



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DİTİYENOPİROL (DTP) TİP İLETKEN POLİMERLERİ KULLANARAK ÖZGÜN KOLESTEROL BİYOSENSÖRLERİN YAPIMI

Nilay GAZEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalını

Mart-2016
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Nilay GAZEL

07.03.2016

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DİTİYENOPİROL (DTP) TİP İLETKEN POLİMERLERİ KULLANARAK ÖZGÜN KOLESTEROL BİYOSENSÖRLERİN YAPIMI

Nilay GAZEL

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Semahat KÜÇÜKKKOLBAŞI
Eş-Danışman: Doç. Dr. Hüseyin Bekir YILDIZ

2016, 93 Sayfa

Kolesterolün vücutta bulunması gereken yapı taşlarından olduğu bilinmektedir. Ancak kandaki kolesterol miktarı artışının sebep olduğu medikal problemler de oldukça yaygındır. Bu sebeple kolesterol miktar tayininin pratik, hızlı ve geniş ölçüm aralığına sahip bir enzim biyosensör ile yapılabilme ihtimali tez çalışmasının ana fikrini oluşturmaktadır.

Çalışmada, öncelikle elektron verici yapısı ile öne çıkan yeni nesil iletken polimer 4-(4H-ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)anilin'in sentezi gerçekleştirildi. Sentez karakterizasyonu ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR ile kontrol edildi. Daha sonra, DTP(aril)anilin'in elektropolimerizasyon ile modifiye edildiği camsı karbon elektroda, kolesterol oksidaz enzimi çapraz bağlama yöntemiyle immobilize edildi. Hazırlanan enzim elektrodunun optimum çalışma koşulları ve performans faktörleri belirlendi. Hazırlanan enzim elektrodun optimum çalışma koşulları; immobilizasyon süresi 2 saat, optimum pH değeri 7,5, çalışma potansiyeli -0,7 V olarak belirlendi ve sıcaklık çalışmaları 23±2 ˚C aralıklarında gerçekleştirildi ve 23±2 ˚C sıcaklık değeri olarak alındı. Optimum çalışma koşullarında ölçümleri alınan kolesterol oksidaz enzim elektodunun performans faktörleri ise; çalışma aralığı 2 µM – 23,7 µM, LOD ve LOQ değerleri sırasıyla; 0,27µM ; 0,82µM, enzim aktivitesinin değerlendirilebilmesi için hesaplanan Michealis-Menten sabiti K_m değeri 17,81 µM ve raf ömrü süresi 1 hafta olarak tespit edildi.

Hazırlanan kolesterol oksidaz biyosensörün rutin analizler için lineer ölçüm aralıklarının yeterli, tekrar kullanılabilirliğinin fazla, operasyon kararlılığının yüksek, ekonomik ve kullanışlı olduğu görüldü.

Anahtar Kelimeler: Ditiyenopirol, elektropolimerizasyon, iletken polimer, kolesterol, kolesterol oksidaz

ABSTRACT

MS THESIS

CONSTRUCTION OF INVENTIVE CHOLESTEROL BIOSENSOR USING DITHIENOPYRROLE TYPE CONDUCTIVE POLYMERS

Nilay GAZEL

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN CHEMISTRY

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI
CO-Advisor: Assoc. Prof. Dr. Hüseyin Bekir YILDIZ

2016, 93 Pages

Cholesterol is a steroid, which is known as an important constituent in an organism. But the medical problems caused by the increase amount of cholesterol in the blood is also quite common. That's why, cholesterol determination is likely to be able to be carried out by an enzyme biosensor which has a fast and wide measurement range is the main idea of the thesis.

At this study, firstly prominent with its electron donating structure new generation conducting polymer 4-(4H-dithienol[3,2-b:2',3'-d]pyrrole-4)aniline is synthesized. Characterisation of polymer is controlled with ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR. Then glassy carbon electrode is modified with DTP(aryl)aniline by electropolymerization.

Ideal working conditions and performance factors of prepared enzym electrode is identified. Ideal working conditions; immobilization time 2 hours, ideal pH value 7,5, working potential -0,7 V, ideal temperature 23±2 ˚C are determined. Performance factors are analysed under ideal working conditions of cholesterol oxidase enzym electrode; working range is 2 µM – 23,7 µM, LOD and LOQ values are; 0,27 µM; 0,82µM, K_m, Michealis-Menten constant, use for determining the enzym activity is 17,81 µM and storage stability is 1 week.

Keywords: Cholesterol, cholesterol oxidase, conducting polymers, dithienopyrrole, electropolymerization.

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans sürecimde, bütün tecrübelerini benimle paylaşan, soru ve sorunlarımı çözümsüz bırakmayan, çalışmalarıma yön vererek beni cesaretlendiren ve her daim maddi manevi desteğini yanımda hissettiğim çok değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI'na,

Yüksek Lisans eğitimim ile yıllar sonra tekrar yollarımız kesişen, tez konumun belirlenmesinde, gerçekleşmesinde ve tamamlanmasında hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen, bilgisini ve tecrübesini bana aktaran saygıdeğer hocam KTO Karatay Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Öğretim Üyelerinden Sayın Doç. Dr. Hüseyin Bekir YILDIZ'a,

Tez araştırma çalışmalarımın ilk günlerinden itibaren bilgisini ve tecrübesini benimle paylaşarak fikir ve desteklerini her zaman bana aktaran Karamanoğlu Mehmet Bey Üniversitesi Kamil Özdağ Fen Fakültesi Öğretim Üyelerinden Arş. Gör. Hacer AZAK'a,

Çalışmalarım boyunca bilimsel ve manevi olarak hep desteklerini gördüğüm çok değerli laboratuvar arkadaşlarım; Zehra Özden ERDOĞAN, Aygen DEMİR ve Dilek SÖĞÜT'e,

Her zaman sevgisi, heyecanı ve içtenliğini yanımda taşıdığım canım dostum Meral YILDIZ'a,

Hayatım boyunca verdiğim bütün kararlara saygı duyan ve cesaretlendiren, çok değerli fikirleriyle her zaman yanımda olan ve maddi manevi her daim beni destekleyen çok kıymetli babam Recep ASENA, annem Şengül ASENA, ablalarım Sibel ASENA ve Neval ASENA'ya,

Son olarak hayatıma girdiği andan itibaren her zaman yanımda olan, tez çalışmam boyunca gösterdiği sabır ve fedakârlıkla gücümü arttıran, verdiği destekle geleceğe güvenle bakmamı sağlayan sevgili eşim Celalettin Sami GAZEL'e ve hayattaki en değerli varlığın kendisi olduğunu gözlerine her baktığımda hissettiğim en kıymetlim kızım Begüm GAZEL'e sonsuz teşekkür ederim.

Nilay GAZEL
KONYA-2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **ix**

1. GİRİŞ **1**

1.1 Kolesterolün Önemi ve Tayini 2
1.2 İletken Polimerler 4
1.2.1. İletken Polimerlerde İletkenlik 5
1.2.2. İletken Polimerlerin Sentez Yöntemleri 7
1.2.3. İletken Polimerlerin Kullanım Alanları 12
1.2.4. Ditiyenopirol ve Özellikleri 16
1.3. Voltametri 17
1.3.1. Çalışma Prensibi ve Hücre Bileşenleri 18
1.3.2. Voltametrik Teknikler 20
1.4.Biyosensörler 24
1.4.1. Biyosensörlerin Yapısı ve Çalışma Mekanizması 27
1.4.2. Biyosensörlerin Uygulama Alanları 29
1.5. Enzimler 30
1.5.1. Enzimlerin Yapısı ve Çalışma Mekanizması 32
1.5.2. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri 36
1.6. Enzim Biyosensörleri 39
1.6.1. Kolesterol Oksidaz Biyosensörü 42

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **44**

2.1. Kolesterol Oksidaz Biyosensörleri İle Yapılan Çalışmalar 44
2.2. İletken Polimerlerle Yapılan Biyosensör Çalışmaları 46

3. MATERYAL VE METOT **48**

3.1. Kullanılan Cihaz ve Elektrotlar 48
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler 48
3.3. Kullanılan Çözeltiler 51
3.3.1. Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS) 51
3.3.2. Elektropolimerizasyon Çözeltisi 51
3.3.3. Referans Elektrot İç Dolgu Çözeltisi 51
3.3.4. Enzim Çözeltisi 51
3.3.5. Gluteraldehit Çözeltisi 51
3.3.6. Kolesterol Stok Çözeltisi ve Kolesterol Çözeltisi 52
3.3.7. Hidrojen Peroksit Çözeltisi 52
3.4. Deneysel İşlemler 52

3.4.1. 4-(4H-ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)anilin Sentezi ve Karakterizasyonu...52
3.4.2. Camsı Karbon Elektrotun Temizlenmesi 54
3.4.3. 4-(4H-ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)anilin Monomerinin Elektropolimerizasyonu 54
3.4.4. Kolesterol Oksidaz Biyosensörün Hazırlanması 54
3.4.5. Modifiye Edilmiş ve Modifiye Edilmemiş Enzimsiz Elektrotların Hidrojen Perokside Duyarlığın Belirlenmesi....55
3.4.6. Kolesterol Oksidaz Enzim Elektrotun Optimum Çalışma Koşullarının Belirlenmesi 56
3.4.7. Biyosensör Elektrotlarının Performans Faktörleri....57

4.ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA 59

4.1.1. 4-(4H-ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)anilin Sentezi ve Karakterizasyonu...59
4.1.2. 4-(4H-ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)anilin Monomerinin Elektropolimerizasyonu 59
4.1.3. Modifiye edilmemiş ve Modifiye edilmiş Camsı Karbon Elektrotların H_2O_2 Duyarlıkları 60
4.1.4. Kolesterol Oksidaz Enzim Elektrotun Optimum Çalışma Koşullarının Belirlenmesi 62
4.1.5. Biyosensör Elektrotlarının Performans Faktörleri....66

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 71

5.1 Sonuçlar 71
5.2 Öneriler 71

KAYNAKLAR 73

EKLER 80

ÖZGEÇMİŞ....83

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

A	Amper
ACN	Asetonitril
DCM	Dikolorometan
E_1	Potansiyel değeri
[E]	Enzim Konsantrasyonu
$[E]_0$	Enzim Başlangıç Konsantrasyonu
[ES]	Enzim-Substrat Kompleks Konsantrasyonu
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
Ip	Pik Akımı
IU	Enzim Aktivitesi
K_m	Michaelis-Menten sabiti
LOD	Algılama Sınırı
LOQ	Kantitatif Ölçme Sınırı
µA	Mikroamper
µl	Mikrolitre
mM	Milimolar
µM	Mikromolar
mV/s	Milivolt/saat
[S]	Substrat Konsantrasyonu
S/cm	İletkenlik birimi
V	Volt
ΔG	Serbest Enerji
δ	Sigma
π	pi

Kısaltmalar

COx	Kolesterol Oksidaz
CV	Dönüşümlü Voltametri
DNA	Deoksirübo Nükleik Asit
DTP	Ditiyeno(3,2-b:2',3'-d) pirol
DTP(aril)anilin	4-(4H-ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)anilin
FAD	Flavin Adenin Nükleotit
GA	Glutaraldehit
GOD	Glikoz Oksidaz
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
PA	Poliasetilen
PT	Politiyofen
PPy	Polipirol
PEO	Polietilenoksit
SNS	2,5-ditiyofenil-pirol
TBAPF6	Tetrabütilamonyum hekzaflorofosfat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Kolesterolün yapısı 3
Şekil 1.2. Bazı iletken polimerler....4
Şekil 1.3. Yalıtkan, yarıiletken ve metal maddelerde band aralığı 5
Şekil 1.4. Solitonlar arası atlama (hopping) 7
Şekil 1.5. a-Zincir üzerinde yükün taşınması, b-Zincirlerin arasında yükün taşınması, c-Partiküller arasında yükün taşınması....7
Şekil 1.6. Pirolün demir (III) klorür ile kimyasal polimerizasyonu....8
Şekil 1.7. Elektroliz hücresi....9
Şekil 1.8. Elektrokimyasal yöntemle polimerleştirilebilen bazı monomerler 10
Şekil 1.9.Polipirol'ün indirgenmesi ve yükseltgenmesi....10
Şekil 1.10. Elektrokromik materyal çalışma prensibi 13
Şekil 1.11 Fotovoltaik hücre çalışma prensibi....13
Şekil 1.12. DTP ve DTP(aril)anilin....17
Şekil 1.13. Voltamogram çizim prensibi....18
Şekil 1.14. CV için potansiyel – zaman eğrisi....20
Şekil 1.15. Şekil CV Akım/Potansiyel eğrisi....21
Şekil 1.16. Uygulanan potansiyelin zamana karşı değişim eğrisi....22
Şekil 1.17. Kronamperomogram örneği 22
Şekil 1.18. Biyosensör Yapısı....24
Şekil 1.19. Biyosensör çalışma prensibi şematik gösterimi 25
Şekil 1.20 Enzim yapısı....32
Şekil 1.21. Enzim-substrat kompleksinin oluşması 33
Şekil 1.22 Reaksiyon hızı-substrat derişimi grafiği 35
Şekil 1.23 Lineweaver-Burk eğrisi....36
Şekil 1.24 COx enzimi çalışma mekanizması 42
Şekil 3.1. 3,3'-dibrom-2,2'-bitiyofen (2) sentezi....53
Şekil 3.2. 4-(4H-ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)anilin sentezi....53
Şekil 4.1. DTP(aril)anilin'in elektropolimerizasyonu [(1:1 ACN/DCM ortamında 15 döngülü voltamogram (-0,7V-1,4 V, 0,1 V/s)] 60
Şekil 4.2. Modifiye edilmemiş çıplak elektrodun H_2O_2 cevabı (0,1M PBS pH 7,5, -0,7V, 250s, 0,1V/s, oda sıcaklığı) 61
Şekil 4.3. DTP(aril) anilin ile modifiye edilmiş elektrodun H_2O_2 cevabı (0,1M PBS pH 7,5, -0,7V, 250s, 0,1V/s, oda sıcaklığı) 61
Şekil 4.4. DTP(aril)anilin modifiye elektrot cevabına immobilizasyon süresinin etkisi (0,1M PBS pH 7,5, -0,7V, 0,1V/s, oda sıcaklığı) 62
Şekil 4.5. DTP(aril)anilin modifiye elektrot cevabına pH'nın etkisi (0,1M PBS, Kolesterol derişimi; 19,8µM, -0,7V, 0,1V/s, oda sıcaklığı) 63
Şekil 4.6. DTP(aril)anilin modifiye elektrot cevabına çalışma potansiyelinin etkisi (0,1M PBS, Kolesterol derişimi; 19,8µM, pH 7,5, 0,1V/s, oda sıcaklığı) 64
Şekil 4.7. DTP(aril)anilin modifiye elektrot cevabına sıcaklığın etkisi (0,1M PBS, pH 7,5, Kolesterol derişimi; 19,8µM, -0,7V, 0,1V/s)....65
Şekil 4.8. DTP(aril)anilin modifiye elektrot cevabına kolesterol derişiminin etkisi (0,1M PBS, pH 7,5, -0,7V, 0,1V/s, oda sıcaklığı)....66
Şekil 4.9. DTP(aril)anilin modifiye COx enzim elektrodunun tekrarlanabilirlik ve operasyonel stabilite çalışması (0,1M PBS pH 7,5, -0,7V, 0,1V/s, oda sıcaklığı, kolesterol derişimi, 19,8 µM) 68

Şekil 4.10. DTP(aril)anilin modifiye kolesterol oksidaz enzim elektrodunun aktivitesinin belirlenmesi için çizilen Lineweaver Burk eğrisi (0,1M PBS pH 7,5, oda sıcaklığı, -0,7V, Kolesterol derişimi 19,8 μM).....69
Şekil 4.11. DTP(aril)anilin modifiye kolesterol oksidaz enzim elektrodunun raf ömrü (0,1M PBS pH 7,5, oda sıcaklığı, -0,7V, Kolesterol derişimi 19,8 μM).....70

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3. 1. Kullanılan Kimyasal Maddeler 50
Çizelge 4.1. DTP(aril)anilin modifiye COx biyosensörünün Kalibrasyon grafiği verileri 66
Çizelge 5.1 Kolestrol tayini için hazırlanan bazı biyosensörlerin özelliklerinin karşılaştırılması 72

1. GİRİŞ

Kolesterol vücudumuzun yapı taşı olan hücrelerde ve hücrelerin zarlarında bulunan ve vücut için gerekli olan bir maddedir. Yağ molekülleri kanda proteinlere bağlanarak taşınır ve vücuttaki tüm organlara dağılır ve kolesterol miktarı fazlalığında bütün organlara zarar verebildiği gibi önemli hastalıkların başlangıcına da sebep olmaktadır. Sağlıklı bir insanda kandaki toplam kolesterol derişimin 5,17-6,18 mM olması gerekmektedir (Ahmad, Pan ve ark. 2010). Bu değerlerin üzerindeki derişimlerin insan sağlığı için tehlikeli olduğu bilinmektedir. Bu derişimin tespit edilmesi için rutin analizler gerçekleştirilmektedir. Bu analizlerin yapılması için birçok yöntem mevcuttur. Örneğin; kromatografik ve spektrofotometrik yöntemler, yüksek maliyet, uzun analiz süresi gibi dezavantajlara sahipken, elektrokimyasal yöntemler yüksek duyarlık, düşük maliyet ve kısa analiz süresi ile önemli bir üstünlüğe sahiptirler.

Polimerler, yalıtkan materyaller olarak tanınmışlardır ancak iletken karaktere sahip olabilecekleri ilk kez 1977 yılında Shirakawa, MacDiarmid ve Heeger'in Ziegler-Natta katalizörü kullanarak metalik görünümlü ancak yeterince iletken olmayan gümüş renginde poliasetilen (PA) filmlerinin; klor, brom ve iyot buharlarıyla tepkimesi sonucu mekanik özelliklerinin iyileştiğini ve ilk hallerinden 10^9 kat daha fazla iletken hale geldiklerinde anlaşılmıştır (Ito, Shirakawa ve ark. 1996). Bu gelişme ile birlikte iletken polimer terimi ortaya atılmış, sentezleri ve kullanım alanlarında yenilikçi çalışmalar gerçekleştirilmiştir. İletken polimerlerin başarılı kullanım alanlarından biri de biyosensör uygulamaları olmuştur.

Biyosensörler; biyolojik olaylardaki biyokimyasal değişimleri algılayarak, biyolojik olayın teşhisine imkân tanıyan bir ölçme sistemi olarak isimlendirilebilirler. Biyosensörlerin en yaygın uygulaması olan elektrokimyasal biyosensörlerin avantajları; küçük miktarları tanımlayabilme özellikleri, ekonomik oluşları, tespitleri için az güç ve hacim gereksinimine sahip olmaları, biyomedikal ve çevre uygulamalarında geniş ölçüm aralıklarında çalışılabilir olmaları olarak tanımlanabilir (Wang 2005), (Kafi and Chen 2009). Elektrokimyasal biyosensörler en basit tanımıyla üzerinde tutuklanmış bir veya birden çok biyolojik katalizör taşıyan elektrotların kullanıldığı sistemlerdir. Elektrokimyasal biyosensörlerde en geniş uygulama alanına ise amperometrik enzim biyosensörleri sahiptir. Kolesterol derişiminin tespiti için kullanılan enzimler içerisinde en sık karşılaşılan enzim kolesterol oksidaz enzimidir.

Tez araştırmasının amacı; DTP(aril)anilin'in elektropolimerizasyon tekniği ile elektroda kaplanmasından sonra elektrodun kolesterol oksidaz enzimi ile immobilize edilerek bir enzim biyosensörün elde edilip kolesterol miktarı tayininin hızlı eldesi için alternatif bir metot olarak önerilmesidir. Biyosensör eldesi için iletken polimerlerin seçilmesinin sebebi, kolay hazırlanmaları, yeniden üretilebilmeleri ve sahip oldukları elektrokimyasal özellikleridir. Ayrıca iletken polimerlerin bilim dünyasında kabul edilen uygulamalarda kullanılması, yeni fikir ve araştırmalarda fonksiyonel kaynak olabilmeleri yeni çalışma metotlarında yer almalarını sağlamaktadır. Bu sebeple bu çalışmada iletken polimerlerin içerisinde en yeni sentezlerden olan çözünür DTP(aril)anilin iletken polimeri seçilmiştir.

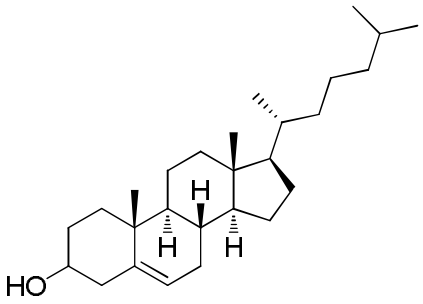
Kolesterol oksidaz biyosensörün, optimum çalışma koşulları ve performans faktörleri belirlenmesi amacıyla immobilizasyon süresi, optimum pH, çalışma potansiyeli, optimum sıcaklık, çalışma aralığı, tekrarlanabilirlik, operasyonel stabilite ve raf ömrü parametreleri incelenmiştir.

1.1 Kolesterolün Önemi ve Tayini

Canlı vücudunun önemli yapıtaşlarından biri olan kolesterol; steroid ve alkol bileşimi olan bir steroldür. Kolesterol, hücre membranlarının yapımı ve bakımı, hormon üretimi, vücut gelişimi, sinir sistemi gelişimi gibi pek çok fonksiyonda önemli bir yere sahiptir.

Karaciğer tarafından sentezlenen kolesterol, birçok hücre ve hücre içi yapının bileşiminde yer alır, sindirime yardımcı olur, hormonların yapısında ve diğer vücut fonksiyonlarında önemli rol oynar. Kolesterol eksikliğinde, sinir sistemi fonksiyonlarını yerine getiremez ve sindirim sistemi bozuklukları görülebilir. Ancak sağlıklı bir yaşam için kolesterol düzeyini belli bir seviyede tutmak çok önemlidir.

Günümüzde yaşlı nüfusu olduğu kadar genç nüfusu da etkilemeye başlayan önemli sağlık problemlerinden biri olan kandaki kolesterol miktarı fazlalığı fark edilebilir düzeye sahip bir yükseliş grafiği izlemektedir. Bilinçsiz beslenme, sağlıksız ve stresli yaşam şartlarının sebep olduğu yüksek kolesterol fazlalığı kalp hastalıkları, koroner arter hastalıkları, yüksek tansiyon, serebral tromboz gibi hastalıklara sebep olmaktadır (Zeybek 2010).



Şekil 1.1. Kolesterolün yapısı

Beslenme ve yaşam düzeyindeki kalitesizlikler günümüz teknolojisinin avantajı ve dezavantajı olarak karşımıza çıkmaktadırlar. Bu nedenle kandaki kolesterol tayinleri için basit ve hızlı yöntemler klinik çalışmalar için çok önemlidir (Yildiz, Demirkol ve ark. 2013).

Kolesterolün uygun geçirgenlik ve akışkanlığa sahip olması gerekmektedir. Kandaki kolesterol derişimi hastalıkların teşhisi ve tedavisi için önemli bir parametredir, ölçümleri medikal görüntüleme ve teşhislerde rutin bir işlemdir. Bu sebeple basit, pratik ve yüksek hassasiyete sahip kolesterol biyosensörlerinin kullanımı avantaj sağlamaktadır.

Yıllar içinde kolesterol tayini için birçok analitik yöntem geliştirilmiştir. Ancak kromatografik, kalorimetrik ve spektroskopik yöntemleri içeren bu kimyasal yöntemlerin bir kısmı güvenilir ve kesin olsa da vakit kaybına sebep olan, pahalı cihazlar gerektiren ve birçok ayırma işlemine sahip olan yöntemlerdir. Kolesterol tayin çalışmalarında en çok tercih edilen enzim kolesterol oksidaz (COx) enzimidir. Amperometrik enzim elektrotlar, yüksek duyarlık, geniş doğrusal çalışma aralığı, yüksek kararlılık, hızlı cevap ve düşük maliyet gibi avantajlar sunmalarına bağlı olarak, diğer yöntemlere önemli bir alternatiftir (Singh, Solanki ve ark. 2006). COx (E.C. 1.1.3.6) flavin adenozin dinükleotit (FAD) içeren bir enzimdir ve kolesterol oksidasyonunu kolest-4-en-3on ve hidrojen peroksite katalize eder. Biyolojik ortamlarda kolesterol seviyelerinin incelenmesi için çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir [(Khan, Solanki ve ark. 2009), (Tsai, Chen ve ark. 2008), (Arya, Datta ve ark. 2008), (Turkarslan, Kayahan ve ark. 2009)].

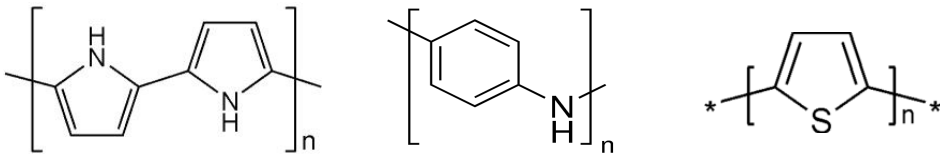
1.2 İletken Polimerler

Polimerler, monomer olarak adlandırılan küçük moleküllü yapıların yan yana gelerek birbirlerine tekrarlar halinde eklenmesiyle oluşan çok uzun zincirli moleküllerdir. Aynı monomerlerin oluşturduğu polimerlere homopolimer, en az iki farklı tip monomerden oluşan polimere ise kopolimer denir. Bir kimyasal tepkimede polimer oluşumuna, polimerleşme veya polimerizasyon denir.

Polimerlerin metallerden daha hafif ve ucuz olduğu bilinmektedir. Ayrıca kolay şekil alabilmeleri dikkat çekmiştir ancak iletken olmamaları metallere karşı dezavantaj olarak görülmüştür. Bu sebeple iki materyalin bir araya getirilerek alternatif iletken bir madde elde edilmesi çalışmaları başlatılmıştır.

Bu hedefle yola çıkan, Shirakawa, Macdiarmid ve Heeger çalışmalarında yalıtkan polimer PA molekülünü katkılama yoluyla, iletkenliğinin 10^9 kat arttırıldığını elde ederek iletken polimer kavramını bulmuşlardır. Bu buluşlarıyla iletken polimerler çalışmalarının öncüsü olarak kabul edilmişlerdir ve 2000 yılında Kimya Nobel ödülünü kazanmışlardır.

İletken polimerler araştırmalarının en önemli adımı ise 1979'da Diaz'ın pirolü elektrokimyasal yöntemle yükseltgeyerek polipirolü üretmesiyle atılmıştır. Polipirol anot üzerinde üretilebilmiş ve güçlü bir film olarak yüzeyden çıkarıldığında iletkenliği 100 S/cm'ye ulaşabilmiştir (Diaz 1979).



polipirol polianilin politiyofen

Şekil 1.2. Bazı iletken polimerler

1.2.1. İletken Polimerlerde İletkenlik

Genel olarak katılardaki elektron davranışı bant teorisi ile tanımlanabilir. Teoriye göre; bir katıda enerji bantları, elektronlar tarafından sürekli doldurulur ve elektronların bulunamayacağı enerji aralıkları da katıların yapısında mevcuttur. Eğer bir maddede enerji bantlarından biri elektronlarla tamamen dolu ve kendisinden sonra gelen boş enerji bantı ile arasındaki enerji farkı büyük ise, madde yalıtkandır. Bu sebeple, organik maddelerin yalıtkanlık özellikleri, yüksek enerjili elektronlar ile iletkenlik bantı arasında geniş enerji aralığına sahip delokalize elektronlara sahip olmalarıyla açıklanmaktadır.

Polimerler birden fazla atomdan oluştukları için toplam bağ ve karşı bağ sayılarından dolayı molekül orbital sayıları da oldukça fazladır. Yapılarındaki bağ orbitallerinin birleşmesi sonucu değerlik bantı, karşı bağ orbitallerinin birleşmesi sonucunda ise iletkenlik bantı oluşmaktadır.

Değerlik ve iletkenlik bantlarının arasındaki aralık bant aralığı (bant eşiği), bu aralığın aşılması için gerekli enerji ise bant aralık enerjisi olarak tanımlanır. Maddeler bant aralık enerjilerinin büyüklüklerine göre yalıtkan, yarı iletken ve iletken olarak sınıflandırılırlar.



