca uzaklaştırdıktan sonra 20 μ M GOD içeren pH 6,52 olan fosfat tamponuna daldırılmış ve bu ortamda 0,65 V potansiyel fark uygulanarak (-) yüklü olan GOD'yi (pI değeri 4,2) PANI-PIP filminin içine immobilize etmişlerdir. Enzim sistemini glukoz çözeltisine daldırılarak oluşan H_2O_2 'nin elektrokimyasal oksidasyonu sırasında açığa çıkan akımı ölçmüşlerdir. Film bileşimi ile biyosensörün hassaslığını, H_2O_2 geçirgenliğini ve interferens özellik gösteren askorbik asitin etkisini inceleyerek biyosensörü karakterize etmişlerdir.

Ramanathan ve ark., (2001), GOD ve CAT'ın ko-immobilize edildiği sol jel esaslı termal glukoz biyosensörü tasarlayarak karakterize etmişlerdir. Gözenekli camsı karbon elektrot su ile iyice ıslatıldıktan sonra yüzeyi tetraetoksisilandan hazırlanmış olan sol-jel ile muamele edip kurutmuşlar sonrasında üzerine GOD-CAT karışımı dökülerek enzim karışımını jel içine immobilize etmişlerdir. Camsı karbon elektrotu mekanik destek; sol-jeli ise enzimin desteğe tutunmasını sağlayan yapıştırıcı olarak kullanmışlardır. Elde ettikleri elektrotu enzim termistörü içeren bir kolona yerleştirip, farklı derişimlerdeki glukoz enjeksiyonu ile kolondan geçen tampon çözeltinin sıcaklığındaki değişimini ölçmüşlerdir.

Tinkılıç ve ark., (2002), bakır tel üzerinde grafit-epoksi tabakası ve sonrasında bu tabakanın yüzeyinde oluşturulan PVC ve PVC-NH₂ membrana üreaz ve glukoz oksidazı gluteraldehit aracılığıyla çapraz bağlama yöntemiyle immobilize etmişler, böylece glukoz ve üre biyosensörü oluşturmuşlardır. İmmobilizasyon aşamasında gluteraldehit enzimden önce ve enzimle birlikte olmak üzere iki farklı şekilde kullanmış ve ilk şekilde oluşturulan biyosensörün daha hızlı cevap verdiğini belirlemişlerdir. Glukoz derişimine bağlı olarak amperometrik ölçüm yaptıklarında 0,1-50 mM

aralığında lineer cevap almışlardır. Tasarlanan biyosensörün yüksek hassaslık ve uzun ömür göstermesi, kolay ve düşük maliyette hazırlanabilmesi, küçük olması ve kısa sürede cevap vermesi gibi önemli özellikleri olduğunu rapor etmişlerdir.

Borole ve ark., (2003), polianilin (PA), poli-o-toluidin (POT) ve onların kopolimerleri polianilin-co-o-toluidin (PA-co-POT) asetat ve fosfat tamponu içinde platin levhaya elektrokimyasal olarak depolanmış ve oluşturulan ince filmler içine basit bir teknik olan tutuklama yöntemiyle glukoz oksidazı (GOD) hapsedmişler ve bir glukoz biyosensörü tasarlamışlardır. Maksimum akım PA, POT ve PA-co-POT GOD elektrotları için 0,60 V potansiyelde ve pH 5,5 te gözlemişlerdir. Fosfat tamponunda hazırlanan elektrotlar asetat tamponunda hazırlananlara kıyasla daha hızlı yanıt vermiştir. PA GOD elektrotun POT ve PA-co-POT GOD göre; PA-co-POT GOD elektrotunun da POT GOD elektrota göre da hızlı cevap verdiğini bulmuşlardır.

Borole ve ark., (2004), poli-o-anisidin (POA), poli-o-toluidin (POA) ve onların kopolimerleri olan poli-o-anisidin-co-o-toluidin (POA-co-POT)'i 1 M H₂SO₄ elektrolit ortamında 0,1 M'lık monomer çözeltileri 50 mV/s tarama hızıyla -0,2 ve 1,0 V potansiyel aralığında Ag/AgCl elektrota karşı platin elektrot üzerine elektropolimerize etmişlerdir. POA, POT ve onların kopolimerleri (POA-co-POT) asetat ve fosfat tamponu içinde platin levhaya elektrokimyasal olarak depolanmış ve oluşturulan ince filmler içine tutuklama yöntemiyle glukoz oksidazı (GOD) hapsedmişler ve bir glukoz biyosensörü tasarlamışlardır. Her iki tamponda da POA, POT, POA-co-POT GOD elektrotları için maksimum akımı pH 5,5'te ve 0,60 V potansiyel aralığında gözlemişlerdir. Amperometrik ölçümlerde fosfat tamponunun asetat tamponuna göre daha hızlı yanıt verdiğini görmüşler ve fosfat tamponunu tercih etmişlerdir. POT GOD elektrot her iki tampon içinde amperometrik ölçümlerde kullanım için POA-co-POT ve POA GOD elektrotlara göre tercih edilmiştir. Çünkü; POT GOD orantılı olarak iyi sonuçlar vermiştir. Kopolimer GOD elektrot, POA GOD elektrotun sonuçlarına göre daha iyi sonuçlar göstermiştir.

Eftekhari, (2004), substrat demir elektrot üzerine polianilin filmin elektrodepolanmasıyla oluşturulan modifiye enzim elektrot örnekleri üzerinde çalışmıştır. Demir substratını pasifleştirerek anilinin elektropolimerizasyonunu gerçekleştirmiştir. Substrat yüzeyindeki pasif tabaka varlığının meydana gelen elektroaktif film üzerinde önemli etkilere sahip olduğunu belirtmiştir. Anilinin

elektropolimerizasyonunu GOD varlığında gerçekleştirerek enzim elektrotlarını elde etmiştir. Pasifleştirilmiş demir elektrot üzerindeki polianilin film formunun daha kararlı olduğunu rapor etmiştir.

Chen ve ark., (2006), askorbik asit gibi safsızlıkların girişimlerini elimine etmek amacıyla; polipirol film elektrot, polipirol-glukoz oksidaz elektrot, karşı elektrot, referans elektrot gibi dörtlü elektrot hücresi ile meydana gelen, girişimsiz bir glukoz biyosensörü tasarlamışlardır. Glukoz oksidazın net katalitik akımını, glukoz oksidazsız iki çalışma elektrotun cevap akımları farkından elde etmişlerdir. Glukoz biyosensörünün analitik performansı üzerine pH'nın, sıcaklığın ve potansiyelin etkisini araştırmışlardır. Enzim ile katalizlenen reaksiyonun optimum pH'ını ve aktivasyon enerjisini sırasıyla 5,5 ve 25 kJ/mol olarak bulmuşlardır. I_{MAX} ve K_M değerlerini sırasıyla 5,88 μA ve 23,3 mmol/dm³ bulmuşlardır. Biyosensör cevap akımlarının 0,005'ten 20 mmol/dm³'e artan glukoz derişimleriyle lineer bir şekilde arttığını bildirmişlerdir. Ayrıca glukoz biyosensörünü UV ve FTIR ile karakterize etmişlerdir. Elde edilen girişimsiz polipirol glukoz biyosensöründe glukoz tayininin hassas bir şekilde yapılabildiği insan plazma örneklerine uygulamada ilerlenebileceği sonucuna varmışlardır.

Yu ve Sundmacher, (2007), biyoyakıt hücresi veya biyosensör olarak uygulama potansiyeli olabilecek bir enzim elektrotu hazırlamışlar; bu amaçla GOD ve ferrosen-GOD'nin dopant olarak kullanıldığı ortamda elektrokimyasal yöntemle iletken polimer matriksi sentezlemişlerdir. Elde edilen polimer-enzim tabakasını fiziksel ve elektrokimyasal yöntemlerle karakterize ederek glukozun oksidasyon aktivitesini araştırmışlardır. GOD-ferrosen ortamında elde edilen enzim elektrotunun glukoz oksidasyon akımının daha yüksek olduğunu rapor etmişler ve maksimum duyarlılığı 20 mM glukoz derişimi için gözlemişlerdir.

Ekanayake ve ark., (2008), platin üzerine kaplı nano gözenekli alümina elektrot kullanarak iletken bir polimer olan polipirol (PPy) ile amperometrik GOD biyosensörü tasarlamışlardır. Çalışma içerisinde polipirol film içine yapay porlar (gözenekler) yerleştirilmiş ve modelde gözenek boyutları seçilirken GOD molekülünün gözenek boyutları baz alınmıştır. Gözenek boyutları dikkatli bir biçimde incelenerek, eşleştirilmiştir. PF₆⁻ ile dop edilen polipirol filmini 0,05 M pirol ve 0,1 M NaPF₆ ile 0,3 mA/cm² akım yoğunluğunda 90 s. süreyle sentezlemişlerdir. İmmobilizasyonu

nanogözenekli polipirol film üzerine 5µL GOD'nin fiziksel adsorpsiyonuyla gerçekleştirmişlerdir. Çapraz bağlayıcı olarak 5 µl % 1 (v/v) gluteraldehit çözeltisi kullanmışlardır. Sentezlenen filmleri elektrokimyasal teknikler ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanarak karakterize etmişlerdir. 0,4 V'de glukozun farklı derişimlerine karşı amperometrik cevaplamaları ölçmüşlerdir. Nanogözenekli elektrotlar molekül ağırlığı yüksek olan enzimin taşınmasıyla oluşturulmuştur ve sonuç olarak kullanılan çapraz bağlayıcının sensörün duyarlılığını, tekrar kullanılabilirliğini, kararlılığını ve raf ömrünü arttırdığını bildirmişlerdir.

Yavuz ve ark., (2008), 0,10 M H₂SO₄ asitli ortamda yeni poli (N-metilanolin)/Kitosan (PNMANI)/Ch kompozitinin elektrokimyasal senteziyle amperometrik glukoz sensörü hazırlamışlardır. GOD enzimi bu kompozit yüzeyine fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle immobilize edilmiştir. Sentezlenen kompozit FTIR ve UV görünür bölge spektrofotometrik yöntemlerle karakterize edilmiş ve ayrıntılı yanıt çalışmaları glukoz derişimi ve pH'ya göre yapılmıştır. PNMANI/Ch/GOD elektrot amperometrik yöntemle glukoz algılaması 0,06-1,831 mM aralığı içindeki glukoz derişimleri için kullanılmıştır. Elektrotun cevap verme süresi 70 s. olarak bulunmuş ve Michaelis-Menten sabiti 1,71 mM olarak hesaplanmıştır.

JingJing ve JunJie, (2009), SBA-15 mezogözenekli silika kompozitinin (AuNPs-SBA-15) kapsüllendiği altın nanopartiküller üzerine horseradish peroksidaz ve glukoz oksidazın bağlandığı yeni bir bienzim biyosensörü tasarlamışlardır. Bienzim biyokonjugasyon biyosensörün elektrokimyasal davranışı dönüşümlü voltametri ve elektrokimyasal impedans spektroskopisiyle incelenmiştir. Sonuçların; doğrudan elektrokimyasal olarak gerçekleştirilmesi sonucunda; elektron transfer arayüzeyinde ve elektro iletken yüzeyinde hızlanan HRP'nin, mezogözenekli AuNPs-SBA-15 varlığında iyice artan protein yüklemesi gösterdiğini bildirmişlerdir. AuNPs-SBA-15 kompozitinin elektrokatalitik etkisinden dolayı biyosensör, enzimatik reaksiyonlardan oluşan H₂O₂'ye duyarlı cevap verdiğini rapor etmişlerdir. Böylece, bienzim biyosensörün glukoz tespiti için herhangi bir mediyatör eklenmeksizin kullanılabileceğini söylemişlerdir. Maksimum glukoz tespiti 1'den 48 µM lineer aralık ile 0,5 µM olduğu sonucuna varmışlardır.

Ghica ve Brett, (2009), fenoksazin boya, parlak krezil mavisi (BCB) camısı karbon elektrot üzerine dönüşümlü potansiyel tekniği ile polimerize edilmiş ve poli (parlak krezil mavisi) (PBCB) ile sonuçlanan film için dönüşümlü voltametri,

diferansiyel puls voltametri ve elektrokimyasal impedans spektroskopisiyle çalışmışlardır. Elde ettikleri polimer filmlerin elektrokimyasal özelliklerini incelemişler ve birbirleriyle karşılaştırmışlardır. Farklı yardımcı elektrolitler içinde farklı pH değerleri ile çalışan diferansiyel puls voltametrisinde en yüksek akım pH 4,1'de en yüksek akım görülmüş ve sonra azalmaya başlamıştır. Oksidasyon pikinin yoğun akımı sonucunda polimerin kalınlaşabileceği sonucunu bildirmişlerdir. Aynı davranışı dönüşümlü voltametride de görmüşlerdir. Oksidasyon ve redüksiyon piklerinin akım yoğunluğu her ikisinde de lineer bir şekilde tarama hızının kare köküne bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Bu davranış difüzyon kontrol işlemiyle uyumlu olmuştur. Ayrıca 51 mV/pH eğimi içinde artan pH ile potansiyel pikin negatif değerlere hareket ettiğini görmüşler, redoks işlemi süresince proton ve elektron sayılarının eşit olduğunu belirtmişlerdir. Modifiye elektrotu PBCB ile 0,00 V amperometrik modunda hidrojen peroksiti tayin etmede başarılı bir şekilde uygulamışlardır. Lineer doğrusal yanıt 1,3 mM ve 31 μ M arasındadır. Glukoz oksidaz enzimini çapraz bağlayıcı gluteraldehit ile immobilize etmişlerdir ve sığır serum albumin (BSA): polimer fonksiyonu glukoz biyosensörü içinde redoks mediyatörü olarak düşük karışımlarda küçük negatif potansiyeller glukozun tayinine olanak sağlamaktadır.

Ahmadlinezhad ve ark., (2009), Prusya mavisıyla modifiye edilmiş nanogözenekli altın yüzeye GOD immobilize ederek orijinal bir glukoz biyosensörü tasarlamışlardır. Bu çalışmada hızlı cevap veren ve 2,5 μ M gibi düşük glukoz derişimine duyarlı amperometrik glukoz biyosensörü hazırlamışlardır. Hassasiyetinin çok yüksek olduğunu bulmuşlar, 177 μ A/mM, Michaelis Menten sabitini 2,1 mM olarak hesaplamışlardır. Bununla beraber biyosensörün tekrar kullanım kararlılığının iyi olduğunu ve 60 gün süreyle bu kararlılığı sürdürdüğünü bildirmişlerdir. Biyosensörün anti girişim yeteneği incelenmiş; askorbik asit, ürik asit, asetaminofen gibi girişim etkisi yapan bileşiklerden çok az miktarda etkilendiği sonucuna ulaşmışlardır.

Rahman ve ark., (2009), glukozu son derece duyarlı olan GOD adsorbe edilmiş multiwall karbon nanotüpe modifiye edilmiş film elektrot geliştirmişlerdir. Elektrokimyasal çalışmalar için düşük potansiyel değerler gösterdiğini bildirmişlerdir. Glukoza karşı olan algı özelliklerini dönüşümlü voltametri ve kronoamperometri tekniklerini kullanarak çalışmışlardır. Çizilen kalibrasyon grafiğinde derişim aralığını 1,0 ile 500 μ M arasında olduğunu açıklamışlardır. Girişim etkisi yapan diğer biyolojik

bileşiklerin neler olabileceğini araştırmışlardır. Glukoz biyosensörünün tekrar kullanım kararlılığını, depolama kararlılığını ve hassasiyetini ölçmüşlerdir. Tasarlanan glukoz biyosensörünün insan serum örneklerine başarıyla uygulanabileceği sonucuna ulaşmışlardır.

Luo ve ark., (2010), camı karbon elektrot (GCE) üzerine kitosan/ NiFe_2O_4 nanopartiküller (CHIT/ NiFe_2O_4 NPs) ile glukoz oksidaz entegre ederek orijinal bir glukoz biyosensörü tasarlamışlardır. CHIT/ NiFe_2O_4 NPs/GOD'nin özelliklerini X-kırınım ışını (XRD), taramalı elektron mikroskobu (SEM), UV spektroskopisi, FTIR ve elektrokimyasal impedans spektroskopisiyle karakterize etmişlerdir. Dönüşümlü voltametri ile çalışılarak bir redoks mediyatörü olan ferrosen karboksilik asit kullanıldığında GCE'ye modifiye edilmiş CHIT/ NiFe_2O_4 NPs/GOD glukozun oksidasyonunda mükemmel bir elektrokatalitik cevap verdiğini görmüşlerdir. Biyosensörün glukozu duyarlı olduğu lineer aralığı $1 \times 10^{-4} - 2 \times 10^{-2}$ mol/L olarak tespit etmişlerdir. Tasarlanan biyosensörün glukozu tayini için mükemmel bir performans sergilediği, 0,6 V'da ve 4 s'den daha kısa sürede cevap verdiğini bulmuşlardır.

Nenkova ve ark., (2010), poliakrilonitril (PAN) filmine silika jel ve karbon nanotüplere (MWNTs) tutuklanacak nanokompozit materyal hazırlamışlar ve glukoz oksidazı çapraz bağlayarak yeni bir amperometrik biyosensör tasarlamışlardır. Nanokompozit matriksini hazırlayabilmek için en uygun koşulları araştırmışlardır. Silika jel, MWNTs ve enzim konsantrasyon miktarının biyosensör performansına etkisini incelemişlerdir. Silika jel/ MWNTs/ PAN/ GOD glukoz derişiminin $5 \mu\text{M}$ 'dan 2mM 'a kadar olan aralıkta lineer bir aralığa sahip olduğunu bulmuşlar ve biyosensör cevap süresini 16 s olarak tespit etmişlerdir. Biyosensörün duyarlılığını $16 \mu\text{A}/\text{mM}$ olarak Michaelis Menten sabitini $13,9 \text{mM}$ olarak hesaplamışlardır. Askorbik asitin girişim etkisi ve biyosensörün kararlı olduğu süreleri tespit etmişlerdir. Tüm sonuçlar Silika jel/ MWNTs/ PAN'nın glukozu tespitinde biyosensör tasarlamak için umut verici bir malzeme sağlayabileceği sonucuna ulaşmışlardır.

