



T.C.

MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PİROL VE N-METİLPİROLÜN HOMO VE KOPOLİMER FİMLERİ İLE
OLUŞTURULAN GLUKOZ BİYOSENSÖRÜNÜN TASARLANMASINDA
YANIT YÜZEY YÖNTEMİNİN KULLANIMI**

SEDA AĞÇAM

KİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY

OCAK-2016



T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PİROL VE N-METİLPİROLÜN HOMO VE KOPOLİMER
FİLMLERİ İLE OLUŞTURULAN GLUKOZ BİYOSENSÖRÜNÜN
TASARLANMASINDA YANIT YÜZEY YÖNTEMİNİN KULLANIMI**

SEDA AĞÇAM

KİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HATAY
OCAK-2016**

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PİROL VE N-METİL PİROLÜN HOMO VE KOPOLİMER FİMLERİ İLE
OLUŞTURULAN GLUKOZ BİYOSENSÖRÜNÜN TASARLANMASINDA
YANIT YÜZEY YÖNTEMİNİN KULLANIMI**

SEDA AĞÇAM

KİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Doç. Dr. Gül ÖZYILMAZ danışmanlığında hazırlanan bu tez 29/01/2016 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından OYBİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.


Doç. Dr. Gül ÖZYILMAZ
Başkan


Prof. Dr. A. TUNCAY ÖZYILMAZ
Üye


Prof. Dr. Ali KILINÇ
Üye

Kod No:

Prof. Dr. Okan ŞENER
Enstitü Müdürü

Bu çalışma MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.
TÜBİTAK Proje No: 113Z424
MKÜ BAP Proje No:
Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

29/01/2016

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.

SEDA AĞÇAM

ÖZET

PIROL VE N-METİLPİROLÜN HOMO VE KOPOLİMER FİMLERİ İLE OLUŞTURULAN GLUKOZ BİYOSENSÖRÜNÜN TASARLANMASINDA YANIT YÜZEY YÖNTEMİNİN KULLANIMI

Bu çalışmada yüzey alanı $0,09 \text{ cm}^2$ olan platin elektrot (Pt) yüzeyine dönüşümlü voltametri tekniği ile polipirol (PPy), poli-N-Metil pirol (PNMP) ve poli(pirol-ko-N-metil pirol) (PPy-ko-NMP) sentezlenerek üzerine glukoz oksidaz (GOD) enziminin immobilizasyonu ile amperometrik biyosensör tasarımı gerçekleştirilmiştir. Glukoz varlığında ölçülecek akım değeri, biyosensörün hazırlanması ve çalışma koşullarından etkileneceğinden deneysel parametreler yanıt yüzey yöntemi (YYY) ile optimize edilmiştir. Bunun için State Ease Design Expert 8.0.7.1. (Seri No 0021-6578) bilgisayar programı kullanılmıştır. Pt/PPy-GOD-Chi/GAL, Pt/NMP-GOD-Chi/GAL ve Pt/PPy-ko-PNMP/GOD-Chi/GAL enzim elektrotların SEM görüntüleri ile dijital fotoğrafları elde edilmiş ve GOD içermeyen elektrotlar için elde edilen görüntüler ile karşılaştırılmıştır. Elektrotlar, glukoz içeren ve içermeyen ortamlarda dönüşümlü voltametri ve doğrusal taramalı voltametri teknikleri ile karakterize edilmiştir. Optimum potansiyel değerleri Pt/PPy-GOD-Chi/GAL ve Pt/NMP-GOD-Chi/GAL elektrotları için 0,8 V, Pt/PPy-ko-PNMP-GOD-Chi/GAL elektrodu için 0,6 V ve optimum pH değerleri ise PPy ve PNMP ile modifiye edilmiş enzim elektrotlar için 6, PPy-ko-PNMP ile modifiye edilen elektrot için ise 8 olarak bulunmuştur. Glukoz derişimine bağı akım değerlerinde her elektrot için 3mM glukoz derişimine kadar doğrusal bir artış gözlenmiş, ancak daha yüksek glukoz derişimlerinde akım değerlerindeki artış azalmıştır. Lineweaver-Burk eğrisinden Pt/PPy-GOD-Chi/GAL, Pt/NMP-GOD-Chi/GAL ve Pt/(PPy-ko-NMP)-GOD-Chi/GAL için K_m değerleri sırasıyla; 30,5, 17,82 ve 31,72 mM, I_{max} değerleri ise 909,1, 588,23 ve 714,28 μA olarak hesaplanmıştır. Glukoz biyosensörünün tekrar kullanım kararlılığı ve depolama kararlılığı sırasıyla oda sıcaklığı ve 4°C 'de ayrı ayrı ölçülmüştür. Sonuç olarak Pt/PPy-GOD-Chi/GAL elektrodun tekrar kullanım kararlılığı en yüksek iken, depolama kararlılığı en iyi elektrodun Pt/(PPy-ko-NMP)-GOD-Chi/GAL olduğu gözlenmiştir.

2016, 122 sayfa

Anahtar Kelimeler: Yanıt yüzey yöntemi, PPy, PNMP, PPy-ko-PNMP, amperometrik glukoz biyosensörü

ABSTRACT

PYRROLE AND N- METHYLPYRROLE THE HOMO AND COPOLYMER FILMS CREATED WITH GLUCOSE UTILIZATION OF RESPONSE SURFACE METHODOLOGY IN DESIGNING THE BIOSENSORS

In this study, construction of amperometric glucose biosensor was carried out by immobilizing of glucose oxidase (GOD) on platinum electrode with $0,09\text{ cm}^2$ surface area which coated with polypyrrole (PPy), poly(N-methylpyrrole) (PNMP) or poly(pyrrole-co-N-methyl pyrrole) (PPy-co-PNMP) by the cyclic voltammetry technique. Because measuring current values in the presence of glucose affected from electrode preparing and working conditions, experimental parameters were optimized by response surface methodology (RSM). To this, State Ease Design Expert 8.0.7.1. (Serial Number:0021-6578) software was used. The SEM images and digital photo of Pt/PPy-GOD-Chi/GAL, Pt/NMP-GOD-Chi/GAL and Pt/PPy-co-PNMP/GOD-Chi/GAL enzyme electrodes were obtained and compared with GOD free electrodes. All electrodes well characterized in absence and in the presence of glucose by cyclic Voltammetry, linear sweep and impedance techniques. Optimal potential values were determined as 0.8V for Pt/PPy-GOD-Chi/GAL and Pt/NMP-GOD-Chi/GAL electrodes and as 0.6V for Pt/PPy-co-PNMP/GOD-Chi/GAL electrode. Optimal pH values were determined for Pt/PPy-GOD-Chi/GAL and Pt/NMP-GOD-Chi/GAL electrodes as 6, for Pt/PPy-co-PNMP/GOD-Chi/GAL electrode as 8. It was observed that, current values increased by increasing glucose concentration up to 3 mM and then increment in current values decreased at higher glucose concentration of Pt/PPy-GOD-Chi/GAL, Pt/NMP-GOD-Chi/GAL and Pt/PPy-co-PNMP/GOD-Chi/GAL electrodes. K_m valves of were calculated from Lineweaver-Burk plot as 30,5, 17,8 and 31,72 mM, respectively, while I_{max} values were 909,1, 588,23 and 714,28 μA , respectively. Reusabilities and storage stabilities were determined at room temperature and at $4\text{ }^\circ\text{C}$ respectively. As a result, it was observed that, while operational stability was the highest for Pt/PPy-GOD-Chi/GAL, the best storage stability showing electrode was Pt/PPy-co-PNMP/GOD-Chi/GAL.

2016, 122 pages

Keywords: Response surface methodology, Pt electrode, PPy, PNMP, PPy-co-PNMP, amperometric glucose biosensor

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca değerli yardımlarını esirgemeyen, bilgilerini benimle paylaşmaktan çekinmeyip ufkumu açarak yol gösteren, tavsiyelerde bulunan, her zaman yanımda olan, bana zoru sevdiren ve bilimsel annem olarak gördüğüm, danışman hocam Sayın Doç. Dr. Gül ÖZYILMAZ ‘a

Değerli yorumları ve tecrübelerinden yararlandığım kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Ali Tuncay ÖZYILMAZ’a

Her zaman yanımda olan ve tecrübeleriyle yoluma ışık tutan, Esra YAĞIZ, Hülya Ragibe ABAY, Esiye İrem BAYRAM, Taşkın ÇAMURCU, Büşra AVŞAR ve Fatma ÇOLAK’a,

Manevi yardımlarıyla daima yanımda olan, sıcaklıkları ve dostane tavırlarından dolayı Didem GÖKHAN, Pelin AKÇAM ve İzel ÖZDEMİR’e,

Maddi, manevi her zaman beni destekleyen, eğitimi ve kültürlü bir birey olarak yetişmem için benden hiçbir desteğini esirgemeyen sevgi dolu Babam Ali AĞÇAM, annem Selva AĞÇAM, ablam Sedef EKENEL, kardeşim Ufuk AĞÇAM ve tatlı bir gülüşüyle yeniden güç kazanmamı sağlayan yeğenim Defne EKENEL’e sonsuz minnet ve şükranlarımı bir borç bilir, yürekten teşekkür ederim.

Tezi hazırlamam konusunda bana tolerans gösteren, çalıştığım firmaya (CSC Rafine Yağ San. Ve Tic. A.Ş.) teşekkür ederim.

Beni yetiştiren tüm bölüm öğretim elemanlarına, destek ve katkılarından dolayı; MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine, MKÜ Fen Bilimleri Enstitüsüne ve TÜBİTAK’a can-ı yürekten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	XV
1.GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	7
3. MATERYAL VE YÖNTEM	18
3.1. Materyal	18
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	18
3.1.2. Kullanılan Elektrotlar	18
3.1.3. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	18
3.2. Yöntem.....	19
3.2.1. Elektrotların Hazırlanması ve Temizlenmesi.....	19
3.2.2. PPy ile Modifiye Enzim Elektrodun Hazırlanması.....	19
3.2.3. PNMP ile Modifiye Enzim Elektrodun Hazırlanması	20
3.2.4. Kopolimer ile Modifiye Enzim Elektrodun Hazırlanması	21
3.2.5. YYY ile En Uygun Tarama Hızı ve Monomer Derişiminin Optimizasyonu... ..	23
3.2.5.1. PPy için Tarama Hızı ve Monomer Derişiminin Optimizasyonu	23
3.2.5.2. PNMP için Tarama Hızı ve Monomer Derişiminin Optimizasyonunu	24
3.2.5.3. PPy-ko-PNMP için Tarama Hızı ve Monomer Derişiminin Optimizasyonu	25
3.2.6. PPy, PNMP ve PPy-ko-PNMP Kaplı Elektrotlar için Chi, GOD ve GAL Derişiminin YYY ile Optimizasyonu	27
3.2.7. PPy, PNMP ve PPy-ko-PNMP Kaplı Elektrotlar için pH ve Çalışma Potansiyelinin YYY ile Optimizasyonu.....	29
3.2.8. Biyosensörlerin Yapısal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	31
3.2.9. GlukozBiyosensörünün Elektrokimyasal Karakterizasyonu.....	31
3.2.9.1. Glukoz Biyosensörlerinin CV ve DTV Eğrileri.....	31
3.2.9.2. Glukoz Biyosensörlerinin İmpedans Analizleri	31
3.2.10. Glukoz Biyosensörlerinin Biyokimyasal Karakterizasyonu	32
3.2.10.1. Akım Cevabına Glukoz Derişiminin Etkisi	32

3.2.10.2. Glukoz Biyosensörlerinin Tekrar Kullanım Kararlılığının Belirlenmesi	32
3.2.10.3. Glukoz Biyosensörlerinin Depolama Kararlılığının Belirlenmesi	32
4.ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	33
4.1. BULGULAR.....	33
4.1.1. YYY ile Monomer Derişimi ve Tarama Hızı Optimizasyonu	33
4.1.1.1. PPy Sentez Şartlarının Optimizasyonu	33
4.1.1.2. PNMP Sentez Şartlarının Optimizasyonu	40
4.1.1.3. PPy-ko-PNMP Sentez Şartlarının Optimizasyonu.....	46
4.1.2. İletken Polimerlerle Modifiye Edilmiş Elektrotlar için Chi, GOD ve GAL Derişimlerinin YYY ile Optimizasyonu	52
4.1.2.1. PPy Kaplı Elektrot için Chi, GOD ve GAL Derişimlerinin YYY ile Optimizasyonu.....	52
4.1.2.2. PNMP ile Modifiye Edilmiş Elektrottan Enzim Elektrot Tasarımında Chi, GOD ve GAL Derişimlerinin Optimizasyonu.....	60
4.1.2.3. PPy-ko-PNMP Kaplı Elektrodun Chi, GOD ve GAL Derişiminin.....	68
Optimizasyonu	68
4.1.3. Enzim Elektrotların Yapısal Karakterizasyonu.....	75
4.1.3.1. Enzim Elektrotların Dijital Fotoğraf Makinesi ile Elde Edilen Görüntüleri.....	75
4.1.3.2. Enzim Elektrotların SEM Görüntüleri.....	77
4.1.4. Enzim Elektrotların Elektrokimyasal Karakterizasyonu.....	79
4.1.4.1. Enzim Elektrotların TV Analizleri.....	79
4.1.4.1.1. PPy ile Modifiye Edilerek Oluşturulan Enzim Elektrodun CV Analizi.....	79
4.1.4.1.2. PNMP ile Modifiye Edilerek Oluşturulan Enzim Elektrodun CV Analizi	80
4.1.4.1.3. PPy-ko-PNMP ile Modifiye Edilerek Oluşturulan Enzim Elektrodun CV Analizi	81
4.1.4.2. Enzim Elektrotların DTV Analizleri.....	82
4.1.4.2.1. PPy ile Modifiye Edilerek Oluşturulan Enzim Elektrodun LCV Analizi	82
4.1.4.2.2. PNMP ile Modifiye Edilerek Oluşturulan Enzim Elektrodun DTV Analizi.....	83
4.1.4.2.3. PPy-ko-PNMP ile Modifiye Edilerek Oluşturulan Enzim Elektrodun DTV Analizi.....	84
4.1.4.3. Enzim Elektrotların İmpedans Analizleri.....	84
4.1.5. Enzim Elektrotların Biyokimyasal Karakterizasyonu.....	86

4.1.5.1. Enzim Elektrotların Glukoz Akım Cevabı Üzerine pH ve Potansiyel Etkisinin YYY ile Araştırılması	86
4.1.5.1.1. PPy ile Modifiye Enzim Elektrodun Akım Cevabına Potansiyel ve pH Etkisi	87
4.1.5.1.2. PNMP ile Modifiye Enzim Elektrodun Akım Cevabına Potansiyel ve pH Etkisi	92
4.1.5.1.3. PPy-ko-PNMP ile modifiye enzim elektrodun akım cevabına Potansiyel ve pH etkisi.....	97
4.1.6. Enzim Elektrotların Kinetik Parametreleri.....	101
4.1.6.1. PPy ile Modifiye Edilen Elektrodun Kinetik Parametreleri.....	101
4.1.6.2. PNMP ile Modifiye Edilen Elektrodun Kinetik Parametreleri	102
4.1.6.3. PPy-ko-NMP ile Modifiye Edilen Elektrodun Kinetik Parametreleri	103
4.1.7. Enzim Elektrotların Tekrar Kullanım Kararlılığı.....	104
4.1.8. Enzim Elektrotların Depolama Kararlılığı	105
4.2. TARTIŞMA	107
4.2.1. Elektrot Tasarım Parametrelerinin Optimizasyonu.....	107
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	115
KAYNAKLAR	117
ÖZGEÇMİŞ	122

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları	18
Çizelge 3.2. PPy için tarama hızı ve monomer derişimi optimizasyonunda optimal tasarım ile oluşturulan deneysel çalışma programı	24
Çizelge 3.3. PNMP için tarama hızı ve monomer derişimi optimizasyonunda optimal tasarım ile oluşturulan deneysel çalışma programı	25
Çizelge 3.4. Optimal tasarım ile kopolimer derişimi ve tarama hızı için oluşturulan deneysel çalışma programı	27
Çizelge 3.5. Biyosensör tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin YYY ile optimizasyonunda Box-Behnken tasarım değerleri	28
Çizelge 3.6. Glukoz biyosensörlerinin Box-Behnken tasarımı ile oluşturulmuş Chi-GOD ve GAL optimizasyonuna ait çalışma setleri.....	29
Çizelge 3.7. Glukoz biyosensörlerinin optimal tasarım ile oluşturulmuş pH ve çalışma potansiyeli optimizasyonuna ait çalışma setleri	30
Çizelge 4.1. PPy sentez koşullarının optimizasyonunda YYY deney seti ve 4 farklı glukoz derişimi için ölçülen net akım cevapları	34
Çizelge 4.2. PPy-monomer derişimi ve tarama hızı oranının optimizasyonu çalışmasında elde edilen sonuçlara göre yapılan matematiksel model analizi	35
Çizelge 4.3. PPy monomer derişimi ve tarama hızının optimizasyonu çalışmasına ait ANOVA analizi (Kuatratik Model)	35
Çizelge 4.4. PNMP sentez koşullarının optimizasyonunda YYY deney seti ve 4 farklı glukoz derişimi için ölçülen net akım cevapları	41
Çizelge 4.5. PNMP-monomer derişimi ve tarama hızının optimizasyonu çalışmasında elde edilen sonuçlara göre yapılan matematiksel model analizi	42
Çizelge 4.6. PNMP monomer derişimi ve tarama hızının optimizasyonu çalışmasına ait ANOVA analizi (Kuatratik Model)	42
Çizelge 4.7. PPy-ko-PNMP sentez koşullarının optimizasyonunda YYY deney seti ve 4. farklı glukoz derişimi için ölçülen net akım cevapları.....	47
Çizelge 4.8. PPy-ko-PNMP-monomer derişimi ve tarama hızı oranını optimizasyonunda elde edilen sonuçlara göre yapılan matematiksel model analizi	48
Çizelge 4.9. PPy-ko-PNMP sentez koşullarının optimizasyonu çalışmasının ANOVA analizi (Kuatratik Model)	48
Çizelge 4.10. PPy ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box-Behnken tasarımı ile optimizasyonu	53
Çizelge 4.11. PPy ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin optimizasyonunda elde edilen sonuçlara göre matematiksel model analizi.....	54