Şekil 1.3. Yalıtkan, yarıiletken ve metal maddelerde band aralığı

Elektronların serbest hareketi sonucu elektriksel iletkenlik oluşur, bu da boş bantların birbirine yakınlıklarının sonucunda gerçekleşebilir. Metallerde bu enerji bantları olmadığından elektronlar serbestçe hareket edebilmektedirler ve bu sayede

iletkenlik elde edilmiştir. Bu tanıma göre bazı polimerler, metallerle yalıtkanlar arası bir iletkenliğe sahiptir. Bu özelliğe sahip polimerlere iletken polimerler denir.

İletken polimerleri diğer polimerlerden ayıran temel özellik, sırayla değişen tek ve çift bağlardan oluşan bir zincir yapısına (konjugasyon) sahip olmalarıdır. Polimerlerin elektronik iletkenlik gösterebilmesi, polimer örgüsünde, elektronların zincir boyunca taşınmasını sağlayan uygun yerlerin bulunmasına bağlıdır. Çünkü bu yapı sayesinde polimer örgüsünde elektronların taşınması sağlanır ve iletkenlik yapısı kazanılır.

Konjugasyonda, karbon atomları arasındaki bağlar birbiri ardı sıra değişen tek ve çift bağlar şeklinde dizilmişlerdir. Her bir bağ kuvvetli bir bağ olan sigma (δ) bağı içerir. Ayrıca, her çift bağda daha zayıf daha az lokalize olmuş bir pi (π) bağı vardır. Uzun konjugasyona sahip polimerlerde ise, p orbitallerinin dikey örtüşmesiyle π bağları oluşur. π bağındaki π elektronları metalik iletkenliğe neden olur.

Ancak konjugasyonun polimerlere iletken özellik vermek için yeterli olmadığı tespit edilmiştir. Maddelerin yapısında bulunan bir elektron eksikliğinin olduğu konuma boşluk (HOLE) denir. Bu boşluklara dopant maddeleri girdirilerek maddenin iletkenliği arttırılabilir. Dopantlar madde içerisinde elektron ve boşluklarının sayısını arttırır. Artan boşlukların yakın bir konumdan elektronun atlayarak doldurması sağlanmış olur ve bu şekilde yükün uzun bir mesafeye taşınması elde edilir.

Polimerin yükseltgenme ya da indirgenme ile uygun bir molekül ya da atomla etkileştirilerek iletken hale getirilmesine dop etme denir. Bu iş için kullanılan atom ya da moleküle ise dopant adı verilir. Doping sonucu iletken hale getirilen polimere dop edilmiş polimer denir. Örneğin; PA, halojen dopantı ile yükseltgenme sonucu (p-tipi doping) iyi bir elektriksel iletkene dönüştürülmüştür. İndirgenme ile doping de mümkündür. Buna n-tipi doping adı verilir ve genelde alkali metaller için kullanılır.

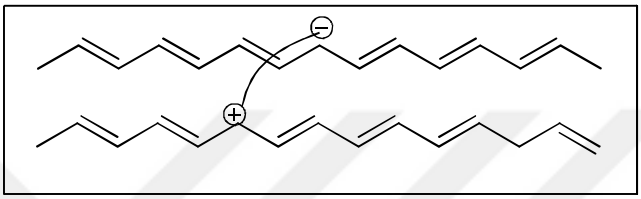
$[CH]_n + 3x/2\ I_2 \rightarrow [CH]_n^{+x} + xI_3^-$ p-tipi doping

$[CH]_n + xNa \rightarrow [CH]_n^{-x} + xNa^+$ n-tipi doping

İletken polimerlerin iletkenliğinin araştırma çalışmalarında yeni bir görüş daha öne sürülmüştür. Elektronların hareketinin yalnızca konjugasyonla değil ek olarak elektronların atlaması ile de gerçekleşebileceği belirlenmiştir. Bu atlama adımına da hopping adı verilmiştir.

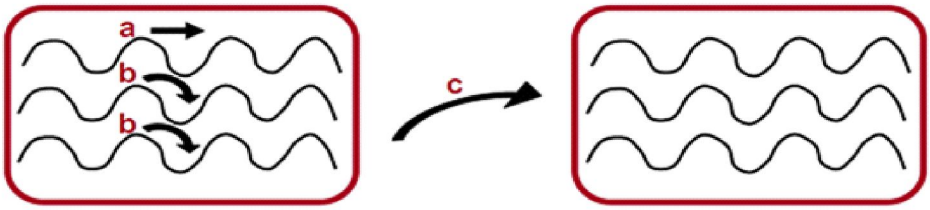
Hopping mekanizmasında yüklerin zincirler arasındaki hareketi incelenir. İndirgenme ve yükseltgenme ile polimer zinciri üzerinde meydana gelen iyonik halde yüklerin bir molekülden diğerine geçişini bu mekanizma açıklamaktadır.

Hopping mekanizması bir diğer zincirdeki nötral solitondan bir elektronun alınmasını gerektirmektedir. Bir polimerin yığın halinde elektriksel iletkenlik gösterebilmesi için zincirler arasında da iletimin sağlanması gerekir. Bir nötral soliton kendisinin bulunduğu polimer zincirine yakın bir zincirdeki yüklü solitonla etkileşir ve solitonun elektronu, etkileştiği zincirdeki kusurlu yere atlar.



Şekil 1.4. Solitonlar arası atlama (hopping)

Polimer zincirinde elektronik yükün hareketi üç şekilde olmaktadır; kristal bir yapıda zincir üzerinde, kristal bir yapıda zincirden zincire ve amorf bir bölgede zincirden zinciredir.



Şekil 1.5. a-Zincir üzerinde yükün taşınması, b-Zincirlerin arasında yükün taşınması, c-Partiküller arasında yükün taşınması

1.2.2. İletken Polimerlerin Sentez Yöntemleri

İletken polimerler, yüksek iletkenliğe sahip olmaları için doplanırlar ve böylece π sistemleri yükseltgenir veya indirgenirler (Gorman 1991). Çalışmadan da görüldüğü gibi iletken polimerlerin sentezinde monomerlerin yapısındaki π elektronları önemli bir rol oynar. Monomeri, aromatik yada daha çok karbon-karbon bağ yapısında olan iletken polimerler değişik yöntemlerle sentezlenir. İletken polimerlerin sentezinde, başlangıçta kullanılan monomerler, sonuçta oluşan polimerin yapısında korunabilen tipik aromatik

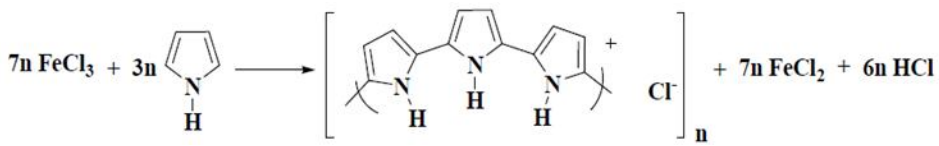
veya çoklu konjuge bağ yapısına sahiptirler. Örneğin, asetilenin polimerizasyonu sonucu konjuge etilen birimlerini içeren polietilen oluşmaktadır. Benzenin polimerizasyonunda ise birbirine kovalent bağlı aromatik zincirli poli(p-fenilen) oluşur. Bu şekilde elde edilen iletken polimerlerin yapısında π konjugasyonunun uzatılması çok önemlidir. İletken polimerler, birçok teknik kullanılarak sentezlenebilirler (Cao, Andreatta ve ark. 1989). İletken polimerlerin sentezinde kullanılan başlıca yöntemler; elektrokimyasal polimerizasyon, kimyasal polimerizasyon, piroliz, arayüzey polimerizasyonu ve emülsiyon polimerizasyonu gaz fazı yöntemleridir.

Bu polimerizasyon yöntemlerinden sıkça kullanılanları kimyasal polimerizasyon ve elektrokimyasal polimerizasyondur.

1.2.2.1. Kimyasal Polimerizasyon

Kimyasal yöntemde, uygun bir çözücüde çözülen monomer bir yükseltgenme veya indirgenme aracı olarak kullanılan bir kimyasal madde ile etkileştirilerek polimerleştirilir. Kimyasal polimerizasyon tekniğinde, monomerik parçalar kondenzasyon yoluyla veya yükseltgenme-eşleşme ile polimerleştirilir. Yükseltgen eşleşme, monomerin Friedel Crafts reaksiyon koşulları altında yükseltgenmesi (oksidasyonu) ile gerçekleşir. İki molekül tepkimeye girerek büyük bir molekül oluştururken H_2O veya HCl gibi küçük moleküller açığa çıktığında gerçekleşen tepkimeye kondenzasyon tepkimesi denir. Zincirleme kondenzasyon tepkimelerinden oluşan tepkimeye kondenzasyon polimerleşmesi denir.

Konjuge polimerlerin tümü kimyasal yöntemle sentezlenebilmektedir. Bir çalışmada, çözücü olarak metanol, doping maddesi olarak 2,5 M $FeCl_3$ kullanılarak pirolün kimyasal yöntemle polimeri hazırlanmış ve iletkenliğinin 190 S/cm'ye ulaştığı belirlenmiştir (Topbaş 2006).



Şekil 1.6. Pirolün demir (III) klorür ile kimyasal polimerizasyonu

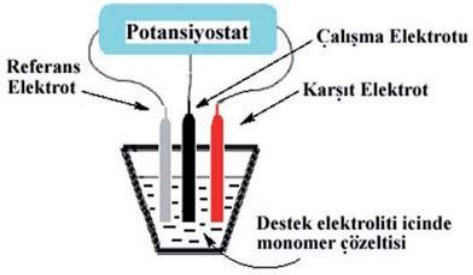
Bu yöntemde yükseltgenme basamağının kontrol edilememesi ve oluşan ürünün saf olmaması dezavantaj oluşturmaktadır. Örneğin, monomerin uygun bir çözücüdeki

çözeltisi, bu yükseltgen kimyasal maddelere maruz bırakıldığında, monomerin radikal katyonları meydana gelir. Kimyasal olarak aktif olan bu radikal katyonlar monomer molekülleri ile reaksiyona girerek oligomerleri veya çözünmeyen polimerleri verir.

Kimyasal yöntemle polimerizasyonda, diğer bir dezavantaj ise polimerin nötral formundan daha sert (rijit) olan yükseltgenmiş formda oluşması ve kuvvetli yükseltgenme reaktifleri kullanıldığı için polimerizasyon sırasında fazla yükseltgenme ve parçalanma meydana gelebilmesidir.

1.2.2.2. Elektrokimyasal Polimerizasyon

Elektrokimyasal polimerizasyon, monomerin bir çözücü ve/veya destek elektrolitle birlikte hücreye yerleştirilerek elektroliz işlemi uygulanmasıdır. Elektrokimyasal polimerizasyon, bir elektrot yüzeyinde yürüyen reaksiyonlarda oluşan ürünlerin başlattığı polimerizasyon tekniği olarak da tanımlanabilir. Elektropolimerizasyon, çözücü, monomer derişimi, elektrolit çeşidi, sıcaklık, pH, elektrotta kullanılan malzeme ve uygulanan elektriksel şartlar gibi birçok deneysel değişkenliğe sahiptir.



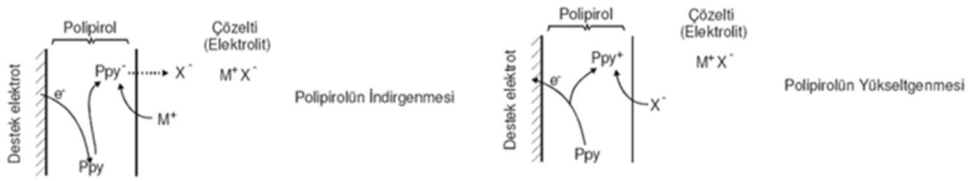
Şekil 1.7. Elektroliz hücresi

Bu yöntemle elektrot yüzeyinde veya çözeltide polimer elde edilebilmektedir. Elektropolimerizasyon genellikle, 3 elektrotlu bir sistemden oluşur; çalışma, karşıt ve referans elektrot. Hücre içine konulan sulu veya susuz ortamdaki monomer çözeltinin, dönüşümlü voltametri (CV) tekniği ile uygun bir voltamogramı alınarak sabit akım veya sabit potansiyelde polimerleşme gerçekleştirilmektedir. Monomerin indirgenmesi veya yükseltgenmesi ile oluşan radikal anyon veya radikal katyon zinciri büyümekte ve bunlar da iletken polimer zincirleri oluşturmaktadır. Bu aşamada, monomerin

yükseltgenme veya indirgenme potansiyelinde çözücü olarak, destek elektrolit ve elektronların reaksiyon vermemesi gerekmektedir.

Şekil 1.8. Elektrokimyasal yöntemle polimerleştirilebilen bazı monomerler

Örnek olarak, pirolün polimerleştirilmesinde, monomer katyon radikale yükseltgenmektedir. Meydana gelen rezonans yapı, radikalin kararlılığını artırır. Monomer radikalleri, dimeri oluşturur; oluşan dimerin yükseltgenme potansiyeli monomerinkine göre daha düşük olduğundan dimer büyür, sürekli katılmalarla pasifleşme olmadan polimerleşme meydana gelir. Bu polimerler elektrot üzerine birikir.



Şekil 1.9. Polipirol'ün indirgenmesi ve yükseltgenmesi

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

Elektrokimyasal polimerizasyonun başlıca avantajı, reaksiyon hızının ve doping yönteminin kontrol edilebilmesidir. Bunun yanı sıra, basit, seçici, tekrarlanabilir bir yöntemdir ve film kalınlığının, mol kütlesinin kontrolü kolaydır. Akım ve potansiyel uygulamalarının kontrollü yapılabilir olması (sabit potansiyel ve sabit akım elektroliz), ve başlangıç ve bitiş basamaklarının kontrol edilebilmesi yöntemin sahip olduğu önemli avantajlarındandır. Bu sebeple daha saf, yan ürünlerden ve kirlilikten arınmış ürünler elde etmek mümkündür (Batır 2009). Başlıca dezavantajı ise bu yöntemle elde edilen ürünlerin çözülemeyen polimerler olmalarıdır.

1.2.2.2. Piroliz

Piroliz, organik maddelerin oksijensiz ortamda ısıtılarak gaz, katı veya sıvı ürünlere dönüşmesi işlemidir ve atıkların inert, vakum veya indirgen (hidrojen) gibi ortamlarda katalizörlü veya katalizörsüz, sıcaklık etkisiyle bozundurulması temeline dayanır.

Piroliz yönteminde; polimerlerden ısıtma yöntemi ile halojenler, oksijen ve azot gibi heteroatomlar, uzun bir aromatik yapı oluşturmak için ayrılmaktadırlar.

İletken organik materyal eldesi çalışmalarında karşımıza çıkan ilk ve en eski yöntem pirolizdir. Pirolizle molekülün yapısında oluşan küçük değişimler karbon atomları üzerinden zincir boyunca devam eder. Böylece taşıyıcı yük hareketliliği artar ve serbest radikalleri oluşturarak yük taşıyıcıların sayısını da arttırır. Polimer pirolizinin ürünü, başlangıç polimerinin yapısı ve piroliz şartlarına bağlı olarak toz, film veya lif halinde olabilmektedir (Macdiarmid, Chiang ve ark. 1987).

1.2.2.3. Gaz Fazı Yöntemi Polimerizasyonu

Gaz fazı polimerizasyonunda, polimerizasyon reaksiyonları genellikle fotokimyasal olarak monomer buharında başlatılır. Yüksek mol kütleli polimer uçucu olmadığından büyümekte olan polimer tanecikleri bir sis oluşturur. Monomer molekülleri, gaz fazından büyümekte olan tanecik içine difüzlenir.

Gaz fazı polimerizasyon reaksiyonu genellikle fotokimyasal olarak monomer buharında başlatılır.

Bu yöntem etilen, tetrafloraetilen ve vinil klorür gibi gaz haldeki monomerler ile kullanılır. Monomer basınç altında başlatıcı içeren bir reaksiyon kabına gönderilir. Oluşan yüksek molekül ağırlıklı polimer molekülleri ucucu değildir. Bundan dolayı büyümekte olan polimer zincirlerini içeren polimer tanecikleri hemen bir sis oluşturur ve polimerizasyon reaksiyonu yoğun fazda sürdürülür. Sis içindeki polimer taneciklerinde bir tek makro-radikal bulunur. Monomer molekülleri, gaz fazından büyümekte olan tanecik içine difüzlenirler ve ürün katı tanecikler olarak elde edilir.

Gaz-fazı polimerizasyonunda, polimerizasyon hızı çok kez gaz fazındaki monomerin absorpsiyon hızı ile denetlendiği için, reaksiyon hızı sıcaklığın yükseltilmesi ile düşebilir. Bir başka deyişle, sistem görünüşte negatif bir aktifleşme

enerjisi verir. Sıcaklığı artırırsak monomerler sis yerine gaz fazı tercih ederler, bu nedenle reaksiyon hızı azalır. Dolayısıyla aktifleşme enerjisi negatif gibi görünür.

1.2.2.4. Ara Yüzey Polimerizasyonu

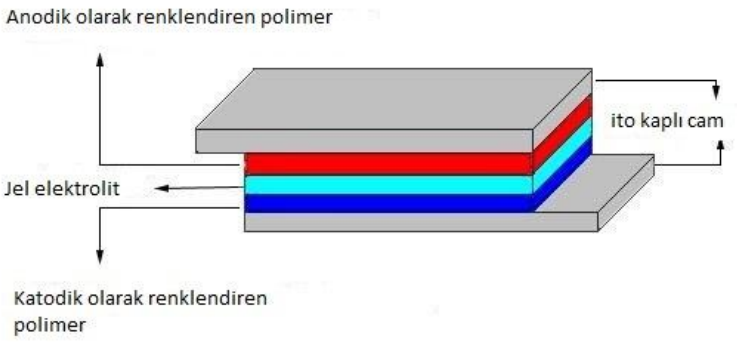
Bu yöntemde, iki fazlı bir sistemin ara yüzeyinde iletken polimer sentezlenmektedir. Bir tuzun sulu çözeltisi ve bir asit çözeltisinin karışımından oluşan polar bir faz ile monomer ve benzen, toluen gibi çözücülerin karıştırılmasıyla oluşan apolar bir faz arasındaki ara yüzeyde iletken polimer sentezlenmektedir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

1.2.3. İletken Polimerlerin Kullanım Alanları

İletken polimerler hem teorik hem de pratik uygulamalardan dolayı oldukça dikkat çekmişlerdir ve çeşitli elektrokimyasal özelliklerinden dolayı çok değişik alanlarda kullanılabilmektedirler. Özellikle, elektrokromik uygulamalarda, fotokimyasal hücre uygulamalarında, korozyon önleyici uygulamalarında, kanser hücresi tedavi uygulamalarında ve biyosensör yapımında kullanım potansiyeline sahip oldukları bilinmektedirler. 1980'lerde iletken polimerlerin kararlılıkları ve işlenmeleri konusunda kaydedilen ilerlemeler, akademik çevrelerin ve ticari firmaların bu konuya olan ilgilerini arttırmıştır.

1.2.3.1. Elektrokromik Uygulamalar

Elektrokromizim; optiksel özelliklerdeki tersinebilir değişikliklerdir. Malzeme elektrokimyasal olarak indirgendiğinde veya yükseltgendiğinde ortaya çıkar. Elektrokromik materyalde elektron transferi sırasında yeni optik bantlar oluşur dolayısıyla renklenmede farklılıklar gözlemlenir. Bu sistemde elektrokromik elektrot ve karşıt elektrot, aralarında ise jel veya sıvı halde elektrolit bulunmaktadır. Renk değişimi bu iki elektrot arasında uygulanan potansiyel değişimi ile sağlanmaktadır. Birden fazla redoks hali olan malzemelerde birden fazla renk geçişi gözlenebilir.

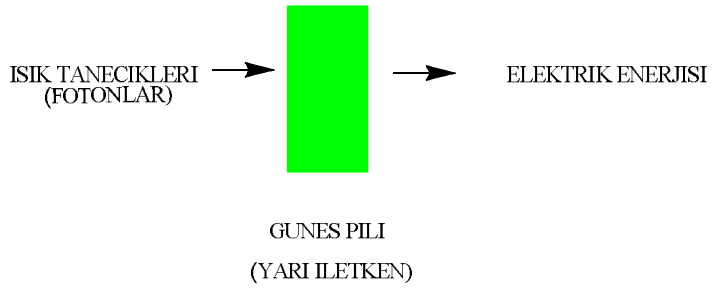


Şekil 1.10. Elektrokromik materyal çalışma prensibi

Çoklu renklere sahip polimerler, görüntü cihazları, akıllı camlar, arabaların dikiz aynaları, tavan camları, binalarda kullanılan pencere camları, saat ekranları, reklam panoları ve güneş gözlüklerinin üretiminde kullanılabilirler. Geliştirilmekte olan alanlar ise tekstil uygulamaları, kaplama malzemeleri, kamuflaj malzemeleri ve televizyon ekranlarıdır.

1.2.3.2. Fotovoltaik Hücre Uygulamaları

Yüzeylerine gelen güneş enerjisini elektrik enerjisine dönüştüren sistemler fotovoltaik piller veya güneş pilleri olarak adlandırılırlar. Güneş enerjisi, güneş pilinin yapısına bağlı olarak %5 ile %20 arasında bir verimle elektrik enerjisine çevirebilir.



Şekil 1.11. Fotovoltaik hücre çalışma prensibi

Güneş pili yapımında en çok Silisyum (1.1 eV), Galyum arsenit (GaAs – 1.43 eV), kadmiyum tellür (CdTe) gibi anorganik yarı iletken maddeler kullanılır. Güneş pilinin üst kısımları yansımayı önleyici kaplama veya korumalardan oluşur. Güneş hücreleri son derece kırılgan olduklarından böyle bir koruma, çatlama ve kırılmaları önlemek için gereklidir. Işık bu katmanlara nüfuz ettiğinde silikon veya galyum arsenite çarpar. Tabakalar arasındaki bölümlerin farklılıkları sebebiyle güneşten gelen ışınlar bu

bölgelere çarptığında elektronların tabakalar arası akışı sağlanmış olur. Bu tabakalar arasına tel çekilmek suretiyle güneş hücresi artı ve eksi kutuplara sahip bir pil halini alır ve böylece bir araca güç sağlamak için kullanılabilir.

Yatlar veya teknelerde, sokak lambaları ve şehir aydınlatmasında, tarım sulamada ve bazı ulaşım araçlarında geliştirilerek uygulanmışlardır.

1.2.3.3. Korozyon Önleyici Uygulamalar

Malzemelerin zaman içerisinde bulundukları ortamın etkisiyle tahribata uğraması korozyon olarak tanımlanır. Korozyona karşı kullanılan başlıca iletken polimerler; poli(anilin) (ilk kullanılan), poli(pirol), poli(indol), poli(tiyofen)dir. Bu polimerlerin monomerleri de korozyona karşı inhibitör etkili maddelerdir. Polimerlerin koruma etkisi genel olarak yüzeyde bir örtü oluşturması ile açıklanır. İletken olmayan polimerler için bu görüş doğrudur. İletken polimerler için durum biraz farklıdır. Yüzeyde bir örtü oluşturması yine ilk görülen koruma etkisini belirler. Ancak bu kapatıcı etkisi yanında oldukça önemli olan bir diğer etkisi "anodik koruma" etkisidir. İletken polimerlerin redoks potansiyelleri çoğu teknik metalin redoks potansiyelinden daha pozitiftir. Bunun sonucu olarak polimer metalin yükseltgenmesine neden olur. Doğal olarak metalin yükseltgenmesi, polimerin kapatıcı etkisinin zayıf kaldığı aktif porlar içinde gerçekleşir. Porlar içinde metalin çözünmesine gene porlar içine doğru difüzyonla giren oksijen de katkı yapar. Sonuçta oluşan metal iyonlarının hidroksit oluşturarak çökelmesi porların tıkanmasına neden olur. Çıplak metal yüzeyinde çökelecek bu tür korozyon ürünleri yeterince koruyucu olmadığı halde, porlar içindeki çökeltiler polimerin tutma etkisi ile yüzeyi bloke eder ve korozyona karşı koruma etkisini artırır.

1.2.3.4. Kanser Hücresi Tedavi Uygulamaları

Klasik teşhis yöntemlerinde karşılaşılan çeşitli problemler, bu yöntemlerin verimliliğini azaltır. En önemli problemler spektrum aralığının sınırlı oluşu, penetrasyon derinliğinin yeterli olmayışı, hedef hücrelerin tam olarak odaklanamaması ve sinyal / gürültü oranın düşük olmasıdır. Bu sebeple son yıllarda nanoteknoloji ile tümörlerin erken teşhisi elde edilebilme ihtimali çok ilgi çekmektedir. Nanoyapıların, tek bir tümör hücresine girebilmesi, bu konudaki görüntüleme tekniklerinin limitlerini arttırmaktadır. Klasik yöntemlerle kanser hücresi teşhisinde 1.000.000 kanser hücresi teşhis edilebilirken nanoteknolojik yöntemlerle 100 kanser hücresini teşhis etmek mümkündür (Oylar 2011).

Bu değişimin elektriksel yöntemlerle tespit edilmesi, yeni bir elektriksel biyosensör sisteminin temelini oluşturur.

1.2.3.5. Biyosensörler

Biyosensör; biyolojik olaylardaki biyokimyasal değişimleri algılayarak, biyolojik olayın teşhisine imkân tanıyan bir ölçme sistemi olarak tanımlanabilir.

Biyosensörlerin özellikleri;

Duyarlılık: Cihazın analitteki değişime (derişim) birebir cevap vermesi demektir. Duyarlılık yüksekse analitteki birim değişim sensörün ekranında gözükür.

Seçicilik: Cihazın sadece analite özgünlüğünü gösterir. Cihaz başka reaktiflere ilgi göstermez ve hatalı sonuç vermez.

Ölçüm aralığı: Cihazın ölçebildiği analit derişiminin aralığıdır. Analit belli bir derişimden az veya çoksa cihaz iyi bir duyarlılıkta sonuç vermeyebilir.

Ölçüm süresi: Analit derişimindeki bir basamak değişime karşı cihazın vereceği nihai yanıtın sadece %63'lük kısmını ölçmek için gösterdiği ölçüm süresidir. Bir tür cihazın ölçme hızını gösterir.

Tutarlılık: Cihazın sonuçlarındaki tutarlılığı ifade eder.

Tespit sınırı: Cihazın tespit edebileceği en düşük analit derişimini ifade eder.

Kararlılık: Belirli bir süre içinde cihazın duyarlılığındaki veya baz çizgisinde değişimleri dikkate alan bir kalite ölçüm değeridir.

Biyosensörlerin kullanım alanları; biyomedikal sektör, klinik diyagnostik, süreç kontrolü, gıda üretim ve analizi, tarla tarımı ve veterinerlik, bakteriyel ve viral diyagnostik, çevre koruma ve kirlilik kontrolü, askeri uygulamalardır.

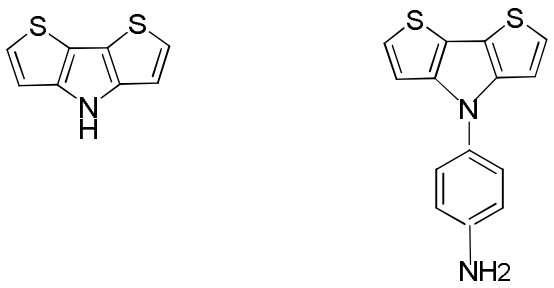
Ticari olarak üretilen ilk biyosensör ise, şeker hastalığı teşhisi için kan ve idrarda glikoz tayinini mümkün kılan glikoz oksidaz (GOD) elektrodudur.

1.2.4. Ditiyenopirol ve Özellikleri

p-konjuge organik materyallerin sentezi ve uygulamaları, faydalı optik ve elektronik özellikleri ve düşük maliyetleri, kolay üretilebilirlikleri, hafif oluşları ve esnek büyük ekipmanların üretimlerinde kullanılabilme kapasitesinin oluşu gibi orijinal avantajları sebebiyle büyümekte olan organik materyallerin araştırılması alanında oldukça büyük ilgi çekmektedir.

