




**T.C.**

**SELÇUK ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

# GLİKOZ TAYİNİ İÇİN BİR BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

**ESRA TÜRKMEN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Kimya Anabilim Dalı**

**07/05/2015**
**KONYA**
**Her Hakkı Saklıdır**

# ÖZET

## YÜKSEK LİSANS TEZİ

## GLİKOZ TAYİNİ İÇİN BİR BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

**Esra TÜRKMEN**

**Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**
**Kimya Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Salih YILDIZ**

**2015, 114 Sayfa**

**Jüri**
**Prof. Dr. Salih YILDIZ**
**Prof. Dr. Handan KAMIŞ**
**Doç. Dr. Sabri ALPAYDIN**

Glikozun biyoelektrokimyasal tayini için elektrokimyasal olarak platin nanopartikül biriktirilmiş polivinilferrosenyum perklorat filmi üzerine *o*-fenilendiamin içeren enzim çözeltisi kullanılarak glikoz oksidazın immobilizasyonuna dayanan yeni bir glikoz biyosensörü hazırlandı. İlk olarak, polivinilferrosenyum perklorat kaplı platin elektrot Ag/AgCl elektroduna karşı +0,7 V'da polivinilferrosenin elektrokimyasal oksidasyonuyla hazırlandı. Daha sonra platin nanopartiküller polivinilferrosenyum perklorat kaplı platin elektrot üzerine elektrokimyasal biriktirme yöntemiyle kaplandı. Son olarak, glikoz oksidaz +0,7 V'da modifiye platin elektrot üzerine *o*-fenilendiaminin elektrokimyasal polimerizasyonu ile eş zamanlı olarak immobilize edildi. Hazırlanan biyosensörün akım cevapları enzimatik olarak ortaya çıkan $H_2O_2$'in elektrokimyasal oksidasyonuna dayanmaktadır. Biyosensör 17,40 $\mu AmM^{-1}cm^{-2}$ seçiciliği ve 0,018 mM gözlenebilme sınırı ile 0,06 mM – 9,64 mM arasında bir lineer aralık göstermiştir. Ayrıca, biyosensörün akım cevabı üzerine uygulama potansiyelinin, polimer film kalınlığının, *o*-fenilendiamin konsantrasyonunun, enzim konsantrasyonunun, elektrokimyasal polimerizasyon süresinin ve sıcaklığın etkileri incelendi. Biyosensörün performansını belirleyen lineer aralık, cevap süresi, seçicilik, tekrarlanabilirlik, yinelenebilirlik ve kararlılık gibi faktörler tanımlandı. Ayrıca, hazırlanan biyosensör kan serumundaki glikoz konsantrasyonunun belirlenmesi için gerçek numune analizine uygulandı.

**Anahtar Kelimeler:** Elektrokimyasal polimerizasyon, glikoz biyosensörü, *o*-fenilendiamin, platin nanopartikül, polivinilferrosen.

# ABSTRACT

## MS THESIS

## THE DEVELOPMENT OF A BIOSENSOR FOR THE DETERMINATION OF GLUCOSE

**Esra TÜRKMEN**

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY**
**DOCTOR OF PHILOSOPHY IN CHEMISTRY**

**Advisor: Prof. Dr. Salih YILDIZ**

**2015, 114 Pages**

**Jury**
**Prof. Dr. Salih YILDIZ**
**Prof. Dr. Handan KAMIŞ**
**Assoc. Prof. Dr. Sabri ALPAYDIN**

A new glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase using enzyme solution containing *o*-phenylenediamine on platinum nanoparticles electrodeposited polyvinylferrocenium perchlorate film was fabricated for the bioelectrochemical determination of glucose. Firstly, polyvinylferrocenium perchlorate coated platinum electrode was prepared by electrooxidizing polyvinylferrocene at +0,7 V versus Ag/AgCl. Then, platinum nanoparticles were electrodeposited on polyvinylferrocenium perchlorate coated platinum electrode. Finally, glucose oxidase was immobilized simultaneously with the electropolymerization of *o*-phenylenediamine on the modified platinum electrode by applying a potential of +0,7 V. The response current of the prepared biosensor was based on the electrochemical oxidation of enzymatically generated $H_2O_2$. The biosensor showed a linear range from 0.06 mM to 9.64 mM with a sensitivity of 17.40 $\mu AmM^{-1}cm^{-2}$ and a detection limit of 0.018 mM. The effects of applied potential, polymeric film thickness, *o*-phenylenediamine concentration, enzyme concentration, electropolymerization time and temperature on the response current of the biosensor were also examined. The performance of the biosensor, i.e. linear range, response time, sensitivity, reproducibility, repeatability and stability was described. In addition, the prepared biosensor was applied to the analysis of real samples for the determination of glucose concentration in human blood serum.

**Keywords:** Electropolymerization, glucose biosensor, *o*-phenylenediamine, platinum nanoparticle, polyvinylferrocene.

# ÖNSÖZ

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Salih YILDIZ danışmanlığında tamamlanarak, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne Yüksek Lisans Tezi olarak sunulmuştur.

Tez çalışmam boyunca desteğini ve ilgisini esirgemeyen, değerli görüşlerini benimle paylaşan, çalışmalarımı gerçekleştirebilmem için bana laboratuvarını açan, danışman hocam Sayın Prof. Dr. Salih YILDIZ'a, tez çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren hocam Sayın Prof. Dr. Handan KAMIŞ'a, bu tezde en az benim kadar emeği olan, büyük bir sabırla bana tüm bildiklerini öğreten, çalışmamın her aşamasında bana destek olan Sayın Arş. Gör. Dr. Salih Zeki BAŞ'a, hayatım boyunca beni maddi, manevi destekleyen ve sürekli arkamda güçlerini hissettiğim, beni bu günlere getiren, sevgilerini ve emeklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen sevgili Aileme, sabrını ve ilgisini benden esirgemeyen sevgili nişanlım Murat Fatih İNAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Esra TÜRKMEN
KONYA - 2015

# İÇİNDEKİLER

**ÖZET** ..... **iv**

**ABSTRACT** ..... **v**

**ÖNSÖZ** ..... **vi**

**İÇİNDEKİLER** ..... **vii**

**SİMGELER VE KISALTMALAR** ..... **ix**

**1. GİRİŞ** ..... **1**

**2. BİYOSENSÖRLER** ..... **5**

2.1. Biyosensörlerin Tarihçesi ..... 5
2.2. Biyosensörler ..... 7
2.2.1. Biyoreseptörler ..... 8
2.2.2. Fiziksel bileşenler ..... 11
2.3. İmmobilizasyon Yöntemleri ..... 13
2.3.1. Kovalent bağlama ..... 13
2.3.2. Tutuklama ..... 14
2.3.3. Adsorpsiyon ..... 14
2.3.4. Çapraz bağlama ..... 15
2.4. İmmobilize Enzim ..... 15
2.5. Biyosensörlerin Performans Kriterleri ..... 16
2.5.1. Seçicilik ..... 17
2.5.2. Duyarlık ..... 17
2.5.3. Doğrusallık ..... 17
2.5.4. Cevap süresi ..... 18
2.5.5. Gözlenebilme sınırı ..... 19
2.5.6. Kararlılık ..... 19
2.5.7. Kesinlik (Tekrarlanabilirlik) ..... 20
2.5.8. Kullanım ömrü ..... 20
2.6. Biyosensörlerin Avantajları ve Dezavantajları ..... 21

**3. ENZİMLER** ..... **23**

3.1. Enzimlerin Yapısı ..... 23
3.2. Enzimlerin Sınıflandırılması ..... 25
3.3. Enzim Kinetiği ..... 27

**4. GLİKOZ OKSİDAZ ENZİMİ** ..... **33**

4.1. Gox Enziminin Genel Özellikleri ..... 35
4.2. Glikoz Elektrodu ..... 37
4.2.1. Glikoz oksidaz enzim elektrodu ile glikoz tayini ..... 37

**5. REDOKS POLİMERLERİ ..... 39**

**6. KAYNAK ARAŞTIRMASI ..... 44**

6.1. Gox Enzimi Biyosensörleri ile İlgili Kaynak Araştırması ..... 44
6.2. PVF Polimeri ile İlgili Kaynak Araştırması ..... 46
6.3. PoPD Polimeri ile İlgili Kaynak Araştırması ..... 49
6.4. Platin Nanopartikülleri Kullanılarak Hazırlanan Biyosensörleri ile İlgili Kaynak Araştırması ..... 54

**7. MATERYAL VE METOT ..... 57**

7.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler ..... 57
7.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Hücre ve Elektrotlar ..... 57
7.3. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ..... 58
7.4. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Yöntemler ..... 59
7.4.1. Gerilim kontrollü kulometri ..... 59
7.4.2. Kronoamperometri ..... 60
7.4.3. Dönüşümlü voltametri ..... 61
7.4.4. Taramalı elektron mikroskopu ..... 64
7.4.5. Atomik kuvvet mikroskopu ..... 66
7.5. Glikoz Oksidaz Biyosensörünün Hazırlanması ve İşleyişi ..... 67
7.5.1. Elektrokimyasal polimerizasyon ..... 71

**8. ARAŞTIRMA SONUÇLARI ..... 76**

8.1. Gox-PoPD/PtNPs/$PVF^{+}ClO_4^{-}$/Pt ve Gox-PoPD/$PVF^{+}ClO_4^{-}$/Pt Biyosensörlerine Ait Araştırma Sonuçları ..... 76
8.1.1. Voltametrik ölçümler ..... 76
8.1.2. Uygulama potansiyelinin etkisi ..... 78
8.1.3. $PVF^{+}ClO_4^{-}$ film kalınlığının etkisi ..... 79
8.1.4. *o*PD filminin elektropolimerizasyon süresi ve konsantrasyonu ..... 80
8.1.5. Gox enzim konsantrasyonunun etkisi ..... 82
8.1.6. pH etkisi ..... 83
8.1.7. Sıcaklık etkisi ..... 84
8.1.8. Girişim etkisi ..... 86
8.1.9. Tekrarlanabilirlik ve tekrar kullanılabilirlik ..... 88
8.1.10. Kararlılık ..... 89
8.1.11. Gerçek numune ..... 90
8.1.12. FT-IR spektrumları ..... 91
8.1.13. SEM ve AFM ile yüzey karakterizasyonu ..... 93

**9. SONUÇ VE TARTIŞMA ..... 96**

**KAYNAKLAR ..... 103**

**ÖZGEÇMİŞ ..... 114**

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

$C$ : substrat konsantrasyonu

$C_{yük}$ : yükseltgenmiş türlerin konsantrasyonu

$C_{ind}$ : indirgenmiş türlerin konsantrasyonu

$c_m$ : gözlenebilme sınırı

$E_{pc}$ : katodik pik potansiyeli

$E_{pa}$ : anodik pik potansiyeli

$E_{1/2}$ : voltametrik yarı dalga potansiyeli

$F$ : Faraday sabiti, 96485 C

FAD : flavin adenin dinükleotid

Gox : glikoz oksidaz

$\Delta C$ : analit konsantrasyonu

$\Delta S$ : sinyal değişimi

$i$ : akım

$I_{max}$ : maksimum akım değeri

$i_{pc}$ : katodik pik akımı

$i_{pa}$ : anodik pik akımı

$k$ : elektron transfer hızı

$k_1$ : enzim ile substrat arasındaki reaksiyonun ileri yöndeki hız sabiti

$k_{-1}$ : enzim ile substrat arasındaki reaksiyonun geri yöndeki hız sabiti

$k_2$ : enzim-substrat kompleksinde ürün oluşumuna ait ileri yöndeki hız sabiti

$k_{-2}$ : enzim-substrat kompleksinde ürün oluşumuna ait ileri yöndeki hız sabiti

$k_{ET}$ : elektron transferine ait hız sabiti

K : balık tazeliğinde kullanılan kalite standart değeri

$Km$ : Michaelis-Menten sabiti

$Km_{app}$ : görünür Michaelis-Menten sabiti

$n$ : elektron sayısı

M : redoks medyatörü

$t$ : zaman

$R_{SE}$ : kendiliğinden değişme hızı

$SD$ : standart sapma

$SD/m$ : kalibrasyon eğrisinin eğimi

$S_m$ : analitik sinyal

$\overline{S}_{bl}$ : ortalama tanık sinyali

$s_{bl}$ : tanığın standart sapması

$v$ : reaksiyon hızı

$V_m$ : maksimum hız

$\lambda$ : taneciğin geometrisindeki değişim enerjisi

$Q$ : elektrik yükü

[E] : enzim konsantrasyonu

[S] : substrat konsantrasyonu

[ES] : enzim-substrat kompleks konsantrasyonu

$[E]_0$ : enzim başlangıç konsantrasyonu

# 1. GİRİŞ

Günümüzde büyük ilerlemelerin kaydedildiği bilim dallarından biri olan biyomalzeme biliminde biyolojik sistemlerle etkileştiğinde uyum sağlayabilecek yeni malzemelerin geliştirilmesi için yoğun çaba harcanmaktadır. Biyomateryaller, insan vücudundaki canlı dokuların işlevlerini yerine getirmek ya da desteklemek amacıyla kullanılan doğal ya da sentetik malzemelerdir. Bu malzemeler sürekli olarak veya belirli aralıklarla vücut akışkanlarıyla (örneğin kan gibi) temas etmektedirler.

Biyomateryaller; biyolojik unsurlarla etkileşim halinde olan yapılar veya yüzeylerdir. Bu materyallerin geliştirilmesi çalışmaları 1960'lı yıllarda başlamıştır. Yaklaşık elli yıllık bir süreçte hızlı bir gelişim gösteren üretim çalışmaları günümüzde yeni bir bilim dalı haline gelmiş ve artık "Biyomateryal Bilimi" olarak adlandırılmaktadır (Meyers, 2008). Biyomateryaller; tıp, biyoloji, kimya, doku mühendisliği, bilgisayar ve malzeme bilimlerinin de ortak bir paydası olarak değerlendirilmektedir. Biyomateryal biliminin, son yıllarda adından sıkça söz ettiren ve pek çok farklı alanlarda yaygın kullanımı bulunan bir alt dalı da "Biyosensörler"dir (Von Lucadou, 1988).

Günümüzde biyoteknoloji, biyokimya, tıp ve eczacılık alanlarındaki gelişmeler enzimler, proteinler, hormonlar, nükleik asitler gibi biyomoleküllerin bu alanlardaki teknolojilerde kullanımını attırmaktadır. Biyomoleküllerin bu alanlardaki kullanımında en önemli unsur ürünün biyolojik aktivitesini uygulanan işlemlerle kaybetmemesidir. Son yıllarda oldukça fazla çalışmanın yapıldığı biyomolekül kullanım alanlı teknolojilerden bir tanesi de, analizdeki hedef molekülün tanınmasına imkân sağlayan, diğer teknolojilere göre daha kuvvetli ve maliyeti düşük bir teknoloji olan biyosensör teknolojisidir. Biyosensörler temel olarak, enzim, antikor, nükleik asit, mikroorganizma ve doku kültürü gibi biyomoleküller ve bu moleküllerin hedef analit ile arasındaki etkileşimin sonucunu sinyal olarak veren bir çeviriciden oluşan cihazlardır (Murphy, 2006; Mohanty, 2006).

Biyosensörler, "biyo" (biyolojik kökenli) ve "sensör" (algılayıcı) kelimelerinden oluşan nitel ve nicel analiz yapabilen, tayin edilecek moleküle duyarlı biyolojik tanı materyallerini içeren bir çevirici yardımı ile biyolojik tanı materyali ve analit arasındaki etkileşim sonucu oluşan biyokimyasal sinyalleri ölçülebilir elektrik sinyallerine dönüştüren, küçük ve kompleks analitik cihazlardır. Günümüzde biyosensörler özellikle klinik ve çevresel analizlerde, gıda ve ilaç sektöründe, ziraat ve

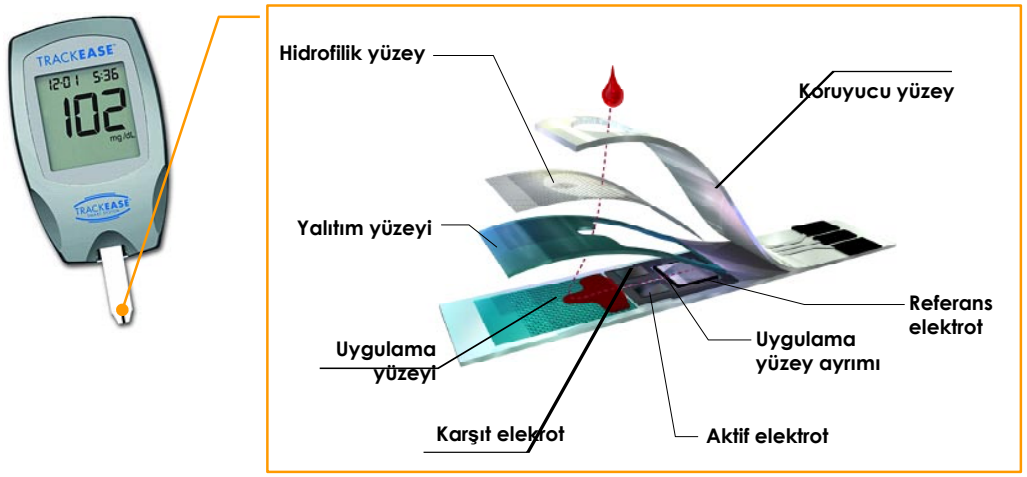
biyoloji gibi alanlarda kullanılmaktadır. Tanım olarak ise; "Birbiri içine geçmiş, biri biyokimyasal, diğeri çevirici olmak üzere iki birleşik sistemden oluşur. Biyokimyasal kısım, analizlenecek madde ile etkileşerek onu tanır. Bu etkileşme sonucunda oluşan biyokimyasal ürün, çevirici kısım tarafından okunabilir bir sayısal değere çevrilir (Özsöz, 2006).

Bir kimyasal sensör örnek yapısındaki analit miktarının doğrudan ölçülmesi için kullanılır. Bu tür bir sensör idealde, örneğe zarar vermeden, sürekli ve tersinir bir şekilde çalışabilmelidir. Kimyasal sensörler hedef analit ile kaplanmış sinyal çevirici bir kısım içerirler. Bu etkileşimden meydana gelen kimyasal değişiklikler sinyal çevirici element tarafından elektriksel sinyallere çevrilir. Kimyasal sensörlerin en temel uygulamalarından biri biyosensörlerdir. Elektrokimyasal biyosensör en basit tanımıyla üzerinde tutuklanmış bir veya birden çok biyolojik katalizör taşıyan elektrotların kullanıldığı sistemdir. Biyosensörler çeşitli gaz, iyon ve biyolojik maddelerin nitel ve nicel analizinde ve orijinal sistemlerin izlenmesine olanak verdiğinden pek çok bilim dalında uygulama alanı bulmaktadır. Teknolojinin gelişmesiyle birlikte elektroaktif özellik gösteren çeşitli kimyasal ve biyolojik maddeler uygun biyosensörler geliştirilerek daha kolay, daha çabuk ve daha duyarlı tayin edilebilmişlerdir. Klasik elektrokimya ile sadece anyon ve katyonları belirleyen sensörler hazırlanabilirken sisteme biyomateryalin de katılması ile diğer birçok maddenin tayini mümkün kılınmaktadır (Malhotra ve Chaubey, 2003).

Canlı hücredeki bütün biyokimyasal reaksiyonlar genetik kontrol altında hücre içinde sentezlenen enzimlerin kontrolü ve düzeni altında gerçekleşmektedir. Buna göre de enzimler yaşam için gerekli temel biyolojik maddelerdir. İnsanlar, enzim varlığının fark edilmesi ve ortaya konulmasından çok önceleri, bu maddelerin gerçekleştirdiği aktivitelerden bilinçsizce yararlanmayı bilmişlerdir. Örneğin, zengin bir amilaz kaynağı olan malt biracılıkta, papaya enzimi içeren papaya bitkisinin suyu et yumuşatmada kullanılmıştır (Megep, 2007).

Enzimler canlı hücreler tarafından genetik kontrol altında hücre içinde sentez edilen organik katalizörlerdir. Kataliz deyimi, Yunanca'da, kimyasal reaksiyonlarda etkili olan, reaksiyonu hızlandıran ve kolaylaştıran anlamında kullanılmaktadır. Biyolojik olaylarda ise katalizör olma özelliğinde olan maddelere enzim adı verilmektedir. Genel olarak enzimler belirli maddeler arasındaki belirli reaksiyonları katalize etmektedirler (Megep, 2007).

Enzimler yapı ve görev bakımından farklı olan "apoenzim" ve "koenzim/kofaktör" olarak adlandırılan iki ayrı grup bulunur. Apoenzim, enzimin özgünlüğünü (spesifikliğini) yani sadece özel bir reaksiyonu katalize etme ve başka bir reaksiyonda görev yapma özelliğini sağlayan kısmıdır. Koenzim (kofaktör) ise enzimin yardımcı ve etkin biçimidir. Tek başına etkili değildir. Etkinlik gösterebilmesi için apoenzime ihtiyaç duyar (Megep, 2007). Enzimlerin apoenzim ve kofaktörün kazandırdığı seçicilik ve spesifiklik özellikleri ile biyosensörlerde biyomolekül olarak kullanımı 1950 yıllarına kadar dayanmaktadır. 1950 yıllarının ortalarında L. C. Clark'ın, glikoz oksidaz enzimini oksijen elektrodu ile kombine ederek bir ameliyat esnasında kanın oksijen miktarını izlemesiyle başlayan enzim biyosensörleri kullanımı, Şekil 1.1'de gösterilen günümüzde aynı enzimin kullanıldığı ve 1 µL kan örneğinin elektrot yüzeyine damlatılmasıyla 10 saniye gibi kısa bir sürede $mg\,dL^{-1}$ olarak sonuç alınan glikoz biyosensörlerine kadar ulaşmıştır (Baş, 2011).




**Şekil 1.1.** Kandaki glikoz tayini için tasarlanmış ticari bir glikoz biyosensörü

Biyosensörler, klinik, teşhis, tıbbi uygulamalar, süreç denetleme, biyoreaktörler, kalite kontrol, tarım ve veterinerlik, bakteriyel ve viral teşhis, ilaç üretimi, endüstriyel atık su denetimi, madencilik, askeri savunma sanayi gibi alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle 20. yüzyılın son 10 yılında, askeri bir tehdit oluşturması açısından hem dönemin genelkurmay başkanı, ABD eski Dışişleri Bakanı Colin Powell'ın olabilecek en ürkütücü silahın biyolojik silahlar olduğu yönündeki açıklamaları, 21. yüzyılın ilk dönemi için hem maddi hem

de teknik açıdan biyosensör araştırmalarının yönünü belirlemiştir (Meral, 2006).

Günümüzde, kolestrol oksidaz (Özer, 2007), kolin oksidaz (Gülce, 2003), peroksidaz (Şenel, 2010), üreaz (Kuralay, 2006), ksantin oksidaz (Hu, 2000) gibi birçok farklı enzimler kullanılarak hazırlanan biyosensörler ile besin analizleri, tıbbi uygulamalar, çevresel analizler ve savunma-güvenlik sektörü gibi değişik alanlarda kalitatif veya kantitatif analizler yapılmaktadır (Baş, 2011).

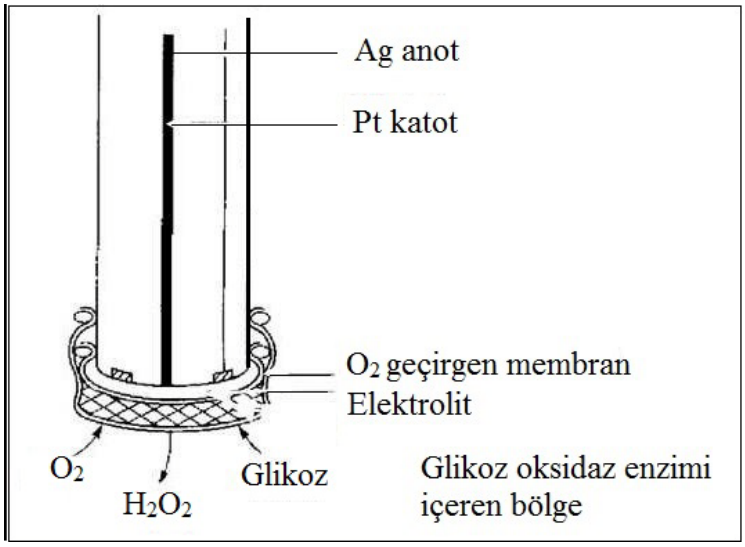
İlk amperometrik biyosensör kandaki glikoz analizi için Clark ve Lyons tarafından oksijen elektrodu ve glikoz oksidaz enzimi kullanılarak geliştirilen biyosensördür. Bu biyosensör bir yandan biyolojik sistemin yüksek spesifisikliğini (enzim) diğer taraftan ise fiziksel sistemin (elektrot) tayin duyarlılığını birleştirmiş ve geniş spektrumlu bir uygulama olanağı bulmuştur. İnsan kanındaki glikoz konsantrasyonunun belirlenmesi diabet hastalığının teşhisi ve tedavisi için önemli bir analizdir.

Biyosensör teknolojisine olan ilginin gün geçtikçe artması ve glikoz tayininin özellikle diyabet hastalığındaki kolayca kullanımı ve canlı yaşamında daha birçok alanda kullanımı düşünüldüğünde glikoz tayini için yapı ve özellikleri farklı iki polimer kullanılarak amperometrik bir biyosensör geliştirilmiştir. Geliştirilen bu biyosensör üzerine uygulama potansiyeli, kullanılan polimerin ve glikoz oksidazın miktarı, polimer film kalınlığının etkisi, sıcaklık ve pH parametreleri etkisi araştırılmıştır. Araştırılan bu etkilere ek olarak geliştirmiş olduğumuz biyosensörün gözlenebilme sınırı, tekrarlanabilirliği, kararlılığı ve aktivasyon enerjileri belirlenmiştir.

# 2. BİYOSENSÖRLER

## 2.1. Biyosensörlerin Tarihçesi

Biyosensörlerin tarihi 1950'li yılların ortalarında L. C. Clark'ın Cincinnati Hastanesi'nde (Ohio, ABD) ameliyat sırasında kanın $O_2$ miktarını bir elektrot ile izlemesiyle başlamaktadır. 1962 yılında Clark ve Lyons Glikoz oksidaz (Gox) enzimini $O_2$ elektrodu ile kombine ederek kanın glikoz düzeyini ölçebilmişlerdir (Şekil 2.1). Böylece yeni bir analitik sistem oluşturulmuştur. Bu sistem ile hem biyolojik sistemin yüksek spesifisikliği (enzim) hem de fiziksel sistemin (elektrot) tayin duyarlılığı birleştirilmiş ve geniş spektrumlu bir uygulama olanağı sağlanmıştır.




**Şekil 2.1.** Clark'ın enzim elektrodu

$$\text{Glikoz} + O_2 \rightarrow \text{Glikonik asit} + H_2O_2 \qquad (2.1)$$

Bir biyolojik sıvıdaki glikoz ve çözünmüş oksijen elektrot etrafındaki membranı geçerek elektrot yüzeyine ulaştığında glikoz yükseltgenerek glikonik aside dönüşmektedir ve bu sırada $O_2$ kullanılmaktadır. Ortamdaki glikoz bittiğinde, $O_2$ elektrodu ile reaksiyonun başlangıcındaki ve sonundaki çözünmüş $O_2$ miktarı belirlenmektedir. $O_2$ miktarındaki fark ortamdaki glikozun oksidasyonu için harcanan $O_2$ olup, bu farktan biyolojik sıvıdaki glikoz miktarı bulunmaktadır. Klasik elektrokimya ile sadece anyon ve katyonları belirleyen sensörler hazırlanabilirken, sisteme biyomateryalin de katılması ile diğer birçok maddenin tayini yapılabilmektedir. Böylece hazırlanan bu analiz sistemlerine biyosensör denilmektedir.

Clark ve Lyons (1962) ilk defa biyosensör terimini kullanmışlardır. Enzim-elektrot kompleksini hazırlayan ikili, bu kompleksi glikoz sensörü olarak kullanmışlardır. Sensör oksido-reduktaz enzimi olan glikoz oksidazın platin elektroduna immobilize olmasına dayanmaktadır. Platin elektrot enzim tarafından üretilen $H_2O_2$ tarafından +0,6 V'ta polarize olmaktadır. Bu prensibe göre çalışan tarihin ilk biyosensörü 1974 yılında piyasada Yellow Spirngs Instrument (YSI) olarak tanımlanmıştır.

YSI sensörünün geliştirilmesinde ana özellik yeni nesil membranlardır. Clark burada sandviç membrandan faydalanmaktadır. Enzim nükleopor polikarbonat membran ve selüloz asetat membran arasına yerleşmektedir. Bu membranlar normalde ortamın potansiyel yapısını etkileyecek olan diğer faktörleri elemekte ve cihazın duyarlılığını ve özgünlüğünü yükseltmektedir. Örneğin, Clark'ın kullandığı membran $H_2O_2$'in geçişine olanak sağlarken askorbat ve diğer parazitik (girişime sebep olan) kimyasalların geçişine izin vermemektedir.

Clark ve Lyons'un geliştirdiği ilk nesil biyosensör membran diyalizatörü, reaksiyon bölgesi ve çeviricileri içermektedir. İkinci nesil biyosensörlerde $O_2$ yerine elektronları enzimin redoks merkezinden elektrodun yüzeyine taşıyabilen bir elektron akseptörü (redoks aracısı) kullanılmaktadır.

$$Gox - FADH_2 + M_{ox} \rightarrow Gox - FAD + M_{red} + 2H_2 \qquad (2.2)$$

$$M_{red} \leftrightarrow M_{ox} \qquad (2.3)$$

Gox: Glikoz oksidaz, FAD: Flavin Adenin Dinükleotid, M: Redoks aracısı

Üçüncü nesil biyosensörlerde enzimin redoks merkezi ile elektrot yüzeyi arasında direkt elektriksel iletişim sağlanmaktadır ve bu yüzden redoks aracılarına gereksinim kalmamaktadır.

Biyosensör teknolojisinin tarihsel geçmişine bakıldığında bu alandaki ilk çalışmaların enzim sensörleriyle başladığı görülmektedir. Bunun yanı sıra elektrokimya alanındaki gelişmeler, özellikle amperometrik ve potansiyometrik esaslı sensörlerin pratik uygulamalarda rahatlıkla kullanılabileceği zemini oluşturmaktadır. Çeşitli

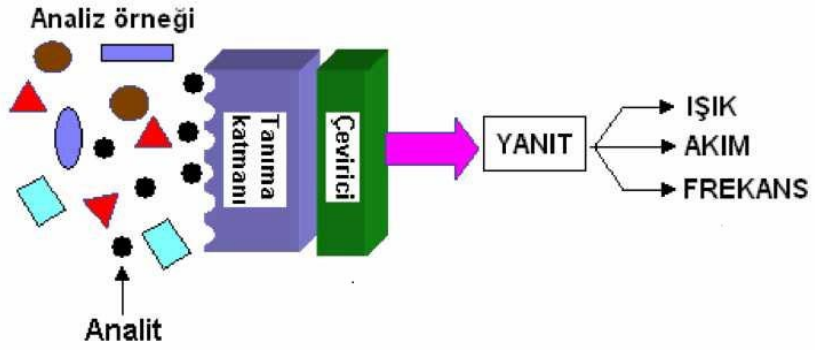
maddelerin duyarlı ve pratik analizlerine duyulan gereksinimin de artmasıyla çeşitli enzim elektrotlarıyla ilgili bilimsel çalışmalar planlanmıştır (Çubukçu, 2008).

Bugünkü çalışmalara bakıldığında elektrokimyasal esaslı iletim sitemlerinin pratik ve ticari uygulamalarında enzim elektrotlarının büyük bir üstünlüğü göze çarpmaktadır. Bu sonuçtaki en büyük faktör canlı sistemlerle ilgili hemen hemen her türlü maddenin doğrudan veya dolaylı olarak analizinde kullanılabilecek binlerce enzimin varlığıdır (Telefoncu, 1999).

## 2.2. Biyosensörler

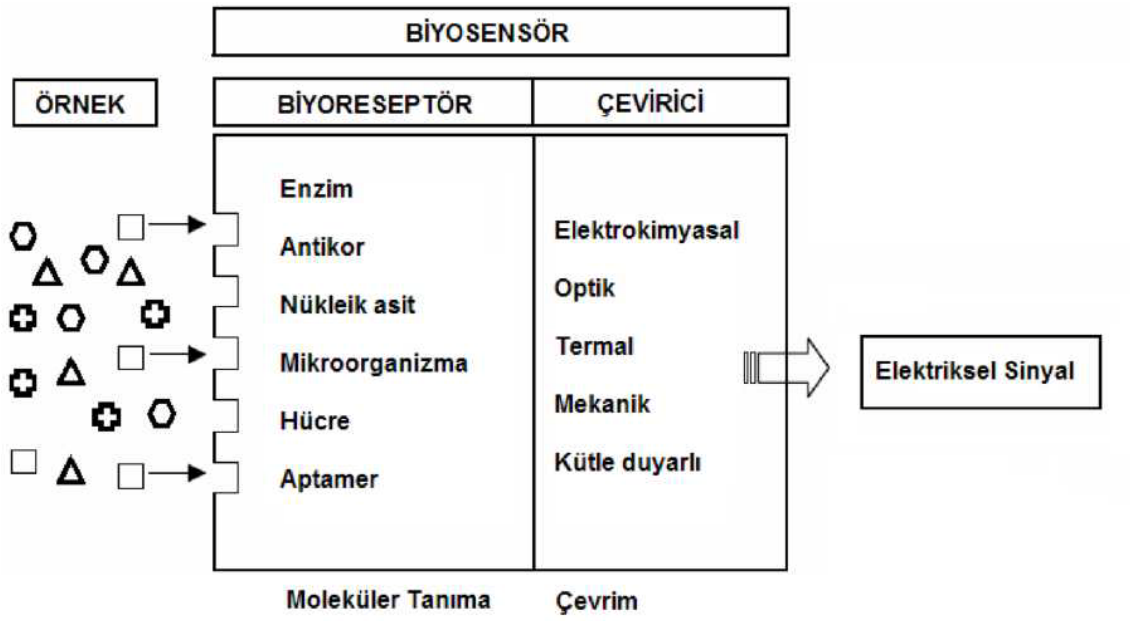
Canlıların çevrelerindeki değişimi algılama ve yanıt verme mekanizmaları, biyosensörlerin geliştirilmesi için temel oluşturmaktadır. Biyosensörler; genelde biyolojik analizler için kullanılan bir çeşit özel sensördür ve IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) tarafından, "kimyasal bir bileşiğe karşı verilen biyolojik yanıtı optik, termal ya da elektriksel sinyallere dönüştüren cihazlar" olarak tanımlanmaktadır (Aydın, 2012).

Biyosensörler, “biyo” (biyolojik kökenli) ve “sensör” (algılayıcı) kelimelerinin birleşmesiyle oluşan, nicel ve nitel analiz yapabilen kompleks cihazlar olarak tanımlanmaktadır. Bir diğer tanımda ise birbiri içine geçmiş, bir tanesi biyokimyasal, diğeri elektrokimyasal iki çevirici sistemden oluşan algılayıcı sistemlerdir (Şekil 2.2). Biyokimyasal çeviricilerin çalışma prensibini; analizi yapılacak madde ile etkileşerek onu tanıma ve bu etkileşme sonucunda oluşan biyokimyasal ürünün vermiş olduğu sinyalin, elektrokimyasal çevirici tarafından okunabilir bir sayısal değere çevrilmesi oluşturmaktadır (Coulet, 1991).




**Şekil 2.2.** Biyosensör bileşenleri (Arıksoysal, 2006)

Biyosensörler, herhangi bir biyolojik örnek içindeki kimyasal bir ajanın miktarı veya aktivitesine seçici ve tersinir olarak cevap veren analitik teknolojilerdir. Şekil 2.3'te şematik olarak gösterilen bir biyosensör, biyobileşenler (receptor) ve fiziksel bileşenlerden (transducer) oluşmaktadır (Baş, 2011).




**Şekil 2.3.** Biyosensörlerin yapısı ve çalışma prensibi (Temiz, 2006)

Biyosensörler için biyoreseptör veya çevirici türüne göre sınıflandırma yapılmaktadır.

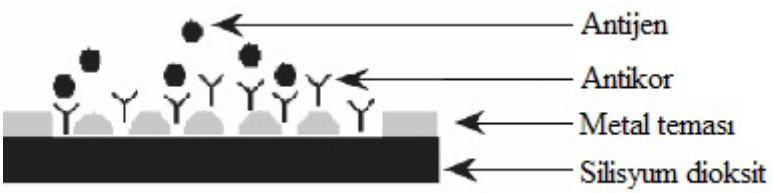
### 2.2.1. Biyoreseptörler

#### 2.2.1.1. Enzimler

Biyosensör teknolojisinin ilk çalışmalarına bakıldığında enzim sensörleriyle başlandığı görülmektedir. 1962 yılında Clark ve Lyons, 1967 yılında Updike ve Hick tarafından rapor edilen glikoz tayinine yönelik glikoz oksidaz enzim elektrotları bu konudaki ilk örnekleri oluşturmaktadır. Yüksek spesifikliklerinden dolayı enzimler en yaygın kullanılan biyoreseptörlerdir. Aynı zamanda enzimler biyokatalitik özellikleri ile de ön plana çıkmaktadırlar. Enzimlerin sağlamış olduğu bu katalitik etki biyosensörlerin daha düşük limitler arasında ölçüm yapabilmelerini sağlamaktadır.

### 2.2.1.2. Antikorlar

Antikorlar yüzlerce aminoasitin düzenli bir sırayla bağlanmasıyla oluşan protein yapısında kompleks biyomoleküllerdir. Antijenler ise bağışıklık sisteminde antikorlar tarafından tanınan ve immün cevap oluşumuna sebep olan yabancı moleküllerdir. Biyobileşen olarak kullanılan antikorlar bir glikoprotein olup, antijenlere cevap veren biyosensörler olarak kullanılmaktadır. Kandaki proteinlerin %20'sini oluşturmaktadırlar. Y şeklinde olup, iki tane antijen tanıma bölgesi ihtiva etmektedirler. Genel olarak antikorları birbirinden ayıran farklılık antijen tanıma bölgeleridir. Her farklı antikor kendine özgü olan antijeni tanımaktadır ve ona geçici olarak bağlanmaktadır. İşte bu özelliklerinden faydalanılarak tasarlanan immüno (bağışıklık) sensörlerin geliştirilmesi ve özel analitlerin analiz edilmesi mümkün olmaktadır (Şekil 2.4).




**Şekil 2.4.** Bir immunosensör örneği

### 2.2.1.3. Aptamerler

Aptamerler genel olarak rastgele sentezlenmiş tek zincirli oligonükleotidlerdir. Oligonükleotid sentezleme basamağıyla farklı zincir dizilim sekanslarına sahip çok sayıda sentetik oligonükleotid sentezlemek mümkündür. Sentezlenen ürünler ise biyosensör teknolojisinde biyoreseptör olarak kullanılmaktadır. Son 10 yıl içinde özel yöntemlerle üretilen aptamer proteinlerin bazılarının altın ve bakır gibi madenlere karşı bile özgün bağlanma göstermiş oldukları görülmektedir. Bu özellikleri ile yer altı suları üzerinden maden aramaları yapmak için biyosensör olarak kullanılabilecekleri düşünülmektedir.

### 2.2.1.4. Doku biyosensörleri

1981 yılında ilk defa bitki dokusu temelli elektrot hazırlanmasından itibaren, birçok bitki dokusu temelli biyosensör geliştirilmiştir. Bitki doku materyalleri kullanılarak oluşturulan biyosensörler, izole enzimlerle oluşturulan biyosensörlere

alternatif olmaktadır. Hayvansal ve bitkisel dokuların ve organellerin kimi enzimlerce özellikle zengin olduğu bilinmektedir. Bu enzimlerin izole edilmiş preparatları yerine doğrudan yoğun bulundukları bu kaynaklar biyosensör hazırlanmasında kullanılmaktadır (Telefoncu, 1999). Böylece doku biyosensörlerinde enzimin saflaştırılması gerekliliği ortadan kalkar. Ayrıca doku biyosensörleri bazı enzimler için doğal ortamda artan kararlılık ve düşük maliyet gibi avantajlara sahip olmaktadırlar (Macholan, 1987).

Doku kesitleri kullanıldığında biyosensörün cevap süresi genellikle uzun olmaktadır. Bu süreyi kısaltmak için direkt doku kesiti yerine doku ezilerek veya iyice homojenize edilerek hazırlanmaktadır. Böylece difüzyon problemi de azaltılmış olacaktır (Telefoncu, 1999).

#### 2.2.1.5. Nükleik asit

Nükleik asit sensörleriyle DNA, RNA, bunların parçaları veya bunları taşıyan moleküllerin analizi yapılabilmektedir. Gen analizlerinde kullanılan DNA biyosensörleri DNA'nın yapısında bulunan bazların (adenin = timin, guanin = sitozin) birbirlerini tamamlayıcı özelliklerine (Ferrari, 2007) ve tersinir hibridizasyon/dehibridizasyon mekanizmasına göre geliştirilmişlerdir (Placko, 2007). Eğer DNA molekülünün belirli bir kısmını oluşturan baz dizisi biliniyor ise bu durumda bu diziyi tamamlayacak olan ve prob olarak adlandırılan karşı dizi sentezlenebilmekte ve optik olarak teşhis edilebilen bir bileşik ile etiketlenebilmektedir. DNA çift sarmal yapısı etiketleme işleminden sonra ısı veya kimyasalların etkisiyle ayrılarak prob üzerine yerleştirilmektedir. Ardından analit içerisine yerleştirilen prob hedef moleküller ile hibritleşme reaksiyonuna girerek çiftli sarmal yapıyı oluşturmaktadır. Daha sonra optik mikroskop veya ışıma yoluyla yapı analiz edilmektedir (McGlennen, 2001). Ayrıca, hibridizasyon reaksiyonu redoks indikatörü, enzim, interkalatör, nanopartikül veya bir destek maddesi kullanılarakta analiz edilmektedir (Baş, 2014).

Biyosensörlerde biyoreseptör olarak kullanılmaya uygun birçok biyolojik materyal bulunmaktadır. Bakteriler, hücreler, organeller, membran tabakaları bunlardan bazılarıdır. Herhangi bir biyomateryalin biyoreseptör olarak kullanılabilmesi için, materyalin istenilen analiti bir şekilde özgün olarak tanıma kapasitesine sahip olması gereklidir.

### 2.2.2. Fiziksel bileşenler

Biyosensörlerde biyolojik ve biyokimyasal sinyalleri ölçülebilir sinyallere dönüştürebilen sistemlere çevirici (transducer) denir (Gürsoy, 2002). Bir substrat için bileşenin aktivitesi tüketilen $O_2$ miktarındaki değişim ile, oluşan $H_2O_2$ miktarındaki değişim ile, NADH konsantrasyonundaki değişim ile, floresans şiddetindeki değişim ile, pH değişimleri ile, iletkenlik, sıcaklık ya da kütledeki değişim ile ölçülebilir (Luongs, 1997). Çeviriciler biyolojik reaksiyon sonucunda meydana gelen değişime bağlı olarak elde edilmek istenen sinyalin türüne göre elektrokimyasal, optik, kütle ve ısı ölçüm sistemleri olmak üzere sınıflandırılabilir.

Elektrokimyasal bileşenler ile hazırlanan biyosensörlerde biyolojik reaksiyon sırasında, elektron gibi elektrokimyasal taneciklerin harcanması veya oluşumu sonucunda ortaya çıkan sinyaller elektrokimyasal dedektörler ile ölçülmektedir (Baş, 2011).

