

**DİTİYONEPİROL (DTP) TARZI İLETKEN
POLİMERLERİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE
BU POLİMERLERİN BİYOSENSÖR UYGULAMALARI**

Hacer AZAK

Doktora Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

Doç. Dr. Hüseyin Bekir YILDIZ

Karaman–2015

T.C
KARAMANOĞLU MEHMETBEY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DİTİYONEPİROL (DTP) TARZI İLETKEN POLİMERLERİN
SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE
BU POLİMERLERİN BİYOSENSÖR UYGULAMALARI

DOKTORA TEZİ
Hacer AZAK

Anabilim Dalı: Kimya
Programı : Biyokimya

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Hüseyin Bekir YILDIZ

KARAMAN-2015

TEZ ONAYI

Hacer AZAK tarafından hazırlanan “Ditiyonepirol (DTP) Tarzı İletken Polimerlerin Sentezi, Karakterizasyonu ve Bu Polimerlerin Biyosensör Uygulamaları” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman:

Doç. Dr. Hüseyin Bekir YILDIZ

Jüri Üyeleri

İmza

Prof. Dr. İbrahim YILMAZ
Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Kimya Anabilimdalı

Prof. Dr. Fevzi KILIÇEL
Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Kimya Anabilimdalı

Doç. Dr. Hüseyin Bekir YILDIZ
KTO Karatay Üniversitesi, Malzeme Bilimi ve
Nanoteknoloji Anabilimdalı

Doç.Dr. Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI
Selçuk Üniversitesi, Kimya Anabilimdalı

Yrd. Doç. Dr. Aysel ÇİMEN
Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Kimya Anabilimdalı

Tez Savunma Tarihi: 03/12/2015

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Fevzi KILIÇEL
Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitede ki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Hacer AZAK

Bu alışma Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı kapsamında TÜBİTAK-COST 112T622 nolu proje ve Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 02D13 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

ÖZET

Doktora Tezi

DİTİYONEPIROL (DTP) TARZI İLETKEN POLİMERLERİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE BU POLİMERLERİN BİYOSENSÖR UYGULAMALARI

Hacer AZAK

**Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı**

Danışman: Doç. Dr. Hüseyin Bekir YILDIZ

Aralık 2015, 172 Sayfa

Bu çalışma, giderek önemi artan ve nanoteknoloji alanında uygulama alanı oluşturan, literatürde benzer türevleri bulunmayan, elektron verici $-NH_2$ ile fonksiyonlandırılmış ve konjuge π yapısına sahip yeni nesil DTP-Alkil- NH_2 ve DTP-Aril- NH_2 bileşiklerinin sentezini ve biyosensör uygulamalarını kapsamaktadır.

Çalışmanın ilk aşamasında, Pd ve CuI katalizörleri kullanılarak 3,3'-Dibrom-2,2'-bitiyofen ve diammin bileşiklerinin kapling reaksiyonu ile, serbest amino gruplarına sahip 10-(4H-Ditiyeno [3,2-b:2',3'-d] pirol-4-il) dekan-1-amin ve 5-(4H- ditiyol [3,2-b:2',3'-d] pirol-4-il) naftalin-1-amin monomerleri sentezlendi. FT-IR, 1H -NMR, ^{13}C -NMR ve floresans spektroskopisi ölçümleri ile sentezlenen maddelerin yapısı aydınlatıldı.

Çalışmanın ikinci aşamasında, DTP-Alkil- NH_2 ve DTP-Aril- NH_2 monomerlerinin enzimatik ve mikrobiyal biyosensör uygulamaları gerçekleştirildi. Enzimatik biyosensör uygulamasında DTP-Alkil- NH_2 ve DTP-Aril- NH_2 monomerleri camsı karbon elektrot ve grafit elektrot yüzeylerinde elektrokimyasal olarak polimerleştirildi ve iletken elektrot yüzeyleri oluşturuldu. İletken polimer kaplı elektrot yüzey üzerine ksantin oksidaz (XOx) ve glukoz oksidaz (GOx) enzimleri immobilize edilerek Poly (DTP-Alkil- NH_2 /XOx), Poly (DTP-Alkil- NH_2 /GOx) ve Poly (DTP-Aril- NH_2 /GOx) olmak üzere üç tip enzimatik biyosensör hazırlandı. Hazırlanan enzimatik biyosensörlerin çalışma koşulları optimize edilerek, analitik karakterizasyonları gerçekleştirildi ve farklı gıda numunelerindeki glukoz ve ksantin miktarları amperometrik olarak tayin edildi.

Mikrobiyal biyosensör uygulamasında ise, grafit elektrot yüzeyi DTP-Alkil- NH_2 monomer yapısı ile polimerleştirildi ve iletken yüzeye *G.Oxydans* bakterisi immobilize

edilerek Poly(DTP-Alkil-NH₂/G.*Oxydans*) mikrobiyal biyosensörü hazırlandı. Hazırlanan yeni nesil mikrobiyal biyosensörün çalışma koşulları optimize edilerek analitik karakterizasyonu gerçekleştirildi ve glukoz miktarı amperometrik olarak tayin edildi. Sonuç olarak elde edilen veriler önerilen DTP türevi iletken polimerlerin, farklı substrat tayinlerine duyarlı, kararlılığı yüksek enzimatik ve mikrobiyal biyosensör sistemlerinin oluşturmada önemli bileşikler olduğunu kanıtladı.

Anahtar Kelimeler: İletken Polimer, Ditiyonepirol, Enzimatik Biyosensör, Mikrobiyal Biyosensör, Glukoz Oksidaz, Ksantin Oksidaz, Gluconobacter Oxydans

ABSTRACT

PH. D Thesis

THE SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF DITHIONEPYRROLE STYLE CONDUCTIVE POLYMERS AND BIOSENSOR APPLICATIONS OF THESE POLYMERS

Hacer AZAK

Karamanoğlu Mehmetbey University
Graduate School of Natural and Applied Science
Department of Chemistry

Supervisor: Associate Professor Huseyin Bekir YILDIZ

December 2015, 172 pages

This study presents the synthesis of a new generation conjugated- π structure DTP-Alkyl-NH₂, DTP-Aryl-NH₂ compounds, which are functionalized with electron-donating -NH₂ groups, has no similar derivatives in literature and constituted an important field in nanotechnology applications increasingly, and also offer their biosensor applications.

In the first part of study, 10- (4H-dithieno [3,2-b:2',3'-d] pyrrol-4-yl) decan-1-amine and 5- (4H-dithiolane [3,2-b:2',3'-d] pyrrol-4-yl) naphthalene-1-amine monomers, which have free amino groups, were synthesized with coupling reactions of 3,3'-dibromo-2,2'-bithiophene and the diamine compounds by using Pd and CuI catalyst. The structure of the synthesized compounds were clarified and characterized with FT-IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR and fluorescence spectroscopy measurements.

In the second part of study, the enzymatic and microbial biosensor applications of DTP-Alkyl-NH₂ and DTP-Aryl-NH₂ monomers were carried out. In the application of enzymatic biosensor, DTP-Alkyl-NH₂ and DTP-Aryl-NH₂ monomers were electrochemically polymerized on the glassy carbon electrode and graphite electrode surface, and the conductive electrode surfaces were formed. Three type of enzymatic biosensors; Poly (DTP-Alkyl-NH₂/XOx), Poly (DTP-Alkyl-NH₂/GOx) and Poly (DTP-Aryl-NH₂/GOx), were prepared by immobilizing xanthine oxidase (XOx) and glucose oxidase (GOx) enzymes on the conductive polymer coated electrode surface. The working conditions of constructed enzymatic biosensors were optimized and their characterization was performed analytically. With these enzymatic biosensors, the amount of glucose and xanthine in the different food sample were determined amperometrically.

In the application of microbial biosensor, DTP-Alkyl-NH₂ monomer was polymerized on the graphite electrode surface, and the poly (DTP-Alkyl-NH₂/G.Oxydans) microbial

biosensor was constructed by immobilizing G.Oxydans bacteria on the conductive surface. The working conditions of new generation microbial biosensors were optimized and their characterization was performed analytically, and with these microbial biosensors, the amount of glucose was determined amperometrically.

As a consequence, the obtained results have proved the suggested conducting polymers of DTP derivatives are important compounds in forming the stable enzymatic and microbial biosensor systems and are sensitive to the determination of various substrates.

Keywords: Conducting Polymer, Dithionepirol, Enzymatic Biosensors, Microbial Biosensors, Glucose Oxidase, Xanthine Oxidase, Gluconobacter Oxydans.

ÖNSÖZ

Bu çalışma KTO Karatay Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Öğretim Üyelerinden Doç. Dr. Hüseyin Bekir YILDIZ' ın danışmanlığında hazırlanarak Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne Doktora tezi olarak sunulmuştur.

Tez konusunun belirlenmesi, çalışmanın yürütülmesi ve tez yazımı aşamasında beni yönlendiren ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam sayın Doç. Dr. Hüseyin Bekir YILDIZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Sağladığı laboratuvar imkânı ve bilgileri ile yol gösteren Sayın Prof. Dr. Suna TİMUR 'a tezimin biçimlendirilmesi ve yayınlanması aşamalarında yanımda olan tez izleme komitesinin değerli üyesi Sayın Doç. Dr. Dilek ODACI DEMİRKOL ve Doç. Dr. Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI hocalarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Ve Karamanoğlu Mehmet Bey Üniversitesi Kimya Bölümünün değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. İbrahim YILMAZ, Prof. Dr. Fevzi KILIÇEL, Doç. Dr. Oktay TALAZ, Yrd. Doç. Dr. Aysel ÇİMEN ve çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Fatmanur ARSLAN, Arş. Gör. Nevin GENÇ ve Arş. Gör. Nihan KARUK'a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tüm çalışmam boyunca beni sabırla dinleyen ve her zaman yanımda olan dostlarım Öğr. Gör. Hacer SÖNMEZER, Arş. Gör. Hatice CEYLAN, Arş. Gör. Duygu AYDIN'a hep yanımda oldukları için minnettarım.

Hayatım boyunca beni maddi ve manevi anlamda destekleyen ve arkamda güçlerini daima hissettiğim, göstermiş oldukları sabır ve fedakârlıklar için babam Metin AZAK, annem Fatma AZAK, kardeşlerim Seda AZAK, Eda AZAK ve Selim AZAK'a ve tüm aileme teşekkürlerimi sunarım iyi ki varsınız...

Hacer AZAK
ARALIK, 2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT.....	III
İÇİNDEKİLER	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	XVIII
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1. İletken Polimerler	4
2.2. İletken Polimerlerde İletkenlik Mekanizması ve Bant Teorisi	5
2.2.1. Band Teorisi.....	7
2.2.2. İletken Polimerlerde Katkılama (Doping) İşlemi ve Elektriksel İletkenlik	11
2.2.3. İletken Polimerlerde Atlama (Hopping) Olayı	15
2.3. İletken Polimer Sentez Yöntemleri	16
2.3.1. Kimyasal Polimerizasyon	16
2.3.2. Elektrokimyasal Polimerizasyon	17
2.3.3. Piroliz	19
2.3.4. Kondenzasyon Polimerizasyonu	19
2.3.5. Emülsiyon Polimerizasyonu	20
2.3.6. Gaz Fazı Yöntemi Polimerizasyonu.....	21
2.3.7. Ara-Yüzey Polimerizasyonu.....	21
2.4. Piroz ve Türevleri.....	22
2.5. Tiyofen ve Türevleri.....	26
2.5.1. 2,5-ditiyofenil-piroz (SNS).....	27
2.5.2. 2,5-ditiyofenil-piroz (SNS) Sentez ve Yöntemleri	29
2.6. Ditiyonepiroz ve Özellikleri	30
2.7. Kapling Reaksiyonları	35
2.7.1. Heck Reaksiyonu.....	36
2.7.2. Negishi Reaksiyonu.....	38

2.7.3. Suzuki Reaksiyonu	39
2.7.4. Buchwald-Hartwig Aminasyon Reaksiyonu	41
2.8. İletken Polimerlerin Kullanım Alanları	43
2.9. İletken Polimerlerin Modifikasyonu.....	44
2.10. Biyosensörler	46
2.11. Biyosensör Bileşenleri.....	48
2.11.1. Biyobileşenler	48
2.11.2. Fiziksel Bileşenler.....	49
2.11.2.1. Elektrokimyasal Dönüştürücüler	49
2.11.2.2. Optik Dönüştürücüler	51
2.11.2.3. Piezo-elektrik Dönüştürücüler	51
2.12. İdeal Bir Biyosensörün Özellikleri.....	52
2.13. Enzimler.....	57
2.13.1. Enzimlerin Sınıflandırması	58
2.13.2. Enzim Aktivitesi	59
2.14. Enzimatik Reaksiyon Kinetiği	59
2.15. Enzim İmmobilizasyonu.....	64
2.15.1. İmmobilizasyon Yöntemleri	65
2.15.1.1. Adsorbsiyon	65
2.15.1.2. Kovalent Bağlama	66
2.15.1.3. Çapraz Bağlama.....	67
2.15.1.4. Tutuklama Yöntemi.....	67
2.16. Glukoz Oksidaz Enzimi	69
2.17. Ksantin Oksidaz Enzimi	71
2.18. Amperometrik Enzim Sensörleri.....	74
2.18.1. Birinci Nesil Amperometrik Biyosensörler	78
2.18.2. İkinci Nesil Amperometrik Biyosensör.....	78
2.18.3. Üçüncü Nesil Amperometrik Biyosensör	78
2.19. Mikroorganizma Temelli Sensörler	79
2.20. Biyoreseptör Olarak Mikroorganizma Kullanılmasının Avantajları	81
2.21. Gluconobacter Oxydans.....	82

3. MATERYAL VE METOT	84
3.1. Kullanılan Cihazlar.....	84
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	86
3.3. Kullanılan Çözeltiler.....	87
3.3.1. Fosfat Tampon Çözeltisi.....	87
3.3.2. Asetat Tampon Çözeltisi.....	87
3.3.3. Glukoz Çözeltisi	87
3.3.4. Glukoz Oksidaz Enzim Çözeltisi.....	88
3.3.5. Ksantin Oksidaz Enzim Çözeltisi.....	88
3.3.6. Ksantin Çözeltisi	88
3.3.7. Gluteraldehit Çözeltisi	88
3.3.8. Diğer Çözeltiler	88
3.4. <i>Gluconobacter Oxydans</i> Hücrelerinin Kültivasyonu	89
3.5. DTP Türevlerinin Sentezi ve Karakterizasyonu.....	89
3.5.1. 3,3'-Dibrom-2,2'-bitiyofen Sentezi.....	90
3.5.2. 10-(4H-Ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin Sentezi	91
3.5.3. 5-(4H-ditiyol [3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)naftalin-1-amin Sentezi.....	92
3.6. Floresans Özelliklerinin İncelenmesi	93
3.7. Camsı Karbon Elektrodun Temizlenmesi	93
3.8. Elektropolimerizasyon ile Elektrotların Hazırlanması	94
3.8.1.10-(4H-Ditiyeno[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin Monomerinin Elektropolimerizasyonu	94
3.8.2.5-(4H-ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)naftalin-1-amin Monomerinin Elektropolimerizasyonu	94
3.9. Hazırlanan Biyosensörler	95
3.9.1. Enzim Biyosensörler	95
3.9.2. Mikrobiyal Biyosensör.....	98
3.9.2.1.10-(4H-Ditiyeno[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin)(DTP-Alkil NH ₂) Polimer Bazlı <i>G. Oxydans</i> Biyosensörü	99
3.10. Enzim Biyosensör Elektrotlarının Optimum Koşullarının Belirlenmesi.....	100
3.10.1. DTP-Alkil-NH ₂ Ditiyolpirol Glukoz Biyosensör Elektrodu.....	100

3.10.1.1. Optimum pH	100
3.10.1.2. Tarama Sayısı	100
3.10.2. DTP-Aril-NH ₂ Ditiyolpirol Glukoz Biyosensör Elektrodu.....	100
3.10.2.1. Optimum pH	100
3.10.2.2. Tarama Sayısı.....	101
3.10.3. DTP-Alkil-NH ₂ Ditiyolpirol Ksantin Biyosensör Elektrodu	101
3.10.3.1. Optimum pH	101
3.10.3.2. Tarama Sayısı.....	101
3.10.3.3. Optimum Sıcaklık.....	102
3.10.3.4. Çalışma Potansiyeli	102
3.11. Mikrobiyal Biyosensör Elektrotlarının Optimum Koşulların Belirlenmesi.....	102
3.11.1. DTP-Alkil-NH ₂ Ditiyolpirol <i>G.Oxydans</i> Biyosensör Elektrodu	102
3.11.1.1. Optimum pH	102
3.11.1.2. Tarama Sayısı	103
3.12. Biyosensör Elektrotlarının Performans Faktörleri	103
3.12.1. DTP-Alkil-NH ₂ Ditiyolpirol Glukoz Biyosensör Elektrodu.....	103
3.12.1.1. Doğrusal Tayin Aralığı.....	103
3.12.1.2. Analiz Sonuçlarının Tekrarlanabilirliği ve Operasyonel Stabilite	103
3.12.1.3. Bozucu Türlerin Belirlenmesi.....	104
3.12.2. DTP-Aril- NH ₂ Ditiyolpirol Glukoz Biyosensör Elektrodu	104
3.12.2.1. Doğrusal Tayin Aralığı.....	104
3.12.2.2. Analiz Sonuçlarının Tekrarlanabilirliği ve Operasyonel Stabilite	104
3.12.2.3. Bozucu Türlerin Belirlenmesi.....	104
3.12.3. DTP-Alkil-NH ₂ Ditiyolpirol Ksantin Biyosensör Elektrodu.....	105
3.12.3.1. Doğrusal Tayin Aralığı.....	105
3.12.3.2. Analiz Sonuçlarının Tekrarlanabilirliği ve Operasyonel Stabilite	105
3.12.3.3. Bozucu Türlerin Belirlenmesi.....	105
3.12.4. <i>G.Oxydans</i> Elektrodunun Performans Faktörlerinin Belirlenmesi.....	106
3.12.4.1. Doğrusal Tayin Aralığı.....	106
3.12.4.2. Analiz Sonuçlarının Tekrarlanabilirliği ve Operasyonel Stabilite.....	106
3.12.4.3. Bozucu Türlerin Belirlenmesi.....	106

3.13. Gerçek Numune Analizi	107
3.13.4. Meyve Sularında Glukoz Tayini	107
4. BULGULAR	108
4.1. Sentez Ve Karakterizasyon Sonuçları	108
4.1.1. 3,3'-Dibrom-2,2'-bitiyofen	108
4.1.2. 10-(4H-Ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin	109
4.1.3. 5-(4H-ditiyol [3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)naftalin-1-amin	110
4.2. Floresans Ölçümleri.....	112
4.3. Elektropolimerizasyon ile Elektrotların Hazırlanması	116
4.3.1. 10-(4H-Ditiyeno[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin Elektropolimerizasyonu	116
4.3.2. 5-(4H-ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)naftalin-1-amin(DTP-Aril-NH ₂) Elektropolimerizasyonu	117
4.4. Enzim Biyosensör Elektrotlarının Optimum Koşullarının Belirlenmesi.....	118
4.4.1. DTP-Alkil-NH ₂ Ditiyolpirol Glukoz Biyosensör Elektrodu	118
4.4.1.1. Optimum pH	118
4.4.1.2. Tarama Sayısı.....	119
4.4.2. DTP-Aril-NH ₂ Ditiyolpirol Glukoz Biyosensör Elektrodu	120
4.4.2.1. Optimum pH	120
4.4.2.2. Tarama Sayısı.....	121
4.4.3. DTP-Alkil-NH ₂ Ditiyolpirol Ksantin Biyosensör Elektrodu.....	122
4.4.3.1. Optimum pH	122
4.4.3.2. Tarama Sayısı.....	123
4.4.3.3. Optimum Sıcaklık	124
4.4.3.4. Çalışma Potansiyeli	125
4.5. Mikrobiyal Biyosensör Elektrotlarının Optimum Koşulların Belirlenmesi.....	126
4.5.1. DTP-Alkil-NH ₂ Ditiyolpirol <i>G.Oxydans</i> Biyosensör Elektrodu	126
4.5.1.1. Optimum pH	126
4.5.2.2. Tarama Sayısı.....	126
4.6. Enzim Elektrotlarının Performans Faktörleri.....	127
4.6.1. DTP-Alkil-NH ₂ Ditiyolpirol Glukoz Biyosensör Elektrodu	127

4.6.1.1. Doğrusal Tayin Aralığı.....	127
4.6.1.2. Analiz Sonuçlarının Tekrarlanabilirliği ve Operasyonel Stabilite.....	128
4.6.1.3. Bozucu Türlerin Belirlenmesi.....	128
4.6.2. DTP-Aril- NH ₂ Ditiyolpirol Glukoz Biyosensör Elektrodu	130
4.6.2.1. Doğrusal Tayin Aralığı.....	130
4.6.2.2. Analiz Sonuçlarının Tekrarlanabilirliği ve Operasyonel Stabilite.....	130
4.6.2.3. Bozucu Türlerin Belirlenmesi.....	131
4.6.3. DTP-Alkil-NH ₂ Ditiyolpirol Ksantin Biyosensör Elektrodu.....	132
4.6.3.1. Doğrusal Tayin Aralığı.....	132
4.6.3.2. Analiz Sonuçlarının Tekrarlanabilirliği ve Operasyonel Stabilite.....	133
4.6.3.3. Bozucu Türlerin Belirlenmesi.....	135
4.7. Mikrobiyal Biyosensör Performans Faktörleri.....	137
4.7.1. DTP-Alkil-NH ₂ Ditiyolpirol <i>G.Oxydans</i> Biyosensör Elektrodu	137
4.7.1.1. Doğrusal Tayin Aralığı.....	137
4.7.1.2. Analiz Sonuçlarının Tekrarlanabilirliği ve Operasyonel Stabilite	138
4.7.1.3. Bozucu Türlerin Belirlenmesi.....	138
4.8. Gerçek Numune Analizi	139
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	141
6. KAYNAKLAR.....	145
ÖZGEÇMİŞ.....	160

EKLER	164
EK 1.	3,3'-Dibrom-2,2'-bitiyofen (2) bileşiminin 400 MHz ¹ H-NMR spektrumu (CDCl ₃)..... 164
EK 2.	3,3'-Dibrom-2,2'-bitiyofen bileşiminin 100 MHz ¹³ C-NMR spektrumu (CDCl ₃)..... 165
EK 3.	10-(4H-Ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin bileşiği 400 MHz ¹ H-NMR spektrumu (CDCl ₃)..... 166
EK 4.	10-(4H-Ditiyol [3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin bileşiği 100 MHz ¹³ C-NMR spektrumu (CDCl ₃)..... 167
EK 5.	5-(4H-ditiyol [3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)naftalin-1-amin 400 MHz ¹ H-NMR spektrumu (CDCl ₃)..... 168
EK 6.	5-(4H-ditiyol [3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)naftalin-1-amin 400 MHz ¹³ C-NMR spektrumu (CDCl ₃)..... 169
EK 7.	3,3'-Dibrom-2,2'-bitiyofen bileşiği IR spektrumu 170
EK 8.	10-(4H-Ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin bileşiği IR spektrumu 171
EK 9.	5-(4H-ditiyol [3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)naftalin-1-amin (DTP-Naf-NH ₂) bileşiği IR spektrumu 172

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. İletken polimer ve diğer iletken maddelerin iletkenlik türleri ve iletkenlik sınırlarının karşılaştırılması	6
Şekil 2.2. π sistem modeli.....	7
Şekil 2.3. İletken (a), yarı iletken (b) ve yalıtkan (c) maddelerde band aralığı	8
Şekil 2.4. Moleküler orbital diyagramı	9
Şekil 2.5. a) Poli(asetilen) polimerinin değerlik bandına p ya da n-tipi katılma b) P tipi katılma durumunda elektriksel iletkenlik mekanizması.....	13
Şekil 2.6. a) Zincir üzerinde yükün taşınması, b) Zincirler arasında yükün taşınması, c) Partiküller arasında yükün taşınması.....	15
Şekil 2.7. Kimyasal polimerizasyon (Teasdale ve ark., 2003)	17
Şekil 2.8. Tiyofenin elektropolimerizasyon mekanizması	18
Şekil 2.9. Piyrol, Sceptrin ve Polypiyrol Yapıları	22
Şekil 2.10. Piyrolün elektrokimyasal polimerizasyon mekanizması	25
Şekil 2.11. Tiyofen, Xanthopappins ve Politiyofen yapıları	26
Şekil 2.12. 2,5-ditiyofenil-piyrol (SNS) ve SNS-NH ₂ yapıları	28
Şekil 2.13. Anilin ile fonksiyonelleştirmiş Ditiyofenil-piyrol polimerik yapısı	28
Şekil 2.14. (SNS-NH ₂) polimerinin glukoz oksidaz ile kovalent bağlanmasının şematik gösterimi	28
Şekil 2.15. Ditiyolfenil-piyrolbenzamin sentez yöntemi	29
Şekil 2.16. Ditiyofenil-piyrol sentez yöntemi	29
Şekil 2.17. Ditiyolpirol ve N-Alkil-Ditiyolpirol yapısı.....	30
Şekil 2.18. Ditiyolpirol (DTP) türevlerinden elde edilebilen bileşikler	31
Şekil 2.19. Ditiyolpirol bileşiğinin ilk sentez yöntemi	31
Şekil 2.20. N-alkil sübstitüe DTP bileşikler sentezi	32
Şekil 2.21. N-Asetil Ditiyolpirol bileşiğinin sentezi.....	32
Şekil 2.22. İndoleditiyofenpirol ve diindoletiyofenpirol bileşiklerinin sentez yöntemleri.....	33
Şekil 2.23. Dimerik ve trimerik ditiyolpirol bileşiklerinin sentez yöntemi.....	34

Şekil 2.24. Palladyum katalizörlüğünde gerçekleşen reaksiyonlar.....	36
Şekil 2.25. Heck reaksiyonunun genel şeması.....	37
Şekil 2.26. Heck reaksiyon mekanizması.....	38
Şekil 2.27. Negishi kapling reaksiyonunun genel mekanizması	39
Şekil 2.28. Organik bir kısım içeren boronik asit ile aril halojenürün reaksiyonu	40
Şekil 2.29. Suzuki kapling reaksiyonunun genel mekanizması	41
Şekil 2.30. Buchwald-Hartwig aminasyon reaksiyonunun katalitik döngüsü.....	42
Şekil 2.31. Polipirol ve glukoz oksidazın etkileşmesi.....	45
Şekil 2.32. Poli-(N-3-aminopropil pirol-ko-pirol) kopolimerine kovalent olarak enzim bağlanması	46
Şekil 2.33. Bir biyosensörün şematik gösterimi	47
Şekil 2.34. Bir biyosensör için kalibrasyon eğrisi	53
Şekil 2.35. Bir analitik yöntemin çalışma aralığı.....	54
Şekil 2.36. Enzim-substrat kompleksinin oluşması	57
Şekil 2.37. Reaksiyon hızı-substrat konsantrasyonu grafiği	62
Şekil 2.38. Lineweaver-Burk eğrisi	62
Şekil 2.39. Glukozdan glukonik asitin oluşmasının enzimatik mekanizması	70
Şekil 2.40. Ksantin oksidaz tarafından katalizlenen reaksiyonlar	72
Şekil 2.41. Ksantin oksidaz enzimin katalizlediği reaksiyonlar	72
Şekil 2.42. Ksantin oksidazın yapısı	73
Şekil 2.43. Enzim biyosensörlerdeki gelişimin şematik gösterilişi (a) 1. nesil biyosensörler, (b) 2. nesil biyosensörler, (c) 3. nesil biyosensörler.....	77
Şekil 2.44. <i>G. Oxydans</i> hücrelerinin görünümü	82
Şekil 3.1. DTP-Alkil-NH ₂ ditiyolpirol bileşik sentez şeması.....	89
Şekil 3.2. DTP-Aril-NH ₂ ditiyolpirol bileşik sentez şeması.....	90
Şekil 3.3. 3,3'-dibrom-2,2'-bitiyofen (2) sentezi.....	91
Şekil 3.4. 10-(4H-Ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin (3) sentezi.....	92
Şekil 3.5. 5-(4H-ditiyol [3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)naftalin-1-amin (5) sentezi	93
Şekil 3.6. poly(DTP-Aril-NH ₂) glukoz oksidaz enzim elektrodunun hazırlanması	95
Şekil 3.7. poly(DTP-Alkil-NH ₂) ksantin oksidaz enzim elektrodunun hazırlanması	96
Şekil 3.8. Ksantin oksidaz ile ksantin arasındaki enzimatik reaksiyon.....	97

Şekil 3.9. Poly (DTP-Alkil-NH ₂) / <i>G.Oxydans</i> elektrodunun hazırlanması.....	99
Şekil 4.1. 3,3'-dibrom-2,2'-bitiyofen.....	108
Şekil 4.2. 10-(4H-Ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin.....	110
Şekil 4.3. 5-(4H-ditiyol [3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)naftalin-1-amin	111
Şekil 4.4. 5-(4H-ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)naftalin-1-amin monomerinin uyarma spektrum.....	113
Şekil 4.5. 5-(4H-ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)naftalin-1-amin monomerinin emiyon spektrum	114
Şekil 4.6. 10-(4H-Ditiyeno[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin monomerinin uyarma spektrumu	114
Şekil 4.7. 10-(4H-Ditiyeno[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin monomerinin emiyon spekturumu	115
Şekil 4.8. Monomerinin asetonitril/diklormetan çözücü ortamında 0,1 V/s ile N ₂ atmosferindeki dönüşümlü voltamogramı.....	116
Şekil 4.9. 5-(4H-ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)naftalin-1-amin monomerinin TBAPF6/DCM ortamında 100 mV/s dönüşümlü voltamogramı.....	117
Şekil 4.10. pH'ın Poly(DTP-Alkil-NH ₂)/GOx biyosensörü üzerine etkisi [pH 3,5– 5,5; 50 mM sodyum fosfat tamponları; Oda sıcaklığında; 100 mV]	118
Şekil 4.11. Tarama sayısının Poly(DTP-Alkil-NH ₂)/GOx biyosensör cevabı üzerine etkisi	119
Şekil 4.12. pH'nın Poly(DTP-Naftil-NH ₂)/GOx biyosensörü üzerinde etkisi	120
Şekil 4.13. Polimerizasyon döngü sayısının Poly(DTP-Naftil-NH ₂)/GOx biyosensör cevabına etkisi.....	121
Şekil 4.14. Farklı pH lardaki ksantin substratlı biyosensör cevabı PBS tamponunda (+0,5V, 10 mM)	122
Şekil 4.15. Polimerizasyon döngü sayısının Poly(DTP-alkil-NH ₂)/XOx biyosensör cevabına etkisi.....	123
Şekil 4.16. Sıcaklığın etkisi +0,5V (10mM pH 7,0 fosfat tamponu)	124
Şekil 4.17. Uygulanan ponsiyel etkisi (10mM fosfat tamponu, pH 7,0).....	125
Şekil 4.18. Biyosensör cevabına pH'ın etkisi (pH 6,0–8,0; 50 mM tamponları;30 °C; -700 mV).....	126

Şekil 4.19. Poly(DTP-Alkil-NH ₂)/GOx biyosensörünün farklı glukoz konsantrasyonlarına karşılık elde edilen kalibrasyon grafiği [50 mM, pH: 4,5 fosfat tamponu; oda sıcaklığında; 100 mV].....	127
Şekil 4.20. Poly(DTP-Alkil-NH ₂)/GOx biyosensörünün farklı substratlara (0,1 mM) cevabı [Fosfat tamponu pH 4,5; 50 mM,100mV]	129
Şekil 4.21. Poly(DTP-Aril-NH ₂)/GOx biyosensörünün farklı glukoz konsantrasyonlarına karşılık elde edilen kalibrasyon grafiği	130
Şekil 4.22. Biyosensörün farklı substratlara (0,25 mM) cevabı (Sodyum asetat tamponu pH 4,5; 50 mM, -0,7 V, oda sıcaklığı).....	131
Şekil 4.23. Farklı Ksantin konsantrasyonuna karşılık gelen kalibrasyon grafiği (10mM PBS pH 7,0)	133
Şekil 4.24. A) Sabit konsantrasyonda ksantin eklemesiyle operasyonel kararlılığı B) Hazırlanan biyosensörün zamana bağlı cevabı (+4 ⁰ C’de depolanan 10mM pH: 7,0 PBS).....	135
Şekil 4.25. Biyosensörün farklı substratlara verdiği cevap	136
Şekil 4.26. Glukoz tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı [50 mM, pH 7,0 fosfat tamponu; 30 °C; -700 mV]	137
Şekil 4.27. 10-(4H-Ditieno[3,2-b:2’,3’-d]pirol-4-il)dekan-1-amin)/ <i>G. Oxydans</i> biyosensörünün farklı substratlara (0,25 mM) cevabı.....	139

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Dop edilmiş bazı iletken polimerlerin yapıları ve iletkenlikleri	14
Çizelge 2.2. İmmobilizasyon metotlarının karşılaştırılması.....	69
Çizelge 2.3. Amperometrik biyosensörlerde kullanılan çeşitli enzimler	76
Çizelge 2.4. Amperometrik mikroorganizma temelli biyosensör örnekleri	79
Çizelge 4.1. Diklormetan (DCM) çözücüsü içinde ki floresans ölçüm	112
Çizelge 4.2. Kloroform(CHCl ₃) çözücüsü içinde ki floresans ölçüm.....	112
Çizelge 4.3. Metanol (MeOH) çözücüsü içinde ki floresans ölçüm	112
Çizelge 4.4. THF çözücüsü içinde ki floresans ölçümü	113
Çizelge 4.5. DMF çözücüsü içinde ki floresans ölçümü.....	113
Çizelge 4.6. Poly (DTP-Aril-NH ₂)/GOx biyosensörü ve spektrofotometrik yöntemler kullanılarak meyve sularındaki toplam glukoz tayini deneyleri sonuçları..	140
Çizelge 5.1. Ksantin oksidaz enzimiyle yapılan farklı çalışmaların kıyaslanması	142
Çizelge 5.2. Amperometrik mikroorganizma temelli biyosensör örnekleri	143

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
[E]	Enzim Konsantrasyonu
[E] ₀	Enzim Başlangıç Konsantrasyonu
[ES]	Enzim-Substrat Kompleks Konsantrasyonu
[S]	Substrat Konsantrasyonu
μA	Mikroamper
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
Å ⁰	Angstromdur
eV	Elektron Volt
I _{Em}	Maksimum Uyarım Akımı
I _{Ex}	Maksimum Işıma Akımı
I _U	Enzim Aktivitesi
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mV	Milivolt
Scm ⁻¹	İletkenlik Birimi
V _m	Maksimum Hız
λ _{Em}	Uyarım İçin Işıma Dalga Boyu
λ _{Ex}	Işıma İçin Uyarım Dalga Boyu
λ _{max}	Maksimum Işıma Dalga Boyu
π	Atomlar Arası pi Bağı
σ	Atomlar Arası sigma Bağı

Kısaltmalar

AET

ATP

CCE

CDCl₃

CNT

CP

CPE

CV

DBSA

DTP

EDC

EPR

FAD

FIA

GO_x

HGNC

HOMO

İTO

LUMO

NHS

OFET

OLED

PA

PF

PPP

Pt

PTs

SNS

XO_x

X-ray

Açıklama

Alan Etkili Transistör

Adenozin Trifosfat

Camsı Karbon Elektrot

Dötero Kloroform

Karbon Nano Tüp

İletken Polimer

Karbon Paste Elektrot

Dönüşümlü Voltametri

Dedasilbensülfonik asit

Dithione PiroL

Çözünür Karbodiimid

Elektronik Paramagnetik Rezonan

Flavin Adenin Dinükleotid

Akış Enjeksiyonlu Analiz

Glukoz Oksidaz

Gen İsimlendirme Komitesi

Yüksek Eşleşmiş Moleküler orbital

İndiyum tin oksit

DüşükEşleşmemiş Moleküler orbital

Dihidroksi Süksinimid

Organik Alan Etkili Transistör

Işık Yayan Diyotla

Poliasetilen

Polifuran

Poliparafenilen

Platin

Politiyofen

2,5-ditiyofenil-pirol

Ksantin Oksidaz

X-Işınımı

1. GİRİŞ

Son yıllara kadar bilinen organik polimerlerin hepsinin oda sıcaklığında 10^{-10} S/cm veya daha az iletkenliğe sahip yalıtkanlar olduğu bilinmekteydi. 10^{-10} S/cm den daha az iletken olmasından dolayı bu polimerler elektriksel iletkenlik açısından yalıtkan malzeme olarak kullanılmışlardır. Polimerlerin de iletken karaktere sahip olabileceği ilk kez bir iletken polimer olan poliasetilen ile ilgili çalışmalarla aydınlatılmıştır. 1977 yılında Shirakawa, MacDiarmid ve Heeger; Ziegler-Natta katalizörü kullanarak metalik görünümlü ancak yeterince iletken olmayan gümüş renginde poliasetilen filmlerinin; klor, brom ve iyot buharlarıyla tepkimesi sonucu mekanik özelliklerinin iyileştiğini ve ilk hallerinden 10^9 kat daha fazla iletken olabildiklerini göstermişlerdir (Ito ve ark., 1974; Shirakawa ve ark., 1977).

Dop edilmiş (katkılanmış) poliasetilenin iletkenliği bu yöntemle 10^5 S/m² 'ye kadar çıkarılmıştır. Bu değer metallerin iletkenlik değerine yakındır ve bu ilerlemeler sonucunda "iletken polimer" terimi ortaya çıkmıştır. İletken polimerleri, diğer polimerlerden ayıran temel özellik, sırayla değişen tek ve çift bağlardan oluşan bir zincir yapısına sahip olmalarıdır. Bu şekilde sırayla değişen bağ yapısına, "konjugasyon" denir. Dolayısıyla poliasetilen, bunun en güzel örneğini teşkil etmektedir.

Poliasetilenin metalik iletkenlik özelliği göstermesine rağmen, hava ile temas ettiğinde, çabucak oksitlenmesi ve kararlı olmaması, kullanımını engellemiştir. Bundan dolayı araştırmalar, atmosfer şartlarında bozulup değişmeyen, oksitlenmeyen, işlenebilir yeni iletken polimerler üzerine kaymıştır. Örneğin konjuge- π bağlarına sahip olan anilin, pirol, furan, tiyofen, inden ve azulen gibi heterosiklik bileşiklerden iletken polimerler sentezlenmiştir. Poli(tiyofen) türevleri alan-tesirli transistör yapımında kullanılacak umut vaat eden iletken polimerlerdendir. Poli(pirol) "stealth" adlı radara görünmeyen uçakların, dış yüzeylerinin kaplamasında kullanılmak üzere test edilmiştir. Ayrıca bazı iletken polimerlerin elektrokromik özellikleri, bu polimerlerin, yazın, güneş ışığı altında kararlı "akıllı pencereler"de kullanımına imkân sağlamaktadır.

1977 yılında dop edilmiş poliasetilenin metallerdeki yakını bir iletkenlik gösterdiği tespit edildikten sonra, iletken polimer bilimi birçok dalda hızla gelişmeye başlamıştır. Son olarak, yüksek saflıkta polimerler sentezlendikçe, yarı iletken polimerler elektronik devrelerin yapımında kullanılmaya başlanmıştır. Bu elektronik devrelerin arasında; transistörler, FET'ler, fotodiyotlar ve LED'ler bulunmaktadır. Özellikle polimerik LED'ler, düşük maliyet ve hızlı üretimlerinden dolayı endüstriyel mânâda çok cazip karakteristik özellikler göstermektedir (Granqvist ve ark., 2007; Bange, 1999; Skotheim ve ark., 1998).

İletken polimerlerin bunlardan başka farklı uygulama alanları da vardır. Bu uygulama alanlarının arasında; modifiye elektrotlar, fotovoltik, elektrokromik cihazlar ve biyosensörler verilebilir (Mortimer, 1997).

Günümüzde iletken polimerler biyomoleküller için uygun matriksler ve biyosensör sistemlerinde, yöntemin kararlılığının artırılmasında, cevap verme süresinin kısa olmasında ve duyarlılığının artırılmasında etkili olduğu için medikal teşhislerde çok sık kullanılmaktadırlar. Bu gibi avantajları sayesinde özellikle ön plana çıkan monomerlerden tiyofen ve pirol esaslı türevlerinin sentezlerine ait birçok çalışma yapılmaktadır. Monomerlerde elektron salıcı (dönör) ve elektron çekici (akseptör) grupların bulunması, bu monomerlerden sentezlenen iletken polimerlerin (kopolimerlerin) fiziksel, kimyasal ve elektronik özelliklerini önemli ölçüde etkilemektedir.

Bu tez çalışması kapsamında alkil ve aril grubu içeren daha önceki çalışmalardan farklı olarak elektron verici $-NH_2$ fonksiyonel grubu içeren pek çok nanoteknolojik alanda uygulama imkânı olacak yeni nesil DTP-Alkil- NH_2 , DTP-Aril- NH_2 dithionepirol bileşikleri sentezlendi. Bu tür bileşikler elektronik ve fotovoltik özelliklere sahiptir. Sentezlenen $-NH_2$ fonksiyonlu grup içeren dithionepirol bileşiklerinin elektrot yüzeyine elektropolimerizasyonu sonucunda enzim bazlı biyosensörler hemde mikrobakteriyel bazlı biyosensörler hazırlanmıştır. Enzim biyosensörlerinin hazırlanmasında ksantin oksidaz ve glukoz oksidaz enzimlerinin camı karbon elektrot yüzeyine gluteraldehit kimyasalı ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Mikrobiyal biyosensörün hazırlanması içinde *G.Oxydans* bakteri türü kullanılmıştır. Bu işlem içinde elektrokimyasal olarak polimerleştirilen N-Alkil- NH_2 , monomeri grafit karbon elektrot üzerine gluteraldehit

kimyasalı ile çapraz bağlanmasıyla elektrot yüzeyi modifiye edilmiş ve glukoz tespitine yönelik biyosensör hazırlanmıştır. Her iki çeşit biyosensörlerde de glukoz ve ksantin miktarı amperometrik akım değişimleri ile ölçülmüştür. Hazırlanan biyosensörlerin optimum pH, tayin aralığı, sıcaklık, kullanım kararlılığı ve raf ömrü çalışmaları ile analitiksel karakterizasyonuda yapılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. İletken Polimerler

Polimer kelimesi bilindiği gibi birden çok monomer biriminin kovalent bağlarla bağlanarak bir araya gelmesi sonucu oluşan daha büyük makromolekül bileşiklere verilen genel isimdir. Polimerleri oluşturan monomer birimler aynı kimyasal yapıya sahip olabileceği gibi, kimyasal formülü farklı monomerlerin de birbirine bağlayarak polimer zincirini oluşturmak mümkündür. Bu sayede farklı molekül sayısı, özellikleri, çeşitleri ve uygulama alanları değişmektedir. Örneğin bir polimer bileşiği hem tıp alanında organ yapımında kullanılabilmekte hem de bir başka polimer ile yapılan kompozit ya da karışımı hazırlanarak metal iyonlarının tutulması ve zenginleştirilmesi amacıyla kullanılabilmektedir. Yine bir başka polimer bileşiği, uzun yıllar boyunca boya maddesi olarak kullanılmış ve şimdilerde bu madde yüksek iletkenlik gösterdiği için elektronik devrelerin yapımında kullanılmaktadır, ayrıca bir başka polimer ile kompoziti hazırlanarak yüzey koruyucu madde olarak kullanılabilmektedir.

Son yıllarda hızla gelişen ve benzer polimer maddelerin kullanımında yepyeni ufuklar açan ve yakın gelecekte çok önemli bir teknoloji haline dönüşecek olan bir konu, elektriksel iletkenlik gösteren polimerlerdir. Bu polimerler, metallere kimyasal yapı ve bağ karakterleri ile diğer polimerlerden ise içerdikleri konjüge bağların varlığı ile ayırt edilirler. İletken polimerler, sahip oldukları özelliklerden dolayı sıklıkla “sentetik metal” olarak adlandırılır. İletken polimerlere ait ilk çalışmalar Chiang ve ark. (1977) tarafından çalışılmaya başlanmış ve günümüze kadar devam etmiştir.

Shirakawa, MacDiarmid ve Heeger tarafından yalıtkan polimer olarak bilinen polyasetilenin (PA) molekülünün katkılama yoluyla iletkenliğinin 10^9 kat daha fazla arttığı bulunması iletken polimer kavramını ortaya çıkarmıştır. Bu konu üzerinde ki çalışmalarıyla Shirakawa, MacDiarmid ve Heeger 2000 yılında Kimya Nobel Ödülü almışlardır. Bu bileşikler yapısında bulunan elektronlarla yeterli düzeyde elektriksel iletkenliği sağlayabilmektedirler. Polimerlerin elektriksel iletkenlik gösterebilmesi için, polimer zincirinde bulunan elektronların polimer zincir boyunca taşınmasını sağlayan uygun yerlerin bulunması gerekir. İletken polimerlerde bu koşulu, monomer yapısında ve zincir boyunca uzanan polimer zincir üzerinde bulunan konjüge çift bağlar

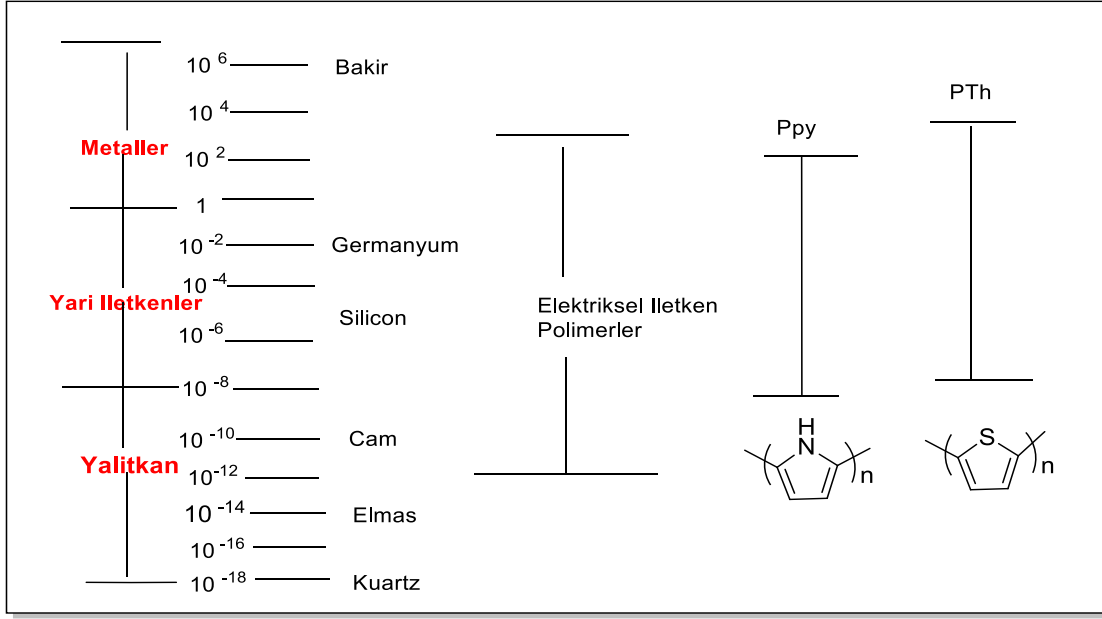
sağlamaktadır. Bu özelliğin sağlanabilmesi için, monomerlerin polimer zincirinde korunabilecek aromatik veya konjuge karbon-karbon çift bağları içeren bağlarının olması gerekir ve bu bilgiler literatürde yer almaktadır (Smith, 1976).

Bilinen heterosiklik bileşikler, karbon atomu başta olmak üzere, oksijen, kükürt, azot gibi heteroatomları yapılarında bulduran bileşikleridir. π konjugasyonuna ek olarak polimerlerin sahip olduğu heteroatomlar da ortaklanmamış elektronlarının varlığı konjugasyonunu sağlar ve bu da iletkenlik üzerinde etkili olur. Heteroatomların sağladığı bu konjugasyon genişletilmiş konjugasyon olarak bilinir. Konjugasyon aracılığı ile elektronların polimer zincir üzerindeki hareketi sağlanmış olur. Dolayısı ile polimerlerin iletken olma özelliği açıklanmış olur. Ancak, çoğu zaman tek başına konjugasyon yüksek düzeyde iletkenlik için tek başına yeterli değildir. Konjuge çift bağlara sahip polimerlerin iletkenliği katkılama (doping veya doplama) işlemiyle artırılır. Katkılama işleminde polimer yapısına iletkenlik sağlayacak olan elektronlar verilerek yani, indirgenme ile polimer zincirinde eksi yükler oluşturulur veya polimer yapısından elektronlar kopartılarak yükseltgenme yoluyla artı yükler oluşturulur. Dolayısıyla konjuge çiftli bağlar içeren polimer zincirinde elektronik uyarma sonucunda, bir elektronun artı yüklü bir boşluğa veya merkeze geçmesiyle geldiği yerde de bir artı yüklü boşluk oluşacaktır. Bu şekildeki elektron hareketliliği ard arda zincir boyunca veya zincirler arasında yinelenerek elektrik iletilir.

İletken polimerler içerisinde polipirol bileşiğinin, elektrolitik yöntemlerle elektrot üzerinde üretildiğinde kendiliğinden iletken hale geldiği saptanmasıyla bu bileşik ilgi çekmeye başlamıştır. Bir süre sonrada başta pirol ve tiyofen türevleri olmak üzere farklı organik bileşiklerden de iletken polimerlerin sentezlenmesi gerçekleştirilmiştir.

2.2. İletken Polimerlerde İletkenlik Mekanizması ve Bant Teorisi

İletken polimerlerin sağladığı benzersiz iletkenlik özelliği, aynı bileşik için çok fazla sayıda uygulama alanı sağlamaktadır. En çok kullanılan iletken polimerler olan poliasetilen, polianilin ve polipirol gibi polimerlerin optik absorpsiyon çalışmaları sonucunda, bu polimerlerin değerlik bandını iletkenlik bandından ayıran band mesafesinin yarı iletkenlerde ki gibi olduğu görülmüştür.



Şekil 2.1. İletken polimer ve diğer iletken maddelerin iletkenlik türleri ve iletkenlik sınırlarının karşılaştırılması

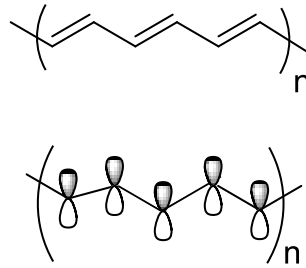
Polimerlerin iletkenlik özellikleri ve erişilen maksimum değerler göz önüne alındığında, Şekil 2.1'de görüldüğü üzere cam ile metal bileşikleri arasında özellikler ve değerler göstermektedir. Polimerin yapısında sağlanan maksimum hatasızlık, yüklenen maddelerin derişimi, türünün uygun seçimi, zincir uzunlukları, yönlenmelerinin kontrol edilmesi, sp³ hibriti yapmış yapıların bulunmaması (konjugasyonu bozucu safsızlıkların bulunmaması) ya da zincir üzerinde böyle bir bozuk yapının oluşmasına izin verilmediği koşullarda sentezlenen polimerler iletkenlik özelliği kazandırılır. Kısacası birçok parametrenin kontrolü ile ulaşılan en iyi iletkenlik değeri 2x10⁶ S/cm olarak poliasetilen polimerinde ölçülmüştür (Heeger, 1991).

Poli(asetilen) polimerinde ulaşılan iletkenlik değeri 2x10⁵ S/cm olup bu değer metalik bakırın iletkenlik değerinden 4 kat daha fazladır.

2.2.1. Band Teorisi

Metallerin iletkenliği elektronik iletkenliktir ve bu iletkenlik bant teorisi yardımı ile açıklanabilir. Bu teoride esas olan maddelerdeki dolu bant (değerlik elektronlarının bulunduğu bant) ile boş bant (iletim bandı) arasındaki enerji farkıdır. Bu teoriye göre katıda elektronlar tarafından doldurulacak sürekli enerji bantları ve elektronların bulunamayacağı enerji aralıkları bulunur. Teori elektriksel direnç ve optik absorpsiyon gibi birçok olayı açıklamada büyük yarar sağlar.

Bu özelliklerin tam olarak anlaşılabilmesi için moleküler orbital teorisi ile işe başlanması gerekir. Bu teoriye göre eğer iki atom bir araya gelirse farklı enerjilerdeki bağ, anti-bağ orbitalleri oluşur. Bu teorideki en önemli nokta moleküldeki N atomik orbitalden dolayı N tane moleküler orbitalin oluşacağıdır. İki atomik orbitalin birleşmesi sonucunda 2 tane moleküler orbital oluşmakta, n tane atomik orbital birleştiğinde ise n tane moleküler orbital oluşmaktadır. N tane moleküler orbitalde bulunan bağ ve antibağ molekül orbitalleri bir araya geldiğinde (bir kristal ya da polimer yapıda) bu orbitallerin düzenlenmesi ile bir enerji bandı oluşmaktadır (Şekil 2.2). Enerji bandı içinde bulunan bağ yapıcı ve antibağ moleküler orbitaller sırasıyla, değerlik bandı ve iletkenlik bandı olarak işlev görmektedirler.

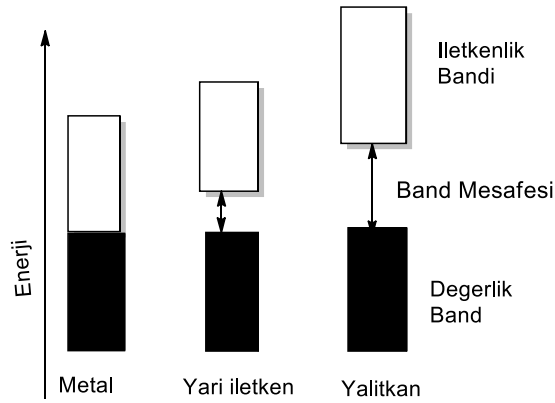


Şekil 2.2. π sistem modeli

Maddelerin moleküler orbitallerini bant olarak isimlendirerek metallerin ve yarı-metallerin özelliklerini daha rahat anlaşılabilir. Yalıtkanlar, yarı iletkenler gibi diğer maddelerin özellikleri bant teorisine bağlı olarak ifade edilen valans bandı, iletkenlik bandı gibi kavramlarla açıklanır.

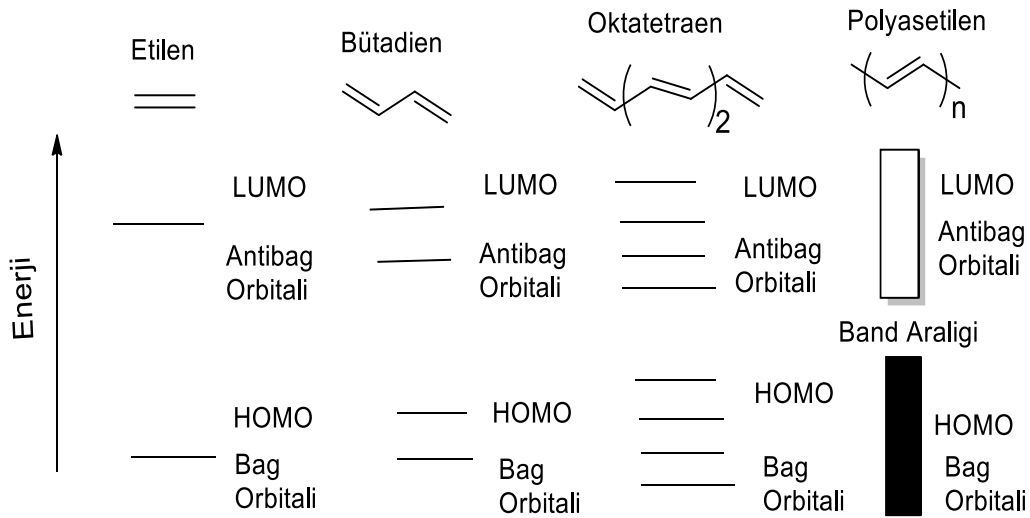
Elektriksel özellikler moleküllerin elektronik yapısının sonucu olarak açığa çıkmaktadır. Polimerlerle ilgili bu durum elektronik iletkenliğinin mekanizması band teorisyle açıklanmaktadır.