Son zamanlarda, ditiyeno(3,2-b:2',3'-d)pirol (DTP) kısmı çok ilgi çekmektedir ve DTP bazlı p-konjuge organik materyaller, organik ışık yayan diyotlarda (Evenson, Mumm ve ark. 2011), organik ince film transistörlerde (Balaji, Phua ve ark. 2010), alan etki transistörlerde (Liu, Wang ve ark. 2012), (Tiwari, Kim ve ark. 2012) ve fotovoltaik hücreler ve (Kim, Lim ve ark. 2011), (Lu, Chen ve ark. 2010) fotolüminesans ve elektrolüminesans ince filmlerde (Mo, Radke ve ark. 2010) kullanılmışlardır. Poli(ditieno[3,2-b:2',3'-d]pirol) (poliDTP), alkil N-ditieno[3,2-b:2',3'-d]pirol (alkil N-DTP), ve poli N-ditieno[3,2-b:2',3'-d]pirol (poli N-DTP) yapıları gibi sübstitüe DTP kompleksleri sentezlenmiştir (Udum, Yildiz ve ark. 2014). Bu sentezler kullanılarak çeşitli biyosensörler geliştirilmiştir.

DTP türevlerinin tiofen-pirol-tiofen kaynaşmış halka sistemlerinden dolayı sentezleri çok önemlidir. Düzlemsel kristal yapılarının güzel olması, genişletilmiş konjugasyonları ve güçlü elektron verme kabiliyetleri sebebiyle fonksiyonel grupların yerlerine geçmeleri çok kolay olması, gelecek vaat eden materyallerden olmalarını sağlamaktadır.



Şekil 1.12. DTP ve DTP(aril)anilin

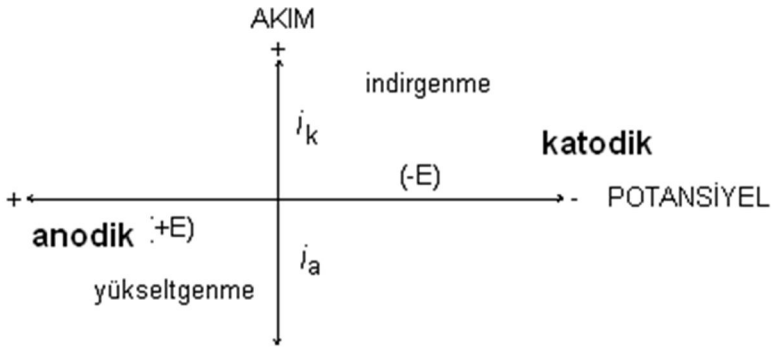
1.3. Voltametri

Voltametri, birçok elektroanalitik tekniği kapsayan, polarize edilmiş bir indikatör veya çalışma elektroduna potansiyel uygulanmasıyla ölçülen akım farkının analit hakkında bilgi vermesine dayanan bir ölçüm tekniğidir. Genellikle voltametride kullanılan çalışma elektrotlarının yüzeyi, sahip olunan küçük yüzey alanının polarizasyonu arttırdığı bilindiği için milimetrik, mikrometrik veya daha küçük yapılar olan mikroelektrotluk birimlerde seçilirler. Bilinen bütün voltametrik tekniklerde temel amaç; polarize edilmiş elektroda farklı potansiyeller uygulandığında elektrot yüzeyindeki elektroaktif türün indirgenmesi veya yükseltgenmesi sonucu oluşan akımı gözlemlemektir.

Çekoslavak kimyacı Jaroslav Heyrovsky 1920′li yılların başında voltametriyi, voltametrinin bir grubu olan polarografiden yararlanarak geliştirmiştir. Keşfedildiği ilk zamanlarda voltametri (özellikle klasik polarografi), sulu çözeltilerdeki inorganik iyonların ve bazı organik türlerin tayinleri için kimyacılar tarafından kullanılan en önemli araçlardan biriydi. Ancak 1950'lerin sonu ve 1960'ların başında bu analitik uygulamaların birçoğu yerini çeşitli spektroskopik yöntemlere bıraktı ve voltametri, çözeltideki moleküler oksijenin tayini gibi bazı özel uygulamalar dışında daha az önemli bir analiz yöntemi haline geldi. 1960'ların ortalarında klasik voltametrik yöntemlerde, yöntemin duyarlılığı ve seçiciliğini önemli ölçüde artıran birçok ana değişiklik geliştirildi. Modern voltametri, yükseltgenme ve indirgenme olaylarının yanı sıra adsorpsiyon olayları ile de ilgilenen kimyacılar tarafından halen güçlü bir teknik olarak kullanılmaktadır.

Uygulanan potansiyelin ölçülen akım değerine karşı çizilen grafiğine voltamagram denir. Voltamogramlar çizilirken, katodik akımın "y eksenin" pozitif kısmında, anodik akımın "y ekseninin" negatif kısmında yer alması, ayrıca potansiyelin

negatif yönde değişmesi "x ekseninin" negatif tarafına doğru olması ilkesi benimsenmiştir.



Şekil 1.13. Voltamogram çizim prensibi

1.3.1. Çalışma Prensibi ve Hücre Bileşenleri

Voltametrinin çalışma prensibi; elektrokimyasal hücrede polarize olabilen bir çalışma elektrodu ile karşılaştırma elektrodu arasında değeri zamanla değiştirilen potansiyel uygulanarak akımın ölçülmesi ilkesine dayanır. İndirgenmeden dolayı oluşan akıma katodik akım, yükseltgenmeden dolayı oluşan akıma ise anodik akım adı verilir. Genel olarak, katodik akımlar pozitif, anodik akımlar ise negatif işaretlerle gösterilir. Uygulanan potansiyelin belirli bir süre verilmesinden sonra akımın sabit kaldığı bir bölgeye ulaşılır. Bu alandaki akıma sınır akımı denir. Elektrodun üzerinde reaksiyon öncesi küçük de olsa bir akım görülür bu akım artık akım olarak isimlendirilir. Sınır akımı ile artık akım arasındaki yükseklik dalga yüksekliğidir. Dalga yüksekliği, elektroaktif maddenin derişimi ile doğru orantılıdır. Sınır akımı, analitin kütle aktarım işlemiyle elektrot yüzeyine tanınma hızındaki sınırlamadan kaynaklanır. Sınır akımları genellikle analitin derişimi ile doğru orantılıdır.

Voltametrik ölçümlerde analit, elektrot yüzeyine üç şekilde taşınır; elektrik alanı etkisi altında göç, karıştırma veya titreşim sebebiyle konveksiyon ve elektrot yüzeyindeki sıvı filmi ile ana çözelti arasındaki derişim farkından kaynaklanan difüzyondur.

Göç, sonuçların doğruluğunu etkileyeceğinden voltamatride istenmeyen bir olaydır. Bu sebeple göç miktarını en aza indirmek için elektroliz çözeltisi içine destek elektrolit adı verilen elektrot reaksiyonlarına girmeyen ve onları engellemeyen elektrolitten aşırı miktarda eklenir. Çözeltide bulunan bütün iyonlar elektriği taşıdıkları

için, destek elektrolitine oranla indirgenen veya yükseltgenen iyonun katkısı ihmal edilir ve reaksiyon veren iyonun göçü ihmal edilmiş olur.

Voltametrik çalışmalar genellikle; cam, kuartz veya teflon voltametri hücrelerinde gerçekleştirilir. Hücrenin yapıldığı malzeme kirlenme veya adsorpsiyon olaylarının en az gözlendiği maddelerden seçilir. Bir mikro elektrot içeren elektrokimyasal hücreye değiştirilebilir bir potansiyel uyarma sinyali uygulanır. Bu uyarma sinyali yöntemin dayandığı karakteristik bir akım cevabı oluşturur. Klasik voltametrik uyarma sinyali, hücreye uygulanan doğru akım potansiyelinin zamanın bir fonksiyonu olarak doğrusal olarak arttığı doğrusal bir taramadır.

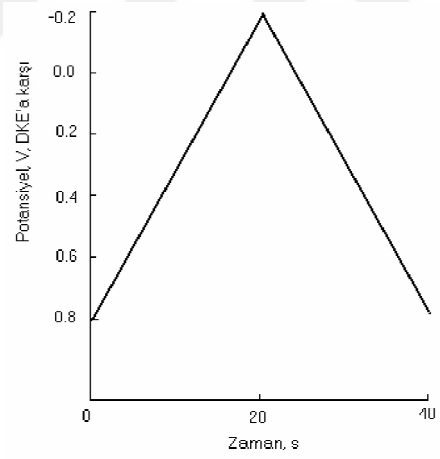
Bu hücre, analiti ve elektroaktif olmayan destek elektrolit içeren bir çözeltiye daldırılmış üç elektrottan oluşur. Üç elektrottan biri, zamanla potansiyeli doğrusal olarak değişen mikro elektrot veya makro elektrodudur. Çalışma elektrotları çok çeşitliliğe sahiptirler. Bunlardan bazıları; civa, platin, altın, camsı karbon elektrotlardır. Voltametrik ölçümlerde kimyasal reaksiyon çalışma elektrodunda meydana gelir. Çalışma elektrodunda elektroaktif türlerle kolay elektron transferi olmalıdır. Elektrodun yapısı ve hazırlanması performansı etkileyen önemli faktörlerden biridir. Hücrenin sahip olduğu diğer bir elektrot da potansiyeli deney süresince sabit kalan bir referans elektrottur. Referans elektrotları genellikle Ag/AgCl, Ag/Ag^{+}, $Cu/CuSO_4$ ve doymuş kalomel elektrotlarıdır. İdeal bir referans elektrodun potansiyeli zamanla değişmemeli, elektrottan küçük miktarda geçen bir akımdan sonra hemen denge potansiyeline dönebilmelidir. Ayrıca sıcaklığa karşı da düşük duyarlılığa sahip olmalıdır. Hücrenin üçüncü elektrodu ise elektriğin, sinyal kaynağından ve çözeltinin içinden geçerek mikroelektroda aktarılmasını sağlayan karşıt elektrottur. Karşıt elektrotta genellikle helezon şeklinde ve düz yapıda bir platin tel veya grafittir. Meydana gelen faradayik akımı dengeleyecek olan karşıt reaksiyonun gerçekleştiği elektrottur. Yani; çalışma elektrodunda indirgenme oluyorsa karşıt elektrotta yükseltgenme olur (Kakutani ve Senda 1980). Aktif yüzey geniş tutularak, küçük akım şiddetlerinde bile potansiyeli sabit kalan yani polarize edilemeyen elektrolar olmalıdırlar.

1.3.2. Voltametrik Teknikler

Elektrokimyasal tekniklerde, elektrot–çözelti sistemine bir elektriksel etki uygulanarak sistemin verdiği cevap ölçülür. Daha çok akım olarak ortaya çıkan bu cevap, sistemin özellikleri hakkında bilgi verir. Hemen hemen bütün elektrokimyasal tekniklerde potansiyel, akım ve zaman parametreleri bulunur. Bu parametrelere tekniğin adında yer verilir. Örneğin; voltametri, kronoamperometri, gibi adlandırmalarda sırasıyla potansiyel-akım, zaman–akım ve zaman–yük parametrelerinden teknik hakkında kabaca bilgi edinilebilir.

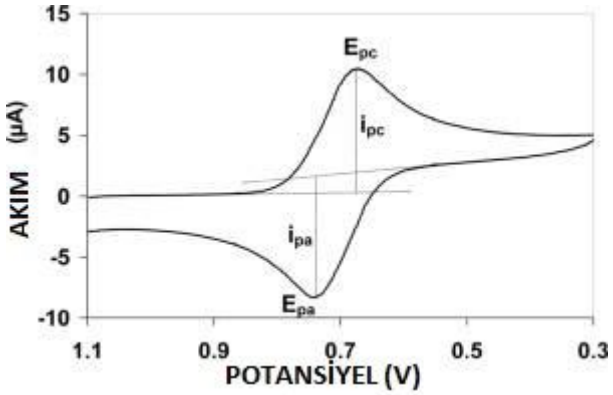
1.3.2.1.Dönüşümlü Voltametri

CV tekniği, karıştırılmayan bir çözeltideki, küçük bir durgun elektrotun akım cevabının, potansiyel ile uyarılmasıyla ölçülmesi esasına dayanır. Potansiyelin zamanla değişme hızına tarama hızı adı verilir.



Şekil 1.14. CV için potansiyel – zaman eğrisi

Potansiyel taramasının E1 ve E2 potansiyel değerleri arasında yapıldıktan sonra tekrar aynı veya farklı tarama hızıyla, ilk tarama yönüne göre ters yönde tarama yapılması durumunda CV olarak adlandırılır (Glodowski and Kublik 1980). Tarama üçgen biçimindedir. Aranan bilgiye bağlı olarak tek veya çoklu dönüşüm kullanılabilir. Potansiyel tarama sırasında, potansiyostat, sağlanan potansiyelden gelen akımı ölçer. Oluşan potansiyele karşı akım grafiği, dönüşümlü voltamogram olarak adlandırılır.



Şekil 1.15. Şekil CV Akım/Potansiyel eğrisi

İleri taramada indirgenme olmuşsa, ters taramada yükseltgenme meydana gelir. CV'de akımın, potansiyele karşı grafiği çizilir. Tarama hızı pratikte 10 mV/s'den birkaç yüz V/s'ye kadar değiştirilebilir. Çok yüksek tarama hızlarında (birkaç bin V/s) çift tabaka yüklenmesi ve ohmik düşme (IR) problemleri ortaya çıkar. Ancak mikro elektrot kullanıldığı zaman bu tür problemler minimuma indirilir. CV tekniğinde, tarama hızı önemli parametrelerden biridir ve tarama hızı–pik akımı değişiminden faydalanılarak adsorpsiyon, difüzyon ve heterojen elektrot reaksiyonunu takip eden kimyasal reaksiyonların özellikleri incelenebilir. Ayrıca bu teknikte, tarama yönünün değiştirilmesi ile reaksiyon mekanizması ve kinetik veriler hakkında fikir edinilebilir. Bir dönüşümlü voltamogramın önemli parametreleri, katodik pik potansiyeli Epc, anodik pik potansiyeli Epa, katodik pik akımı Ipc ve anodik pik akımı Ipa' dır. Tersinir bir elektrot reaksiyonu için anodik ve katodik pik akımları mutlak değer olarak yaklaşık eşittir, fakat zıt işaretlidir ve pik potansiyellerinin farkı 0,00592/n' dir. Burada n, yarı reaksiyonda yer alan elektron sayısıdır.

Elektroaktif maddelerin redoks potansiyelinin hızlı yerleşmesine olanak sağladığı için bir elektrokimyasal çalışmada genellikle ilk gerçekleştirilen deney CV uygulamasıdır. CV, redoks süreçlerinin termodinamiklerinde, heterojen elektron transfer reaksiyonlarının kinetiklerinde ve çiftleşmiş kimyasal reaksiyonlarda veya adsorpsiyon süreçlerinde önemli bilginin hızlı elde edilmesini sağlar.

CV aynı zamanda, pik akımlarının ölçülmesine dayanarak kantitatif amaçlar içinde yararlı olabilir. Bu kantitatif uygulamalar, doğru bir temelin kuruluşunu gerektirir. Bitişik pikler için (bir karışımın), ikinci pikin temeli birinci pikden (t-1/2'ye göre) gelen akımın ekstrapolasyonu ile elde edilir. Arka plan reaksiyonları, öncelikle çift tabaka yüklemesi ve redoks-yüzey yöntemleri ile ilişkili olanları, tayin sınırını

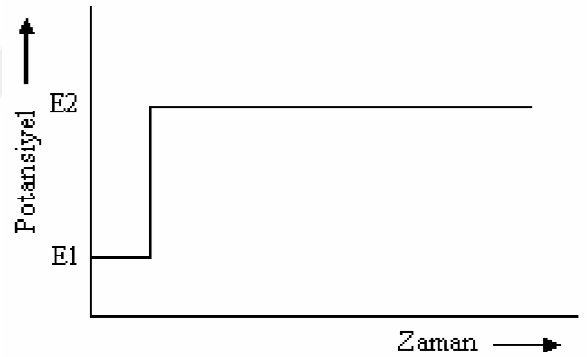
yaklaşık olarak 1×10^{-5} M seviyesinde sınırlandırır. Arka plan-çıkarılmış CV, düşük derişimlerin ölçülmesinde uygulanılabilir.

1.3.2.2.Kronoamperometri

Eğer elektrokimyasal reaksiyonun gerçekleştiği uygun potansiyel biliniyor ise, doğrudan o potansiyel değeri uygulanır ve akım gözlenir. Bu işlem amperometri olarak adlandırılır. Amperometride uygulanan potansiyel sabit iken akım şiddeti ile madde derişim arasındaki değişimler incelenir.

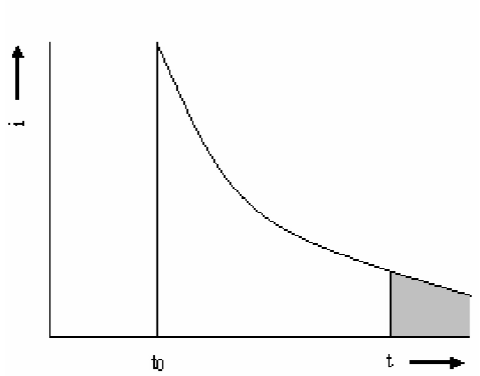
Çalışma elektrot potansiyelinin ani olarak değiştirilip uygulanan sabit potansiyelde (normal polorografide plato bölgesi) akım değişiminin zamana karşı ölçüldüğü ve akım-zaman ilişkisinin gözlendiği bir elektroanalitik tekniktir. Ölçümler milisaniye mertebesinde yapılır. Kinetik amaçlı kullanılır.

Kronoamperometride çözeltiye daldırılan çalışma elektrotuna uygulanan potansiyel–zaman grafiği Şekil 1.16.'da gösterildiği gibidir;



Şekil 1.16. Uygulanan potansiyelin zamana karşı değişim eğrisi

Şekil 1.17.'de ise elde edilen kronamperomogramlar görülmektedir.



Şekil 1.17. Kronamperomogram örneği

Önce çalışma elektrotuna herhangi bir indirgenmenin olmadığı E1 potansiyeli uygulanır. Sonra potansiyel ani olarak E2'ye değiştirilir. E2 potansiyeli, indirgenme difüzyon kontrollü olacak şekilde seçilir. E1 potansiyelinde reaksiyon olmaz, E2 potansiyelinde ise akım difüzyon kontrollüdür. E1 ve E2 potansiyeli seçilirken önce maddenin dönüşümlü voltamogramı incelenir. Akım henüz gözlenmediği artık akım bölgesindeki potansiyel başlangıç potansiyeli (E1) olarak seçilir. Dönüşümlü voltamogramdaki pik potansiyelinin daha ötesinde bir potansiyelde E2 potansiyeli olarak alınır. Potansiyel E2 değerinde belirli bir süre sabit tutulur. Bu potansiyelde oluşan akımın zamanla değişimi aşağıda Cottrell eşitliğinde verildiği gibidir;

$$i(t) = \frac{nFAD^{1/2}C_0}{\pi^{1/2}t^{1/2}}$$

Bu eşitliğe göre akım, $t^{1/2}$ ile ters orantılı olarak değişir. Cottrell eşitliğine göre akım, $t^{-1/2}$ ye göre grafiğe geçirildiği zaman orijinden geçen bir doğru elde edilir. Bu grafik yardımıyla bir elektrot reaksiyonunun difüzyon kontrollü olup olmadığı test edildiği gibi elektroaktif maddenin difüzyon katsayısı ve aktarılan elektron sayısı da bulunabilir. Ancak deneyin güvenilir olması için, zaman aralığının geniş tutulması gerekir.

Kronoamperometri tekniği genellikle elektroaktif türlerin difüzyon katsayılarının veya çalışma elektrodunun yüzey alanının hesaplanmasında kullanılır. Aynı zamanda, elektrot reaksiyonlarının mekanizmasının belirlenmesiyle ilgili çalışmalarda da kronoamperometri verilerinden yararlanılır (Wang, Wang ve ark. 2000).

1.4.Biyosensörler

Biyosensör, biyolojik moleküllerin veya sistemlerin seçimlilik özellikleri ile modern elektronik tekniklerin işlem yeteneğinin birleştirilmesiyle geliştirilen biyoanalitik cihazlardır.

Biyosensörler biyoloji, fizik, kimya, biyokimya gibi pek çok bilim alanının bilgi birikiminin multidisipliner bir anlayış çerçevesinde kullanılmasıyla geliştirilmiştir.

Biyosensörler, temel olarak bir seçici analiz için, biyokimyasal moleküler tanıma özellikleri kullanan küçük cihazlardır. Herhangi bir biyosensör sisteminde olan başlıca işlemler, analit tanıma, sinyal çevirici ve sinyal okumadır.



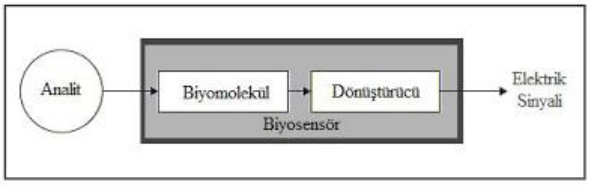
Şekil 1.18. Biyosensör Yapısı

Sinyal; optik, termal, elektrik veya elektronik bir element tarafından çevirilmiş olabilir. Biyokimyasal reaksiyon ve yük taşıma hızlarının belirgin bir şekilde elektroda doğru türlerin kütle taşıma hızını geçtiği anda iletken polimer/çözelti kısmında elektrokimyasal bir dönüşüm meydana gelir. Bu difüzyon kontrollü elektrokatalitik süreç amperometrik çalışmalarda kullanılır (Gerard, Chaubey ve ark. 2002).

Biyosensörlerin yapısında görev alan komponentler çoğu kez biyoreseptör olarak da adlandırılırlar. Biyoreseptörler analizlenecek maddeyi dönüşüme uğratırlar. Bunların içinde en yaygın kullanılanlar enzimler ve antikorlardır. Enzim-substrat ve antikor-antigen arasındaki etkileşimin ilk adımı analitlerin protein moleküllerine bağlanmasıdır. Hidrolazlar dışındaki enzimler kosubstrat yokluğunda yalnız substratı enzime bağlarlar. Aynı durum inhibitör ve diğer effektörler için de geçerlidir. Kosubstrat varlığında ise substratın kimyasal bir dönüşümü gerçekleşir. Son yıllarda geliştirilmiş olan katalitik antikorlar yalnız antigenlere bağlanmakla kalmaz bunlar kimyasal bir dönüşümü de katalizlerler. Biyoreseptörle yakın temas halinde olan bir çevirici ilgi duyulan analit için yüksek derecede spesifik olmalıdır. Ayrıca bu çevirici

uygun derişim aralığı içinde en hızlı sürede cevap verebilmelidir. Biyoreseptörler, enzimler gibi biyolojik moleküler türler veya tanıma olayı için bir biyolojik mekanizmayı kullanan ve yaşayan biyolojik sistemler olabilirler (Vo-Dinh and Cullum 2000).

Bir biyosensörün biyoreseptör kısmı, enzim gibi, biyomolekülün iletken polimere (Zhao, Meng ve ark. 2008), doğal polimere (Endo, Ikeda ve ark. 2008), hidrojele (Matharu, Sumana ve ark. 2007), Langmuir-Blodged Filme (Patel, Meier ve ark. 2001), (Isik, Alkan ve ark. 2003), immobilize ederek uygulanabilir. Tutuklanmış enzimler serbest haldeki olanlarınkine oranla sık ve tekrar tekrar kullanıldıkları için çok daha fazla tercih edilirler. İmmobilizasyon ürünlerin enzimle kirlenmemesini sağlar ayrıca bu enzimlerin daha uzun yaşam süresi ve öngörülebilir bozulma hızına sahip olduğu bilinmektedir (Przybyt and Bialkowska 2002), (de Prada, Pena ve ark. 2004), (Patel, Meier ve ark. 2001), (Tuncagil, Odaci ve ark. 2009).



Şekil 1.19. Biyosensör çalışma prensibi şematik gösterimi

Sinyal çeviriciler**,** reseptörlerin biyolojik reaksiyonunu ölçülebilir fiziksel bir sinyale dönüştürürler. Biyokimyasal reaksiyona göre çeviriciler seçilir. Elektrotlar amperometrik ve potensiyometrik ölçümlerde kullanılır ve burada hedef maddedir (O_2 elektrodunda çözünmüş O_2, pH elektrodunda H^+ iyonu gibi). Teorik olarak reseptör ve sinyal çeviricilerin birçok kombinasyonu mümkün olmasına rağmen bu kombinasyonlar bir elektrik sinyali oluşturmazlarsa biyosensör fonksiyon göstermez. Örneğin; çevirici olarak bir termistörün kullanılması durumunda substratın dönüşüm reaksiyonu sonucu entalpide bir değişim olmaz ise biyosensör çalışmaz.

Biyosensörler, 1950'li yılların ortalarında L.C. Clark'ın kandaki glukoz seviyesini ölçmesiyle kullanılmaya başlanmıştır. Clark ve Lyons'un geliştirdiği birinci nesil biyosensörlerde elektron alıcı olarak oksijen kullanılırken, ikinci nesil biyosensörlerde elektron alıcı olarak redoks medyatörleri kullanılmaya başlanmıştır (Dinckaya, Akyilmaz ve ark. 1999). Üçüncü nesil biyosensörlerde enzimin indirgenme

yükseltgenme merkezi ile elektrot yüzeyi arasında doğrudan elektriksel iletişim sağlanmış ve indirgenme yükseltgenme medyatörlerine gereksinim kalmamıştır.

Biyosensörler; sinyal çevirici türüne göre;

- Optik biyosensörler
- Kalorimetrik biyosensörler
- Piezoelektrik biyosensörler
- Elektrokimyasal biyosensörler olarak sınıflandırılabilirler.

Optik biyosensörler; biyokimyasal bir reaksiyon sonucu yayılan ya da absorplanan ışının ölçümünü esas alırlar. Optik biyosensörlerde hedef ışıktır.

Kalorimetrik biyosensörler; analitin uygun biyomolekül ile biyokimyasal reaksiyonu sonucu oluşan ısı değişiminin ölçümüne dayanır.

Piezoelektrik biyosensörler; karakteristik rezonans frekansındaki farklanmayı belirleyerek piezoelektrik kristal yüzeyinde toplanan numunenin kütlesinin ölçümüne dayanır. Kristalin salınım rezonansının kütle yüklenimi sebebiyle değişmesi piezoelektrik sensörlerin hedefidir.

Elektrokimyasal biyosensörler; biyoetkileşim sırasında oluşan ya da tüketilen elektron gibi elektrokimyasal türlerin oluşturduğu sinyalin ölçümünü esas alır. Ölçülecek elektrokimyasal özelliğe göre elektrokimyasal biyosensörler, kondüktometrik, potansiyometrik ve amperometrik olarak üç gruba ayrılır. **Kondüktometrik biyosensörler**, biyolojik bir elementin sebep olduğu bir çift metal elektrot arasındaki iletkenlikteki değişiklerin ölçümüne dayanır. **Potansiyometrik biyosensörlerde,** çalışma elektrodu ve referans elektrot arasındaki potansiyel farkının ölçümünden yararlanılarak madde miktarı tayin edilir. **Amperometrik biyosensörlerde** ise, sabit bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümü esas alınır (Dinckaya, Akyilmaz ve ark. 1999), (Gerard, Chaubey ve ark. 2002).

Zamanla elektrokimyasal biyosensörler en çok kullanılan biyosensörler haline gelmiştir. Elektrokimyasal biyosensörler diğer biyosensörlere göre bulanık ortamlarda kullanılabilirlikleri, oldukça düşük duyarlılığa sahip olmaları ve küçük boyutlara yatkın olup az maliyetle üretilebilirlikleriyle avantaj kazanmıştır.

1.4.1. Biyosensörlerin Yapısı ve Çalışma Mekanizması

Biyosensörlerin tarihi 1950'li yılların ortalarında L.C. Clark'ın Cincinnati Hastanesinde (Ohio, ABD) ameliyat sırasında kanın O_2 miktarını bir elektrot ile izlenmesiyle başlar. 1962 yılında Clark ve Lyons, GOD enzimini O_2 elektrotla kombine ederek kanın glikoz düzeyini ölçmeyi başarmışlardır. Biyolojik sıvıdaki çözünmüş oksijen elektrot etrafındaki membranı geçerek elektrot yüzeyine ulaştığında glukoz oksitlenip glukonik aside dönüşür ve bu sırada O_2 harcanır. Ortamda glukoz bitince O_2 tüketimi durur. O_2 elektrodu ile başlangıçtaki ve reaksiyon sonundaki çözünmüş oksijen ölçülür. Aradaki fark ortamdaki glukozun yükseltgenmesi için harcanan O_2 olup buradan biyolojik sıvıdaki glukoz miktarı hesaplanır.

