



T.C.

MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NÖTRAL ORTAMDA GLUKOZ OKSİDAZ İÇEREN HOMO ve KOPOLİMER
FİLMLEİN SENTEZİ ve KARAKTERİZASYONU**

Rağibe Hülya AKYÜREKOĞLU

KİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY

AĞUSTOS-2017



**T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NÖTRAL ORTAMDA GLUKOZ OKSİDAZ İÇEREN HOMO ve
KOPOLİMER FİLMLEİN SENTEZİ ve KARAKTERİZASYONU**

Rağibe Hülya AKYÜREKOĞLU

**KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HATAY
AĞUSTOS-2017**

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.

Rağibe Hülya AKYÜREKOĞLU

ÖZET

NÖTRAL ORTAMDA GLUKOZ OKSİDAZ İÇEREN HOMO VE KOPOLİMER FİMLERİN SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU

Bu projede Pt elektrot üzerine pirol ve N-metilpirolün homo ve ko-polimerleri sentezlenerek Glukoz Oksidaz (GOD) içeren ince bir kitosan (Chi) film ile kaplanmış ve sonrasında, Chi film içerisinden enzimin kaçışını engellemek amacıyla Chi ve GOD bünyesinde bulunan $-NH_2$ grupları arasında, glutaraldehit (GAL) ile çapraz bağlar oluşturulmuştur. Enzim elektrotların tasarımında polipirol (PPy), poli(N-metilpirol) (PNMP) ve poli(pirol-co-N-metilpirol) (P(Py-co-NMP)) kullanılarak 3 ayrı elektrot oluşturulmuştur. Biyosensör tasarımında monomer derişimi, tarama hızı, Chi derişimi, GOD derişimi ve GAL derişimi parametrelerinin etkisi klasik yöntemle araştırılmıştır. Elde edilen elektrotların etkinliği glukoz derişimine bağlı akım değerlerinin kronoamperometrik yöntemle belirlenmesiyle tayin edilmiştir. Elde edilen veriler ışığında en uygun monomer derişimi ve tarama hızı PPy için 25 mM ve 50 mV/s; PNMP için 50 mM ve 20 mV/s ve P(Py-co-NMP) için ise 50 mM (1:1 Py:NMP) ve 50 mV/s olarak belirlenmiştir. PPy, PNMP ve P(Py-co-NMP) için en uygun Chi derişimi sırasıyla % 0.25, 1,00 ve 0,50; GAL derişimi ise sırasıyla %0.05, 0.10 ve 0.025 olarak tespit edilmiştir. Tüm polimer türlerinde 4 mg/ml GOD ile hazırlanan elektrotlar en yüksek akım değerini göstermişlerdir. Elde edilen polimer filmlerin FTIR analizi, tasarlanan elektrotların yüzey fotoğrafları ve SEM görüntüleri elde edilmiştir. PPy, PNMP ve P(Py-co-NMP) ile oluşturulan elektrotların glukoz derişimine bağlı akım cevapları, I_{max} ve K_m değerleri, tekrar kullanım kararlılıkları belirlenmiştir. Ayrıca, tasarlanan biyosensörler ZnO, TiO₂, TiZnO₃ nanopartiküller ile modifiye edilmiş ve elektron transferine en büyük katkırı ZnO nanopartiküllerin sağladığı gözlenmiştir. ZnO nanopartikül ile modifiye edilen ve edilmeyen elektrotlar ile elma suyu, gazoz, bal ve üzüm suyunda glukoz tayini yapılmış, sonuçlar ticari glukoz kiti ile ölçülen sonuçlarla karşılaştırılmıştır.

2017, 58 sayfa

Anahtar Kelimeler: Glukoz, amperometrik biyosensör, polipirol, poli(N-metilpirol), poli(pirol-co-N-metilpirol)

ABSTRACT

SYNTHESIS and CHARACTERIZATION OF GLUCOSE OXIDASE CONTAINING HOMO and COPOLYMER FILMS IN NEUTRAL MEDIA

In this study, Pt electrode was coated by homo or copolymer of pyrrole and N-methylpyrrole films and layered by Glucose Oxidase(GOD) containing thin chitosan gel and after that, crosslinking with glutaraldehyde between $-NH_2$ groups of chitosan and GOD was achieved to prevent enzyme leakage from chitosan film. Three different electrode types were constructed using polypyrrole, poly(N-methylpyrrole) and poly(pyrrole-co-N-methylpyrrole). The effect of monomer concentration, scan rate, Chi concentration, GOD concentration and GAL concentration on biosensor construction was investigated by classical method. The efficiencies of obtained electrodes were determined by current value measurement depending on glucose concentration by chronoamperometric method. In sight of obtained data, optimal monomer concentration and scan rates were determined for PPy as 25 mM and 50 mV/s; for PNMP as 50 mM and 20 mV/s; and for P(Py-co-NMP) 50 mM (1:1 Py:NMP) and 50 mV/s, respectively. For PPy, PNMP and P(Py-co-NMP) electrodes, optimal Chi concentrations were determined as 0.25, 1.00 and 0.50 %, respectively; whereas optimal GAL concentrations were determined as 0.05, 0.10 and 0.025 %, respectively. The electrodes which were prepared using 4 mg/ml GOD showed the highest current values for all electrode types. FTIR analysis of polymer films, photos and SEM images of electrodes surface were obtained. Current responses depending on glucose concentration, I_{max} and K_m values, operational stability of electrodes obtained by PPy, PNMP ve P(Py-co-NMP) were determined. Also, electrodes were modified by using ZnO, TiO_2 , $TiZnO_3$ nanoparticles and the highest contribution was observed by the ZnO nanoparticle modified electrode. Glucose determination was carried out in apple juice, fizzy-drink, honey and grape juice by ZnO nanoparticle modified and unmodified electrodes and results were compared with those of obtained by commercial glucose kit.

2017, 58 pages

Keywords: Glucose, amperometric biosensor, polypyrrole, poly(N-methylpyrrole), poly(pyrrole-co-N-methylpyrrole)

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın gerçekleştirilmesinde değerli bilgilerini benimle paylaşan, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan, samimiyetini benden esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr.Gül ÖZYILMAZ'a ,

Ayrıca çalışmalarım süresince kıymetli bilgilerini, yardımlarını ve önerilerini sunan hocam Prof.Dr.A.Tuncay ÖZYILMAZ'a,

Tez çalışmalarım sırasında her türlü yardım ve desteği gösteren meslektaşım ve kadim dostum E.İrem BAYRAM ve canım arkadaşım Seda AĞÇAM'a, emeği geçen Dr.Esra YAĞIZ'a, Nazan UYGUN'a, Taşkın ÇAMURCU'ya,

Maddi manevi hiçbirseyi benden esirgemeyip yüksek lisans eğitimim boyunca bana hep destek olan canım annem, babam, sevgili eşim Derviş AKYÜREKOĞLU ve hayatımı daha anlamlı kılan bitanecik kızım Selvi Naz AKYÜREKOĞLU'na sonsuz teşekkürler.

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

A: Akım (μA)

I: Akım yoğunluğu ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)

mM: Derişim (mmol/L)

M: Derişim (mol/L)

U: Enzim ünitesi ($\mu\text{mol}/\text{dk}$)

KISALTMALAR

Ag/AgCl: Referans Elektrot

Chi: Kitosan

CO₂: Karbondioksit

CV: Dönüşümlü Voltametri

FAD: Flavın Adenin Dinükleotid

GAL: Glutaraldehit

GOD: Glukoz Oksidaz

HCl: Hidroklorik Asit

H₂O₂: Hidrojen Peroksit

HRP: Peroksidaz

I_{MAX}: Maksimum Akım

K_M: Michaelis-Menten Hız Sabiti

NaOx: Sodyum Okzalat

PNMP: Poli N-metilpirol

PPy: Poli Pirol

P(PPy-co-NMP): Poli-pirol ve poli-N-metil kopolimeri

Pt: Platin

R²: Belirtme Katsayısı

[S]: Substrat Derişimi

SEM: Scanning Electron Microscopy

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	7
3. MATERYAL ve METOD.....	14
3.1. Materyal.....	14
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	14
3.1.2. Elektrokimyasal Ölçümler İçin Kullanılan Elektrotlar.....	14
3.1.3. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	14
3.2. Yöntem.....	15
3.2.1. Elektrotların Hazırlanması ve Temizlenmesi.....	15
3.2.2. Glukoz Biyosensörü Hazırlama Parametrelerinin Optimizasyonu.....	15
3.2.3. Glukoz Biyosensörün Tasarım Parametrelerinin Optimizasyonu.....	16
3.2.3.1. Monomer Derişiminin Belirlenmesi.....	16
3.2.3.2. Tarama Hızının Belirlenmesi.....	17
3.2.3.3. Kitosan Derişiminin Belirlenmesi.....	17
3.2.3.4. Enzim Derişiminin Belirlenmesi.....	17
3.2.3.5. Glutaraldehit (GAL) Derişiminin Belirlenmesi.....	17
3.2.4. Glukoz Biyosensörün Karakterizasyonu.....	17
3.2.4.1. Glukoz Biyosensörlerin Yüzey Özelliklerinin Karakterizasyonu... ..	17
3.2.4.2. FTIR Analizi.....	18
3.2.4.3. Kronoamperometrik Olarak Glukoz Derişimine Bağlı Akım Değerlerinin Ölçülmesi.....	18
3.2.4.4. Glukoz Derişimine Bağlı Akım Cevabının ve Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi.....	19
3.2.4.5. Biyosensörün tekrar kullanım kararlılığı.....	19
3.2.5. Hazırlanan enzim elektrotların metal oksit nanopartiküllerle Optimizasyonu.....	19
3.2.6. Biyosensörün gerçek örneklerde glukoz tayininde kullanımı.....	20
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	21
4.1. Polipirol (PPy) sentezi.....	21
4.2. Poli(N-metipirol) (PNMP) sentezi.....	25
4.3. Poli(Pirol-co-N-metilpirol) (P(Py-co-NMP) sentezi.....	28
4.4. Elektrot Tasarımında Chi, GOD ve GAL Derişimlerinin Optimizasyonu....	30
4.4.1. PPy Esaslı Elektrot Tasarımında Chi, GOD ve GAL Derişimlerinin Optimizasyonu.....	30
4.4.2. PNMP Esaslı Elektrot Tasarımında Chi, GOD ve GAL Derişimlerinin Optimizasyonu.....	32
4.4.3. P(Py-co-NMP) Esaslı Elektrot Tasarımında Chi, GOD ve GAL Derişimlerinin Optimizasyonu.....	34
4.5. Enzim Elektrotların Yapısal Karakterizasyonu.....	36

4.5.1. Polimer Filmlerin FTIR Analizleri.....	36
4.5.2. Enzim Elektrotların Dijital Fotoğraf Makinesi İle Elde Edilen Görüntüleri.....	38
4.5.3. Enzim Elektrotların SEM Görüntüleri.....	41
4.6. Enzim Elektrotların Kinetik Parametreleri.....	43
4.6.1. PPy İle Modifiye Edilen Elektrodun Kinetik Parametreleri.....	43
4.6.2. PNMP İle Modifiye Edilen Elektrodun Kinetik Parametreleri.....	44
4.6.3. P(Py-co-NMP) İle Modifiye Edilen Elektrodun Kinetik Parametreleri.....	45
4.7. Enzim Elektrotların Tekrar Kullanım Kararlılıkları.....	45
4.8. PPy İle Oluşturulmuş Enzim Elektrotların Metaloksit Nanopartiküllerle Modifikasyonu.....	46
4.9. PPy İle Oluşturulmuş Enzim Elektrotların Gerçek Örneklerde Glukoz Tayininde Kullanımı.....	48
5.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	50
KAYNAKLAR.....	52
ÖZGEÇMİŞ.....	54

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Bir biyosensörün genel gösterimi	1
Şekil 1.2. Yaygın olarak kullanılan bazı iletken polimerler	4
Şekil 3.1. Oluşturulan enzim elektrodun şematik gösterimi	16
Şekil 3.2. Çalışmalarda kullanılan tek hücreli üç elektrot sisteminin şematik gösterimi	18
Şekil 4.1. Elektrokimyasal analiz cihazında CV ile polimer sentezinin yapıldığı tek hücreli üç elektrot sistemi.....	21
Şekil 4.2. Farklı Py derişiminde sentezlenen PPy ile oluşturulan biyosensörlerin glukoz derişimine bağlı akım cevabının değışimi	22
Şekil 4.3. Farklı tarama hızlarında sentezlenen PPy ile oluşturulan biyosensörlerin glukoz derişimine bağlı akım cevabının değışimi.	23
Şekil 4.4. PPy sentez eğrisi	24
Şekil 4.5. Farklı NMP derişiminde sentezlenen PNMP ile oluşturulan biyosensörlerin glukoz derişimine bağlı akım cevabının değışimi	26
Şekil 4.6. Farklı tarama hızlarında sentezlenen PNMP ile oluşturulan biyosensörlerin glukoz derişimine bağlı akım cevabının değışimi	26
Şekil 4.7. Poli N-Metilpirolün sentez eğrisi	27
Şekil 4.8. Farklı monomer derişim oranları kullanılarak elde edilen biyosensörlerin glukoz derişimine bağlı akım cevapları.....	28
Şekil 4.9. Farklı tarama hızında elde edilen kopolimer ile oluşturulan biyosensörlerin glukoz derişimine bağlı akım cevapları	29
Şekil 4.10. Kopolimer film sentez eğrisi	29
Şekil 4.11. PPy ile modifiye elektrodun tasarımında kullanılan Chi derişiminin glukozla bağlı akım cevabı üzerine etkisi.....	30
Şekil 4.12. PPy ile modifiye elektrodun tasarımında kullanılan GOD derişiminin glukozla bağlı akım cevabı üzerine etkisi.....	31
Şekil 4.13. PPy ile modifiye elektrodun tasarımında kullanılan GAL derişiminin glukozla bağlı akım cevabı üzerine etkisi.....	32
Şekil 4.14. PNMP ile modifiye elektrodun tasarımında kullanılan Chi derişiminin glukozla bağlı akım cevabı üzerine etkisi.....	32
Şekil 4.15. PPy ile modifiye elektrodun tasarımında kullanılan GOD derişiminin glukozla bağlı akım cevabı üzerine etkisi.....	33
Şekil 4.16. PNMP ile modifiye elektrodun tasarımında kullanılan GAL derişiminin glukozla bağlı akım cevabı üzerine etkisi.....	33
Şekil 4.17. Kopolimer kaplı elektrot ile farklı Chi derişiminde elde edilen biyosensörlerin glukoz derişimine bağlı akım cevapları	34
Şekil 4.18. Kopolimer kaplı elektrot ile farklı GOD derişiminde elde edilen biyosensörlerin glukoz derişimine bağlı akım cevapları	35
Şekil 4.19. Kopolimer kaplı elektrot ile farklı GAL derişiminde elde edilen biyosensörlerin glukoz derişimine bağlı akım cevapları	35
Şekil 4.20. Py monomeri (a) ve PPy (b) filmin FTIR spektrumları.....	36
Şekil 4.21. NMP monomeri (a) ve PNMP (b) filmin FTIR spektrumu	37
Şekil 4.22. P(Py-co-NMP) filmin FTIR spektrumu	38

Şekil 4.23. Pt (A), Pt/PPy (B), Pt/PPy/GOD+Chi (C) ve Pt/PPy/GOD+Chi/GAL (D) elektrot yüzeylerinin fotoğraf görüntüleri	39
Şekil 4.24. Pt , Pt/PNMP , Pt/PNMP/GOD+Chi ve Pt/PNMP/GOD+Chi/GAL elektrot yüzeylerinin fotoğraf görüntüleri.....	40
Şekil 4.25. Pt (A), Pt/P(Py-co-NMP) (B), Pt/P(Py-co-NMP)/GOD+Chi (C) ve Pt/ P (Py-co-NMP) /GOD+Chi/GAL (D) elektrot yüzeylerinin fotoğraf görüntüleri....	41
Şekil 4.26. Pt/PPy (A) ve Pt/PPy /GOD+Chi/GAL (B) elektrot yüzeylerinin SEM görüntüleri	42
Şekil 4.27. Pt/PNMP (A) ve Pt/PNMP/GOD+Chi/GAL (B) elektrot yüzeylerinin SEM görüntüleri	42
Şekil 4.28. Pt/P(Py-co-NMP) (A) ve Pt/ P(Py-co-NMP) /GOD+Chi/GAL (B) elektrot yüzeylerinin SEM görüntüleri	42
Şekil 4.29. PPy ile modifiye edilen elektrot için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri.....	44
Şekil 4.30. PNMP ile modifiye edilen elektrot için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri.....	44
Şekil 4.31. P(Py-co-NMP) ile modifiye edilen elektrot için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri	45
Şekil. 4.32. PPy, PNMP ve Ppy-co-PNMP ile modifiye edilen enzim elektrotların tekrarkullanım kararlılığı	46
Şekil.4.33. Herbir nanopartikül için farklı derişimlerde hazırlanan elektrotların glukoz derişimine bağı akım değerleri	47
Şekil.4.34. Kit ile hazırlanan standart glukoz eğrisi	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

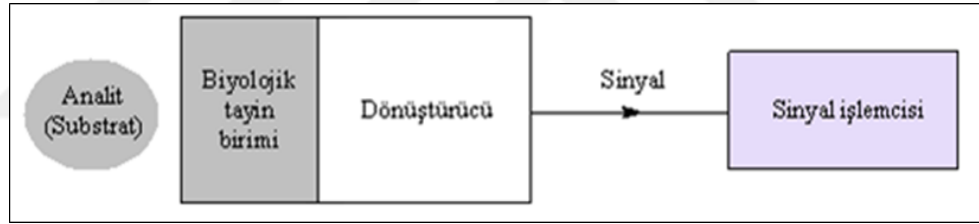
Çizelge.4.1. Bazı içeceklerin glukoz derişimlerinin glukoz kiti ve Pt/PPy/Chi+GOD/GAL ve Pt/PPy/Chi+GOD+ZnO/GAL elektrotları ile belirlenmesi ve karşılaştırılması.....	49
Çizelge 5.1. Klasik yöntemle optimize edilen elektrotların en uygun tasarım koşulları	50
Çizelge.5.2. Lineweaver-Burk grafiklerinden yararlanarak elde edilen K_M ve I_{max} değerleri.....	50



1.GİRİŞ

Biyosensörlerin tarihi 1950'li yılların ortalarında L.C.Clark'ın Cincinnati Hastanesi'nde (Ohio, ABD) ameliyat sırasında kanın O₂ miktarını bir elektrod ile izlemesiyle başlar. 1962 yılında *Clark ve Lyons* Glukoz oksidaz (GOD) enzimini O₂ elektrodu ile kombine ederek kanın glukoz düzeyini ölçmeyi başarmışlardır. Böylece yeni bir analitik sistem oluşmuştur. Bu sistem bir yandan biyolojik sistemin yüksek spesifisikliğini (enzim) diğer taraftan ise fiziksel sistemin (elektrod) tayin duyarlılığını birleştirmiş ve geniş spektrumlu bir uygulama olanağı bulmuştur.

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



Şekil 1.1 Bir biyosensörün genel gösterimi (Özcan, 2008)

Biyosensör sistemleri üç temel bileşenden oluşmaktadır. Bunlar; seçici tanıma mekanizmasına sahip "biyomolekül/biyoajan", bu biyoajanın incelenen maddeyle etkileşmesi sonucu oluşan fizikokimyasal sinyalleri elektronik sinyallere dönüştürebilen "dönüştürücü" ve "elektronik" bölümlerdir. Bu bileşenlerden en önemlisi, tayin edilecek maddeye karşı son derece seçimli fakat tersinir bir şekilde etkileşime giren, duyarlı biyolojik ajandır (Telefoncu, 1999).

Biyosensörlerin performans faktörlerini seçicilik, kullanım ömrü, kalibrasyon gereksinmesi, tekrarlanabilirlik, kararlılık, yüksek duyarlılık, yeterli düzeyde tayin sınırı, geniş ölçüm aralığı, hızlı cevap zamanı, basitlik ve ucuzluk yönünden incelersek;

Seçicilik : Biyosensörün kompleks bir matriks içerisinde tek başına analitik bir ölçüm cihazı olarak kullanılabilmesini sağlar. Seçiciliğin yeterli olmadığı durumlarda

Çalışma prosedürüne bu eksiği giderecek ek işlemler eklenmesi gerekir. Seçiciliğin zayıf olmasından kaynaklanan sorunlar biyosensörün kullanımını zor hale getirmektedir.

Kullanım ömrü : Biyolojik çevirici olarak enzim kullanıldığı durumlarda enzim aktivitesindeki azalma kullanım ömrünü kısıtlayan en önemli faktördür. Enzimin yaşam süresi, biyosensörün kullanım ömrü yanı sıra kalibrasyon sıklığı, stabilite, tekrarlanabilirlik gibi parametreleri de etkilemektedir.

Kalibrasyon gereksinmesi : İdeal bir biyosensörün hiç kalibrasyona gerek duymaması ya da en az kalibrasyona gereksinmesi istenir. Ama teorikte planlanan bu özellik pratikte günümüzde gerçekleştirilememiştir. Biyosensörlerin kullanım ömürleri boyunca sıkça ya da belirli aralıklarla kalibre edilerek duyarlılıklarından bir şey kaybedip kaybetmedikleri araştırılır.

Tekrarlanabilirlik : İdeal bir biyosensör elektrodunun aynı derişimde ya da aynı özelliklere sahip birden fazla örneğe daldırılmasıyla yapılan deneylerde aynı sonuçların okunması gerekir. Tekrarlanabilirlik değeri ne denli iyi olursa o biyosensör uygulaması da o denli iyi olur.

Kararlılık : Elektrot kararlılığının yüksek olduğu durumlar ideal biyosensörler için gereklidir. Kararlılık, kullanılan enzimin fiziksel dayanıklılığından etkilendiği gibi; pH, ısı, nem, ortam O₂ derişimi, enzimi immobilize etmede kullanılan polimerin kimyasal ve fiziksel karakteri gibi parametrelerden de etkilenmektedir.