Modern elektroanalitik sistemler oldukça düşük tayin limitlerine sahip olup ($10^{-9}$ M), küçük hacimde örneklere (1-2 μL) olanak tanımaktadır. Aynı zamanda elektrot sistemi ölçüm ortamından sürekli alınan sinyalin (on-line) takibine izin verir. Elektrokimyasal analiz için gereken malzeme, diğer analitik metotlarla karşılaştırıldığında çok daha ucuz ve basittir. Ayrıca elektrokimyasal sensörler optik esaslı sensörlere göre bulanık ortamda çalışabilme, karşılaştırılabilir enstrümental duyarlılık, immobilizasyona uygunluk gibi avantajlara sahiptir (Yüce, 2011).

Elektrokimyasal biyosensörler, biyokimyasal reaksiyon sonucunda bazı iyonlu yapıların konsantrasyonlarında meydana gelen değişim ile orantılı olarak değişen iletkenliğin ölçümüne dayanan kondüktometrik biyosensör, referans elektrota göre çalışma elektrodundaki potansiyel ölçümüne dayanan potansiyometrik biyosensör ve biyokimyasal reaksiyonda çalışma elektrodunda meydana gelen akım değişikliğine dayanan amperometrik biyosensör olarak üç farklı şekilde sınıflandırılmaktadır.

Potansiyometrik biyosensörler, bir çalışma ve referans elektrot arasındaki potansiyel farkının ölçümünü esas almaktadır ve belirlenen elektrot potansiyeli doğrudan analit derişimini tanımlamaktadır. 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 biyosensörler, pH ya da tek değerlikli iyonlara duyarlı cam elektrotlar, anyonlara, katyonlara duyarlı iyon seçimli elektrotlar, karbondioksit veya amonyağa yönelik gaz

duyarlı elektrotlardan oluşmaktadır (Baş, 2011). Potansiyometrik sensörlerin düşük hassasiyet, spesifik olmayan etkileşimlere ait ve aletsel sinyal alınması gibi büyük problemleri vardır. Özellikle sinyal/gürültü oranı analitik problemlere sebep olabilmektedir (Yüce, 2011).

Kondüktometrik biyosensörlerde, 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 (Baş, 2011). Klinik örneklerdeki bakteri tespitinde, endüstriyel mikrobiyal proses kontrolünde bu sensörlerden faydalanılmaktadır.

Amperometrik biyosensörler, biyosensörlerden bahsedildiğinde ilk akla gelen daha genel ve yaygın kullanım imkânı bulmuş, analiz amacına yönelik biyoanalitik sistemlerdir. Amperometrik biyosensörler bir substratın yükseltgenme veya indirgenme sonucu oluşan akım değişimini ölçer. Genel anlamda belli bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümünü esas alır (Telefoncu, 1999). Amperometrik biyosensörlerde akım şiddeti, çalışma elektrodunda yükseltgenen veya indirgenen elektroaktif türlerin derişiminin bir fonksiyonudur. Amperometrik biyosensörlerdeki en önemli faktör biyokatalizatör ile elektrot veya varsa iletken polimer arasındaki elektron akışıdır. Amperometrik biyosensör sistemlerine en uygun enzimler oksidazlar, dehidrogenazlar yani oksidoredüktaz sınıfı enzimlerdir (Clark, 1987). Biyobileşen olarak enzimlerin kullanıldığı amperometrik biyosensörlerde, enzimatik reaksiyon esnasında harcanan $O_2$ veya oluşan $H_2O_2$ değişimleri izlenerek ilgili analit tayini yapılabilmektedir (Baş, 2011).

Optik biyosensörler, iletici sistem olarak optik lifler üzerine uygun bir yöntemle bir biyomolekülün immobilize edilerek biyokimyasal etkileşim sonucunda meydana gelen değişimi kimyasal ya da fizikokimyasal absorbans, emilim ve saçılım yöntemleriyle ölçüm yapan aygıtlardır. Optik biyosensörler, biyokimyasal reaksiyon esnasında absorbans 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 (Baş, 2011).

Kütle hassas biyosensörlerde çevirici olarak piezoelektrik kristallerin kullanılır, rezonans frekanstaki değişime dayanarak santimetrekarede nanogram seviyesinde kütle değişimini ölçebilen ve bu yüzden de antikor-antijen etkileşimlerinde sıkça kullanılan biyosensörlerdir. Kütle hassas biyosensörlerin çalışma prensibi piezoelektrik etkiye

dayanır. Sensör yüzeyinde bir madde adsorblandığı veya biriktiği zaman piezoelektrik kristalin rezonans frekansındaki değişimin ölçülmesiyle sonuca ulaşılır (Yüce, 2011).

Enzim immobilizasyonu ile hazırlanan bir piezoelektrik enzim sensöründe, enzim-substrat etkileşmesinden dolayı meydana gelen kütle değişimlerinin piezoelektrik kuartz diskin vibrasyonunda sebep oldukları değişimden faydalanılarak madde miktarı tespit edilir.

Termal biyosensörler, bir enzimatik reaksiyondaki enzim ile substrat arasında gerçekleşen biyokimyasal reaksiyon sonucu meydana gelen entalpi değişiminden yararlanılarak substrat derişiminin belirlenmesini esas alan biyosensörlerdir. Enzimatik reaksiyon sonucu oluşan sıcaklık değişimi ile substrat konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişkiden sonuca ulaşılır. Sıcaklık değişimleri termal olarak yalıtılmış ortamdaki termistörler veya termofiller aracılığıyla izlenir. Kullanılan termistörler çok küçük sıcaklık değişimlerine bile duyarlıdır. Dolayısıyla çok düşük miktardaki substrat derişiminin ölçümüne ($10^{-5}$ M) olanak tanırlar (Yüce, 2011).

## 2.3. İmmobilizasyon Yöntemleri

Biyosensörlerin hazırlanmasında uygun biyomolekül ve çevirici sistemin seçilmesi kadar biyomolekülün çevirici sisteme immobilizasyonu da önem teşkil eden bir unsurdur. İmmobilizasyon işlemi biyoreseptörlerin kararlılığı ve kullanımı açısından büyük avantaj sağlar. İmmobilizasyon yöntemi biyomolekülün kimyasal yapısı, fiziksel durumu dikkate alınarak en önemlisi de biyomolekülün işlevselliğinin korunmasını sağlayacak şekilde belirlenmektedir. Bu amaçla başlıca dört yöntem kullanılmaktadır.

### 2.3.1. Kovalent bağlama

Enzimler çeviriciyle doğrudan veya önceden film veya tabakayla kaplanmış şekilde kovalent olarak bağlanabilirler. Enzimler doğrudan çevirici yüzeylerine bağlanabileceği gibi uygun bir materyale de yine kovalent olarak bağlanarak immobilize edilen preparatın çevirici yüzeyinde bir film veya tabaka oluşturulmasıyla da biyosensör hazırlanabilir.

Enzimlerin kovalent olarak immobilize edilmesinde dikkat edilmesi gereken kriterler vardır. Özellikle enzim aktivitesi için bağlanmanın aktif merkezdeki aminoasitler üzerinden gerçekleşmemesi ve bu grupların sterik olarak olumsuz etkilenmemesi önemli bir husustur. Kovalent bağlanmanın enzim molekülü üzerindeki

fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleşmesi istenir. Bu fonksiyonel gruplar, $NH_2$ gibi nükleofilik gruplardır. Diğer önemli bir husus ise immobilizasyon için gerekli reaksiyonda kullanılan kimyasal maddelerin enzimin aktif merkezini etkilememesidir.

### 2.3.2. Tutuklama

Temel olarak tutuklama biyoreseptörün bir membran veya tabaka içerisinde hapsedilmesidir. Tutuklama polimer matris kafeslerde gerçekleştirilebileceği gibi yarı geçirgen membranlar içinde (mikro-kapsülleme) ve miseller ile de gerçekleştirilebilir. Polimer kafeste tutuklama yöntemi ile biyomoleküllerin suda çözünmeyen çapraz bağlı polimer örgüsü içerisinde tutuklanması şeklinde gerçekleşmektedir. Polimerleşme sonucu enzim molekülleri çapraz bağ ağları arasında tutuklanmakta ve böylece ana çözeltiye geçmeleri engellenmektedir. Mikrokapsülleme yönteminde ise özel olarak hazırlanmış olan zarlardan enzim dışarı çıkamazken, substrat ve ürünün hareketi serbesttir. Bu yöntemi kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyon tekniklerinden ayıran en önemli özellik enzim molekülünün fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır. Bu yöntem enzimler yanında organeller, hücreler ve antikorlar için de uygulanabilir.

### 2.3.3. Adsorpsiyon

Adsorpsiyon kovalent olmayan etkileşimlerce biyokatalizörün yüzeye adsorbe edildiği bir immobilizasyon yöntemidir. Bu yöntem yüzey aktif suda çözünmeyen bir adsorbanın enzim çözeltisi ile muamele edilmesi karıştırılması ve enzim aşırısının iyice yıkanarak ortamdan uzaklaştırılması temeline dayanır. Adsorpsiyon ile immobilizasyonda hidrofobik etkileşimlerle söz konusu olsa da en çok van der Waals, iyonik ve hidrojen bağı etkileşimleri gibi elektrostatik güçler etkindir. Bir yüzeye adsorbe olan biyomoleküller pH, sıcaklık ve iyonik kuvvet değişimlerine çok duyarlıdır. İmmobilizasyon işleminin basit, hızlı ve ucuz oluşu, değişik biçim ve yükteki taşıyıcıları seçme olanağı vermesi yöntemin avantajlarıdır. Yöntemin sakıncaları ise; optimum koşulları saptamak zordur, enzim ile taşıyıcı arasında kuvvetli bir bağlanma yoksa enzim serbest halde reaksiyon ortamına geçerek ürünleri kirletebilir.

### 2.3.4. Çapraz bağlama

Bu yöntem biyosensör hazırlanmasında daha çok tutuklama ve kovalent bağlama yöntemlerinin kombinasyonu şeklinde uygulanır. İki fonksiyonlu reaktifler enzimler yanında organeller, hücreler ve antijenlerin immobilizasyonunda da uygulanır.

Çapraz bağlamada iki yöntem kullanılır:

- *Doğrudan bağlama yöntemi:* Bu yöntemde yaklaşık 10 µL enzim çözeltisi bir kılcal boru yardımıyla çevirici yüzeyine ince bir tabaka oluşturacak şekilde damlatılır. Daha sonra çapraz bağlayıcı reaktif ilave edilir. Bu yöntem daldırma yöntemine göre daha az biyobileşen ile çalışabilmektedir (Telefoncu, 1999).
- *Daldırma yöntemi:* Elektrot önce enzim ve çapraz bağlayıcının bulunduğu karışıma veya enzim, albümin, jelatin gibi suda çözünen protein ve çapraz bağlayıcının bulunduğu karışıma daldırılır, sonra kendi ekseni etrafında homojen bir enzim tabakası elde edilecek şekilde döndürülür. Bundan sonra elektrot glisin çözeltisine daldırılarak nötrleştirilir, çapraz bağlayıcının fazlası ve diğer reaksiyona girmeyen maddeler yıkanarak uzaklaştırılır. Yöntem çok kolay ve özellikle küçük çeviriciler için çok uygundur (Telefoncu, 1999).

## 2.4. İmmobilize Enzim

Enzimlerin, suda çözünmemeleri için matris adı verilen ve destek görevi gören materyaller üzerine çeşitli yöntemlerle tutturulmalarına enzim immobilizasyonu adı verilir. Enzimlerin matrislere aktif grupları kapanmayacak şekilde immobilizasyonu gerekir. Aktif gruplar kapanırsa enzim substratı bağlayamaz ve verimi azalır.

İmmobilize enzimler, serbest halde bulunan enzimlere göre birçok avantaja sahiptir. Bu avantajlar şu şekilde sıralanabilir:

- Enzimler tekrar tekrar kullanılırlar. Özellikle üretimi zor ve pahalı enzimler için bu önemlidir.
- İmmobilize enzimlerin aktivitesi, serbest enzimlere göre daha kolay kontrol edilebilir.
- Ürün enzimle kontamine olmaz, çünkü enzim matriste tutulur.
- Matris enzimi fiziksel bir bariyer olarak koruduğundan, immobilize enzimler dayanıklı hale gelir ve pH, sıcaklık gibi fiziksel değişimlerden daha az etkilenir.
- Sürekli fermentasyonlar için enzimi daha kullanışlı hale getirir.

- İmmobilize enzimler çok daha doğru bir şekilde kontrol edilirler.
- İmmobilize hücrelerle birçok enzim de immobilize olacağından aynı anda birden fazla reaksiyonu katalizleyebilirler.
- Serbest enzimlere göre daha pratik, hızlı ve ucuz analiz olanağı sağlarlar.

## 2.5. Biyosensörlerin Performans Kriterleri

Hazırlanmış olan bir biyosensörün hedeflenen amaçlar doğrultusunda olup olmadığına ancak performans kriterleri belirlendikten sonra karar verilebilir. Biyosensörler genel olarak sekiz parametreye göre nitelendirilirler.

### 2.5.1. Seçicilik

İdeal bir biyosensörde en önemli parametrelerden birisi seçicilik özelliğidir. Seçicilik biyosensörlerin ölçüm yapılacak ortam içerisinde yalnızca teşhis edilmek istenen molekül ile etkileşime girme kabiliyetidir. Yani biyosensörün bileşenlerinden olan biyomolekülün hedef analite karşı duyarlılığıdır. Ortamda bulunabilecek başka analitlere karşı ilgi göstermez ve dolayısıyla hatalı sonuç vermez. Bu yüzden ortamda girişim yapabilecek türlerin girişim yüzdeleri belirlenmeli ve girişimi engelleyecek önlemler alınmalıdır. Bir biyosensörün seçiciliği üzerinde başlıca sensörle girişimler, biyokatalizörle girişimler ve pH etkili olmaktadır.

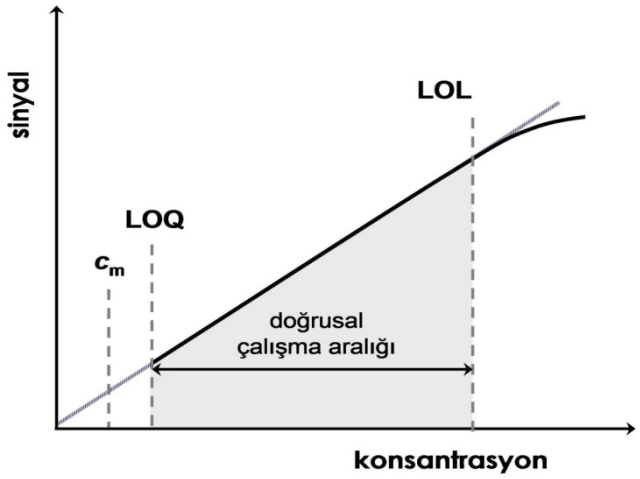
### 2.5.2. Duyarlık

Duyarlık ölçüm ortamına eklenen analit konsantrasyonu ($\Delta C$) ile biyokimyasal reaksiyon sonucu biyosensörün çıkış sinyalindeki değişim ($\Delta S/\Delta C$) olarak tanımlanır. Bu oranın büyüklüğü biyosensörün duyarlığının ölçüsüdür. İdeal bir biyosensörün duyarlığının biyosensörün kullanım süresi boyunca sabit kalması ve yüksek duyarlık göstermesi istenir.

### 2.5.3. Doğrusallık

Hazırlanan biyosensör ile yapılan çalışmalarda, doğru ölçüm alınabilmesi için ölçüm ortamına analitin belirli miktarlarda ilave edilmesiyle değişen analit konsantrasyonu ile sinyal değişimlerinin doğrusal eğilim gösterdiği lineer bölgeyi tanımlamak gerekmektedir. Ölçüm ortamına her bir analit eklemesinden sonra artan analit konsantrasyonu ile ölçülen sinyal arasındaki ilişki belirli bir analit konsantrasyonuna kadar doğrusal bir değişim göstermekte, daha sonraki analit konsantrasyonlarında ortam kararlılığının bozulması, biyomolekülün aktivitesinin azalması, elektrot yüzeyinin oluşan bazı radikallere bağlı olarak değişim göstermesi gibi nedenlerden dolayı doğrusallıktan sapma görülmektedir.

Şekil 2.5'te 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).




**Şekil 2.5.** Bir analitik yöntemin çalışma aralığı

### 2.5.4. Cevap süresi

Biyosensörlerin gelişmesinin ve kullanılmasının en önemli nedenlerinden biri pratik olarak kısa sürede sonuç verebilmesidir. Cevap süresi, analizlenecek maddenin ölçüm ortamına eklenmesiyle sinyal değişiminin okunduğu ana kadar geçen süre olarak tanımlanmaktadır.

Bir biyosensörün cevap süresi 3 ana aşamada meydana gelen olaylar ile değişir.

1. Substratın analiz ortamından sensör yüzeyine ne kadar hızlı difüzlendiği,
2. Biyokatalizörün aktif merkezi ile ne kadar hızlı tepkime verdiği,
3. Oluşan ürünün ölçüldüğü yer olan sensör yüzeyine ne kadar hızlı difüzlendiği.

Bu üç olayı etkileyen başlıca unsurlar çözeltinin karıştırma hızı, substrat derişimi, enzim derişimi, optimum pH, sıcaklık ve sensör yüzeyinde veya biyoaktif tabaka yüzeyinde herhangi bir katman kullanılıp kullanılmadığı ve kullanılıyorsa niteliğidir. Bu unsurlardan karıştırma hızının artışı cevap süresini kısaltırken, substrat derişimindeki artış uzamasına yol açar. Enzim miktarının artışı ve optimum pH'a yakınlaşma cevap süresini kısaltır.

Ancak enzim miktarı artışı biyoaktif tabaka kalınlaşmasına yol açacağı için difüzyon problemini arttırabilir ve cevap süresi uzar. Bu sorun spesifik aktivitesi yüksek enzim preparatlarının kullanımıyla giderilebilir. Sıcaklık difüzyonu olumlu yönde etkileyerek cevap süresinin kısalmasına yol açar. Ancak enzimin optimum sıcaklığından uzaklaşmasının enzim aktivitesinde bir düşmeye neden olacağı gözden uzak tutulmamalıdır (Dinçkaya, 1999).

Biyosensörler için cevap süresi genel olarak birkaç saniye ile birkaç dakika arasında değişir. Bir biyosensörün en az sürede en çok sayıda analize imkân vermesi sadece cevap süresiyle sınırlı bir durum değildir. Yeni bir ölçüme hazır hale gelebilmesi için gereken polarizasyon, denge veya yenilenme gibi işlemlerin aldığı süre çoğu zaman cevap süresinden çok daha fazla bir süre alır (Dinçkaya, 1999).

### 2.5.5. Gözlenebilme sınırı

Belirli bir güven seviyesinde, hazırlanan biyosensörün cevap verebildiği en küçük analit konsantrasyonu gözlenebilme sınırı olarak tanımlanmaktadır. Bu gözlenebilme sınırı analitik sinyal büyüklüğünün tanık sinyalindeki istatiksel sapma oranına bağlıdır. Diğer bir ifadeyle, analitik sinyal gürültü sinyalindeki sapmanın *k* katı kadar büyük olmadığı sürece sinyali belirli bir kesinlikle görmek imkânsızdır. Belirlenen en küçük analitik sinyal, $S_m$, ortalama tanık sinyali, $\overline{S}_{bl}$ ile tanığın standart sapmasının, $s_{bl}$, *k* katının toplamına eşittir.

$$S_m = \overline{S}_{bl} + k s_{bl} \tag{2.8}$$

Deneysel çalışma sonrası elde edilen veriler kullanılarak yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda $\overline{S}_{bl}$ ve $s_{bl}$ belirlenir ve $S_m$ hesaplanır. Konsantrasyon ile değişen sinyal verileri dikkate alınarak çizilen kalibrasyon grafiğinde eğim, *m*, kullanılarak gözlenebilme sınırı, $c_m$, aşağıda şekilde bulunur (Skoog, 1998).

$$c_m = \frac{S_m - \overline{S}_{bl}}{m} \tag{2.9}$$

### 2.5.6. Kararlılık

Bir enzim elektrodunun kararlılığı diğer faktörlerde yeterli koşullar sağlandıktan sonra onun pratik kullanılabilirliğinin en önemli belirteçlerinden biridir. Kararlılık biyosensörlerin kullanım ömrü hakkında bilgi verir ve biyosensör ile ne kadar çok sayıda ölçüm yapılabilmesine imkân sağlamasıyla ölçülmektedir. Kararlılık, kullanılan enzimin fiziksel dayanıklılığından etkilendiği gibi; pH, ısı, nem, ortam, $O_2$ derişimi, enzimin immobilizasyonunda kullanılan polimerin kimyasal ve fiziksel karakteri gibi parametrelerden de etkilenmektedir.

### 2.5.7. Kesinlik (Tekrarlanabilirlik)

Substrata karşı aynı enzim elektrot ile aynı derişimde ya da aynı özelliklere sahip birden fazla örnek ile yapılan denemelerde elde edilen sonuçların aynı olması biyosensörün tekrarlanabilirliğini yani kesinliğini gösterir. Enzim aktivitesi, kararlılığı ve saflık düzeyi hazırlanacak olan enzim sensörü ile tekrarlanabilir sonuçlar alınmasında oldukça önemlidir. Ölçümün kesinliğinin bulunmasında standart sapma, korelasyon ve korelasyon katsayısı sayısal hesaplamaları kullanılmaktadır. Her zaman standart kalibrasyon grafiği çizme gereğinden kaçınılması durumunda, standart ilave yöntemlerinden yararlanılır. Bu amaçla analizlenecek örnek ölçülür, ardından gerçek değeri bilinmeyen bu örneğin ölçme sonuçlarına göre yaklaşık iki katı derişimde bilinen bir standart eklenir ve ölçme işlemi gerçekleştirilir. Bu yöntem sensör cevabının örnek derişimiyle doğrusal değiştiğinin bilindiği durumlarda aşağıdaki bağıntı yardımıyla hesaplanır (Dinçkaya, 1999).

$$C_u = \frac{r_u C_s}{(r_{(u+s)} - r_u)} \tag{2.10}$$

Bağıntıda $C_u$, bilinmeyen örneğin konsantrasyonu, $C_s$, eklenen standardın konsantrasyonunu, $r_u$, bilinmeyen örneğin sensör cevabını, $r_{(u+s)}$, bilinmeyen örnek ve eklenen standardın sensör cevapları toplamını ifade eder (Dinçkaya, 1999).

### 2.5.8. Kullanım ömrü

Bir biyosensörün önemli bir özelliği normal işlem koşulları altında hassasiyetini koruyabildiği kadar uzun bir kullanım ömrüne sahip olmasıdır. Bu kullanım ömrü yapılan toplam ölçüm sayısına veya ölçülen analitin derişiminin büyüklüğüne bağlı olabilir ve ölçümler sonucunda biyomolekülün aktivitesindeki değişimin bir ölçüsü olarak tanımlanan bir faktördür. Daha yüksek derişimler hassasiyetin daha hızlı bir şekilde düşmesine neden olabilir. Ayrıca analit derişimine bağlı olmaksızın analiz ortamında aktivasyonu engelleyecek diğer kimyasal türler bulunabilir. Bir diğer önemli özellik ise biyosensörün saklanması ve kullanılması arasında geçen zamanın uzunluğudur. Biyosensörün yapısına uygun ortamda muhafaza edilmesi gerektiği gibi biyolojik bileşenin biyoaktivitesini koruyabilmesi için özel bir kimyasal ortamda

saklanması da gerekebilmektedir (Can, 2010). Biyosensörün kullanım ömrünü kalibrasyon sıklığı, kararlılık, tekrarlanabilirlik gibi parametreleri de etkilemektedir.

### 2.6. Biyosensörlerin Avantajları ve Dezavantajları

Genel olarak tüm analitlerin ölçüm tekniklerinde; kimyasalı bulunduğu kompleks yapıdan ekstrakte etmek ve girişim yapabilecek maddelerin uzaklaştırılması için saflaştırmak ve daha sonrasında tayin aşaması söz konusudur. Günümüzde ince tabaka kromatografisi (TLC), sıvı kromatografisi (LC), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) en çok kullanılan analit ayırma yöntemleri arasındadır (Garden ve Strachan, 2001). Kromatografik yöntemlerle ayırma işlemi gerçekleştirildikten sonra UV absorbsiyonu, floresans ölçümü, kütle spektrofotometrisi ya da amperometrik tayin yöntemleri kullanılarak analiz yapılmaktadır. Saflaştırmak için kromatografik yöntemler yanında "analit-spesifik antikor" etkileşimlerinin kullanıldığı immüno kimyasal teknikler de uygulanmaktadır.

Biyosensörler diğer analiz yöntemleri ile yarış içindedir (Petanen ve Romantschuk, 2003). Bu yarışta, uygun hassasiyeti ve doğrusallığı göstermesi gerekirken, başlangıçta bazı avantajları da taşımaktadır. Biyosensörlerin yüksek spesifiklik yanında; renkli ve bulanık çözeltilerde geniş bir konsantrasyon aralığında doğrudan ölçüme olanak sağlamak gibi üstünlükleri vardır (Telefoncu, 1999). Biyolojik algılayıcı elementlerin seçiciliği örnek ön hazırlığına ve fazla miktarda örneğe bağlı kalmaksızın kompleks karışımlarda gerçek zamanlı analiz için çok yüksek spesifiklikte cihazların geliştirilmesine elverişlidir. Biyosensörler ayrıca düşük maliyete, hıza, basit kullanıma sahip ve çoğaltılabilir analitik cihazlardır (Flynn, 2002; Turpeinen, 2003; Velasco-Garcia ve Mottram, 2003). Biyosensörler dondurularak kurutulabilirler, böylece onları kullanmak ve stoklamak daha da kolaylaşır. Dondurularak kurutulmuş hücreler arazi çalışması için uygundurlar çünkü günlük olarak kültüre alınmalarına ve spesifik bir şekilde stoklanmalarına gerek yoktur. Ancak duyarlılıkları düşebilir. Bu durumda hücreler suda inkübe edildikten sonra tekrar besi ortamına alınırlarsa duyarlılıklarını yeniden kazanırlar (Tauriainen, 1997).

Biyosensörlerin kompleks maddelerin rasyonel ve ucuz olarak tayininde kullanımı ekonomik ve toplumsal ağırlık kazanmalarını sağlamıştır. Biyoçip teknolojisindeki gelişmelere bağlı olarak biyosensörlerin önemi ve ağırlığı gittikçe artacaktır. Bunun yanında biyosensör hazırlamanın uzun sürmesi, moleküler biyolojik

süreçler hakkında yeterli bilgi birikiminin olmaması gibi sorunlar da biyosensörlerin yaygınlaşmasını yavaşlatmaktadır.

Biyosensörlerin ticari olarak üretilmesine engel teşkil eden bazı etkenler vardır. Bunlar biyoreseptörlerin, antikorların ve enzimlerin uzun süreli stabilizasyonundaki sorunlar, sensörlerin sterilize edilebilirlikleri, in vivo uygulamalar için biyouygunluk sorunları, diğer maddelerle oluşan spesifik olmayan adsorbsiyonlar, enzim bazlı sensörlerde immobilizasyon ve mediator sorunları, gıdalardaki diğer bileşenlerin oluşturduğu girişimin azaltılmasındaki problemler, sensörlerin küçültülmesindeki problemler sayılabilir (Deshpande ve Rocco, 1994). Sterilizasyon iki açıdan önemlidir, birincisi korumasız olan sensör bölümüne örnekten bulaşabilecek mikroorganizma ya da enzimlerin yarattığı sorunlar ve ikincisi on-line sistemlerde biyosensör materyalinden oluşabilecek sızıntı ya da bulaşmanın gıdaya ya da fermantasyona etki etmesidir (Prodromidis ve Karayannis, 2002).

Gelişen sensör teknolojisi uzun dönem içinde aşağıda belirtilen üstünlüklere sahip birçok yeni uygulamaya olanak sağlayacaktır (Biran, 2003). Bunlar:

- Yüksek duyarlık,
- Kısa ölçüm süresi,
- Gereksinime göre işlem akışı,
- Ölçüm ve analiz giderlerinde düşme,
- Otomatik ölçüm ve ayar sistemlerinin devreye sokulması,
- Multi sensör sistemlerinin geliştirilmesi, aynı anda birçok analitin tayini.

Bütün bunlara rağmen biyosensör alanında çözülmesi gereken birçok problemler de vardır:

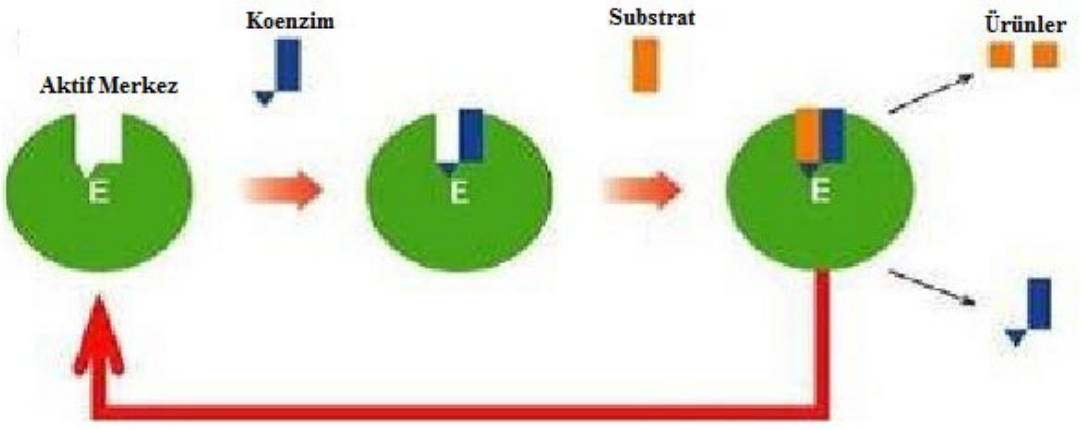
- Biyokomponentlerin ömrünün kısa olması,
- Biyosensör hazırlamanın uzun sürmesi,
- Moleküler biyolojik süreçler hakkında yeterli bilgi birikimi olmaması,
- Biyouyumluluk problemleri,
- Sensörlerin steril tutulabilme güçlüğü,
- Mikroorganizmaların genetik kararlılıklarının düşük olması,
- Gerekli duyarlılığa ve seçiciliğe sahip olmayan mikroorganizmalar (Yüce, 2011).

# 3. ENZİMLER

Enzimler canlı hücreler tarafından genetik kontrol altında hücre içinde sentez edilen ve biyolojik aktiviteye sahip organik katalizörlerdir. Enzimleri biyolojik sistemlerdeki reaksiyonları, canlılığa zarar vermeyecek ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan "biyokatalizörler" olarak da tanımlayabiliriz. Bununla birlikte, enzimlerin yeterli koşullar sağlandığında etkilerini canlı organizma dışında da gösterebilmeleri, doğal ortamlarının dışında da pek çok alanda yararlanabilme imkânını ortaya çıkarmaktadır (Chanp ve Harvey, 1997). Yaşamsal olayların tümü enzim gerektirir. Sindirim, solunum, büyüme, kas kasılması, fotosentez vb. daha birçok fiziksel ve kimyasal olayların oluşumunda enzimler rol oynar. Enzimler başta gıda sanayisi olmak üzere deterjan endüstrisinde, kâğıt üretiminde, deri işlenmesinde, tekstil endüstrisi gibi diğer endüstriyel alanlarda da kullanıldığı gibi tıpta teşhis ve tedavide de geniş bir kullanım alanına sahiptir (Kirk, 2002).

## 3.1. Enzimlerin Yapısı

Bazı enzimler yalnız proteinden oluşmuştur. Fakat çoğunluğunda yapı ve görev bakımından farklı olan "apoenzim" ve "koenzim/kofaktör" olarak adlandırılan iki ayrı grup bulunur. Apoenzim, enzimin özgünlüğünü (spesifikliğini) yani sadece özel bir reaksiyonu katalize etme ve başka bir reaksiyonda görev yapmama özelliğini sağlayan proteinden oluşan kısımdır. Isı ile kolayca denatüre (proteinin doğal özelliğinin kaybolması) olur. Koenzim (kofaktör) ise enzimin yardımcı ve etkin biçimidir. Tek başına etkili değildir. Etkinlik gösterebilmesi için apoenzime ihtiyaç duyar. Organik ya da inorganik maddelerden meydana gelmiştir. Eğer bir koenzim apoenzime kolay ayrılmayacak bir şekilde bağlı ise o zaman koenzime "prostetik grup" adı verilir. Apoenzim ile koenzimin birlikte oluşturduğu gruba tam enzim anlamına gelen haloenzim (aktif enzim) denir. Bir koenzim enzimin aktif bölgesini katalitik aktiviteye hazır hale getirir. Enzimin spesifik olarak etki yaptığı maddeye "Substrat" denilir. Enzimatik bir reaksiyon sonucu substrattan oluşan maddeye ise "Ürün" adı verilir.

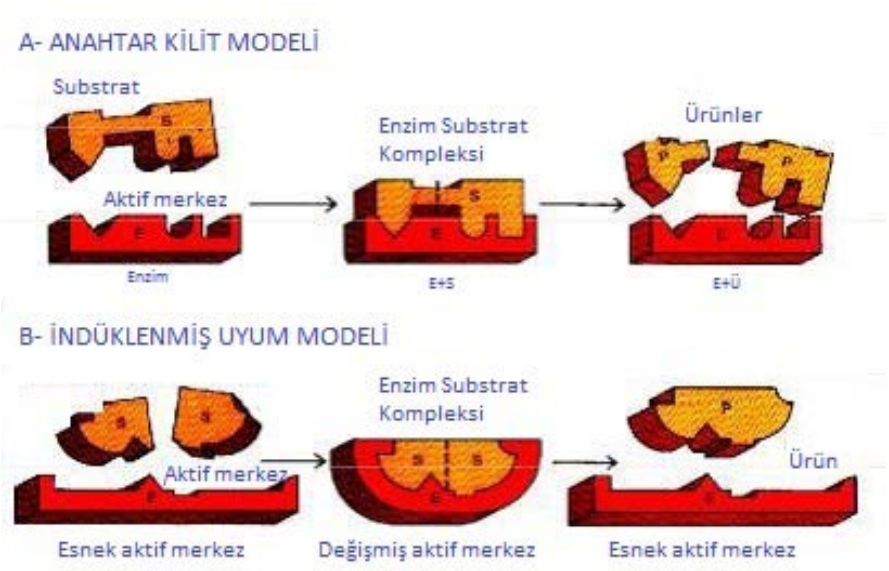



**Şekil 3.1.** Bir aktif enzimin yapısı

Enzim ile substrat bağlanmasında iki model ileri sürülmektedir.

**1. Anahtar-kilit modeli:** Enzimler hangi tepkimeyi katalizledikleri ve bu tepkimeye hangi substratın girdiğine çok büyük bir özgüllük gösterirler. 1894 yılında Emil Fischer bunun nedeninin, enzim ve substratının birbirine tam uyan tamamlayıcı geometrik şekilleri olmasından dolayı olduğunu öne sürmüştür. Bunun nedeninin, enzim ve substratının birbirine tam uyan tamamlayıcı geometrik şekilleri olmasından dolayı olduğu öne sürülmüştür. Bu model enzim özgüllüğünü açıklasa da geçiş halinin enzim tarafından stabilizasyonunu açıklamakta yetersiz kalmaktadır.

**2. İndüklenmiş Uyum Modeli:** 1958 yılında Daniel Koshland tarafından ileri sürülen indüklenmiş-uyum modelinde ise enzim substratı olmadığında serbest halde bulunur ve enzimler göreli olarak esnek yapıdadır. Buna göre substrat varlığında enzimin aktif merkezinin şekli substrat tarafından sürekli olarak değiştirilmektedir. Yani substrat sadece hareketsiz bir aktif merkeze bağlanmıyor. Aktif merkezi oluşturan aminoasit yan zincirleri biçim alarak enzimin katalitik işlevini yerine getirmesini sağlıyorlar. Bazı durumlarda örneğin glikoz oksidazlarda substrat molekül de aktif merkezin şeklini biraz değiştirir (Vasella, 2002). Substrat tamamen bağlanana kadar aktif merkez şeklini değiştirir, o noktada en son şekil ve yükü belirlenmiş olur. Enzimin bağlandığı substrat parçalandığında ve reaksiyon tamamlandığında enzim değişmeden ayrılır. Ve bundan dolayı enzimler tekrar tekrar kullanılabilmektedir. Enzimler genellikle çift yönlü çalışır yani geri dönüşümlüdür.




**Şekil 3.2.** Enzim-Substrat birleşme modelleri

### 3.2. Enzimlerin Sınıflandırılması

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliğine (IUBMB) göre; enzim adlandırmaları, enzimin etkilediği tepkimenin türüne ve mekanizmasına göre yapılmaktadır. Tepkimeler ve bu tepkimeleri katalize eden enzimler 6 ana gruba ayrılmıştır.

**1. Oksidoredüktazlar:** Bu tür enzimler iki substrat arasındaki yükseltgenme, indirgenme reaksiyonlarını kataliz ederler.

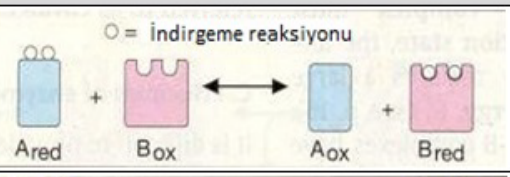
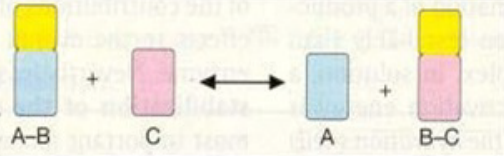
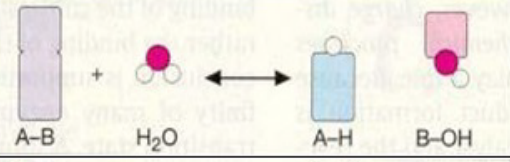
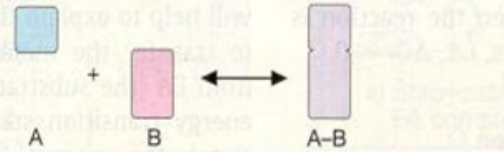
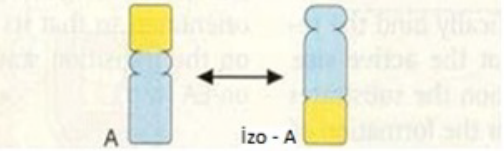
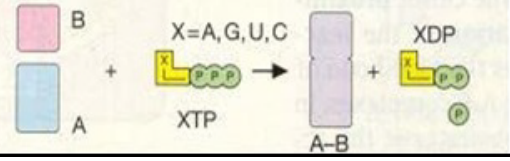
**2. Transferazlar:** Bu sınıfa giren enzimler bir atom grubunun veya molekülün diğer moleküle aktarılmasını sağlarlar.

**3. Hidrolazlar:** Genel olarak bu tür enzimler ester, eter, peptit, C−C, P−N bağlarının hidrolizini kataliz ederler.

**4. Liazlar:** 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'deki ya da ona benzer yapıdaki bileşiklerde bulunan pirofosfat bağının parçalanmasına bağlı olarak meydana gelen enerji ile iki molekülün birbirine bağlanmasını kataliz ederler.

| Sınıf | Reaksiyon Tipi | Önemli Altsınıflar |
|---|---|---|
| 1. Oksiredüktazlar |  | Dehidrojenazlar<br>Oksidazlar, Peroksidazlar<br>Redüktazlar<br>Monooksijenazlar<br>Dioksijenazlar |
| 2. Transferazlar |  | C - Transferazlar<br>Glikosiltransferazlar<br>Aminotransferazlar<br>Fosfotransferazlar |
| 3. Hidrolazlar |  | Esterazlar<br>Glikosidazlar<br>Peptidazlar<br>Amidazlar |
| 4. Liazlar |  | C - C - Liazlar<br>C - O - Liazlar<br>C - N - Liazlar<br>C - S - Liazlar |
| 5. İzomerazlar |  | Epimerazlar<br>Cis - Trans - İzomerazlar<br>Moleküliçi Transferazlar |
| 6. Ligazlar |  | C - C - Ligazlar<br>C - O - Ligazlar<br>C - N - Ligazlar<br>C - S - Ligazlar |

**Şekil 3.3.** Enzimlerin sınıflandırılması

Her enzim için kullanılışlı ve kısa bir isim, enzimin katalize ettiği reaksiyonu belirleyen bir sistemik isim ve enzimin durumunu ortaya koymak için bir sınıflandırma numarası verilmiştir. Enzimlerin sınıflandırılmalarında dört diziden oluşan sayılar kullanılmaktadır. Dizide yer alan birinci sayı, enzimin hangi sınıfa mensup olduğunu göstermektedir. İkinci ve üçüncü sayılar alt ve daha alt sınıflarını açıklamaktadır. Dördüncü sayı üçüncü sayı ile ifade edilen alt sınıftaki seri numarasını belirtmektedir. Bunu bir örnekle açıklamak gerekirse, örneğin sınıflandırma numarası 1.1.1.1. olan enzim, yani "Alkol dehidrogenaz" ele alındığında, bu numara dizisinde ilk sıradaki 1 sayısı enzimin oksidoredüktaz grubuna dahil olduğunu, ikinci dizideki 1 sayısı, verici (donör) maddenin CH-OH grubu üzerine etki yaptığını, üçüncü 1 sayısı, akseptör olarak

NAD ve NADP'den yararlandığını, dördüncü 1 sayısı ise doğrudan doğruya enzimin sistemik adı olan "Alkol: NAD oksiredüktaz"ı açıklamaktadır. Bu enzimin öteden beri kullanılan adı ise doğrudan doğruya "Alkol dehidrogenaz"dır (Bingöl, 1977).

### 3.3. Enzim Kinetiği

Enzimler, reaksiyona giren substratlar ile kompleksler oluşturur ve oluşan bu kompleksler üzerinden ürünler oluşmaktadır. Ortamın sıcaklığı, pH'ı, iyon şiddeti, hidrolik basıncı, inhibitör ya da aktivatörlerin varlığı gibi durumlar enzim reaksiyonlarının hızını ve kinetiğini büyük ölçüde etkilemektedir. Enzim kinetiğinde en çok kullanılan eşitlik, 1913 yılında Leonor Michaelis ve Maud Menten tarafından geliştirilmiştir.

Enzim ile substrat arasındaki reaksiyon sonucu ürün oluşmadan önce enzim ile substrat arasında bir enzim-substrat kompleksi oluştuğu ve sonra bu kompleksin ürün ile enzime ayrıştığı kabul edilmektedir (Pekin, 1979).

$$\text{enzim(E)} + \text{substrat(S)} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \text{ES} \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} \text{ürün(Ü)} + \text{enzim(E)}$$

Fakat 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. Bu haliyle mekanizmanın reaksiyon hızı,

$$v = k_2[\text{ES}] \tag{3.1}$$

şeklinde gösterilir.