Elektrokimya araştırmalarındaki bu yeni gelişme sayesinde sadece anyon ve katyon belirleyen sensörlerin hazırlanması ile kısıtlanan çalışmalar yerini birçok maddenin tayin edilebileceği yeni biyosensör araştırmalarına bırakmıştır.

Biyosensör sistemi üç temel bileşenden oluşmaktadır. Bunlar, seçici tanıma mekanizmasına sahip biyomolekül, bu biyomolekülün incelenen madde ile etkileşimi sonucu oluşan fizikokimyasal sinyalleri elektronik sinyallere çeviren 'çevirici' ve 'elektronik' bölümlerdir. Bu bileşenlerden en önemlisi, tayin edilecek maddeye karşı son derece seçimli fakat tersinir bir şekilde etkileşime duyarlı biyomoleküllerdir. Biyosensörlerde biyomolekül olarak; enzimler, mikroorganizmalar, organeller, doku kesitleri, antikorlar, nükleik asitler ve biyolojik zarlar içine yerleşmiş kimyasal reseptörler kullanılabilir. Biyosensörlerin yapısında görev alan biyomoleküller çoğu kez biyoreseptör olarak adlandırılırlar. Biyoreseptörler analizlenecek maddeyi dönüşüme uğratırlar ve bu dönüşüme eşlik eden değişimler sinyal çevirici tarafından algılanır. En yaygın kullanılan biyoreseptörler, yüksek spesifikliklerinden dolayı enzimlerdir. Uygun bir enzimin bulunamaması veya enzimin kararsız olması ve birden çok sayıda maddenin tayini durumlarında hücre sistemleri veya mikroorganizmalar kullanılır. İncelenen maddenin varlığında, biyomolekül bir dönüştürücü ile belirlenebilen fizikokimyasal bir etkiye sahip olmalıdır.

Biyosensörler farklı bir bakış açısıyla analizlenecek madde(analit)-biyoaktif bileşen ilişkisine göre aşağıdaki şekilde de sınıflandırılabilirler;

- Biyoaffinite esaslı biyosensörler
- Biyokatalitik esaslı biyosensörler
- İmmobilize hücre esaslı biyosensörler

• Transmembran esaslı biyosensörler

Biyoaffinite molekülleri olan antikorlar, hormon almaçları, Deoksiribo Nükleik Asit (DNA), lektin gibi moleküller antijenlerin, hormonların, DNA parçacıklarının ve glikoproteinlerin moleküler tanımlanmasında kullanılırlar (örneğin; iletici sistem üzerinde antikor immobilizasyonuyla antijenlerin tayini).

Biyokatalitik moleküller ise, analit üzerinde moleküler değişime neden olmakta ve bu dönüşüm sonucu ortamda azalan ya da artan madde miktarı takip edilerek sonuca gidilmektedir. Bu amaçla saf enzim sistemleri, mikroorganizmalar ve bitkisel veya hayvansal doku parçaları kullanılır.

İmmobilize hücre esaslı biyosensörler; iletici sistem üzerinde hücrelerin immobilizasyonuyla o hücreler tarafından metabolize edilen çeşitli maddelerin tayininde kullanılırlar.

Transmembran esaslı biyosensörler; çeşitli moleküllere özellikli reseptör veya farklı membran proteinlerini içeren hücre membranlarının iletici sistem üzerinde immobilizasyonuyla söz konusu moleküllerin seçimli bir şekilde tayinlerinde tercih edilmektedirler.

Biyosensörlerin çalışma prensibinde öncelikle substratın çözelti içerisinden biyosensör yüzeyine taşınması gerekir. Substratın taşınması; difüzyon, karıştırma vb. gibi çeşitli şekillerde olabilir. Substrat biyokatalizörün aktif bölgesine difüzlenir. Biyokatalizör polimerik gözenekli membrana (selülozik diyaliz membranı gibi) emdirilmiş veya algılayıcı ile polimerik membran (selofan, selüloz asetat/nitrat, polivinil alkol, poliüretan vb) arasına sandviç edilmiş veya polimerik bir jel içinde hapsedilmiş olabilir. Biyokatalizör ve substrat arasında reaksiyon meydana gelen bu etkileşme sonucu gaz molekülleri (O_2, CO_2, NH_3, vb) salınabilir veya kullanılabilir, seçimli iyonlar (H^+, NH_4^+, diğer tek değerlikli anyon ve katyonlar) oluşabilir, ısı ortaya çıkabilir veya kaybolabilir, optik yoğunluk değişebilir, elektron salınabilir veya kullanılabilir. Biyokatalizör ve substrat reaksiyonu sonucu oluşan ürün algılayıcı yüzeyine taşınır. Algılayıcı yüzeyinde yukarıda bahsedilen değişimler algılanıp elektriksel devrelerle ölçülebilecek bir boyuta dönüştürülür. Ölçülen elektriksel sinyal analit derişimiyle orantılıdır.

1.4.2. Biyosensörlerin Uygulama Alanları

Günümüzde biyosensörler; klinik diyagnostik, biyomedikal sektör, proses kontrolü, biyoreaktörler, ilaç sanayi, biyoteknoloji, tarla tarımı, bağ-bahçe tarımı ve veterinerlik, sıvıların analizinde, çevre kirliliği ve kontrolünde, biyoloji, kimya, savunma sanayi, arıtım ve kontrol teknolojileri gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılmakta ve bu konularda yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Son yıllarda biyosensör kavram ve tanımlarında önemli değişme ve genişlemelere paralel olarak, algılama mekanizmaları (görme, işitme, koku alma, tat alma) ideal biyosensör olarak görülmekte ve bu mekanizmaların yapay olarak üretilmesi çalışmaları hızla devam etmektedir. Ayrıca biyosensörler; gıda maddeleri, metabolitler, vitaminler, antibiyotikler, organik maddeler, bazı organik bileşiklerin yanında enzimler, virüsler ve mikroorganizmaların tayininde kullanılırlar.

Son yıllarda tıbbi analizörlere enzim elektrotları takılarak yoğun bakım ünitelerinde kullanılmaya başlanmıştır. Biyoteknoloji ve gıda endüstrisinde başta glukoz olmak üzere birçok monosakkarit, aminoasitler, organik asitler (laktik asit) üre ve alkol tayinlerinde enzim sensörleri kullanılmaktadır. Ayrıca, gıdalardaki yabancı maddeler (pestisitler, toksinler ve hormonlar vb.) yanında aroma ve tazelik gibi kompleks değişkenlerin tayininde de biyosensörler kullanılabilir. Toprak, hava ve su kirliliğinin kontrolünde mikrobiyal sensörler ve enzim sensörleri kullanılmaktadır. İlaçların kötü amaçla kullanımı ve uyuşturucu ile mücadelede biyosensörler kullanılabilir (Dinckaya, Akyilmaz ve ark. 1999).

Biyosensör hazırlamada aktif biyolojik materyalin kararlılığını koruyarak immobilize edilmesi gerekir. Bu nedenle genellikle jelde tutuklama yöntemi kullanılır. En çok kullanılan biyomateryal mikroorganizmalardır ve çoğu kez aktif çamurdan, nehir suyundan ve topraktan elde edilirler. Uzun yaşam süreleri, ucuz ve kararlı oluşları, pH ve sıcaklık değişimlerini tolere edebilmeleri nedeniyle saflaştırılmış enzim ve anti badilere göre üstünlük sağlarlar.

Kirlilik kaynağı emüsyon derecelerinin ve atmosfer kirliliğinin ölçümü amacı ile çok sayıda gaz bileşeninin ölçümüne gerek duyulur. Bu nedenle mikrobiyal esaslı CO_2, NO_2, NH_3,CH_4, SO_2 gibi gaz bileşenlerin ölçümüne dayalı biyosensörler geliştirilmiştir.

Örnekler incelendiğinde; patojenlerin tayini, biyoremediasyonun öncesinde ve sonrasında toksik maddelerin seviyelerinin belirlenmesi, organofosfatların tayini ve belirlenmesi, mikrobiyolojik tahlillere bir alternatif olarak, folik asit, biotin, B12

vitamini ve pantotenik asitin rutin analitik ölçümlerinin gerçekleştirilmesi, özellikle et ve bal gibi yiyeceklerdeki antibiyotikler ve büyütme faktörleri gibi ilaç artıklarının belirlenmesi, ilaç keşfi ve yeni bileşiklerin biyolojik aktivitesinin değerlendirilmesi, biyosensörlerde protein mühendisliği, mantar zehirleri gibi toksik metabolitlerin tayini, hastalıklar esnasında, tuzaktan kurtularak insan nefesine yerleşen ve korunan moleküllerin tayini gibi geliştirilmiş biyosensör uygulamaları da görülmektedir.

1.5. Enzimler

Birçok kimyasal reaksiyon bilindiği üzere kendiliğinden gerçekleşir. Bazı reaksiyonların belirli bir hızda gerçekleşebilmeleri için ise katalizlenmeye ihtiyaçları vardır. Katalizörler, substratın kimyasal olarak başka bir maddeye dönüşümünü sağlamak için, gerekli aktivasyon enerjisini azaltan moleküllerdir. Termodinamik olarak bu enerji miktarı, serbest enerjideki değişim olarak da ifade edilebilir. Katalizörler, reaksiyon sırasında harcanmazlar ya da değişime uğramazlar. Substratın ürüne dönüşürken sınırsız olarak kullanılan katalizörler kararlılıklarıyla bu işlemi sınırlandırır veya devam ettirirler. Buda yapılarındaki bozulmayla ilgilidir.

Canlı organizmada meydana gelen birçok biyokimyasal reaksiyon, protein yapılı özellikli biyokatalizörler olan enzimler tarafından katalizlenir. Biyoreseptör olarak en çok kullanılan biyomoleküller enzimlerdir. Biyosensörlerin birbirinden farklılıklarının tanımı olan sensörün analite olan özgünlüğü aslında tamamen biyoreseptörün analite karşı özgünlüğüdür. Enzimlerin substratlarına karşı oldukça yüksek bir özgünlüğü, afinitesi vardır öyleki; birçok kimyasal arasından ilgili oldukları substratı seçer ve reaksiyonu tetiklerler. Enzimler, geri dönüşümlü bir reaksiyonun dengesini değiştirmez, sadece denge haline erişilmesini kolaylaştırırlar.

Enzimlerin 19. yüzyıldan sonra ortaya çıktığı bilinmektedir. 1883 yılında şekeri alt birimlerine parçalayan aktif madde izole edilmiş ve bu maddeye diastaz, daha sonra mide suyundan ekstrakte edilmiş maddeye ise pepsin adı verilmiştir. Bunlara ve diğer aktif maddelere genel olarak fermentler denilmiştir. 1878'de Kuhne tarafından Yunanca maya anlamına gelen "enzume" kelimesinden türeyen "enzim" teriminin kullanılması önerilmiştir. Bir çalışmada, canlı hücrenin olmadığı ortamlara maya hücresi ekstraktının ilave edildiği ve şeker fermantasyonunun gerçekleştiğini görülmüştür. Sumner, fasulyeden üreaz enzimini izole etmiş ve kristalleştirebilmiştir. Bu çalışmasıyla da 1947 yılında Nobel ödülünü almaya hak kazanmıştır.

Substratlara ek olarak enzimler inhibitör, aktivitör, allosterik aktivitör ya da inhibitör gibi özellikli moleküllerle de bağlanabilirler. Metal iyonları gibi inorganik ya da organik bileşenler olabilen koenzimler, enzimlerin reaksiyonları katalizlemesini sağladıkları için reaksiyonlarda oldukça önemli rol oynarlar. Enzim substrat kompleksindeki stabilizasyonu sağlayan kovalent olmayan etkileşimler, protein yapısının stabilizasyonu sağlayan etkileşimlerle aynıdır.

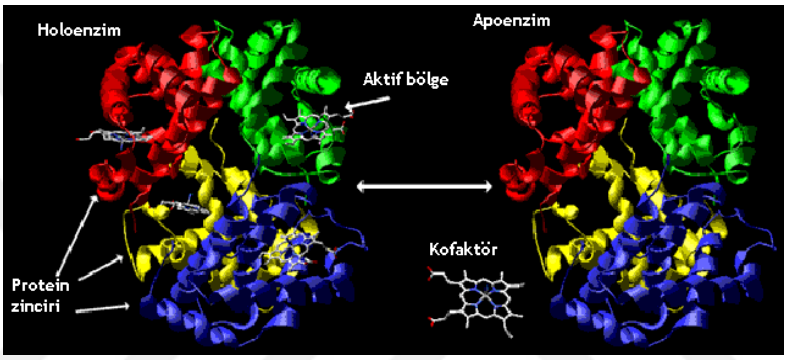
Enzimlerin karakteristik özellikleri, moleküler yapılarındaki farklılıklardan gelir. Enzimler yüzlerce aminoasidin meydana getirdiği proteinlerdir. Bu aminoasitler, birbirlerine bir aminoasidin karboksil grubundaki karbon atomu ile bir sonraki aminoasidin α-amino grubundaki N atomunun peptid bağı oluşturması ile kovalent olarak bağlanmışlardır. Radikal grubunun özelliğine göre aminoasitler hidrofilik ya da hidrofobik özellik gösterebilirler. Enzimler çoğu zaman renksizdirler, suda veya tuz çözeltisinde çözülebilirler.

Enzim aktivitesi; belirlenmiş bir sürede, belirli ortam şartlarına sahip substrat miktarının enzim miktarının etkisiyle uğradığı değişimin ölçülebilir değerine verilen tanımdır. Enzim miktarı yerine 'enzim ünitesi' tanımı kullanılmaktadır. Enzim aktivitesi, spesifik aktivite ile belirtilir. Bir miligram proteinde bulunan ünite sayısına spesifik aktivite denilmektedir. Yani spesifik aktivite ünite/mg olarak kabul edilmektedir. Biyolojik sıvılarda ölçülen enzim aktiviteleri optimum şartlarda 1 saniyede 1 mol substratın ürüne dönüşümünü katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlanır. Bu birim, uluslararası birim (katal) olarak kabul edilir. En çok kullanılan enzim aktivitesi birimi ise IU'dir ve 1 IU enzim aktivitesi optimum şartlarda 1 dakikada 1 µmol substratın ürüne dönüşümünü katalizleyen enzim miktarını ifade eder. Enzimle kataliz edilen tepkimelerin hızını etkileyen faktörlerin tamamı (enzim derişimi, substrat derişimi, sıcaklık, pH ve inhibitörlerin varlığı) önem taşır.

Enzimlerin spesifiklik özellikleri dört kısımda açıklanabilir. Mutlak spesifiklik; bir enzimin yalnızca spesifik bir substratın spesifik bir reaksiyonunu katalize etme özelliğidir. Grup spesifikliği; bir enzimin benzer fonksiyonel grupları içeren sınırlı sayıda substrat ile reaksiyonlaşma özelliğidir. Bağ spesifikliği; bir enzimin proteinlerin peptit bağı, karbonhidratların glukozidik bağı gibi belli bağ tipleri üzerine etkili olmasıdır. Stereospesifiklik; bir enzimin yalnızca glukozun D ve L izomerleri gibi belli optik izomerlere etkili olma özelliğidir.

1.5.1. Enzimlerin Yapısı ve Çalışma Mekanizması

Enzimler, protein yapılı temel taşları amino asit olan biyomoleküllerdir. Amino asitler ise bir tane karbon atomuna (C) bağlanmış bir amino grubu ($-NH_2$), bir hidrojen (-H), bir karboksil grubu (-COOH) ve bir de değişken yan gruptan (-R) oluşurlar. Bütün aminoasitlerin temel yapısı aynıdır ancak taşıdıkları yan grupların büyüklükleri, şekilleri, elektrik yükleri ve hidrofilik veya hidrofobik yapıları ile farklılaşma gösterirler. Aminoasitler birbirleriyle etkileşirler ve büklümlü kıvrılmış bir yapı haline gelerek enzimlerin 3 boyutlu bir yapı halini almalarına sebep olurlar.



Şekil 1.20. Enzim yapısı

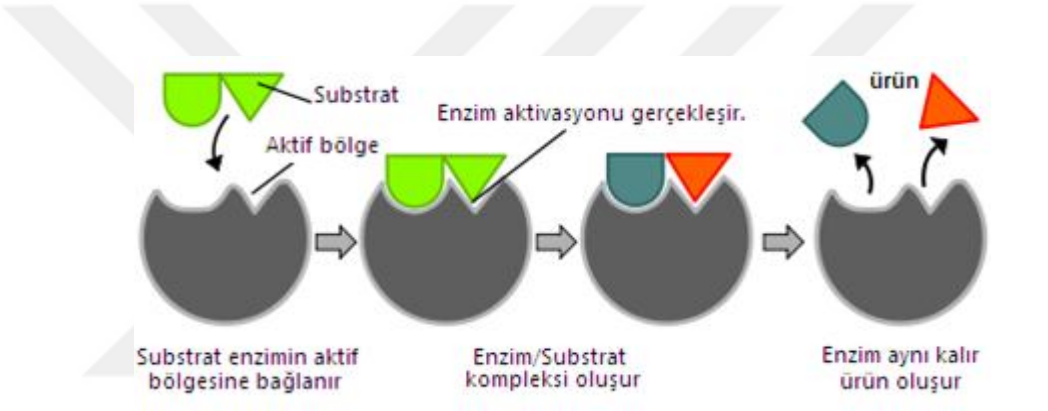
Bu 3 boyutlu yapıdaki aminoasitlerin yan gruplarından bazıları belirli bir bölgede birikerek 'aktif bölge' denilen alanı oluştururlar. Bu aktif bölge sayesinde enzimlere, katalizleme ve seçicilik özellikleri kazandırılarak biyokimyasal reaksiyonlar bu bölgede gerçekleştirilir. Aktif bölgeyi oluşturan amino asit yan zincirleri substrata uyumlu üç boyutlu bir yapı oluşturur ve aktif bölge substratı bağlayarak bir enzim-substrat kompleksi meydana getirir. Ardından oluşan kompleks ürüne dönüştükten sonra enzim üründen ayrılır.

Aktif bölgenin substrat için uygun geometride olması uygun yön ve açıda bulunması, etki reaksiyon serbest enerji (ΔG) değişiminin yaklaşık 10 kat azalmasına yani reaksiyon hızlarının yüz milyon kat artmasında yardım ederek enzimlerin substrat kompleksinin oluşmasını çok kolaylaştırır.

Emil Fischer ise enzimlerin substratlarla ilşkisinin bir anahtar kilit sistemine benzediğini öne sürmüştür. Ayrıca her enzimin kendi substratına karşı etki gösterdiğini tanımlayarak, bu yapının bazı durumlarda kesin olduğunun bazı istisnai durumlarda da farklılık gösterebileceğini öngörmüştür. Örneğin; fonksiyonlu grup yapısına sahip olan

ve birbirine benzeyen enzimlerin sadece kendi substratlarına değil farklı substratlara da etki edebileceği görülmüştür. Ancak farklı substratlarla etkileşmelerinde etkime hızlarında Km değerleri farklılıkları oluşmaktadır.

Enzimlerde substratın ve koenzimlerin bağlanarak biyokimyasal tepkimelerin meydana geldiği yerler aktif merkez olarak adlandırılır. Aktif merkezler aminoasit kalıntılarından oluşmuş ve özel geometriye sahip kısımlardır. Aktif merkez, büyük enzim molekülünün sadece küçük bir kısmını kaplar. Enzim molekülünün büyük olması, aktif merkezin geometrik yapısının oluşması için gereklidir. Şekil 1.21'de gösterilen modelde substrat, enzimin aktif merkez bölgesine bağlanır ve bir enzim substrat kompleksi oluşur. Bu kompleksin bozunması sonucu ürün meydana gelir ve enzim yeniden serbest kalır.



Şekil 1.21. Enzim-substrat kompleksinin oluşması

1.5.1.1. Enzimatik Reaksiyon Kinetiği

Enzim katalizli reaksiyonlar ilk olarak 19. yüzyılın sonlarında çalışılmıştır. 1913 yılında Michelis ve Menten gerçekleştirdikleri çalışmalarında enzim-substrat kompleksi oluşturmuşlar ve substrat derişimi arttıkça reaksiyon hızının da hiperbolik olarak maksimuma ulaştığını görmüşlerdir. Bu çalışma sonucunda substrat, ara ürün ve serbest enzim-enzim substrat kompleksi arasında dengeli gerçekleşen enzim katalizli reaksiyonlar için bir hız eşitliği önermişlerdir;

ES'nin ürüne yıkım hızının, ES'nin enzim substrat içine dağılmasından çok daha yavaş olduğu varsayılmaktadır. Michelis ve Menten, eşitliklerini bu varsayımı baz alarak oluşturmuşlardır, bundan dolayı;

$k_{+2} << k_{+1}$

Ancak Michelis ve Menten'in formülasyonu, enzim katalizinin ilk basamağını ilgilendirdiğinden, bu konuda Briggs ve Haldane başlangıç reaksiyon hızı açısından daha geçerli bir önermede bulunmuşlardır. Buna göre, reaksiyon başladıktan hemen sonra, ara ürün (enzim-substrat kompleksi) derişiminin sabit kaldığı durgun hale ulaşılır.

$d[ES]/dt = k_{+1}[E][S] - k_{-1}[ES] - k_{+2}[ES] = 0$

Toplam enzim derişimi için serbest enzim derişimi ile o andaki enzim substrat kompleksinin derişiminin toplamı; başlangıçta reaksiyon sistemine konulmuş olan enzim derişmine, $[E]_0$, değerine eşit olmasından dolayı, eşitliği yazılır.

$[E] + [ES] = [E]_0$

[E], enzim derişimi için bulunan bağıntı eşitlik (3)'de yerine yazılırsa aşağıdaki bağıntı elde edilmektedir.

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

verilen eşitlik düzenlendiğinde;

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

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

Substrat derişimlerinin büyük olduğu bu bölgelerde reaksiyon birinci derecedendir. Substrat derişiminin Km sabitine eşit olduğu durumda

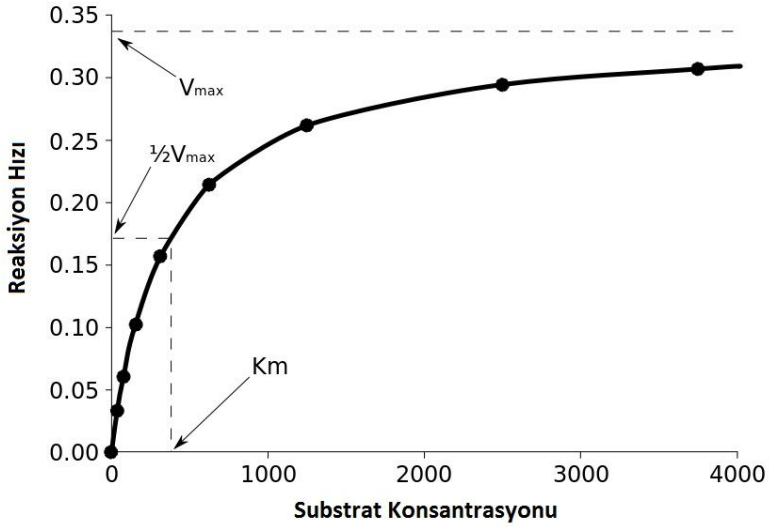
$[S]=Km$

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

Bu eşitliğe Michealis-Menten denklemi denmiştir.

Bu durumda K_m; Maksimumu hızın yarısına karşılık gelen substrat derişimi olarak tanımlanır ve birimi mol/L dir. Michaelis-Menten denklemi enzimatik etkinin kantitatif incelenmesinde bütün enzimler için temel bir ifadedir. Enzimlerin K_m değerleri çok farklılık gösterir. Birçok enzim için bu değer 10^{-5}-10^{-3} M arasındadır. K_m değeri enzim derişimine bağlı değildir. Substratın yapısı, pH, sıcaklık ve iyonik şiddet ile değişebilir. Bir enzimin birden fazla substratı varsa her bir substrat için ayrı bir K_m değeri vardır. Bu durumda K_m, ES'nin sağlamlık ölçüsüdür. Yüksek K_m zayıf

bağlanmayı düşük K_m kuvvetli bağlanmayı ifade eder. K_m enzimin substrat ilgisini gösterir. Enzimlerin V_{max} değerleri de birbirlerinden çok farklıdır. Km de değişikliğe neden olan faktörler V_{max} da etkiler. V_{max} enzimin katalitik aktivitesinin bir ifadesidir.

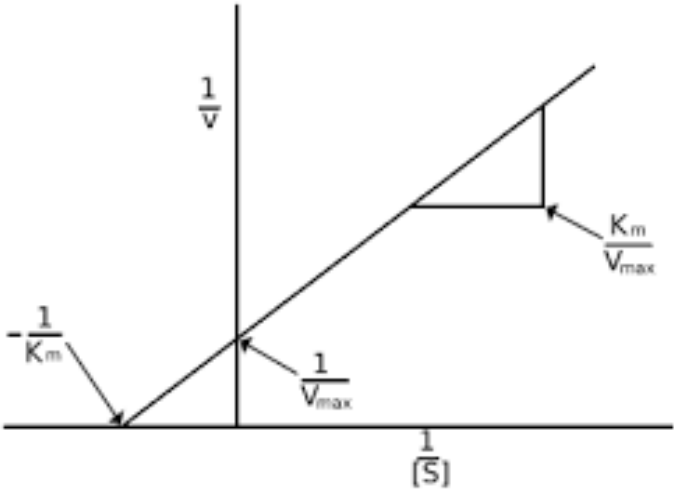


Şekil 1.22. Reaksiyon hızı-substrat derişimi grafiği

Michaelis Menten eşitliği bir doğru grafiğine dönüştürülür, bu doğrunun çizildiği grafikte;

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

Bu eğriye de Lineweaver-Burk Eğrisi adı verilmiştir. Eğri x eksenini kesecek şekilde uzatıldığında kesme noktası $-1/K_m$ elde edilir.



Şekil 1.23. Lineweaver-Burk eğrisi

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{k_2 [E]_0} \frac{1}{[S]}$$

Veya

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

Bu eşitliklere göre 1/v ile 1/[S] arasında çizilen grafikte, doğrunun ordinatı kestiği değerden $1/V_m$, doğrunun eğiminden de K_m/V_m değerleri bulunur. Elde edilen sonuçlara göre Michaelis-Menten sabitleri de hesaplanır.

1.5.2. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Biyosensör uygulamalarında biyoreseptör olarak en çok kullanılan biyomoleküller enzimlerdir. Enzim reaksiyonlarının kontrolü, serbest enzimlerin ortamdan istenilen şartlarda uzaklaştırılamadığı için, oldukça zordur. Ayrıca enzimlerin aktivitelerini tüketmeden reaksiyon ortamından çıkarılmaları imkânsızdır bu sebeple tekrar kullanılabilirlikleri de olanaksızdır. Bu problemlerin çözümü için enzim çalışmalarında enzimler immobilize edilerek kullanılırlar. İmmobilizasyon ile hareketleri sınırlandırılan enzimlerin kullanım avantajları şunlardır;

Reaksiyonun bitiminde ortamdan kolayca uzaklaştırılabilirler, ürün oluşumu kontrol altında gerçekleşir, tekrar kullanılabilirlik sağlanır, daha kararlıdırlar, sürekli

uygulanabilirler, enzimin parçalanma olasılığı azdır, mekanistik çarpışmalara ve çevre koşullarına karşı dayanıklıdır.

Enzimin etkin bir şekilde yüzeyde tutunabilmesi için, uygulanan immobilizasyon yönteminin;

• Enzimin çevirici yüzey üzerine etkili ve kararlı bir şekilde tutunmasını sağlaması,

• Enzimin biyolojik özelliklerini etkilememesi,

• Biyouyumlu ve kimyasal olarak inert olması gerekmektedir.