Yüksek duyarlılık : Hazırlanan elektroda immobilize edilmiş olan enzim; sadece belirli maddelere (substratlara) karşı duyarlı olmalıdır. Duyarlılık, akım-derişim eğrisinin eğimi ile orantılıdır. Eğim değeri büyüdükçe duyarlılıkta da artış gözlenir. Kullanılan enzimin substratları dşında biyosensörlerin girişim yapan maddelerden etkilenmemesi istenir

Yeterli düzeyde tayin sınırı : Tasarlanan biyosensörün ideal tanımına uyması için tayin sınırının belirli bir derişim değerin altında olması gerekmektedir. Belirtilen bu tayin sınırı elektrot yüzeyinin büyüklüğü, enzimin tayin edilecek maddeye karşı olan afinitesi, immobilize edilen enzim miktarı, enzimin immobilizasyonunda kullanılan polimer tabakasının kalınlığı gibi faktörlerden etkilenir

Geniş ölçüm aralığı : Ölçüm aralığı denen bölge, biyosensörden alınan akım-derişim eğrilerinin lineer olduğu derişim aralığıdır. Tüm biyosensör uygulamalarında çalışma ortamında belirli bir derişim değeri ulaşıldıktan sonra akım-derişim eğrilerinde

lineerlikten sapma gözlenmeye başlar. Bu durum enzimatik eğrilerin en önemli ve de karakteristik özelliğidir. Lineerlikten sapmanın nedeni yanıt olarak okunan akım değerlerindeki değişimin azalmasından kaynaklanır. Bunun nedeniyse ortamda artan analizlenecek madde miktarının fazlasıyla reaksiyona girecek enzim olmamasıdır.

Hızlı cevap zamanı : Amperometrik uygulamalarda analizlenecek bir madde örneğini çalışma ortamına enjekte etmeden önce elektrot yüzeyinde oluşan akımın sabit kalması istenir. Akım sabit kaldıktan sonra analizlenecek madde ortama enjekte edilir ve akımdaki değişim kaydedilir. İkinci bir enjeksiyondan önce akım değerinin yine sabit kalması beklenir. İlk enjeksiyondan sonra akımın tekrar sabit kalmasına kadar geçen zamana „cevap zamanı“ denir. Cevap zamanının kısa ya da hızlı olması ideal sensörlerin özelliklerindendir.

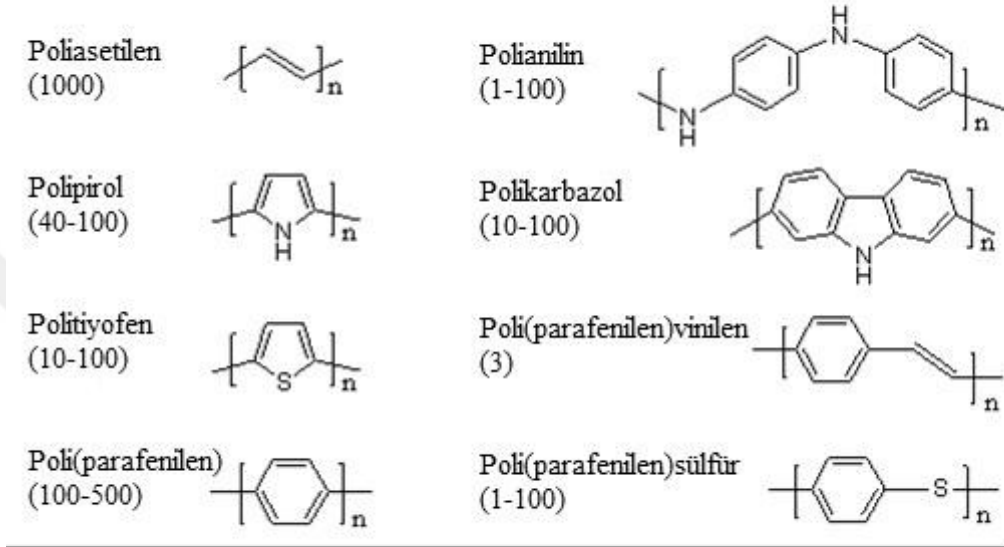
Basitlik ve ucuzluk : Kullanımı, tasarımı basit ve ucuz biyosensörler hazırlamak biyosensör yapımında her zaman hedef alınmış bir düşüncedir. Biyosensör yapılarının basitleştirilmesine en iyi örnek ikinci kuşak biyosensörlerin yapılarında bulunan mediyatörlerin daha gelişmiş modeller olan üçüncü kuşak biyosensörlerde ortadan kaldırılmasıdır.

Biyosensörler tıp, gıda, eczacılık, çevre kirliliği, savunma ve birçok endüstriyel aktivitede özellikle otomasyon, kalite kontrolü, durum tespit ve enerji saklanması çok önemli rol oynarlar. Bugüne kadar 180’den fazla farklı madde için biyosensör hazırlanmış olup bunlardan ancak 25 kadarı ticari olarak üretilmektedir. Biyosensörler; gıda maddeleri, metabolitler, vitaminler, antibiyotikler ve ilaçlar gibi organik maddeler ile enzim, virüs ve mikroorganizmaların tayininde kullanılırlar. Bunların dışında BOD, toksisite ve mutajenite testlerinde de başarı ile uygulanmaktadırlar.

Enzim esaslı amperometrik biyosensörün spesifik özellikleri; yüksek oranda immobilize edilen enzimin aktif merkezi ile uygun bir çalışma potansiyelinin uygulandığı bir elektrot yüzeyi arasındaki elektron transfer sürecinin kinetiğine bağlıdır. Yüksek duyarlılık (hassasiyet) ve hızlı cevap özelliklerine sahip bir amperometrik enzim elektrot geliştirmenin temel ön koşulu; biyobileşenden elektroda hızlı bir elektron transferini mümkün kılmaktır (Bal, 2012). Elektron transferini sağlamak amacıyla da iletken polimerlerin kullanımı oldukça yaygındır.

İletken polimerler biyolojik materyallerin immobilizasyonu için uygun kompozitlerdir. Bu malzemelerin redoks özelliklerinden dolayı son yıllarda kullanımı

oldukça yaygınlaşmıştır. Enzim, elektrolit çözeltiye eklenerek elektropolimerleşme ile polimer matriks içerisine hapsedileceği gibi (Can, 2010), sentezlenmiş polimer filme fiziksel ya da kimyasal olarak bağlanarak da immobilize edilebilir (Yağız, 2015, Bayram, 2015).



Şekil.1.2.Yaygın olarak kullanılan bazı iletken polimerler

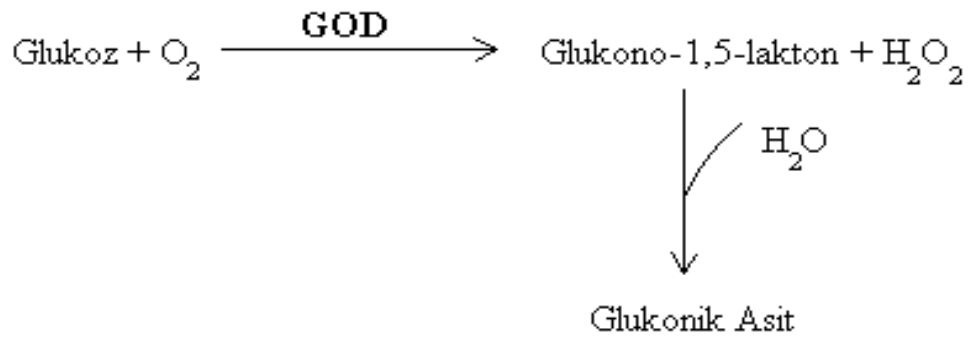
Çevresel kararlılığı, kolay sentezlenmesi ve yüksek iletkenliğinden dolayı ticari uygulamalarda iletken polimerler içerisinde en fazla tercih edileni Polipirol (PPy) dur. PPy ilk kez 1916 yılında kimyasal polimerizasyonla sentezlenmiş ve pirol siyahı olarak adlandırılmıştır. PPy, pirol ya da süstitüe pirol monomerlerinin yükseltgenmesi ile elde edilmektedir. Yükseltgenme genellikle ya kimyasal bir yükseltgen varlığında çözelti içerisinde kimyasal polimerizasyon ile ya da dışarıdan gerilim uygulanarak iletken elektrot yüzeyinde elektropolimerizasyon yöntemi ile gerçekleştirilmektedir.

Elektrokimyasal dönüştürücü temeline dayanan amperometri genel anlamda belli bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümünü esas alır. Söz konusu akım yoğunluğu çalışma elektrotunda yükseltgenen ya da indirgenen elektroaktif türlerin derişiminin bir fonksiyonu olarak tanımlanır. İkinci elektrot referans elektrot olarak iş görür. Kalibrasyon işlemi ile akım yoğunluklarından ilgili türlerin derişimleri belirlenir.

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

Biyosensörler farklı özellikteki iki elemanın (çevirici ve biyoalgılayıcı) kombinasyonu ile oluşurlar. Uygun biyoalgılayıcı ve dönüştürücü seçildikten sonra bunların birbirine bağlanması aşılması gereken en önemli sorundur. Bu bağlama işlemi biyoalgılayıcının immobilizasyonu olarak tanımlanır. Biyoaktif bileşen ile iletici unsurun birleştirilmesinde oldukça farklı immobilizasyon yöntemlerinden yararlanılabilir Hangi yöntemin kullanılacağı seçilen dönüştürücü ve biyoalgılayıcıya göre belirlenir. İmmobilizasyon biyoalgılayıcın stabilizasyonu ve tekrar kullanımı açısından büyük avantaj sağlar. Biyoaktif bileşen sensör olarak da adlandırabileceğimiz temel iletici unsur üzerinde fiziksel olarak jel içinde veya polimer matrikste tutuklanabilir, elektrot yüzeyinde biriktirilebilir, kovalent veya çapraz bağlanarak immobilize edilebilir.

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



Yüzeyinde GOD immobilize edilmiş elektrot glukoz çözeltisine daldırıldığında glukoz derişimi ile orantılı miktarda H_2O_2 meydana gelir. Enzimatik aktivite ile oluşan H_2O_2

sabit potansiyelde moleküler oksijene yükseltgendiğinde açığa çıkan akım yoğunluğunun ölçümü amperometrik biyosensörün temelini oluşturmaktadır.

Bu çalışmanın amacı Pt elektrot üzerinde pirol ve N-metilpirolün homo ve kopolimer filmleri oluşturarak yüzeye GOD immobilize etmek glukozla duyarlı amperometrik biyosensör oluşturmaktadır. Gerek polimer film sentezi ve immobilizasyon koşulları ve gerekse çalışma koşulları hem GOD aktivitesini, hem de elektron transfer hızını etkileyeceğinden glukoz derişimine bağı akım değerleri değışiklik gösterecektir. Bu çalışmada glukoz derişimine bağı akım değerlerini etkileyecek parametrelerin optimizasyonu ve enzim elektrodun modifiye edilerek elma suyu, gazoz, bal ve üzüm suyu gibi içeceklerde glukoz tayininde kullanımı hedeflenmektedir.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Rodriguez ve ark. (2000), Bakır ile kapladıkları camı karbon elektroda GOx immobilize ederek amperometrik glukoz biyosensörü oluşturmuşlardır. Elektrokimyasal olarak kaplanan bakırın, hızlı ve hassas bir glukoz ölçümü için enzimatik reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksitin serbest kalması yönünde etkin bir elektrokatalitik aktivite sağladığını belirtmişlerdir. Bu özelliğinden dolayı, glukozu karşı yüksek hassasiyet gösterip, hızlı tespit yaptığını da bildirmişlerdir. Biyosensör cevabında etkili olan pH, potansiyel, zaman, bakır tuzu ve enzim derişimi gibi faktörleri, hidrojen peroksit ve glukozdan kaynaklanan amperometrik sinyaller aracılığıyla araştırmışlar. - 0,05 V potansiyel akımda kaplanan bakırın gözenekli yapısı sayesinde ürik ve askorbik asit gibi kolayca okside olan bileşiklere karşı ilgi gösterdiği sonucuna varmışlardır. Doğrusal cevabı 2×10^{-2} M glukoz derişiminde bulmuşlardır. Algılama sınırını $1,2 \times 10^{-3}$ M olarak tespit etmişlerdir.

R. Garjonyte ve A. Malinauskas (2000), Glukoz oksidazı, prusya mavisi modifiye edilmiş platin yüzeyine kaplanmış polipirol ve poli(o-fenilendiamin) tabakalarına immobilize etmişlerdir. Oluşan biyosensör enzim reaksiyonu sonucunda oluşan hidrojen peroksit miktarını amperometrik yöntemle tanımlayarak glukoz miktarına ulaşmışlardır ve biyosensörün anodik 0,60 V ve katodik 0,00 V veya 0,20 V potansiyellerde çalıştığını gözlemlemişlerdir. Poli(o-fenilendiamin) ortamında, askorbat veya asetaminofen gibi bileşenlerin etkisinin şiddetlice düştüğünü bulmuşlardır.

H. Xue ve ark. (2000), İletken polianilin-poliizopren (PANI-PIP) kompozit filmine GOD'ı immobilize ederek H₂O₂ seçici geçirgen bir biyosensör tasarlamışlardır. Platin elektrot önce PIP ile kaplandıktan sonra, 1 M HCl içinde, 0,02 M anilin içeren çözeltiye daldırılarak 0,65 V sabit potansiyel altında elektrokimyasal olarak PANI sentezlemişlerdir. PANI-PIP filmi ile kaplı olan Pt elektrodu pH 4,5 olan 0,1M fosfat tamponuna daldırıp -0,5 V potansiyel altında film bünyesinde bulunan Cl⁻ iyonlarını mümkün olduğunca uzaklaştırdıktan sonra içinde GOD bulunan pH 6,52 olan fosfat tamponuna daldırılmış ve bu ortamda 0,65 V potansiyel fark uygulanarak (-) yüklü olan GOD'ı (pI değeri 4,2) PANI-PIP filminin içine immobilize etmişlerdir. Enzim sistemini glukoz çözeltisine daldırarak oluşan H₂O₂'nin elektrokimyasal oksidasyonu sırasında açığa çıkan akımı ölçmüşlerdir. Film bileşimi ile biyosensörün hassaslığını, H₂O₂

geçirgenliğini ve interferens özellik gösteren askorbik asidin etkisini inceleyerek biyosensörü karakterize etmişlerdir.

A.L. Sharma ve ark. (2003), poli(2-floroanilin) ITO kaplı cam plakalara 4 M per klorik asit elektrolit ortamında elektrokimyasal olarak kaplamışlardır. Bu polimerik filmler FT-IR ve UV-Vis spektrofotometreleri ile karakterize edilmiştir. Polimer filmin oda sıcaklığındaki elektrik iletkenliğinin polianilin filmden daha düşük olduğunu bulmuşlardır. SEM analizleri polimer filmin yüzey morfolojisinin sivri olmayan iğne şeklinde olduğunu ortaya koymuştur. GOD polimer film yüzeyine fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle immobilize edilmiştir. Poli(2-floroanilin) ve poli(2-floroanilin)/GOD filmlerinin redoks karakterizasyonları siklik voltammometrik tekniği ile belirlenmiştir. Glukozun amperometrik ölçümü 0,2 V potansiyel altında (Ag/AgCl) referans elektroduna karşı ölçülmüş ve enzim elektrodunun 32 gün boyunca kararlı olduğunu bulmuşlardır.

Ali Eftekhari (2004), Demir yüzeyinde oluşturulan polianilin bir enzim modifiye edilmiş elektrotun hazırlanmak için kaplamıştır. Bunun için anilinin elektrokimyasal polimerizasyonunu pasifleştirilmiş demir yüzeyinde gerçekleştirmiştir. Demir yüzeyinde pasif bir tabakanın bulunmasının elektroaktif film oluşumu üzerine önemli etkisinin olduğunu belirtmiştir. Elektropolimerizasyon prosesi üzerine pasif bileşenin etkilerini incelemek için chronopotentiometric ölçümleri kullanmıştır. Enzim elektrot, demir yüzeyine kaplanmış polianilin yüzeyine glikoz oksidazın immobilize edilmesi ile oluşturmuştur. Demir yüzeyinde pasif bir tabaka bulunması ve bulunmaması halinde enzim elektrot oluşturmuş ve onları karşılaştırmış, pasif tabaka olması durumunda oluşturulan enzim elektrotun daha kararlı olduğunu tespit etmiştir.

Ramanavičius ve ark. (2006), Yaptıkları çalışmada pirolün elektrokimyasal polimerizasyonu sırasında, biyolojik olarak aktif moleküllerin immobilizasyonunu da gerçekleştirmişlerdir. Bazı olmaması gereken elektrokimyasal etkileşimlerin önlenmesi ve bazı redoks enzimlerde elektron transferini kolaylaştırması açısından polimerin özelliklerini tartışmışlardır. İmmunosensörler ve DNA sensörlerinde polipirol uygulamalarının son gelişmelerini sunmuşlardır. İlgili ajanlar tarafından katkılı elektrokimyasal olarak üretilen PPy ve yarı iletken özelliklerinin, değişikliklere dayalı bazı yeni hedef DNA ve hedef protein algılama yöntemlerini tanıtmışlardır.

Can (2010), Yaptığı çalışmada yüzey alanı 0,18 cm² olan platin levha üzerine dönüşümlü voltametri tekniği ile para toluen sülfonik asit (pTSA) ve sodyum para toluen sülfonat ortamında (NapTS) polipirrol (PPy) sentezlemiş ve sentez ortamındaki glukoz oksidaz (GOD) enziminin aynı zamanlı olarak immobilize edilmesi ile glukoz biyosensörü tasarlamıştır. Elektrotları farklı glukoz derişimlerinde dönüşümlü voltametri ve doğrusal taramalı voltametri teknikleri ile karakterize etmiştir. Glukoz derişimine bağı olarak (0,05-30 mM) gözlediğı akım değerlerinde her iki elektrot için 1mM glukoz derişimine kadar doğrusal bir artış gözlemlemiş, ancak daha yüksek glukoz derişimlerinde akım değerlerindeki artışın azaldığını görmüştür. Glukoz biyosensörünün depolama kararlılığını sulu tampon ortamında bekleterek ayrı ayrı ölçmüş ve Pt/PPy-GODNapTS elektrodunun depolama kararlılığının daha yüksek olduğunu gözlemlemiştir. Ayrıca tasarladığı biyosensörler ile malt ieeğı, gazoz, şarap, bal ve üzüm suyu olmak üzere 5 sıvıda glukoz tayini yapmış ve Pt/PPy-GODNapTS elektrodunun Pt/PPy-GODpTSA elektroda göre daha doğru sonuçlar verdiğini gözlemlemiştir.

Kotanen ve ark. (2012), Pt elektrot üzerinde PPy varlığından dolayı elektropolimerizasyonun gerçekleşeceği, glukoz oksidaz üstüne hidrojel kaplı amperometrik glukoz biyosensörü tasarlamışlardır. Pt elektrotları, elektrokatalitik aktivasyon ve kimyasal modifikasyonla 3-aminopropil-trimetil-oksilan ile birlikte polietilen glolikol N-hidroksisüksinamid, poliHEMA temelli hidrojel çözeltisine daldırılarak çapraz bağlamışlardır. PPy'nin polimerizasyonu glukoz oksidaz kaynaklı glukozu duyarlı bir dönüştürücü olarak kendini göstermiştir. Elektropolimerik yük yoğunluğuna bağı biyo çevirici hassasiyeti ve enzim aktivasyonunu maksimum olarak 1 Mc/cm² ve Km değerini 33 olarak tespit etmişlerdir. 17 gün sonunda askorbik asitle yapılan depolama kararlılığında periyodik artış gözlemlemiştir. Bu yöntemin biyosensör, biyoelektronik ve biyonik cihazlarda, hassas kantitatif metal ya da yarı iletken biyo arayüzlerinde enzimin katalitik biyoaktivitesini ölçmek için kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Bal (2012), Glukoz tayini için amperometrik enzim elektrodu geliştirmiştir. Glukoz oksidazı pirolün paratoluensülfonatlı ortamda elektropolimerleşmesiyle hazırlanan polipirrol-paratoluensülfonat film üzerine glutaraldehitte çapraz bağlama yöntemiyle immobilize etmiştir. Bu amaçla önce polipirrol-paratoluensülfonat filminin

en uygun çalışma şartlarını belirlemiştir. Glukoz tayinini, hazırlanan enzim elektrodun yüzeyinde gerçekleşen enzimatik tepkime sonucu oluşan hidrojen peroksitin 0,30 V' da yükseltgenmesine dayanarak yapmıştır. Glukoz enzim elektrodunun cevabına pH' nın ve sıcaklığın etkisini incelemiştir. İmmobilize edilen glukoz oksidazın Km ve Vmax değerlerini hesaplamıştır. Enzim elektrodun tekrar kullanılabilirliği ve raf ömrünü tayin etmiştir. Hazırladığı enzim elektrotla biyolojik sıvıda (kan) glukoz tayini yapmıştır. Biyolojik ortamlarda olabilecek girişimlerin enzim elektrot cevabı üzerine etkilerini incelemiştir.

Wang ve ark. (2012), kitosan (CS)- glukoz oksidaz (GOD) film ve gümüş nanoteller (AgNWs) üzerine bir amperometrik glukoz biyosensör üretmişlerdir. Üretim süreci taramalı elektron mikroskobu tarafından karakterize edilmiş ve biyosensörün elektrokimyasal davranışları dönüşümlü voltametri (CV) ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ile karakterize etmişlerdir. Glukoz biyosensör yüksek duyarlılık, hızlı cevap ve iyi stabilite göstermiştir.

Karpuz (2013), Ürik asit tayini için yeni bir amperometrik biyosensör geliştirmiştir. Bu amaçla pirol elektropolimerleşirken paratoluensülfonat da elektrot yüzeyine taşınmıştır. Aynı zamanda yüzeye taşınan enzimi immobilize ederek, platin/polipirol-paratoluensülfonat-enzim biyosensörü hazırlamıştır. Ürik asit tayinini, enzim elektrodun yüzeyindeki enzimatik reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksitin +0,30 V'da yükseltgenmesine dayanarak yapmıştır. Ürik asit biyosensörünün cevap akımına pH'nın, sıcaklığın ve substrat derişiminin etkisini incelemiştir. İmmobilize enzimin Km ve Vmaks değerlerini hesaplamıştır. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliği ve raf ömrünü tayin etmiştir. Hazırladığı biyosensörle kanda ürik asit tayini yapmıştır. Biyolojik ortamlarda olabilecek girişimlerin biyosensörün cevap akımı üzerine etkilerini incelemiştir.

Özyurt (2014), Glukoz tayini için yeni bir amperometrik enzim elektrot geliştirmiştir. Bu amaçla, platin levha üzerinde pirolün poli (sodyum-4-stirensülfonat) lı ortamda elektropolimerlesmesi ile polipirol-poli (sodyum-4-stirensülfonat) filmi hazırlamıştır. Polipirol-poli(sodyum-4-stirensülfonat) filminin en iyi çalışma şartlarını belirlemiştir. Glukoz oksidaz enzimini, polipirol-poli(sodyum-4-stirensülfonat) filmi içine hapsedme yöntemiyle immobilize etmiştir. Glukoz tayinini, hazırlanan enzim elektrodun yüzeyinde gerçekleşen enzimatik tepkime sonucu oluşan hidrojen peroksitin

+0,40V'da yükseltgenmesine dayanarak yapmıştır. Enzim elektrodun glukoz tayini için çalışma aralığını tayin etmiştir. Glukoz enzim elektrodunun cevabına pH'nın ve sıcaklığın etkisini araştırmıştır. Enzim elektrodun tekrar kullanılabilirliği ve raf ömrünü tayin etmiştir. Biyolojik ortamlarda olabilecek girişimlerin enzim elektrot cevabı üzerine etkilerini incelemiştir. Hazırlanan enzim elektrotla biyolojik sıvıda (kan) glukoz tayini yapmıştır.