Gu ve ark., (2010), glukoz oksidaz ve horseradish peroksidinin (HRP) yalnız başına ve indiyum tinoksit (ITO) elektrota modifiye edilmiş altın nanopartiküller (GNPs) üzerine silika sol-jel (SG) içine aynı anda tutuklamışlardır. Mono enzim GOD ve bienzim GOD-HRP olarak kullanılmasını tasarlamışlardır. Biyosensörün analitik performansı için en uygun koşulları incelemişler ve birbiriyle karşılaştırmışlardır. Mono

enzim GOD biyosensörü için optimal GOD derişimini 250 U/ml, bienzim biyosensörü olan GOD/HRP için 2 U/ml almışlardır. Glukoz tespit lineer aralığını sırsıyla 0,05 - 4,0 mmol/L ile 0,02 - 3,20 mmol/L olarak bulmuşlardır. Glukoz için amperometrik tepkiyi 0,10 V dolaylarında görmüşlerdir. Bienzim glukoz biyosensörünün mono enzim biyosensöre göre 2,4 kat daha duyarlı olduğu; her iki biyosensörün hızlı yanıt, yüksek duyarlılık ve uzun süre kararlı olduğu sonucuna ulaşmışlardır.

Liu ve ark., (2010), oda sıcaklığında iyonik bir sıvı olan n-oktil-pridinyum hekzaflorofosfat (OPPF₆) ile grafit tozunu karıştırarak koloidal modifiye karbon altın iyonik sıvı elektrot hazırlamışlardır. Bu kompozit matrikse biyoaktivitesini koruyan ve mükemmel kararlılık gösteren GOD'yi tutuklamışlardır. pH koşullarının, çalışma potansiyelinin ve GOD'nin bağlanma etkilerini incelemişlerdir. Özellikle GOD tutuklanmış bu iyonik karbon sıvı elektrotun bir saatten fazla asidik ortamda (pH 2,0) aktivitesini koruduğunu belirtmişlerdir. Önerilen biyosensörün $5,0 \times 10^{-6}$ - $1,2 \times 10^{-3}$ ile $2,6 \times 10^{-3}$ - $1,3 \times 10^{-2}$ M glukoz derişim aralığında cevap verdiği ve algılama sınırının $3,5 \times 10^{-6}$ M olduğunu bildirmişlerdir. Biyosensörün cevap süresinin hızlı (10 s), raf ömrünün 2 aydan fazla olduğu, nasyon bir film ile biyosensör cevap yüzeyinin kaplanması sonucunda askorbik asit, ürik asit gibi elektroaktif girişim etkilerinin önemli ölçüde indirgenebileceği sonucuna ulaşmışlardır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada kullanılan p-toluen sülfonik asit ($C_7H_8O_3S$) Fluka'dan, sodyum p-toluen sülfonat ($C_7H_7O_3SNa$) ve glukoz Aldrich, *Aspergillus niger* kaynaklı glukoz oksidaz enzimi (G-0543,429 U.mg⁻¹, 24 mg/ml) Sigma'dan, sodyum hidroksit Carlo Erba'dan; pirol, fosforik asit, hidroklorik asit Merck, glukoz tayin kiti Glucose-GOD-PAP Single Reagent Dia Lab firmalarından tedarik edilmiştir. Kullanılan diğer kimyasalların tümü analitik saflıktadır.

3.1.2. Elektrokimyasal Ölçümler İçin Kullanılan Elektrotlar

Karşıtl Elektrot: 1 cm² yüzey alanına sahip platin levha kullanılmıştır.

Referans Elektrot: Potansiyel kontrolü sağlamak amacıyla Ag/AgCl (3 M KCl) elektrot kullanılmıştır.

Çalışma Elektrotu: 0,18 cm² yüzey alanına sahip platin levha kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan Araç ve Gereçler

Cihazlar	Marka
Electrochemical Workstation	CHI 660b
UV- Görünür Bölge Spektrofotometresi	Shimadzu UV-1208
SEM	Jeol JSM-5500 LV
Dijital Fotoğraf Makinesi	Canon Ultrasonic EF 100 mm
Analitik Terazî	Sartorius BL 210 S
pH metre	Gnolab wtw Series
Magnetik Karıştırıcı Isıtıcı	Heidolph MR 3001
Saf Su Cihazı	New Human Power I Scholar-UV
Vortex	NM-110 Nüve
Su Banyosu	Memmert
Etüv	Nüve FN 400

Ayrıca otomatik pipet, cam pipet, büret, mezür, piset, damlalık, baget, balık, balon, balon joje, beher, puar, destilasyon düzeneği de kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

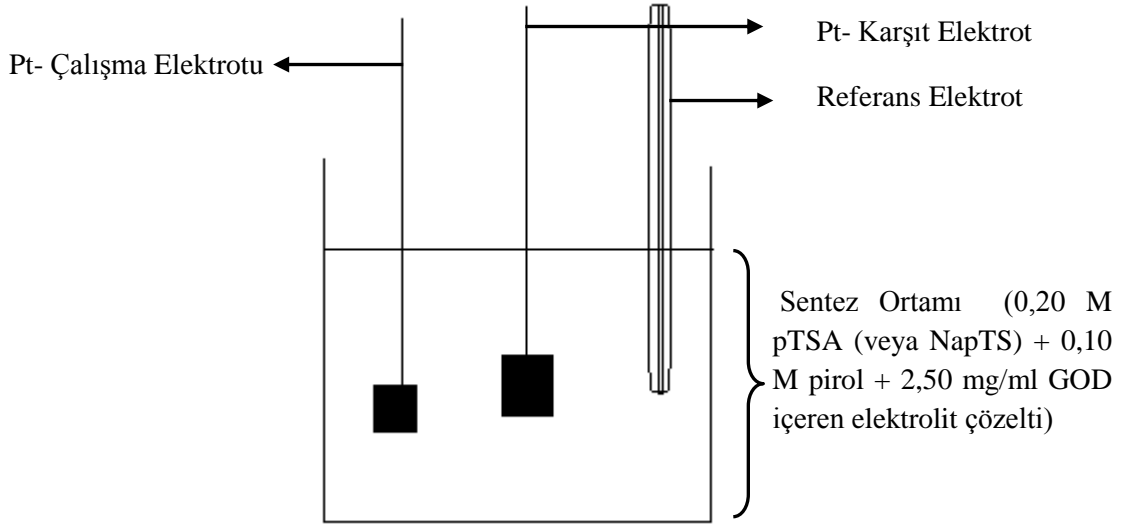
3.2.1. Elektrotların Hazırlanması ve Temizlenmesi

30 cm uzunluğundaki bakır tel, platin tel ile kaynak yapılmıştır. $0,18 \text{ cm}^2$ yüzey alanına sahip platin levha ile platin tel birbirine ısıl işlem altında tutturulmuştur. Bakır telin bir ucu ve platin levha dışarıda kalacak şekilde bakır telin etrafı bir poliester bloğu ile kaplanmıştır. Hazırlanan platin levha elektrotlar önce bek alevinde akkor haline

gelene kadar ısıtılmış, ardından sıcak kromik asite daldırılmıştır. Platin yüzey alanı çeşme suyu ve ardından saf su ile yıkanarak kaplamaya hazır hale getirilmiştir.

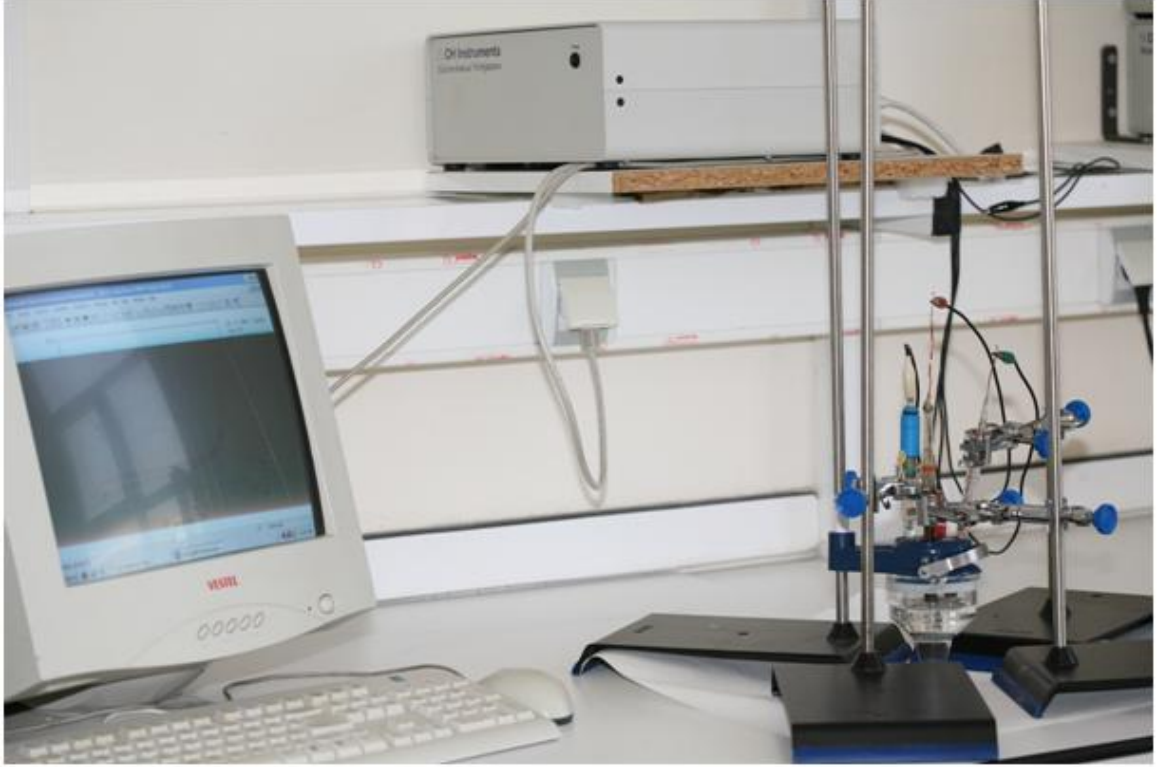
3.2.2. Sentez Ortamının Hazırlanması ve Glukoz Oksidazın İmmobilizasyonu

0,20 M pTSA ve 0,20 M NapTS çözeltileri taze olarak oda sıcaklığında hazırlanmıştır. Monomer olarak kullanılan pirol sentezden önce damıtılmış ve karanlık ortamda saklanmıştır. Glukoz oksidaz (GOD) enzimi ise kullanılmadığı zamanlarda buzdolabında muhafaza edilmiştir. Sentez ortamını hazırlamak için oda sıcaklığında uygun elektrolit çözelti içine derişimi 0,10 M olacak şekilde pirol eklenmiş ve homojen bir çözelti elde etmek için karıştırılmıştır. Ardından derişimi 2,50 mg/ml olacak şekilde GOD ilave edilmiş ve yine homojen karışım elde edilene kadar karıştırılmıştır. Polipirol film sentezi ve eş zamanlı gerçekleşen GOD immobilizasyonu oda sıcaklığında dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak tek hücreli üç elektrot sisteminde gerçekleştirilmiştir. Sentezin gerçekleştiği tek hücreli üç elektrot sistemi şematik olarak Şekil 3.1.'de görülmektedir.



Şekil 3.1. Tek hücreli üç elektrot sisteminin şematik gösterimi

Sentezler, pTSA sulu çözelti ortamında 0,10 - 0,75 V, NapTS çözeltilisinde ise 0,10 - 1,00 V potansiyel aralığında 50 mV/s tarama hızı ile 50 segment uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Sentezin gerçekleştiği tek hücreli üç elektrot sistemi ve cihaz fotoğrafı Şekil 3.2.'de verilmiştir.



Şekil 3.2. Sentezde kullanılan CHI 660b cihazı

Sentez süreleri pTSA ortamı için 12, NapTS ortamı için ise 15 dakika sürmüştür. Sentez tamamlandıktan sonra elektrotlar saf su ile yıkanmıştır.

3.2.3. Kaplanmış Elektrotların SEM Görüntülerinin ve Dijital Fotoğraflarının Çekilmesi

GOD yokluğunda pTSA ve NapTS ortamında sentezlenen polipirol filmlerin (Pt/PPy_{pTSA} ve Pt/PPy_{NapTS}) ve GOD varlığında sentezlenen GOD immobilize edilmiş PPy film kaplı elektrotların ($Pt/PPy-GOD_{pTSA}$ ve $Pt/PPy-GOD_{NapTS}$) dijital fotoğraf makinesi ile fotoğrafları çekilmiş ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülenmiştir.

3.2.4. Glukoz Biyosensörünün Elektrokimyasal Karakterizasyonu

Her iki ortam için, GOD içermeyen (Pt/PPy) ve GOD içeren (Pt/PPy-GOD) elektrotların yüzeyleri doğrusal taramalı voltametri (DTV) ve dönüşümlü voltametri teknikleri (DV) ile karakterize edilmiştir. Bu amaçla DTV için 50 mM fosfat tamponunda hazırlanan 0, 5, 10 ve 20 mM glukoz çözeltileri kullanılmış ve 1 mV/s tarama hızı uygulanmıştır. DV tekniği için ise 0, 10, 20 mM glukoz çözeltileri kullanılmış ve 5 mV/s tarama hızı uygulanarak elektrotlar karakterize edilmiştir.

3.2.5. Glukoz Biyosensörünün Biyokimyasal Karakterizasyonu

3.2.5.1. Potansiyelin Etkisi

Pt/PPy-GOD_{pTSA} ve Pt/PPy-GOD_{NapTS} elektrotlar farklı potansiyellerde (0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8) derişimi 10 mM olan glukoz çözeltisiyle, optimum pH'larda ölçüm alınmıştır.

3.2.5.2. pH Etkisi

Pt/PPy-GOD_{pTSA} ve Pt/PPy-GOD_{NapTS} elektrotlar farklı pH değerlerinde (4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0) ve derişimi 10 mM olan glukoz çözeltisine daldırılıp sabit potansiyelde akım değeri ölçülmüştür. Bu ölçüm sonuçlarına göre polimerin deforme olabileceği pH ve potansiyel değerleri göz önünde tutularak en yüksek akımın elde edildiği pH değeri seçilmiştir.

3.2.5.3. Glukoz Derişiminin Etkisi

Çalışılan glukoz çözelti derişim aralığı 0 ile 30 mM arasında seçilmiş, bu çözeltiler her bir ortam için belirlenen optimum pH değerinde hazırlanmıştır. Her iki elektrot için optimum potansiyeller uygulanarak ölçüm alınmış ve Lineweaver – Burk eğrilerinden I_{MAX} ve K_M değerleri hesaplanmıştır.

3.2.5.4. Glukoz Biyosensörünün Tekrar Kullanım Kararlılığının Belirlenmesi

Biyosensörlerin tekrar kullanım kararlılıkları optimum çalışma koşullarında 5, 10, 20 mM glukoz çözeltileri için belirlenmiştir. Her çalışmada elektrotlar yeniden sentezlenerek 50 defa ardışık akım değerleri ölçülmüştür.

3.2.5.5. Glukoz Biyosensörünün Raf Ömrünün Belirlenmesi

Pt/PPy-GOD_{pTSA} ve Pt/PPy-GOD_{NapTS} elektrotları bir ay boyunca 15 °C sıcaklıkta tampon çözeltilerde bekletilmiş, her gün 10 mM glukoz çözeltisi kullanılarak akım değerleri ölçülmüştür.

3.2.6. Glukoz Biyosensörünün Ticari Sıvı ve İçeceklerde Glukoz Tayini

Pt/PPy-GOD_{pTSA} ve Pt/PPy-GOD_{NapTS} elektrotları piyasada bulunan bal, malt içeceği, şarap, gazoz, üzüm suyu gibi sıvılarda bulunan glukoz derişimlerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Aynı örneklerin glukoz derişimleri glukoz oksidaz – peroksidaz enzim sistemi içeren ticari glukoz kiti ile de belirlenmiş, elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır.

Biyosensör elektrotlarla piyasada bulunan ticari sıvı ve içeceklerdeki glukoz tayinini belirlemeden önce 0 - 1 mM glukoz çözeltileri kullanılarak standart glukoz eğrisi oluşturulmuştur.

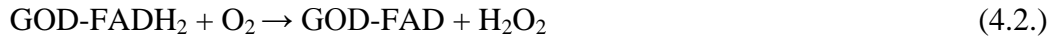
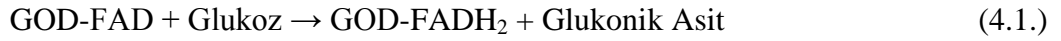
Benzer şekilde 0,0 – 7,5 mM glukoz çözeltileri ve glukoz kiti kullanılarak yine bir standart glukoz eğrisi oluşturulmuştur. Bu eğrinin oluşturulması için 13 deney tüpü alınmış ve pH 7 fosfat tamponunda hazırlanan 0,05; 0,10; 0,20; 0,30; 0,40; 0,50; 0,60; 0,80; 1,00; 1,50; 2,50; 5,00; 7,50 mM olan standart glukoz çözeltilerinden 0,05 ml 37 °C sıcaklığındaki su banyosunda sıcaklıkları dengelenene kadar bekletilmiştir. Ardından her tüpe 0,40 ml fosfat tamponu ve glukoz tayin kiti çözeltisinden 0,50 ml eklenmiş, son hacim 3 ml olacak şekilde saf suyla tamamlanmıştır. Tüpler vortex cihazı ile karıştırılmış ve 37 °C sıcaklığındaki su banyosunda 20 dakika bekletilmiştir. Reaksiyon sonunda tüp içeriklerinin absorbans değerleri köre karşı 505 nm'de UV spektrofotometresinde okunarak absorbans değerleri derişime karşı grafiğe geçirilmiştir. Okumalarda tek kullanımlık küvetler kullanılmış ve her derişim üçer paralel olacak

şekilde çalışılmıştır. Örnekler belli oranlarda seyreltilmiş ve glukoz içerikleri aynı yöntemle çizilmiş olan standart glukoz eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Bu çalışmada Pt elektrot yüzeyinde elektrokimyasal olarak polipirol (PPy) sentezlenerek, sentez ortamında bulunan glukoz oksidaz (GOD) enziminin polimer matrisi içinde tutuklanmasıyla glukoz biyosensörü tasarlanmıştır.