Enzim, bir yüzey üzerine immobilize edilirken, seçilen yöntem çok önemlidir. Uygulanan yöntem enzimin aktif merkezindeki kimyasal yapıyı ya da reaktif grupları değiştirerek enzim aktivitesinde bir kayba sebep olmamalıdır.

1.5.2.1. Adsorbsiyon

Bu yöntem, enzim proteininin suda çözünmeyen bir taşıyıcı üzerine fiziksel adsorbsiyonunu temel almaktadır. Uygun taşıyıcı yüzeyler kullanılırsa uygulaması kolay ve ucuz olan bu yöntemi kullanmak büyük avantaj sağlar. Enzim molekülünde ve aktif bölgede hemen hemen hiçbir hasara ve konformasyonal değişime yol açmayan bir immobilizasyon yöntemidir. Ancak enzim ve taşıyıcı arasındaki bağlar zayıftır bu sebeple uygulama sırasında adsorbe edilmiş enzim taşıyıcı yüzeyden ayrılabilir. Enzimlerin fiziksel adsorbsiyonu için uygulanan bazı yöntemler; statik işlem, elektro-boşalım, reaktörde bekletme, çalkalama ya da karıştırma banyosunda bekletmedir.

Bu yöntemin önemli avantajı, bağlama için kimyasal madde ihtiyacı olmaması ve işlemin tamamlanması için çok aşamaya ihtiyaç duyulmamasıdır. Kimyasal bağlama işlemlerinde enzime zarar verme ihtimali yüksektir adsorbsiyonda ise bu ihtimal çok düşüktü**r.** Çünkü adsorbsiyonda bağlanma, hidrojen bağları, çoklu tuz köprüleri ve Van der Waal's kuvvetleriyle olmaktadır buda önemli bir dezavantaj oluşturmaktadır. Oluşan zayıf bağlardan dolayı ortam pH'sının, sıcaklığın, iyonik kuvvetlerin değişimiyle ve substrat varlığıyla enzim proteininin taşıyıcı yüzey üzerinden desorbsiyonu gözlenmektedir. Bir diğer dezavantaj ise, çok spesifik bir yöntem olmamasından dolayı, diğer proteinlerin ve maddelerin immobilize edilecek enzim gibi kullanılmasıdır. Bu durum immobilize enzimin özelliklerini değiştirmekte ve reaksiyon hızını düşürmektedir.

1.5.2.2. Kovalent Bağlama

Kovalent bağlama metoduyla ise enzimler, suda çözünmeyen taşıyıcıya, bu taşıyıcının üzeri bir film veya tabaka ile kaplanmış da olabilir, kovalent bağlanırlar. Kovalent bağlama enzim molekülünde bulunan fonksiyonel gruplar karboksil, hidroksil ve sülfidril gibi gruplar ile gerçekleşir.

Kovalent bağlama daha karmaşık bir immobilizasyon yöntemidir ve immobilizasyon için gerekli şartlar daha fazladır. Bu sebeple kovalent bağlama enzimin konformasyonunu değiştirebileceği gibi, enzimin aktif bölgesini de etkileyerek aktivite kaybına sebep olabilir. Ancak enzim ve taşıyıcı yüzey arasındaki bağlanma kuvvetleri çok güçlüdür, yüksek iyonik güçteki bir çözeltide bile enzimin taşıyıcı yüzey üzerinden desorbsiyonu gibi bir durum kovalent bağlamada oluşmaz. Ancak bağlanma aktivite yüzdesini artırmak için kullanılan temel amino asit kalıntılarının taşıyıcıya kovalent bağlanması engellenmelidir. Önemli avantajlarından biri de kovalent bağlama ile gerçekleşen immobilizasyon sonrasında pH, iyonik şiddet ve substrat ile geriye dönüş reaksiyonlarının gerçekleşmemesidir.

1.5.2.3. Çapraz Bağlama

Bu yöntemde enzim immobilizasyonu, enzim proteinlerinin diğer protein moleküllerine ya da fonksiyonel gruplara moleküller arası çapraz bağlanmasıyla gerçekleşir. Genel olarak çapraz bağlama, diğer yöntemlerle sıkça kullanılmaktadır. Tutuklanmış molekül glutaraldehit, hegzametilen diizosiyanat, diflorodinitrobenzen, disüksinil süberat gibi bifonksiyonel reaktiflerle film veya tabakaya kovalent bağlanır. Gluteraldehit (GA) en sık kullanılan çapraz bağlayıcı reaktiftir ve ortamdaki derişimi %2-5 (w/w) olmalıdır. Bağlanma reaksiyonları ağır koşullarda gerçekleşir. Bu koşullar enzimin aktif bölgesinde konformasyon değişikliklerine yol açabileceği gibi enzim aktivitesine de sebep olabilmektedir.

1.5.2.4. Tutuklama Yöntemi

Enzim tutuklama yöntemi, enzim biyomolekülünün polimer veya membranın örgü yapısının içerisinde tutulmasını temel almaktadır. Bu tutuklama işlemi, enzim substratının difüzyonunu sağlayacak şekilde gerçekleştirilir.

Bu yöntem, enzimin bir taşıyıcıya bağlanmamasından dolayı kovalent bağlama ve çapraz bağlamaya göre farklılık göstermektedir. Bu da geniş kullanım alanı sağlamaktadır. Ancak kimyasal polimerizasyon reaksiyonlarında, uygulanan koşullar enzim aktivitesini düşürebilmektedir. Bundan dolayı enzim immobilizasyonu için uygun koşulların sağlanması çok önemlidir.

Tutuklama yöntemi; polimer matrikste tutuklama, mikrokapsülleme, lipozom tekniği olmak üzere üçe ayrılır.

Polimer matrikste tutuklama yönteminde; yüksek derecede çapraz bağlı bir polimer enzim çözeltisi içerisinde oluşturulur. İşlem sırasında çapraz bağlar enzim molekülleri arasında tutuklanır ve ana çözeltiye geçemezler.

Mikrokapsülleme yönteminde; enzim molekülleri yarı geçirgen bir memran içinde tutuklanır. Yarı geçirgen membranın gözenek çapları, substrat moleküllerinin kapsül içine girişine ve ürün moleküllerinin dışarı çıkışına olanak verecek bir büyüklükte olmalıdır. Substrat molekülleri ne kadar küçükse bu yöntem ile immobilize edilmiş enzimin verimliliği o ölçüde yüksek olacaktır.

Lipozom yönteminde ise, sıvı-yüzey yapıcı membran ilkesi kullanılır. Süreksiz, dönüşümlü ve tamamen fiziksel bir yöntemdir bu özelliklerinden dolayı da avantajı diğer yöntemlere göre yüksektir.

1.6. Enzim Biyosensörleri

Çeşitli maddelerin çok sayıdaki yüksek duyarlılığa sahip ve hızlı analizlerine duyulan gereksinimin de artmasıyla ilk enzim elektrotlarıyla ilgili bilimsel çalışmalar başlamıştır. Bu ilerlemelerin doğal bir sonucu olarak farklı biyolojik materyallerin ve iletim sistemlerin kombinasyonuyla çok çeşitli biyosensörler geliştirilmiş ve geliştirilmeye devam edilmektedir. Bütün bu gelişmelerin sonucu olarak en çok kullanım oranına sahip olan sistemlerin elektrokimyasal olanlarıdır. Biyosensörlerde olduğu gibi enzim sensörleri de biyoreseptör, taşıyıcı ve ölçüm sisteminden oluşmaktadır.

Enzim ile modifiye edilmiş elektrotlar amperometrik biyosensörlerin en önemli uygulamalarıdır. Bu sistemler enzimin biyolojik fonksiyonu sayesinde biyolojik temelli olan substrat kullanımlarında yüksek duyarlılık gösterirler. Enzim reaksiyonunun kinetiği ürün oluşumunun ya da reaktantın azalmasının hızı olarak izlenir. Enzim sensörlerinde ürün elektroaktif ise aralarındaki reaksiyon amperometrik tekniklerle incelenebilir. Amperometrik biyosensörler de bu reaksiyonların sonucunda oluşurlar. Bu elektrokimyasal reaksiyonlar elektrot yüzeyinde gerçekleşir ve akım oluşturmak için kullanılırlar. Reaksiyondaki enzimatik oksidasyon sonucu açığa çıkan elektronlar anoda transfer edilerek elektron alıcısına taşınırlar.

Enzim biyosensörlerinde kullanılacak elektrot seçimi de elektriksel iletkenliğe göre yapılır. Genellikle altın, platin ya da karbon (camımsı karbon, karbon fiber veya nanotüp film) gibi katı destek elektrotlar kullanılırlar. Enzim elektrotlarını oluşturmasında kullanılacak olan enzimlerde analitin reaksiyon tipine seçilir.

Redoks enzimleri (oksido-redüktazlar) en çok kullanılan enzimlerdir. Ayrıca lipazlar ve esterazlar gibi hidrolaz sınıfı enzimler de redoks enzimleri ile beraber kullanılabilmektedir. Enzim elektrotlarının kullanımında yaşanan en büyük sorun reaksiyonların oksijen olan ihtiyaçları ve amperometrik yöntemlerle izlenirken hidrojen perokside duyulan ihtiyaçtır. Bu problemin üstesinden ugun medyatörler kullanılarak gelinmektedir. Enzim sensörlerinde, immobilizasyon materyali olarak iletken polimerler, fonksiyonelleştirilmiş polimerler, kompozit materyaller, sol-gel ve nanomateryaller kullanılabilmektedir.

Amperometrik enzim biyosensörlerinin üç gruba ayrıldığı görülür;

Birinci nesil enzim elektrotlar; sadece enzim ve taşıyıcıdan oluşan sistemlerdir. Sistemde bulunan substratın ürüne dönüşümü sırasında ortamda bulunan oksijen gazının hidrojen perokside indirgenmesi gözlemlenir. Birincil nesil enzim elektrotlarda reaksiyon ürünü olan hidrojen peroksidin +0,68 V'luk sabit potansiyelde yükseltgenmesinden de yararlanılır (Gerard, Chaubey ve ark. 2002).

$$\text{Substrat} + O_2 \xrightarrow{\text{Biyomateryal}} \text{Ürün} + H_2O_2$$

Bu elektrotlarda, sabit potansiyelde kaydedilen akım, substrat derişimi ile orantılıdır. Birinci nesil elektrotların dezavantajı hidrojen peroksitin yükseltgendiği potansiyelde yükseltgenebilecek diğer türlerin yapacağı girişim etkisidir (Vidal, Espuelas ve ark. 2004).

İkinci nesil enzim elektrotlarda; ise elektron aktarımını oksijen yerine medyatör adı verilen oksitleyici reaktifler yapar. Medyatörler koenzimlerin rejenere olmasını sağlarlar. Kullanılacak medyatörlerin ortamda ki oksijenle reaksiyon vermemesi, indirgenmiş ve yükseltgenmiş formlarının kararlı olması indirgenmiş koenzim ile hızlı reaksiyon verebilmesi gibi özellikleri barındırması gerekir.

İdeal bir medyatörün sahip olması gereken özellikler; indirgenmiş enzimle hızlı reaksiyon vermesi, kararlı indirgenmiş ve yükseltgenmiş formlarının olması, indirgenmiş formunun oksijenle reaksiyon vermemesi, çalışma koşullarında kararlı olması ve elektron aktarımı sırasında yan reaksiyonlara katılmaması, numunedeki diğer elektroaktif türlerden daha düşük bir redoks potansiyeline sahip olması ve toksik olmaması olarak sıralanabilir (Gerard, Chaubey ve ark. 2002), (Schindler, Thanh ve ark. 1998). Medyatör olarak kullanılan madde çözeltiye katılabildiği gibi, elektroda immobilize de edilebilir. İlk yöntem kolay olmasına karşın teknolojik bir yöntem değildir. Medyatörlerin immobilizasyonu ise, uygun ve daha teknolojik bir yöntemdir (Berezhetskyy, Sosovska ve ark. 2008).

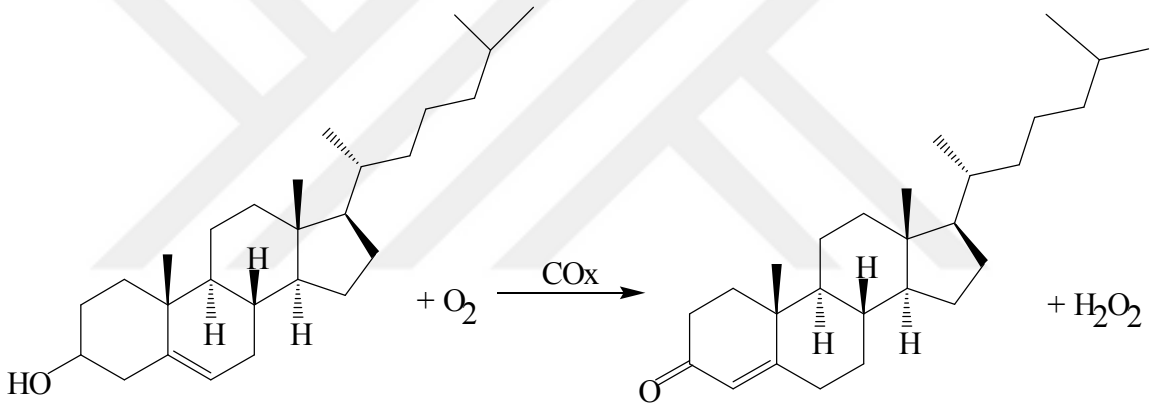
Her iki nesil sensörler incelendiğinde yapay bir medyatörün kullanımının kompleks ortamlarda gerçekleştirildiğindeki çalışmalarda numunelerin kirlenmesine sebep olduğu gerçeği farkedilmektedir. Bu sebeple her ne kadar karmaşık uygulamalarda gerçekleştirilmesinde avantajlı gibi görünsede ikinci nesil biyosensörlerdeki medyatör kirlenmesinin önlenmesi de mecburi ve dezavantajlı bir adımdır.

Üçüncü nesil enzim elektrotlarda ise enzim redoks merkezi ile elektrot yüzeyi arasında organik iletken tuzlar sayesinde doğrudan bir etkileşim kurulur. Söz konusu maddeler ortamda, sıcaklığında genellikle metalik özellikler gösterdiklerinden genellikle organik metaller olarak isimlendirilirler.

1.6.1. Kolesterol Oksidaz Biyosensörü

COx (COx- EC 1.1.3.6) enzimi FAD içeren bir flavoenzimdir. COx üç kimyasal dönüşümü katalizler. Birinci katalitik dönüşüm, indirgeyici yarı-reaksiyon olarak adlandırılır ve steroit halkasının C(3)-OH grubunun dehidrojenasyonu reaksiyonudur. Oluşan iki redoks ekivalenti flavin kofaktörüne transfer edilir. İkinci katalitik adım, indirgenmiş flavin, yükseltgenmiş enzim ve hidrojen peroksit oluşturmak üzere oksijen ile reaksiyona girer. Bu adım yükseltgeyici yarı-reaksiyon olarak adlandırılır. Son olarak, yükseltgenmiş steroit, steroit halka sistemindeki çift bağın izomerizasyonu reaksiyonuna girer ve kolest–4-en– 3-on oluşur.

Serbest kolesterolün tayini için geliştirilen amperometrik biyosensörlerde COx enzimi kullanılır;



Şekil 1.24. COx enzimi çalışma mekanizması

Cox enziminden oluşturulan kolesterol biyosensörlerle kolesterol tayininde en önemli sorun kolesterolün suda çözünememesidir. Bu sebeple kolesterolün çözünmesi için alkol ve türevleri kullanılabilirler. Ayrıca ek olarak yüzey aktifleştirici bir maddenin de kullanımı gerekmektedir. Ancak bu maddenin kullanımı %3'ün üzerine çıktığında enzim aktivitesi önlenebilir. Vidal'ın gerçekleştirdiği çalışmada yüzey aktif madde içeriğinin %5'ten fazla kullanıldığında kolesterol moleküllerinin etrafında yoğun misellerin oluşumuna yol açarak substratın enzimatik yükseltgenmesine bozucu etki yapabileceği tartışılmıştır (Vidal, Garcia ve ark. 1999).

Birçok çalışmada yüzey aktifleştirici olarak Triton X–100 ve/veya 2-propanol kullanıldığı görülmüştür.

Amperometrik kolesterol biyosensörleri ile toplam veya serbest kolesterol tayini, enzimatik reaksiyon sonucunda oluşan hidrojen peroksitin uygun potansiyellerde enzim elektrotta yükseltgenmesi üzerine temellendirilir. Elde edilen akım değerleri kolesterol derişimi ile orantılıdır (Shih, Douglas ve ark. 2009). Bu derişimlere göre elde edilen sonuçlar yorumlanır ve kolesterol tayin sonuçları elde edilir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kolesterol Oksidaz Biyosensörleri İle Yapılan Çalışmalar

Allain ve arkadaşları, toplam serum kolesterolün ilk enzimatik tayinini gerçekleştirmişlerdir. Çalışmalarında kolesterol esterleri kolesterol ester hidrolazı ile serbest kolesterol moleküllerine hidrolize edilmişlerdir. Daha sonra serbest kolesteroller, COx enzimi ile koles-4-en-3-on 'a ve hidrojen peroksite sentezlenmişlerdir (Allain 1974).

Başka bir çalışmada, kolesterol tayini için yeni, spesifik, hızlı ve hassas bir elektrot geliştirdiklerini açıklamışlardır. Kardiyovasküler hastalıkları önleyici medikal teşhisler için önem taşıyan klinik deneylerde kullanılabilecek orijinal ve umut vaad eden bir yönteme sahip olduklarını belirtmişlerdir. Elektrotun karbon pasta yüzeyine sahip olduğu ve yüzeyinin tekrarlanabilirlik için uygun bir yüzey olduğunu da eklemişlerdir (Charpentier ve ElMurr 1995).

Farklı analitik yöntemler temel alınarak birçok enzimatik kolesterol biyosensör dizaynı yapılmıştır. COx ve kolesterol esteraz gibi enzimlerin enzim-substrat etkileşimleri spektrofotometri (Isik, Alkan ve ark. 2003), (Malhotra, Chaubey ve ark. 2006), (Kumar, Pandey ve ark. 2006), yüzey plazmon rezonans (Arya, Prusty ve ark. 2007), kuartz kristal mikrobalans (Yang, Chong ve ark. 2002) ve elektrokimya (Vidal, Espuelas ve ark. 2004), (Qiu, Lou ve ark. 2005), (Lee ve Ozer 2007) içeren farklı tekniklerle tespit edilebilir.

Bir başka çalışmada, amperometrik bir biyosensör oluşturmak için bir redoks enzimi olan COx enzimini poli(3,4-etilendioksipirol)'a immobilizasyon ile bağlamışlardır. Operasyonel ve depolama kararlılıkları, pH ve sıcaklık değişimleri ölçülmüş. Cevap süresi 150 s ve tespit edilebilir substrat derişimi de 0.4 mM olarak belirlenmiştir. Elde edilen biyosensörün maksimum bağıl aktivitesi 20 gün boyunca gözlemlenmiştir. Akım cevabı pH 7'de ve 40 ˚C'de maksimum değeri göstermiştir (Turkarslan, Kayahan ve ark. 2009)

Yıldız ve arkadaşları, (Yildiz, Demirkol ve ark. 2013), COx'ı iki farklı poli(etilenoksit)'e immobilize ederek amperometrik biyosensör üretmişleridir. Her iki elektrotun da kinetik parametreleri, operasyonel ve depolama kararlılıkları, optimum sıcaklık ve pH değerleri araştırılmıştır. Sonuçlara göre meyve sularındaki kolesterol

miktarı tayini için alternatif bir biyosensör üretiminin elde edildiği belirtilerek klasik yöntemlerin yerine geçebileceği düşünülmüştür.

Diğer bir yayında, camsı karbon elektrodu elektrobirikimli Pt- birleşimli fulleren bazlı, nanokürecikli ZnO ile modifiye ederek yüksek hassasiyete sahip kolesterol biyosensörü üretmişlerdir. ZnO ve Pt partüküllerinin birleşiminin (PtZONS) düşük potansiyellerde kolesterolün amperometrik tayinini kolaylaştırdığı ve biyosensörün antigirişim yapma yeteneğini arttırdığını gözlemlenmiştir. Ayrıca, ZnO'nun Pt nanoparçacıklarının elektrokatalitik aktivitesini arttırdığı görülmüştür. Bu özelliğinde kolesterol tayini için üretilen biyosensörün hassasiyetini arttırdığı belirtilmiştir (Ahmad, Pan ve ark. 2010).

COx, kolesterol esteraz ve horseradish peroksidaz enzimlerini gözeneksiz altın ağları üzerine immobilize ederek yüksek hassasiyete sahip yeni bir kolesterol biyosensörü elde edilmiştir (Ahmadalinezhad and Chen 2011).

Singh ve ark., kolesterol ester tayini için amperometrik biyosensör üretmişlerdir. Platinyum elektrot kullanılan çalışmada pirol elektropolimerizasyon ile elektroda bağlanmıştır. Biyosensörün karakterizasyonu için çalışma potansiyeli, cevap aralığı, optimum pH, sıcaklık ve raf ömrü gibi deneyler uygulanmıştır (Singh, Chaubey ve ark. 2004).

Tan ve ark, (Tan, Ll ve ark. 2005), yeni bir amperometrik kolesterol biyosensörü de sol-jel kitosan/silika ve çoklu duvarlı karbon nanotüpler organik-anorganik hibrit bileşim materyalinden geliştirilmişlerdir. Prusya mavisi ile modifiye edilmiş camsı karbon elektrotun yüzeyine COx immobilize etmek için hibrit bileşim filmi kullanılmıştır. Enzim yükü, Triton X-100 derişimi, pH, sıcaklık ve çalışma potansiyeli gibi araştırmalar çalışılmıştır. Hibrit filmin çoklu duvarlı karbon nanotüp varlığında ve yokluğunda analitik karakteristik özellikleri ve dinamik parametreleri kıyaslanmıştır ve sonuçta çoklu duvar varlığında biyosensörün analitik performansının iyileşme gösterdiği görülmüştür.

Bir diğer çalışmada ise, elektrot yüzeyi öncelikle platinize edilmiş ve sonra elektrobirikimli yüzeye sahip olan çoklu tabaka yapılı bir amperometrik kolesterol biyosensörü geliştirmişlerdir. COx'ın tutuklanmış olduğu iç tabakada polipirol tabakası olan, dış tabakanın ise poli(o-fenilendiamin) olduğu çift taraflı bir polimer oluşturulmuştur. Stabilite cevabı yaklaşık bir ay olan bir biyosensör oluşturulmuştur. Basit bir yapıya sahip olan biyosensörün benzerlerine oranla daha avantajlı olduğu belirtilmiştir. Referans sentetik serum örneklerinde ölçülen kolesterol tayinlerinin

başarısının çift polimer tabakasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Vidal, Garcia-Ruiz ve ark. 2001).

2.2. İletken Polimerlerle Yapılan Biyosensör Çalışmaları

Türkaslan, tez çalışmasında, Polipirol (PPy), poli(3,4-etilendioksitiyofen) (PEDOT) ve poli(3,4etilendioksipirol) iletken polimer matrislerinde COX ve alkol oksidaz enzimlerini fiziksel yolla tutuklamıştır. Enzim elektrotlarının amperometrik cevapları medyatörsüz ortamda H_2O_2'nin yükseltgenme akımının izlenmesiyle elde edilmiştir. Km, Imax gibi kinetik parametreler, kullanım kararlılığı ve raf ömrü tayinleri, pH ve sıcaklıktaki değişimlerin etkileri tüm tutuklama matrisleri için incelenmiştir (Turkaslan 2010).

Aydın tez çalışmasında GOD enzimini PEO-co-PPy, CP-co-PPy ve PPy iletken kopolimer matrisleri içerisinde fiziksel yöntemle tutuklayarak, PPy/GOD, PEOco-PPy/GOD ve CP-co-PPy/GOD enzim elektrotlarını elde etmiştir. Elde edilen enzim elektrotlarının sıcaklık, pH, raf ömrü ve kullanım kararlılıklarına göre verdiği sonuçlar doğrultusunda meyve suları içerisindeki glikoz miktarını tayini için alternatif bir biyosensör üretimini gerçekleştirmiş olduğunu belirtmiştir (Aydın 2012).

Yıldız ve arkadaşları ise, iki farklı hassas ve etkili fotoelektrokimyasal biyosensörü elde etmişlerdir; P(SNS-NH_2)/ChOx/$[Ru(bpy)3]^{2+}$ ve ChOx/$[Ru(bpy)3]^{2+}$. Biyosensör eldesi COx enziminin modifiye P(SNS-NH2) elektrot ve tioanilin ile modifiye edilmiş altın plaka GA eşliğinde kovalent bağlanmasıyla elde edilmiştir. Her iki enzim elektrot için kinetik parametreler, operasyonel ve depolama kararlılıkları, optimum sıcaklık ve pH değerleri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen enzim elektrotların gerçek numunelerde ön çalışma olmaksızın kullanılabilecek olabilirliği öne sürülmüştür. Ayrıca çalışmanın fotoelektrokimyanın kolesterol biyosensörlerin üretiminde alternatif bir yöntem olarak çalışılabileceği vurgulanmıştır (Yildiz, Talaz ve ark. 2013).

Azak, tez çalışmasında DTP-Alkil-NH_2 ve DTP-Aril-NH_2 monomerlerini, camsı karbon ve grafit elektrotlarda elektropolimerizasyon tekniği kullanarak iletken elektrot yüzeylerini oluşturmuştur. İletken polimer kaplı elektrot yüzey üzerine ksantin oksidaz ve glukoz oksidaz enzimleri immobilize edilerek Poly (DTP-Alkil-NH_2/XOx), Poly (DTP-Alkil-NH_2/GOx) ve Poly (DTP-Aril-NH_2/GOx) olmak üzere üç tip enzimatik biyosensör hazırlamıştır. Bu enzimatik biyosensörlerin çalışma koşulları optimize

edilmiş, analitik karakterizasyonları gerçekleştirilmiş ve farklı gıda numunelerindeki glukoz ve ksantin miktarlarını amperometrik olarak tayin etmiştir (Azak 2015).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Cihaz ve Elektrotlar

Elektrokimyasal ölçümler, PalmSens EmStat analizör ve BASi C3 hücre stand kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışma elektrodu olarak camsı karbon elektrot (BAS MF 2012), karşıt elektrot olarak platin tel (BASi MW-1032) ve referans elektrot olarak da Ag/AgCl referans elektrodu (BASi MF-2052) ve bu elektrotların temizleme işlemi için temizleme kiti (BASi MF- 2060) kullanıldı. Ayrıca elektropolimerizasyon deneylerinde referans elektrot olarak da Ag/Ag^+ elektrot (BASi MW-1085) kullanılmıştır.

Hassas tartım işlemlerinde ACCULAB marka tartı kullanıldı. Karıştırma ve çözme işlemleri için ELMA LC 30 H marka ultrasonik banyo kullanıldı. Hazırlanan çözeltilerin pH'sı VWR pH 1100 L kullanılarak ayarlandı. Kullanımdan önce pH 4 ve pH 7 kalibrasyon tampon çözeltileri ile oda sıcaklığında kalibre edilmiştir. Çözeltilerin hazırlanmasında ELGA marka saf su cihazından elde edilen ultra saf su kullanıldı.

Çözelti ilaveleri için Eppendorf Research Plus marka mikropipetler kullanıldı. Sabit sıcaklık gerektiren çalışmalarda WiseCircu marka termostatlı ve sirkülasyonlu su banyosu ve çift cidarlı hücre kullanıldı. Sentez çalışmalarında ise Wise marka karıştırıcılı ısıtıcı ve evaporatör kullanılmıştır.

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

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler Merck, Fluka, Aldrich ya da Acros gibi yabancı firmalardan satın alındı. Başlangıç maddesi olarak kullanılacak bazı kimyasallar ise sentez işlemi sonucunda laboratuvar ortamında elde edildi. Sentez aşamasında ortamın inert ortamda olması gerektiği için cam malzemeler etüv veya hızlı kurutucu kullanılarak kurutularak kullanıldı. Reaksiyon ortamının inert ortamı sürdürebilmesi için yüksek saflıkta azot gazı kullanılarak reaksiyon dengede tutulmuştur. Maddeler reaksiyon ortamına kuru enjektörler yardımıyla eklendi.