Bu teoriye göre, bir materyalin iletkenliği, kısmen dolu olan değerlik bandı ile boş iletkenlik bandı arasındaki enerji farkının az veya sıfıra yakın olmasına bağlıdır. Bu iki enerji düzeyi arasındaki geçişi sağlamak için gerekli enerjiye bant eşik enerjisi adı verilmektedir. İletkenlerdeki bant boşluğu hemen hemen sıfırdır. Yalıtkanlarda, değerlik bandı ile iletkenlik bandı arasındaki enerji farkı (bant boşluğu) elektronların geçişine olanak vermeyecek ölçüde büyüktür ve bu nedenle elektriksel iletkenlik söz konusu değildir. Yarı iletkenlerde ise, değerlik bandı ile iletkenlik bandı arasındaki enerji farkı, elektronların geçebileceği ölçüdedir (1–4 eV arasında). Bu enerji, görünür bölgedeki ışımının enerjisine karşı gelir bu nedenle bu tür materyaller genellikle renklidir (Blasse ve Grabmaier, 1994).



Şekil 2.3. İletken (a), yarı iletken (b) ve yalıtkan (c) maddelerde band aralığı

Molekül orbital teorisine göre bağ oluşumu sırasında iki yeni enerji düzeyi ortaya çıkar. Bunlar, iki elektronun bulunduğu bağ enerji düzeyi (bağ orbitali) ve boş olan antibağ enerji düzeyidir (antibağ orbitali). Bağ enerji düzeyindeki elektronlar, ısı veya ışık etkisiyle yeterli enerji alarak daha yüksek enerjili antibağ enerji düzeyine çıkabilirler. Daha karmaşık moleküller (birden fazla elektronu olan moleküller) arasında bağ oluşumu da aynı şekilde açıklanabilir. Moleküler her yeni atom katılmasında, molekülün elektronik yapısına yeni bir bağ ve anti bağ enerji düzeyi eklenir. Bu durum, yine Şekil 2.4'de orta büyüklükte bir molekül için gösterilmiştir. Molekül büyüklüğü arttıkça bağ orbitallerinin sayısı artar ve orbital enerji düzeyleri arasındaki fark azalır. Bir noktada birbirinden net ayrılmış enerji düzeyleri yerine sürekli görünümdeki bir enerji bandı oluşur. Bu banda, bağ bandı veya valens bandı denilir.



Şekil 2.4. Moleküler orbital diyagramı

Bağ bandı içerisinde bulunan elektronlar kolayca yerlerini değiştirerek band içerisinde hareket edebilirler. Bağ bandı oluşumuna benzer şekilde sayıları sonsuza yaklaşan antibağ orbitalleri de başka bir enerji bandı oluşturur (iletkenlik bandı). Yüksek mol kütleli polimerlerde yüzlerce, binlerce atom bulunacağı için molekül orbitallerinin sayısı oldukça fazladır. Bağ bandı ve iletkenlik bandı arasındaki aralığa band eşiği veya band aralığı denir. Bu aralığın geçilmesi için gerekli enerjiye ise band eşik enerjisi adı

verilir. Maddelerin yalıtkan, yarı iletken, iletken şeklinde elektriksel iletkenlikleri açısından gruplandırılmasında band eşik enerjisinin büyüklüğü önemlidir. İletken polimerleri iletkenlik yönünden diğer organik maddelerden ve polimerlerden ayıran en önemli özellik sahip oldukları delokalize olmuş elektronlardır. Konjuge polimerlerin moleküler orbital diyagramında enerji seviyeleri birbirinden ayrılmaz (bant oluşur) ve HOMO - LUMO seviyeleri arasındaki fark normal π sistemlerine göre daha azdır. Bunu Şekil 2.4 de ki şekil üzerinden açıklayacak olursak birer elektronu bulunan benzer iki atomun bir araya gelerek oluşturduğu bağ yapmadan önceki ve bağ yaptıktan sonraki elektron enerji düzeyleri görülmüştür.

Elektriksel iletkenlikten, iletkenlik bandında, bağ bandında veya bağ eşiğindeki yeni bir enerji düzeyinde bulunan çiftleşmemiş elektronlar sorumludur. Bu tür serbest elektronlar, sisteme uygulanan potansiyele bağlı olarak uygun yönde hareket ederler. Bağ bandı enerji düzeyleri tamamen elektronlarca dolu olduğundan elektronların bir yöne akımını sağlamak zordur. Böyle bir sistemde ısı veya ışık uyarısıyla serbest elektronlar oluşturulabilir. Yeterli enerjiye ulaşan bağ bandının en üst düzeyindeki elektronlar, band eşiğini geçerek iletkenlik bandının en alt düzeyindeki enerji seviyesine yerleşirler. Yalıtkanlarda band eşiği bu geçişe izin vermeyecek kadar geniştir. Yaygın kullanılan polimerlerin çoğu benzer davranış gösterdikleri için yalıtkanlardır. Yarı iletkenlerde band eşik uyarısı, yalıtkanlardan daha küçüktür ve iletkenlikleri 10^{-6} - 10^2 S/cm aralığında değişir. Bu düzeydeki elektriksel iletkenlik düşük gibi gözükse de, yeterli elektrik akımı sağlayacak büyüklüktedir. Ana zinciri üzerinde ardı ardına tek ve çift bağ sıraları içeren iletken polimerler yarı iletkenlik gösterebilirler.

Yarı iletken polimerlerde değerlik bandı ve iletkenlik bandı arasındaki enerji seviyesi yeterince düşük olduğunda, ısı veya ışık etkisiyle serbest elektronlar iletkenlik bandının en düşük enerji düzeyine geçebilirler. Bu elektronlar iletkenlik bandı içerisinde hareket ederek yük taşıyıcı işlevi yapar ve zincir boyunca ilerleyerek artı yüklü yöne doğru yönelir. Bu sırada bağ bandı içerisinde kalan artı yük boşluğu, polimer zinciri üzerinde elektrona ters yönde hareket eder. Elektriği bu yolla ileten maddelere intrinsik yarı iletkenler denir ve iletkenlikleri sıcaklık ya da ışık yoğunluğunun artışıyla yükselir. Serbest elektron oluşturma yollarından diğeri, dıştan yapılan bir etkiyle polimerden

elektron almak veya polimere elektron vermektir. İndirgen ya da yükseltgen özellik gösteren kimyasallar veya elektrokimyasal yöntem bu amaçla kullanılabilir.

2.2.2. İletken Polimerlerde Katkılama (Doping) İşlemi ve Elektriksel İletkenlik

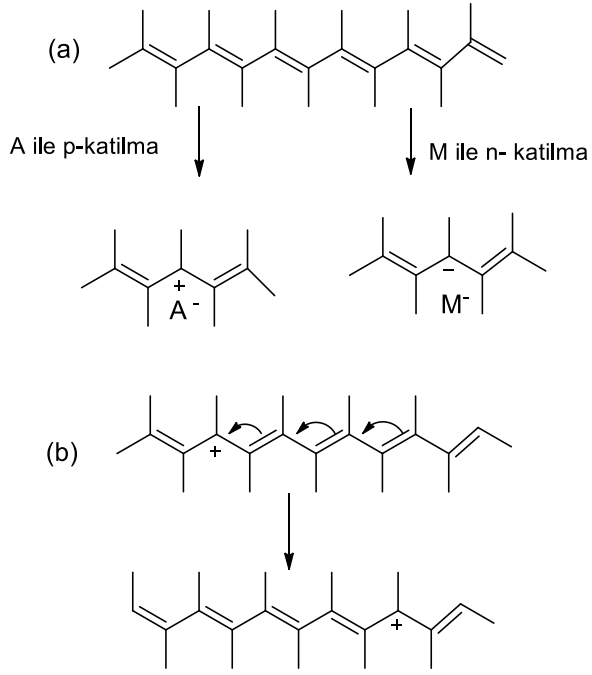
Yapılan araştırmalar poliasetilen molekülü için elektriksel iletkenliğin nasıl olurda gerçekleştiği yönünde ki soru üzerine odaklanmıştır. Bu çalışmalar neticesinde her konjugasyona sahip moleküllerin iletken özellik göstermediği sonucuna varılmıştır. Ve sonuçlara göre bu sorunun cevabının polimere uygun yöntemler kullanılarak π -sistemi boyunca kolaylıkla elektronların uzaklaştırılması veya polimer içine elektron verilmesi (katkılaması) şeklinde ifade edilmektedir. Ve bir polimerin iletkenliğini artırmak için katkılama doplama veya dop etme işlemi gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Polimerlerin iletkenliği yalıtkan veya yarı iletkenlik değerlerinden (10^{-10} - 10^{-5} S/cm), metal iletkenlik değerlerine (10^0 - 10^4 S/cm) kadar arttırılabilir. Doplama amacıyla kullanılan kimyasal maddelere dopant adı verilir. Polimer sentezinde kullanılan dopantın türü polimerin iletkenlik düzeyini etkiler. Polimere elektron verilmiş ise, bu elektronlar band bağ eşiğinde yeni bir enerji düzeyine yerleşebilir ve band eşik enerjisini düşürür. Doping yapma işlemi, iletken polimerler hazırlamak için konjuge π bağlarına sahip olan bir polimeri uygun bir reaktif ile indirgemek veya yükseltmek ile gerçekleştirilir (MacDiarmid ve Heeger 1979).

Elektronik Paramagnetik Rezonans (EPR) çalışmaları da göstermiştir ki elektronları çiftleşmiş halde bulunan hem nötral hemde ağır doplanmış (katkılanmış) iletken polimerlerin net spinleri yoktur. Fakat buna rağmen orta düzeyde katkılanmış iletken polimerlerde paramagnetik yapıda olabileceği ortaya çıkarmıştır.

Örneğin poli(asetilen) polimerinde ana zincir üzerindeki karbon atomlarına ait ve sp^2 hibritleşmesine katılmamış pz orbitallerinde bulunan elektronlarla yapılan π orbitalleri ve bunların oluşturduğu π bandı kısmi olarak doludur ve bu durumu nedeniyle metalik bir özellik gösterir. Fakat kısmi dolu π bandına sahip olmasına rağmen bir metal gibi iletkenlik gösteremez ve yalıtandır. Çünkü π bandında bulunan değerlik ve iletkenlik bantları arasındaki mesafe elektronun atlamasına izin vermeyecek kadar geniştir.

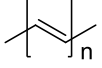
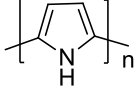
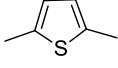
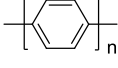
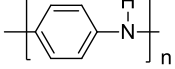
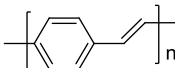
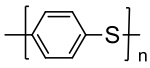
(AE(π - π^* geçişi)) bunun sonucu olarak polimerin iletkenlik karakteri metalik polimerden yarı iletken polimere dñnmektedir. Polimere ilave edilen bu kimyasal maddeler (tipleri farklı olsada p ya da n-tipi) değerlik bandı ile iletkenlik bandı arasında bulunan boşluğu doldurarak elektronların aktarılmasını sağlamaktadırlar (Randriamahazaka, 2005).

Dopantların yapısı iletken polimerlerin kararlılığında önemli rol oynar. Polimerin yapısına katılacak maddenin türü ve cinsi polimerin değerlik bandının elektronik yapısına göre değişiklik gösterir. Eğer elektronlar polimerin değerlik bandından koparak elektron eksikliği olan safsızlığa (A; akseptör) geçerse madde negatif yüklü olacaktır. Bu durumda polimer A'nin varlığında bir polikasyon gibi davranacaktır. Polimerin değerlik orbitalinde meydana gelen boşluklara (+ yük merkezlerine) yüklü anyonlar elektronlarını aktararak tüm zincir üzerinde konjügasyon tamamlanır ve elektron akışı sağlanır. Bu tip bir yükleme p-katılması olarak isimlendirilir. Eğer elektronlar safsızlıktan (D; donör) kopup polimerin değerlik bandına geçerse, polimerde negatif yüklü merkezler olacaktır. Bu durumda polimer D+'nin varlığında bir polianyon gibi davranacaktır. Polimerin değerlik orbitalinde ve polimer zinciri boyunca meydana gelen - yük merkezleri + yüklü katyonların varlığında elektronlarını tüm zincir boyunca aktararak konjügasyonu tamamlar ve bir elektron akışı sağlanır. Bu tip bir yükleme (doping) n-katılması olarak isimlendirilir Eğer poli(asetilen) I_3^- ve ClO_4^- gibi anyonlar ve Na^+ gibi katyonlarla yüklenirse iletkenlik değeri metalik değerlere yaklaşmaktadır (Epstein ve ark., 1987, McAndrew, 1997).



Şekil 2.5. a) Poli(asetilen) polimerinin değerlik bandına p ya da n-tipi katılma b) P tipi katılma durumunda elektriksel iletkenlik mekanizması

Çizelge 2.1. Dop edilmiş bazı iletken polimerlerin yapıları ve iletkenlikleri

Polimer	Tekrar Eden Birim	Doping Maddeleri	Renk	
			Doyurulmamış	Doyurulmuş
Poliasetilen (trans)		I ₂ , Br ₂ , Li, Na, AsF ₅	-	-
Polipirol		BF ₄ ⁻ , ClO ₄ ⁻ , Cl, Tosilat	Sarı-Yeşil	Mavi-siyah
Politiyofen		BF ₄ ⁻ , ClO ₄ ⁻ , Cl Tosilat, FeCl ₄	Kırmızı	Mavi
Poliparafenilen		AsF ₅ , Li, K	-	-
Polianilin		HCl, Asitler	Mavi	Yeşil
Poli (parafenilen vinilen)		AsF ₅	-	-
PoliFenilen Sülfid		AsF ₅	-	-

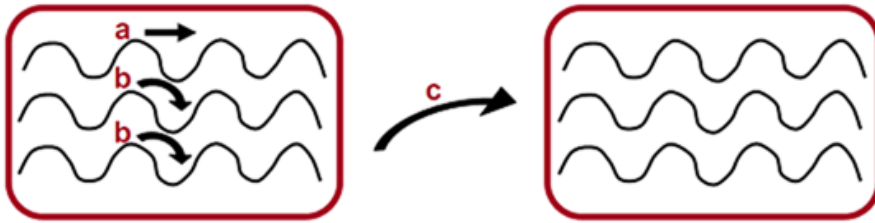
Polimerlerin kimyasal katkılaması ya AsF₃, BF₃, I₂ gibi bileşiklerin gaz halinde reaksiyonuyla ya da FeCl₃'ün sulu çözeltisinde gerçekleştirilir. İletken polimerlerde bant boşluğunu belirleyen diğer özellik molekülde bulunan donör, akseptör gruplardır. Donör akseptör tipi polimerler düşük bant boşluğuna sahiptirler. Polimerde bulunan donör molekülün HOMO enerji düzeyinin yüksek olması istenirken akseptörün LUMO enerji düzeyinin düşük olması istenir. Polimerlerde donör akseptörün birlikte olduğu durumlarda HOMO enerji düzeyi donörün HOMO enerji düzeyine ve LUMO enerji düzeyi de akseptörün LUMO düzeyine yakın olmalıdır. Molekülde güçlü donör güçlü akseptörün bulunması halinde bant boşluğu daha düşük olan konjüge polimerler elde edilir. Bu tür polimerler elektrokromik malzemeler, OLED ve fotovoltaik gibi cihazlarda kullanılırlar (Malinauskas, 2001).

2.2.3. İletken Polimerlerde Atlama (Hopping) Olayı

İletken polimerlerin iletkenlik mekanizmasının açıklanmasının zaman almasının en önemli sebebi katkılama esasına pozitif yük taşıyıcıların hareketliliğidir. Bu yük taşıyıcıların (elektron aktarımı) hareketi polimer zinciri boyunca zincir içinde taşınma ya da bir zincirden diğer zincire sıçrama yoluyla yapılabilir. Ve bu farklı polimer zincirleri arasındaki elektron aktarımı hopping mekanizmasıyla açıklanır. Bu durum farklı polimer zincirlerin birbirine olan yakınlığına bağlıdır. Yani iletkenlik sadece aynı polimer zincir içinde konjugasyon boyunca elektronların aktarımı şeklinde değil aynı zamanda yük taşınmasıyla da gerçekleştirilmektedir. Bir nötral soliton kendisinin bulunduğu polimer zincirine yakın bir zincirdeki yüklü solitonla etkileşir ve solitonun elektronu, etkileştiği zincirdeki kusurlu yere atlar (Wang ve ark., 1992).

Polimer zincirinde elektronik yükün hareketi temelde üç tiptir

- ✓ Kristal bir yapıda zincir üzerinde
- ✓ Kristal bir yapıda zincirden zincir
- ✓ Amorf bir bölgede zincirden zincire



Şekil 2.6. a) Zincir üzerinde yükün taşınması, b) Zincirler arasında yükün taşınması, c) Partiküller arasında yükün taşınması

2.3. İletken Polimer Sentez Yöntemleri

İletken polimerlerin sentezi de polimerlerin sentezi gibi başlama, büyüme ve sonlanma basamaklarını içermektedir. Başlama basamağı, monomerin yükseltgenmesi sonucunda radikal katyonun oluşmasını, büyüme basamağı, monomer katyonlarının çiftlenme reaksiyonu ile zincir ve zincir üzerindeki reaktif merkezlerde de zincir büyümesi ile gerçekleşmektedir. Sonlanma reaksiyonu ise monomer radikallerinin ve zincirler üzerindeki aktif merkezlerinin çiftleşmesi ile gerçekleşir.

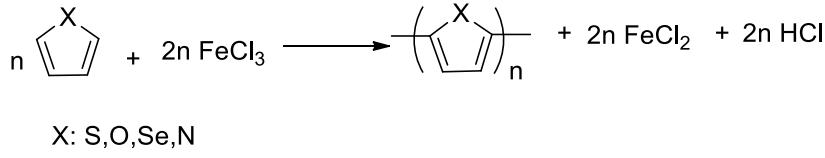
İletken polimerler sentezlenirken π -elektron konjugasyonunun artırılması, çözünürlüğünün iyi olması, hem iletken hem de iletken olmayan durumlarda kararlı olması, sentez kolaylığı, yüksek verimli olması ve polimer zincirinin uzunluğu gibi parametreler göz önünde bulundurulur. Bunun için iletken polimerlerin sentezi için en fazla elektrokimyasal ve kimyasal polimerizasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Diğer taraftan piroliz ve katalitik polimerizasyon gibi yöntemlerde kullanılmaktadır (Kumar ve Sharma 1998).

İletken polimerlerin sentezinde, başlangıçta kullanılan monomerler sonuçta oluşan polimerin yapısında, korunabilen tipik aromatik veya çoklu konjuge bağ yapısına sahiptirler. Örneğin asetilenin polimerizasyonu sonucu konjuge etilen birimleri içeren polietilen oluşmaktadır. Benzenin polimerizasyonunda ise birbirine kovalent bağlı aromatik zincirli poli(p-fenilen) oluşur. Bu şekilde elde edilen iletken polimerlerin yapısında π konjugasyonunun uzatılması çok önemlidir.

2.3.1. Kimyasal Polimerizasyon

Kimyasal polimerizasyon yöntemi ile iletken polimer sentezinde, monomer uygun çözücüde çözülerek, katalizör eşliğinde, bir yükseltgeme veya indirgeme aracı (genellikle bir asit, baz veya tuz) kullanılarak polimerleştirilir. Kimyasal polimerizasyon yönteminin çok miktarda ve düşük maliyetle ürün elde etmek gibi avantajlarının yanında yükseltgenme basamağının kontrol edilememesi yada elde edilen ürünün safsızlıklar içermesi gibi dezavantajları da bulunmaktadır. Bunun yanında kuvvetli yükseltgenler kullanılırsa da polimerler aşırı yükseltgeneceği için parçalanabilir.

Kimyasal yöntemde, kullanılacak olan doping maddesi ve katalizörün elde edilecek iletken polimerin elektriksel iletkenliği üzerinde önemli etkisi bulunmaktadır.



Şekil 2.7. Kimyasal polimerizasyon (Teasdale ve ark., 2003)

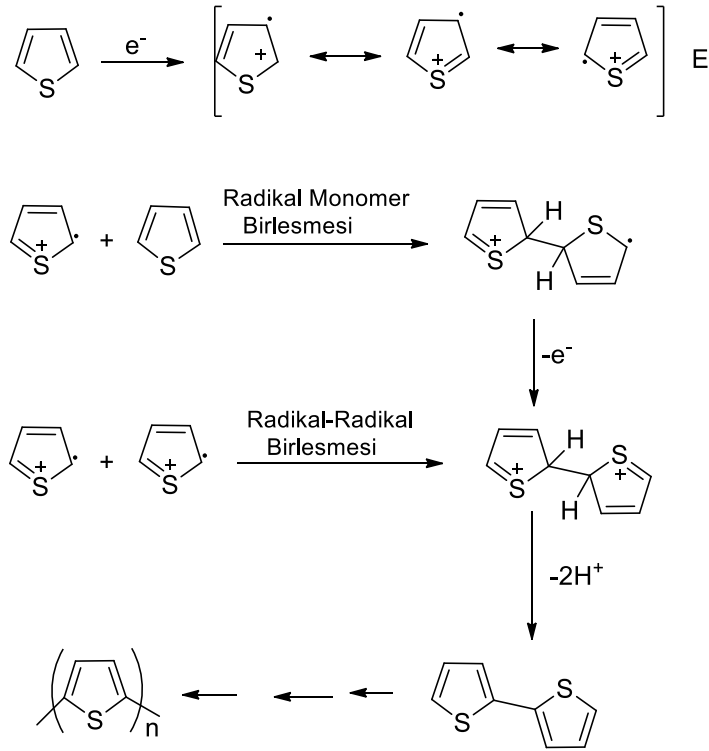
2.3.2. Elektrokimyasal Polimerizasyon

Elektrokimyasal polimerizasyonda monomer ve elektrolit içeren çözeltide, dönüşümlü voltametri (C.V) tekniği ile genellikle çalışma elektrotu, karşıt elektrot ve referans elektrottan oluşan üç elektrotlu sistem kullanarak gerçekleştirilmektedir. Uygun potansiyel aralığı uygulanarak ya da uygun bir sabit potansiyel uygulanarak çalışma elektrodu üzerinde (Pt, Au, ITO kaplı cam elektrot, vs gibi) polimer filmi oluşturulmaktadır.

Elektrokimyasal yöntemle başlatılmış katılma polimerleşmesinde, aktif türlerden biri kation, anyon ya da serbest radikal vermek üzere elektrot yüzeyinde reaksiyona girer. Elektrot yüzeyinde başlatılan polimerleşme reaksiyonu, çözelti içerisinde devam eder ve genellikle elektrot yüzeyi yalıtkan bir polimer tabakası çökeltisiyle kaplanarak, reaksiyon duruncaya kadar polimerleşme devam eder. Ancak, çözelti içinde meydana gelen polimerlerin, elektrot yüzeyi tamamen kaplanıncaya kadar çözelti içine dağılmadığı kabul edilir (Rocali,1999).

Anodik aktif aromatik monomerlerden pirol ve tiyofenin polimerleştirilmesinde, monomer kation radikale yükseltgenmektedir. Meydana gelen rezonans yapı, radikalın kararlılığını artırır. Monomer radikalleri, dimeri oluşturur, oluşan dimerin yükseltgenme potansiyeli monomerinkine göre daha düşük olduğundan dimer büyür, sürekli katılmalarla pasifleşme olmadan polimerleşme meydana gelir. Bu polimerler elektrot

üzerine birikir. Diğer polimerleşme türlerinden farklı olarak polimerin mol kütlesi elektrot üzerinde birikme ile belirlenmez.



Şekil 2.8. Tiyofenin elektropolimerizasyon mekanizması

Genellikle, iletken polimerlerin elektrokimyasal sentezi, potansiyostatik ve galvanostatik elektrolizlerle gerçekleştirilebilir. Sabit akım elektrolizi (CCE/Galvanostatik), akımın kontrol edildiği elektroliz yöntemidir. Sabit potansiyel elektrolizi (CPE/Potansiyostatik), potansiyel sabitken akım değişimine izin verir. İletken polimerler biyolojik türler için uygun bir immobilizasyon ortamı olarak kullanılırlar. 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 kullanılabilir. Medyatörler iletken polimerlerin yapısında yer aldığı anda amperometrik sensörlerin cevabı ve hassasiyeti üzerinde önemli işlevler üstlenir. Medyatörlerin etkisiyle hızlı elektron transferi sayesinde biyosensör üretiminde kullanılan ince polimerik filmlerin duyarlılığında önemli iyileşmeler olmaktadır (Mao ve ark., 2003; Xue ve ark., 2005).

2.3.3. Piroliz

Piroliz, iletken organik materyaller elde etmek için bilinen en eski yöntemdir. Bu yöntemde uzun bir aromatik yapı oluşturmak için ısıtma ile polimerden heteroatomlar (halojenler, oksijen ve azot gibi) ayrılmaktadır. Bu yöntemle ısıtma ile polimerden halojen, oksijen ve azot gibi heteroatomlar uzaklaştırılır bu yöntemle birlikte uzun zincirli aromatik yapı oluşturulur. Isısal uyarma ile oluşan radikaller konjuge yapıda sürekli olarak bulunurlar. Bu aşamada karbon atomları üzerinde yapıda ki küçük değişiklikler polimer zinciri boyunca devam eder. Polimer pirolizinin ürünü, başlangıç polimerinin yapısı ve piroliz şartlarına bağlı olarak toz, film veya lif halinde olabilmektedir (Mac Diarmid ve ark., 1987).

2.3.4. Kondenzasyon Polimerizasyonu

Kondenzasyon polimerleri, küçük bir molekülün çıkması ile benzer veya farklı yapıdaki monomerlerin reaksiyona girmesi sonucu elde edilir. Bu tür polimerlere kondenzasyon polimerizasyonu (basamaklı polimerizasyonda) denir. Burada en önemli ön koşul; OH⁻, NH₃, CO₃⁼ v.b. gibi küçük moleküller çıkarak, kondenzasyon polimerlerini oluşturmaktır. Örneğin dikarboksilli asitlerle glikollerden poliesterlerin, dikarboksilli asitlerle diaminlerden poliamidlerin oluşmasında yan ürün olarak su açığa çıkar. Bu tip polimerizasyonda polimer zincirinin tekrar eden biriminin molekül formülü, polimerin oluşumunda yer alan monomerde bulunan atomlardan yoksundur. İletken polimerlere örnek olarak verilen poliparafenilen (PPP) kondenzasyon polimerizasyonu ile sentezlenmiştir. Elde edilen PPP'nin iletkenlik değeri 10⁻⁴ S/cm olarak ölçülmüştür. Bu

değer I_2 , AsF_5 , $SbCl_6$, IF_5 , SO_3F gibi uygun dopantlar ile 10^2 S/cm arttırılmıştır (Shackette ve ark., 1981; Toptaş, 2006).

2.3.5. Emülsiyon Polimerizasyonu

Emülsiyon polimerizasyonun da birbiri ile karışmayan iki faz söz konusudur. Monomer fazı dağıtıcı faz içinde emülsiyon halinde dağıtılmıştır. Çeşitli emülsiyon yapıcı maddeler kullanılarak monomer fazı dağıtma fazı içinde emülsiyon halde kararlı olarak tutulur. Emülsiyon polimerizasyonun da, emülsiyon ortamı olarak genellikle su kullanılır. Monomer emülsiyon yapıcı bir madde yardımı ile bu ortamda dağıtılır. Polimerizasyon başlatıcısı suda çözünen bir maddedir ve serbest radikalleri üretir. Emülsiyon yapıcı aktif bir madde olup, hidrofil ve hidrofob gruplar içerir. Monomerin az bir kısmı misellerin içine girer, büyük bir kısmı ise monomer damlaları halinde dağılır. Polimerizasyon bir serbest radikalın misel içinde difüzyonu ile başlar ve misel aktiftenmiş olur. Damlacıklardan difüzyon yoluyla geçen monomer, polimer taneciklerini sürekli olarak besler. Polimer tanecikleri büyürken monomer damlacıkları küçülür. Polimerleşme %50-80 ilerlediğinde monomer damlacıkları tükenir. Geri kalan monomerlerin tümü polimer tanecikleri içinde bulunur. Genellikle %100 polimerleşmeye erişilir. Emülsiyon polimerizasyonu yöntemi ile de iletken polimerler sentezlemek mümkündür (Österholm ve ark., 1994).

Bu yöntemde monomer, apolar veya zayıf polar bir çözücü ve asidik bir tuz, emülsiyon oluşturan dedosilbensülfonik asit (DBSA) gibi bir yüzey aktif madde ile eş zamanlı olarak karıştırılmakta, belli sıcaklık ve süre sonunda viskoz bir emülsiyon oluşmaktadır. Bu emülsiyon da çöktürülerek saflaştırılmakta ve böylece iletken olabilen polimerler elde edilmektedir.

2.3.6. Gaz Fazı Yöntemi Polimerizasyonu

Gaz fazı polimerizasyonunda, polimerizasyon reaksiyonları genellikle fotokimyasal olarak monomer buharında başlatılır. Yüksek mol kütleli polimer uçucu olmadığından büyümekte olan polimer tanecikleri bir sis oluşturur. Monomer molekülleri, gaz fazından büyümekte olan tanecik içine difüzenir. Bu yöntemle, genellikle yalıtkan bir polimer matriksi ve bir yükseltgen madde karışımına belli bir sıcaklıkta maruz bırakılan monomer, buhar fazında polimerleştirilerek çöktürülmekte ve bu şekilde iletken polimer veya kompozitler hazırlanmaktadır.

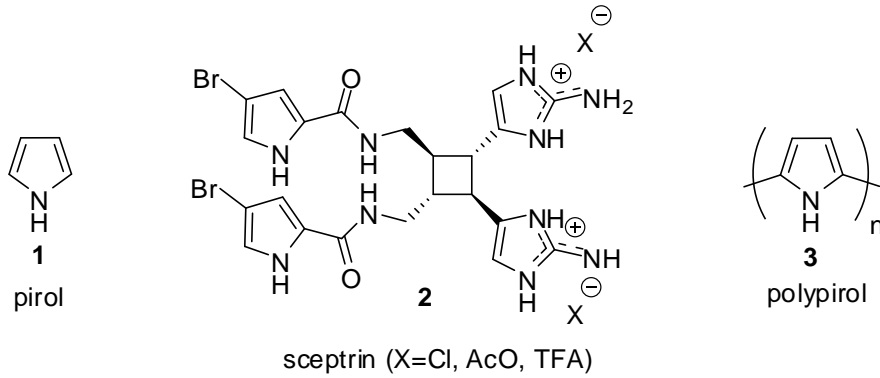
2.3.7. Ara-Yüzey Polimerizasyonu

Bu yöntemde, iki fazlı bir sistemin ara yüzeyinde iletken polimer sentezlenmektedir. Bir tuzun sulu çözeltisi ve bir asit çözeltisinin karışımından oluşan polar bir faz ile monomer ve benzen, toluen gibi çözücülerin karıştırılmasıyla oluşan apolar bir faz arasındaki ara yüzeyde iletken polimer sentezlenmektedir (Genies ve ark., 1990).

2.4. Piyol ve Türevleri

Piyoller, çoğu doğal ürünlerin özünü oluşturduğundan dolayı heterosiklik kimyada piyollerin sentezinin önemli bir yeri vardır. Çeşitli alkilpiyol türevlerinin çok iyi bir derecede biyolojik aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Bundan dolayı piyollerin sentezi amacıyla kullanışlı birçok metot olmasına rağmen bu metotların birçoğu çok fazla sentetik basamak içerdiklerinden dolayı sonuçta oluşan piyol türevlerinin verimleri yeteri kadar yüksek olmamaktadır. Bundan dolayı piyol türevlerinin sentezi için yapılan çalışmalar halen yapılmaya devam etmektedir (Sundberg, 1984; Toyota ve Ihara, 1988; Leonid ve Belen, 1994; Saxton, 1997).

Sceptrin, yapısında piyol halkası içeren, antihistamik, antibakteriyal aktiviteye sahip, samotostatin inhibitörü ve alzhemir hastalığı tedavisinde kullanılan doğal bir piyol alkoloittir (Keifer ve ark., 1991; Rosa ve ark., 1992; Vassas ve ark., 1996; Cefieri ve ark., 1997; Baran ve ark., 2004).



Şekil 2.9. Piyol, Sceptrin ve Polypiyol Yapıları

Polipirol (PPy), yapısında birbirine bağı çok sayıda pirol halkası içeren ve endüstriyel uygulamalar için umut vaat eden iletken polimerler bileşimidir. Çevresel kararlılığı, çözünürlük özellikleri ve iletkenliğinin yüksek olmasından dolayı ilgi çekmektedir (Zhang ve ark., 2010; Li ve ark., 2011).

Polipirolün fiziksel, kimyasal ve yüksek iletkenliğinden dolayı elektroorganik aygıtlarda (Ginness ve Corry, 1974), süperkapasitör (Shinde ve ark., 2014; Zhang ve ark., 2014), elektrokromizm (Coelho ve ark., 2014), güneş hücreleri (Sookhakian ve ark., 2014), fotokataliz (Zhang ve ark., 2012; Duan ve ark., 2013) gibi çok farklı uygulamalarda geniş bir şekilde kullanılmaktadır.

Ayrıca polipirolün sahip olduğu konjugasyon yapısı ve yüksek iletkenliği sayesinde fotokataliz reaksiyon sırasında elektron transferine yardımcı olabileceği de belirtilmiştir (Wang ve ark., 2012).

Polipirol biyosensör alanında en fazla kullanılan polimerdir. Bunun başlıca sebepleri

- ✓ Biyouyumlu olması
- ✓ Kimyasal ve çevresel kararlılığa sahip olması
- ✓ Yüksek iletkenliğe sahip olması
- ✓ Enzimin biyokatalitik katmandan ayrılmasını engellemesi
- ✓ Film kalınlığının kontrol edilebilmesi
- ✓ Kolaylıkla polimerleşmesi sayılabilir

Polipirol (Ppy) hem kimyasal (Kang ve ark., 2000; Ferenets ve ark., 2007; Joshi ve ark., 2011) hem de elektrokimyasal yöntemlerle kolaylıkla sentezlenebilmektedir (Lu ve ark., 2006; Moreno ve ark., 2008; Ding ve ark., 2012).

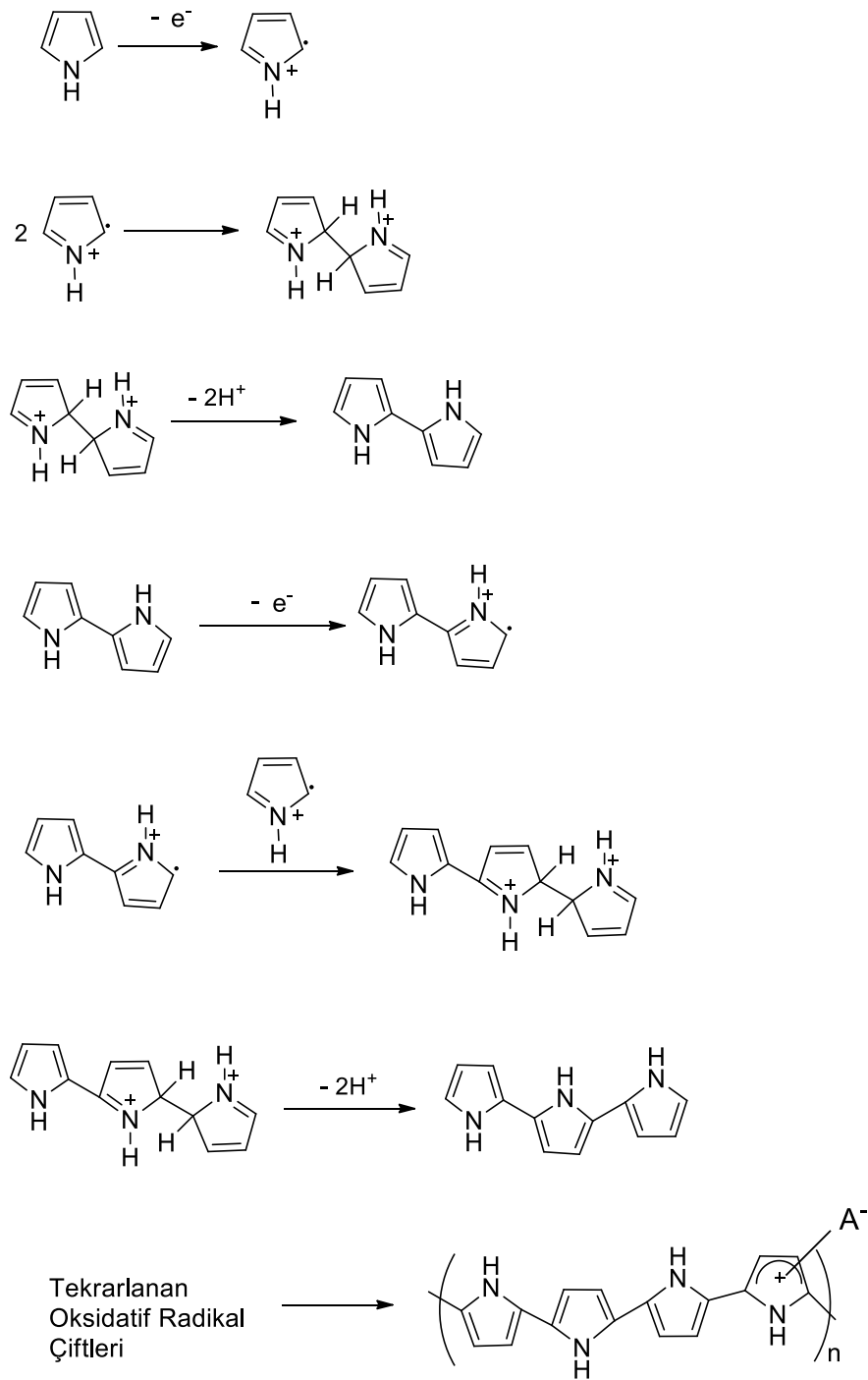
Biswass ve arkadaşları polipirolü amonyum peroksidisülfat (APS) ile kimyasal yükseltgenme polimerleşmesi yöntemiyle toluen ortamında sentezlemişlerdir (Biswass ve ark., 2013).

Başka bir çalışmada ise polipirol kimyasal polimerleşme yöntemiyle poli(stiren-kometakrilat asit) kabuk çekirdek yapısında $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ yükseltgeyici olarak saf su ortamında sentezlenmiştir. Sentezlenen yapının spektroskopik ve morfolojik

karakterizasyonunun yanı sıra elektriksel iletkenliği de ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir (Carrillo ve ark., 2013).

Fakat bunlar arasında en çok kullanılan elektrokimyasal polimerleşme yöntemidir. Bu alandaki araştırmalar genellikle protik ve aprotik çözücü ortamında, asetonitiril, propilen karbonat v.b. gibi çözücülerde, elektrokimyasal olarak gerçekleştirilmiştir (Takakubo, 1987).

Elektrokimyasal olarak ilerleyen polimerleşme reaksiyonunda destek elektrolit çözetisinde ki monomerin anot yüzeyinde yükseltgenmesiyle meydana gelir. Uygulanan potansiyelle birlikte yükseltgenen monomer genellikle radikal katyon oluşturur ve yeni monomer katılmasını takip eden elektron aktarımları sonucunda yüzeyde artı yüklü polimer zincirleri oluşur. Çözeltideki elektrolit olarak bulunan ClO_4^- , BF_4^- gibi anyonları da artı yüklü polimerlerde dopant olarak yer alır ve nötrleşmeyi sağlarlar. Yükseltgenmiş hale gelen polimer iletken özellik göstermektedir ve elektrolizle indirgenince nötrleşir ve anyonlar çözeltiye geçer, indirgenmiş polimer iletkenliğini kaybeder.



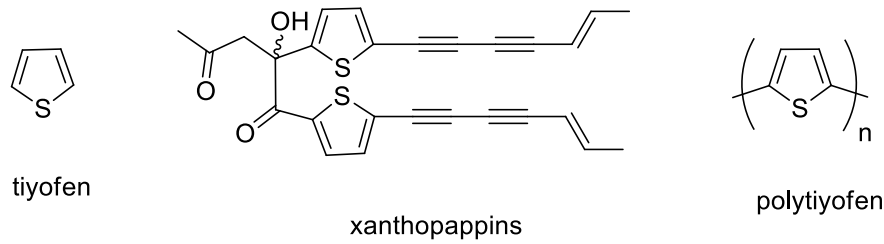
Şekil 2.10. Piriolün elektrokimyasal polimerizasyon mekanizması

2.5. Tiyofen ve Türevleri

Tiyofen, yapısında kükürt atomu içeren beş üyeli aromatik heterosiklik bir bileşiktir. Tiyofen halkası çok sayıda doğal ve sentetik bileşiğin yapısını bulduğundan dolayı türevlerinin sentezi çok yaygın çalışılan bir konudur (Downum ve Wen, 1995).

Xanthopappins, yapısında tiyofen halkası içeren bu bileşiklerin ışık Emilimi, fototoksik ve böcek öldürücü etkileri vardır (Downum, 1986).

Politiyofen (PTs), tiyofenin polimerizasyonu sonucu birbirine bağlı çok sayıda tiyofen halkası içeren bileşiklerdir. Politiyofen, günümüzde sensörler, batayalar, optik cihazlar, güneş pilleri, alan etkili transistörlerde uygulama alanı bulan önemli bir sınıfını oluşturmaktadır (Gariner, 1996; Katz, 1997; San ve ark., 2007).



Şekil 2.11. Tiyofen, Xanthopappins ve Politiyofen yapıları

Literatürde tiyofenin polimerleşmesinde üç yöntem daha sık kullanılmıştır:

- ✓ Elektropolimerleşme
- ✓ Çifte bozunma polimerleşmesi
- ✓ Kimyasal polimerleşme (Ruo ve Zheng, 2009).

Yapılan bir çalışmada 2,5-dibromtiyofenin $NiCl_2$ katalizörlüğünde polikondenzasyonu Yamamoto ve ark. tarafından (1980) gerçekleştirilmiştir Benzer sonuçlar Ni, Pd, Co ve Fe katalitik sistemlerinde de bulunmuştur (Lin ve Dudek, 1980).

1983'te elektropolimerleşme yöntemi ile yüksek iletkenlik gösteren Politiyofen (PTs) filmleri hazırlanmıştır ama bunlar nadiren elektrolüminesans materyallerin hazırlanmasında kullanılmıştır (Waltman ve ark., 1983).

1984'te tiyofenin kloroform içinde FeCl_3 ile polimerleşmesi gerçekleştirilmiştir (Yoshino ve ark., 1984).

Yapılan bir çalışmada Politiyofen (PTs) ve polifuranın (PF), asetilen siyahı ile kimyasal yükseltgenme yoluyla iletken kompozitleri hazırlanmıştır. Tiyofen ve furanın asetilen siyahı ile süspansiyonu CHCl_3 ortamında ve susuz FeCl_3 tuzu kullanılarak oda sıcaklığında polimerleşmesi gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen kompozitlerin iletkenlikleri 10^{-2} S/cm ile 10^{-3} S/cm aralığında bulunmuştur (Ballav ve Biswas, 2005).

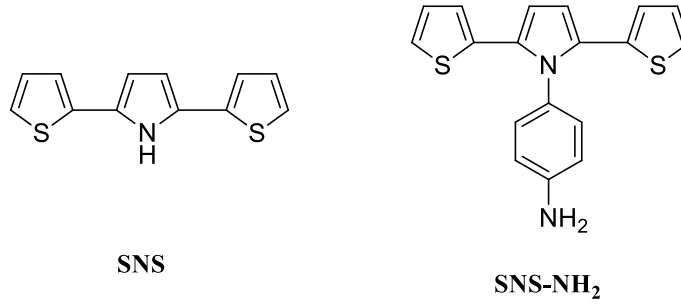
Tiyofen monomeri ile sentezlenen bu politiyofenler (PTs) yüksek iletkenlik ve ısıl kararlılık gösterebilirler de, genel organik çözücülerde çözünmemektedirler. Bu amaçla tiyofen yerine tiyofen türevleri kullanılarak çözünebilir ve işlenebilir homopolimer ve kompozitler sentezlenmiştir. 3-metil-4-feniltiyofen iletken polimeri kimyasal ve elektrokimyasal polimerleşme yöntemiyle sentezlenmiştir (Pokhodenko ve ark., 1993).

Poli(3-metiltiyofen)-kauçuk iletken kompoziti emülsiyon yoluyla sentezlenmiştir. Polimerleşme gerçekleşikten sonra polimer metanol çözeltisinde çökeltilmiştir. İletkenlik 1,3 S/cm gibi yüksek bir değer bulunmuş ve iyi mekanik özellikler göstermiştir (Sun ve Ruckenstein, 1995).

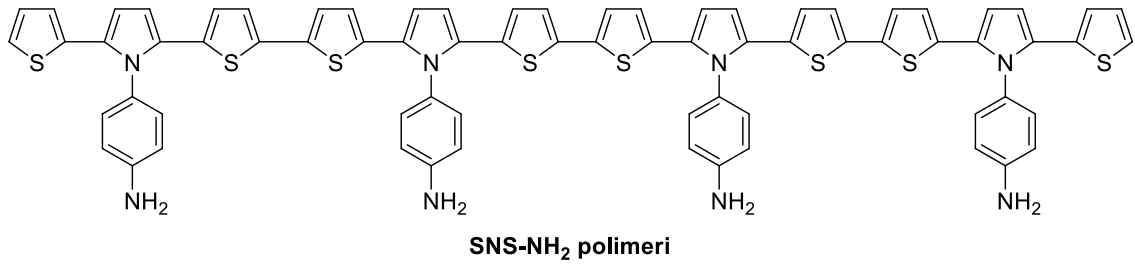
2.5.1. 2,5-ditiyofenil-pirol (SNS)

Şekil 2.12'te gösterildiği gibi 2,5-ditiyofenil-pirol (SNS), pirol halkasına 2 ve 5 pozisyonlarından iki tane tiyofen bağlı yapılardır. Bu bileşikler pirol halkasının $-\text{NH}$ grubunun kolaylıkla fonksiyoneleştirilebilmesinden dolayı pek çok analogu sentezlenmiştir. π -konjuge sistemleri ve kolaylıkla polimerleştirilebilmesinden dolayı bu bileşiklerin sentez, elektrokimyasal ve optik özellikleri araştırmacıların ilgisini çekmektedir (Yıldız ve ark., 2008). $-\text{NH}$ grubu benzamin ile fonksiyonelleştirilmiş (SNS- NH_2) (Şekil 2.12), monomerlerin en son uygulamalarından biriside elektrot yüzeyinde polimerleştirilip (Şekil 2.13), $-\text{NH}_2$ gruplarına da enzim ile kovalent

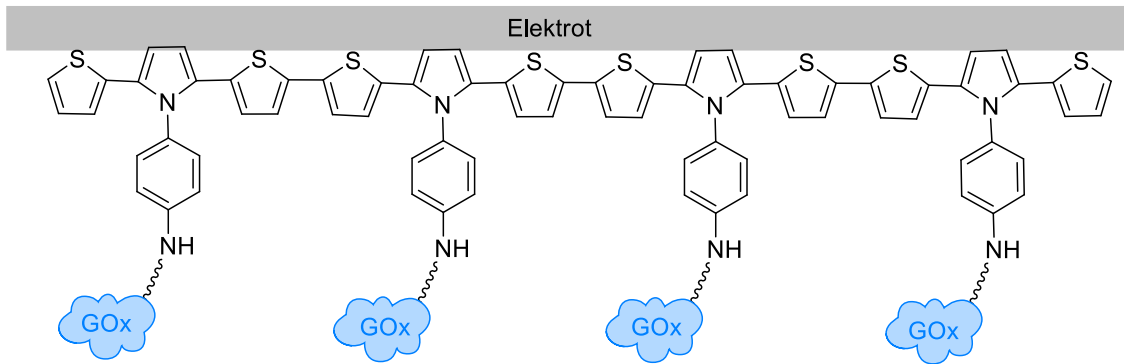
bağlanması sonucu biyosensör uygulaması yapılmıştır (Şekil 2.14) (Röckel ve ark., 1994).



Şekil 2.12. 2,5-ditiyofenil-pirol (SNS) ve SNS-NH₂ yapıları



Şekil 2.13. Anilin ile fonksiyonelleştirmiş Ditiyofenil-pirol polimerik yapısı

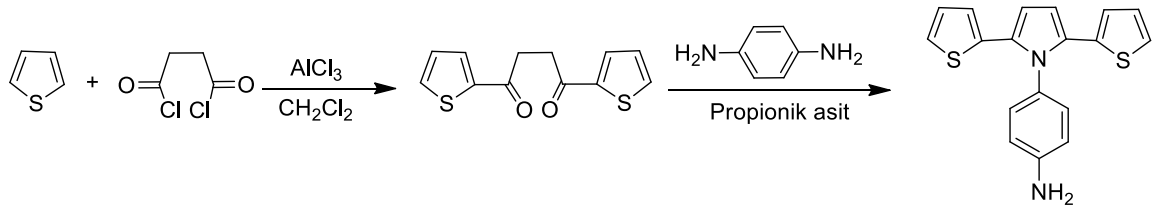


Şekil 2.14. (SNS-NH₂) polimerinin glukoz oksidaz ile kovalent bağlanması şematik gösterimi

2.5.2. 2,5-ditiyofenil-pirol (SNS) Sentez ve Yöntemleri

Ditiyofenil-pirolbenzamino Sentez Yöntemi

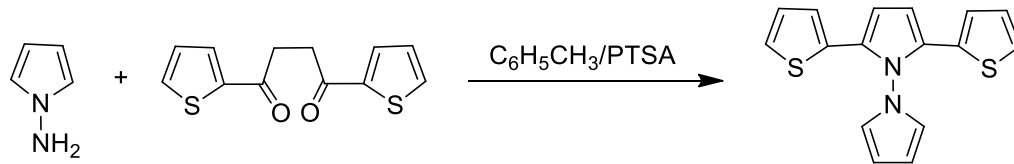
Konjuge- π sistemine sahip bileşikler, iletken polimerlerin, nanoteknolojik alanda kullanılan malzemelerin ve biyoteknolojik alanda uygulama sahası bulmaktadır. Toppare ve grubu 2,5-ditiyofenil-pirolbenzamino (SNS-Aril-NH₂) yapısında monomer sentezleyerek spektroeletrokimyasal, elektrokromik aygıt özelliklerini incelemiştir (Yıldız, 2008).



Şekil 2.15. Ditiyofenil-pirolbenzamino sentez yöntemi

Ditiyofenil-pirol Sentez Yöntemi

Demir ve grubu 2,5-ditiyofenil-pirol molekülünün N-pirol analogunu sentezleyerek floresans ve elektrokromik özelliklerini incelemiştir (Cihaner, 2008).

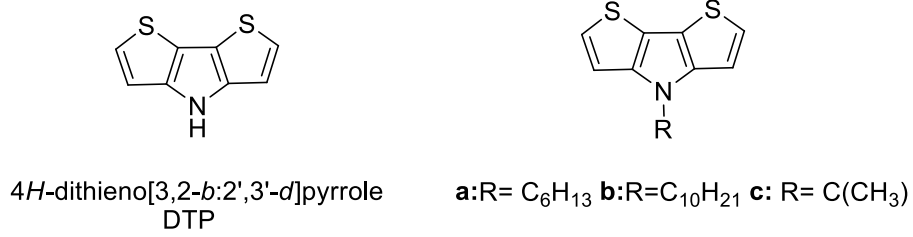


Şekil 2.16. Ditiyofenil-pirol sentez yöntemi

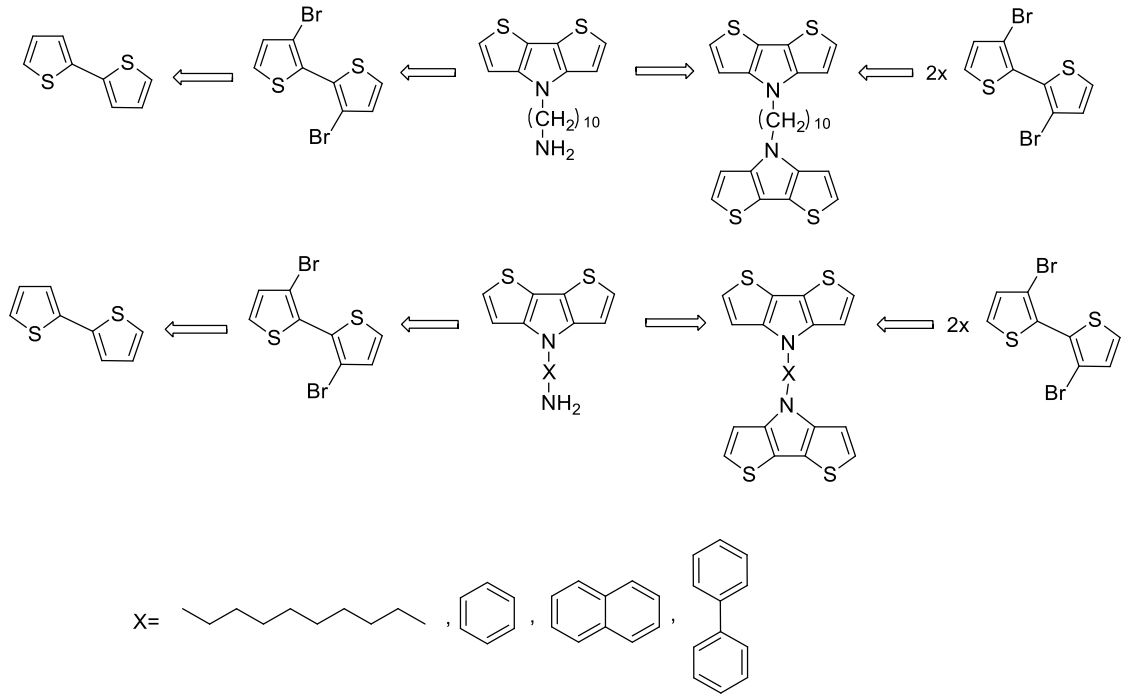
2.6. Dithionepirol ve Özellikleri

Ditiyolpirol (DTP), pirol halkasına kaynaşmış iki tiyofen halkasından oluşan bitişik halka sistemlerini tanımlamak için kullanılan bir terimdir. π -Konjuge sistemlere sahip bileşikler optik, elektronik, fotovoltik aletlerde uygulamaları, ışık yayan diyotlar, sensör alan etkili transistör özelliklerinden araştırmacıların ilgisini çekmektedir (Kossmehl ve ark., 1999; Gong ve ark., 2002; Zhang, 2007; Liu ve ark., 2007; Güneş ve ark., 2007; Shirota ve Kageyama, 2007; Soci ve ark., 2007).

Son yıllarda oligo ve poly ditiyolpiroller, düzlemsel yapısı, yeni bir yapıda konjuge π sistemi ve halka sistemindeki (DTP) N-H bağının alkil gruplarıyla kolay fonksiyonelleştirile bilmesinden dolayı N-alkil DTP bileşikleri nanoteknoloji, organik sentez kimyası ve polimer kimyası alanından pek çok araştırmacının çalışma konusu olmuştur (Ogawa ve Rasmussen, 2007) .



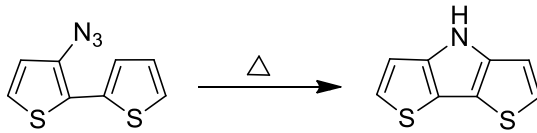
Şekil 2.17. Ditiyolpirol ve N-Alkil-Ditiyolpirol yapısı



Şekil 2.18. Ditiyolpirol (DTP) türevlerinden elde edilebilen bileşikler

Ditiyolpirol Bileşiğinin Termal Sentez Yöntemi

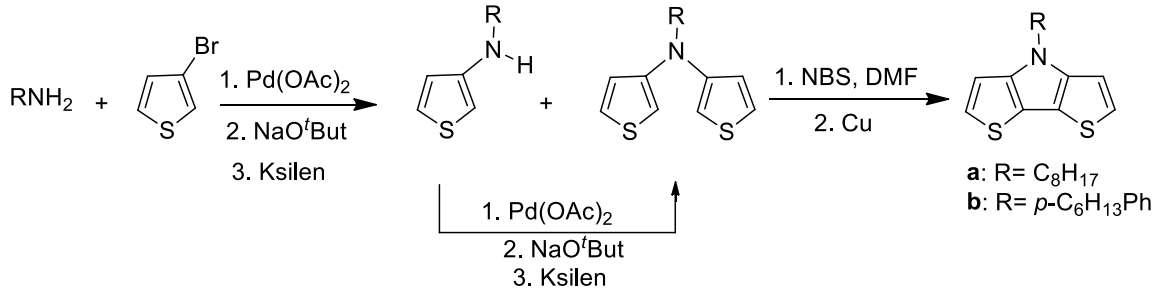
Zanardi ve grubu o-azidobitiyofen bileşiğinin termal olarak düzenlenmesi ile DTP bileşiğinin ilk sentezini gerçekleştirmişlerdir (Zanirato, 1983).