PPy senteziyle eş zamanlı gerçekleşen GOD immobilizasyonu p-toluen sülfonik asit (pTSA) ve sodyum p-toluen sülfonat (NapTS) elektrolit ortamlarında gerçekleştirilerek sırasıyla Pt/PPy-GOD_{pTSA} ve Pt/PPy-GOD_{NapTS} enzim elektrotları elde edilmiştir. Enzim elektrotları glukoz çözeltisine daldırıldığında, öncelikle GOD katalizörlüğünde biyokimyasal olarak aşağıdaki tepkimeler gerçekleşir.



İki basamak üzerinden yürüyen tepkimede görüldü gibi, birinci aşamada GOD glukozu yükseltgeyerek kendisi indirgenmiş, ikinci aşamada ise GOD, O₂'i H₂O₂'e indirgeyerek kendisi tekrar yükseltgenmiştir. Oluşan H₂O₂ Pt elektrot yüzeyinde sabit bir potansiyelde aşağıdaki tepkimeye göre yükseltgenir.

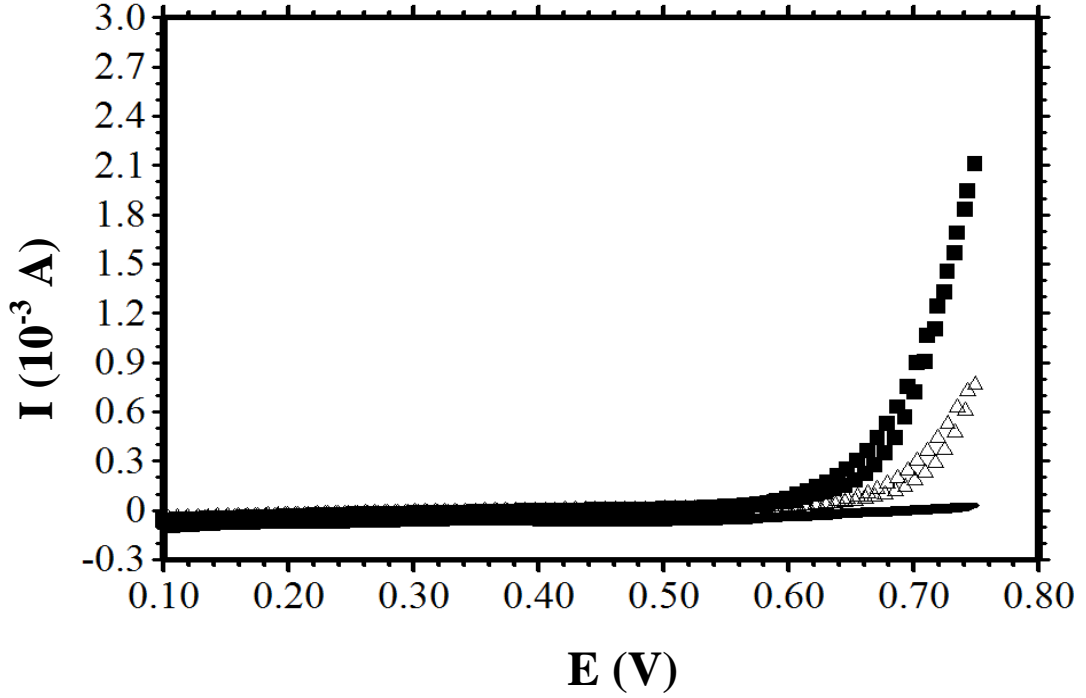


Yükseltgenmenin meydana geleceği bir potansiyelde çalışıldığında devreden geçen anodik akım oluşan H₂O₂ dolayısıyla glukoz derişimi ile orantılı olacaktır.

4.1. Enzim Elektrotlarının Oluşturulması

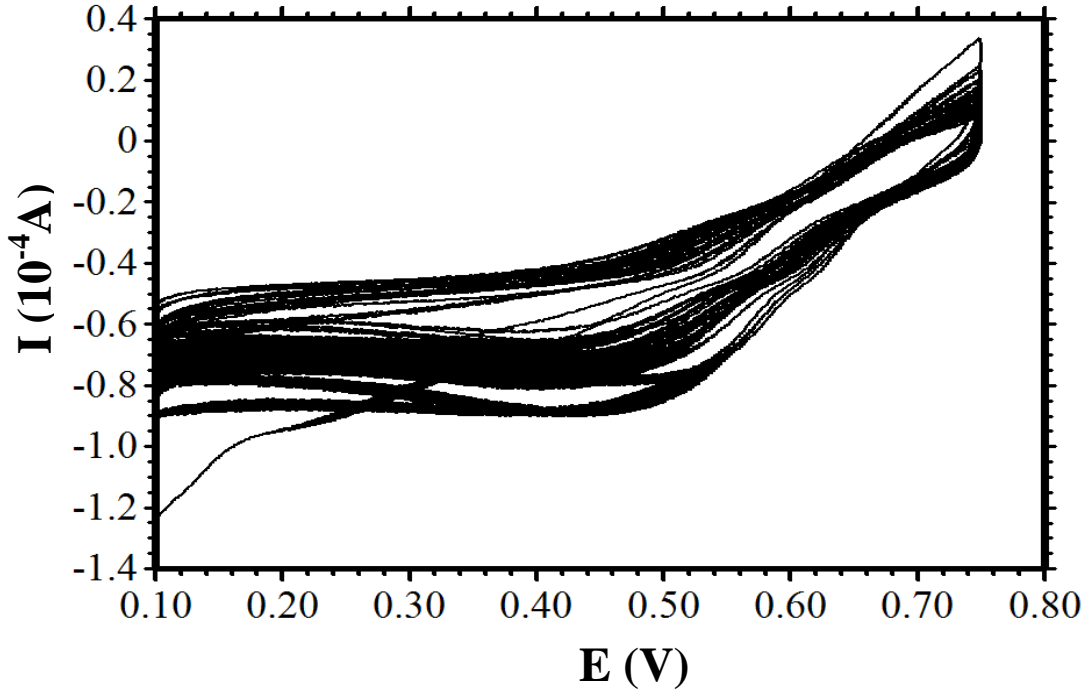
4.1.1. pTSA Ortamında

GOD immobilize edilmiş polipirol filmler, pirol ve GOD'nin bulunduğu 0,20 M pTSA çözelti ortamında 0,10 – 0,75 V potansiyel aralığında, 50 mV/s tarama hızı ile 50 segment uygulanarak elde edilmiştir. Platin elektrot yüzeyine polipirol ve GOD immobilize edilmiş polipirol filmlerin sentezlerinin tespiti için pTSA, pTSA + pirol ve pTSA + pirol + GOD çözeltileri için elde edilen birinci dönüşümlü voltammogram eğrileri Şekil 4.1.'de verilmiştir.



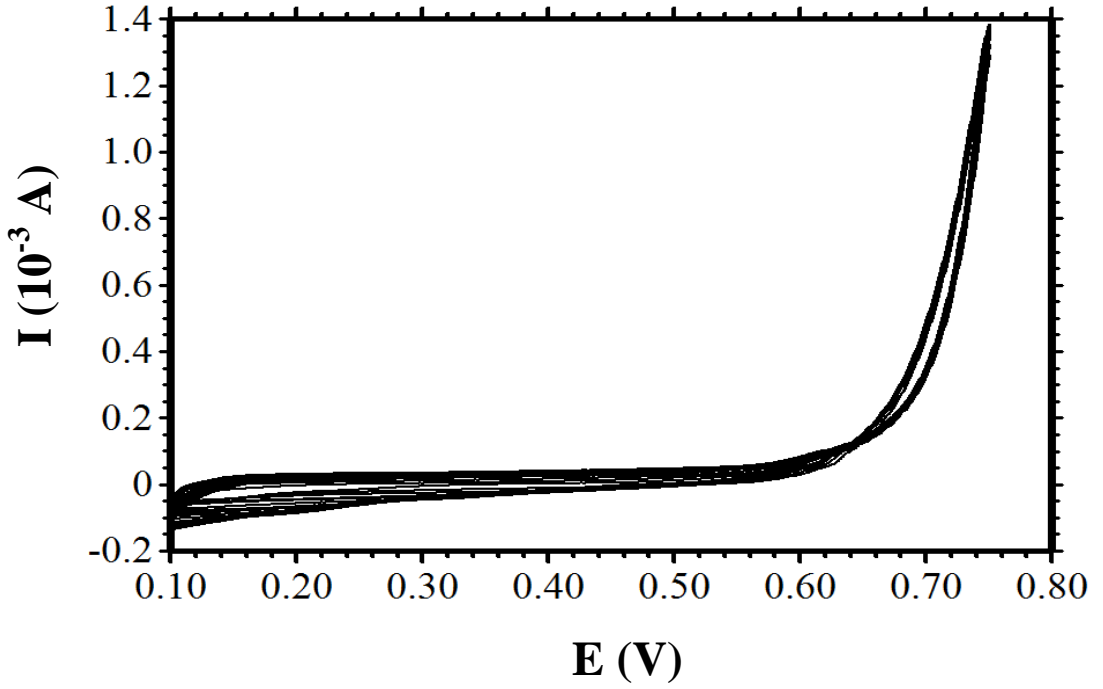
Şekil 4.1. Platin elektrotun 0,20 M pTSA (---), 0,20 M pTSA + 0,10 M pirol (Δ) ve 0,20 M pTSA + 0,10 M pirol + 2,0 mg/ml GOD (\blacksquare) çözeltisi içerisinde elde edilen birinci dönüşümlü voltammogram eğrileri (tarama hızı: 50 mV/s)

Monomersiz ve GOD'siz pTSA çözeltisinde elde edilen akım değerlerinin yaklaşık sıfır dolaylarında olduğu gözlenmiştir. Elektrolit pTSA ortamına pirol ilavesiyle akım değerlerinin 0,65 V potansiyelden sonra arttığı gözlenmiştir. Bu potansiyelden sonra hızlı akım artışı pirol oksidasyonundan kaynaklanmaktadır. GOD enzimi ve pirolün pTSA elektrolit ortamına ilave edilmesiyle elde edilen oksidasyona karşılık gelen akım değerlerinin artışı, pTSA + pirolün bulunduğu ortama göre daha önceki potansiyellerde başlamıştır. Bu durum ortamın daha iletken olması ile ilişkilidir. Enzimin bulunduğu elektrolit ortamında elde edilen eğrinin yaklaşık 0,55 V'den sonra en yüksek akım değerine sahip olması pirolün oksidasyonuna ek olarak GOD enziminin oksidasyonuna da karşılık gelmektedir (Yu ve ark., 2007).



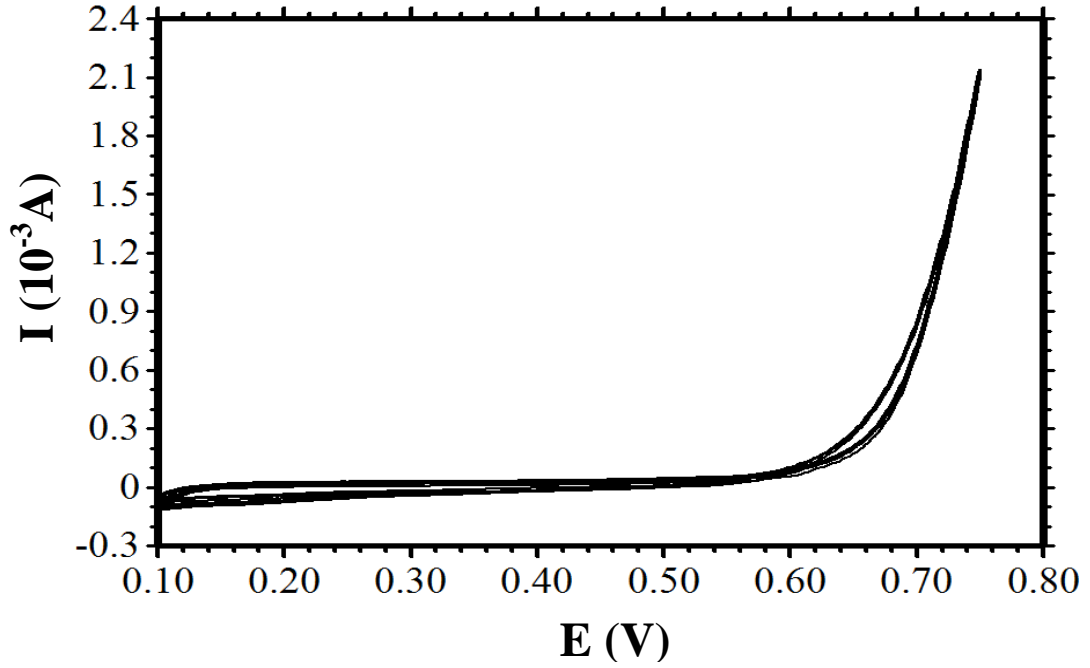
Şekil 4.2. Platin elektrotun 0,20 M pTSA çözeltisi içerisinde elde edilen dönüşümlü voltammogram eğrileri (tarama hızı: 50 mV/s)

Monomersiz ve GOD'siz pTSA çözeltisi için 50 mV/s tarama hızı ile 50 segment uygulanarak elde edilen dönüşümlü voltammogram eğrileri Şekil 4.2.'de verilmiştir. Anodik yöndeki taramaların akım değerleri sıfırın altında bir değerden başlamaktadır. 0,50 V potansiyelden sonra görülen çok düşük akım artışı platin oksitlerinin bozunmasından kaynaklanmaktadır. Katodik yöndeki çok düşük akım değişimlerinin gözlenmesi ise elektrot yüzeyinde elektrokimyasal bir değişimin olmadığını göstermektedir.



Şekil 4.3. Platin elektrotun 0,20 M pTSA + 0,10 M pirol çözeltisi içerisinde elde edilen dönüşümlü voltammogram eğrileri (tarama hızı: 50 mV/s)

Elektrolit çözeltiye pirol eklendiği zaman (Şekil 4.3.) akım değerlerinin monomersiz ortama göre arttığı gözlenmiştir. Pirol monomerinin elektrokimyasal yükseltgenmesi anot üzerinde gerçekleşmiş ve elde edilen polimer platin üzerinde film şeklinde birikmiştir. Dönüşümlü voltammogramda pirole ait yükseltgenme piki pTSA çözeltisinde 0,60 V dolaylarındadır. Yükseltgenme piki pirol radikal katyonunun oluşumuyla ilgilidir. Oluşan radikal katyon bir başka pirol radikal katyonuyla birleşerek dimerik yapıyı oluşturur. Oluşan dimerler diğer dimerler ve oligomerler ile birleşerek polimerleşirler ve böylece elektrot yüzeyinde bir film şeklinde polipirol oluşur. Dönüşümlü voltammogram eğrilerinden de görüldüğü gibi geri dönüşüm esnasında katodik yönde akım artışı elektrot yüzeyinde oluşan PPy filmin indirgenmesine karşılık gelmektedir. Bu katodik akım artışları aynı zamanda elektrot yüzeyinde polimer film varlığını göstermektedir.

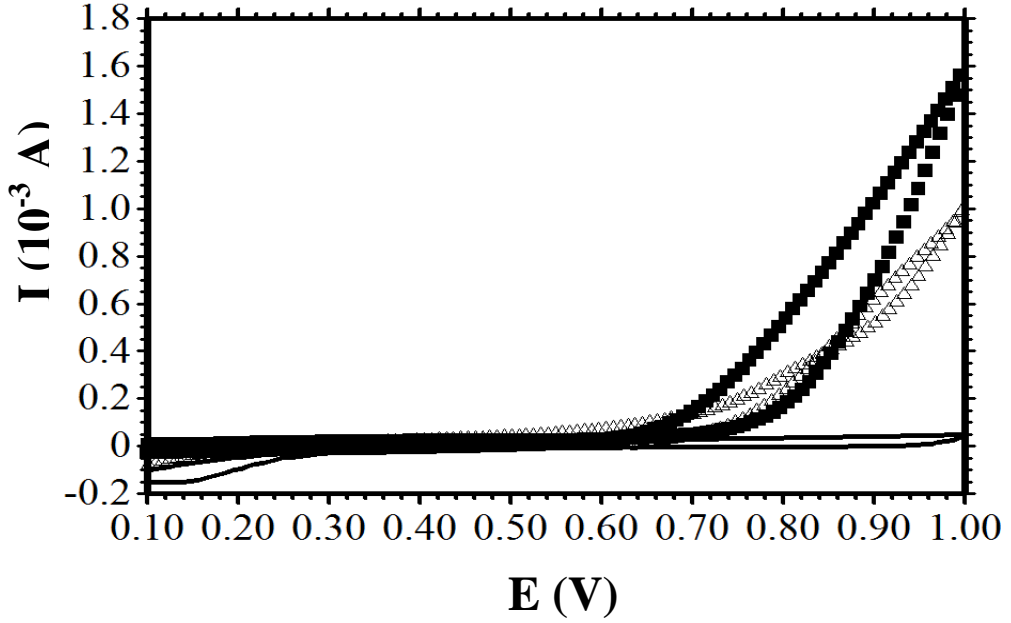


Şekil 4.4. Platin elektrotun 0,20 M pTSA + 0,10 M pirol + 2,0 mg/ml GOD çözeltisi içerisinde elde edilen dönüşümlü voltammogram eğrileri (tarama hızı: 50 mV/s)

Elektrolit çözeltiye pirol + GOD ilave edildiğinde (Şekil 4.4.) akım değerlerinin monomerli ortama göre daha da arttığı görülmektedir. Pirol oksidasyonunun yanında glukoz oksidazın oksidasyonunun da meydana gelmesi akım değerindeki bu yüksek artışa neden olmaktadır. GOD eklenen pTSA sulu çözeltisinde pirolün yükseltgenme pik geriliminin + 0,60 V'tan daha anodik bölgeye + 0,65 V civarına kaymış olduğu görülmektedir. Bu durum elektrot yüzeyinde GOD ile birlikte tutunan PPy filmin, GOD'siz PPy filme göre daha az iletken olması ile ilişkilidir.