Çizelge 4.12. PPy ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box-Behnken tasarımı ile optimizasyonu ANOVA analizi	54
Çizelge 4.13. PPy ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box Behnken tasarımı ile optimizasyonu ANOVA analizi (Kuadratik Model).....	55
Çizelge 4.14. PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box Behnken tasarımı ile optimizasyonu	61
Çizelge 4.15. PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin YYY optimizasyonunda elde edilen sonuçlara göre matematiksel model analizi.....	62
Çizelge 4.16. PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box Behnken tasarımı ile optimizasyonu ANOVA analizi (Lineer Model)	62
Çizelge 4.17. PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box-Behnken tasarımı ile optimizasyonu-ANOVA analizi (Kuadratik Model)	63
Çizelge 4.18. PPy-ko-PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box-Behnken tasarımı ile optimizasyonu.....	69
Çizelge 4.19. PPy-ko-PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin optimizasyonu çalışmasında elde edilen sonuçlara göre yapılan matematiksel model analizi	69
Çizelge 4.20. PPy-ko-PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box-Behnken tasarımı ile optimizasyonu (ANOVA analizi).....	70
Çizelge 4.21. PPy ile oluşturulmuş enzim elektrodun pH ve potansiyel değerlerinin optimizasyonunda glukoz derişimine bağlı akım cevabı (Optimal tasarım)	87
Çizelge 4.22. PPy ile oluşturulmuş enzim elektrodun pH ve çalışma potansiyeli optimizasyonu çalışmasında elde edilen sonuçlara göre matematiksel model analizi	88
Çizelge 4.23. PPy ile oluşturulmuş enzim elektrodun pH ve çalışma potansiyeli optimizasyonuna ait modifiye edilmiş ANOVA değerlendirmesi (Kübik Model).....	89
Çizelge 4.24. PNMP ile oluşturulmuş enzim elektrodun pH ve potansiyel değerlerinin optimizasyonu glukoz derişimine bağlı akım cevabı(Optimal tasarım).....	92
Çizelge 4.25. PNMP ile oluşturulmuş enzim elektrodun pH ve çalışma potansiyeli optimizasyonunda elde edilen sonuçlara göre matematiksel model analizi.....	93

Çizelge 4.26. PNMP ile oluşturulmuş enzim elektrodun pH ve potansiyel değerlerinin optimal tasarımı ANOVA analizi (Kübik model).....	93
Çizelge 4.27. PPy-ko-PNMP ile oluşturulmuş enzim elektrodun pH ve potansiyel değerlerinin optimizasyonunda glukoz derişimine bağı akım cevabı (Optimal tasarım).....	97
Çizelge 4.28. PPy-ko-PNMP ile oluşturulmuş enzim elektrodun pH ve çalışma potansiyeli optimizasyonunda elde edilen sonuçlara göre matematiksel model analizi.....	98
Çizelge 4.29. PPy-ko-PNMP ile oluşturulmuş enzim elektrodun pH ve potansiyel değerlerinin Optimal tasarımı ANOVA analizi (Kubik model).....	99
Çizelge 4.30. Elektrot yüzeylerine ait optimum pH ve çalışma potansiyeli değerleri.....	117
Çizelge 4.31. Enzim elektrotların elektrokimyasal ve biyokimyasal optimizasyonu ve karakterizasyonunda elde edilen veriler.....	112

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. GOD esaslı amperometrik biyosensörün çalışma prensibi	4
Şekil 3.1. Pirool(Py) ve Polipiroolün(PPy) kimyasal yapısı	19
Şekil.3.2. N-Metilpirol(NMP) ve Poli-N-Metilpirolün(PNMP) Kimyasal Yapısı	20
Şekil 3.3. Sentezde kullanılan Pocket Stat (IVIUM) ve üç elektrot sistemi	21
Şekil 3.4. Oluşturulan enzim elektrodun şematik gösterimi	22
Şekil 3.5. Enzim elektrodun tasarım aşamaları	22
Şekil 4.1. PPy sentezinin YYY ile optimizasyonunda elde edilen gerçek ve tahmini değerler grafiği	38
Şekil 4.2. Elektrot tasarımında PPy sentezi aşamasında Py derişimi ve tarama hızı etkisinin yanıt yüzey grafiği	39
Şekil 4.3. Elektrot tasarımında PPy sentezi aşamasında Py derişimi ve tarama hızı etkisinin kontur grafiği	39
Şekil.4.4. Optimum derişim(10 mM) ve tarama hızında (50 mV/s) Pt elektrot yüzeyine, sentezlenmiş PPy'ye ait CV eğrisi	40
Şekil 4.5. Elektrot tasarımında PNMP sentezi aşamasında NMP derişimi ve tarama hızı etkisinin gerçek ve tahmini değerler grafiği	44
Şekil 4.6. Elektrot tasarımında PNMP sentezi aşamasında NMP derişimi ve tarama hızı etkisinin yanıt yüzey grafiği	44
Şekil 4.7. Elektrot tasarımında PNMP sentezi aşamasında NMP derişimi ve tarama hızı etkisinin kontur grafiği	45
Şekil.4.8. Optimum derişim(10 mM) ve tarama hızında (20 mV/s) Pt elektrot yüzeyine, sentezlenmiş PNMP'ye ait CV eğrisi	46
Şekil 4.9. Elektrot tasarımında PPy-ko-NMPPsentezi aşamasında NMP derişimi ve tarama hızı etkisinin gerçek ve tahmini değerler grafiği (Toplam monomer derişimi: 10mM)	50
Şekil 4.10. Elektrot tasarımında PPy-ko-PNMP sentezi aşamasında NMP derişimi ve tarama hızı etkisinin yanıt yüzey grafiği (Toplam monomer derişimi: 10mM)	50
Şekil 4.11. Elektrot tasarımında PPy-ko-PNMP sentezi aşamasında NMP derişimi ve tarama hızı etkisinin kontur grafiği (Toplam monomer derişimi: 10 mM)	51
Şekil.4.12. Optimum derişim(5:5 mM) ve tarama hızında (50 mV/s) Pt elektrot yüzeyine, sentezlenmiş PPy-ko-PNMP'ye ait CV eğrisi	51
Şekil 4.13. PPy ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen gerçek ve tahmini değerler grafiği	56
Şekil 4.14. PPy ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box-Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen yanıt yüzey grafiği	57

Şekil 4.15. PPy ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box-Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen kontur grafiğı.....	57
Şekil 4.16. PPy ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box-Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen yanıt yüzey grafiğı.....	58
Şekil 4.17. PPy ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box -Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen kontur grafiğı	59
Şekil 4.18. PPy ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box-Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen yanıt yüzey grafiğı.....	59
Şekil 4.19. PPy ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box- Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen kontur grafiğı	60
Şekil 4.20. PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen gerçek ve tahmini değerler grafiğı	64
Şekil 4.21. PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen yanıt yüzey grafiğı.....	65
Şekil 4.22. PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box-Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen kontur grafiğı	65
Şekil 4.23. PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box-Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen yanıt yüzey grafiğı.....	66
Şekil 4.24. PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box-Behnken tasarımı ile optimizasyonunda Kuadratik model için elde edilen kontur grafiğı	66
Şekil 4.25. PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen yanıt yüzey grafiğı.....	67
Şekil 4.26. PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box-Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen kontur grafiğı.....	67
Şekil 4.27. PPy-ko-PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box-Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen gerçek ve tahmini değerler grafiğı	71

Şekil 4.28. PPy-ko-PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box-Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen yanıt yüzey grafiğı	72
Şekil 4.29. PPy-ko-PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box-Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen kontur grafiğı	72
Şekil 4.30. PPy-ko-PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box-Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen yanıt yüzey grafiğı	73
Şekil 4.31. PPy-ko-PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box-Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen kontur grafiğı	73
Şekil 4.32. PPy-ko-PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box-Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen yanıt yüzey grafiğı	74
Şekil 4.33. PPy-ko-PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box -Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen kontur grafiğı	74
Şekil 4.34. Pt (A), Pt/PPy (B), Pt/PPy/GOD+Chi (C) ve Pt/PPy/GOD+Chi/GAL (D) elektrot yüzeylerinin fotoğraf görüntüleri	75
Şekil 4.35. Pt (A), Pt/PNMP (B), Pt/PNMP/ Chi-GOD (C) ve Pt/PNMP/ Chi-GOD/GAL (D) elektrot yüzeylerinin fotoğraf görüntüleri	76
Şekil 4.36. Pt (A), Pt/PPy-ko-PNMP(B), Pt/PPy-ko-PNMP)/ Chi /GOD (C) ve Pt/PPy- ko-PNMP /GOD+Chi/GAL (D) elektrot yüzeylerinin fotoğraf görüntüleri	77
Şekil 4.37. Pt/PPy (A) ve Pt/PPy / Chi-GOD/GAL (B) elektrot yüzeylerinin SEM görüntüleri	78
Şekil 4.38. Pt/PNMP (A) ve Pt/PNMP/ Chi-GOD /GAL (B) elektrot yüzeylerinin SEM görüntüleri	78
Şekil 4.39. Pt/PPy-ko-PNMP (A) ve Pt/PPy-ko-PNMP /GOD+Chi/GAL (B) elektrot yüzeylerinin SEM görüntüleri	79
Şekil.4.40. PPy ile modifiye edilerek oluşturulan enzim elektrodun glukoz içermeyen (-) ve glukoz içeren (-) tampon çözeltide elde edilen CV diyagramı (50 mV/s).....	79
Şekil 4.41. PNMP ile modifiye edilerek oluşturulan enzim elektrodun glukoz içermeyen (-) ve glukoz içeren (-) tampon çözeltide elde edilen CV diyagramı (20mV/s).....	80
Şekil 4.42. PPy-ko-PNMP ile modifiye edilerek oluşturulan enzim elektrodun glukoz içermeyen (-) ve glukoz içeren (-) tampon çözeltide elde edilen CV diyagramı (100 mV/s)	81

Şekil 4.43. PPy ile modifiye edilerek oluşturulan enzim elektrodun glukoz içermeyen (-) ve glukoz içeren (-) tampon çözeltide elde edilen DTV diyagramı (10 mV/s).....	82
Şekil 4.44. PNMP ile modifiye edilerek oluşturulan enzim elektrodun glukoz içermeyen (-) ve glukoz içeren (-) tampon çözeltide elde edilen DTV diyagramı (10 mV/s).....	83
Şekil 4.45. PPy-ko-PNMP ile modifiye edilerek oluşturulan enzim elektrodun glukoz içermeyen (-) ve glukoz içeren (-) tampon çözeltide elde edilen DTV diyagramı (10 mV/s).....	84
Şekil 4.46. PPy ile modifiye edilerek oluşturulan enzim elektrodun glukoz içermeyen (-) ve glukoz içeren (-) tampon çözeltide elde edilen impedans ve Nyquist eğrileri	85
Şekil 4.47. PNMP ile modifiye edilerek oluşturulan enzim elektrodun glukoz içermeyen (-) ve glukoz içeren (-) tampon çözeltide elde edilen impedans ve Nyquist eğrileri	85
Şekil 4.48. PPy-ko-PNMP ile modifiye edilerek oluşturulan enzim elektrodun glukoz içermeyen (-) ve glukoz içeren (-) tampon çözeltide elde edilen impedans ve Nyquist eğrileri	86
Şekil 4.49. PPy ile oluşturulmuş enzim elektrodun pH ve potansiyel değerlerinin optimizasyonunda gerçek ve tahmini değerler grafiği	90
Şekil 4.50. PPy ile oluşturulmuş enzim elektrodun pH ve potansiyel değerlerinin optimizasyonunda elde edilen yanıt yüzey grafiği.....	91
Şekil 4.51. PPy ile oluşturulmuş enzim elektrodun pH ve potansiyel değerlerinin optimizasyonunda elde edilen kontur grafiği	91
Şekil 4.52. PNMP ile oluşturulmuş enzim elektrodun pH ve potansiyel değerlerinin optimizasyonunda elde edilen gerçek ve tahmini değerler grafiği.....	95
Şekil 4.53. PNMP ile oluşturulmuş enzim elektrodun pH ve potansiyel değerlerinin optimizasyonunda elde edilen yanıt yüzey grafiği	96
Şekil 4.54. PNMP ile oluşturulmuş enzim elektrodun pH ve potansiyel değerlerinin optimizasyonunda elde edilen kontur grafiği	96
Şekil 4.55. PPy-ko-PNMP ile oluşturulmuş enzim elektrodun pH ve potansiyel değerlerinin optimizasyonunda elde edilen gerçek ve tahmini değerler grafiği	100
Şekil 4.56. PPy-ko-PNMP ile oluşturulmuş enzim elektrodun pH ve potansiyel değerlerinin optimizasyonunda elde edilen yanıt yüzey grafiği	100
Şekil 4.57. PPy-ko-PNMP ile oluşturulmuş enzim elektrodun pH ve potansiyel değerlerinin optimizasyonunda elde edilen kontur grafiği.....	101
Şekil 4.58. PPy ile modifiye edilmiş elektrodun Michaelis Menten (A) ve Lineweaver-Burk grafiği (B).....	102

Şekil 4.59. PNMP ile modifiye edilmiş elektrodun Michaelis-Menten (A) ve Lineweaver-Burk grafiği (B).....	103
Şekil 4.60. PPy-ko-PNMP ile modifiye edilmiş elektrodun Michaelis-Menten (A) ve Lineweaver-Burk grafiği (B).....	104
Şekil 4.61. PPy, PNMP ve PPy-ko-PNMP ile modifiye edilen enzim elektrotların tekrar kullanım kararlılığı	105
Şekil 4.62. Enzim elektroların depolama kararlılıkları ile modifiye elektrotlar	106



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

A	: Akım (A)
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
ANOVA	: Varyans Analizi
BphC_LA-4	: 2,3dihidroksibifenil 1,2-dioksigenaz
Chi	: Kitosan
CO₂	: Karbondioksit
CV	: Dönüşümlü Voltametri
C.V.	: Varyasyon Katsayısı
DTV	: Doğrusal Taramalı Voltametri
dk	: Dakika
FAD	: Flavın Adenin Dinükleotid
GAL	: Glutaraldehit
GCE	: Camsı Karbon Elektrot
GOD	: Glukoz Oksidaz
HCl	: Hidroklorik Asit
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HRP	: Peroksidaz
I_{max}	: Maksimum Akım
K_m	: Michaelis-Menten Hız Sabiti
DTV	: Doğrusal Taramalı Voltametri
NaOx	: Sodyum Okzalit
PB	: Prusya Mavisi
POA	: Poli-o-anisidin
POA-ko-POT	: Poli-o-anisidin-ko-o-toluidin
POPD	: Poli o-fenildiaminin
POT	: Poli-o-toluidin
PPyNWA	: Polipirol nanotel
Pred-R²	: Tahminlenmiş Belirtme Katsayısı
PNMP	: Poli N-metilpirol
PPy	: Poli Pirol
PRESS	: Tahmini Kalıntı Hata Kareler Toplamı

PPy-ko-PNMP	: Poli-pirol ve poli-N-metilpirol kopolimeri
Pt	: Platin
RSD	: Rölatif Standart Sapma
RSM	: Response Surface Methodology
R²	: Belirtme Katsayısı
R²_{adj}	: Düzeltilmiş Belirtme Katsayısı
[S]	: Substrat Derişimi
SD	: Serbestlik Derecesi
SEM	: Scanning Electron Microscopy
YYY	:YanıtYüzeyYöntemi



1.GİRİŞ

Basit bir monosakkarit olan glukoz, yaşam için en önemli karbohidratlardan biridir. Hücreler onu bir enerji kaynağı ve metabolik reaksiyonlarda bir ara ürün olarak kullanırlar. Fotosentezin ana ürünlerinden biridir ve hücresel solunum onunla başlar. Glukoz, canlılarda çok yaygın bulunan bir yakıttır. Glukozun enzimler yardımıyla yıkılması olarak bilinen glikoliz ve bunu izleyen sitrik asit döngüsü yoluyla glukoz, CO₂ ve suya oksitlenerek enerji sağlar.

Glukoz tayini, gıda işlemleri ve fermentasyonda olduğu kadar hayati ve ticari açıdan da çok önemlidir. Diyabetin izlenmesi ve tıbbi teşhis amacıyla glukoz tayini oldukça yaygın bir şekilde yapılmaktadır. Deri altı dokularında glukoz derişimini sürekli bir değerlendirmeye tabi tutabilmek ve kandaki glukoz seviyesini belirleyebilmek amacıyla duyarlı, seçici, güvenilir ve düşük maliyetli glukoz sensörü üretimi giderek artmaktadır (Ustabaş, 2010).

Biyosensörler, tayin edilecek moleküle duyarlı bir biyolojik bileşenin, etkileşim sonucu oluşan değişimleri elektrik sinyaline dönüştüren fizikokimyasal bir dönüştürücüyle birleştirilmiş analitik cihazlardır. Biyosensörün amacı; analitin miktarı ile orantılı elektrik sinyali üretmektir. Biyosensör sistemleri üç temel bileşenden oluşmaktadır. Bunlar; seçici tanıma mekanizmasına sahip 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).

Biyosensörler klinik tıpta teşhis ve tayin amacıyla, fermentasyon analizi ve kontrolünde biyoloji, kimya, gıda endüstrisi, ziraat ve veterinerlikteki çeşitli analizlerde, endüstriyel gaz ve sıvıların analizinde, çevre kirlenmesinin izlenmesinde, patlayıcılar ve diğer askeri alanlarda kullanılmaktadır.

Biyosensörler dönüştürücünün türüne göre optik, (Gerard ve ark.,1999; Singhal ve ark., 2000), kalorimetrik, (Mosbach ve Danielsson, 1981; Xie ve ark., 1993) piezoelektrik ve elektrokimyasal dönüştürücüler olarak sınıflandırılabilir. Elektrokimyasal dönüştürücü türleri de kendi aralarında; amperometrik (Umana ve Waller, 1986; Fortier ve Belanger, 1995; Bayram, 2015; Yağız, 2015), potansiyometrik

(Ratcliffe,1990; Trojanowicz ve ark., 1993), yarı iletken ve kondüktometrik (Nishizawa ve ark.,1992; Contractor ve ark., 1994) dönüştürücüler olarak dört gruba ayrılır.

Amperometri; sabit uygulanan bir potansiyelde elektrokimyasal bir hücredeki akım değerlerinin ya da yoğunluğunun ölçümüne dayanır. Akım yoğunluğu, çalışma elektrodu yüzeyinde yükseltgenme veya indirgenme tepkimelerine giren, çözeltideki elektrokimyasal olarak aktif türlerin bir fonksiyonudur ve bu türlerin derişimleri ile orantılıdır (Erden, 2010).