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

$$\frac{d[\text{ES}]}{dt} = k_1[\text{E}][\text{S}] - k_{-1}[\text{ES}] - k_2[\text{ES}] \tag{3.2}$$

Herhangi bir *t* anındaki serbest enzim konsantrasyonu ile o andaki enzim substrat kompleksinin konsantrasyonunun toplamı; başlangıçta reaksiyon sistemine konulmuş olan enzim konsantrasyonuna, $[E]_0$, değerine eşit olmasından dolayı, her üç konsantrasyon arasında

$$[E] + [ES] = [E]_0 \tag{3.3}$$

eşitliği yazılır. Bu eşitlikte herhangi bir *t* anındaki serbest enzim konsantrasyonu aşağıdaki bağıntı ile bulunabilir.

$$[E] = [E]_0 - [ES] \tag{3.4}$$

[E], enzim konsantrasyonu için bulunan bağıntı eşitlik (3.2)'de yerine yazılırsa aşağıdaki bağıntı elde edilmektedir.

$$k_1\{[E]_0 - [ES]\}[S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0 \tag{3.5}$$

Bu eşitlik düzenlendiğinde aşağıda verilen eşitlik (3.6) elde edilmektedir.

$$[ES] = \frac{k_1[E]_0[S]}{k_{-1} + k_2 + k_1[S]} \tag{3.6}$$

Eşitlik (3.1) ve eşitlik (3.6) kullanılarak enzimatik bir reaksiyonun hız bağıntısı aşağıdaki şekilde ifade edilebilir.

$$v = k_2 \frac{k_1[E]_0[S]}{k_{-1} + k_2 + k_1[S]} \tag{3.7}$$

(3.7) eşitliğinin sağ tarafında pay ve payda $k_1$ ile bölünürse,

$$v = k_2 \frac{k_1[E]_0[S]}{k_{-1} + k_2 + k_1[S]} \tag{3.8}$$

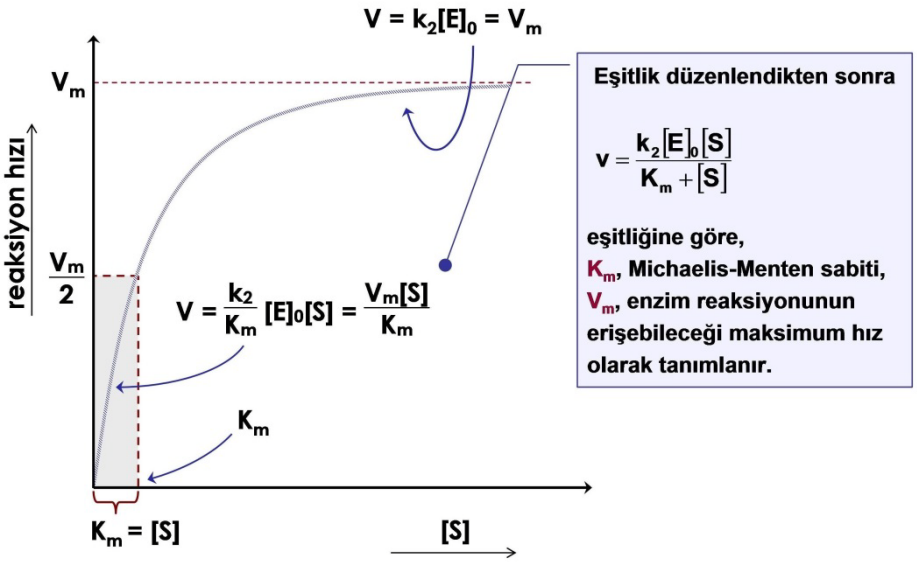
eşitliği elde edilmektedir.

$$\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_m \qquad (3.9)$$

Eşitlik (3.9) göz önüne alınırsa reaksiyon hızı için eşitlik aşağıdaki gibi olmaktadır.

$$v = \frac{k_2[\mathrm{E}]_0[\mathrm{S}]}{K_m + [\mathrm{S}]} \qquad (3.10)$$

Bu eşitlikteki $K_m$ sabitine Michaelis-Menten sabiti adı verilmektedir. Eşitlik (3.10)'a göre reaksiyon hızı, $v$ ile substrat konsantrasyonu, [S], arasında bir grafik çizildiğinde Şekil 3.4'te görüldüğü gibi bir eğri elde edilmektedir (Pekin, 1979).




**Şekil 3.4.** Reaksiyon hızı-substrat konsantrasyonu grafiği

Grafikten de görüldüğü gibi belirli bir substrat konsantrasyonundan sonra reaksiyon hızı sınır bir değere ulaşmakta ve daha sonra sabit kalmaktadır. $V_m$ ile gösterilen bu sınır değer enzim reaksiyonunun erişebileceği maksimum hızdır. $V_m$ değeri substrat konsantrasyonuna bağımlı değildir. Bu sonuçla maksimum hız olarak adlandırılan $V_m$ değeri ancak başlangıçta alınan enzim konsantrasyonu ile değişmektedir. Substrat konsantrasyonunun çok yüksek olduğu sınır bölgelerde

$$v = k_2[E]_0 = V_m \tag{3.11}$$

eşitliği geçerli olmaktadır. Bu eşitlik, sınır hızın geçerli olduğu konsantrasyon bölgelerinde reaksiyonun substrata göre sıfırıncı mertebeden olduğunu göstermektedir. Grafikten de görüleceği gibi bu bölgede reaksiyon hızı, substrat konsantrasyonu ile değişmemektedir. $V_m$, sınır hızı grafikten hesaplanabilir ve reaksiyon sistemine katılan $[E]_0$, enzim konsantrasyonunun bilinmesiyle $k_2$, hız sabiti

$$k_2 = \frac{V_m}{[E]_0} \tag{3.12}$$

şeklinde hesaplanmaktadır. Şekil 3.5'teki eğrinin sınır hıza kadar olan kısmında hız ile substrat konsantrasyonu arasında

$$v = \frac{k_2}{K_m}[E][S] \tag{3.13}$$

eşitliği geçerli olmaktadır. Bu bağıntı eşitlik (3.11) göz önüne alınarak yazılırsa, reaksiyon hızı için yeni bir eşitlik elde edilmektedir.

$$v = \frac{V_m}{K_m}[S] \tag{3.14}$$

Substrat konsantrasyonlarının büyük olduğu bu bölgelerde reaksiyon birinci mertebedendir. Substrat konsantrasyonunun $K_m$ sabitine eşit olduğu durumda,

$$[S] = K_m \tag{3.15}$$

eşitlik aşağıdaki gibi olmaktadır.

$$v = \frac{k_2[E]_0[S]}{2[S]} \tag{3.16.a}$$

Buradan da eşitlik,

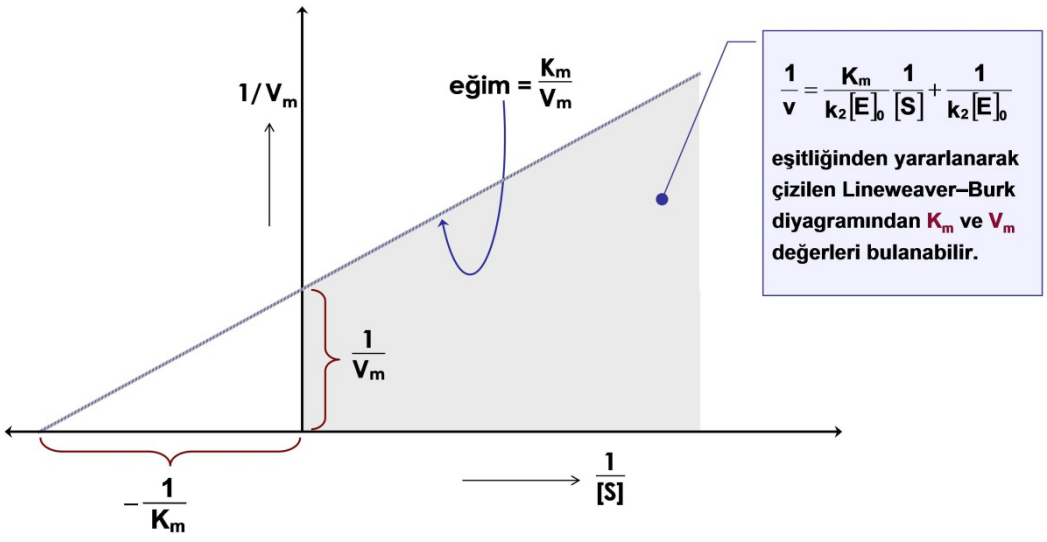
$$v = \frac{k_2[E]_0}{2} \tag{3.16.b}$$

ya da

$$v = \frac{V_m}{2} \tag{3.16.c}$$

olarak yazılabilir. Eşitlik (3.16.c)'de sınır hızın yarısına eşit olan değer, Şekil 3.4'te ki grafiğin ordinatı üzerinde işaretlenerek apsise paralel bir doğru çizildiğinde, bu doğrunun eğriyi kestiği noktanın apsisi Michaelis-Menten sabitine, $K_m$, değerine eşit olmaktadır. Substrat konsantrasyonunun daha düşük olduğu durumlarda reaksiyon hızı substrat konsantrasyonu ile doğrusal olarak değişmektedir. Bu değişimin olduğu bölgede enzim reaksiyonunun hızı ölçülerek grafikten substrat konsantrasyonu bulunmaktadır. Şekil 3.4'te ki grafikten $V_m$ sınır hızları, $K_m$ sabitleri ve substrat konsantrasyonları bulunabilir.

Eşitlik (3.10)'un aşağıdaki gibi düzenlenerek grafik çizimi yapılırsa Şekil 3.5'teki gibi bir doğru elde edilir. Bu doğrunun eğiminden ve doğrunun ordinatı kestiği noktadan Michaelis-Menten sabitleri bulunabilir.



**Şekil 3.5.** Lineweaver – Burk diyagramı

Eşitlik (3.10) yeniden düzenlendiğinde,

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{k_2[\mathrm{E}]_0}\frac{1}{[\mathrm{S}]} + \frac{1}{k_2[\mathrm{E}]_0} \tag{3.17}$$

ya da

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m}\frac{1}{[\mathrm{S}]} + \frac{1}{V_m} \tag{3.18}$$

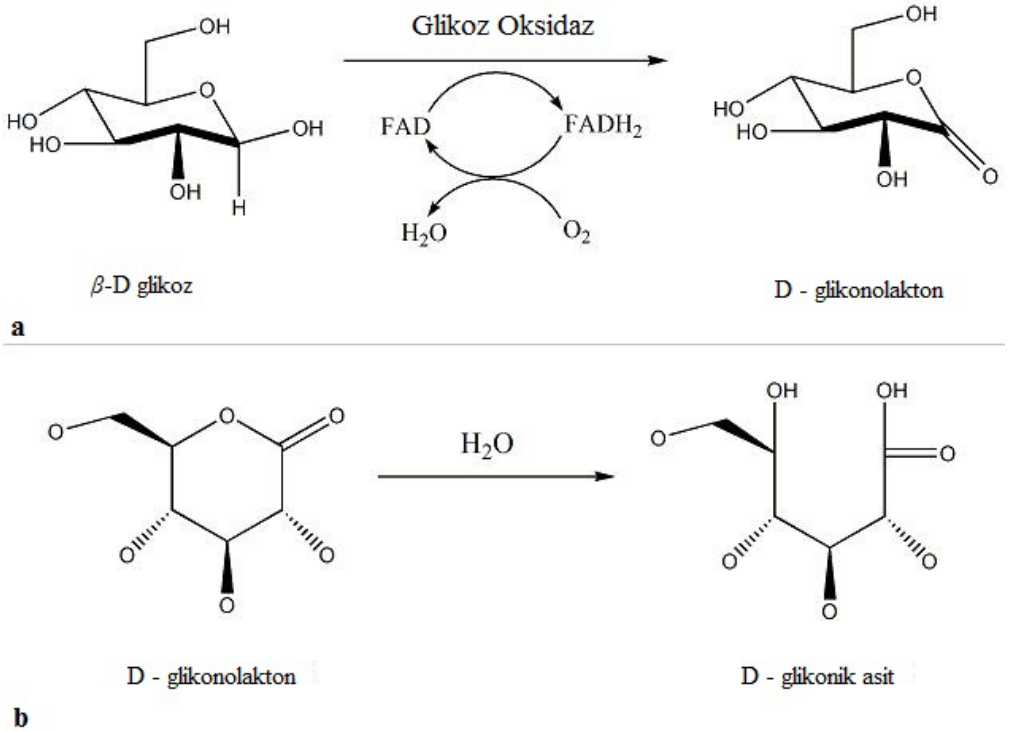
eşitlikleri elde edilmektedir.

Bu eşitliklere göre $1/v$ ile $1/[\mathrm{S}]$ 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).

## 4. GLİKOZ OKSİDAZ ENZİMİ

Glikoz oksidaz (Gox) enzimi, yapısında disülfit bağlarıyla birbirine kovalent bağlı iki benzer polipeptit zinciri içeren bir glikoprotein olup oksidoredüktaz sınıfı bir enzimdir. Bu enzim *Aspergillus, Pénicillium, Talaromyces flavus* ve *Phanerochaete* türlerinden elde edilmektedir. *Aspergillus, Pénicillium, Talaromyces flavus*'dan elde edilen glikoz oksidazlar 147-180 kDa'luk moleküler ağırlıklara sahip ve optimum pH'ları 4,5-6,5 civarındadır. Katalizledikleri reaksiyonlar aynı olsa da farklı kaynaklardan elde edilen enzimler farklı kimyasal özellikler gösterir. Elde edilen tüm bu glikoz oksidazlar substrat olarak glikoza oldukça spesifiktir.

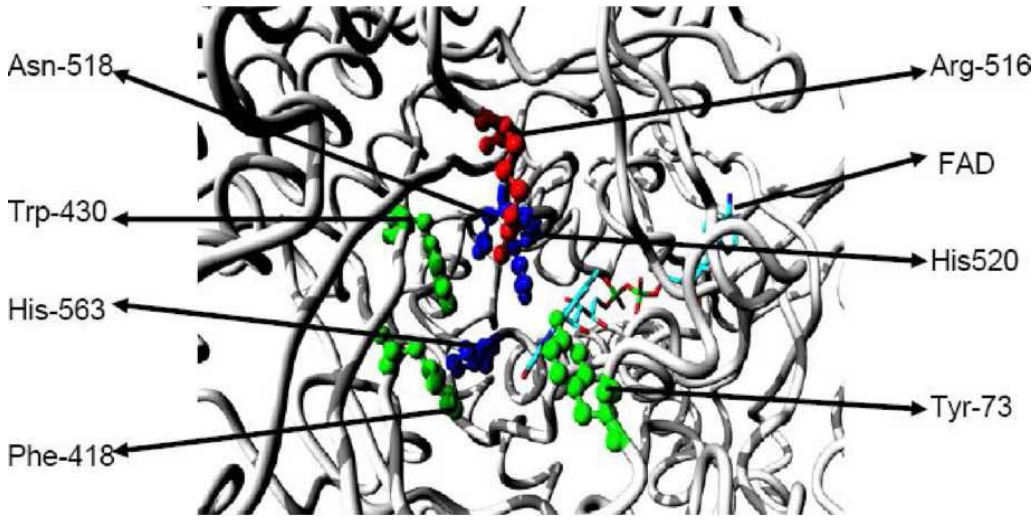
Glikoz oksidaz (Gox) (EC 1.1.3.4 *β*-D-glikoz: oksijen oksidoredüktaz) glikozun moleküler oksijen ile yükseltgenip glikono-δ-lakton (glikono-1,5-lakton) ve hidrojen peroksit ($H_2O_2$) oluşturduğu reaksiyonu katalizler. Aynı zamanda laktonun sulu ortamda katalizlenmesinden lakton glikonik asit oluştururken hidrojen peroksitin katalizlenmesinden su ve oksijen oluşur. Ancak hidrojen peroksitin ve glikonik asitin ortamda fazla birikmesi enzim aktivitesini düşürür. Glikozun glikonik asit ve hidrojen peroksite oksidasyonu eş zamanlı gerçekleşir ve bu reaksiyon mekanizması Şekil 4.1'de verilmiştir (Wolhfart, 2005).



**Şekil 4.1.** Glikozdan glikonik asitin oluşmasının enzimatik mekanizması, **(a)** *β*-D-glikozdan D-glikonolakton oluşumu **(b)** D-glikonolaktonun su varlığında glikonik asite hidrolizi (Wolhfart, 2005)

Gox aktivitesi ilk defa 1904 yılında N. A. Maksimow tarafından *Aspergillus niger*'de saptanmıştır. Enzimin oksidatif etkisi olduğunu belirleyen D. Müller (1928), saflaştırılan enzimin sahip olduğu sarı rengin, bünyesindeki prostetik gruptan (flavin adenin dinükleotit, FAD) kaynaklandığını öne sürmüştür. Glikoz oksidazın bir katalizör olarak işlev görebilmesi için flavin adenin dinükleotit (FAD) koenzimine ihtiyacı vardır. Glikoz oksidaz tarafından katalizlenen indirgeme reaksiyonlarında FAD elektron alıcısı olarak görev alır ve $FADH_2$'ye indirgenir. Daha sonra $FADH_2$ moleküler oksijen tarafından tekrar FAD'a yükseltgenir ve oksijen de hidrojen peroksite indirgenir. D. Keilin ve E. F. Hartree (1948) oksidasyonun FAD tarafından gerçekleştirildiğini; enzimin açığa çıkardığı $H_2O_2$ ile antimikrobiyal aktivite gösterip antibiyotik olarak davrandığını belirlemişlerdir. Enzim ticari olarak ilk kez 1952 yılında üretilmeye başlanmıştır. Önceleri enzim kaynağı olarak *Penicullum notatum* ve *Pencillum glaucum* kullanılmış olup, günümüzde *Aspergillus niger* veya *Pencullum amagasakienese* kullanılmaktadır (Özyılmaz, 2005). *Aspergillus niger* çevrede sık rastlanan ve insanda infeksiyona sebep olan flamentöz bir mantardır. *Aspergillus niger*'in salgıladığı enzimlerden dolayı bu mikroorganizma biyoteknoloji endüstrisinde önemli kullanım alanı bulmuştur.

Gox'ın aktif-bölgesinin Tyr-73, Phe-418, Trp-430, Arg-516, Asn-518, His-520 ve His-563 olduğu görülmüştür (Şekil 4.2).




**Şekil 4.2.** Gox'ın monomerindeki FAD ve aktif bölge artıkları protein yapısı

## 4.1. Gox Enziminin Genel Özellikleri

Katalizledikleri reaksiyonlar aynı olsa da, değişik kaynaklardan saflaştırılan Gox molekülleri farklı kimyasal özellikler gösterir. Örneğin *Aspergillus Niger* kaynaklı Gox birbirine disülfit köprüleri ile bağlı 2 eşdeğer alt üniteden meydana gelmiştir. *Aspergillus Niger* Gox'ın her alt ünitede 1 mol FAD içermektedir. Gox molekülünde yaklaşık olarak %74 protein, %16 nötral şeker ve %2 amino şekeri bulunmaktadır. Enzim yapısında bulunan karbonhidratın %80'ini mannoz oluşturmaktadır. Mannoz, enzimin protein kısmına Asn amino asit artığının R grubundaki amino azotu, Thr ve Ser amino asit artıklarının R gruplarındaki hidroksil oksijeni üzerinden glikozidik bağ ile bağlanmıştır. Ayrıca, enzimdeki FAD molekülü flavin-hipoksantin dinükleotit ile yer değiştirdiğinde Gox aktivitesinde bir değişim gözlenmemektedir. FAD molekülü ile apoprotein arasında kovalent bağ bulunmadığından enzim tamamen denatüre edilerek FAD molekülü enzimden uzaklaştırılabilir. Enzimin yapısında bulunan karbonhidrat tamamen uzaklaştırılsa bile aktivite göstermeye devam eder ancak, termal stabilitesi azalır. Gox $\beta$-D-glikoz için oldukça spesifik olup $\beta$-D-glikoz'u $\alpha$-D-glikoza göre 157 kez daha hızlı okside eder. Ayrıca enzim 2-deoksi-D-glikoz, D-mannoz ve D-galaktoz için çok düşük de olsa aktivite göstermektedir (Özyılmaz, 2005).

**Çizelge 4.1.** Gox enziminin genel özellikleri

| **Özellikler** | **Değerler** |
|---|---|
| Moleküler ağırlık | 130-180 kDa |
| Ekstinksiyon katsayısı | 25,180-28,200 (450 nm'de) |
| Spesifik aktivite (pH 5,6; 25-37ºC) | 80-172 µmol glikoz/dak/mg enzim |
| Sıcaklık aralığı | 0-40ºC |
| pH aralığı | 4,5-6,5 |
| İnhibitörleri | $Ag^{+}$, $Hg^{+}$ ve $Cu^{+2}$ iyonları, arsenik, p-klorormerküribenzoat, fenimerkürik asetat |
| İzoelektrik nokta (pI) | 4,2-4,4 |

Gox enziminin genel özellikleri şu şekilde sıralanabilir:

- Gox'ın moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 130 kDa ile 180 kDa arasında değişmektedir.
- Gox enzimi D-glikozun p-anomeri için oldukça spesifiktir; bu spesifikliğini a-anomeri için göstermez.
- Yapıda en çok mannoz ve heksozamin bulunmaktadır ve karbonhidrat içeriğinin %16 olduğu bilinmektedir.
- Aminoasit içeriği olarak da Gox'ın histidin, arginin, tirozin, daha az miktarda da lizin ve fenilalanin içerdiği görülmüştür.
- Optimum pH değeri ise 4,5-6,5 arasında değişmekte ve enzimin geniş bir pH aralığı bulunmaktadır.
- İzoelektrik noktası 4,2-4,4 civarındadır.

Genellikle katalaz (CAT) enzimi ile birlikte kullanılan Gox, bira, balık, konserve yiyeceklerde ve içeceklerde oksijenin uzaklaştırılmasıyla renk ve tadın sabitlenmesinde kullanılmaktadır.

Bunun dışında glikoz oksidaz enzimi, gıda endüstrisinde kullanılan yumurta tozunun üretilmesinde renk koruyucu olarak (esmerleşmeyi önlemede) kullanılmaktadır. Gox fırıncılık endüstrisinde çok kullanılan bir enzimdir. Süne (insektisit) zarar görmüş buğday unlarının gluten yapısı bozulur. Gluten yapısı bozulmuş düşük kaliteli buğday unları, ekmek yapımında kullanılamazlar. Gox oluşturduğu hidrojen peroksit sayesinde glutenin çapraz bağlarının onarımı ile buğday ununun kalitesini arttırmaktadır.

Ayrıca un sanayisinde kullanılan başlıca enzimlerden biridir. Hamurda ve ekmekte; hamur kuruluğu, elle veya makinayla işleme kolaylığı, ekmek şeklinin ve yüzeyinin düzgünlüğü ve ekmek hacminde artışı sağlamaktadır.

Oksijen birçok gıda için problem oluşturur. Örneğin yüksek yağ içeren gıdalardan mayonez ortamda oksijenin olması ile çok çabuk bozulur. Gox'ın varlığında oksijeni enzim kullanılır ve glikonik asit oluşturur (Wong, 2008).

Şarap üretiminde glikozun bir kısmı glikoz oksidazla D-glikono-1,5-lakton'a dönüştürülerek glikozun tamamen alkole dönüşümü engellenir. Böylece alkol içeriğini ayarlar ve bakterisit etkisiyle şarabın bozulmasını önleyerek şarabın özelliklerini iyileştirir.

Tüm bu kullanım alanlarının dışında Gox ürettiği glikonik asidin metal, deri ve yiyecek endüstrilerinde mayhoşlandırıcı olarak kullanılmasından ötürü oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır.

Glikoz oksidaz, yiyecek ve içecekler de raf ömrünü uzatmak için içlerinde bulunan artık glikoz ve oksijeni çıkarmakta kullanılır.

Diğer enzimlere oranla daha spesifik olmasından dolayı Gox, diagnostik reaktifi olarak da kullanılmaktadır. Bu enzimi analitik bir reaktif olarak kullanan glikoz/Gox sisteminin özellikle de biyosensörler için yöntem geliştirmede güvenilir bir model oluşturduğu bilinmektedir.

Gox enzimi, klinik kimya ve biyoteknolojideki kullanımları nedeni ile büyük bir ticari önem taşımaktadır. Gox enzimi glikozun glikonik asite ve hidrojen peroksite oksitlenmesini katalizlediğinden analitik bir reaktif olarak vücut sıvılarında (kan, üre vb.) hipoglisemi ve hiperglisemiye yol açabilecek glikoz derişimindeki değişimleri izlemek amacıyla geliştirilen glikoz biyosensörlerinde kullanılırlar. Özellikle diyabetli hastaların kan şekeri seviyesinin hızlı ve güvenilir bir şekilde ölçülmesi için glikoz biyosensörlerinden faydalanılır.

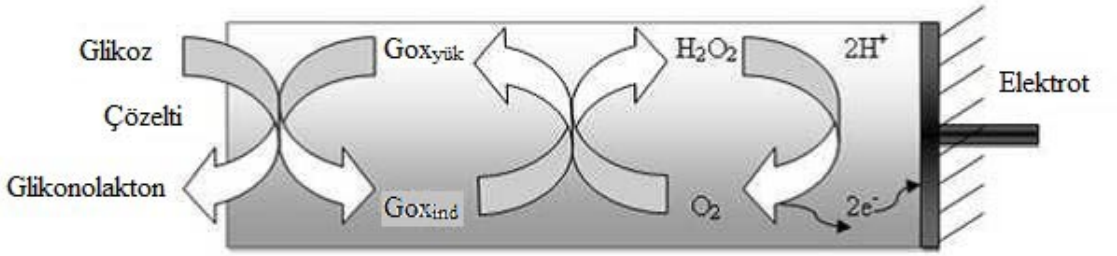
Glikoz, diyabet gibi bazı hastalıkların tanısının yanı sıra gıda endüstrisinde de tayini yapılan analitlerden biridir. Glikoz tayini, HPLC ve gaz-sıvı kromotografisi gibi cihazlarla yapılmasına rağmen glikoz biyosensörleri daha ucuz, hızlı ve kolay tayin imkânı sunmaktadır.

## 4.2. Glikoz Elektrodu

### 4.2.1. Glikoz oksidaz enzim elektrodu ile glikoz tayini

1967'de S. J. Uptike ve G. P. Hick tarafından rapor edilen glikoz tayinine yönelik glikoz oksidaz enzim elektrotları bu konudaki ilk örnekleri oluşturmaktadır. Biyosensör teknolojisindeki ilk örnekler özellikle amperometrik ve potansiyometrik temelli enzim elektrotları şeklinde ortaya çıkmışlardır (Dinçkaya, 1999).

Pek çok iletken polimer biyosensörü ile glikoz derişiminin belirlenmesi enzimatik reaksiyon sırasında tüketilen oksijenin indirgenme akımının veya açığa çıkan hidrojen peroksitin yükseltgenme akımının izlenmesiyle gerçekleştirilmektedir (Adeloju, 2001).




**Şekil 4.3.** Glikoz tayini için hazırlanan enzim elektrodun çalışma prensibi (Erdem, 2012)

Glikoz oksidazın immobilize edildiği film çözeltideki glikoz ile temas ettiğinde oksijen varlığında Gox enziminin etkisiyle glikonik asit ve $H_2O_2$ oluşmaktadır. Glikoz reaksiyonunda harcanan $O_2$ ve oluşan $H_2O_2$ derişimi glikoz derişimi ile orantılıdır. Bundan yararlanarak $O_2$ derişimindeki azalma veya $H_2O_2$ derişimindeki artmanın incelenmesi ile glikoz tayin edilebilir (Şekil 4.3).

## 5. REDOKS POLİMERLERİ

Polimer modifiye elektrotların hazırlanmasında temel olarak üç tür polimer kullanılır. Bunlar redoks polimerleri, elektronik olarak iletken polimerler ve iyon değişim polimerleridir (Gökdoğan, 2004).

Redoks polimeri, elektroaktif olan veya elektroaktif olmayan ana polimer zincirine kovalent veya elektrostatik olarak bağlı redoks aktif geçiş metalleri içeren, elektriksel iletkenliği yükseltgenme veya indirgenme özelliğine sahip gruplar arasında elektron atlaması yolu ile sağlayan polimerler olarak tanımlanmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, redoks polimerleri gibi elektroaktif polimerler ile hazırlanan elektrotlarda yüksek elektrokatalitik özelliğe sahip yeni polimerik materyallerin geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

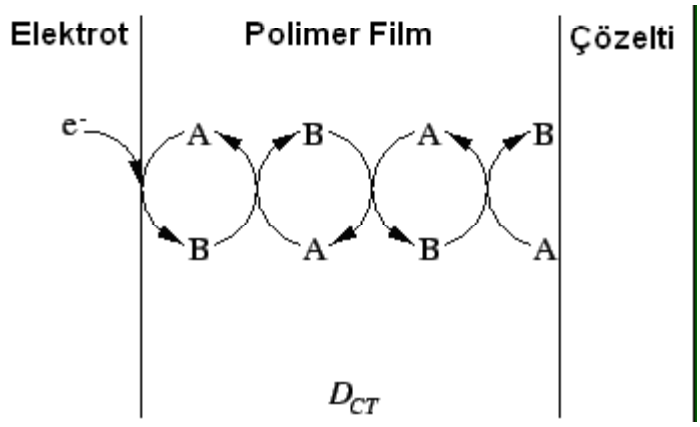
Polimerlerle modifiye edilmiş elektrot matrisine, elektrokatalitik özellikli geçiş metali türlerinin yerleştirilmesi, elektrot ile substrat arasında gerçekleşen elektron transferini kolaylaştırıcı bir aracı (mediator) görevi sağlamaktadır. Ayrıca, elektrokatalitik olarak desteklenen yeni polimerik materyallerde, elektrodun kimyasal, elektrokimyasal, optiksel ve immobilize molekül özelliklerinin istenilen yönde geliştirilmesi, uygulanan potansiyel ve akım yardımı ile reaksiyon hızını kontrol edilebilme, elektrokatalitik bölgelerin elektrota yakın olması, az bir materyal miktarı ile yüksek konsantrasyonlu aktif merkezler oluşturma, polimerdeki diğer katalitik bölgelerin yakınlığından kaynaklanan kümülatif etkisi, katalizörün substrat ortamından kolay ayrılabilmesi gibi özelliklerin geliştirilmesi hedeflemektedir (Baş, 2011).

Elektron transferi bakımından karşılaştırıldığında, iletken polimerlerden farklı olarak redoks polimerleri dar bir potansiyel aralığında iletkenlik göstermektedirler ve gösterdikleri bu iletkenlik, polimer filmde indirgenen ve yükseltgenen yapıların konsantrasyonları eşit olduğu durumda redoks merkezlerinin formal potansiyel değerlerinde maksimum olmaktadır. Polimerlerdeki redoks iletimi, Kaufman ve çalışma arkadaşları tarafından önerilen elektron transferinin ardışık redoks grupları arasında kendiliğinden gerçekleşen bir seri elektron atlama (hopping) işleminin ilerlemesi yoluyla sağlandığı öngörülmektedir. Kaufman ve çalışma arkadaşları, elektrot ile polimerin redoks bölgeleri arasındaki yük transferi hakkında yaptıkları öneriyi aşağıdaki eşitlik (5.1) ile ifade etmişlerdir.

$$R_{SE} = k_{ET}\, C_{yük}\, C_{ind} \qquad (5.1)$$

Bu eşitlikte, $C_{yük}$, yükseltgenmiş türlerin konsantrasyonunu, $C_{ind}$, indirgenmiş türlerin konsantrasyonunu, $R_{SE}$, kendiliğinden değişme hızını, ET, elektron transferini göstermektedir. Polimer filmde bütün redoks türünün konsantrasyonları $C_{yük} + C_{ind} = C_{toplam}$ şeklinde sabitlendiğinde kendiliğinden değişme hızı, indirgenen ve yükseltgenen türlerin konsantrasyonlarının birbirine eşit olduğu şartlarda ($C_{yük} = C_{ind}$) maksimum olmaktadır ve bundan dolayı maksimum iletkenliğe $E°$ değerinde ulaşılmaktadır (Kaufman, 1979; Kaufman, 1980).

İletkenliğe sebep olan ve film tabakası boyunca gerçekleşen kendiliğinden değişim serisi Şekil 5.1'de verilmiştir.




**Şekil 5.1.** Bir redoks polimer filmi boyunca yarı difüzyon kontrollü yük transferi aracılığı ile yük yayılması ($D_{CT}$: difüzyonla yük transferi) (Kavanoz, 2004)

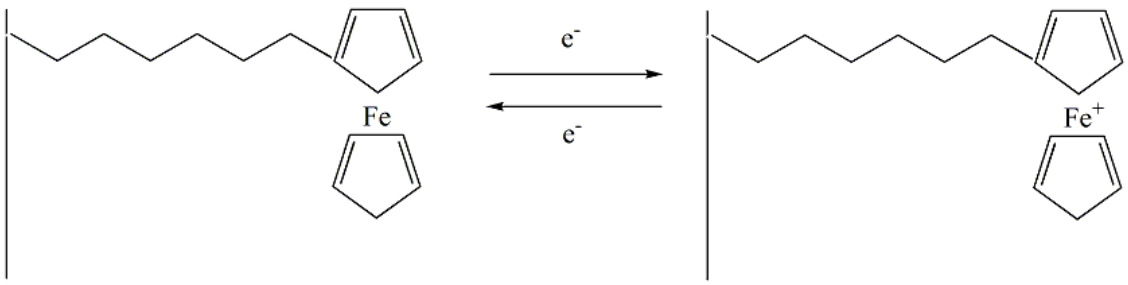
Şekil 5.1'de gösterilen yük transferinde iletkenliği sağlayan iki temel olay vardır. Redoks bölgesinin 1 nm gibi oldukça yakınında gerçekleşen elektrot polimer ara yüzeyine yapılan yük transferidir. İkinci olay ise yüzeyler arasındaki derişim farkı tarafından yönlendirilen ve difüzyon kontrollü davranış ile belirlenen film tabakalarına yükün dağılmasıdır.

Redoks polimerler kullanılarak mikroelektrokimyasal diyotlar, transistörler, sensörler ve biyosensörler gibi etkin elektrokatalitik özelliklere sahip malzemelerin geliştirilmesi günümüzde en çok yapılan çalışmalar arasında yer almaktadır (Silva, 1989; Sasaki, 1973). Bu polimerlerden bir tanesi de elektroaktif bir polimer olan polivinilferrosen (PVF) polimeridir.

Platin elektrot üzerine anodik elektrolizle biriktirilmiş PVF filmlerinin kararlı, hızlı ve tersinir redoks davranışları gösterdiği Bard grubu tarafından belirlenmiştir. Ferrosen ve ferrosenyum içeren kısmen yükseltgenmiş polimer filmi sabit ve tekrarlanabilir gerilim göstermişlerdir (Peerce ve Bard., 1980). Polivinilferrosen, tersinir elektron prosesinin sağladığı avantajı, yüksek kararlılığı, çeşitli metotlar kullanılarak ince filmler hazırlayabilme kolaylığı ile iletken polimer sistemlerinde sıklıkla kullanılmaktadır (Yu, 2005). Polivinilferrosen polimeri, elektroanalizde (Gülce, 1995), elektrokatalizde (Gülce, 1994a; Gülce, 1994b), elektrokimyasal diyot olarak (Wang, 1991), referans elektrot olarak (Kannuck, 1987), biyosensör hazırlanmasında (Dong, 1991; Nguyen, 1993; Gülce, 1995a; Gülce, 1995b; Gülce, 2002a; Gülce, 2002b; Gülce, 2002c; Gülce, 2003; Gülce, 2005; Şen, 2004; Kuralay, 2005; Kuralay, 2006; Sulak, 2006; Baş, 2011), ikincil piller (Kawai, 1989), gibi çeşitli uygulama alanlarında kullanılmaktadır.

Ferrosen tersinir bir elektron aktarımıyla, kolaylıkla ferrosenyum katyonuna yükseltgenebilen fonksiyonel bir moleküldür. Vinilferrosenin, ferrosen içeren doymamış bileşiklerden radikal homo ve kopolimerizasyonuyla, polimerleştiği bulunmuştur (Aso, 1969).

Elektronik olarak iletken polimerlerin aksine redoks polimerleri karakteristik olarak dar bir potansiyel aralığında iletkenlik gösterirler. Polivinilferrosen polimerinde elektriksel iletkenlik, polimerin yapısındaki yükseltgenmiş ve indirgenmiş gruplar arasında elektron atlaması (hopping) yoluyla sağlanmaktadır (Şekil 5.2). PVF ile kaplanan elektrotlarda yüzeye bağlanmış ferrosen, tersinir bir elektron aktarımıyla kolaylıkla ferrosenyum katyonuna yükseltgenebilen fonksiyonel bir moleküldür. Böylece ferrosen grubundaki Fe merkezi tersinir olarak yükseltgenip-indirgenmekte ve böylece yük ferrosen grupları arasında elektron atlama yoluyla polimer zinciri boyunca taşınmaktadır (Aso, 1969; Umana, 1980; Gülce, 1993; Kavanoz, 2009).



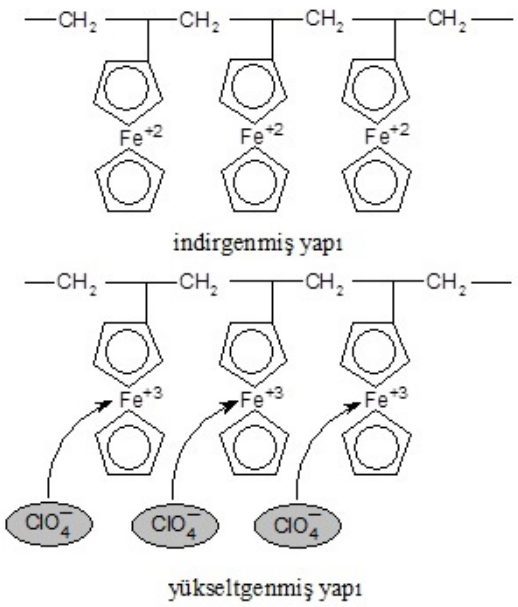
**Şekil 5.2.** Ferrosen polimerinin yükseltgenme- indirgenme tepkimesi (Umana, 1980)

Metilen klorürdeki polivinilferrosen (PVF) çözeltisi ile elektrot yüzeyinin kaplanması, farklı iki metot kullanılarak gerçekleştirilir.

- Elektrot yüzeyine elektrokimyasal çöktürme
- Daldırıp kurutma, damlatma-buharlaştırma ya da damlatma-döndürerek buharlaştırma yöntemleri kullanılabilir.

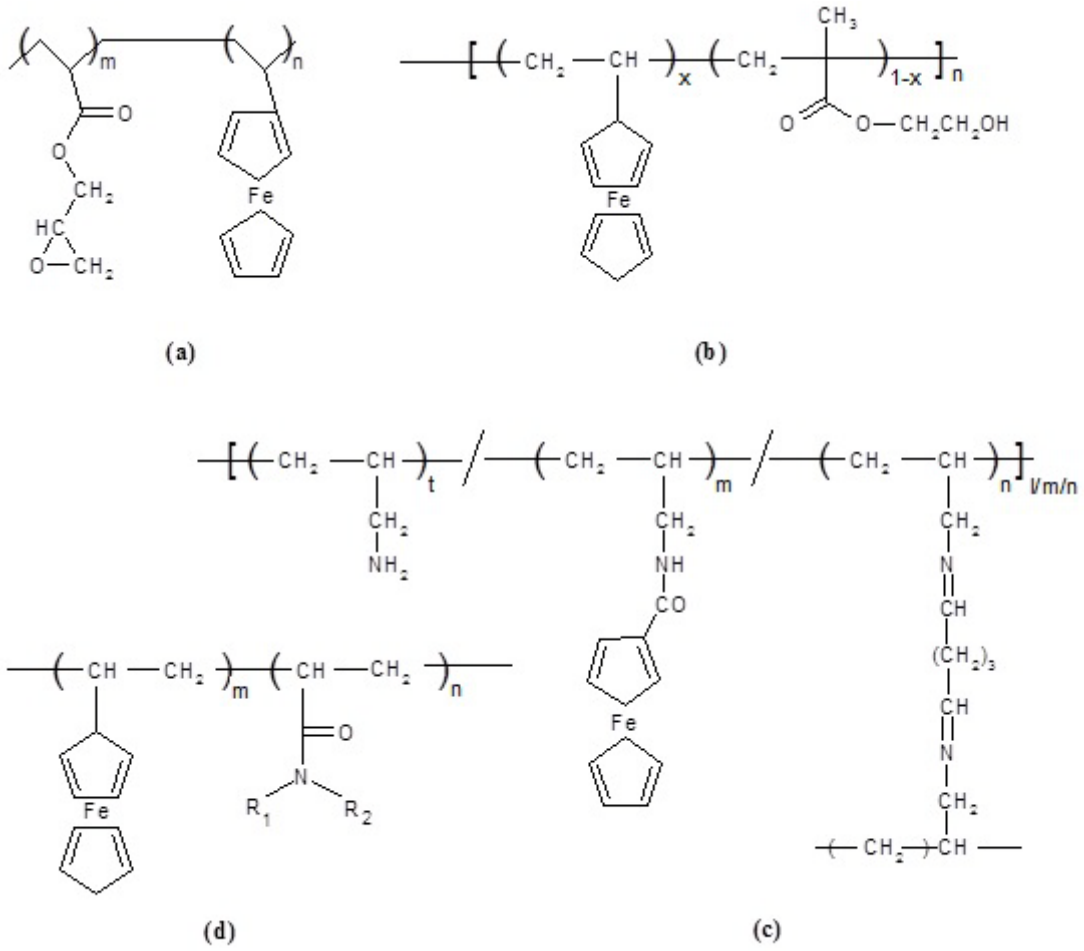
Elektrokimyasal çöktürme yönteminde polimer çözeltisine daldırılan elektrota uygun bir gerilim uygulanarak yapılan elektrolizle polimerin yükseltgenmiş formu elektrot yüzeyinde biriktirilir. Daldırıp-kurutma yönteminde elektrot polimer çözeltisinde bir süre bekletildikten sonra kurutulur (dip-coating), damlatma-buharlaştırma yönteminde PVF çözeltisinin çok küçük hacimlerde elektrot yüzeyine damlatılarak çözücünün buharlaşması (droplet evaporation) sağlanır. Damlatma-döndürerek buharlaştırma yönteminde ise elektrot yüzeyine PVF çözeltisi damlatılarak elektrodun döndürülmesi (spin coating) yoluyla çözücü buharlaştırılır (Umana, 1980; Gülce, 1993).

Yapmış olduğumuz bu çalışmada öncelikle PVF polimerinin elektrokimyasal olarak kaplanması gerçekleştirilmiştir. Elektrokimyasal olarak kaplanan PVF film tabakası, metilen klorürde çözünmüş PVF'nin sabit gerilimdeki anodik elektrolizi ile hazırlanmıştır. Elektrot yüzeyine biriktirilen polimerin Şekil 5.3'te görüldüğü gibi $ClO_4^-$ karşıt anyonu ile ferrosen ve ferrosenyum gruplarını içeren kısmen yükseltgenmiş bir yapıda olduğu ileri sürülmüştür (Gökdoğan, 2004).




**Şekil 5.3.** Polivinilferrosenin indirgenmiş ve yükseltgenmiş yapıları

Polivinilferrosenin yalnız olarak kullanılmasının yanında ferrosenin hem direkt polimerleşmeye katılmasıyla oluşan kopolimerleri hem de polimer zincirine sonradan bağlanarak oluşan modifiye ferrosen polimerleri hazırlanmıştır. Bu polimerler ile elektrot üzerinde oluşturulan polimer filmlerine enzim immobilize edilerek amperometrik çalışmalarda kullanılmıştır. Şekil 5.4'te yapıları gösterilen, glisidil metakrilat ile vinilferrosenden hazırlanmış kopolimeri (a), 2-hidroksietilmetakrilat ile vinilferrosenden hazırlanmış kopolimeri (b), ferrosen içeren çapraz bağlı polialilamin modifiye polimerini (c), N-izosiklopropil akrilamit ve N-izopropil akrilamit kullanılarak vinilferrosen ile hazırlanan kopolimerler (d) gösterilmektedir (Saito, 1998; Kuramoto, 1998; Koide, 1999; Şenel, 2010).