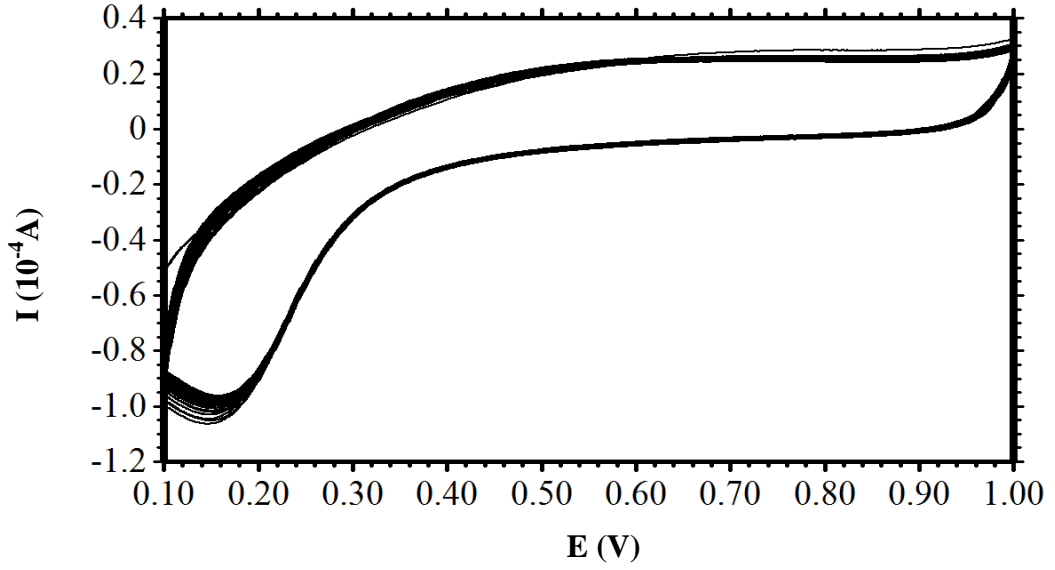
4.1.2. NapTS Ortamında

GOD immobilize edilmiş polipirol filmler, pirol ve GOD'nin bulunduğu 0,20 M NapTS çözelti ortamında 0,10 – 1,00 V potansiyel aralığında, 50 mV/s tarama hızı ile 50 segment uygulanarak elde edilmiştir. Platin elektrot yüzeyine polipirol ve GOD immobilize edilmiş, polipirol filmlerin sentezlerinin tespiti için NapTS, NapTS + pirol ve NapTS + pirol + GOD çözeltileri için elde edilen birinci dönüşümlü voltammogram eğrileri Şekil 4.5.'te verilmiştir.



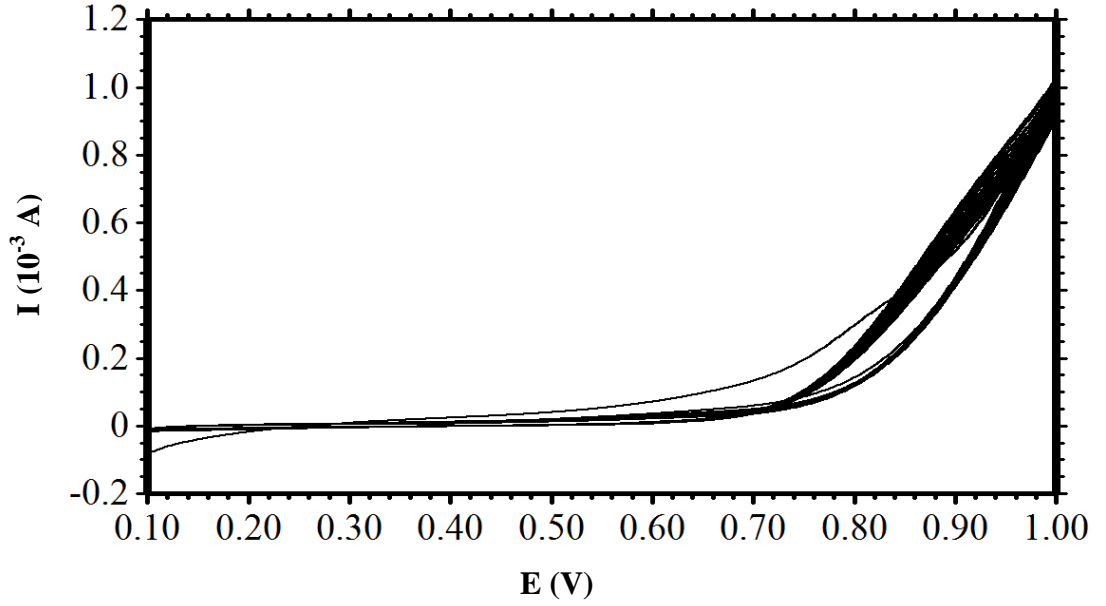
Şekil 4.5. Platin elektrotun 0,20 M NapTS (---); 0,20 M NapTS+ 0,10 M pirol (Δ) ve 0,20 M NapTS + 0,10 M pirol + 2 mg/ml GOD (\blacksquare) çözeltisi içerisinde elde edilen birinci dönüşümlü voltammogram eğrileri (tarama hızı: 50 mV/s)

Birinci dönüşümlü voltammogram eğrilerine bakıldığında monomersiz ve GOD'siz NapTS çözeltisinde elde edilen akım değerlerinin yaklaşık sıfır dolaylarında olduğu gözlenmiştir. Bu durum monomersiz ve GOD'siz pTSA elektrolit çözeltisinde gözlenen akım değerleri ile uyumlu olup, bu sonuç her iki ortamda da elektrokimyasal bir reaksiyonun olmadığını göstermektedir. Elektrolit çözeltiye pirol ilave edildiğinde akım değerleri 0,60 V'a kadar sıfır dolaylarında seyrederken, bu potansiyelden sonra hızlı akım artışı pirolün oksidasyonuna karşılık gelmektedir. Elektrolit ortamına hem pirol hem de GOD eklendiğinde akım değerlerinin, GOD'siz ortama göre yaklaşık iki kat arttığı gözlenir. Bu durum GOD'nin elektrolit çözeltide iletkenliğe katkıda bulunduğunun göstergesidir. NapTS + pirol + GOD çözeltisi için birinci voltammogram eğrilerinden elde edilen akım değerlerinin, pTSA + pirol + GOD çözeltisi için elde edilene göre oldukça düşük olduğu gözlenmiştir. Bu durum asidik ortamda sentezlenen GOD immobilize edilmiş PPy filmin, NapTS ortamında sentezlenene göre daha iletken olduğunu göstermektedir. Geri dönüşüm esnasında katodik yönde akım artışları ise sentezlenen filmin indirgenmesine karşılık gelmektedir.



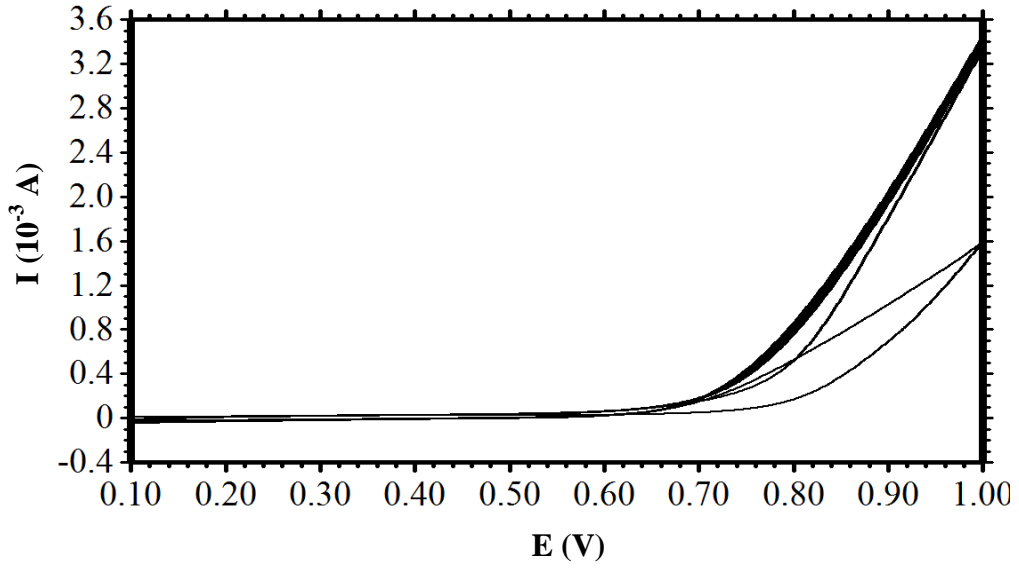
Şekil 4.6. Platin elektrotun 0,20 M NapTS sulu çözeltisi içerisinde elde edilen dönüşümlü voltammogram eğrileri (tarama hızı: 50 mV/s)

Monomersiz ve GOD'siz NapTS çözeltisi için 50 mV/s tarama hızı ile 50 segment uygulanarak elde edilen dönüşümlü voltammogram eğrileri Şekil 4.6.'da verilmiştir. Anodik yöndeki pikin akım değeri sıfırın altında bir değerden başlamaktadır. 0,90 V potansiyelden sonra görülen hızlı akım artışı platin oksitlerin bozunmasından kaynaklanmaktadır. Katodik yönde aynı akım değişimlerinin sıfır dolaylarında olduğu, 0,15 V potansiyelde katodik yöndeki pikin ise platin elektrot yüzeyinde p-toluen sülfonat iyonunun indirgenmesinden kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.7. Platin elektrotun 0,20 M NapTS + 0,10 M pirol çözeltisi içerisinde elde edilen dönüşümlü voltammogram eğrileri (tarama hızı: 50 mV/s)

Elektrolit çözeltiye pirol eklendiği zaman (Şekil 4.7.) akım değerlerinin monomersiz ortama göre arttığı gözlenmiştir. Dönüşümlü voltammogramda pirole ait yükseltgenme piki NapTS çözeltisinde 0,70 V dolaylarındadır. Asidik ortama göre (0,60 V) bu değer daha anodik yönde olup, sentezlenen filmin nötr ortamda daha az iletken olduğunun göstergesidir. Her iki ortamın akım değerleri karşılaştırıldığında (Şekil 4.3. ve Şekil 4.7.), asidik ortamda elde edilen akım değerlerinin daha yüksek olduğu gözlenmektedir. Bu durum asidik ortamda sentezlenen PPy filmin, nötr ortamda sentezlenene göre daha iletken olduğunun bir başka göstergesidir. Dönüşümlü voltammogram eğrilerinden elde edilen yüksek akım değerleri sentezlenen PPy film kalınlığının daha fazla olduğunu da işaret etmektedir.



Şekil 4.8. Platin elektrotun 0,20 M NapTS + 0,10 M pirol + 2,0 mg/ml GOD çözeltisi içerisinde elde edilen dönüşümlü voltammogram eğrileri (tarama hızı: 50 mV/s)

Elektrolit çözeltiye pirol + GOD ilave edildiğinde (Şekil 4.8.) akım değerlerinin monomerli ortama göre daha da arttığı görülmüştür. Pirol oksidasyonunun yanında glukoz oksidazın oksidasyonunun da meydana gelmesi akım değerindeki bu artışa neden olmaktadır. Glukoz oksidaz eklenen NapTS sulu çözeltisinde pirolün yükseltgenme pik gerilimi +0,70 V'tan daha anodik bölgeye +0,80 V civarına kaymış olduğu görülmüştür. Bu potansiyel değer, asidik ortam (Şekil 4.4.) ile karşılaştırıldığında oldukça pozitif olduğu görülmektedir. NapTS gibi nötr bir elektrolit çözeltide GOD immobilize edilmiş PPy filmin yüksek potansiyellerde elde edilmesi polimer film yapısında tutuklanan GOD miktarının daha fazla olması ile ilişkilidir. Çünkü pirolün oksidasyonunun daha üst potansiyellerde olması, platin yüzeyine sentezlenen çok ince PPy ve beraberinde tutuklanan GOD'nin etkisi ile iletkenliğin platin yüzeyine göre daha düşük olduğunu göstermektedir. Bu durumda oksidasyon potansiyelinin daha üst potansiyellere kayması beklenecektir. Bu davranış Şekil 4.7. ile 4.8.'de görülmekte olup, GOD'li ortamda pirolün oksidasyonunun GOD'siz ortama (0,70 V) göre 0,80 V potansiyele kayması, GOD'nin iletkenliğe negatif etkisinden kaynaklanmaktadır. Elektropolimerizasyon işlemi elektrolit bir çözeltide gerçekleştiği için, kütle aktarımı difüzyon kontrollü olarak elektrot yüzeyindeki difüzyon tabakasında gerçekleşmektedir. Glukoz oksidaz molekülleri

elektropolimerleşme esnasında platin yüzeyine doğru difüzlenerak polimer yapısı içinde tutuklanmaktadır. Çözelti ortamı olarak asidik ve nötr ortamların alınması polipirol filmin ve GOD enziminin hangi ortamda daha fazla ve iletken bir yapıda bulunduğunu elektrokimyasal olarak araştırmaktır. Bu amaçlar ışığında Şekil 4.3. ve 4.7. incelendiği zaman pTSA ortamında elde edilen eğrinin akım değerlerinin NapTS ortamındakine göre yüksek olması sentezlenen PPy'nin asidik ortamda daha kalın olduğuna işaret etmektedir. Bu eğrilerden polipirolün oksidasyon potansiyelinin NapTS ortamında daha pozitif değerde olması sentezlenen polimer filmin daha yalıtkan olduğunu gösterir.

Şekil 4.4. ve 4.8. incelendiği zaman ise, enzim ilavesi sonucu pTSA ortamında elde edilen eğrideki akım değerlerinin NapTS ortamındakine göre daha düşük olduğu görülmüştür. Polipirol filme tutuklanan GOD enziminin asidik ortamda kısmen denatüre olduğu ve buna bağlı olarak polipirol filme tutunan GOD miktarının nötr ortama göre daha düşük olduğu, pirol ve GOD'nin oksidasyonuna karşılık gelen akım değerlerinin de daha düşük olması sonucunu ortaya çıkarmaktadır. Bu düşünceyi her iki ortamda pirolün oksidasyonuna karşılık gelen potansiyel değerlerin, nötr ortam için daha pozitif değerlerde gözlenmesi de desteklemektedir.

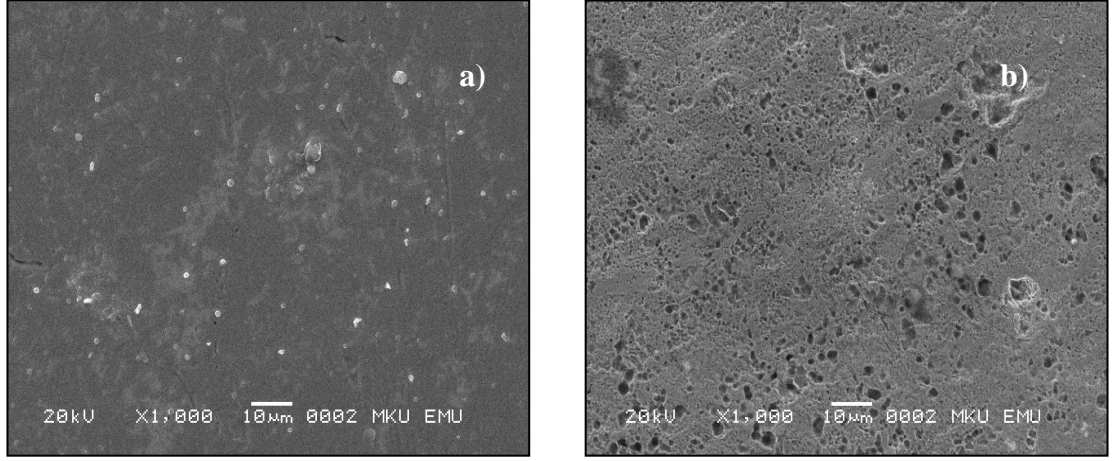
4.2. Pt, Pt / PPy ve Pt / PPy – GOD Elektrotlarının Dijital Fotoğrafları ve SEM Görüntüleri

4.2.1. pTSA Ortamında

pTSA ortamında sentez yapılmadan önce dijital fotoğraf makinesi ile çıplak platin elektrotun fotoğrafı çekilmiştir (Şekil 4.9.). pTSA ortamında sentezlenen PPy ve GOD immobilize edilmiş PPy film elektrotlarının SEM görüntüleri ise Şekil 4.10.'da verilmiştir. Elektrotlar SEM ile görüntülenmeden önce çözünürlüğü yüksek bir fotoğraf makinesi ile de fotoğraflar çekilmiştir (Şekil 4.11.).