Çözücülerin bir kısmı da susuz özellikli kullanıldı. Sentez işleminde kullanılacak katı kimyasallar ise desikatörde muhafaza edildi. Reaksiyonlar İnce Tabaka

Kromatografisi (İTK) ile izlenerek ürünlerin pek çoğu kolon kromatografi ile saflaştırıldı. İTK'da TLC Merck 60 F254 silikajel kartlar kullanılırken kolon kromatografide adsorban olarak silikajel 60 (230-400 Mesh) kullanılmıştır. Reaksiyon sonrası ekstraksiyon işlemlerinde organik fazı kurutmak için susuz $MgSO_4$ kullanıldı. Kullanılan kimyasal maddelerin ismi, saflık dereceleri ve temin edildikleri firmaların bilgileri Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3. 1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kimyasal Adı	Saflık Derecesi	Temin Edildiği Firma
Silica gel HF (254)	İTK için	Aldrich
Silica gel/TLC Cards	İTK için	Aldrich
1,10 diamino dekan		Acros
p-fenilendiamin		Alfa
3,3-dibromo-2,2 ditiyofen		Tci
R-BINAP		Acros
Glutaraldehit	25%	Merck
Magnezyum sülfat (susuz)		Acros
Hidrojen Peroksit	30%	Merck
Bakır(I) İyodür		Acros
Metanol	Yüksek saflıkta	VWR
L-prolin	99%	Acros
Sodyum dihidrojenfosfat monohidrat ($NaH_2PO4.H_2O$)	99%	Merck
Disodyum hidrojenfosfatdihidrat ($Na_2HPO_4.2H_2O$)	99,5%	Merck
1,3 diaminopropan		Aldrich
Potasyum Karbonat		VWR
N-Hekzan	Yüksek saflıkta	VWR
Aseton	Yüksek saflıkta	VWR
Diklorometan (DCM)	Yüksek saflıkta	VWR
Etil asetat	Yüksek saflıkta	VWR
Kolesterol	%95	
Kolesterol Oksidaz		Acros
DMSO	%99	Sigma
Triton X-100		Sigma
Tetrabütilamonyum perklorat		Sigma
Gümüş nitrat	%98	Fluka
		Sigma

3.3. Kullanılan Çözeltiler

3.3.1. Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS)

Fosfat derişimi 0,1 M olacak şekilde monosodyum dihidrojenfosfatmonohidrat ve disodyum hidrojenfosfatdihidrattan hesaplanan miktarlarda tartılarak ultra saf suda çözüldü. Tampon çözelti pH ayarlaması 0,100 M KOH ve 0,100 M HCl kullanılarak 7,5'e ayarlandı. Farklı pH değerlerindeki fosfat tampon çözeltileri de aynı işlemle hazırlandı. Hazırlanan tampon çözeltileri kullanılıncaya kadar +4˚C'de buzdolabında saklandı.

3.3.2. Elektropolimerizasyon Çözeltisi

Elektropolimerizasyon için Bölüm 3.4.1.'de sentez işlemleri anlatılan DTP(aril)anilin maddesinden 4 mg tartıldı üzerine 1:1 oranında DCM/Asetonitril (ACN) eklendi daha sonra 0,1 M $TBAPF_6$ eklendi. Bu çözelti hazırlandıktan sonra kullanılıncaya kadar +4˚C'de buzdolabında saklandı.

3.3.3. Referans Elektrot İç Dolgu Çözeltisi

Elektropolimerizasyon çalışmalarında referans elektrot olarak kullanılan Ag/Ag^+ elektrotların iç dolgu çözeltisi, 0,10 M tetrabütilamonyum perklorat ve 0,01 M gümüş nitrat 50 mL'lik balonda ACN içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

3.3.4. Enzim Çözeltisi

COx (17 U/mg) enzimi, derişimi 1 mg/mL olacak şekilde 0,1 M pH 7,5 fosfat tamponunda çözüldü. -20˚C'de muhafaza edildi.

3.3.5. Gluteraldehit Çözeltisi

%25'lik GA çözeltisinden %1'lik GA çözeltisi hazırlandı. Seyreltme işlemi 0,1 M 7,5 pH fosfat tamponu ile gerçekleştirildi. Bu çözelti hazırlandıktan sonra kullanılıncaya kadar +4˚C'de buzdolabında saklandı.

3.3.6. Kolesterol Stok Çözeltisi ve Kolesterol Çözeltisi

0,05 M kolesterol stok çözeltisi 0,387 g kolesterol 20 ml etanolde çözülerek hazırlandı. Hazırlanan stok çözelti 10 gün süreyle +4˚C'de buzdolabında saklandı. Kolesterol çözeltisi hazırlamak için ise, deney öncesi stok çözeltiden 1 mL alındı, 25 mL'lik balon jojede etanolle seyreltildi ve %1'lik Triton X-100 eklendi.

3.3.7. Hidrojen Peroksit Çözeltisi

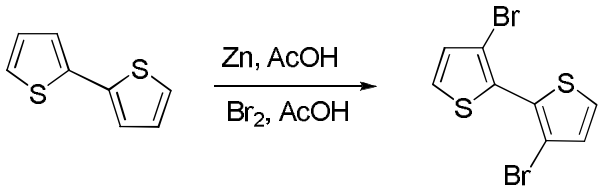
%30'lik ρ=1,11 kg/L olan hidrojen peroksitten hesaplanan miktarda kullanılarak 10 mL 5×10^{-5} M lık stok çözelti hazırlandı.

3.4. Deneysel İşlemler

3.4.1. 4-(4H-ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)anilin Sentezi ve Karakterizasyonu

DTP(aril)anilin sentezinin çıkış maddesi olan 3,3'-Dibrom-2,2'-bitiyofen'in sentezi aşağıda verilen yöntemle sentezlenmiştir;

2,2'-Bitiyofen, glasial asetik asit içerisinde brom ve çinko ilave edilerek elde edilir. Daha sonra 1,39 g (8,36 mmol) 2,2'-bitiyofen (1), 10 mL glasial asetik asit içerisinde çözülür ve karışıma 10 mL glasial asetik asit içerisinde çözünmüş 4,80 g (30,80 mmol) brom oda sıcaklığında 20 dakikada damlatılarak ilave edilir. Karışım 16 saat oda sıcaklığında, daha sonra 24 saat yağ banyosunda 90 ºC'de karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığına soğutulup üzerine 0,41 g (6,33 mmol) çinko tozu yavaş yavaş ilave edildi. Karışım yağ banyosunda 16 saat 90 ºC'de karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığına soğutuldu. Karışımın glasial asetik asit çözücüsü vakumda uzaklaştırıldı. Karışım 100 mL CH_2Cl_2'de çözülüp, %10'luk KOH (2x50 mL) ve su (1x50 mL) ile yıkandı. Organik faz $MgSO_4$ ile kurutulup, çözücüsü vakumda uzaklaştırıldı. Ham ürün etanolden kristallendirildi ve %85 verimle 3,20 gr ürün elde edildi. Elde edilen açık gri renkli kristallerin erime noktası 102 ºC olarak bulundu (Gronowitz 1961).

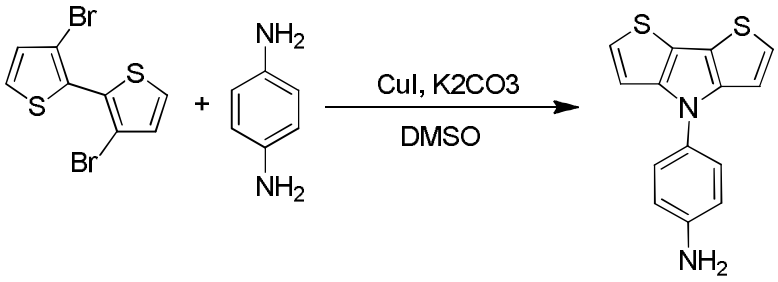


1 **2**

Şekil 3.1. 3,3'-dibrom-2,2'-bitiyofen (2) sentezi

Tez çalışmasında kullanılacak olan iletken polimer DTP(aril)anilin (4) araştırma laboratuvarımızda aşağıda belirtildiği gibi sentezlendi;

100 mg (0,308 mmol) 3,3'-dibromo-2,2'-bitiyofen (2) bileşiği ve 33,37 mg (0,308 mmol) 1,4-diaminobenzen (3) bileşiği üzerine 85 mg (0,616 mmol) K_2CO_3, 14 mg (0,074 mmol), CuI, 14 mg (0,12 mmol) L-pirolin ilave edildi ve 4 mL DMSO içerisinde çözülen karışımdan sürekli azot gazı geçirilerek geri soğutucu altında 120 ºC sabit ısı sağlanarak 24 saat boyunca reflüks edilmesi sağlandı. Elde edilen bileşik doygun NaCl çözeltisiyle doyurulup EtOAc (3x30 mL) ile ekstrakte edildi ve $MgSO_4$ ile kurutuldu. Organik fazın çözücüsü vakum altında uzaklaştırıldı. Ham ürün silikajel ile hazırlanan kolondan metanol ile yürütülerek saflaştırıldı. Elde edilen ürün ve çözücü karışımı vakum eşliğinde evaporatörde uçurularak uzaklaştırıldı. Elde edilen ürün %5 verimle 4 mg'dır.



2 **3** **4**

Şekil 3.2. 4-(4H-ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)anilin sentezi

3.4.2. Camsı Karbon Elektrotun Temizlenmesi

Tez çalışmasında kullanılan camsı karbon elektrotların yüzeylerini temizlemek için 0,05 μm boyutundaki alümina süspansiyonundan birkaç damla temizleme pedine damlatıldı ve saat yönünde, saat yönünün tersi yönde dairesel hareketlerle (sekiz çizilerek) mekanik olarak temizlendi. Elektrot yüzeyi saf su ile temizlendikten sonra sırasıyla ACN ve saf su içerisinde 2'şer dakika süresince ultrasonik banyoda oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

3.4.3. 4-(4H-ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)anilin Monomerinin Elektropolimerizasyonu

4-(4H-ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)anilinmonomerinin elektropolimerizasyonu için, elektrot yüzeyi temizlendikten sonra 4 mg monomer ve 0,387g $TBAPF_6$, ACN/DCM (1/1) çözeltisi içinde hazırlandı daha sonra döngüsel voltametri ile -0,7 V ile 1,4 V arasında 0,1 V/s tarama hızında 15 döngü uygulanarak elektropolimerizasyon işlemi gerçekleştirildi ve elektrot yüzeyi modifikasyonu tamamlandı. Referans elektrot olarak bölüm 3.3.3.'de açıklanan şekilde hazırlanan Ag/Ag^+, karşıt elektrot olarak platin tel, çalışma elektrodu olarak da camsı karbon elektrot kullanıldı.

3.4.4. Kolesterol Oksidaz Biyosensörün Hazırlanması

3.4.4.'te belirtildiği gibi elektropolimerizasyonu yapılan elektrot oda sıcaklığında kurutulduktan sonra çapraz bağlama için kullanılacak olan 3.3.5'te hazırlanışı anlatılan GA çözeltisi (214μl) ve 3.3.4.'te belirtildiği yöntemle hazırlanan enzim çözeltisi (150μl) karışımına daldırıldı, 2 saat boyunca immobilizasyonun tamamlanması beklendi. Daha sonra karışımdan çıkarılan elektrot un kuruması için oda sıcaklığında uygun sürede bekletildi. Kuruduktan sonra ultra saf su ile yıkanan elektrot biyosensör olarak kullanıma hazır hale getirildi.

3.4.5. Modifiye Edilmiş ve Modifiye Edilmemiş Enzimsiz Elektrotların Hidrojen Perokside Duyarlığın Belirlenmesi

Enzimsiz elektrotların H_2O_2'e karşı amperometrik duyarlığını belirlemek için, üç elektrotlu hücre sistemi kullanıldı. Hücreye 0,1 M pH 7,5 fosfat tamponundan 5 mL eklendi. Hem modifiye edilmemiş elektrota hem de modifiye edilmiş elektrota -0,7 V sabit potansiyel 250 s süresince uygulandı. Elektrot denge süresine getirildikten sonra Bölüm 3.3.7' de anlatıldığı gibi hazırlanan H_2O_2 stok çözeltisinden 5×10^{-5} M H_2O_2 çözeltisi hazırlandı. 5×10^{-5} M H_2O_2 çözeltisinden belirlenmiş miktarlarda eklenerek amperometrik ölçümler kaydedildi. H_2O_2 derişimine karşı akım farkları grafiğe geçirildi. Elde edilen grafiklerin eğiminden DTP(aril)anilin ile modifiye edilmiş ve edilmemiş elektrodun H_2O_2'e karşı duyarlığı belirlendi ve duyarlılıkların karşılaştırılması yapıldı.

3.4.6. Kolesterol Oksidaz Enzim Elektrotun Optimum Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

3.4.6.1. İmmobilizasyon Süresi

COx enzim elektrodun immobilizasyonu için en uygun sürenin belirlenmesi için DTP(aril)anilin ile modifiye edilmiş elektrot Bölüm 3.4.5'te anlatılan adımlara uygun şekilde hazırlandı. Elektrotun bekletilme süreleri 2, 6, 16, 20 saat olarak belirlenerek -0,7 V aralığında 0,1 V/s tarama hızında 0,1 M pH 7,5 fosfat tampon ve sabit derişimde kolesterol çözeltisinde amperometrik ölçümler alındı. Her bir immobilizasyon süresine karşı akım farklarına göre grafiği çizilerek en uygun süre belirlendi.

3.4.6.2. Optimum pH

Enzim elektrodunu tampon pH cevabını incelemek ve optimum pH değerini belirlemek için Bölüm 3.3.1.'de anlatılan yöntemle hazırlanan 0,1 M fosfat tamponundan, 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 ve 9,0 pH değerlerinde tampon çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan enzim elektrot her bir pH değerinde -0,7 V'ta dengeye getirildi ve sabit derişimde kolesterol çözeltisinde amperometrik cevabı ölçüldü. Her bir pH tamponu için aynı işlem tekrarlandı ve pH değerlerine karşı akım farkları grafiği çizilerek optimum pH değeri belirlendi.

3.4.6.3. Çalışma Potansiyeli

DTP(aril)anilin ile modifiye edilmiş COx enzim elektrot için en uygun çalışma potansiyelinin belirlenmesi için; enzim elektrodun -0,8 V ile 1,0 V arasında değişen potansiyeller uygulanmıştır. 0,1 M pH 7,5 fosfat tamponunda sabit derişimde kolesterol çözeltisinden eklenerek kolesterol cevabı ölçüldü. Elde edilen amperometrik çalışma sonucunda akım farklarına karşı potansiyel grafiği çizildi ve çalışmalarda kullanılacak optimum potansiyel değeri belirlendi.

3.4.6.4. Optimum Sıcaklık

COx enzim elektrot için en uygun çalışma sıcaklığının belirlenmesi amacı ile sirkülasyonlu su banyosu yardımı ile sıcaklığı 15˚C' de sabit tutulan 0,1 M pH 7,5 fosfat tamponunda Ag/AgCl'e karşı -0,7 V'ta kararlı hal akımı elde edilene kadar bekletildi. Çözeltiye sıcaklığı, ısıtıcı yardımı ile 15˚C' de sabit tutulan stok kolesterol çözeltisinden belirli miktarlar ilave edildi ve Ag/AgCl'e karşı -0,7 V potansiyelde amperometrik cevaplar belirlendi. Bu işlem, tampon ve su banyosunun sıcaklığı sırasıyla 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ve 50˚C' ye ayarlanarak tekrar edildi ve sıcaklığa karşı hesaplanan akım farkları grafiğe geçirildi. Elde edilen sonuçlara göre en uygun çalışma sıcaklığı belirlendi.

3.4.7. Biyosensör Elektrotlarının Performans Faktörleri

3.4.7.1. Kolesterol Derişiminin Etkisi

COx enzim elektrodun kolesterole cevabının ve doğrusal çalışma aralığının belirlenmesi amacıyla biyosensör 0,1 M pH 7,5 fosfat tamponunda Ag/AgCl'e karşı -0,7 V'ta ölçümler alındı. Daha sonra farklı derişimlerdeki stok kolesterol çözeltilerinden belirlenen miktarlarda tampon çözeltiye ilave edildi ve sonra enzim elektrodun Ag/AgCl'e karşı -0,7 V potansiyelde amperometrik cevabı ölçüldü ve kolesterol derişimine karşı hesaplanan akım farkları grafiğe geçirildi. Her deneme 3 tekrarlı ölçüm sonucunda elde edildi. Elde edilen grafiklerden yaralanarak enzim elektrodun doğrusal çalışma aralığı ve eğiminden ise duyarlığı belirlendi.

3.4.7.2. Tekrarlanabilirlik ve Operasyonel Stabilite

COx enzim elektrodunun tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi amacıyla, enzim elektrot 0,1 M pH 7,5 fosfat tamponunda Ag/AgCl'e karşı -0,7 V potansiyelde 30 ölçüm alındı, her deneme 2 tekrarlı ölçümle tamamlandı. Stok kolesterol çözeltisinden belirlenmiş miktarda ilaveler yapıldı Ag/AgCl'e karşı -0,7 V'ta amperometrik cevaplar belirlendi. Elde edilen pik akımlarından tekrarlanabilir olduklarını belirlemek için standart sapması hesaplandı.

Operasyonel stabiliteyi belirlemek için ise tekrarlı ölçümlerin cevabına göre meydana gelen azalmaların yüzde hesapları yapıldı.

3.4.7.3. Enzim Elektrodun Aktivitesinin Belirlenmesi

Optimum şartlarda dengeye getirilen enzim elektrodun aktivitesinin belirlenmesi için, farklı kolesterol derişimlerindeki kolesterol cevabı denenmiştir. Bu deneyler sırasında 0,1 M pH 7,50 fosfat tamponu kullanılmıştır. İmmobilize enzim için Michealis-Menten sabitinin hesaplanması için; 1/C ye karşı 1/ΔIp grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen Lineweaver- Burk eğrisi kullanılarak Michealis-Menten sabiti hesaplanmıştır.

3.4.7.4. Raf Ömrü

Kolesterol oksidaz enzim elektrodunun ömrünün belirlenmesi için belli aralıklarla amperometrik ölçümlerinin alınması gerektiği planlandı. Kullanılmadığı zaman pH 7,5 fosfat tamponunda saklanan elektrodun ölçümleri 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30. günlerde sabit derişimde kolesterol çözeltisinden eklemeler yapılarak tamamlandı. Ag/AgCl referans elektroduna karşı -0,7 V potansiyel ile çalışıldı. Deneyler sonucunda günlere karşı akım farkı grafiği çizildi.

4.ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1.1. 4-(4H-ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)anilin Sentezi ve Karakterizasyonu

Bölüm 3.4.1.'de sentez basamakları verilen DTP(aril)anilin monomerinin sentezi gerçekleştirildi (Udum, Yildiz ve ark. 2014). Bu sentezde meydana gelen en önemli problem azot ortamının sağlanması ve ortam şartlarının sabit tutulmasıydı. Gerçekleştirilen birçok denemeden sonra reaksiyon başarılı bir şekilde tamamlandı. Kolon kromatografisi ile saflaştırma yapıldıktan sonra İTK kontrolleri yapılan ürünün kesin eldesinden emin olmak için ^{1}H-NMR, ^{13}C- NMR ve IR sonuçları incelendi.

4-(4H-ditiyol[3,2-*b:*2',3'-*d*]pirol-4-il)anilin ^{1}H-NMR spektrumu ($CDCl_3$) EK 2'de, ^{13}C-NMR 110-150 ppm arası açılmış spektrumu ($CDCl_3$) EK 1'de, IR spektrumu EK 3'te yer almaktadır.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.75 (dublet, AB sisteminin A kısmı, =CH, 2H), 7.14 (dublet, AB sisteminin A kısmı, =CH, 2H), 7.08 (dublet, AB sisteminin B kısmı, =CH, 2H), 7.86 (d, AB sisteminin B kısmı, =CH, 2H), 6.74 (bs,NH_2, 2H).

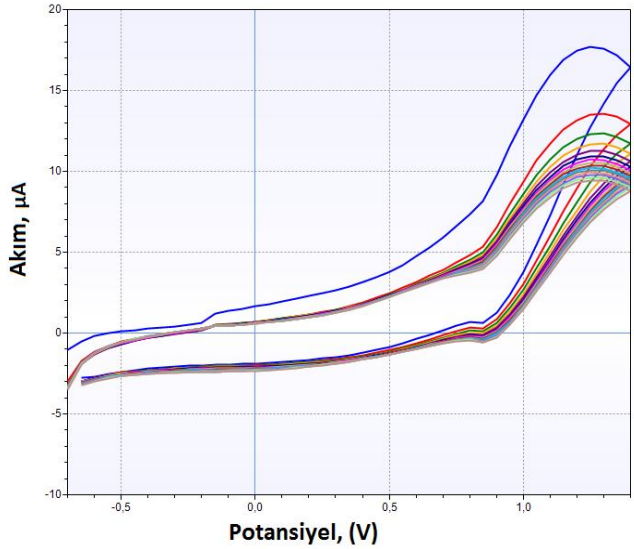
^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 148.47, 145.78, 124.32, 120.23, 115.78, 114.75, 112.06.

IR (cm^{-1}): 3737.3, 3622.2, 3366.7, 3057.3, 3024.9, 2924.1, 2856.7, 2337.6, 1707.9, 1600.0, 1571.2, 1495.6, 1448.8, 1398.4, 1304.9.

Sonuçlara göre ürün sentezinin başarıyla gerçekleştirildiği ve %5 verimle 4 mg elde edildiği belirlendi.

4.1.2. 4-(4H-ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)anilin Monomerinin Elektropolimerizasyonu

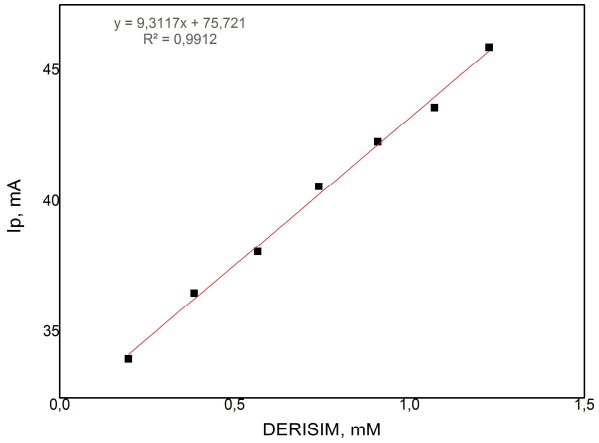
Bölüm 3.4.3.'de verilen elektropolimerizasyon şartlarıyla gerçekleştirilen çalışma sonucunda elektrodun tamamen polimer film ile kaplandığı görüldü. Şekil 4.1 incelendiğinde, yükseltgenme pikinin tamamen tersinmez olduğu ve devam eden döngülerde yükseltgenme pik akım değerlerinin önemli ölçüde azaldığı görülmektedir. Bu azalma elektrot yüzeyinin polimerik film ile kaplandığını ve yüzeye artık çözeltide bulunan monomerlerin ulaşmasının engellendiğini göstermektedir (Azak 2015).



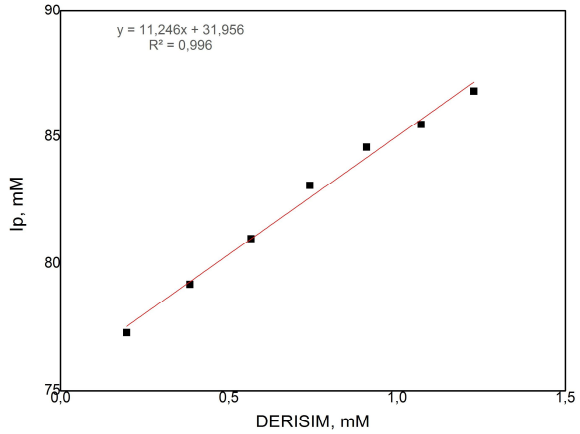
Şekil 4.1. DTP(aril)anilin'in elektropolimerizasyonu [(1:1 ACN/DCM ortamında 15 döngülü voltamogram (-0,7V-1,4 V, 0,1 V/s)]

4.1.3. Modifiye edilmemiş ve Modifiye edilmiş Camsı Karbon Elektrotların H_2O_2 Duyarlıkları

Kolesterolün tayininin amperometrik olarak incelendiğinde, oluşan hidrojen peroksidin çalışma elektrodu üzerinde yükseltgenmesi esasına göre gerçekleştiği görülmektedir. Bu sebeple tez çalışmasında ilk olarak, hazırlanan DTP(aril)anilin modifye camsı karbon elektrodun H_2O_2'e olan duyarlılığı çalışılmıştır. Karşılaştırma amacı ile modifiye edilmemiş çıplak elektroda da aynı çalışma uygulanmıştır. Amperometrik ölçümlerin gerçekleşmesi için Bölüm 3.3.7.'de anlatıldığı gibi hazırlanan H_2O_2 çözeltisi Bölüm 3.4.5.'te belirtilen uygulama ile hücreye ölçüm esnasında eklenmiştir. Eklemeler sonucunda akım farkının derişime karşı grafiği elde edilmiştir. Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te görülen grafikler incelendiğinde modifiye edilmemiş elektrodun duyarlığı 9,3117 µA/µM iken modifiye edilmiş elektrodun duyarlığının 11,246 µA/µM olduğu hesaplanmıştır. DTP(aril)anilin modifiye elektrodun çıplak elektrottan daha yüksek bir duyarlığa sahip olduğu görülmektedir.



Şekil 4.2. Modifiye edilmemiş çıplak elektrodun H_2O_2 cevabı (0,1M PBS pH 7,5, -0,7V, 250s, 0,1V/s, oda sıcaklığı)

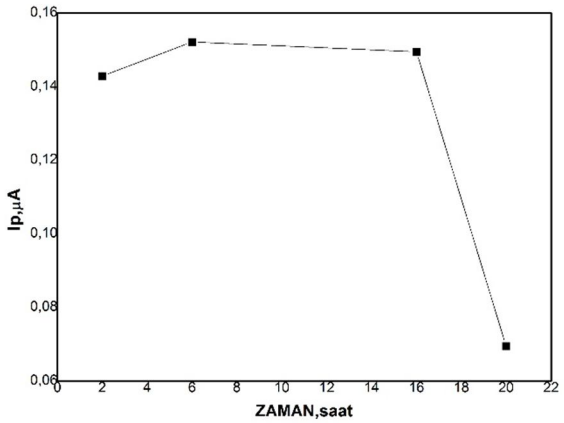


Şekil 4.3. DTP(aril) anilin ile modifiye edilmiş elektrodun H_2O_2 cevabı (0,1M PBS pH 7,5, -0,7V, 250s, 0,1V/s, oda sıcaklığı)

4.1.4. Kolesterol Oksidaz Enzim Elektrodun Optimum Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

4.1.4.1. İmmobilizasyon Süresi

Tez çalışmasında kullanılacak kolesterol oksidaz elektrodunun en uygun sürede immobilizasyonu için immobilizasyon süresi denemeleri yapıldı. Literatür araştırmalarında kolesterol oksidaz enziminin immobilizasyon sürelerinde farklı değerler kullanıldığı görüldü ve uygun olduğu düşünülen aralıkta çalışmalar yapıldı (Yildiz, Demirkol ve ark. 2013), (Zeybek 2010). Bölüm 3.4.6.1'de anlatıldığı gibi belirlenen sürelerde immobilizasyon için elektrotların bekleme süreleri sonucunda ölçümleri iki tekrarlı olarak alındı. İmmobilizasyon süresine karşı akım farkı grafiği çizildi. 2, 6 ve 16 saatlik immobilizasyon denemelerinde birbirine yakın duyarlılıklar görüldü. 20 saat immobilizasyondan sonra ise akım farkında ani bir düşüş gözlendi bunun sebebinin elektroda bağlanan fazla miktardaki enzimlerin elektrot yüzeyinin kapattığını ve enzimlerin substrat cevabını engellediği görüşü ile açıklanabilir. Şekil 4.2'de görüldüğü gibi en yüksek akım farkı 6 saat süresinde görüldü ancak 2 saat ile 6 saat arasındaki duyarlılık farkının az olması sebebiyle pratik ve hızlı denemeler adına 2 saat immobilizasyon süresi seçildi ve deneyler 2 saat üzerinden tamamlandı.