Şekil 2.19. Ditiyolpirol bileşiğinin ilk sentez yöntemi

N-Alkil-Ditiyolpirol Bileşiğinin İlk Sentez Yöntemi

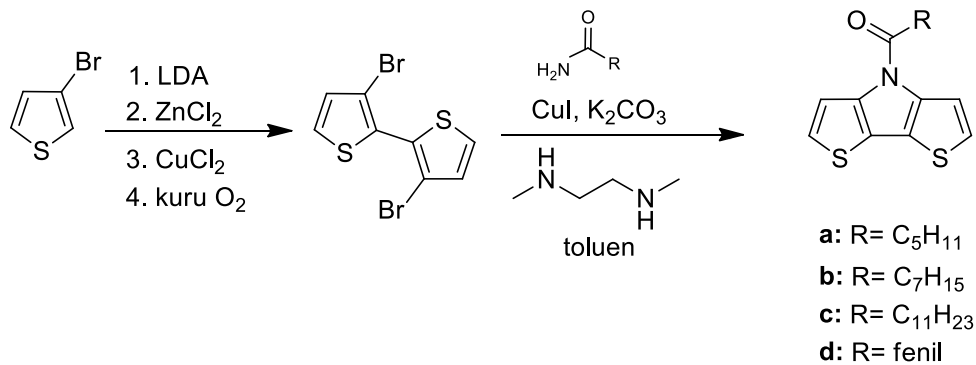
Ramussen ve Ogawa yaptıkları çalışmada N-alkil sübtitüe DTP bileşiklerinin sentezini gerçekleştirmişlerdir. Sentezledikleri bileşiklerin X-ray analizinde son derece düzlemsel konjuge- π sistemi görmüşlerdir. Bundan dolayı elektrokimyasal ve fotofiziksel özelliklerini incelemişlerdir. Bu çalışmadan sonra DTP bileşiği son yıllarda araştırmacıların ilgisini çeken bir molekül olmuştur (Ogawa ve Rasmussen, 2003).



Şekil 2.20. N-alkil sübtitüe DTP bileşikleri sentezi

N-Asetil Ditiyolpirol Bileşiğinin Sentez Yöntemi

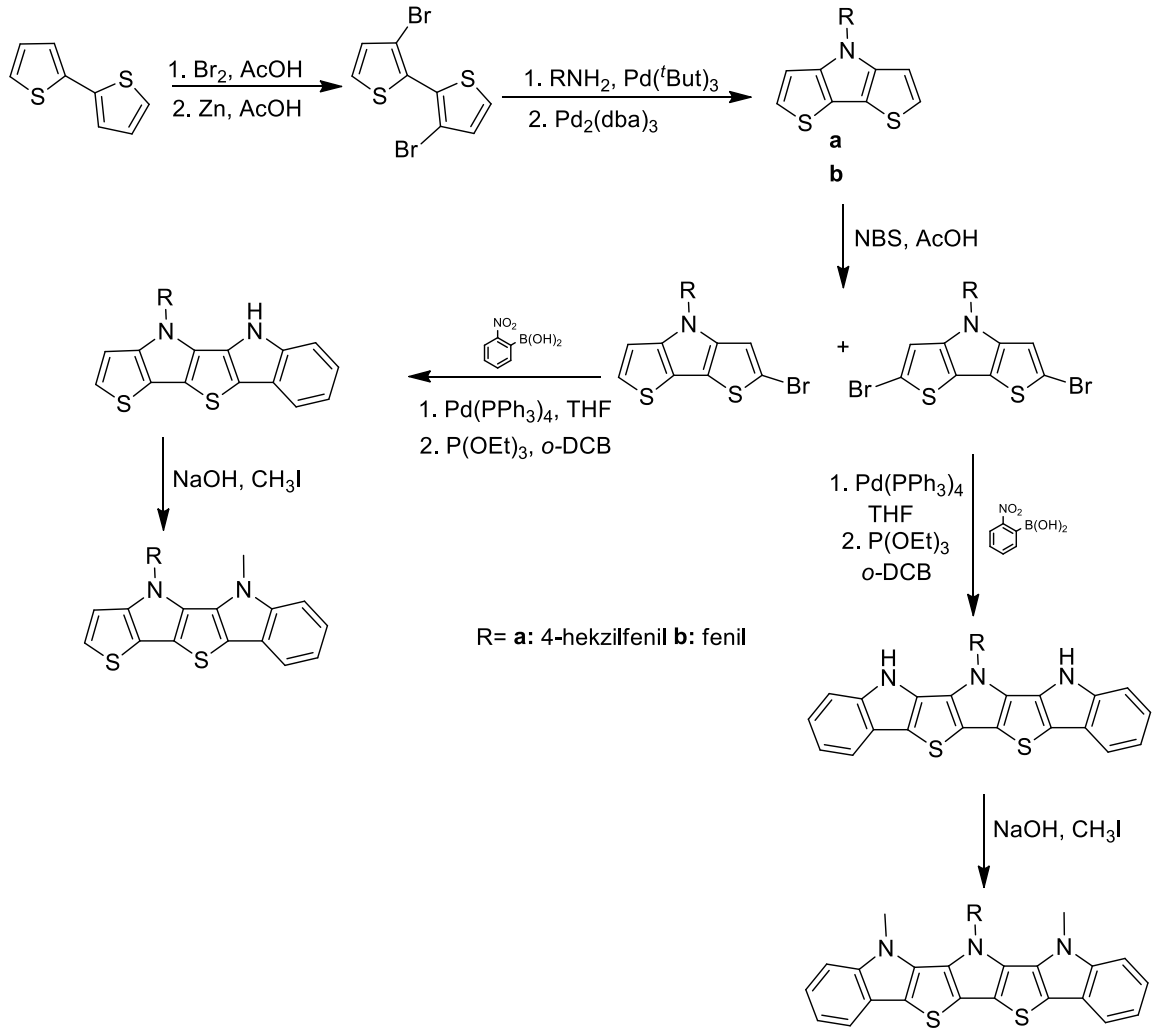
Rasmussen ve Evenson 3-bromotiyofen molekülünden çıkarak N-asetil grubu içeren ikinci nesil DTP molekülleri sentezleyerek elektrokimyasal ve fotofiziksel özelliklerini incelemişlerdir (Evenson ve Rasmussen, 2010).



Şekil 2.21. N-Asetil Ditiyolpirol bileşiğinin sentezi

İndoletitiyofenpirol ve Diindoletiyofenpirol Bileşiklerinin Sentez Yöntemi

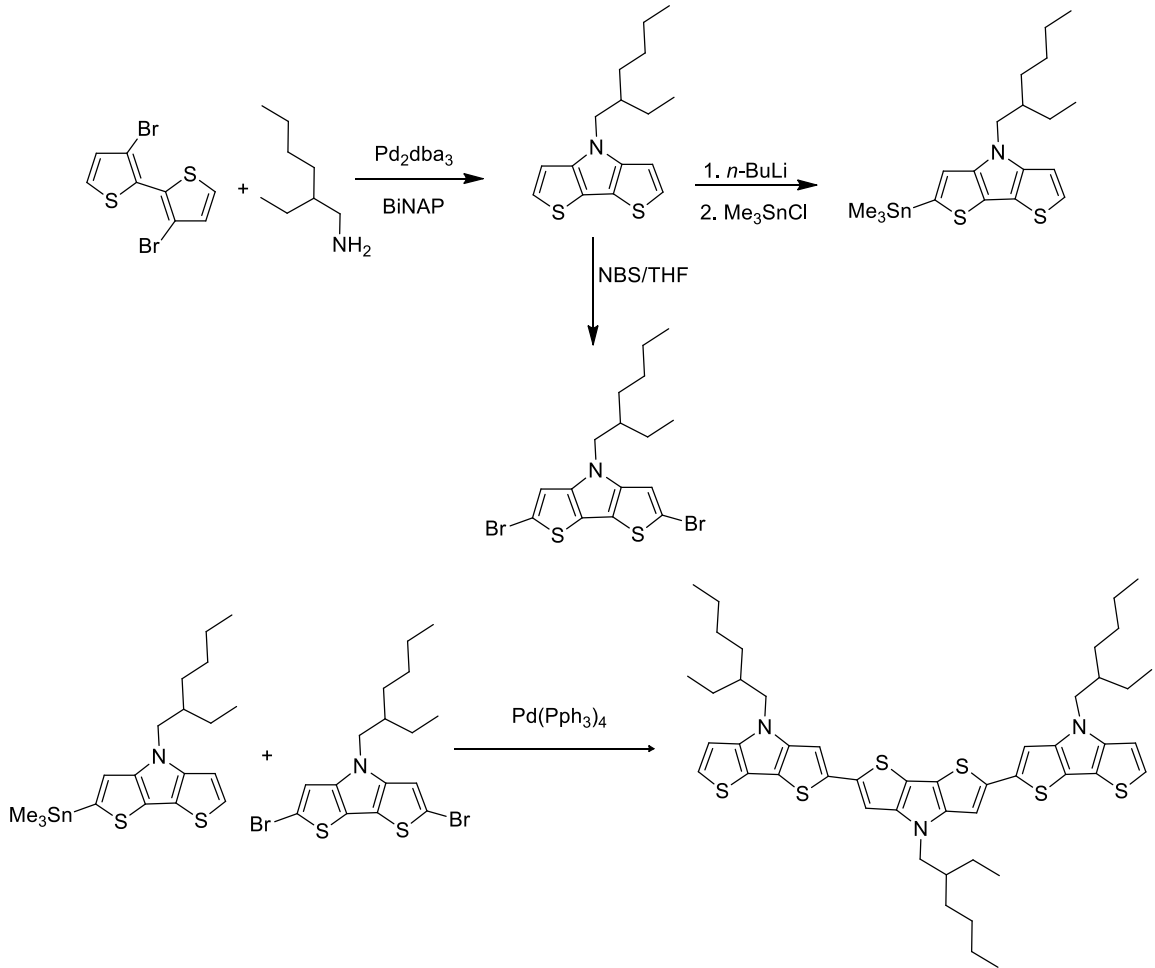
Valiyaveettil ve grubu indoletitiyofenpirol ve diindoletiyofenpirol moleküllerin sentezleyerek elektrokimyasal, fotofiziksel ve kristal yapı özelliklerini incelemiştir (Parameswaran ve ark.,2009).



Şekil 2.22. İndoletitiyofenpirol ve diindoletiyofenpirol bileşiklerinin sentez yöntemleri

Dimerik ve Trimerik Ditiyolpirol Bileşikleri

Roncali ve arkadaşları N-alkil DTP moleküllerinin Stille kapling reaksiyonu ile dimer ve trimer yapılarını elde ederek elektrokimyasal ve fotofiziksel özelliklerini incelemiştir (Yassin ve ark.,2010).



Şekil 2.23. Dimerik ve trimerik ditiyolpirol bileşiklerinin sentez yöntemi

2.7. Kapling Reaksiyonları

Kimyasal reaksiyonlar genellikle organik çözücülerde gerçekleştirilir. Organik sentezlerde kullanılan birçok çözücünün alev alıcı, uçucu ve toksik yani çevre ve insana sağlığı için potansiyel bir tehlike yarattığı bilinmektedir. Bu yüzden özellikle son yıllarda tehlikeli organik çözücülerin alternatif çözümlerle yer değiştirilmesi üzerine giderek artan çabalar ortaya çıkmıştır. Bu alternatif çözümlere su, süper kritik ortamlar (karbondioksit) perflorinli çözücüler ve iyonik sıvılar örnek olarak verilebilir. Alternatif çözümler özellikle çevresel yönden bakıldığında sentezlenme işlemleri açısından bir çok avantajı içermesinin yanı sıra ürünün atık maddelerden kolaylıkla ayrılması yönüyle de oldukça avantajlıdır (Anastas ve Kirchoff, 2002; Tzscucke ve ark., 2002).

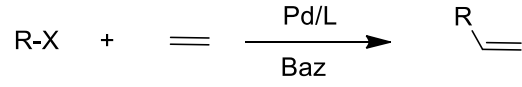
Geçmişten günümüze kadar, geçiş metalleri organik kimyada önem kazanan reaktiflerdir ve geçiş metal komplekslerini içeren homojen katalizli reaksiyonlar modern kimyada büyük öneme sahiptir. Özellikle yüksek seçicilik (kemo, regio ve enantiyoseçicilik) gerektiren organik dönüşümlerde oldukça yaygın kullanılırlar (Diderich ve Stangh, 1998).

Son yüzyılda, organopalladyum katalizli C-C bağ oluşumu organik moleküllerin sentezi için en etkili yaklaşımlardan biri olmuştur. Periyodik tablodaki 85 metalin sadece bir kaçının organometalik bileşiği bu tür reaksiyonlar için kullanılır. Palladyum bu amaçla öncelikli olarak bir rol oynamasına karşın geçiş metalleri sık sık kullanılmıştır (Tsuji, 1995; Malleron ve ark., 1997).

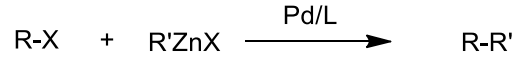
Organopalladyum kompleksleri oldukça kararlı bileşikler olup ve toksik olmamaları avantajdır (Tsuji, 1990). Organik sentezlerdeki sıfır değerlikli palladyumun en büyük katkısı karbon-karbon bağ oluşumunu sağlamasıdır.

Organik moleküllerin sentezinde, aril elektrofiller ve nükleofilik substratlar arasında metal katalize kapling reaksiyonları en yaygın kullanışlı metodlardan biridir (Wu ve ark., 2010). Metal katalize karbon-karbon bağ oluşumunda pek çok reaksiyon bilinmektedir. Bu reaksiyonların en ünlüleri palladyum katalize Suzuki-Miyaura, Heck ve Negish kapling reaksiyonlarıdır. Suzuki-Miyaura, Heck ve Negish bilim katkılarında dolayı 2010 yılında kimyada dalında Nobel ödülü almışlardır (Şekil 2.24).

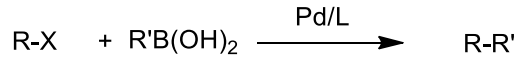
Heck Reaksiyonu



Negishi Reaksiyonu



Suzuki Reaksiyonu

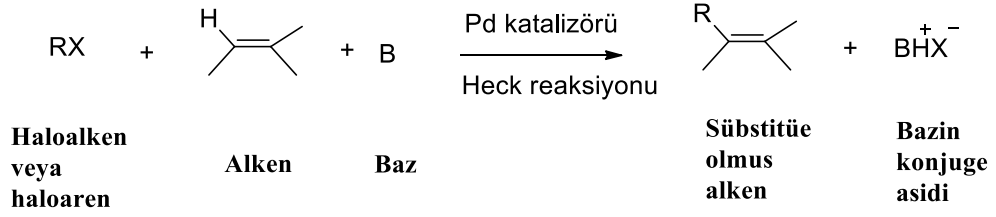


Şekil 2.24. Palladyum katalizörlüğünde gerçekleşen reaksiyonlar

Palladyum katalize reaksiyonlar pek çok organik molekülün sentezlenmesinde kullanılmakla birlikte, günümüzde bu reaksiyonların ligandlarla geliştirilmesi kimyacıların en önemli hedeflerinden birisidir. Günümüzde kompleks sentetik doğal ürünlerin sentezleri incelendiğinde bunların büyük bir çoğunluğunda kapling reaksiyonunun bir veya birden fazla kademedede kullanıldığı görülmektedir.

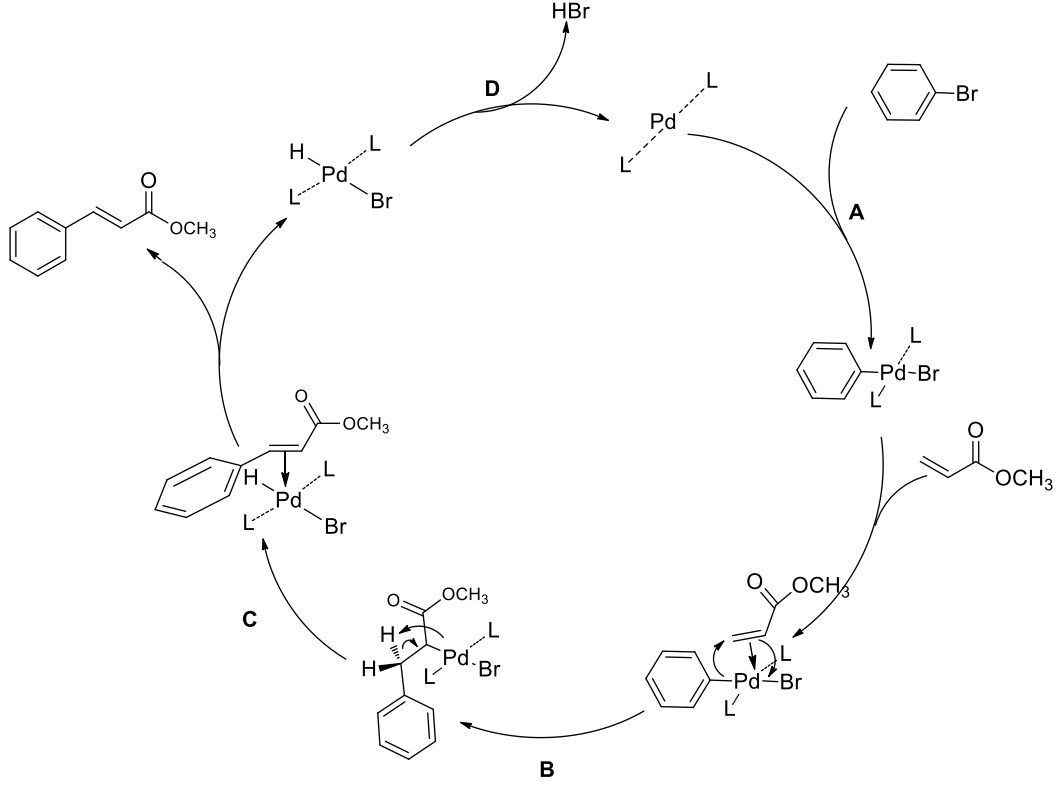
2.7.1. Heck Reaksiyonu

1970'lerin başında Richard Heck ilk önce Hercule Şirketi'nde daha sonrada Dalware Üniversitesi'nde yaptığı çalışmalar sonucu paladyum katalizli reaksiyonları ilk olarak uygulamıştır. Reaksiyon, bir alkenin karbon-karbon çift bağındaki vinilik hidrojen ile haloalken veya haloarenlerin karbon guruplarının yerdeğiştirilmesi şeklindedir ve Heck Reaksiyonu olarak bilinir. Özellikle sentetik organik kimyada önemli bir yere sahip olan bu metot yerdeğiştirme reaksiyonları için sık kullanılan genel metodlardan birisidir (Şekil 2.25).



Şekil 2.25. Heck reaksiyonunun genel şeması

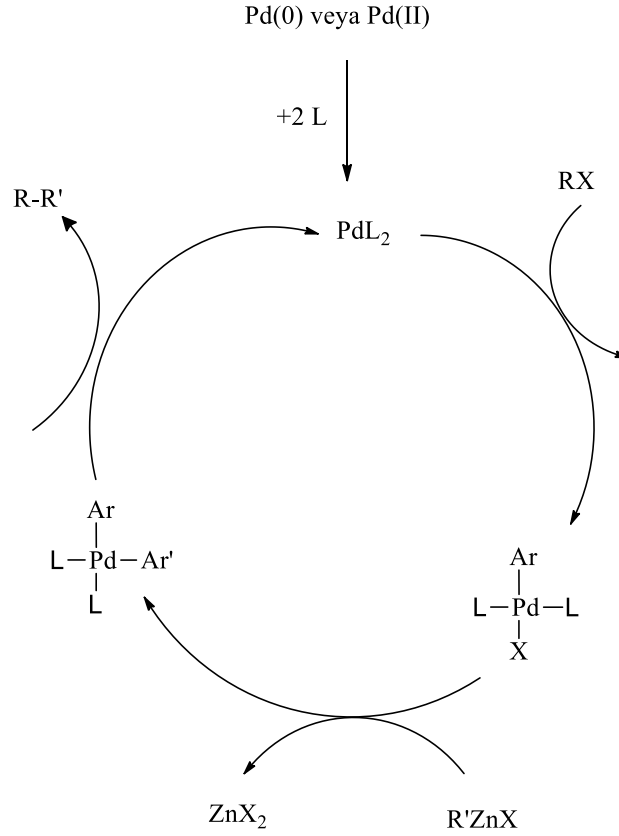
Aktif Pd(0), katalizlenen oksidatif bir organik halojenür RX (mekanizmada X olarak Br örnek verilmiştir) ile reaksiyona girdiğinde reaksiyon başlar. Bu reaksiyon oluşumu ile bir organo palladyum bileşik olan RPdX'te Pd(0)'dan Pd(II)'ye yükseltgenir. Bu süreçte yeni bir palladyum-karbon bağı oluşur. Bir sonraki adımda olefin palladyum için koordine olur. Olefin ile R grubu metale monte edilir ve birbiri ile tepkime verebilecek konuma gelir. Bir sonraki adımda ise, palladyum üzerinde R grubu koordine olmuş olefinin karbonlarından biri göç eder ve palladyuma olefinin diğer karbonu bağlanır. Bu süreç, bir göçmen ekleme olarak adlandırılır ve karbon-karbon bağı oluşturur. Son olarak, organik grup organo halojenür RX, R grubu substratı olefin ile bir hidrojen atomu yerine yeni bir olefin, β-eliminasyonu yoluyla oluşur. Bu adımda, kısa ömürlü HPdX türleri Pd(0) vermek için HX kaybeder. Oluşan Pd(0) türleri artık başka bir katalitik döngüsüne girmek için hazır olur.



Şekil 2.26. Heck reaksiyon mekanizması

2.7.2. Negishi Reaksiyonu

Alkil ve aril halojenürlerin organo çinko reaktantları ile kapling reaksiyonu 1997 yılında Negishi tarafından bulundu ve bu reaksiyon Negishi kapling reaksiyonu olarak adlandırıldı. Palladyumun aktivasyonu sonucu oluşan Pd(0), PdL₂ yapısına alkil veya aril halojenürlerin oksidatif katılması sonucu Pd(II) merkezli tetra kordine yapı oluşur. Pd(II) merkezli tetra kordine yapıya R'ZnX organo çinko reaktantındaki aril veya alkil grubuyla transmetalasyonu sonucu palladium yapısına transfer olur. Alkil veya aril halojenürdeki, halojen grubu çinko yapısına transfer olarak ZnX₂ şeklinde ayrılır. Oluşan PdL₂R₂ tetra kordine yapısı redüktif eliminasyon sonucu R-R', C-C bağı oluşur. Palladyum (0)'a indirgenerek reaksiyonun katalitik döngüsüne tekrar katılır (Wu ve ark. 2010).



Şekil 2.27. Negishi kapling reaksiyonunun genel mekanizması

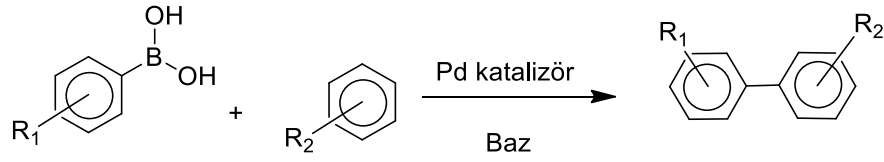
2.7.3. Suzuki Reaksiyonu

Palladyum katalizli C-C kapling reaksiyonları arasında Suzuki (Miyaura-Suzuki reaksiyonu olarak da adlandırılır) reaksiyonu amiral gemisi görevini üstlenmiştir. Suzuki reaksiyonu aril veya vinil boronik asitin, Pd(0) katalizörlüğünde aril veya vinil halojenürlerle olan reaksiyonu olarak tanımlanır (Miyaura ve ark. 1979; Miyaura ve Suzuki, 1979).

Bu tip reaksiyonla özellikle poliolefin, süstitüe bifenil ve stiren türevleri sentezlenir. Bu reaksiyon halojenürlerin yerine triflat (OTF) gibi psudohalojenürler, boronik asit yerine de boron-esterleri ile de çalışılabilir (Miyaura ve Suzuki, 1995; Suzuki, 1999).

Akira Suzuki tarafından yapılan, Suzuki reaksiyonu ile ilgili ilk çalışma 1979 yılında yapılmıştır. Bu reaksiyonda organik bir kısım içeren boronik asit ile bir aril halojenürün

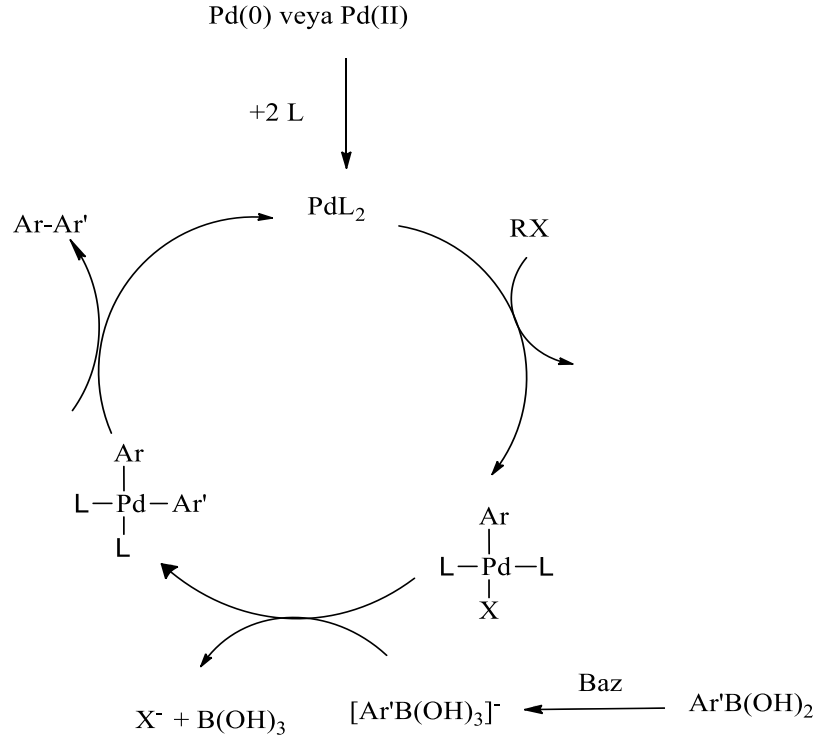
reaksiyonunu içermiştir (Şekil 2.28) Burada dönüşümü tetrakis (trifenilfosfin) palladyum (0) kompleksi sağlamıştır.



Şekil 2.28. Organik bir kısım içeren boronik asit ile aril halojenürün reaksiyonu

Suzuki reaksiyonları, boronik asit türevlerinin ısıya, neme ve havaya karşı kararlı olması, toksik olmayan doğası, çok çeşitli yollarla kolay elde edilebilmeleri, çok çeşitli fonksiyonel yapı içeren gruplara karşı toleranslı davranmaları, basit deney koşullarında kullanılabilmesi ve oluşan ürünün reaksiyon karışımından kolayca ayrılabilmesi nedeniyle oldukça avantajlıdır.

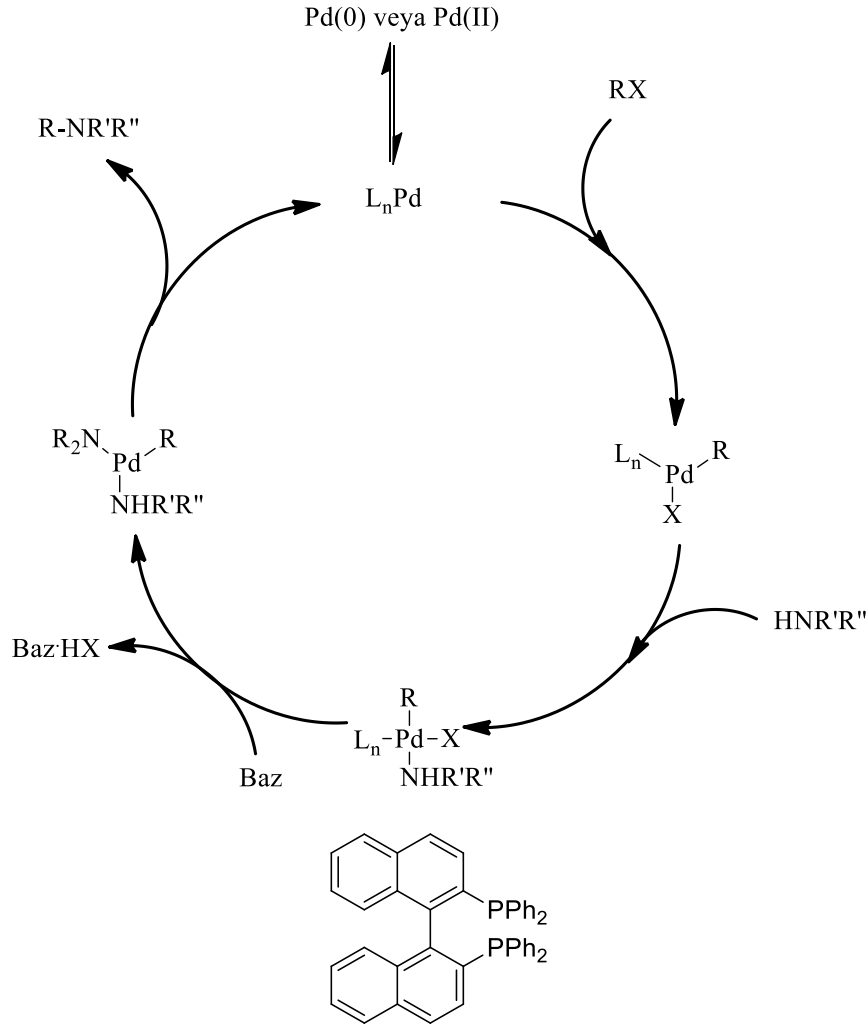
Karbon-karbon kapling reaksiyonlarında en yaygın kullanılan reaksiyon Suzuki-Miyaru reaksiyonudur. Suzuki kapling reaksiyonu Pd(II)'nin Pd(0) indirgenerek aktive edilmesi veya Pd(0) ile başlar. Aril halojenürlerin oksidatif katılması sonucu Pd merkezli tetra kordine yapı oluşur. Aril boranik asitlerin, Pd(II) tetra kordine yapıda transmetalasyonu esnasında, tetra koordine yapıdaki halojen ile aril boranik asitteki aril grubu ile transmetalasyon gerçekleşir. Oluşan 2 mol ligand ve 2 mol aril grubu içeren Pd(II) tetra kordine yapının redüktif eliminasyonu sonucu Ar-Ar arasında karbon-karbon bağı oluşur. Pd(II)'de redüktif eliminasyondan sonar Pd(0), PdL₂ yapısına dönüşerek tekrar reaksiyon döngüsüne katılır.



Şekil 2.29. Suzuki kapling reaksiyonun genel mekanizması

2.7.4. Buchwald-Hartwig Aminasyon Reaksiyonu

Karbon azot arasında C-N oluşturmak için en yaygın reaksiyon palladium temelli Buchwald-Hartwig aminasyon reaksiyonudur. Reaksiyon döngüsü kataliz öncesi palladium aktivasyonu ile başlar. Aril halojenürlerin aktive edilmiş LnPd(0) oksidatif katılır. Amin grubunun katılması ile Pd(II) tetra kordine yapı oluşur. Amin grubundaki hidrojen bazla deprotonasyonu maruz kalır, halojen ayrılması ve redüktif eliminasyonla arilamin ile LnPd(0) yapısı oluşur. LnPd(0) tekrar reaksiyon döngüsüne katılır.



Şekil 2.30. Buchwald-Hartwig aminasyon reaksiyonunun katalitik döngüsü

Karbon azot arasındaki C-N bağı oluşturmak üzere kapling reaksiyonlarında ilk jenerasyon P(o-tolyl) tek dişli ligandlar kullanılmasına karşın Buchwald ve grubu çift dişli biaril fosfin BINAP ligand üzerine çalışmalar yaptı. Çift dişli fosfin ligand BINAP, β -hidrür eliminasyonun engeller, oksidatif katılma ve redüktif eliminasyona katkı sağlar. Buchwald ve grubu çalışmalarında Pd_2dba_3 ve BINAP katalize sistemin primer aminlerin monoarilasyonunda başarılı bir şekilde uygulamışlar, ürün verimini artırarak, inaktif palladium(bis)aminarilhalojen yapısında oluşmadığını bulmuşlardır (Wolfe ve ark. 1996)

2.8. İletken Polimerlerin Kullanım Alanları

İletken polimerler valans bandı ile değerlik bandı arasındaki fark olan band enerjisinin değerine göre çeşitli uygulamalar için kullanılmaktadır. Temelde  sınıfta toplanabilir.

Kullanımıyla ilgili ilk sınıflandırma iletken polimerlerin nötral formları içindir. Bu nötral formları kullanılacak olan cihaz için rneğin Etkili Alan Transistörler gibi. Bu durum onların yarı iletken ve lüminesans özellikleri için bir avantajdır.

İletken polimerlerin kullanımları ile ilgili ikinci sınıflandırma bileşiklerin doplanmış yani katkılanmış ve iletken formları içindir. Bu sınıflandırmada aynı örnek uygulamaları da elektrostatik yük dağılımı ve EMI koruyucular enzim immobilizasyonu ve kapasitörler için elektrot materyaller.

nc grup kategoride ise polimerlerin çeşitli indirgen ve iletken formları arasında ki tersinir dönüşümünden yararlanılır. Bu indirgenmiş hali ile çeşitli yükseltgenmiş halleri arasında dönüşüm sırasında ışığın farklı dalga boylarında absorblamasına bağlı olarak polimer renk, iletkenlik ve yük değişimine uğrar. Bu özellikleriyle de akıllı camlarda elektrokromik cihazlarda, ilaç taşınımında, fotovoltatik pillerde, organik ışık saçan diyotlarda, gaz ve kimyasal sensörlerde ve biyosensörlerde aktif tabaka olarak kullanılmaktadır.

Elektrokromik uygulamalarda polimerin indirgenmiş hali ile çeşitli yükseltgenmiş halleri arasında ki ışığı absorblama dalga boylarının farklılığından yararlanılır. Gaz ve kimyasal sensörlerde polimerin iletkenliğinin değişmesi kriter olarak kullanılır. Biyosensörler ise enzimlerin polimer içerisinde hapsedilmesi yâda bağlanması ile substratlarına karşı katalizör işlevini yerine getirmesi sayesinde çalışırlar. Yarı iletken polimerin aktif tabakada ışığı alarak eksiton oluşturması ve pozitif yük ile elektronun gereken elektrotlara ulaşması ile fotovoltatik pil oluşur ve güneş enerjisinin elektrik enerjisine dönüşümü sağlanır. Işık saçan diyotlarda ise cihaz konfigürasyonu aynı olmakla beraber fotovoltatik pilin tersine olarak çalışır. Ve uygulanan gerilimi ışığa dönüştürür.

Biyosensörler, biyolojik komponent ile fizikokimyasal algılayıcıdan oluşmuş, analitin tespiti için kullanılan analitik cihazlardır (Banica, 2012).

Bu cihazlar, analitin miktarına bağı olarak sayısal elektrik sinyalleri üretmektedir. Biyosensörlerde biyolojik komponent olarak enzimler, mikroorganizmalar, organeller ve nukleik asitler kullanılabilir.

Ölçüm tekniğine göre biyosensörlerin birçok çeşiti vardır:

a) Amperometrik biyosensörler; b) Konduktometrik biyosensörler; c) Potansiyometrik biyosensörler; ç) Optik biyosensörler; d) Termal biyosensörler; e) Piezoelektrik biyosensörler.

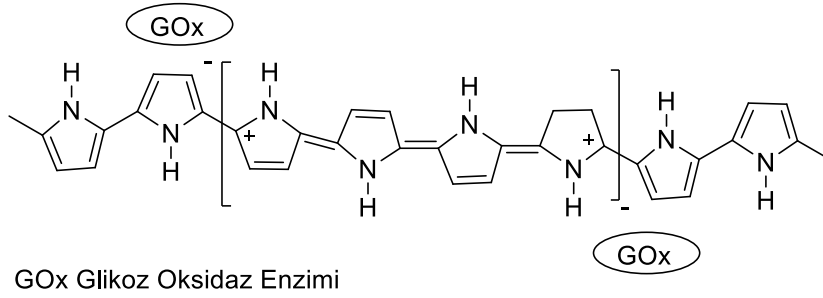
Biyosensörler eczacılık, gıda, tarım, tıp, savunma ve birçok endüstriyel uygulama alanlarında kullanılmaktadır.

2.9. İletken Polimerlerin Modifikasyonu

Elektrokimyasal sentezde potansiyostatik veya galvanostatik koşullar ayarlanarak pek çok parametre kontrol edilebilir. Böylece geleneksel olarak biyosensör üretiminde kullanılan diğer yöntemlere göre pek çok üstünlük sağlanmaktadır. Elektrokimyasal immobilizasyon yöntemlerinin önemli üstünlüklerini şöyle sıralayabiliriz.

- i) Bütün immobilizasyon yöntemlerinden daha hızlı olan tek basamaklı bir işlemdir.
- ii) Elektrodun geometrisi, boyutu ve şekli ne olursa olsun immobilize enzimin dağılımı kontrol edilebilir
- iii) Film kalınlığı biriktirme basamağında uygulanan yük miktarı aracılığıyla tam olarak kontrol edilebilir ve bu çok tabakalı/çok enzimli bir yapının oluşturulmasını sağlar. Böylece yüzeyin boyut ve geometrisi ne olursa olsun yüzeye kaplanan polimerin oluşumunda bir standart sağlanarak yeniden üretilebilirlik oranı yükseltilmiş olur.

Biyosensör üretiminde elektrokimyasal olarak polimerleşebilen filmlerin içine biyomoleküllerin tutuklanması en yaygın yaklaşımdır. Burada monomer ve enzimin yer aldığı çözeltide elektrokimyasal yükseltgenme gerçekleşirken enzim polimerik yapı içinde tutuklanır (Şekil 2.31).



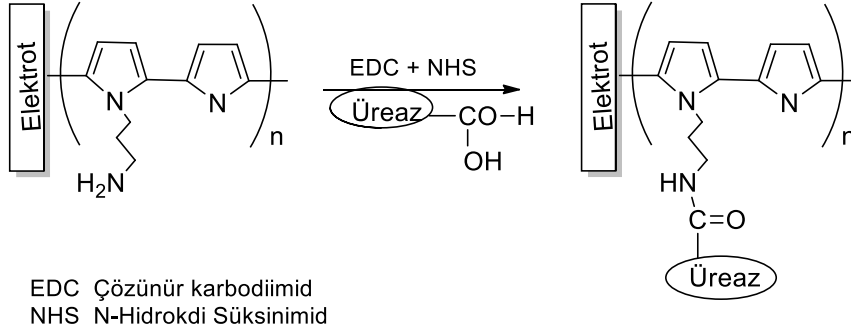
Şekil 2.31. Polipirol ve glukoz oksidazın etkileşmesi

Polimerleşme gerçekleşirken enzim molekülleri homojen bir şekilde polimer yapıda dağılmış olur. Bu yöntem, tek basamaklı hazırlama işleminin yeniden üretilebilirliği ve basitliği gibi üstünlüklere sahip olan doğrudan immobilizasyon yöntemidir. Ayrıca polimerizasyon çözeltisine eşzamanlı olarak medyatörler, koenzimler veya diğer enzimlerin eklenmesiyle bu türlerin de immobilizasyonu gerçekleştirilebilir (Vidal ve ark., 2003).

Elektrokimyasal olarak sentezlenmiş polimer filmlerinin içine enzimin girme mekanizmasıyla ilgili farklı görüşler vardır. Elektrostatik etkileşimin enzimin yapıya girmesinde büyük rol oynadığı ileri sürülmektedir ve dolaylı deneysel çalışmalar bu varsayımı desteklemektedir (Kajiya ve ark., 1991).

Enzimlerin polimerik yapıya immobilize edilmesi için farklı bir yaklaşım kovalent bağlanmayla gerçekleştirilmektedir. Bu yaklaşımda öncelikle belli fonksiyonel gruplara sahip monomer veya monomer karışımları uygun bir elektrot yüzeyinde polimerleştirilmekte ve suda çözünen bir karbodiimit vasıtasıyla enzim kovalent olarak bağlanmaktadır. Bu şekilde elde edilen elektrotlarda immobilize enzimin kararlılığında çok büyük oranda iyileşme sağlanmaktadır. Şekil 2.32'de poli-(N-3-aminopropil pirol-

kopirol) kopolimerine üreaz enziminin kovalent olarak nasıl bağlandığı görülmektedir (Rajesh ve ark., 2005).



Şekil 2.32. Poli-(N-3-aminopropil pirol-ko-pirol) kopolimerine kovalent olarak enzim bağlanması

2.10. Biyosensörler

Sensörler, fiziksel bir özelliği algılayan veya ölçen sonra kayıt altına alan, gösteren ya da başka bir şekilde cevap oluşturan cihazlardır. Burun, kulak, göz, dil ve parmaklarımız sensörü ifade eden en temel örneklerdir. Laboratuvarlarda kullanılan turnusol kâğıdı en iyi bilinen sensör türüdür, ortamın asitlik ve bazlığı hakkında bilgi verir. Daha kesin bir pH ölçümü için spesifik indikatörler kullanılır. Bununla beraber, ortamın asitliğini ölçen en iyi metot elektriksel cevapla pH yı ölçen bir pH metredir. Sonuçta bu yöntemlerde asitliğin derecesine göre cevap veren sensör, ya bir kimyasal madde ya da pH metredeki cam membran elektrottur. Oluşan kimyasal ya da elektriksel cevaplar genellikle gözlerimizle görebileceğimiz bir sinyale dönüştürülür. Turnusol kâğıdındaki renk değişiminin sebebi, kimyasal tepkime sonucu görünür bölge ışığın absorbansındaki değişimdir ve bu değişim aydınlık bir ortamda gözlerimiz tarafından algılanmaktadır. pH metrede ise, oluşan elektriksel cevap (potansiyel değişiminden kaynaklanan) metre göstergesi ibresinin hareketine ya da dijital göstergede görülebilen

bir cevaba dönüştürülmüştür. Sensör cihazının bu dönüşümünü gerçekleştiren kısmına “transdüser” denmektedir. Sensörler üç sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar:

- ✓ Basınç, sıcaklık, kütle, uzaklık gibi özellikleri ölçen fiziksel sensörler,
- ✓ Kimyasal ya da fiziksel cevaplar ile kimyasal maddeleri ölçen kimyasal sensörler,
- ✓ Biyolojik bileşenleri kullanarak kimyasal maddeleri ölçen biyosensörlerdir.



Şekil 2.33. Bir biyosensörün şematik gösterimi

Bir biyosensör; bir biyoreseptör ve bir çeviriciden oluşan biyolojik tanıma sistemine sahip cihazlar olarak tanımlanır. Biyoreseptörler enzimler gibi biyolojik moleküler türler veya tanıma olayı için bir biyolojik mekanizmayı kullanan yaşayan biyolojik sistemlerdir. Bir enzimin bir biyosensör içinde bir elektrot olarak kullanımının ilk gösterilişinden beri, böyle kimyasal cihazların gelişimi büyük bir ilerleme göstermiştir. Yüksek duyarlılığı, potansiyel seçiciliği, düşük maliyeti, minyatürleştirme ve otomasyon imkânı sayesinde kimyada ve biyolojide enzim içeren biyosensörler geniş bir ölçüde kullanılmaktadır.

2.11. Biyosensör Bileşenleri

2.11.1. Biyobileşenler

Biyobileşenler bir biyolojik numune ile yüksek spesifikte etkileşerek analiz için ilk basamağı gerçekleştirmiş olurlar. Fiziksel bileşenler ise biyobileşenlerin biyolojik reaksiyonu sonucunda meydana gelen değişimi ölçülebilir fiziksel bir sinyale dönüştürürler. Biyobileşen olarak enzimler, antikorlar, nükleik asitler, mikroorganizmalar, doku kültürleri ve organeller kullanılmaktadır.

Biyobileşen olarak kullanılan mikroorganizmalar ile ölçüm ortamdaki oksijen, karbondioksit, amonyak gibi gaz miktarındaki ya da amonyum, klorür gibi iyonların miktarlarındaki değişimin amperometrik, potansiyometrik, iletkenlik, optik, kalorimetrik gibi farklı fiziksel bileşenler kullanılarak mikrobiyal biyosensörler hazırlanmaktadır. Hazırlanan ilk mikrobiyal biyosensör *Streptococcus faecium* mikroorganizmasının kullanılmasıyla hazırlanan ve arjine seçimli bir biyosensördür ve ölçüm ortamında oluşan amonyak miktarının tayinine dayanmaktadır.

Biyobileşen olarak nükleik asitlerin kullanıldığı nükleik asit tabanlı biyosensörler toksinler hariç bakteri ve virüs gibi tüm canlıların tesbitinde kullanılabilirler. Çok hassas olan bu tip biyosensörler de her canlının kendine has DNA şifresi bulunmasından dolayı, polimeraz zincir reaksiyon metodu adı verilen bir metot sayesinde çok az miktardaki (femto veya attogram DNA) örnek içinden istenilen analitin tespiti mümkün olmaktadır.

2.11.2. Fiziksel Bileşenler

Fiziksel bileşenler biyolojik reaksiyon sonucunda meydana gelen değişime bağlı olarak elde edilmek istenen sinyalin türüne göre dönüştürücüler başlıca dört alt gruba ayrılırlar.

- i) Elektrokimyasal dönüştürücüler
- ii) Optik dönüştürücüler
- iii) Piezo-elektrik cihazlar
- iv) Termal sensörler

2.11.2.1. Elektrokimyasal Dönüştürücüler

Potansiyometrik Biosensörler

Çalışma işleyişi, referans elektrodu ve çalışma elektrodu ile oluşturulan bir biyokimyasal reaksiyon ortamındaki potansiyel değişimin izlenmesi sonucunda ölçüm ortamındaki türlerin nicel analizine dayanmaktadır. Ölçüm ortamındaki çalışma elektrodu ile aynı ortamda bulunan referans elektrodu arasında oluşan potansiyel değeri ile analizi yapılacak türün konsantrasyonu arasında logaritmik bir ilişki vardır. Potansiyometrik biosensörler, pH ya da tek değerlikli iyonlara duyarlı cam elektrotlar, anyon ve katyonlara duyarlı iyon seçimli elektrotlar, karbondioksit veya amonyaka yönelik gaz duyarlı elektrotlardan oluşmaktadır. İyon aktivitesindeki değişikliğe cevap veren iyon seçimli elektrotlar olarak tanımlanan potansiyometrik sensörler ile Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , H^+ veya NH_4^+ gibi iyonların bulunduğu kompleks biyolojik matrikste, uygun iyon değiştirici membrana iyonların bağlanmasıyla elektrot potansiyelinde oluşan hassas değişiklikten yola çıkarak bu iyonların tayinleri gerçekleştirilmektedir.

Amperometrik Biyosensörler

Çalışma işleyişi bir çalışma elektrodu ile bir referans elektrodu arasına denge potansiyelinden farklı bir potansiyel uygulandığında, ölçüm ortamında gerçekleşen biyokimyasal reaksiyon sonucunda meydana gelen akım değişikliğinin çalışma elektrodunda yükseltgenen veya indirgenen elektroaktif türlerin konsantrasyonların da meydana gelen değişime dayanmaktadır. Çalışma elektrodunda indirgenen veya yükseltgenen madde bir katyon, bir anyon veya yüksüz bir bileşik olabilir. Biyobileşen olarak enzimlerin kullanıldığı amperometrik biyosensörlerde, enzimatik reaksiyon esnasında harcanan O_2 ve oluşan H_2O_2 değişimleri izlenerek ilgili analit tayini yapılabilmektedir.

Örnek olarak glukoz tayini için tasarlanmış bir glukoz biyosensöründe, glukoz ile glukoz oksidaz arasında oksijen varlığında gerçekleşen enzimatik reaksiyonda, harcanan O_2 miktarı veya oluşan H_2O_2 miktarı amperometrik olarak izlenerek ölçüm ortamında meydana gelen akım değişimi ile glukoz miktarı tayini yapılmaktadır. Reaksiyon ortamında destek elektrolit olarak tanımlanan ve elektrotlar arasına uygulanan potansiyellerde elektroaktif olmayan yani elektrot üzerinde indirgenmeyen ve yükseltgenmeyen iyonların fazla miktarda bulunması çözeltinin elektriksel direncini azaltmaktadır. Ayrıca, destek elektrolitin varlığında ve ölçüm ortamının karıştırılmadığı durumda çalışma elektrodunda indirgenen veya yükseltgenen türün elektrot yüzeyine taşınımı sadece difüzyon yoluyla olmaktadır.

Bir elektrot reaksiyonunun hızı, yani akım değişimi, ölçüm ortamından elektrot yüzeyine doğru türün kütle aktarım (difüzyon) hızına, çalışma elektrodunda reaksiyona girecek olan maddenin bir kimyasal reaksiyon sonucunda oluştuğu durumlarda bu kimyasal reaksiyonun hızına, elektrot reaksiyonunun adsorplanan türler üzerinden yürüdüğü durumlarda yüzeye tutunma ve yüzeyden ayrılarak ölçüm ortamına geçme hızlarına ve elektrot yüzeyinde madde ile elektrot arasındaki elektron ya da yük aktarım hızına bağlı olarak değişmektedir.

Kondüktometrik Bivosensörler

Çalışma işleyişi, biyokimyasal reaksiyon sonucunda ölçüm ortamındaki bazı iyonların konsantrasyonları ile reaksiyon ortamında meydana gelen iletkenlik değişiminin iki metal elektrot çiftinin arasındaki iletkenlik ölçümünün izlenmesine dayanmaktadır Alan-Etkili-Transistör (AET) temelli sensörler; Bazen yukarıda bahsedilen elektrokimyasal dönüştürücü türlerinden biri silikon-çip temelli alan etkili bir transistör üzerinde daha küçük boyutlarda tasarlanabilir. Bu yöntem genellikle potansiyometrik sensörlerde kullanıldığı gibi kondüktometrik veya voltametrik olanlarda da kullanılabilir.

2.11.2.2. Optik Dönüştürücüler

Optik biyosensörler, iletici olarak optik lifler üzerine uygun bir yöntem ile biyomolekülün immobilizasyonu ile hazırlanan ve biyokimyasal etkileşim sonucunda meydana gelen değişimin optik özelliklerinde ki farklılığına dayanan biyosensörlerdir. Optik biyosensörler, biyokimyasal reaksiyon esnasında absorban değişimi, reaktantlardan ya da ürünlerden birinin floresans özellik göstermesi sonucu meydana gelecek floresans şiddetindeki değişimi ve biyokimyasal reaksiyon sonucunda ortam kırma indisindeki değişimi temel almaktadır.

2.11.2.3. Piezo-elektrik Dönüştürüler

Piezoelektrik biyosensörler karakteristik rezonans frekansındaki farklanmayı belirleyerek bir piezoelektrik kristal yüzeyinde toplanan örneğin kütlelerinin ölçülmesine dayanmaktadır.

Kalorimetrik biyosensörler ise, enzim ile substrat arasında gerçekleşen biyokimyasal reaksiyon sonucunda meydana gelen ısı değişimi ile substrat konsantrasyonunun belirlenmesini temel alan biyosensörlerdir.

2.12. İdeal Bir Biyosensörün Özellikleri

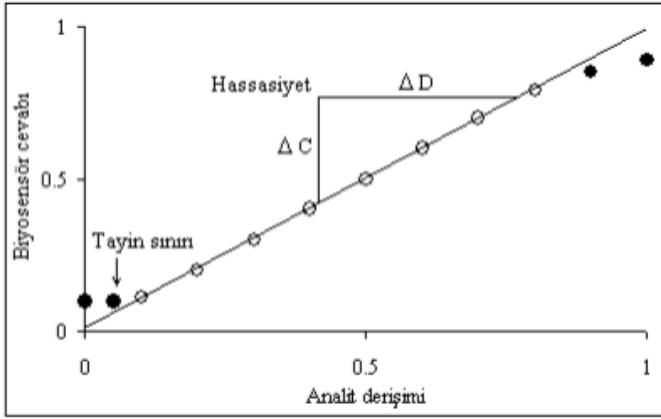
Elektrokimyasal, optik veya diğer biyosensör türlerini en uygun bir şekilde tasarlayabilmek için ölçüm sisteminin sahip olması gereken bazı temel fiziksel özelliklerin olması gerekmektedir. İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken bazı önemli karakteristik ve özellikler şöyle sıralanabilir.

Kalibrasyon Gereksinimi

Kalibrasyon grafiği, bir denge akımına göre düzeltilmiş kararlı hal cevaplarının ölçülmesi ve analit derişimine veya logaritmasına karşı grafiğe geçirilmesi ile çizilir. Kalibrasyon grafiğinde substrat derişimi ile biyosensör cevabı arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu derişim aralığına doğrusal çalışma aralığı adı verilir. İdeal bir biyosensörün hiç kalibrasyona gerek duymaması ya da en az kalibrasyona gerek duyması istenir. Fakat bu özellik uygulamada gerçekleştirilememiştir. Biyosensör yanıtını etkileyen parametrelerin sensör kalibrasyonunu etkileyeceği unutulmamalıdır. Kullanım ömürleri boyunca biyosensörler, sıklıkla kalibre edilmelidirler

Yüksek Duyarlılık

Hassasiyet, genellikle özel bir kimyasalın derişiminin de ki değişime (ΔD) bağlı olarak biyosensör cevabında meydana gelen değişimin (ΔC) ölçüsü olarak ($\Delta C/\Delta D$) tanımlanır (Şekil 2.34). Çoğu durumda biyosensör ölçüm yaparken, bir kimyasal reaksiyondaki ilgili reaktifin veya ürünün derişiminde ki 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 değıştikçe zamanla sinyalde meydana gelen değışim olarak ($\Delta C/\Delta D \cdot \Delta t$) tanımlanabilir.



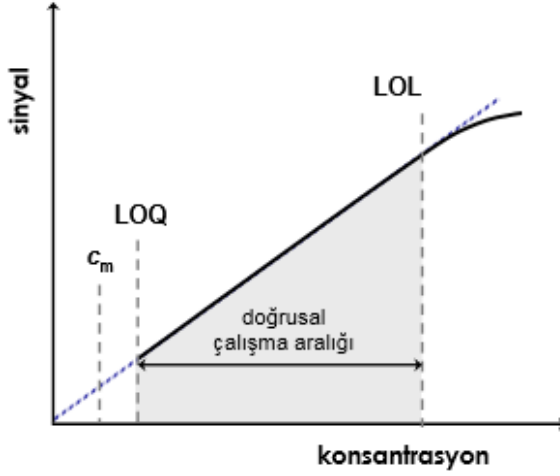
Şekil 2.34. Bir biyosensör için kalibrasyon eğrisi

Eğride doğrusal bir cevap aralığı (\circ), tayin sınırının altındaki derişimlerde ve daha yüksek derişimlerde doğrusal olmayan davranış (\bullet) görülmektedir. Hassasiyet doğrusal cevap aralığının eğimi olarak tanımlanır.

Hedef analite yönelik olarak hazırlanan bir biyosensörün etkin duyarlılığını belirleyen pek çok etken vardır. Bunlar; sensörün fiziksel boyutu, membran kalınlığı, örnekten algılayıcı bölgeye kimyasal türlerin kütle transferi ve biyosensörün aktivitesini düşüren çeşitli işlemlerdir. İdeal olarak, bir biyosensörün duyarlılığı kullanım ömrü boyunca değişmemeli ve dönüştürücünün çıkış sinyalinin belirlenebilmesine yetecek kadar yüksek olmalıdır.

Geniş Ölçüm Aralığı

Belli bir derişimde standart çözelti ilavesinden sonra ortam kararlılığının bozulması, enzim aktivitesinin azalması, elektrot yüzeyinin oluşan bazı radikallerle dolması gibi nedenlerle biyosensör cevabı azalır ve ileriki derişimlerde eklemelerden sonra biyosensör cevabı gözlenmez. Kalibrasyon grafiğinde analit derişimi ile sensör yanıtı arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu bölgeye “doğrusal aralık” denir. Doğru ölçümün yapılabilmesi için biyosensör cevabının doğrusal eğilim gösterdiği doğrusal bölgeyi tanımlamak gereklidir. Biyosensör için ölçüm aralığı tanımlanan bu doğrusal aralıktır. Doğrusal aralığın geniş olması biyosensör için avantajdır.



Şekil 2.35. Bir analitik yöntemin çalışma aralığı

Şekil 2.35 de bir analitik yöntemin doğrusal çalışma aralığı gösterilmiştir ve bu aralık tayin edilebilen en düşük konsantrasyondan (kantitatif ölçüm sınırı, LOQ) kalibrasyon eğrisinin doğrusallıktan sapma gösterdiği (doğrusallık sınırı, LOL) konsantrasyonuna kadar olan aralığı kapsamaktadır (Skoog,1998).