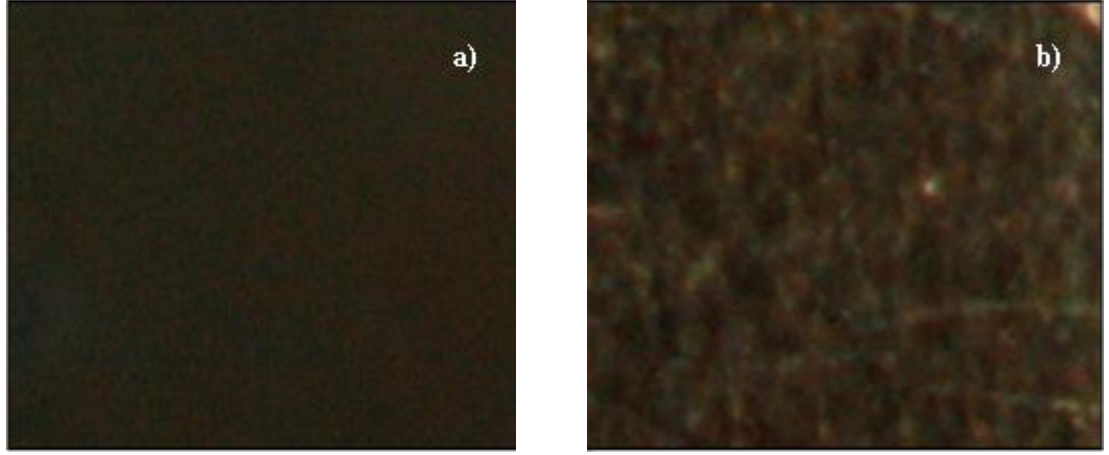


Şekil 4.9. Çıplak platin elektrotun fotoğrafı



Şekil 4.10. Pt/PPy_{pTSA} (a) ve Pt/PPy-GOD_{pTSA} elektrotlarının (b) SEM görüntüleri

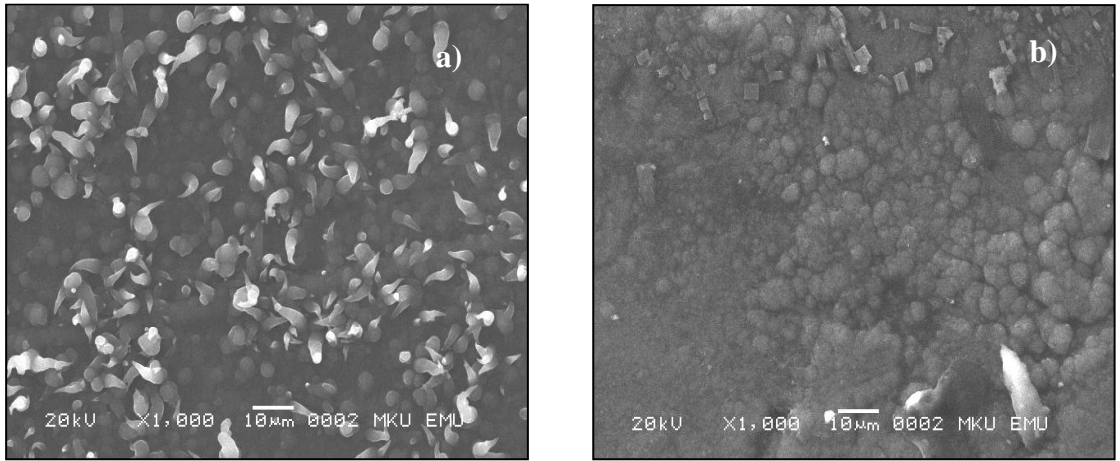
Pt/PPy elektrot siyah renkli olup, SEM görüntülerinden de homojen bir yapıya sahip olduğu anlaşılmaktadır. GOD immobilizasyonu sonucu elde edilen SEM görüntülerinden homojen bir kaplama olan polipirolün farklı bölgelerinde GOD'nin varlığını andıran farklı yapılar gözlenmiştir (Şekil 4.10.).



Şekil 4.11. Pt/PPy_{pTSA} (a) ve Pt/PPy-GOD_{pTSA} elektrotlarının (b) dijital fotoğrafları

Şekil 4.11(b)'de görüldüğü gibi PPy film kaplamanın rengindeki sarıya kayma PPy film yapısına tutunan GOD'nin varlığını teyit etmektedir. Dijital fotoğraf ve SEM görüntüleri dikkate alındığında PPy film elektrota GOD enziminin başarılı bir şekilde immobilize edildiği ortaya çıkmaktadır.

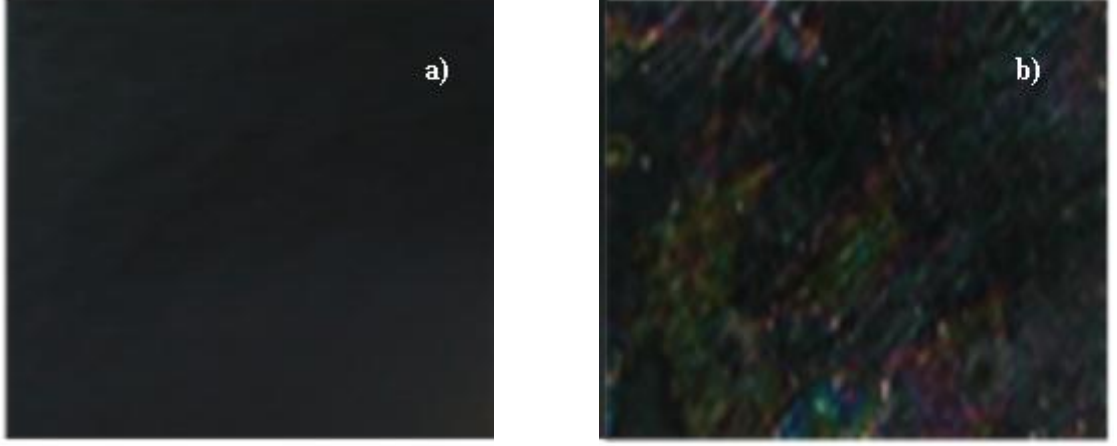
4.2.2. NapTS Ortamında



Şekil 4.12. Pt/PPy_{NapTS} (a) ve Pt/PPy-GOD_{NapTS} elektrotlarının (b) SEM görüntüleri

NapTS ortamında sentezlenen PPy ve GOD immobilize edilmiş PPy film elektrotlarının SEM görüntüleri ve dijital fotoğrafları Şekil 4.12. ve 4.13.'de verilmiştir. Nötür ortamdaki sentez aralığı 0,10 ile 1,00 V arasında olup elde edilen filmin homojen

bir yapıya sahip olmadığı ve koyu siyah renkli pürüzlü olduğu görülmüştür. GOD immobilizasyonu sonucu elde edilen SEM görüntülerinde pürüzlü yüzeyin granüllü bir yapıya dönüştüğü görülmüştür.



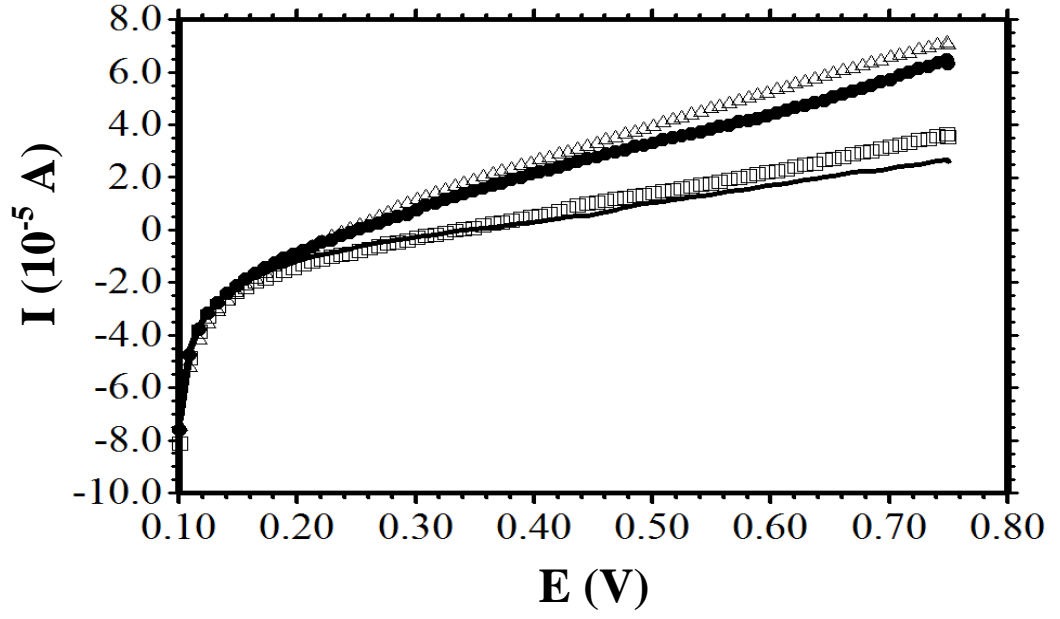
Şekil 4.13. Pt/PPy_{NapTS} (a) ve Pt/PPy-GOD_{NapTS} elektrotlarının (b) dijital fotoğrafları

Dijital fotoğrafta da PPy film kaplamasının rengindeki sarıya kayma GOD varlığını belirgin hale getirmektedir.

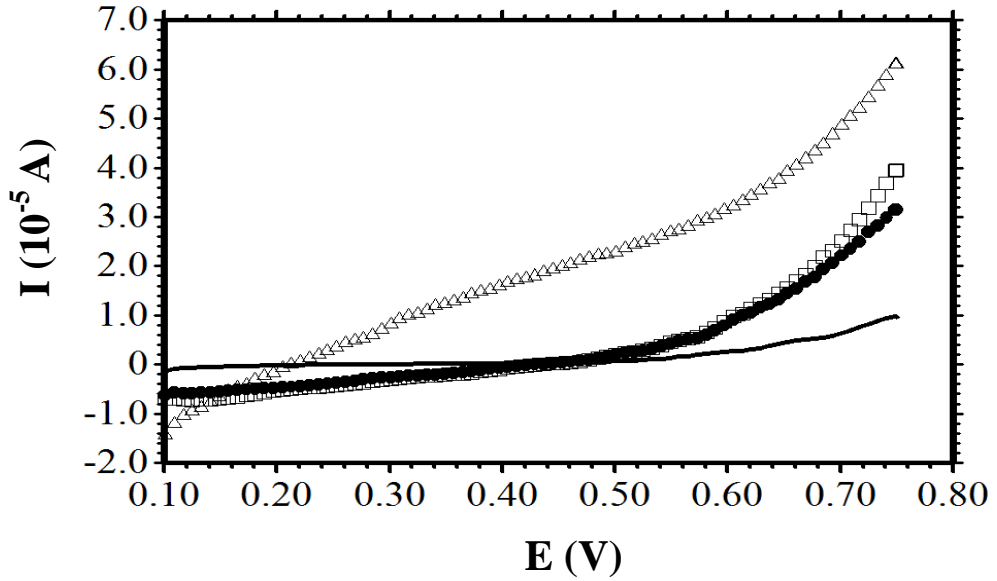
4.3. Glukoz Biyosensörünün Elektrokimyasal Karakterizasyonu

4.3.1. Pt/PPy-GOD_{pTSA} ve Pt/PPy-GOD_{NapTS} Elektrotların DTV Eğrileri

Pt/PPy-GOD_{pTSA} ve Pt/PPy-GOD_{NapTS} elektrotların DTV eğrileri sırasıyla 0,10-0,75 V ve 0,10-1,00 V potansiyel aralığında 0; 5; 10; 20 mM glukoz derişimindeki çözeltiler kullanılarak elde edilmiştir. Çalışmada 1 mV/s tarama hızı uygulanmıştır (Şekil 4.14. ve 4.15.). Her iki çözelti ortamında GOD immobilize edilmiş film elektrotlarında alınan DTV akım değerlerinin derişimi 20 mM olan glukoz çözeltilerinde düştüğü görülmüştür. 20 mM derişimde okunan akım değerindeki düşüş, çözelti ve elektrot ara yüzeyinde artan glukoz derişimine bağlı olarak elektrolit çözeltinin iletkenliğinin azalmasından kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.14. Pt/PPy-GOD_{pTSA} elektrotuyla elde edilen doğrusal taramalı voltammogram eğrileri (tarama hızı: 1mV/s. 0 mM (----), 5 mM (●),10 mM (Δ), 20 mM (□) glukoz çözeltileri)

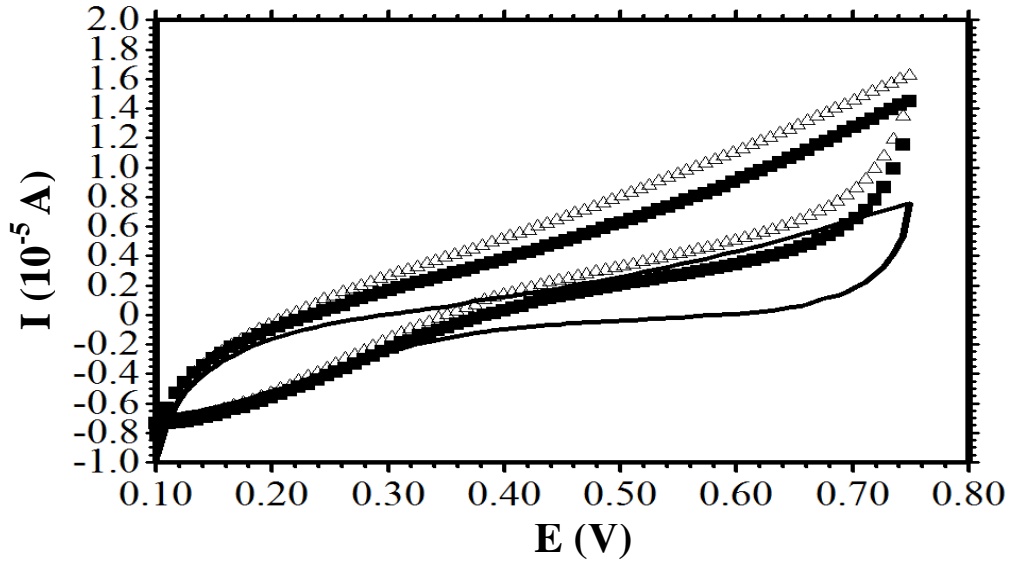


Şekil 4.15. Pt/PPy-GOD_{NapTS} elektrotuyla elde edilen doğrusal taramalı voltammogram eğrileri (tarama hızı: 1 mV/s. 0 mM (----), 5 mM (●),10 mM (Δ), 20 mM (□) glukoz çözeltileri)

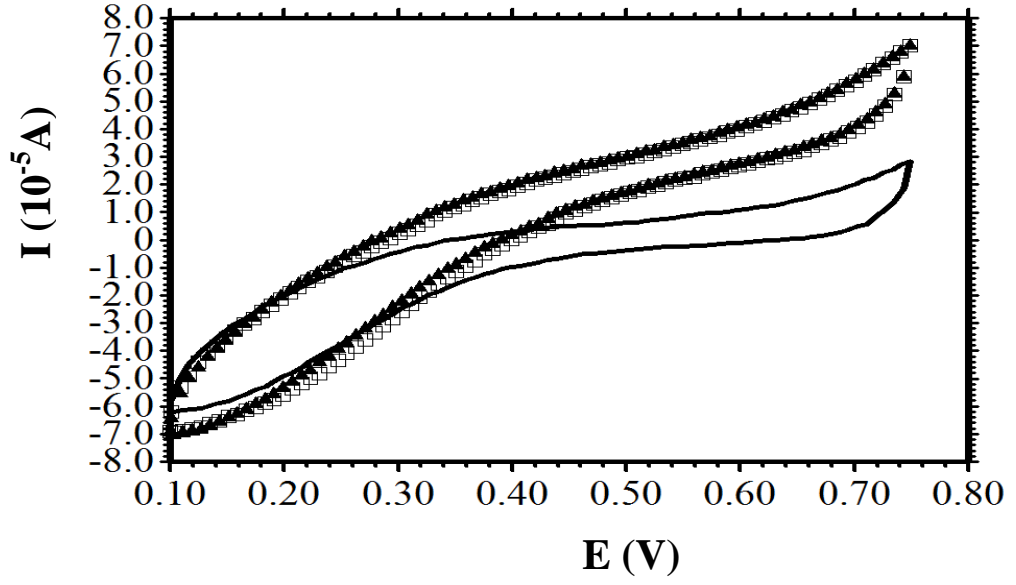
4.3.2. Pt/PPy-GOD_{pTSA} ve Pt/PPy-GOD_{NapTS} Elektrotların DV Eğrileri

Pt/PPy-GOD_{pTSA} ve Pt/PPy-GOD_{NapTS} elektrotların 0; 10; 20 mM glukoz derişimlerinde DV tekniğiyle elektrokimyasal davranışları karakterize edilmiştir. Dönüşümlü voltametri de çalışılan potansiyel aralığı pTSA ortamı için 0,10 – 0,75 V, NapTS için ise 0,10 – 1,00 V olup, 5 mV/s tarama hızı uygulanmıştır. Tarama sayısı olarak 10 segment uygulanmıştır. pTSA ve NapTS elektrolitleri için birinci ve onuncu voltammogram eğrileri sırasıyla Şekil 4.16.; 4.17.; 4.18.; 4.19.’da verilmiştir. Şekil 4.16.’da görüldüğü gibi Pt/PPy-GOD_{pTSA} elektrotun akım değerlerinin glukozsuz ortama göre daha yüksek olması elektrot yüzeyinde glukozu cevap veren GOD’nin varlığına işaret etmektedir. 20 mM glukoz çözeltisi için elde edilen akım değerlerinin, 10 mM glukoz çözeltisindekine göre daha düşük olması DTV ölçümlerinden elde edilen sonuçlarla uyumluluk göstermektedir.

Pt/PPy-GOD_{pTSA} elektrotun onuncu tarama esnasında elde edilen akım değerlerinin glukozsuz ortam için en düşük olması elektrot yüzeyinde hala GOD enziminin varlığına işaret etmektedir.