**Şekil 5.4.** Bazı redoks polimerleri **(a)** GMA-co-VFc, **(b)** VFc-HEMA, **(c)** modifiye polialilamin, **(d)** Poly(NAAM-co-VFc)

## 6. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 6.1. Gox Enzimi Biyosensörleri ile İlgili Kaynak Araştırması

Sung ve Bae'nin yaptıkları çalışmada yeni bir glikoz enzim elektrodunu pirol ile birlikte polianyon, polietilen glikol elektrokimyasal polimerizasyon yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. Platin elektrot yüzeyinde polipirol matrisi içine glikoz oksidazı immobilize edilmiştir. Daha sonra tutuklanan glikoz oksidaz, PEG (polietilen glikol) üzerinden polianyon ile birleştirilmiştir. PEG 1000, 2000, 3000, 4000 gibi dört farklı zincir uzunluğu denenerek, bunların enzim immobilizasyonu ve elektrot işlevi üzerindeki etkisini incelenmiştir. Enzim elektrodunun hazırlanmasında 800 mV potansiyel ve 225 mC/cm$^2$ film kalınlığı kullanılmıştır. Elektrot üzerindeki immobilize enzimin aktivitesi 119-209 mU/cm$^2$ arasında değiştiği gözlenmiştir. Biyoaktivite ise

daha uzun PEG'lerde arttığı gözlenmiştir. Amperometrik cevap 270 nA/mM $cm^2$ kadar değişen duyarlılık ile 20 mM glikoz derişimine kadar doğrusallık gözlenmiştir (Sung ve Bae, 2002).

Xian ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada Au nanopartikülleri ve polianilin (PANI) nanofiberleri birleştirilerek bir nanokompozit sentezlenmiştir. Hazırlanan Au-PANI nanokompoziti camsı karbon elektrot yüzeyine kaplanmıştır. Glutaraldehit ve sığır serum albümin (BSA) ile karıştırılan Gox enzimi Au/PANI/GC elektrodu yüzeyine damlatarak çapraz bağlanması sağlanmıştır ve hazırlanan enzim elektrot ile SCE'ye karşı +0,6 V potansiyelde glikoz tayini için kullanılmıştır (Xian, 2005).

Z. Gao ve çalışma arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, karbon elektrot üzerindeki alümina nanopartikül membran içinde glikoz oksidaz (Gox) ve bir difüze polimerik medyatör olan poli(vinilferrosenkoakrilamit) (PVFcAA)'nın ortak dağılımına dayanan bir glikoz biyosensörü tanımlanmıştır. Bu biyosensör kinetik olarak hızlı bir redoks çiftinin klasik özelliklerini göstermiştir. 200 mV/s'ye kadar tarama hızında, 25ºC'da medyatörün pikten pike ayrılma potansiyeli 59 mV bulunmuştur. Glikoz varlığında Ag/AgCl'e karşı altın levhada +0,3 V potansiyelde tipik katalitik yükseltgenme akımı gözlenmiştir. Optimum deney şartlarında +0,3 V potansiyelde, 5. saniyedeki pik akımı ve daha uzun test zamanlarında ölçülen akımlar 0,05-6,0 mg/mL glikoz derişim aralığında lineer bulunmuştur. Karbon elektrot üzerine minyatür bir kanal açarak ve bu kanalı kısmen nanopartikül duyarlı membran ile doldurarak, 0,20 mg'lık örnek kadar az bir örnekte, glikozun kusursuz bir şekilde tayinini yapılabilmiştir. Kan şekeri analizinde başarılı çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar ticari kan şekeri analizörü ile bulunan referans değerler ile uyumluluk gösterdiği görülmüştür (Gao, 2005).

Gülce ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada anaerobik çözelti ortamında glukoz tayini için Pt polivinilferrosenyum matrisine glikoz oksidaz immobilizasyonu ile amperometrik enzim elektrodu geliştirmiştir. Polimer film kalınlığı, biriktirilen enzim miktarı, aracının miktarı, glikoz konsantrasyonu, uygulanan potansiyel, ortam pH'ı gibi paremetrelerin enzim elektrodunun cevabına etkileri incelenmiştir. Cevap süresi 30-40 s, elektrolit çözeltisinin pH'ı 7,4, çalışma sıcaklığı 25ºC ve doğrusal cevabın 5,0 mM'a kadar glikoz konsantrasyonunda olduğu

bulunulmuştur. Girişim yapabilecek türlerin girişim sinyalleri ölçülmüştür (Gülce, 2005).

Chen ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada askorbik asit gibi safsızlıkların girişimlerini gidermek amacıyla polipirol film elektrot, polipirol-glikoz oksidaz elektrot, karşı elektrot, referans elektrot gibi dörtlü elektrot hücresi ile meydana gelen girişimsiz bir glikoz biyosensörü tasarlanmıştır. Glikoz oksidazın net katalitik akımı, glikoz oksidazsız iki çalışma elektrodunun cevap akımları farkından elde edilmiştir. Glikoz biyosensörünün analitik performansı üzerine pH'nın, sıcaklığın ve potansiyelin etkisini araştırılmıştır. Enzim ile katalizlenen reaksiyonun optimum pH'ını ve aktivasyon enerjisini sırasıyla 5,5 ve 25 kJ/mol olarak bulunmuştur. Biyosensör cevap akımlarının 0,005'ten 20 mmol/$dm^3$'e artan glikoz derişimleriyle lineer bir şekilde arttığı gözlenmiştir. Ayrıca, glikoz biyosensörü UV ve FTIR kullanılarak karakterize edilmiştir. Elde edilen girişimsiz polipirol glikoz biyosensöründe glikoz tayininin hassas bir şekilde yapılıp insan plazma örneklerine uygulamada ilerlenebileceği sonucuna ulaşılmıştır (Chen, 2006)

Gade ve arkadaşları yaptıkları çalışmada glikoz tayini için kolay hazırlanabilen ve homojen bir biokompoziti temel alan amperometrik bir enzim elektrodu hazırlamışlardır. Bu biokompoziti kitosan hidrojel, altın parçacıkları ve glikoz oksidazın direkt ve kolay elektrokimyasal tutuklanma metotlarından yararlanarak hazırlamışlardır. Enzim elektrodunun cevap süresini oldukça kısa bulmuşlardır. Glikoz için tayin sınırını 2,7 μM; 5,0 mM ile 2,4 mM arasında doğrusallık sergilediğini belirtmişlerdir (Gade, 2006).

### 6.2. PVF Polimeri ile İlgili Kaynak Araştırması

Gülce ve arkadaşlarının bir başka çalışmasında antrasen ve bunun bazı türevlerinin polivinilferrosenyum kaplı Pt elektrot yüzeyindeki elektrokimyasal indirgenme davranışları incelenmiş ve PVF kaplanmamış Pt yüzeyde asetonitril/0,1 M TBAP çözeltisinde dönüşümlü voltametri yöntemi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Filmde elektrot reaksiyonlarından sonra meydana gelen yapısal değişiklikler IR spektroskopi ve DSC ölçümleri ile takip edilmiştir. Antrasen türevlerinin katalitik indirgenmesi elektrot reaksiyonlarının kaplanmış yüzeyde yapılmasıyla meydana gelmiştir. Bu çalışma, $PVF^+ClO_4^-$ 'nin çözeltideki türlerin indirgenmesi için kimyasal

olarak modifiye edilmiş elektrot olarak kullanıldığında katalitik özelliklerinin ne kadar önemli olduğunu göstermiştir (Gülce, 1994-a).

Aynı grup tarafından polivinilferrosenyum kaplı Pt elektrodunda antrasen ve 9,10-difenil antrasenin elektrokimyasal yükseltgenme davranışı incelenmiş ve asetonitril/0,1 M TBAP çözeltisinde dönüşümlü voltametri kullanılarak kaplanmamış Pt yüzeydeki cevap karşılaştırılmıştır. Elektrot reaksiyonundan sonra film yapısında meydana gelen değişiklikler IR spektroskopisi ile tayin edilmiştir. Elektrot potansiyeli +1,5 ve 0,00 V arasında çalışıldığınıda kinon ve hidroksi substite tipi ürünlerinin oluşumunun açıklanabileceği gösterilmiştir. Antrasenin katalitik yükseltgenmesi, potansiyel döngüsünün +1,50 ve 2,30 V arasında tutulmasıyla elde edilmiştir. Bu çalışma ortamında $PVF^{+}$ merkezlerinin antrasenin indirgenmesini katalizlediği ortaya çıkmıştır (Gülce, 1994-b).

Gülce ve arkadaşları diğer bir çalışmalarında aerobik çözelti koşullarında basit, duyarlı, kararlı, düşük maliyetli ve hızlı cevap alınabilen bir glikoz sensörü tanımlamışlardır. Elektrodun akım cevabı hem voltametrik pik akımı değerleri hem de kararlı akım değerleri elde edilerek tayin edilmiştir. Bu çalışmada, aerobik koşullar altında glikoz tayini için glukoz oksidazın PVF redoks polimere immobilize edilerek kullanılabileceği ilk kez belirlenmiştir. Polimerik materyalin ferrosenyum merkezlerinin, enzimatik reaksiyon boyunca üretilen hidrojenperoksitin yükseltgenmesi için görünür bir aracı olduğu belirlenmiştir (Gülce, 1995-a).

Aynı çalışma grubu bir diğer çalışmasında, glukoz oksidaz ve invertazın polivinil ferrosenyum perklorat film içine birlikte immobilize edilmelerine dayanarak, basit, hassas, kararlı ve düşük maliyetli bir sukroz sensörü geliştirmiştir. İnvertaz, $\alpha$-glikoz ve $\beta$-fruktozun sukroza dönüşümünü katalizler. Sık kullanılan bir üçüncü enzim olan ve mutarasyon için kullanılan mutorazın kullanımını elimine eden ortam katalizörü olan fosfat iyonları $\alpha$-glukoz ve $\beta$-fruktoza dönüşümü sağlar. Glikoz oksidaz $H_2O_2$ üreterek glukonik asitin $\beta$-glikoza yükseltgenmesini katalizler. $O_2$'nin indirgenme akımına dayalı sükroz elektrotlarının aksine $H_2O_2$'nin yükseltgenmesine dayanan akımı $PVF^{+}$ merkezlerinin katalizlediğini ortaya çıkarmışlardır (Gülce, 1995-b).

Aynı grup tarafından yapılan bir diğer çalışmada $\beta$-galaktosidaz ve glikoz oksidazın redoks polimeri olan polyvinilferrosenyum perklorat ($PVF^{+}ClO_4^{-}$) içinde birlikte immobilize edilmesiyle laktoz tayini için bir enzim elektrot geliştirilmiştir. Elektrodun amperometrik cevabı enzimatik olarak üretilen $H_2O_2$'nin elektro

yükseltgenmesini sağlayan +0,7 V'da ölçülmüştür. Optimum pH=7,8 olarak belirlenmiştir. Substrat, tampon derişimi ve pH'nın elektrot cevabına etkisi incelenmiştir. Laktoz tayini için polarimerik, kromatografik, spektroskopik ve titrimetrik metotlar çok kullanılmaktadır. Bu yöntemler genellikle yorucu, zaman alıcı ve pahalıdır. Enzim immobilizasyon tekniklerinin elektrokimyasal sensörlerle kullanıldığında daha hızlı ve ucuz analiz metotları olarak çok daha kullanışlı olduğu belirlenmiştir (Gülce, 2002-a).

Polivinilferrosenyum perklorat kaplı Pt elektrot yüzeyine galaktoz oksidaz immobilize edilerek galaktoz tayini için, yeni bir enzim elektrodu geliştirilmiştir. Enzim elektrodunun amperometrik cevabı SCE'ye karşı +0,70 V'da ölçülmüştür. Enzim elektrot cevabı üzerine galaktoz derişimi ve sıcaklığın etkisi araştırılmıştır. Doğrusal çalışma aralığı 40,0 mM'a kadar ve cevap süresi 30-40 s olarak bulunmuştur (Gülce, 2002-b).

Gülce ve çalışma grubu bir diğer çalışmasında, alkol tayini için polivinilferrosenyum perklorat kaplı Pt elektrot yüzeyinde alkol oksidaz tutuklayarak, yeni bir enzim elektrodu geliştirmişlerdir. Enzimatik olarak üretilen $H_2O_2$'nin elektrokimyasal yükseltgenmesi sabit +0,7 V'da ölçülerek amperometrik cevap alınmıştır. Enzim elektroduna substrat tampon ve enzim derişimi, pH ve sıcaklığın etkisi araştırılmıştır. Çalışma sıcaklığı $30^oC$ ve optimum pH=8,0 olarak belirlenmiştir. Enzim elektrodunun duyarlılığı sırasıyla: metanol > etanol > n-butanol > benzil alkol şeklindedir. Lineer cevabın metanol için 3,7 mM, etanol için 3,0 mM, n-butanol için 6,2 mM, benzil alkol için 5,2 mM'a kadar olduğu belirlenmiştir. İmmobilize enzim sisteminde metanol için görünür Michaelis-Menten sabiti 5,78 mM ve aktivasyon enerjisi 38,07 kj/mol olarak bulunmuştur (Gülce, 2002-c).

Yıldız ve çalışma grubu organik peroksitler, t-bütilhidroperoksit, 2-bütanon peroksit, kümen hidroperoksit ve t-bütil perasetat ölçümü için amperometrik bir enzim elektrodu geliştirmişlerdir. Enzim elektrodu polivinilferrosenyum film içinde horseradish peroksidaz elektrostatik immobilizasyon ile hazırlanmıştır. PVF+ClO4-film Platin elektrot üzerine +0,7 V'ta 0,1 M TBAP'daki metilenklorid içindeki polivinilferrosenin elektroyükseltgenmesi ile kaplanmıştır. Modifiye enzim elektrodu pH=8,5 0,05 M fosfat tamponunda HRP'ın anyon değiştirmesi ile hazırlanmıştır. Film kalınlığı, immobilizasyon sırasındaki enzim konsantrasyonu, sıcaklık gibi

parametrelerin enzim elektrodunun performansı üzerine etkileri araştırılmıştır (Yıldız, 2002).

Gülce ve arkadaşları bir diğer çalışmalarında kolin tayini için yeni bir enzim elektrodu geliştirmişlerdir. Enzim elektrodu polivinilferrosenyum perklorat kaplı Pt yüzeyine kolin oksidaz tutuklanarak hazırlanmıştır. Kolin oksidaz, $H_2O_2$ üreterek kolinin betaine yükseltgenmesini katalizler. Polivinilferrosenyum merkezlerinin $H_2O_2$ yükseltgenmesini katalizlemesi ile akım ölçülmüştür. Kolin derişimi, çalışma sıcaklığı ve pH'ın enzim elektrodun cevabı üzerine etkileri çalışılmıştır. Cevap süresi 60-70 sn ve lineer çalışma aralığı 1,2 mM kolin derişimi olarak bulunmuştur. Ölçülebilir akımı üreten minimum substrat derişimi 4,10-6 mM olarak bulunmuştur. Hazırlanan bu enzim elektrot için Michaelis-Menten sabiti aktivasyon enerjisi sırasıyla 2,32 mM ve 38,91 kJ/mol olarak bulunmuştur (Gülce, 2003).

Şahin ve arkadaşları tarafından polivinilferrosen (PVF) ve platin üzerine PVF birikmesine dayalı lizin analizi için iki amperometrik biyosensör elde edilmiştir. Bu yöntem +0,7 V tetrabütilamonyum perklorat (TBAP) ihtiva eden metilen klorür içinde polivinilferrosen ile +0,15 V Ag/AgCI ve $PVF^+ClO_4^-$ yüzeyi üzerinde platin parçacıkların elektrot modifikasyonuna dayalıdır. Lizin oksidaz (LyOx) enzim modifiye elektrotlar içine iyon değişim işlemi ile immobilize edilmiştir. Enzimatik üretilen $H_2O_2$ oksidasyonunu ölçen $PVF^+LyOx^-$ ve $PVF^+LyOx^-$/Pt biosensor Ag/AgCl elektroduna verdiği cevap +0,6 V olarak okunmuştur. Böyle biyosensör için uygulanan potansiyel, pH, sıcaklık gibi deneysel koşullar etkisi incelenmiş ve biyosensörler analitik performans özellikleri belirlenmiştir. İki biyosensörler deneysel sonuçlar birbiri ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar $PVF^+LyOx^-$/Pt biyosensör aralığı 3,0 mM kadar doğrusal olurken $PVF^+LyOx^-$ biyosensör aralığı 1,3 kadar doğrusal olduğunu göstermiştir. $PVF^+LyOx^-$/Pt and $PVF^+LyOx^-$ biyosensörlerinin algılama sınırları sırasıyla ($6{,}5\times10^4$ ve $5{,}0\times10^4$ mM) olarak belirlenmiştir. Sensörlerin cevap süresi 30 saniyeden az bulunmuştur. Anti-parazit özelliği ve biyosensörler uzun vadeli istikrarlı çalışılmıştır. Geliştirilen biyosensörler, farmasötik örneklerde lizin belirlemek için kullanılmıştır (Şahin, 2013).

### 6.3. P*o*PD Polimeri ile İlgili Kaynak Araştırması

Castanon ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada P*o*PD, etanol için elektrokimyasal bir biyosensör elde etmek üzere, bir alkol dehidrojenaz-nikotinamid

adenin dinükleotid ile modifiye edilen elektrot yüzeyinde elektropolimerizasyonuyla elde edilmiştir. Enzimatik olarak üretilmiş NADH'ın iletken film ile verimli elektrokatalitik oksidasyonu, düşük uygulama potansiyelleri, etanol konsantrasyonuna bağlı olan bir akım sağlamıştır. Analitik performansı en iyi hale getirmek için çeşitli deneysel değişkenlerin etkisi araştırılmıştır. 3 x $10^{-8}$ – 3 x $10^{-6}$ M ve 20 sn'lik bir tepki süresi aralığında etanol için doğrusal tepkiler elde edilmiştir. Farklı alkollere yönelik duyarlılıktaki eğilim maya ADH'nin bilinen biyoözgüllüğü ile uyum içindedir. Etanol sensör tam anlamıyla doğruluk ve kesinlik ile sonuçlanan, çeşitli alkollü içecek analizine uygulandı (Castanon, 1997).

Garjonyte ve Malinauskas'ın yaptığı bir çalışmada glikoz için amperometrik bir biyosensörlerin geliştirilmesi elektropolimerizasyon metoduyla üretilen P*o*PD filmi üzerine Gox enziminin immobilizasyonu ile hazırlanmıştır. P*o*PD-Gox membran bazlı sensörler askorbik asit girişimine yönelik düşük bir hassasiyet göstermiştir. Platin elektrot ve P*o*PD-Gox kompozit tabaka arasına P*o*PD'nin ek bir tabakası yerleştirilerek askorbatın girişim etkisi engellenebilmiştir. Birkaç P*o*PD ve P*o*PD-Gox tabakaların kombinasyonuyla birlikte, 0,2-0,7 μA $mM^{-1}$ $cm^{-2}$ değerindeki hassasiyet, glikozun 8-14 mM konsantrasyonları içinde doğrusal yanıt aralığı, 4-8 saniye cevap süresi ve %95 oranında askorbat tutma özellikleri ile karakterize edilen glikoz biyosensörler hazırlanmıştır. Elde edilen PB/P*o*PD–Gox biyosensör, potansiyel olarak +0,4 V ile +0,6 V aralığında hem anodik bir şekilde, hem de +0,2 V ile -0,2 V aralığında Ag/AgCl ile birlikte katodik bir şekilde çalıştırılabilmiştir (Garjonyte, 1999).

Jing-Juan ve Hong-Yuan'ın yaptığı bir çalışmada bir platin mikrodisk elektrodun yüzeyine P*o*PD polimeri ile birlikte Gox enziminin immobilize edilmesiyle bir glikoz biyosensörü geliştirilmiş ve glikozun amperometrik tayini için başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Farklı monomer konsantrasyonları ve polimerizasyon potansiyelinde hazırlanan sensörlerin performansı ayrıntılı olarak araştırılmıştır. P*o*PD ile benzer bir şekilde, P*p*PD'nin askorbik asit, ürik asit ve L-sisteinin elektrokimyasal girişimini belirgin bir oranda ortadan kaldırdığı bulunmuştur. Uygun koşullar altında biyosensör ile glikozun akıma duyarlılık tepkisi, korelasyon katsayısı 0,9995 ile $5{,}0\times10^{-3}$ – $3{,}0\times10^{-3}$ M aralığında doğrusal bir ilişki göstermiştir. Michaelis-Menten eşitliğine göre, glikoz ve P*p*PD/Gox-düzenlenmiş mikroelektrodun maksimum düzeydeki sabit akım yoğunluğu için görünür Michaelis sabiti sırasıyla, 3,94 mM ve 607,5 mA $cm^{-2}$ nulunmuştur. P*o*PD ile geliştirilen biyosensörün ve poli (fenol) film kullanılarak elde

edilenden daha büyük lineer aralığa sahip olduğu bulunmuştur. Buna ek olarak, sensörün kararlılığı, 2 aylık bir süre boyunca incelendi (Jing-Juan, 1999).

Alvarez-Crespo ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada glutamat biyosensör dehidrogenaz-$NAD^+$ modifiye karbon pasta elektrot üzerinde *o*-fenilendiamin'in elektropolimerizasyonuyla geliştirilmiştir. Glutamata amperometrik cevap 0 V (Ag/AgCl) değerine yakın olarak uygulanan enzimatik olarak üretilen NADH'ın elektrokatalitik oksidasyonu vasıtasıyla elde edilmiştir. Karbon bileşimininin, polimer kalınlığının ve diğer değişkenlerinin optimize edilmesinin ardından, glutamat için doğrusal amperometrik cevabın $3{,}8\times10^{-6}$ M'lık bir gözlenebilme sınırı ile $5{,}0\times10^{-6}$ – $7{,}8\times10^{-5}$ M konsantrasyon aralığı içerisinde elde edilmiştir. Biyosensör, tavuk bulyon küplerindeki glutamatın tayinine uygulanmıştır. Enzimatik spektrofotometrik yöntem ile ilgili doğru sonuçlar bulunmuştur (Alvarez, 1997).

Ping ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada Prusya mavisi (PM) ve P*o*PD modifiye edilmiş camsı karbon elektrot (GCE) bazlı bir amperometrik algılayıcı, $H_2O_2$ tayini için geliştirilmiştir. Prusya mavisi filmi camsı karbon elektrot üzerine elektrokimyasal olarak birikririlirken P*o*PD filmi dönüşümlü voltametri ile Prusya mavisi tabakasının üzerinde şekillenmiştir. P*o*PD filminin Prusya mavisi bazlı sensörün kararlılığını ve seçiciliğini son derece geliştirdiği bulunmuştur. Uygun koşullar altında, geliştirilen elektrot 0,05 μM'lik tayin sınırı ile oldukça geniş bir yelpazede 0,1 mM ile 0,12 mM arasında doğrusal sıra olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, geliştirilmiş elektrot 10 farklı ticari içecekte $H_2O_2$'nin amperometrik olarak belirlenmesi için uygulanmıştır. Deneysel sonuçlar önerilen elektrodun aseptik ambalajlı içeceklerdeki $H_2O_2$'yi tespit etmek için yararlı bir araç olabileceğini göstermiştir (Ping, 2011).

Karalemas ve arkadaşlarının yapmış olduğu bu çalışmada L-lizin biyosensörün Si-altın şerit elektrot (SGSE) üzerine hazırlanışı anlatılmıştır. Yapılar, (a) poli *o*-fenilendiaminin elektrot yüzeyinde elektropolimerizasyon ile oluşumu ve (b) lizin oksidazın glutaraldehit ile altın/P*o*PD elektrot üzerinde immobilizasyonunu kapsamaktadır. Elektropolimerizasyonun tekrarlanabilirliğinin ve elde edilen polimerin kararlılığının yanı sıra $H_2O_2$ ve lizine karşı altın/P*o*PD elektrodunun davranışı incelenmiştir. Bu çalışma, elektropolimerizasyonun ile elde edilen polimerin en az 40 gün boyunca oldukça dayanıklı olduğunu göstermiştir. Biyosensör $0{,}01\text{-}10^{-5}$ M (0,1-10 mM) lizin aralığında doğrusal bir kalibrasyon eğrisi göstermiştir. Diğer aminoasitlerin biyosensör performansına olan girişim etkisi de incelenmiş ve amperometrik seçicilik

katsayıları hesaplanmıştır. Biyosensör temelde tirosin ve sisteine yanıt vermişken fenilalanin, arginin, histidin ve ornitin için alınan cevaplar çok düşüktür. Elektropolimerizasyon koşullarını değiştirerek, girişimlerin etkisi daha da azaltılmıştır (Karalemas, 2000).

Rothwell ve arkadaşlarının yapmış olduğu bu çalışmada, Biyosensör uygulamaları için yapılan çalışmalarda uygulanan elektrokimyasal potansiyeli ile nötral ortam içerisinde Pt-Ir teli elektrotları üzerine polimerleştirilen iletken olmayan ve iyonik olmayan P*o*PD'nin geçirgenlik özellikleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Hidrojen peroksit ve askorbik analitleri üzerine girişim etkisi incelenmiştir. POPD filmi SCE'ye karşı 700 mV potansiyelinde gerçekleştirildiğinde, 0,10±%0.02 'lik optimum değere ulaştığında artan polimerizasyon potansiyeli ile daha da iyileştirilmesi için bu son S% aralığında bir eğilim oluşmuştur. S% deki bu ilerleme, hidrojen peroksitteki geçirgenlikteki artışlarının ve uygulanan polimerizasyon potansiyelinin yüksek değerleri için askorbik asit geçirgenliğindeki düşüşlerin şaşırtıcı kombinasyonundan kaynaklanmıştır. (Rothwell, 2010).

Lin-Tao ve arkadaşlarının yapmış olduğu bu çalışmada, yüksek oranda dağıtılmış mikro platin ile düzenlenmiş Poli-*o*-fenilendiamin (P*o*PD) filmi elektroaktivitede büyük bir artışa ve hidrojen peroksit için elektrokatalitik azalmaya neden olmuştur. Farklı metal-polimer konfigürasyonu, elektrokimyasal davranışı ve kompozit filmin elektrokatalitik aktivitesini güçlü bir şekilde etkileyeceği düşünülmüştür. Katalitik tepkinin potansiyel tarama oranı, pH ve türlerin konsantrasyonuna olan bağımlılıkları ayrıntılı olarak incelenmiştir (Lin-Tao, 1999).

Garjonyte ve arkadaşlarının yapmış olduğu bu çalışmada, Gox enzimi Prusya mavisi (PB) ile modifiye edilmiş platin elektrot üzerinde karşılık gelen monomerin elektropolimerizasyonu ile Gox polipirol PPY bir tabaka ya da P*o*PD içerisinde immobilize edilmiştir. Elde edilen biyosensörler, enzimatik reaksiyon sırasında oluşan hidrojen peroksitinin saptanması için glikoza yönelik amperometrik cevaplar göstermiş olup hem +0,6 V Ag/AgCl potansiyelinde anodik şekilde hem de 0 V veya +0,2 V seviyesinde katodik şekilde çalışılmıştır. P*o*PD ile modifiye edilen biyosensörün üzerine askorbat ve asetaminofen gibi girişimlerin etkisinin de büyük ölçüde azaltıldığı görülmüştür (Garjonyte, 2000).

Corcuera ve arkadaşlarının yapmış olduğu bu çalışmada, elektrot yüzey alanını ve dolayısıyla elektrot duyarlılığını artırmak için platinle kaplama kullanılmıştır. Ancak

platinle kaplama koşulları ve enzim biyosensörlerinin reaksiyon yayması üzerine etkileri konusunda çok az çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada üretilen amperometrik glikoz biyosensörünün duyarlılığı 192±48 μA $cm^{-2}$ $mM^{-1}$ olarak bulunmuştur. Tekrarlanabilirlik için ölçülen en kötü değer %2,32±1,22 olup gözlenebilme sınırının en az 0,94 mM olduğu bulunmuştur. Bunun yanı sıra, algılama 25 mM'ye kadar doğrusal olup, bir sensörün diğerine göre değişkenliği %24 iken 21ºC'de sensörlerin yarılanma ömrünün 12 gün olduğu gözlenmiştir. 4ºC raf ömründe ise biyosensör duyarlılığında bir azalma olmaksızın en az bir ay dayandığı gözlenmiştir. Bu şartlar altında, sensörlerin duyarlılıklarında büyük bir azalma olmadan en azından 120 kez kullanılabilmiştir. Ancak sık ayarlamanın gerekli olduğunu görülmüştür. Üretilen bu sensör elma suyu ve beyaz şaraptaki glikozun tayini için kullanılmıştır.. Platin ile kaplanmış bir elektrot üzerinde ince bir poli-o-fenilendiamin film içerisine glikoz oksidaz immobilize edildiğinde, alt katman gözenekli bir matris içinde hızla yayılır ve $H_2O_2$ enzim/polimer film boyunca üretilir. Bu koşullar altında, difüzyon görünüşe göre çok yönlüdür ve platinle kaplamada, yüksek amperometrik cevap ile sonuçlanan yüzey alanında etkin büyük bir artış görülmüştür (Corcuera, 2005).

Koyuncu Zeybek ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada, fenolik bileşiklerin tayini için polimer film temelli amperometrik enzim elektrotlar hazırlanmıştır. Bu amaçla, *o*-fenilendiamin (*o*-PD) veya *o*-PD ve 3-metiltiyofen (3-MT) içeren asetonitril-su karışımı kullanılarak platin elektrotlar elektropolimerizasyon yoluyla modifiye edilmiştir. Hazırlanan Pt/P*o*PD ve Pt/P*o*PD-3MT elektrotlara polifenol oksidaz (Pox) enzimi immobilize edilmiş ve elektrotların pirokateşole duyarlıkları belirlenmiştir. Daha yüksek duyarlığın elde edildiği Pt/P*o*PD-3MT/Pox elektrot ile çalışma koşulları ve performans faktörleri çalışılmıştır. Pt/P*o*PD-3MT/Pox elektrot için optimum tampon cinsi, tampon derişimi, pH'sı, sıcaklık ve çalışma potansiyeli sırasıyla fosfat; 0,10 M; 7,0; 25ºC ve Ag/AgCl'e karşı -0,20 V olarak belirlenmiştir. Enzim elektrodun doğrusal çalışma aralığı $1{,}96\times10^{-6}$-$3{,}50\times10^{-5}$ M olarak belirlenmiştir. Enzim elektrodun cevap süresi, tekrar kullanılabilirliği, ömrü ve diğer bazı fenolik bileşiklere amperometrik cevapları da araştırılmıştır (Koyuncu Zeybek, 2010).

Rameshkumar ve Ramaraj arkadaşların yaptğı bir çalışmada basit bir yöntem olan Nafyon-poli(*o*-fenilenediaminden) altın (Au) nanoyapıları hazırlamak için (NF-PPD) kompozit film modifiye elektrot (İTO veya GC / NF PPD / Au) ve asidik ortamda oksijenin elektrokatalitik azaltılması yönünde uygulamaları yapılmıştır. NF-PPD

kompozit film, modifiye edilmiş elektrotta Au nano oluşumu in-situ spektroelektrokimyasal yöntemle ile izlenmiştir. *o*PD monomeri oksidatif Au nano elektrokimyasal biriktirilmesi sırasında polimerize edilmiştir. NF-PPD/Au modifiye elektrot dönüşümlü voltametri, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve X-ışını kırınımı (XRD) ile karekterizasyon analizleri yapılmıştır. Au nano elektrot yüzeyi üzerinde oluşturulmuş olan kompozit film, etanol içinde çözülmüş ve yüksek çözünürlüklü transmisyon elektron mikroskobu (HRTEM) ile karakterize analizi edilmiştir. HRTEM görüntüleri NF-PPD filmi bir füzyon büyüme sürecine göre zencefil şeklindeki Au nanoyapılarda oluşumunu göstermiştir. Bu çalışmada incelenen GC/NF-PPD/Au modifiye elektrot diğer kontrol edilene göre modifiye elektrotlar daha asidik ortam içinde, oksijen indirgeme reaksiyonu (ORR) doğru en yüksek akım yoğunluğu, yığın aktivite ve kararlılık açısından daha iyi bir elektrokatalitik aktivite göstermiştir. Nafyon matris içinde Au modifiye elektrotta PPD nanoyapıların varlığı ORR de bir sinerjistik katalitik aktivite göstermiştir (Rameshkumar ve Ramaraj 2015).

### 6.4. Platin Nanopartikülleri Kullanılarak Hazırlanan Biyosensörleri ile İlgili Kaynak Araştırması

Y. Zou ve çalışma grubu tarafından çok katlı karbon nanotüpler içerisine platin nanopartiküllerinin elektrokimyasal olarak biriktirilmesine dayanan glikoz biyosensörleri hazırlanmıştır. Modifiye elektrot, camsı karbon elektrot yüzeyinin dimetilformamid çözücüsü içerisindeki karbon nanotüplerin süspansiyonundan damlatılması ve çözücünün infarered lambası altında buharlaştırlmasından sonra 0,1 M HCl içeren 10 mM $H_2PtCl_6$ çözeltisinde 5 dakika boyunca $-0{,}2$ V sabit potansiyel uygulanarak platin nanopartiküllerinin biriktirilmesiyle hazırlanmıştır. Sonra, modifiye elektrot yüzeyine fosfat tamponu içerisindeki glikoz oksidaz çözeltisi ve kitosan-$SiO_2$ sol-gel karışımının damlatılmasıyla glikoz oksidaz immobilizasyonu sağlanmıştır. Son olarak elektrot yüzeyi koruyucu film görevi üstlenmesi için nafyon ile kaplanmıştır. Hazırlanan biyosensörün yüksek elektrokatalitik aktivite ve kararlılığa sahip olduğu ifade edilmiştir. Lineer çalışma aralığı 1 μM – 23 mM, gözlenebilme sınırı 1 μM olarak belirlenmiştir (Zou, 2008).

S. Chakraborty ve çalışma grubu tarafından, $H_2O_2$'in amperometrik tayini için elektron aracısı ve enzim kullanmaksızın platin nanopartüklleri ile desteklenen yüksek seçicilikte bir elektrot hazırlanmıştır. Bu elektrot hazırlanması, ilk olarak

poli(dialildimetilamonyum)klorür (PDDA) polimerinin camsı karbon yüzeyine çözücüsünün buharlaşması sonucunda kaplanması, ikinci basamakta ise polimer film kaplı elektrodun $H_2PtCl_6$ çözeltisi içerisinde bir süre bekletilerek platin nanopartküllerinin kimyasal indirgenme yoluyla elektrot üzerine birikmesiyle gerçekleşmiştir. Platin nanopartikülleri biriktirilmiş polimer film yüzeyi alan emisyon taramalı elektron mikroskopi, X-ray kırınımı, spektral ve elektrokimyasal ölçümleri ile karakterize edilmiştir. Elektrot yüzeyindeki platin nanopartikülerinin ortalama boyutu 17 nm olarak belirlenmiştir. Platin nanopartiküllerinin $H_2O_2$'in yükseltgenmesine çok iyi elektrokatalitik aktivite gösterdiği ve platin elektroda göre yükseltgenmenin daha düşük potansiyelde gerçekleştiği gözlenmiştir. Hazırlanan bu elektrot, platin elektrodun akisine, çözelti içerisindeki yüzey oksitleri ve diğer türlerin aktivasyon engelleyici etkisinden etkilenmemiştir. Platin nanopartikül biriktirilerek hazırlanan bu elektrodun duyarlılığı 9,15 $\mu AmM^{-1}$ ve linner cevabının üst limiti 3 mM olarak belirlenmiştir (Chakraborty, 2009).

S. Liu ve çalışma grubu tarafından elektrokimyasal bir yöntem kullanmaksızın altın nanopartikülleri ile modifiye ettikleri bir DNA biyosensörü geliştirilmiştir. Elektrot yüzeyinde altın nanopartiküllerinin biriktirilmesi, altın elektrot ve polielektrolit çoklu tabaka ile kaplı altın elektrodun $HAuCl_4$ çözeltisinde bekletilmesi ile hazırlanmıştır. Çözelti içerisine elektrolit katkısı yapması amacıyla $KNO_3$ ilave edilmiştir. Altın nanopartikülleri ile modifiye edilen elektrodun morfolojisi farklı $HAuCl_4$ konsantrasyonlarında ve farklı biriktirme sürelerinde incelenmiştir. Altın nanopartikülleri ile modifiye edilen elektrot üzerine DNA immobilizasyonu ile hazırlanan biyosensör dönüşümlü voltametri ve diferansiyel puls voltametrisi ile karakterize edilmiştir. Elektrodun gözlenebilme sınırı $1\times10^{-11}$ M olarak bulunmuştur (Liu, 2010).

Baş ve çalışma grubu tarafından hazırlanan ksantin biyosensörü öncelikle platin elektrodun polivinilferrosenyum perklorat ($PVF^+ClO_4^-$) ile modifiye edilmesi ve daha sonra -0,2 V'da $H_2PtCl_6$ çözeltisi kullanılarak elektrot üzerinde Pt nanopartiküllerinin biriktirilmesine dayanmaktadır. Son olarak ksantin oksidaz bu elektrot üzerine immobilize edilerek ksantin tayini için bir biyosensör hazırlanmıştır. Hazırlanan biyosensör 0,5 V uygulama potansiyelinde ksantine karşı $0{,}43\times10^{-3}$–2.84 mM lineer cevaplar vermiştir. Biyosensörün optimizasyon şartlarının belirlenmesi için biyosensörün akım cevapları üzerine uygulama potansiyeli, sıcaklık, Pt biriktirme

potansiyeli, Pt biriktirme süresi, enzim konsantrasyonu, immobilizasyon süresi ve polimer film kalınlığının etkisi araştırılmıştır. Ksantin tayini için biyosensörün gözlene bilme sınırı $1,3\times10^{-4}$ mM olarak tespit edilmiştir (Baş, 2011).

Ren ve arkadaşları tarafından glikoz tayini için ultraseçici yeni bir biyosensör hazırlanmıştır. Çalışmada kullanılan biyosensör Pt nanoküp, kitosan, glikoz oksaidaz ve nafyon ile oluşturulan karışımı ile Pt elektrot yüzeyinin modifikasyonuna dayanmaktadır. Ayrıca, Pt nanoküplerinin biyosensörün cevapları üzerine etkisi araştırılmıştır. Hazırlanan biyosensörün 0,5 μM gözlenebilme sınırı ve 35,92 $\mu A/mMcm^2$ seçicilik ile $1\times10^{-6}$ – $5\times10^{-3}$ M aralığında lineer cevaplar verdiği blerlinemiştir (Ren, 2012).

Tsai ve çalışma grubu tarafından yapılan çalışmada, glikoz oksidaz platin nanopartikül, karbon nanotüp ve aliminyum kaplı silikadan oluşan nanokompozit ile modifiye edilmiş camsı karbon elektrot üzerine adsorpsiyon tekniği kullanılarak immobilize edilmiştir. Hazırlanan biyosensörün akım cevaplarını etkileyen faktörler optimizasyon çalışması ile belirlenmiştir. 5 saniyeden daha kısa bir sürede glikoza karşı cevapların elde edilebildiği bu biyosensörde 10,5 mM glikoz konsantrasyonuna kadar lineer cevaplar elde edilmiştir (Tsai, 2009).

# 7. MATERYAL VE METOT

## 7.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

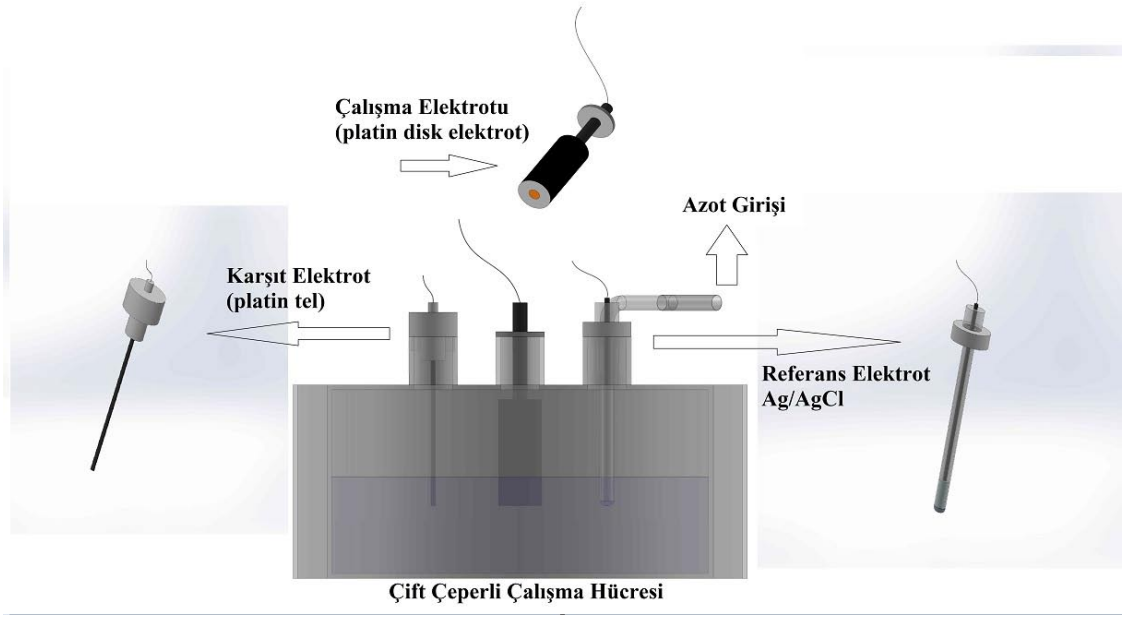
Çalışmamızda kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmalar Çizelge 7.1'de verilmiştir.

**Çizelge 7.1.** Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler ve çözeltiler

| Kullanılan Kimyasal Maddeler | Temin Edildiği Firma |
|---|---|
| Asetik Asit | Merck |
| Askorbik Asit | Merck |
| Diklorometan | Merck |
| D-(+)-glikoz | Sigma Aldrich |
| Fosforik Asit | Merck |
| Glikoz Oksidaz | Alfa Easer |
| Hegzakloroplatinik Asit | Sigma Aldrich |
| Hidrojen Peroksit Çözeltisi | Sigma Aldrich |
| Nafyon | Merck |
| *o*-fenilendiamin | Merck |
| Sodyum Asetat | Sigma Aldrich |
| Sodyum Fosfat Di Bazik | Alfa Easer |
| Sodyum Fosfat Mono Bazik | Merck |
| Sodyum Hidroksit | Merck |
| Tetra Bütil Amonyum Perklorat | Sigma Aldrich |
| Ürik Asit | Sigma Aldrich |
| Vinil Ferrosen | Merck |

## 7.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Hücre ve Elektrotlar

Deneysel çalışmalarda kullanılan cam hücre, sıcaklık kontrolünün sağlanması için çift çeperli olarak tasarlanmış olup, çalışma elektrodunun, referans elektrodunun, karşıt elektrodunun, gaz giriş borusunun ve gaz çıkış borusunun yerleştirildiği beş rodajlı girişe sahiptir (Şekil 7.1).




**Şekil 7.1.** Deneysel çalışmalarda kullanılan hücre ve elektrotlar

Deneysel çalışmalar boyunca glikoz analizinde, *o*PD'in Gox immobilizasyonu ile eş zamanlı gerçekleştirilen elektropolimerizasyonu ve platin nanopartiküllerinin elektrokimyasal biriktirilmesi işlemlerinde kullandığımız üçlü elektrot sisteminde çalışma elektrodu olarak 0,0314 $cm^2$ yüzey alanında platin disk elektrot, referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrot ve karşıt elektrot olarak platin spiral ve platin tel elektrotlar kullanılmıştır. Polivinilferrosenin sabit potansiyelde elektrokimyasal çöktürme yoluyla kaplanması işleminde referans elektrot olarak susuz Ag/AgCl elektrodu kullanılmıştır. Platin disk çalışma elektrodu her çalışmadan önce sırasıyla 1 µm, 0,3 µm, 0,05 µm tanecik boyutuna sahip alümina tozu ile temizlenmiş ve sonra elektrota ultrasonik banyoda 10 dakika boyunca sonikasyon işlemi uygulanmıştır. Son olarak, çalışma elektrodu sırasıyla distile su ve metilen klorür çözücüsü ile yıkanıp kurutulduktan sonra kullanılmıştır.

### 7.3. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

Bütün amperometrik ve elektrokimyasal ölçümler CHI marka (660C model) bir elektrokimyasal analiz cihazında gerçekleştirilmiştir.

Çalışma elektrodu olarak kullanılan platin disk çalışma elektrotlarını temizlemek için Branson marka (1510-MTH model) ultrasoniksiyon cihazı kullanılmıştır.