Standart sapma ve eğimden giderek hesaplamaya dayalı yaklaşımlarda genellikle aşağıdaki eşitlik kullanılır.

$$\text{LOD} = \frac{3,3 S}{m} \quad (1)$$

Burada LOD belirtme sınırı, S: Standart sapma ve m kalibrasyon grafiğinin eğimidir. Bu işlem için öncelikle optimum çalışma parametreleri kullanılarak en az 10 noktada oluşan bir kalibrasyon grafiği çizilir ve bu grafiğin doğru denklemi $y=mX+b$ bulunur LOD hesabı için eşitlikte standart sapma yerine konulacak olan değer değişik şekillerde elde edilebilir.

LOQ Tayin Sınırı (Limit of Quantation)

Biyosensörün cevap verebildiği en küçük derişim değeri tayin sınırı olarak adlandırılır. Bir yöntemin tayin sınırı kabul edilebilir bir doğrulukla (veya gerçeklik ve kesinlikle) tayin edilebilecek en düşük madde miktarı yâda analit derişimi olarak tanımlanmaktadır. Tayin sınırı uygulamada aynı belirtme sınırı hesaplanırken kullanılan 3,3 çarpanı yerine 10 çarpanı kullanılarak aynı yollarla hesaplanır.

$$\text{LOQ} = \frac{10 S}{m} \quad (2)$$

Düşük tayin sınırı biyosensör için bir avantajdır. Tayin sınırı, elektrot yüzeyinin büyüklüğü, biyolojik materyalin analite karşı ilgisi ve biyolojik materyalin immobilizasyonunda kullanılan polimerin kalınlığından etkilenir.

Kararlılık

Performans faktörlerinden bir tanesinde kullanım ömrü hakkında bilgi veren biyosensörlerin kararlılığıdır. Aynı biyosensör ile ne kadar çok sayıda ölçüm yapılabilmesine imkân sağlamasıyla ölçülmektedir. Biyosensörün kararlılığının büyük olması iş gücü ve ekonomik açıdan çok önemli avantajlar sağlamaktadır. Enzimin saflık düzeyi, kaynağı ve immobilizasyon yöntemi enzim sensörünün kararlılığını önemli ölçüde etkilemektedir (Emre, 2007).

Kullanım Ömrü

Hazırlanan biyosensörler ile yapılan ölçümler sonucunda biyomolekülün aktivitesindeki değişimin bir ölçüsü olarak tanımlanan bir faktördür. Gerekli çalışma ve çevre koşullarının oluşturulması biyosensörün aktivitesinin koruyucu yönde etki gösterecek ve böylece biyosensörün kullanım ömrü uzayacaktır.

Cevap Süresi

Biyosensörler için önemli bir performans parametresi olan cevap süresi ölçüm ortamına analitin eklenmesiyle meydana gelen sinyal değişiminin tekrar kararlı hal değerine ulaştığı zaman aralığı olarak tanımlanmaktadır. Bir biyosensörün cevap süresi, elektrot materyaline, destek maddesinin cinsine, biyomolekülün yapısına, analitin biyomoleküle olan ilgisine ve analitin elektrot yüzeyindeki redoks potansiyeline bağlı olarak değişim göstermektedir.

Seçicilik

İdeal bir biyosensörde olması gereken en önemli özelliklerden biri de seçiciliktir çünkü bu özellik, biyosensörün kompleks bir matris içinde tek başına analitik bir ölçüm cihazı olarak kullanılabilmesine olanak sağlamaktadır. Bir biyosensörün seçiciliği, biyosensörü oluşturan bileşenlerden olan biyomolekülün hedef analite karşı duyarlı olması ve ölçüm ortamında olabilecek diğer maddelerden etkilenmemesiyle ifade edilmektedir. İdeal bir biyosensör sadece hedef analit derişimindeki değişime cevap vermeli ve diğer kimyasal türlerin varlığından etkilenmemelidir. Aksi takdirde hedef analit derişiminin tayininde hata meydana gelir.

Biyosensörün seçimliliğini etkileyen sensörle girişimlerin olması, biyokatalizatorle girişimlerin olması ve pH değeri gibi bazı faktörler vardır.

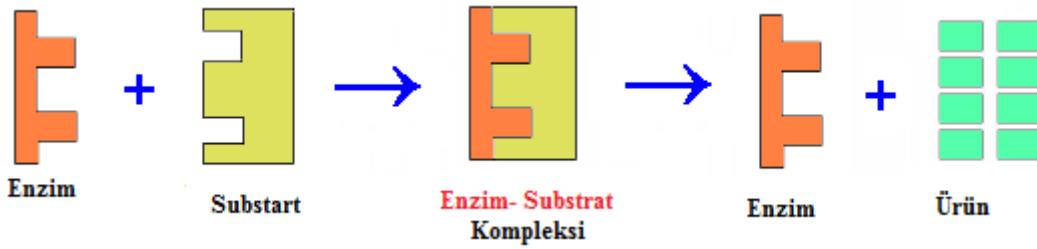
Hızlı Yanıt Zamanı

Amperometrik uygulamalarda analizi yapılacak bir madde örneğini çalışma ortamına ilave edilmeden önce elektrot yüzeyinde oluşan akımın sabit kalması istenir (durgun hal). Akım sabit kaldıktan sonra analit ortama ilave edilir ve akımdaki değişim kaydedilir. İkinci bir ilaveden önce akım değerinin gene sabit kalması beklenir. Tepkime ortamına analit eklemesi yapıldığı andan akım değişiminin olduğu ve tekrar kararlı hal akımına ulaşıldığı ana kadar geçen zamana “yanıt zamanı” denir. Bir biyosensör elektrodunun yanıt zamanı, elde edilen akım-zaman eğrilerinden

anlaşılabilir. Merdiven basamağı şeklinde elde edilen eğride basamakların şekli yayvan ve geniş ise yanıt zamanı uzun (yavaş), tersi söz konusu ise yanıt zamanı kısadır.

2.13. Enzimler

Emil Fischer 1894 yılında doğal glikozitleri hidrolizleyen enzimlerin sadece bir stereoizomere, örneğin sadece dekstro şekline karşı etkin olduğunu ve levo şekline etki etmediğini göstermiş ve enzimler ile substratlar arasında anahtar kilit ilişkisine benzer bir ilişkinin olduğunu bulmuştur. Her enzim kendi substratına karşı etki göstermektedir. Bu özgülük bazı durumlarda kesin olup bazı durumlarda da sınırlı bir genişliğe sahiptir. Fonksiyonlu grup yapısı birbirine benzeyen enzimler birden çok substrata etkiyebilir. Ama bu durum sonucunda etkime hızlarında Km değerleri farklılıkları oluşmaktadır. Enzimlerde substratın ve koenzimlerin bağlanarak biyokimyasal tepkimelerin meydana geldiği yerler aktif merkez olarak adlandırılır. Aktif merkezler aminoasit kalıntılarından oluşmuş ve özel geometriye sahip kısımlardır. Aktif merkez büyük enzim molekülünün sadece küçük bir kısmını kaplar. Enzim molekülünün büyük olması, aktif merkezin geometrik yapısının oluşması için gereklidir. Şekil 2.36'da gösterilen modelde substrat, enzimin aktif merkez bölgesine bağlanır ve bir enzimsubstrat kompleksi oluşur. Bu kompleksin bozunması sonucu ürün meydana gelir ve enzim yeniden serbest kalır.



Şekil 2.36. Enzim-substrat kompleksinin oluşması

2.13.1. Enzimlerin Sınıflandırması

Enzimlerin çeşitliğinin ve sayısının fazla olmasından dolayı, enzimlerin belirli gruplar altında toplanmasının enzim bilimi yönünden büyük kolaylık ve bütünlük sağlayacağı düşünüldükçe Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından yeni bir sınıflandırma sistemi kabul edilmiştir. Bu sınıflandırma sistemi ile birlikte her enzim 4 rakamlı bir numara örneğin 2.7.1.1. şeklinde kodlanmıştır. Kodlama işleminde ilk sayı enzimin sınıfını, ikinci sayı enzimin alt sınıfını, üçüncü sayı grubunu, dördüncü sayı ise enzimin kendine özgü sayısını göstermektedir.

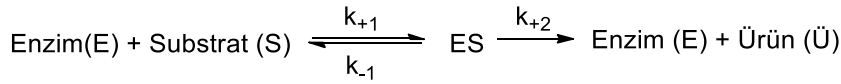
1. Oksidoredüktazlar: Bu tür enzimler iki substrat arasındaki yükseltgenme, indirgenme reaksiyonlarını kataliz ederler.
2. Transferazlar: Bu sınıfa giren enzimler bir atom grubunun veya molekülün diğer moleküle aktarılmasını sağlarlar.
3. Hidrolazlar: Genel olarak bu tür enzimler ester, eter, peptit, C–C, P–N bağlarının hidrolizini kataliz ederler.
4. Liyazlar: Hidroliz dışındaki mekanizmalar ile substratlardan bazı grupların çıkışını sağlayan enzim türleri bu gruba girer. Genellikle C–C, C–O, C–N, C–S bağlarına etki ederler.
5. İzomerazlar: Moleküldeki karbon atomlarının yerlerini değiştiren ya da çeşitli grupları bir karbon atomundan diğerine kaydıran, başka bir ifadeyle izomerleşmeyi sağlayan enzimlerdir.
6. Ligazlar: Bu enzim türleri ATP de ki ya da ona benzer yapıdaki bileşiklerde bulunan pirofosfat bağının parçalanmasına bağlı olarak meydana gelen enerji ile iki molekülün birbirine bağlanmasını kataliz ederler.

2.13.2. Enzim Aktivitesi

Enzim aktivitesi; belirli bir zamanda ve belirli başlangıç şartlarında, bilinen bir enzim miktarının etkisiyle değişime uğrayan substrat miktarının ölçülebilmesiyle ifade edilen değerdir. Enzim miktarı yerine “enzim ünitesi” (aktivitesi) kullanılmaktadır. Enzim aktivitesi turnover sayısı ile ifade edilir. Turnover sayısı, enzim molekülü tarafından bir saniyede ürüne dönüştürülen substrat molekül sayısıdır. Bilinen en yüksek turnover sayısı 40.000.000’lik değerle katalaza aittir, ikinci olarak en yüksek değere 400.000 ile karbonik anhidraza aittir. Turnover sayısı sadece saf enzim için ifade edildiğinden enzim aktivitesi, spesifik aktivite ile belirtilir. Spesifik aktivite 1 mg protein başına enzim ünitesi (EU/mg protein) olarak tarif edilir. Klinikte, biyolojik sıvılarda ölçülen enzim aktiviteleri optimum şartlarda 1 saniyede 1 mol substratın ürüne dönüşümünü katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlanır. Bu birim, uluslararası birim (katal) olarak kabul edilir. En çok kullanılan enzim aktivitesi birimi ise IU’dur ve 1 IU enzim aktivitesi optimum şartlarda 1 dakikada 1 μ mol substratın ürüne dönüşümünü katalizleyen enzim miktarını ifade eder. Enzimle kataliz edilen tepkimelerin hızını etkileyen faktörlerin tamamı (enzim derişimi, substrat derişimi, sıcaklık, pH ve inhibitörlerin varlığı) klinik için önem taşır.

2.14. Enzimatik Reaksiyon Kinetiği

1913 yılında Leonor Michaelis ve Maud Menten, enzimli reaksiyonların ilk basamağında bir ES kompleksi oluşumundan hareket ederek bir model geliştirdiler. Enzimle katalizlenmiş reaksiyonlar doyumlu olduğu için, kataliz hızları artan substrata doğrusal bir tepki göstermez. Eğer ilk reaksiyon hızı çeşitli substrat konsantrasyonları [S] için ölçülürse, reaksiyon hızı [S] arttıkça artar. Ancak, [S] yükseldikçe, enzim doygunlaşır (satüre olur) ve hız, enzimin en büyük hızı olan V_{max} 'a ulaşır.



reaksiyonun ilk anlarında ürün konsantrasyonu çok düşük olmasından dolayı, Ü ürünü ile E enziminin birleşerek ara kompleks meydana getirme hızı çok yavaş olmaktadır. Kinetik hesaplamalarda bu küçük hız değeri önemsenmemektedir.

$$k_{+2} \ll k_{-1}$$

Kararlı durum ilkesine göre, [ES] konsantrasyonunun zamanla değişmesi sabit kabul edilerek aşağıdaki eşitlik yazılabilir.

$$d[\text{ES}]/dt = k_{+1} [\text{E}][\text{S}] - k_{-1}[\text{ES}] - k_{+2} [\text{ES}] = 0 \quad (1)$$

Toplam enzim konsantrasyonu için serbest enzim konsantrasyonu ile o andaki enzim substrat kompleksinin konsantrasyonunun toplamı; başlangıçta reaksiyon sistemine konulmuş olan enzim konsantrasyonuna, $[\text{E}]_0$, değerine eşit olmasından dolayı, eşitliği yazılır.

$$[\text{E}] + [\text{ES}] = [\text{E}]_0 \quad (2)$$

$[\text{E}]$, enzim konsantrasyonu için bulunan bağıntı eşitlik (3)'de yerine yazılırsa aşağıdaki bağıntı elde edilmektedir.

$$d[\text{ES}]/dt = k_{+1} [\text{E}]_0[\text{S}] - (k_{-1}[\text{S}] - k_{-1} + k_{+2})[\text{ES}] = 0 \quad (3)$$

verilen eşitlik düzenlendiğinde;

$$[\text{ES}] = \frac{[\text{E}]_0 [\text{S}]}{(k_{-1} + k_{+2})/k_{+1} + [\text{S}]} \quad (4)$$

$$v = k_{+2} [ES] = \frac{k_{+2} [E]_0 [S]}{(k_{-1} + k_{+2})/k_{+1} + [S]} \quad (5)$$

Substrat konsantrasyonlarının büyük olduğu bu bölgelerde reaksiyon birinci mertebededir. Substrat konsantrasyonunun K_m sabitine eşit olduğu durumda

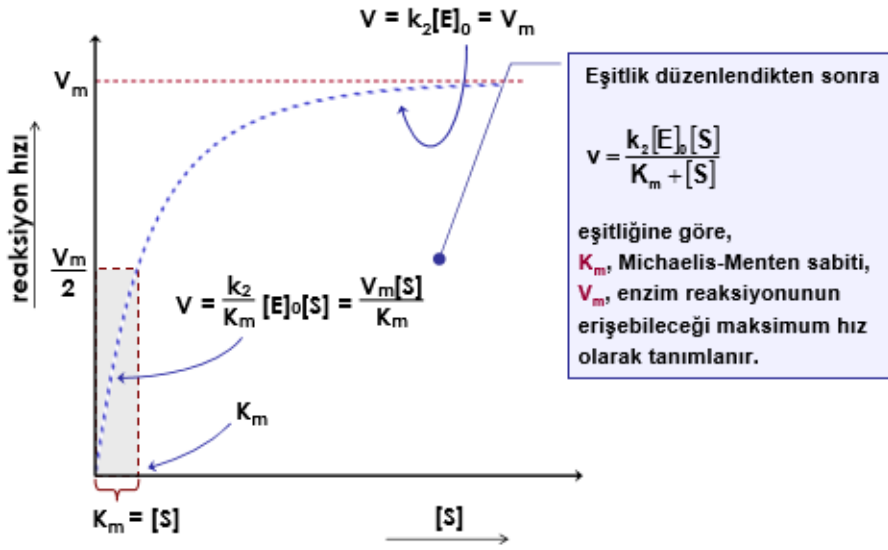
$$[S] = K_m \quad (6)$$

$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (7)$$

Bu eşitliğe Michealis-Menten denklemi denmiştir.

Bu durumda K_m ; Maksimumu hızın yarısına karşılık gelen substrat konsantrasyonu olarak tanımlanır ve birimi mol/L dir. Michaelis-Menten denklemi enzimatik etkinin kantitatif incelenmesinde bütün enzimler için temel bir ifadedir. Enzimlerin K_m değerleri çok farklılık gösterir. Birçok enzim için bu değer 10^{-5} - 10^{-3} M arasındadır. K_m değeri enzim konsantrasyonuna bağlı değildir. Substratın yapısı, pH, sıcaklık ve iyonik şiddet ile değişebilir. Bir enzimin birden fazla substratı varsa her bir substrat için ayrı bir K_m değeri vardır. Bu durumda K_m , ES nin sağlamlık ölçüsüdür. Yüksek K_m zayıf bağlanmayı düşük K_m kuvvetli bağlanmayı ifade eder. K_m enzimin substrat ilgisini gösterir. Enzimlerin V_{max} değerleri de birbirlerinden çok farklıdır. K_m de değişikliğe neden olan faktörler V_{max} da etkiler. V_{max} enzimin katalitik aktivitesinin bir ifadesidir.

Bir enzimin kinetik özellikleri ile ilgili en faydalı bilgi K_m ve V_{max} değerlerinden elde edilir. Bu iki değer deneysel olarak bulunabilir. Değişik substrat konsantrasyonların da hızlar tayin edilir. Bulunan değerler grafik çizilerek veya eşitlik formülü ile hesaplanabilir.

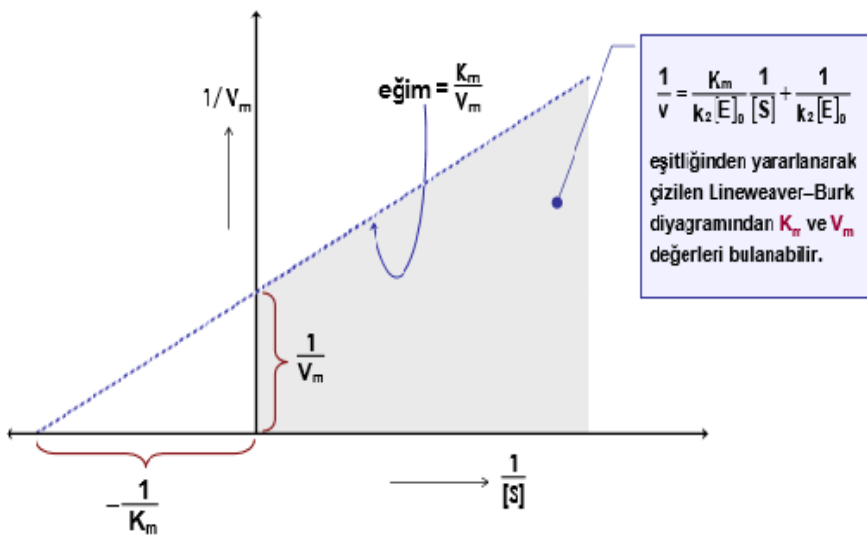


Şekil 2.37. Reaksiyon hızı-substrat konsantrasyonu grafiği

Michaelis-Menten eşitliğini bir doğru denklemine dönüştürmek gerekir. Buda eşitliğin her iki tarafı ters çevrilerek yapılır. Bu doğrunun çizildiği grafikte;

$x=1/[S]$, $y=1/V$ ve eğim $m=K_m/V_{max}$ ve y ekseninin kesildiği nokta $1/V_{max}$ olur.

Bu eğriye Lineweaver-Burk Eğrisi adı verilir. Eğri x eksenini kesecek şekilde uzatıldığında kesme noktası $-1/K_m$ yi verir.



Şekil 2.38. Lineweaver-Burk eğrisi

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{k_2 [E]_0} \frac{1}{[S]} \quad (8)$$

Ya da

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \quad (9)$$

Bu eşitliklere göre $1/v$ ile $1/[S]$ arasında çizilen grafikte, doğrunun ordinatı kestiği değerden $1/V_m$, doğrunun eğiminden de K_m/V_m değerleri bulunur. Bulunan bu değerlerden de Michaelis-Menten sabitleri hesaplanabilmektedir (Pekin, 1979).

2.15. Enzim İmmobilizasyonu

Enzim immobilizasyonu, enzim katalizli prosesler de enzim moleküllerinin katalitik aktifliğini koruyarak tekrar ve sürekli kullanımını sağlamak amacıyla bir destek maddesine fiziksel veya kimyasal bağlanması olarak ifade edilebilir.

Enzimler canlılar tarafından üretildiklerinden endüstriyel veya analitik amaçlı kullanımları için doku, kan, mikroorganizma gibi canlı veya canlı kökenli kaynaklardan saflaştırılırlar. Enzim üretiminde hammadde olarak canlıların kullanımı ekonomik açıdan sınırlayıcı bir durum olsa da bu sorun mikrobiyal kaynaklar sayesinde büyük ölçüde çözülmüş görünmektedir. Bununla birlikte enzimlerin mikrobiyal kaynaklardan saflaştırılması oldukça masraflı bir iştir. Endüstriyel uygulamalarda serbest enzimin aktivitesini kaybetmeden geri kazanılması çok zordur. Serbest enzim, reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılmadığından reaksiyonun kontrolü çok güçtür. Reaksiyonun istenilen anda durdurulması için inhibitör katılması düşünülebilir. Ancak serbest enzim tarafından kirletilmiş olan reaksiyon ürünlerine böylece yeni bir kirlilik unsuru eklenmiş olacaktır. Ürün veya ürünlerin bu kirlilik unsurlarından arıtılması maliyeti çok arttırmaktadır. Katalizör olarak kullanılan serbest enzimi reaksiyon ortamından aktivitesini yitirmeden çıkarabilmek olanaksız olduğundan enzimin yeniden kullanılması da söz konusu değildir. Bu ise enzimlerin spesifik ama o ölçüde pahalı katalizör olmaları nedeniyle maliyeti yükselten önemli bir etmendir. Ayrıca serbest enzimler sürekli üretim sistemlerine de uygulanamazlar. Bu nedenle saflaştırılan enzimlerden olabildiğince faydalanmak için immobilizasyon teknikleri geliştirilmiştir (Telefoncu, 1997).

İmmobilize enzimin serbest enzime göre üstünlükleri;

- ✓ Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir (süzme, santrifüjleme v.b.) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz.
- ✓ Çevre koşullarına (pH, sıcaklık v.s.) karşı daha dayanıklıdır.
- ✓ Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
- ✓ Sürekli işlemlere uygulanabilir.
- ✓ Doğal enzime kıyasla daha kararlıdır.

- ✓ Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- ✓ Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
- ✓ Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilir.
- ✓ Enzimin kendi kendini parçalama olasılığı azalır.

2.15.1. İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak yöntemi seçerken, immobilizasyon sırasında veya immobilizasyondan sonra enzim aktif merkezinin zarar görmeyeceği bir yöntem olmasına dikkat edilmelidir. Böyle bir seçim yaparken enzimin yapısı çok iyi bilinmelidir. Enzim ile taşıyıcı arasında herhangi bir bağlanma söz konusu ise ya bu bağlanmanın aktif merkez üzerinden gerçekleşmeyeceği taşıyıcılar seçilmeli ya da immobilizasyon işlemi sırasında aktif merkez korunmalıdır (Özlü, 2013).

2.15.1.1. Adsorbsiyon

Enzim immobilizasyonunda kullanılan en eski ve en basit yöntemdir. Yüzey aktif, suda çözünmeyen bir adsorbanın (aktif karbon, gözenekli cam, kül, silikajel, CaCO_3 , nişasta, gluten gibi) enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının yıkanarak ortamdaki uzaklaştırılması esasına dayanmaktadır (Nelson ve Griffen, 1916; Klivanov, 2001).

Adsorpsiyon yöntemi ile enzim immobilizasyonu işlemi ılımlı koşullarda gerçekleştirilir, bu şekilde kullanılan taşıyıcının aktive edilmesine gerek duyulmaz, ekonomik olarak avantajlıdır ve genellikle immobilizasyon işlemi sonunda enzim aktivitesini büyük ölçüde korur. Her ne kadar yöntem basit gözükse de optimizasyon koşullarının belirlenmesi zordur. Eğer taşıyıcı ve enzim arasındaki non kovalent etkileşim yeteri kadar büyük değilse desorpsiyon ile enzim ortama geçebilir ve böylelikle ürün kirlenmesine neden olur (Telefoncu, 1997).

2.15.1.2. Kovalent Bağlama

Kovalent bağlı metotlarla proteinlerin immobilizasyonu, immobilizasyon metotları içerisinde en fazla kullanılan metotlardan birisidir. Bu metodu kullanmanın avantajlarından birisi, enzim ve matriks arasındaki bağın son derece dengeli ve sağlam olmasıdır. Bundan dolayı enzimin çözeltiye geri kaçıışı önlenmiş olmaktadır. Ancak bağlanma aktivite yüzdesini artırmak için kullanılan temel amino asit rezidülerinin taşıyıcıya kovalent bağlanması engellenmelidir. Bu durum bazı durumlarda uygulamanın ne kadar zor şartlar gerektirdiğini gösterir Kovalent bağların formasyonu genellikle enzimde gösterilen aminoasitlerin yan zincirlerinde görülür. Bir enzimin kovalent bağlanması, polimerin reaktif gruplar içeren ajanlarla (etilenin kopolimerizasyonu, maleik asidin anhidridi) veya polimer ve enzimin arasında köprü vazifesi görececek iki fonksiyonlu ajanların etkileşmesiyle oluşur. Bunun yanında sülfidril, oksit, amino, karboksil, hidroksil, amonyum, imino, amid, metiltiyol, guanidil ve fenol halkası gibi pek çok fonksiyonel grup içeren parçalar kimyasal bağlarda etkin olarak görev alır.

Kovalent Bağlamanın Avantajları

Enzim immobilizasyonunda kovalent bağlanmanın bazı önemli avantajları aşağıda sıralanmıştır:

- ✓ Enzimlerin taşıyıcı matrikse adsorpsiyonu oldukça uygundur. Bundan dolayı yaygın şekilde kullanılması
- ✓ Geniş spektrumlarda bağlanma reaksiyonları, pek çok fonksiyonel grup içeren taşıyıcılarla sağlam bir bağın oluşumu ve bağlanmadan sonra enzim aktivitesinin devam etmesi
- ✓ Kovalent bağlı tutunma pH, iyonik şiddet ve substrat ile geriye dönüş reaksiyonunun olmaması

2.15.1.3. Çapraz Bağlama

Çapraz bağlama ile yapılan enzim immobilizasyon yöntemlerinde küçük molekül yapılı, bir veya multi fonksiyonel reaktifler, enzim molekülleri arasında bağlar yaparak suda çözünmeyen kompleksler oluşturmaktadır (Govardhan, 1999; Schoevaart ve ark.,2004; Sheldon ve ark., 2007).

Çapraz bağlanma derecesi ve immobilizasyon, protein ve reaktif derişimine, pH'ya ve immobilize edilecek enzime çok bağlıdır. En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri; glutaraldehit, kloroformat ve karbonilimidazol, heterosiklik halojenürler, bioksiranlar, divinilsülfoler, p-benzokinon, geçiş metal iyonları ve epiklorohidrinlerdir. Genellikle pahalı olmadığı ve ticari olarak kolay bulunduğu için glutaraldehit çapraz bağlama reaktifi olarak kullanılmaktadır.

2.15.1.4. Tutuklama Yöntemi

Tutuklama yöntemi, enzim molekülünü belirli bir mekânda durmaya zorlanmaktadır. Enzim bulunduğu çevreden dışarıya çıkamaz. Bu işlem polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirilebileceği gibi yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ve miseller ile de gerçekleştirilebilir. Bu yöntemi, kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayıran en önemli özellik enzim molekülünün fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır. Tutuklama yöntemi; polimer matrikste tutuklama, mikrokapsülleme, lipozom tekniği olmak üzere üçe ayrılır.

• Polimer Matrikste Tutuklama Yöntemi

Yüksek derecede çapraz bağlı bir polimerin enzim çözeltisi içinde oluşturulması temeline dayanır Polimerleşme sonucu enzim molekülleri çapraz bağ ağları arasında tutuklanmakta ve böylece ana çözeltiliye geçmeleri engellenmektedir. Bu amaçla en çok kullanılan polimer N,N'-metilenbisakrilamid ile çapraz bağlanmış poliakrilamiddir.

- **Mikrokapsülleme Yöntemi**

Enzim moleküllerinin yarı geçirgen bir membran içinde tutuklanması esasına dayanır. Mikrokapsüllerin büyüklüğü 1100 m arasında değişmektedir. Yarıgeçirgen membranın gözenek çapları; substrat moleküllerinin kapsül içine girişine ve ürün moleküllerinin dışarı çıkışına olanak verecek bir büyüklükte olmalıdır. Substrat molekülleri ne kadar küçükse bu yöntem ile immobilize edilmiş enzimin verimliliği o ölçüde yüksek olacaktır.

- **Lipozom Yöntemi**

Sıvı-yüzey yapıcı membran temeline dayanır. Yöntemin en önemli üstünlüğü; süreksiz, dönüşümlü ve tamamen fiziksel oluşudur. Aynı anda bir adımda birçok enzimin immobilizasyonuna olanak sağlar ve oldukça büyük bir kontakt yüzeyine sahiptir. Önemli sakıncaları ise; substrat ve ürünün membranda geçişinin çözünürlüğe bağımlı olması, işlem sırasında enzimin inaktive olması ve sıvı olan membrandan enzimin kaçma olasılığıdır.

Çizelge 2.2. İmmobilizasyon metotlarının karşılaştırılması

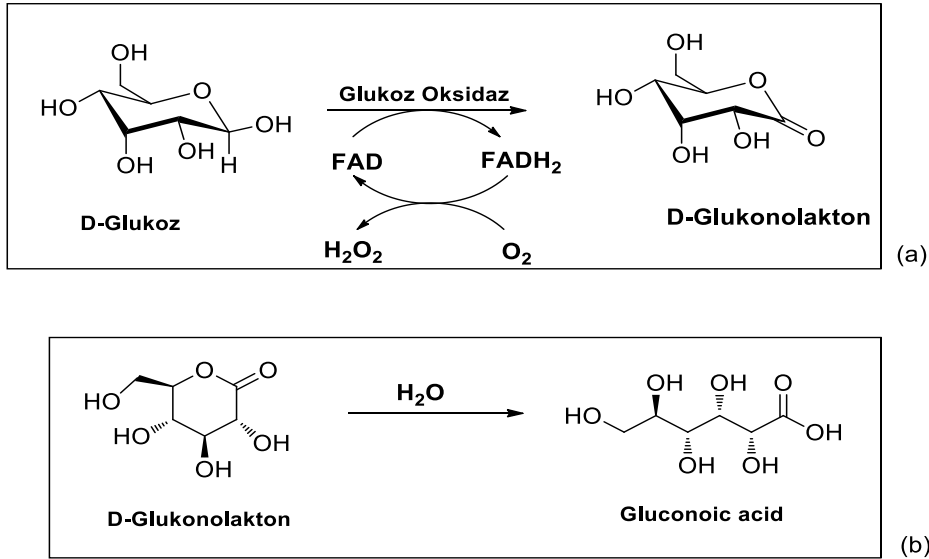
İmmobilizasyon Metodu	Avantajları	Dezavantajları
Adsorbsiyon	<ul style="list-style-type: none">• Kolay• Enzimin kimyasal modifikasyonuna gereksinim yoktur• Tersinirdir.• Genellikle ucuzdur.	<ul style="list-style-type: none">• Zayıf bağlanma ve enzim kaçıışı• Zayıf ya da olmayan stabilite• Spesifik olmayan bağlanma• Kütle transferini önleyebilir.
Kovalent	<ul style="list-style-type: none">• Sıkı bağlanma• Çok sayıda destek materyali ve kovalent bağlayıcı• Enzim miktarının ve mikro çevrenin rasyonel olarak kontrolü	<ul style="list-style-type: none">• Enzimlerin kimyasal modifikasyonu• Genellikle pahalı• Taşıyıcı ile aktivitenin seyrelmesi
Tutuklama ve Kapsülasyon	<ul style="list-style-type: none">• Enzimin kimyasal modifikasyonuna gereksinim yoktur.• Basit olabilir• Hücreler için uygundur.	<ul style="list-style-type: none">• Zayıf yâda olmayan stabilite• Çevresel koşullara bağımlıdır.• Genellikle kütle transferinin önlenmesi
Çapraz Bağlama	<ul style="list-style-type: none">• Yüksek ve hacimsel aktivite• Yüksek sıcaklık ve organik solventlere uygundur.• Taşıyıcı gerektirmez• Sıkı bağlanma• Hücreler için uygundur.	<ul style="list-style-type: none">• Enzimlerin kimyasal modifikasyonu• Partikül özelliklerinin kontrolünün zor oluşu• Kütle transferini önleyebilir.• Enzimlerin kristalizasyonunu gerektirmesi

2.16. Glukoz Oksidaz Enzimi

Karbohidratlar, biyosferde en bol bulunan organik bileşiklerdir ve metabolik sistemlerin birçoğunda önemli rol oynarlar. Bu yüzden onların analizleri yaşam, gıda, tarım ve medikal bilimlerde büyük öneme sahiptir. Fizyolojik sıvılarda karbohidrat analizi, belirli hastalıkların tanısı ve ilaçların etkilerinin belirlenmesinde önemlidir. Örneğin, kan glukoz konsantrasyonunun bilinmesi, diyabet hastalığının izlenmesinde gereklidir ve rutin olarak yapılan analizdir. Glukozun nicel tayini biyokimya, klinik kimya, gıda ürünleri ve fermantasyonda çok önemli yere sahiptir. Refraktif indeks, UV-Vis ve kolorimetri gibi geleneksel karbohidrat tayin yöntemlerinin seçimliliği yoktur ve duyarlılığı düşüktür. Kromatografik metotlar ya da kapiler elektroforezde kullanılan

dedektöre bağılı olarak kompleks matrislerde tayinler zor olabilmektedir. Çünkü çok fazla sinyal algılanır ya da bazı analitler için tayin limitleri uygun değildir ve analitlerin türevlendirilmesine ihtiyaç duyulur. Ancak, uygun doku, mikroorganizma ya da enzimlerin biyobileşen olarak kullanıldığı biyosensör sistemleri ile bu tip sınırlamalar ortadan kaldırılabilir. Son yıllarda yapılan çalışmalar incelendiğinde dünyada biyosensör teknolojisine olan ilgi açıktır ki ülkemizde de bu konuda çalışmalar hızla artmaktadır. GOx, biyosensör çalışmalarında, farklı formlarda biyoanalitik cihazlarda, biyoyakıt araştırmalarında en çok kullanılan, glukoz oksidasyonunu gerçekleştiren enzimdir.

Glukoz oksidaz (GOx) (EC 1.1.3.4, β -D-glukoz: oksijen oksidoredüktaz) glukozun moleküler oksijen ile yükseltgenip glukono-1.5-lakton ve hidrojen peroksidin (H_2O_2) oluştuğu reaksiyonu katalizler. Lakton sulu ortamda herhangi bir enzime ihtiyaç duymaksızın hidroliz olarak glukonik aside dönüşür.

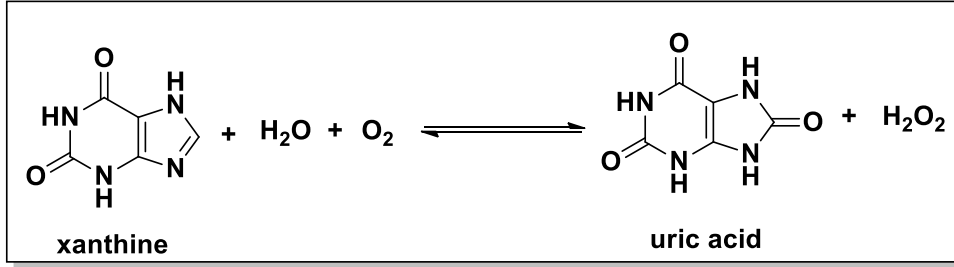
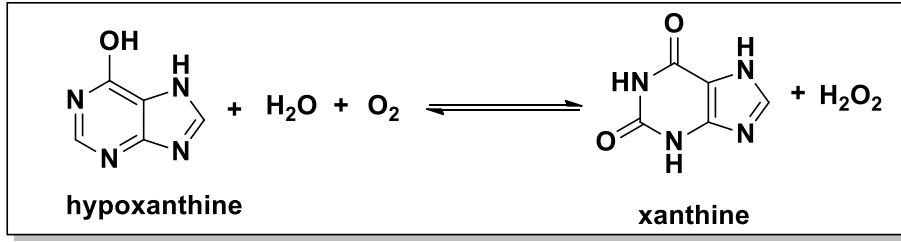


Şekil 2.39. Glukozdan glukonik asitin oluşmasının enzimatik mekanizması

Glukoz oksidazın katalitik merkezinde glutamat (Glu412), Glutamin (Gln329) Histidin (His 559 ve His 516) aminoasitleri ve bunların yakınlarında bir FAD molekülü bulunmaktadır. Enzim glukozu yükseltgerken glukoz üzerindeki elektronlar aktif merkez aminoasitleri tarafından FAD üzerine taşınırlar ve böylelikle FAD indirgenir. Hidrojen peroksit üretimine neden olan oksidaz enzimi temelli biyosensörler yaygın olarak kullanılmaktadır. 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.

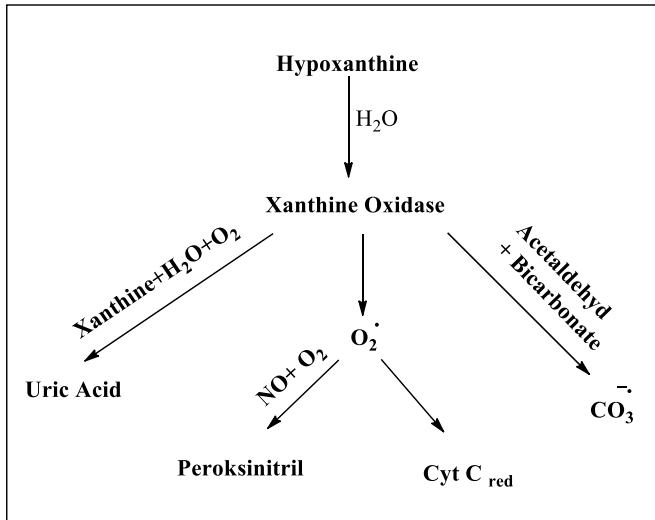
2.17. Ksantin Oksidaz Enzimi

Ksantin oksido-redüktaz sınıfının bir üyesi olan ve çoğunlukla hayvansal ürünlerden izole edilen bir enzim türüdür. Bu tip enzimler reaktif oksijen türleri üretirler. Bu enzimler hipoksantin oksidasyonu ile ksantine katalizler ve daha da fazlası ksantin oksidasyonu ile ürik aside dönüştürür. Ksantin oksidaz enzimi insan ve memeli vücudunda bulunan pürin bazlarının metabolizmasının kontrol edilmesinde önemli rol oynar. Ksantin oksidaz enziminin optimum pH değeri yaklaşık 8,3 izoelektrik noktası ise 5,3-5,4 olarak belirlenmiştir. Ksantin oksidaz enzim aktivitesi olarak tanımlanmaktadır (EC 1.17.3.2). Bu proteinler insanların DNA yapısında XHD sembolüyle kodlanmış HGNC ye sahiptir. Canlı metabolizmasındaki çoğu yaşamsal protein ksantin dehidrogenaz aktivitesinden oluşmuştur.



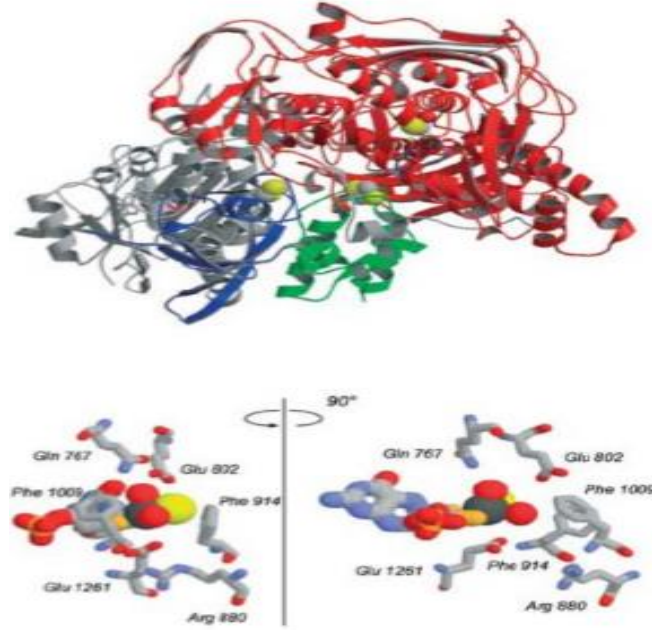
Şekil 2.40. Ksantin oksidaz tarafından katalizlenen reaksiyonlar

Ksantin oksidaz genel olarak düşük spesifilikte süperoksit üreten bir enzim türüdür. Diğer moleküllerle kombine edilerek enzimler ve reaktif oksidantlar oluşturulabilir. Bu sayede diğer substratlar okside edilir. Ksantin oksidaz ile katalize diğer bir reaksiyon, S nitrosotiyollerin reaktif azot türlerine ve nitrik aside bozulmasıdır. Buda aerobik şartlar altında peroksinitrit oluşturulması için bir süperoksit anyon ile olur. Ksantin oksidaz, aynı zamanda katalaz ve bikarbonat varlığında asetaldehid ile oksidasyonu sonunda güçlü bir elektron oksitleyici karbonat kökü anyon elde etmek için bulunmuştur.



Şekil 2.41. Ksantin oksidaz enzimin katalizlediği reaksiyonlar

Ksantin oksidaz enzimi flavoprotein yapısındadır. Bu yüzden yapısında FAD, Fe ve Mo ihtiva eden bir modeli vardır yapılan araştırmalar yapısında enzimatik birim başına 2 molibden atomu,8 demir atomu ve 2 FAD (Flavin) molekölü bağlanmıştır.



şekil 2.42. Ksantin oksidazın yapısı

Ksantin ve hipoksantin tayinleri tıbbi, biyolojik alanlarda ve gıda endüstrisinde önemli bir ilgiye sahiptir Ağır karaciğer hastalıkları sırasında kan içine ksantin oksidaz salınır. Yani herhangi bir kan tahlilinde ksantin oksidaz miktarının belirlenmesi karaciğer hasarı olmuş olup olmadığını belirlemek için bir yoldur. Ksantin ve hipoksantinden ürik asit dönüşümü olduğu için vücutta ürik asit kristallerinin fazla miktarda birikmesiyle oluşan gut hastalığının teşhisinde ksantin oksidaz enziminden faydalanılmaktadır. Aynı şekilde balıklarda ölüm sonrasında da devam eden pürin bozunması ürik asit oluşumuyla sonlanmaktadır. Bozunma sırasında hipoksantin ve ksantin oluşmakta ve bu maddelerin miktarları ksantin oksidaz enzimi ile belirlenmektedir. Bir organa ya da vücudun bir bölümüne atardamarlarla gelen kanın azalması ya da hiç gelmediği durumlarda dokular yeterince oksijen elde edemez ve kan aracılığıyla attıkları artık maddeleri temizleyemeyip biriktirmeye başlarlar. Bu olay sonrasında, dokuda oluşan

süperoksit radikallerinin büyük kısmının kaynağı ksantin oksidaz enzim sistemidir. *Xanthinuria* nadir görülen genetik bir bozukluktur. Ksantin oksidaz eksikliği kanda ksantin konsantrasyonunun artmasına yol açar. Bu durumda böbrek yetmezliği gibi sağlık sorunlarına neden olabilir. Serum ürik asit konsantrasyonunun da ki artış kardiyovasküler sağlık faktörlerinin bir göstergesi olarak araştırma kapsamındadır. Ve bu durum kalp nakli yapılan hastalarda daha fazladır.

Ksantin oksidaz aktivitesinin, ksantin ve hipoksantin tayinlerinin tıbbi, biyolojik ve gıda açısından önemi farklı tayin metotlarının geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Bunun için yapılan çalışmalar spektrofotometrik ve spektrofluorometrik metotlarını kapsamaktadır. Kullanılan bu yöntemlere ek olarak elektrokimyasal yöntemlerde kullanılmaktadır. Bu yöntemlerde ksantin oksidaz elektrodu ile yapılır ve enzimatik reaksiyon sonucu açığa çıkan hidrojen peroksidin yükseltgenmesiyle oluşan akımın ölçümü prensibine dayanmaktadır. Bu şekilde sonuçlar daha hızlı bir şekilde elde edilir ayrıca maliyeti de daha düşüktür. Ksantin oksidaz enzimi ile modifiye edilmiş farklı biyosensör sistemleri hazırlanmıştır. Hazırlanan bu biyosensörler de kullanıldığı substratlar (ksantin, hipoksantin) ya da analitler (balık, hücre kültürü, rat beyni), tayin için kullanılan teknik, uygulama potansiyeli, biyosensörün lineer aralığı ve biyosensörlerin ömrü verilerek bazı özellikler yönünden karşılaştırılması yapılmıştır.

2.18. Amperometrik Enzim Sensörleri

Enzim ile modifiye edilmiş elektrotlar amperometrik biyosensörlerin ve biyo yakıt hücrelerinin temel parçalarındandır. Enzim elektrotları elektrokimyasal prosesi immobilize enzim aktivitesi ile kombine eden minyatür kimyasal iletici sistemlerdir. Bu sistemler enzimin biyoloji fonksiyonu sayesinde biyolojik orijinli olan substrat modüllerine karşı genellikle yüksek seçicilik gösterir. Bu nedenle enzimlerin sahip olduğu bu özellik enzim sensörleri oluşturulmasında avantaj sağlar. Tipik olarak enzim reaksiyonunun kinetiği ürün oluşumunun ya da reaktantın eksilmesinin hızı olarak izlenir. Eğer ürün ya da reaktant elektroaktif ise reaksiyon direkt olarak amperometri ile izlenebilir. Böylece bu tip elektrokimyasal reaksiyonlar amperometrik biyosensörlerin oluşturulmasında kullanılabilir. Elektrokimyasal biyosensörlerin büyük bir kısmı

katalitik reaksiyon sırasında elektronlar kullanan yada üreten oksido-redüktaz sınıfı enzimleri içerir. Bu elektrokimyasal reaksiyonlar elektrot yüzeyinde gerçekleşir ve akım oluşturmak için kullanılır. Enzimatik oksidasyon sonucu açığa çıkan elektronlar anoda transfer edilir. Burada oksijen gibi yüksek bir elektron alıcısına taşınır.

Enzim elektrotlarının değişmez parçaları enzimler ve elektrot materyalidir. Elektrot materyalinin seçiminde önemli olan parametreler elektriksel iletkenlik ve materyalin sertliğidir. Bu nedenle altın (folyo yada çubuk), platin (folyo yada çubuk) yada karbon (kağıt, çubuk, pasta, metallenmiş karbon, camımsı karbon, karbon fiber, nanotüp film) gibi katı destek elektrotlar kullanılırlar. Enzim elektrotlarını oluşturmak amacıyla kullanılan enzimler analizlemek istediğimiz analitin reaksiyon tipine bağlı olarak seçilir. Amperometrik enzim biyosensörlerinin hazırlanmasında biyolojik materyal olarak en çok kullanılan enzimler Çizelge 2.3'de verilmiştir.

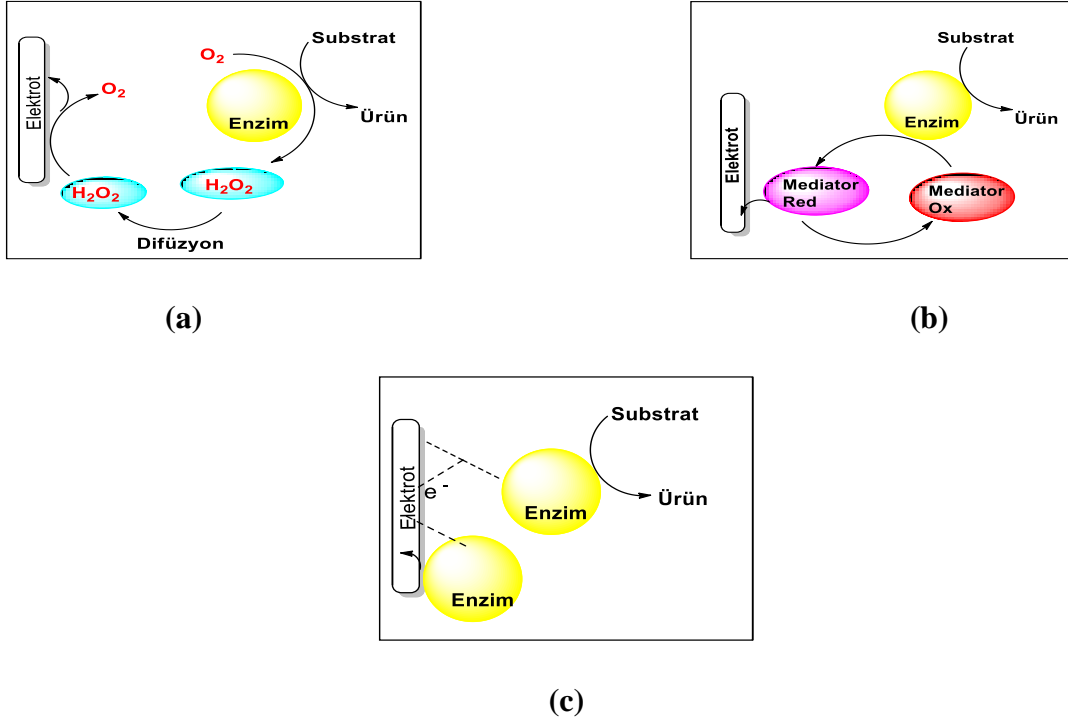
Çizelge 2.3. Amperometrik biyosensörlerde kullanılan çeşitli enzimler

Substrat	Enzim
Glukoz	Glukoz oksidaz ya da glukoz dehidrogenaz
Fruktoz	Fruktoz dehidrogenaz
Laktat	Laktat Oksidaz
Aldehit	Aldehit Dehidrojenaz
H ₂ O ₂	Peroksidaz
Kolin	Kolin Oksidaz
Üre	Üreaz
H ₂ O ₂ , florür, siyanür	Katalaz
Galaktoz	Galaktoz Oksidaz
Etanol, metanol, formaldehid	Alkol Oksidaz
Glutamat	Glutamat Oksidaz
Triptofan	Triptofan-2-monooksijenaz
Lizin	Lizin Oksidaz
Ksantin, Hipoksantin	Ksantin oksidaz
Alkol	Alkol Dehidrogenaz
Bilirubin	Bilirubin Oksidaz
Fenolik bileşikler	Lakkaz
Tiyolik bileşikler	Sülfidril oksidaz
İndirgenmiş Glutatiyon	Glutatiyon redüktaz
Homosistein	L-homosistein desülfüraz
Fenolik bileşikler	Tirozinaz
Histamin	Monoamin oksidaz
Gliserol	Gliserol dehidrogenaz

Redoks enzimleri (oksidoreduktazlar) en çok kullanılan enzimlerdir. Ayrıca lipazlar ve esterazlar gibi hidrolaz sınıfı enzimler de redoks enzimleri ile beraber kullanılabilir. Tüm bu enzimlerin içinde glukoz oksidaz kan glukoz tayininin öneminden dolayı en çok kullanılan enzimdir. Enzim elektrotlarının en önemli problemi ko-substrat olarak oksijene ihtiyaç duymaları ve reaksiyonun amperometrik yöntemlerle izlenmesinin hidrojen peroksit dayalı olmasıdır. Bu problem medyatörler kullanılarak aşılmaya çalışılmaktadır.

Enzim sensörleri hazırlanırken immobilizasyon materyali olarak iletken polimerler, fonksiyonelleştirilmiş polimerler, kompozit materyaller, sol-gel ve nanomateryaller kullanılabilir.

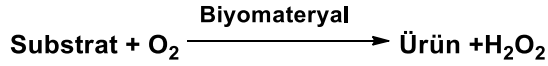
Amperometrik enzim biyosensörlerinin üç gruba ayrıldığı görülür. Bunlar Birinci Nesil, İkinci Nesil ve Üçüncü Nesil enzim elektrotları olarak adlandırılır.



Şekil 2.43. Enzim biyosensörlerindeki gelişimin şematik gösterilişi (a) 1. Nesil biyosensörler, (b) 2. nesil biyosensörler, (c) 3. nesil biyosensörler

2.18.1. Birinci Nesil Amperometrik Biyosensörler

Bu sistemlerde substratın ürüne dönüşümü sırasında ortamda bulunan moleküler oksijen (O_2) hidrojen peroksit (H_2O_2) indirgenir. Azalan O_2 derişiminin ya da artan H_2O_2 derişimin ölçülmesi ile ürüne dönüştürülen substrat miktarı belirlenebilir.(Şekil 2.43a)



2.18.2. İkinci Nesil Amperometrik Biyosensör

Bu sistemler aynı zamanda aracılı enzim elektrotları olarak adlandırılır. Enzimatik reaksiyonda elektron transferi oksijen yerine ortamda bulunan diğer bir oksitleyici reaktif tarafından gerçekleştirilir (Şekil 2.43b). Bu reaktiflere medyatör adı verilir. Medyatörler koenzimlerin rejenere olmasını sağlarlar kullanılacak medyatörlerin ortamda ki oksijenle reaksiyon vermemesi, indirgenmiş ve yükseltgenmiş formlarının kararlı olması indirgenmiş koenzim ile hızlı reaksiyon verebilmesi gibi özellikleri barındırması gerekir. Ferrosen bileşikleri en sık kullanılan medyatörlerdir.

2.18.3. Üçüncü Nesil Amperometrik Biyosensör

Bu sistemlerin temelini enzim redoks merkezi ile elektrot yüzeyi arasında doğrudan bir etkileşim kurulması oluşturur (Şekil 2.43c). Bu ilişki genellikle organik iletken tuzlar sayesinde kurulur. Söz konusu maddeler ortamda sıcaklığında genellikle metalik özellikler gösterdiklerinden genellikle organik metaller olarak adlandırılır.

2.19. Mikroorganizma Temelli Sensörler

Mikroorganizmalar, organizmalar ve hücre bazlı biyosensörler içinde en çok kullanılan biyoreseptör sınıfını oluşturmaktadır. Mikroorganizmaların, biyoreseptör olarak kullanılabilmesi için en önemli şart onların biyokimyasal yanıtı fiziksel sinyale dönüştüren elektrokimyasal transduser ile etkin bir şekilde entegre olabilmeleridir. Elektrokimyasal yaklaşımlar mikrobiyal biyosensör geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılabilir. Amperometri, elektrokimyasal mikrobiyal biyosensörlerde en çok kullanılan tekniktir. Çizelge 2.4 de özetlenmiştir.

Çizelge 2.4. Amperometrik mikroorganizma temelli biyosensör örnekleri

Hedef Analit	Mikroorganizma	Elektrot	Tayin Limiti	Tayin Aralığı	Referans
Galactose	<i>P.Putida</i>	CNT-GE	-	0,5-6mM	Timur ve ark. (2007)
Glucose	<i>G.Oxydans</i>	GE	-	0,25-4mM	Tuncağıl ve ark.(2009)
Glucose	<i>G.Oxydans</i>	GE	-	0,05-1 mM	Odacı ve ark.(2009)
Glucose	<i>P.Putia</i>	Cys-Au	-	1-7,5 mM	Timur ve ark.(2007)
Glucose	<i>P.Putia</i>	CNT-CPE		0,05-2 mM	Timur ve ark. (2007)
Mannos	<i>P.Flouorescens</i>	GE		0,2-1 mM	Odacı ve ark. (2008)
Etanol	<i>G.Oxydans</i>	GCE	3,3µM	10µM-1,5mM	Valach ve ark.(2009)
Vitamin B1	<i>S.Cerevisiae</i>	DOE		5-100 mM	Akyılmaz ve ark. (2006)
Caffein	<i>P.Alcaligenes</i>	COE		0,1-1mg/ml	Babu ve ark. (2007)
L-lactate	<i>H.polymorpHa</i>	GE		6 µM-1,6 mM	Smutok ve ark.(2007)
L-Lysine	<i>S.Cerevisiae</i>	DOE		1-10 µM	Akyılmaz ve ark.(2007)

Amperometrik mikrobiyal biyosensörleri yaygın olarak çevre uygulamaları için kullanılmışlardır. Petrol katkı maddeleri, pestisitler, kas hastalıklarına sebep olan sentetik organofosfor bileşikler için dünya çapında sıklıkla kullanılmaktadır.