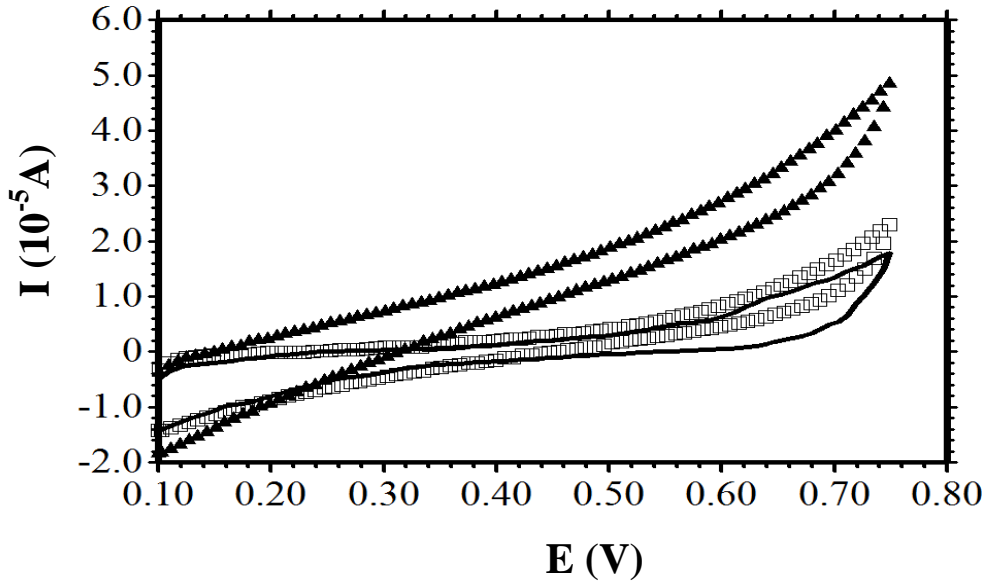


Şekil 4.16. Pt/PPy-GOD_{pTSA} elektrotuyla elde edilen birinci dönüşümlü voltammogram eğrileri (tarama hızı: 5 mV/s. 0 mM (----), 10 mM (Δ), 20 mM (\blacksquare) glukoz çözeltileri)

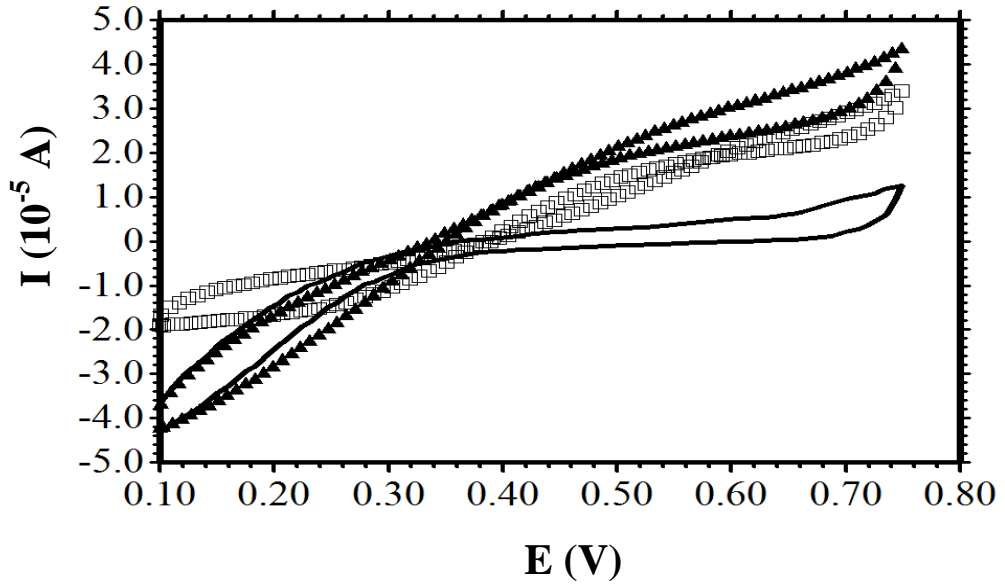


Şekil 4.17. Pt/PPy-GOD_{pTSA} elektrotuyla elde edilen onuncu dönüşümlü voltammogram eğrileri (tarama hızı: 5 mV/s. 0 mM (-----), 10 mM (▲), 20 mM (□) glukoz çözeltileri)

Ayrıca Şekil 4.16. ve 4.17.'de bulunan dönüşümlü voltammogram eğrilerinin birinci ve onuncu eğrileri incelendiğinde; asidik ortamda anodik yönde 0,70 V dolaylarında akım değerlerinde artış gözlenmiştir ve bu artış optimum potansiyel değeri vermektedir. Katodik yönde de yine 0,70 V dolaylardaki artış anodik yönde görülen artışı destekler durumdadır.



Şekil 4.18. Pt/PPy-GOD_{NapTS} elektrotuyla elde edilen birinci dönüşümlü voltammogram eğrileri (tarama hızı: 5 mV/s. 0 mM (----), 10 mM (▲), 20 mM (□) glukoz çözeltileri)



Şekil 4.19. Pt/PPy-GOD_{NapTS} elektrotuyla elde edilen onuncu dönüşümlü voltammogram eğrileri (tarama hızı: 5 mV/s. 0 mM (----), 10 mM (▲), 20 mM (□) glukoz çözeltileri)

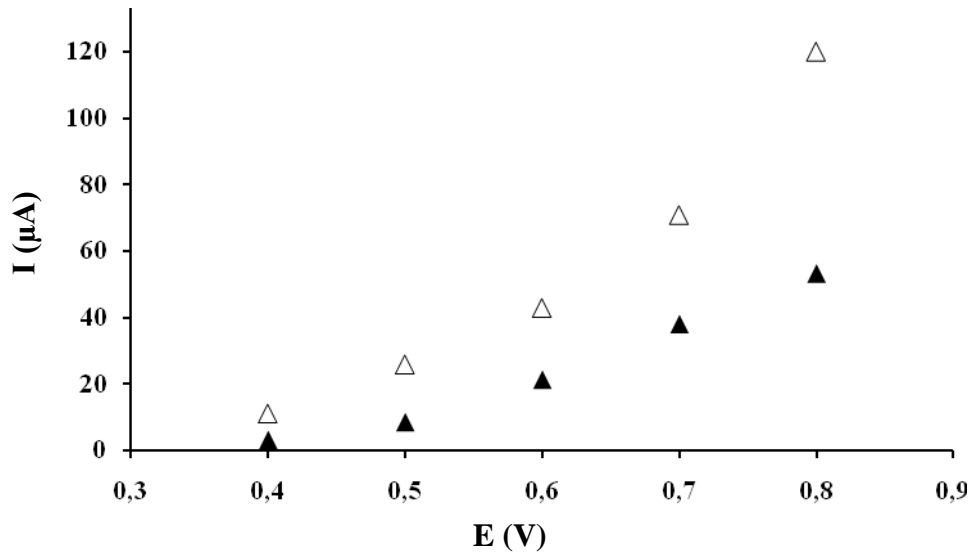
Nötür ortamda ise (Şekil 4.18. ve 4.19.) birinci ve onuncu voltammogram eğrileri incelendiğinde 0,60 V dolaylarında akım pikinde artış gözlenmiştir ve bu artış optimum potansiyel değeri vermektedir. Katodik yönde de yine 0,60 V dolaylarındaki artış anodik yönde görülen artışı destekler durumdadır.

Her iki çözelti ortamında GOD immobilize edilmiş film elektrotların akım değerleri derişimi 20 mM olan glukoz çözeltisinde düşmüştür. Uygulanan DV ve DTV tekniklerinde aynı düşüş görüldüğünden birbirini destekler durumdadır. 20 mM derişiminde meydana gelen azalma çözelti ve elektrot ara yüzeyinde artan glukoz moleküllerinin PPy iletkenliğini azaltmasına bağlanabilir.

4.4. Glukoz Biyosensörünün Biyokimyasal Karakterizasyonu

4.4.1. Potansiyelin Etkisi

pH ve glukoz derişimi sabit tutularak okunan akım değerleri potansiyele karşı grafiğe geçirildiğinde Şekil 4.20. elde edilmiştir.

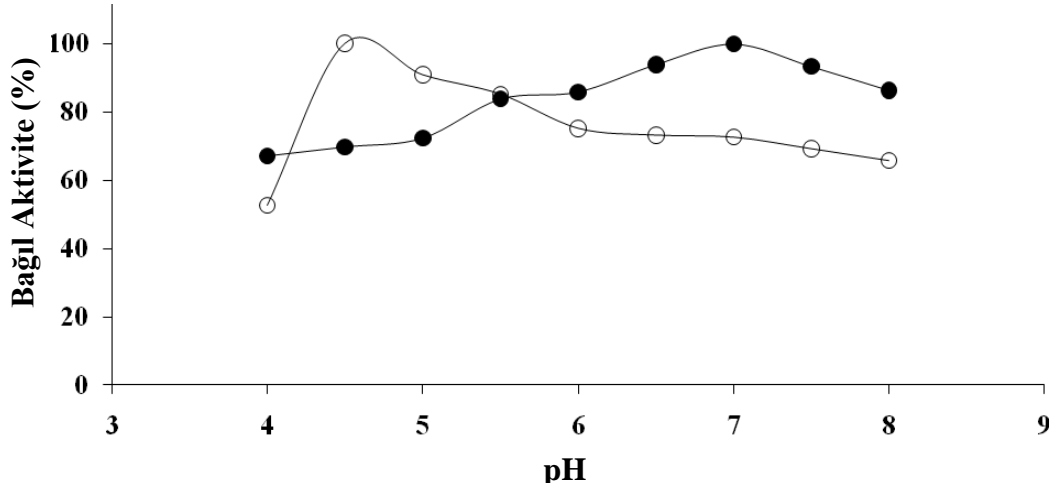


Şekil 4.20. Potansiyelin biyosensör cevap akımına etkisi pTSA (Δ), NapTS (▲)

Şekil 4.20.'de görüldüğü gibi potansiyel artışına bağlı olarak akım değerleri de artmaktadır. Hazırlanan biyosensör elektrotları ile yapılan karakterizasyon deneyleri sonucunda NapTS için 0,60 V; pTSA için 0,70 V olarak optimum potansiyel değerler belirlenmiştir. Uygulanan potansiyeldeki artışa bağlı olarak akım değerleri artsa bile PPy filmin deformasyonunu engellemek için yüksek potansiyellerde çalışmak uygun olmayacaktır. Nitekim her iki elektrot için 0,8 V'de gözlenen akımdaki hızlı artış PPy filmde deformasyonun başladığını göstermektedir.

4.4.2. pH'in Etkisi

Pt/PPy-GOD_{pTSA} ve Pt/PPy-GOD_{NapTS} elektrotları kullanılarak pH 4,0 – 8,0 aralığında farklı pH'larda 10 mM glukoz çözeltisi için sırasıyla 0,70 ve 0,60 V potansiyel fark koşullarında akım değerleri ölçülmüş ve elde edilen sonuçlar % bağıl aktivite olarak Şekil 4.21.'de verilmiştir. Şekil 4.21. incelendiğinde akım değerlerinin pH değerlerindeki değişime bağlı olarak değiştiği görülmektedir. En yüksek akım değerleri Pt/PPy-GOD_{NapTS} için pH 7,0'da Pt/PPy-GOD_{pTSA} için ise 4,5'de gözlenmiş, daha yüksek pH değerlerinde cevap akımı tekrar azalmaya başlamıştır. Enzim ve substrat moleküllerinde asidik ve bazik gruplar olduğundan (E-S) aktifleşmiş kompleksinin en etkin bir şekilde oluşması, yani hızın maksimum olması için bu grupların belirli bir iyonlaşma durumunda olması gereklidir. Bunun dışındaki iyonlaşmalarda (E-S) kompleksinin oluşumu zorlaşacak ve tepkime hızı düşeceğinden akım değerlerinde azalma gözlenecektir (Tüzün, 1992).

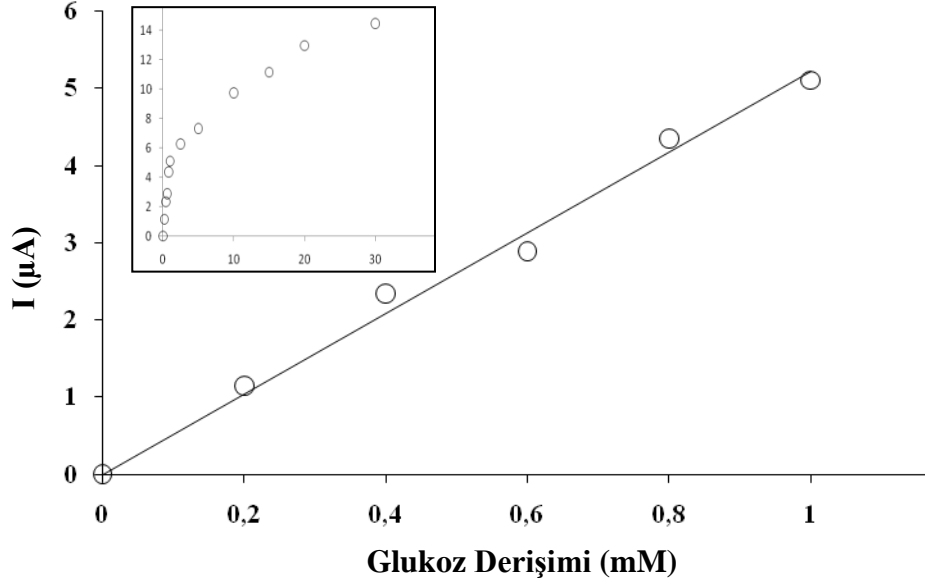


Şekil 4.21. pH'in biyosensör aktivitesine etkisi (●) Pt/PPy-GOD_{NapTS} ve Pt/PPy-GOD_{pTSA} (○)

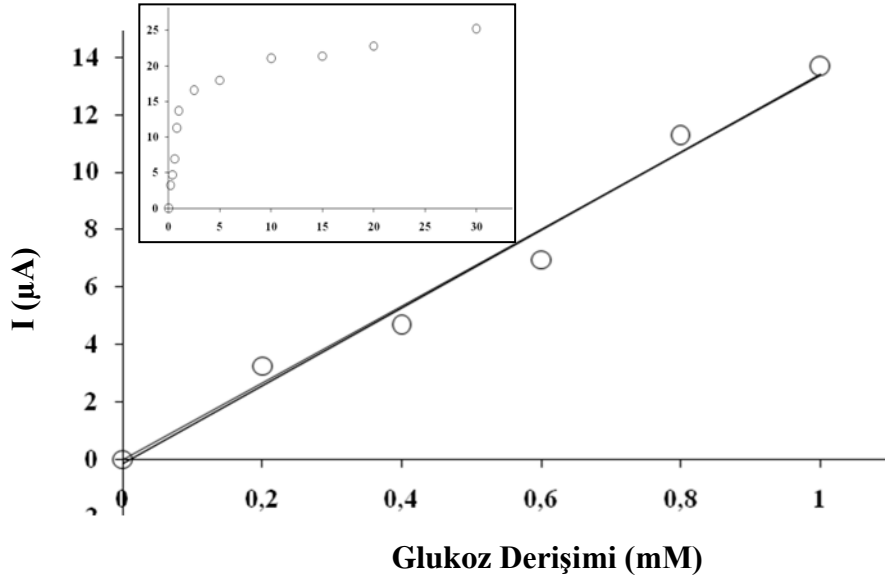
4.4.3. Substrat Derişiminin Etkisi

Substrat derişimi arttıkça açığa çıkan H₂O₂, dolayısıyla akım miktarının artması beklenmekle birlikte, enzimatik tepkimelerde aktivite başlangıçta substrat derişimi ile

artarken enzim substratı ile doymun hale geldiğinde substrat derişimi artsa bile aktivitede artış gözlenmez. Pt/PPy-GOD_{pTSA} ve Pt/PPy-GOD_{NapTS} elektrotları ile optimal koşullarda 0,0 – 30 mM glukoz çözeltileri için akım değerleri ölçülmüş ve elde edilen sonuçlar sırasıyla Şekil 4.22. ve 4.23.'de verilmiştir.



Şekil 4.22. Pt/PPy-GOD_{pTSA} elektrotu ile ölçülen akım değerlerinin glukoz derişimine bağlı olarak değişimi



Şekil 4.23. Pt/PPy-GOD_{NapTS} elektrotu ile ölçülen akım değerlerinin glukoz derişimine bağı olarak değişimi

Şekil 4.22. ve 4.23. incelendiğinde, her iki elektrot için 1 mM glukoz derişimine kadar glukoz derişimi arttıkça akım değerlerinin doğrusal olarak arttığı, ancak daha yüksek glukoz derişimlerinde cevap akımının derişimle orantılı bir şekilde artmadığı gözlenmektedir.

Elde edilen akım değerlerinden her bir elektrot için glukoz içermeyen tampon çözeltilerinin akım değerlerinin çıkarılmasıyla net akım değerleri hesaplanmıştır. Bu değerler kullanılarak çizilen grafiklerden de görüldüğü gibi Pt/PPy-GOD_{NapTS} elektrotu ile daha yüksek cevaplar alınmıştır. Enzimlerin substratları ile etkileşime girebilmeleri için belirli bir üç boyutlu yapıya sahip olmaları gerekir. Ortam pH'ı enzimin üç boyutlu yapısını önemli derecede etkileyeceğinden substratına olan ilgisini de etkileyecektir. Bu nedenle NapTS ortamına göre daha asidik olan pTSA ortamı biyosensörün oluşturulması sırasında enzimin üç boyutlu yapısını substratına olan ilgisini azaltacak şekilde değiştirmiş olabilir. Dolayısıyla Pt/PPy-GOD_{NapTS} elektrotuyla elde edilen akım değerlerinin Pt/PPy-GOD_{pTSA} elektrotuyla ölçülen akım değerlerinden daha yüksek çıkması beklenen bir durum olmakla beraber nötr ortamın GOD enziminin aktivitesini asidik ortam kadar etkilemediği ve kısmi denatürasyona yol açmadığı düşünülebilir.