Çözeltilerin hazırlanmasında ve kullanılan malzemelerin yıkanmasında kullanılan deiyonize su Millipore marka ultra saf su cihazı ile elde edilmiştir. Çözelti ilaveleri için Precise marka (SH-3 model) manyetik karıştırıcı kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan tampon çözeltilerin pH'ları WTW marka (pH/ion/cond 750 model) pH metre kullanılarak ayarlandı.

Çözelti ilaveleri için Brand marka mikropipet kullanılmıştır.

Sabit sıcaklık gerektiren çalışmalarda Nüve marka (BM402 model) marka termostatlı ve sirkülasyonlu su banyosu kullanılmıştır.

Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen elektrotların SEM görüntüleri için Zeiss marka EVO-LS 10 model taramalı elektron mikroskopu ve AFM görüntüleri için Veeco di Caliber marka atomik kuvvet mikroskopu kullanıldı.

Elde edilen elektrotların yapısal analizi için FT-IR spektrumları Perkin Elmer marka spektrometresiyle alındı.

## 7.4. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Yöntemler

### 7.4.1. Gerilim kontrollü kulometri

Bir elektrokimyasal sistemin incelenmesinde voltametrik yöntemler ve gerilim kontrollü kulometri birbirini tamamlar niteliktedir. Voltametrik yöntemler mekanizma hakkında bilgi vermesi açısından, gerilim kontrollü kulometri yöntemi ise voltametrik verilerin doğruluğunu kanıtlaması ve mekanizmanın belirlenmesi açısından önemlidir. Gerilim kontrollü kulometri yöntemi, bir elektrokimyasal hücredeki elektroliz edilen elektroaktif madde veya maddelerin miktarının harcanan elektrik yükü miktarıyla doğru orantılı olmasına dayanmaktadır.

Gerilim kontrollü kulometri yöntemi ile elektrot yüzeyindeki tek bir maddenin indirgenmesi ya da yükseltgenmesi sonucunda gerçekleşen elektrolizde harcanan elektrik yükü (7.1) eşitliği ile gösterilmektedir.

$$Q_\infty = \int_0^\infty i \, \mathrm{d}t = nFN \tag{7.1}$$

Eşitlikte *i*: akımı (amper), *t*: elektroliz süresini, *n*: aktarılan elektron mol sayısını, *F*: faraday sabitini, *N*: elektroliz olan maddenin mol sayısını, *Q* ise N mol maddenin

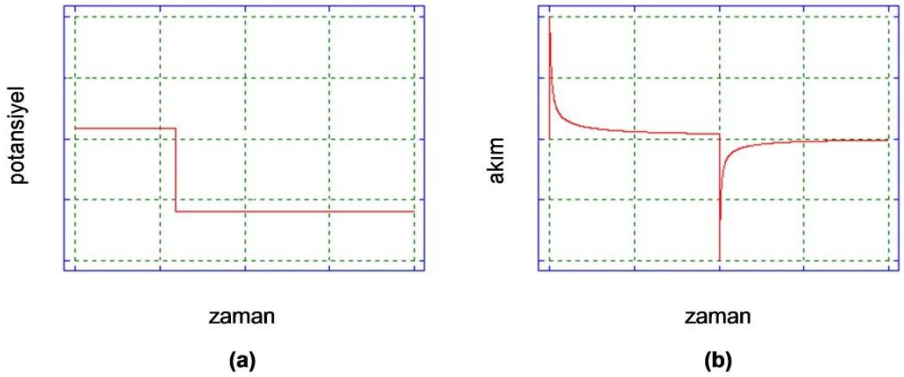
yükseltgenmesi ya da indirgenmesi sırasında harcanan toplam elektrik yük miktarını (Coulomb) göstermektedir (Bard, 2001).

Deneysel çalışmalarda, platin çalışma elektrodunun $PVF^{+}ClO_4^{-}$ filmi ile elektrokimyasal çöktürme yoluyla kaplanmasında ve $PVF^{+}ClO_4^{-}$ polimer film üzerine platinin biriktirilmesinde gerilim kontrollü kulometri yönetimi kullanılmıştır.

### 7.4.2. Kronoamperometri

Bu yöntemde, çalışma elektrodu ile referans elektrot arasına uygulanan sabit potansiyel sonrasında sistemin termodinamik dengesi değişmekte ve elektrodun bulunduğu ortamda tayin edilecek maddenin, elektrot yüzeyinde indirgenmesi veya yükseltgenmesi sonucu bir akım oluşmaktadır. Amperometrenin esası oluşan bu akımın ölçülmesine dayanmaktadır. Bu sistemde oluşan akım miktarı, difüzyon hızına, madde moleküllerinin elektrot yüzeyine ve dolayısıyla da çözelti içindeki derişime bağlıdır. Amperometrik yöntemin kullanıldığı biyosensör uygulamalarında elektrot seçimliliği ve duyarlılığı büyük ölçüde biyokatalizörün elektrot yüzeyinde tutuklanmasına bağlıdır.

Durgun bir çözeltide çalışma elektrodu ile karşılaştırma elektrodu arasına incelenen sistemin voltamogramında plato bölgesinde sabit bir gerilim değeri uygulandığında basit elektrot reaksiyonu için zamanın karekökü ile azalan bir akım oluşmaktadır. Uygulanan sabit bir gerilimde akımın zamanla değişiminin ölçüldüğü bu yöntem kronoamperometri olarak adlandırılır. Kronoamperometrik çalışmalarda, çalışma elektroduna uygulanan etki sabit bir gerilim basamağı uyarmasıdır (Şekil 7.2.a). Başlangıçta çalışma elektrodunun gerilimi pozitiftir. t=0 anında çalışma elektrodunun gerilimi elektrot yüzeyinde tepkiyen derişimini bir anda sıfıra götürecek ölçüde negatif olan bir $E_{son}$ değerine atlatılmaktadır. Sistemin bu uyarıya cevabı zamana bağlı olarak değişen bir akımdır (Şekil 7.2.b).



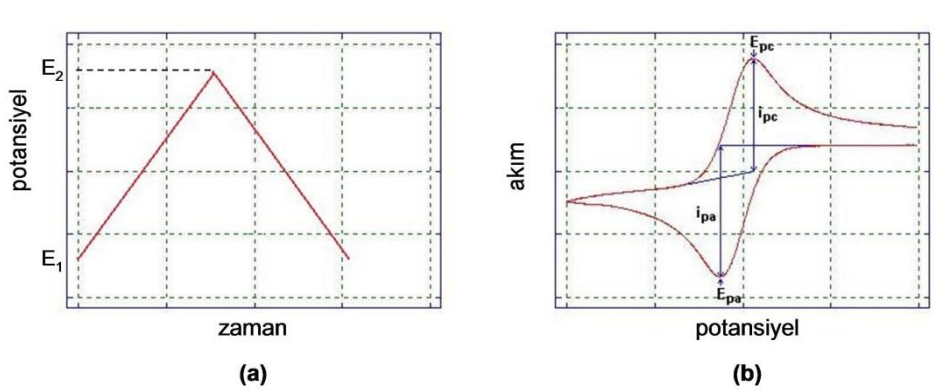

**Şekil 7.2. (a)** Kronoamperometrik uyarı, **(b)** Kronoamperometrik cevap

Deneysel çalışmalarda, tasarlanan her bir biyosensör daha önceden tespit edilmiş uygulama potansiyelinde kararlı hal akım eğrisi elde edilene kadar elektroliz yapılmıştır. Kararlı hal akım değerine ulaşıldıktan sonra ortama konsantrasyonu belirli glikoz çözeltisinden belirli miktarlarda eklenerek amperometrik akım cevapları kaydedilmiştir. Ortama her bir substrat ilavesinden sonra meydana gelen akım değişiminin kararlı hal akım değerine ulaştığı gözlemlendikten sonra diğer substrat eklemesi yapılmıştır.

### 7.4.3. Dönüşümlü voltametri

Dönüşümlü voltametri yönteminde karşıt elektroduna göre çalışma elektrodunun geriliminin belirli bir gerilim programına uyacak şekilde değiştirilmesi esas alınmaktadır. Gerilim taraması bir başlangıç gerilimi ($E_1$) değerinden başlar. Zamanla doğrusal olarak değişen ileri yöndeki gerilim taraması belirli bir gerilim değerine ($E_2$) ulaştıktan sonra tarama yönü ters çevrilir. Yeniden başlangıç gerilim değerine ulaşıldığında gerilim taraması tamamlanır. İleri ve geri yöndeki gerilim tarama hızı aynı olmakla birlikte istenildiğinde farklı gerilim tarama hızları da uygulanabilir. Ayrıca ileri ve geri yöndeki tarama bir kez yapılabildiği gibi (tek döngülü voltametri), birçok kez de uygulanabilir (çok döngülü voltametri). İleri yöndeki gerilim taraması sırasında çalışma ve karşıt elektrotlar arasında geçen akım kaydedilirse pik şeklinde bir akım-gerilim eğrisi elde edilir. Bu pik çözeltideki elektroaktif maddenin yükseltgenmesine (ya da indirgenmesine) aittir. Gerilim tarama yönü ters çevrildiğinde yükseltgenmiş elektroaktif türün yeniden indirgenmesine (ya da yükseltgenmesine) karşı gelen bir geri

pik gözlenir. Gerilim programı ard arda uygulandığında ise çok döngülü dönüşümlü voltamogram elde edilir. Bu yöntemde voltametrik uyarma sinyali ve tersinir bir elektroyükseltgenme sistemi için elde edilen dönüşümlü voltamogram Şekil 7.3'te gösterilmiştir. Şekil 7.3.b'de verilen bir dönüşümlü voltamogramda, $E_{pc}$, katodik pik potansiyelini, $E_{pa}$, anodik pik potansiyelini, $i_{pc}$, katodik pik akımını ve $i_{pa}$, anodik pik akımını göstermektedir.




**Şekil 7.3. (a)** Voltamogramın elde edilmesinde kullanılan dönüşümlü voltametrik uyarma sinyali **(b)** Tersinir bir elektrokimyasal reaksiyon için elde edilen dönüşümlü voltamogram

Tersinir bir sistem için dönüşümlü voltamogramda anodik ve katodik pik akımları birbirine eşittir. Ayrıca bu piklerin gerilimleri $E_{pa}$ ve $E_{pk}$ ile gösterilirse 25 ºC'de voltametrik yarı dalga gerilimi, $E_{1/2}$ ile bu yöntemde ölçülen pik gerilimleri arasında

$$E_{pa} = E_{1/2} + \frac{0{,}029}{n} \tag{7.2}$$

$$E_{pk} = E_{1/2} - \frac{0{,}029}{n} \tag{7.3}$$

eşitlikleri yazılabilir. Anodik ve katodik pikler arasındaki gerilim farkı (7.4) eşitliği ile verilebilir.

$$E_{pa} - E_{pk} = \frac{0,058}{n} \qquad (7.4)$$

Gerilim taraması sırasında çalışma elektrodunda gerçeklesen elektrot tepkimesinin ürünü gerilim tarama yönü ters çevrildiğinde tekrar elektrot tepkimesine girebilir. İleri yöndeki gerilim taraması sırasında oluşan elektrot tepkimesi tersinir ise, geri yöndeki gerilim taraması sırasında gözlenen pik akımı ileri yöndeki gerilim taraması sırasında gözlenen pik akımına eşit olur. Bu sistemde çalışma elektroduna uygulanan gerilim elektroaktif maddenin yükseltgenme gerilimine ulaşınca yükseltgenme olayı başlar. Elektrot yüzeyini çevreleyen kısımdaki madde hızlı bir şekilde tüketilir. Bu nedenle akımda hızlı bir artış gözlenir. Bu sırada çalışma elektrodu civarında bir difüzyon tabakası oluşur ve çözeltiden elektrot yüzeyine doğru difüzyonla madde aktarımı başlar. Difüzyonla kütle aktarım hızı, elektron aktarım hızından çok daha küçük olduğunda, voltamogramın tepe noktasından sonra akımda üstel bir düşüş gözlenir.

Dönüşümlü voltomogramların ayrıntılı olarak incelenmesi ile bir sistemin hangi gerilimde ve kaç adımda indirgenip yükseltgenebileceğini, elektrokimyasal açıdan tersinir olup olmadığını, elektrot tepkimesinin bir çözelti tepkimesi ile eş zamanlı gidip gitmediğini, indirgenme veya yükseltgenme ürünlerinin kararlı olup olmadığını, elektrot tepkimesinde yer alan türlerin yüzeye tutunup tutunmadığını anlamak mümkündür. Elde edilen dönüşümlü voltomogramlar elektron ve kütle aktarım hızlarına, elektrot yüzeyinde ve çözeltide oluşan bağlaşık kimyasal tepkimelere bağlı olarak değişik şekiller alırlar.

Dönüşümlü voltametrinin yararlı bir yönü de yöntemin değişik tarama hızlarında uygulanabilmesidir. Böylece elektrot tepkimesiyle oluşan ara ürünlerin kararlılıklarıyla ilgili görüşler belirlenir. Bağlaşık kimyasal tepkimelerle ya da başlangıçta oluşan ara ürünlerin yeniden yükseltgenmesine karşı gelen iki veya daha çok elektron aktarımını içeren voltametrik yükseltgenmeler, düşük tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltamogramlarda gözlenebilir. Ayrıca gerilim tarama hızını artırarak kimyasal adımlar saf dışı edilebilir ve böylece ilk ürünün ya da katyon radikalinin indirgenme pikini gözlemek olanağı doğar. Dönüşümlü voltametrik veriler yardımıyla birçok katyon radikalinin kararlılığı üzerine yarı nicel görüşler öne sürülmüştür (Bard ve Faulkner, 1944).

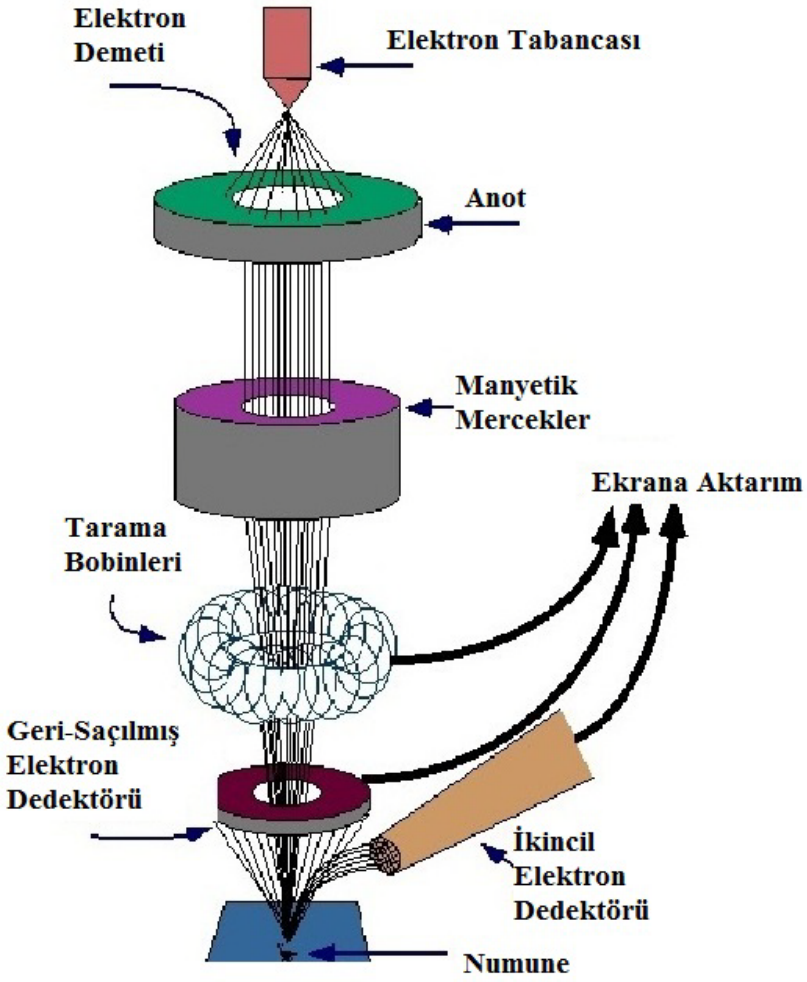
Deneysel çalışmalarda, tasarlanan her bir biyosensörün çalışma şartları optimize edildikten sonra voltametrik davranışları dönüşümlü voltametri yöntemi ile belirli bir aralıkta potansiyel taraması yapılarak incelenmiş ve kararlı akım eğrisi elde edildikten sonra belirli konsantrasyonlarda glikoz çözeltisi eklenerek elde edilen voltamogramlar kaydedilmiştir.

### 7.4.4. Taramalı elektron mikroskopu

Taramalı elektron mikroskopu (Scanning Electron Microscope, SEM), elektron demetinin incelenen örneğin yüzeyi ile yaptığı fiziksel etkileşmelerin (elastik, elastik olmayan çarpışmalar ve diğerleri) sonucunda ortaya çıkan sinyallerin toplanması ve incelenmesi prensibine dayanarak görüntü elde eden elektrooptik prensipler kapsamında tasarlanmış bir cihazdır. Taramalı Elektron Mikroskopu, birçok dalda araştırma-geliştirme çalışmalarında kullanımının yanında, mikro elektronikte yonga üretiminde, sanayinin değişik kollarında hata analizlerinde, biyolojik bilimlerde, tıp ve kriminal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Taramalı elektron mikroskopu katı yüzeyinin çok ince bir tabakasının incelenmesi için geliştirilmiştir. Bu incelemeler sonucunda, maddenin fiziksel ve kimyasal özellikleri hakkında çok önemli bilgiler elde edilir. Bunun için katı maddenin yüzeyi, çok iyi odaklanmış bir elektron demetiyle ince tabakalar halinde taranır (Görçay, 2010).

Taramalı elektron mikroskopunda görüntü, yüksek voltaj ile hızlandırılmış elektronların numune üzerine odaklanması, bu elektron demetinin numune yüzeyinde taratılması sırasında elektron ve numune atomları arasında oluşan çeşitli girişimler sonucunda meydana gelen etkilerin uygun algılayıcılarda toplanması ve sinyal güçlendiricilerinden geçirildikten sonra bir katot ışınları tüpünün ekranına aktarılmasıyla elde edilir. Modern sistemlerde bu algılayıcılardan gelen sinyaller dijital sinyallere çevrilip bilgisayar monitörüne verilmektedir. Gerek ayırım gücü, gerek odak derinliği gerekse görüntü ve analizi birleştirebilme özelliği, taramalı elektron mikroskopunun kullanım alanını genişletmektedir.




**Şekil 7.4.** Taramalı elektron mikroskopunun şematik görünüşü

Taramalı elektron mikroskopu, optik kolon, numune hücresi ve görüntüleme sistemi olmak üzere üç temel kısımdan oluşmaktadır (Şekil 7.4). Optik kolon kısmında; elektron demetinin kaynağı olan elektron tabancası, elektronları numuneye doğru hızlandırmak için yüksek gerilimin uygulandığı anot plakası, ince elektron demeti elde etmek için yoğunlaştırıcı mercekler, demeti numune üzerinde odaklamak için objektif merceği, bu merceğe bağlı çeşitli çapta apatürler ve elektron demetinin numune yüzeyini taraması için tarama bobinleri yer almaktadır. Mercek sistemleri elektromanyetik alan ile elektron demetini inceltmekte veya numune üzerine odaklamaktadır. Tüm optik kolon ve numune $10^{-4}$ Pa gibi bir vakumda tutulmaktadır. Görüntü sisteminde, elektron demeti ile numune girişimi sonucunda oluşan çeşitli elektron ve ışımaları toplayan dedektörler, bunların sinyal çoğaltıcıları ve

numune yüzeyinde elektron demetini görüntü ekranıyla senkronize tarayan manyetik bobinler bulunmaktadır.

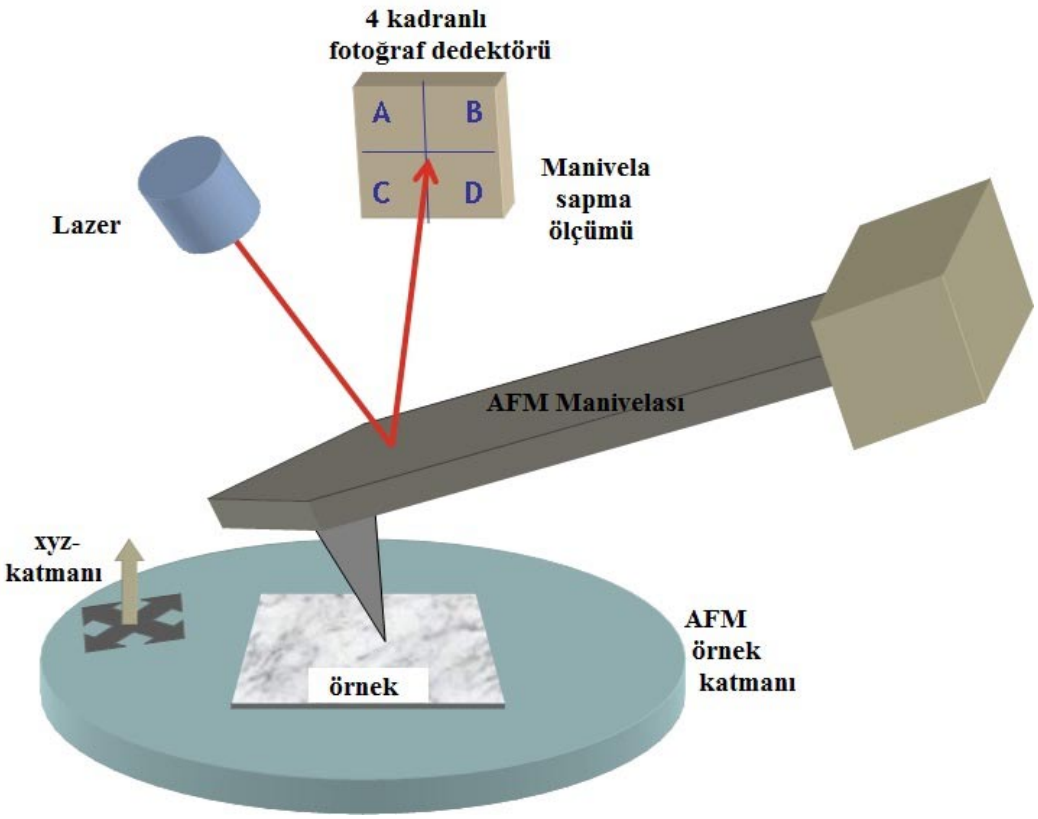
Bir numune yüzeyi, enerjili elektron demetiyle tarandığında, yüzeyden gelen elektronlardan çeşitli sinyaller elde edilir.

1. Geri saçılma elektronlarından gelen sinyaller,
2. Sekonder elektronlardan ileri gelen sinyaller,
3. Auger elektronlarından gelen sinyaller,
4. X-ışınları floresansından gelen sinyaller,
5. Diğer fotonlardan ileri gelen sinyaller.

Bütün bu sinyaller yüzey çalışmalarında kullanılabilir. Ancak, bunlardan en çok kullanılanları geri saçılma sinyalleridir (Gündüz, 2005).

### 7.4.5. Atomik kuvvet mikroskopu

Atomik kuvvet mikroskopu (Atomic Force Microscopy, AFM) atomik boyutlara kadar sivriltilmiş bir iğne ucu yardımıyla, iletken ve yalıtkan yüzeylerin yüksek çözünürlükte, üç boyutlu görüntülenmesini sağlar. Görüntüleme, iğne ucunun yüzey ile etkileşiminin incelenmesi sonucunda gerçekleştirilir. Atomik Kuvvet Mikroskopunda genelde algılayıcı olarak ucunda sivri bir iğne olan yay kullanılır. Nanometre altı çözünürlük elde edebilmek için yay sapmalarını ölçen bir sensör ve pikometre mertebelerinde çözünürlüğe sahip örnek pozisyonlama düzenekleri gerekir. AFM yayı yüzey üzerinde gezdirildiğinde örnek yüzeyi topografisindeki değişiklikler sensörde elde edilen sinyalin değişimine sebep olur. AFM'de iğne-yay sistemi, örnek yüzeyinde piezoelektrik malzeme sayesinde tarama yapar. Tarama piezoelektrik malzemeye verilen voltaj sayesinde olur. Örnek ve tarama iğnesi arasında yer alan atomlar arası etkileşme kuvveti sebebiyle iğne-yay sisteminde sapmalar meydana gelir. Bu sapmalar optik ya da elektriksel yöntemlerle belirlenir ve daha sonra geri besleme mekanizmasına gönderilir ve görüntü elde edilirken referans olarak kullanılır (Çelik, 2011; Şahin, 2009).




**Şekil 7.5.** Atomik kuvvet mikroskopu şematik görünüşü

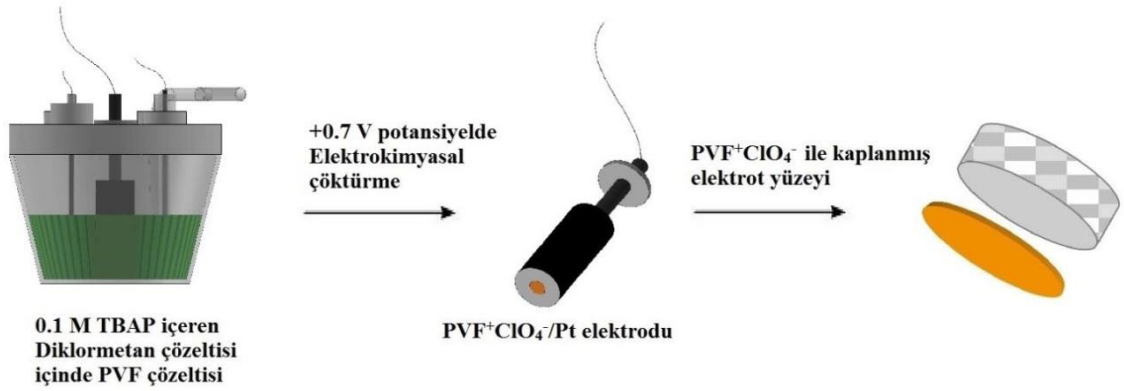
AFM tekniği ile ultra yüksek vakumda ve sıvıda atomik çözünürlükte iletken veya yalıtkan örnekleri inceleyebilmek mümkündür. AFM'nin sıvıda çalışmasıyla biyolojik molekülleri kendi ortamlarında inceleme fırsatı doğmuştur. AFM tekniği biyolojik molekülleri kendi aktif ortamlarında yüksek çözünürlükte görüntülemenin tek yoludur.

Deneysel çalışmalarda tasarlanan glikoz oksidaz biyosensörün hazırlanmasında, elektrokimyasal çöktürme, metal biriktirme, elektropolimerizasyon ve enzim immobilizasyonu gibi her bir basamaktan sonra SEM ve AFM görüntüleri alınmıştır.

### 7.5. Glikoz Oksidaz Biyosensörünün Hazırlanması ve İşleyişi

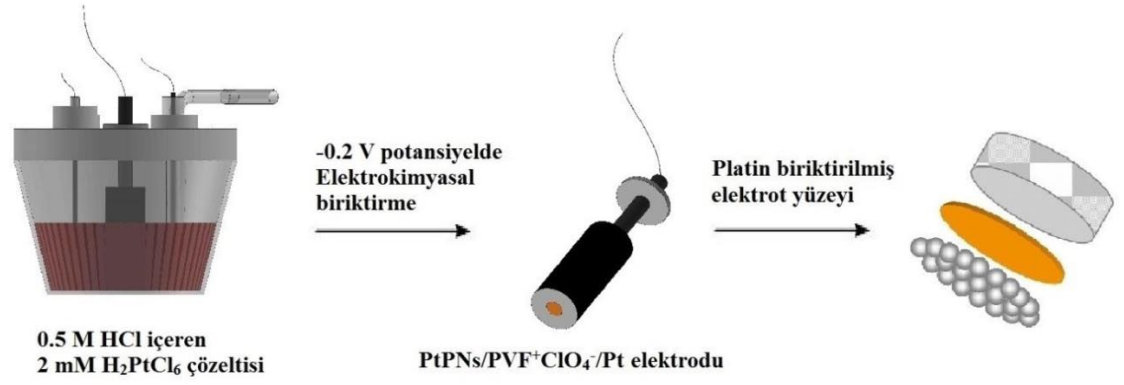
Glikoz tayini Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^{+}ClO_4^{-}$/Pt ve Gox-P*o*PD/$PVF^{+}ClO_4^{-}$/Pt olmak üzere geliştirilen iki farklı biyosensör kullanılarak elde edilen amperometrik cevaplar yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Bu biyosensörleri geliştirmek üzere $PVF^{+}ClO_4^{-}$ filmi ile kaplanması azot atmosferi altında gerilim kontrollü elektroliz yöntemi ile +0,7 V potansiyelde 0,1 M tetrabütilamonyum perklorat (TBAP) içeren diklorometan

çözeltisi içinde PVF'nin elektrokimyasal oksidasyonu ile platin elektrot üzerine Şekil 7.6'da gösterildiği gibi gerçekleştirilmiştir.



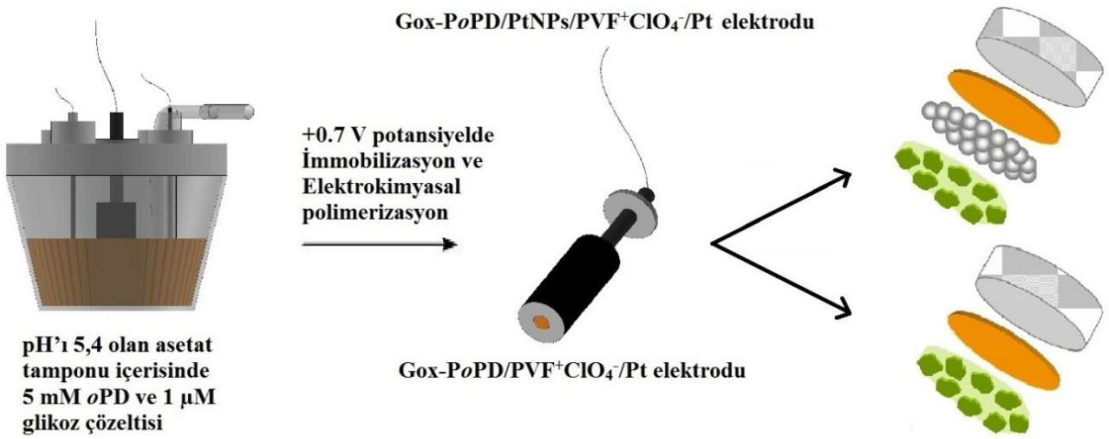

**Şekil 7.6.** Elektrokimyasal çöktürme yöntemi kullanılarak platin elektrot üzerine çöktürülerek elde edilen $PVF^{+}ClO_4^{-}$/Pt elektrotunun şematik gösterimi

Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^{+}ClO_4^{-}$/Pt olarak tanımladığımız enzim elektrodunu hazırlamak üzere 0,5 M HCl içeren 2 mM $H_2PtCl_6$ çözeltisi içerisinde -0,2 V sabit potansiyelli elektroliz yöntemi kullanılarak $PVF^{+}ClO_4^{-}$/Pt modifiye elektrodu üzerine platin nanopartikül biriktirilmesi Şekil 7.7'de gösterildiği gibi elde edilmiştir.



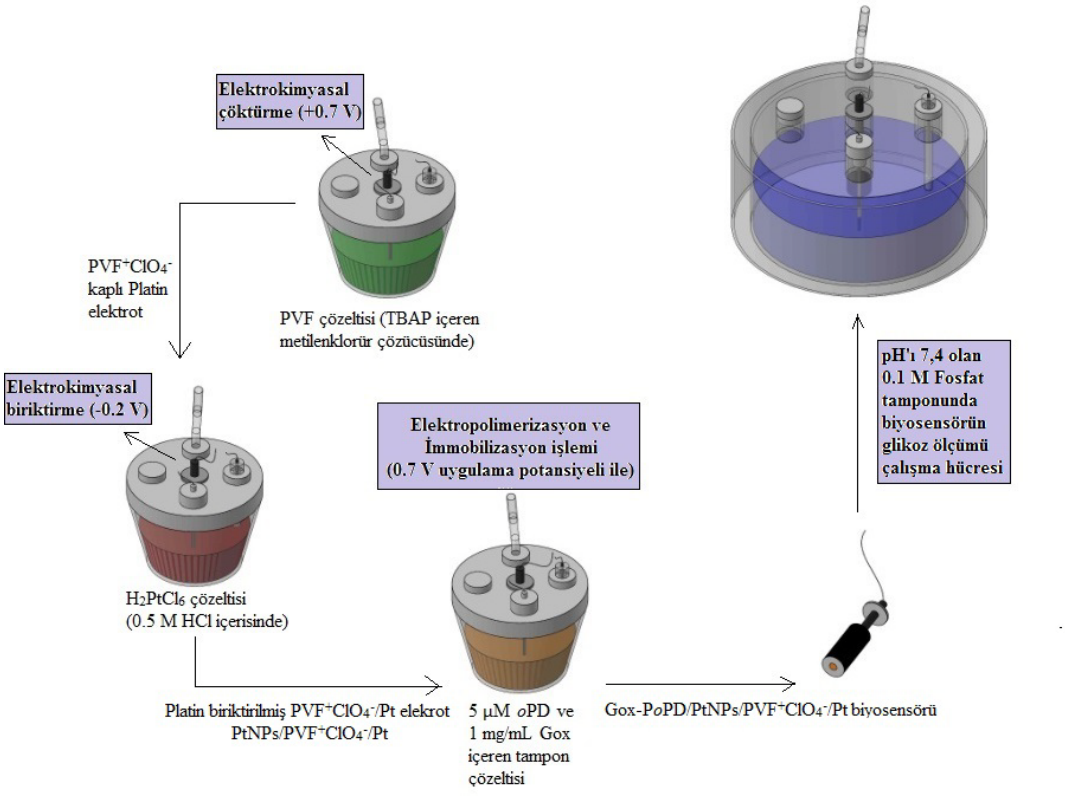

**Şekil 7.7.** Elektrokimyasal biriktirme yöntemi kullanılarak $PVF^{+}ClO_4^{-}$/Pt modifiye elektrodu üzerine platin nanopartikül biriktirilmesi ile elde edilen PtNPs/$PVF^{+}ClO_4^{-}$/Pt elektrodunun şematik gösterimi

Geliştirilen her iki biyosensör için Gox enziminin immobilizasyonu 5 mM *o*PD ve 1 $mgmL^{-1}$ Gox içeren 0,1 M pH'ı 5,4 olan asetat tamponu içerisinde sabit potansiyelli elektroliz ile +0,7 V potansiyelde *o*PD'nin elektrokimyasal polimerizasyonu ile eş zamanlı olarak Şekil 7.8'de gösterildiği gibi gerçekleştirilmiştir.




**Şekil 7.8.** Eş zamanlı olarak gerçekleştirilen Gox enziminin immobilizasyonu ve *o*PD'nin elektrokimyasal polimerizasyonu ile elde edilen elektrotların şematik gösterimi

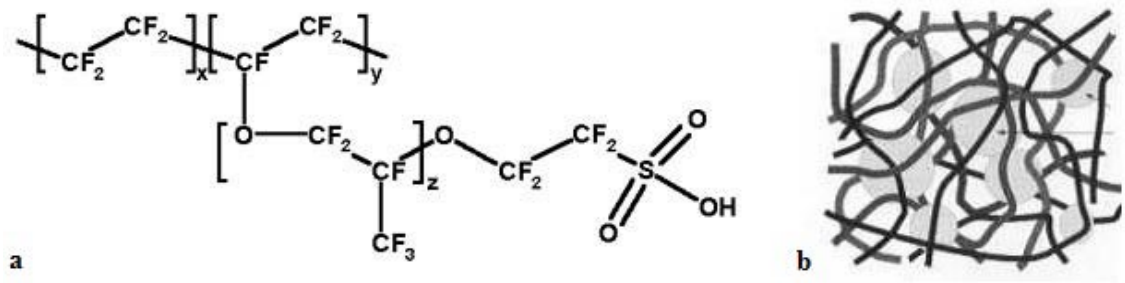
Çalışma elektrodu olarak hazırlanan Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^{+}ClO_4^{-}$/Pt ve Gox-P*o*PD/$PVF^{+}ClO_4^{-}$/Pt biyosensörleri için ölçüm ortamı, karşıt elektrot olarak platin spiral elektrot, referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrot kullanılarak çift çeperli cam hücre içerisine konulan pH'ı 7,4 olan 0,1 M fosfat tamponu içerisinden azot gazı geçirilerek doygun hale getirilerek hazırlanmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalar ile belirlenen uygulama potansiyelinde kararlı hal akım eğrisi elde edildikten sonra 1 $mgmL^{-1}$ Gox enzimi çözeltisinden belirli miktarda eklemeler yapılarak alınan akım cevapları kaydedilmiştir (Şekil 7.9).




**Şekil 7.9.** Biyosensörlerin hazırlanmasına ait şematik gösterim

Hazırlanan biyosensörleri optimize etmek amacıyla uygulama potansiyelinin etkisi, çalışma ortamının sıcaklığı ve pH'ının etkisi, PVF kalınlığının etkisi, *o*PD filminin elektrokimyasal polimerizasyonunun süresinin etkisi, Gox enzimi konsantrasyonunun etkisi konuları üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Çalışma koşullarının optimize edilmesinin yanı sıra biyosensörlerin doğrusal çalışma aralığı, gözlenebilme sınırı, tekrarlanabilirliği, kararlılığı, duyarlığı, Michaelis-Menten sabiti ve aktivasyon enerjisini belirlemek için gerekli çalışmalar yapılmıştır. Ayrıca, hazırlanan biyosensörler ile gerçek numune ve girişim çalışmaları yapılmıştır. Gerçek numune çalışmaları optimize edilmiş koşullarda doğrusal çalışma aralığı dikkate alınarak hazırlanan uygun hacimlerdeki insan kan serumu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Girişim çalışmaları ise elektroaktif ürik asit ve askorbik asit maddeleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve bu türlerin girişimi elektrokimyasal polimerizasyon basamağında kullanılan P*o*PD filminin seçici-geçirgen özelliği ile engellenmiştir. P*o*PD filminin girişim üzerine etkisini incelemek amacıyla biyosensörler polianyonik Nafyon çözeltisi ile kaplanarak girişim çalışması yapılmış ve Nafyonsuz biyosensör kullanılarak elde edilen girişim sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır.

Nafyon, sülfonatlı perflorlanmış bir proton değişim malzemesi olarak elektrokimyasal uygulamalarda girişim yapan maddelerin girişimlerinin engellenmesi için geliştirilen metotlarda yaygın olarak kullanılan yarı geçirgen anyonik bir polimerdir. 1970'lerde Dupont tarafından geliştirilen Nafyon'un iskeletini Teflon™ olarak da bilinen Politetrafloroetilen zincirleri oluşturur. Bu Teflon zincirlerine Şekil 7.10.a'da görüldüğü gibi sülfonik asit ($HSO_3$) ile sona eren yan zincirler tutunmuştur. Zar malzemenin yakından görünüşü Şekil 7.10.b'de görüldüğü gibi spagetti-benzeri zincir molekülleri ile sülfonit yan zincirlerinin bir kümeleşmesi gibidir.




**Şekil 7.10. a)** Nafyonun yapısı, **b)** Nafyonun yakından görünüşü

Bu malzemenin ilginç bir özelliği uzun zincir molekülleri hidrofobik iken; sülfonit yan zincirlerinin yüksek derece hidrofilik (Bilaloğlu, 2004) sülfonat gruplarından oluşan nafyon anyonik yapıların yüzeye tutunmasını engelleyerek askorbik asit ve ürik asit gibi maddelerin geçişini kısıtlarken, hidrojen peroksitin geçişine izin vermektedir (Yuan, 2005). Son yıllarda redoks polimer modifiyeli elektrotların kullanımının yaygınlaşması, kolay hazırlanabilme, iyi elektriksel iletkenlik ve birçok redoks çifti için yüksek partitisyon katsayısına sahip olmasından dolayı nafyonu önemli hale getirmiştir. Nafyon filmler genellikle elektrot modifikasyonunda ve biyosensör hazırlanmasında sıklıkla kullanılmaktadır (Canbay, 2013).

### 7.5.1. Elektrokimyasal polimerizasyon

Elektrokimyasal polimerizasyon polimerlerin sentezini oldukça kolaylaştıran alternatif bir yöntem olarak son yıllarda çok sık kullanılan polimerizasyon yöntemlerinden biridir. İlk elektrokimyasal sentez 1862 yılında Letheby tarafından anilin monomerinin siyah renkli polianilin elde edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. 1990'lı yıllarda ise Szavas bu metodu kullanıp vinil monomerinden elektrokimyasal

polimerizasyon yöntemiyle polivinil elde etmiştir. Elektropolimerizasyon işlemi genellikle sulu veya susuz çözeltiler kullanılarak sabit potansiyelde potansiyostatik olarak ya da belli tarama hızında dönüşümlü voltametri teknikleri kullanılarak karşıt, referans ve çalışma elektrotlarına sahip üç elektrotlu hücre içerisinde monomer ve destek elektrolit üzerinden akım geçirildiğinde çalışma elektrodu yüzeyinde pozitif yüklü çözünmez polimer film tabakası olarak veya çözeltide polimer olarak elde edilmektedir. Elektrokimyasal polimerleşmede karıştırma, polimer zincirlerinin yeteri kadar büyümeden elektrottan uzaklaşmasına, hatta polimerleşmenin tamamen durmasına neden olabilmektedir. Polimerin oluşumu elektrot yüzeyinde gerçekleştiğinden diğer polimerizasyon tekniklerinden farklı olduğu ve film oluşumunun kimyasal mekanizması ve kinetiği incelendiğinde iletken bir yüzeyde gerçekleştiği görülmüştür. İletken yüzeyde elde edilen bu filmlerin oldukça kararlı oldukları ve mekanik özellikleri bakımından çok az bozunmaya uğradıkları yapılan çalışmalar sonucunda görülebilmektedir. Elektrokimyasal polimerleşmede uygun bir gerilim veya akım uygulaması ile polimerleşmenin başlangıç ve bitiş basamaklarının kontrol edilebilmeleri ve sahip olduğu elektrokimyasal stokiyometri ile polimerlerin gelişmesini sağladığı için tercih edilen bir yöntem olmuştur. (Altunbaş, 2008; Şen, 2007; Selçuk, 2010; Türkmen, 2013; Yılmaz, 2010; Kavanoz, 2010; Zeybek, 2010 ve Koyuncu Zeybek, 2010).