Dervisevic ve ark. (2015), yeni glukoz biyosensör kalem grafit elektrot kaplı poli (glisidil metakrilat-ko-vinilferosen) (poli(GMA-co-VFc)) üzerine glukoz oksidaz (GOx) immobilizasyonu ile üretilmiştir. Glukoza poli(GMA-co-VFc)-GOx'in amperometrik akım değeri 2,7 μ M'ın algılama sınırıyla 1 ve 16 mM (0,9998 korrelasyon katsayısı) arasındaki konsantrasyon aralığında doğrusal olduğunu belirlemiştir. Deneysel parametreler detaylı çalışılmış ve biyosensörün analitik performansını yöneten, sıcaklık ve pH dahil optimizasyonu yapmışlardır. Kinetik parametreler ve biyosensörün stabilitesini ayrıca çalışmışlardır.

Yağız (2015), Yaptığı çalışmada karbon pasta elektrot (CPE) yüzeyine dönüşümlü voltametri tekniği ile polianilin (PANI), poli(o-anisidin) (POA) ve poli(anilin-ko-o-anisidin) (PANI-co-POA) sentezlemiş ve sonrasında elektrot üzerine glukoz oksidaz (GOD) enziminin immobilizasyonu ile amperometrik biyosensör tasarımı gerçekleştirmiştir. Glukoz varlığında ölçülecek akım değeri biyosensörün hazırlanması ve çalışma koşullarından etkileneceğinden, deneysel parametreleri yanıt yüzey yöntemi (YYY) ile optimize etmiştir. Bunun için State Ease Design Expert 8.0.7.1. (Seri No 0021-6578) bilgisayar programı kullanmıştır. CPE'yi, karbon pasta içerisine MWCNT, iyonik sıvı veya organik bileşik ilavesi ile modifiye etmiş, en yüksek akım değerini 1(2-ciyanometil)pirol ile hazırlanan elektrotların gösterdiğini bildirmiştir. Elde ettiği veriler ışığında, Design Expert programının çalışılan parametreler cinsinden akım değerinin tahminlenmesinde çoğunlukla kuadratik modeli önerdiği sonucuna varmıştır. Çalışmada deneysel olarak ölçülen akım değerleri ile model tarafından tahminlenen değerlerin birbirine oldukça yakın olduğunu ve model uygunluğunun ANOVA testi ile desteklendiği sonucuna varmıştır. Optimal koşullarda oluşturduğu polimer kaplı elektrotların yüzeylerine GOD+invertaz ve GOD+galaktozidaz enzimlerinin koimmobilizasyonu ile sırasıyla sükröz ve laktoz biyosensörler oluşturmuştur. CPE esaslı biyosensörlerin glukoz, sükröz ve laktoza

duyarlı olduklarını CV ve impedans analizleri ile göstermiştir. Ayrıca, kinetik parametreler açısından PANI, tekrar kullanım ve depolama kararlılıkları bakımından PANI-co-POA esaslı biyosensörlerin kullanımının daha uygun olduğu sonucuna ulaşmıştır.

Bayram (2015), glukoz tayini için yeni bir amperometrik biyosensör geliştirilmiştir. Pt elektrot yüzeyinde sodyum okzalat (NaOx) ortamında dönüşümlü voltametri tekniğiyle poli-o-anisidin ve poli-o-toluidin sentezi gerçekleştirip bu polimer kaplı elektrotları glukoz oksidaz enzimi (GOD) ve ZnFe₂O₄ nanopartikülü içeren kitosan çözeltisine daldırarak yüzeyde GOD içeren ince bir film tabakası oluşturmuş ve son olarak elektrotları glutaraldehit (GAL) çözeltisi ile etkileştirerek çapraz bağlanmalarla enzimin yüzeye immobilizasyonunu sağlamıştır. Segment sayısı, tarama hızı, monomer derişimi, kitosan derişimi, glutaraldehit derişimi, enzim derişimi ve nanopartikül derişimi optimize ederek en uygun elektrot tasarım parametrelerini belirlemiştir. Elektrotları yüzey yapısı ve biyokimyasal özellikleri açısından karakterize etmiştir. ZnFe₂O₄ nanopartikül içeren elektrotların glukoz varlığında ölçülen akım değerlerinin nanopartikülsüz elektrotlara göre daha yüksek olduğunu gözlemleyip ZnFe₂O₄ nanopartikülünün elektron transferini hızlandırarak akım değerlerini arttırdığı sonucuna ulaşmıştır. Pt/POA/Chi+GOD/GAL, Pt/POA/Chi+GOD+ZnFe₂O₄/GAL, Pt/POT/Chi+GOD/GAL ve Pt/POT/Chi+GOD+ZnFe₂O₄/GAL elektrotların akım değerlerini 1 mM glukoz derişimine kadar doğrusal olarak arttığını gözlemlemiştir. Linewear-Burk eğrisinden K_M değerleri ve I_{max} değerleri hesaplanmıştır. En yüksek I_{max} değeri 11,947µA olup bu değeri POA kaplı, ZnFe₂O₄ nanopartikül içeren elektrot için elde etmiştir.

Ağçam (2016), Bu çalışmada, yüzey alanı 0.09 cm² olan platin levha üzerine dönüşümlü voltametri tekniği ile sodyum okzalat ortamında (NaOx) pirol (Py), poli-N-metil pirolün (PNMP) homo ve kopolimer filmleri sentezlemiş, kitosan ortamında bulunan glukozoksidaz (GOD) enziminin immobilize edilmesi ile glukoz biyosensörü tasarlamıştır. Glukoz varlığında ölçülecek akım değerini, deneysel parametreleri yanıt yüzey yöntemi (YYY) ile optimize etmiştir. Elektrotları farklı glukoz derişimlerinde dönüşümlü voltametri ve doğrusal taramalı voltametri teknikleri ile karakterize etmiştir. Elde ettiği Pt/PPy-GOD-Chi/GAL, Pt/NMP-GOD-Chi/GAL ve Pt/PPy-co-PNMP-GOD-Chi/GAL enzim elektrotları için optimum potansiyel değerlerini 0.8 V; optimum

pH değerlerini 6 olarak bulmuştur. Glukoz derişimine bağlı olarak (0.5-3 mM) gözlenen akım değerlerinde her elektrot için 3mM glukoz derişimine kadar doğrusal bir artışın olduğunu daha yüksek glukoz derişimlerinde akım değerlerinde artışın azaldığını gözlemlemiştir. Lineweaver-Burk eğrisinden Pt/PPy-GOD-Chi/GAL, Pt/NMP-GOD-Chi/GAL ve Pt(PPy-co-NMP)-GOD-Chi/GAL için K_M değerlerini sırasıyla; 30.5, 17.82 ve 31.72 mM, I_{max} değerlerini ise 909.1, 588.23 ve 714.28 μA olarak hesaplamıştır.



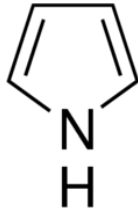
3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

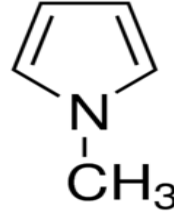
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada kullanılan pirol (Merck), N-metil pirol (Merck), sodyum okzalat (Fluka), kitosan (Aldrich), Aspergillus niger kaynaklı glukoz oksidaz enzimi (Sigma), glutaraldehit (Sigma), demir çinko oksit (Aldrich), glukoz (Aldrich), fosforik asit (Sigma), hidroklorik asit (Merck) firmalarından tedarik edilmiştir. Kullanılan diğer bütün kimyasal maddeler analitik saflıktadır. Pirol ve N-metil pirol monomerleri polimer sentezinden önce distillenerek kullanılmıştır.

Polimer sentezinde kullanılan monomerlerin kimyasal formülleri aşağıda verilmiştir:



Pirol



N-metil pirol

3.1.2. Elektrokimyasal Ölçümlerde Kullanılan Elektrotlar

Çalışma Elektrotları: Yüzey alanı 0.09 cm² olan platin levha kullanılmıştır.

Karşı Elektrot: 0.09 cm² yüzey alanına sahip platin levha kullanılmıştır.

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

3.1.3. Kullanılan Araç ve Gereçler

Elektrokimyasal Analiz Cihazı: Polimer filmlerin sentezi ve konoamperometrik ölçümler için CHI 606 C cihazı kullanılmıştır.

Analitik Terazı: Hassas tartım yapmak amacıyla RADWAG marka terazı kullanılmıştır.

Çözünürlüğü Yüksek Digital Fotoğraf makinesi: Biyosensör elektrotların fotoğraflarının çekilmesinde Canon Ultrasonik EF 100 mm kullanılmıştır.

Taramalı elektron mikroskopu: Biyosensör oluşumunda elde edilen filmlerin yapı morfolojileri için Jeol JSM-5500 marka SEM cihazı kullanılmıştır.

Fourier Transform Infrared (FTIR) spektroskopisi: Enzimli ve enzimsiz polimer filmlerin yapısal özelliklerinin belirlenmesi için Perkin Elmer marka FTIR cihazı kullanılmıştır.

pH metre: Çözeltilerin pH'ının belirlenmesinde Hanna marka pH metre kullanılmıştır.

Saf Su Cihazı: Saf su eldesinde New Human Power I Scholar-UV marka saf su cihazı kullanılmıştır.

Vortex: GOD çözeltisinin homojenizasyonunda IsoLab Dragon marka vortex cihazı kullanılmıştır.

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

3.2. Yöntem

3.2.1. Elektrotların Hazırlanması ve Temizlenmesi

30 cm uzunluğundaki bakır tel, platin tel ile kaynak yapılmıştır. 0,09 cm² yüzey alanına sahip platin levha ile platin tel birbirine ısıtılma altında tutturulmuştur. Bakır telin bir ucu ve platin levha dışarıda kalacak şekilde bakır telin etrafı polister ile kaplanmıştır. Hazırlanan platin levha elektrotlar önce bek alevinde akkor haline gelene kadar ısıtılmış, ardından sıcak kromik asite daldırılmıştır. Platin yüzey alanı çeşme suyu ve ardından saf su ile yıkanarak hazır hale gelmiştir. Her çalışmadan sonra platin elektrotların yüzeyi bek alevinde yakıldıktan sonra sırasıyla aseton, etanol, hidroklorik asit, nitrik asitte bekletilmış ve ardından saf suyla yıkanmıştır.

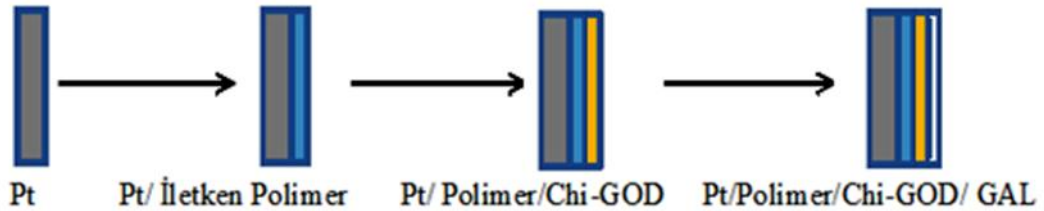
3.2.2. Glukoz Biyosensörü Hazırlama Parametrelerinin Optimizasyonu

Monomerler sentezden önce damıtılmış ve buzdolabında muhafaza edilmiştir. Temizlenen elektrotların yüzeyine homopolimer filmlerin sentezi monomer içeren sodyum okzalot (NaOx) ortamında taze olarak oda sıcaklığında hazırlanmıştır. Polimer film sentezleri oda sıcaklığında dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak tek hücrede üç elektrot sistemi ile gerçekleştirilmiştir.

Polimer filmler için yapılan ön denemelerde, poli(piröl) (PPy) sentezi, 0,15 M NaOx ortamında -0,5 – 1,8 V potansiyel aralığında 50 mV/s tarama hızı ile 26 segment, poli(N metil piröl) (PNMP) sentezi ise 0,15 M NaOx ortamında -0,5– 1,5 V potansiyel aralığında 50mV/s tarama hızı ile 20 segment uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

Polimer film ile kaplanan platin elektrotlar saf su ile yıkanmış ve yarım saat kurumaya bırakılmıştır. Sonrasında GOD içeren kitosan çözeltisine 15 saniye daldırılmıştır. Elektrotlar 1 saat kurutulduktan sonra son olarak glutaraldehit (GAL) çözeltisine 5 saniye daldırılmıştır. Aşırı GAL'in uzaklaştırılması için tamponda 10 s tutulan elektrotlar kullanılmadan önce 4 °C'de 20 saat bekletilmiştir.

Hazırlanan elektrotlar kronoamperometrik yöntemle 0,60 V potansiyel fark uygulanarak, fosfat tamponunda hazırlanmış 0,2-3,0 mM aralığında glukoz çözeltilerinde 120 saniyelik ölçümler alınmıştır.



Şekil 3.1. Oluşturulan enzim elektrodun şematik gösterimi

3.2.3. Glukoz Biyosensörün Tasarım Parametrelerinin Optimizasyonu

3.2.3.1. Monomer Derişiminin Optimizasyonu

PPy sentezi için 10-125 mM arasında piröl; PNMP için ise 25-200 mM arasındaki N-metilpiröl derişimlerinde optimum monomer derişimi belirlenmiştir.

Kopolimer için toplam 50 mM olacak şekilde (1:9),(5:5),(9:1) oranları kullanılarak optimum derişim belirlenmiştir.

3.2.3.2. Tarama Hızının Belirlenmesi

Pt elektrot yüzeyine dönüşümlü voltametri tekniğiyle PPy, PNMP ve kopolimer sentezi için uygulanacak tarama hızının optimizasyonu yapılmıştır. Monomer derişimi, uygulanan potansiyel aralık sabit tutularak PPy, PNMP ve kopolimer sentezi için 20-50-100 mV/s tarama hızı uygulanarak, Pt elektrot yüzeyi polimerle kaplanmıştır. Bu elektrotlarla oluşturulan biyosensörlerin glukoza bağlı akım değerleri kronoamperometrik olarak belirlenmiş ve en uygun tarama hızı seçilmiştir.

3.2.3.3. Kitosan Derişiminin Optimizasyonu

Pirol, N metil pirol veya kopolimer kaplı elektrotların % 0,25 - 1,0 arasında kitosan derişimleri kullanılarak optimum kitosan derişimi belirlenmiştir.

3.2.3.4. Enzim Derişiminin Optimizasyonu

Pirol, N-metilpirol veya kopolimer için 1-4 mg/ml arasında enzim derişimleri kullanılarak optimum enzim derişimi belirlenmiştir.

3.2.3.5. Glutaraldehit (GAL) Derişiminin Optimizasyonu

Pirol, N metil pirol veya kopolimer kaplı elektrotların % 0,025 - 0,10 arasında GAL derişimleri kullanılarak optimum glutaraldehit derişimi belirlenmiştir.

3.2.4. Glukoz Biyosensörünün Karakterizasyonu

3.2.4.1. Glukoz Biyosensörlerin Yüzey Özelliklerinin Karakterizasyonu

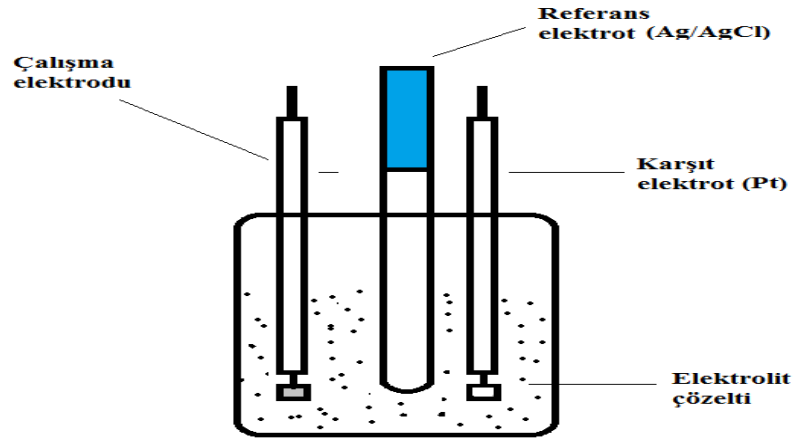
Pirol veya N metil pirol kaplı elektrotların (Pt/PPy/Ch₁+GOD/GAL ve Pt/PNMP/Ch₁+GOD/GAL) dijital fotoğraf makinesi ile fotoğrafları çekilmiş ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülenmiştir.

3.2.4.2. FTIR Analizi

Pt elektrot yüzeyinde kaplanan polimer tabakalar kazınarak FTIR analizi yapılmış; monomer spektrumları ile karşılaştırılarak polimer sentezinin gerçekleştiği yapısal olarak gösterilmiştir.

3.2.4.3. Kronoamperometrik Olarak Glukoz Derişimine Bağlı Akım Değerlerinin Ölçülmesi

Bu aşamada tek hücreli üç elektrot tekniği (Şekil 3.2) ile glukozu karşı elektrodun akım cevabı kronoamperometrik olarak sabit potansiyelde ölçülmüştür.



Şekil 3.2. Çalışmalarda kullanılan tek hücreli üç elektrot sisteminin şematik gösterimi

Çalışma elektrodu olarak iletken polimer ve GOD içeren kitosan ile modifiye edilmiş yüzey alanı 0,09 cm² olan Pt elektrot (enzim elektrot), karşı elektrot olarak yüzey alanı 0,09 cm² olan Pt elektrot; referans elektrot olarak da Ag/AgCl (3M, KCl) elektrot kullanılmıştır.

Glukoza bağlı akım cevabı ölçülürken, önce glukoz içermeyen tampon çözeltinin akım değeri ölçülmüş; sonrasında bu çözeltiye glukoz derişimi istenen

değerde olacak şekilde stok glukoz çözeltisinden eklenip tekrar akım değeri ölçülmüş ve bu iki değer arasındaki fark net akım cevabı olarak belirlenmiştir. Akım değerleri sabit potansiyelde ve 120 s ölçüm süresi alınarak yani konoamperometrik metotla ölçülmüştür.

3.2.4.4. Glukoz Derişimine Bağlı Akım Cevabının Ve Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

Bu aşamada tek hücreli üçlü elektrot tekniği ile önce tampon çözelti içinde 120 s boyunca akım ölçüldükten sonra, içerisine stok glukoz çözeltisinden eklenerek yine 120 s boyunca akım değeri ölçülmüştür. Her ölçüm sonrasında glukoz derişimi artırılarak ölçüm tekrarlanmıştır. Glukoz derişimine (0,2-3,0 mM) bağlı akım değerleri kullanılarak Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiş I_{max} ve K_m değerleri hesaplanmıştır.

3.2.4.5. Biyosensörün tekrar kullanım kararlılığı

Bu aşamada optimal koşullarda elde edilen elektrotlar yine optimum pH ve potansiyelde kullanılarak ve ardışık olarak 20 kullanım sayısına bağlı olarak akım değerlerindeki değişim belirlenmiştir.

3.2.5. Hazırlanan enzim elektrotların metal oksit nanopartiküllerle optimizasyonu

PPy, PNMP ve PPy-co-PNMP ile elde edilen elektrotlardan en yüksek etkinlik gösteren polimer türü seçilerek metaloksit nanopartiküllerle modifiye edilmiştir. Metal oksit nanopartikül olarak ZnO, TiO₂ ve ZnTiO₃ nanopartikülleri ile modifiye edilmiştir. Bunun için kitosan çözeltisine 0,1, 0,5 ve 2,0% olacak şekilde metal oksit nanopartiküller eklenmiş ve ultrasonikatör ile homojen hale getirilen çözeltiye GOD eklenerek enzim elektrot tasarımında kullanılmıştır. Elde edilen elektrotlar glukoz derişimine bağlı akım değerleri karşılaştırılarak elektron iletimine en yüksek katkıda bulunan metal oksit nanopartikül seçilmiştir.

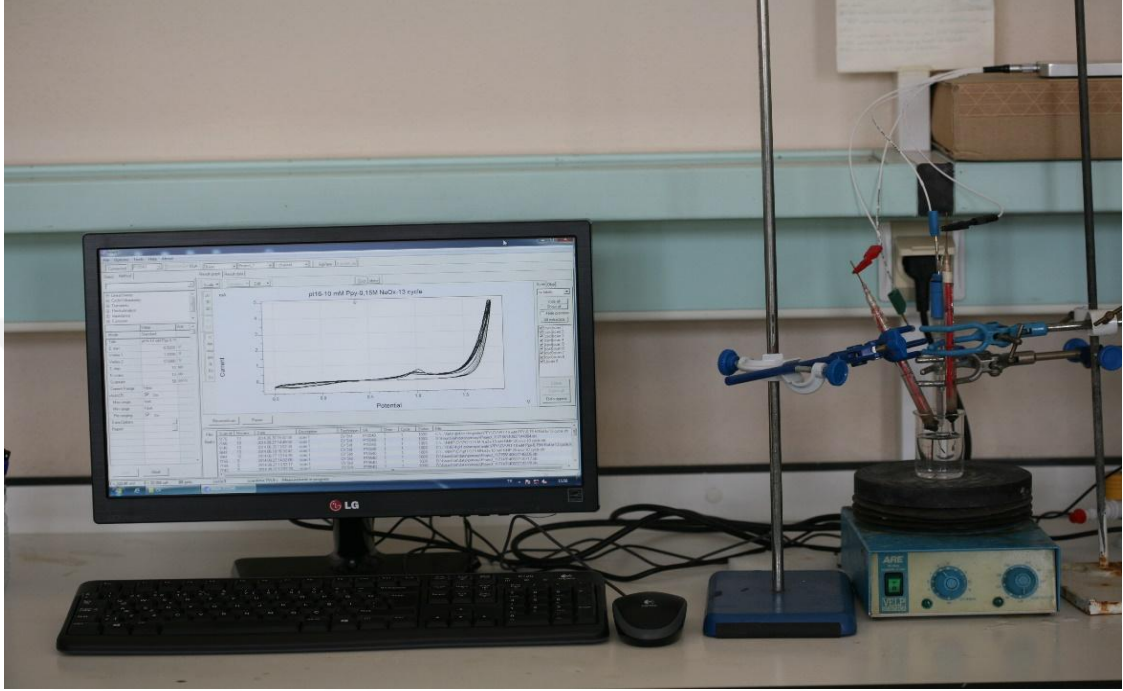
3.2.6. Biyosensörün gerçek örneklerde glukoz tayininde kullanımı

Çalışmanın bu aşamasında elma suyu, üzüm suyu, gazoz ve bal olmak üzere 4 farklı örnekte glukoz tayini yapılacaktır. Bunun için örneklerin glukoz derişimi hem ticari olarak satılan glukoz kitiyle spektrofotometrik olarak, hem de metaloksit nanopartikül ile modifiye edilmiş ve edilmemiş elektrotlarla elektrokimyasal olarak ölçülmüştür.