Amperometrik mikrobiyal biyosensörler aynı zamanda sağlık ve fermantasyon uygulamalarında da hızlı ve duyarlı ölçüm sistemleri olabilirler. Gıda ve fermantasyonun kalite kontrolünde ve diyabetin tanısında, glukozun tespiti büyük önem taşımaktadır. Ayrıca global biyosensör pazarının %85 ini bu sektörde ki biyosensör uygulamaları oluşturmaktadır. Glukoz tespiti için çok çeşitli mikrobiyal biyosensör solunum aktivitesiyle oksijen tüketiminin ilişkilendirilmesiyle rapor edilmiştir. Biyoreseptör olarak *Pseudomonas Fluorescens* ve *Gluconobacter Oxydans* kullanıldığı çeşitli sistemler mevcuttur. Bu sistemlerin hemen tamamında amperometrik yanıtı güçlendirmek için elektrotlar, CNT'ler veya CP'lerle modifiye edilmişlerdir. Bu tip mikrobiyal biyosensörlerin çalışma potansiyeli genellikle -0,7 V (Ag/AgCl,3M KCl) civarındadır. Ancak pek çok madde bu potansiyelde indirgendiği için bu durum önemli bir girişim sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Çalışma potansiyelinin değerini düşürmek için osminyum redoks polimerleri, ferrosen ve 2,5- dibromo-1,4-benzokinon gibi çeşitli mediyatörler biyosensörlere entegre edilerek kullanılmıştır.

Genel olarak glukozun karbon kaynağı olarak kullanılan bakteriler ayrıca galaktoz, katekol, mannoz ve ksiloz gibi diğer karbon kaynaklarını da metabolize edebilecek genetik yeterliliğe sahiptirler. Bu maddelerin tayini için geliştirilmiş çeşitli mikrobiyal biyosensörler de mevcuttur. Bakterilerin özel besiyerinde istenen uygun karbon kaynağına adaptasyonlarının sağlanmasıyla söz konusu maddeler için seçici mikrobiyal biyosensörler geliştirilebilir. Birçok alanda alkollerin yüksek duyarlılık seçicilik ve doğruluk ile tayinlerine gereksinim duyulmaktadır. *G.Oxydans*, *Pichia Angutsa* ve *Candida Tropicalis* gibi mikroorganizmalar etanolü oksijen varlığında metabolize edebilirler ve bu özellikleri kullanılarak değişik biyosensörler için biyoreseptör görevi görmüşlerdir. Ayrıca FIA sisteminde etanol ölçümü için mediyatör olarak ferrisiyanürün kullanıldığı *G.Oxydans* temelli amperometrik bir biyosensör de geliştirilmiştir.

2.20. Biyoreseptör Olarak Mikroorganizma Kullanılmasının Avantajları

Bir mikrobiyal biyosensör, elektrot yüzeyine (transdüser) canlı veya cansız mikrobiyal hücrelerin immobilizasyonu esasına dayanmaktadır. Mikroorganizmaların değişik pH ve sıcaklık aralıklarında çalışma imkânı sağlamaları enzimlere kıyasla onları daha kullanışlı kılar. Mikroorganizmalar, kolay immobilize edilebilmeleri, yapılarında birçok enzimi bir arada bulundurmaları ve dayanıklı olmaları nedeni ile tercih edilirler. Enzimler biyosensör sistemlerinde en çok kullanılan biyomoleküller olmalarına rağmen çalışma basamakları oldukça zorlayıcı ve yüksek maliyetlidir. Bu nedenle mikroorganizmaların duyarlılığı yüksek olan enzimlerin yerine kullanılabilmesi biyosensör sistemleri açısından çok büyük önem taşır. Mikroorganizmaların immobilizasyonu kısa sürede kolaylıkla gerçekleştirilebilmektedir.

Mikrobiyal sensörlerin enzim sensörlerine göre bazı avantajları vardır:

- ✓ Enzimler doğal ortamlarında bulunacaklarından dış etkilere karşı daha dayanıklıdır.
- ✓ Koenzimlerle çalışan enzimler için dışarıdan koenzim ilavesi gerekmez, koenzim rejenerasyonu hücre içinde olur.
- ✓ Enzim elektrodlarından genelde uzun ömürlüdürler.
- ✓ Saf enzim yerine hücre kullanılması ekonomiktir.

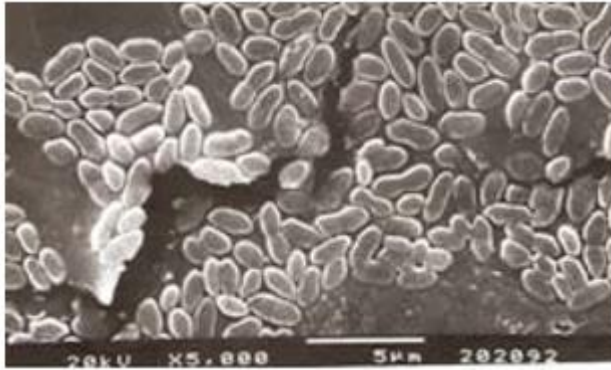
Enzim sensörlerine göre bazı dezavantajlara da sahiptirler:

- ✓ Hücre membranı difüzyon bariyeri oluşturduğundan membrandan geçemeyen moleküller için uygun sensör hazırlanamaz.
- ✓ Mikrobiyal sensörlerin cevap süresi enzim sensörlerinden daha uzundur.
- ✓ Hücre birçok enzim içerdiğinden hedef reaksiyonun diğer enzimlerce etkilenmesi söz konusudur.

2.21. Gluconobacter Oxydans

Gluconobacter Oxydans *Acetobacteraceae* ailesine ait gram- negatif türü bir bakteridir. *G.Oxydans* yapısal olarak çubuk ya da değişen oval şekilli bakterilerdir. Bunların sınırlı metabolik yetenekleri olduğu için küçük bir genom boyutunda olma eğilimindedir. Hareketli veya hareketsiz olabilir. Endospor oluşturmazlar. Bu bakteriler kemoorganotropiktir ve oksijenin son elektron alıcısı olduğu solunum metabolizmasına sahip, zorunlu aerobtur (De Muynck ve ark., 2008; Odaci, 2010).

Bu özellikleri ile oksidatif fermantasyon sürecinde kısmen oksitleyici karbohidrat ve alkoller içerir. Ve bunlar C Vitamini, *D*-Glukonik asit ve keto glukonik asitlerin sentezleri için kullanılmaktadır. *G. Oxydans* çiçek, meyve, bahçe toprağı, alkollü içecekler, elma şarabı ve alkolsüz içecekler bulunur. *G. Oxydans* en önemli özelliğı ile tamamen karbon substratların okside olmasıdır. Karbon substratlara örnek verecek olursak *D*- sorbitol, Gliserol, *D*- früktoz ve *D*-glukozun Bu özellikleriyle endüstriyel biyoteknoloji de en fazla kullanılan mikroorganizma sınıfına girmektedir.



Şekil 2.44. *G. Oxydans* hücrelerinin görünümü

G. Oxydans hücrelerinde elektron taşıma sisteminin kompozisyonu hala kesin değildir. Bu tür bakteriler aerobik solunum yaptıkları için enerji elde etmek için okside olmaları gerekir.

Gluconobacter Oxydans en önemli yıkım yollardan biri olan pentoz fosfat yolu ile şekerlerin ve poliollerin yıkımını gerçekleştirir. Bu yöntemde oksidasyon ürünü olarak

şekerler, alifatik ve siklik alkoller, steroidler oluşur. Diğer bir yöntem de pentoz fosfat yolunda substratlar (polioller ve şekerler) çoğu zaman önce özel kinaz enzimleriyle fosforilasyonu olur daha sonra dehidrogenazlar ve izomerazlar kullanılarak parçalanır. Pentoz fosfat yolu dışında, *G. Oxydans* birçok membrana bağlı dehidrogenaz enzimleri içerir ve bu enzimler alkoller ve şekerleri kısmi olarak okside eder. Ürün olarak oluşan aldehytler, ketonlar ve asitler hücreden boşaltılır. Bunlar glutamat, aspartat ve süksinat biyosentezleri için temelde sorumludurlar. Bundan dolayı trikarboksilik asit döngüsü boyunca bu özelliklere sahiptir.

Dihidroksi asetondan okside gliserole doğru ilerleyen bir süreçte, sorbitol, glukonat ve arabitol oksitlemek için membrana gliserol dehidrogenaz bağlanır. *G. Oxydans* birçok membrana bağlı dehidrojenazları içerir ki bunlar biyoteknolojik deneylerde substratların tamamlanmamış oksidasyonu için çok yararlıdır. *G.Oxydans* hücrelerinin kullanıldığı biyosensör uygulamalarında çeşitli immobilizasyon yöntemleri kullanılarak *D*-Glukoz, *D*-Fruktoz, *D*-ksiloz, laktat, etanol, gliserol, sükroz ve laktoz tayinine yönelik biyosensörler hazırlanabilir. *Gluconobacter* türlerinde alkol oksidasyonu, glukoz oksidasyonunda olduğu gibi farklı metabolik yollarla gerçekleştirilir. Birinci yolda alkol sitoplazmik membran yolu ile taşınır ve sitozolik alkol ve aldehid dehidrogenazlarla oksidasyonu gerçekleştirilir. İkinci yolda ise membrana bağlı dehidrogenazlarla periplazmik boşlukta direkt oksidasyon yapılır.

3. ATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Cihazlar

Elektrokimyasal Ölçüm Cihazı

Amperometrik ölçüm işlemlerinde Palm-Sens PcTrace 4,6 elektrokimyasal analiz cihazı kullanıldı. Camsı karbon ya da grafit elektrotlar çalışma elektrodu olarak, Ag/AgCl elektrotlar (İç çözelti olarak doygun AgCl içeren 3M KCl çözeltisi kullanılan Radiometer Analytical Elektrotlar, REF321) referans elektrot olarak ve platin elektrotlar (Metrohm, İsviçre) karşıt elektrot olarak kullanıldı.

Terazi

Hassas tartım işlemlerinde 0,0000 hassasiyete sahip Metler Toledo JB1603-C/FACT marka hassas terazi kullanıldı.

Erime Noktası Tayin Cihazı

Erime noktası tayinleri, Electrothermal 9100 marka cihaz ile yapıldı.

Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spektroskopisi

IR spektrumları KBr paletleri halinde Perkin Elmer Spectrum 100 FT-IR spektrometresinden alındı.

Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi

^1H NMR ve ^{13}C NMR spektrumları çözücü olarak CDCl_3 ve DMSO-d₆ kullanılarak Varian ve Bruker 400 MHz spektrometre ile alındı. NMR spektrumunda kayma değerleri (δ) ppm cinsinden belirtildi.

pH Metre

Tampon çözeltilerinin pH'larının ölçülmesinde Thermo marka Orion model 720A pH metre cihazı kullanıldı.

Fotolüminesans Spektroskopisi

Sentezlenen bileşiklerin fotofizksel özellikleri UV-Vis spektroskopi (çift ışın yollu UV-Vis Spektrofotometresi Perkin Elmer Lambda 25) ve Fotolüminesans Spektroskopisi Shimadzu RF-5301PC spektrofluorometre cihazları kullanıldı.

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler; Merck, Fluka, Aldrich ya da Acros gibi yabancı firmalardan satın alındı. Gerekli olan bazı başlangıç maddeleri ise laboratuvar şartlarında sentezlendi. Başlangıç maddeleri ve ara maddelerin sentezi inert atmosfer gerektirdiğinden tüm cam malzemeler 110⁰C'de etüvde bir gece bekletildikten sonra kullanıldı. Maddeler reaksiyon ortamına kuru enjektörler yardımıyla eklendi.

Çözücülerin çoğu kuru olarak kullanıldı.

- Kloroform, metanol, etil asetat ve hekzan gibi ekstra saf özellikteki çözücüler önce destillenmiş sonra 4Å moleküler sieve üzerinde saklandı.
- Toluen ise CaH₂ üzerinden destillenip kurutulduktan sonra N₂ atmosferi altında 4Å moleküler sieve veya sodyum parçacıkları üzerinde muhafaza edildi.
- Aseton susuz CaCl₂ üzerinden destillenip 4Å moleküler sieve içerisinde saklandı.
- THF ise kurulan özel düzenek ile sodyum metali üzerinden destile edilip kullanıldı.

Katı maddeler 1-2 gün 110⁰C'de etüvde bekletildikten sonra desikant olarak MgSO₄, CaCl₂ kullanılan vakum desikatöründe muhafaza edildi.

Reaksiyonlar İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) ile izlenerek ürünlerin pek çoğu kolon ve flaş kromatografi ile saflaştırıldı. İTK'da TLC aluminium sheet Merck 60 F254 silikajel kartlar kullanılırken kolon ve flaş kromatografide adsorban olarak silikajel 60 (230-400 Mesh) kullanılmıştır. Reaksiyon sonrası ekstraksiyon işlemlerinde organik fazı kurutmak için susuz MgSO₄ kullanıldı.

Çalışmada kullanılan elektrot yüzeylerinin temizlenmesi için BASİ marka temizleme kitleri (MF-2060 PK- 4) kullanıldı.

3.3. Kullanılan Çözeltiler

3.3.1. Fosfat Tampon Çözeltisi

PBS (Fosfat Tampon Çözeltisi) tamponu biyolojik uygulamalarda canlı organizmadaki pH koşullarını sağladığı için kullanılmaktadır. In vitro hücre kültürü çalışmalarında hücrelere uygulanacak örnekler PBS tamponunda hazırlanır. Tampon hazırlamak için aşağıdaki maddeler belirtilen miktarlarda tartılarak bir beherin içine alındı.

Malzemeler: NaCl 8,0 g/L, KCl 0,2 g/L, Na₂HPO₄ 1,44 g/L, KH₂PO₄ 0,24 g/L, 500 mL tampon hazırlamak için beherin üzerine yaklaşık 490 mL distile su eklendi. Daha sonra manyetik karıştırıcıda çözününceye kadar karıştırıldı. Çözündükten sonra beherdeki çözelti 500 mL'ye tamamlandı. Daha sonra uygun bir şişeye alınarak denemelerde kullanmak üzere +4°C buzdolabında saklandı.

3.3.2. Asetat Tampon Çözeltisi

Sodyum asetat belli miktarlarda tartılarak saf suda çözüldü, hazırlanan çözeltinin pH'sı 0,1 M Asetik Asit ile 7,0 olarak ayarlandı ve çözeltideki analitik derişimi 0,1 M olacak şekilde seyreltildi. Farklı pH ve derişimlerdeki tampon çözeltileri hazırlamak için aynı yol izlendi. Tampon çözeltiler buzdolabında +4 °C'de saklandı.

3.3.3. Glukoz Çözeltisi

Belli bir miktarda tartılan glukoz pH'sı 7,0 olan 0,1 M fosfat tamponuyla 1 M'lık çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltiden seyreltme işlemi yapılarak istenilen derişimdeki glukoz çözeltileri hazırlandı. Farklı pH'daki glukoz çözeltileri hazırlamak içinde aynı yol izlendi. Hazırlanan glukoz çözeltileri mutarotasyon için 24 saat oda sıcaklığında bekletildi ve en fazla 7 gün kullanıldı. Bu süre içinde buzdolabında +4 °C de muhafaza edildi.

3.3.4. Glukoz Oksidaz Enzim Çözeltisi

Glukoz oksidaz enzimi (*Aspergillus Niger*) 1 mg tartıldı ve 5 ml pH 7,0 olan fosfat tamponunda çözüldü. Deney sırasında kullanılacak olan enzim çözeltisi buzdolabında +4 °C de bekletildi. Uzun süre kullanılmadığı zaman çözelti derin dondurucuda -20 °C de muhafaza edildi.

3.3.5. Ksantin Oksidaz Enzim Çözeltisi

Deneyisel çalışma boyunca hazırlanan enzim biyosensörlerinde kullanılan ksantin oksidaz enzimi 1 mg tartılıp pH 7,0 olan 0,01 M fosfat tampon çözeltisi içerisinde çözümlenerek hazırlandı. Ksantin oksidaz çözeltisi seri çalışmalar için günlük olarak hazırlanmış ve çalışmalar boyunca -18 °C’de muhafaza edildi.

3.3.6. Ksantin Çözeltisi

Ksantin çözeltilerinin hazırlanmasında derişimi $1,0 \times 10^{-2}$ olacak şekilde 50 ml stok çözelti hazırlandı bunun için, ksantinden uygun miktarda tartıldı ultra saf su ve 0,1 M NaOH çözeltisi kullanılarak çözüldü. Ve çalışmalar boyunca +4 °C’de muhafaza edildi.

3.3.7. Gluteraldehit Çözeltisi

Derişik Gluteraldehit çözeltisinden uygun miktarlarda alınarak %2,5 ve %1’lik gluteraldehit çözeltileri hazırlandı.

3.3.8. Diğer Çözeltiler

Askorbik asit, ksilol, metanol, 3-asetamidofenol, sodyum benzoat, $1,0 \times 10^{-2}$ M stok çözeltileri, söz konusu maddelerin uygun miktarları tartılarak saf suda çözünmesiyle hazırlandı.

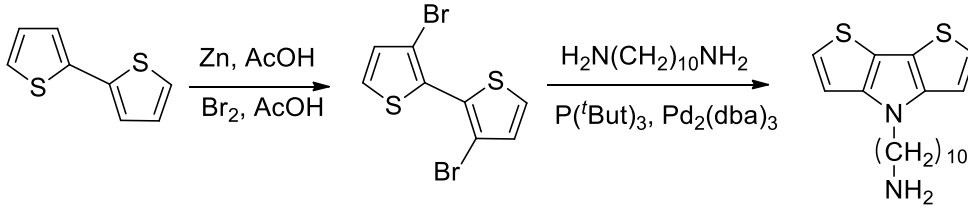
Ürik asit çözeltisinin hazır katı ürik asitten belli bir miktar tartılarak 0,1 M sodyum hidroksit çözeltisinde çözüldükten sonra derişimi 0,1 M pH:7,4 olan fosfat tamponu ile tamamlanarak derişimi 1×10^{-3} M olan 25 mL stok ürik asit çözeltisi hazırlandı.

3.4. *Gluconobacter Oxydans* Hücrelerinin Kültivasyonu

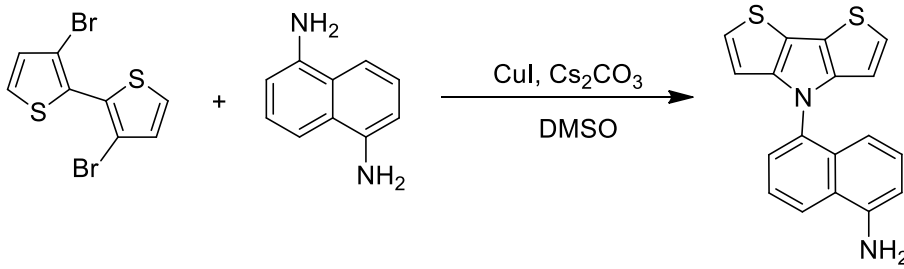
G.Oxydans hücreleri için büyüme ortamı için agar ortamı hazırlandı. Bunun için 100 gr *D*-Glukoz (g/L); 10 gr maya ekstratı (g/L); 20 gr kalsiyum karbonat (g/L); 20 gr agar (g/L).Büyüme ortamı için; 5 gr *D*-Glukoz (g/L); 5gr maya ekstratı (g/L). Stok kültürler yatık agarda 28 °C'de 24 saat boyunca inkübe edildi. Hücreler yatık agardan 5 ml lik büyüme ortamına alınarak 28 °C' de,175 rpm çalkalamalı inkübatörde 24 saat boyunca inkübe edildi. Hücreler 50 ml lik büyüme ortamına alınarak 28 °C'de 175 rpm 17 saat boyunca üremeye bırakıldı. *G.Oxydans* hücrelerinin 17. saatinde büyüme ortamından alınarak 10 ml alınarak % 0,9 luk NaCl çözeltisi ile yapılan seyreltmelerden dökme plaka yöntemine göre petrilere pipetlendi ve üzerine 45 °C'de besi agarı döküldükten sonra petrilere 28 °C'de 12 saat inkübe edildi. Hücrelerin büyümeleri spektrofotometrik olarak 600 nm'de absorbansları okunarak izlendi.

3.5. DTP Türevlerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

Bu tez çalışması kapsamında 10-(4H-Ditiyeno[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin ve 5-(4H-ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)naftalin-1-amin bileşiklerinin Pd ve CuI gibi katalizörler kullanılarak Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'de gösterildiği gibi sentezi 1 ekivalent 3,3'-Dibrom-2,2'-bitiyofen ve 1 ekivalent diamin bileşiklerinin kapling reaksiyonu ile DTP-Aril-NH₂ ditiyolpirol ve DTP-Alkil-NH₂ monomerleri sentezlendi (Azak ve ark., 2013;Udum ve Ark.,2014).



Şekil 3.1. DTP-Alkil-NH₂ ditiyolpirol bileşik sentez şeması



Şekil 3.2. DTP-Arilyl-NH₂ ditiyolpirol bileşik sentez şeması

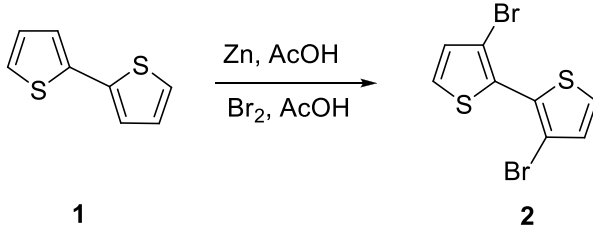
3.5.1. 3,3'-Dibrom-2,2'-bitiyofen Sentezi

Karbon-brom bağı, organik kimyada karbon-karbon ve karbon heteroatom bağları oluşturmada kullanılan en önemli işlevsel gruplardan birisidir. 2,2'-Bitiyofen, glisyal asetik asit içerisinde brom ve çinko ilave edilerek, 3,3'-dibrom-2,2'-bitiyofen bileşiğinin sentezi aşağıda anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

1,39 g (8,36 mmol) 2,2'-bitiyofen (1), 10 mL glisyal asetik asit içerisinde çözülerek, karışıma 10 mL glisyal asetik asit içerisinde çözülmüş 4,80 g (30,80 mmol) brom oda sıcaklığında 20 dakikada damlatılarak ilave edildi. Karışım 16 saat oda sıcaklığında, daha sonra 24 saat yağ banyosunda 90 °C'de karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığına soğutulup üzerine 0,41 g (6,33 mmol) çinko tozu yavaş yavaş ilave edildi. Karışım yağ banyosunda 16 saat 90 °C'de karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığına soğutuldu. Karışımın glisyal asetik asit çözücüsü vakumda uzaklaştırıldı. Karışım 100 mL CH₂Cl₂'de çözülüp, %10'luk KOH (2x50 mL) ve su (1x50 mL) ile yıkandı. Organik faz MgSO₄ ile kurutulup, çözücüsü vakumda uzaklaştırıldı. Ham ürün etanolden kristallendirildi ve

%85 verimle 3,20 gr ürün elde edildi. Ve elde edilen açık gri renkli kristallerin erime noktası 102 °C olarak bulundu.

Şekil 3.3'te 3,3'-dibrom-2,2'-bitiyofen (2) sentezi gösterilmiştir.

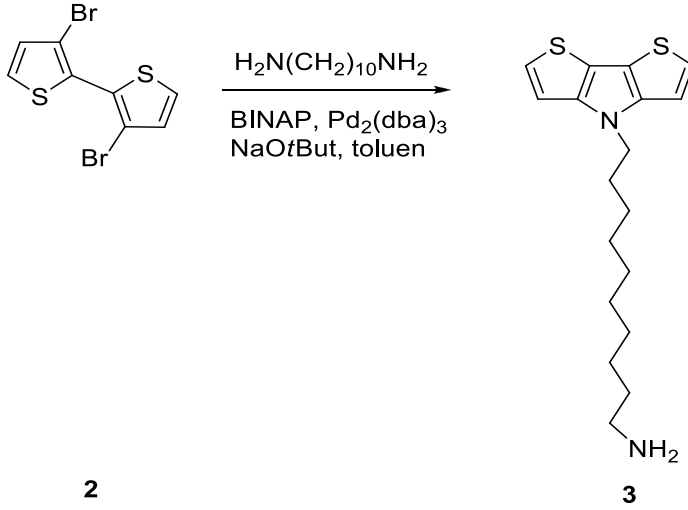


Şekil 3.3. 3,3'-dibrom-2,2'-bitiyofen (2) sentezi

3.5.2. 10-(4H-Ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin Sentezi

100 mg (0,31 mmol) 3,3'-Dibrom-2,2'-bitiyofen ve 53 mg (0,31 mmol) 1,10-diaminodekan bileşiği üzerine sırasıyla; BINAP 14 mg (0,02 mmol), Pd₂(dba)₃ 14 mg ve (0,015 mmol), t-BuONa 65 mg (0,67 mmol) 4 mL kuru toluen içerisinde çözüldü. Karışımın içerisinde 10 dakika azot gazı geçirildi ve azot atmosferinde yağ banyosunda 130 °C'de 5 gün karıştırıldı. Reaksiyonun ilerleyişi TLC ile takip edilerek başlangıç maddesinin bittiği anda reaksiyon durduruldu ve çözücü vakum altında uzaklaştırıldı. Ham ürün 30 mL EtOAc ile çözülerek su (1x20 mL) ile yıkandı. Su fazı tekrar EtOAc (2x30 mL) yıkandı. MgSO₄ ile kurutulan organik çözeltilerin çözücüsü vakumda uzaklaştırıldı. Ham ürün silikajel (20 g) kolondan metanol ile elüe edildi. Organik çözücü vakumda uzaklaştırılarak %45 verimle 46 mg elde edildi. Metanol/heksanda kristallendirilen sarı renkli kristallerin erime noktası 147 °C olarak bulundu.

Şekil 3.4. 10-(4H-Ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin(3)sentezi gösterilmiştir.



Şekil 3.4. 10-(4H-Ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin (3) sentezi

3.5.3. 5-(4H-ditiyol [3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)naftalin-1-amin Sentezi

200 mg (0,617 mmol) 3,3'-dibromo-2,2'-bitiyofen (2) bileşiği ve 195 mg (1,233 mmol) 1,5-diaminonaftalin (4) bileşiği üzerine sırasıyla Cs₂CO₃ 400 mg (1,134 mmol), CuI 20 mg (0,105 mmol), L-pirolin 15 mg (0,13 mmol) ilave edildi ve 2 mL DMSO içerisinde çözülen karışım azot gazı geçirilerek geri soğutucu altında 110 °C'yi aşmayacak şekilde 8 gün süreyle reflüks edildi. Bu süre boyunca reaksiyonun ilerleyişi TLC ile takip edilerek başlangıç maddesinin bittiği anda reaksiyon durduruldu ve doygun NaCl çözeltisiyle doyurulup EtOAc (3x30 mL) ile ekstraksiyon yapıldı, MgSO₄ ile kurutuldu. Organik fazın çözücüsü vakum altında uzaklaştırıldı. Balonda bulunan madde metilen klorür ve n-Hekzan ile kristallendirildi. Üst faz alınarak organik çözücü vakumda uzaklaştırıldı ve %30 verimle 118 mg olarak elde edildi.

Şekil 3.5'te 5-(4H-ditiyol [3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)naftalin-1-amin (5) sentezi gösterilmiştir.

3.8. Elektropolimerizasyon ile Elektrotların Hazırlanması

3.8.1. 10-(4H-Ditieno[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin Monomerinin Elektropolimerizasyonu

10-(4H-Ditieno[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin monomerinin elektropolimerizasyonu için , camısı elektrot yüzeyi temizlendikten sonra 0,387g TBAPF₆, 2,50 mg monomer asetonitril çözeltisi içinde hazırlandıktan sonra döngüsel voltammetrik yöntemle -1,0 ile 1,0 V arasında 0,1 V/s tarama hızında 20 döngü ile elektropolimerizasyon işlemi uygulanarak elektrot yüzeyi monomer ile modifiye edildi.

3.8.2. 5-(4H-ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)naftalin-1-amin Monomerinin Elektropolimerizasyonu

Camsı elektrot yüzeyi temizlendikten sonra 0,387g TBAPF₆, 2,50 mg monomer asetonitril çözeltisi içinde hazırlandıktan sonra döngüsel voltammetrik yöntemle -1,0 ile 1,0 V arasında 0,1 V/s tarama hızında 20 döngü ile elektropolimerizasyon işlemi uygulanarak elektrot yüzeyi monomer ile modifiye edildi.

3.9. Hazırlanan Biyosensörler

Bu tez çalışması kapsamında glukoz ve ksantin tayinine yönelik olarak hazırlanan biyosensör sistemleri iki sınıfta toplanmaktadır.

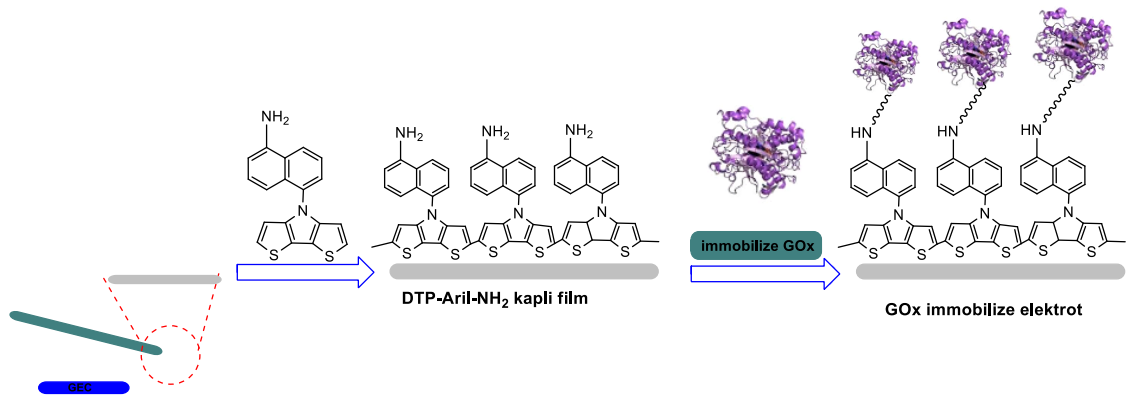
3.9.1. Enzim Biyosensörler

Glukoz Oksidaz Enzim Biyosensörlerinin Hazırlanması

Glukoz tayinine yönelik poly (DTP-Alkil- NH₂) ve poly (DTP-Aril-NH₂) ile modifiye edilmiş camı karbon elektrotları temel alan glukoz oksidaz enzim biyosensörleri hazırlandı ve glukoz tespiti için optimum parametreler belirlendi.

Bunun için, polimerizasyon işleminden sonra glukoz oksidaz enziminin immobilizasyonu için, 1mg/mL enzim ve %1'lik 5 µL glutaraldehit içeren fosfat tampon çözeltisini (50 mM, pH 7,0) iletken polimerle kaplanmış camı elektrot üzerine yayarak ve oda sıcaklığında 1 saat boyunca kurutmaya bırakılarak yapıldı. Elektrot yüzeyi destile su ile yıkanarak çalışma sıcaklığı ve tamponunda 10 dakika bekletildi (Her iki monomer içinde aynı işlemler ayrı ayrı gerçekleştirildi).

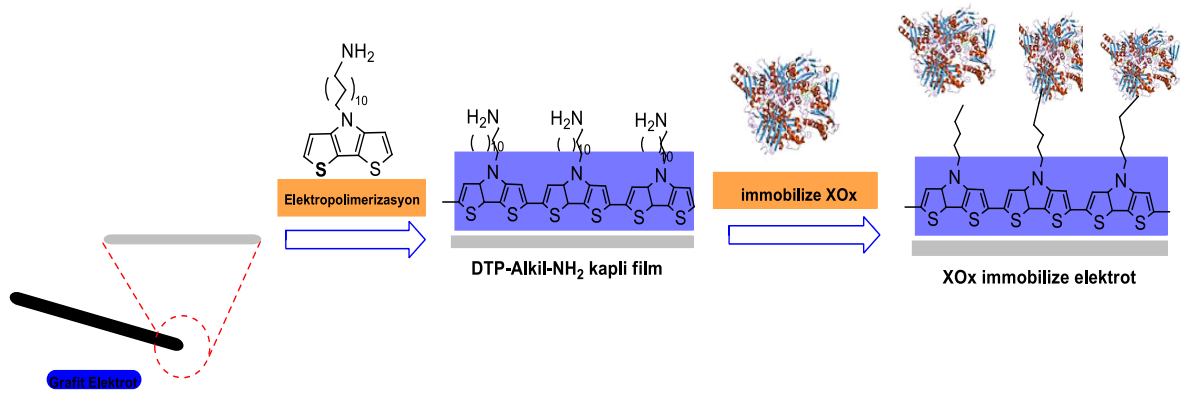
Bu çalışmada DTP-Alkil-NH₂ ve DTP-Aril-NH₂ monomerlerinin elektrokimyasal olarak polimerleşmesiyle elde edilen iletken polimerin serbest amin grupları olması sebebiyle enzim immobilizasyonu yukarıda anlatılan işlem sayesinde kolaylıkla olmuştur.



Şekil 3.6. poly(DTP-Aril-NH₂) glukoz oksidaz enzim elektrodunun hazırlanması

Ksantin Oksidaz Enzim Biyosensörünün Hazırlanması

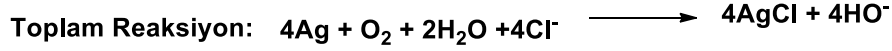
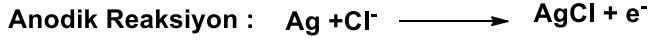
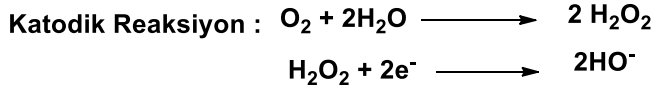
Polimerizasyon işleminden sonra ksantin oksidaz enziminin immobilizasyonu için, %2,5 lik 5 µL glutaraldehit içeren potasyum fosfat tampon çözeltisini (10 mM, pH 7,0) iletken polimerle kaplanmış grafit elektrot üzerine yayarak ve oda sıcaklığında 3 saat boyunca kurutmaya bırakıldı. Glutaraldehit çözeltisiyle modifiye edilmiş çalışma elektrot yüzeyi üzerine, amonyum sülfat çözeltisi içinde 2 mgr XOx enziminin 48 saat boyunca 4 °C ortamında 150 rpm dönme hızında karıştırılmak suretiyle hazırlanan XOx enzim solüsyonu yayıldı.



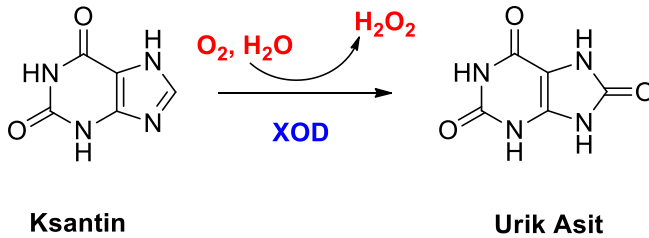
Şekil 3.7. poly(DTP-Alkil-NH₂) ksantin oksidaz enzim elektrodunun hazırlanması

Enzim Biyosensörlerinin Çalışma İlkesi

Üçlü elektrot sisteminin kullanıldığı amperometrik ölçümlerde referans elektrot olan Ag/AgCl'e karşı -0,7 V sabit potansiyel uygulanır. O₂ aşağıdaki eşitliğe göre indirgenir ve tüketilen O₂ konsantrasyonu ile orantılı olarak akım elde edilir. Oksijen tüketimine ilişkin reaksiyonlar aşağıda verilmiştir.



Yapılan elektropolimerizasyon ve amperometrik deneyler, çalışma elektrodu olarak camsı karbon ve grafit elektrotlar ile Ag/AgCl referans elektrot ve karşıt elektrot olarakda platin elektrot içeren bir üç elektrotlu hücre konfigürasyonu ve bir potansiyostat kullanıldı. Bütün deneyler oda sıcaklığında (25 °C) elektrokimyasal olarak 10 mL 50 mM pH:7,0 potasyum fosfat tampon çözeltisi içinde yapılmıştır. Amperometrik deneylerde biyosensör tampon çözeltisi içerisinde kalibre edildikten sonra ortama substrat eklenmesi yapılarak akım yoğunluğu ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$) ölçülen biyosensör tepkisi glukoz varlığında -0,7 V sabit potansiyel altında oksijen tüketilerek alındı. Her ölçümün sonunda tampon çözeltisi yenilendi.



Şekil 3.8. Ksantin oksidaz ile ksantin arasındaki enzimatik reaksiyon

Hazırlanan ksantin oksidaz biyosensörün işleyişi Şekil 3.8’de gösterilen ksantin oksidaz ile ksantin arasında meydana gelen enzimatik reaksiyon sonucunda oluşan H_2O_2 ’in yükseltgenme akımının ölçümü üzerinden gerçekleşmektedir. Belirli konsantrasyonlardaki glukoz ve ksantin standartlarına ilişkin alınan akım değerleri ile kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Kalibrasyon grafiğinin eğimi kullanılarak doğal örneklerdeki glukoz ve ksantin miktarı da tayin edilebilmiştir.

3.9.2. Mikrobiyal Biyosensör

Hazırlanan her mikrobiyal biyosensörün aynı sayıda hücre içermesi biyosensörlerin performans faktörleri açısından önemlidir. Bu nedenle elde edilen optik yoğunluk sonuçlarına bağlı olarak gerekli seyreltmeler yapılarak mikrobiyal biyosensörü hazırlandı. Biyosensörlerin hazırlanışı sırasında ilk olarak *G. Oxydans* hücreleri içeren 10 ml büyüme ortamı 6000 gr'da 15 dakika santrifüjlendi. Üst faz atıldı, çöken hücreler 50-1 oranında pH: 7,0; 50 mM fosfat tamponunda çözüldü ve bu karışım biyosensör hazırlanmasında kullanıldı.

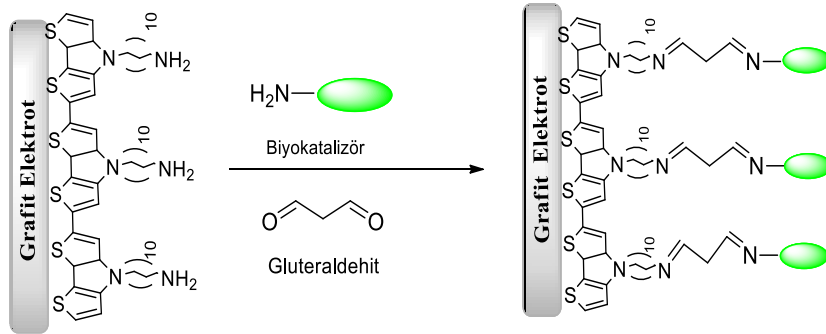
Mikrobiyal Biyosensörlerin Çalışma İlkesi

Mikrobiyal biyosensörlerle yapılan ölçümlerde canlı hücrelerin metabolik aktiviteleri sonucu kullandıkları oksijenden kaynaklanan sinyal izlenmektedir. Elektrotların yüzeyine canlı hücreler immobilize edilmiştir. Ölçüm hücresine substrat ilavesinin ardından, metabolik aktivite sonucunda oksijenin kullanılması çözülmüş oksijen miktarının farklanmasına neden olmaktadır. Çözülmüş oksijen miktarındaki farklanmanın bakteri hücrelerini temel alan biyosensörlerle belirlenmesi mümkündür. Yapılan çalışmalarda reaksiyon -700 mV'da amperometrik olarak akımdaki farklanma izlendi.

Ölçüm yapılmadan önce mikrobiyal biyosensör termostata bağlı reaksiyon hücresine alınarak ve manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak çalışma tamponu ve 30 °C sıcaklıkta 3 dk. boyunca bekletildi. Substrat ilavesi öncesinde ve sonrasında akım değerleri birbirinden farklıydı. Metabolik aktivite sonucunda okunan akım değeri, substrat yokluğuna kıyasla daha düşüktür. Deneysel çalışmalarda, her iki denge durumunda okunan akım değerinin farkı alındı. Söz konusu farklanma, substrat derişimiyle orantılıdır ve A/cm^2 olarak belirlendi. Bu kısımda öncelikle glukoz derişimi ile akım değerindeki farklanmalar arasında grafikler çizildi ve çeşitli parametrelerin sensör cevabına etkileri belirlendi.

3.9.2.1. 10-(4H-Ditiyeno[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin) (DTP-Alkil NH₂) Polimer Bazlı *G.Oxydans* Biyosensörü

Biyosensörün hazırlanışı sırasında hücreler pH: 7,0; 50 mM fosfat tamponunda çözüldü ve bu karışım biyosensör hazırlanmasında kullanıldı. Hazırlanan *G. Oxydans* hücre karışımından 5 µL ve 5 µL de %1 lik Gluteraldehit çözeltisi iletken polimerle kaplanmış grafit elektrot üzerine yayarak ve oda sıcaklığında 1 saat boyunca kurutmaya bırakılarak yapıldı. Elektrot yüzeyi distile su ile yıkanarak çalışma sıcaklığı ve tamponunda 10 dakika bekletildi. DTP-Alkil-NH₂ monomerinin elektrokimyasal olarak polimerleşmesiyle elde edilen iletken polimerin serbest amin grupları olması sebebiyle *G.Oxydans* bazlı biyosensör sisteminin hazırlanması kolaylıkla gerçekleştirildi. Geliştirilen biyosensör sistemi ile 10 ml pH:7,0 fosfat tamponunda, ortamda konsantrasyonu 2,5 mM olacak şekilde glukoz eklenerek oksidasyon pikinde meydana gelen değişimler izlenerek kaydedildi.



Şekil 3.9. Poly (DTP-Alkil-NH₂) / *G.Oxydans* elektrodunun hazırlanması

3.10. Enzim Biyosensör Elektrotlarının Optimum Koşullarının Belirlenmesi

3.10.1. DTP-Alkil-NH₂ Ditiyolpirol Glukoz Biyosensör Elektrodu

3.10.1.1. Optimum pH

Glukoz oksidaz biyosensörünün optimum pH'sını belirlemek amacıyla sodyum fosfat ve sodyum asetat tamponları kullanıldı. 50 mM konsantrasyonda sodyum asetat ile pH'sı 3,0; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 olan tamponlar hazırlandı. Asetat tamponu glukoz oksidaz enzimi için en uygun tampon olması asetat tamponu hazırlamamız da sebep oldu. Hazırlanan her bir tampon ile alınan biyosensör cevapları kaydedilerek glukoz biyosensörünün optimum pH değeri belirlendi. Denemeler sonucunda elde edilen verilere göre biyosensörün optimum pH-Akım grafiği çizildi.

3.10.1.2. Tarama Sayısı

Bu çalışmada tarama sayısının biyosensör cevabı üzerindeki etkisi belirlendi. Bu amaca yönelik olarak; biyosensör hazırlanmasında artan tarama sayısı ile biyosensör cevabı arasındaki ilişki incelendi.

3.10.2. DTP-Aril-NH₂ Ditiyolpirol Glukoz Biyosensör Elektrodu

3.10.2.1. Optimum pH

Glukoz oksidaz biyosensörünün optimum pH'sını belirlemek amacıyla sodyum fosfat ve sodyum asetat tamponları kullanıldı. 50 mM konsantrasyonda sodyum asetat tamponu ile pH'sı 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 olan tamponlar hazırlandı. Hazırlanan her bir tampon ile alınan biyosensör cevapları kaydedilerek glukoz biyosensörünün optimum pH değeri belirlendi. Hazırlanan biyosensör ile pH optimizasyonu yapıldı. Bunu takip eden çalışmalarda en yüksek akım değerinin olduğu pH değerinde devam edilmiştir.

3.10.2.2. Tarama Sayısı

Bu çalışmada tarama sayısının biyosensör cevabı üzerindeki etkisi belirlendi. Bu amaca yönelik olarak; biyosensör hazırlanmasında artan tarama sayısının biyosensör cevabı üzerinde ki etkisi incelendi.

3.10.3. DTP-Alkil-NH₂ Ditiyolpirol Ksantin Biyosensör Elektrodu

3.10.3.1. Optimum pH

Ksantin oksidaz biyosensörünün optimum pH'sını belirlemek amacıyla sodyum fosfat (PBS) tamponları kullanıldı bunun için 10 mM konsantrasyonda fosfat tamponu (PBS tamponu) ile pH'sı 5,0 dan 8,0 a kadar olan tampon çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan her bir tampon ile alınan biyosensör cevapları kaydedilerek ksantin biyosensörünün optimum pH değeri belirlendi. Hazırlanan biyosensör ile pH optimizasyonu yapıldı.

3.10.3.2. Tarama Sayısı

Elektrot yüzey üzerinde polimer kalınlığı yani elektropolimerleşme sırasında ki tarama sayısı, enzim ile elektrot arasında ki elektron transferinde etkili olduğu için çok önemli bir parametredir. Bunun sebepten polimer film kalınlığının etkisini biyosensör elektrodunun amperometrik olarak ölçülmesiyle araştırıldı. Polimer kalınlığının optimizasyonu çalışmasında 1,3,5,10,15,20 döngü sayısına kadar çalışma elektrodu üzerinde polimer film tabakası kaplandı ve elektrot yüzeyinde optimum kalınlık değeri bulundu.

3.10.3.3. Optimum Sıcaklık

Ksantin biyosensörlerinin optimum sıcaklığının belirlenmesine yönelik çalışmalarda 25–45 °C’de düşük sıcaklıktan yüksek sıcaklığa doğru ölçümler yapılarak ksantin biyosensörüne ait akım yoğunluğu değerleri izlendi. Çalışmalar pH 7,4; 10 mM fosfat (PBS) tamponunda gerçekleştirildi. Yapılan denemeler sonucunda sıcaklık ve % biyosensör cevabı arasında grafik çizildi.

3.10.3.4. Çalışma Potansiyeli

DTP-Alkil-NH₂ Ditiyolpirol ksantin biyosensör elektrodun hidrojen perokside duyarlılığını araştırırken, hidrojen peroksidin yükseltgenebilmesi için uygun potansiyelin belirlenmesi amacıyla, çeşitli çalışma potansiyellerinde kalibrasyon eğrileri çizildi. Bu potansiyeller -0,3 V ile 0,70 V arasında değişen potansiyeller uygulandı. Bu potansiyellerde çizilen kalibrasyon eğrilerinden en iyi çalışma potansiyeli belirlendi.

3.11. Mikrobiyal Biyosensör Elektrodlarının Optimum Koşulların Belirlenmesi

3.11.1. DTP-Alkil-NH₂ Ditiyolpirol *G.Oxydans* Biyosensör Elektrodu

3.11.1.1. Optimum pH

pH hücrelerin metabolik aktivitesini belirleyen önemli bir parametredir. *G. Oxydans* biyosensörünün optimum pH’sını belirlemek için 50 mM pH 5,5 sodyum asetat tamponu ve pH 6,0; 6,5; 7,0 sodyum fosfat hazırlandı ve hazırlanan tamponlar kullanılarak akım değerlerindeki farklanmalar incelenmiştir. Oluşturulan grafikte en iyi akım cevabının alındığı pH değeri ile hazırlanan tampon sistemi tüm çalışmalar bu pH değeri üzerinden devam etti.

3.11.1.2. Tarama Sayısı

Bu çalışmada tarama sayısının biyosensör cevabı üzerindeki etkisi belirlendi. Bu amaca yönelik olarak; biyosensör hazırlanmasında artan tarama sayısı ile biyosensör cevabı arasındaki ilişki incelendi.

3.12. Biyosensör Elektrotlarının Performans Faktörleri

3.12.1. DTP-Alkil-NH₂ Ditiyolpirol Glukoz Biyosensör Elektrodu

3.12.1.1. Doğrusal Tayin Aralığı

Geliştirilen biyosensörlerin biyoaktif tabaka bileşenleri ve çalışma koşullarının optimizasyonu sonrası karakterizasyonu amacıyla standart akım-konsantrasyon grafiği çizilerek glukoz ölçüm aralığı belirlendi. Bunun için biyosensörün farklı glukoz konsantrasyonlarında ki cevabını görmek için ölçümler 50 mM pH 4,5 sodyum asetat tamponunda oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Belirlenen çalışma koşullarında, farklı substrat konsantrasyonlarında elde edilen biyosensör cevapları kaydedilmiştir.

3.12.1.2. Analiz Sonuçlarının Tekrarlanabilirliği ve Operasyonel Stabilité

Optimize edilmiş çalışma koşullarında hazırlanan glukoz oksidaz enzim elektrodu ile doğrusal tayin aralığına giren bir glukoz konsantrasyonu seçilerek 60 tekrarlı ölçüm alındı. Kalibrasyon grafikleri yardımıyla konsantrasyon değerleri saptanarak standart sapma (S.D.) ve varyasyon katsayıları (C.V) hesaplandı. Operasyonel stabiliteyi belirlemek amacıyla hazırlanan glukoz biyosensörü ile alınan tekrarlı ölçüm sonuçlarına göre sensör cevabında meydana gelen azalmalar kaydedilerek yüzdesel olarak hesaplandı.

3.12.1.3. Bozucu Türlerin Belirlenmesi

Hazırlanan biyosensör sisteminin farklı substratlara karşı ne ölçüde cevap verdiği farklı substratlar kullanılarak yapılan ölçümlerle belirlendi.

3.12.2. DTP-Aril- NH₂ Ditiyolpirol Glukoz Biyosensör Elektrodu

3.12.2.1. Doğrusal Tayin Aralığı

Geliştirilen biyosensörlerin biyoaktif tabaka bileşenleri ve çalışma koşullarının optimizasyonu sonrası karakterizasyonu amacıyla standart grafiği çizilerek glukoz ölçüm aralığı belirlendi. Ölçümler 50 mM pH 4,5 fosfat tamponunda oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

3.12.2.2. Analiz Sonuçlarının Tekrarlanabilirliği ve Operasyonel Stabilité

Hazırlanan glukoz oksidaz biyosensörünün belirli çalışma sıcaklığında ve doğrusal tayin aralığına giren bir konsantrasyon aralığı seçilerek 50 tekrarlı ölçüm alındı. Tekrarlanan ölçümler sonrasında ilgili substratın kalibrasyon grafikleri yardımıyla konsantrasyon değerleri saptandı. Operasyonel stabiliteyi belirlemek amacıyla hazırlanan glukoz biyosensörü ile alınan tekrarlı ölçüm sonuçlarına göre sensör cevabında meydana gelen azalmalar kaydedilerek yüzdesel olarak hesaplandı.

3.12.2.3. Bozucu Türlerin Belirlenmesi

Farklı substratlar kullanılarak biyosensör sisteminin cevapları ölçüldü. Biyosensörün glukozu verdiği cevap % 100 olarak alındı. Belirlenen çalışma koşullarında, farklı substratların (3-asetamidofenol, etanol, L-askorbik asit) kullanımını sonucu elde edilen biyosensör cevapları 2 kez tekrarlanarak biyosensör cevabı not edilmiş ve daha sonra girişim kıyaslanmıştır. Ve daha sonra girişim yapabilecek olan bileşikler ve glukoz aynı anda reaksiyon ortamına eklenerek, biyosensör cevapları ölçüldü.

3.12.3. DTP-Alkil-NH₂ Ditiyolpirol Ksantin Biyosensör Elektrodu

3.12.3.1. Doğrusal Tayin Aralığı

Biyosensörün farklı ksantin konsantrasyonlarının da ki cevabını incelemek amacıyla ksantin substratının 0,3 ile 25 µM arasında farklı konsantrasyonları kullanıldı. Belirlenen çalışma koşullarında, farklı substrat konsantrasyonlarının da elde edilen biyosensör cevapları kıyaslandı.

3.12.3.2. Analiz Sonuçlarının Tekrarlanabilirliği ve Operasyonel Stabilité

Hazırlanan ksantin biyosensörünün belirlenen optimum çalışma sıcaklığında ki doğrusal tayin aralığına giren herhangi bir konsantrasyonda 20 tekrarlı ölçümler yapıldı. Tekrarlanan ölçümler sonrasında ilgili substratın kalibrasyon grafikleri yardımıyla konsantrasyon değerleri saptandı.

Biyosensörün operasyonel kararlılığının belirlenmesi amacıyla yeni hazırlanan biyosensörler daha önce optimizasyonu yapılarak belirlenmiş olan çalışma sıcaklığında ve çalışma tamponu içinde bekletilerek 10 mM ksantin standardı için ölçümler gerçekleştirildi. Başlangıçta elde edilen biyosensör cevapları % 100 kabul edilerek belirli zaman dilimlerinde yapılan ölçümlerde elde edilen biyosensör cevapları ile kıyaslandı. Ölçümler sodyum fosfat tamponunda (pH 7,4; 10 mM), 35 °C ve +900 mV'da gerçekleştirildi.

3.12.3.3. Bozucu Türlerin Belirlenmesi

Farklı substratlar kullanılarak biyosensör sisteminin cevapları ölçüldü. Biyosensörün Ksantin substratına verdiği cevap %100 olarak alındı. Belirlenen çalışma koşullarında, farklı substratların (ürik asit, askorbik asit, glukoz, ve sodyum benzoat) kullanımını sonucu elde edilen biyosensör cevapları değerlendirildi.

3.12.4. G.Oxydans Elektrodunun Performans Faktörlerinin Belirlenmesi

3.12.4.1. Doğrusal Tayin Aralığı

Optimum olarak bulunan koşullarda hazırlanan biyosensörler için doğrusal tayin aralığını belirlemek amacıyla denemeler gerçekleştirildi. 100 mV potansiyelde ve pH: 7,0 tamponunda gerçekleştirilen denemelerde farklı konsantrasyonlar da alınan glukoz çözeltisiyle elektrot sistemi içine ilave edilerek açığa çıkan akım farklanmaları kaydedilmiştir. Açığa çıkan akım ve glukoz konsantrasyonlarına bağlı olarak grafik çizilerek glukoz çözeltisi için doğrusal tayin aralığı belirlenmiştir.

3.12.4.2. Analiz Sonuçlarının Tekrarlanabilirliği ve Operasyonel Stabilité

G. Oxydans biyosensörlerinin analitik karakterizasyonuna yönelik olarak yapılan bir diğer çalışma, tekrarlanabilirliklerinin test edilmesiydi. Bunun için her bir sistem için belirlenen optimum koşullarda ve elde edilen doğrusal kalibrasyon aralığında ki glukoz konsantrasyonunda 0,75 mM için 10 kez ölçüm alındı. Yapılan ölçümler sonrasında elde edilen akım değerleri kalibrasyon grafiğinde verilen ilgili denklemde y değeri olarak kullanılıp S.D. değerleri hesaplandı.

3.12.4.3. Bozucu Türlerin Belirlenmesi

Geliştirilen biyosensör sisteminin substrat spesifikliğinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda farklı substratlar (Glukoz, xylose ve metanol) kullanılarak sensör cevabı izlendi. Glukoz için elde edilen cevap %100 olarak kabul edildi ve diğer substratlar için % de biyosensör cevabı hesaplandı.

3.13. Gerçek Numune Analizi

3.13.1. Meyve Sularında Glukoz Tayini

Son olarak hazırlanan P(DTP-Naftil-NH₂)/GOx biyosensör sistemleri ile gerçek örneklerdeki (Fizzy meyve suyu ve fizzy marka portakal suyu) toplam glukoz miktarı tayin etme çalışması yapıldı. Bunun için spektrofotometrik referans yöntem olan Trinder metodu ile de örneklerdeki glukoz miktarı tespit edilmeye çalışıldı.(Barham and Trinder, 1972).

Bu metotta gerçekleşen reaksiyonda glukoz, glukoz oksidaz enzimi tarafından D-glukonata oksitlenir ve hidrojen peroksit oluşur. Peroksidaz varlığında fenol ve 4-aminoantipirin karışımı hidrojen peroksit tarafından oksitlenir. Oluşan kırmızı renkli kinon imin glukoz konsantrasyonu ile orantılıdır ve spektrofotometrik olarak izlenerek tayin gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

4.1. Sentez Ve Karakterizasyon Sonuçları

4.1.1. 3,3'-Dibrom-2,2'-bitiyofen

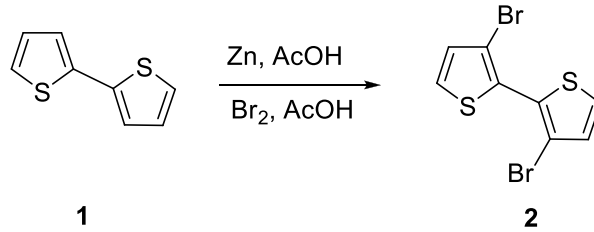
Bölüm 3.5.1. de anlatıldığı gibi sentezlenen 3,3'-Dibrom-2,2'-bitiyofen (**2**) bileşiğine ait $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ ve IR spektrumu sonuçları şöyledir:

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.40 (d, $J = 5.4$ Hz, AB sisteminin A kısmı, =CH, 2H), 7.12 (d, $J = 5.4$ Hz, AB sisteminin B kısmı, =CH, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 130.8, 128.9, 127.5, 112.7.