Elektrokimyasal polimerizasyonun avantajları;

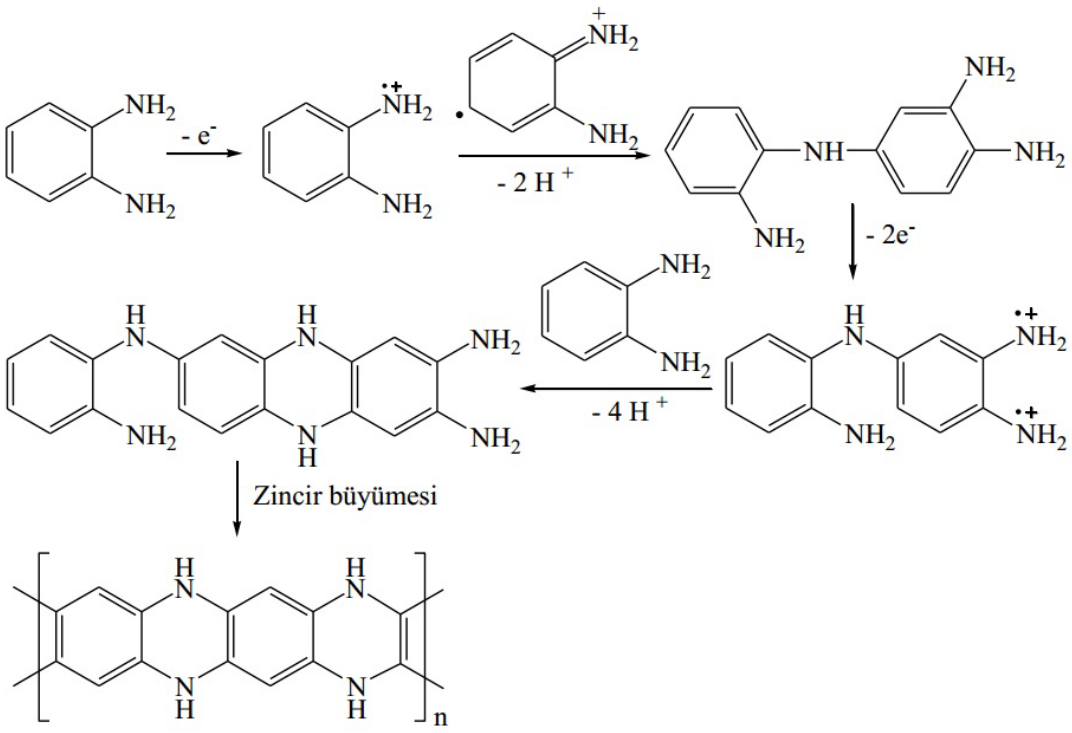
1. Reaksiyonlar oda sıcaklığında gerçekleşir.
2. Homojen filmler oluşturmak mümkündür.
3. Polimer filmler doğrudan elektrot yüzeyinde elde edilir.
4. İstenen iyonla polimerin katkılanması aynı anda gerçekleşir.
5. Filmin kalınlığı kontrol edilir.
6. Hiçbir çözücüde çözünmeyen iletken polimerin elektrot yüzeyinde film oluşumu esnasında IR, UV-vis ve ESR gibi spektroskopik yöntemlerle karakterize edilmesine olanak vermektedir (Kavanoz, 2009; Türkmen, 2013).

Elektropolimerizasyon sürecinde sıcaklık, çözücü sistemi (su içeren), elektrolit, elektrot sistemi, elektrot üzerinde polimerin birikme süresi ve potansiyelin uygunluğu gibi bir dizi önemli değişken dikkate alınmalıdır. Bütün bu parametreler polimer filmin kullanılacağı uygulama türü için farklılık göstermekte ve filmin biçimi (kalınlık ve topografi), mekanik özellikleri ve iletkenliği üzerinde etkili olmaktadır (Schmidt, 2007).

Enzim temelli amperometrik biyosensörlerde, elektropolimerizasyon yolu ile hazırlanmış polimer filmler sıklıkla kullanılmaktadır Biyosensör hazırlanırken kullanılan pek çok yöntemden farklı olarak, elektropolimerizasyon yöntemi kullanılarak polimer film elektrot yüzeyine kolay bir şekilde modifiye edilebilirken polimer filmin homojenliği ve kalınlık kontrolü gibi bazı avantajlar sunmaktadır. Biyosensör üretiminde kullanılan enzimler, monomerlerin elektropolimerizasyonu esnasında iletken polimer ağ içine karşıt anyon olarak girebilir veya elektropolimerizasyondan sonra pozitif yüklü film üzerine immobilize edilebilmektedir (Gerard, 2002; Vidal, 2003 ve Inzelt, 2008). İletken olmayan veya iletkenliği oldukça düşük polimerler biyomoleküllerin immobilizasyonu için yeni bir destek matrisi olarak biyosensör yapımında elektrokimyasal olarak sentezlenerek, hem biyosensörlerin hızını, tekrarlanabilirliğini, duyarlığını ve seçiciliğini geliştirdikleri hem de enzimlerin immobilizasyonu için uygun matris ortamı oldukları için sıklıkla kullanılmaktadırlar.

Polifenol ve türevleri, polifenilendiaminler ve aşırı yükseltgenmiş, elektroinaktif polipirol gibi iletken olmayan polimerleri içeren kompozit yapılar ya da materyaller de amperometrik biyosensör tasarımı için kullanılabilinmektedirler (Zeybek, 2010).

Poli-*o*-fenilendiamin(P*o*PD), polianilin türevi bir polimer olup anilin çekirdeğindeki amino gruplarının hidrojenler ile yer değiştirmesi ile elde edilmektedir. Poli-*o*-fenilendiaminler asidik sulu ortam içinde fenilendiaminlerin kimyasal ve elektrokimyasal yöntemler kullanılarak oligomerleri veya polimerleri sentezlenilebilmektedir. 1960'larda Adams ve arkadaşları tarafından P*o*PD polimeri ilk kez elektrokimyasal yöntemle sentezlenmiştir. O zamandan beri P*o*PD polimerinin polimerizasyon mekanizması, redoks dönüşümü, karalılığı, yapısı ve uygulamaları ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. P*o*PD polimeri ile ilgili birçok uygulama yapılmasına rağmen elektrokimyasal sentez mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Chiba ve arkadaşları sulu ortamda elektropolimerizasyon sonucu oluşan P*o*PD polimerinin kısmen açık fenazin halkalarını esas alan merdiven şeklinde bir yapıdan meydana geldiğini göstermişlerdir. Yapılan araştırmalar sonucu elde edilen bu yapının IR absorbsiyon spektral verilerine göre merdiven yapılı P*o*PD polimerinin Şekil 7.11'de görüldüğü gibi kısmen açık halkalı ve kinon-imin tipi yükseltgenmiş kısımlar içerdiği görülmüştür (Zeybek, 2010).




**Şekil 7.11.** Merdiven yapılı PoPD'nin oluşumu için önerilen mekanizma (Sivakkumar ve Saraswathi, 2004)

Biyosensörlerde seçiciliği geliştirmek için son yıllarda matris ortamı olarak poli-*o*-fenilendiamin (P*o*PD) gibi polimerler yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Bu polimerlerin bazı türlerinin özellikle büyük molekülleri elektrot yüzeyine geçirmeme gibi bir üstünlüğü olduğu söylenmektedir. Özellikle oksidaz temelli biyosensörlerde tayin genellikle $H_2O_2$ indirgenmesi ya da yükseltgenmesine dayandığından elde edilen filmin bu türe geçirgen olması ve gerçek numunelerde bulunabilecek diğer bazı girişim yapan türleri etkili bir şekilde engellemesi gerekmektedir. Enzimler, reseptörler, antikorlar, hücreler gibi biyolojik moleküllerin çoğu çözelti ortamında çok düşük bir kararlılığa (ömre) sahip olmaktadırlar. Biyolojik moleküller uygun bir matris ortamına immobilize edilerek bu sorun ortadan kaldırılabilmektedir. Polifenilendiaminlerin *orto* izomeri olan poli-*o*-fenilendiamin (P*o*PD) polimeri hem seçici geçirgen bir film oluşturması hem de immobilizasyon matrisi oluşturması ve ilave film tabakalarına ihtiyaç duyulmadan ilgili substrat tayinlerinin yapılabilmesi gibi avantajlarından dolayı biyosensör geliştirilmesinde P*o*PD filminin en çok çalışılan formudur (Rothwell, 2008).

Hazırladığımız Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^+ClO_4^-$/Pt ve Gox-P*o*PD/$PVF^+ClO_4^-$/Pt biyosensörlerinin geliştirilmesinde enzimin immobilizasyonu ile eş zamanlı olarak

gerçekleştirilen *o*PD monomerinin elektropolimerizasyonu ile elde edilen P*o*PD filmi, hem seçici geçirgen bir membran hem de enzim immobilizasyonu için uygun bir matris olarak kullanılmıştır. Ancak, P*o*PD film kaplı elektrotlarla ilgili pek çok farklı çalışma bulunmasına rağmen, diğer çalışmalarda, genellikle sulu ortamda film oluşumu gerçekleştirilmekte ve çoğunlukla P*o*PD film sadece seçici geçirgen bir membran olarak kullanılmaktadır. Yapmış olduğumuz bu çalışmada ise hazırlanan P*o*PD film tabakası, hem seçici geçirgen bir membran hem de enzim immobilizasyonu için bir matris olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, P*o*PD filmin, hem elektroaktif maddelerin girişim etkisini gidermede, hem de çalışmada kullanılan enzimlerin immobilizasyonu için matris ortamı oluşturmada etkili olduğu çeşitli çalışmalarda da belirtilmektedir (Garjonyte ve Malinauskas, 1999; Vidal, 1999 ve Yasuzawa, 2000).

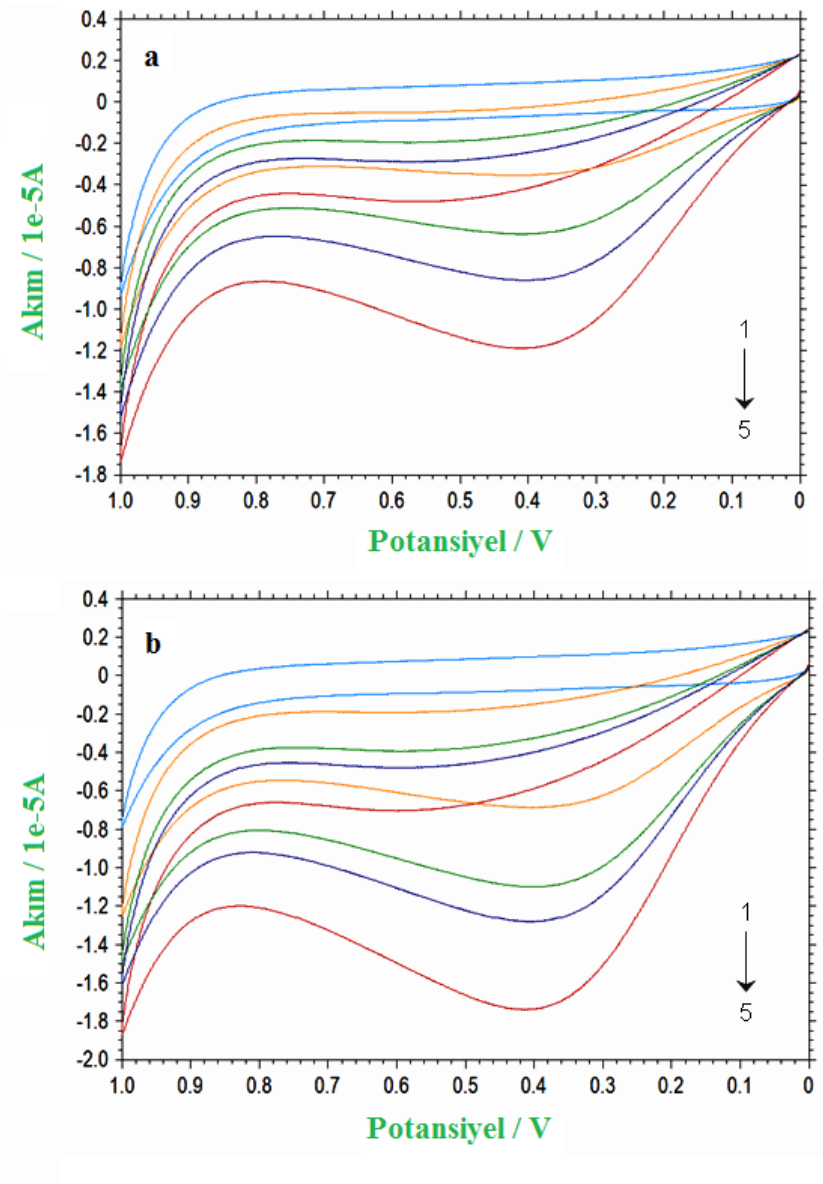
# 8. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

## 8.1. Gox-P*o*PD/PtNPs/PVF$^+$ClO$_4^-$/Pt ve Gox-P*o*PD/PVF$^+$ClO$_4^-$/Pt Biyosensörlerine Ait Araştırma Sonuçları

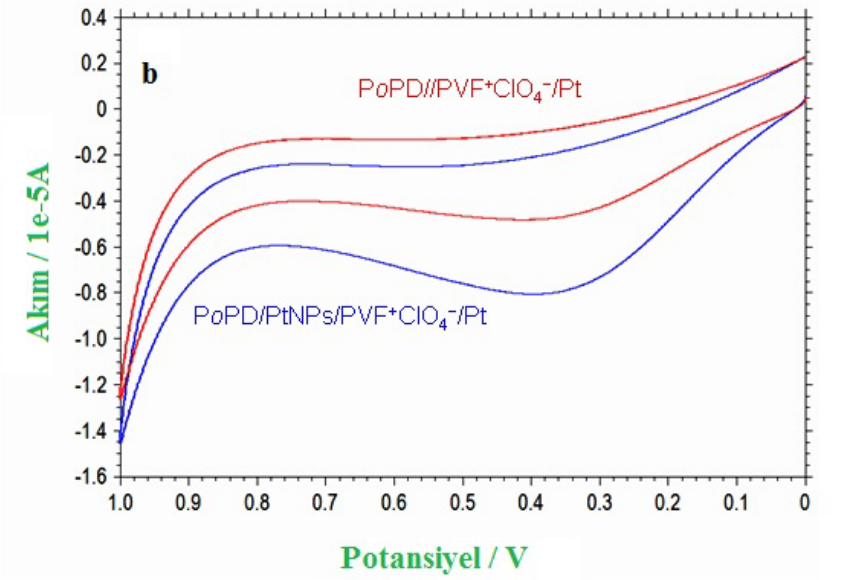
### 8.1.1. Voltametrik ölçümler

Hazırlanan biyosensörler ile yapılan glikoz tayini Gox enzimi ile glikoz arasındaki enzimatik reaksiyon sonucunda oluşan hidrojen peroksitin yükseltgenmesine dayanmaktadır. Bu nedenle, enzim immobilizasyonundan önce P*o*PD/PtNPs/PVF$^+$ClO$_4^-$/Pt elektrodunun hidrojen peroksite karşı voltametrik davranışının incelenmesi biyosensör ile yapacağımız glikoz tayininde bize yol göstericektir. Bu düşünceyle, Şekil 8.1.a'da P*o*PD/PtNPs/PVF$^+$ClO$_4^-$/Pt elektrodunun pH'ı 7,4 olan 0,1 M fosfat tamponu içerisinde, 100 mVs$^{-1}$ tarama hızında 0,5 mM – 2 mM aralığındaki konsantrasyonlarda $H_2O_2$ eklenmesi ile elde edilen voltamogramlar gösterilmektedir. Ölçüm ortamına $H_2O_2$ eklenmesi ile birlikte +0,3 V ile +0,6 V arasında oldukça geniş bir yükseltgenme piki gözlenmiş, ölçüm ortamındaki $H_2O_2$'in konsantrasyonunun artması ile birlikte bu anodik pikin akım şiddeti giderek artmıştır. Bu sonucun biyosensörün glikoza karşı vereceği cevaplar ile tutarlılığınının araştırılması için Gox-P*o*PD/PtNPs/PVF$^+$ClO$_4^-$/Pt biyosensörünün pH'ı 7,4 olan 0,1 M fosfat tamponu içerisinde, 100 mVs$^{-1}$ tarama hızında 1 mM – 4 mM aralığındaki konsantrasyonlarda glikoz eklenmesi ile elde edilen voltamogramlar incelenmiş ve Şekil 8.1.b'de gösterilmiştir. Ölçüm ortamındaki glikoz konsantrasyonundaki artış ile +0,3 V ile +0,6 V aralığında gözlenen yükseltgenme pikinin akım şiddetinde kademeli bir artış gözlenmiştir. $H_2O_2$ ile yapılan voltametrik ölçümler dikkate alındığında, Şekil 8.1.b'de verilen voltamogramlarda gözlenen akım artışının enzimatik reaksiyon sonucunda oluşan $H_2O_2$'in yükseltgenmesine ait olduğu doğrulanmaktadır.

Ayrıca, hazırlanan biyosensörde Pt nanopartiküllerinin katalik etkisinin araştırılması amacıyla, P*o*PD/PVF$^+$ClO$_4^-$/Pt ve P*o*PD/PtNPs/PVF$^+$ClO$_4^-$/Pt elektrotlarının pH'ı 7,4 olan 0,1 M fosfat tamponu içerisinde, 100 mVs$^{-1}$ tarama hızında, 1 mM $H_2O_2$ eklenmesi ile elde edilen voltamogramlar Şekil 8.2'de gösterilmiştir. P*o*PD/PtNPs/PVF$^+$ClO$_4^-$/Pt elektrodunun P*o*PD/PVF$^+$ClO$_4^-$/Pt elektroduna göre $H_2O_2$ eklenmesiyle +0,3 V ile +0,6 V arasında gözlenen pikin akım şiddeti daha büyük olmuştur. Bu sonuç Pt nanopartiküllerinin $H_2O_2$ karşı elektrokatalitik etki gösterdiğini ortaya çıkarmaktadır.



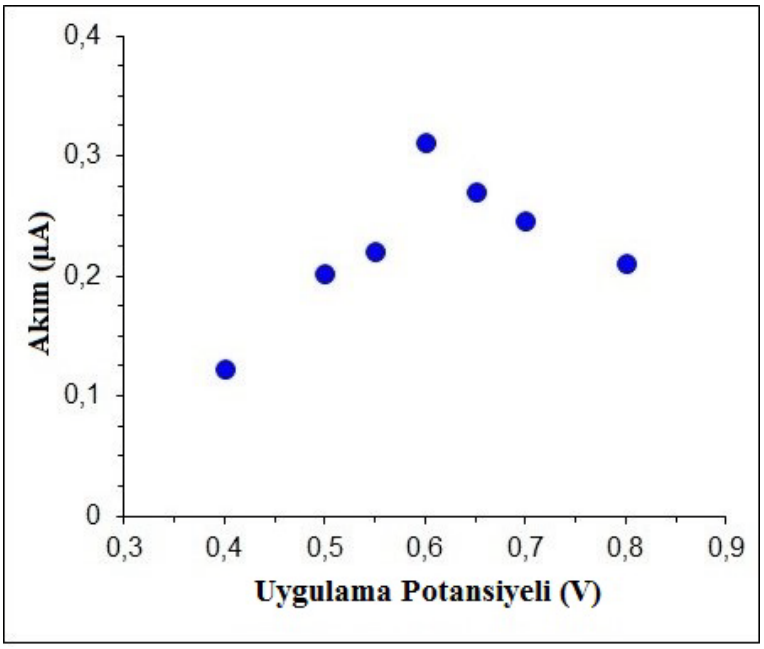

**Şekil 8.1. (a)** PoPD/PtNPs/$PVF^{+}ClO_4^{-}$/Pt elektrodunun 0 mM(1), 0.5 mM(2), 1 mM(3), 1.5 mM(4), 2 mM(5) $H_2O_2$ eklenmesiyle elde edilen voltamogramları. **(b)** Gox-PoPD/PtNPs/$PVF^{+}ClO_4^{-}$/Pt elektrodunun 0 mM(1), 1 mM(2), 2 mM(3), 3 mM(4), 4 mM(5) glikoz eklenmesiyle elde edilen voltamogramları. Tarama hızı: 100 $mVs^{-1}$




**Şekil 8.2.** P*o*PD/PVF$^+$ClO$_4^-$/Pt ve P*o*PD/PtNPs/PVF$^+$ClO$_4^-$/Pt elektrotlarının 1 mM $H_2O_2$ eklenmesiyle elde edilen voltamogramları. Tarama hızı: 100 mVs$^{-1}$

### 8.1.2. Uygulama potansiyelinin etkisi

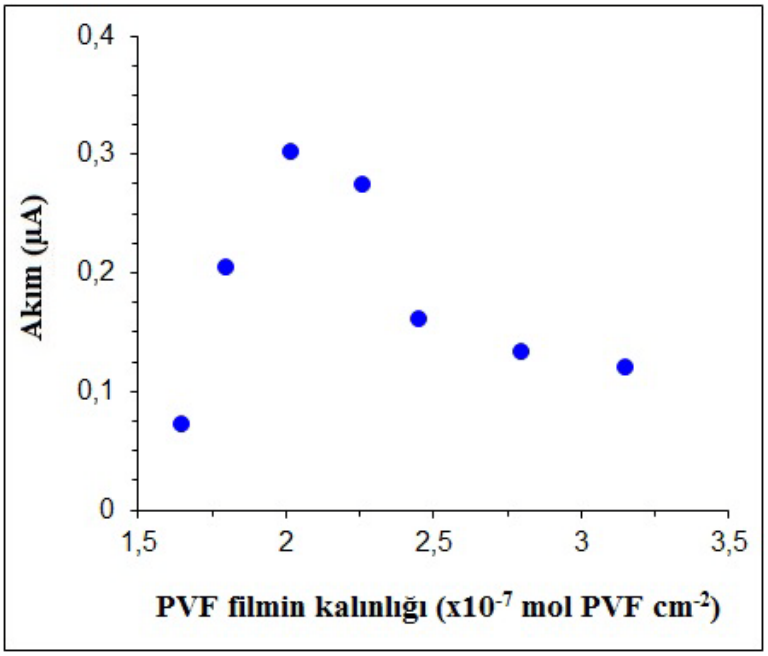
Gox-P*o*PD/PtNPs/PVF$^+$ClO$_4^-$/Pt ve Gox-P*o*PD/PVF$^+$ClO$_4^-$/Pt biyosensörlerinin glikoza verdiği akım cevabı üzerine uygulama potansiyeli etkisinin incelenmesi amacıyla +0,4 V ile +0,8 V çalışma potansiyeli aralığında çalışmalar yapılmıştır. Bu konuda yapılan her bir çalışmada pH'ı 7,4 olan 0,1 M fosfat tamponu içerisinde +0,4 V ile +0,8 V arası 1 µM glikoza karşı akım cevapları incelenmiş ve bu akım cevaplarındaki değişim Şekil 8.3'te gösterilmiştir. İncelemeler sonucunda +0,4 V ile +0,6 V arasında potansiyel arttıkça akım değerlerinin arttığı gözlenmiştir. Ancak, +0,6 V potansiyelde maksimum akım cevabı alındıktan sonra uygulama potansiyelindeki artış ile birlikte hazırlanan biyosensörün akım cevaplarında azalma olduğu gözlenmiştir. Sonuçların Şekil 8.2'de verilen farklı konsantrasyonda ki glikoz varlığında elde edilen Gox-P*o*PD/PtNPs/PVF$^+$ClO$_4^-$/Pt biyosensörünün voltamogramları ile uyumlu olduğu görülmüştür. Bu nedenle takip eden deneylerde glikozun amperometrik tayini için uygulama potansiyeli olarak +0,6 V seçilmiştir.




**Şekil 8.3.** Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^+ClO_4^-$/Pt biyosensörüne akım cevabı üzerine uygulama potansiyelinin etkisi ($2{,}02\times10^{-7}$ mol PVF $cm^{-2}$ 2,0 mM $H_2PtCl_6$ $2{,}00\times10^{-2}$ C Pt film kalınlığı, 5µM *o*PD, 1,0 mg Gox $mL^{-1}$, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30°C)

### 8.1.3. $PVF^+ClO_4^-$ film kalınlığının etkisi

Polimerik film kalınlığının hazırlanan biyosensörün akım cevabı üzerine etkisi her bir elektrodun $PVF^+ClO_4^-$ filminin 0,5 mC ($1{,}65\times10^{-7}$ mol/$cm^2$) ile 1,8 mC ($3{,}15\times10^{-7}$ mol/$cm^2$) arasındaki çeşitli kalınlıklarla kaplanması ile pH'ı 7,4 olan 0,1 M fosfat tamponu içerisinde +0,6 V uygulama potansiyelinde, ortama eklenen 0,1 µM glikoza karşı biyosensörün akım cevaplarındaki değişimler ölçülerek incelenmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen veriler kaydedilerek Şekil 8.4'te gösterilmiştir. İncelemeler sonucunda polimer film kalınlığı 0,5 mC ($1{,}65\times10^{-7}$ mol/$cm^2$)'den 0,8 mC ($2{,}02\times10^{-7}$ mol/$cm^2$) değerine yükselmesi ile elektrodun akım cevabı artmaya devam etmiştir. Ancak 0,8 mC ($2{,}02\times10^{-7}$ mol/$cm^2$)'den sonra akım cevaplarının aniden azaldığı görülmüştür. Daha sonra artan film kalınlığı ile birlikte alınan akım cevapları yavaş yavaş azalmaya devam etmiştir.



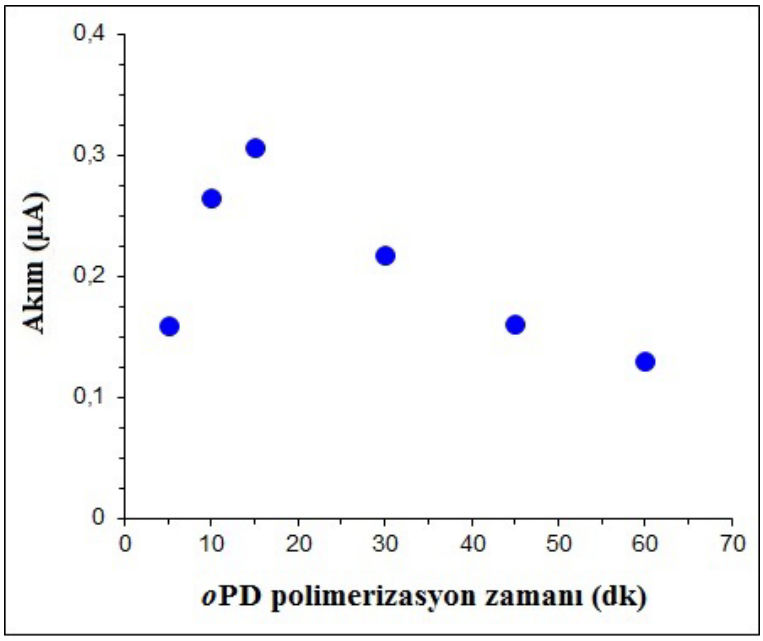

**Şekil 8.4.** Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^{+}ClO_4^{-}$/Pt biyosensörü için akım cevabı üzerine $PVF^{+}ClO_4^{-}$ film kalınlığının etkisi (5 µM *o*PD, 1,0 mg Gox $mL^{-1}$, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30°C)

Daha büyük film kalınlığına sahip biyosensörlerde akım cevabının düşmesi, polimer film kalınlığının polimer matris içerisine glikozun difüzyon hızını etkilemesinin yanı sıra biyosensörlerin akım cevaplarını da önemli ölçüde düşürmektedir (Gülce, 1995). Aynı miktardaki glikozun ölçüm ortamına eklenmesi ile birlikte daha büyük film kalınlığına sahip biyosensörün cevap sürelerinin hem uzadığı hem de akım değerlerinin küçüldüğü gözlemlenmiştir.

### 8.1.4. *o*PD filminin elektropolimerizasyon süresi ve konsantrasyonu

Hazırlanan biyosensörün akım cevabı üzerine *o*PD'nin sabit potansiyelde elektroliz yöntemi ile polimerizasyonuna elektroliz süresinin yani bir başka deyişle *o*PD film kalınlığının etkisini incelemek amacıyla 5 dk, 10 dk, 15 dk, 30 dk, 45 dk ve 60 dk olmak üzere farklı sürelerde *o*PD'nin elektropolimerizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu polimerizasyon işlemi +0,7 V 'da pH'ı 5,4 olan 0,1 M asetat tamponunda Gox enziminin immobilizasyonu ile eş zamanlı olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen elektrotlar kullanılarak +0,6 V potansiyelde pH'ı 7,4 olan 0,1 M fosfat tamponu içerisine 1 µM glikoz eklenmesi sonucu alınan akım cevapları kaydedilmiştir. Elde edilen akım değerleri Şekil 8.5'teki *o*PD'nin elektropolimerizasyon zamanına karşı akım grafiğinde gösterilmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen en yüksek akım cevabı

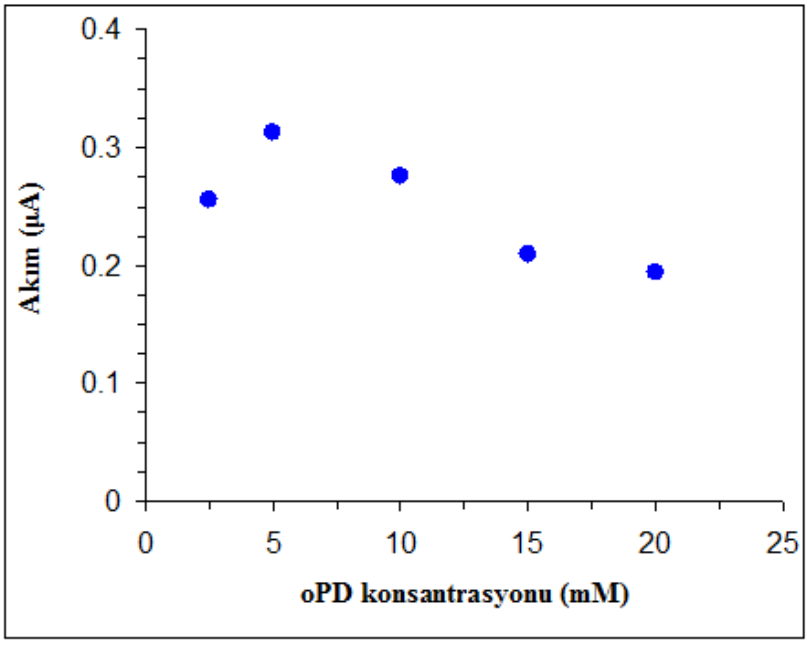
*o*PD'nin 15 dk'lık elektrolizi ile gözlenmiş ve *o*PD'nin elektropolimerizasyonu için en uygun elektroliz süresinin 15 dk olduğuna karar verilmiştir. Elektropolimerizasyon süresi elektrot üzerinde üretilen polimerin büyüme oranını, film kalınlığını ve film kalitesini etkilemektedir. Ayrıca, daha uzun elektropolimerizasyon süresinde hazırlanan biyosensörlerin cevaplarındaki azalma substratın sınırlı difüzyonundan da kaynaklanabilir. Bundan sonraki deneysel çalışmalarda Gox enzimi ile aynı hücrede eş zamanlı olarak sabit potansiyelde elektroliz yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen P*o*PD filminin elektropolimerizasyon süresi 15 dk olarak çalışılmıştır.




**Şekil 8.5.** Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^{+}ClO_4^{-}$/Pt biyosensörüne *o*PD filminin elektropolimerizasyon süresinin akım cevabı üzerine etkisi ($2{,}02\times10^{-7}$ mol PVF $cm^{-2}$ 2,0 mM $H_2PtCl_6$ $2{,}00\times10^{-2}$ C Pt film kalınlığı, 5µM *o*PD, 1,0 mg Gox $mL^{-1}$, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30°C)

Hazırlanan biyosensörün akım cevabı üzerine *o*PD'nin sabit potansiyelde elektroliz yöntemi ile polimerizasyonu için *o*PD monomeri ile hazırlanan çözelti konsantrasyonun etkisini incelemek amacıyla 2,5 µM ile 20µM konsantrasyon aralığında olmak üzere farklı konsantrasyonlarda *o*PD'nin elektropolimerizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu polimerizasyon işlemi +0,7 V 'da pH'ı 5,4 olan 0,1 M asetat tamponunda Gox enziminin immobilizasyonu ile eş zamanlı olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen elektrotlar kullanılarak +0,6 V potansiyelde pH'ı 7,4 olan 0,1 M fosfat tamponu içerisine 1 µM glikoz eklenmesi sonucu alınan akım cevapları kaydedilmiştir. Elde edilen akım değerleri Şekil 8.6'daki *o*PD'nin konsantrasyonuna karşı akım

grafiğinde gösterilmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen en yüksek akım cevabı *o*PD'nin 5µM'lık çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilen elektrolizi ile gözlenmiş ve *o*PD'nin elektropolimerizasyonu için en uygun elektroliz konsantrasyonun 5µM olduğuna karar verilmiştir.

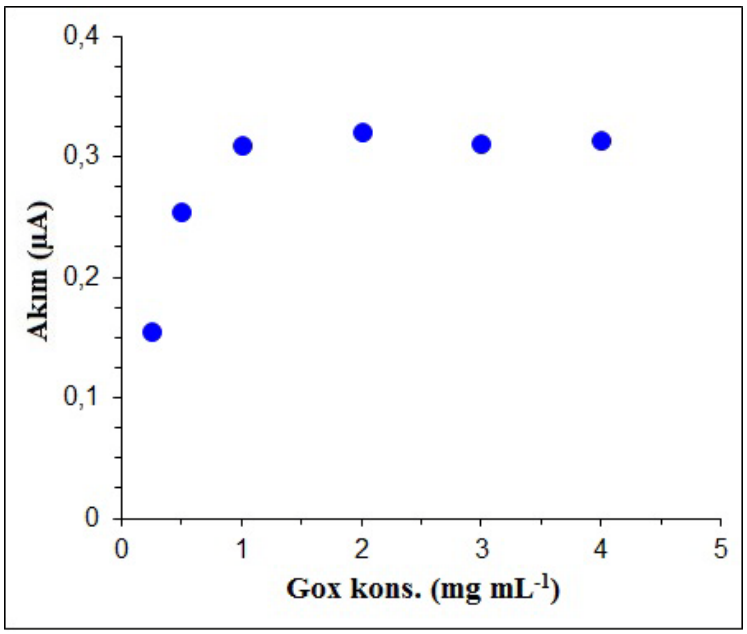



**Şekil 8.6.** Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^{+}ClO_4^{-}$/Pt biyosensörüne *o*PD konsantrasyonunun akım cevabı üzerine etkisi ($2{,}02\times10^{-7}$ mol PVF $cm^{-2}$ 2,0 mM $H_2PtCl_6$ $2{,}00\times10^{-2}$ C Pt film kalınlığı, 2,5-20 µM *o*PD, 1,0 mg Gox $mL^{-1}$, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30°C)

### 8.1.5. Gox enzim konsantrasyonunun etkisi

Hazırlanan biyosensörün akım cevaplarını etkileyen parametrelerden bir tanesi de polimerik matris içerisine immobilize olan Gox enziminin miktarıdır. Tutuklanan Gox enziminin miktarı ise immobilizasyon işlemi sırasında kullanılan çözeltide bulunan çözünmüş Gox enziminin miktarına bağlı olduğu bilinmektedir. Biyosensörün 1µM glikoza verdiği akım cevabı üzerine Gox enziminin konsantrasyon etkisini incelemek amacıyla 0,25 $mgmL^{-1}$ ile 4 $mgmL^{-1}$ arasında değişen enzim konsantrasyonları ile Gox enziminin immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu immobilizasyon işlemi +0,7 V 'da pH'ı 5,4 olan 0,1 M asetat tamponunda 5µM *o*PD ve farklı konsantrasyonda Gox enzim çözeltileri kullanılarak eş zamanlı olarak gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan elektrotlar +0,6 V çalışma potansiyelinde pH'ı 7,4 olan 0,1 M fosfat tamponu içerisinde 1µM glikozun eklenmesi sonucu alınan akım cevapları kaydedilmiştir. Elde edilen sonuçlar kullanılarak Gox enzim konsantrasyonuna karşı akım cevapları Şekil 8.7'de gösterilen

grafiğe aktarılmıştır. Grafikte de görüldüğü gibi immobilizasyon işlemi sırasında kullanılan Gox enzim konsantrasyonunun artması ile akım cevaplarının 1mgmL$^{-1}$ enzim konsantrasyonuna kadar arttığı görülmüştür. Düşük Gox enzim konsantrasyonunda daha düşük akım değerlerinin elde edilmesi polimerik yapı içerisine yeterli miktarda enzimin tutuklanamaması nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Çözeltideki Gox enzim konsantrasyonu belirli bir konsantrasyondan sonra artmasıyla alınan akım cevabının önemli miktarda değişmediği görülmüştür. Bunun sebebinin ise belli bir Gox enzim konsantrasyonundan sonra polimer matris içerisinde maksimum miktarda enzim tutuklanmış olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bundan sonra yapılan çalışmalarda Gox enzim konsantrasyonu olarak akım cevabının sabit bir değere ulaştığı ilk değer olan 1 mgmL$^{-1}$ seçilmiştir.

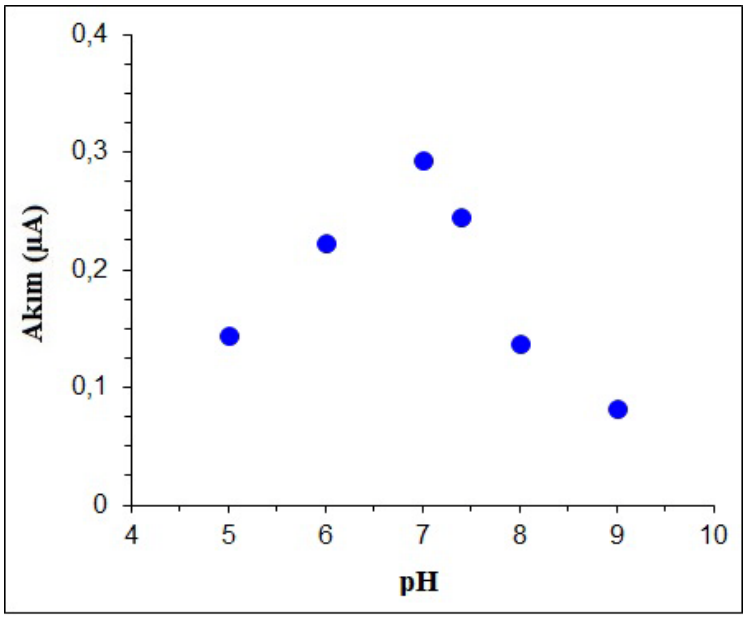



**Şekil 8.7.** Gox-P*o*PD/PtNPs/PVF$^{+}$ClO$_4^{-}$/Pt biyosensörü için akım cevabı üzerine Gox enzim konsantrasyonunun etkisi (2,02×10$^{-7}$ mol PVF cm$^{-2}$ 2,0 mM $H_2PtCl_6$ 2,00×10$^{-2}$ C Pt film kalınlığı, 5µM *o*PD, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30°C)

### 8.1.6. pH etkisi

Enzim aktivitesi yüksek oranda ortamın sıcaklığı ve pH'ına bağlıdır. Bu nedenle her enzimin en yüksek aktivite gösterdiği optimum sıcaklık ve pH'ının belirlenmesi gerekmektedir. Söz konusu bu durum aynı şekilde immobilize enzimler için de geçerli olmaktadır. Buna bağlı olarak hazırlanan biyosensörün akım cevabı üzerine pH'ın

etkisini incelemek amacıyla +0,6 V çalışma potansiyelinde, ortam pH'ı 5,0-9,0 aralığında değişen 0,1 M fosfat tamponu içerisine 1 µM glikoz eklenmesi ile elde edilen akım cevapları kaydedilerek Şekil 8.8'de gösterilmiştir. Grafik incelendiğinde en yüksek akım cevabının ölçüm ortamının pH'ı 7 iken alındığı gözlenmiştir.



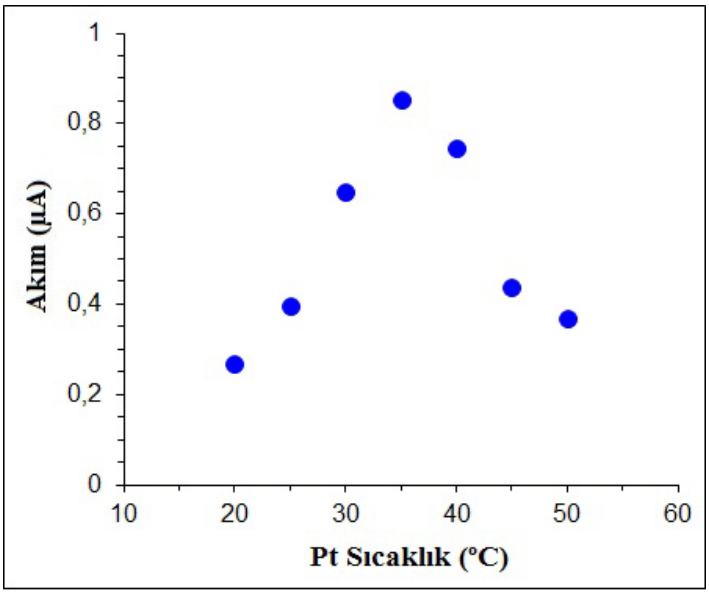

**Şekil 8.8.** Gox-P*o*PD/PtNPs/PVF$^{+}$ClO$_4^{-}$/Pt biyosensörü için akım cevabı üzerine pH'ın etkisi ($2{,}02\times10^{-7}$ mol PVF cm$^{-2}$ 2,0 mM $H_2PtCl_6$ $2{,}00\times10^{-2}$ C Pt film kalınlığı, 5µM *o*PD, 1,0 mg Gox mL$^{-1}$, pH'ı 5,0-9,0 aralığında 0,1 M fosfat tamponu, 30°C)

### 8.1.7. Sıcaklık etkisi

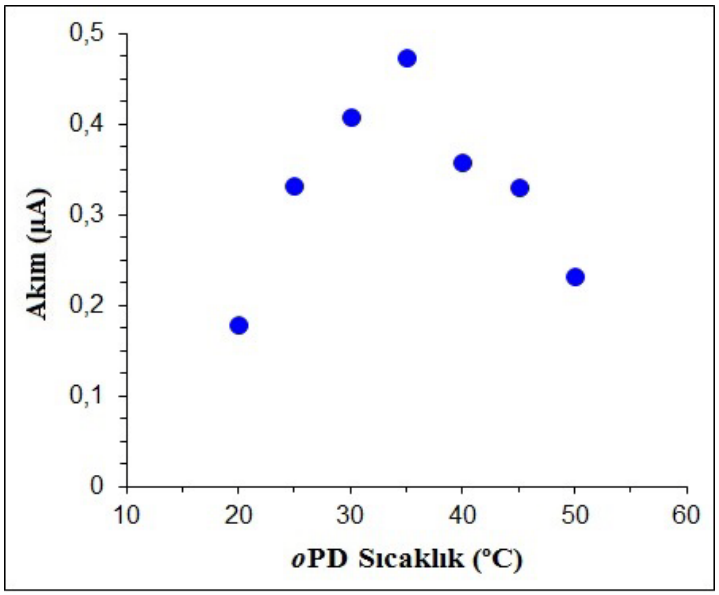
Sıcaklık, enzimlerin kararlılığını ve enzimatik reaksiyonların hızını etkileyen önemli bir faktördür. Aynı zamanda çalışma sıcaklığı difüzyonu olumlu yönde etkileyerek cevap süresinin kısalmasına yol açmaktadır. Özellikle pH'ın tamponla sabit tutulduğu reaksiyon ortamında, ortam sıcaklığı arttıkça reaksiyon hızı da belirli bir noktaya kadar artmaya devam etmektedir. Enzimlerin maksimum aktivite gösterdiği bu sıcaklığa optimum sıcaklık denir. Ancak enzimin optimum sıcaklığı üzerindeki sıcaklıklarda çalışıldığında reaksiyon hızında enzim denatürasyonundan kaynaklanan ani düşüşler meydana gelmektedir.

Gox-P*o*PD/PtNPs/PVF$^{+}$ClO$_4^{-}$/Pt ve Gox-P*o*PD/PVF$^{+}$ClO$_4^{-}$/Pt biyosensörlerinin akım cevapları üzerine sıcaklığın etkisi pH'ı 7 olan 0,1 M fosfat tamponu içerisinde ve 20ºC ile 55ºC aralığında değişen ölçüm ortamında, +0,6 V uygulama potansiyelinde biyosensörlerin 1 µM glikoza karşı alınan akım cevapları kaydedilmiştir (Şekil 8.9 ve

8.10). Grafikler incelendiğinde 20-35ºC sıcaklık aralığında artan sıcaklıkla birlikte biyosensörün akım cevabının arttığı ancak 35ºC üzerindeki sıcaklıklarda akım cevabının azaldığı görülmüştür. Gox enzimi için optimum sıcaklığın 35ºC olduğu ve 35ºC üzerindeki sıcaklıklarda Gox enziminin denatüre olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda akım cevaplarındaki bu azalmada yüksek sıcaklıklarda tampon çözelti içerisindeki moleküler oksijen konsantrasyonunun azalmasının da etkili olduğu düşünülmektedir.