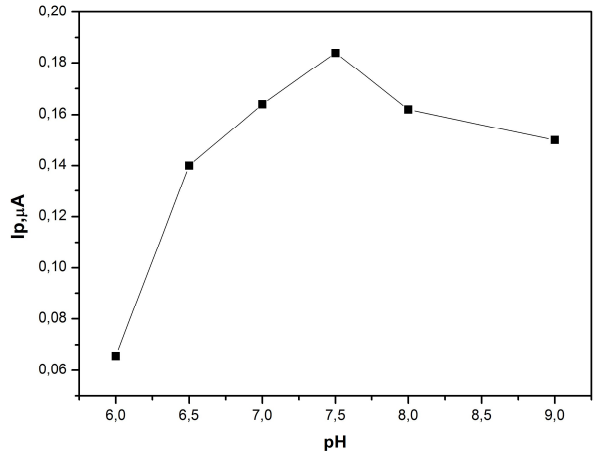


Şekil 4.4. DTP(aril)anilin modifiye elektrot cevabına immobilizasyon süresinin etkisi (0,1M PBS pH 7,5, -0,7V, 0,1V/s, oda sıcaklığı)

4.1.4.2. Optimum pH

Enzimlerin biyoaktivitelerinin, çözeltinin pH değerinden etkilendiği ve pH değerinin enzimlerin doğal yapılarını bozabildikleri bilinmektedir. Bu sebeple optimum bir pH ortamında deneylerin gerçekleştirilmesi önem taşımaktadır (Turkarslan, Kayahan ve ark. 2009).

Kolesterol oksidaz ile immobilize edilmiş DTP(aril)anilin modifiye elektrot için en uygun ortam pH değerinin belirlenmesi için bölüm 3.4.6.2'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilen ölçümler sonucunda elde edilen akım değerlerinin pH değerlerine karşı grafiği çizildi.



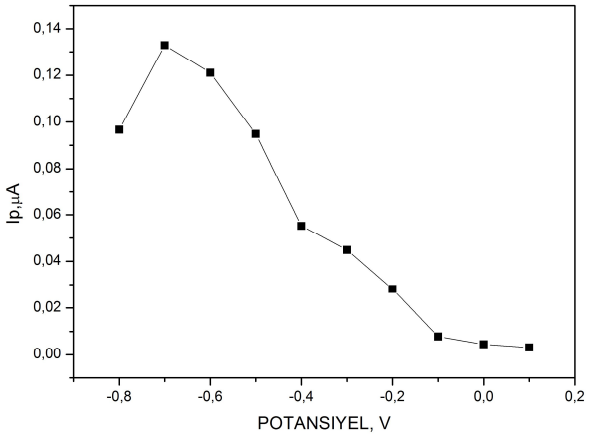
Şekil 4.5. DTP(aril)anilin modifiye elektrot cevabına pH'nın etkisi (0,1M PBS, Kolesterol derişimi; 19,8µM, -0,7V, 0,1V/s, oda sıcaklığı)

Grafiğe göre pH 6,0 ve 7,5 arasında akım farkının arttığı ancak pH 7,5'ten sonra azaldığı görülmektedir. Literatür kaynaklarında kolesterol oksidaz enzimin optimum pH çalışma aralığı 6,0-8,0 arasında olduğu belirtilmiştir (Li, Liao ve ark. 2005). En yüksek akım farkı değerine sahip pH değeri optimum ortam pH'sı olarak kabul edildi ve tez çalışmasında ölçümler pH 7,5 ile tamamlandı.

4.1.4.3. Çalışma Potansiyeli

Yapılan çalışmalar incelendiğinde kolesterol enziminin çalışma potansiyeli aralığının geniş olduğu bilinmektedir, bazı çalışmalarda 0,8 V ve 0,2 V gibi pozitif potansiyel değerleri kullanılırken (Singh, Chaubey ve ark. 2004), (Ahmad, Pan ve ark. 2010), farklı çalışmalarda da 0,0 V ve -0,05 V gibi potansiyellerin uygulandığı da görülmüştür (Charpentier and ElMurr 1995), (Tan, Ll ve ark. 2005), (Li, Xie ve ark. 2015)

COx enzim elektrodun en uygun çalışma potansiyelini elde etmek için Bölüm 3.4.6.3' te belirtilen işlemler doğrultusunda ölçümler alınmıştır. Akım farkı değerlerinin çalışma potansiyellerine karşı grafikleri çizilerek incelenmiştir. Şekil 4.6'da görüldüğü üzere en yüksek akım farkı değerine sahip -0,7 V çalışma potansiyeli en uygun çalışma potansiyeli olarak belirlenmiştir.



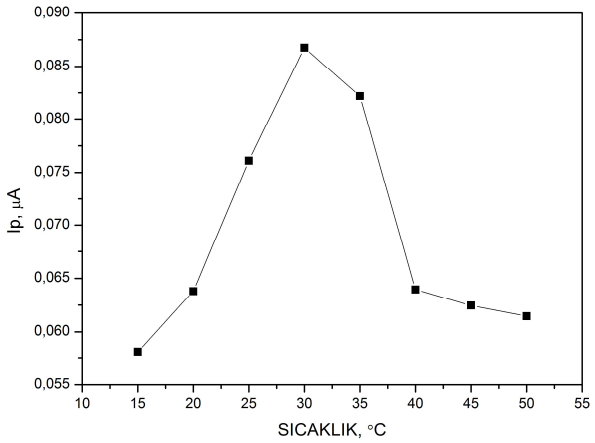
Şekil 4.6. DTP(aril)anilin modifiye elektrot cevabına çalışma potansiyelinin etkisi (0,1M PBS, Kolesterol derişimi; 19,8µM, pH 7,5, 0,1V/s, oda sıcaklığı)

4.1.4.4. Optimum Sıcaklık

Enzimlerin çalışıldığı ortamlarda sıcaklık değeri çok önemlidir (Khun, Ibupoto ve ark. 2012), yüksek veya düşük sıcaklıklarda enzimlerin aktivitelerinin azalması ya da yok olması ile karşı karşıya kalınabilir. Bu sebeple tez çalışmamızda optimum sıcaklık değerini elde edebilmek için Bölüm 3.4.6.4.'te belirtildiği koşullarda denemeler gerçekleştirildi. Çizilen akım farkları- sıcaklık grafiğinin verilerine göre en yüksek akım farkı 30˚C sıcaklıkta olduğu görüldü. Daha yüksek sıcaklıklarda akım farkının azalmasının sebebinin enzimin deaktive olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir

(Pei and Li 2000). COx enziminin optimum olarak aktif olduğu sıcaklığın 37˚C olduğu bilinmektedir (MacLachlan, Wotherspoon ve ark. 2000). Kolesterol enzimlerinin kullanıldığı birçok kolesterol tayini araştırmalarında amperometrik biyosensör uygulamaları için sıcaklık etkisinin incelendiği görülmüştür ancak pratik çalışma koşulları sağlanması açısından oda sıcaklığı veya oda sıcaklığına yakın sıcaklıklar kullanıldığı belirlenmiştir (Brahim, Narinesingh ve ark. 2001).

Bu nedenle tez çalışmasındaki deneyler oda sıcaklığında (23±2 ˚C) sabit tutularak tamamlandı (Şekil 4.7.).

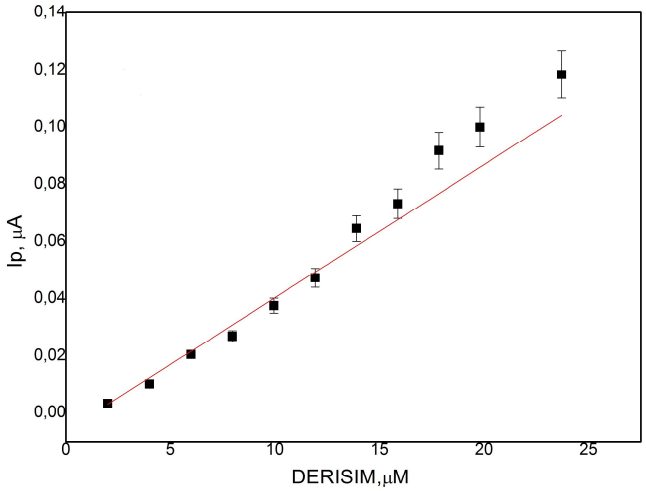


Şekil 4.7. DTP(aril)anilin modifiye elektrot cevabına sıcaklığın etkisi (0,1M PBS, pH 7,5, Kolesterol derişimi; 19,8µM, -0,7V, 0,1V/s)

4.1.5. Biyosensör Elektrotlarının Performans Faktörleri

4.1.5.1. Kolesterol Derişiminin Etkisi

COx enzim elektrodunun amperometrik biyosensör uygulaması denemesindeki kolesterol derişiminin etkisini görebilmek için amperometrik ölçümlerde hücreye, Bölüm 3.4.7.1.'de açıklandığı gibi kolesterol çözeltisinin farklı derişimlerinden eklendi. Çalışma sonucunda kolesterol çözeltisi derişimlerine karşı akım farkı grafiği çizildi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. DTP(aril)anilin modifiye elektrot cevabına kolesterol derişiminin etkisi (0,1M PBS, pH 7,5, -0,7V, 0,1V/s, oda sıcaklığı)

Çizelge 4.1. DTP(aril)anilin modifiye COx biyosensörünün Kalibrasyon grafiği verileri

Parametre	**Değer**
Lineer aralık (µM)	2-23,7
Denklem	y=a+bx
Eğim (µA/ µM)	$0{,}00465 \pm 1{,}12 \times 10^{-4}$
Kesim noktası (µA)	$-0{,}00614 \pm 3{,}79 \times 10^{-4}$
Koralasyon sabiti(R^2)	0.97689
LOD (µM)	0,27
LOQ (µM)	0,82

Grafik incelendiğinde, kolesterol enzim elektrodun 2,00 µM ve 23,7 µM derişim aralığında kolesterole doğrusal cevap verdiği görüldü. Hazırlanan kolesterol oksidaz enzim elektrotun çalışma aralığının oldukça geniş olduğu tespit edildi (Çizelge 4.1.) Ayrıca yapılan bazı literatür taramalarına göre çok daha yüksek bir tayin sınırı ve geniş

çalışma aralığının elde edildiği belirlendi. Bu çalışmalardan bazılarına göre; çalışma aralıkları 2,0-12,0 mM (Kumar vd. 2006), 0,025-0,3 mM (Vidal vd. 2004b) ve 1,29-12,93 mM (Dhand vd. 2008)'dır. Ayrıca bu çalışmalarda biyosensörlerin sahip olduğu düşük tayin sınır sebebi ile gerçek numunelerde kolesterol tayini yapılamadığı düşünülmektedir.

En düşük gözlenebilme (kalitatif) sınırı ve tayin (kantitatif) sınırı aşağıda verilen eşitlikler ile hesaplanmıştır. Eşitliklerde δ, tanık numunenin standart sapması ve s ise kalibrasyon grafiğinin eğimidir (Skoog 1998).

$$LOD = \frac{3,3\delta}{s}$$

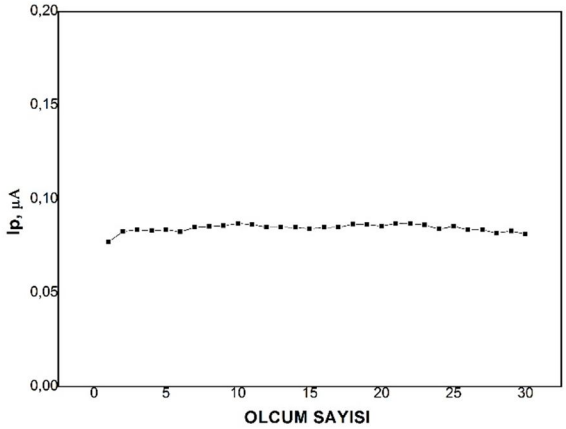
$$LOQ = \frac{10\delta}{s}$$

LOD: 0,27 µM LOQ: 0,82 µM olarak bulunmuştur.

Elde edilen kolesterol oksidaz enzim biyosensörünün çalışma aralığının serumda bulunan kolesterol derişiminden daha düşük olduğu görüldü. Bu sebeple serum numunelerinin derişim aralığı ile uyum içerisinde olup doğru kolesterol tayini cevaplarının bu biyosensörle elde edilebileceği düşünülmektedir.

4.1.5.2. Tekrarlanabilirlik ve Operasyonel Stabilite

Enzimlerin elde edilme mekanizması çok kolay ve hızlı işlemlere sahip değildirler, bu sebeple hem yüksek maliyetlidirler hem de kolay ulaşılabilirlikleri yoktur. Bu dezavantajların problem olmaması için enzim kullanılan çalışmalar zamanla direk kullanım yerine yerini immobilize yöntemlere bırakmıştır (Hooda, Gahlaut ve ark. 2009). İmmobilize enzim elektrodun çok sayıda analiz için bozulmadan veya deaktive olmadan kullanılması büyük öneme sahiptir. Bu amaçla elektrodun tekrar kullanılabilirliği ve operasyonel stabilite deneyleri için Bölüm 3.4.7.2.'de tanımlanan işlemler uygulanarak çalışmalar gerçekleştirildi. Önceden belirlenmiş kolesterol derişimi kullanılarak elektrodun kolesterol tayini 30 defa ölçümü alındı ve tüm ölçümler 2 tekrarlı gerçekleştirildi. Ölçüm sayısına karşı akım farkı grafiğe geçirildi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. DTP(aril)anilin modifiye COx enzim elektrodunun tekrarlanabilirlik ve operasyonel stabilite çalışması (0,1M PBS pH 7,5, -0,7V, 0,1V/s, oda sıcaklığı, kolesterol derişimi, 19,8 µM)

Literatür çalışmalarında kolesterol biyosensörlerinin tekrar kullanılabilirliğinin, kolesterol derişimin sabit olduğu tekrarlı ölçümler ile gerçekleştirildiği görülmüştür. Ayrıca biyosensörlerin güvenilirlikleri ve tekrar kullanılabilirliklerinin kabul edilmesi için bağıl standart sapmalarının %5'ten küçük bir değere sahip olması gerekir. Grafik incelendiğinde 30 ölçümün ortalama değerinin 0,079±0,035 ve bağıl standart sapma değerinin de %3,84 olduğu görülmüştür. Bazı çalışmalar incelendiğinde; % 5,06 (Shih, Douglas ve ark. 2009), %4,7 (Abdelwahab, Won ve ark. 2010), %1,9 (Gopalan, Lee ve ark. 2009) gibi bağıl standart sapma değerleri görülmüştür. Elde edilen bağıl standart sapma değerinin istenen aralıkta olduğu görüldü. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliği cevabını yüksek olduğu belirlendi.

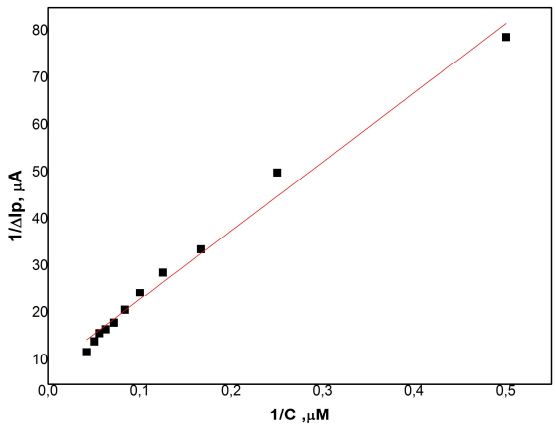
Ayrıca enzim aktivitesinin kararlılığını belirlemek için yapılan operasyonel stabilite çalışmaları incelendiğinde şekil 4.9'da görülen 30 ölçümde sadece %2,75'ini kaybettiği görüldü bu sebeple kolesterol biyosensörünün 30 ölçümde duyarlılığının hemen hemen hiç azalmadığı söylenebilir.

4.1.5.3. Enzim Elektrodun Aktivitesinin Belirlenmesi

DTP(aril)anilin ile modifikasyonu yapılan COx enzim biyosensörün enzim aktivitesinin hesaplanması için Bölüm 3.4.7.3.'te belirtilen basamaklar uygulandı. Biyosensör elektrodun farklı kolesterol derişimlerine verdiği amperometrik cevaplar 0,1 M pH 7,5 fosfat tamponunda çalışıldı. Michaelis Menten kinetiğine göre; ortamdaki enzim miktarı sabit olduğunda substrat derişimi artınca reaksiyonun hızının artığı ve sonunda da sabit bir değere ulaştığı bilinmektedir (Yavuz 2005). Michaelis Menten sabitinin (Km) hesaplanabilmesi için, Lineweaver Burk eğrisi çizildi (Şekil 4.12). 1/C'ye karşı 1/ΔIp çizilen grafiğin verileri kullanılarak;

$$1/\Delta Ip = (146{,}73 \times 1/C) + 8{,}2388$$

denklemi elde edildi ve K_m değeri 17,81 µM olarak hesaplanmıştır. Biyosensör çalışmalarında yüksek hassasiyete sahip elektrotların K_m değerlerinin düşük olması gerektiği bilinir. Bazı literatürlerdeki K_m değerleri; 0,007mM (Umar, Ahmad ve ark. 2014), 4,7 mM (Umar, Rahman ve ark. 2009), 0,295 µM (Wo 2016) olarak rapor edilmiştir. Bu veriler ile karşılaştırıldığında oldukça düşük K_m değerine sahip olan kolesterol oksidaz biyosensörünün enzim aktivitesinin yüksek olduğu söylenebilir.

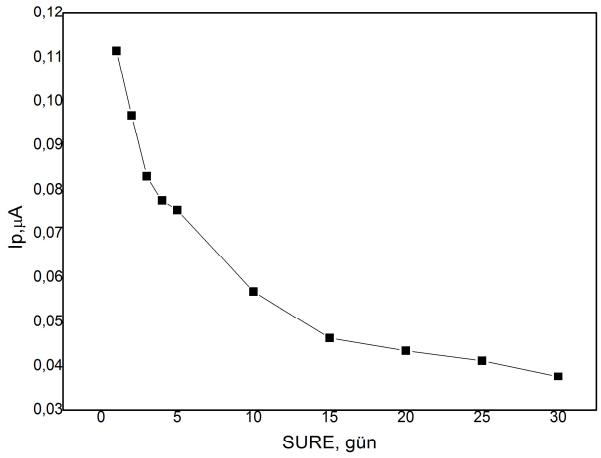


Şekil 4.10. DTP(aril)anilin modifiye kolesterol oksidaz enzim elektrodunun aktivitesinin belirlenmesi için çizilen Lineweaver Burk eğrisi (0,1M PBS pH 7,5, oda sıcaklığı, -0,7V, Kolesterol derişimi 19,8 µM)

4.1.5.4. Raf ömrü

Kolesterol oksidaz elektrodunun ömür çalışması için Bölüm 3.4.7.4.'te verilen işlemler doğrultusunda deneyler gerçekleştirildi. Çalışma elektrodu kullanılmadığı zaman 0,1 M pH 7,5 fosfat tamponu içinde muhafaza edildi. Elde edilen biyosensörün raf ömrü denemesinin 5. gününün sonunda elektrodun duyarlılığının %32,45 kayba uğradığı görüldü. 10. günün sonunda ise %48,99'luk kayıp gözlendi. Bu kaybın sebebinin enzimin bozulması veya çapraz bağlama ile bağlanmış olan enzim bağlarının zayıflaması olarak düşünüldü. Hazırlanan elektrodun 10. gün sonunda duyarlılığının yaklaşık yarısını kaybetmiş olmasına rağmen aynı çalışma aralığında kullanılabileceği düşünüldü ancak yüksek verimle kullanım için ortalama sürenin bir hafta olduğu söylenebilir.

Ahmad ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada biyosensör ömrünün 5 hafta gibi uzun bir süreye sahip olduğu belirtilmiştir (Ahmad, Pan ve ark. 2010). Ancak farklı çalışmalarda 2 hafta (Ozer, Ozyoruk ve ark. 2007), 15 gün (Vidal, Garcia ve ark. 1999), 20 gün (Turkarslan, Kayahan ve ark. 2009) gibi biyosensör ömür süreleri de çalışılmıştır. İmmobilizasyon süreci ve süresi, kullanılan modifikasyon maddeleri, kullanılan polimer filmi yapısı veya kalınlığı gibi parametreler bu farklanmaların sebebi olarak düşünülebilir.



Şekil 4.11. DTP(aril)anilin modifiye kolesterol oksidaz enzim elektrodunun raf ömrü (0,1M PBS pH 7,5, oda sıcaklığı, -0,7V, Kolesterol derişimi 19,8 µM)

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Tez çalışmasında; kolesterol tayini için, polimer temelli COx enzim biyosensörü geliştirildi. DTP(aril)anilin ile modifiye edilen camsı karbon elektrota COx enzimi çapraz bağlama yöntemi ile immobilize edildi. Kolesterol tayininde kullanılması için geliştirilen enzim biyosensörünün optimum şartları tespit edildi ve performans faktörleri belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre geliştirilen elektrodun:

- ✓ Optimum çalışma pH'sı 7,5'tir
- ✓ Optimum immobilizasyon süresi 2 saattir
- ✓ Çalışma potansiyeli oldukça düşüktür (-0,7 V)
- ✓ Optimum sıcaklık değerine iyi cevap vermektedir (23±2 ˚C)
- ✓ Geniş bir derişim aralığına (2,0 - 23,7 μM) sahiptir
- ✓ Gözlenebilme sınırı düşüktür (2 μM)
- ✓ Tekrar kullanılabilirliği yüksektir (LOD: 0,27, LOQ: 0,82)
- ✓ Enzim aktivitesi kolesterol enzim biyosensörlerine göre yüksektir (K_m= 17,81 μM)
- ✓ Raf ömrü 1 hafta olarak belirlenmiştir.

Diğer yöntemler göz önüne alınırsa biyosensör uygulamaların üstünlüğü bu çalışma ile tekrar ispatlanmıştır. Farklı biyosensör uygulamaları incelendiğinde, geliştirilen iletken polimer DTP(aril)anilin modifiye kolesterol oksidaz immobilize biyosensörün benzerlerine kıyasla yüksek duyarlık ve hızlı sonuç alma performasına sahip olması dikkat çekmektedir (Çizelge 5.1).

5.2 Öneriler

Tez çalışmasında geliştirilen enzim biyosensörünün kan serumunda kolesterol tayininin yüksek doğrulukla yapılmasına olanak sağlayacağı söylenebilir. Ayrıca elde edilen sonuçlarının prototip kolesterol ölçüm ekipmanı çalışmalarına ışık olabileceği düşünülebilir.

Çizelge 5.1 Kolesterol tayini için hazırlanan bazı biyosensörlerin özelliklerinin karşılaştırılması

Kullanılan Elektrot, Enzim	Çalışma aralığı	Çalışma potansiyeli	Ömrü	Gözlenebilme Sınırı	Kaynak
Pt, COx	-/0,4mM/-	0,7V	20 gün		(Turkarslan, Kayahan ve ark. 2009)
Camsı karbon, COx	-/4,79µM	0,4V	7. günde %60'ı kamış	0,044 $AM^{-1}cm^{-2}$	(Tsai, Chen ve ark. 2008)
ITO kaplı cam levha, COx	25-400 mg/dL/	(-0,5)-(0,9) V	10 hafta	-/ 88,9 mA mg/dL	(Matharu, Sumana ve ark. 2007)
AuNP, Mikro Peroksidaz, COx	10 - 130 µM	0,3 V	1 ay sonunda %95'i kalmış	0,3-0,04 µM.	(Abdelwahab, Won ve ark. 2010)
Au kaplı titanyum tabaka, COx, Kolesterol esteraz, horeseradish peroksidaz	0,97–7,8 mM		60 gün sonunda %95'si kalmış	29,33 -A mM^{-1} cm^{-2}).	(Ahmadalinezhad and Chen 2011)
Çalışılan DTP(aril)anilin modifiye elektrot, COx	2,0 µM – 23,7 µM	-0,7 V	1 hafta	0,27 µM	Bu tez çalışması

KAYNAKLAR

Abdelwahab, A. A., M. S. Won and Y. B. Shim, 2010, Direct Electrochemistry of Cholesterol Oxidase Immobilized on a Conducting Polymer: Application for a Cholesterol Biosensor, *Electroanalysis* 22(1): 21-25.

Ahmad, M., C. F. Pan, L. Gan, Z. Nawaz and J. Zhu, 2010, Highly Sensitive Amperometric Cholesterol Biosensor Based on Pt-Incorporated Fullerene-like ZnO Nanospheres, *Journal of Physical Chemistry C* 114(1): 243-250.

Ahmadalinezhad, A. and A. C. Chen, 2011, High-performance electrochemical biosensor for the detection of total cholesterol, *Biosensors & Bioelectronics* 26(11): 4508-4513.

Allain, C. C., Poon, L.S., 1974, EnzymaticDeterminationof Total Serum Cholesterol, *Clinical Chemistry* 20(4): 470-475.

Arya, S. K., M. Datta and B. D. Malhotra, 2008, Recent advances in cholesterol biosensor, *Biosensors & Bioelectronics* 23(7): 1083-1100.

Arya, S. K., A. K. Prusty, S. P. Singh, P. R. Solanki, M. K. Pandey, M. Datta and B. D. Malhotra, 2007, Cholesterol biosensor based on N-(2-aminoethyl)-3-aminopropyl-trimethoxysilane self-assembled monolayer, *Analytical Biochemistry* 363(2): 210-218.

Aydın, Y., 2012, İletken Polimerlerin İçerisinde Enzim Tutuklamasıyla Yapilan Biyosensörler, Yüksek Lisans Tezi, *Karamanoğlu Mehmet Bey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Karaman.

Azak, H., 2015, Ditiyonepirol (DTP) Tarzı İletken Polimerlerin Sentezi, Karakterizasyonu Ve Bu Polimerlerin Biyosensör Uygulamaları, Doktora Tezi, *Karamanoğlu Mehmet Bey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Karaman.

Balaji, G., D. I. Phua, W. L. Shim and S. Valiyaveettil, 2010, Synthesis and Characterization of Unsymmetric Indolodithienopyrrole and Extended Diindolodithienopyrrole, *Organic Letters* 12(2): 232-235.

Batır, G. G., 2009, 3-[(2,5-Dimetil-4-Brom)Fenil] Tiyofenin Elektrokimyasal Polimerizasyonu, Karakterizasyonu ve Glikoz Biyosensörü Olarak Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Isparta.

Berezhetskyy, A. L., O. F. Sosovska, C. Durrieu, J. M. Chovelon, S. V. Dzyadevych and C. Tran-Minh, 2008, Alkaline phosphatase conductometric biosensor for heavy-metal ions determination, *Irbm* 29(2-3): 136-140.

Brahim, S., D. Narinesingh and A. Guiseppi-Elie, 2001, Amperometric determination of cholesterol in serum using a biosensor of cholesterol oxidase contained within a polypyrrole-hydrogel membrane, *Analytica Chimica Acta* 448(1-2): 27-36.

Cao, Y., A. Andreatta, A. J. Heeger and P. Smith, 1989, Influence of Chemical Polymerization Conditions on the Properties of Polyaniline, *Polymer* 30(12): 2305-2311.

Charpentier, L. and N. ElMurr, 1995, Amperometric determination of cholesterol in serum with use of a renewable surface peroxidase electrode, *Analytica Chimica Acta* 318(1): 89-93.

de Prada, A. G. V., N. Pena, C. Parrado, A. J. Reviejo and J. M. Pingarron, 2004, Amperometric multidetection with composite enzyme electrodes, *Talanta* 62(5): 896-903.

Diaz, A. F., Kanazawa, K.K., Gardini, G.P., 1979), Electrochemical polymerization of pyrrole, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*(14): 635-636.

Dinckaya, E., E. Akyilmaz, A. Telefoncu and S. Akgol, 1999, Eggplant tissue homogenate-based bioselective membrane electrode for determination of catechol, *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* 36(1): 36-38.

Endo, T., R. Ikeda, Y. Yanagida and T. Hatsuzawa, 2008, Stimuli-responsive hydrogel-silver nanoparticles composite for development of localized surface plasmon resonance-based optical biosensor, *Analytica Chimica Acta* 611(2): 205-211.