Amperometrik biyosensörler; biyosensörlerden bahsedilince akla ilk gelen genel ve yaygın kullanım imkanı bulmuş, analiz amacına yönelik biyoanalitik sistemlerdir. Bu biyosensörler, sabit bir potansiyelde indirgenen ya da yükseltgenen bazı elektroaktif türlerin derişimi ile orantılı olarak açığa çıkan elektron yoğunluğunun elektrokimyasal bir hücrede akım şiddetinin ölçümünü esas alır. (Telefoncu, 1999). Amperometrik biyosensörlerdeki en önemli faktör enzim ile elektrot arasındaki elektron akışıdır. Bu sistemlere en uygun enzimler oksidazlar, dehidrogenazlar gibi oksidoredüktaz sınıfı enzimlerdir (Clark, 1962). Amperometrik biyosensörlerin en önemli avantajı elektrokimyasal hücrede 10^{-8} M'dan daha düşük derisimlere sahip analitlerin tayininin yapılabilir olmasıdır (Dzyadevych ve ark., 2011).

Bir amperometrik enzim elektrodun 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 kılmaktadır (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).

Literatürde iletken polimerler ile hazırlanmış biyosensörlerle ilgili çok sayıda yayın bulunmaktadır. Polipirol (Sung ve ark., 2003; Can, 2010; Chen ve ark., 2005;

Ma ve ark., 2003), poli (3,4-etilen dioksitiyofen), (Lupu, 2013), poli-o-anisidin ve poli-o-toluidin (Borole ve ark., 2004; Bayram, 2015), polivinilferrosen (Yavuz, 2005), Polianilin (Abhijit, 2013, Borole ve ark., 2004; Zejun ve ark., 2014; Jie ve ark., 2015), Poliasetilen (Saraswathi ve ark., 1993), Politiyofen (Kawai ve ark., 1990), Poli indol (Santhanam ve Gupta, 1993), Polipropilen imin (Shukla ve ark., 2014), Polisülfür nitrit (Greene ve ark.,1975), Poliparafenilen (Ivory ve ark.1979), poli o-fenildiaminin (POPD), (Malinauskas ve ark.,2000), Poli-vinil sülfonat (Gambhir ve ark.,2001), Poli-N-Metil Pirol (Miyamoto ve ark.,1990) gibi polimerlerle ilgili çalışmalar yapmışlardır.

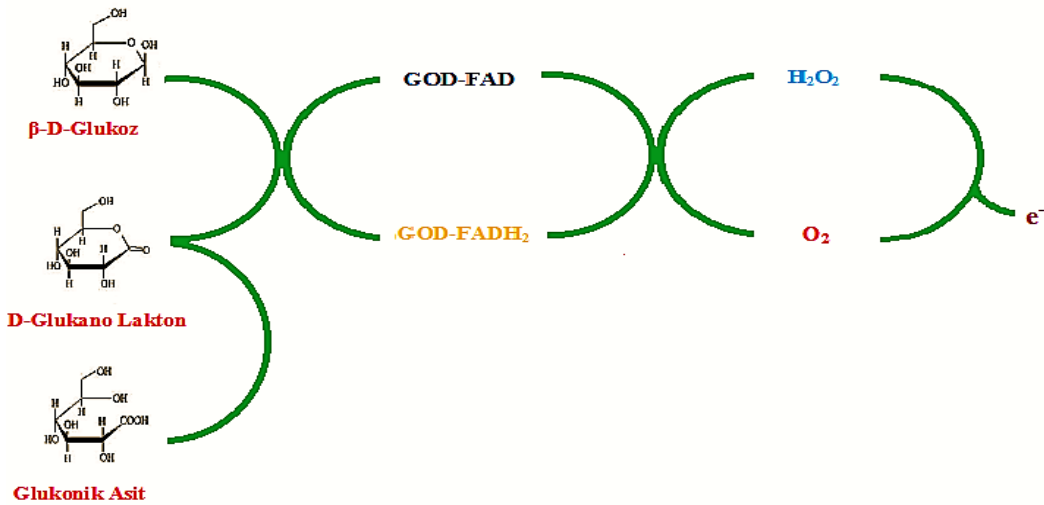
Elektrokimyasal polimerleşme, üç elektrotlu bir hücrede monomer ve destek elektrolitini içeren uygun bir çözücüde gerçekleştirilir. Elektropolimerleşme, ince filmler elde etmek için potansiyostatik (gerilim kontrollü), kalın filmler elde etmek için galvanostatik (akım kontrollü) yürütülebileceği gibi dönüşümlü voltametrik (gerilim taramalı) olarak da gerçekleştirilebilir (Deshpande ve Amalnerkar, 1993).

Elektrokimyasal sentezler; çalışma, referans ve karşıt elektrottan oluşan bir hücrede gerçekleştirilir. Çalışma elektrotu olarak altın (Lu ve ark., 2002; Zhang ve ark., 2004), platin (Malinauskas ve Garjonyte, 2000; Ma ve ark., 2005; Ren ve ark., 2009; Bayram, 2015), titanyum (Song ve ark., 2011), nikel, (Zhao ve ark., 2007; Sue ve ark., 2008), camı karbon (Huang, K.J., 2012), karbon (Anazawa ve ark., 2002; Yağız, 2015) vb. malzemeler kullanılmakta ve bu elektrotların yüzeyinde elektropolimerleşme gerçekleştirilmektedir. Elektrokimyasal polimerleşme ile iletken polimer oluşturabilecek monomerler, nispeten düşük yükseltgenme gerilimine sahiptirler ve elektrofilik süstitüsyon reaksiyonu gösterme eğilimindedirler. İletken polimerler biyolojik türler için uygun bir immobilizasyon ortamı olarak kullanılır. Bu malzemelerin redoks özelliklerinden dolayı son yıllarda kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır. Özellikle polipirol nispeten daha kararlı olması, kolay hazırlanması ve iletkenliğinin yüksek olmasından dolayı, sensör çalışmalarında en umut verici iletken polimerdir (Ahuja ve ark.,2007).

Amperometrik biyosensörlerin tasarımında kullanılan en önemli biyolojik bileşen olan enzimler, canlı organizmalardaki biyokimyasal reaksiyonları gerçekleştiren protein yapısında olan biyolojik katalizörlerdir. Enzimler, reaksiyonları enzim içermeyen bir reaksiyona göre 10^7 ila 10^{16} kat arttırabilirler. Biyosensör tasarımında enzimler çoğunlukla elektrot yüzeyine immobilize edilmektedir. İmmobilizasyon işlemi

elektrot bünyesindeki enzimin substratı ile etkileşimini önemli derecede etkiler (Yağız,2015). Bu nedenle biyosensör tasarımı enzimin immobilizasyonu önemli bir basamaktır. Biyosensör tasarımı kullanılan ilk ve en yaygın kullanılan enzim glukoz oksidazdır (Luque ve ark., 2005; Li ve Lin, 2007; Comba ve ark., 2010; Özyılmaz ve ark., 2011). Bunun dışında , β -galaktozidaz (Amam ve Fransear, 2010), fruktoz dehidrogenaz (Trivedi ve ark., 2009), α -amilaz (Zajoncova ve ark., 2004), alkol oksidaz (Azevedo ve ark., 2005), lipaz (Kartal ve ark., 2007) gibi enzimler de biyosensör uygulamalarında kullanılmaktadır.

Endüstriyel, biyomedikal ve biyoteknolojik araştırmalarda son yıllarda yaygın olarak kullanılan, oksidoredüktaz enzim sınıfının bir üyesi olan glukoz oksidaz (GOD) (EC 1.1.3.4, β -D-glukoz: oksijen oksidoredüktaz), glukozu moleküler oksijen varlığında glukono-1,5-laktona yükseltgeyerek hidrojen peroksit (H_2O_2) açığa çıkarır. Açığa çıkan lakton sulu ortamda herhangi bir enzime ihtiyaç duymaksızın hidroliz olarak glukonik aside dönüşür. Molekül ağırlığı enzimin kaynağına ve türüne göre 120 kDa (Witt ve ark., 1998) ile 290 kDa (Shin ve ark., 1993) arasında değişebilen GOD, dimerik ya da tetramerik bir proteindir. GOD, yapısında non-kovalent olarak bulunan Flavin Adenin Dinükleotid (FAD) molekülü sayesinde oksidasyonu gerçekleştirir. Bu reaksiyonlarda açığa çıkan H_2O_2 'nin sabit potansiyelde moleküler oksijene oksidasyonu sonucu oluşan elektron yoğunluğunun akım olarak ölçümü amperometrik biyosensörün temelini oluşturur. GOD esaslı amperometrik biyosensörün çalışma prensibi Şekil 1.1'de verilmiştir.



Şekil 1.1. GOD esaslı amperometrik biyosensörün çalışma prensibi

Her ne kadar ölçülecek akım yoğunluğu; glukoz derişimi ile orantılı olsa da, bu değerin büyüklüğü enzim elektrodun oluşturulma ve amperometrik ölçüm şartlarına bağılı olarak değışim gösterecektir. Dolayısıyla en yüksek akım değerlerini elde etmek amacıyla çalışma koşullarının optimizasyonu yapılmalıdır.

Optimizasyon, deneysel çalışmalarda verimliliğı arttırmak, üretimde kaliteyi yükseltmek, maliyeti düşürmek, kaynak ve zamandan tasarruf etmek amacıyla hemen her araştırmanın başlangıcında gerçekleştirilen çalışmanın bir adımıdır. Geleneksel deney tasarım yöntemleri yüksek malzeme maliyeti, uzun zaman ve kaynak gerektiren yöntemlerdir. Her bir parametrenin deney üzerindeki etkisini araştırmak için diğ er bütün parametreler sabit tutularak her seferinde bir parametre denenir. Bu durumda parametrelerin aynı anda 4 ya da 5'ten fazla seviyelerinin incelenmesine olanak sağlamaz. Dolayısıyla; deney sayısının azaltılması, zamandan ve maliyetten tasarruf, kaynakların verimli kullanılması ve araştırma-geliştirme faaliyetlerinin hızlandırılması için sistemin incelenen değ erinin ölçülmesini sağlayacak deneylerin tasarlanması gerekmektedir (Subaşı, 2010). Bu amaçla ürünün veya üretim prosesinin performansını optimum noktaya eriş tirmek için kullanılan ve bir optimizasyon tekniğı olan Yanıt Yüzey Yöntemi (YYY) (Response Surface Methodology) 1951 yılında Wilson ve Box tarafından tanımlanmış ve geliştirilmiştir. Kimya endüstrisinde ilk kez Myers ve Montgomery tarafından kullanılan YYY, proseslerin geliştirilmesi ve optimizasyonu için gerekli istatistiksel ve matematiksel tekniklerin birlikte kullanıldığı bir yöntem olarak tanımlanmıştır (Subaşı, 2010). YYY'de iki ya da daha fazla değ işken kullanılarak modelleme yapılmaktadır. Bu yöntem ile daha az değ işken kullanılarak ürün performansının ve sürecin iyileştirilmesi amaçlamaktadır. Yanıt modellerini oluşturmak için gerekli veriler genellikle tam faktöriyel, kesirli faktöriyel veya merkezi kompozit tasarım gibi biri matematiksel deney tasarımı yöntemi vasıtasıyla elde edilir (Myers ve Montgomery, 1995).

YYY, süreç açısından en iyi yanıtın bulunması için faktörlerin belirlenmesini, süreçte etkin olan faktör seviyelerinin bulunmasını, mevcut koşullarda elde edilen bir kalite düzeyinin üzerinde bir ürün kalitesinin sağlanabilmesi için yeni üretim koşullarının belirlenebilmesini, yanıt ve nicel faktörler arasındaki ilişkinin bir modelle tanımlanmasını sağlamaktadır (Göncü, 2011).

YYY model regresyon analizi yardımıyla oluşturulur. *Yanıt yüzey oluşturmanın amacı*, deneysel bir çalışmada sonuç üzerinde etkin olan çok sayıdaki parametrelerden oluşan bir tasarım düzleminde belirli özellikleri sağlayan bir bölgeyi (etkinliği araştırılan parametreleri kapsayan bir aralık) ve bu bölgeye ait optimum noktayı tahmin etmektir. Bir faktörün etkisinin veya diğer faktörlerle etkileşiminin yanıt değişkenin değerlerinde ne derece önemli bir etkiye sahip olduğuna regresyon katsayıları yardımıyla karar verilir (Turan ve ark., 2011).

Bu tür tasarımların hazırlanmasında kullanılan paket programlar mevcuttur. Bu programların içeriğinde, yapılacak çalışmanın türüne göre seçme imkânı sunan çok sayıda yöntem yer almaktadır. Seçilecek yöntemin belirlenmesi oldukça önemlidir. Çünkü her bir tasarım yöntemi için farklı deneysel tasarımlar ve uygulama alanları vardır. Bu nedenle araştırmacı seçilecek yöntemin kendi çalışmasına uygunluğundan emin olmalıdır. Ayrıca doğru yöntemin seçilmesi deneysel maliyetlerin düşürülmesi ve daha az zaman harcanması gibi önemli faktörleri etkilemektedir.

Bu çalışmanın amacı, Pt elektrot üzerine dönüşümlü voltametri tekniğiyle sentezlenen polipirol (PPy), poli N-metilpirol (PNMP) ve PPy-ko-PNMP iletken polimer filmlerin, üzerine glukoz oksidaz (GOD) enziminin immobilizasyonu ile glukoz duyarlı biyosensör tasarımı, biyosensör tasarım parametrelerinin optimizasyonu ve elde edilen elektrotların ayrıntılı bir şekilde karakterizasyonunun yapılarak elektrokatalik özelliklerinin belirlenmesidir. Bu çalışmada enzim elektrodunun kullanımında glukoz çözeltisinde ölçülen akım değerlerinin nicel büyüklüğünü etkileyen parametreler üzerine çalışılmıştır. Bu nedenle Yanıt Yüzey Yöntemi (YYY) ile monomer derişimi, tarama hızı, GOD, GAL ve Chi derişimleri ile pH ve çalışma potansiyeli gibi çeşitli parametrelerin, akım değeri üzerine etkisi incelenmiştir. Yüzeyi PPy, NMP ve PPy-ko-PNMP ile modifiye edilmiş enzim elektrotlar, SEM ve fotoğraf görüntüleri ile yapısal, CV, DTV ve impedans analizleri ile elektrokimyasal, kinetik parametreleri, depolama ve tekrar kullanım kararlılıkları belirlenerek biyokimyasal olarak karakterize edilmişlerdir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

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

Gouda ve ark. (2001), gıda ve fermentasyon örneklerinin analizi için, Immobilize multienzim ve katodik amperometri bazlı sükroz biyosensörü tasarlamışlardır. İnvertaz, mutarotaz ve GOD içeren çoklu enzim sistemini, çapraz bağlama maddesi olarak glutaraldehid ile immobilize etmişlerdir. % 1-10 aralığında sükroz tahmini için biyosensör çalışma parametrelerini standardize etmişlerdir. Yanıt yüzey metodu (YYY) ile üç faktöre dayalı üç değişken tasarımını yapmışlardır. Biyosensör cevabı üzerine önemli değişkenlerin (enzimlerin konsantrasyonu invertaz (10-50 IU), mutarotaz (5-105 IU) ve GOD (1-9 IU) olarak etkilerini incelemişlerdir. Biyosensör cevabı üzerine çalışılan parametreler aralığında, invertaz derişiminin azalıp mutarotaz ve GOD derişimin artmasının tepki süresini azalttığı sonucuna ulaşmışlardır. Mutarotaz derişiminin 75 IU olduğu zamanlar, beta-D-glikoz inhibisyonuna sebep olduğundan, cevap süresinin arttığını gözlemlemişlerdir. Sükroz analizi için elde edilen optimum konsantrasyonları: invertaz için 10 IU, mutarotaz için 40 IU ve GOD için 9 IU olarak belirlemişlerdir. Bu koşullarla birlikte, tahmin edilen ve gerçek deneysel tepki süresinin sırasıyla 2,26 ve 2,35 dk larda elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Razola ve ark. (2002), Platin elektrot üzerine elektropolimerizasyon yöntemiyle Polipirol kaplayarak, üzerine yaban turpu peroksidazı (HRP) immobilize etmişlerdir. Daha sonra enzimin daha iyi tutunması amacıyla ikinci PPy tabakasıyla tekrar kaplamışlardır. Tasarlanan biyosensör, $4,9 \times 10^{-7}$ ve $6,3 \times 10^{-4}$ M derişim aralığındaki

hidrojen peroksit derişiminin belirlenmesini sağlamıştır. Biyosensörün depolama kararlılığının belirlenmesi için yapılan çalışma sonucunda 35 gün sonra aktivitesinin %90'ını koruduğunu belirlemişlerdir.

Rai ve ark. (2003), mosambi suyunda bulunan pektinaz enzimini değişik sürelerde (40-141 dakika) ve (32-49 °C) sıcaklıkta muamele ederek, çok sayıda farklı olan enzim konsantrasyonuna ait çözeltiler (% w /v 0,0004-0,0014) elde etmişlerdir. Elde ettikleri çözeltilerde, çeşitli parametrelerin (örneğin, görünür viskozite, berraklık ve çözünmeyen katı alkol) enzim tedavisi koşullarına etkisini incelemişlerdir. Optimum işlem koşullarını yanıt yüzey metodunu kullanarak belirlemişlerdir. Optimum sonuçlara göre; viskozite, çözünmeyen katı alkol ve enzim derişiminin sıcaklık ile azaldığını tespit etmişlerdir. Clarity Suyunda yaptıkları deneme sonuçlarına göre ise sıcaklığın artmasıyla enzim derişiminin arttığını bildirmişlerdir.

Borole ve ark. (2004), poli(o-anisidin) (POA), poli(o-toluidin) (POT) ve onların kopolimerleri olan poli(o-anisidin-co-o-toluidin) (POA-ko-POT)' i 0,1 M derişimde, 1 M H₂SO₄ elektrolit ortamında 50 mV/s tarama hızıyla -0,2 ve 1,0 V potansiyel aralığında Ag\AgCl elektrotla karşı platin elektrot yüzeyine sentezlemişlerdir. Oluşturulan ince filmlere hapsedme yöntemiyle GOD immobilize ederek bir glukoz biyosensörü tasarlamışlardır. Ölçümlerde asetat ve fosfat tamponları kullanılmış, her iki tamponda da POA/GOD, POT/GOD, POA-ko-POT/GOD elektrotları için maksimum akım değerlerini pH 5,5'te ve 0,60 V potansiyel aralığında gözlemişlerdir. Amperometrik ölçümlerde fosfat tamponunun asetat tamponuna göre daha hızlı yanıt verdiğini görmüşler ve fosfat tamponunu tercih etmişlerdir. POT/GOD elektrot, her iki tampon ortamında da daha iyi sonuçlar verdiği için, POA-ko-POT/GOD ve POA/GOD elektrotlara göre tercih edilmiştir. Kopolimer/GOD elektrodun, POA/GOD elektroda göre daha iyi sonuç verdiğini belirtmişlerdir.