**Şekil 8.9.** Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^{+}ClO_4^{-}$/Pt biyosensörü için akım cevabı üzerine sıcaklığın etkisi ($2{,}02\times10^{-7}$ mol PVF $cm^{-2}$ 2,0 mM $H_2PtCl_6$ $2{,}00\times10^{-2}$ C Pt film kalınlığı, 5µM *o*PD, 1,0 mg Gox $mL^{-1}$, 0,10 M pH 7 fosfat tamponu)



**Şekil 8.10.** Gox-P*o*PD/$PVF^+ClO_4^-$/Pt biyosensörü için akım cevabı üzerine sıcaklığın etkisi ($2{,}02\times10^{-7}$ mol PVF $cm^{-2}$ 2,0 mM $H_2PtCl_6$ $2{,}00\times10^{-2}$ C Pt film kalınlığı, 5µM *o*PD, 1,0 mg Gox $mL^{-1}$, 0,10 M pH 7 fosfat tamponu)

Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^+ClO_4^-$/Pt ve Gox-P*o*PD/$PVF^+ClO_4^-$/Pt biyosensörleri için 20-35ºC aralığında artan akım değerleri kullanılarak biyosensörlerde gerçekleşen enzimatik reaksiyon hızının sıcaklıkla değişimi ve bu değişime bağlı olarak reaksiyonun aktivasyon enerjisi hesaplanmıştır. Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^+ClO_4^-$/Pt ve Gox-P*o*PD/$PVF^+ClO_4^-$/Pt biyosensörleri için enzimatik reaksiyonun aktivasyon enerjileri Arrhenius eşitliği kullanılarak belirlenmiştir. Biyosensörün akım cevabı üzerine sıcaklığın etkisi aşağıdaki Arrhenius eşitliği ile tanımlanmaktadır:

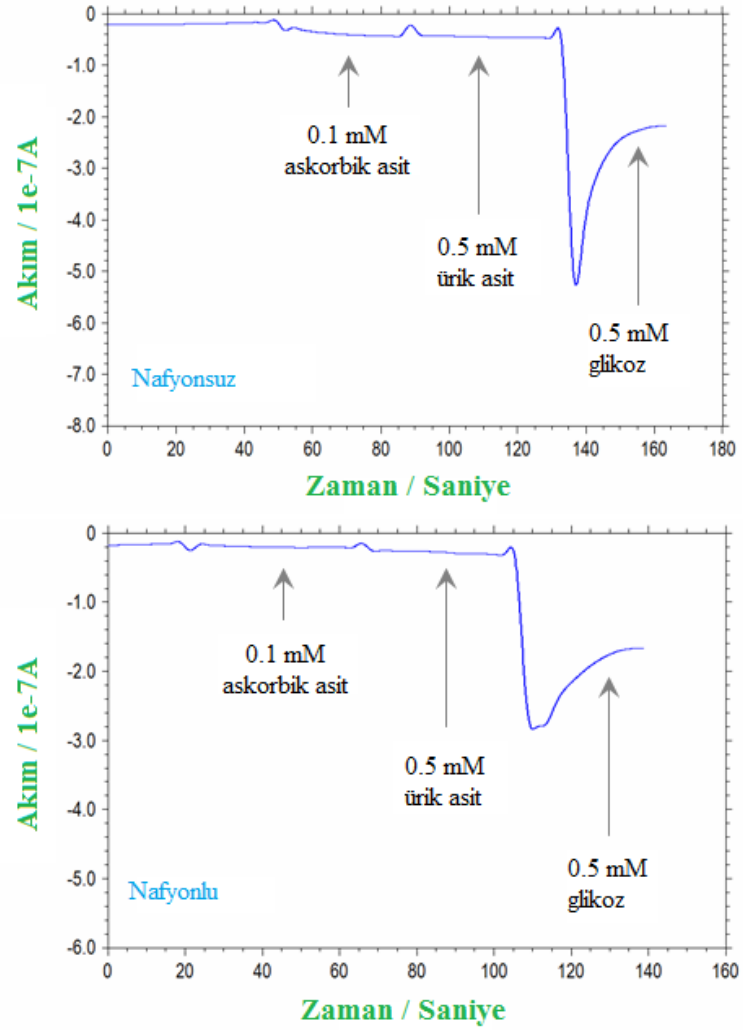
$$i(T) = i_0 \exp(-E_a/RT) \qquad (8.1)$$

Bu eşitlikte; $i_0$ : akımların toplamı, i : kararlı hal akımı, $E_a$: aktivasyon enerjisi, R : Evrensel (universal) gaz sabiti, $T$ : Kelvin mutlak sıcaklığı şeklindedir. Arrhenius eşitliği kullanılarak çizilen ln$i$ - 1/$T$ grafiğinin eğiminden Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^+ClO_4^-$/Pt ve Gox-P*o*PD/$PVF^+ClO_4^-$/Pt biyosensörleri için sırasıyla 59,8 $kjmol^{-1}$ ve 47,20 $kjmol^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.

### 8.1.8. Girişim etkisi

Amperometrik bir biyosensör için en önemli faktörlerden biri biyosensörün analite karşı olan seçiciliğidir (Fuang, 2010). Çalışma elektrotlarına yüksek bir anodik potansiyel uygulanmasıyla kanda bulunan glikozun yanı sıra bazı maddeler (ürik asit, askorbik asit v.b.) de yükseltgenebilir. Bu durum, amperometrik cevap akımının artmasına dolayısıyla glikozun kandaki gerçek değerinden daha yüksek bir değerde bulunmasına sebep olmaktadır. Bu bilgilere dayanarak Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^+ClO_4^-$/Pt ve Gox-P*o*PD/$PVF^+ClO_4^-$/Pt biyosensörleri üzerine girişim yapan türlerin etkisini incelemek amacıyla pH'ı 7 olan 0,1 M fosfat tamponunda +0,6 V çalışma potansiyelinde, ölçüm ortamına normal fizyolojik seviyelerde hazırlanan elektroaktif ürik asit (0,1 mM) ve askorbik asit (0,5 mM) türlerinin eklenmesi sonucu elde edilen akım cevapları glikozun (0,5 mM) akım cevaplarıyla karşılaştırılmıştır. Şekil 8.11'de görüldüğü gibi Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^+ClO_4^-$/Pt biyosensörünün ürik sit ve askorbik asite karşı akım cevapları verilmiştir. Bu girişim maddelerine karşı elde edilen cevaplar

biyosensörün glikoza karşı verdiği cevaplar ile karşılaştırıldığında kayda değer akım cevapları gözlenmemiştir. Bu durumun Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^{+}ClO_4^{-}$/Pt biyosensörünün hazırlanmasında kullanılan P*o*PD filminin girişim yapan elektroaktif türlere karşı seçici geçirgenlik özelliği göstermesine bağlanabilir. Aynı zamanda *o*PD girişim etkisini karşılaştırmak amacıyla Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^{+}ClO_4^{-}$/Pt biyosensörü anyonik bir polimer olan 2,5 µL nafyon çözeltisi ile kaplanmıştır. Nafyon ile kaplanan biyosensör pH'ı 7,4 olan 0,1 M fosfat tamponunda +0,6 V çalışma potansiyelinde ölçüm ortamına normal fizyolojik seviyelerde hazırlanan elektroaktif ürik asit ve askorbik asit maddelerinin eklenmesi sonucu elde edilen akım cevapları incelenmiştir. Elde edilen akım cevapları nafyon kullanmaksızın hazırlanan biyosensörün aynı maddelere verdiği cevaplar ile karşılaştırıldığında önemli bir farklılık görülmemiştir. Ancak, nafyonlu ve nafyonsuz hazırlanan biyosensörlerin +0,6 V'da glikoza karşı verdiği cevaplar incelendiğinde Nafyon/Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^{+}ClO_4^{-}$/Pt biyosensörünün akım cevabı Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^{+}ClO_4^{-}$/Pt biyosensörün cevabına göre %21 azaldığı belirlenmiştir. Akım cevabındaki bu azalmanın nafyon çözeltisinin organik çözücülüğü ile bir miktar enzimin denatüre olmasından kaynaklanabileceği gibi nafyonun oluşturduğu film tabakasının glikozun difüzyonunu sınırlayabileceğini de söylemek mümkündür. Bütün bu sonuçlar incelendiğinde, hazırlanmasında kullanılan P*o*PD sayesinde Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^{+}ClO_4^{-}$/Pt biyosensörünün ürik asit ve askorbik asit maddelerine karşı +0,6 V'da yapılan glikoz tayininde girişim etkisi göstermediği belirlenmiştir.




**Şekil 8.11.** Gox-P*o*PD/PtNPs/PVF$^{+}$ClO$_4^{-}$/Pt ve Nafyon/Gox-P*o*PD/PtNPs/PVF$^{+}$ClO$_4^{-}$/Pt biyosensörleri için akım cevabı üzerine girişim etkisi ($2{,}02\times10^{-7}$ mol PVF cm$^{-2}$ 2,0 mM $H_2PtCl_6$ $2{,}00\times10^{-2}$ C Pt film kalınlığı, 5µM *o*PD, 1,0 mg Gox mL$^{-1}$, pH'ı 7 olan 0,1 M fosfat tamponu, 30°C)

### 8.1.9. Tekrarlanabilirlik ve tekrar kullanılabilirlik

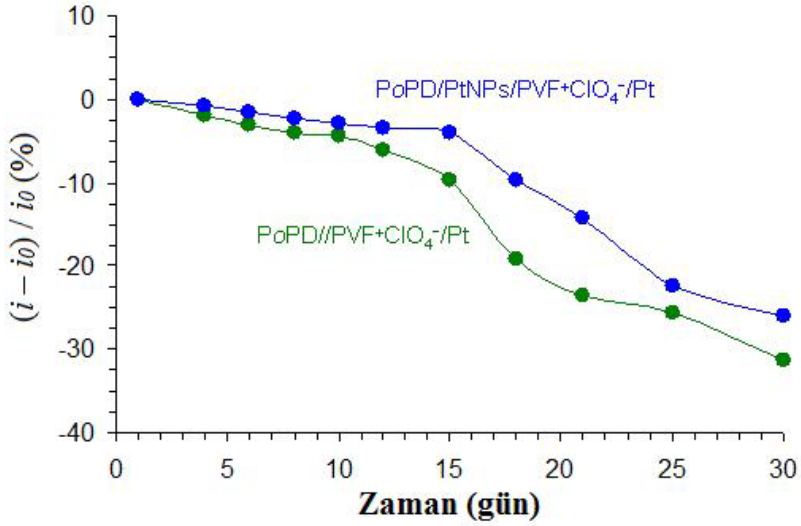
Gox-P*o*PD/PtNPs/PVF$^{+}$ClO$_4^{-}$/Pt ve Gox-P*o*PD/PVF$^{+}$ClO$_4^{-}$/Pt biyosensörlerinin tekrar kullanılabilirliğini belirlemek amacıyla pH'ı 7 olan 0,1 M fosfat tamponu içerisinde +0,6 V çalışma potansiyelinde optimize edilmiş şartlarda hazırlanan elektrodun ard arda 7 kez 1 µM glikoza verdiği akım cevapları kaydedilerek elde edilen ölçüm değerlerinin bağıl standart sapmaları hesaplanmıştır. Hesaplanan bağıl standart sapmaları Gox-P*o*PD/PtNPs/PVF$^{+}$ClO$_4^{-}$/Pt biyosensörü için %3,03 ve Gox-P*o*PD/PVF$^{+}$ClO$_4^{-}$/Pt biyosensörü için %4,58 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar geliştirdiğimiz glikoz biyosensörlerin tekrar kullanılabilirliğinin oldukça iyi olduğunu göstermiştir.

Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^+ClO_4^-$/Pt ve Gox-P*o*PD/$PVF^+ClO_4^-$/Pt biyosensörlerinin tekrarlanabilirliğini (kesinlik) belirlemek amacıyla pH'ı 7 olan 0,1 M fosfat tamponu içerisinde +0,6 V çalışma potansiyelinde optimize edilmiş şartlarda hazırlanan elektrotların 1 µM glikoza verdiği akım cevabı kaydedilerek elde edilen ölçüm değerlerinin bağıl standart sapmaları hesaplanmıştır. Hesaplanan bağıl standart sapmaları Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^+ClO_4^-$/Pt biyosensörü için %4,64 ve Gox-P*o*PD/$PVF^+ClO_4^-$/Pt biyosensörü için %4,93 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar aynı şartlarda hazırlanmış farklı elektrotlardan glikoza karşı alınan akım cevapları arasındaki uyum derecesini gösteren tekrarlanabilirliğinin (kesinlik) oldukça iyi olduğunu göstermiştir.

### 8.1.10. Kararlılık

Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^+ClO_4^-$/Pt ve Gox-P*o*PD/$PVF^+ClO_4^-$/Pt biyosensörleri için depolama kararlılığını (ömrünü) belirlemek amacıyla pH'ı 7 olan 0,1 M fosfat tamponu içerisinde +0,6 V çalışma potansiyelinde optimize edilmiş şartlarda hazırlanan biyosensörlerin 30 gün boyunca belirli aralıklar ile 1 µM glikoza karşı verdiği akım cevapları kaydedilmiş ve sonuçlar Şekil 8.12'de gösterilmiştir. Grafikte $i_0$, hazırlanan biyosensörün 1 µM glikoza karşı verdiği akım cevabını; *i*, biyosensörün herhangi bir zamanda 1 µM glikoza karşı verdiği akım cevabını göstermekdir.

30 gün süren çalışmaların ilk 15 gününde Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^+ClO_4^-$/Pt biyosensörünün glikoza karşı akım cevabının %95'ini koruyarak oldukça iyi bir kararlılık gösterdiği gözlenmiştir. 30 günün sonunda yapılan ölçümlerde Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^+ClO_4^-$/Pt biyosensörünün %26'lık bir aktivite kaybına uğradığı gözlenmiştir. Gox-P*o*PD/$PVF^+ClO_4^-$/Pt biyosensörü için depolama kararlılığının Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^+ClO_4^-$/Pt biyosensörüne göre biraz daha kısa olduğu görülmüş olup. 15 gün sonra alınan akım cevabının %90'ının korunduğu gözlenmiştir. Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^+ClO_4^-$/Pt biyosensörünün daha iyi bir kararlılığa sahip olmasının sebebi Pt nanopartikül- $PVF^+ClO_4^-$ polimer matrisi kararlı olmasından kaynaklandığı düşünülebilir.




**Şekil 8.12.** Gox-P*o*PD/PtNPs/PVF$^{+}$ClO$_4^{-}$/Pt ve Gox-P*o*PD/PVF$^{+}$ClO$_4^{-}$/Pt biyosensörlerinin akım depolanma kararlılığı ($2{,}02\times10^{-7}$ mol PVF cm$^{-2}$ 2,0 mM $H_2PtCl_6$ $2{,}00\times10^{-2}$ C Pt film kalınlığı, 5µM *o*PD, 1,0 mg Gox mL$^{-1}$, pH'ı 7 olan 0,1 M fosfat tamponu, 30°C)

Bu sonuçlar hazırlanan biyosensörlerin uzun süre kullanılabileceğini göstermiştir. Biyosensörler kullanılmadığı zamanlarda +4ºC'de 0,1 M pH'ı 7 olan fosfat tamponu içerisinde muhafaza edilmiştir.

Biyosensörün amperometrik cevabının zamanla azalmasının nedeni enzimlerin uygun ortam koşullarında saklanmış olmalarına rağmen belli bir zaman içinde immobilize enzimin aktivite kaybına uğramaları olarak düşünülebilir. Serbest enzimlerde aktivite kaybı daha hızlı gerçekleşirken yapılan birçok araştırmada immobilize enzimlerde aktivitenin daha uzun süre korunduğu bilinmektedir.

Enzimin aktif merkezinin şeklinde sıcaklığın, atmosferin ve bazı kimyasal maddelerin etkisiyle yapısal değişiklikler meydana gelmesi veya aktif merkezdeki grupların çevresindeki diğer gruplarla etkileşmesinin aktivite kaybına neden olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle biyosensörlerin kullanılmadığı süreler içinde de kararlılığının (ömrünün) azalması söz konusu olmuştur (Arslan, 2004).

### 8.1.11. Gerçek numune

Kandaki glikoz tayini başlıca diyabet hastalarının teşhisi, taraması ve takibinde kullanılmaktadır. Her insan kanında glikoz seviyesinin belli bir aralıkta olması gerekmektedir. Glikoz seviyesinin normal aralığın altında olması hipoglisemi (düşük

şeker düzeyi), normal aralığın üstünde olması hiperglisemi (yüksek şeker düzeyi) olarak adlandırılmaktadır.

Gox-P*o*PD/PtNPs/PVF$^{+}$ClO$_4^{-}$/Pt ve Gox-P*o*PD/PVF$^{+}$ClO$_4^{-}$/Pt biyosensörlerinin gerçek numuneler üzerine akım cevaplarını incelemek amacıyla +0,6 V çalışma potansiyelinde ölçüm ortamı olan 0,1 M pH'ı 7,4 olan fosfat tamponu içerisine 400 µL kan serum numunesi eklenerek alınan akım cevapları kaydedilmiştir. Kaydedilen akım cevaplarındaki değişim incelenmiş, kan serumundaki glikoz miktarı ve bağıl hatalar hesaplanarak Çizelge 8.1'de verilmiştir. Numunelerindeki glikoz konsantrasyonu her iki biyosensörün kalibrasyon eğrileri kullanılarak hesaplanmıştır. Çizelge 8.1'den de görüleceği gibi kan serum numuneleri içerisindeki glikoz miktarı spektroskopik ölçüm sonuçları ile oldukça uyumlu olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar geliştirmiş olduğumuz biyosensörlerin kan serumundaki glikoz tayini için kullanılabileceğini göstermiştir.

**Çizelge 8.1. (a)** Gox-P*o*PD/PVF$^{+}$ClO$_4^{-}$/Pt ve **(b)** Gox-P*o*PD/PtNPs/PVF$^{+}$ClO$_4^{-}$/Pt biyosensörleri için gerçek numune analizleri

| Biyosensör | Örnek | Spektroskopik ölçümden elde edilen sonuç (mM) | Biyosensörden elde edilen sonuç (mM) | Bağıl hata (%) |
|---|---|---|---|---|
| a | 1 | 6,33 | 6,15 | 2,84 |
| | 2 | 6,83 | 6,61 | 3,22 |
| | 3 | 5,72 | 5,54 | 3,15 |
| b | 1 | 6,33 | 6,19 | 2,21 |
| | 2 | 6,83 | 6,66 | 2,49 |
| | 3 | 5,72 | 5,60 | 2,10 |

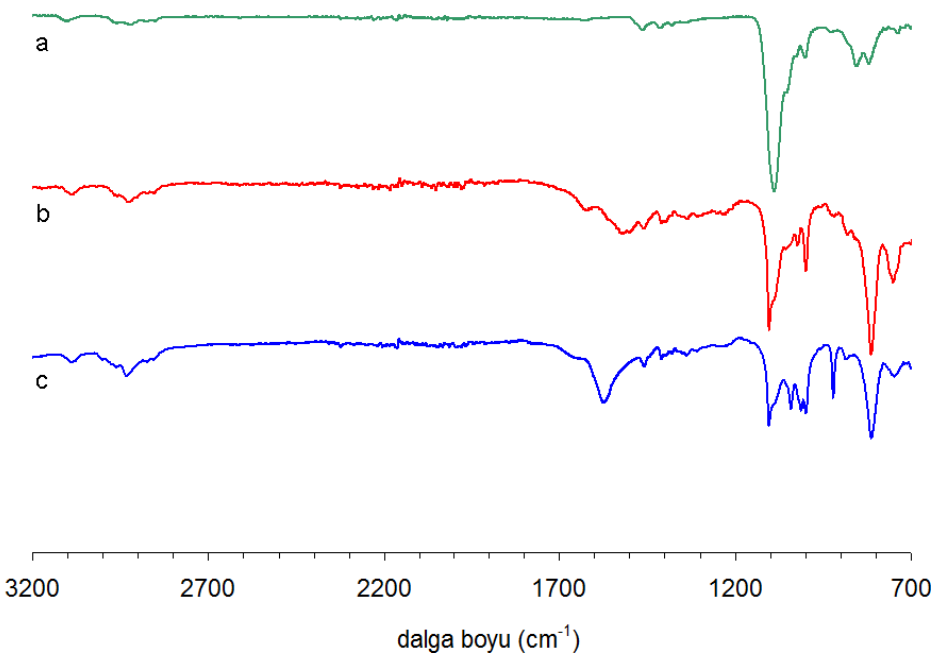
### 8.1.12. FT-IR spektrumları

Gox-P*o*PD/PtNPs/PVF$^{+}$ClO$_4^{-}$/Pt ve Gox-P*o*PD/PVF$^{+}$ClO$_4^{-}$/Pt biyosensörlerinin karakterizasyonu, FT-IR tekniği kullanılarak biyosensörlerin hazırlanma süreci boyunca her aşamada FT-IR spektrumları alınarak incelenmiştir. PVF çözeltisinin +0,7 V potansiyelde elektrot üzerine elektrokimyasal çöktürme yöntemiyle kaplanmasıyla hazırlanan PVF$^{+}$ClO$_4^{-}$ filminin Şekil 8.12.a'da gösterilen FT-IR spektrumunda 3100 cm$^{-1}$'de gözlenen pik aromatik pentadienil halkasındaki C-H arasındaki gerilmelere aittir. 1091 cm$^{-1}$'de gözlenen güçlü keskin pik polimer zincirlerindeki pozitif yük varlığını göstermiştir. 2921 cm$^{-1}$ ve 2860 cm$^{-1}$'de gözlenen pikler C-H arasındaki gerilme

titreşimlerinden ileri gelmektedir. 1415 $cm^{-1}$, 1463 $cm^{-1}$ ve 1630 $cm^{-1}$'de gözlenen pikler polimerin aromatik yapısındaki C=C gerilme titreşimlerini göstermektedir.

$PVF^{+}ClO_4^{-}$/Pt elektrodu üzerine 0,1 M pH'ı 5,4 olan asetat tamponu içerisinde +0,7 V potansiyelde *o*PD'nin elektropolimerizasyonu ile hazırlanan P*o*PD/$PVF^{+}ClO_4^{-}$ filminin Şekil 8.12.b'de gösterilen FT-IR spektrumunda yeni 1623 $cm^{-1}$, 1520 $cm^{-1}$, 1334 $cm^{-1}$ ve 1228 $cm^{-1}$ bantları görülmüştür. 1623 $cm^{-1}$ ve 1520 $cm^{-1}$'de gözlenen pikler sırasıyla fenazin yapısındaki C=N ve C=C gerilme titreşimlerinden ileri gelmektedir. 1334 $cm^{-1}$ ve 1220 $cm^{-1}$'de gözlenen pikler benzenoit ve kinoid imin yapısındaki C-N arasındaki bağ gerilimine aittir. 750 $cm^{-1}$ ve 815 $cm^{-1}$'de gözlenen pikler sübstitüe benzen yapısı ve aromatik halkadaki C-H esneme hareketlerinden ileri gelmektedir.

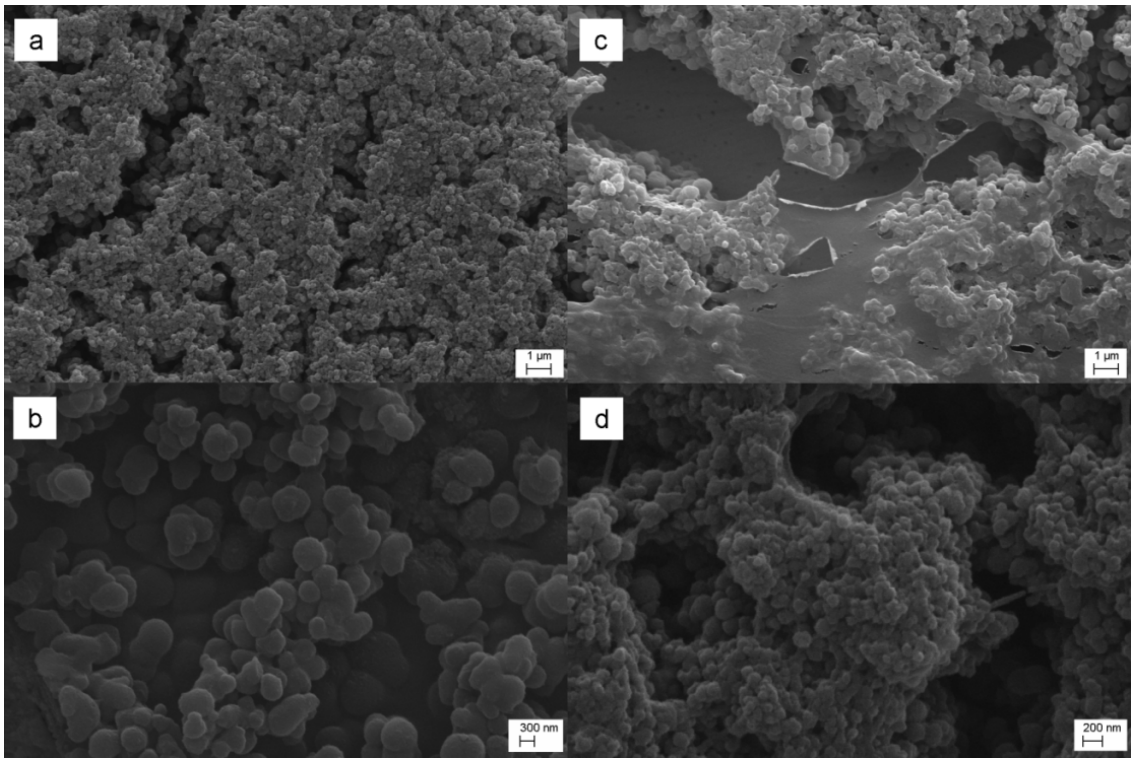
P*o*PD/$PVF^{+}ClO_4^{-}$/Pt modifiye elektrodu üzerine 0,1 M pH'ı 5,4 olan asetat tamponu içerisinde +0,7 V potansiyelde Gox enziminin immobilizasyonu ile elde edilen Gox-P*o*PD/$PVF^{+}ClO_4^{-}$ filminin Şekil 8.12.c'de gösterilen spektrumunda 1576 $cm^{-1}$'de Gox'ın amin bağından gelen yeni bir pik gözlenmiştir. Bütün bu sonuçlar değerlendirildiğinde biyosensörün hazırlanmasına ilşikin her bir basamağın başarıyla gerçekleştiği ve son basamakta Gox enziminin başarılı bir şekilde immobilize olduğu belirlenmiştir.




**Şekil 8.12. (a)** $PVF^{+}ClO_4^{-}$, **(b)** P*o*PD/$PVF^{+}ClO_4^{-}$ ve **(c)** Gox/P*o*PD/$PVF^{+}ClO_4^{-}$'nin FT-IR spektrumları

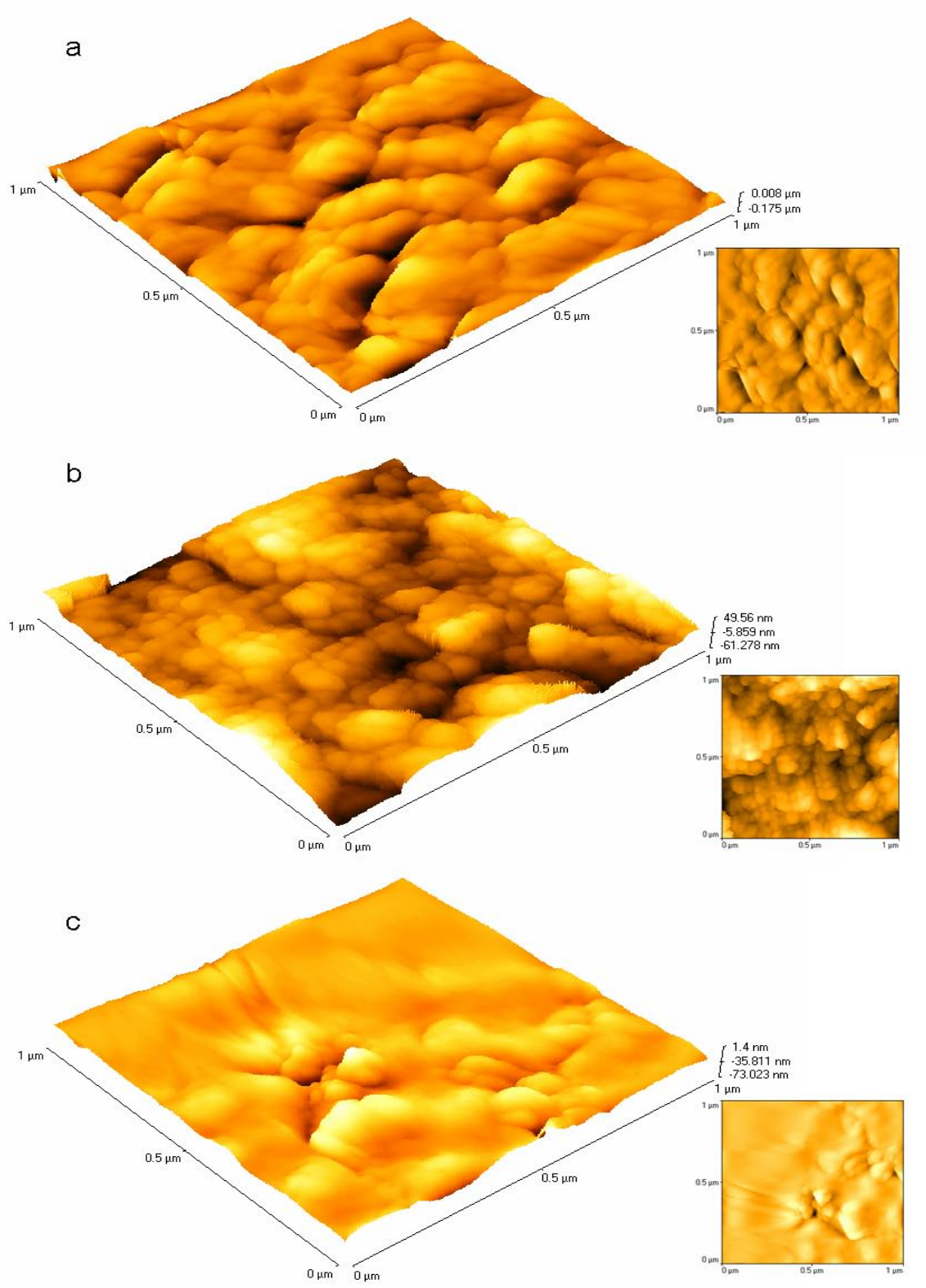
### 8.1.13. SEM ve AFM ile yüzey karakterizasyonu

Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^+ClO_4^-$/Pt ve Gox-P*o*PD/$PVF^+ClO_4^-$/Pt biyosensörlerinin yapısal karakterizasyonuna ek olarak, hazırlanan biyosensörlerin yüzey morfolojilerini incelemek amacıyla optimum şartlarda hazırlanan $PVF^+ClO_4^-$/Pt, PtNPs/$PVF^+ClO_4^-$/Pt, P*o*PD/$PVF^+ClO_4^-$/Pt ve Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^+ClO_4^-$/Pt elektrotlarının SEM görüntüleri alınmıştır. SEM analizi elektrotların hazırlanması sürecinde her bir basamakta modifiye edilen elektrot yüzeylerini karakterize etmek ve elektrot yüzeylerinin homojenliği, gözenekliği ve tanecik büyüklüğü hakkında bilgi edinmek amacıyla kullanılmıştır. Şekil 8.13.a'da elektrot üzerine PVF'nin elektrokimyasal çöktürülme yöntemi ile hazırlanan polimer kaplı $PVF^+ClO_4^-$/Pt filme ait SEM görüntüsü verilmiştir. Polimerin belirtilen yöntem ile elektrot yüzeyine oldukça homojen bir şekilde kaplandığı gözlenmektedir. Şekil 8.13.b'de verilen PtNPs/$PVF^+ClO_4^-$/Pt elektrot yüzeyinin SEM görüntüsünde Pt nanopartikülleri 10-30 nm çap aralığında küresel şekilde $PVF^+ClO_4^-$ matris yüzeyine düzenli bir şekilde dağılmış olduğu gözlenmektedir. Şekil 8.13.c'de verilen P*o*PD/$PVF^+ClO_4^-$/Pt elektrot yüzeyinin SEM görüntüsünde $PVF^+ClO_4^-$ filmi üzerinde ince bir *o*PD filminin olduğunu gözlenmektedir. Şekil 8.13.d'de verilen Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^+ClO_4^-$/Pt elektrot yüzeyinin SEM görüntüsünde *o*PD'nin elektropolimerizasyonu ile Gox enziminin eş zamanlı immobilize edilmesiyle yüzeyin genişçe bir oranının enzim molekülüyle kaplanmış olduğunu gözlenmektedir. Elde edilen son SEM görüntüsü Gox enziminin modifiye elektrot yüzeyine başarılı bir şekilde immobilize olduğunu doğrulamaktadır.




**Şekil 8.13. (a)** $PVF^{+}ClO_4^{-}$/Pt **(b)** PtNPs/$PVF^{+}ClO_4^{-}$/Pt **(c)** P*o*PD/$PVF^{+}ClO_4^{-}$/Pt **(d)** Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^{+}ClO_4^{-}$/Pt yüzeylerine ait SEM görüntüleri

Polimer filminin ve immobilize Gox enzim elektrodunun (Gox-P*o*PD/PtNPs/ $PVF^{+}ClO_4^{-}$/Pt) yüzeysel analizi AFM tekniği kullanılarak da gerçekleştirilmiştir ve 1×1 µm tarama alanı içinde yüzey görüntüleri Şekil 8.14'te 2 ve 3 boyutlu olarak gösterilmiştir. Şekil 8.14.a'da verilen $PVF^{+}ClO_4^{-}$/Pt elektrodunun AFM görüntüsünde polimerin elektrot yüzeyine homojen bir şekilde kaplandığı gözlenmektedir. Şekil 8.14.b'de verilen AFM görüntüsünde $PVF^{+}ClO_4^{-}$ matrisi üzerine Pt nanopartiküllerinin elektrokimyasal biriktirilmesini göstermiştir. Pt nanopartiküllerinin elektrokimyasal biriktirilmesinden sonra polimer film üzerinde yaklaşık 25 nm çapında birçok benzer küresel nanopartikül yapılarının olduğu platin iyonunun elektrokimyasal olarak metalik platine indirgenebildiğini doğrulamıştır. Şekil 8.14.c'de verilen Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^{+}ClO_4^{-}$/Pt elektrodunun AFM görüntüsünde modifiye elektrot üzerine *o*PD'nin elektropolimerizasyonu ile eş zamanlı olarak Gox'ın immobilizasyonu sonucu yüzeyin enzim yüklenmesiyle pürüzsüz bir yapı oluşturduğunu gözlenmektedir.

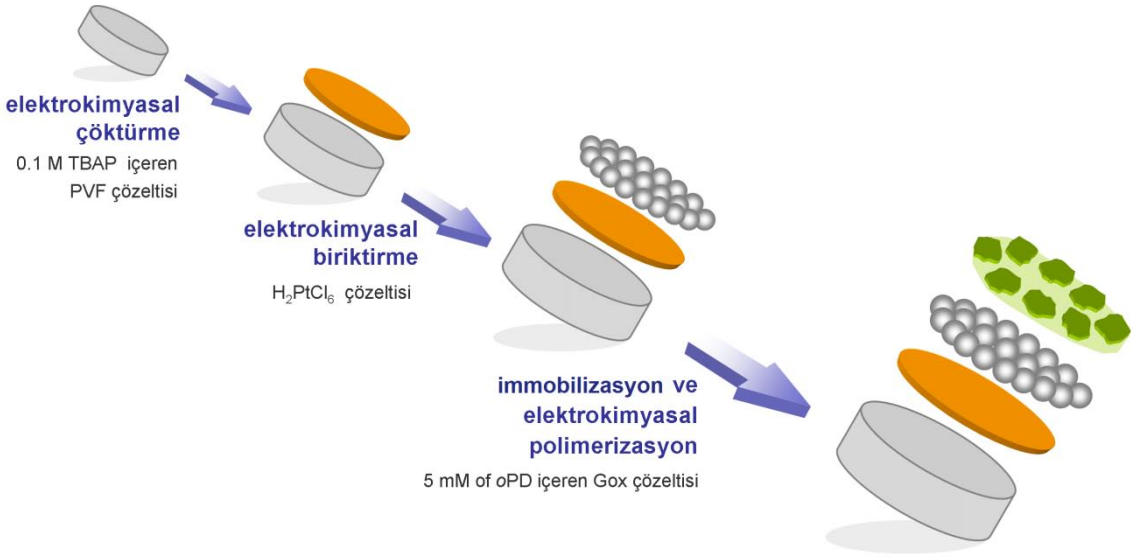



**Şekil 8.14. (a)** $PVF^{+}ClO_4^{-}$/Pt yüzeyi **(b)** PtNPs/$PVF^{+}ClO_4^{-}$/Pt yüzeyi **(c)** Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^{+}ClO_4^{-}$/Pt yüzeylerine ait AFM görüntüleri

## 9. SONUÇ VE TARTIŞMA

Glikoz, diyabet gibi bazı hastalıkların yanı sıra gıda endüstrisinde de tayini yapılan analitlerden biridir. Glikoz tayini HPLC ve gaz sıvı kromatografisi gibi cihazlarla yapılmasına rağmen glikoz biyosensörleri daha ucuz, hızlı ve kolay tayin imkanı sunmaktadır.

Bu tez çalışmasında biyosensör ve biyokimyasal alanlarda çeşitli uygulamalar için kullanılabilecek yeni bir amperometrik bir biyosensör geliştirilmiştir. Glikoz biyosensörünün geliştirilmesinde Gox enzimi varlığında enzimatik reaksiyon sonucunda ortaya çıkan $H_2O_2$'nin elektrokimyasal oksidasyonuna dayanan Gox-P*o*PD/$PVF^+ClO_4^-$/Pt ve Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^+ClO_4^-$/Pt biyosensörleri elektrokimyasal yöntemler kullanılarak Pt disk elektrot üzerine sırasıyla $PVF^+ClO_4^-$ filminin elektrokimyasal çöktürülmesi, Pt nanopartiküllerinin elektrokimyasal biriktirilmesi (Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^+ClO_4^-$/Pt biyosensörün için) ve *o*PD'nin elektropolimerizasyonu ile eş zamanlı Gox enziminin immobilizasyon işlemlerinin uygulanmasıyla gerçekleştirilmiştir (Şekil 9.1).




**Şekil 9.1.** Biyosensörlerin geliştirilmesinin şematik gösterimi

Hazırlanan elektrotlar oksijenle doyurulmuş pH'ı 7 olan 0,1 M fosfat tamponu içerisine glikoz eklenmesiyle oluşan $H_2O_2$'i takip eden reaksiyonlara göre glikonik asite yükseltgenmiştir.

$$\text{Glikoz} + O_2 \xrightarrow{\text{Gox}} \text{Glikonik Asit} + H_2O_2 \qquad (9.1)$$

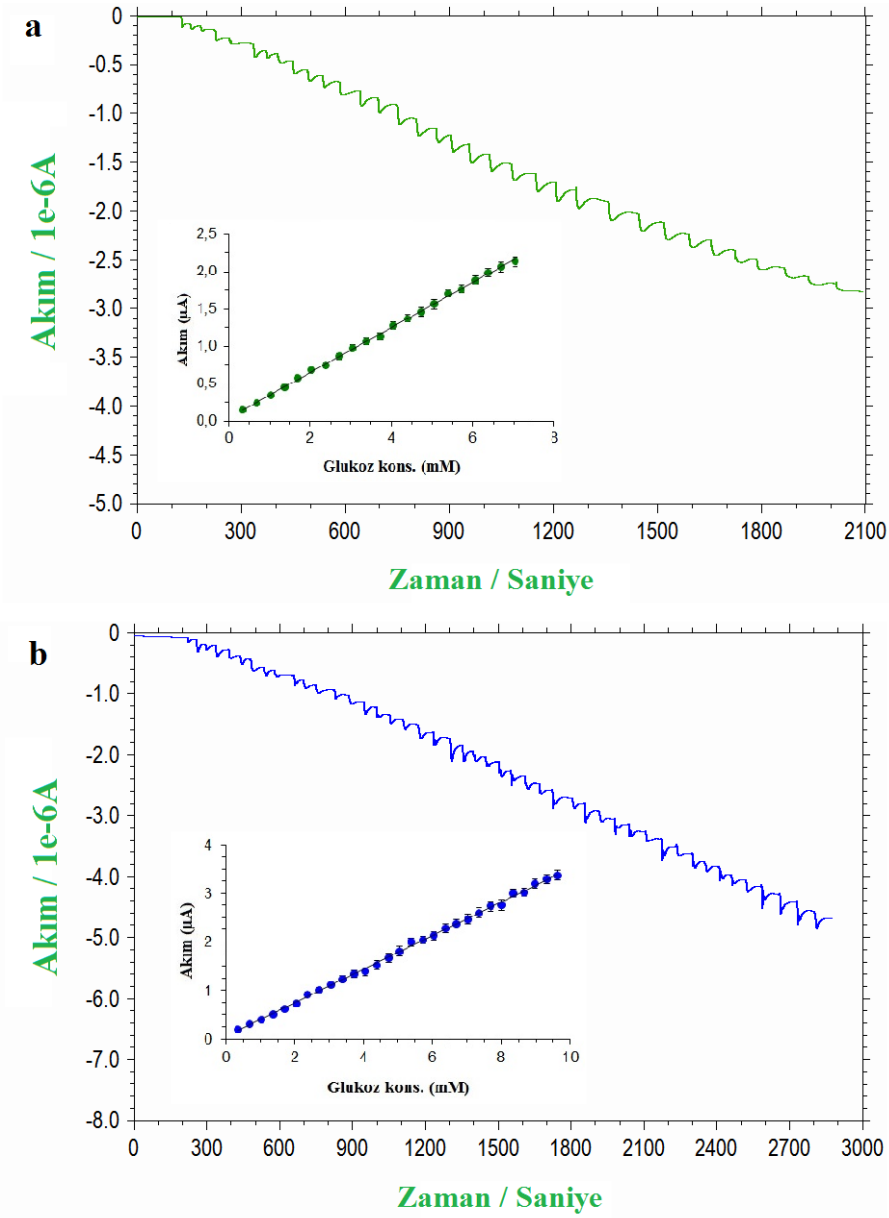
$H_2O_2$'in elektrokimyasal oksidasyonuna karşılık gelen +0,6 V potansiyel uygulandığında, gözlenen pik enzimatik reaksiyon esnasında harcanan glikoz miktarıyla orantılı olarak oluşan $H_2O_2$'den kaynaklanmaktadır. Enzimatik reaksiyon sonucunda oluşan $H_2O_2$ uygulanan potansiyelde aşağıdaki gösterilen reaksiyona göre yükseltgenmektedir. Böylece, $H_2O_2$'in oksidasyon akımının ölçülmesi esasına dayanarak glikoz tayini yapılabilmektedir.

$$H_2O_2 \xrightarrow{+0,6\ V} O_2 + 2H^+ + 2e^- \qquad (9.2)$$

Gox-P*o*PD/$PVF^+ClO_4^-$/Pt ve Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^+ClO_4^-$/Pt biyosensörleri olmak üzere aynı yöntemlerle hazırlanan 2 farklı biyosensörün +0,6 V'da pH'ı 7 olan 0,1 M fosfat tamponu içerisine 0,1 μM glikozun ardışık eklenmesiyle hem glikoza verdikleri akım cevaplarının glikozun konsantrasyonu ile değişimi hem de platin nanopartikülünün akım cevabını nasıl etkilediği gözlenmiştir. Gözlemler sonucu her iki biyosensörde de ölçüm ortamı içerisindeki glikoz konsantrasyonun kademeli olarak artmasıyla glikozun glikonik asite katalizlenerek biyosensörlerden alınan akım cevabının arttığı görülmüştür. Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^+ClO_4^-$/Pt ve biyosensörünün akım cevabının daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu durum Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^+ClO_4^-$/Pt biyosensöründeki Pt nanopartiküllerinin elektron transfer yeteneğinin enzimatik olarak üretilen $H_2O_2$'nin oksidasyonuna karşı etkili olduğunu göstermiştir. Biyosensörlerde elektron transferinin ve duyarlılığının araştırılması için genellikle iletken ve yarı iletken metal nanopartiküllerinden yararlanılmaktadır (Jonrang, 2004). Nanopartiküller sahip oldukları nanoboyutlar sayesinde enzimin aktif bölgesi ile elektrot arasındaki mesafeyi azaltarak $e^-$ aktarımını kolaylaştırarak daha düşük potansiyellerde çalışma olanağı sunarak girişim yapan elektroaktif türlerin bozucu etkisini engellemektedir (Murphy, 2006). Bu çalışmada platin nanopartikülünün girişime katkısına ihtiyaç duyulmamaktadır. Çünkü her iki biyosensörde bulunan P*o*PD filmi hem enzim için uygun ortam sağlamakta hem de girişim yapan türlerin etkisini engellemektedir.