Metal oksit nanopartiküllerle modifiye edilmiş ve edilmemiş elektrotlar elma suyu, gazoz, bal ve üzüm suyu gibi sıvılarda bulunan glukoz derişimlerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Aynı örneklerin glukoz derişimleri glukoz oksidaz – peroksidaz enzim sistemi içeren ticari glukoz kiti ile de belirlenmiş, elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Biyosensör elektrotlarla piyasada bulunan ticari sıvı ve içeceklerdeki glukoz tayinini belirlemeden önce 0 - 1 mM glukoz çözeltileri kullanılarak standart glukoz eğrisi oluşturulmuştur. Benzer şekilde 0,0 – 7,5 mM glukoz çözeltileri ve glukoz kiti kullanılarak yine bir standart glukoz eğrisi oluşturulmuştur. Bu eğrinin oluşturulması için 13 deney tüpü alınmış ve pH 7 fosfat tamponunda hazırlanan 0,05; 0,10; 0,20; 0,30; 0,40; 0,50; 0,60; 0,80; 1,00; 1,50; 2,50; 5,00; 7,50 mM olan standart glukoz çözeltilerinden 0,05 ml 37 °C sıcaklığındaki su banyosunda sıcaklıkları dengelenene kadar bekletilmiştir. Ardından her tüpe 0,40 ml fosfat tamponu ve glukoz tayin kiti çözeltilisinden 0,50 ml eklenmiş, son hacim 3 ml olacak şekilde saf suyla tamamlanmıştır. Tüpler vortex cihazı ile karıştırılmış ve 37 °C sıcaklığındaki su banyosunda 20 dakika bekletilmiştir. Reaksiyon sonunda tüp içeriklerinin absorbans değerleri köre karşı 505 nm’de UV spektrofotometresinde okunarak absorbans değerleri derişime karşı grafiğe geçirilmiştir. Okumalarda tek kullanımlık küvetler kullanılmış ve her derişim üçer paralel olacak şekilde çalışılmıştır. Örnekler belli oranlarda seyreltilmiş ve glukoz içerikleri aynı yöntemle çizilmiş olan standart glukoz eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır (Can, 2010).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Platin elektrot üzerine iletken polimerler tek hücreli üçlü elektrot sisteminde dönüşümlü voltametri tekniği (CV) ile sentezlenmiştir (Şekil 4.1)



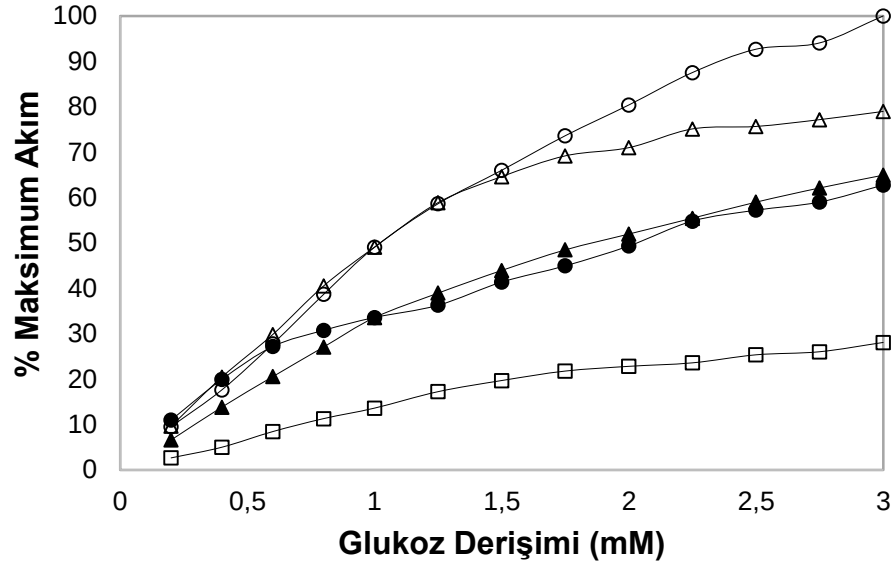
Şekil 4.1. Elektrokimyasal analiz cihazında CV ile polimer sentezinin yapıldığı tek hücreli üç elektrot sistemi

4.1. Polipirol (PPy) sentezi

Polipirol (PPy) sentezi monomer olarak farklı derişimlerde pirol (Py) içeren 0,15 M Na-Ox elektrolit çözelti kullanılarak CV yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Sentezde uygulanan potansiyel aralık için çok sayıda ön deneme çalışmaları yapılmış ve -0,5 ile +1,8V potansiyel aralığının en uygun olduğu belirlenmiştir.

Çalışmada öncelikle monomer derişim etkisi araştırılmıştır. Bunun için 0,15 M Na-Ox elektrolit derişiminde 50 mV/s tarama hızında Py monomer derişimi 10, 25, 50, 75 ve 100 mM olarak değiştirilerek platin elektrot üzerine PPy sentezlenmiş ve elde edilen elektrotlar 2 mg/ml GOD içeren % 0.5 kitosan çözeltisi ve sonrasında % 0,1 GAL çözeltisi ile muamele edilerek enzim elektrotlar hazırlanmıştır. Elde edilen

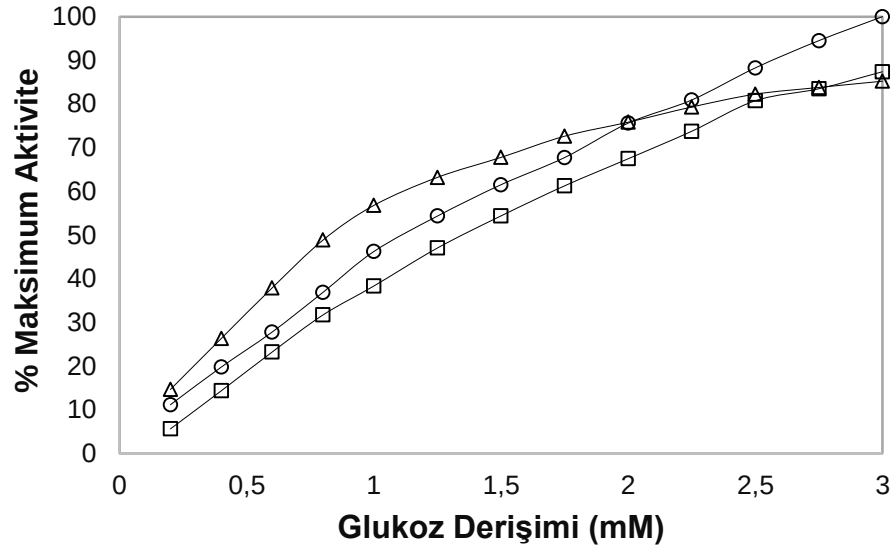
elektrotlar 20 saat bekletildikten sonra, 0,6 V sabit potansiyelde önce pH=6 tamponu ve sonrasında farklı glukoz çözeltilerindeki akım değerleri ölçülmüştür.



Şekil 4.2. Farklı Py derişiminde sentezlenen PPy ile oluşturulan biyosensörlerin glukoz derişimine bağı akım cevabının değışimi (●: 10 mM; ○: 25 mM; △:50 mM; ▲:75 mM □:100 mM pirol)

Şekil 4.2’de görüldüğü gibi en yüksek akım cevabı 25 mM pirol monomeri kullanılarak hazırlanan elektrotla elde edilmiştir. Monomer derişiminin değışimi PPy’nin gözenek büyüklüğünü etkiler. Düşük monomer derişiminde büyük gözenek yapılı polimer oluşur ve bu yapı üzerine GOD+Chi filminin adsorpsiyonu zayıf olacaktır. Yüksek monomer derişiminde ise yüzeyde heterojen yapıda bir polimer oluşumu meydana gelir ve bu durumda da GOD+Chi filminin yüzeyden kolaylıkla desorpsiyonu meydana gelecektir. Ancak uygun gözenek büyüklüğünde film elde edildiğinde GOD+Chi tabakanın yüzeye sıkı tutunması ve glukoz varlığında GOD’nin açığa çıkardığı H_2O_2 ’nin parçalanmasıyla oluşan elektron iletimi daha kolay olacaktır. Özellikle polimer tabaka ile Chi tabaka arayüzeyinde bulunan ve polimer bünyesindeki gözeneklere adsorbe olan GOD moleküllerinin glukoz ile verdiği reaksiyon elektron yoğunluğunun oluşumunda etkili olduğu düşünülmektedir. Dolayısı ile arayüzeyde polimer yüzeye tutunmuş GOD miktarı ile glukoz derişimine bağı akım yoğunluğu orantılı olacaktır. Bu bağlamda sentezlenen polimer filmin gözenekliliğı ve homojenliğı akım yoğunluğunda önemli bir role sahiptir.

Sonraki aşamada 25 mM pirol monomeri kullanılarak tarama hızları değiştirilmiş ve glukoz derişimine bağı akım cevapları ölçüldüğünde Şekil 4.3. elde edilmiştir.

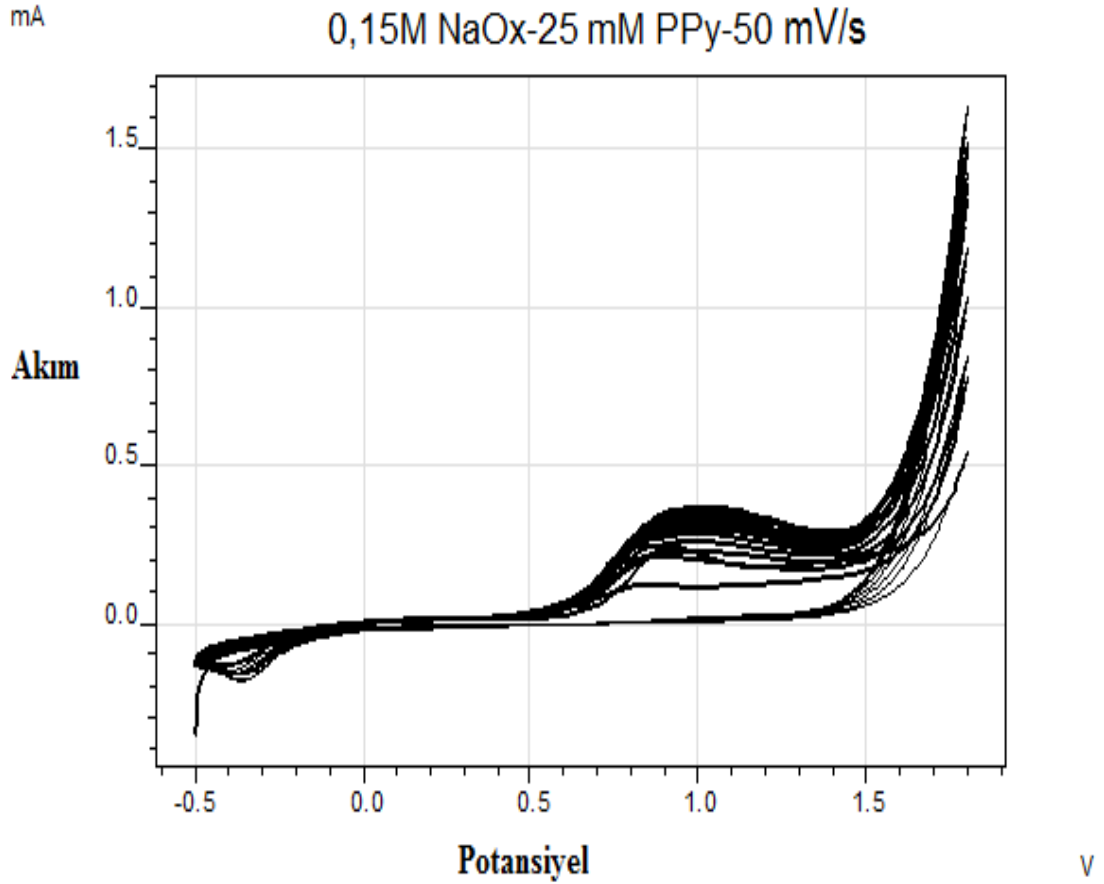


Şekil 4.3. Farklı tarama hızlarında sentezlenen PPy ile oluşturulan biyosensörlerin glukoz derişimine bağı akım cevabının değışimi. Tarama hızı: Δ :20 mV/s; O: 50 mV/s; $\square$:100 mV/s

Şekil 4.3’de görüldüğü gibi düşük glukoz derişimleri için 20 mV/s tarama hızı ile elde edilen elektrotların akım değıerleri en yüksekken, yüksek glukoz derişimlerinde 50 mV/s tarama hızı ile elde edilen elektrotun akım değıerleri yüksek çıkmıştır. Ancak akım değıerleri glukoz derişimine bağı olarak lineer olarak arttığından optimal tarama hızı 50 mV/s olarak seçilmiştir.

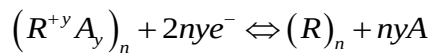
Tarama hızının polimer filmin gözenek yapısı ve iletkenliğine oldukça büyük etkisi vardır. Tarama hızı arttıkça gözenekli ve düzensiz bir polimer oluşur; bu da Chi bünyesindeki GOD’nin polimer yüzeye adsorpsiyonunu zorlaştırır.

15 mM Na-Ox ve 25 mM Py monomer karışımından oluşan çözelti içinde dönüşümlü voltametri (CV) yöntem ile 50 mV/s tarama hızı ile 13 tarama sayısı uygulanarak platin elektrot yüzeyine sentezlenen PPy filmin dönüşümlü voltamogram eğrisi Şekil 4.4’de verilmiştir. Platin elektrot yüzeyinin kararlı yapısından dolayı akım değıerlerinin yaklaşık -0,50 V ile 0,50 V aralığında yaklaşık sıfır dolaylarında olduğu görülmüştür.



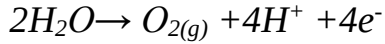
Şekil 4.4. PPy sentez eğrisi (25 mM pirol ve 50 mV/s tarama hızı)

Pirol monomerinin oksidasyonundan dolayı akım değerleri 0,50 V'tan sonra hızlı bir şekilde artmıştır. Bu oksidasyon pikinden sonra elektrot yüzeyi siyah bir tabaka ile kaplanmıştır. Bu piklerin tarama sayısı arttıkça akım değerlerinin artması, sentezlenen PPy filmin iletkenliğinin arttığını göstermektedir. Ayrıca bu akım artışları polipirol filmin indirgenmesi ve yükseltgenmesi olaylarına karşılık gelmekte olup A: $C_2O_4^{2-}$, R:PPy olmak üzere tepkime aşağıdaki gibi verilebilir:



Çözeltide çok sayıda bulunan okzalat iyonları ($C_2O_4^{2-}$) polimer film sentezlenirken filmin üç boyutlu yapısına katılırlar ve yükseltgenmiş yapıda elde edilen film indirgenirken bu iyonlar polimer yapısından ayrılarak çözeltiye geçerler. Yani elektrodun yüzeyindeki PPy filmi dışarıdan elektron gönderildiği zaman film indirgenir ve yük denkliliğini sağlamak için iyonlar polimer filmin gözeneklerinden çözeltiye doğru

difüzlenirler. Yükseltgenme esnasında ise polimer film elektron kaybettiğinden yine yük denliğini sağlamak için $C_2O_4^{2-}$ iyonları yeniden filmin gözeneklerinden polimer film yapısına doğru difüzlenirler. Bu sonuç itibari ile platin elektrot yüzeyinde sentezlenen PPy film hem yükseltgen hem de indirgen formda elde edilmiştir. PPy film sentez eğrisindeki yaklaşık 1,50 V potansiyelden sonraki akım artışı aşağıdaki tepkimeye göre oksijen çıkışını göstermektedir.

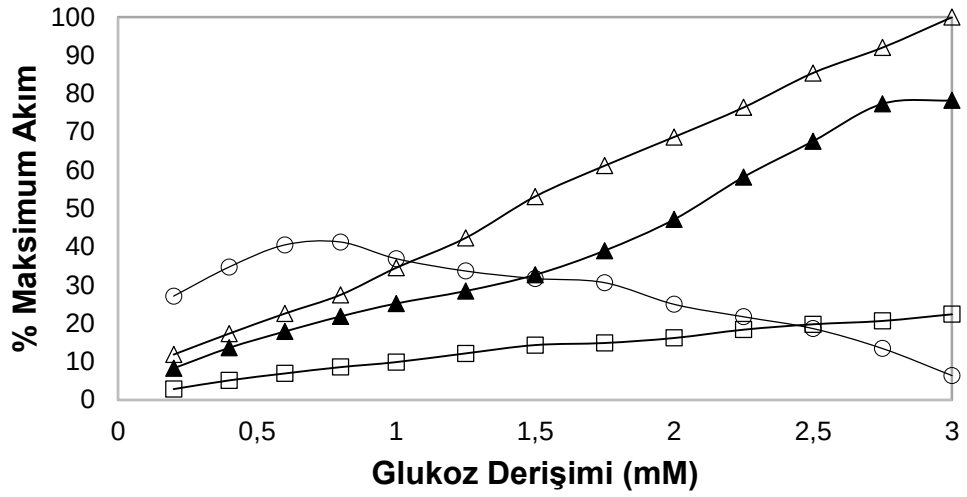


Polimer film sentezi esnasında oksijen çıkışının gözlenmesi polimer filmin gözenekli bir yapıya bürünmesini sağlamaktadır. Bu durum ise GOD enziminin polimer film yüzeyinde iyi tutunmasını sağlamaktadır.

4.2 Poli(N-metilpirol) (PNMP) sentezi

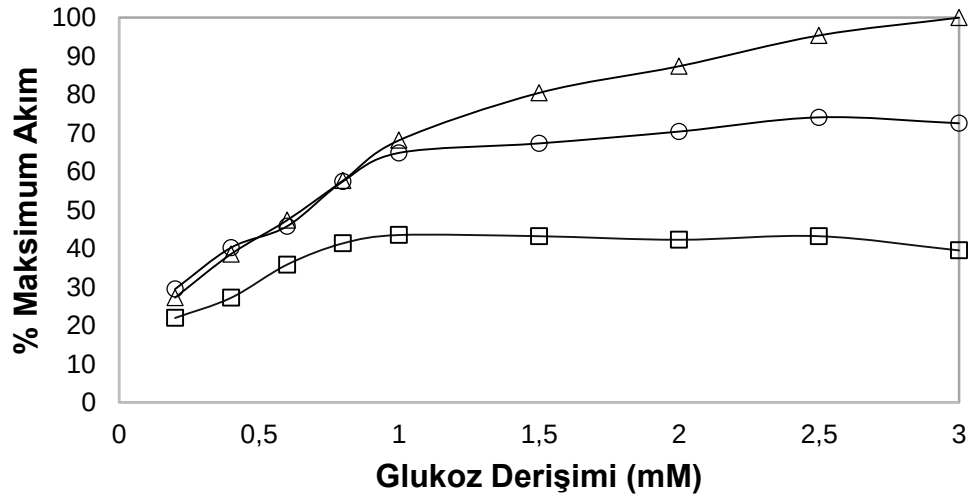
Poli(N-metilpirol) (PNMP) sentezi monomer olarak N-metilpirol içeren 0,15 M Na-Ox elektrolit çözelti kullanılarak -0,5 ile +1,5V potansiyel aralığında CV yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Sentezde uygulanan potansiyel aralık için çok sayıda ön deneme çalışmaları yapılmıştır. Çalışmada öncelikle monomer derişim etkisi araştırılmıştır. Bunun için 0,15 M NaOx elektrolit derişiminde 50 mV/s tarama hızında NMP monomer derişimi 10, 25, 50, 75 ve 100 mM olarak değiştirilerek platin elektrot üzerine PNMP sentezlenmiş ve elde edilen elektrotlar 2 mg/ml GOD içeren % 0.5 kitosan çözeltisi ve sonrasında %0.1 GAL çözeltisi ile muamele edilerek enzim elektrotlar hazırlanmıştır. Elde edilen elektrotlar 20 saat bekletildikten sonra, 0,6 V sabit potansiyelde önce pH 6 tamponu sonra farklı glukoz çözeltilerindeki akım değerleri ölçülmüştür. 100 mM NMP monomer derişiminde elde edilen elektrotla glukoz derişimine bağlı akım cevabı ölçülememiştir (Değerler negatif çıkmıştır). Diğer elektrotlar için elde edilen sonuçlar Şekil 4.5’de verilmiştir.

Şekil 4.5.’de görüldüğü gibi en yüksek akım cevabı 50 mM NMP monomer derişimi ile hazırlanan elektrot için elde edilmiştir.



Şekil 4.5. Farklı NMP derişiminde sentezlenen PNMP ile oluşturulan biyosensörlerin glukoz derişimine bağı akım cevabının değışimi. □: 10 mM; ▲:25 mM △:50 mM; O: 75 mM NMP

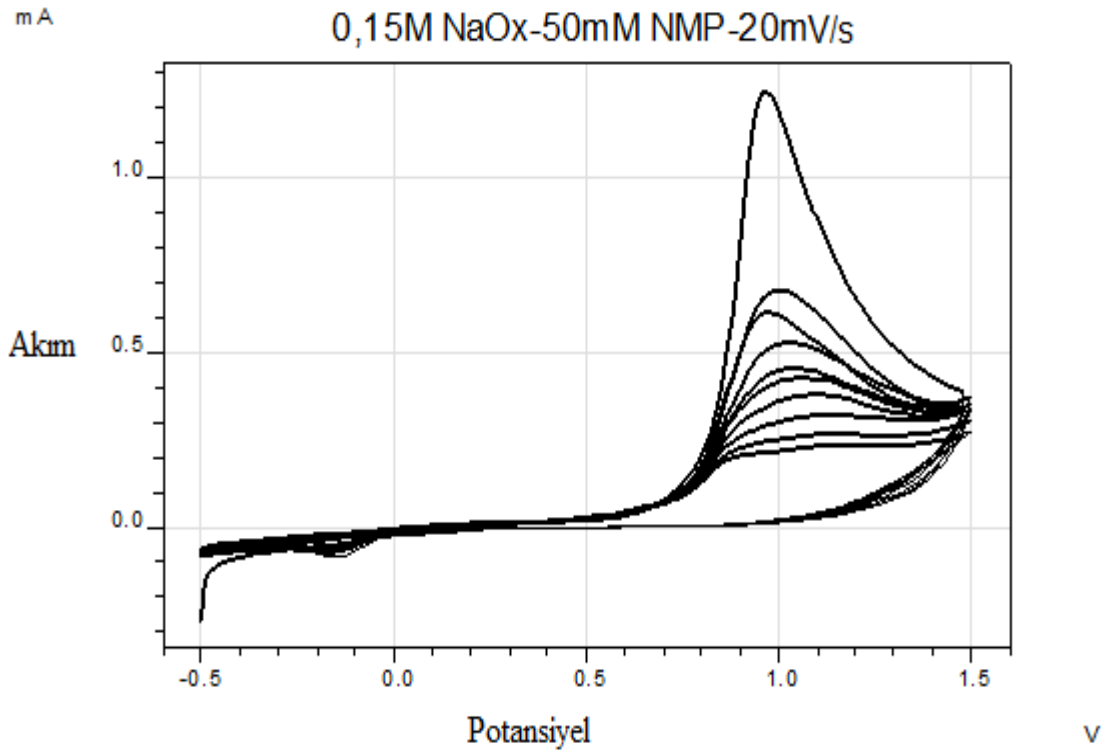
Sonraki aşamada 50 mM NMP monomeri kullanılarak tarama hızları değıştirilmiş ve glukoz derişimine bağı akım cevapları ölçüldüğünde Şekil 4.6. elde edilmiştir.