Yavuz (2005), kolay ve hassas voltametrik glukoz enzim elektrodunun tasarlanması için yeni bir yöntem tanımlamıştır. Polivinilferrosen (PVF) kaplı Pt elektroda dayanan enzim elektrodunun geliştirilmesini sağlayacak basit bir enzim tutuklama yöntemini araştırmış, bu çalışmada iki yeni glukoz enzim elektrodu geliştirmiştir. Çalışmasının birinci adımında, PVF kaplanmış Pt elektrodu enzim çözeltilisine daldırarak GOD'nin polimer matriks içerisinde tutuklanması sağlamıştır. Tasarladığı enzim elektrodu, PVF-GOD enzim elektrot olarak tanımlamıştır. Elektrot

cevabı üzerine polimerik film kalınlığı, pH, sıcaklık, substrat ve enzim derişim etkisini araştırmıştır. Lineer alışma aralığının üç sınırı 73,86 mM glukoz olarak bulmuştur. Tutuklanmış enzim sistemi için görüner Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve aktivasyon enerjisini sırasıyla 417,57 mM ve 14,48 kJ/mol olarak bulmuştur. Çalışmanın ikinci adımında GOD'yi, PVF kaplanmış ve ardından Au biriktirilmiş Pt elektrot üzerine aynı yöntemle tutuklamıştır. Lineer alışma aralığının üç sınırı 105,26 mM glukoz olarak bulmuştur. Tutuklanmış enzim sistemi için Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve aktivasyon enerjisini sırasıyla 371 mM ve 18,76 kJ/mol olarak bulmuştur.

Ramanaviius ve ark. (2006), yaptıkları çalışmada PPy'nin elektrokimyasal polimerizasyonu sırasında, biyolojik olarak aktif moleküllerin immobilizasyonunu da gerçekleştirmişlerdir. Bazı istenmeyen elektrokimyasal etkileşimlerin önlenmesi ve bazı redoks enzimlerde elektron transferini kolaylaştırması açısından polimerin özelliklerini tartışmışlardır. İmmunosensör ve DNA sensörlerinde PPy 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. Moleküler baskılı PPy gelişiminde son gelişmeler ve sorunları değerlendirilmişlerdir.

Ekanayake ve ark. (2007), Pt plaka üzerine gözenekli alüminyum substrat oluşturup, daha sonra üzerine PPy nanotüp ile kaplayarak yeni bir amperometrik glukoz biyosensörü tasarlamışlardır. Yaptıkları alışmada GOD'yi model enzim olarak kullanmışlardır. Ticari olarak temin edilebilen nano gözenekli alüminyum diskleri fiziksel adsorpsiyonla enzim sıkışmasının uygulanabilirliğini incelemek amacıyla elektrot yapımında kullanmışlardır. Nanotüp dizisi içeren polipirol / PF_6^- filmi 0,3 mA / cm^2 arasında bir akım yoğunluğunda 0,05 M pirol ve 0,1 M $LiPF_6$ itiva eden bir çözelti kullanarak 90 saniye boyunca sentezlemişlerdir. Her elektrotta, immobilizasyonu fiziksel adsorbsiyon ile yapmışlardır. PPy nanotüpün çapını 100 nm olarak belirlemişlerdir. Sentezlenen nanotüpün karakterizasyonunu galvanostatik elektrokimyasal teknikle yapmışlardır. Michaelis–Menten sabitini (K_m) 7,01 mM olarak hesaplamışlardır. Nano gözenekli elektrotların kullanımının etkili bir enzim immobilizasyonu sağlamakla birlikte reaksiyonun algılanması için yüksek bir yüzey alanı sağladığı sonucuna vararak, bu faktörlerin tasarlanacak yeni biyosensörlerin karakteristik performanslarının arttırılması için kullanılabileceği sonucuna varmışlardır.

Pang ve ark. (2008), yaptıkları çalışmada, karbon nanotüpleri (CNT), modifiye titan nanotüp (NT) dizilerinin iç buharında geliştirerek hazırlamışlardır. Çapı ~3 nm olan Pt nanopartikülleri, hidrojen peroksit oksidasyonu için güçlü katalitik faaliyet göstermek amacıyla titan destekli CNT (TiO₂ / CNT) elektrot üzerine sentezlemişlerdir. Glukoz oksidaz (GOD) modifiye ettikleri TiO₂ / CNT / Pt elektrotla hazırladıkları glukoz biyosensörünün, 0,006 mM ile 1,5 mM glukoz aralığında 0,24 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ gibi yüksek hassasiyet değerine sahip olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca yanıt süresinin 3 saniyeden daha düşük olduğunu, dedeksiyon limitini 5,7 μM ve gürültü oranını da 3 olarak bulmuşlardır.

Ren ve ark. (2009), yaptıkları çalışmada, platin ve silika jel içerisine GOD'nin immobilizasyonu ile glukoz biyosensörü tasarlamışlardır. Nanopartiküllerin özelliklerinden tam olarak faydalanmak için glukoz biyosensöründe, Pt ve SiO₂ nanopartikülleri kullanmışlardır. Elde ettikleri deneysel sonuçlara göre platin ve silika jel nanopartikülleri içeren enzim biyosensörünün akım değerlerinin 10mM β -D-glukoz çözeltisi içinde 0,32 $\mu\text{A cm}^{-2}$ ve 33 $\mu\text{A cm}^{-2}$ kadar arttığını belirlemişlerdir.

Can (2010), yaptığı çalışmada yüzey alanı 0,18 cm^2 olan platin levha üzerine dönüşümlü voltametri tekniği ile para toluen sülfonik asit (pTSA) ve sodyum para tolue sülfonat ortamında (NapTS) polipirol (PPy) sentezlemiş ve sentez ortamında bulunan GOD enziminin eş zamanlı olarak immobilize edilmesi ile glukoz biyosensörü tasarlamıştır. Pt/PPy-GODpTSA ve Pt/PPy-GODNapTS enzim elektrotların SEM görüntüleri ve dijital fotoğraflarını, GOD içermeyen elektrotlar için elde edilen görüntüler ile karşılaştırmıştır. Elektrotları farklı glukoz derişimlerinde dönüşümlü voltametri ve doğrusal taramalı voltametri teknikleri ile karakterize etmiştir. Elde ettiği Pt/PPy-GODpTSA ve Pt/PPy-GODNapTS enzim elektrotları için optimum potansiyel değerlerini sırasıyla 0,7 ve 0,6 V; optimum pH değerleri ise sırasıyla 4,5 ve 7,0 olarak bulmuştur. Glukoz derişimine bağlı olarak (0,05-30 mM) gözlediği akım değerlerinde her iki elektrot için 1mM glukoz derişimine kadar doğrusal bir artış gözlemlemiş, ancak daha yüksek glukoz derişimlerinde akım değerlerindeki artışın azaldığını görmüştür. Lineweaver-Burk eğrisinden Pt/PPy-GODpTSA ve Pt/PPy-GODNapTS için Km değerlerini sırasıyla 5,2 ve 1,7 mM, Vmax değerlerini ise 14,2 ve 25,4 μA olarak hesaplamıştır. Glukoz biyosensörünün depolama kararlılığını sulu tampon ortamında bekleterek ayrı ayrı ölçmüştür. Genel olarak Pt/PPy-GODNapTS elektrodunun

depolama kararlılığının daha yüksek olduğunu, ancak 30 gün sonunda her iki elektrodun aktivitelerinin neredeyse tamamını kaybettiklerini gözlemlemiştir. Pt/PPy-GODpTSA ve Pt/PPy-GODNapTS elektrotların tekrar kullanım kararlılıklarını 5, 10 ve 20 mM glukoz çözeltilerinde belirlemiş ve 50 ardışık ölçüm sonrasında Pt/PPy-GODNapTS elektrodun daha yüksek kararlılık gösterdiğini saptamıştır. Ayrıca Pt/PPy-GODpTSA elektrodunun tekrar kullanım kararlılığı glukoz derişimi arttıkça azalırken Pt/PPy-GODNapTS elektrodunun tekrar kullanım kararlılığının glukoz derişiminden etkilenmediğini gözlemlemiştir. Ayrıca tasarladığı biyosensörler ile malt ieeği, 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.

Ustabaş (2010), GOD enzimini, anilinin polivinilsülfonatlı ortamda elektropolimerleşmesiyle hazırlanan polianilin-polivinilsülfonat film içine hapsetme yöntemiyle immobilize etmiştir. Bu amaçla önce polianilin-polivinilsülfonat filminin optimum çalışma şartlarını belirlemiştir. Glukoz tayinini, hazırladığı enzim elektrodun yüzeyinde gerçekleşen enzimatik tepkime sonucu oluşan hidrojen peroksite 0,40 V' da yükseltgenmesine dayanarak yapmıştır. Biyosensörün glukoz tayini için çalışma aralığını $1,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-5}$ M olarak tayin etmiştir. Glukoz biyosensörünün cevabına pH' nın ve sıcaklığın etkisini incelemiştir. İmmobilize ettiği glukoz oksidazın K_m ve V_{max} değerlerini 0,186 mM - 1,121 μA olarak hesaplamıştır. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliği ve raf ömrünü tayin etmiştir. 16 ölçüm sonra $1,0 \times 10^{-5}$ M glukoz için, bağıl standart sapmayı %12,36 olarak bulmuştur. Hazırladığı biyosensörle biyolojik sıvıda (kan) glukoz tayini yapmıştır. Biyolojik ortamlarda olabilecek girişimlerin, biyosensör cevabı üzerine etkilerini incelemiştir.

Chen ve ark. (2011), çok duvarlı karbon nanotüp üzerine bimetal(PtPd-MWCNTs) nanopartiküller kullanarak hassas, seçici ve istikrarlı amperometrik glukoz biyosensörü tasarlamışlardır. Biyosensörü, camsı karbon elektrodun üzerine Nafion film oluşturarak (PtPd-MWCNTs) katalizörlerinin immobilize edilmesi ile tasarlamışlardır. Nafion film kaplamayı ürik asit, askorbik asit ve fruktoz gibi ortak girişimi ortadan kaldırmak için kullanmışlardır. Elde ettikleri biyosensörün geniş lineer aralığını (0,062-14,07 mM) ve düşük algılama sınırı (0.031 mM) dolayısıyla glukozu karşı iyi bir yanıt sergilediğini belirlemişlerdir. Biyosensörün yanıt süresinin 5 s olduğu ve yüksek

hassasiyet gösterdiğini tespit etmişlerdir ($112 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$). Michaelis-Menten sabitini (K_m) 3,3 mM olarak belirlemişlerdir. Buna ek olarak, biyosensörün yüksek tekrarlanabilirlik, iyi depolama kararlılığı ve tatmin edici bir anti-parazit özellik gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Gerçek serum numunesi ile analiz yaparak biyosensörün, uygulanabilirliğini de değerlendirmişlerdir.

Urkut ve ark. (2011), yanıt yüzey yöntemini (RSM) nükleik asit biyosensörlerinde etikete göre gıda kaynaklı patojen algılama optimizasyonu için kullanmışlardır. Gıda örneklerinden elde edilen *Listeria monocytogenes* amplikonlarını model olarak kullanmışlardır. Hibritleşme ölçüsü Diferansiyel Puls Voltametri ve Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi ile elde edilen guanini, oksidasyon sinyallerini kullanılarak belirlemişlerdir. Biyosensör seçiciliği üzerinde etkili olan tuz konsantrasyonu ve hibridizasyon süresi dahil, hibridizasyon parametrelerinin etkilerini araştırmak için de RSM' yi kullanmışlardır. İstatistiksel sonuçlara göre, hibridizasyon sonrası tamamlayıcı olan ve olmayan hedeflerin saptama sınırını 267 pM olarak tespit etmişlerdir.

Zhang ve ark. (2011), yaptıkları çalışmada, iki istatistiksel deneysel tasarım olan, Plackett-Burman tasarım (PBD) ve yanıt yüzey yöntemini (RSM), 2,3-dihidroksibifenil, 1,2-dioksigenaz (BphC_LA-4)'ın etkisinin katekol biyosensörü üzerine etkisini araştırmak için kullanılmışlardır. En önemli faktörü PBD tarafından değerlendirmiş ve dört önemli parametreyi RSM tarafından optimize etmişlerdir. Uygun fermentasyon koşulları altında, substrat olarak katekol kullanıldığı zaman BphC_LA-4 'ün spesifik aktivitesinin maksimum olarak 0,58 U / mg değerinde tespit etmişlerdir. Bu arada, eş modelleme ve moleküler yerleştirme ile BphC_LA4, ve katekolik substart arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. BphC_LA-4'e düşük bağlanma ilgisiyle bağlanan 4-metilkatekol ile 3-metilkatekol ve katekolü kıyaslamışlardır. Bu durumun katekolik alt tabakalar arasındaki etkileşime yardımcı olduğunu gözlemlemişlerdir. SiO₂ kullanılarak hazırlanan sol-jelli BphC_LA-4'lü enzim elektrodunun bu üç katekolik bileşiklere iyi tepki gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Yıldız ve ark. (2011), yaptıkları çalışmada, nanoteknoloji alanında yaygın olarak araştırılan Ag nanopartiküllerin liken (*Cetraria islandica* L.) özü ile biyosentezini gerçekleştirmişlerdir. Ag nanopartikülünün biyosentezine tepkime süresinin, AgNO₃/likan oranının ve tepkime sıcaklığının etkisini incelemişlerdir. Nanotanecik

sentezini; likenin ekstraksiyonu, nanotaneciğin sentezlenmesi ve Yanıt Yüzey Yöntemi (RSM) ile optimum sentez koşullarının belirlenmesi olmak üzere üç adımda gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda elde edilen liken özütü ve Ag nanopartikülleri, UV-VIS (Ultraviyole ve görünür bölge spektroskopisi) FTIR (Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi), TEM (Geçirgen elektron mikroskobu) EDX (Enerji Dağılımlı X Işınımı Kırınımı) ve XRD (X-ışını kırınımı) ile karakterize etmişlerdir.

Can (2012), yaptığı çalışmada *Kluyveromyces lactis* β -galaktozidazı kullanarak laktoz'dan galaktooligosakkarit (GOS) sentezini gerçekleştirmiştir. Sentez için en uygun koşulların elde edilmesinde yanıt yüzey yöntemini kullanmıştır. Modelin oluşturulması amacıyla 4-faktör ve 3-düzy Box-Behnken tasarımını kullanmıştır. GOS sentezini etkileyen faktörleri; reaksiyon ortamının pH'sı, sıcaklığı, başlangıç laktoz derişimi ve reaksiyon süresi olarak belirlemiştir. Box-Behnken tasarımı ile belirlenen farklı koşullar içeren toplam 27 farklı deneysel sentez ortamında GOS sentezini gerçekleştirmiştir. En yüksek GOS verimine %17,2 (w/w) olarak pH'nın 6, sıcaklığın 60 °C, başlangıç laktoz derişiminin 300 mM (%10 w/v) ve reaksiyon süresinin 6 saat olduğu koşullarda ulaşmıştır. Ayrıca önerilen modelin matematiksel formunun *Kluyveromyces lactis* β -galaktozidazı kullanılarak katalizlenen GOS sentezi için GOS verimlerini tahminlemede kullanılabilirliğinin uygun olduğunu belirlemiştir.

Kotanen ve ark. (2012), Pt elektrot üzerine elektropolimerizasyon tekniği ile PPy sentezlemişlerdir. GOD üstüne hidrojel kaplayarak, amperometrik glukoz biyosensörü tasarlamışlardır. 25 ve 100 μ m boyutunda olan Pt elektrotları, elektrokatalitik aktivasyon ve kimyasal modifikasyonla 3-aminopropil-trimetil-oksilan ile birlikte polietilen glikol N-hidroksisüksinamid, poliHEMA temelli hidrojel çözeltisine daldırılarak çapraz bağlamışlardır. PPy'nin polimerizasyonu glukoz oksidaz kaynaklı glukozu duyarlı bir dönüştürücü olarak kendini gösterdiğinin kanıtı olarak. i) Diğer elektrokimyasal filmlerle karşılaştırıldığında duyarlılığında dört kat artma ii) Elektropolimerik yük yoğunluğuna bağlı biyo çevirici hassasiyeti ve enzim aktivasyonunu maksimum olarak 1 Mc/cm² ve Km değerini 33 olarak tespit etmişlerdir. İii) 17 gün sonunda askorbik asitle yapılan depolama kararlığında periyodik artış gözlemlenmiştir. Bu yöntemin biyosensör, biyoelektronik ve biyonik cihazlarda, hassas kantitatif metal ya da yarı iletken biyo arayüzlerinde enzimin katalitik biyoaktivitesini ölçmek için kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Xu ve ark. (2012), iyice hizalanmış PPy nanotellerin (PPyNWA) üzerini Pt nanopartiküllerle kaplayarak (PtNPs), GOD'nin yüzey adsorpsiyonu ile modifiye edilmesine dayalı yeni glukoz biyosensörü tasarlamışlardır. PPyNWA-GOx, PPyNWA-PtNPs ve PPyNWA-PtNPs-GOD elektrotlarının elektro-kimyasal özelliklerindeki belirgin farklılığı, siklik voltametri ile ortaya çıkarmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre özellikle PPyNWA-GOD biyosensöründe elektron transferinin doğrudan gerçekleşmesinin PtNPs modifikasyonundan kaynaklandığı sonucuna varmışlardır. PPyNWA-PtNPs-GOD glikoz biyosensörünün, hem potansiyometrik hem de amperometrik duyarlılığı için optimum koşulları 0,2 M pirol, 0,1 mA cm⁻² akım yoğunluğunu, polimerizasyon süresini 600 s, tarama hızını 50 mVs⁻¹ ve 20 döngü sayısı olarak belirlemişlerdir. Potansiyometrik sonuçlara göre hassasiyeti 40.5 mV, doğrusal aralığı 10-1000 µM ($R^2 = 0,9936$) olarak bulmuşlardır. Amperometrik sonuçlara göre duyarlılığı 34.7 µA cm⁻²mM⁻¹, uygulanan potansiyelini 700 mV ve doğrusal aralığı 0,1-9 mM ($R^2 = 0,9977$) olarak tespit etmişlerdir. Glukoz algılama sınırını potansiyometrik olarak 5.6 µM, Amperometrik olarak 27.7 µM bulmuşlardır.