Her iki biyosensöründe 15-20 sn içinde kararlı hal akımının %90'ına ulaştığı görülmüştür. Gox-P*o*PD /$PVF^+ClO_4^-$/Pt akım cevabının 0,9993 korelasyon katsayısı ile

Şekil 9.2.b'de görüldüğü gibi 0,11 mM'dan 7,03 mM'a kadar olan glikoz konsantrasyon aralığında lineer olduğu gözlenmiştir. Geliştirilen iki biyosensör karşılaştırıldığında 0,9998 korelasyon katsayısı sabitiyle Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^{+}ClO_4^{-}$/Pt biyosensörünün Şekil 9.2.a'da görüldüğü gibi glikoz tayini için 0,06 mM'da 9,64 mM'a kadar daha geniş bir lineer aralık gösterdiği gözlenmiştir.




**Şekil 9.2.(a)** Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^{+}ClO_4^{-}$/Pt ve **(b)** Gox-P*o*PD /$PVF^{+}ClO_4^{-}$/Pt biyosensörlerinin akım cevaplarının ölçüm ortamına eklenen glikoz konsantrasyonu ile değişimi ($2{,}02\times10^{-7}$ mol PVF $cm^{-2}$ 2,0 mM $H_2PtCl_6$ $2{,}00\times10^{-2}$ C Pt film kalınlığı, 5µM *o*PD, 0,10 M pH 7 fosfat tamponu, 30°C)

Hazırlanan iki biyosensöre ait optimizasyon çalışmaları ve diğer parametreler için elde edilen sonuçlar Çizelge 9.1'de gösterilmiştir.

**Çizelge 9.1.** Gox-P*o*PD/$PVF^+ClO_4^-$/Pt ve Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^+ClO_4^-$/Pt biyosensörleri için optimum şartlar

| **Parametreler** | **Biyosensörler** | |
|---|---|---|
| | **Gox-P*o*PD/$PVF^+ClO_4$/Pt** | **Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^+ClO_4$/Pt** |
| Uygulama potansiyeli, V | 0,6 | 0,6 |
| $PVF^+ClO_4^-$ film kalınlığı, mol PVF $cm^{-2}$ | $2{,}02\times10^{-7}$ | $2{,}02\times10^{-7}$ |
| Gox konsantrasyonu, mg Gox $mL^{-1}$ | 1,0 | 1,0 |
| Gox immobilizasyon süresi, dakika | 15 | 15 |
| Pt biriktirme potansiyeli, V | - | -0,2 |
| Pt film kalınlığı, C | - | $1{,}0\times10^{-2}$ |
| P*o*PD konsantrasyonu, mM | 5 | 5 |
| Sıcaklık, °C<br>(max. akım değerlerine göre) | 35 | 35 |
| Cevap süresi, saniye | 15 | 20 |
| Doğrusal çalışma aralığı, mM | 0,11-7,03 | 0,06-9,64 |
| Gözlenebilme sınırı, mM | 0,018 | 0,035 |
| Tekrarlanabilirlik, %BSS | 4,58 | 3,03 |
| Duyarlık, µA $mM^{-1}cm^{-2}$ | 13,06 | 17,40 |
| $E_a$, kj $mol^{-1}$ | 47,29 | 59,80 |
| $K_{mapp}$ , mM | 0,985 | 0,760 |

Bu çalışmanın ilk aşamasında hazırlanan biyosensörleri için $PVF^+ClO_4^-$ film kalınlığının etkisi araştırılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde biyosensörlerin en yüksek akım değerine polimer filminin $2{,}02\times10^{-7}$ mol PVF $cm^{-2}$ kalınlık değerinde ulaşılmıştır. Daha kalın polimer film kalınlığında akım değerindeki azalmanın glikozun difüzyon hızına bağlı olduğu belirlenmiştir (Gülce, 2005). $PVF^+ClO_4^-$ film kalınlığının biyosensörün akım değerlerinde meydana getirdiği değişimin yanı sıra polimer film kalınlığı arttıkça Görünür Michaelis-Menten sabiti değerlerinde de artışa sebep olduğu yapılan araştırmalarca bilinmektedir (Aydın, 2002).

P*o*PD filmi ile yapılan araştırmalar incelendiğinde Garjonyte ve Malinauskas'ın yaptığı çalışmada P*o*PD filminin askorbik asit girişiminin engellendiği belirlenmiştir.

Yapılan diğer bir çalışmada P*o*PD filminin glikoz oksidaz enzimine uygun matris ortamı sağladığı ve ürik asit, askorbik asit gibi analitlerin girişimini belirgin bir şekilde engellediği görülmüştür (Jing-Juan ve Hong Yuan, 1999). P*o*PD filmi oksidaz temelli biyosensörlerin tayin mekanizmasında yer alan $H_2O_2$'ye geçirgen olup daha büyük moleküllere karşı geçirgen olmadığı yapılan araştırmalarca belirlenmiştir. Yaptığımız optimizasyon çalışmasında Gox enzimin immobilizasyonu ile eş zamanlı olarak gerçekleştirilen *o*PD'nin elektropolimerizasyonun süresi ve oPD monomer konsantrasyon etkisi araştırılmıştır. Çalışmalar sonucunda *o*PD'nin en uygun polimerizasyon süresinin 15 dk, konsantrasyonun ise 5 µM olduğu belirlenmiştir. Daha uzun elektropolimerizasyon süresinde ve yüksek konsantrasyonda hazırlanan biyosensörün cevaplarındaki azalma substratın sınırlı difüzyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Glikoz oksidaz enziminin tutuklanmasıyla elde edilen biyosensörlerin akım cevabına karşı enzim konsantrasyonunun etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde Gox enziminin $1 mgmL^{-1}$ olduğu gözlenmiştir. Bu sonucun aynı zamanda *o*PD polimer matrisinin enzim tutuklama miktarının bir göstergesi olduğu düşünülmektedir.

Serbest enzimin ilgili aktivitelerde optimum veya optimuma en yakın olan sıcaklık değerinde termal kararlılığının daha fazla olduğu görülmektedir. Genel olarak optimum sıcaklık aralıklarının dışında serbest enzim üç boyutlu yapısının denatüre olması nedeniyle aktivitesini kaybedeceği düşünülmektedir. İmmobilizasyon yöntemi ise enzim uygulamalarında termal kararlılık kazandıran bir uygulamadır (Kocatürk, 2008). İmmobilize enzim ile geliştirilen biyosensörler üzerine sıcaklığın etkisini araştırmak amacıyla 20ºC ile 55ºC arasında değişen sıcaklık aralığında çalışılmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen akım cevabının en yüksek olduğu sıcaklık değerinin 35ºC olduğu gözlenmiştir. Daha yüksek sıcaklıklarda immobilize enzimin denatüre olduğu düşünülmektedir. Tutuklama yöntemi, enzim aktivitesinde, immobilize enzim için serbest enzime göre daha düşük sıcaklıklarda çalışma imkânı sağlamıştır. Böylelikle bu immobilizasyon yönteminin endüstriyel açıdan daha düşük sıcaklıklarda ve daha düşük maliyetle çalışabilme imkânı sağlayabileceği düşünülmektedir (Kocatürk, 2008). $V_m$ reaksiyon hızı ve $K_m$ Michaelis-Menten sabiti Lineweaver-Burk grafiğinden yararlanılarak bulunmuştur. $K_m$ enzimin substrata olan ilgisiyle ters orantılı bir parametredir (Yıldız, 2006). $K_m$ kinetik sabiti enzim ile substrat arasındaki ES

kompleksinin sağlamlık ölçüsüdür. $V_m$ sabiti ise enzimin aktifliğinin bir ölçüsüdür. Enzim ne kadar aktif ise $V_m$ o derece yüksektir. Gox-P*o*PD/PVF+$ClO_4^-$/Pt ve Gox-P*o*PD/PtNPs/PVF+$ClO_4^-$/Pt biyosensörleri için $K_{mapp}$ değerleri sırasıyla 9,85 mM ve 7,60 mM olarak bulunmuştur. Geliştirmiş olduğumuz glikoz biyosensörleri için bulunan bu değerler farklı araştırmacılar tarafından yapılan glikoz biyosensörleri için bulunan değerlerle karşılaştırıldığında daha küçük olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç immobilize Gox'ın yüksek enzim aktivitesini ve glikoza karşı duyarlılığını bir kez daha ispatlamıştır. İmmobilize yapılarda $K_m$ değerinin artması enzimin substratına karşı serbest enzimden daha düşük bir affiniteye sahip olduğunu açıkça göstermektedir. Katı bir destek üzerine immobilize edilmiş serbest enzim için farklı kinetik davranışlarının birkaç sebebi olduğu gözlenmiştir.

Ortam pH'ının, enzimlerin iyonlaşabilen grupları üzerinde önemli bir etkisi olduğu için enzim aktivitesindeki rolü büyüktür. Aktif merkezin konformasyonunu koruyup işlevini yerine getirebilmesi için bu grupların iyonik formda olması gerekmektedir. pH substrattaki iyonlaşabilen grupları etkileyebilmektedir. İmmobilizasyon çalışmalarında optimum pH'ın değişimi enzimin yüküne veya kullanılan matrise bağlıdır. Bu değişim, enzimin yapı - fonksiyon ilişkisinin anlaşılmasında yardımcı olur (Kocatürk, 2008). Hazırlanan biyosensörlerin bir diğer optimizasyon parametresi akım cevabı üzerine pH'ın etkisini araştırmak amacıyla 5,0-9,0 pH aralığında değiştirilerek çalışılmıştır. Elde edilen sonuca göre en yüksek akım cevabının pH 7,0 iken alındığı gözlenmiştir. Serbest Gox enzimin pH'ının 4,5-6,5 arası olduğu bilinmektedir. Bu bilgiye dayanarak biyosensör yapımında Gox'ın tutuklanması sonucunda enzimin pH'ı artmıştır. Dolayısıyla enzimin kararlı olarak çalışılabileceği pH bölgesi genişlemiştir.

Hazırlanan farklı iki biyosensörün optimizasyon parametrelerinin belirlenmesinden sonra performans özelliklerinin araştırılması amacıyla çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların bir tanesinde doğrusal çalışma aralığının tespiti için kendi optimizayon koşullarında hazırlanmış ve ölçüm ortamına glikozun ardışık eklenmesiyle elde edilen akım cevapları arasındaki Şekil 9.2'de görüldüğü gibi lineer değişim aralığı belirlenmiştir. Gox-P*o*PD/PVF$^+ClO_4^-$/Pt ve Gox-P*o*PD/PtNPs/PVF$^+ClO_4^-$/Pt biyosensörlerinin glikoza duyarlığı sırasıyla 13,06 μA/mM $cm^2$ ve 17,40 μA/mM $cm^2$ olduğu bulunmuştur. Gox-P*o*PD/PVF$^+ClO_4^-$/Pt ve Gox-P*o*PD/PtNPs/PVF$^+ClO_4^-$/Pt biyosensörlerinin kararlığını ömrünü araştırmak amacıyla bir ay boyunca çalışmalar

yapılmıştır. Elde edilen sonuçları karşılaştırılacak olursak platin nanopartiküllü biyosensörün kararlılığının daha yüksek olduğu görülmüştür. Geliştirilen her iki biyosensörün sonuçlarına bakıldığında Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^{+}ClO_4^{-}$/Pt biyosensörünün daha üstün özelliklerde olduğu gözlenmiştir.

Geliştirilen biyosensörlerin analit performansı farklı PtNPs merkezli glikoz biyosensörleriyle karşılaştırılarak performansları Çizelge 9.2'de özetlenmiştir.

**Çizelge 9.2.** Geliştirilen biyosensörlerin diğer araştırmalar sonucunda elde edilen glikoz biyosensörleri ile karşılaştırılması

| **Elektrot** | **$E_{app}$ (V)** | **Lineer aralık (mM)** | **LOD (mM)** | **Hassasiyet ($\mu A\ mM^{-1}cm^{-2}$)** | **$Km_{app}$ (mM)** | **Referans** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Gox-P*o*PD/$PVF^{+}ClO_4^{-}$/Pt | 0.6 | 0.11 - 7.03 | 0.035 | 13.06 | 9.85 | Bu çalışma |
| Gox-P*o*PD/PtNPs/$PVF^{+}ClO_4^{-}$/Pt | 0.6 | 0.06 - 9.64 | 0.018 | 17.40 | 7.60 | Bu çalışma |
| Gox/Pt/OMC/Au | -0.1 | 0.05 - 3.70 | 0.05 | 12.10 | 2.18 | Jiang ve ark., 2011 |
| Gox/AuNPs/PtNPs/CNT | 0.6 | 0.5 - 16.5 | 0.4 | - | 10.73 | Chu ve ark., 2007 |
| Gox/Au-PtNPs/CNTs/CS | 0.1 | 0.001 - 7.0 | $2\times10^{-4}$ | 120.74 | 5.20 | Kang ve ark., 2007 |
| Nafion/Gox/Pt/CNT | 0.6 | 0.1 - 13.5 | - | 91 | 10.11 | Tang ve ark., 2004 |
| Nafion/CHIT/Gox/PtNCs/Pt | 0.6 | 0.001 – 8 | $5\times10^{-4}$ | 35.92 | - | Ren ve ark., 2012 |
| Nafion/Gox/PtNPs/ACNTs | 0.3 | 0.01 – 7 | $8.89\times10^{-3}$ | - | 9.28 | Zhao ve ark., 2007 |
| Gox/Pt/MWCNT/ACS | 0.5 | 0.05 - 10.5 | $6.18\times10^{-3}$ | 113.13 | 11.02 | Tsai ve Tsai, 2009 |
| Gox/Pt/CNT/$TiO_2$ | 0.4 | 0.006 - 1.5 | $5.7\times10^{-3}$ | 0.24 | - | Pang ve ark., 2009 |
| CS-GA-Gox/PtNPs/Au | 0.7 | 0.001 - 5.3 | $1x10^{-4}$ | 102 | 10.6 | Tan ve ark., 2010 |
| Gox/PtNPs/PIL-CNTs/GCE | 0.6 | 12 üzeri | 0.01 | 28.28 | - | Chu ve ark., 2010 |
| Gox/Pt-CNTs | -0.1 | 0.16 - 11.5 | 0.055 | - | 2.6 | Wen ve ark., 2009 |
| Gox/Pt/graphene oxide | 0.5 | 0.001 – 2 | 0.001 | 78 | - | Shi ve ark., 2012 |

## KAYNAKLAR

Adeloju, S. B. and Moline, A. N., 2001, Fabrication of ultra thin polypyrrole glucose oxidase film from supporting electrolyte free monomer solution for potentiometric biosensing of glucose, *Biosensors and Bioelectronics,* 16: 133-139.

Alvarez-Crespo, S. L., Lobo-Castanon, M. J., Miranda-Ordieres, A. J. and Tunon-Blanco, P., 1997, Amperometric glutamate biosensor based on poly(*o*-phenylenediamine) film electrogenerated onto modified carbon paste electrodes, *Biosensors & Bioelectronics,* 8: 739-747.

Altunbaş, E., 2008, Polirodaninin bakır üzerine elektrokimyasal sentezi ve korozyon davranışlarının belirlenmesi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi*, Adana.

Arıksoysal, D., 2006, DNA'da meydana gelen bazı mutasyonların ve hibridizasyonun tayinine yönelik elektrokimyasal dna biyosensörlerin tasarımı, *Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, İzmir.

Arslan, F., 2004, Ksantin tayini için polipirol filme ksantin oksidaz enziminin immobilizasyonu ile yeni bir biyosensör hazırlanması, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı*, Ankara.

Aso, B. C., Kunitake, T. and Nakashima, T., 1969, Cationic polimerization and copolimerization of vinilferrocene, *Die Makromolekulare Chemie*, 124: 232-240.

Aydın, Y., 2012, İletken polimerlerin içerisinde enzim tutuklamasıyla yapılan biyosensörler, Yüksek Lisans Tezi, *Karamanoğlu Mehmet Bey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,* Karaman.

Baş, S. Z., Gülce, H., Yıldız, S. and Gülce, A., 2011, Amperometric biosensors based on deposition of gold and platinum nanoparticles on polyvinylferrocene modified electrode for xanthine detection, *Talanta*, 87: 189-196.

Baş, S. Z., Gülce, H. and Yıldız, S., 2011, Amperometric xhantine biosensors based on electrodeposition of platinium on polyvinylferrocenium coated Pt electrode, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,* 72: 282-288.

Baş, S. Z., 2011, Ksantin tayini için amperometrik enzim elektrotların geliştirilmesi, Doktora Tezi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,* Konya, 4-8.

Bian, C., Xiong, H., Zhang, X, Wen, W. and Wang, S., 2011, An electrochemical biosensor for analysis of Fenton-mediated oxidative damage to BSA using poly-o-phenylenediamine as electroactive probe, *Biosensors & Bioelectronics,* 28: 216-220.

Bingöl, G., 1977, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları Ders Kitabı Serisi, Ankara, 45-46.

Biran, I., Rissin, D., Ron, E. and Walt, D., 2003, Optical imaging fiber-based live bacterial cell array biosensor, *Analytical Biochemistry,* 315: 106-113.

Can, F., 2010, Glukoz Oksidaz Enziminin İletken Polimerlere İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, *Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,* Hatay.

Cash, K. J. and Clark, H. A., 2010, *Trends in Molecular Medicine,* 16: 584-593.

Chakraborty, S. and Raj, R., 2009, Pt nanoparticle-based highly sensitive platform for the enzyme-free amperometric sensing of $H_2O_2$, *Biosensors and Bioelectronics*, 24: 3264-3268.

Chanp, P. C. ve Harvey, R. A., 1997, Biyokimya 2. baskı, Tokullugil, A., Dirican, M. ve Ulukaya, E., *Nobel Tıp Kitabevleri*, İstanbul, 47-51.

Chaubey, A. and Malhotra, B. D., 2003, Mediated Biosensors, *Biosensors & Bioelectronics,* 17: 441-456.

Chen C., Jiang, Y. and Kan, J., 2006, A noninterference polypyrrole glucose biosensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 22: 639-643.

Chu, X., Duan, D., Shen, G. and Yu, R., 2007, Amperometric glucose biosensor based on electrodeposition of platinum nanoparticles onto covalently immobilized carbon nanotube electrode, *Talanta*, 71: 2040-2047.

Chu, X., Wu, B., Xiao, C., Zhang, X. and Chen, J., 2010, A new amperometric glucose biosensor based on platinum nanoparticles/polymerized ionic liquid-carbon nanotubes nanocomposites, *Electrochim. Acta*, 55: 2848-2852.

Clark, L. C. and Lyons, C., 1962, Electrode systems for continuous monitoring incardiovascular surgery, *Ann. NY. Acad. Sci.*, 102: 29-45.

Corcuera, J. I. R., Cavalieri, R. P. and Powers, J. R., 2005, Improved platinization conditions produce a 60-fold increase in sensitivity of amperometric biosensors using glucose oxidase immobilized in poly-*o*-phenylenediamine, *Journal of Electroanalytical Chemistry,* 575: 299-241.

Coulet, P. R., 1991, What is a Biosensor?, Chapter 1; Biosensor principles and applications, L. J. Blum and P. R. Coulet, Marcel Dekker Inc., New York, 1-6.

Çelik, Ü., 2011, Sıvıda Çalışan Atomik Çözünürlüklü Yüzeye Değmeyen Atomik Kuvvet Mikroskobu, Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,* İstanbul

Çınar, M., 2006, Pt biriktirilmiş polivinil ferrosen modifiye pt elektrodunu temel alan yeni bir kolin biyosensörünün geliştirilmesi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı*, 2008.

Çubukçu, M., 2008, Nanokompozitler ve Elektrokimyasal Biyosensör Uygulamaları, Yüksek Lisans Tezi, *Muğla Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,* Muğla.

D'Silva, C., Wang, X. and Pethig, R., 1989, Physical and electrochemical characterisation of polyvinylferrocene films, *J. Phys. D: Appl. Phys.,* 22: 1591-1597.

Deshpande, S. S. and Rocco, R. M., 1994, Biosensors and their potential use in food quality control, *Food Technology,* 146-150.

Dinçkaya, E., 1999, Enzim Sensörleri, Biyosensörler, *Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları,* 81-142.

Dong, S., and Che, G., 1991, Electrocatalysis at a microdisk electrode modified with a redox species, *J. Electroanal. Chem.,* 309: 103-114.

Erdem, C., 2012, Glikoz tayini için nikel oksit modifiye karbon pasta elektrotların hazırlanması, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,* Ankara.

Feng, L., Zhang, X., Zhao, D. and Wang, S., 2011, Electrochemical studies of bovine serum albümin immobilization onto the poly-o-phenylenediamine and carbon-coated nickel composite film and its interaction with papaverine, *Sensors and Actuators,* 152: 88-93.

Ferrari, M., Bashir, R. and Wereley, S., 2007, BioMEMS and Biomedical Nanotechnology, *Springer US*.

Flynn, H., Mahon, V., Diaz, G., Demergasso, C., Corbisier, P., Mcharg, A. and Paton, G., 2002, Assessment of Bioavailable Arsenic and Copper in Soils and Sediments from the Antofagasta Region of Northern Chile, *The Science of the Total Environment,* 286: 51-59.

Gao, Z., Xie, F., Shariff, M., Arshad, M. and Ying, J. Y., 2005, A disposable glucose biosensor based on diffusional mediator dispersed in nanoparticulate membrane on screen-printed carbon electrode, *Sensors and Actuators B*, 111-112: 339-346.

Gade, V. K., Shirale, D. J., Gaikwad, P. D., Savale, P. A., Kakde, K. P., Kharat, H. J. and Shirsat, M. D., 2006, Immobilization of GOD on electrochemically synthesized PPy–PVS composite film by cross-linking via glutaraldehyde for.

Garden, S. R., and Strachan, N. J. C., 2001, Novel colorimetric immunoassay for the detection of aflatoxin B1, *Analytical Chimica Acta,* 444: 187-19.

Garjonyte, R. and Malinauskas, A., 1999, Amperometric glucose biosensor based on glucose oxidase immobilized in poly(o-phenylenediamine) layer, *Sensors and Actuators,* 56: 85-92.

Garjonyte, R. and Malinauskas, A., 2000, Glucose biosensor based on glucose oxidase immobilized in electropolymerized polypyrrole and poly(o-phenylenediamine) films on a Prussian Blue-modified electrode, *Sensors and Actuators,* 63: 122-128.

Gerard M., Chavbev A., Malhotra B.D., 2002, Application of conducting polymers to biosensors", Biosensors&Bioelectronics, 17: 345-359

Gökdoğan, Ö., 2004, Polivinilferrosen modifiye elektrotlarda oksijenin elektrokimyasal indirgenmesinin incelenmesi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,* Yüksek Lisans Tezi, Isparta.

Gülce, H., 1993, Polivinilferrosen modifiye elektrodunun sulu ve susuz ortamlardaki elektrokimyasal davranışı, *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Doktora Tezi, Ankara.

Gülce, H., Özyörük, H. and Yıldız, A., 1994a, Electrochemical reduction of anthracenes on poly(vinylferrocenium) coated Pt electrodes in acetonitrile, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.,* 98: 228-233.

Gülce, H., Özyörük, H. and Yıldız, A., 1994b, Electrochemical oxidation of anthracenes on poly(vinylferrocenium) coated Pt electrodes in acetonitrile, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.,* 98: 828-832.

Gülce, H., Özyörük, H. and Yıldız, A., 1995, Electrochemical response of the poly(vinylferrocenium) coated Pt electrodes towards some anions in aqueous medium. *Electroanalysis,* 7: 178-183.

Gülce, H., Özyörük, H., Çelebi, S. S. and Yıldız, A., 1995a, Amperometric enzyme electrode for aerobic glucose monitoring prepared by glucose oxidase immobilized in poly(vinylferrocenium), *J. Electroanal. Chem.,* 394: 63-70.

Gülce, H., Özyörük, H., Çelebi, S. S. and Yıldız, A., 1995b, Amperometric enzyme electrode for sucrose determination prepared from glucose oxidase and invertase co-immobilized in polyvinylferrocenium, *J. Electroanal. Chem.,* 397: 217-223.

Gülce, H., Ataman, İ., Gülce, A. and Yıldız, A., 2002a, A new amperometric enzyme electrode for galactose determination, *Enzyme Microb. Tech.,* 30: 41-44.

Gülce, H., Gülce, A. and Yıldız, A., 2002b, A novel two-enzyme amperometric electrode for lactose determination, *Anal. Sci.,* 18: 1-3.

Gülce, H., Gülce, A., Kavanoz, M., Coşkun, H. and Yıldız, A., 2002c, A new amperometric enzyme electrode for alcohol determination, *Biosens. Bioelectron.,* 17: 517-521.

Gülce, H., Aktaş, Y.S., Gülce, A. and Yıldız, A., 2003, Polyvinylferrocenium immobilized enzyme electrode for choline analysis, *Enzyme and Microbial Technology*, 32: 895-899.

Gülce, A. and Gülce, H., 2005, Polyvinylferrocenium modified Pt electrode for anaerobic glucose monitoring, *J. Biochem. Biophys. Methods,* 62: 81–92.

Gündüz, T., 2005, Ultraviyole ve görünür alan moleküler absorpsiyon spektroskopisi, İnstrümental Analiz, Gazi Kitabevi, Ankara, 229-711.

Gürsoy, O., Kınık, O. ve Kavas, G., 2002, Gıda güvenliği ve HACCP kapsamında süt teknolojisi açısından biyosensörlerin değerlendirilmesi, *Dünya yayıncılık,* 62-68.

Hu, S., Xu, C., Luo, J. and Cui, D., 2000, Biosensor for detection of hypoxanthine based on xanthine oxidase immobilized on chemically modified carbon paste electrode, *Analytica Chimica Acta*, 412: 55-61.

Jiang, X., Wu, Y., Mao, X., Cui, X. and Zhu, L., 2011, Amperometric glucose biosensor based on integration of glucose oxidase with platinum nanoparticles/ordered mesoporous carbon nanocomposite, *Sensor. Actuat. B*, 153: 158-163.

Jing-Juan, X. and Hong-Yuan. C., 1999, Amperometric glucose sensor based on coimmobilization of glucose oxidase and Poly(p-phenylenediamine) at a platinum microdisk electrode, *Analytical Biochemistry,* 280: 221-226.

Kang, X, Mai, Z., Zou, X., Cai, P. and Mo, J., 2007, A novel glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in chitosan on a glassy carbon electrode modified with gold–platinum alloy nanoparticles/multiwall carbon nanotubes, *Anal. Biochem.*, 369: 71-79.

Kannuck, R. M., Bellama, J. M., Blubaugh, E. A. and Durst, R. A., 1987, Crosslinked Poly(vinylferrocene)-Modified Reference Electrode for Nonaqueous Electrochemistry, *Anal. Chem.,* 59: 1473-1475.

Karalemas, I. D., Georgiou, C. A. and Papastathopoulos, D. S., 2000, Construction of a L-lysine biosensor by immobilizing lysine oxidase on a gold-poly(o-phenylenediamine) electrode, *Talanta,* 53: 391-402.

Kavanoz, M., 2009, Polivinilferrosen/Polianilin kompozit elektrodun elektrokimyasal olarak hazırlanması, karakterizasyonu ve fenolik bileşiklerinin tayininde kullanılması, *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.

Kaufman, F. B. and Engler, E. M., 1979, Solid-state spectroelectrochemistry of crosslinked donor bound polymer films, *J. Am. Chem. Soc.*, 101(3): 547-549.

Kaufman, F. B., Schroeder, A. H., Engler, E. M., Kramer, S. R. and Chambers, J. Q., 1980, Ion and electron transport in stable, electroactive tetrathiafulvalene polymer coated electrodes, *J. Am. Chem. Soc.*, 102(2): 483-488.

Kawai, T., Iwakura, C. and Yoneyama, H., 1989, Electrochemical characteristics of poly(vinylferrocene) derivatives for battery application, *Electrochim. Acta,* 34: 1357-1361.

Kirk, O., Borchert, T. V. and Fuglsang, C. C., 2002, Industrial enzyme applications, *Current Opinion in Biotechnology,* 13: 345-351.

Koide, S. and Yokoyama, K., 1999, Electrochemical characterization of an enzyme electrode based on a ferrocene-containing redox polymer, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 468: 193-201.

Koyuncu Zeybek, D., 2010, Kolestrolün ve fenolik bileşiklerin tayinin için amperometrik enzim elektrotlarının hazırlanması, A*nkara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.* Doktora Tezi, Ankara.

Kuralay, F., Özyörük, H., Yıldız, A., 2005, Potentiometric enzyme electrode for urea determination using immobilized urease in poly(vinylferrocenium) film, *Sensors and Actuators B,* 109: 194-199.

Kuralay, F., Özyörük, H., Yıldız, A., 2006, Amperometric enzyme electrode for urea determination using immobilized urease in poly(vinylferrocenium) film, *Sensors and Actuators B,* 114: 500-506.

Kuramoto, N. and Shishido, Y., 1998, Property of thermo-sensitive and redox-active poly(N-cyclopropylacrylamide-covinylferrocene) and poly(Nisopropylacrylamide -co-vinylferrocene), *Polymer*, 39(3): 669-675.

Lin-Tao, C. and Hong-Yuan, C., 1999, Electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide at platinum microparticles dispersed in a poly(o-phenylenediamine) film, *Sensors and Actuators,* 55: 14-18.

Liu, S., Liu, J., Wang, L. and Zhao, F., 2010, Development of electrochemical DNA biosensor based on gold nanoparticle modified electrode by electroless deposition, *Bioelectrochemistry*, 79: 37-42.

Liu, P., Zhang, X., Xu, W., Guo, C. and Wang, S., 2012, Electrochemical sensor for the determination of brucine in human serum based on molecularly imprinted poly-o-phenylenediamine/SWNTs composite film, *Sensors and Actuators,* 163: 84-89.

Lobo Castanon, M. J., Miranda Ordieres, A. J. and Tunon Blanco, P., 1997, Amperometric detection of ethanol with poly-(o-phenylenediamine)- modified enzyme electrodes, *Biosensors & Bioelectronics,* 6: 511-520.

Luong, J. H. T., Bouvrette, P. and Male, K. B., 1997, Developments and applications of biosensors in food analysis, *TIBTECH,* 369-377.

Macholan, L., 1987, Recent Progress in Developing Enzyme and Tissue-based Membrane Electrodes, *Acta-Biotechnol,* 7(69): 547-553.

McGlennen, R.C., 2001, Miniaturization Technologies for Molecular Diagnostics, *Clinical Chemistry,* 47(3): 393-402.

MEGEP, 2007, Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi, *Enzimlerin Özellikleri,* Ankara.

Meyers, M. A., 2008, Biological Materials: Structure & Mechanical Properties, *Progress in Materials Science,* 53: 1-4.

Mohanty, S. P. and Kougianos, E., 2006, Biosensors: a tutorial review, *Potentials IEEE*, 25(2): 35-40.

Murphy, L., 2006, Biosensors and bioelectrochemistry, *Current Opinion in Chemical Biology*, 10: 177-184.

Nguyen, A. L. and Luong, J. H. T., 1993, Mediated glucose biosensor based on polyvinylferrocene, *Appl. Biochem. Biotechnol.,* 43: 117-132.

Özer, B. C., Özyörük, H., Çelebi, S. S. and Yıldız, A., 2007, Amperometric enzyme electrode for free cholesterol determination prepared with cholesterol oxidase immobilized in poly(vinylferrocenium) film, *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 262-265.

Özsöz, M., Erdem, A., Arıksoysal, D., Kara Kadayıfcılar, P., Karadeniz, H., Yalçın, G., Çavdar, S. ve Meriç, B., 2006, Elektrokimyasal DNA biyosensörleri, *7. Elektrokimya Güneri Toplantısı*, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü, Ankara.

Özyılmaz, G., 2005, Glukoz, oksidaz ve katalazın ayrı ayrı ve birlikte immobilizasyonu ve karakterizasyonu, *Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,* Adana.

Peerce, P. J. and Bard, A. J., 1980, Polymer fılms on electrodes, Part 1 The application of poly(vinylferrocene)-coated platinum electrodesas reference electrodes in acetonitrile, *J. Electroanal. Chem.*, 108: 11-125.

Pang, X., He, D., Luo, S. and Cai, Q, 2009, An amperometric glucose biosensor fabricated with Pt nanoparticle-decorated carbon nanotubes/$TiO_2$ nanotube arrays composite, *Sensor. Actuat. B*, 137: 134-138.

Petanen, T., and M. Romantschuk, 2003, Toxicity and Bioavailability to Bacteria of Particle-Associated Arsenite and Mercury, *Chemosphere,* 50: 409-413.

Pekin, B., 1979, Biyokimya Mühendisliği (Temel İlkeler), İzmir.

Ping, J., Wu, J., Fan, K. and Ying, Y., 2011, An amperometric sensor based on Prussian blue and poly(o-phenylenediamine) modified glassy carbon electrode for the determination of hydrogen peroxide in beverages, *Food Chemistry,* 126: 2005-2010.

Placko, D., 2007, Fundamentals of Instrumentation and Measurement, ISTE Ltd.

Prodromidis, M. I. and Karayannis, M., 2002, Enzyme based amperometric biosensors for food analysis, *Electro analysis,* 14: 241-261.

Ren, J., Shi, W., Li, K. and Ma, Z., 2012, Ultrasensitive platinum nanocubes enhanced amperometric glucose biosensor based on chitosan and nafion film, *Sensor. Actuat. B*, 163: 115-120.

Rothwell, S. A., Killoroan, S. J., Neville, E. M., Crotty, A. M. and O'Neill, R. D., 2008, Poly(*o*-phenylenediamine) electrosynthesized in absence of added background electrolyte provides an new permselectivity benchmark for biosensor, *Electrochemistry Communications*, 10: 1078-1081.

Rothwell, S. A., McMahon, C. P. and O'Neill, R. D., 2010, Effects of polymerization potential on the permselectivity of poly(*o*-phenylenediamine) coatings deposited on Pt-Ir electrodes for biosensor applications, *Electrochimica Acta,* 55: 1051-1060.

Sasaki, Y., Walker, L. L., Hurst, E. L. and Pittman, C. U., 1973, Preparation of Polyvinylferrocene, *Journal of Polymer Science,* 11: 1213-1224.

Saito, T. and Watanabe, M., 1998, Characterization of poly(vinylferrocene-co-2-hydroxyethyl methacrylate) for use as electron mediator in enzymatic glucose sensor, *Reactive & Functional Polymers*, 37: 263-269.

Schmidt, C. E., Guimard, N. K. and Gomez, N., 2007, Conducting polymers in biomedical Engineering, *Journal of Progress in Polymer Science*, 32: 876-921.

Shi, J., Zhang, H., Snyder, A., Wang, M. X., Xie, J., Porterfield, D. and Stanciu, L. A., 2012, An aqueous media based approach for the preparation of a biosensor platform composed of graphene oxide and Pt-black, *Biosens. Bioelectron.*, 38: 314-320.

Sidwell, J. S. and Rechnitz G. A., 1986, Progress and Challenges for Biosensors using Plant Tissue Materials, *Biosensors,* 2(4): 221-233.

Skoog, D., Holler, F. and Nieman, T., 1998, Principles of Instrumental Analysis.

Sulak, M. T., Gökdoğan, Ö., Gülce, A. and Gülce, H., 2006, Amperometric glucose biosensor based on gold-deposited polyvinylferrocene film on Pt electrode, *Biosensors and Bioelectronics,* 21: 1719-1726.

Sung, W. and Bae, Y., 2002, A glucose oxidase electrode based on polypyrrol with polyanion/PEG/enzyme conjugate dopant, *Biosensors and Bioelectronics*, 18: 1231-1239.

Şahin, R., 2009, Çoklu Frekanslı Atomik Kuvvet Mikroskobu Ve Uygulamaları, Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,* İstanbul (2013 VAR)

Şen, S., Gülce, A. and Gülce, H., 2004, Polyvinylferrocenium modified Pt electrode for the design of amperometric choline and acetylcholine enzyme electrodes, *Biosensors and Bioelectronics,* 19: 1261-1268.

Şen, S., 2007, Polivinilferrosen/Polipirol kompozitlerinin sentezi ve karakterizasyonu, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı*, Isparta.

Şenel, M., Çevik, E. and 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: 444–450.

Tan, Y., Deng, W., Chen, C., Xie, Q, Lei, L., Li, Y., Fang, Z., Ma, M., Chen, J. and Yao, S., 2010, Immobilization of enzymes at high load/activity by aqueous electrodeposition of enzyme-tethered chitosan for highly sensitive amperometric biosensing, *Biosens. Bioelectron.*, 25: 2644-2650.

Tang, H., Chen, J., Yao, S., Nie, L., Deng, G. and Kuang, Y., 2004, Amperometric glucose biosensor based on adsorption of glucose oxidase at platinum nanoparticle-modiWed carbon nanotube electrode, *Anal. Biochem.*, 331: 89-97.

Tauriainen S., Karp, M., Chang, W. and Virta, M., 1997, Recombinant luminecent bacteria for measuring bioavailable arsenite and antimonite, Applied Environmental, *Microbiology,* 63: 4456-4461.

Telefoncu, A., 1999, Biyosensörler, *Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi,* İzmir, 1-9.

Teker, M. S., Tamer, U. and Pekmez, N. O., 2012, Fabrication and characterization of poly(vinylferrocenium)perchlorate/poly(3,4-ethylenedioxythiophene) composite-coated electrode in methylene chloride, *Synth. Met.*, 162: 924.

Tsai, M. C. and Tsai, Y.C., 2009, Adsorption of glucose oxidase at platinum-multiwalled carbon nanotube-alumina-coated silica nanocomposite for amperometric glucose biosensor, *Sensor. Actuat. B*, 141: 592-598.

Turpeinen, R., Virta, M. and Haggblom, M., 2003, Analysis of Arsenic Bioavailability in Contaminated Soils, *Environmental Toxicology and Chemistry,* 22: 1-6.

Türkmen, H., 2013, Tiyofenin Elektrokimyasal Polimerizasyonu Karakterizasyonu ve biyosensör olarak geliştirilmesi, *Nevşehir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı*, Nevşehir.

Umana, M., Rolinson, D. R., Nowak, R., Daum, P. and Murray, R. W., 1980, X-Ray photoelectron spectroscopy of metal, metal oxide and carbon electrode surfaces chemically modified with ferrocene and ferricenium, *Surface science*, 101: 295-309.

Uyar, İ., Güven, Ö. ve Artıktay, I., Dokuz Eylül Üniversitesi Buca Eğitim Fakültesi Fen Bilgisi Eğitimi Anabilim Dalı, İzmir.

Velasco-Garcia, M. N. and Mottram, T., 2003, Biosensor technology addressing agricultural problems, *Biosystems Engineering,* 84: 1-12.

Vidal, J. C., Garcia, E. and Castillo, J. R., 1999, In situ Preparation of overoxidized PPy/*o*PPD bilayer biosensors for the determination of glucose and cholesterol in serum, *Sensors and Actuators,* 57: 219-226.

Von Lucadou, I., Luft, G., Preidel, W. and Richter, G. J., 1988, The electocatalytic glucose sensor, *Horm Metab Res Suppl,* 20: 41-43.

Wang, X. B., Bonnett, J. M., Pethig, R., Baker, P. K., Parri, O. L. and Underhill, A. E., 1991, Electrochemical properties of substituted polycinylferrocene films, *J. Mol. Electron,* 7: 167-178.

Wen, Z., Ci, S. and Li, J., 2009, Pt nanoparticles inserting in carbon nanotube arrays: nanocomposites for glucose biosensors, *J. Phys. Chem. C*, 113: 13482-13487.

Wolhfarht, G., Trivic, S., Kandrac, J., Pericin, G. and Leskovak, V., 2005, Glucose oxidase from aspergillus niger,the mechanism of action with molecular oxygen,quinones, and one-electron acceptors, *The International Journal of Biochemistry&Cell Biology*, 37: 731-750.

Wong, C. M., Wong, K. H. and Chen, X. D., 2008, Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications, *Apll Microbiol Biotechnol*, 78: 927-938.

Xian, Y., Hu, Y., Liu, F., Xian, Y., Wang, H. and Jin, L., 2005, Glucose biosensor based on Au nanoparticles–conductive polyaniline nanocomposite, *Biosensors and Bioelectronics*, 21: 1996-2000.

Yetkin, A., 2010, Poli - [N - (Ferrosenilmetil) - Ofenilendiamin]'in Sentezi, Elektrokimyasal ve Elektrokromik Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,* Konya.

Yuan, C. J, Hsu, C. L, Wang, S. C and Chang, K.S., 2005, Eliminating the interference of ascorbic acid and uric acid to the amperometric glucose biosensor by cation exchangers membrane and size exclusion membrane, *Electroanalysis,* 17(24): 2239-2245.

Yüce, M., 2011, Bazı Ağır Metallerin Tayininde Kullanılmak Üzere Mikrobiyal Biyosensör Geliştirilmesi, Ankara.

Zeybek, B., 2010, Bazı iletken polimerlerin elektrokimyasal sentezi ve uygulamaları, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi Kimya Anabilim Dalı*, Ankara

Zhao, K, Zhuang, S, Chang, Z., Songm, H., Dai, L., He, P. and Fang, Y., 2007, Amperometric glucose biosensor based on platinum nanoparticles combined aligned carbon nanotubes electrode, *Electroanal.*, 19: 1069-1074.

Zou, Y., Xiang, C., Sun, L., Xu, F., 2008, Glucose biosensor based on electrodeposition of platinum nanoparticles onto carbon nanotubes and immobilizing enzyme with chitosan-$SiO_2$ sol–gel, *Biosensors and Bioelectronics*, 23: 1010-1016.

# ÖZGEÇMİŞ

## KİŞİSEL BİLGİLER


| | | |
|---|---|---|
| **Adı Soyadı** | **:** | Esra Türkmen |
| **Uyruğu** | **:** | T. C. |
| **Doğum Yeri ve Tarihi** | **:** | Cihanbeyli, 1988 |
| **Telefon** | **:** | 0332 235 9775 |
| **Faks** | **:** | - |
| **e-mail** | **:** | esraturkmenn@outlook.com |


## EĞİTİM

| **Derece** | | **Adı, İlçe, İl** | **Bitirme Yılı** |
|---|---|---|---|
| Lise | : | Selçuklu Lisesi (YDA), Konya | 2007 |
| Üniversite | : | S.Ü., Fen Fak., Kimya Bölümü, Konya | 2012 |
| Yüksek Lisans | : | S.Ü., Fen Bilimleri Ens., Kimya ABD, Konya | 2015 |

## İŞ DENEYİMLERİ

| **Yıl** | **Kurum** | **Görevi** |
|---|---|---|
| 2014-2015 | Anadolu Birlik Holding Panplast Sulama Tarım San. ve Tic. A.Ş. | Kalite Sistemleri Personeli |

## YABANCI DİLLER

İngilizce