IR (cm^{-1}): 3105.2, 3087.0, 2925.0, 2854.8, 2519.0, 2351.0, 2146.4, 1737.1, 1712.7, 1550.9, 1444.0, 1340.2, 1157.0, 857.6.

3,3'-Dibrom-2,2'-bitiyofen (**2**) bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu (CDCl_3) EK 1'de, $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu (CDCl_3) EK 2'de, IR spektrumu EK 7'de yer almaktadır.



Şekil 4.1. 3,3'-dibrom-2,2'-bitiyofen

4.1.2. 10-(4H-Ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin

Bölüm 3.5.2. sentez prosedürü verilen 10-(4H-Ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin (3) monomerinin sentezi için ekivalent miktarlarda 2,2'-bitiyofen ve 1,10 diamino dekan bileşiği, BINAP, t-BuONa ve Pd₂(dba)₃ katalizörlüğünde kapling reaksiyonu gerçekleştirildi. Bu sentezde karşılaştığımız en büyük problemlerden birisi azot atmosferi oluşturma ve kuru tolueni muhafaza edilmesiydi. Bu sorunlar çözüldükten sonra reaksiyonlar başarılı bir şekilde gerçekleştirildi. Ham ürünün ¹H-NMR'ına göre reaksiyonun yüksek verimle gerçekleştiği görülürken, silikajel kolon kromatografisiyle % 45 verimle hedeflenen ürün elde edildi. Bunun nedeni olarak kolon dolgu maddesi SiO₂ asidik karakterde olduğundan 10-(4H-Dithiyeno[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin molekülümüzdeki amin grubuyla bağ oluşturarak maddemizin bir kısmı SiO₂ kolonda kaldığı düşünüldü. Saflaştırma işlemlerinde kolon dolgu maddesi olarak alüminyum oksit ve florosil de kullanılarak bu sorun giderilmeye çalışıldı. Sentezlenen 10-(4H-Dithiyeno[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin nolu molekülün ¹H-NMR'ında en ayırt edici piklerden birisi azot atomuna bağlı metilenik protonları 4,18 ppm'de triplet olarak rezonans olmasıdır.

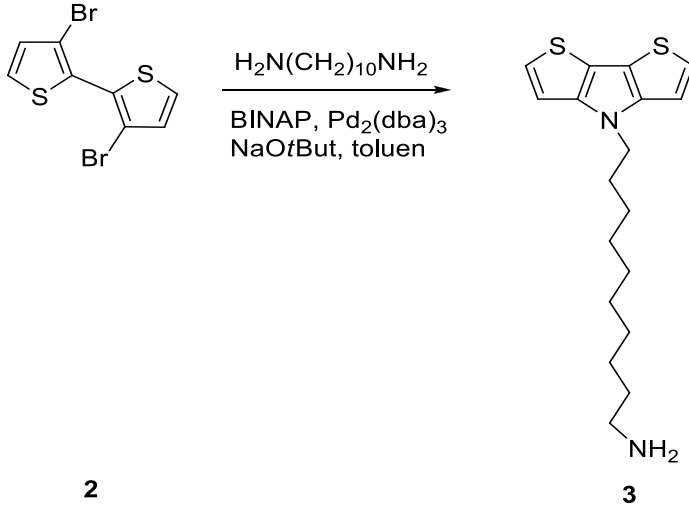
Bölüm 3.5.2. de bahsedilen 10-(4H-Ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin (3) bileşiğine ait ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve IR spektrumu sonuçları şöyledir:

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.16 (d, J = 5.3 Hz, AB sisteminin A kısmı, =CH, 2H), 6.99 (d, J = 5.3 Hz, AB sisteminin B kısmı, =CH, 2H), 4.18 (t, J = 7.0 Hz, CH₂, 2H), 2.67-2.63 (m, CH₂, 2H), 1.87-1.83 (m, CH₂, 2H), 1.42-1.40 (m, CH₂, 2H), 1.38-1.23 (m, CH₂,NH₂, 14H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 145.0, 122.7, 114.6, 110.9, 47.4, 42.2, 33.9, 30.3, 29.5, 29.4, 29.4, 29.2, 27.0, 26.8

IR (cm⁻¹): 3099.1, 3077.8, 2922.0, 2848.7, 1667.0, 1575.3, 1523.4, 1462.3, 1404.3, 1370.7, 1385.5, 1282.1, 1187.5, 1095.9, 1080.6, 1047.0, 845.4, 796.6.

10-(4H-Ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin (3) bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu (CDCl₃) EK 3'te, ¹³C-NMR spektrumu (CDCl₃) EK 4'te, IR spektrumu EK 8'de yer almaktadır.



Şekil 4.2. 10-(4H-Ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin

4.1.3. 5-(4H-ditiyol [3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)naftalin-1-amin

Bölüm 3.5.3. sentez prosedürü verilen sentez sırasında 5-(4H-ditiyol [3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)naftalin-1-amin molekülünün sentezi için 1,5 diaminonaftalin bileşiğinin çözünürlüğü toluende çok düşük olduğu için toluen ve paladyum katalizörlerle gerçekleştirilemedi. DMSO çözücü ortamında CuI katalizörlüğünde, baz olarak Cs₂CO₃, ligand olarak L-prolin kullanılarak sentez gerçekleştirildi. ¹H-NMR spektrumu ile yapı aydınlatılıp, D₂O ile de amin grubundaki proton ile döteryum yer değiştirilerek yapıya kesinlik kazandırıldı.

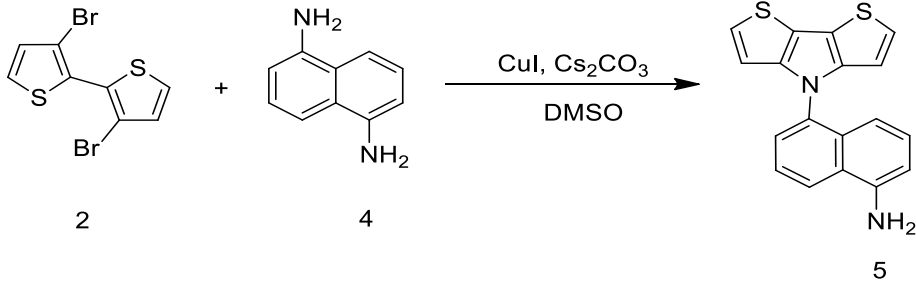
5-(4H-ditiyol [3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)naftalin-1-amin (5) bileşiğine ait ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve IR spektrumu sonuçları şöyledir:

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): δ 7.41(t, J=5.2 Hz, =CH, 2H), 7.34 (d, J=5.2 Hz, =CH, 1H), 7.22-7.18 (m, =CH, 3H), 7.08 (d, J=5.2 Hz, =CH, 2H) 7.01(d, J=5.2 Hz, =CH, 2H), 4.18-4.01(bs, NH₂, 2H).

¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): δ 132.66, 129.58, 127.52, 127.07, 126.05, 124.13, 122.99, 122.74, 122.48, 122.02, 121.35, 119.63, 119.58, 118.99.

IR (cm⁻¹): 3095.9, 2922.8, 2851.6, 1733.2, 1551.0, 1480.5, 1397.5, 1342.9, 1144.7, 1083.0.

5-(4H-ditiyol [3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)naftalin-1-amin bileşğinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu (CDCl_3) EK 5'da, $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu (CDCl_3) EK 6'da, IR spektrumu EK 9'da yer almaktadır.



Şekil 4.3. 5-(4H-ditiyol [3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)naftalin-1-amin

4.2. Floresans Ölçümleri

Sentezlediğimiz DTP-Alkil-NH₂ ve DTP-Aril-NH₂ türevi bileşiklerinin floresans özelliklerini belirlemek amacıyla bölüm 3.6 da belirtildiği şekilde uyarma ve emisyon dalga boyları ölçülmüş ve Çizelge 4.1., Çizelge 4.2., Çizelge 4.3., Çizelge 4.4., Çizelge 4.5.'de gösterildiği üzere monomerlerin farklı çözücü içerisinde floresans özellik gösterdiği bulunmuştur.

Çizelge 4.1. Diklormetan (DCM) çözücüsü içinde ki floresans ölçüm

Bileşik	^a λ _{Ex}	^b λ _{Em}	^c λ _{max} (Ex1)	^d λ _{max} (Em1)	^e I _{Ex1}	^f I _{Em1}	^c λ _{max} (Ex2)	^d λ _{max} (Em2)	^e I _{Ex2}	^f I _{Em2}
5 nolu Bil.	252	456	251	464	89	84	384	553	385	49
3 nolu Bil.	391	480	384	469	51	53	410	-	49	-

Çizelge 4.2. Kloroform(CHCl₃) çözücüsü içinde ki floresans ölçüm

Bileşik	^a λ _{Ex}	^b λ _{Em}	^c λ _{max} (Ex1)	^d λ _{max} (Em1)	^e I _{Ex1}	^f I _{Em1}	^c λ _{max} (Ex2)	^d λ _{max} (Em2)	^e I _{Ex2}	^f I _{Em2}
5 nolu Bil.	380	468	281	447	45	106	381	-	92	-
3 nolu Bil.	450	503	381	511	25	18	-	-	-	-

Çizelge 4.3. Metanol (MeOH) çözücüsü içinde ki floresans ölçüm

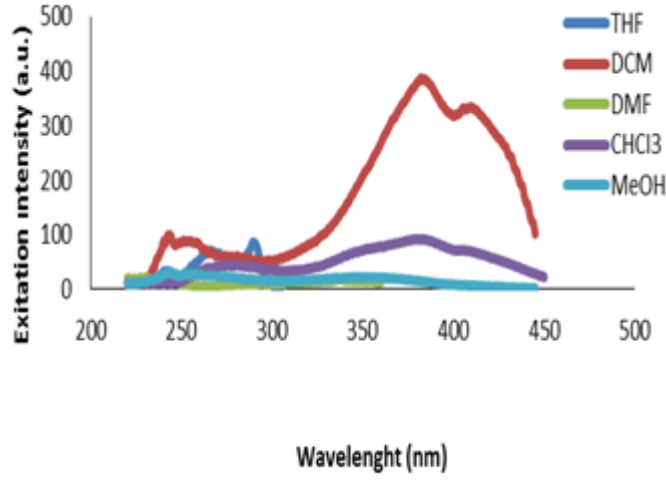
Bileşik	^a λ _{Ex}	^b λ _{Em}	^c λ _{max} (Ex1)	^d λ _{max} (Em1)	^e I _{Ex1}	^f I _{Em1}	^c λ _{max} (Ex2)	^d λ _{max} (Em2)	^e I _{Ex2}	^f I _{Em2}
5 nolu Bil.	258	452	255	449	28	28	351	-	23	-
3 nolu Bil.	360	445	243	436	33	51	350	-	53	-

Çizelge 4.4. THF çözücüsü içinde ki floresans ölçümü

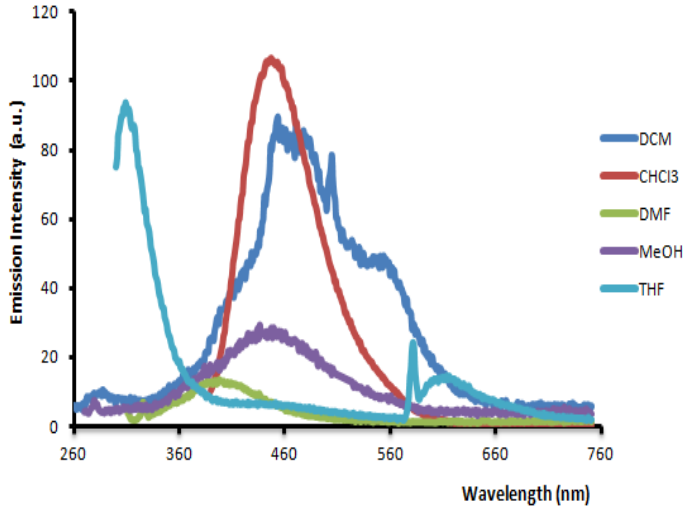
Bileşik	^a λ_{Ex}	^b λ_{Em}	^c λ_{max} (Ex1)	^d λ_{max} (Em1)	^e I_{Ex1}	^f I_{Em1}	^c λ_{max} (Ex2)	^d λ_{max} (Em2)	^e I_{Ex2}	^f I_{Em2}
5 nolu Bil.	289	317	266	309	71	93	290	613	85	14
3 nolu Bil.	266	324	267	308	33	43	290	610	34	9

Çizelge 4.5. DMF çözücüsü içinde ki floresans ölçümü

Bileşik	^a λ_{Ex}	^b λ_{Em}	^c λ_{max} (Ex1)	^d λ_{max} (Em1)	^e I_{Ex1}	^f I_{Em1}	^c λ_{max} (Ex2)	^d λ_{max} (Em2)	^e I_{Ex2}	^f I_{Em2}
5 nolu Bil.	296	374	236	393	21	13	337	-	19	-
3 nolu Bil.	382	443	227	450	14	33	271	-	5	-

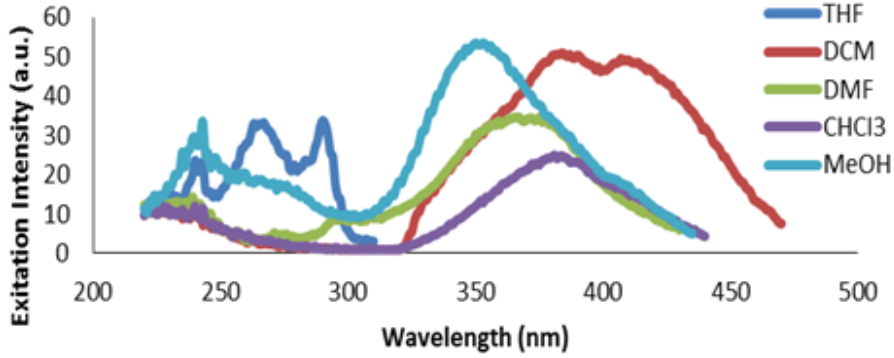


Şekil 4.4. 5-(4H-dityol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)naftalin-1-amin monomerinin uyarma spektrum

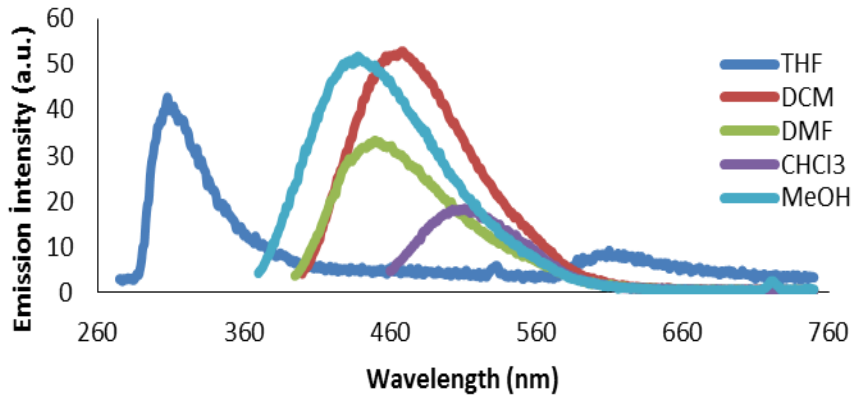


Şekil 4.5. 5-(4H-ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)naftalin-1-amin monomerinin emisyon spektrum

Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te elde edilen grafikler incelendiğinde 5-(4H-ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)naftalin-1-amin monomerinin kloroform (CHCl_3)çözücüsü içinde emisyon dalboyunun (λ_{max}) 468 nm olduğu bulunmuştur.Uyarma dalga boyunun da (λ_{max}) 380 nm olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.6. 10-(4H-Ditiyeno[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin monomerinin uyarma spektrumu



Şekil 4.7. 10-(4H-Dityyeno[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin monomerinin emisyon spektrumu

Şekil 4.6. ve Şekil 4.7. elde edilen grafikler incelendiğinde 10-(4H-Dityyeno[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin monomerinin Kloroform (CHCl₃) çözücüsü içerisinde emisyon dalga boyunun (λ_{\max}) 503 nm olduğu bulunmuştur. Uyarma dalga boyunun ise (λ_{\max}) 450 nm olduğu bulunmuştur.

Bu sonuçlar açıkça göstermiştir ki sentezlediğimiz bu 5-(4H-dityyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)naftalin-1-amin ve 10-(4H-Dityyeno[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin bileşikleri güçlü bir floresans şiddeti göstermektedir. Bileşiklerin bu özellikleri sayesinde OLED (Organik Işık Yayan Diyotlar), Elektrokromik Cihaz (ECD), FET (Alan etkili tranzistör), optik sensörler, ilaç taşınımı, kanser hücre çalışmaları, biyosensörler gibi birçok araştırma ve uygulama alanına sahip olduğu tesbit edilmiştir.

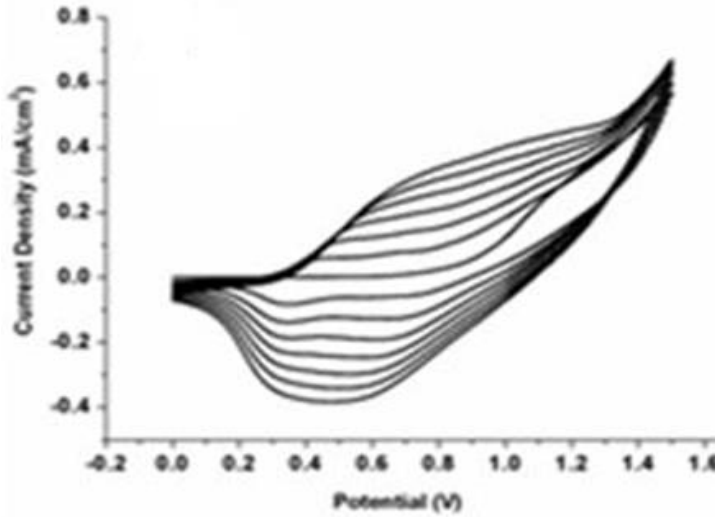
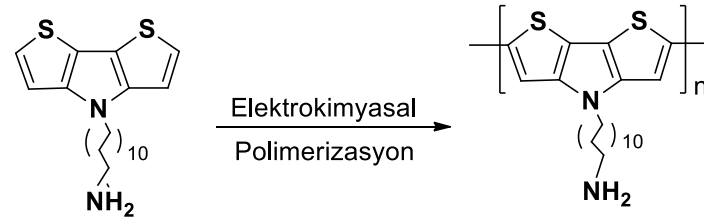
Ayrıca kullanılan farklı çözümler içerisinde Kloroform (CHCl₃) içerisinde yüksek dalga boyuna kaymış olmasında artan poliarite ile birlikte floresans emisyonunun maksimum daha uzun dalga boyuna kaydığını göstermiştir.

4.3. Elektropolimerizasyon ile Elektrotların Hazırlanması

4.3.1. 10-(4H-Ditieno[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin

Elektropolimerizasyonu

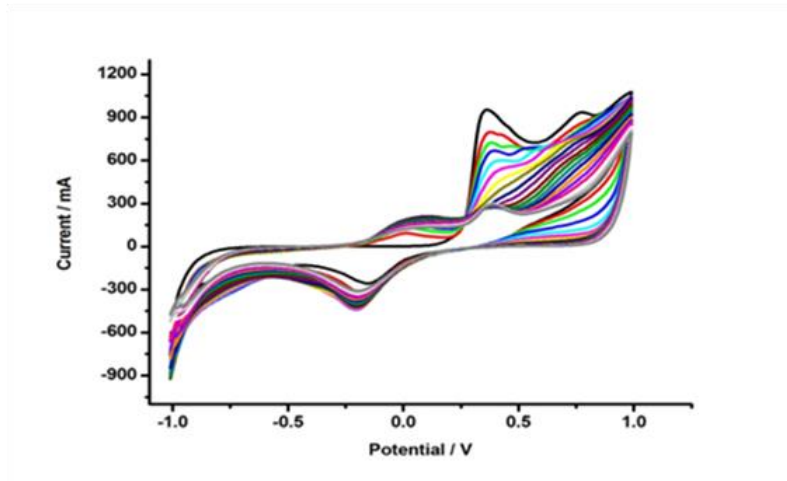
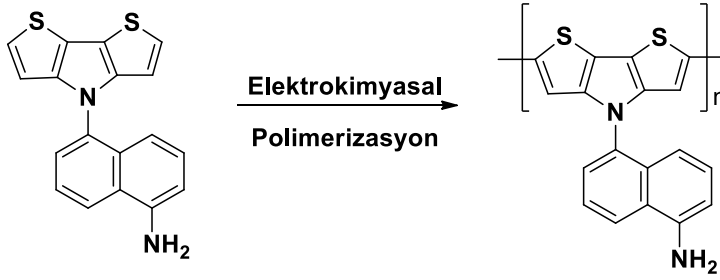
Bölüm 3.8.1. de verilen elektropolimerleşme şartlarıyla gerçekleştirilen yöntem incelendiğinde, yükseltgenme pikinin tamamen tersinmez olduğu ve devam eden döngülerde yükseltgenme pik akım değerlerinin önemli ölçüde azaldığı görülmektedir. Bu davranış elektrot yüzeyinde polimerik filmin oluştuğunu ve yüzeye monomerlerin ulaşmasının engellendiğini göstermektedir (Udum ve Ark., 2014).



Şekil 4.8. Monomerinin asetonitril/diklormetan çözücü ortamında 0,1 V/s ile N₂ atmosferindeki dönüşümlü voltamogramı

4.3.2. 5-(4H-ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)naftalin-1-amin(DTP-Aril-NH₂) Elektropolimerizasyonu

Bölüm 3.8.2. de verilen prosedür yapıldığında elde edilen grafik Şekil 4.9 da verilmiştir. Şekil 4.9 incelendiğinde, yükseltgenme pikinin tamamen tersinmez olduğu ve devam eden döngülerde yükseltgenme pik akım değerlerinin önemli ölçüde azaldığı görülmektedir. Bu davranış elektrot yüzeyinde polimerik filmin oluştuğunu ve yüzeye monomerlerin ulaşmasının engellendiğini göstermektedir (Azak ve ark.,2013). Biz de, çalışmamızda bu optimum koşulları sağlayarak hazırladığımız polimer filmleri kullandık.



Şekil 4.9. 5-(4H-ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)naftalin-1-amin
TBAPF₆/DCM ortamında 100 mV/s dönüşümlü voltamogramı

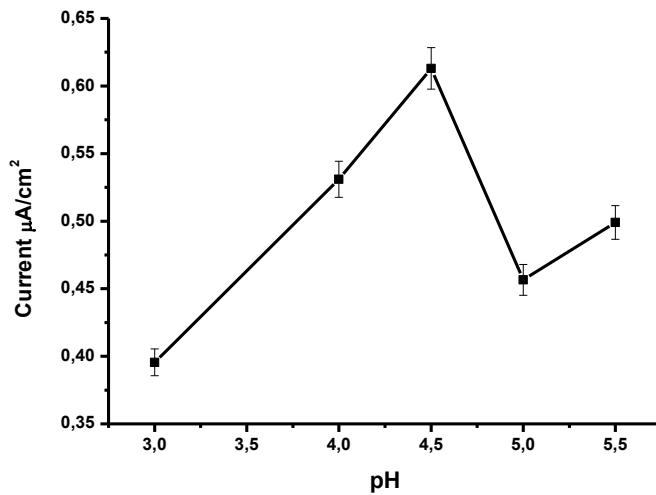
monomerinin

4.4. Enzim Biyosensör Elektrotlarının Optimum Koşullarının Belirlenmesi

4.4.1. DTP-Alkil-NH₂ Ditiyolpirol Glukoz Biyosensör Elektrodu

4.4.1.1 . Optimum pH

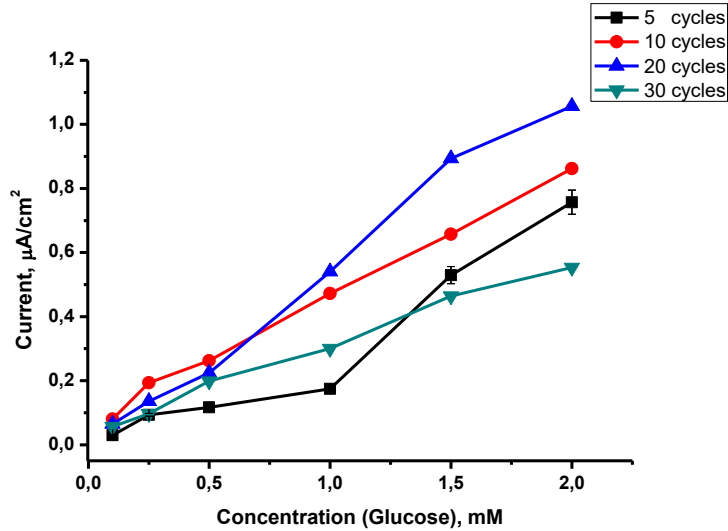
Enzimler protein yapısındaki moleküller oldukları için katalitik aktiviteleri çevre koşullarından önemli oranda etkilenmektedir. Enzimin aktivitesi de biyosensörün performansını direkt olarak etkilediği için optimum pH'nın belirlenmesi gereklidir. Bu nedenle immobilizasyonun neden olduğu pH-aktivite davranışlarındaki değişimler hakkında elde edilen bilgiler, enzim proteinin yapı fonksiyon ilişkisini anlamak ve 10-(4H-Dithiyeno[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin bazlı glukoz biyosensörün optimum çalışma koşullarını belirlemek açısından faydalı olacaktır. Biyosensörlerinin optimum pH'ını belirlemek amacıyla ölçümler gerçekleştirildi. Yapılan denemeler sonucunda pH ve akım değeri (μA) arasında çizilen optimum pH grafiği Şekil 4.10'da verilmiştir. Görüldüğü üzere sistem için de akım üzerinde pH 4,5 arasında artış göstermiş ve pH 5,5'tan sonra biyosensör cevabında düşüş görülmüştür. Serbest GOx enzimin optimum pH'ı da 5,5 olarak belirlenmiştir. Bu nedenle immobilizasyon sonrasında enzimin yapısının ve yüzeyindeki yük dağılımının değişmediği sonucuna varılmıştır (Bright and Appleby, 1969; Weibel and Bright, 1971).



Şekil 4.10. pH'nın Poly(DTP-Alkil-NH₂)/GOx biyosensörü üzerine etkisi [pH 3,5–5,5; 50 mM sodyum fosfat tamponları; Oda sıcaklığında; 100 mV]

4.4.1.2. Tarama Sayısı

Biyosensör karakterizasyonunda ilk çalışma olarak polimerizasyonda döngü sayısının biyosensör cevabına olan etkisi araştırıldı. Bunun için 5,10,20 ve 30 döngü sayısında polimerizasyon sonucunda meydana getirilen 3 değişik Poly(DTP-Alkil-NH₂)/GOx biyosensörünün Ph:4,5 fosfat tamponu ortamında ve farklı konsantrasyonlarda ki (0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mM) glukoz substratı kullanılarak ortamında ki biyosensör cevaplarına bakıldı. Amperometrik akım farklanmasının 20 döngülü enzim elektroda en yüksek akım şiddeti gözlenmiştir. Bunun sebebi 20 döngü sayısında polimer film elektron transferi için optimum kalınlıkta ve iletkenlikte olmasıdır. 20 döngüden itibaren enzim elektrodu kullanıldığında amperometrik cevabın düştüğü gözlemlenmiştir. 20 döngü sayısından fazla yapılması durumunda meydana getirilen polimer filmin elektron transferi için çok kalın olması ve kompakt olmayan mikro yapıların oluşmasına neden olmakta buda amperometrik cevabın düşürmesi şeklinde bu olayın nedeni yorumlanabilir. Buna karşın 20 döngü sayısından az döngü sayısı uygulanması da (5,10 döngü sayısında) enzimi tutuklamak için kullanılan fonksiyonel grupların az olmasına neden olmaktadır ve bu durumda da düşük biyosensör cevapları elde edilmektedir (Şekil 4.11).

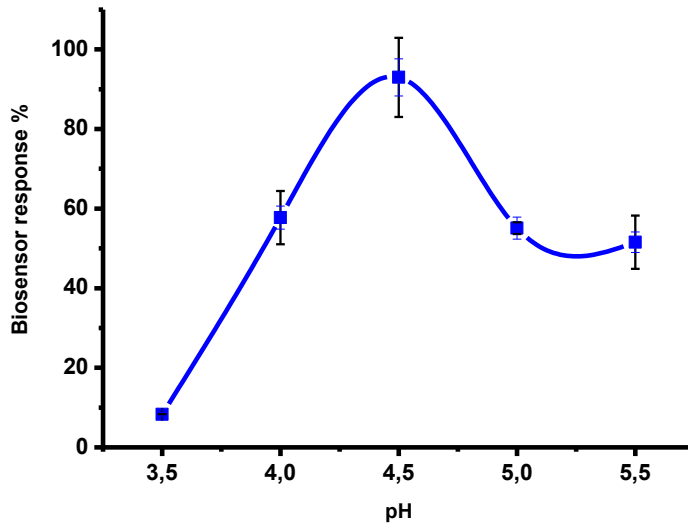


Şekil 4.11. Tarama sayısının Poly(DTP-Alkil-NH₂)/GOx biyosensör cevabı üzerine etkisi

4.4.2. DTP-Aril-NH₂ Ditiyolpirol Glukoz Biyosensör Elektrodu

4.4.2.1. Optimum pH

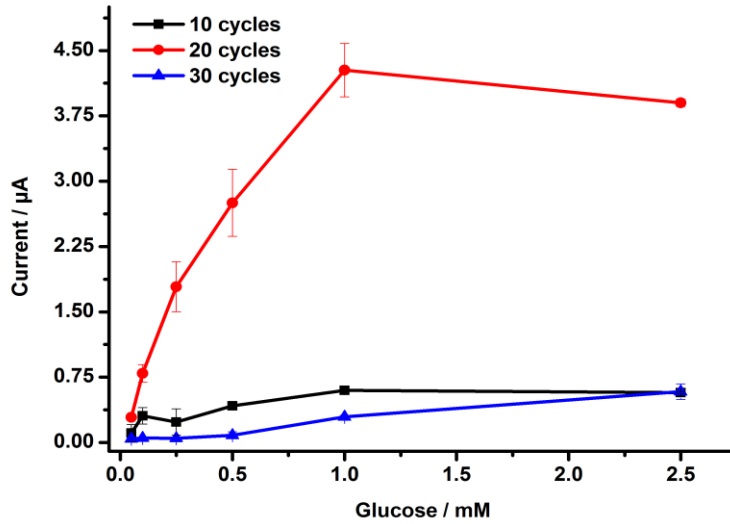
Serbest glukoz oksidaz enzimi için maksimum aktivite pH 5,5’de görülmüştür. Poly(DTP-Naftil-NH₂)/GOx biyosensörü için maksimum aktivitenin görüldüğü pH değerinin 4,5 olduğu gözlenmiş olup, 25 °C’de ki pH optimizasyonları için ortamın pH değeri 3,5 ile 5,5 arasında değiştirilmiştir. Glukoz oksidazın pH 4,0’den düşük asidik ortamda denatürize olmasından dolayı pH optimizasyonları enzim elektrotları için pH 3,5’ten başlatılmıştır. Biyosensör cevabı % yüzde olarak ifade edilmiş Şekil 4.12’ten anlaşılacağı üzere biyosensör cevabının en yüksek olduğu pH değeri 4,5 olarak belirlenmiştir. Ve bundan sonra ki Poly(DTP-Aril-NH₂)/GOx biyosensör çalışmalarında bu pH kullanılmıştır. Bu pH daki çalışma aralığı serbest halde GOx enziminin çalışma aralığına yakındır. Ve bu durum bize immobilize halde enzim yapısı fazla değişime uğramadığını göstermektedir.



Şekil 4.12. pH'nın Poly(DTP-Naftil-NH₂)/GOx biyosensörü üzerinde etkisi

4.4.2.2. Tarama Sayısı

Bunun için 10, 20 ve 30 döngü sayısında polimerizasyon sonucunda meydana getirilen 3 değişik Poly(DTP-Naftil-NH₂)/GOx biyosensörünün glukoz ortamında biyosensör cevabına bakıldı. 20 döngü sayısı sonucu oluşturulan Poly(DTP-Naftil-NH₂)/GOx biyosensördeki meydana getirilen polimer filmin enzim tutuklaması için en uygun film kalınlığında olduğu anlaşıldı. 20 döngü sayısından fazla yapılması durumunda (30 döngü sayısında) yani polimerizasyon zamanının fazla olması filmin bozulmasına neden olmaktadır bu da biyosensör cevabının düşmesine sebep olmaktadır. Buna karşın 20 döngü sayısından az döngü sayısı uygulanması da (10 döngü sayısında) enzimi tutuklamak için kullanılan fonksiyonel grupların az olur ve bu durumda da düşük biyosensör cevabı elde edilir.

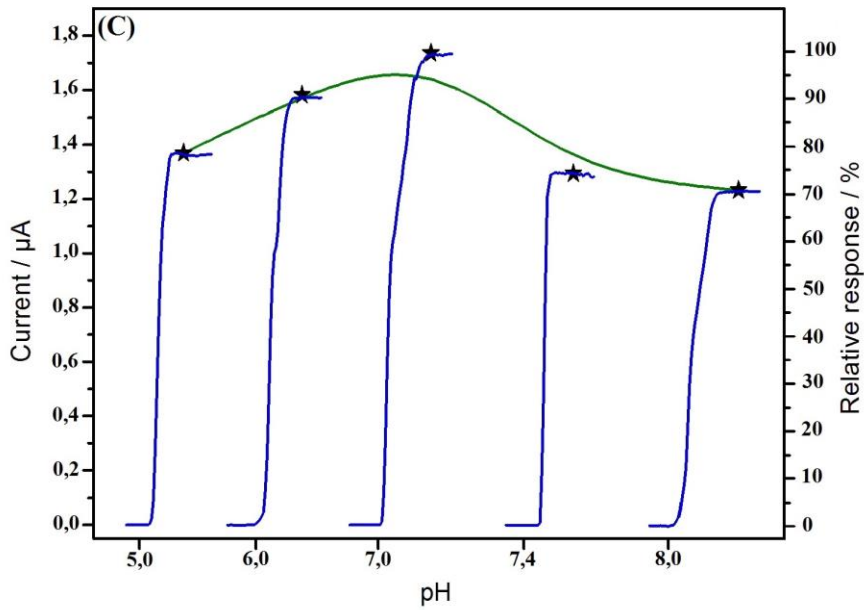


Şekil 4.13. Polimerizasyon döngü sayısının Poly(DTP-Naftil-NH₂)/GOx biyosensör cevabına etkisi

4.4.3. DTP-Alkil-NH₂ Ditiyolpirol Ksantin Biyosensör Elektrodu

4.4.3.1. Optimum pH

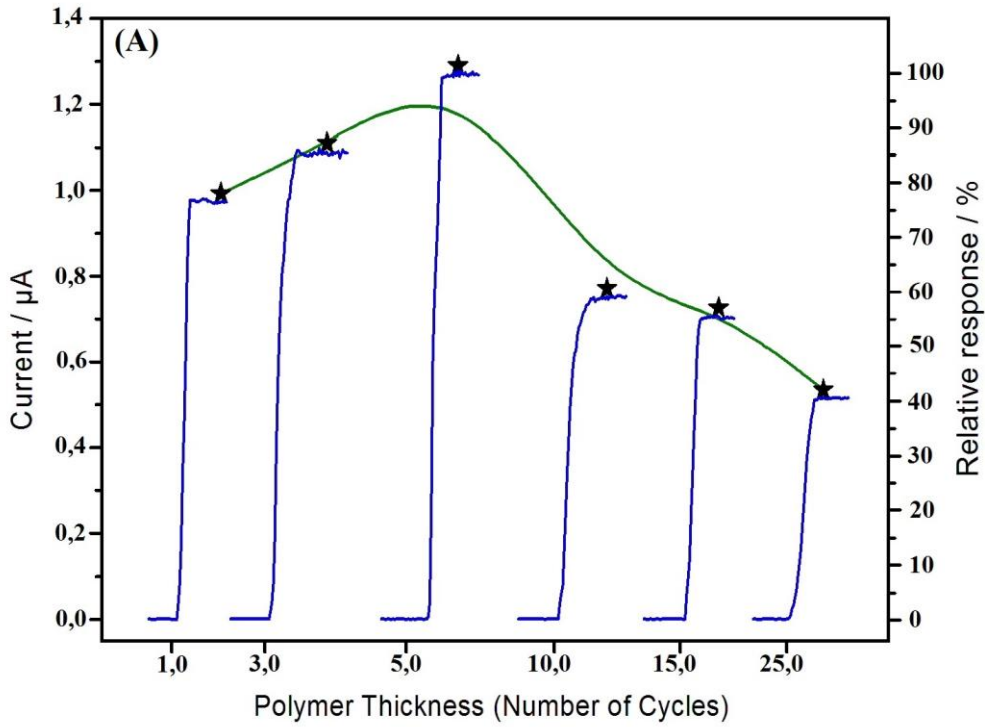
Bir biyosensör için en önemli parametrelerden biride optimum pH nın belirlenmesidir. Bu amaçla Poly (DTP-Alkil-NH₂)/XOx biyosensörü için optimum pH belirlendi. Serbest ksantin oksidaz enzimi için maksimum aktivite pH 8,0'de görüldü. pH'nın Poly (DTP-Alkil-NH₂)/XOx biyosensörü üzerinde ki etkisini incelemek amacıyla pH 5,0 dan pH 8,0 kadar 10 mM fosfat tamponunda hazırlanmış çözeltiler içersinde değişen pH şartlarıyla biyosensör cevabı incelendi.ve sonuçlar gösterdi ki pH 7,0 da maksimum biyosensör cevabı gözlemlendi. Şekil 4.14 de pH 7,4 olduğunda biyosensör cevabının %30 oranında gerilediği ve bundan sonra ki artan pH degerlerine bağlı olarak biyosensör cevabının azaldığı görüldü. Optimizasyon denemesiyle biyosensör hazırlamak için immobilize olan XOx enziminin aktivite gösterdiği pH değerini pek değiştirmedeği görüldü.



Şekil 4.14. Farklı pH lardaki ksantin substratlı biyosensör cevabı PBS tamponunda(+0,5V, 10 mM)

4.4.3.2. Tarama Sayısı

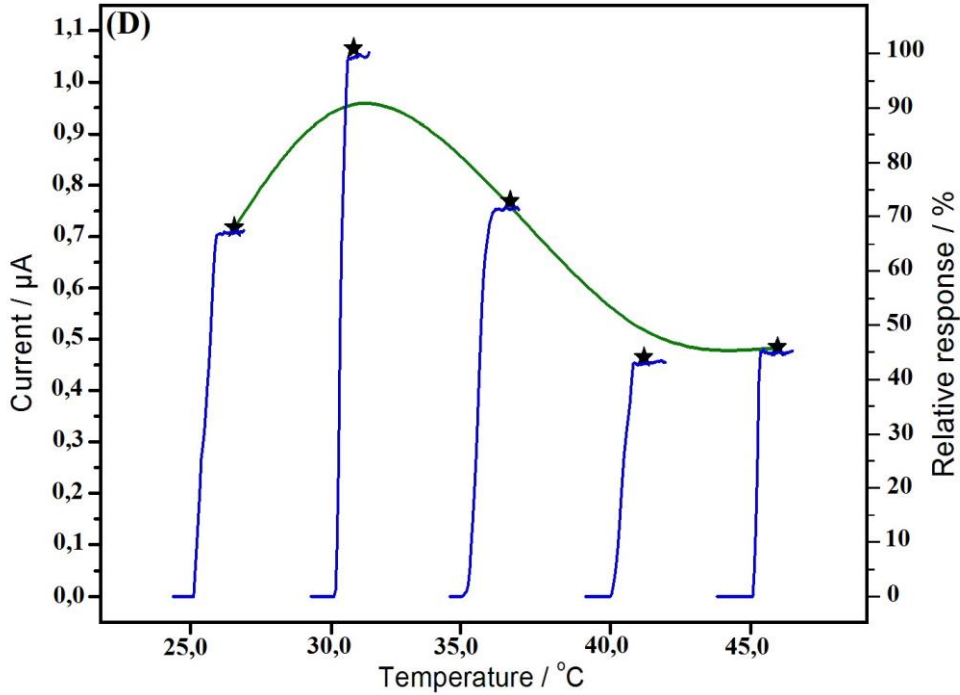
Elektrot yüzeyi ile enzim arasında elektronik geçişi kolaylaştıran polimer tabakasının kalınlığı önemli bir parametredir. Bu polimer film kalınlığı hazırlanan biyosensör elektrodunun amperometrik cevaplarıyla ölçülmektedir. Şekil 4.15'te görüldüğü üzere artan polimer film kalınlığıyla birlikte biyosensörün akım değerinde doğrusal bir artış olmadığı 5. döngüden itibaren artan döngü sayısında enzim elektrodu kullanıldığında amperometrik cevabın düştüğü gözlemlendi. Bunun sebebi polimer film içine elektronun difüze olmasını sınırlandırıldığı için akım değerlerinde düşme gözlenmesidir. 5 döngülü enzim elektroda en yüksek akım şiddeti gözlemlendi. Bunun sebebi 5 döngü sayısında polimer film elektron transferi için optimum kalınlıkta ve iletkenlikte olmasıdır.



Şekil 4.15. Polimerizasyon döngü sayısının Poly(DTP-alkil-NH₂)/XOx biyosensör cevabına etkisi

4.4.3.3. Optimum Sıcaklık

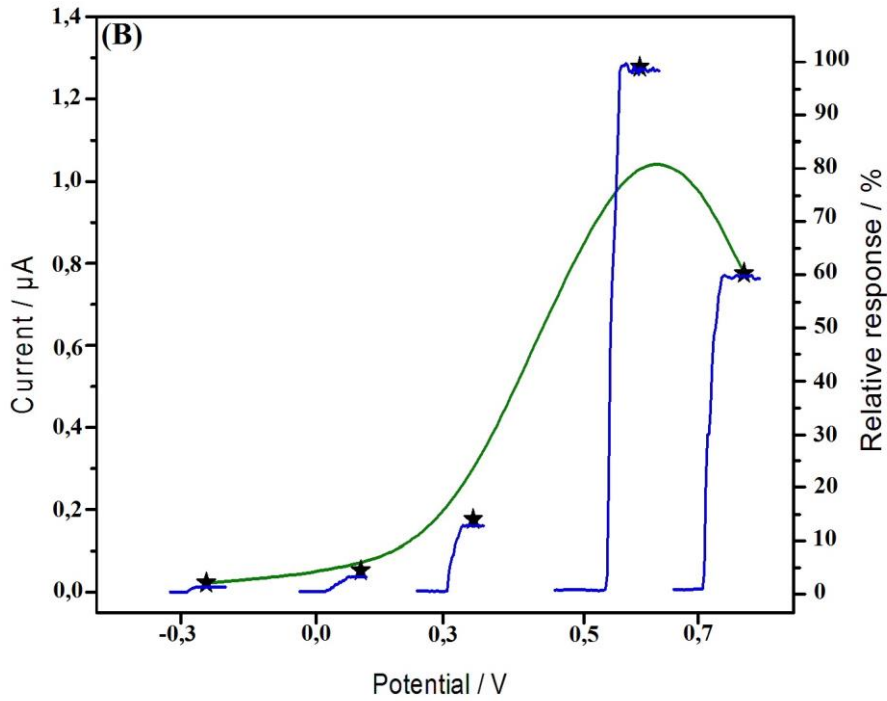
Çalışma sıcaklığının belirlenmesi amacıyla termostatik ölçüm hücresi kullanılarak 25 ile 45⁰C arasındaki sıcaklıklarda ölçümler kullanılarak hazırlanan ksantin oksidaz enzimi için uygun sıcaklık değeri belirlendi.Şekil 4.16'da verilen biyosensör akım cevapları incelendiğinde en yüksek akım değerinin sıcaklık 30⁰C olduğunda gözlemlendi.30⁰C deki alınan maksimum akım değerleri 35⁰C ile kıyaslandığında sensör cevabının yaklaşık %35, 45⁰C lerde %55 oranda daha azaldığı görüldü.Bu artan sıcaklıkla birlikte protein yapısında olan enzimlerin termal olarak aktivitesini kaybetmiş olabileceği düşünülmüştür çünkü çözeltideki moleküler oksijen değeri azalmıştır.



Şekil 4.16. Sıcaklığın etkisi +0,5V (10mM pH 7,0 fosfat tamponu)

4.4.3.4. Çalışma Potansiyeli

Şekil 4.17 de görüldüğü gibi -0,3 V – 0,7 V arasında artan potansiyelinin biyosensör cevabına etkisi bakıldı. Yüksek uygulanan potansiyeler ile -0,3 ; 0,0 ve + 0,3 V gibi düşük potansiyeller ile kıyaslandığında amperometrik biyosensör cevabı üzerinde olumsuz bir etkisi gözlenmiştir. Maksimum akım cevabı 0,5 V ta elde edildi ve bundan sonraki uygulanan potansiyelerde biyosensör cevabının neredeyse % 40 'ı gerilediği görüldü. Böylece optimum çalışma potansiyeli 0,5 V olarak seçildi ve bundan sonraki deneysel çalışmalarda bu potansiyel üzerinden devam edildi.



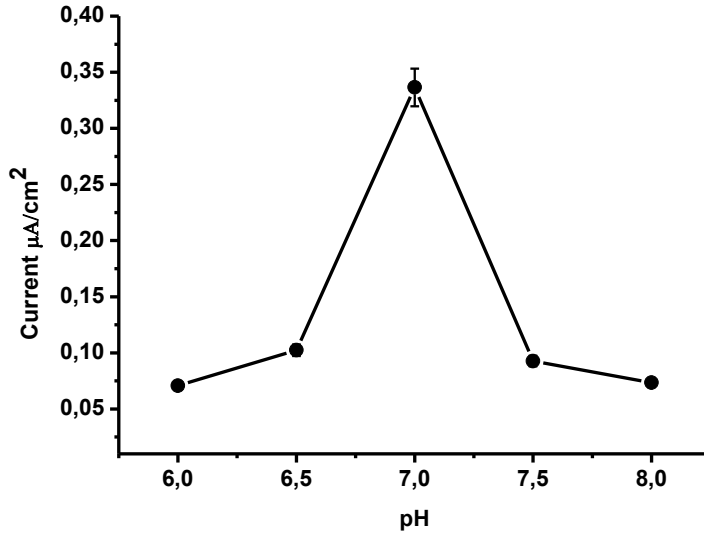
Şekil 4.17. Uygulanan potansiyel etkisi (10mM fosfat tamponu, pH 7,0)

4.5. Mikrobiyal Biyosensör Elektrotlarının Optimum Koşulların Belirlenmesi

4.5.1. DTP-Alkil-NH₂ Ditiyolpirol *G.Oxydans* Biyosensör Elektrodu

4.5.1.1. Optimum pH

10-(4H-Ditiyeno[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin) / *G.Oxydans* biyosensörlerinin optimum pH'sını belirlemek amacıyla 50 mM pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 fosfat tamponlarında ölçümler alındı. pH ile % biyosensör cevabı arasında çizilen optimum pH grafiğinden (Şekil 4.18) çalışma pH'sı 7,0 olarak bulundu. Bu pH değeri hücrelerin büyüme ortamının pH'sı ile uyumlu olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.18. Biyosensör cevabına pH'ın etkisi (pH 6,0–8,0; 50 mM tamponları; 30 °C; -700 mV)

4.5.2.2. Tarama Sayısı

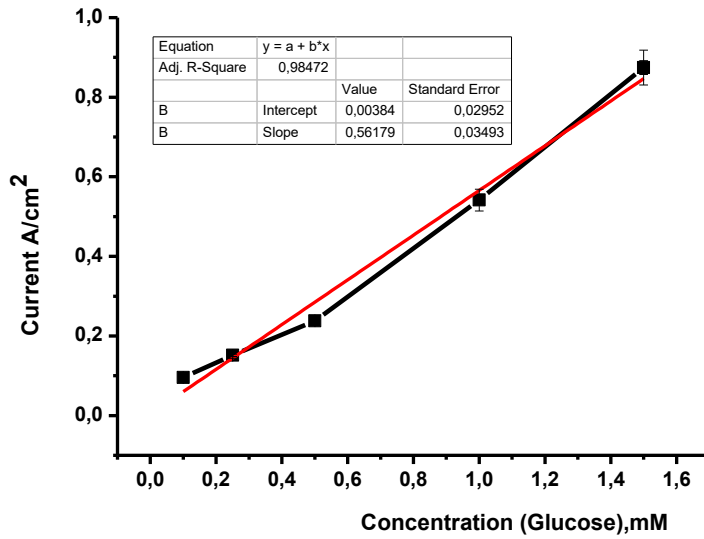
Bu çalışmada tarama sayısının biyosensör cevabı üzerindeki etkisi belirlendi. Bu amaca yönelik olarak; biyosensör hazırlanmasında artan tarama sayısı ile biyosensör cevabı arasındaki ilişki incelendi.

4.6. Enzim Elektrotlarının Performans Faktörleri

4.6.1. DTP-Alkil-NH₂ Ditiyolpirol Glukoz Biyosensör Elektrodu

4.6.1.1. Doğrusal Tayin Aralığı

Geliştirilen glukoz biyosensörlerinin hazırlama ve çalışma koşullarının optimizasyonu sonrasında, karakterizasyonu amacıyla glukoz için ölçüm aralığı belirlendi. Bunun için biyosensörün farklı glukoz konsantrasyonlarında ki cevabını görmek için ölçümler 50 mM pH:3,5 fosfat tamponunda oda sıcaklığında ölçümler gerçekleştirilmiştir. Belirlenen çalışma koşullarında, farklı substrat konsantrasyonlarında elde edilen biyosensör cevapları Şekil 4.19'da verildi. 0,05 -1,5 mM aralığında glukoz dedeksiyonu gerçekleştirilebildi. Glukoz biyosensörleri ile glukoz analizi çalışmalarında cevap süresi 50. saniye olarak bulundu.



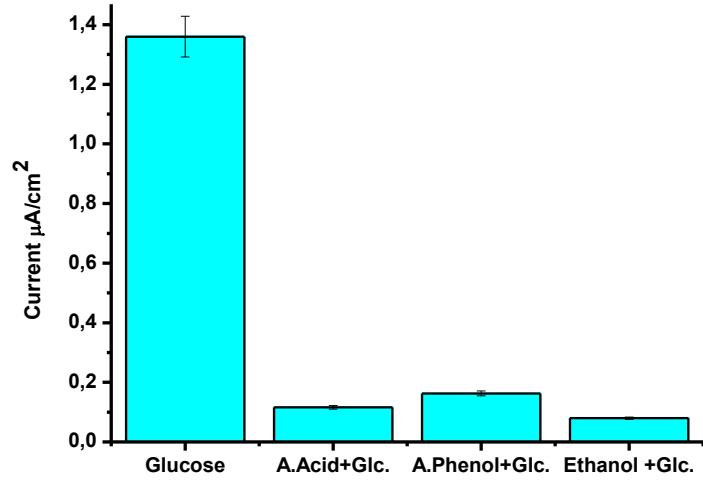
Şekil 4.19. Poly(DTP-Alkil-NH₂)/GOx biyosensörünün farklı glukoz konsantrasyonlarına karşılık elde edilen kalibrasyon grafiği [50 mM, pH: 4,5 fosfat tamponu; oda sıcaklığında; 100 mV]

4.6.1.2. Analiz Sonuçlarının Tekrarlanabilirliği ve Operasyonel Stabilitite

Bu bölümde optimize edilmiş çalışma koşullarında hazırlanan glukoz oksidaz enzim elektrodu ile doğrusal tayin aralığına giren bir glukoz konsantrasyonu seçilerek 60 tekrarlı ölçüm alındı. Kalibrasyon grafikleri yardımıyla konsantrasyon değerleri saptanarak standart sapma (S.D) $\pm 0,034234$ mM ve varyasyon katsayıları (CV)% 3,261 (n= 60) hesaplandı. Operasyonel stabiliteyi belirlemek amacıyla hazırlanan glukoz biyosensörü ile alınan tekrarlı ölçüm sonuçlarına göre sensör cevabında meydana gelen azalmalar kaydedilerek yüzdesel olarak hesaplandı. Ve bu hazırlanan glukoz biyosensörünün LOD : 0,1973 mM olarak tespit edildi.

4.6.1.3. Bozucu Türlerin Belirlenmesi

Farklı substratlar kullanılarak biyosensör sisteminin cevapları ölçüldü. Biyosensörün glukozu verdiği akım farklanması olarak alındı. Belirlenen çalışma koşullarında, farklı substratların (Glukoz, Askorbik asit+Glukoz, Asetamidofenol+Glukoz, Etanol +Glukoz) kullanımı sonucu elde edilen biyosensör cevapları Şekil 4.21'de verildi. 3-asetamidofenol, L-askorbik asit karşı cevap alınmadı. Ölçümler en az 2 kez tekrarlandı. Fakat eşit hacimlerde (2,5 mM) 3-asetamidofenol ile glukozun varlığında, ve L-askorbik asit ile glukozun ilavesi ye akımlarda meydana gelen farklanma grafiğe geçirilmiş Şekil 4.21 de gösterildi.

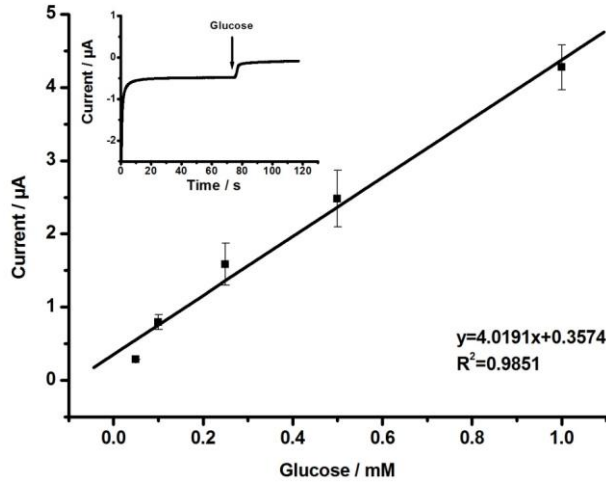


Şekil 4.20. Poly(DTP-Alkil-NH₂)/GOx biyosensörünün farklı substratlara (0,1 mM) cevabı [Fosfat tamponu pH 4,5; 50 mM,100mV]

4.6.2. DTP-Aril- NH₂ Ditiyolpirol Glukoz Biyosensör Elektrodu

4.6.2.1. Doğrusal Tayin Aralığı

Biyosensörün farklı glukoz konsantrasyonlarında ki cevabını incelemek amacıyla glukozun farklı konsantrasyonları kullanıldı. Belirlenen çalışma koşullarında, farklı substrat konsantrasyonlarında elde edilen biyosensör cevapları Şekil 4.22’de verildi.



Şekil 4.21. Poly(DTP-Aril-NH₂)/GOx biyosensörünün farklı glukoz konsantrasyonlarına karşılık elde edilen kalibrasyon grafiği

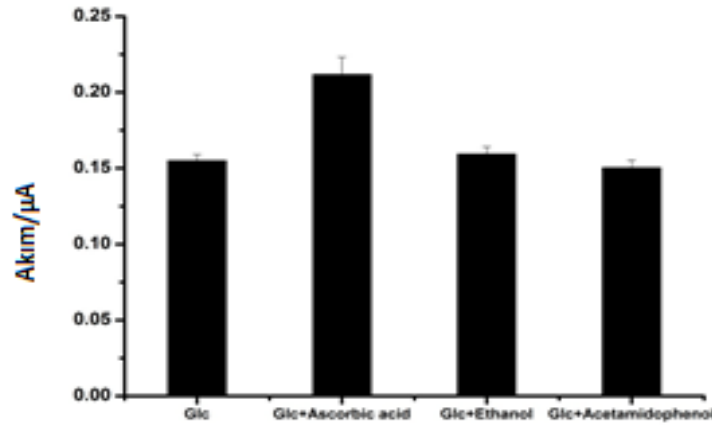
4.6.2.2. Analiz Sonuçlarının Tekrarlanabilirliği ve Operasyonel Stabilité

Poly(DTP-Aril-NH₂)/GOx biyosensörünün kararlılık deneyleri de yapıldı. Bu biyosensörü her gün düzenli olarak 1 kere ölçtükten oda sıcaklığında siteril bir ortamda sakladığımız zaman 1 hafta sonunda duyarlılığında % 20 lik bir düşme gözlemlendi. Eğer elektrodu 4 °C’de buzdolabında sakladığımız zaman 1 hafta hergün bir kere biyosensör responsunu ölçüldükten sonra duyarlılığında %15 lik bir düşme gözlemlendi. Hazırlanan glukoz oksidaz biyosensörünün belirli çalışma sıcaklığında ve doğrusal tayin aralığına giren bir konsantrasyon aralığı seçilerek 50 tekrarlı ölçüm alındı. Tekrarlanan ölçümler sonrasında ilgili substratın kalibrasyon grafikleri

yardımıyla konsantrasyon değerleri saptandı. Bu işlemler sonrasında glukoz oksidaz biyosensörü ile glukoz için standart sapma (S.D) $0,164 \pm 0,006$ mM (n=7) ve varyasyon katsayısı (C.V) % 3,399 olarak bulundu. Ve bu hazırlanan glukoz biyosensörünün LOD : 0,005 M olarak tespit edildi.