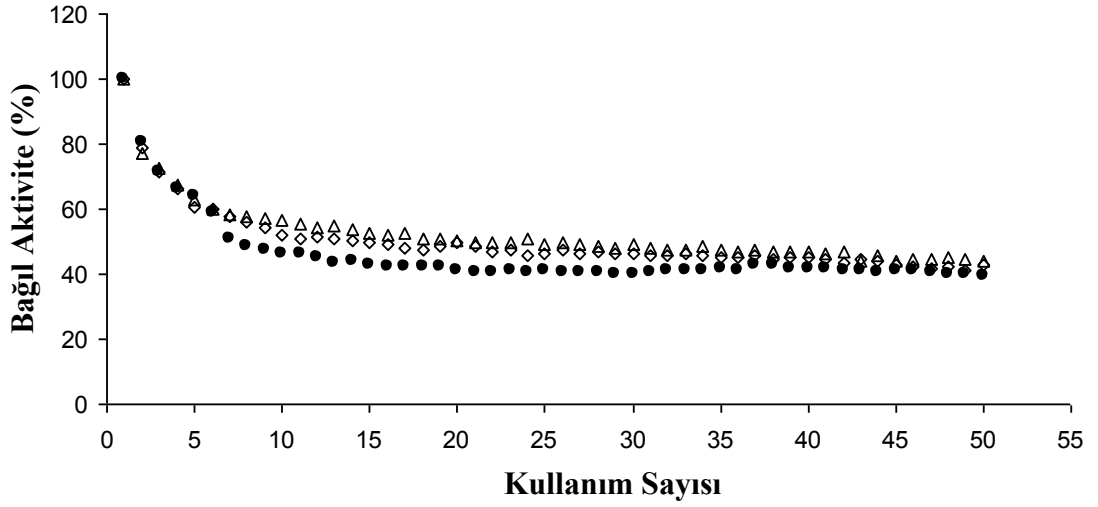
Enzimatik reaksiyonlarda, tepkime hızı başlangıçta substrat derişimi ile orantılı olarak artarken, sonrasında substrat derişimi artsa bile tepkime hızı sabit kalır. Bu

durumda enzim maksimum hıza ulaşmıştır ve bu hızın yarısına ulaşmak için gerekli substrat derişimi K_M olarak adlandırılır. Bu çalışmada tepkime hızının belirlenmesi akım ölçümü ile dolaylı olarak yapılmaktadır.

Her iki elektrot sistemi için lineer bölgede elde edilen veriler kullanılarak Lineweaver - Burk grafikleri çizildiğinde, Pt/PPy-GOD_{pTSA} ve Pt/PPy-GOD_{NapTS} için K_M değerleri sırasıyla 5,2 ve 1,7 mM; I_{MAX} değerleri ise sırasıyla 14,2 ve 25,4 μA olarak hesaplanmıştır. Pt/PPy-GOD_{NapTS} için elde edilen I_{MAX} değerinin Pt/PPy-GOD_{pTSA} için elde edilen I_{MAX} değerinden büyük olması enzim etkinliğinin daha yüksek olduğunu gösterir. Yine aynı şekilde K_M değerlerinin farklı çıkması enzimin mikroçevresindeki etkilenmelerin farklı olduğunu göstermektedir. K_M değeri düştükçe substrata olan ilgi artmakta ve Pt/PPy-GOD_{NapTS} elektrotun biyokatalitik etkinliğinin, dolayısıyla akım değerlerinin daha yüksek olduğu sonucunu doğurmaktadır. Hesaplanan I_{MAX} değerleri de bu sonucu desteklemektedir. Ma ve ark. (2005), PPy kaplı Pt elektrot üzerinde GOD enzimini adsorbe ederek GOD\PPy elektrotu tasarlamışlar ve 0,4 V potansiyel farkta 0-17 mM glukoz derişim aralığında ölçüm aldıklarında akım değerlerinde lineer artış gözlemlemişlerdir. Ekanayake ve Preethichandra (2008), Pt kaplı alumina elektrot yüzeyine GOD immobilize etmişler, K_M ve I_{MAX} değerlerini sırasıyla 7,01 mM ve 120 μA olarak hesaplamışlardır.

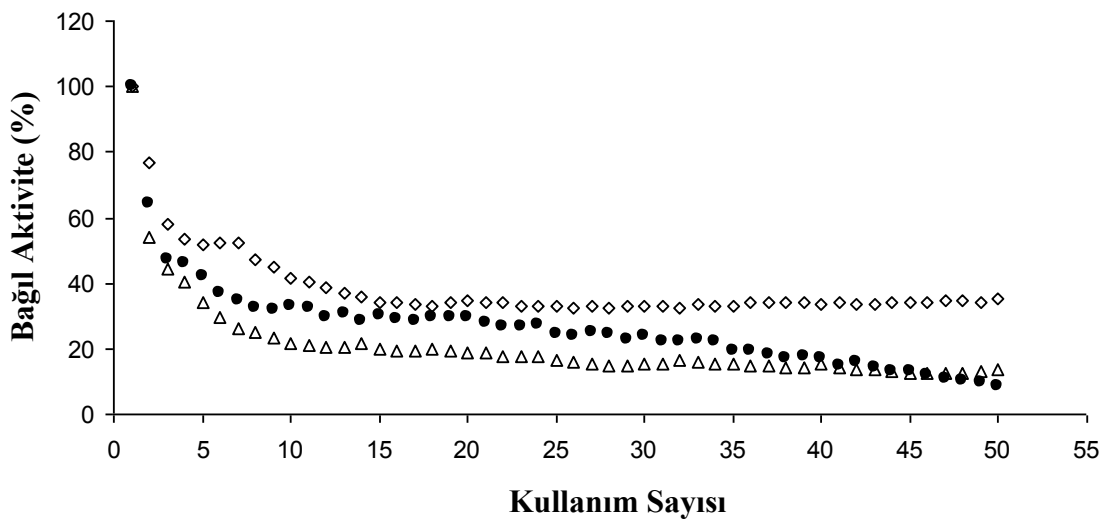
4.4.4. Biyosensörün Tekrar Kullanılabilirliği

Pt/PPy-GOD_{pTSA} ve Pt/PPy-GOD_{NapTS} elektrotlar ile 5, 10, 20 mM glukoz çözeltilerinde 50 ardışık ölçüm alınmış ve cevap akımları % bağıl aktivite olarak ölçme sayısına karşı grafiğe geçirildiğinde Şekil 4.24. ve 4.25. elde edilmiştir.



Şekil 4.24. Farklı glukoz derişimlerinde Pt/PPy-GOD_{NapTS} elektrotunun tekrar kullanım kararlılığı (◇ : 5 mM, ● : 10 mM, △ : 20 mM)

Şekil 4.24. ve 4.25. incelendiğinde, ölçme sayısı arttıkça özellikle ilk 5 kullanımda akımlarda azalma olduğu ve bağlı aktivitenin düştüğü görülmektedir. Akımlardaki bu düşmelerin zamanla enzim aktivitesindeki değişmeden kaynaklandığı söylenebilir. Pt/PPy-GOD_{NapTS} elektrotu için 5,10,20 mM glukoz derişiminde 50 ölçme sonunda başlangıç aktivitesinin sırasıyla yaklaşık % 43,0; 39,5 ve 44,0'ını koruduğu görülmektedir.



Şekil 4.25. Farklı glukoz derişimlerinde Pt/PPy-GOD_{PtSA} elektrotunun tekrar kullanım kararlılığı (◇ : 5 mM, ● : 10 mM, △ : 20 mM)

Pt/PPy-GOD_{pTSA} için ise bu değerler sırasıyla yaklaşık % 35,2; 8,5 ve 13,4 olarak bulunmuştur.

İmmobilize enzimlerin tekrar kullanım kararlılığının kullanım sayısına bağlı olarak düşmesi genel olarak gözlenen bir durumdur. Ancak GOD sisteminde açığa çıkan H₂O₂ molekülü enzimi deaktive etmesine rağmen üretilir üretilmez oksidasyona uğradığından çok fazla etkilemez. Buna karşın meydana gelen glukonik asit enzimin mikro çevresinde pH'yı düşüreceğinden GOD'ı, dolayısıyla biyosensör etkinliğini olumsuz yönde etkileyecektir. Glukoz derişimine bağlı olarak enzimin üreteceği glukonik asit miktarında meydana gelecek değişim de enzimin tekrar kullanım kararlılığını farklı oranda etkileyecektir.

Pt/PPy-GOD_{NapTS} elektrotun tekrar kullanım kararlılığının Pt/PPy-GOD_{pTSA} elektrotu göre daha yüksek olması NapTS ortamında oluşturulan elektrotun bünyesindeki GOD'nin daha kararlı olması ile açıklanabilir. Ancak Pt/PPy-GOD_{NapTS} elektrotun kararlılığının glukoz derişimine bağlı olarak değişmezken Pt/PPy-GOD_{pTSA} elektrotun glukoz derişimi arttıkça daha düşük kullanım kararlığı göstermesi her iki elektrotun K_M parametreleriyle açıklanabilir. Pt/PPy-GOD_{NapTS} elektrotu için K_M değeri 1,7 mM olarak bulunmuş olup bu değer glukoz çözeltisi derişimlerinden (5,10,20 mM) küçüktür. Akım değerlerinin ölçüldüğü glukoz çözeltilerinin derişimleri K_M 'den yüksek olduğundan, çalışılan koşullarda GOD substratı ile doyurulmuş olabilir. Her üç derişimde de GOD aktivitesi birbirine yakın olacağından meydana gelecek H₂O₂ ve glukonik asit miktarları da benzer olacaktır. Böylece Şekil 4.25. incelendiğinde akım değerlerin her üç derişim için de birbirine yakın değerler çıkması beklenecek bir durumdur. Ancak Pt/PPy-GOD_{pTSA} elektrotunda kullanılan glukoz derişimleri K_M değerlerinin altında veya üzerinde olduğundan GOD aktivitesi glukoz derişimine bağlı olarak artacak ve her biri için oluşan H₂O₂ ve glukonik asit miktarları farklı olacaktır. Bu durumda Pt/PPy-GOD_{pTSA} elektrotunun tekrar kullanım kararlılığı 5, 10, 20 mM glukoz derişimlerinden farklı oranda etkilenecektir.

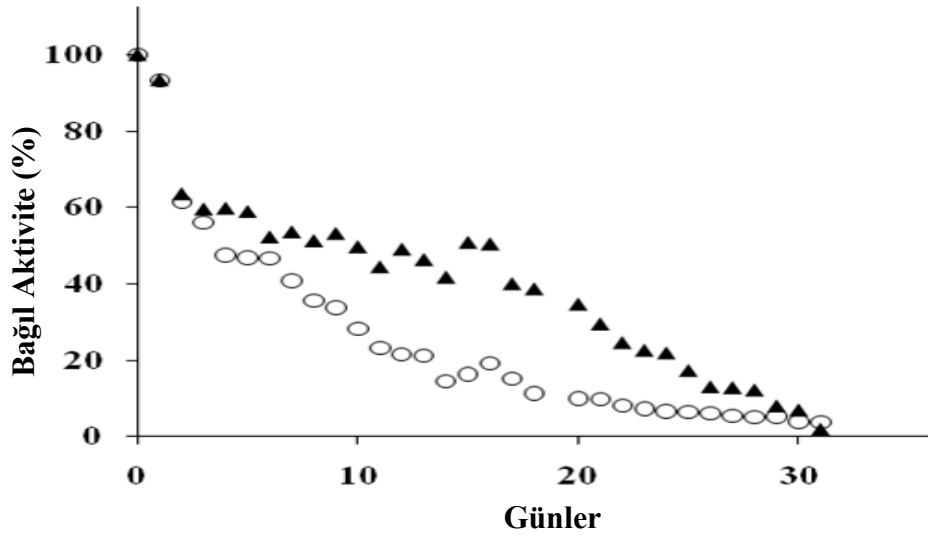
Ancak Pt/PPy-GOD_{pTSA} için hesaplanan K_M değeri (5,2 mM) kullanılan glukoz derişimlerinden düşük olmadığından her derişim için GOD aktivitesi farklı olacağından enzimin tekrar kullanıma bağlı aktivite değerleri glukoz derişimine bağlı olarak değişmiştir. Şekil 4.24. incelendiğinde akım değerlerinin her üç derişim için de farklı

olduđu ve glukoz deriřimi arttıka tekrar kullanım kararlılıđının dūřtūđu gōzlenmektedir.

Tekrarlanabilirlik biyosensōr için çok önemli olup hazırlanan biyosensōrle arka arkaya fazla sayıda analiz açısından pahalı olduğu için bu Şekilde hazırlanan bir biyosensōr daha avantajlıdır.

4.4.5. Biyosensōrün Raf mrü

Pt/PPy-GOD_{pTSA} ve Pt/PPy-GOD_{NapTS} elektrotları 30 gūn boyunca 15 °C’de sırasıyla pH 4,5 ve pH 7,0 fosfat tamponlarında bekletilmiřtir. Elektrotlar gūn ařırı kullanılarak 10 mM glukoz içeren ozeltide akım deđerleri ölçülmüş ve sonuçlar bařlangıç aktivite yūzdesi olarak hesaplanmış, % bađıl aktivite Şekil 4.26.’da verilmiřtir.



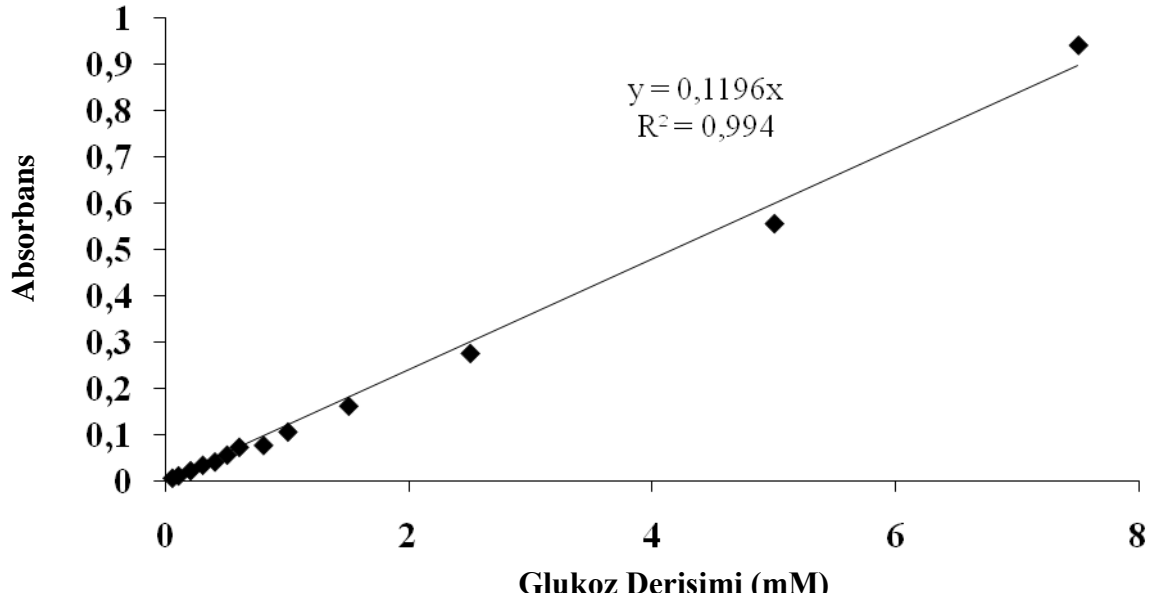
Şekil 4.26. Biyosensōrün depolama kararlılığı (▲) Pt/PPy-GOD_{NapTS}; (o) Pt/PPy-GOD_{pTSA}

Şekil 4.26. incelendiđinde Pt/PPy-GOD_{pTSA} için gōzlenen aktivite deđerini Pt/PPy-GOD_{NapTS}’a gōre bariz bir Őekilde deđerirmiřtir. İlk ũ gūn boyunca alınan 3 ölçüm sonunda her iki ortam için aynı aktivite deđerini gōzlenirken 8. gūnden sonra farkın açıldıđı; bařlangıç aktivitesinin Pt/PPy-GOD_{NapTS} için % 54’ü iken Pt/PPy-GOD_{pTSA} için % 35’e kadar dūřtūđu gōrölmüştür. Biyosensōrün 30 gūn sonunda

başlangıç aktivitesinin pTSA için % 3,75 NaPTS için %1,82'ye düştüğü görülmüştür. 30 gün sonunda elektrotların biyokatalitik etkinliklerini neredeyse tamamen kaybetmeleri depolama sırasında bağlı GOD'nin olası desorpsiyonuna, depolama çözeltisinin pH'ına bağlanabilir. Ancak 30 gün boyunca aynı elektrotun kullanılması nedeniyle sadece depolama süresi değil, aynı zamanda tekrar kullanıma bağlı olarak da aktivitelere düşüş gözlenmiştir.

4.4.6. Ticari Sıvı ve İçeceklerde Glukoz Tayini

Biyosensörün doğruluğunu ve güvenilirliğini belirlemek amacıyla Pt/PPy-GOD_{pTSA} ve Pt/PPy-GOD_{NaPTS} elektrotları malt içeceği, gazoz, üzüm suyu, bal ve şarap gibi glukoz içeceklerin derişimlerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Aynı örneklerin glukoz derişimleri ticari olarak satılan glukoz kitiyle de belirlenmiştir. Ancak bunun için öncelikle glukoz kiti kullanılarak 0,0 - 7,5 mM glukoz çözeltileri ile standart kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 4.27.).



Şekil 4.27. Kit ile hazırlanan standart glukoz eğrisi

Uygun oranlarda seyreltilen sıvı örneklerinin glukoz derişimleri glukoz kiti, Pt/PPy-GOD_{pTSA} ve Pt/PPy-GOD_{NapTS} elektrotları olmak üzere üç farklı şekilde ölçülmüş ve elde edilen sonuçlar çizelge 4.1’de verilmiştir. Glukoz kiti ile bulunan değerler içeceklerin gerçek glukoz derişimi olarak kabul edilmiştir.