Şekil 4.6. Farklı tarama hızlarında sentezlenen PNMP ile oluşturulan biyosensörlerin glukoz derişimine bağı akım cevabının değışimi. Tarama hızı: △:20 mV/s; O: 50 mV/s; □:100 mV/s

Şekil 4.6.'da görüldüğü gibi tarama hızı arttıkça glukoz derişimine bağı akım cevabında azalma gözlenmiştir. En yüksek akım değerleri 20 mV/s tarama hızı ile oluşturulan elektrot için gözlenmiştir.

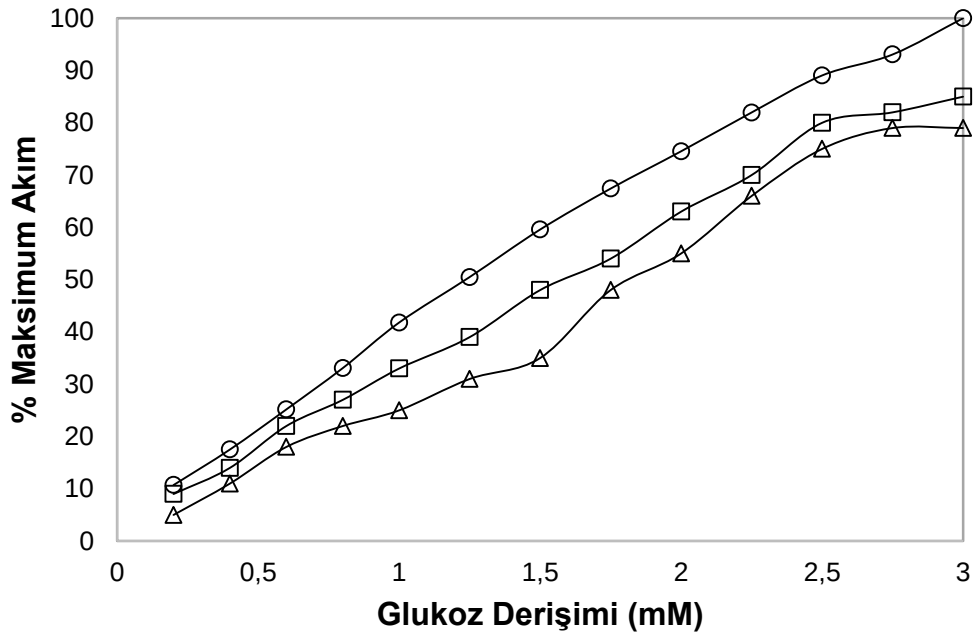
15 mM Na-Ox ve 50 mM NMP monomer karışımından oluşan çözelti içinde CV yöntem ile 20 mV/s tarama hızı ile 10 tarama sayısı uygulanarak platin elektrot yüzeyine sentezlenen poli(N-metilpirol) (PNMP) filmin dönüşümlü voltamogram eğrisi Şekil 4.7'de verilmiştir. Platin elektrot yüzeyinin kararlı yapısından dolayı PPy sentez eğrisinde olduğu gibi akım değerlerinin yaklaşık -0,50 V ile 0,50 V aralığında yaklaşık sıfır dolaylarında olduğu görülmüştür. Platin elektrot yüzeyinde siyah bir görüntünün oluşmasına neden olan pik NMP monomerinin oksidasyonundan dolayı yaklaşık 1,00 V dolaylarında ortaya çıkmıştır. Bu pikin akım değerlerinin azalması sentezlenen PNMP filmin iletkenliğinin her taramadan sonra düştüğünü göstermektedir. Platin elektrot yüzeyinde pirolün türevi olan monomer N-metilpirolden sentezlenen PNMP filmin de, PPy sentezi esnasında gerçekleşen benzer olaylara bağı olarak hem yükseltgen hem de indirgen formlara sahip olacaktır.



Şekil 4.7. Poli N-Metilpirolün sentez eğrisi (50 mM NMP, 20 mV/s)

4.3. Poli(Pirol-co-N-metilpirol) (P(Py-co-NMP) sentezi

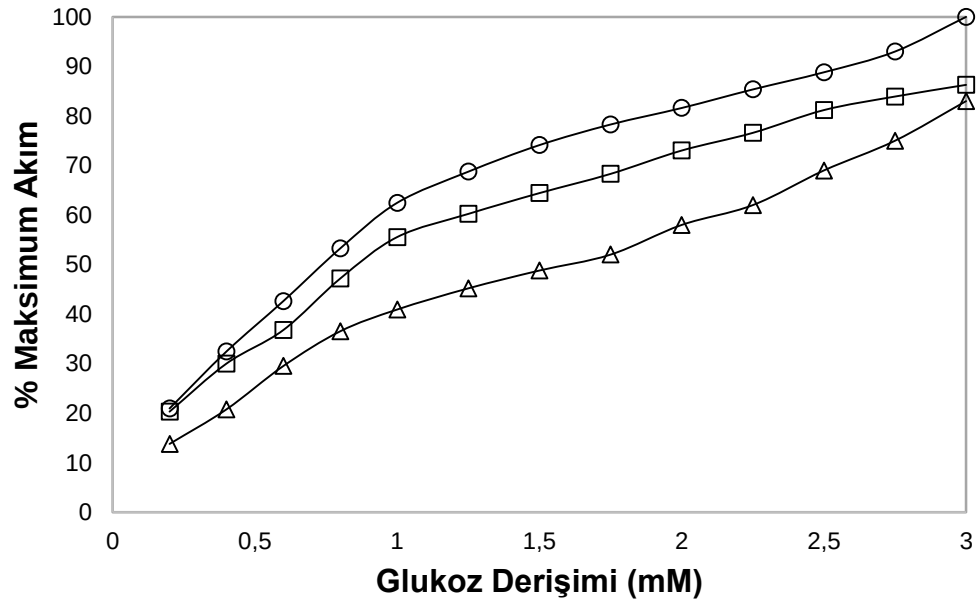
Toplam monomer derişimi 50 mM ve NMP:Py monomer derişim oranları 1:9, 5:5 ve 9:1 olacak şekilde Pt elektrot üzerinde 3 ayrı polimer sentezi gerçekleştirilerek enzim elektrotlar oluşturulmuş ve glukoz derişimine bağı akım cevabı değerleri Şekil 4.8’ de verilmiştir.



Şekil 4.8. Farklı monomer derişim oranları kullanılarak elde edilen biyosensörlerin glukoz derişimine bağı akım cevapları (NMP:Py oranları: O: 5:5; □: 9:1; △: 1:9)

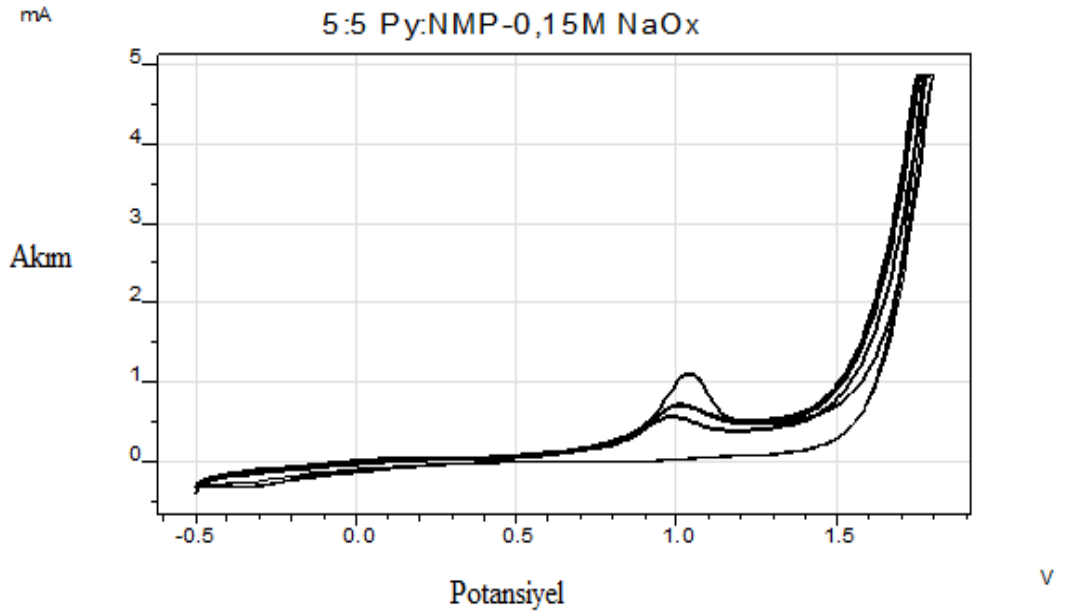
Şekil 4.8’de görüldüğü gibi, NMP:Py derişim oranları 5:5 iken (25 mM NMP ve 25 mM Py) sentezlenen P(Py-co-NMP) ile oluşturulan elektrotların glukoz derişimine bağı akım değerleri en yüksek çıkmıştır. Bu nedenle ilerleyen çalışmalarda eşit derişim oranlarında monomer kullanılarak kopolimer sentezi yapılmaya karar verilmiştir. NMP ve Py derişimleri 25 mM olan şartlarda kopolimer sentezine tarama hızının etkisi araştırılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.9’da verilmiştir.

Şekil 4.9’da görüldüğü gibi 50 mV/s tarama hızı ile oluşturulan elektrodun glukoz derişimine bağı akım değerleri en yüksek çıkmıştır.



Şekil 4.9. Farklı tarama hızında elde edilen kopolimer ile oluşturulan biyosensörlerin glukoz derişimine bağı akım cevapları (Tarama hızı: □: 20; O: 50; △: 100 mV/s)

25'er mM NMP ve Py içeren elektrolit ortamda (0,15 M Na-Ox) CV ile sentezlenen P(Py-co-NMP) filmin gelişim eğrisi Şekil 4.10'da verilmiştir.



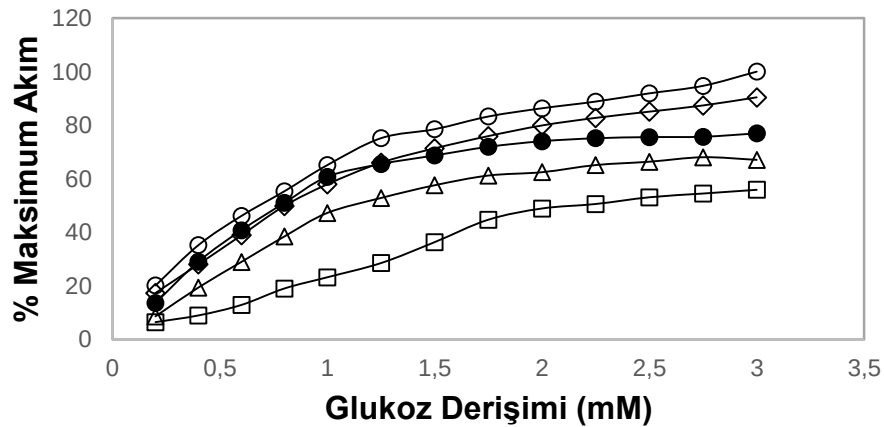
Şekil 4.10. Kopolimer film sentez eğrisi (25:25 Py:NMP, 50 mV/s)

15 mM sodyum okzalot ve 25 mM pirol + 25 mM N-metilpirol monomer karışımından oluşan çözelti içinde potansiyodinamik ölçüm ile 50 mV/s tarama hızı ile 13 tarama sayısı uygulanarak platin elektrot yüzeyine sentezlenen poli(pirol-co-N-metilpirol)(PPy-co-PNMP) filmin dönüşümlü voltamogram eğrisi Şekil 4.10'da verilmiştir. Platin elektrot yüzeyine PPy-co-PNMP kopolimer film sentez eğrisinde 0,50 V potansiyele kadar akım değerlerinin sıfır dolaylarında olması hiçbir elektrokimyasal tepkimenin olmadığını göstermektedir. Bu potansiyelden sonraki akım değerlerindeki hızlı artış monomerlerin yükseltgenmesine karşılık gelmektedir. Bu akım değerlerinin tarama sayısı arttıkça oluşan kopolimer filmlerin iletkenliğinin azalmasından dolayı azaldığı gözlenmiştir. Kopolimer film sentezi için elde edilen monomer oksidasyon pik şiddetinin, polipirol sentezinkinden daha yüksek, poli(N-metilpirol) sentezinkine benzer olduğu görülmüştür. Oksijen çıkışı ise yaklaşık 1,5 V'tan sonra gözlenmiştir.

4.4. Elektrot Tasarımında Chi, GOD ve GAL Derişimlerinin Optimizasyonu

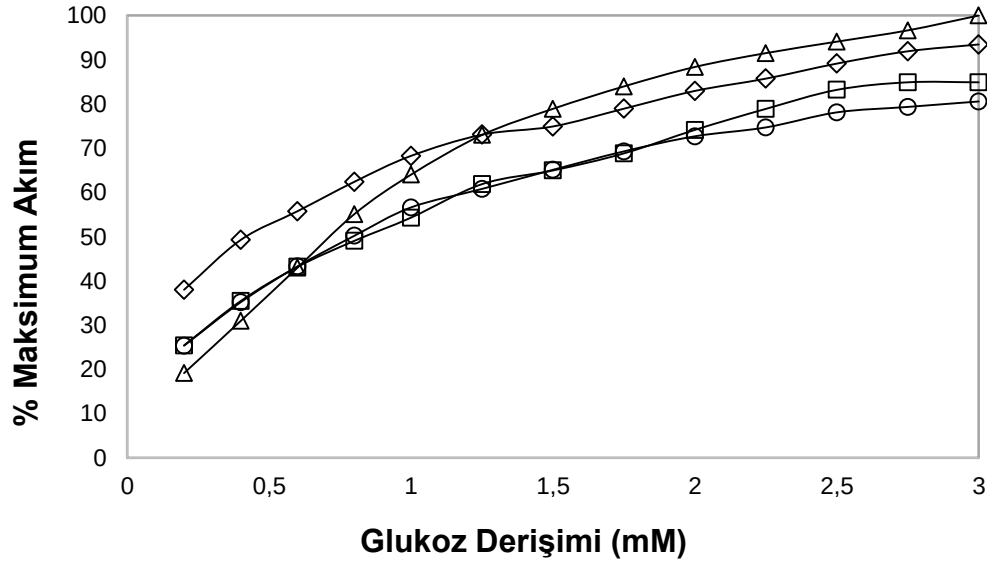
4.4.1. PPy Esaslı Elektrot Tasarımında Chi, GOD ve GAL Derişimlerinin Optimizasyonu

25 mM Py ve 50 mV/s tarama hızı ile elde edilen PPy filmle kaplı Pt elektrot GOD içeren farklı derişimde Chi ile modifiye edilerek enzim elektrotlar oluşturulmuş ve bu elektrotların glukozla bağı akım cevapları Şekil 4.11'de verilmiştir.



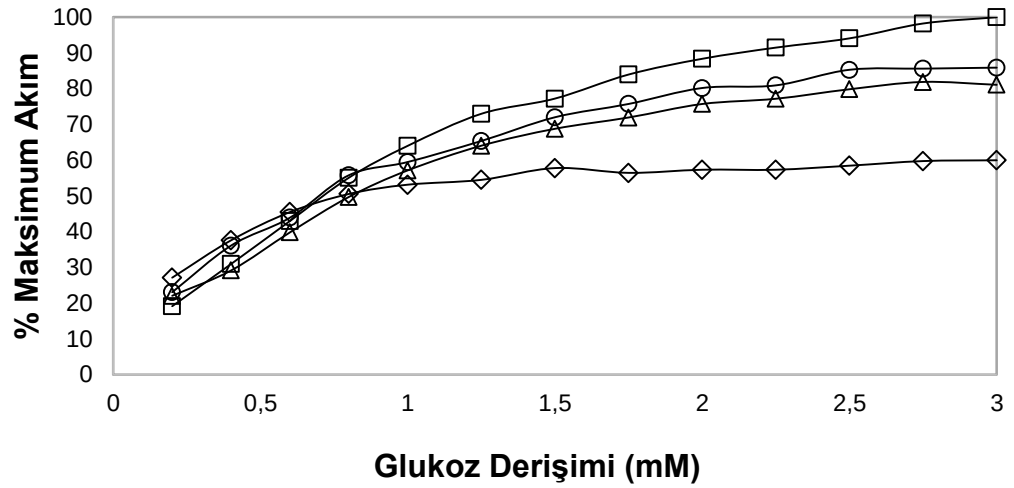
Şekil 4.11. PPy ile modifiye elektrodun tasarımında kullanılan Chi derişiminin glukozla bağı akım cevabı üzerine etkisi (Δ : %0,10; $\circ$: %0,25; $\diamond$: %0,50, $\bullet$: %0,75 ve $\square$: %1,0 Chi)

%0,25 Chi kullanılarak farklı derişimde GOD ile hazırlanan elektrotların glukoz derişimine bağı akım cevapları Şekil 4.12.'de verilmiştir. Şekil 4.12.'de görüldüğü gibi 3 ve 4 mg/ml GOD ile oluşturulan enzim elektrotların akım cevapları daha yüksek çıkmıştır. Elektrot tasarımı için sonraki çalışmalarda GOD derişiminin 4 mg/ml olmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.12. PPy ile modifiye elektrodun tasarımında kullanılan GOD derişiminin glukoz bağı akım cevabı üzerine etkisi (O: 1 mg/ml, □:2 mg/ml; ◇: 3 mg/ml ve △:4 mg/ml)

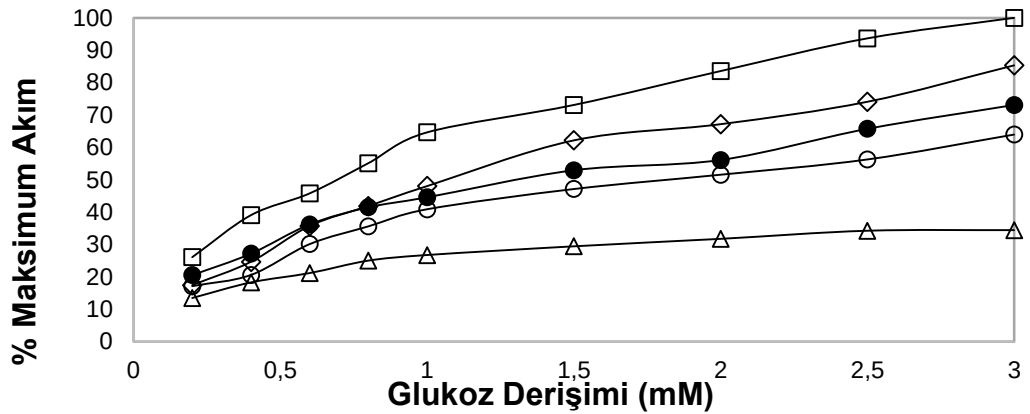
GAL derişimi %0,025 ve %0,1 arasında değıştirilerek farklı elektrotlar hazırlanmış ve bu elektrotların glukoz derişimine bağı akım cevapları Şekil 4.13.'de verilmiştir. GAL, Chi ve GOD moleküllerinin yapısında bulunan $-NH_2$ grupları arasında çapraz bağlar oluşturarak jel matriksinden GOD kaçışını engellemektedir. Düşük GAL derişiminde yeterince çapraz bağlar meydana gelemeyeceğinden elektrot yüzeyinden GOD kaçışı olacaktır. Yüksek GAL derişiminde ise çapraz bağ sayısı fazla olacağından gözenek yapısı küçülecek ve substratın GOD'ye ulaşması zorlaşacaktır. Şekil 4.13.'de görüldüğü gibi % 0,050 GAL kullanılarak hazırlanan elektrodun akım cevabı en yüksek çıkmıştır.



Şekil 4.13. PPy ile modifiye elektrodun tasarımında kullanılan GAL derişiminin glukozu bağlı akım cevabı üzerine etkisi (O: %0,025; □: %0,050; △: % 0,075 ve ◇: % 0,10 GAL)

4.4.2. PNMP Esaslı Elektrot Tasarımında Chi, GOD ve GAL Derişimlerinin Optimizasyonu

Optimal koşullarda sentezlenen PNMP üzerine farklı kitosan derişimleri ile biyosensör oluşturulmuş ve glukoz derişimine bağlı elde edilen akım cevabı değerleri Şekil 4.14' de verilmiştir.