4.6.2.3. Bozucu Türlerin Belirlenmesi

Farklı substratlar kullanılarak biyosensör sisteminin cevapları ölçüldü. Biyosensörün glukozu verdiği cevap % 100 olarak alındı. Belirlenen çalışma koşullarında, farklı substratların (3-asetamidofenol, L-askorbik asit, etanol) kullanımı sonucu elde edilen biyosensör cevapları Şekil 4.23'te verilmiştir. 3-asetamidofenol, L-askorbik asit karşı cevap alınmadı. Ölçümler 2 kez tekrarlandı fakat eşit hacimlerde 3-asetamidofenol ile glukozun varlığında, ve de L-askorbik asit ile glukozun ilavesiyle akımlarda meydana gelen farklanma grafiğe geçirilmiş Şekil 4.23'te gösterildi.



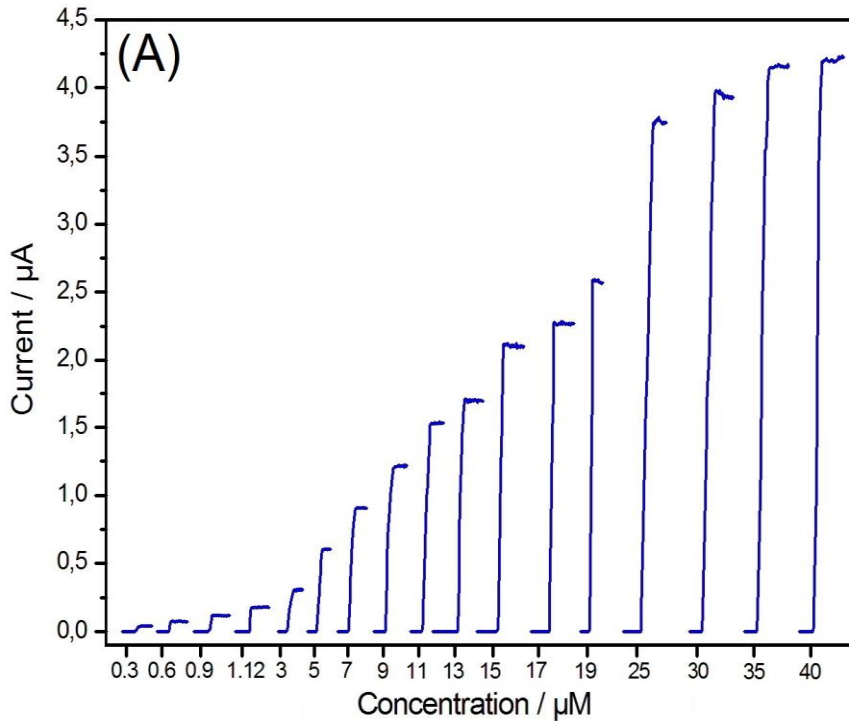
Şekil 4.22. Biyosensörün farklı substratlara (0,25 mM) cevabı (Sodyum asetat tamponu pH 4,5; 50 mM, -0,7 V, oda sıcaklığı)

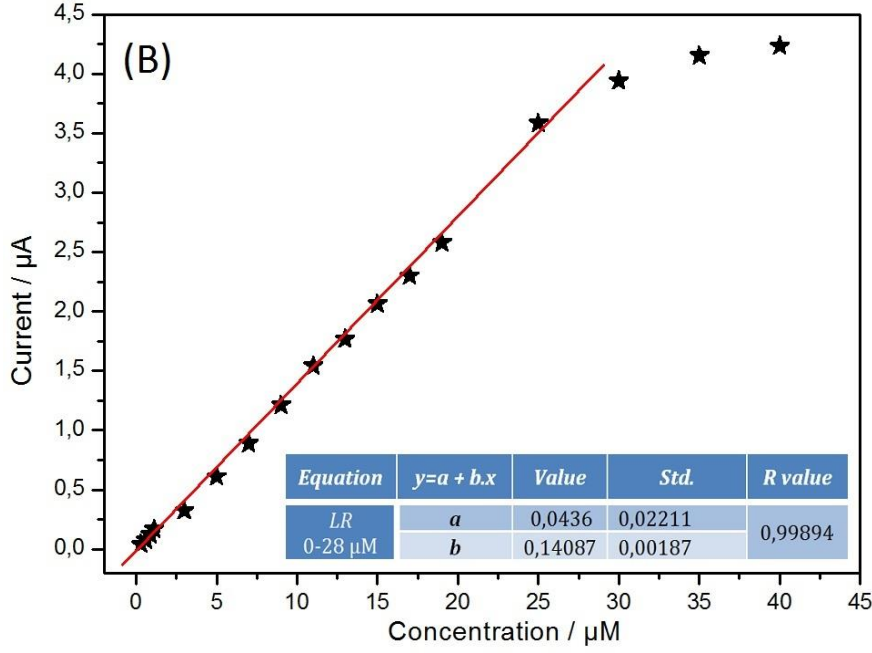
4.6.3. DTP-Alkil-NH₂ Ditiyolpirol Ksantin Biosensör Elektrodu

4.6.3.1. Doğrusal Tayin Aralığı

Optimum potansiyel aralığı ve optimum çalışma pH aralığı belirlendikten sonra 10 ml fosfat tamponu (10 mM, pH 7,0) içine belirli konsantrasyonlarda ksantin ilave edilerek iletken polimerle başarı ile kaplanıp ksantin oksidaz immobilize edilmiş elektrottan açığa çıkan akım sinyalleri ölçüldü. Modifiye edilmiş elektrot 5 saniye içinde % 95 oranında kararlı duruma geldi. Ve işlemler farklı konsantrasyonlarda ksantin substratının ortama ilave edilmesiyle devam etti. 25 μ M ilavesinden sonra artan konsantrasyonla doğrusallıktan sapma görüldü. Buda Michael –Menten modelinin tipik özelliğini göstermektedir.

0,3 ile 25 μ M arasında değişen ksantin konsantrasyonu artışı ile biosensör cevabı da doğrusal bir şekilde artmıştır. Korelasyon katsayısı 0,99894 olarak bulunmuştur. Ayrıca LOD: 0,074 μ M, duyarlılığı da 124 mAM^{-1} bulundu.



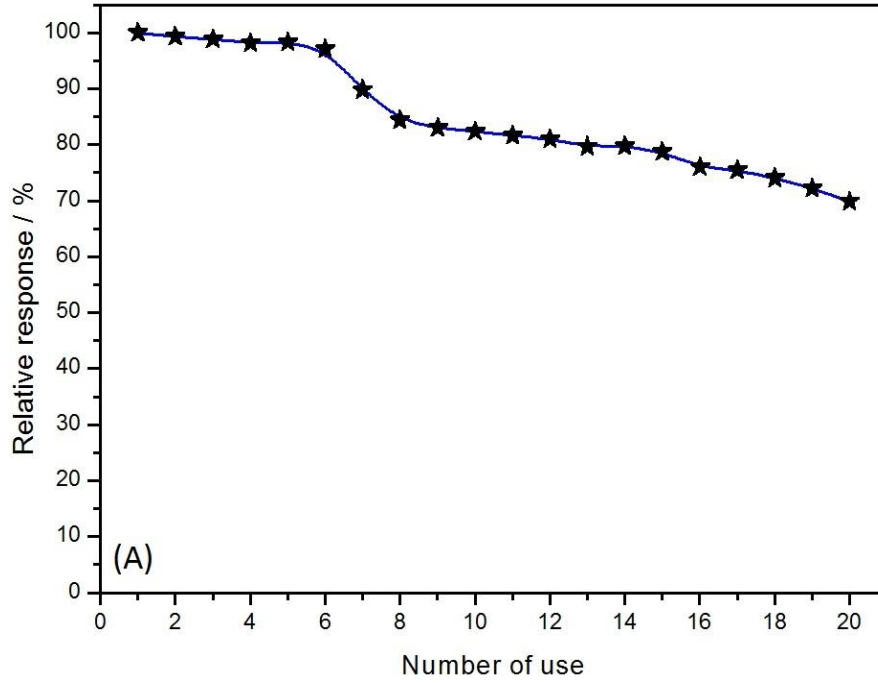


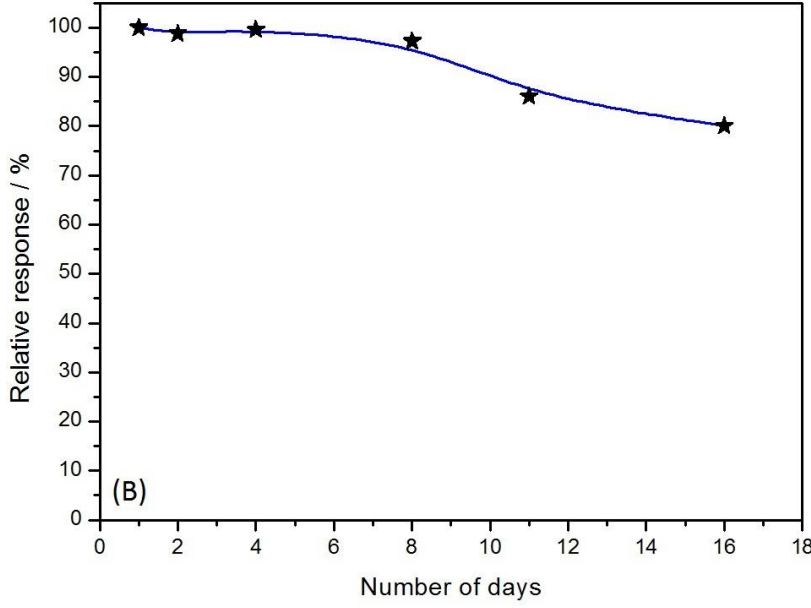
Şekil 4.23. Farklı Ksantin konsantrasyonuna karşılık gelen kalibrasyon grafiği (10mM PBS pH 7,0)

4.6.3.2. Analiz Sonuçlarının Tekrarlanabilirliği ve Operasyonel Stabilité

Enzimler kendi katalitik aktivitelerini çok kolay kaybettikleri ve denatüre oldukları için enzimlerin dikkatli depolanması ve bakımı çok önemlidir. Enzim elektrotlarının tekrar kullanılabilirlik bakımından stabilitesi 1 günde 20 başarılı ölçüm yapılarak çalışıldı. Ve biyosensörün akım cevabı izlendi. Ölçümler 10 mM pH 7,0 fosfat tamponunda 0,50 V potansiyel uygulamasıyla gerçekleşti. Hazırlanan biyosensör cevapları her ölçümden sonra 5 dakika boyunca 4 °C'de saklayarak deneyler gerçekleştirildi. Şekil 4.25' de görüldüğü gibi biyosensör cevabının ilk 6 deney de birbirine yakın değerler olduğu bundan sonraki ölçümlerde biyosensör cevabının % 80 oranında azaldığı görüldü. Ölçüm sayısı birbirini tekrar eden 20 ölçüme kadar gerçekleştirildi. 20. ölçümden sonra biyosensör cevabının ilk ölçümden alınan biyosensör cevabı yaklaşık % 70 oranında ilk ölçümden verdiği tepkiyi korumuş oldu.

Ksantin tayinine yönelik hazırlanan biyosensör kullanılmadığı zaman elektrot 10 mM pH 7,0 fosfat tamponu içinde +4 °C de muhafaza edildi. Raf ömrünün belirlenmesi için yapılan deneylerde biyosensörün amperometrik akım tepkisi 8 gün boyunca % 4 lük bir kayba uğradığı gözlemlendi. 2 hafta içinde devam eden ölçümlerde biyosensör cevabının ilk ölçümlere göre % 15 oranında azaldığı belirlendi. Bunun sebebi bu kadar süre boyunca biyosensör cevabında ki azalmanın sebebi enzimin denatüre olması veya iç membrandan enzimin bağının zayıflaması sonucu çıkabilir. Sonuç olarak 16. Günün sonunda biyosensör cevabının ilk cevaba oranla %80 oranında muhafaz edildiği gözlemlendi.



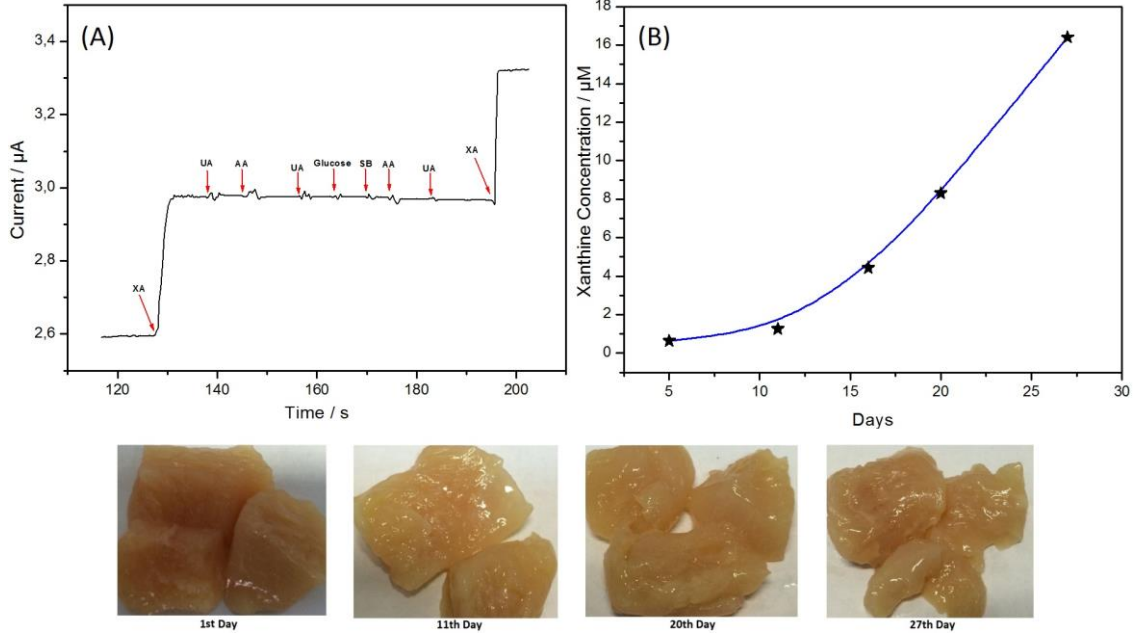


Şekil 4.24. A) Sabit konsantrasyonda ksantin eklemesiyle operasyonel kararlılığı B) Hazırlanan biyosensörün zamana bağlı cevabı (+4⁰C’de depolanan 10mM pH: 7,0 PBS)

4.6.3.3. Bozucu Türlerin Belirlenmesi

Hazırlanan Ksantin Oksidaz biyosensörüyle gerçek numunelerde ksantin miktarı ölçümü yapılmıştır. Bunun için önce olası durumlarda girişimcilik etkisi yapabilecek (ürik asit, askorbik asit, glukoz, ve sodyum benzoat gibi)kimyasallara karşı bir çalışma yapıldı. Şekil 4.26 (A) da gözlendiği gibi girişimci etkisi oluşturacak kimyasalların değişik konsantrasyonlar da elde edilen biyosensör cevabı ile sabit konsantrasyonda ki ksantin konsantrasyonunda alınan cevaplar kıyaslandı. Girişim etkisi yapan kimyasalların varlığında I_{max} değeri çok fazla değişmez buda bu bileşiklerin varlığı ksantin miktarının belirlenmesine bir girişimi yoktur sonucunu verir.

Şekil 4.26 (B) de gösterilene göre 10 ile 25 gün arasında lineer doğrusallık yakalanmıştır. Daha sonraki günlerde doğrusallığın kaybolduğu bulunmuştur.



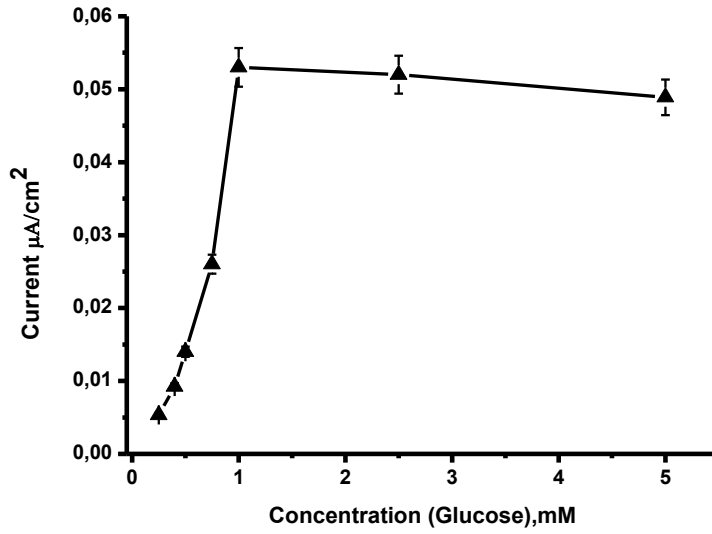
Şekil 4.25. Biyosensörün farklı substratlara verdiği cevap

4.7. Mikrobiyal Biyosensör Performans Faktörleri

4.7.1. DTP-Alkil-NH₂ Ditiyolpirol *G.Oxydans* Biyosensör Elektrodu

4.7.1.1. Doğrusal Tayin Aralığı

Optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra, bulunan koşullarda 10-(4H-Ditiyeno[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin)/*G. Oxydans* biyosensörleri kullanılarak glukoz tayini gerçekleştirildi ve *G.Oxydans* biyosensörü için cevap süresi 30 sn olarak bulundu. Glukoz konsantrasyonu ve akım arasındaki ilişkiden yararlanarak oluşturulan kalibrasyon grafiği şekil 4.27 'de verilmiştir. Ve elde edilen kalibrasyon neticesinde $y=0,0694x(\text{Mm}) -0,0171$ ($R^2=0,9848$) eşitliği elde edildi. Literatürlerde *G. Oxydans* hücreleri kullanılarak hazırlanan biyosensörlerin analitik performanslarının kıyaslanması yapıldı.



Şekil 4.26. Glukoz tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı [50 mM, pH 7,0 fosfat tamponu; 30 °C; -700 mV]

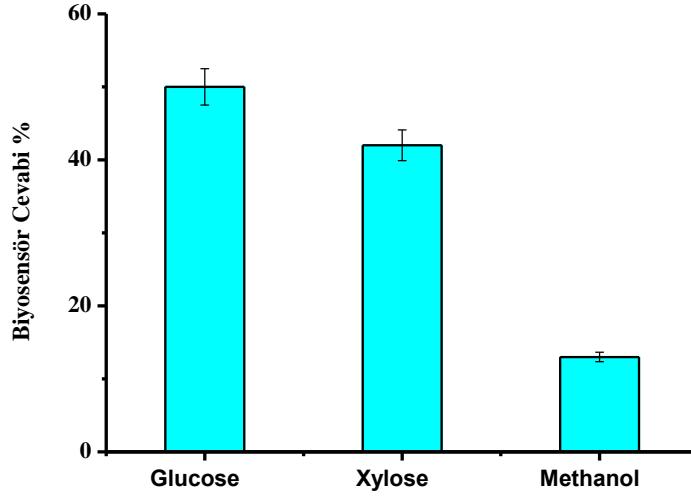
4.7.1.2. Analiz Sonuçlarının Tekrarlanabilirliği ve Operasyonel Stabilité

G. Oxydans biyosensörlerinin tekrarlanabilirliklerinin test edilmesi hazırlanan biyosensörlerin analitik karakterizasyonuna yöneliktir. Bu sistem için 0,25 mM glukoz içeren standartlar kullanılarak 10 ölçüm yapıldı. Bu işlem sonucunda LOD değeri $\pm 0,4943$ olarak bulunmuştur. Varvasyon katsayısı (% C.V) değeri de % 4,6951 olarak hesaplandı. Hazırlanan mikrobiyal biyosensörlerin operasyonel kararlılığının belirlenmesi amacıyla daha önce optimizasyonu yapılan koşullarda ard arda ölçümler alındı.

4.7.1.3. Bozucu Türlerin Belirlenmesi

10-(4H-Ditiyeno[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin)/*G. Oxydans* biyosensörü ile bazı bileşiklerin girişim etkisi yapıp yapmayacağını tayin etmek için glukoz, metanol, xylool, kullanılarak ölçümler yapılmıştır. Glukoz dışındaki diğer bileşikler için elde edilen sonuçlar Şekil 4.28' de gösterildi. Glukoz için elde edilen cevap %100 olarak kabul edildi ve diğer substratlar için % de biyosensör cevabı hesaplandı. Sırasıyla Xylose için % 84; Metanol için de % 26 biyosensör cevabı gözlemlendi. Substrat spesifikliğı sonuçları incelendiğimizde glukoz daha az duyarlılıkla olsa bile dönüşüme uğrattığını görülmektedir. *Gluconobacter* hücreleri çoklu dehidrogenaz aktivitesine sahiptirler ve bu yüzden substrat aralıkları geniştir. Ancak *G. Oxydans* ile hazırlanan biyosensörlerin spesifikliğı hücrelerin dehidrogenaz aktiviteleri kontrol edilerek değiştirilebilir. Dehidrogenaz aktiviteleri hücrelerin büyüdüğü karbon kaynağına bağlıdır (Svitel ve ark., 2006; Lee ve ark., 2002).

Hücreler glukoz içeren ortamda kültive edildiğı için glukoz dışındaki hiçbir monosakkaride biyosensör sinyal elde edilememişken alkol dehidrogenaz aktivitesinden dolayı metanol için biyosensör cevabı gözlenmiştir.



Şekil4.27.10-(4H-Ditiyeno[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin)/*G.Oxydans* biyosensörünün farklı substratlara (0,25 mM) cevabı

4.8. Gerçek Numune Analizi

Son olarak hazırlanan Poly (DTP-Aril-NH₂)/GOx biyosensör sistemleri ile gerçek örneklerdeki (Fizzy meyve suyu ve fizzy marka portakal suyu) toplam glukoz miktarı tayin etme çalışması yapıldı. Bunun için spektrofotometrik referans yöntem olan Trinder metodu ile de örneklerde ki glukoz miktarı tespit edilmeye çalışılmıştır (Barham and Trinder, 1972).

Bu metotta gerçekleşen reaksiyonda glukoz, glukoz oksidaz enzimi tarafından D-glukonata oksitlenir ve hidrojen peroksit oluşur. Peroksidaz varlığında fenol ve 4-aminoantipirin karışımı hidrojen peroksit tarafından oksitlenir. Oluşan kırmızı renkli kinon imin glukoz konsantrasyonu ile orantılıdır ve spektrofotometrik olarak izlenerek tayin gerçekleştirildi. Glukoz miktarının tayini için 500 nm deki absorbans değerleri gereklidir. Çizelge 4.6 Poly(DTP-Aril-NH₂)/GOx biyosensörüyle Trinder metodundan çıkan sonuçları göstermektedir.

Bunun için gazlı örneğin gazı alınmış ve örnekler 50 mM 4,5 fosfat tamponunda 1:20 oranında seyreltildi. Günlük hazırlanmış Poly (DTP -Aril-NH₂)/GOx biyosensörü ile

kalibrasyon eğrisi çizildi ve örneklerden alınan glukoz miktarını saptamak için kullanıldı. Biyosensörden alınan değerlerle referans yöntemden alınan değerler birbiriyle karşılaştırıldı. Çıkan sonuçlara göre Poly(DTP-Aril-NH₂)/GOx biyosensörü gerçek numunelerde glukoz tayini için çok rahatlıkla kullanılabilir.

Çizelge 4.6. Poly (DTP-Aril-NH₂)/GOx biyosensörü ve spektrofotometrik yöntemler kullanılarak meyve sularındaki toplam glukoz tayini deneyleri sonuçları

Örnek	Glukoz (M) ^a		
	DTP-Naftil-NH ₂ /GOx	Spektrofotometrik	Geri Kazanım %
Fizzy Meyve Suyu	0,064 M ± 0,006	0,065 M ± 0,001	98,5
Fizzy (with orange)	0,051 M ± 0,008	0,050 M ± 0,001	102
(n:3) *Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verilmiştir			

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Ditiyol pirol bileşikleri(DTP) pirol halkasının 2 ve 3 nolu pozisyonlarından bitişik tiyofen halkaları içeren yapılardır. Bu bileşiklerin düzlemsel bir yapıda π -konjuge yapıda olmasından dolayı son yıllarda birçok uygulama alanı bulmuştur. Bu tez çalışması kapsamında alkil ve aril grubu içeren daha önceki çalışmalardan farklı olarak elektron verici $-NH_2$ fonksiyonel grubu içeren pek çok nanoteknolojik alanda uygulama imkânı olacak yeni nesil N-Alkil- NH_2 , N-Aril- NH_2 dithionepirol bileşikleri sentezlendi. 10-(4H-Dithiyeno[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin molekül dibromo tiyofen bileşiğinin bir mol 1,10-diaminodekan ile Pd_2dba_3 katalizörlüğünde, ligand olarak BİNAP ve baz olarak Na^tOBut, çözücü olarak toluen kullanılarak gerçekleştirildi. Önemli bir yere sahip olan son yıllarda paladyum katalizör sistemli kalpling reaksiyonları içerisinde karbon azot arasındaki C-N bağı oluşturmak için en yaygın reaksiyon palladium temelli kalpling reaksiyonlarından biri olan Buchwald-Hartwig Aminasyon yöntemine göre gerçekleştirilmiş olup yapı tayini yapıldı. Gerçekleştirilen organopaladyum katalizli C-N bağı oluşumu reaksiyonuyla organik kimya alanında moleküllerin sentezi için en etkili yaklaşımlardan biri oldu.

5-(4H-ditiyol [3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)naftalin-1-amin molekülü CuI ve Pd katalizörlüğünde, ligand olarak L-prolin ve baz olarak ta Cs_2CO_3 kullanılarak DMSO çözücüsü kullanılarak Ullman Tipi Reaksiyon sistemine göre gerçekleştirildi. Sentezlenen bileşiklerin spektroskopik olarak yapılarının karakterizasyonu yapıldı. Bu sentez yöntemi pahalı olan palladyum şartlarına göre ekonomik olarak daha avantajlı olmasıyla dikkat çekti.

DTP-Alkil- NH_2 ve DTP-Aril- NH_2 türevi monomerlerin sentez ve karakterizasyon işlemlerinden sonra glukoz ve ksantin tayinine yönelik biyosensörler hazırlandı. Glukoz miktarının tespitine yönelik, sentezlenen 5-(4H-ditiyol [3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)naftalin-1-amin ve 10-(4H-Dithiyeno[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin monomerlerinin camsı karbon elektrot yüzey üzerine elektrokimyasal olarak polimerleştirildikten sonra, gluteraldehit kimyasalı ile çapraz olarak bağlandı ve mediyatör olarak iletken polimer kullanılan glukoz biyosensörleri hazırlandı. Ve hazırlanan bu biyosensörlerin karakterizasyonu ve optimum parametreleri belirlendi.

Ksantin miktarının belirlenmesi amacıyla elektrokimyasal olarak elektrot yüzeyine polimerleştirilen 10-(4H-Dithiyeno[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin monomeri gluteraldehit kimyasalının ksantin oksidaz enzimine kimyasal olarak bağlanmasıyla iletken polimerin mediyatör olarak kullanıldığı ksantin oksidaz enzim biyosensörü elde edildi ve hazırlanan bu biyosensörün karakterizasyon ve optimum değerleri belirlendi. Hazırlanan ksantin biyosensörünün diğer yapılan ksantin biyosensör çalışmalarıyla kıyaslandığında hazırladığımız ksantin biyosensörünün tayin limit sınırının ve cevap süresinin diğer hazırlanan sensör cevaplarına göre daha hassas olduğu görüldü.

Çizelge 5.1. Ksantin oksidaz enzimiyle yapılan farklı çalışmaların kıyaslanması

Elektrot Materyali	Cevap Süresi (s)(mAM ⁻¹)	Tayin Aralığı (µM)	Tayin Limit (µM)	Duyarlılık	Referans
Poly (DTP-Alkil-NH ₂)	5	0,3-25	0,074	124	Bu tez projesi
ZnO-NPs-PPy	8	0,8-40	0,80	-	Devi ve ark., 2011
CHT/Pt/PANI/Fe ₃ O ₄	8	0,2-36	0,10	1,0	Sadeghi ve ark. 2014
P(GMA-co-VFc)/MWCNT	4	2-48	0,12	16	Dervisevic ve ark.,2015
P(GMA-co-VFc)/REGO-Fe ₃ O ₄	3	2-36	0,17	0,17	Dervisevic ve ark.,2015

Hazırlanan bu biyosensör sistemlerini diğer enzim ve mikrobiyal bazlı biyosensörlerinden farklı kılan stabiliteyi, hızı ve duyarlılığı arttıran iletken polimerlerin kullanılmasıydı. Aynı zamanda enzim biyosensörlerin de kattığı bazı avantajlar vardır. Enzim sensörleri ilgili substratlarına karşı yüksek spesifiklik gösterirler. Biyomoleküller için uygun bir matris olan ve bu nedenle biyosensör uygulamalarında stabiliteyi, hızı ve duyarlılığı arttırmak amacıyla kullanılabilen iletken polimerler aracılığıyla hazırlanan enzim biyosensörün doğrusal tayin aralığının geniş olması, sensör sistemi ile tekrarlanabilir sonuçlar elde edilebilmesi geliştirilen biyosensörün biyoteknolojik uygulamalarda kullanım alanına sahip olabileceğini göstermektedir.

Bulunan sonuçlar literatürde yer alan benzer çalışmalarla kıyaslandığında medyatör kullanarak gerçekleştirilen DTP-Alkil-NH₂ ve DTP-Aril-NH₂ biyosensör çalışmaları üstünlük taşımaktadır. Bazı durumlarda ortamdaki oksijen varlığı analiz sonuçlarını etkilemektedir ve ortamda oksijen istenmemektedir. Böyle durumlarda mediyatörlü biyosensörler seçilmelidir.

Çizelge 5.2. Amperometrik mikroorganizma temelli biyosensör örnekleri

Hedef Analit	Mikroorganizma	Elektrot	Tayin Limiti	Tayin Aralığı	Referans
Glucose	<i>G.Oxydans</i>	GE		0,05-1,5 mM	Bu tez çalışması
Galactose	<i>P.Putida</i>	CNT-GE	-	0,5-6mM	Timur ve ark. (2007)
Glucose	<i>G.Oxydans</i>	GE	-	0,25-4mM	Tuncağıl ve ark. (2009)
Glucose	<i>G.Oxydans</i>	GE	-	0,05-1 mM	Odacı ve ark.(2009)
Glucose	<i>P.Putia</i>	Cys-Au	-	1-7,5 mM	Timur ve ark.(2007)
Glucose	<i>P.Putia</i>	CNT-CPE	-	0,05-2 mM	Timur ve ark.(2007)
Mannos	<i>P.Flouorescens</i>	GE	-	0,2-1 mM	Odacı ve ark. (2008)
Etanol	<i>G.Oxydans</i>	GCE	3,3µM	10µM-1,5mM	Valach ve ark. (2009)
Vitamin B1	<i>S.Cerevisiae</i>	DOE	-	5-100 mM	Akyılmaz ve ark. (2006)
Caffein	<i>P.Alcaligenes</i>	COE	-	0,1-1mg/ml	Babu ve ark. (2007)
L-lactate	<i>H.polymorpHa</i>	GE	-	6 µM-1,6 mM	Smutok ve ark.(2007)
L-Lysine	<i>S.Cerevisiae</i>	DOE	-	1-10 µM	Akyılmaz ve ark.(2007)
Methane	<i>P.aeruginosa+</i> <i>K.sp.</i>	PtE	-	%0,3 (V/V) %1-5 (V/V)	Wen ve ark. (2008)
Phenol	<i>P.putida</i>	CNT-CPE	-	0,5- 4 mM	Timur ve ark. (2007)
p-Nitrophenol	<i>Mycobacterium</i>	CPE	20nM	20 µM	Mulchandani ve ark. (2005)
Catecol	<i>p.Putida</i>	Cys-Au	-	0,025-0,2 mM	Timur ve ark. (2007)
Bilirubin oxidase	<i>S.cerevisiae</i>	SPCE	-	6,6-220 mg/L	Nakamura ve ark.(2007)

Çizelge 5.2. (devamı) Amperometrik mikroorganizma temelli biyosensör örnekleri

Hedef Analit	Mikroorganizma	Elektrot	Tayin Limiti	Tayin Aralığı	Referans
Bilirubin Oxidase	<i>P. Syringae</i>	DOE	-	5-100 mg /L	Kara ve ark. (2009)
Choline	<i>A.globiformis</i>	COE	-	80nM -0,2 mM	Sytoycheva ve ark. (2006)
Paraoxon	<i>P.putida JS444</i>	CPE	1 nM	2µM	Lei ve ark. (2007)
parathion	<i>P.putida JS444</i>	CPE	1 nM	2µM	Lei ve ark. (2007)

Tüm bu sonuçlar kullanılan DTP türevlerinin enzim ve mikrobiyal molekülleri tayini için biyosensör geliştirilmesinde önemli bir katkı sağladığını göstermektedir. Sentezlenen DTP türevleri monomerleri elektrot yüzeyinde kolayca polimerleşmekte ve oluşturulan yüzeyler elektron akımını kolaylaştırarak yüksek duyarlılığa sahip yeni elektrotlar oluşturmasında etkili sistem oluşturulmuştur.

6. KAYNAKLAR

- Ahuja, T., Mir, I., Kumar, A. ve Rajesh, D., 2007. Biomolecular Immobilization On Conducting Polymers For Biosensing Applications. *Biomaterials*, 28, 791805.
- Ak, M., 2011. Tiyofen ve Pirol Esaslı Yeni Monomerlerin Sentezi, Polimerleştirilmesi Ve Polimerlerin Özelliklerinin İncelenmesi. *Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı*, Ankara.
- Akyılmaz, E., Erdoğan, A., Öztürk, R. ve Yasa, I., 2007. Sensitivite Determination Of L-Lysine With A New Amperometric Microbial Biosensor Based On *Saccharomces Cerevisia* Yeast Cells. *Biosensors Bioelectronic*, 22, 1055-1060.
- Anastas, P.A. ve Kirchoff, M.M., 2002. Origins, Current Status, and Future Challenges of Green Chemistry. *Accounuts of Chemical Research*, 35(9), 686-694.
- Andersson, M.R., Selse, D., Berggren, M., Jaervinen, H., Hjertberg, T., Wennerstroem, O. ve Oesterholm, J.E., 1994. Regioselective Polymerization of 3-(4-octylpHenyl)thiopHene with FeCl₃. *Macromolecules*, 27 (22), 6503–6506.
- Armarego, W.L.F., 1996. Purification of Laboratory Chemicals. *Copyright Elsevier, Burlington, USA*.
- Arslan Udum, Y., Yıldız, H.B., Azak, H., Sahin, E., Talaz, O., Çırpan, A. ve Toppare, L., 2014. Synthesis And Spectroelectrochemistry Of Dithieno (3,2-B:2',3'-D) Pyrrole Derivatives. *Journal Of Applied Polymer Science*, 131.
- Azak, H., Guler, E., Can, U., Odaci Demirkol, D., Yıldız, H.B., Talaz, O. ve Timur, S., 2013. Synthesis Of An Amine-Functionalized NapHthalenecontaining Conducting Polymer As A Matrix For Biomolecule Immobilization. *RSC Advances*, 3, 19582.
- Babu, V.R.S., Patra, S., Karanth, N.G., Kumar, M.A. ve Thakur, M.S., 2007. Development Of A Biosensor For Caffeine. *Analytica Chimica Acta*, 582, 329-334.
- Ballav, N. ve Biswas, M., 2005. Conducting Composites of PolythiopHene and Polyfuran with Acetylene Black. *Polymer International*, 54, 725-729.
- Banica, F.G., 2012. Chemical Sensors and Biosensors: Fundamentals and Applications. *John Wiley & Sons.*, 576.
- Baran, P.S., Zografos, A.L. ve O'Malley, D.P., 2004. Short Total Synthesis of (±)-Sceptrin. *Journal of the American Chemical Society*, 126, 3726-3727.
- Baş, S.Z., 2011. Ksantin Tayini İçin Amperometrik Enzim Elektrotlarının Geliştirilmesi. *Doktora Tezi. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı*, Konya.

- Bennett, J.T., 2012. Palladium-Catalyzed Amine Synthesis: Chemoselectivity and Reactivity Under Aqueous Conditions. *PH D Thesis, Dalhousie University, Department of Chemistry.*
- Biswas, S., Dutta, B. ve Bhattacharya, S., 2013. Dependence of The Carrier Mobility And Trapped Charge Limited Conduction On Silver Nanoparticles Embedment In Doped Polypyrrole Nanostructures. *Journal Applied Physics*, 114, 143701.
- Blasse, G. ve Grabmaier, B.C., 1994. Luminescent Materials, *Springer-Verlag*, 580.
- Bond, G.C., 1987. Heterogeneous Catalysis: Principles and Applications. *Clarendon Press*, Oxford, UK.
- Brust, M., Bethell, D., Kiely, C.J. ve Schiffrin, D.J., 1998. Self-Assembled Gold Films with Nonmetallic Optical and Electronic Properties. *Langmuir*, 14, 5425-5429.
- Cafieri, F., Carnuccio, R., Fattorusso, E., Tagliatela-Scafati, O. ve Vallefucio, T., 1997. Anti-Histaminic Activity of Bromopyrrole Alkaloids Isolated from Caribbean Agelas Sponges. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 7, 2283-2288.
- Carrillo, I., Sanchez, E., Fierro, J.L.G., Raso, M.A., Acción, F., Enciso, E. ve Redondo, M.I., 2013. Conductivity And Long Term Stability Of Polypyrrole Poly(Styrene-Co-Methacrylic Acid) Core– Shell Particles At Different Polypyrrole Loadings. *Thin Solid Films*, 539, 154–160.
- Chiang, C.K., Fincher, C.R., Park, Y.W., Heeger, A.J. ve Shirakawa, H., 1978. Electrical Conductivity in Doped Polyacetylene. *Physical Review Letters*, 40, 1472 .
- Cihaner, A., Mert, O. ve Demir, A.S., 2009. A Novel Electrochromic and Fluorescent Polythienylpyrrole Bearing 1,1'-Bipyrrrole. *Electrochimica Acta*, 54, 1333-1338.
- Coelho, E.C.S., Nascimento, V.B., Ribeiro, A.S. ve Navarro, M., 2014. Electrochemical And Optical Properties Of New Electrochromic Andfluorescent Nitrobenzoyl Polypyrrole Derivatives. *Electrochimica Acta*, 123, 441– 449.
- Cornils, B., Herrmann, W.A., Schlogl, R. ve Wong, C.H., 2000. Catalysis from A to Z.A. Concise Encyclopedia, *Wiley, VCH, Weinheim.*
- Coskun, Y., Cirpan, A. ve Toppare, L., 2004. Construction of Electrochromic Devices and Their Electrochromic Properties. *Polymer*, 45, 4989–4995.
- Cosnier, S., 2003. Biosensors Based On Electropolymerized Films: New Trends. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377, 507-520.
- Çolak, Ö., 2014. Sakkaroz Tayini İçin Biyosensör Hazırlanması. *Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilimdalı, Ankara.*

- De Benedetto, G.E., Palmisano, F. ve Zambonin, P.G., 1996. Flow-Through Tyrosinase Enzyme Reactor Based On Reticulated Vitrous Carbon Functionalized By An Electrochemically Sntesized Film. *Analytica Chimica Acta*, 326, 149-154.
- De Muynck, W., Van Hyfte, E., Verbeken, K., De Belie, N. ve Verstraete, W., 2008. In Situ Enrichment Of Carbonate Producing Bacteria For Biodeposition İn Practice. *In: Proc. of the 1st International Conference on BioGeoCivil Engineering*, Delft, The Netherlands.
- Dervisevic, M., Custiuc, E., Çevik, E., Durmuş, Z., Şenel, M. ve Durmuş, A., 2015. Electrochemical Biosensor Based On REGO/Fe₃O₄ Bionanocomposite İnterface For Xanthine Detection İn Fish Sample. *Food Control*, 57,402-410.
- Dervisevic, M., Custiuc, E., Çevik, E. ve Şenel, M., 2015. Construction Of Novel Xanthine Biosensor By Using Polymeric Mediator/MWCNT Nanocomposite Layer For Fish Freshness Detection. *Food Chemistry* ,181,277-283.
- Devi, R., Thakur, M. ve Pundir, C.S., 2011. Construction And Application Of An Amperometric Xanthine Biosensor Based On Zinc Oxide Nanoparticles-Polypyrrole Composite Film. *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 3420-3426.
- Diderich, P. ve Stang, P.J., 1998. Metal Catalysis Cross Coupling Reactions, *Wiley-VCH*, Weinheim, Germany,49-97.
- Ding, B., Lu, X., Yuan, C., Yang, S. ve Han Y., 2012. One Step Electrochemical Composite Polymerization Of Polypyrrole Integrated With Functionalized GrapHene/Carbon Nanotubes Nanostructured Composite Film For Electrochemical Capacitors. *Electrochimica Acta*, 62, 132-139.
- Downum, K.R. ve Wen, J.H., 1995. American Chemical Society Books, *Washington*, DC, 134-143.
- Downum, K.R., 1986. In Natural Resistance of Plants to Pests; Green, M.B., Hedin, P.A., Çev., *American Chemical Society Books*, 197-205, Washington.
- Duan, F., Zhang, Q., Shi, D. ve Chen, M., 2013. Enhanced Visible Light PHotocatalytic Activity Of Bi₂WO₆ Via Modification With Polypyrrole. *Applied Surface Science*, 268, 129– 135.
- Emre, F.B., 2007. Kolesterol Biyosensörü Tasarımında Bazı Polimerik Materyallerin Enzim İmmobilizasyon Ortamı Olarak Kullanımı. *İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*, Malatya.
- Endo, T., Ikeda, R., Yanagida, Y. ve Hatsuzawa, T., 2008. Fabrication Of Core-Shell Structured Nanoparticle Layer Substrate for Excitation of Localized Surface Plasmon Resonance and Its Optical Response for DNA in Aqueous Conditions. *Analytica Chimica Acta*, 611, 200–205.

- Evenson, J.S. ve Rasmussen, C.S., 2010. N-Acyldithieno[3,2-b:2',3'-d]pyrroles: Second Generation Dithieno[3,2-b:2',3'-d]pyrrole Building Blocks with Stabilized Energy Levels. *Organic Letters*, 12, 4054-4057.
- Faid, K., Cloutier, R. ve Leclerc, M., 1993. Design of Novel Electroactive Polybithiophene Derivatives. *Macromolecules*, 26, 2501-2507.
- Ferenets, M. ve Harlin, A., 2007. Chemical In Situ Polymerization Of Polypyrrole On Poly(Methyl Metacrylate) Substrate. *Thin Solid Films*, 515, 5324-5328.
- Ferreira, M., Fiorito, P.A. ve Oliveira Jr. N.O., 2004. Enzyme-Mediated Amperometric Biosensors Prepared With The Layer-By-Layer (LbL) Adsorption Technique. *Biosensors and Bioelectronics*, 19, 1611-1615.
- Galzi, C. ve Zerbi, G., 1996. Poly (thiophenes), Substituted. *In The Polymeric Materials Encyclopedia CRC Press*, Boca Raton, FL, 6923.
- Garnier, F., 1996. Thin Film Transistors Based On Semiconductors. *Pure and Applied Chemistry*, 68, 1455-1462.
- Genies, E.M. ve Bidan, G., 1983. Spectroelectrochemical Study Of Polypyrrole Films. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 149, 101-113.
- Gerard, M., Chaubey, A. ve Malhotra, B.D., 2002. Application of Conducting Polymers to Biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 17, 345-359.
- Gill, R., Patolsky, F., Katz, E. ve Willner, I. 2005. Electrochemical Control of the Photocurrent Direction in Intercalated DNA/CdS Nanoparticle Systems. *Angewandte Chemie International Edition*, 44, 4554-4557.
- Ginness, M., Corry, J. ve Proctor, P., 1974. Amorphous Semiconductor Switching in Melanins. *Science*, 183, 853-855.
- Gong, X., Robinson, M.R., Ostrowski, J.C., Moses, D., Bazan, G.C. ve Heeger, A.J., 2002. High-Efficiency Polymer-Based Electrophosphorescent Devices. *Advanced Materials*, 14, 581-585.
- Govardhan, C.P., 1999. Crosslinking Of Enzymes For Improved Stability And Performance. *Curr. Opin. Journal of Biotechnology*, 10, 331-335.
- Granot, E., Patolsky, F. ve Willner, I., 2004. Electrochemical Assembly of a CdS Semiconductor Nanoparticle Monolayer on Surfaces: Structural Properties and Photoelectrochemical Applications. *The Journal of Physical Chemistry B*, 108, 5875-5881.
- Groenendaal, L.B., Zotti, G., Aubert, P.H., Waybright, S.M. ve Reynolds, J.R., 2003. Electrochemistry of Poly(3,4-alkylenedioxythiophene) Derivatives. *Advanced Materials*, 11, 855-879.

- Gursel, A., Alkan, S., Toppare, L. ve Yagci, Y., 2003. Immobilization of Invertase and Glucose Oxidase in Conducting h-Type Polysiloxane/Polypyrrole Block Copolymer. *Reactive and Functional Polymers*, 57, 57-65.
- Gurunathan, K., Amalnerkar, D.P. ve Trivedi, D.C., 2003. Synthesis and Characterization of Conducting Polymer Composite (Pan/TiO₂) For Cathode Material In Rechargeable Battery. *Materials Letters*, 57, 1642–1648.
- Gustafsson, J.C., Inganas, O. ve Anderson, A.M., 1994. Conductive Polyheterocycles As Electrode Materials In Solid State Electrochromic Devices. *Synthetic Metals*, 62, 17-21.
- Gutierrez, M.H., Ford, W.T. ve Herbert, A.P., 1984. A Warning About Structures of Thiophene Polymers. *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry*, 22, 3789-3794.
- Guzmán-Vázquez de P., Pena, A., Parrado, N., Reviejo, C. ve Pingarrón, J.M., 2004. Amperometric Multidetector With Composite Enzyme Electrodes. *Talanta*, 62, 896–903.
- Günes, S., Neugebauer, H. ve Sariciftci, N.S., 2007. Conjugated Polymer-Based Organic Solar Cells. *Chemical Reviews*, 107(4), 1324-1338.
- Heeger, D.J., 1991. Nonlinear model of neural responses in cat visual cortex.
- Hermann, W.A. ve Kohlpainter, C.W., 1993. Process For Cross-Coupling Aromatic Boron Compounds With Aromatic Halogen Compounds or Perfluoroalkylsulfonates. *Angewandte Chemie International Edition*, 32, 1524-1544, England.
- Isık, S., Alkan, S., Toppare, L., Cianga, I. ve Yagci, Y., 2003. Immobilization Of Invertase And Glucose Oxidase In Poly 2-Methylbutyl-2-(3-Thienyl) Acetate/Polypyrrole Matrices. *European Polymer Journal*, 39, 2375–2381.
- Ito, T., Shirakawa, H. ve Ikeda, S., 1974. Simultaneous Polymerization And Formation Of Polyacetylene Film On The Surface Of A Concentrated Soluble Ziegler-Type Catalyst Solution. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 12, 11
- Joshi, A., Gangal, S.A. ve Gupta, S.K., 2011. Ammonia Sensing Properties Of Polypyrrole Thin Films At Room Temperature. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 156, 938-942.
- Kajiya, Y., Sugai, H., Iwakura, C. ve Yoneyama, H., 1991. Glucose Sensitivity Of Polypyrrole Films Containing Immobilized Glucose Oxidase And Hydroquinone Sulfonate Ions. *Analytical Chemistry*, 63, 49-54.

- Kamat, P.V., 2007. Meeting the Clean Energy Demand: Nanostructure Architectures for Solar Energy Conversion. *The Journal of Physical Chemistry C*, 111, 2834-2860.
- Kang, H.C. ve Geckeler, K.E., 2000. Enhanced Electrical Conductivity Of Polypyrrole Prepared By Chemical Oxidative Polymerization: Effect Of The Preparation Technique And Polymer Additive. *Polymer*, 41, 6931-6934.
- Katz, H.E., 1997. Organic Molecular Solids As Thin Film Transistor Semiconductors. *Journal of Materials Chemistry*, 7, 369-376.
- Kauffmann, J.M. ve Guilbault, G.G., 1992. Bioanalytical Applications of Enzymes. *Wiley*, 36.
- Keifer, P.A., Schwartz, R.E., Koker, M.E.S., Hughes, R.G., Rittschof, D. ve Rinehart, K.L., 1991. Bioactive Bromopyrrole Metabolites From the Caribbean Sponge *Agelas Conifera*. *The Journal of Organic Chemistry*, 56, 2965-2975.
- Klibanov, A.M., 2001. Review Article Improving Enzymes By Using Them In Organic Solvents. *Nature*, 409, 241-246.
- Koeckelberghs, G., De Cremer, L., Persoons, A. ve Verbiest, T., 2007. Influence of the Substituent and Polymerization Methodology on the Properties of Chiral Poly(dithieno[3,2-*b*:2',3'-*d*]pyrrole)s. *Macromolecules*, 40, 4173-4181.
- Kossmehl, G. ve Engelmann, G., 1999. Application of Electrically Conductive Polythiophenes Handbook of Oligo- and Polythiophenes, Handbook of Oligo- and Polythiophenes. Editor(s): Denis Fichou *Wiley-Vch Verlag GmbH*. 491-524.
- Kossmehl, G., 1999. Handbook of Oligo- and Polythiophenes Fichou, D. (Ed.), *Wiley-VCH*, Weinheim.
- Kossmehl, G.A., 1986. Semi-conducting and Conducting Polymers With Aromatic and Heteroaromatic Units, In Handbook of Conducting Polymers, ed. Skotheim, T.A. *Marcel Dekker*, 351, New York.
- Kumar, D. ve Sharma, R.C., 1998. Advances In Conducting Polymers. *European Polymer Journal*, 34, 1053-1060.
- Lange, U., Roznyatovskaya, N.V. ve Mirsky, V.M., 2008. Conducting Polymers In Chemical Sensors And Arrays. *Analytica Chimica Acta*, 614, 1-26.
- Lei, Y., Priti, M., Chen, W. ve Mulchandani, A., 2007. Biosensor For Direct Determination Of Fenitrothion And EPN Using Recombinant *Pseudomonas Putida* JS444 With Surface-Expressed Organophosphorous Hydrolase. 2. Modified Carbon Paste Electrode. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 136, 243-250.

- Leonid, I. ve Belen, K., 1994. Relative Stabilities of Hetarenium Ions: Factors Controlling Positional Selectivities of Electrophilic Substitution and Acid-induced Transformations of Pyrrole, Furan and Thiophene Derivatives. *Heterocycles*, 37, 2029–2032.
- Li, Q., Zhang, C. ve Li, J., 2011. Photocatalytic and Microwave Absorbing Properties of Polypyrrole/Doped TiO₂ Composite by In Situ Polymerization Method. *Journal of Alloys and Compounds*, 509, 1953–1957.
- Lin, J.W.P. ve Dudek, L.P., 1980. Synthesis and Properties of Poly (2,5- thienylene). *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry*, 18, 2869-2873.
- Liu, J., Guo, X., Bu, L., Xie, Z., Cheng, Y., Geng, Y., Wang, L., Jing, X. ve Wang, F., 2007. White Electroluminescence From a Single-Polymer System With Simultaneous Two-Color Emission: Polyfluorene Blue Host and Side-Chain-Located Orange Dopant. *Advanced Functional Materials*, 17(12), 1917-1925.
- Lu, G., Li, C. ve Shi, G., 2006. Polypyrrole Micro- And Nanowires Synthesized By Electrochemical Polymerization of Pyrrole In The Aqueous Solutions Of Pyrenesulfonic Acid. *Polymer*, 47, 1778-1784.
- MacDiarmid, A.G., Chiang, J.C., Richter, A.F. ve Epstein, A.J., 1987. Polyaniline: A New Concept In Conducting Polymers. *Synthetic Metals*, 18; 285-290.
- Malinauskas, A., 2001. Chemical Deposition Of Conducting Polymers. *Polymer*, 42, 3957-3972.
- Malleron, J.L., Fiaud, J.C. ve Legros, J.Y., 1997. Handbook of Palladium-Catalyzed Organic Reactions, *Academic Press*, London.
- Mao, F., Mano N. ve Heler, A., 2003. Long Tethers Binding Redox Centers To Polymer Backbones Enhance Electron Transport In Enzyme Wiring Hydrogels. *Journal of the American Chemical Society*, 125, 4951-4957.
- Matharu, Z., Sumana, G., Arya, S.K., Singh, S.P., Gupta, V. ve Malhotra, B.D., 2007. Polyaniline Langmuir-Blodgett-Film-Based Cholesterol Biosensor. *Langmuir*, 23, 13188–13192.
- Mc Clain, M.D. ve Curtis, M.D., 1996. Poly (thiophenes):Organometallic Syntheses. *In The Polymeric Materials Encyclopedia*. CRC Press, 6918, Boca Raton, FL.
- McAndrew, P.E., Parsons, D.W., Simard, L.R., Rochette, C., Ray, P.N., Mendell, J.R., Prior, T.W. ve Burghes, A.H., 1997. Identification of Proximal Spinal Muscular Atrophy Carriers and Patients by Analysis of SMNT and SMNC Gene Copy Number. *The American Journal of Human Genetics*, 60, 1411-22.
- Miyaura, N. ve Suzuki, A., 1979. Stereoselective Synthesis Of Arylated (*E*)-Alkenes By The Reaction Of Alk-1-Enylboranes With Aryl Halides In The Presence Of Palladium Catalyst. *Chemical Communications*, 19, 866-867.

- Miyaura, N. ve Suzuki, A., 1995. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. *Chemical Reviews*, 95, 2457-2483.
- Miyaura, N., Yamada, K. ve Suzuki, A., 1979. A New Stereospecific Cross-Coupling by the Palladium-Catalyzed Reaction of 1-Alkenylboranes With 1-alkenyl or 1-Alkynyl Halides. *Tetrahedron Letters*, 20(36) 3437-3440.
- Muchandani, P., Hangarter, C.M., Lei, Y., Chen, W. ve Mulchandani, A., 2005. Amperometric Microbial Biosensors For Pnitrophenol Using Moraxella Sp. Modified Carbon Paste Electrode. *Biosensors Bioelectronic*, 21, 523-527.
- Moreno, J.S., Panero, S. ve Scrosati, B., 2008. Electrochemical Polymerization Of Polypyrrole-Heparin Nanotubes: Kinetics And Morphological Properties. *Electrochimica Acta*, 53, 2154-2160.
- Mortimer, R.J., Dyer, A.L. ve Roncali, J.R., 2006. Electrochromic Organic and Polymeric Materials For Display Applications. *Displays*, 27, 2-18.
- Nakamura, Y., Tsuchiya, M. ve Ohta, H., 2007. Plastidic Phosphatidic Acid Phosphatases Identified In A Distinct Subfamily Of Lipid Phosphate Phosphatases With Prokaryotic Origin. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 29013.
- Nelson, M.J. ve Griffin, E.G., 1916. Adsorption Of Invertase. *Journal of the American Chemical Society*, 38, 1109.
- Nigrey, P.J., Mac Diarmid, A.G. ve Heeger, A., 1979. Electrochemistry Of Polyacetylene, (CH)_x: Electrochemical Doping of (CH)_x Films to The Metallic State. *Journal of the Chemical Society Chemical Communications*, 594-595.
- Odacı, D., 2010. Karbohidrat Analizine Yönelik Biyosensör Sistemlerinin Geliştirilmesi, Karakterizasyon Ve Uygulamaları, *Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, İzmir*.
- Odacı, D., Timur, S. ve Telefoncu, A., 2009. A Microbial Biosensor Based On Bacterial Cells Immobilized On Chitosan Matrix. *Bioelectrochemistry*, 75, 77-82.
- Odacı, D., Timur, S. ve Telefoncu, A., 2008. Bacterial Sensors Based On Chitosan Matrices. *Sensors And Actuators B: Chemical*, 134, 89-94.
- Ogawa, K. ve Rasmussen, S.C., 2006. N-Functionalized Poly (dithieno[3,2-*b*:2',3'-*d*]pyrrole)s: Highly Fluorescent Materials with Reduced Band Gaps. *Macromolecules*, 39, 1771-1778.
- Ogawa, K. ve Rasmussen, C.S., 2003. A Simple and Efficient Route to N-Functionalized Dithieno[3,2-*b*:2',3'-*d*]pyrroles: Fused-Ring Building Blocks for New Conjugated Polymeric Systems. *The Journal of Organic Chemistry*, 68(7), 2921-2928.