Çizelge 4.1. Bazı içeceklerin glukoz derişimlerinin glukoz kiti ve Pt/PPy-GOD elektrotları ile belirlenmesi ve karşılaştırılması

Örnekler	Kit ile Tayin Edilen Glukoz Yüzdesi (w/v)	Pt/PPy-GOD Elektrotlar ile Tayin Edilen Glukoz Yüzdesi (w/v)	
		Pt/PPY- GOD _{pTSA}	Pt/PPY- GOD _{NapTS}
Malt İçeceği	3.47	3.61	3.37
Gazlı İçecek	4.29	4.27	4.34
Üzüm Suyu	5.68	2.35	5.36
Bal	28.48	28.70	27.2
Şarap	0.05	0.09	0.04

Görüldüğü gibi Pt/PPy-GOD_{NapTS} ile elde edilen sonuçlar içeceklerin glukoz derişimleriyle oldukça uyumlu çıkmıştır. Pt/PPy-GOD_{pTSA} için elde edilen sonuçlar ise malt içeceği, gazoz ve bal için gerçek değerlere yakınken üzüm suyu ve şarapta elde edilen sonuçlar glukoz kiti ile elde edilen sonuçlarla uyumlu bulunmamıştır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- Bu çalışmada Pt elektrot yüzeyinde elektrokimyasal olarak polipirol (PPy) sentezlenerek, sentez ortamında bulunan glukoz oksidaz (GOD) enziminin polimer matriksi içinde tutuklanmasıyla glukoz biyosensörü tasarlanmıştır. Sentez ortamında p-toluen sülfonik asit (pTSA) ve sodyum p-toluen sülfonat (NapTS) olmak üzere iki farklı elektrolit kullanılmış ve sırasıyla Pt/PPy-GOD_{pTSA} ve Pt/PPy-GOD_{NapTS} elektrotları elde edilmiştir. Biyosensör elektrotların elektrokimyasal ve biyokimyasal açıdan karakterizasyonları gerçekleştirilmiş olup biyosensör ile ticari sıvılarda glukoz tayini yapılmıştır.

- Pt elektrot üzerine pTSA ve NapTS elektrolitleri ortamında PPy filmin homojen bir şekilde sentezlendiği ve GOD enziminin bu filmlere bağlandığı hem elektrokimyasal tekniklerle hem de SEM görüntüleri ve dijital fotoğraflar ile ispatlanmıştır.

- GOD bağlı elektrotların elektrokimyasal davranışları GOD bağlı olmayan elektrotlara göre belirgin derecede farklılık göstermiştir.

- pTSA elektroliti ile Pt yüzeyinde oluşturulan PPy filmin iletkenliğinin daha yüksek olduğu, ancak bu ortamın GOD enzimini kısmi olarak denatüre etmesi nedeniyle elde edilen enzim elektrotun biyokimyasal etkinliğinin düşük olduğu gözlenmiştir.

- NapTS elektroliti ortamında elde edilen PPy filmin iletkenliği daha düşük olmakla beraber GOD aktivitesi için daha uygun bir elektrolit olduğu ortaya çıkmıştır.

- Pt/PPy-GOD_{NapTS} elektrotu, biyokatalitik etkinliği, tekrar kullanım kararlılığı, depolama süresi ve ticari sıvıların glukoz derişimlerinin belirlenmesi açısından Pt/PPy-GOD_{pTSA} elektrota göre daha yüksek bir performans göstermiştir.

- Bu çalışma sentez koşullarının değiştirilmesi ile daha da zenginleştirilebilir. Örneğin elektrolit türü, sentez sıcaklığı, GOD enziminin derişimi, polimer türü gibi parametrelerin etkisi incelenebilir. Ayrıca film kalınlığının etkisi incelenebilir. Pt yerine C ve Al gibi farklı elektrot türleri kullanılabilir.

- Elektrot yüzeyinde oluşturulan film SEM görüntüleri ve dijital fotoğraflar yanında IR, X-RD gibi tekniklerle karakterize edilebilir.

- Elektrotun bir defa kullanımı sağlanarak elektrotun depolama kararlılığı daha doğru bir şekilde tayin edilebilir. Ayrıca depolama kararlılığı kuru ortam, farklı tampon gibi farklı saklama koşullarında da araştırılabilir.

- Elektrota immobilize edilen GOD'nin glutaraldehit gibi bir molekülle çapraz bağlanarak elektrotun daha kararlı hale gelmesi sağlanabilir.
- Askorbik asit, ürik asit, üre, asetaminofen gibi organik moleküllerin elektrotun akım cevabı üzerine olan girişim etkisi araştırılabilir.

KAYNAKLAR

- Adeloju, S.B., Moline, A.N., 2001. Fabrication of ultra thin polypyrrole glucose oxidase film from supporting electrolyte free monomer solution for potentiometric biosensing of glucose. **Biosensors and Bioelectronics**, 16: 133-139.
- Ahuja, T., Mir, I.A., Kumar, D., Rajesh, 2007. Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications. **Biomaterials**, 28: 791-805.
- Ahmadalinezhad, A., Kafi, A.K.M., Chen A., 2009. Glucose biosensing based on the highly efficient immobilization of glucose oxidase on a prussian blue modified nanostructured Au surface. **Electrochemistry Communications**, 11: 2048–2051.
- Anonymous, 2010. Biyosensör çeşitleri ve şekilleri. <http://www.biotechproducts.com>.
- Anonymous, 2010. Nano Makineler ve Biyosensör. <http://www.sciam.com>
- Anonymous, 2010. Biyosensör Teknolojisi. <http://www.lbl.gov>
- Anonymous, 2010. Biyosensör. <http://www.zurich.ibm.com>
- Anonymous, 2010. Biyosensör Araştırmaları. <http://www.cranfield.ac.uk>
- Anonymous, 2010. Biyosensör. <http://pubs.acs.org>.
- Aydın, A., 2002. **Pirolün elektrokimyasal polimerizasyonuna organik asit etkilerinin incelenmesi**. Yüksek Lisans Tezi. Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Barrera, C., Zhukov, I., Villagra, E., Bedioui, F., Páez, M.A., Costamagna, J., Zagal, J.H., 2006. Trends in reactivity of unsubstituted and substituted cobalt phthalocyanines for the electrocatalysis of glucose oxidation. **J. Electroanalytical Chemical**. 589: 212-218.
- Bartlett, P.N. 1990. **In Biosensors, Oxford University Press, Oxford**; 42.
- Borole, D.D., Kapadi, U.R., Mahulikar, P.P. and Hundiwal, D.G., 2004. Glucose Oxidase Electrodes of Polyaniline, Poly(o-toluidine) and Their Copolymer as a Biosensor: a Comparative Study. **Polym. Adv. Technol.**, 15: 306-312.
- Buerk, D.G., 1993. **Biosensors: Theory and Applications**, CRC Press, A.B.D., 6-16.
- Chandrasekhar, P., 1999. **Conducting Polymers, Fundamentals and Applications**, Kluwer Academic Publishers, A.B.D., No:1, 718.
- Chen, C., Jiang, Y., Kan, J., 2006. A Noninterference Polypyrrole Glucose Biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, 22: 639–643.
- Cosnier, S., Senillou A., Gratzel, M., Comte, P., Vlachopoluos, N., Renault, N.J., Martelet, C., 1999. A glucose biosensor based on enzyme entrapment within polypyrrole films electrodeposited on mesoporous titanium dioxide. **J. Electroanalytical Chemical**, 469: 176-181.
- Danielsson, B., Winquist, F. 1990. **In Biochemistry Oxford University Press, Oxford**.
- Dinçkaya, E. 1999. **Biyosensörler Lisanüstü Yaz Okulu**, 81-143.
- Eggin, B.R. 1996. **Biosensors: An Introduction**, John Wiley and Sons LTD. and B.G.Teubner, West Sussex.
- Eftekhari, A. 2004. Electropolymerization of Aniline onto Passivated Substrate and Its Application for Preparation of Enzyme-Modified Electrode. **Synthetic Metals**, 145: 211–216.
- Ekanayake, M., Preethichandra, D.M.G. and Kaneto, K., 2008. An Amperometric Glucose Biosensor With Enhanced Measurement Stability and Sensitivity Using an Artificially Porous Conducting Polymer. **Ieee Transactions on**

Instrumentation and Measurement, 57: 1621-1626.

- Garg, S.K., Hoff, H.K., Chase, H.P., 2004. The role of continuous glucose sensors in diabetes care. **Endocrinology & Metabolism Clinics of North America**, 33: 163-173.
- Garjonyte, R., Malinauskas, A., 2000. Glucose Biosensor Based on Glucose Oxidase Immobilized in Electropolymerized Polypyrrole and Poly-*o*-Phenylenediamine/Films on a Prussian Blue Modified Electrode. **Sensors and Actuators**, B, 63:122–128.
- Ghica, M.E., Brett, M.A.C., 2009. Poly(Brilliant Cresyl Blue) Modified Glassy Carbon Electrodes: Electrosynthesis, Characterisation and Application in Biosensors. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 629: 35–42.
- Gu, M., Wang, J., Tu, Y., Di, J., 2010. Fabrication of reagentless glucose biosensors: A comparison of mono-enzyme GOD and bienzyme GOD–HRP systems. **Sensors and Actuators B**,
- Harborn, U., Xie, B., Venkatesh, R., Danielsson, B., 1997. Evaluation of a Miniaturized Thermal Biosensor for the Determination of Glucose in Whole Blood. **Clinica Chimica Acta**, 267: 225-237.
- JingJing, Z., JunJie, Z., 2009. A novel amperometric biosensor based on gold nanoparticles mesoporous silica composite for biosensing glucose. **Science in China Series B: Chemistry**, 52: 815-820.
- King, H., Aubert, R.E., Herman, W.H., 1998. Global burden of diabetes 1995-2025: P prevalence, numerical estimates, and projections. **Diabetes Care**, 21: 1414-1431.
- Leznoff, C.C., Lever, A.B.F., (eds), 1989. **Phthalocyanines: Properties and Applications**. VCH, New-York, A.B.D.
- Kudoh, Y., 1996. Properties of polypyrrole prepared by chemical polymerization using aqueous solution containing Fe₂(SO₄)₃ and anionic surfactant. **Synthetic Metals**, 79: 17-22.
- Li, J., Lin, X., 2007. Glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in poly (*o*-aminophenol) film on polypyrrole Pt nanocomposite modified glassy carbon electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, 22: 2898–2905.
- Liu, X., Zeng, X., Mai, N., Liu, Y., Kong, B., Li, Y., Wei, W., Luo, S., 2010. Amperometric glucose biosensor with remarkable acid stability based on glucose oxidase entrapped in colloidal gold-modified carbon ionic liquid electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, 25: 2675–2679.
- Luo, L., Li, Q., Xu Y., Ding Y., Wang X., Deng D., Xu Y., 2010. Amperometric glucose biosensor based on NiFe₂O₄ nanoparticles and chitosan. **Sensors and Actuators**, B, 145: 293–298.
- Mao, F., Mano N., Heler, A., 2003. Long tethers binding redox centers to polymer backbones enhance electron transport in enzyme wiring hydrogels. **J. Am. Chem. Soc.**, 125: 4951-4957.
- Mizoguchi, K., Kachi, N., Sakamoto, H., Kume, K., Yoshioka, K., Masubuchi, S., Kazama, S., 1997. Magnetic properties in polypyrrole doped by series of dopants. **Synthetic Metals**, 84: 695-698.
- Mizutani, F., Yabuki, S., 1997. Rapid determination of glucose and sucrose by an amperometric glucose sensing electrode combined with an invertase/mutarotase attached measuring cell. **Biosensors and Bioelectronics**, 12: 1013-1020.

- Nenkova, R., Ivanova, D., Vladimirova, J., Godjevargova, T., 2010. New amperometric glucose biosensor based on cross-linking of glucose oxidase on silica gel/multiwalled carbon nanotubes/polyacrylonitrile nanocomposite film. **Sensors and Actuators, B**,
- Oni, J., Diab, N., Reiter, S., Schuhmann, W., 2005. Metallophthalocyaninmodified glassy carbon electrodes: effects of film formation conditions on electrocatalytic activity towards the oxidation of nitric oxide. **Sensors and Actuators, B**, 105: 208-213.
- Özcan, L., 2008. **Polipirol İletken Polimerinin Biyosensör Olarak Kullanımı**. Doktora Tezi. Anadolu Üniversitesi, 114 s, Eskişehir.
- Özyılmaz, G., 2005. **Glukoz Oksidaz ve Katalazın Ayrı Ayrı ve Birlikte İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu**. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi, 158 s, Adana.
- Paddle, B.M., 1996. **Biosens.Bioelectron.**, 11(10),1079.
- Rahman, M.M., Umar, A., Sawada, K., 2009. Development of amperometric glucose biosensor based on glucose oxidase co-immobilized with multiwalled carbon nanotubes at low potential. **Sensors and Actuators, B**, 137: 327–333.
- Ramsay., 1998. **Commercial Biosensors Applications to Clinical Bioprocess and Enviromental Samples**.
- Ramanavičius, A., Ramanavičiene, A., Malinauskas, A., 2006. Electrochemical sensors based on conducting polymer polypyrrole. **Electrochimica Acta**, 51: 6025-6037.
- Ramanathan, K., Jönsson ,B.R., Danielsson, B., 2001. Sol-Gel Based Thermal Biosensor, for Glucose. **Analytica Chimica Acta**, 427: 1-10.
- Retama, J.R., Cabarcos, E.L., Mecerreyes, D., Lopez Ruiz, B., 2004. Design of an amperometric biosensor using polypyrrole microgel composites containing glucose oxidase. **Biosensors and Bioelectronics**, 20: 1111-1117.
- Roth, S., Bleier, H., 1987. Solitons in polyacetylene. **Adv. Phys.**, 36: 385-462.
- Shaolin, Mu S., Kan, J., 2002. The Electrocatalytic Oxidation of Ascorbic Acid on Polyaniline Film Synthesized in the Presence of Ferrocenesulfonic Acid. **Synthetic Metals**, 132: 29–33.
- Sljukic, B., Banks, C.E., Salter, C., Crossley, A., Compton, R.G., 2006. Electrochemically polymerized composites of multi walled carbon nanotubes and poly (vinylferrocene) and their use as modified electrodes, application to glucose sensing. **Analyst**, 131: 670-677.
- Takakubo, M., 1987. Electrochemical polymerization of pyrrole in aqueous solutions. **Synthetic Metals**, 18: 53-58.
- Tran-Minh. C. 1993. **Biosensors**, Chapmanand Hall, London.
- Telefoncu, A., 1999. **Biyosensörler Lisansüstü Yaz Okulu**, 1-81.
- Telefoncu, A., 1997. **Enzimoloji Lisansüstü Yaz Okulu**, 193-248.
- Tinkılıç, N., Çubuk, O., Işıldak, I., 2002. Glucose and Urea Biosensors on all Solid-state PVC-NH₂ Membrane Electrodes. **Analytica Chimica Acta**, 452: 29-34.
- Vrbova, E., Peckova, J., Marek, M., 1993. Biosensor for Determination of Glucose. **Starch**, 45 (10): 341-344.
- Wallace, G.G., Spinks, G.M., Kane Maguire, L.A.P., Teasdale, P.R., 2003. **Conductive Electroactive Polymers: Intelligent Materials Systems**. CRC Press, New York, A.B.D.

- Wang, L.X., Li, X.G., Yang, Y.L., 2001. Preparation, properties and applications of polypyrroles. **React. Funct. Polym.**, 47: 125-139.
- Weibel, M.K., Bright, H.J., 1971 (b). Kinetic behaviour of glucose oxidase bound to porous glass particles. **Biochemical Journal**, 124: 801-807.
- Wersinke, A. 1997. **Frontiers in Biosensorics II: Practical Applications** BirkhauserVerlag,Basel.
- Whitaker, J.R. 1994. **In Food Biosensor Analysis**, NewYork.
- Xue, C., Chen, Z., Luo, F.T., Palaniappan, K., Chesney, D. J., Liu, J., Chen, J., Liu, H., 2005. Synthesis of water soluble electroactive ferrocene grafted poly (*p*-phenylene-ethynylene) via phase transfer and its biosensing application. **Biomacromolecules**, 6: 1810-1815.
- Xue, H., Shen, Z., Li, Y., 2001. Polianiline-Polyisoprene Composite Film Based Glucose Biosensor with High Permselectivity. **Synthetic Metals**, 124: 345-349.
- Yasuzawa, M., Nieda, T., Hirano, T., Kunugi, A., 2000. Properties of Glucose Sensors Based on the Immobilization of Glucose Oxidase in N-Substituted Polypyrrole Film. **Sensors and Actuators, B**, 66: 77-79.
- Yavuz, A.G., Uygun, A., Bhethanabotla, V., 2008. A Novel Glucose Biosensor Based on Electrochemically Synthesized Chitosan- Conductive Poly(N-Methylaniline) Composite. **AICHE Annual Meeting, Nanotechnology and Nanobiotechnology for Sensors II., Philadelphia-Pennsylvania, USA.**
- Yoshimura, K., ve Hozumi, K., 1996. Response characteristics of a glucose electrode with a sensing membrane prepared by plasma polymerization. **Microchemical J**, 53: 404-412.
- Yu, E.H. and Sundmacher, K., 2007. Enzyme Electrodes for Glucose Oxidation Prepared by Electropolymerization of Pyrrole. **Trans IChemE**, B5, 85: 489-493.
- Zhang J.J. & Zhu J.J., 2009. A Novel Amperometric Biosensor Based on Gold Nanoparticles Mesoporous Silica Composite for Biosensing Glucose. **Science in China Press**, 52: 815-820.
- Ziegler, C, Göpel, W. 1998. **Current Opinionin Chemical Biology**, 2,585.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince beni yönlendiren ve laboratuvar çalışmalarım sırasında her türlü konuda fikir ve yardımlarını aldığım değerli Danışman Hocam Yrd. Doç. Dr. Gül Özyılmaz'a sonsuz teşekkür ederim. Ayrıca tezim süresince yapıcı eleştirileri ve çok değerli önerileriyle bana katkıda bulunan sayın Hocam Doç. Dr. A. Tuncay Özyılmaz'a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında desteğini ve yardımını gördüğüm meslektaşım H. Aysun Sertbaş'a ve emeği geçen bütün arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince sabır, ilgi ve desteğini benden esirgemeyen aileme, nişanlım Dr. İlkan Kayar'a ve tez yazımında bıkmadan usanmadan bana yardım eden sevgili kardeşim S. Anıl Can'a; sıkıldığımda şakalarıyla beni güldüren ve sürekli yanımda olan kardeşim Serkan Can'a sonsuz teşekkürler...

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Antakya'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi aynı ilde tamamladım. 2001 yılında girdiğim Dokuz Eylül Üniversitesi Buca Eğitim Fakültesi'nden 2006 yılında Kimya Öğretmeni olarak mezun oldum. 2008 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Yüksek Lisans Öğrenimime başladım.