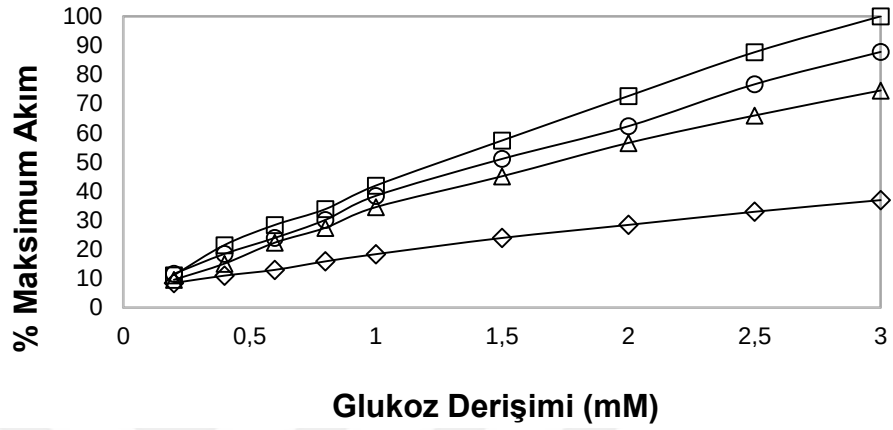


Şekil 4.14. PNMP ile modifiye elektrodun tasarımında kullanılan Chi derişiminin glukozu bağlı akım cevabı üzerine etkisi (△: %0,10; O: %0,25; ●: %0,50, ◇: %0,75 ve □: %1,0 Chi)

Şekil 4.14.' de görüldüğü gibi kullanılan Chi derişimi arttıkça glukoz derişimine bağlı ölçülen akım artmış; en yüksek akım cevabı % 1,0 Chi ile hazırlanan elektrot için

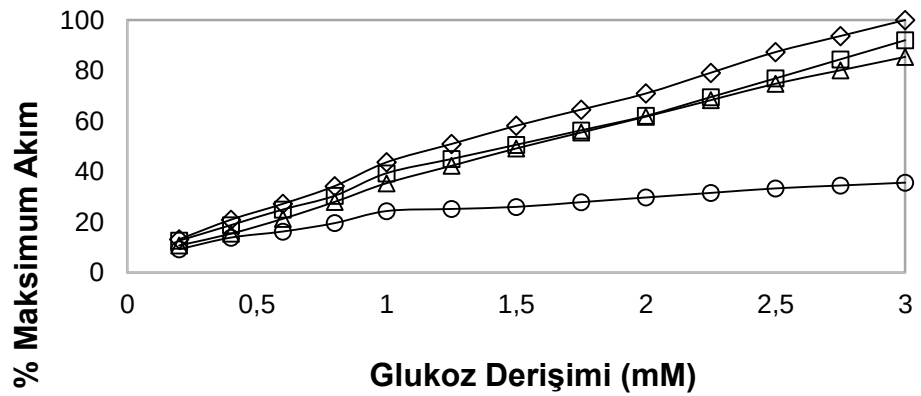
elde edilmiştir. %1 Chi kullanılarak ancak farklı GOD ile hazırlanan elektrotların glukoz derişimine bağı akım değerleri Şekil 4.15’de verilmiştir.

Şekil 4.15’ de görüldüğü gibi, biyosensör oluşturunken kullanılan GOD derişimi 4 mg/ml iken akım cevabı en yüksek çıkmıştır.



Şekil 4.15. PPy ile modifiye elektrodun tasarımında kullanılan GOD derişiminin glukoz bağı akım cevabı üzerine etkisi (◇: 1 mg/ml, ○: 2 mg/ml; △: 3 mg/ml ; ve □: 4 mg/ml)

%1 Chi ve 4 mg/ml GOD ile hazırlanan elektrotlar farklı derişimlerde GAL ile modifiye edilerek oluşturulan elektrotların glukoz derişimine bağı akım cevapları Şekil 4.16’da verilmiştir.

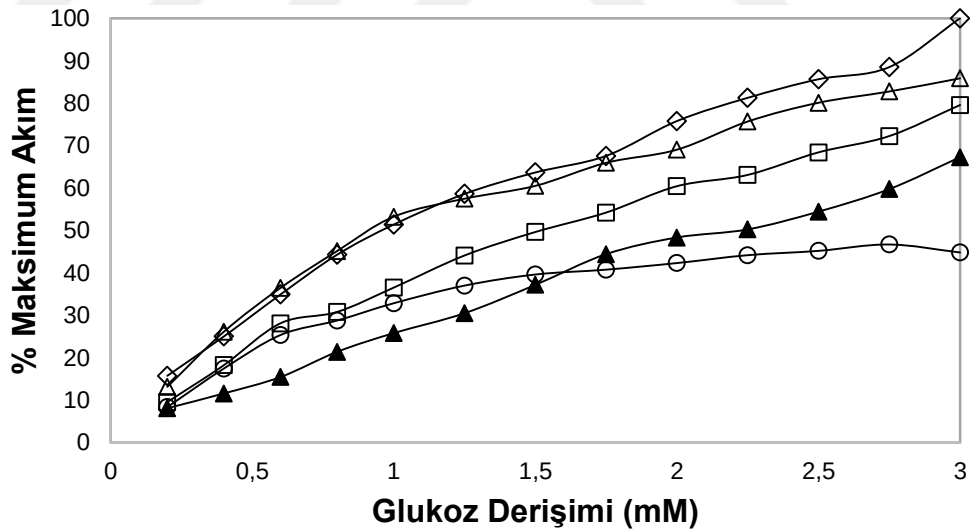


Şekil 4.16. PNMP ile modifiye elektrodun tasarımında kullanılan GAL derişiminin glukoz bağı akım cevabı üzerine etkisi (○: %0,025; □: %0,050; △: % 0,075 ve ◇: % 0,10 GAL)

Şekil 4.16’da görüldüğü gibi en düşük ve en yüksek akım değerleri sırasıyla % 0,025 ve % 0,100 GAL ile hazırlanan elektrotlar için elde edilmişken; %0,050 ve %0,075 GAL ile hazırlanan elektrotların akım değerleri birbirine yakın çıkmıştır.

4.4.3.P(Py-co-NMP) Esaslı Elektrot Tasarımında Chi, GOD ve GAL Derişimlerinin Optimizasyonu

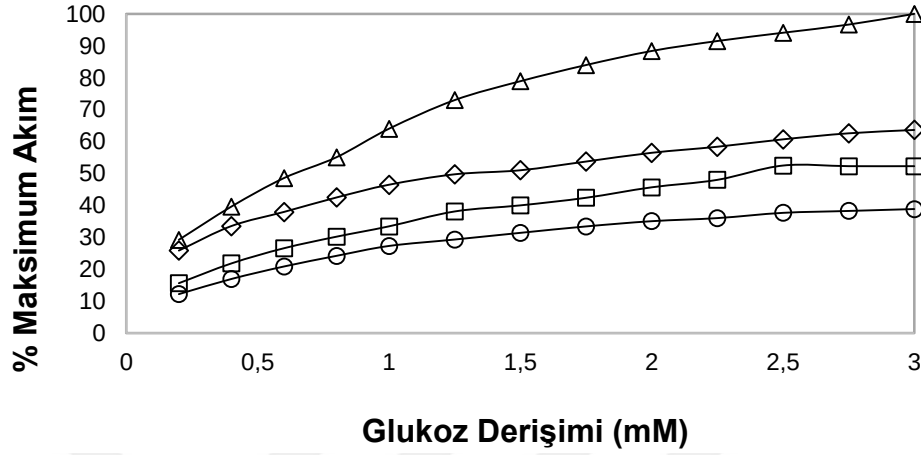
Optimal şartlarda sentezlenen kopolimer filmle kaplı Pt elektrot, 2 mg/ml GOD içeren farklı derişimde Chi ile etkileştirilerek enzim elektrotlar elde edilmiş ve bu elektrotların glukoz derişimine bağlı akım cevapları Şekil 4.17’de verilmiştir. Şekil 4.17’de görüldüğü gibi % 0,50 ve %0,75 Chi ile oluşturulan elektrotların düşük glukoz derişimlerinde akım cevapları hemen hemen aynı iken yüksek glukoz derişimlerinde % 0,50 Chi ile hazırlanan elektrodun akım cevabının tüm elektrotlardan yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle sonraki çalışmalarda kopolimer kaplı Pt elektrodun %0,5 Chi ile modifiye edilmesine karar verilmiştir.



Şekil 4.17. Kopolimer kaplı elektrot ile farklı Chi derişiminde elde edilen biyosensörlerin glukoz derişimine bağlı akım cevapları (O:%0,10; □: %0,25; ◇: %0,50 △:%0,75 ve ▲: %1,0 Chi)

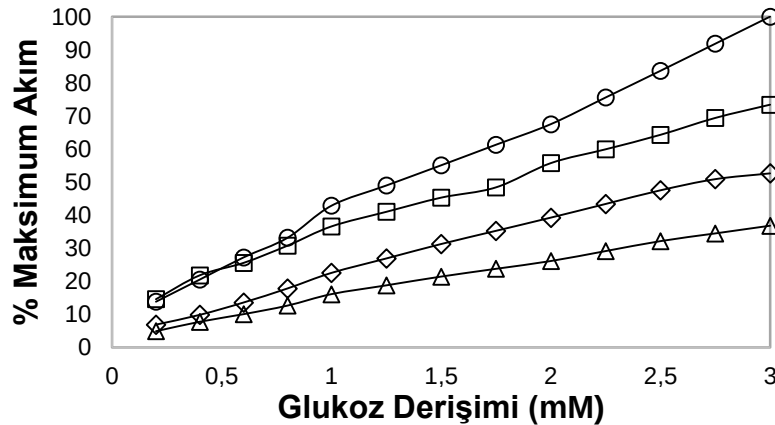
Kopolimer kaplı Pt elektrot 1, 2, 3 ve 4 mg/ml GOD içeren % 0.5 Chi çözeltisi ile muamele edilerek oluşturulan biyosensörlerin glukoz derişimine bağlı akım cevapları

Şekil 4.18’de verilmiştir. Şekil 4.18’de görüldüğü gibi GOD derişimi arttıkça akım cevabı artmıştır. Bu nedenle optimal GOD derişimi 4 mg/ml olarak seçilmiştir.



Şekil 4.18. Kopolimer kaplı elektrot ile farklı GOD derişiminde elde edilen biyosensörlerin glukoz derişimine bağlı akım cevapları (O:1mg/ml ; □:2 mg/ml; ◇:3 mg/ml, △:4 mg/ml GOD)

Şekil 4.19, 4 mg/ml GOD içeren %0,5 Chi çözeltisi ile modifiye edilmiş enzim elektrotların yüzeyinde çapraz bağlanma oluşturan GAL çözeltisinin derişiminin optimizasyon sonuçları görülmektedir. %0,025, 0,050, 0,075 ve 0,100 GAL çözeltileri ile elde edilen elektrotlarda, GAL derişimi arttıkça akım değerlerinde düşme gözlenmiştir.



Şekil 4.19. Kopolimer kaplı elektrot ile farklı GAL derişiminde elde edilen biyosensörlerin glukoz derişimine bağlı akım cevapları (O:%0,025 ; □:%0,050; ◇:%0,075; △:%0,10 GAL)

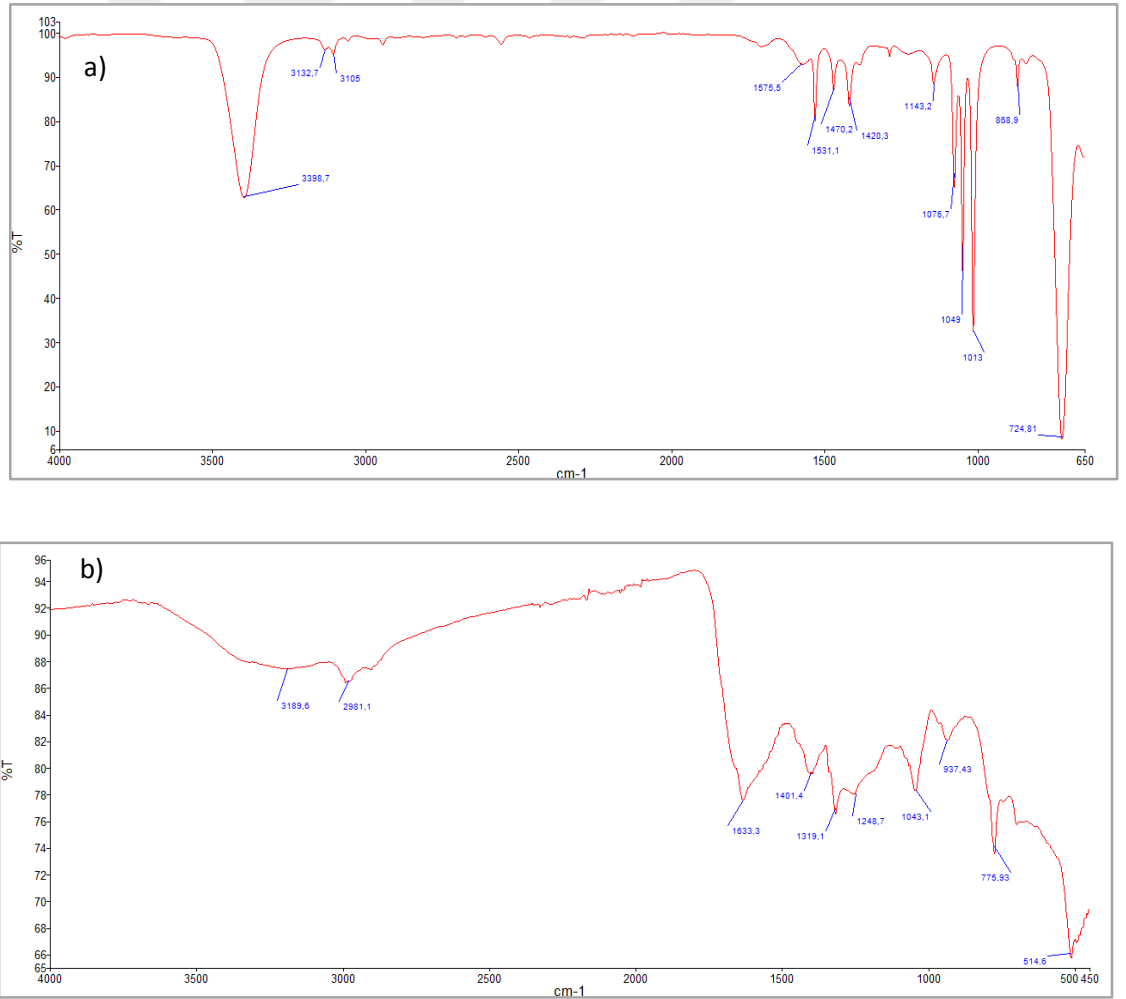
4.5. Enzim Elektrotların Yapısal Karakterizasyonu

4.5.1. Polimer Filmlerin FTIR Analizleri

PPy, PNMP ve P(Py-co-NMP) filmlerinin her biri kendine ait optimal şartlarda Pt elektrot yüzeyinde sentezlenerek biriktirilmiş ve her bir filmin, ayrıca Py ve NMP monomerlerin FTIR analizleri yapılmıştır.

Py ve PPy için elde edilen FTIR ölçümleri sırasıyla Şekil 4.20 (a) ve (b)'de verilmektedir.

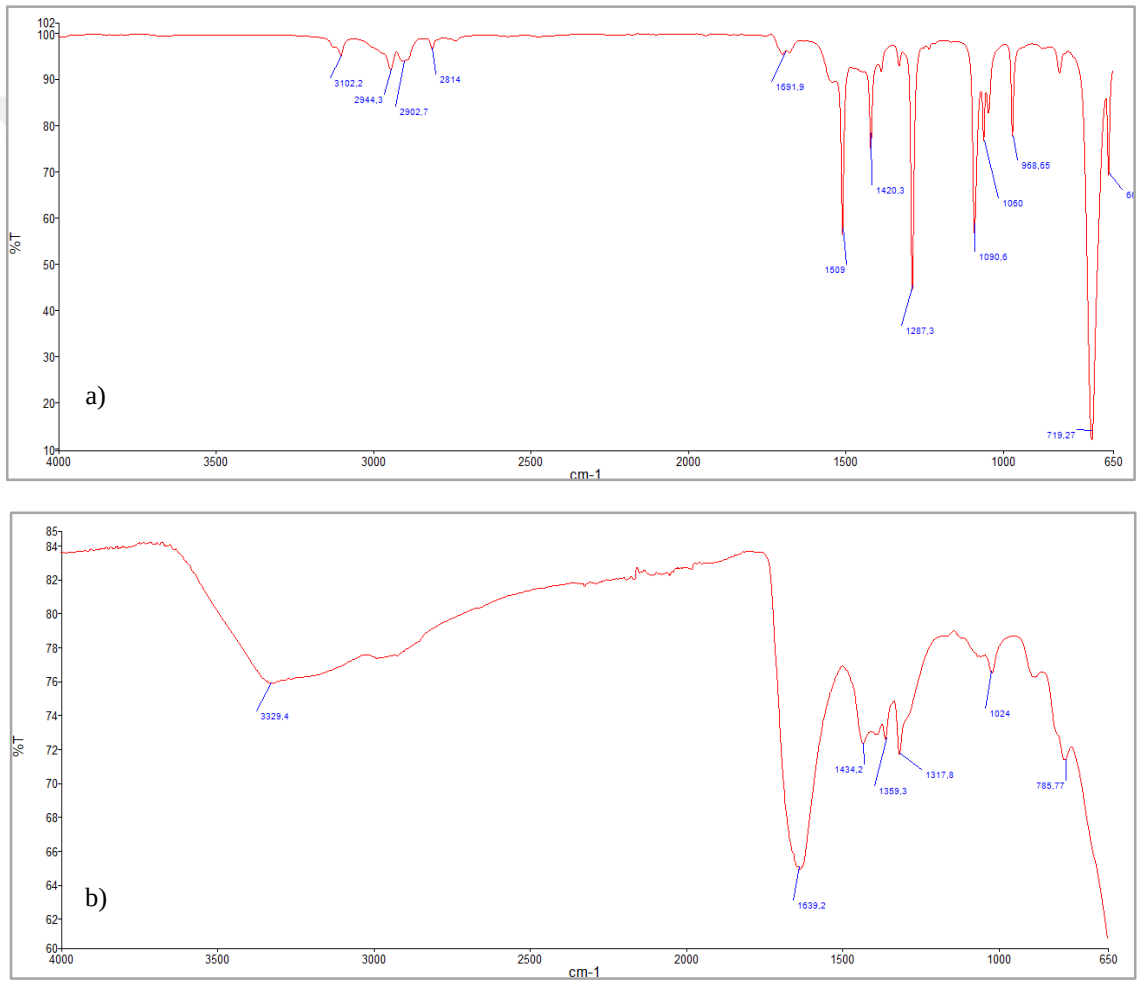
Py için elde edilen spektrumlara bakıldığında, $3398,7\text{ cm}^{-1}$ pik sekonder aminlerin simetrik ve asimetrik $-N-H$ gerilmesine, $3132,7$ ve 3105 cm^{-1} aromatik C-H gerilmesine, $724,8\text{ cm}^{-1}$ piki C-H esnemesine karşılık gelmektedir.



Şekil 4.20. Py monomeri (a) ve PPy (b) filmin FTIR spektrumları

PPy için elde edilen spektrumlara bakıldığında, 3189,6 N-H ve 2981,1 cm^{-1} aromatik C-H, 1633,3 cm^{-1} C=C ve C=N gerilmesine, 775,93 cm^{-1} piki C-H esnemesine karşılık gelmektedir.

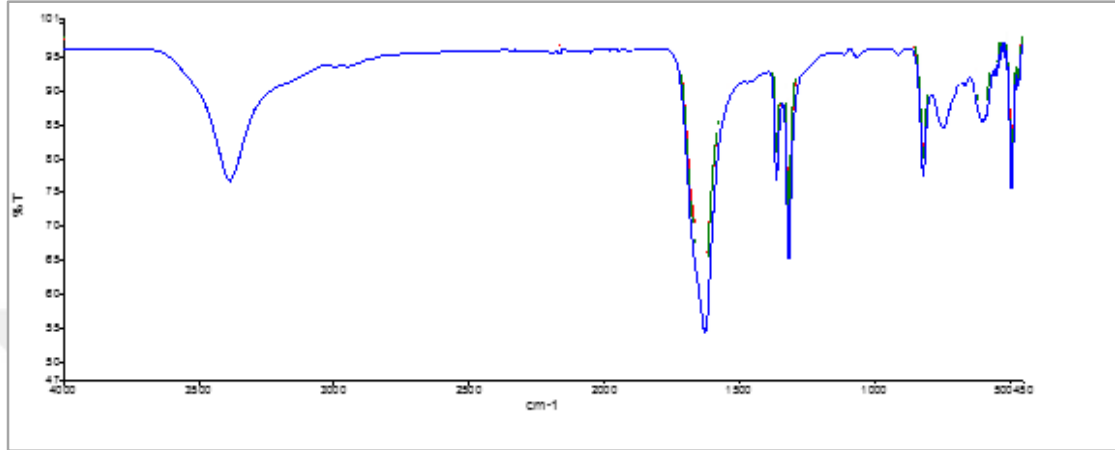
NMP ve PNMP için elde edilen FT-IR ölçümleri sırasıyla Şekil 4.21 (a) ve (b)'de verilmektedir. NMP için elde edilen spektrumlara bakıldığında, 3102,2 cm^{-1} aromatik C-N gerilmesi, 2944,3 ve 2902,7 cm^{-1} alifatik C-H gerilmesi, 1509 cm^{-1} pikleri ise N-C esneme, 1287,3 cm^{-1} piki C-N gerilmesine ve 719,27 cm^{-1} piki C-H esnemesine karşılık gelmektedir.



Şekil 4.21. NMP monomeri (a) ve PNMP (b) filmin FTIR spektrumu

PNMP için elde edilen spektrumlara bakıldığında, 3329,4 cm^{-1} aromatik N=C-H gerilmesi, 1639,2 cm^{-1} pikleri ise C=N esneme, 1434,2; 1359,3 ve 1317,8 cm^{-1} piki C-N gerilmesine karşılık gelmektedir.

Şekil 4.22’de sodyum okzalat ortamında sentezlenen P(Py-co-NMP) kopolimer film için elde edilen spektrumlara bakıldığında hemen hemen aynı yapıların oluştuğu gözlenmektedir. P(Py-co-NMP) kopolimer filmin 3400 cm^{-1} ’de sahip olduğu pikin keskin olması kopolimer filmin oluşumunu göstermektedir.