Bal (2012), glukoz tayini için amperometrik enzim elektrodu geliştirmiştir. GOD'yi pirolün paratoluensülfonatlı ortamda elektropolimerleşmesiyle hazırlanan polipirol-paratoluensülfonat film üzerine glutaraldehitte çapraz bağlama yöntemiyle immobilize etmiştir. Bu amaçla önce PPy-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. Immobilize edilen glukoz oksidazın K_m ve V_{max} 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.

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. Biyosensörün ürik asit için doğrusal çalışma aralığını $5.10^{-7} - 5.10^{-5}$ M olarak tespit etmiştir. İmmobilize enzimin K_m ve V_{max} 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.

Zhang ve ark. (2013), çinko oksit nanoçubuklar üzerine Altın / platin hibrid fonksiyonlu (Pt-Au@ZnONRs) ve biyospesifik etkileşimi olan GOD-lektin kullanarak, yüksek elektrokatalitik aktiviteye dayalı bir amperometrik glukoz biyosensörü tasarlamışlardır. Pt-Au,@ ZnONRs tabakasını çok-aşamalı kemosentez yoluyla hazırlamışlardır. ZnONRs süspansiyonunu Pt-Au' nun mükemmel film oluşturma yeteneğine bağlı olarak, basit bir döküm yöntemi ile camı karbon elektrot (GCE) yüzeyi üzerine modifiye etmişlerdir. Daha sonra, gözenekli altın nanokristallerin üzerine, Pt-Au@ZnONRs tabakası oluşturmak amacıyla $H AuCl_4$ çözelti içine elektrot daldırarak -0,2 V sabit potansiyelde elektrokimyasal dönüşüm gerçekleştirmişlerdir. Altın nanomalzemelerin amino grupları veya ConA proteininin tiyol grupları arasındaki fiziksel adsorpsiyon ve kovalent bağlanma etkileşimlerinin incelenmesi amacıyla, pAu film üzerine, ConA proteinini immobilize etmişlerdir. Sonuç olarak GOD'yi, GOD ve ConA arasındaki biyospesifik etkileşimden dolayı, ConA/pAu/Pt-Au@ZnONRs/GCE üzerine kolayca immobilize etmişlerdir. Pt-Au@ZnONRs kompoziti transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ve X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) kullanarak karakterize etmişlerdir. Dönüşümlü voltametriyi (CV) elektrot tasarım sürecini karakterize etmek için kullanmışlardır. Tasarlanan biyosensörün, glukozu karşı yüksek hassasiyet gösterdiğini, 1,8 μM ile 5,15 mM arasında geniş doğrusal aralığa sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Gözlenebilme sınırını 0,6 μM ve Michaelis-Menten sabitini, 0,41 mM olarak bulmuşlardır. İyi tekrarlanabilirlik, yüksek aktivite ve uzun vadeli istikrar, gibi özellikleri nedeniyle Pt-Au@ZnONRs ve GOD-lektin biyospesifik etkileşimi, biyosensör ve biyokatalizör olarak uygulanabilirlik açısından umut vaat ettiğini bildirmişlerdir.

Mirmoghtadaie ve ark. (2013), folik asitin hızlı analizinde kullanılmak üzere tarama aracı olarak kullanılacak somon sperm ds-DNA'sı ile modifiye edilmiş kalem grafit elektrot kullanarak elektrokimyasal DNA biyosensörü önermişlerdir. İlk başta, kalem grafit elektrot üzerine ds-DNA immobilizasyonunu, yanıt yüzey yöntemi kullanarak optimize etmişlerdir. Çözelti pH'sı, DNA derişimi, birikim süresi ve birikim potansiyelini üç aşamalı olarak optimize etmişlerdir. Reaksiyon için en uygun kombinasyonları, pH'nın 4,8, DNA derişiminin 24 ug/ml, birikim süresinin 304 s birikim potansiyelinin 0,6 V ve adenin sinyalinin 3,04 A olduğu zaman elde etmişlerdir. İkinci olarak, üzerine DNA immobilize edilmiş kalem grafit elektrodun folik asit bağlama kapasitesini, adeninin elektrokimyasal sinyalinin değişimi ile ölçülmüşlerdir. Folik asitin gözlenebilme sınırını $1,06 \times 10^{-8}$ u mol L⁻¹ olarak belirlemişlerdir. Folik asitin 2,0 ve 5,0 u mol L⁻¹ derişiminde, diferansiyel darbe voltametik ölçümleri sonucu bağıl standart sapmaları sırasıyla % 4,6 ve % 4,3 olarak hesaplamışlardır. Biyosensörü farklı gerçek numunelerde folik asit ölçmek için kullanmış ve başarılı sonuç almışlardır.

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 PPy-poli(sodyum-4-stirensülfonat) filmi hazırlamıştır. PPy-poli(sodyum-4-stirensülfonat) filminin en iyi çalışma şartlarını belirlemiştir. GOD enzimini, PPy-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.

Azizli (2015), balık eti tazeliğinin tespiti için yeni bir amperometrik biyosensör geliştirmiştir. Bu amaçla, platin levha üzerinde pirolün sodyum dodesilbenzen sülfonatlı ortamda elektropolimerleşmesi ile PPy/sodyum dodesilbenzen sülfonat film hazırlamıştır. Ksantin oksidaz ve ürikaz enzimlerini, PPy/sodyum dodesilbenzen

sülfonat film içine tutuklama yöntemiyle immobilize etmiştir. Balık tazeliğinin tayinini, hazırlanan enzim elektrodun yüzeyinde gerçekleşen enzimatik tepkime sonucu oluşan hidrojen peroksitin 0,40 V'da yükseltgenmesine dayanarak yapmıştır. Biyosensörün balık tazeliğinin tayini için $1,0 \times 10^{-7}$ M – $1,0 \times 10^{-6}$ M çalışma aralığında çalışmıştır. Hazırladığı biyosensörün cevabına, pH'nın ve sıcaklığın etkisini araştırmıştır. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliği ve raf ömrünü belirlemiştir. Hazırladığı biyosensörle balık eti numunelerinde hipoksantin tayini yapmıştır. Biyolojik ortamda olabilecek girişimlerin biyosensörün cevap akımına etkilerini incelemiştir.

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-ko-POA) sentezleyerek 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-ciyanoetil)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+β-galaktozidaz enzimlerinin koimmobilizasyonu ile sırasıyla sükroz ve laktoz biyosensörler oluşturmuştur. CPE esaslı biyosensörlerin glukoz, sükroz ve laktoza duyarlı olduklarını CV ve impedans analizleri ile göstermiştir. Ayrıca, kinetik parametreler açısından PANI, tekrar kullanım ve depolama kararlılıkları bakımından PANI-ko-POA esaslı biyosensörlerin kullanımının daha uygun olduğu sonucuna ulaşmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada kullanılan, Sodyum okzalot, pirol, N-metilpirol, fosforik asit Merck firmasından, glukoz, *Aspergillus niger* kaynaklı glukozoksidaz (G-0543,429 U.mg⁻¹, 24 mg/ml) (GOD), Glutaraldehit (GAL) ve Kitosan (Chi) SigmaAldrich firmasından tedarik edilmiştir. YYY için Design Expert 8.0.7.1 yazılımı (Seri no:0021-6578) kullanılmış olup State-Ease firmasından satın alınmıştır. Kullanılan diğer bütün kimyasal maddeler analitik saflıktadır. Pirol ve N-metilpirol monomerleri polimer sentezinden önce distillenerek kullanılmıştır.

3.1.2. 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

Çalışmada kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları Çizelge 3.1.'de verilmiştir.
Çizelge 3.1. Kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları

Kullanılan Cihazlar ve Markaları	Kullanım Amaçları
Elektrokimyasal Analiz Cihazı (Ivium Vertex Pocket Stat)	Elektrot üzerinde Polimer sentezi ve elektrokimyasal ölçümlerde kullanılmıştır.
Elektrokimyasal Analiz Cihazı (Chi 660)	CV, DTV ve İmpedans analizlerinde kullanılmıştır.
Fotoğraf Makinesi (Canon Ultrasonic EF 100 mm)	Enzim elektrotların yüzeylerinin görüntülenmesinde kullanılmıştır.
PH metre (Gnolab wtw Series)	Tampon çözelti hazırlamak amacıyla kullanılmıştır.
SEM (Jeol JSM-5500 LV)	Elektrot yüzeylerinin SEM görüntülerinin elde edilmesinde kullanılmıştır (MKÜ-MARGEM)

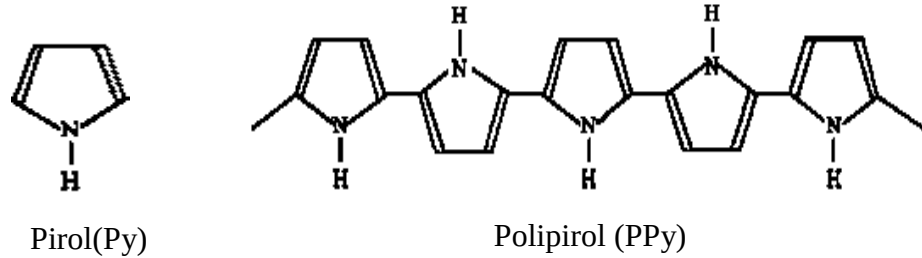
3.2. Yöntem

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 ısıtma işlemi altında tutturulmuştur. Bakır telin bir ucu ve platin levha dışarıda kalacak şekilde bakır telin etrafı bir poliestere bloğu ile kaplanmıştır. Hazırlanan platin levha elektrotlar; önce bek alevinde akkor haline gelene kadar ısıtılmış, ardından sıcak kromik asite daldırılmıştır. Platin yüzey alanı, sırasıyla; saf su, etanol, saf su, aseton, saf su, 0,5 M HCl ve tekrar saf su ile temizlendikten sonra kaplamaya hazır hale getirilmiştir.

3.2.2. PPy ile Modifiye Enzim Elektrodun Hazırlanması

Elektropolimerizasyon, üç elektrot tekniği kullanılarak tek hücrede gerçekleştirilmiştir. Çalışma elektrodu ve karşı elektrot olarak yüzey alanı 0,09 cm² olan platin levha, referans elektrot olarak ise Ag/AgCl (3M, KCl) kullanılmıştır. PPy film sentezi, pirol monomeri içeren NaO_x ile hazırlanan elektrolit ortamında, dönüşümlü voltametri tekniği ile -0,5/1,8 V potansiyel aralığında gerçekleştirilmiştir. Pirol ve PPy'nin kimyasal yapısı Şekil 3.1'de verilmektedir.



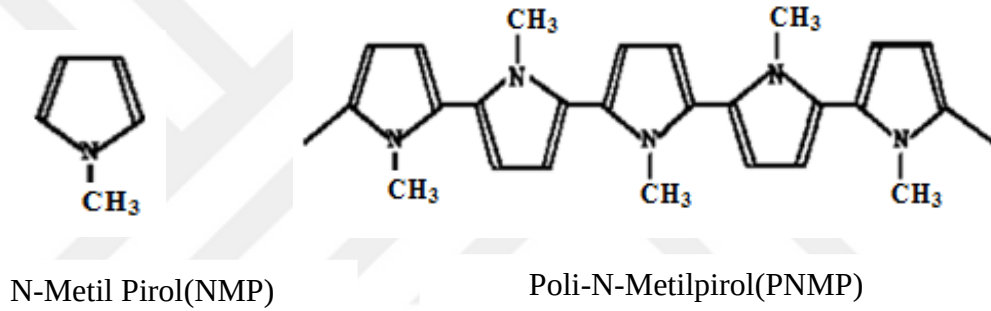
Şekil 3.1. Pirol(Py) ve Polipirolün(PPy) kimyasal yapısı

PPy film kaplı elektrot, 1 saat boyunca açık havada kurumaya bırakıldıktan sonra GOD'nin adsorbsiyonu için kitosan çözeltisinde çözülerek hazırlanan GOD çözeltisinde 15 saniye bekletilmiştir. Elektrot 1 saat boyunca kurumaya bırakıldıktan sonra, önce GAL çözeltisine 5 saniye daldırılmış, sonra da pH= 7 fosfat tamponuna 10 saniye daldırılarak, enzim elektrot oluşturulmuş ve buzdolabında 4°C'de, 20 saat bekletilmiştir. Buzdolabından çıkarılan elektrot 30 dk boyunca tamponda bekletildikten sonra, glukoz derişimine bağlı akım değerlerinin kronoamperometrik yöntemle

ölçülmesinde kullanılmıştır. Elde edilen akım değerlerinden, tampon çözelti için okunan akım değeri çıkarılarak, çalışılan glukoz derişimleri için net akım değerleri hesaplanmıştır.

3.2.3. PNMP ile Modifiye Enzim Elektrodun Hazırlanması

Elektropolimerizasyon, üç elektrot tekniğı kullanılarak tek hücrede gerçekleştirilmiştir. Çalışma elektrodu ve karşı elektrot olarak yüzey alanı $0,09 \text{ cm}^2$ olan platin levha, referans elektrot olarak ise Ag/AgCl (3M, KCl) kullanılmıştır. PNMP film sentezi, N-Metil Pirel monomeri içeren NaO_x ile hazırlanan elektrolit ortamında, dönüşümlü voltametri tekniğı ile -0,5/1,5 V potansiyel aralığında gerçekleştirilmiştir. N-Metil Pirel ve PNMP'nin kimyasal yapısı Şekil 3.2'de verilmektedir.



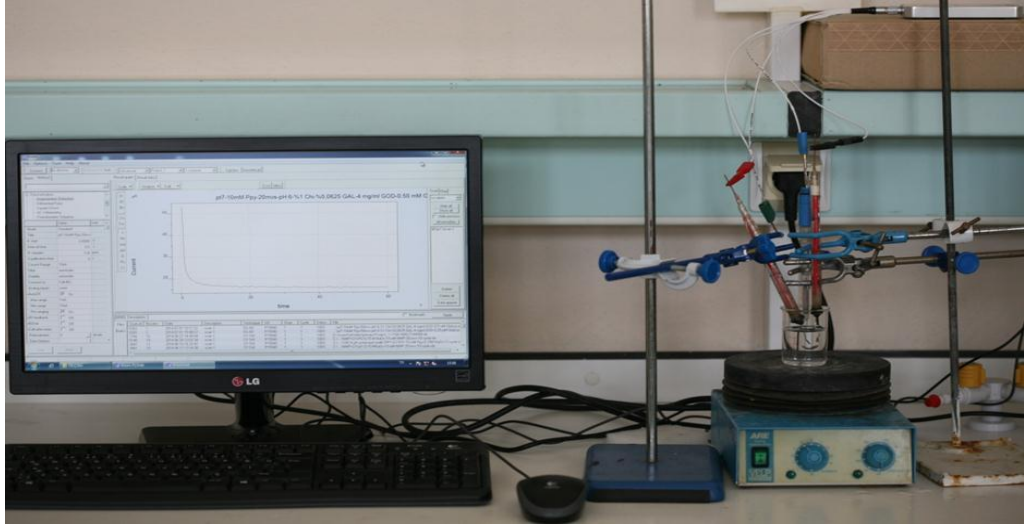
Şekil.3.2. N-Metilpirel(NMP) ve Poli-N-Metilpirelün(PNMP) Kimyasal Yapısı

PNMP film kaplı elektrot, 1 saat boyunca açık havada kurumaya bırakıldıktan sonra GOD'un adsorbsiyonu için kitosan çözeltisinde, çözülerek hazırlanan GOD çözeltisinde 15 saniye bekletilmiştir. Elektrot 1 saat boyunca kurumaya bırakıldıktan sonra, önce GAL çözeltisine 5 saniye daldırılmış, sonra da pH= 7 fosfat tamponuna 10 saniye daldırılarak, enzim elektrot oluşturulmuş ve buzdolabında $4 \text{ }^\circ\text{C}$ de, 20 saat bekletilmiştir. Buzdolabından çıkarılan elektrot 30 dk boyunca tamponda bekletildikten sonra, glukoz derişimine bağı akım değerlerinin kronoamperometrik yöntemle ölçülmesinde kullanılmıştır. Elde edilen akım değerlerinden, tampon çözelti için okunan akım değeri çıkarılarak, çalışılan glukoz derişimleri için net akım değerleri hesaplanmıştır.

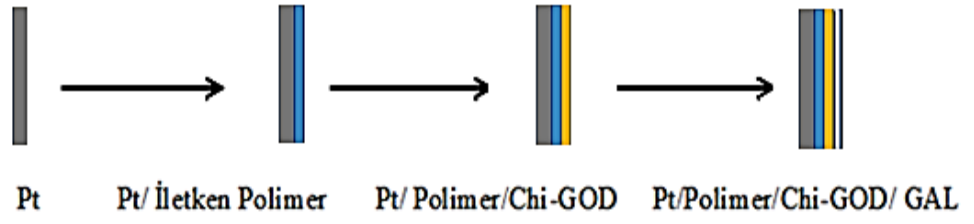
3.2.4. Kopolimer ile Modifiye Enzim Elektrodun Hazırlanması

Elektropolimerizasyon, üç elektrot tekniği kullanılarak tek hücrede gerçekleştirilmiştir. Çalışma elektrodu ve karşı elektrot olarak yüzey alanı $0,09 \text{ cm}^2$ olan platin levha, referans elektrot olarak ise Ag/AgCl (3M, KCl) kullanılmıştır. PPy-ko-PNMP film sentezi, Prol ve N-Metil Prol monomeri içeren NaO_x ile hazırlanan elektrolit ortamında, dönüşümlü voltametri tekniği ile -0,5/1,5 V potansiyel aralığında gerçekleştirilmiştir.