- Ozawa, F., Kubo, A. ve Hayashi, T., 1992. Generation of Tertiary PHospHine-Coordinated Pd(0) Species from Pd(OAc)₂ in the Catalytic Heck Reaction. *Chemistry Letters*, 11, 2177–2180.
- Özcan, L., 2008. Polipirol İletken Polimerinin Biyosensör Olarak Kullanımı. *Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.*
- Özlu, A., 2013. α -Amilaz Enziminin Kitosan ile Hazırlanan Kompozit Taşıyıcılar Üzerine Kovalent Olarak İmmobilizasyonu. *Yüksek Lisans Tezi. Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa, Türkiye.*
- Özyılmaz, G., 2005. Glukoz Oksidaz ve Katalazın Ayrı Ayrı ve Birlikte İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu. *Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.*
- Palmisano, F., Centonze, D. ve Zambonin, P.G., 1994. An İn Situ Electro Synthesized Amperometric Biosensor Based On Lactate Oxidase İmmobilized İn A Poly-O-PHENylenediamine Film: Determination Of Lactate İn Serum By Flow İnjection Analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, 9, 471-479.
- Parameswaran, M., Balaji, G., Jin, T.M., Vijila, C., Vadukumpully, S., Furong, Z. ve Valiyaveetli, S., 2009. Charge Transport Studies in Fluorene – Dithieno[3,2-b:2',3'-d]pyrrole Oligomer Using Time-of-flight PPhotoconductivity Method. *Organic Electronics*, 10(8), 1534-1540.
- Patel, N.G., Meier, S., Cammann, K. ve Chemnitiu, G.C., 2001. Screen-Printed Biosensors Using Different Alcohol Oxidases. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 75, 101–110.
- Patolsky, F., Gill, R., Weizmann, Y., Mokari, T., Banin, U. ve Willner, I., 2003. Lighting-Up the Dynamics of Telomerization and DNA Replication by CdSe–ZnS Quantum Dots. *Journal of the American Chemical Society*, 125, 13918–13919.
- Pekin, B., 1979, Biyokimya Mühendisliği (Temel İlkeler), İzmir.
- Peng, H., Soeller, C. ve Travas-Sejdic, J., 2007. Novel Conducting Polymers for DNA Sensing. *Macromolecules*, 40, 909–914.
- Pokhodenko, V.D., Guba, N.F., Gajduk, O.A. ve Shakhnin, D.B., 1993. Synthesis and Properties of A New Conducting Polymer Based on 3-Methyl-4-PHENylthiopHene. *Synthetic Metals*, 60, 77-79.
- Przybyt, M. ve Bialkowska, B., 2002. Enzyme Electrodes Constructed On The Basis Of Oxygen Electrode With Oxidases İmmobilised By Sol-Gel Technique. *Journal of Materials Science*, 20, 63–79.
- Randriamahazaka, H., Plesse, C., Teyssié, D. ve Chevrot, C., 2005. Relaxation Kinetics Of Poly(3,4-EthylenedioxythiopHene) İn-1-Ethyl-Methylimidazoliumbis

- ((Trifluoromethyl)Sulfonyl) Amide Ionic Liquid During Potential Step Experiments. *Electrochimica Acta*, 50, 1515-1522.
- Roncali, J., 1999. Electrogenated Functional Conjugated Polymers As Advanced Electrode Materials. *Journal of Materials Chemistry*, 9, 1875
- Rosa, R., Silva, W., de Motta, E., Rodriguez, A.D., Morales, J.J. ve Ortiz, M., 1992. Antimuscarinic Activity Of A Family Of C₁₁N₅ Compounds Isolated From Agelas Sponges. *Experientia*, 48, 885-887.
- Röckel, B., Huber, J., Gleiter, R. ve Schumann, W., 1994. Synthesis of Functionalized Poly(dithienylpyrrole) Derivatives and Their Application in Amperometric Biosensors. *Advanced Materials*, 6 (7-8), 568–571.
- Ruo Chen, L. ve Zhen Ping, L., 2009. Polythiophene: Synthesis in Aqueous Medium and Controllable Morphology. *Chinese Science Bulletin*, 54, 2028-2032.
- Sadana, A., 2001, Engineering Biosensors: Kinetics and Design Applications, 1st ed., Academic Press, USA,
- Sadeghi, S., Fooladi, E. ve Malekaneh, M., 2014. A Nanocomposite/Crude Extract Enzyme-Based Xanthine Biosensor. *Analytical Biochemistry*, 464, 51–59.
- San Miguel, L., Porter III, W.W. ve Matzger, A.J., 2007. Planar B-Linked Oligothiophenes Based On Thieno[3,2-B]Thiophene And Dithieno[3,2-B:2',3'-D]Thiophene Fused Units. *Organic Letters*, 9(6), 1005-1008.
- Saxton, J.E., 1997. Recent Progress In The Chemistry Of The Monoterpenoid Indole Alkaloids. *Natural Product Reports*, 14, 559-590.
- Schneider, F., 1979. Sugar Analysis, Official and Tentative Methods Recommended by the International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis, ICUMSA, Peterborough.
- Schoevaart, R., Wolbers, M.W., Golubovic, M., Ottens, M., Kieboom, A.P.G., Rantwijk, F., Wielen, L.A.M. ve Sheldon, R.A., 2004. Preparation, Optimization, And Structures Of Cross-Linked Enzyme Aggregates (Cleas). *Biotechnology and Bioengineering*, 87, 754–762.
- Schuhmann, W., Lehn, C., Schmidt, H.L. ve Grundig, B., 1992. Comparison Of Native And Chemically Stabilized Enzymes In Amperometric Enzyme Electrodes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 7, 393–398.
- Sheldon, R.A., 2007. Cross-Linked Enzyme Aggregates (Cleas): Stable And Recyclable Biocatalysts. *Biochemical Society Transactions*, 35, 1583–1587.
- Shinde, S.S., Gund, G.S., Dubal, D.P., Jambure, S.B. ve Lokhande, C.D., 2014. Morphological Modulation Of Polypyrrole Thin Films Through Oxidizing

- Agents And Their Concurrent Effect On Supercapacitor Performance. *Electrochimica Acta*, 119, 1–10.
- Shipway, A.N., Lahav, M., Blonder, R. ve Willner, I., 1999. Bis-Bipyridinium CyclopHane Receptor–Au Nanoparticle Superstructures for Electrochemical Sensing Applications. *Chemistry of Materials*, 11, 13-15.
- Shirakawa, H., Louis, E.J., Mac Diarmid, A.G., Chiang, C.K. ve Heeger, A.J., 1977. Synthesis Of Electrically Conducting Organic Polymers: Halogen Derivatives Of Polyacetylene, (CH)_x. *Journal of the Chemical Society Chemical Communications*, 578- 580.
- Shirota, Y. ve Kageyama, H., 2007. Charge Carrier Transporting Molecular Materials and Their Applications in Devices. *Chemical Reviews*, 107(4), 953-1010.
- Sinou, D., 1987. PHospHines Hydrosolubles, Syntheses et Applications en Catalyse. *Bulletin de la Societe Chimique de France*, 480-486.
- Situmorang, M., Gooding, J.J., Hibbert, D.B. ve Barnett, D., 1998. Electrodeposited Polytyramine As An Immobilisation Matrix For Enzyme Biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 13, 953–962.
- Skoog, D., Holler, F. ve Nieman, T., 1998. Principles of Instrumental Analysis.
- Skotheim, T.A., 1986. Handbook of Conducting Polymer Marcel Dekker: *New York*, New York
- Smith, T.W., Kuder, J.E. ve Wychick, D., 1976. Voltammetric Behavior Of Polyvinylferrocene. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 14, 2433–2448.
- Smutok, O., Dmytruk, K., Gonchar, M., Sibirny, A. ve Schuhmam, W., 2007. Permeabilized Cells Of Flavocytochrome B2 Over-Producing Recombinant Yeast *Hansenula Polymorpha* As Biological Recognition Element In Amperometric Lactate Biosensor. *Biosensors Bioelectronic*, 23, 599-605.
- Soci, C., Hwang, I.W., Moses, D., Zhu, Z., Waller, D., Gaudiana, R., Brabec, C.J. ve Heeger, A.J., 2007. PPhotoconductivity of a Low-Bandgap Conjugated Polymer. *Advanced Functional Materials*, 17(4), 632-636.
- Sookhakian, M., Amin, Y.M., Baradaran, S., Tajabadi, M.T., Moradi Golsheikh, A. ve Basirun, W.J., 2014. A Layer-By-Layer Assembled Graphene/Zinc Sulfide/Polypyrrole Thin-Film Electrode Via ElectropHoretic Deposition For Solar Cells. *Thin Solid Films*, 552, 204–21.
- Sun, Y. ve Ruckenstein, E., 1995. Poly (3-MethylthiopHene)-Rubber Conductive Composite Prepared Via an Inverted Emulsion Pathway. *Synthetic Metals*, 74, 145-150.

- Sundberg, R.D., 1984. Pyrroles And Their Benzo Derivatives: Synthesis And Applications. In Comprehensive Heterocyclic Chemistry; Katritzky, A.R., Rees, C.W., Eds., Pergamon: Oxford.,4, 313–376..
- Suzuki, A., 1999. Recent Advances in the Cross-Coupling Reactions of Organoboron Derivatives with Organic Electrophiles. *Journal of Organometallic Chemistry*, 57681, 147-168.
- Şahmetlioğlu, E., 2004. İletken Aşı Kopolimerlerin Sentezi Ve Bunların Enzim Tutuklama Matrisleri Olarak Kullanımları. *Doktora Tezi, Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Niğde.
- Şenel, M., Çevik, E. ve Abasıyanık, M.F., 2010. Amperometric Hydrogen Peroxide Biosensor Based On Covalent Immobilization Of Horseradish Peroxidase On Ferrocene Containing Polymeric Mediator. *Sensors and Actuators B*, 145, 444.
- Tarkuc, S., 2010. Tuning the Optoelectronic Properties of Conjugated Polymers via Donor-Acceptor-Donor Architectures. *Yüksek Lisans Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü*, Ankara.
- Telefoncu, A., 1986. İmmobilize Enzimler Ve İmmobilizasyon Yöntemleri. *Temel ve Uygulamalı Enzimoloji Biyokimya Lisans Üstü Yaz Okulu Ders Notu*, İzmir, 116, 193-249
- Tel-Vered, R., Yehezkeli, O., Yildiz, H.B, Wilner, O.I. ve Willner, I., 2008. PHotocatalysis With Ordered Cds Nanoparticle/Relay Or PHotosensitizer/Relay Dyads On DNA Scaffolds. *Angewandte Chemie International Edition*, 47, 8272-8276.
- Tımur, S., Anık Kırgöz, U., Odacı, D. ve Gorton, L., 2007. Development of a Microbial Biosensor Based on Carbon Nanotube (CNT) Modified Electrodes. *Electrochemistry Communications*, 9, 1810-1815.
- Timur, S., 2001. Pestisit Tayinine Yönelik Biyosensör Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu. *Doktora Tezi Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı*, İzmir.
- Timur, S., Haghghi, B., Tkac, J., Pazarlıoğlu., N., Telefoncu, A. ve Gorton, L., 2007. Electrical Wiring Of Pseudomonas Putida And Pseudomonas Fluorescens With Osmium Redox Polymers. *Bioelectrochemistry*, 71, 38-45.
- Toptaş, N., 2006. Anilin ve Poliakrilonitril Kullanarak Kimyasal Polimerizasyon Yöntemi İle İletken Kompozit Lif Hazırlanması. *Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.
- Toyota, M. ve Ihara, N., 1998. Recent Progress in the Chemistry of Non-monoterpenoid Indole Alkaloids. *Natural Product Reports*, 15, 327-340.

- Trojanowicz, M. ve Krawczyk, T.K., 1995. Electrochemical Biosensors Based On Enzymes Immobilized In Electropolymerized Films. *Microchimica Acta*, 121, 167-181.
- Tsuji, J., 1990. Expanding Industrial Applications of Palladium Catalysts. *Synthesis*, 9, 739-749.
- Tsuji, J., 1995. Palladium Reagents and Catalysts: Innovations in Organic Synthesis. *John Wiley*. Chichester/New York.
- Tuncagil, S., Odacı, D., Varış, S., Timur, S. ve Toppare, L., 2009. Electrochemical Polymerization Of 1-(4-Nitrophenyl)-2,5-Di(2-Thienyl)-1 H-Pyrrole As A Novel Immobilization Platform For Microbial Sensing. *Bioelectrochemistry*, 76, 169-174.
- Tuncagil, S., Odacı, D., Varis, S., Timur, S. ve Toppare, L., 2009. Electrochemical Polymerization Of 1-(4-Nitrophenyl)-2,5-Di(2-Thienyl)-1 H-Pyrrole As A Novel Immobilization Platform For Microbial Sensing. *Bioelectrochemistry*, 76, 169-174.
- Tuncagil, S., Kıralp, S., Varis, S. ve Toppare, L., 2008. Immobilization Of Invertase On A Conducting Polymer Of 1-(4-Nitrophenyl)-2,5-Di(2-Thienyl)-1H-Pyrrole. *Reactive and Functional Polymers*, 68, 710-717.
- Turner, A., Wilson, G. ve Kaube, I., 1987. Biosensors: Fundamentals and Applications. *Oxford University Press*, 770.
- Turner, A.P.F., Karube, I. ve Wilson, G.S., 1987. Biosensors: Fundamentals and Applications. *Oxford University Press*, New York.
- Tzschucke, C.C., Markert, C., Bannwarth, W., Roller, S., Habel, A. ve Haag, R., 2002. Modern Separation Techniques For The Efficient Workup in Organic Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 41, 3964-4000.
- Valach, M., Katrlík, J., Sturdik, E. ve Gemeiner, P., 2009. Ethanol Gluconobacter Biosensor Designed For Flow Injection Analysis: Application In Ethanol Fermentation Off-Line Monitoring. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 138, 581-586.
- Vassas, A., Bourdy, G., Paillard, J.J., Lavayre, J., Pais, M., Quirion, J.C. ve Debitus, C., 1996. Naturally Occurring Somatostatin and Vasoactive Intestinal Peptide Inhibitors. Isolation of Alkaloids From Two Marine Sponges. *Planta Medica*, 62
- Vidal, J.C., Ruiz, E.G. ve Castillo, J.R., 2003. Recent Advances In Electro Polymerized Conducting Polymer In Amperometric Biosensors. *Microchimica Acta*, 143, 93-111.
- Vo-Dinh, T. ve Cullum, B., 2000. Biosensors And Biochips: Advances In Biological And Medical Diagnostics. *Journal of Analytical Chemistry*, 366, 540-551.

- Wallace, G.G., Spinks, G.M., Kane-Maguire, L.A.P. ve Teasdale, P.R., 2003. Conductive Electroactive Polymers. *CRC Press*, New York, 248.
- Waltman, R.J., Bargon, J. ve Diaz, A.F., 1983. Electrochemical Studies of Some Conducting Polythiophene Films. *Journal of Physical Chemistry*, 87, 1459-1463.
- Wang, Z.H., Scherr, E.M., Mac Diarmid, A.G. ve Epstein, A.J., 1992. Transport And EPR Studies Of Polyaniline: A Quasi-One-Dimensional Metallic States. *Physical Review B*, 45, 4190-4202.
- Watt, A., Blake, D., Warner, J.H., Thomsen, E.A., Tavenner, E.L., Dunlop, H.R. ve Meredith, J.P., 2005. Lead Sulfide Nanocrystal: Conducting Polymer Solar Cells. *Journal of Applied Physics*, 38, 2006-2012.
- Wen, Z., Yang, Y. ve Lawn, P., 2008. From GDP to the GPI quantifying thirty-five years of development in China. Çev. Lawn, P. ve Clarke, M. Sustainable welfare in the Asia –Pacific: Studies using the Genuine Progress Indicator. *Edward Elgar Publishing*.
- Wilson, R. ve Turner, A.P.F., 1992. Glucose Oxidase: an Ideal Enzyme. *Biosensors Bioelectronic*. 7, 165–185.
- Wochnowski, C. ve Metev, S., 2002. UV-Laser-Assisted Synthesis of Iodine-doped Electrical Conductive Polythiophene. *Applied Surface Science*, 186, 34-39.
- Wolfe, J.P., Wagaw, S. ve Buchwald, S., 1996. An Improved Catalyst System for Aromatic Carbon-Nitrogen Bond Formation: The Possible Involvement of Bis (Phosphine) Palladium Complexes as Key Intermediates. *Journal of the American Chemical Society*, 118, 7215-7216.
- Wu, B., Zhang, G., Shuang, S. ve Choi, M., 2004. Biosensors For Determination Of Glucose With Glucose Oxidase Immobilized On An Eggshell Membrane. *Talanta*, 8, 546-553.
- Wu, X.F., Anbarasan, P., Neumann, H. ve Beller, M., 2010. From Noble Metal to Nobel Prize: Palladium-Catalyzed Coupling Reactions as Key Methods in Organic Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 49, 9047-9050.
- Xue, C., Chen, Z., Luo, F.T., Palaniappan, K., Chesney, D.J., Liu, J., Chen, J. ve 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.
- Yamamoto, T., Sanechika, K. ve Yamamoto, A., 1980. Preparation Of Thermostable And Electric-Conducting Poly (2,5-Thienylene). *Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition*, 18, 9-12.

- Yassin, A., Leriche, P. ve Roncali, J., 2010. Synthesis and Chain-Length Dependence of the Electronic Properties of π -Conjugated Dithieno[3,2-b:2',3'-d]pyrrole (DTP) Oligomers. *Macromolecular Rapid Communications*, 31, 1467-1472.
- Yildiz, E., Camurlu, P., Tanyeli, C., Akhmedov, I. ve Toppare, L., 2008. A Soluble Conducting Polymer of 4-(2,5-di(thiophen-2-yl)-1H-pyrrol-1-yl)benzenamine and Its Multichromic Copolymer With EDOT. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 612(2), 247–256.
- Yildiz, H.B., Tel-Vered, R. ve Willner, I., 2008. Solar Cells with Enhanced Photocurrent Efficiencies Using Oligoaniline-Crosslinked Au/CdS Nanoparticles Arrays on Electrodes. *Advanced Functional Materials*, 18, 3497-3505.
- Yongqing, T., Xiaoyi, W. ve Hanhong, X., 2006. Photoactivated Insecticidal Thiophene Derivatives From Xanthopappus Subacaulis. *Journal of Natural Products*, 69, 1241-1244.
- Yoshino, K., Hayashi, S. ve Sugimoto, R., 1984. Preparation and Properties of Conducting Heterocyclic Polymer Films by Chemical Method. *Japanese Journal of Applied Physics*, 23(2), 899-900.
- Zanirato, P., Spagnolo, P. ve Zanardi, G., 1983. Thermal Decomposition of o-Azidobithienyls. *Journal of the Chemical Society Perkin Trans I.*, 2551-2554.
- Zhang, C., Li, Q. ve Li, J., 2010. Synthesis and Characterization Of Polypyrrole/TiO₂ Composite By In Situ Polymerization Method. *Synthetic Metals*, 160, 1699–1703.
- Zhang, M., Tsao, H.N., Pisula, W., Yang, C., Mishra, A.K. ve Müllen, K., 2007. Field-Effect Transistors Based on a Benzothiadiazole–Cyclopentadithiophene Copolymer. *Journal of the American Chemical Society*, 129, 3472-3473.
- Zhang, Q., Xu, T., Butterfield, D., Misner, M.J., Ryu, D., Emrick, T. ve Russell, T.P., 2005. Controlled Placement of CdSe Nanoparticles in Diblock Copolymer Templates by Electrochemical Deposition. *Nano Letters*, 5, 357-361.
- Zhang, S., Chen, Q., Wang, Y. ve Guo, L., 2012. Synthesis And Photoactivity Of Cds Photocatalysts Modified By Polypyrrole. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 13030-13036.
- Zhang, X., Zeng, X., Yang, M. ve Qi, Y., 2014. Investigation of a Branchlike MoO₃/Polypyrrole Hybrid with Enhanced Electrochemical Performance Used as an Electrode in Supercapacitors. *Applied Materials & Interfaces*, 6, 1125–1130.
- Zhao, C., Meng, Y., Shao, C., Wan, L. ve Jiao, K., 2008. Unadulterated Glucose Biosensor Based on Direct Electron Transfer of Glucose Oxidase Encapsulated Chitosan Modified Glassy Carbon Electrode. *Electroanalysis*, 20, 520–526.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Hacer AZAK
Doğum Tarihi ve Yer : 05/11/1984
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
Telefon : 5552784077
e-mail : hazak@kmu.edu.tr

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya ABD.	2010
Lisans	Selçuk Üniv. Fen Edebiyat Fak. Kimya Bölümü	2007
Lise	Özel Büyükkoyuncu Fen Lisesi	2003

İş Deneyimi

Görev	Kurum	Yıl
Araştırma Görevlisi	Karamanoğlu Mehmetbey Üniv.	2010-Devam Ediyor

Yayınlar

- Sayin, S., **Azak, H.**, Yıldız, H.B., Camurlu, P., Uysal Akkus, G., Toppare, L. ve Ersoz, M., 2015. Calixarene Assembly With Enhanced PHotocurrents Using P(SNS-NH₂)/Cds Nanoparticle Structure Modified Au Electrode Systems. *PHysical Chemistry Chemical PHysics*, 17, 19911-19918.
- Arslan Udum, Y., Yıldız, H.B., **Azak, H.**, Sahin, E., Talaz, O., Çırpan, A. ve Toppare, L., 2014. Synthesis And Spectroelectrochemistry Of Dithieno(3,2-B:2',3'-D)Pyrrole Derivatives. *Journal Of Applied Polymer Science*, 131.(Doktora Tez Makalesi)
- Azak, H.**, Guler, E., Can, U., Odaci Demirkol, D., Yıldız, H.B. Talaz, O. ve Timur, S., 2013. Synthesis Of An Amine-Functionalized NapHthalenecontaining Conducting Polymer As A Matrix For Biomolecule İmmobilization. *RSC Advances*, 3, 19582. (Doktora Tez Makalesi)
- Yıldız, H.B. Kamaci, M., **Azak, H.**, Seçgin, Ö. ve Süer, Ö., 2013. A Comparative Study: Immobilization Of Yeast Cells And İvertase İn Poly(Ethyleneoxide) Electrodes, *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, 91,52-58.
- Talaz, O., Cavdar, H., Durdagi, S., **Azak, H.** ve Ekinci, D., 2013. Synthesis Of 1,4-Bis(İndolin-1-Ylmethyl)Benzene Derivatives And Their Structure–Activity Relationships For The İnteraction Of Human Carbonic Anhydrase İsoforms I And II. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21, 1477-1482.
- Ertul, Ş. ve **Azak, H.**, 2011. Effect Of Macrocyclic Lactam Receptors On Extraction Of Heavy Metals And Chromate Anions. *Journal of Inclusion PPhenomena*, 70(1),153-159 (Y.lisans Tez makalesi).

Ulusal Ve Uluslararası Toplantılarda Sunulan Bildiriler

- H. Azak**, S. Ertul. Yeni Makrosiklik Laktam Türevlerinin Sentezi ve İyon Taşıma Özelliklerinin İncelenmesi. *Uluslararası Katılımlı 25. Ulusal Kimya Kongresi*, 27 Haziran- 2 Temmuz 2011, Erzurum, Türkiye (Poster Sunum).
- U. Can, **H. Azak**, H. B. Yıldız, O. Talaz; “The Synthesis of New Generation Amino Compounds Of Dithionepyrrole” *IUPAC- 44th World Chemistry Congress*, 11-16 Ağustos, 2013, İstanbul, Türkiye (Poster Sunum)
- H. Azak.**, E. Guler, U. Can, D. Demirkol, H. B. Yıldız, O. Talaz, S. Timur ; “Synthesis of Amine Functionalized NapHthalene Containing Conducting Polymer as a Matrix for Biomolecule Immobilization”, *10th International Electrochemistry Meeting*, 4 – 8 Eylül , 2013 , Konya, Türkiye (Poster Sunum).

- S. Akın, S. Sayın, M. Gülen, **H. Azak**, H. B. Yıldız, S. Sönmezoğlu “Modification Of Titanium Oxide Electrode With Thiol-Functionalized Calixarenes Layer For High-Performance Of Dye-Sensitized Solar Cells” *SolarTR-3 Third Turkish Solar Electricity Conference*, 27-29 Nisan 2015, Ankara Türkiye
- D. Odacı Demirkol, H. B. Yıldız, S. Sayın, **H. Azak**, N. Gazel; “Tiyol fonksiyonlu kaliksarenlerin biyosensör olarak enzim immobilizasyonunda kullanılması”, 5. *Fiziksel Kimya Kongresi*, 16-19 Mayıs 2015, Konya, Türkiye (Poster Sunum).
- H. B. Yıldız, S. Sayın, N. Gazel, **H. Azak**, “Poli(etilenoksit) iletken polimerlerin yeni amperometrik kolesterol biyosensörler olarak kullanılması”, 5. *Fiziksel Kimya Kongresi*, 16-19 Mayıs 2015, Konya, Türkiye (Poster Sunum).
- H. B. Yıldız, M. Karaman, S. Sayın, **H. Azak**, N. Gazel; “ P(SNS-NH₂)/AOx/CNT/[Ru(bpy)₃]⁺² yapısıyla modifiye edilmiş elektrotlar kullanılarak fotoelektrokimyasal alkol biyosensörlerin yapımı.”, 5. *Fiziksel Kimya Kongresi*, 16-19 Mayıs 2015, Konya, Türkiye (Poster Sunum).
- H. B. Yıldız, M. Kamacı, **H. Azak**, N. Gazel “Maya Hücreleri ve Invertaz Enziminin Poli(Etilenoksit) Elektrotlarda Tutuklanma“ 5. *Fiziksel Kimya Kongresi*, 16-19 Mayıs 2015, Konya, Türkiye (Poster Sunum).
- H.B. Yıldız, **H. Azak**, M. Kamacı, “A Comparative Study: Immobilization of Yeast Cells and Invertase in Poly(ethyleneoxide) Electrodes” *XXIII International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics of the Bioelectrochemical Society*, 14-18 Haziran, 2015, Malmö, Sweden (Poster Sunum)
- H. Azak**, H. B. Yıldız, S. Sayın, M. Kamacı “New Amperometric Cholesterol Biosensors Using Poly (Ethyleneoxide) Conducting Polymers”, *EUROANALYSIS VIII*, 6 – 10 Eylül 2015, Bordeaux, Fransa (Poster Sunum).
- H. Azak**, H. B. Yıldız, S. Caliskan, M. Kamacı, A. Caliskan “L-Dopa Synthesis Catalyzed By Tyrosinase Immobilized In Poly (Ethyleneoxide) Conducting Polymers”, *EUROANALYSIS VIII*, 6-10 Eylül 2015, Bordeaux, Fransa (Poster Sunum).
- H. Azak**, H. B. Yıldız, Y. Arslan Udum, A. Cirpan, L. Toppare, “4H-ditiyol[3,2-b:2',3'-d] pirol DTP Türevlerinin Sentezi ve Spektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi”, *Uluslararası Katılımlı 27. Ulusal Kimya Kongresi*, 23-28 Ağustos, 2015. Çanakkale, Türkiye.(Poster Sunum).

Projeler

Selçuk Üniversitesi- BAP (Bilimsel Araştırmalar Komisyonu Projesi):

Proje Numarası: 09201065: “Synthesis of macrocyclic lactam compounds containing various heteroatoms and some of their extractions investigation” 2007-2009 (Y. Lisans Tez Projesi)

Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi – BAP (Bilimsel Araştırmalar Komisyonu Projesi

Proje Numarası:02-D-13: “The Synthesis and Characterization of DTP-Style conductive Polymers and Biosensor Applications of These Polymers”, 27/11/2013 – 27/11/2015 (Doktora Tez Projesi)

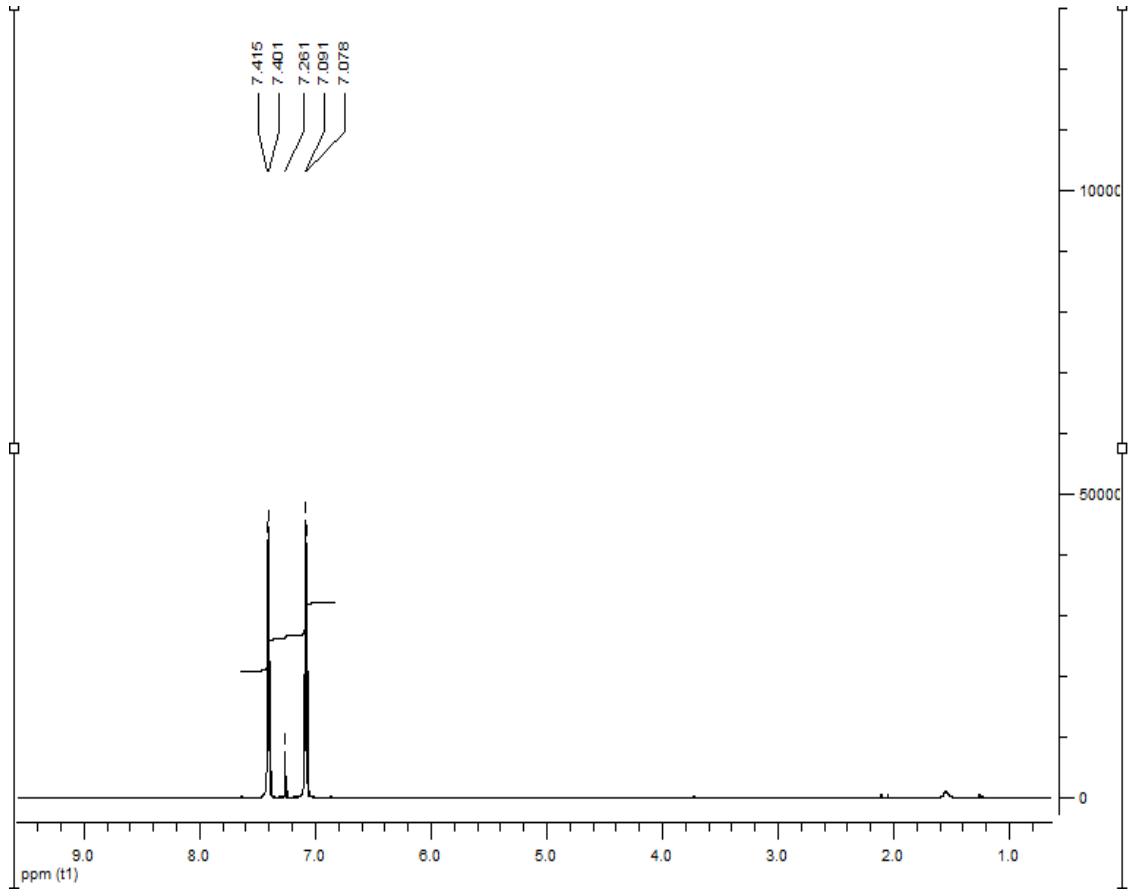
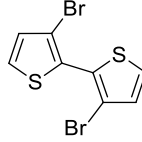
TUBITAK (Türkiye Bilimsel teknolojik araştırma Kurumu) – 1001 Projesi:

Proje Numarası: 111T135: “The synthesis of New Generation Bis and Amino Compounds of Dithionepyrrole: The Usage of These Substances As Nanotechnological Biosensor”, 01/11/2011 – 01/11/2013 (Bursiyer öğrenci)

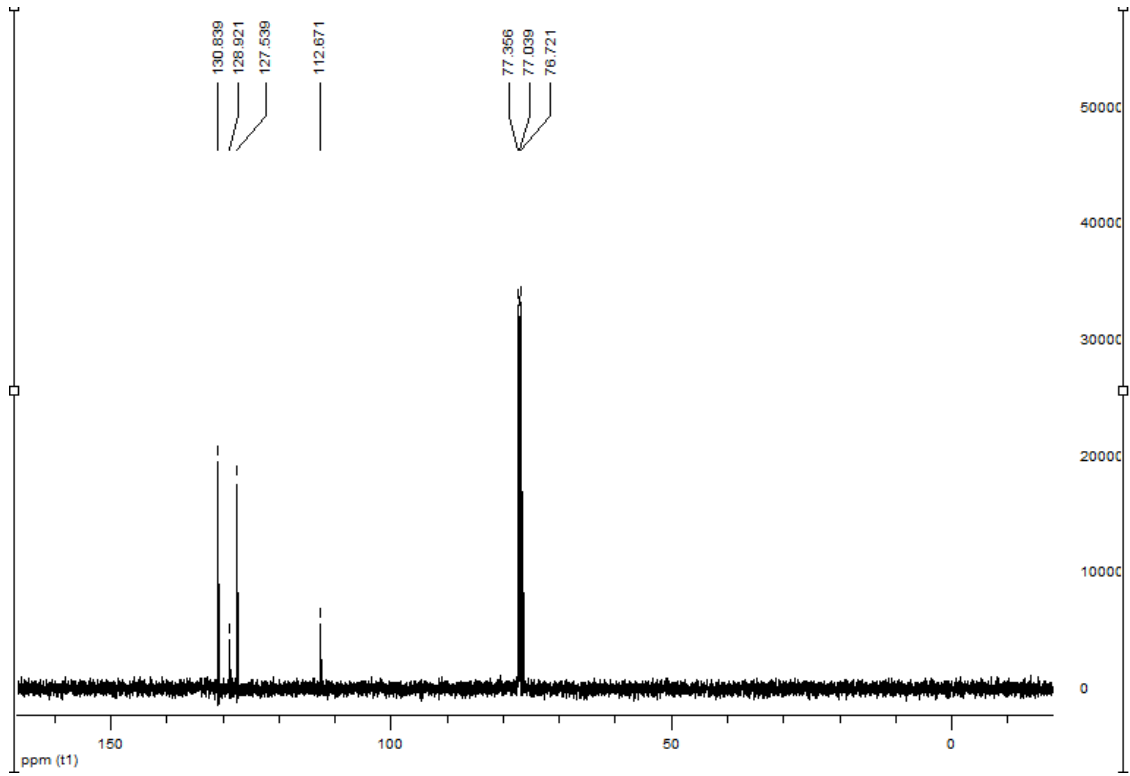
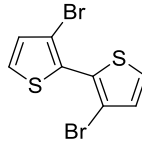
TUBITAK (Türkiye Bilimsel Teknolojik Araştırma Kurumu) – COST ACTION CM1104 Projesi:

Proje Numarası: 112T622: “Solar Cells with Overall Water Splitting Using Oligoaniline-Crosslinked $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpyCONHArNH}_2)]^{+2}$ Dye/Iridium Oxide Nanoparticle Arrays On Three–Dimensionally Ordered Macroporous Gold-Nanoparticle Doped Titanium Dioxide (3-DMGN-TiO₂) PHotonic Crystals Modified Electrodes”, 01/09/2012 - 01/09/2014 (Proje araştırmacı).

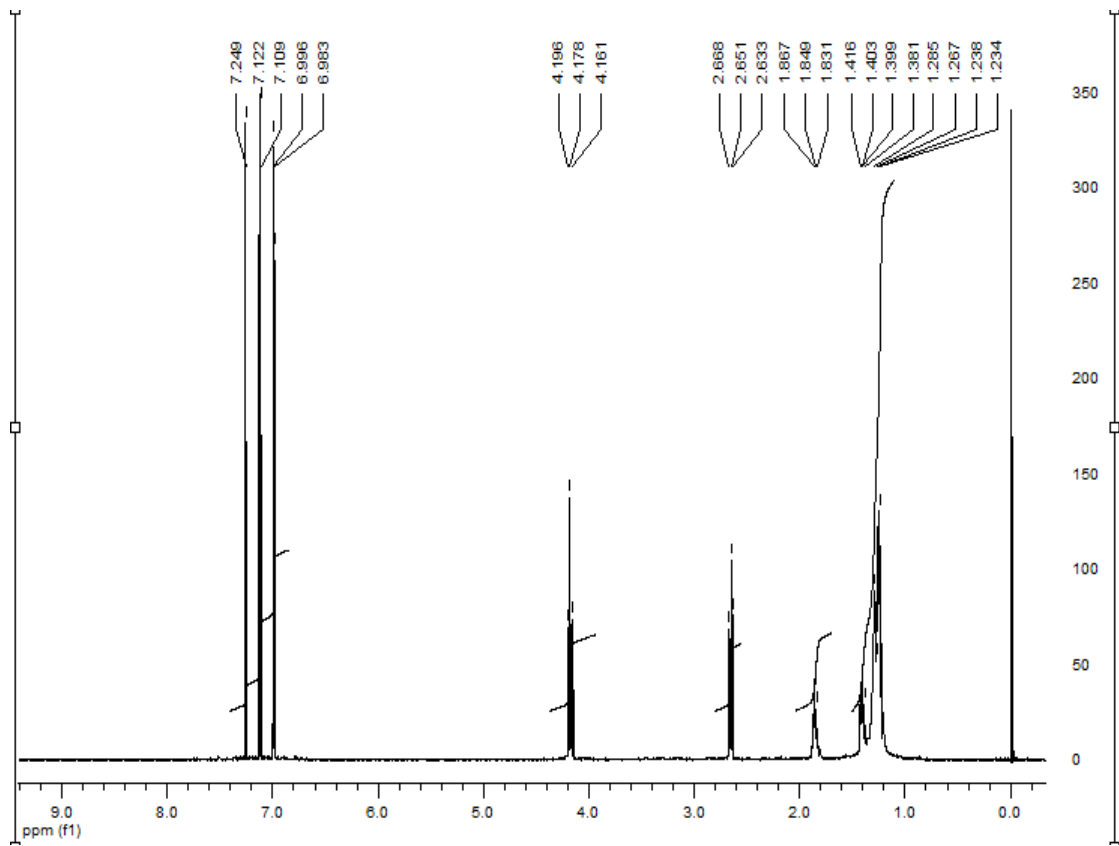
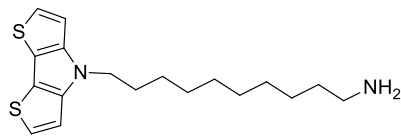
EKLER
¹H-NMR ve ¹³C-NMR SPEKTRUMLARI



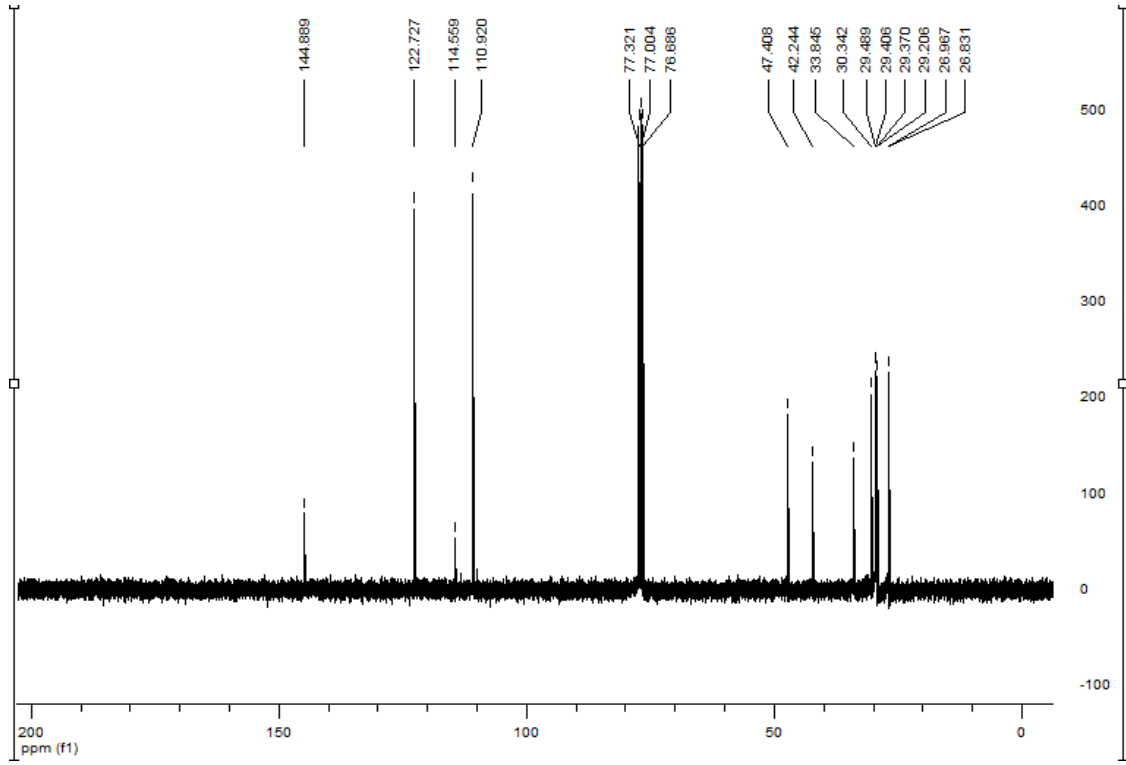
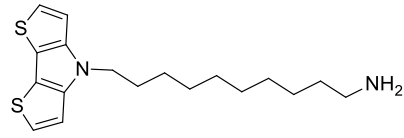
EK 1. 3,3'-Dibrom-2,2'-bitiyofen (2) bileşiginin 400 MHz ¹H-NMR spektrumu (CDCl₃)



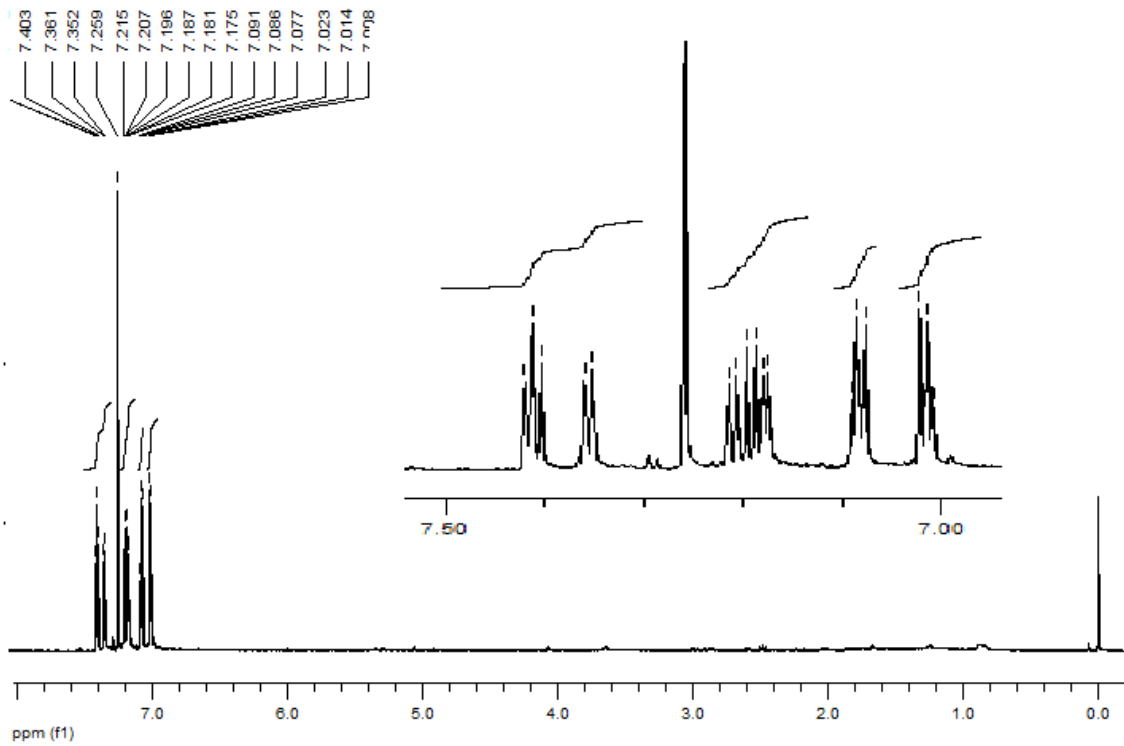
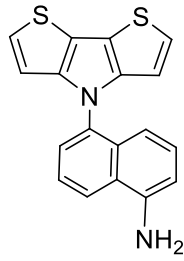
EK 2. 3,3'-Dibrom-2,2'-bitiyofen bileşığının 100 MHz ^{13}C -NMR spektrumu (CDCl_3)



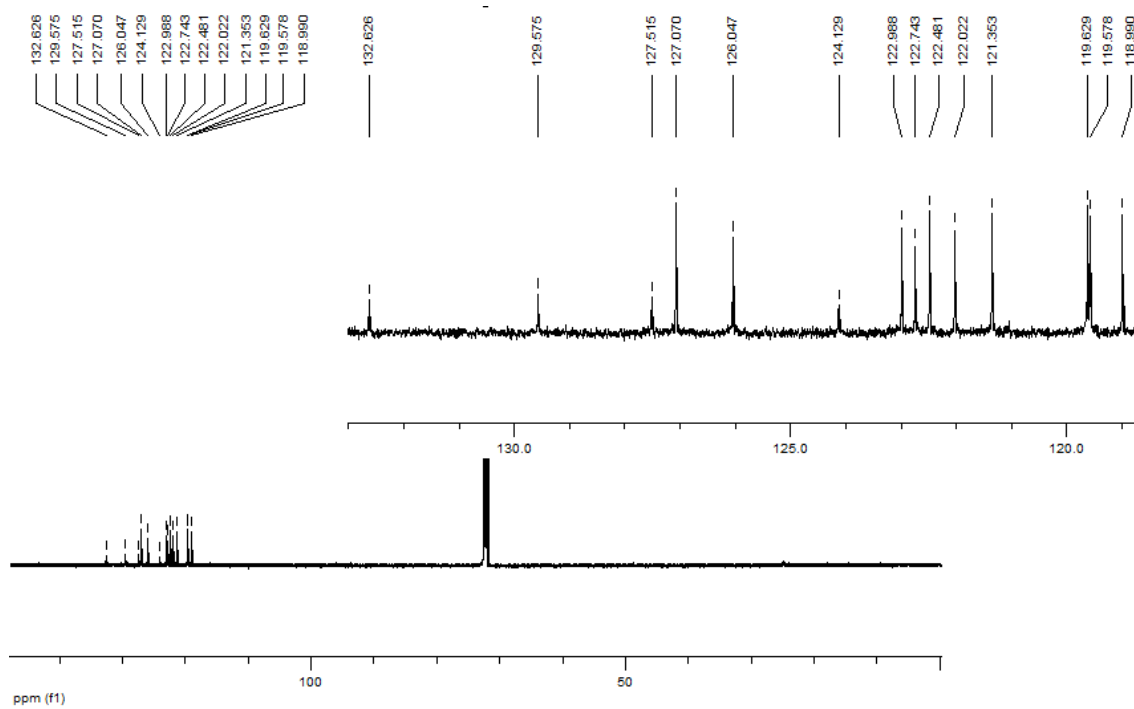
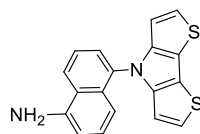
EK 3. 10-(4H-Ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin bileşiği 400 MHz ^1H -NMR spektrumu (CDCl_3)



EK 4. 10-(4H-Ditiyol [3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin bileşiği 100 MHz ^{13}C -NMR spektrumu (CDCl_3)

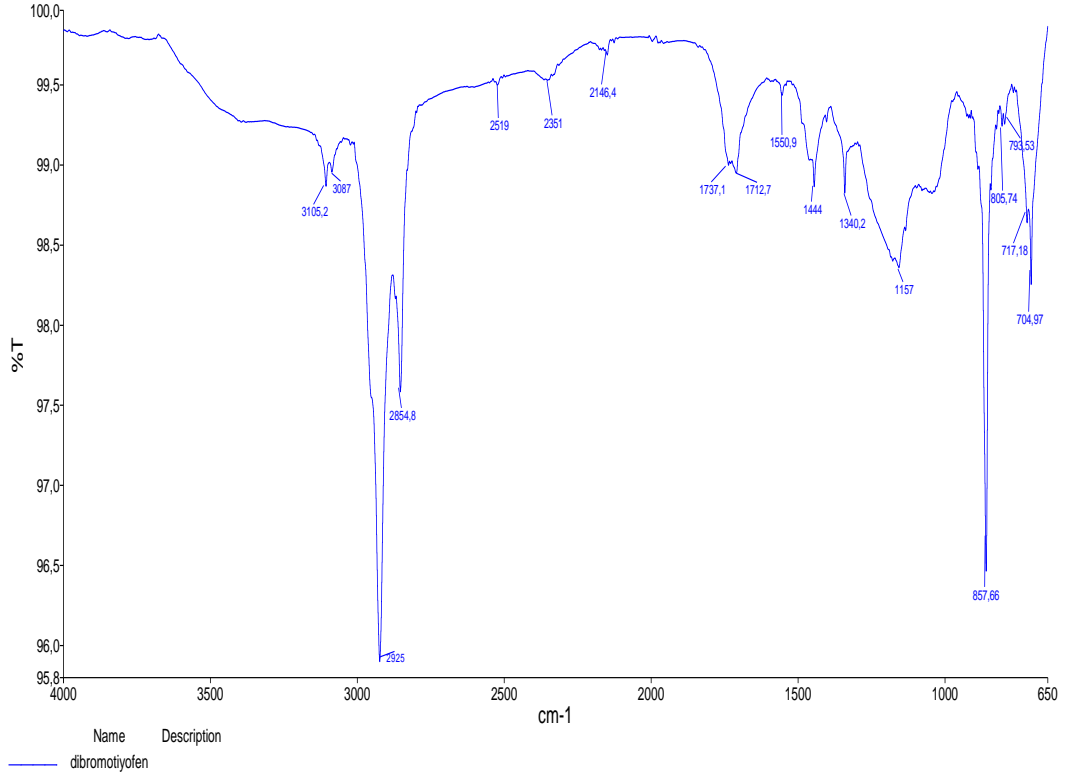
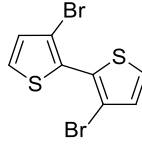


EK 5. 5-(4*H*-ditiyol [3,2-*b*:2',3'-*d*]pirol-4-il)naftalin-1-amin 400 MHz ^1H -NMR spektrumu (CDCl_3)

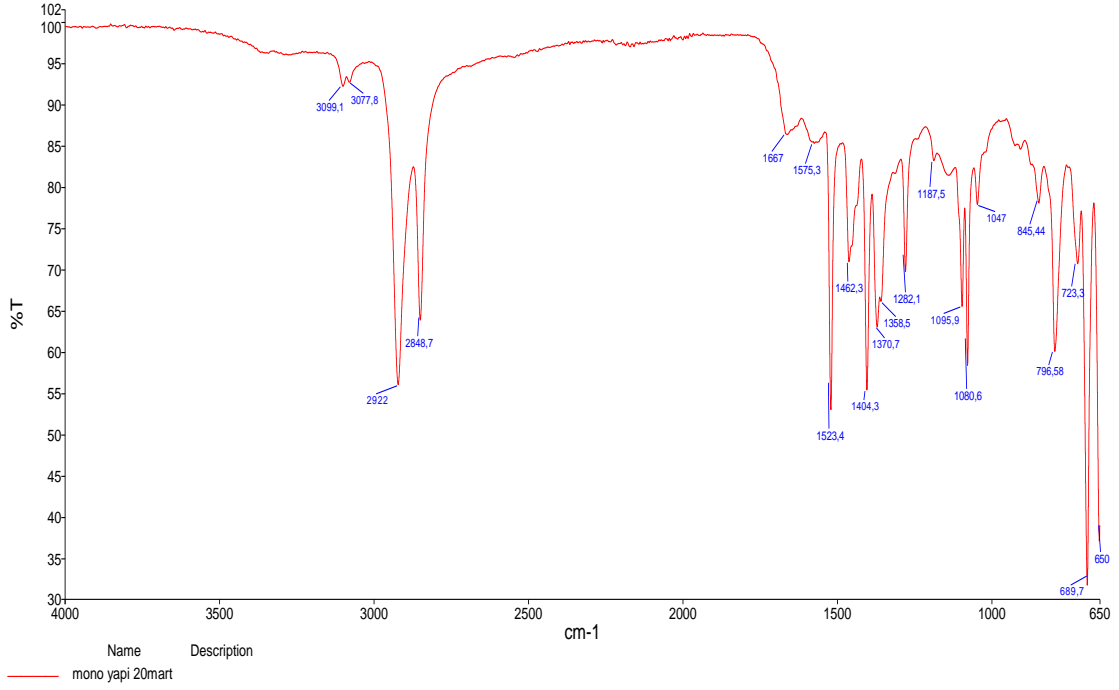
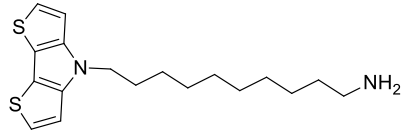


EK 6. 5-(4*H*-ditiyol [3,2-*b*:2',3'-*d*]pirol-4-il)naftalin-1-amin 400 MHz ^{13}C -NMR spektrumu (CDCl_3)

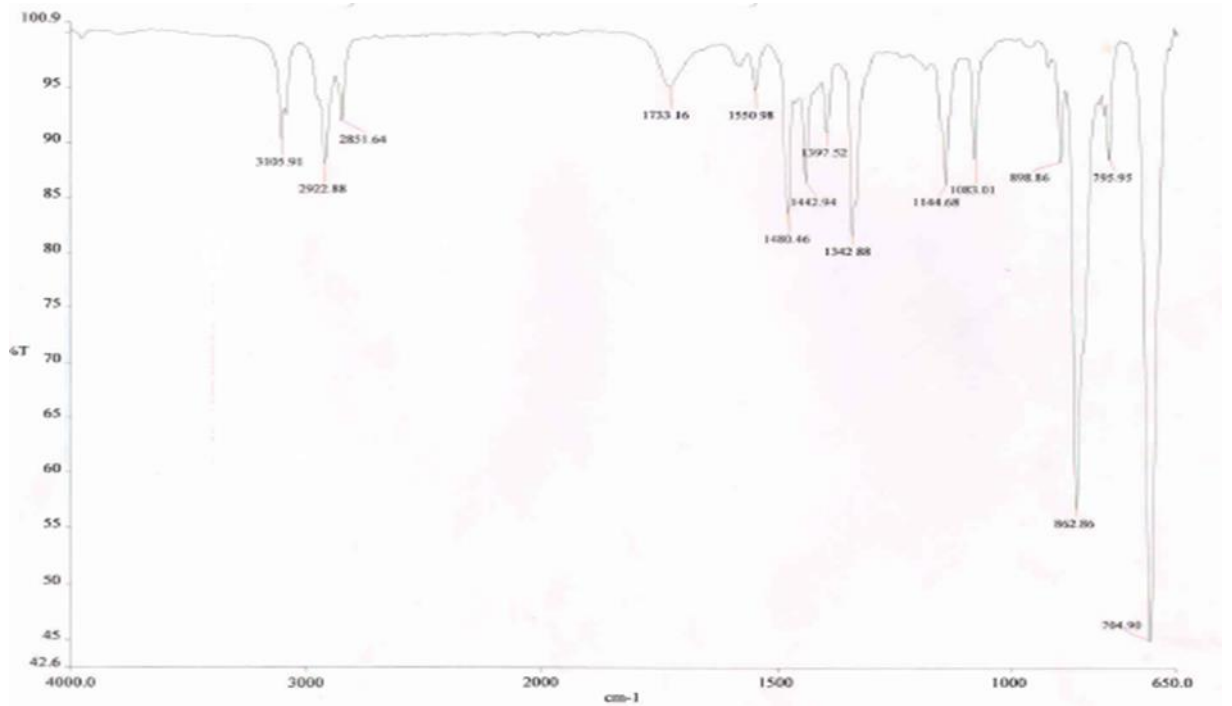
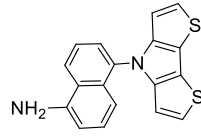
IR SPEKTRUMLARI



EK 7. 3,3'-Dibrom-2,2'-bitiyofen bileşigi IR spektrumu



EK 8. 10-(4H-Ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)dekan-1-amin bileşigi IR spektrumu



EK 9. 5-(4H-ditiyol [3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)naftalin-1-amin (DTP-Naf-NH₂) bileşiği IR spektrumu