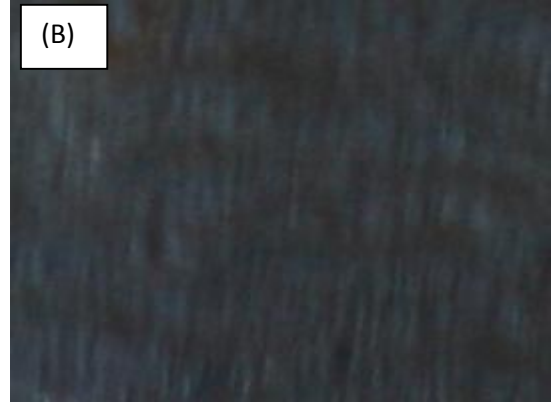
Şekil 4.22. P(Py-co-NMP) filmin FTIR spektrumu

4.5.2.Enzim Elektrotların Dijital Fotoğraf Makinesi İle Elde Edilen Görüntüleri

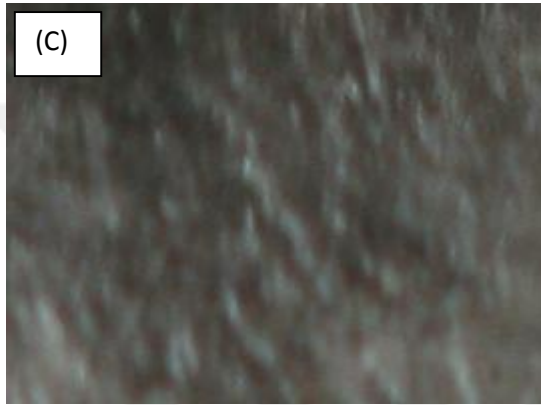
Çıplak Pt ve enzim elektrotların oluşturulması esnasındaki aşamalar polimer film kaplama, GOD+Chi ile etkileşme ve GAL ile etkileşme sonrası elde edilen elektrotların yüzeyleri dijital fotoğraf makinesi ile 67 kez büyütme ile görüntülenmiştir (Şekil 4.24). Şekil 4.23’de çıplak Pt (A) elektrot parlak gri metalik renk sergilerken, elektrot PPy ile kaplandığında yüzeyin koyu mavi renge büründüğü, daha sonra polimer film kaplı Pt elektrot GOD+Chi karışımı ile etkileştirildiğinde oluşan Pt/PPy/GOD+Chi (C) elektrodun yüzeyinin koyu gri renkte olduğu gözlenirken, bu yüzeyin GAL ile etkileştirilmesi sonucu oluşan Pt/PPy/GOD+Chi/GAL (D) elektrodun görüntüleri yüzeyin kahverengi renge dönüştüğünü göstermektedir. Pt elektrot yüzeyinde her etkileşmeden sonra yüzeyin farklı renge dönüşmesi etkileşmelerin gerçekleştiğini göstermektedir.



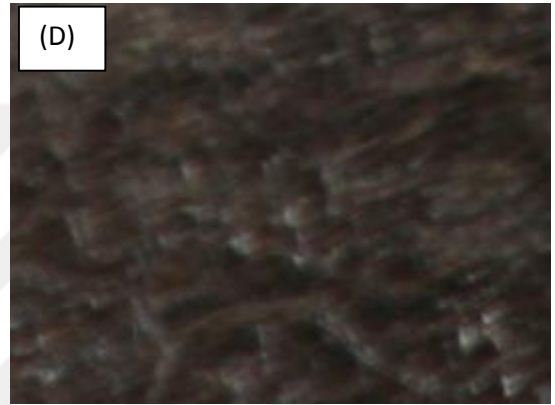
Çıplak pt



PPy kaplı elektrot



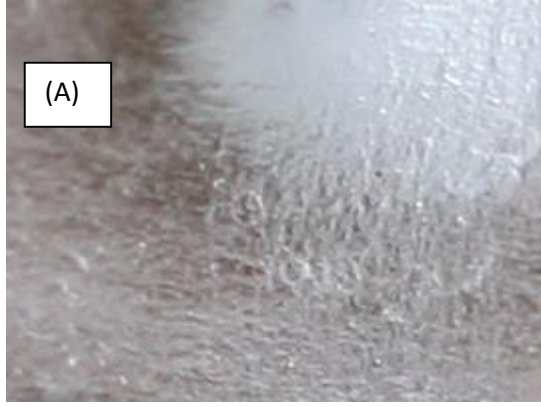
PPy/GOD+Chi



PPy/GOD+Chi/GAL (20 sa bekleme sonrası)

Şekil 4.23. Pt (A), Pt/PPy (B), Pt/PPy/GOD+Chi (C) ve Pt/PPy/GOD+Chi/GAL (D) elektrot yüzeylerinin fotoğraf görüntüleri

Benzer şekilde, PNMP ile modifiye elektrota ait digital fotoğraf görüntüleri Şekil 4.24’ de verilmektedir. Şekil 4.24’de görüldüğü gibi PNMP kaplı elektrodun yüzeyinin homojen ve siyah renkli olduğu bulunmuştur. PNMP kaplı yüzeyin Chi ile etkileştirildiğinde rengin açıldığı görülmektedir. Elektrodun 20 saat GAL’a maruz bırakıldıktan sonra da yüzeyinin değişmesi düşünülen etkileşimlerin gerçekleştiğini göstermektedir. Pt/PPy/GOD+Chi/GAL elektrot yüzeyinin Pt/PNMP/GOD+Chi/GAL yüzeyine göre daha homojen olduğu görülmüştür.



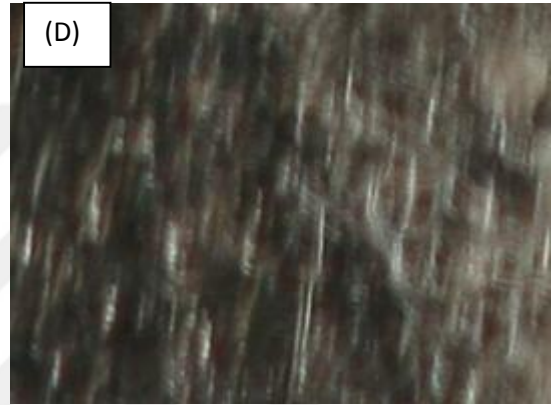
Çıplak pt



NMP kaplı elektrot



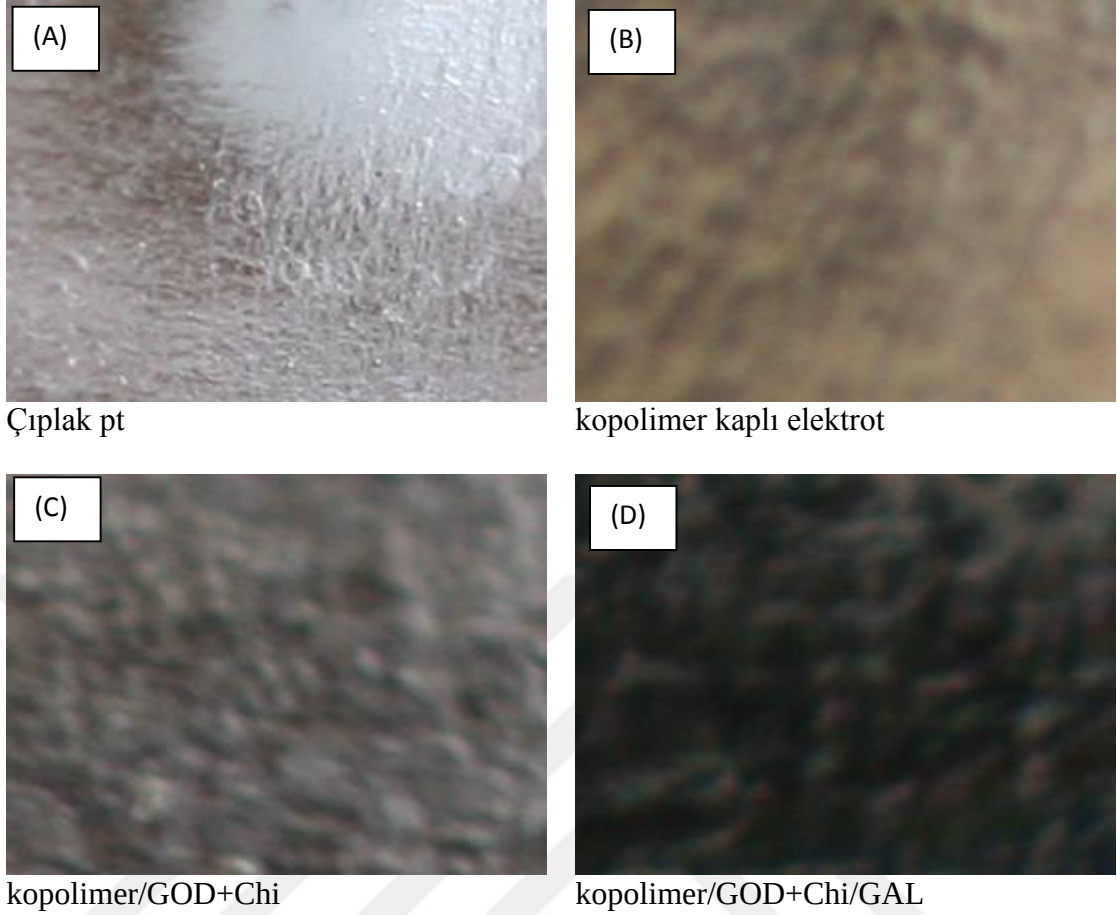
NMP/GOD+Chi



NMP/GOD+Chi/GAL (20 sa bekleme sonrası)

Şekil 4.24. Pt (A), Pt/PNMP (B), Pt/PNMP/GOD+Chi (C) ve Pt/PNMP/GOD+Chi/GAL (D) elektrot yüzeylerinin fotoğraf görüntüleri

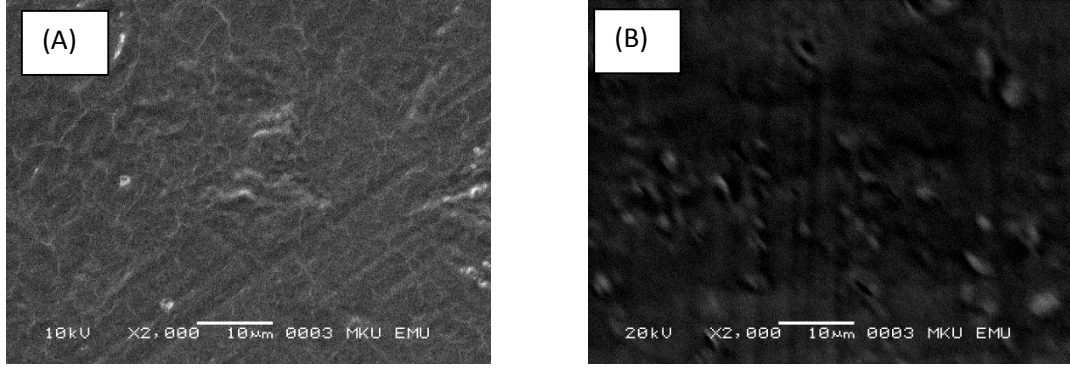
Şekil 4.25’da ise kopolimer film ile oluşturulan enzim elektrotların polimer kaplı, GOD içeren Chi ile yüzeyde ince film oluşturulmuş ve GAL ile muamele edilmiş yapılarının 67 kez büyütülmüş dijital fotoğraf görüntüleri verilmektedir. Şekil 4.25’da görüldüğü gibi, Pt elektrot yüzeyine uygulanan her aşamadaki kaplamaların hem PPy hem de PNMP yüzeylerine göre daha açık renkli olduğu gözlemlenmiştir. Anca gerek GOD immobilizasyonu ve gerekse GAL ile muamele sonrasında elektrot yüzeylerinin görüntülerinin değiştiği gözlemlenmiştir.



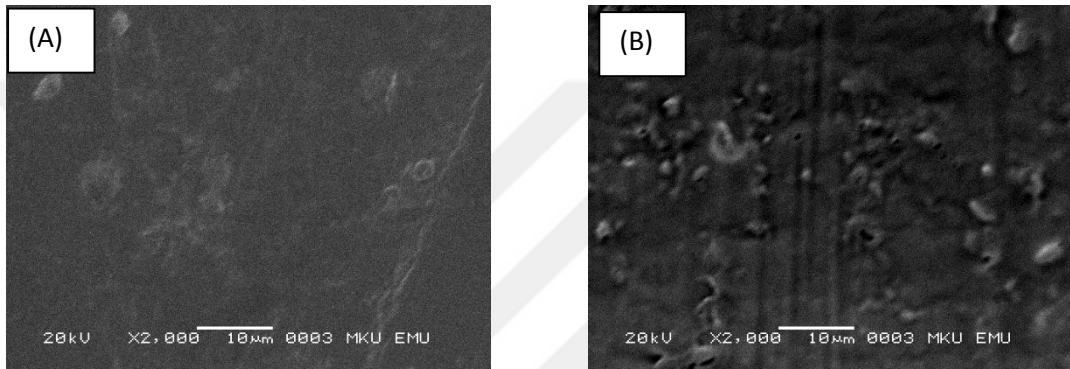
Şekil 4.25. Pt (A), Pt/P(Py-co-NMP) (B), Pt/P(Py-co-NMP)/GOD+Chi (C) ve Pt/ P(Py-co-NMP) /GOD+Chi/GAL (20 sa bekleme sonrası) (D) elektrot yüzeylerinin fotoğraf görüntüleri

4.5.3.Enzim Elektrotların SEM Görüntüleri

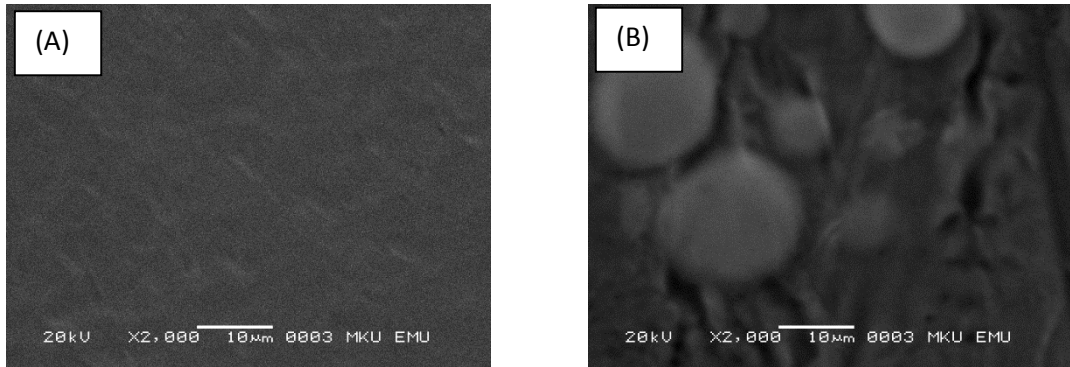
Polimer kaplı (A) ve GOD+Chi ve GAL (B) ile modifiye edilerek hazırlanan elektrotların 2000 kez büyütülmüş SEM görüntüleri PPy, PNMP ve P(Py-co-NMP) için sırasıyla Şekil 4.26, 4.27 ve 4.28’da verilmiştir. Şekil 4.26’de Pt elektrot yüzeyinde sentezlenen PPy filmin homojen ve ince olduğu görülmüştür. PPy film yüzeyinin GOD+Chi ve GAL ile etkileşim sonrası farklı yapının oluştuğunu yansıtan büyük yapıli taneciklerin varlığı görülmektedir. Benzer durum PNMP film yüzeyine GOD+Chi ve GAL ile kaplamalar sonucu da gözlenmiş olup, bazı bölgelerin gözenekli olduğu görülmektedir (Şekil 4.27).



Şekil 4.26. Pt/PPy (A) ve Pt/PPy /GOD+Chi/GAL (B) elektrot yüzeylerinin SEM görüntüleri



Şekil 4.27. Pt/PNMP (A) ve Pt/PNMP/GOD+Chi/GAL (B) elektrot yüzeylerinin SEM görüntüleri



Şekil 4.28. Pt/P(Py-co-NMP) (A) ve Pt/ P(Py-co-NMP) /GOD+Chi/GAL (B) elektrot yüzeylerinin SEM görüntüleri

Şekil 4.28’da PPy-co-PNMP kopolimer filmin PPy ve PNMP homopolimer filmlere göre daha kalın bir görünümlü olduğu düşünülmektedir. Bu yüzeyin etkileşimler sonrası homopolimer film yüzeyindeki etkileşimler sonrasındakinden çok farklı olarak heterojen yapı bir görünüm gözlenmektedir.

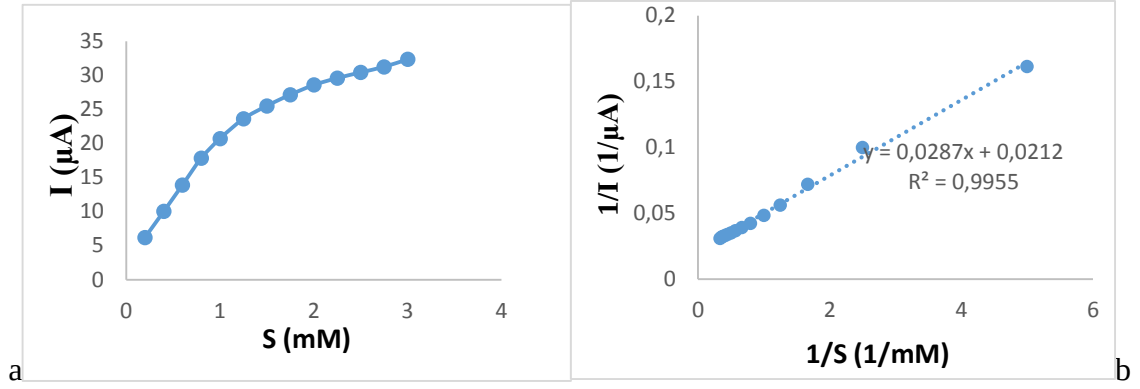
4.6. Enzim Elektrotların Kinetik Parametreleri

Enzimatik reaksiyonlarda, tepkime hızı başlangıçta substrat derişimi ile orantılı olarak artarken, sonrasında substrat derişimi artsa bile tepkime hızı sabit kalır. Bu durumda enzim maksimum hıza ulaşmıştır. Maksimum hızın yarısına ulaşmak için gerekli substrat derişimi K_M olarak tanımlanır. Bu çalışmada tepkime hızının belirlenmesi akım ölçümü ile dolaylı olarak yapılmaktadır. Fiziksel olarak K_M katsayısı enzim ve substratın birbirine olan ilgisini göstermektedir. Enzim ve substrat arasındaki ilgi fazla ise düşük substrat derişimlerinde bile enzimi substrat ile doygun hale getirmek mümkündür (Devlin, 1997).

Optimal koşullarda elde edilen elektrotların tampon çözeltilerdeki akım değerleri kronoamperometrik olarak ölçülmüş, ardından farklı derişimlerde hazırlanmış glukoz çözeltilisindeki akım değerleri ölçülerek akım farkları alınmış, substrat derişimine karşılık gelen net akım değerleri hesaplanarak Michaelis-Menten ve Lineeweaver-Burk eğrileri oluşturulmuştur.

4.6.1. PPy İle Modifiye Edilen Elektrodun Kinetik Parametreleri

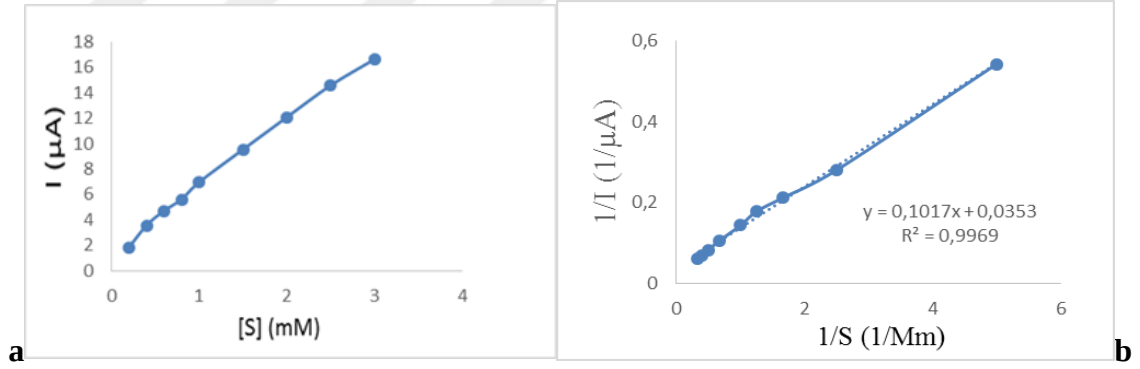
Pt/PPy/Chi+GOD/GAL elektrodunun glukoz derişimine bağlı akım değerleri için elde edilmiş Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri sırasıyla Şekil 4.29.(a) ve Şekil 4.29. (b)'de verilmiştir. Lineweaver-Burk grafiğine göre; edilen denklemde kayma (0,0212) $1/I_{max}$ değerini, eğim (0,0287) ise K_M/I_{max} değerini vermektedir. Bu veriler kullanılarak PPy ile modifiye edilmiş elektrodun I_{max} değeri 47.17 μA , K_M değeri ise 1.35 mM olarak hesaplanmıştır. Li ve Lin (2007), poliaminofenol, polipirol, Pt nanopartikülleri ile camı karbon elektrot üzerinde oluşturdıkları glukoz biyosensöründe, derişime bağlı olarak akım cevabında doğrusal bir artış gözlemiş, K_M ve I_{max} değerlerini sırasıyla 23,9 mM ve 378 μA olarak bulmuştur. Can (2010), yaptığı çalışmada Pt/PPy-GODNapTS için K_M değerlerini sırasıyla 5,2 ve 1,7 mM, I_{max} değerlerini ise 14,2 ve 25,4 μA olarak hesaplamıştır.



Şekil 4.29.PPy ile modifiye edilen elektrot için Michaelis-Menten(a)ve Lineweaver-Burk (b) eğrileri

4.6.2. PNMP İle Modifiye Edilen Elektrodun Kinetik Parametreleri

Pt/PNMP/Chi+GOD/GAL elektrodunun glukoz derişimine bağı akım değerleri için elde edilmiş Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri sırasıyla Şekil 4.30.(a) ve Şekil 4.30. (b)'de verilmiştir.

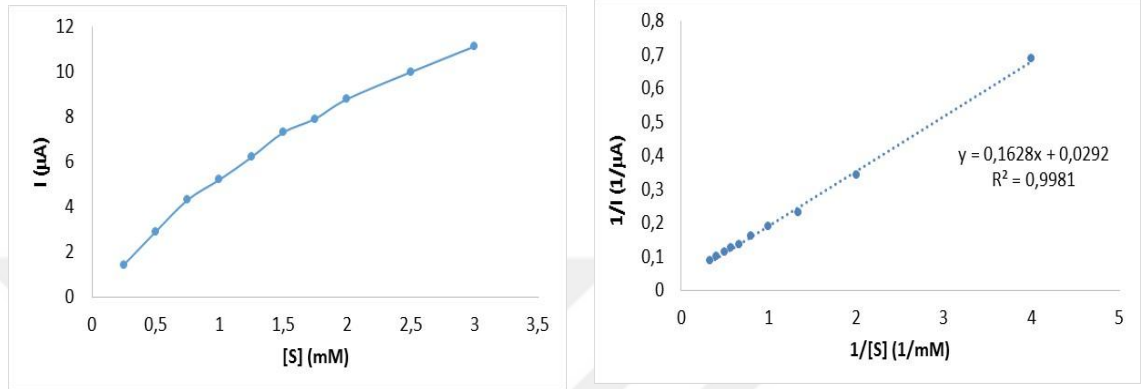


Şekil 4.30.PNMP ile modifiye edilen elektrot için Michaelis-Menten (a) ve Lineweaver-Burk (b) eğrileri

Lineweaver-Burk grafiğine göre; edilen denklemde kayma (0,0353) $1/I_{max}$ değerini, eğim (0,1017) ise K_m/I_{max} değerini vermektedir. Bu veriler kullanılarak PNMP ile modifiye edilmiş elektrodun I_{max} değeri 28,33 μA , K_m değeri ise 2,88 mM olarak hesaplanmıştır.