PPy-ko-PNMP film kaplı elektrot, 1 saat boyunca açık havada kurumaya bırakıldıktan sonra GOD'un adsorbsiyonu için kitosan çözeltisinde, çözülerek hazırlanan GOD çözeltisinde 15 saniye bekletilmiştir. Elektrot 1 saat boyunca kurumaya bırakıldıktan sonra, önce GAL çözeltisine 5 saniye daldırılmış, sonra da pH= 7 fosfat tamponuna 10 saniye daldırılarak, enzim elektrot oluşturulmuş ve buzdolabında 4°C de, 20 saat bekletilmiştir. Buzdolabından çıkarılan elektrot 30 dk boyunca tamponda bekletildikten sonra, glukoz derişimine bağlı akım değerlerinin kronoamperometrik yöntemle ölçülmesinde kullanılmıştır. Elde edilen akım değerlerinden, tampon çözelti için okunan akım değeri çıkarılarak, çalışılan glukoz derişimleri için net akım değerleri hesaplanmıştır. Sentezde kullanılan Pocket Stat (IVIUM) ve üç elektrot sistemi Şekil 3.3 'de, oluşturulan enzim elektrodun şematik gösterimi ise Şekil 3.4'de verilmiştir.

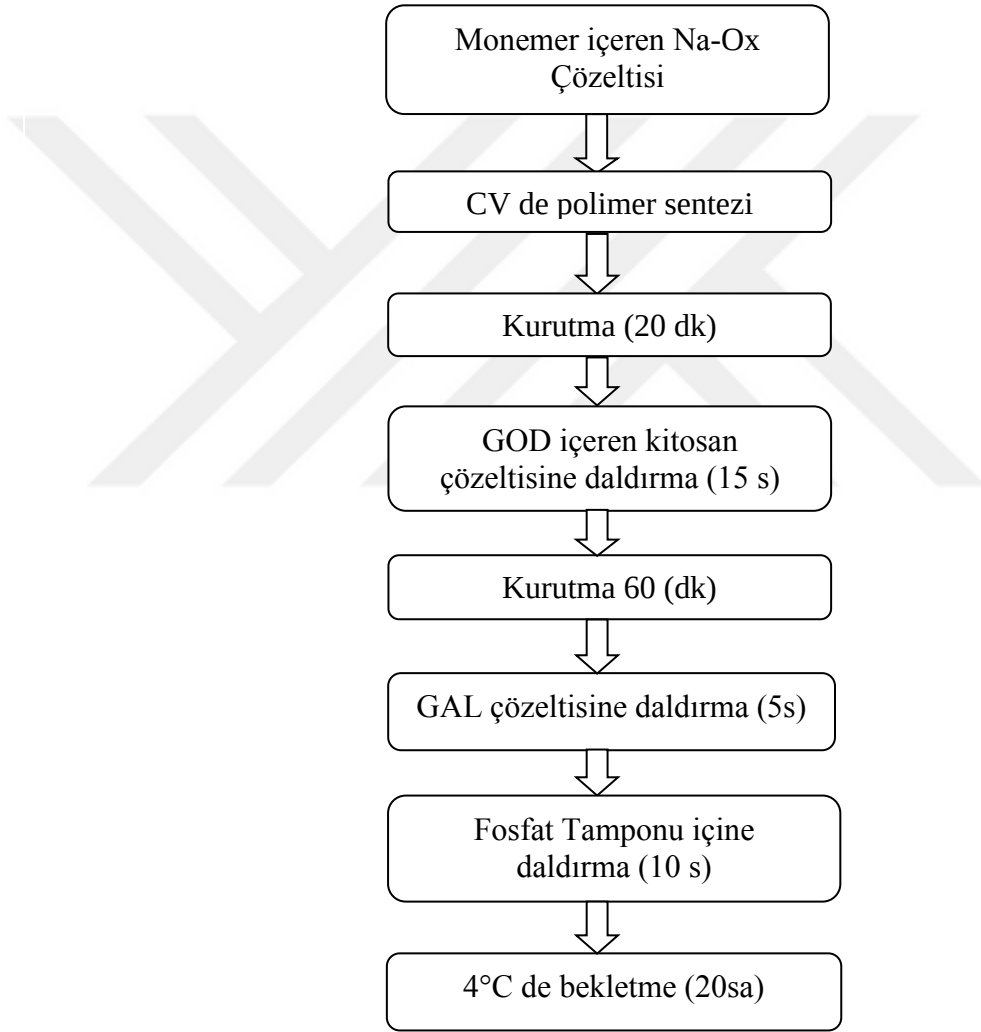


Şekil 3.3. Sentezde kullanılan Pocket Stat (IVIUM) ve üç elektrot sistemi



Şekil 3.4. Oluşturulan enzim elektrodun şematik gösterimi

Enzim elektrot oluşturma aşamaları şematik olarak Şekil 3.5’de verilmiştir.



Şekil 3.5. Enzim elektrodun tasarım aşamaları

3.2.5. YYY ile En Uygun Tarama Hızı ve Monomer Derişiminin Optimizasyonu

3.2.5.1. PPy için Tarama Hızı ve Monomer Derişiminin Optimizasyonu

Glukoz derişimine bağı net akım üzerine en uygun Py derişimi ve tarama hızı değerinin elde edilmesi amacıyla, YYY ile optimizasyon yapılmıştır. YYY ile yapılacak çalışmalarda State Ease Design Expert 8.0.7.1 bilgisayar programı kullanılmıştır (Seri No 0021-6578). Deney setlerinin oluşturulmasında optimal tasarım kullanılmış, Py derişimi için 10, 25 ve 50 mM ve tarama hızı için 10, 20, 50 ve 100 mV/s değerleri kullanarak program tarafında 16 çalışma programı oluşturulmuştur.

Pt elektrot üzerine, 0,15 M NaO_x elektrolit ortamında ve -0,5/1,8 V potansiyel aralığında, 26 segment ile dnüşümlü voltametri tekniği kullanarak elektropolimerizasyon yapılmıştır. PPy ile kaplanan pt elektrot oda sıcaklığında yarım saat kurumaya bırakıldıktan sonra, % 0,5'lik kitosan çözeltisi ile hazırlanan 2 mg/ml GOD çözeltisine 15 saniye daldırılmış ve oda sıcaklığında 1 saat boyunca kurumaya bırakılmıştır. Enzim immobilize edilen Pt elektrot önce % 0,05'lik GAL çözeltisine 5 saniye daldırılmış, hemen ardından pH=7 fosfat tamponuna 10 saniye daldırılarak enzim elektrot oluşturulmuş ve 4 °C de, 20 saat bekletilmiştir. Çalışma paketinde belirtilen şartlarda oluşturulan enzim elektrotların her biri kullanarak önce pH=7 tamponunda kararlı hal akımları elde edilinceye kadar ölçüm alınmış, daha sonra 0,5, 1, 2 ve 3 mM glukoz derişimlerinde 60 s boyunca kronoamperometrik olarak akım cevapları ölçülmüştür. Glukoz derişimine bağı elde edilen akım değerlerinden, tampon için okunan akım değeri çıkarılarak net akım değerleri elde edilmiştir.

PPy için monomer derişimi ve tarama hızı optimizasyonunda optimal tasarım ile oluşturulan deneysel çalışma programı izelge 3.2'de verilmiştir.

Elde edilen net akım cevapları Design Expert programında kullanarak matematiksel model analizi yapılmıştır. Seçilen model için anova analizi yapılmış, gerçek-tahmini değer, yüzey yanıt ve kontür grafikleri elde edilmiştir. Çalışma sonunda en yüksek akım değerinin gözlendiği monomer derişimi ve tarama hızı sonraki çalışmalarda kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. PPy için tarama hızı ve monomer derişimi optimizasyonunda optimal tasarım ile oluşturulan deneysel çalışma programı

Deneyssel çalışmalar	Pirol (mM)	Tarama Hızı (mV/s)
1	10	20
2	10	20
3	10	20
4	10	50
5	10	100
6	25	20
7	25	50
8	25	50
9	25	50
10	25	50
11	25	100
12	50	20
13	50	50
14	50	50
15	50	100
16	50	100

3.2.5.2. PNMP için Tarama Hızı ve Monomer Derişiminin Optimizasyonunu

Glukoz derişimine bağı net akım üzerine en uygun NMP derişimi ve tarama hızı değerinin elde edilmesi amacıyla, YYY ile optimizasyon yapılmıştır. YYY ile yapılacak çalışmalarda State Ease Design Expert 8.0.7.1 bilgisayar programı kullanılmıştır (Seri No 0021-6578). Deney setlerinin oluşturulmasında optimal tasarım kullanılmış, NMP derişimi için 10, 25 ve 50 mM ve tarama hızı için 10,20,50 ve 100 mV/s değerleri kullanılarak program tarafında 16 çalışma programı oluşturulmuştur.

Pt elektrot üzerine, 0,15 M NaO_x elektrolit ortamında ve -0,5/1,5 V potansiyel aralığında 20 segment ile dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak elektropolimerizasyon yapılmıştır. PNMP ile kaplanan pt elektrot oda sıcaklığında 1 saat kurumaya bırakıldıktan sonra, % 0,5'lik kitosan çözeltisi ile hazırlanan 2 mg/ml GOD çözeltisine 15 saniye daldırılmış ve oda sıcaklığında 1 saat boyunca kurumaya bırakılmıştır. Enzim immobilize edilen Pt elektrot önce % 0,05'lik GAL çözeltisine 5 saniye daldırılmış, hemen ardından pH=7 fosfat tamponuna 10 saniye daldırılarak enzim elektrot oluşturulmuş ve 4 °C de, 20 saat bekletilmiştir. Glukoz derişimine bağı elde

edilen akım değerlerinden, tampon için okunan akım değeri çıkarılarak net akım değerleri elde edilmiştir.

PNMP için tarama hızı ve monomer derişimi optimizasyonunda optimal tasarım ile oluşturulan deneysel çalışma programı Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.3. PNMP için tarama hızı ve monomer derişimi optimizasyonunda optimal tasarım ile oluşturulan deneysel çalışma programı

Deneysel çalışmalar	NMP (mM)	Tarama Hızı (mV/s)
1	10	20
2	10	20
3	10	20
4	10	50
5	10	100
6	25	20
7	25	50
8	25	50
9	25	50
10	25	50
11	25	100
12	50	20
13	50	50
14	50	50
15	50	100
16	50	100

Elde edilen net akım cevapları Design Expert programında kullanılarak matematiksel model analizi yapılmıştır. Seçilen model için anova analizi yapılmış, gerçek-tahmini değer, yüzey yanıt ve kontür grafikleri elde edilmiştir. Çalışma sonunda en yüksek akım değerinin gözlendiği N-Metil pirol derişimi ve tarama hızı sonraki çalışmalarda kullanılmıştır.

3.2.5.3. PPy-ko-PNMP için Tarama Hızı ve Monomer Derişiminin Optimizasyonu

Glukoz derişimine bağlı net akım üzerine en uygun NMP:Py derişim oranı ve tarama hızı değerinin elde edilmesi amacıyla, YYY ile optimizasyon yapılmıştır. YYY ile çalışma sayısını belirlemek amacıyla State Ease Design Expert 8.0.7.1 bilgisayar

programı kullanılmıştır (Seri No 0021-6578). Deney setlerinin oluşturulmasında Optimal tasarım kullanılmış, toplam monomer derişimi 10 mM olacak şekilde 1:9, 5:5 ve 9:1 mol oranlarını içeren NMP:Py sentez ortamında Pt elektrot yüzeyine Ppy-co-PNMP sentezlenmiştir. Monomer derişim oranları ve tarama hızı için 20, 50, 100 mv/s değerleri için program tarafından 16 çalışma paketi tasarlanmıştır. Bu çalışma seti oluşturulurken NMP derişimi 1,5 ve 9 mM olarak girilmiş, çalışma setlerinde bu derişimlere karşılık olarak sırasıyla 9, 5 ve 1 mM Py monomeri kullanılmıştır. Pt elektrot üzerine, 0,15 M NaO_x elektrolit ortamında ve -0,5/1,5 V potansiyel aralığında 10 segment ile dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak elektropolimerizasyon yapılmıştır. Kopolimer ile kaplanan pt elektrot oda sıcaklığında 1 saat kurumaya bırakıldıktan sonra, % 0,5'lik kitosan çözeltisi ile hazırlanan 2 mg/ml GOD çözeltisine 15 saniye daldırılmış ve oda sıcaklığında 1 saat boyunca kurumaya bırakılmıştır. Enzim immobilize edilen Pt elektrot önce % 0,05'lik GAL çözeltisine 5 saniye daldırılmış, hemen ardından pH=7 fosfat tamponuna 10 saniye daldırılarak enzim elektrot oluşturulmuş ve 4 °C de, 20 saat bekletilmiştir.

Çalışma paketinde belirtilen şartlarda oluşturulan enzim elektrotların her biri kullanılarak önce pH=7 tamponunda kararlı hal akımları elde edilinceye kadar ölçüm alınmış, daha sonra 0,5, 1, 2 ve 3 mM glukoz derişimlerinde 60 s boyunca kronoamperometrik olarak akım cevapları ölçülmüştür. Glukoz derişimine bağlı elde edilen akım değerlerinden, tampon için okunan akım değeri çıkarılarak net akım değerleri elde edilmiştir.

Optimal tasarım ile kopolimer derişimi ve tarama hızı için oluşturulan deneysel çalışma programı Çizelge 3.4' de verilmiştir.

Elde edilen net akım cevapları Design Expert programında kullanılarak matematiksel model analizi yapılmıştır. Seçilen model için Anova analizi yapılmış, gerçek-tahmini değer, yüzey yanıt ve kontür grafikleri elde edilmiştir. Çalışma sonunda en yüksek akım değerinin gözlendiği monomer derişim oranı ve tarama hızı sonraki çalışmalarda kullanılmıştır.

Çizelge 3.4. Optimal tasarım ile kopolimer derişimi ve tarama hızı için oluşturulan deneysel çalışma programı

Deneysel Çalışmalar	NMP (mM)	PPy (mM)	Tarama Hızı(mV/s)
1	1	9	20
2	1	9	20
3	1	9	50
4	1	9	100
5	1	9	100
6	5	5	20
7	5	5	20
8	5	5	50
9	5	5	50
10	5	5	50
11	5	5	50
12	5	5	100
13	9	1	20
14	9	1	50
15	9	1	100
16	9	1	100

3.2.6. PPy, PNMP ve PPy-ko-PNMP Kaplı Elektrotlar için Chi, GOD ve GAL Derişiminin YYY ile Optimizasyonu

İletken polimer kaplı yüzeye GOD immobilizasyonu ile enzim elektrot oluşturma aşamasında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin optimizasyonu YYY ile Box-Behnken tasarımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Box-Behnken tasarımında kullanılacak Chi, GOD ve GAL derişimleri için en yüksek ve en düşük değerler Çizelge 3.5’de verilmiştir.

Çizelge 3.5. Biyosensör tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin YYY ile optimizasyonunda Box-Behnken tasarım değerleri

Değişkenler	Semboller	Değişkenlerin Kodları		
		En düşük	Orta	En yüksek
		-1	0	+1
Kitosan derişimi (%)	A	0,25	0,63	1,000
GOD derişimi (mg/ml)	B	1,00	2,50	4,000
GAL derişimi	C	0,025	1,00	0,0625

Çizelgedeki parametreler için Design Expert programının Box-Behnken tasarımı için oluşturduğu çalışma seti Çizelge 3.6’da verilmiştir.

Çalışma paketinde belirtilen şartlarda oluşturulan enzim elektrotların her biri kullanılarak önce pH=7 tamponunda kararlı hal akımları elde edinceye kadar ölçüm alınmış, daha sonra 0,5, 1, 2 ve 3 mM glukoz derişimlerinde 60 s boyunca kronoamperometrik olarak akım cevapları ölçülmüştür. Elde edilen akım cevapları Design Expert programında kullanılarak matematiksel model analizi yapılmıştır. Seçilen model için Anova analizi yapılmış, gerçek-tahmini değer, yüzey yanıt ve kontür grafikleri elde edilmiştir. Çalışma sonunda en yüksek akım değerinin gözleendiği GAL, GOD ve Chi derişimleri çalışmanın sonraki aşamalarında kullanılmıştır.

Çizelge 3.6. Glukoz biyosensörlerinin Box-Behnken tasarımı ile oluşturulmuş Chi GOD ve GAL optimizasyonuna ait çalışma setleri

DeneySEL Çalışmalar	Kitosan (%)	Glukozoksidaz (mg/ml)	Glutaraldehit (%)
1	0,250	2,5	0,1000
2	0,250	4,0	0,0625
3	0,250	1,0	0,0625
4	0,250	2,5	0,0250
5	0,625	2,5	0,0625
6	0,625	1,0	0,0250
7	0,625	4,0	0,0250
8	0,625	4,0	0,1000
9	0,625	2,5	0,0625
10	0,625	2,5	0,0625
11	0,625	2,5	0,0600
12	0,625	2,5	0,0625
13	0,625	1,0	0,1000
14	1,000	2,5	0,1000
15	1,000	2,5	0,0225
16	1,000	1,0	0,0625
17	1,000	4,0	0,0625

3.2.7. PPy, PNMP ve PPy-ko-PNMP Kaplı Elektrotlar için pH ve Çalışma Potansiyelinin YYY ile Optimizasyonu

Çalışmanın bu kısmında, glukoz derişimine bağı akım değerlerinin ölçülmesinde kullanılan tamponun pH'sı ve çalışma potansiyelleri YYY ile optimize edilmiştir. Optimal dizayn kullanılarak hazırlanmış çalışma programında, pH için 4-8 aralığı ve çalışma potansiyeli için 0,4-0,8 V aralığında 5'er değer kullanılarak 16 deneysel çalışma seti oluşturulmuştur. Böylece, PPy, PNMP ve PPy-ko-PNMP için elde

edilen en uygun pH ve çalışma potansiyeli çalışmanın sonraki aşamalarında kullanılmıştır.

Glukoz biyosensörlerinin optimal tasarım ile oluşturulmuş pH ve çalışma potansiyeli optimizasyonuna ait çalışma setleri Çizelge 3.7’de verilmiştir.

Çizelge 3.7. Glukoz biyosensörlerinin optimal tasarım ile oluşturulmuş pH ve çalışma potansiyeli optimizasyonuna ait çalışma setleri

Deneysel çalışmalar	Çalışma potansiyeli (V)	pH
1	0,4	4
2	0,6	4
3	0,8	4
4	0,4	5
5	0,4	5
6	0,6	5
7	0,6	5
8	0,6	5
9	0,8	6
10	0,8	6
11	0,5	7
12	0,5	7
13	0,7	7
14	0,4	8
15	0,6	8
16	0,8	8

Elde edilen akım cevapları Design Expert programında kullanılarak matematiksel model analizi yapılmıştır. Seçilen model için Anova analizi yapılmış, gerçek-tahmini değer, yüzey yanıt ve kontür grafikleri elde edilmiştir. Çalışma sonunda en yüksek akım değerinin gözlendiği pH ve çalışma potansiyeli çalışmanın sonraki aşamalarında kullanılmıştır.