Evenson, S. J., M. J. Mumm, K. I. Pokhodnya and S. C. Rasmussen, 2011, Highly Fluorescent Dithieno[3,2-b:2 ',3 '-d]pyrrole-Based Materials: Synthesis, Characterization, and OLED Device Applications, *Macromolecules* 44(4): 835-841.

Genies, E. M., A. Boyle, M. Lapkowski and C. Tsintavis,1990, Polyaniline - a Historical Survey, *Synthetic Metals* 36(2): 139-182.

Gerard, M., A. Chaubey and B. D. Malhotra, 2002, Application of conducting polymers to biosensors, *Biosensors & Bioelectronics* 17(5): 345-359.

Glodowski, S. and Z. Kublik, 1980, Cyclic and Stripping Voltammetry of Tin at Mercury Hanging Drop and Film Electrodes in Acidic Ortho-Diphenol Media in the Presence of Lead and Cadmium, *Analytica Chimica Acta* 115(Mar): 51-60.

Gopalan, A. I., K. P. Lee and D. Ragupathy, 2009, Development of a stable cholesterol biosensor based on multi-walled carbon nanotubes-gold nanoparticles composite covered with a layer of chitosan-room-temperature ionic liquid network, *Biosensors & Bioelectronics* 24(7): 2211-2217.

Gorman, C. B., Grubbs, R. H., 1991, Conjugated Polymers: The Interplay Between Synthesis, Structure, and Properties, *Conjugated Polymers,* 1-48.

Gronowitz, S.,1961, Halogen-Metal Interconversion With Dibromobithienyls, *Acta. Chem. Stad.* 15(6): 1393-1395.

Hooda, V., A. Gahlaut, H. Kumar and C. S. Pundir, 2009, Biosensor based on enzyme coupled PVC reaction cell for electrochemical measurement of serum total cholesterol, *Sensors and Actuators B-Chemical* 136(1): 235-241.

Isik, S., S. Alkan, L. Toppare, I. Cianga and Y. Yagci, 2003, Immobilization of invertase and glucose oxidase in poly 2-methylbutyl-2-(3-thienyl) acetate/polypyrrole matrices, *European Polymer Journal* 39(12): 2375-2381.

Ito, T., H. Shirakawa and S. Ikeda, 1996, Simultaneous polymerization and formation of polyacetylene film on the surface of concentrated soluble Ziegler-type catalyst solution (Reprinted from Journal Polymer Science, Polymer Chemistry edition, vol 12, pg 11-20, 1974), *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* 34(13): 2533-2542.

Kafi, A. K. M. and A. C. Chen, 2009, A novel amperometric biosensor for the detection of nitrophenol, *Talanta* 79(1): 97-102.

Kakutani, T. and M. Senda, 1980, Theory of Ac Polarization and Ac Polarography and Voltammetry of 2-Step Surface Redox Reactions, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 53(7): 1942-1948.

Khan, R., P. R. Solanki, A. Kaushik, S. P. Singh, S. Ahmad and B. D. Malhotra, 2009, Cholesterol biosensor based on electrochemically prepared polyaniline conducting polymer film in presence of a nonionic surfactant, *Journal of Polymer Research* 16(4): 363-373.

Khun, K., Z. H. Ibupoto, O. Nur and M. Willander, 2012, Development of Galactose Biosensor Based on Functionalized ZnO Nanorods with Galactose Oxidase, *Journal of Sensors.*

Kim, J., B. Lim, K. J. Baeg, Y. Y. Noh, D. Khim, H. G. Jeong, J. M. Yun and D. Y. Kim ,2011, Highly Soluble Poly(thienylenevinylene) Derivatives with Charge-Carrier Mobility Exceeding 1 cm(2)V(-1)s(-1), *Chemistry of Materials* 23(21): 4663-4665.

Kumar, A., R. R. Pandey and B. Brantley, 2006, Tetraethylorthosilicate film modified with protein to fabricate cholesterol biosensor, *Talanta* 69(3): 700-705.

Lee, H. and O. Ozer, 2007, Unlocking the value of RFID, *Production and Operations Management* 16(1): 40-64.

Li, G., J. M. Liao, G. Q. Hu, N. Z. Ma and P. J. Wu, 2005, Study of carbon nanotube modified biosensor for monitoring total cholesterol in blood, *Biosensors & Bioelectronics* 20(10): 2140-2144.

Li, Z. J., C. C. Xie, J. H. Wang, A. Meng and F. H. Zhang ,2015, Direct electrochemistry of cholesterol oxidase immobilized on chitosan-graphene and cholesterol sensing, *Sensors and Actuators B-Chemical* 208: 505-511.

Liu, Y., H. F. Wang, H. L. Dong, J. H. Tan, W. P. Hu and X. W. Zhan, 2012, Synthesis of a Conjugated Polymer with Broad Absorption and Its Application in High-Performance Phototransistors, *Macromolecules* 45(3): 1296-1302.

Lu, Y., H. Chen, X. Y. Hou, X. A. Hu and S. C. Ng, 2010, A novel low band gap conjugated polymer based on N-substituted dithieno[3,2-b:2 ',3 '-d]pyrrole, *Synthetic Metals* 160(13-14): 1438-1441.
Macdiarmid, A. G., J. C. Chiang, A. F. Richter and A. J. Epstein, 1987, Polyaniline - a New Concept in Conducting Polymers, *Synthetic Metals* 18(1-3): 285-290.

MacLachlan, J., A. T. L. Wotherspoon, R. O. Ansell and C. J. W. Brooks, 2000, Cholesterol oxidase: sources, physical properties and analytical applications, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 72(5): 169-195.

Malhotra, B. D., A. Chaubey and S. P. Singh, 2006, Prospects of conducting polymers in biosensors, *Analytica Chimica Acta* 578(1): 59-74.

Matharu, Z., G. Sumana, S. K. Arya, S. P. Singh, V. Gupta and B. D. Malhotra, 2007, Polyaniline Langmuir-Blodgett film based cholesterol biosensor, *Langmuir* 23(26): 13188-13192.

Mo, H., K. R. Radke, K. Ogawa, C. L. Heth, B. T. Erpelding and S. C. Rasmussen, 2010, Solution and solid-state properties of highly fluorescent dithieno[3,2-b:2 ',3 '-d]pyrrole-based oligothiophenes, *Physical Chemistry Chemical Physics* 12(43): 14585-14595.

Oylar, Ö., Tekin, İ., 2011, Kanserin Teşhis Ve Tedavisinde Nanoteknolojinin Önemi, *Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 1(16): 147-154.

Ozer, B. C., H. Ozyoruk, S. S. Celebi and A. Yildiz, 2007, Amperometric enzyme electrode for free cholesterol determination prepared with cholesterol oxidase immobilized in poly(vinylferrocenium) film, *Enzyme and Microbial Technology* 40(2): 262-265.

Patel, N. G., S. Meier, K. Cammann and G. C. Chemnitius, 2001, Screen-printed biosensors using different alcohol oxidases, *Sensors and Actuators B-Chemical* 75(1-2): 101-110.

Pei, J. H. and X. Y. Li, 2000, Xanthine and hypoxanthine sensors based on xanthine oxidase immobilized on a CuPtCl6 chemically modified electrode and liquid chromatography electrochemical detection, *Analytica Chimica Acta* 414(1-2): 205-213.

Przybyt, M. and B. Bialkowska, 2002, Enzyme electrodes with enzyme immobilised by Solgel technique, *Frontiers of Multifunctional Nanosystems* 57: 91-108.

Qiu, X. F., Y. B. Lou, A. C. S. Samia, A. Devadoss, J. D. Burgess, S. Dayal and C. Burda 2005, PbTe nanorods by sonoelectrochemistry, *Angewandte Chemie-International Edition* 44(36): 5855-5857.

Schindler, R., H. L. Thanh, B. Lendl and R. Kellner, 1998, Determination of enzyme kinetics and chemometric evaluation of reaction products by FTIR spectroscopy on the example of beta-fructofuranosidase, *Vibrational Spectroscopy* 16(2): 127-135.

Shih, W. M., S. M. Douglas, H. Dietz, T. Liedl, B. Hogberg and F. Graf, 2009, Self-assembly of DNA into Nanoscale Three-Dimensional Shapes, *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* 26(6): 799-799.

Singh, S., A. Chaubey and B. D. Malhotra, 2004, Amperometric cholesterol biosensor based on immobilized cholesterol esterase and cholesterol oxidase on conducting polypyrrole films, *Analytica Chimica Acta* 502(2): 229-234.

Singh, S., P. R. Solanki, M. K. Pandey and B. D. Malhotra, 2006, Cholesterol biosensor based on cholesterol esterase, cholesterol oxidase and peroxidase immobilized onto conducting polyaniline films, *Sensors and Actuators B-Chemical* 115(1): 534-541.

Skoog, D. A., Holler, F.J., Nieman, T.A., 1998, *Fundamentals of Instrumental Analysis.* USA.

Tan, X. C., M. J. Ll, P. X. Cai, L. J. Luo and X. Y. Zou, 2005, An amperometric cholesterol biosensor based on multiwalled carbon nanotubes and organically modified sol-gel/chitosan hybrid composite film, *Analytical Biochemistry* 337(1): 111-120.

Tiwari, S. P., J. Kim, K. A. Knauer, D. K. Hwang, L. E. Polander, S. Barlow, S. R. Marder and B. Kippelen, 2012, Complementary-like inverters based on an ambipolar solution-processed molecular bis(naphthalene diimide)-dithienopyrrole derivative, *Organic Electronics* 13(7): 1166-1170.

Topbaş, N., 2006, Anilin ve Poliakrilonitril Kullanarak Kimyasal Polimerizasyon Yöntemi İle İletken Kompozit Lif Hazırlanması, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Tsai, Y. C., S. Y. Chen and C. A. Lee, 2008), Amperometric cholesterol biosensors based on carbon nanotube-chitosan-platinum-cholesterol oxidase nanobiocomposite, *Sensors and Actuators B-Chemical* 135(1): 96-101.

Tuncagil, S., D. Odaci, S. Varis, S. Timur and L. Toppare, 2009, Electrochemical polymerization of 1-(4-nitrophenyl)-2,5-di(2-thienyl)-1 H-pyrrole as a novel immobilization platform for microbial sensing, *Bioelectrochemistry* 76(1-2): 169-174.

Turkarslan, O., S. K. Kayahan and L. Toppare ,2009, A new amperometric cholesterol biosensor based on poly(3,4-ethylenedioxypyrrole), *Sensors and Actuators B-Chemical* 136(2): 484-488.

Turkarslan, O., S. K. Kayahan and L. Toppare, 2009, Poly(pyrrole) versus poly(3,4-ethylenedioxythiophene): amperometric cholesterol biosensor matrices, *Journal of Solid State Electrochemistry* 13(5): 657-663.

Turkaslan, O., 2010, Amperometric Cholesterol And Alcohol Biosensors Based On Conducting Polymers, Doctor Of Philosophy, METU, Ankara.

Udum, Y. A., H. B. Yildiz, H. Azak, E. Sahin, O. Talaz, A. Cirpan and L. Toppare, 2014, Synthesis and Spectroelectrochemistry of Dithieno(3,2-b:2 ',3 '-d)pyrrole Derivatives, *Journal of Applied Polymer Science* 131(17).

Umar, A., R. Ahmad, S. W. Hwang, S. H. Kim, A. Al-Hajry and Y. B. Hahn, 2014, Development of Highly Sensitive and Selective Cholesterol Biosensor Based on Cholesterol Oxidase Co-Immobilized with alpha-Fe_2O_3 Micro-Pine Shaped Hierarchical Structures, *Electrochimica Acta* 135: 396-403.

Umar, A., M. M. Rahman, M. Vaseem and Y. B. Hahn, 2009, Ultra-sensitive cholesterol biosensor based on low-temperature grown ZnO nanoparticles, *Electrochemistry Communications* 11(1): 118-121.

Vidal, J. C., J. Espuelas and J. R. Castillo, 2004, Amperometric cholesterol biosensor based on in situ reconstituted cholesterol oxidase on an immobilized monolayer of flavin adenine dinucleotide cofactor, *Analytical Biochemistry* 333(1): 88-98.

Vidal, J. C., E. Garcia-Ruiz and J. R. Castillo, 2001, Design of a multilayer cholesterol amperometric biosensor for preparation and use in flow systems, *Electroanalysis* 13(3): 229-235.

Vidal, J. C., E. Garcia and J. R. Castillo, 1999, In situ preparation of a cholesterol biosensor: entrapment of cholesterol oxidase in an overoxidized polypyrrole film electrodeposited in a flow system - Determination of total cholesterol in serum, *Analytica Chimica Acta* 385(1-3): 213-222.

Vo-Dinh, T. and B. Cullum, 2000, Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 366(6-7): 540-551.

Wang, J., 2005, Nanomaterial-based electrochemical biosensors, *Analyst* 130(4): 421-426.

Wang, P., X. P. Wang, L. H. Bi and G. Y. Zhu, 2000, Renewable-surface amperometric nitrite sensor based on sol-gel-derived silicomolybdate-methylsilicate-graphite composite material, *Analyst* 125(7): 1291-1294.

Wo, Q., Hou, Y., Zhang, M., 2016, Amperometric cholesterol biosensor based on zinc oxide films on a silver nanowire–graphene oxide modified electrode, *Analytical Methods* (8): 1806-1812.

Yang, F., A. C. M. Chong, D. C. C. Lam and P. Tong, 2002, Couple stress based strain gradient theory for elasticity, *International Journal of Solids and Structures* 39(10): 2731-2743.

Yavuz, A. G., 2005, Polivinil Ferrosen Modifiye Elektrodunu Temel Alan Glukoz Biyosensörünün Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Esntitüsü, Isparta.

Yildiz, H. B., D. O. Demirkol, S. Sayin, M. Yilmaz, O. Koysuren and M. Kamaci, 2013, New Amperometric Cholesterol Biosensors Using Poly(ethyleneoxide) Conducting

Polymers, *Journal of Macromolecular Science Part a-Pure and Applied Chemistry* 50(10): 1075-1084.

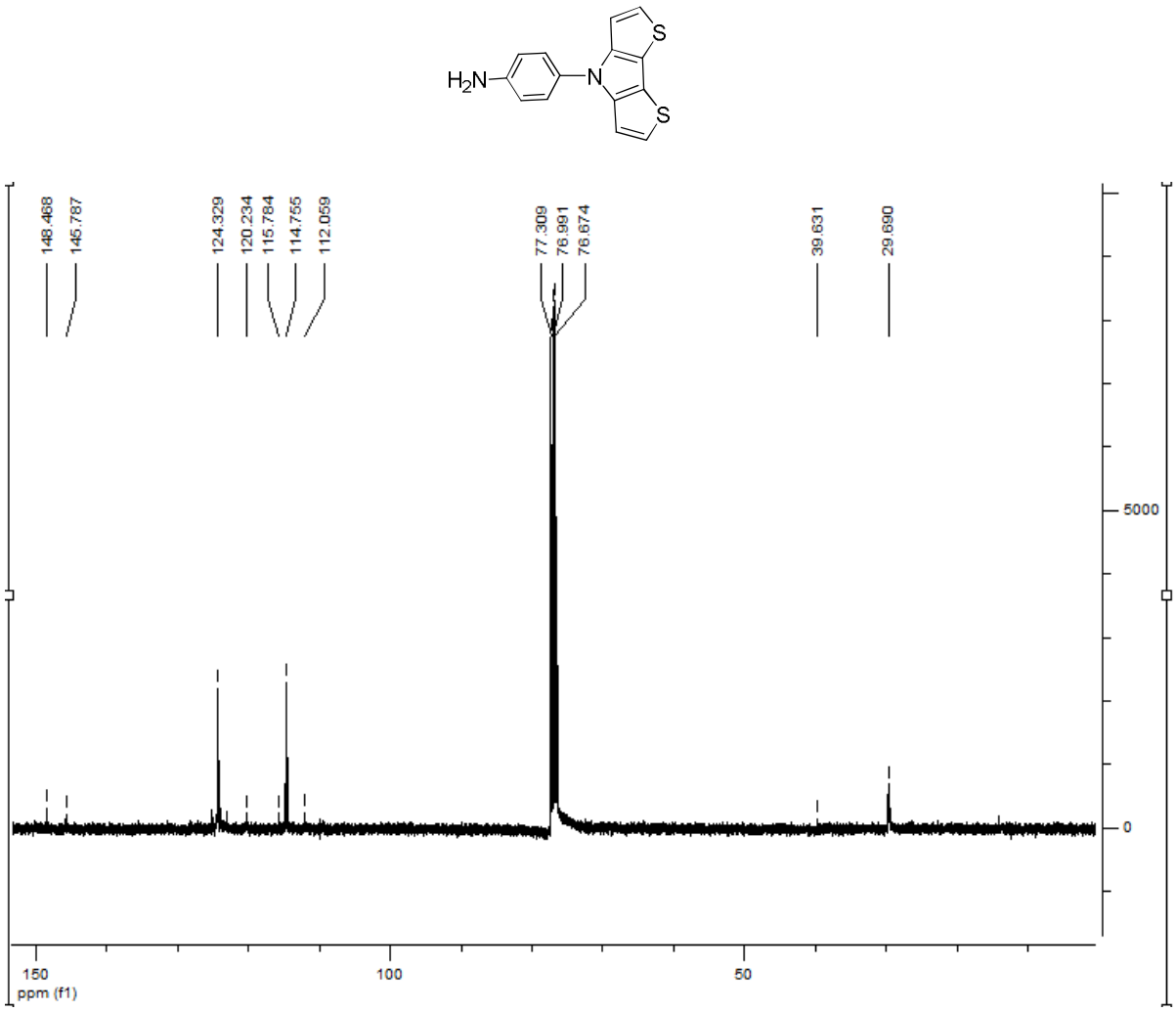
Yildiz, H. B., O. Talaz, M. Kamaci, A. Caliskan and S. Caliskan, 2013, Novel Photoelectrochemical Biosensors for Cholesterol Biosensing by Photonic " Wiring" of Cholesterol Oxidase, *Journal of Macromolecular Science Part a-Pure and Applied Chemistry* 50(12): 1182-1193.

Zeybek, D. K., 2010, Kolesterolün ve fenolik bileşiklerin tayini için amperometrik denim elektrotların hazırlanması, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Zhao, C. Z., Y. Meng, C. L. Shao, L. Wan and K. Jiao, 2008, Unadulterated glucose biosensor based on direct electron transfer of glucose oxidase encapsulated chitosan modified glassy carbon electrode, *Electroanalysis* 20(5): 520-526.

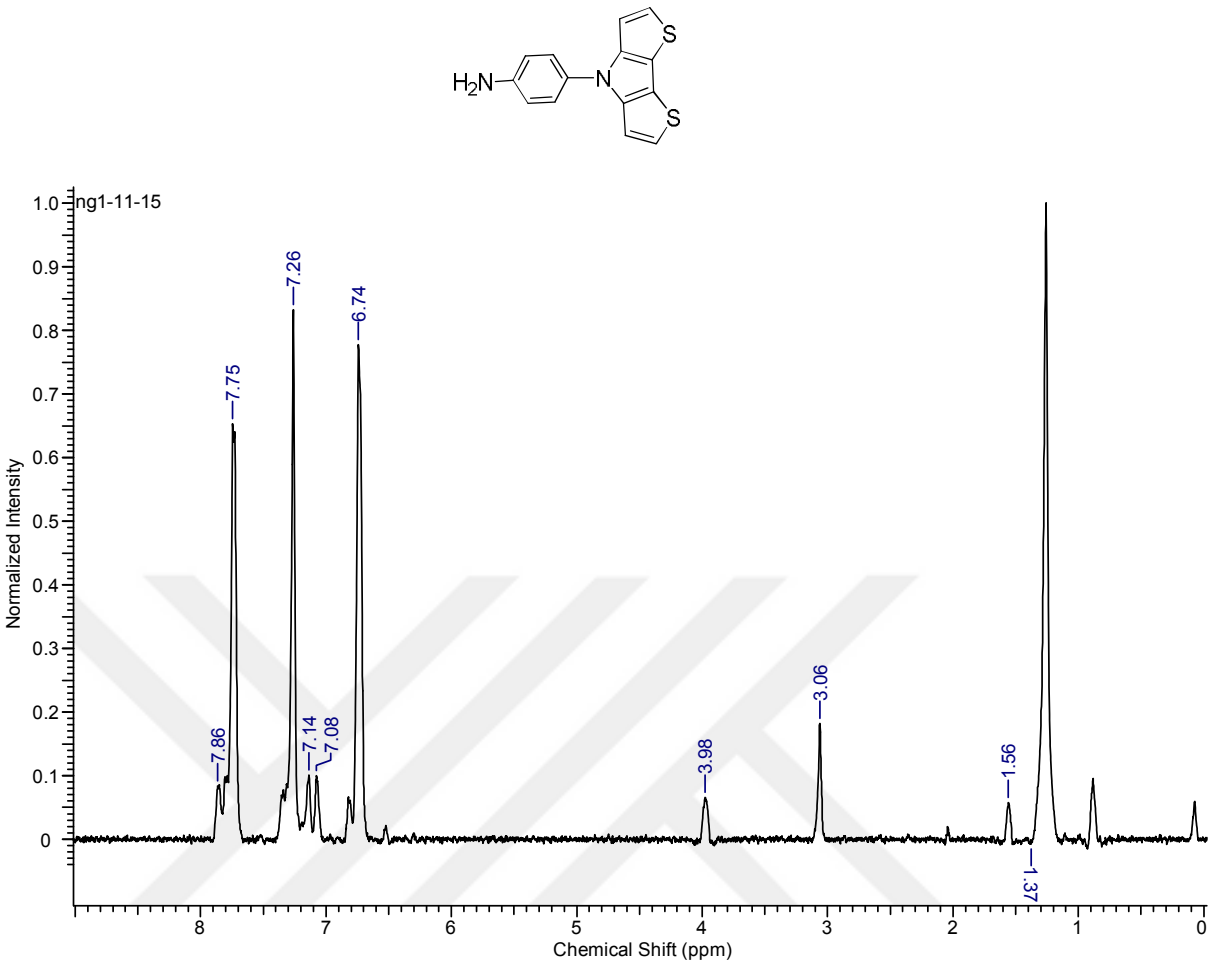
EKLER

EK-1



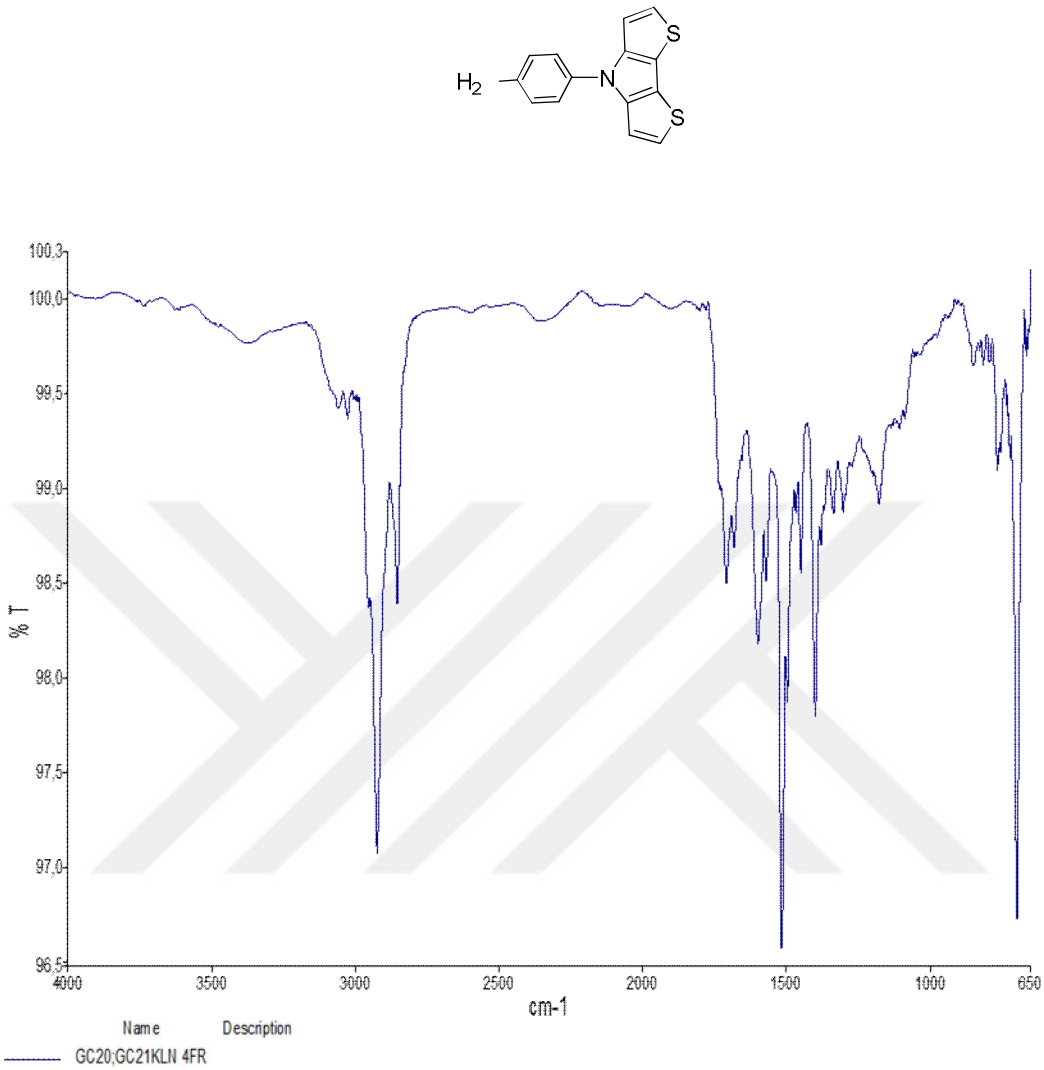
EK 1- 4-(4H-ditiyol [3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)anilin (N-Ph-NH2 monomerinin) 100 MHz 13C-NMR spektrumu 110-150ppm arası açılmış spektrum (CDCl3)

EK-2



EK 2- 4-(4H-ditiyol [3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)anilin (N-Ph-NH_2 monomerinin) anilin 400 MHz ^{1}H-NMR spektrumu ($CDCl_3$)

EK-3



EK 3- 4-(4H-ditiyol[3,2-b:2',3'-d]pirol-4-il)anilin) IR spektrumu

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Nilay GAZEL
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Balıkesir 1983
Telefon : 532 723 07 95
Faks :
e-mail : gazelnilay@gmail.com

EĞİTİM

Derece		Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	:	Meram Anadolu Lisesi, Meram, Konya	2001
Üniversite	:	ODTÜ, Çankaya, Ankara	2008
Yüksek Lisans	:	Selçuk Üniversitesi, Selçuklu, Konya	Devam ediyor

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2008-2009	Nestle A.Ş.	Medikal Delege
2009-2013	Helvacızade A.Ş.	Laboratuvar ve Arge Sorumlusu

UZMANLIK ALANI
Kimya

YABANCI DİLLER
İngilizce

YAYINLAR
- H. B Yıldız, S. Sayın, N. Gazel, H. Azak, "Poli(etilenoksit) iletken polimerlerin yeni amperometrik kolesterol biyosensörler olarak kullanılması", 5. Fiziksel Kimya Kongresi, 16-19 Mayıs 2015, Konya, Turkiye (Poster Sunum).
- H. B. Yıldız, M. Karaman, S. Sayın, H. Azak, N. Gazel; " P(SNS-NH2) /AOx/CNT/[Ru(bpy)3]+2 yapısıyla modifiye edilmiş elektrotlar kullanılarak fotoelektrokimyasal alkol biyosensörlerin yapımı.", 5. Fiziksel Kimya Kongresi, 16-19 Mayıs 2015, Konya, Turkiye (Poster Sunum).
- H. B. Yıldız, M. Kamacı, H. Azak, N. Gazel "Maya Hücreleri ve Invertaz Enziminin Poli(Etilenoksit) Elektrotlarda Tutuklanma" 5. Fiziksel Kimya Kongresi, 16-19 Mayıs 2015, Konya, Turkiye (Poster Sunum).
- D. Odacı Demirkol, H. B. Yıldız S. Sayın, H. Azak, N. Gazel ''Tiyol Fonksiyonlu Kaliksarenlerin Biyosensör Olarak Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılması'', 5. Fiziksel Kimya Kongresi, 16-19 Mayıs 2015, Konya (Poster Sunum).