4.6.3. P(Py-co-NMP) İle Modifiye Edilen Elektrodun Kinetik Parametreleri

Pt/(Py-co-NMP)/Chi+GOD/GAL elektrodunun glukoz derişimine bağlı akım değerleri için elde edilmiş Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri sırasıyla Şekil 4.31.(a) ve Şekil 4.31. (b)'de verilmiştir.



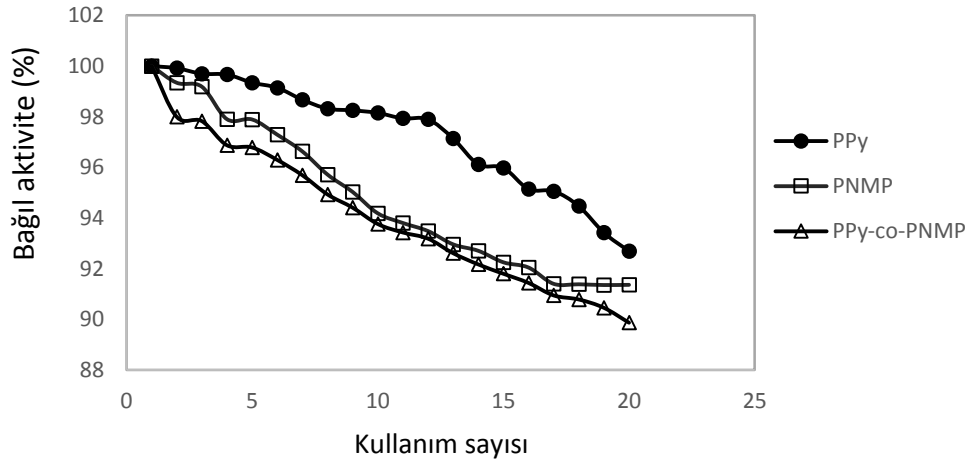
Şekil 4.31.P(Py-co-NMP) ile modifiye edilen elektrot için Michaelis-Menten (a) ve Lineweaver-Burk (b) eğrileri

Lineweaver-Burk grafiğine göre; edilen denklemde kayma (0,0292) $1/I_{max}$ değerini, eğim (0,1628) ise K_m/I_{max} değerini vermektedir. Bu veriler kullanılarak P(Py-co-NMP) ile modifiye edilmiş elektrodun I_{max} değeri 34,25 µA, K_m değeri ise 5,58 mM olarak hesaplanmıştır. Kadam ve ark. (2011), Pt levha üzerine P(Py-co-NMP) kopolimerini galvanostatik olarak kaplayarak GOD esaslı glukoz biyosensörü tasarlamışlardır. Elde ettikleri elektrot için I_{max} ve K_m değerlerini sırasıyla 16,66 µA ve 3,2 mM olarak belirlemişlerdir.

4.7. Enzim Elektrotların Tekrar Kullanım Kararlılıkları

Enzimler kararlı moleküller olmadıklarından bekledikçe veya kullanıldıkça, zamanla aktivitelerini kaybederler. Bu aktivite kaybı istenen bir durum değildir. Biyosensörün kullanım sayısına bağlı olarak aktivitesinin çok fazla değişmemesi kullanılan immobilizasyon tekniğinin iyi olduğunu göstermektedir. Tekrarlanabilirlik biyosensör için çok önemli olup hazırlanan biyosensörle arka arkaya fazla sayıda analiz yapabileceğimizi göstermektedir. Rutin analizlerde tek ölçmede kullanılan kitler maliyet açısından pahalı olduğu için bu şekilde hazırlanan bir biyosensör daha avantajlıdır.

Pt/PPy-Chi+GOD/GAL, Pt/PNMP/Ch,+GOD/GAL ve Pt/P(Py-co-NMP)/Chi+GOD/GAL kaplı elektrotlarla 5 mM glukoz çözeltisinde 20 ardışık ölçüm alınmış ve cevap akımları % bağıl aktivite olarak ölçme sayısına karşı grafiğe geçirildiğinde Şekil 4.32.elde edilmiştir.



Şekil. 4.32. PPy, PNMP ve PPy-co-PNMP ile modifiye edilen enzim elektrotların tekrar kullanım kararlılığı

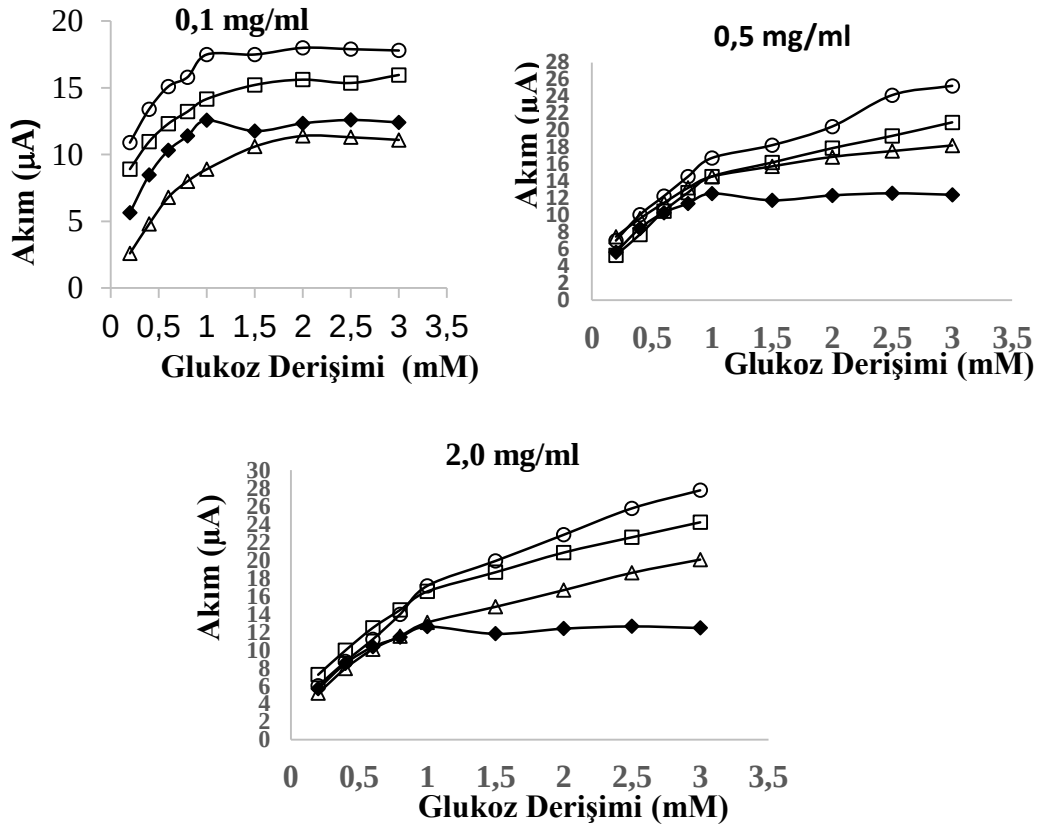
Tekrar kullanım sonucunda her üç elektrot için enzimin yaklaşık aynı akım değerini ölçtüğü söylenebilir. Bağıl aktiviteler PPy için %92,6 , PNMP için %91,36 ve P(Py-co-PNMP) için %89,87 oranında korunmuştur. Bulunan sonuçlar literatür değerleri ile karşılaştırıldığında hazırlanan biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin iyi olduğu söylenebilir. Ozyılmaz ve ark. (2011) GOD enzimini Pt yüzeyinde PPy polimeri içinde hapsetme yöntemi ile immobilize ederek oluşturdukları amperometrik yöntemle oluşturdukları elektrodu 50 defa kullanmışlar ve başlangıçtakine göre % 40 oranında etkinlik kaldığını rapor etmişlerdir.

4.8.PPy İle Oluşturulmuş Enzim Elektrotların Metaloksit Nanopartiküllerle Modifikasyonu

Nanopartiküller, 1 ile 100 nm arasında boyutlarda bulunan materyallerdir. Nanopartiküllerin hızlı kütle transferi, etkin bir şekilde büyük yüzey alanı, yüksek yüzey enerjisi, protein-metal partikülleri yaklaştırma özelliği bulunmaktadır. Ayrıca

elektroanalitik işlemler için hassas, kolay modifiye edilebilir, kararlı bir elektrot yüzeyi oluştururlar. Böylece enzimler biyolojik aktivitelerini kaybetmeden uzun süre kullanılabilir. Bu sebepten biyosensörlerde kullanılan nano yapıları metal ve yarı iletken metal oksitler ile yapılan çalışmalar hızla artmaktadır (Bonnemann ve Richards 2001, Niemeyer 2001, Pingarron vd. 2008).

Bu çalışmada gerek kinetik parametreleri ve gerekse tekrar kullanım kararlılığı gözönünde bulundurulduğunda, PPy kaplı elektrot diğer polimerler ile oluşturulmuş elektrotlara göre belirgin bir üstünlük sağlamıştır. Bu nedenle, PPy kaplı enzim elektrot ticari olarak temin edilmiş ZnO, TiO₂ ve ZnTiO₃ nanopartikülleri ile modifiye edilerek elektron transfer hızına etkileri karşılaştırılmıştır. Bunun için optimal şartlarda Pt elektrot üzerine oluşturulan PPy film üzerine herbir nanopartikül için farklı derişimlerde (0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml ve 2.0 mg/ml) elde edilen Pt/PPy/Chi+GOD+ZnO/GAL, Pt/PPy/Chi+GOD+TiO₂/GAL ve Pt/PPy/Chi+GOD+TiZnO/GAL elektrotların glukoz derişimine bağlı akım değerleri belirlenmiş ve Şekil.4.33.elde edilmiştir.

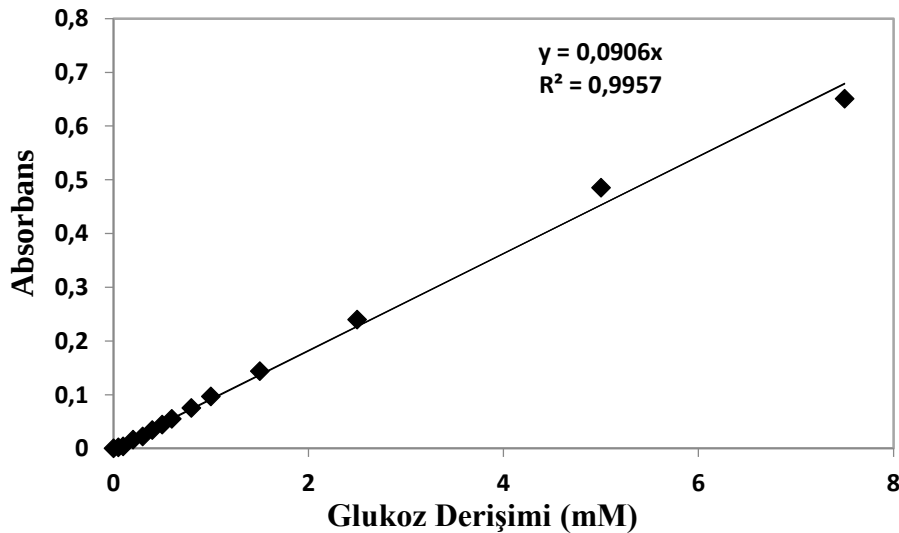


Şekil.4.33.Herbir nanopartikül için farklı derişimlerde hazırlanan elektrotların glukoz derişimine bağlı akım değerleri (♦:Nanopartikülsüz, ○: ZnO, □: TiO₂, △: ZnTiO₃)

Elde edilen grafikler sonucunda 0,1 mg/ml ZnTiO₃ nanopartikül kullanılan çalışma hariç diğer grafiklerde nanopartikül kullanımının elektron transferine katkı sağlayıp akım değerlerini arttırdığı gözlenmiştir. Şekil 4.33' te elde edilen bu grafiklere göre oluşturulan elektrotun farklı nanopartiküllere bağlı olarak ölçülen akım grafikleri incelendiğinde her üç derişim için Pt/PPy/Chi+GOD+ZnO/GAL elektrotun en yüksek performansı gösterdiği belirlenmiştir. ZnO nanopartikülü enzimin aktif bölgesi ile elektrot arasındaki elektron transferini TiO₂ ve ZnTiO₃ nanopartiküllerine göre daha çok hızlandırmıştır.

4.9. PPy İle Oluşturulmuş Enzim Elektrotların Gerçek Örneklerde Glukoz Tayininde Kullanımı

Çalışma koşulları optimize ve karakterize edilen biyosensörün, içecek örneklerindeki glukozun tayini için kullanılabilirliğini tespit etmek amacıyla, elma suyu, üzüm suyu, gazlı içecek ve bal kullanılmıştır. Aynı örneklerin glukoz derişimleri ticari olarak satılan glukoz kitiyle de belirlenmiştir. Ancak bunun için öncelikle glukoz kiti kullanılarak 0,0 - 7,5 mM glukoz çözeltileri ile standart kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. (Şekil 4.34)



Şekil.4.34. Kit ile hazırlanan standart glukoz eğrisi

Uygun oranlarda seyreltilen sıvı örneklerinin glukoz derişimleri glukoz kiti, Pt/PPy/Chi-GOD/GAL ve Pt/PPy/Chi-GOD-ZnO/GAL elektrotları olmak üzere üç farklı şekilde ölçülmüş ve elde edilen sonuçlar çizelge 4.1.de verilmiştir. Glukoz kiti ile bulunan değerler içeceklerin gerçek glukoz derişimi olarak kabul edilmiştir. Çizelgeye göre içeceklerin derişimi ile nanopartikülsüz hazırlanan Pt/PPY/Chi-GOD/GAL elektrotla elde edilen sonuçlar birbirine daha yakın çıkmıştır.

Çizelge.4.1.Bazı içeceklerin glukoz derişimlerinin glukoz kiti ve Pt/PPy/Chi+GOD/GAL ve Pt/PPy/Chi+GOD+ZnO/GAL elektrotları ile belirlenmesi ve karşılaştırılması

	Glukoz Derişimi (mg/dL)		
	Glukoz Kiti	PPy	ZnO NP-PPy
Elma	3,48	4,16	4,99
Üzüm	8,23	8,15	8,50
Gazlı içecek	7,05	6,86	7,23
Bal	85,89	85,97	86,94

Odacı ve ark. (2008), karbon pasta elektrot kullanarak piranoz oksidaz esaslı amperometrik bir biyosensör geliştirerek çeşitli şarap örneklerinin glukoz derişimini DNSA yöntemiyle belirledikleri değerlerin yaklaşık %15 ile %28 aşğısında belirlemişlerdir. Can ve ark. (2010), GOD enzimini pTSA ve NapTS elektrolitleri varlığında PPy sentez ortamına ekleyerek hapsetme yöntemiyle immobilize etmişlerdir. Elde ettikleri enzim elektrotları kullanarak malt içeceği, gazoz, bal, üzüm suyu ve şarapta glukoz tayininde kullanmışlardır. NapTS ile hazırladıkları elektrotun verdiği sonuçların genel olarak ticari glukoz kiti ile elde ettikleri değerlere daha yakın olduğunu tespit etmişlerdir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada hazırlanan modifiye Pt enzim elektrotların, glukozaya duyarlı amperometrik biyosensör olarak kullanılabilecekleri belirlenmiştir.

Yüzeye PPy sentezlenmiş elektrotların genel olarak en yüksek akım değerini gösterdiği belirlenmiştir.

PPy, PNMP ve P(Py-co-NMP) kaplı elektrotların tasarımında monomer derişimi, tarama hızı, Chi, GOD ve GAL moleküllerinin derişimi optimize edilerek en uygun derişim oranı belirlenmiştir.

Çizelge 5.1. Klasik yöntemle optimize edilen elektrotların en uygun tasarım koşulları

Parametre	<u>Elektrodun oluşturulmasında sentezlenen polimer türü</u>		
	PPy	PNMP	P(Py-co-NMP)
Monomer derişimi (mM)	25	50	5:5*
Tarama hızı (mV/s)	50	20	50
Chi derişimi (%)	0,25	1,00	0,50
GOD derişimi (mg/ml)	4	4	4
GAL derişimi (%)	0,05	0,10	0,025

*: toplam 50 mM monomer (25 mM NMP ve 25 mM Py)

Çizelge 5.2’de ise PPy, PNMP ve P(Py-co-NMP) ile oluşturulan enzim elektrotlar için belirlenen I_{max} ve K_M değerleri verilmiştir. En yüksek I_{max} değerini PPy ile hazırlanan enzim elektrot göstermiştir.

Çizelge.5.2. Lineweaver-Burk grafiklerinden yararlanarak elde edilen K_M ve I_{max} değerleri

Monomer	PPy	PNMP	P(Py-co-NMP)
I_{max} (μA)	47,17	28,33	34,25
K_M (mM)	1,35	2,8	5,58

K_M değeri enzimin substrata olan ilgisinin göstergesidir. K_M ne kadar düşükse ilgi o kadar yüksek olduğundan PPy kaplı elektrotun GOD’nin glukozaya olan ilgisini

büyük oranda arttırdığı söylenebilir. Her üç elektrot türünün I_{max} değerleri kıyaslandığında PPy kaplı elektrotun diğer elektrotlara göre oldukça yüksek çıkması pirol monomerinin elektron aktarımına pozitif etkisi olduğunu göstermektedir.

Biyosensör elektrotların elektrokimyasal ve biyokimyasal açıdan karakterizasyonları gerçekleştirilmiş olup biyosensör ile ticari sıvılarda glukoz tayini yapılmıştır.

ZnO , TiO_2 ve $ZnTiO_3$ nanopartikülleri ile hazırlanmış elektrotların glukoz varlığında akım değerleri ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek akım değeri ZnO ile hazırlanmış elektrotta gözlenmiştir.

Elde edilen elektrotların gıda örneklerindeki glukoz derişiminin ölçülmesi ile ilgili çalışmalar yapılarak elektrotların potansiyel kullanım alanları araştırılabilir.

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

Farklı elektrolit türleri denenerek, sentez sıcaklığı, optimum pH optimize edilebilir. Ayrıca polimer kaplı elektrotun depolama kararlılığı incelenebilir.

6.KAYNAKLAR

- Ağcam, S..2016. Pirel ve n-metilpirelin homo ve kopolimer filmleri ile oluşturulan glukoz biyosensörünün tasarlanmasında yanıt yüzey yönteminin kullanımı. Yüksek Lisans Tezi.
- Ali Eftekhari (2004), Eftekhari, A. 2004.Electropolymerization of aniline onto passivated substrate and its application for preparation of enzyme-modified electrode. **Synthetic Metals**, 145: 211-216.
- Bal, Ö., 2012. Biyolojik sıvılardaki glukozun tayini için polipirel filme glukoz oksidaz enziminin immobilizasyonu ile yeni bir biyosensör hazırlanması.Yüksek Lisans Tezi.
- Bayram,E..2015. Nanopartikülle modifiye edilmiş polianilin türevli enzim elektrotların optimizasyonu ve karakterizasyonu. yüksek lisans tez
- Can,F., 2010. Glukoz oksidaz enziminin iletken polimerlere immobilizasyonu ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi.
- Dervisevic M., Çevik, E., Şenel, M., 2015. Development of glucose biosensor based on reconstitution of glucose oxidase onto polymeric redox mediator coated pencil graphite electrodes. **Enzyme and Microbial Technology**, 68: 69-76.
- Devlin, T., 1997. **Text book of biochemistry with clinical correlations**, 136-139
- Eftekhari,A. 2004. Electropolymerization of aniline onto passivated substrate and its application for preparation of enzyme-modified electrode. **Synthetic Metals**, 145: 211-216.
- Garjonyte, R., Malinauskas, A., 2000. Glucose biosensor based on glucose oxidase immobilized in electropolymerized polypyrrole and poly-o-phenylenediamine/films on a prussian blue modified electrode. **Sensors and Actuators**, B, 63:122-128
- Karpuz, G.2013. Polipirel–paratoluensülfonat (ppy-pts) filme ürikaz enziminin immobilizasyonu ile yeni bir biyosensör hazırlanması. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
- Li, J., Lin, X., 2007. Glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in poly(o-aminophenol) film on polypyrrole-Pt nanocomposite modified glassy carbon electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, 22, 2898-2995.
- Malinauskas, A., Garjonyte, R., 2000. Amperometric glucose biosensors based on Prussian Blue-and Polyaniline-glucose oxidase modified electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, 15:445-451
- Özcan, L., 2008. Polipirel iletken polimerinin biyosensör olarak kullanımı. Doktora Tezi. Anadolu Üniversitesi, 114 s, Eskişehir.
- Özyılmaz, G., 2005. Glukoz oksidaz ve katalazın ayrı ayrı ve birlikte immobilizasyonu ve karakterizasyonu. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi, 158 s, Adana.
- Özyurt, M., 2014. Glukoz tayini için yeni bir biyosensör hazırlanması.Yüksek Lisans Tezi
- Ramanavicius, A., Ramanavicien, A., Malinauskas, A.,2006. Electrochemical sensors based on conducting polymer—polypyrrole. **Electrochimica Acta**, 51: 6025–6037

- Rodriguez, M. C. and. Rivas, G. A.,2000. amperometric glucose biosensor based on The deposition of copper and glucose oxidase onto glassy carbon transducer. **Analytical Letters**, 33(12):2373-2389
- Telefoncu A., 1999. **Biyoreseptör immobilizasyonu**. Biyokimya Lisans Üstü Yazokulu, Kuşadası, 42-61.
- Yağız, E., 2015. Modifiye karbon pasta elektrotlarının yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyonu, karakterizasyonu ve biyosensör uygulamalarında kullanımı. Doktora Tezi.
- Wang ve ark. (2012 Wang L., Gao X., Jin L, Wu Q., Chen Z.,Lin X.,2012. Amperometric glucose biosensor based on silver nanowires and glucose oxidase. **Sensors and actuators B: Chemical**, 176: 9-14.



ÖZGEÇMİŞ

Rağibe Hülya AKYÜREKOĞLU, 1987 yılında Antakya’da doğdu. Aynı ilde ilk, orta, lise öğrenimini tamamlayarak 2007 yılında girdiği Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümünden 2011 yılında mezun oldu. 2011 yılında girdiği Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü’nde Yüksek Lisans öğrenimine başladı ve 2014 yılında Eğitim Fakültesinden Formasyon eğitimi aldı. Yazar, evli ve bir çocuk annesidir.