3.2.8. Biyosensörlerin Yapısal Özelliklerinin Belirlenmesi

Çıplak Pt elektrot, Pt/PPy, Pt/PNMP ve Pt/PPy-ko-PNMP film kaplı ve GOD immobilize edilmiş Pt elektrotların yüzeyleri, NaO_x ortamında sentezlenen (Pt/PPy/Chi-GOD/GAL, Pt/PNMP/Chi-GOD/GAL ve Pt/PPy-ko-PNMP/Chi-GOD/GAL) dijital fotoğraf makinesi (Canon Ultrasonic EF 100 mm) ve taramalı elektron mikroskobu (Jeol JSM-5500 LV) (SEM) ile görüntülenmiştir.

3.2.9. GlukozBiyosensörünün Elektrokimyasal Karakterizasyonu

3.2.9.1. Glukoz Biyosensörlerinin CV ve DTV Eğrileri

Yüzeyine PPy, PNMP ile PPy-ko-PNMP sentezlenmiş Pt elektrotun, glukoz içermeyen ve içeren fosfat tamponunda CV analizi yapılmıştır. Bu amaçla optimum pH'larda hazırlanmış tampon çözeltide hazırlanmış, 3 mM glukoz çözeltisi kullanılmıştır. PPy için - 0,5/1,8 V potansiyel, 50 mV/s tarama hızı, PNMP için -0,5/1,5 V potansiyel, 20 mv/s tarama hızı, kopolimer için ise -0,5/1,5 V potansiyel, 100 mv/s tarama hızı uygulanarak modifiye elektrotların metal/çözelti arayüzeyinde elektrot yüzeyinde gerçekleşen indirgenme ve yükseltgenme olaylarını gözlemlemek amacıyla CV eğrileri elde edilmiştir.

Metal/çözelti arayüzeyinde elektrokimyasal tepkimelerin gerçekleşip gerçekleşmediğini tespit etmek amacıyla, Pt/Ppy/Chi-GOD/GAL, Pt/PNMP/Chi-GOD/GAL ve Pt/PPy-ko-PNMP/Chi-GOD/GAL elektrotlarının glukoz içermeyen ve içeren fosfat tamponunda 10 mV/s tarama hızında DTV eğrileri elde edilmiştir.

3.2.9.2. Glukoz Biyosensörlerinin İmpedans Analizleri

Pt/Ppy/Chi-GOD/GAL, Pt/PNMP/Chi-GOD/GAL ve Pt/PPy-ko-PNMP/Chi-GOD/GAL elektrotlarının glukoz içermeyen ve içeren tampon çözeltide, 10^{-3} - 10^5 frekans aralığında ve 7mV genlikte, Pt/PPy/Chi-GOD/GAL ve Pt/PNMP/Chi-GOD/GAL elektrotları için 0,8 V, Pt/PPy-ko-PNMP/Chi-GOD/GAL elektrodu için 0,6 V potansiyel fark uygulanarak yük transferinin tespit edilmesi amacıyla impedans eğrileri elde edilmiştir.

3.2.10. Glukoz Biyosensörlerinin Biyokimyasal Karakterizasyonu

3.2.10.1. Akım Cevabına Glukoz Derişiminin Etkisi

Michaelis Menten sabiti (K_m) ve maksimum akım değerini (I_{max}) belirlemek amacıyla yapılmış olan bu çalışmada, 0,25-5 mM derişimleri arasındaki glukoz çözeltisi için akım cevapları ölçülerek Michaelis Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri çizilmiştir.

3.2.10.2. Glukoz Biyosensörlerinin Tekrar Kullanım Kararlılığının Belirlenmesi

Biyosensörlerin tekrar kullanım kararlılıkları optimum çalışma koşullarında, 3 mM glukoz çözeltisi kullanılarak belirlenmiştir. Pt/Ppy/Chi-GOD/GAL, Pt/PNMP/Chi-GOD/GAL ve Pt/PPy-ko-PNMP/Chi-GOD/GAL elektrotlarının net akım değerleri, glukoz çözeltisinde ardışık olarak 20 kez ölçülmüş ve kullanım sayısına bağlı olarak grafiğe geçirilmiştir.

3.2.10.3. Glukoz Biyosensörlerinin Depolama Kararlılığının Belirlenmesi

Optimal şartlarda elde edilen Pt/Ppy/Chi-GOD/GAL, Pt/PNMP/Chi-GOD/GAL ve Pt/PPy-ko-PNMP/Chi-GOD/GAL elektrotları 4 °C'ta bekletilmiş ve belirli periyotlarla 3 mM glukoz çözeltisi kullanılarak akım cevapları ölçülmüş, her elektrot için net akım değerlerindeki değişim depolama gününe bağlı olarak grafiğe geçirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. BULGULAR

4.1.1. YYY ile Monomer Derişimi ve Tarama Hızı Optimizasyonu

4.1.1.1. PPy Sentez Şartlarının Optimizasyonu

En uygun Py derişimi ve tarama hızını YYY ile belirlemek amacıyla 10, 25 ve 50 mM olmak üzere 3 farklı Py derişimi ve 20-50 ve 100 mV/s olmak üzere 3 farklı tarama hızı seçilerek tasarım yapıldığında Design Expert 8.0.7.1. yazılımı (seri no:0021-6578) tarafından optimal tasarım kullanılarak, 16 farklı deney seti oluşturulmuştur. Çalışma paketinde belirtilen şartlarda oluşturulan enzim elektrotlar kullanılarak 0,5, 1,0, 2,0 ve 3,0 mM glukoz derişimlerinde 60 s boyunca kronoamperometrik olarak akım cevapları ölçülmüştür.

Elde edilen her elektrot için 0,5, 1,0, 2,0 ve 3,0 mM glukoz olmak üzere 4 ayrı net akım değeri belirlenmiştir. Yapılan tüm çalışmalarda 4 farklı glukoz derişimi için okunan akım değerlerinin doğrusal olarak arttığı ve yanıt yüzey, kontur ve gerçek değer-tahmini değer grafiklerinin ve ayrıca varyans analiz sonuçlarının (ANOVA) benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Bu nedenle 4 farklı glukoz derişimi için ölçülen net akım değerleri Çizelge 4.1.'de verilmiş, ancak içlerinden sadece 1 mM glukoz için elde edilen değerlerin ANOVA analizleri, yanıt yüzey, gerçek değer-tahmini değer ve kontur grafikleri verilmiştir.

Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi her elektrodun net akım değeri glukoz derişimi ile orantılıdır. 10 mM Py ile oluşturulan elektrotların akım değerlerinin genel olarak yüksek olduğu gözlenmektedir. 8 nolu elektrodun glukoz derişimine bağlı olarak net akım değerinin diğer elektrotlardan belirgin derecede yüksek olduğu saptandığından dolayı, çalışmanın devamında derişim olarak 10 mM Py, tarama hızı olarak 50 mV/s ile devam edilmiştir. 1 mM glukoz için ölçülen net akım değerleri kullanıldığında program tarafından belirlenen matematiksel model analizinde Çizelge 4.2.'deki veriler elde edilmiştir.

Çizelge 4.1. PPy sentez koşullarının optimizasyonunda YYY deney seti ve 4 farklı glukoz derişimi için ölçülen net akım cevapları

Deneyisel çalışmalar	Pirol Derişimi(mM)	Tarama Hızı (mV/s)	I ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)			
			0,5mM glukoz	1mM glukoz	2mM glukoz	3mM glukoz
1	25,00	50,00	4,100	8,0100	15,360	21,760
2	25,00	50,00	3,670	7,1200	13,580	19,240
3	10,00	20,00	4,990	10,670	19,980	28,700
4	25,00	100,00	3,270	6,5700	12,700	18,600
5	25,00	20,00	2,150	4,2300	8,1600	11,840
6	50,00	50,00	4,370	8,2100	14,730	20,070
7	10,00	20,00	5,150	10,420	20,040	29,080
8	10,00	50,00	5,020	10,090	20,600	31,860
9	25,00	50,00	3,930	7,840	15,120	21,590
10	50,00	50,00	3,950	7,840	14,370	19,980
11	10,00	100,00	4,57	9,160	17,880	26,150
12	50,00	20,00	1,649	3,137	3,8250	5,1970
13	10,00	20,00	4,057	8,342	15,545	21,959
14	50,00	100,0	3,473	6,815	12,895	18,217
15	50,00	100,0	3,473	6,815	12,625	17,982
16	25,00	50,00	4,078	8,132	15,513	22,259

Çizelge 4.2. PPy-monomer derişimi ve tarama hızı oranının optimizasyonu çalışmasında elde edilen sonuçlara göre yapılan matematiksel model analizi

Kaynak	Model		R^2_{adj}	Pred- R^2	
	Sequential p-değeri	Uygunsuzluğu p-değeri			
Doğrusal	0,0486	0,0037	0,2755	-0,0119	
İki faktör etkileşimli	0,2199	0,0037	0,3113	-0,0077	
<u>Kuadratik</u>	<u>0,0014</u>	<u>0,1020</u>	<u>0,7766</u>	<u>0,5868</u>	<u>önerilen</u>
Kübik	0,0712	0,2870	0,8557	0,0138	

Seçilecek matematiksel modelde, model uygunsuzluğunun (Lack of Fit) p-değerinin 0,05'ten küçük olması gerekir, ayrıca düzeltilmiş belirtme katsayısı (R^2_{adj}) ve tahminlenmiş belirtme katsayısı (Pred- R^2) arasındaki farkın 0,2'den fazla olmaması gereklidir. Çizelge 4.2.'deki sonuçlardan, 1 mM glukoz çözeltisi için en iyi tanımlama kuadratik model ile yapılabildiğinden program tarafından önerilen model bu olmuştur. Önerilen kuadratik modelde kullanılan terimlerin model üzerine etkisi en küçük kareler yönteminin kullanıldığı varyans analizi (ANOVA) ile incelenmiş, ANOVA değerlerine ait modelin uygunluğunun test edilmesi amacıyla belirlenen istatistiki veriler Çizelge 4.3.'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. PPy monomer derişimi ve tarama hızının optimizasyonu çalışmasına ait ANOVA analizi (Kuadratik Model)

Kaynak	Kareler toplamı	SD	Ortalama kareler	F değeri	p-değeri Prob > F	
Model	52,00	5	10,40	11,43	0,0007	anlamlı
A-Pirol Derişimi	29,79	1	29,79	32,73	0,0002	
B-Tarama Hızı	4,67	1	4,67	5,13	0,0470	
AB	5,53	1	5,53	6,07	0,0334	
A ²	15,90	1	15,90	17,47	0,0019	
B ²	17,42	1	17,42	19,14	0,0014	
Kalıntı	9,10	10	0,91			
Model uygunsuzluğu	5,15	3	1,72	3,04	0,1020	anlamsız
Saf hata	3,95	7	0,56			
Toplam	61,10	15				
	Standart sapma	0,95		R^2	0,8510	
	Ortalama	7,71		R^2_{adj}	0,7766	
	C.V. %	12,37		Pred- R^2	0,5868	
	PRESS	25,25		Adeq Precision	13,466	

S.D. Serbestlik Derecesi

İdeal bir model için, matematiksel modelin uygunsuzluğunun (lack of fit) anlamsız ($P>0,05$) ve regresyon modelinin anlamlı ($P>0,05$) olması gerekmektedir (Myers ve Montgomery, 1995). Oluşturulan modelde kullanılan her bir parametrenin önem derecesi, Çizelge 4.3.'te verilen 'F-değeri' ve 'p>F değeri' ile belirlenmiştir. 'F-değeri' artıp 'p>F değeri' azaldıkça biyosensörün akım cevabı üzerine etki eden parametrelerin oluşturulan modeldeki önemi de artmaktadır. Monomer derişiminin, tarama hızına kıyasla ortalama kareler değerinin daha yüksek olması, net akım değeri üzerine etkisinin daha önemli olduğunu göstermektedir.

Bununla birlikte, elde edilen en yüksek akım değerine ait önerilen modelin uygunluğunun test edilmesi için Design Expert yazılımı tarafından hesaplanan belirtme katsayısı (R^2), düzeltilmiş belirtme katsayısı (R^2_{adj}), varyasyon katsayısı (C.V.), tahmini kalıntı hata kareler toplamı (PRESS), Pred- R^2 , yeterli hassasiyet (Adeq Precision) gibi istatistiki sonuçlar değerlendirilmiştir.

R^2 , bağımlı (yanıt) değişkenlerin değerlerindeki değişimleri, deneysel faktörlerle ve etkileşimlerle ne derecede açıklanabileceğini göstermektedir. R^2 değeri her zaman 0 ile 1 arasındadır ve 1'e ne kadar yaklaşırsa, modelin uygunluğu ve tahmin etmede kullanılabilirliği o kadar iyidir (Akın, 2009). Bu çalışmadaki R^2 değeri 0,8510 olduğundan, bağımlı değişkende meydana gelen değişimlerin % 85,1'inin bağımsız değişkenler tarafından açıklandığı görülmektedir.

İstatistiki olarak önemsiz terimlerin modelde kullanılabilmesi nedeniyle oluşturulan modellerin değerlendirilmesi aşamasında yüksek R^2 değerleri ile karşılaşılabilmektedir. Bu nedenle R^2_{adj} değerlerinin modelin uygunluğunun değerlendirilmesinde kullanılması önerilmektedir (Aygün, 2012). Bu çalışmada R^2_{adj} değeri 0,7766 olarak hesaplanmıştır. R^2 ve R^2_{adj} değerlerinin birbirlerine yakın olması (% 7,44), uygulanan model ile tahmin edilen akım değerlerinin, deneysel çalışmalarla elde edilen gerçek sonuçları oldukça iyi yansıttığının kanıtıdır.

C.V., standart sapmanın ortalamaya göre yüzde kaçlık bir değişim gösterdiğini belirtmektedir. Büyük C.V. değerleri, verilerin ortalamadan çok fazla uzaklaştığını, küçük C.V. değerleri ise verilerin hemen hemen ortalamayla aynı değere sahip olduğunu göstermektedir (Lazic, 2004). C.V. değerinin % 12,37 olarak bulunması modelin tahmini için kullanılması bakımından olumlu bir durumdur.

R^2_{adj} ile $Pred-R^2$ değerleri arasındaki fark 0,2'den fazla olmamalıdır. Bu belirtme katsayılarının açıklayıcılık oranları arasında % 20'den fazla değişim olması durumunda önerilen model uygun değildir. Bu iki belirtme katsayısı arasındaki fark akım cevabı için 0,1898 (% 18,98) olduğundan oluşturulan model uygundur.

Regresyon modelinin uygun olabilmesi için, Adeq Precision değerinin, yani sinyalin gürültüye oranının 4'ten büyük olması gerekmektedir (Myers ve Montgomery, 1995). Bu çalışmadaki Adeq Precision değeri 13,466 olarak hesaplandığından öngörülen model bu kriter açısından da uygundur.

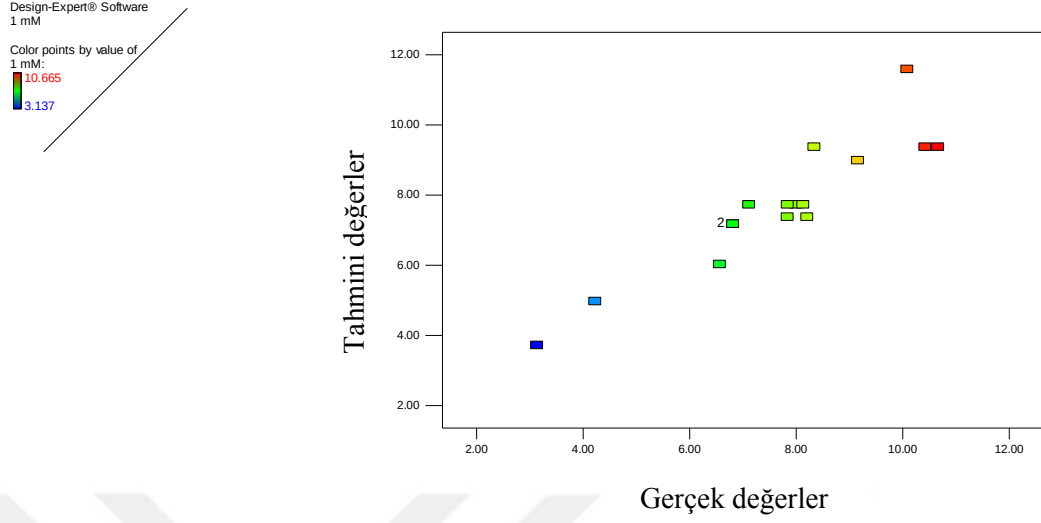
Seçilecek matematiksel modele ait PRESS değerinin diğer matematiksel modellerle kıyaslandığında en düşük olması istenir. ANOVA analizinde elde edilen PRESS değeri bu bakımdan uygun değildir.

Tüm bu istatiki değerlendirmeler neticesinde, bu modelin oluşturulmasında kullanılan Pirol monomer derişimi ve tarama hızı bağımsız değişkenlerinin aralık değerleri dikkate alınmak kaydıyla, 1 mM glukoz derişiminde ölçülecek akım değerinin tahminlenmesinde kullanılabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Program tarafından kuadratik model ve 1 mM glukoz derişiminde ölçülecek akım değeri için önerilen denklem Eşitlik 4.1'de verilmiştir.

$$\begin{aligned} I = & +11.01458 - 0.53034 \times \text{Pirol derişimi} + 0.17197 \times \text{Tarama hızı} + \\ & 1.20052E-003 \times \text{Pirol derişimi} \times \text{Tarama hızı} + 6.08390E-003 \times \text{Pirol} \\ & \text{derişimi}^2 - 1.57328E-003 \times \text{Taramahızı}^2 \end{aligned} \quad (4.1)$$

Eşitlik 4.1. kullanılarak tahmin edilen net akım cevapları ile gerçek sonuçların birbirine yakınlığını gösteren gerçek ve tahmini değerler grafiği Şekil 4.1.de gösterilmiştir.

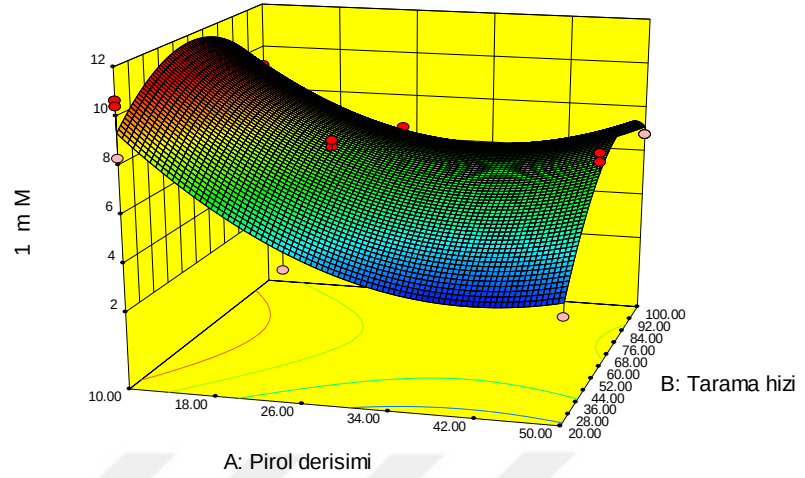


Şekil 4.1. PPy sentezinin YYY ile optimizasyonunda elde edilen gerçek ve tahmini değerler grafiği

Şekil 4.1.'de görüldüğü gibi gerçek değerlere karşı tahmini değerler, yani, deneysel sonuçlar ile oluşturulan matematiksel modelden elde edilen sonuçların karşılaştırılması yapılmaktadır. Bu değerler birbirine ne kadar yakınsa, noktalar grafik üzerindeki doğruya o kadar yakındır. Şekilde de görüldüğü gibi gerçek ve tahmini değerler birbirine oldukça yakındır.

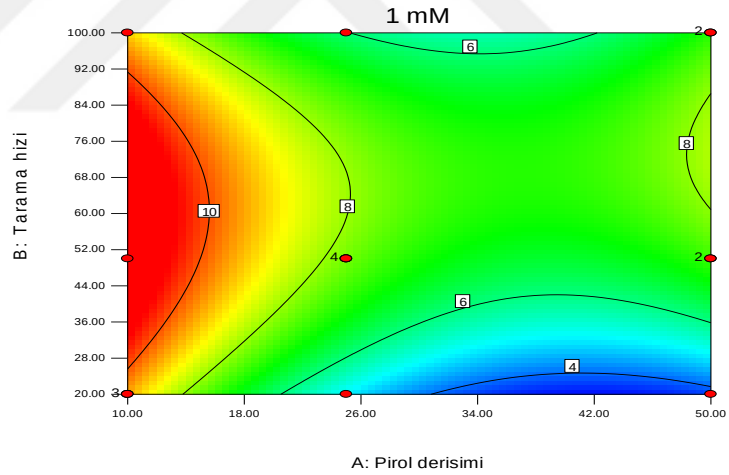
Monomer derişimi (Py) ve tarama hızının akım cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla oluşturulan deney setleri sonucu ölçülen akım değerleri ile elde edilen, yüzey yanıt ve kontur grafikleri sırasıyla Şekil 4.2 ve 4.3'de verilmiştir

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
1 mM
● Design points above predicted value
○ Design points below predicted value
10.665
3.137
X1 = A: Pırol derişimi
X2 = B: Tarama hızı



Şekil 4.2. Elektrot tasarımında PPy sentezi aşamasında Py derişimi ve tarama hızı etkisinin yanıt yüzey grafiğı

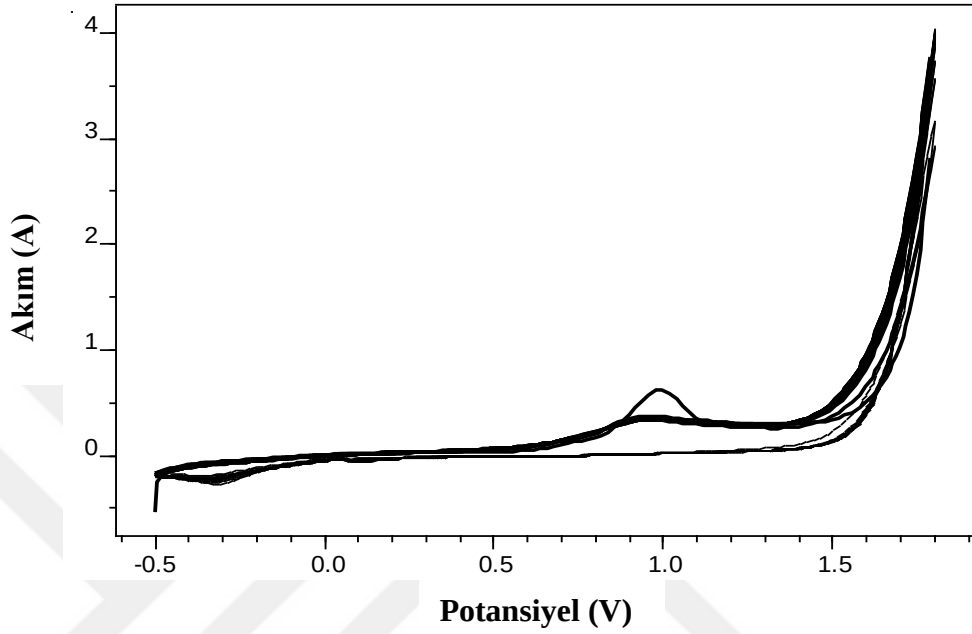
Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
1 mM
● Design Points
10.665
3.137
X1 = A: Pırol derişimi
X2 = B: Tarama hızı



Şekil 4.3. Elektrot tasarımında PPy sentezi aşamasında Py derişimi ve tarama hızı etkisinin kontur grafiğı

Şekil 4.2 ve 4.3’de verilen yüzey ve kontur grafikleri incelendiğinde, belirli tarama hızında, düşük Py derişimi için ölçülen akım değerleri en yüksekken, Py derişimi arttıkça akım değerlerinin düştüğü gözlenmektedir. Buna karşılık yüzey grafiğinde 50 mV/s tarama hızı ile oluşturulan elektrotların net akım değerlerinin 20 ve 100 mV/s tarama hızı ile elde edilenlere göre daha yüksek olduğu görülmektedir. En yüksek net akım cevabı 10 mM Py derişimi ve 50 mV/s tarama hızında elde edildiğı için

bu şartlar optimum değer olarak kabul edilmiştir. Bu elektrodun oluşturulmasında, optimum parametreler doğrultusunda yüzeye sentezlenmiş PPy'ye ait CV eğrisi Şekil 4.4.'te gösterilmiştir.



Şekil.4.4. Optimum derişim(10 mM) ve tarama hızında (50 mV/s) Pt elektrot yüzeyine, sentezlenmiş PPy'ye ait CV eğrisi

Şekil 4.4'de verilen CV eğrisi incelendiğinde, -0,5 ile -0,2 V potansiyel aralığında aşağıya doğru bakan pikin, polimer filmde meydana gelen indirgenmeyi temsil ettiği görülmektedir. Aynı pike karşılık gelen yukarıdaki düz çizgi de yüzeydeki pasif tabakanın meydana geldiğini göstermektedir. 0,8-1,1 V potansiyel aralığında oluşan pik ise monomer oksidasyonuna karşılık gelmektedir.

4.1.1.2. PNMP Sentez Şartlarının Optimizasyonu

En uygun NMP derişimi ve tarama hızını YYY ile belirlemek amacıyla 10, 25 ve 50 mM olmak üzere 3 farklı NMP derişimi ve 20, 50 ve 100 mV/s olmak üzere 3 farklı tarama hızı seçilerek tasarım yapıldığında Design Expert 8.0.7.1. yazılımı (seri no:0021-6578) tarafından optimal tasarım kullanılarak, 16 farklı deney seti oluşturulmuştur. Çalışma paketinde belirtilen şartlarda oluşturulan enzim elektrotlar kullanılarak 0,5, 1,0, 2,0 ve 3,0 mM glukoz derişimlerinde 60 s boyunca kronoamperometrik olarak akım cevapları ölçülmüştür.

Elde edilen her elektrot için 0,5, 1,0, 2,0 ve 3,0 mM glukoz olmak üzere 4 ayrı net akım değeri belirlenmiştir. Yapılan tüm çalışmalarda 4 farklı glukoz derişimi için hesaplanan net akım değerlerinin doğrusal olarak arttığı ve yanıt yüzey, kontur ve gerçek değer-tahmini değer grafiklerinin ve ayrıca varyans analiz sonuçlarının (ANOVA) benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Bu nedenle 4 farklı glukoz derişimi için hesaplanan net akım değerleri Çizelge 4.4.'de verilmiştir. Ancak, içlerinden sadece 1 mM glukoz için elde edilen değerlerin ANOVA analizleri, yanıt yüzey, kontur ve gerçek değer-tahmini değer grafikleri verilmiştir.

Çizelge 4.4. PNMP sentez koşullarının optimizasyonunda YYY deney seti ve 4 farklı glukoz derişimi için ölçülen net akım cevapları

Deneysel çalışmalar	NMP Derişimi (mM)	Tarama Hızı (mV/s)	I ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)			
			0,5mM glukoz	1mM glukoz	2mM glukoz	3mM glukoz
1	2500	50,00	15,11	29,96	59,25	86,68
2	25,00	50,00	14,47	29,16	56,99	84,83
3	10,00	20,00	16,34	33,21	66,09	96,24
4	25,00	100,00	12,42	25,77	50,83	75,16
5	25,00	20,00	14,12	28,33	56,13	82,95
6	50,00	50,00	12,19	24,58	47,99	70,24
7	10,00	20,00	16,26	33,36	66,00	96,18
8	10,00	50,00	14,78	29,85	58,82	86,75
9	25,00	50,00	16,29	32,68	58,09	95,02
10	50,00	50,00	11,52	23,02	45,20	66,55
11	10,00	100,00	12,92	26,33	51,81	76,28
12	50,00	20,00	9,88	20,22	39,69	58,19
13	10,00	20,00	15,83	31,79	63,32	93,49
14	50,00	100,00	13,81	27,75	54,57	79,29
15	50,00	100,00	13,94	27,01	55,63	82,17
16	25,00	50,00	14,12	28,87	58,47	86,37

Çizelge 4.4' de görüldüğü gibi her elektrodun net akım değeri glukoz derişimi ile orantılıdır. 10 mM NMP ile oluşturulan elektrotların akım değerlerinin genel olarak yüksek olduğu gözlenmektedir. 3 nolu elektrodun glukoz derişimine bağlı olarak net

akım değerinin diğer elektrotlardan belirgin derecede yüksek olduğu saptandığından dolayı, çalışmanın devamında derişim olarak 10 mM NMP, tarama hızı olarak 20 mV/s ile devam edilmiştir. 1 mM glukoz için ölçülen net akım değerleri kullanıldığında program tarafından belirlenen matematiksel model analizi Çizelge 4.5.'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. PNMP-monomer derişimi ve tarama hızının optimizasyonu çalışmasında elde edilen sonuçlara göre yapılan matematiksel model analizi

Kaynak	Sequential p-değeri	Model Uygunsuzluğu p-değeri	R ² _{adj}	Pred-R ²
Doğrusal	0,0074	0,0068	0,4573	0,0906
İki faktör etkileşimli	0,0004	0,1369	0,7997	0,7556
Kuadratik	<u>0,0570</u>	<u>0,3514</u>	<u>0,8645</u>	<u>0,7420</u> önerilen
Kübik	0,7800	0,1165	0,8408	-0,9588

Çizelge 4.5.'deki sonuçlardan, 1 mM glukoz çözeltisi için en iyi tanımlama kuadratik model ile yapılabildiğinden program tarafından önerilen model bu olmuştur. Önerilen matematiksel modelde kullanılan terimlerin model üzerine etkisi en küçük kareler yönteminin kullanıldığı varyans analizi (ANOVA) ile incelenmiş, ANOVA değerlerine ait modelin uygunluğunun test edilmesi amacıyla belirlenen istatistiki veriler Çizelge 4.6.'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. PNMP monomer derişimi ve tarama hızının optimizasyonu çalışmasına ait ANOVA analizi (Kuadratik Model)

Kaynak	Kareler toplamı	SD	Ortalama kareler	F değeri	p-değeri Prob > F	
Model	187,82	5	37,56	20,14	< 0,0001	anlamlı
A-NMP derişimi	52,37	1	62,37	33,45	0,0002	
B-Tarama hızı	0,0077	1	0,0077	0,004167	0,9498	
AB	76,38	1	76,38	40,96	<0,0001	
A ²	3,52	1	3,52	1,89	0,1997	
B ²	5,85	1	5,83	3,13	0,1074	
Kalıntı	18,65	10	1,86			
Model uygunsuzluğu	6,63	3	2,21	1,29	0,3514	anlamsız
Saf hata	12,02	7	1,72			
Toplam	206,46	15				
	Standart sapma	1,37		R ²	0,9097	
	Ortalama	28,24		R ² _{adj}	0,8645	
	C.V. %	4,83		Pred-R ²	0,7420	
	PRESS	53,27		Adeq Precision	14,993	

S.D. Serbestlik Derecesi

Çizelge 4.6’da görüldüğü gibi verilerin analizinde yanıt cevabı için en uygun model kuadratik model önerilmiştir. Model için p değeri <0,0001 olarak hesaplanmış ve sonuç anlamlı bulunmuştur. Model için belirlenen lack of fit değeri ise 0,3514 olarak anlamlı bulunmamıştır. Monomer derişiminin, tarama hızına kıyasla ortalama kareler değerinin daha yüksek olması, net akım değeri üzerine etkisinin daha önemli olduğunu göstermektedir. % C.V. değeri, yani standart sapmanın ortalamadan sapma değeri 4.83 olarak bulunmuştur. R^2 değeri 0,9097 olduğundan, bağımlı değişkende meydana gelen değişimlerin % 90’ının bağımsız değişkenler tarafından açıklandığı görülmektedir. R^2 ve R^2_{adj} değerlerinin birbirlerine yakın olması (% 4,52), ve ayrıca R^2_{adj} (0,8645) ile $Pred-R^2$ (0,7420) değerleri arasında 0,2’den daha az fark olması (0,1225, %12,25) model için olumlu istatistiki verilerdir. Bu da uygulanan modelin, elde edilen gerçek sonuçları oldukça iyi yansıttığının kanıtıdır. Bu çalışmada Adeq. Precision. değeri (yeterli hassasiyet) 14,993 olduğundan model bu kriter açısından uygundur.

Tüm bu istatiki değerlendirilmeler neticesinde, bu modelin oluşturulmasında kullanılan NMP monomer derişimi ve tarama hızı bağımsız değişkenlerinin aralık değerleri dikkate alınmak kaydıyla, 1 mM glukoz derişiminde ölçülecek akım değerinin tahminlenmesinde kullanılabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Seçilecek matematiksel modele ait PRESS değerinin diğer matematiksel modellerle kıyaslandığında en düşük olması istenir. ANOVA analizinde elde edilen PRESS değeri bu bakımdan uygun değildir.

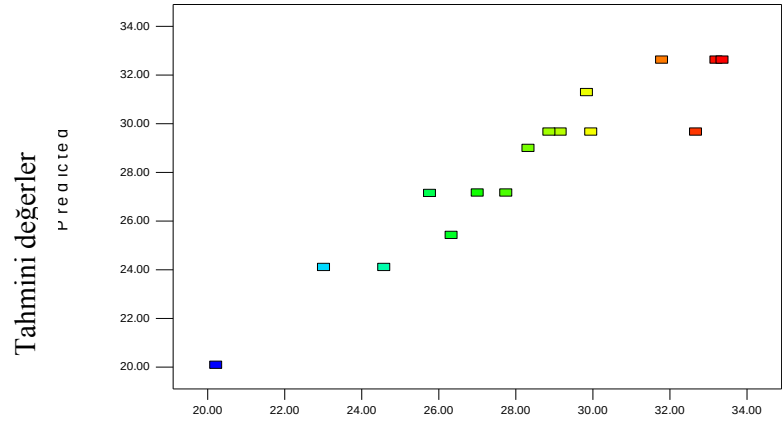
Program tarafından kuadratik model ve 1 mM glukoz derişiminde ölçülecek akım değeri için önerilen Eşitlik 4.2. aşağıda verilmiştir.

$$I = +35.19298 - 0.23105 \times \text{NMP derişimi} - 0.025391 \times \text{Tarama hızı} + 4.46215E-3 \times \text{NMP derişimi} \times \text{Tarama hızı} - 2.86079E-003 \times \text{NMP derişimi}^2 - 9.10474E-4 \times \text{Tarama hızı}^2 \quad (4.2.)$$

Eşitlik 4.2. kullanılarak tahmin edilen net akım cevapları ile gerçek sonuçların birbirine yakınlığını gösteren gerçek ve tahmini değerler grafiği Şekil 4.5.de gösterilmiştir.

Design-Expert® Software
1 mM

Color points by value of
1 mM:
33.364
20.221



Gerçek değerler

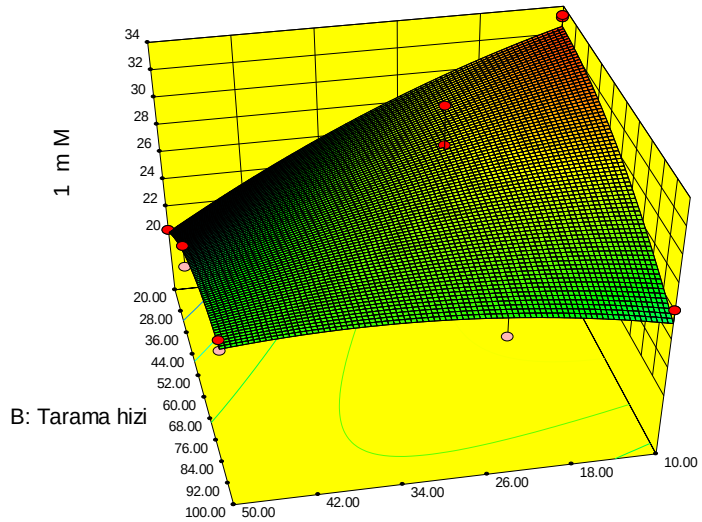
Şekil 4.5. Elektrot tasarımında PNMP sentezi aşamasında NMP derişimi ve tarama hızı etkisinin gerçek ve tahmini değerler grafiğı

Şekil 4.5’de gerçek değerlerin tahmini değerlere yakın olduğı görölmektedir. Monomer derişimi (NMP) ve tarama hızının akım cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla oluşturulan deney setleri sonucu ölçülen akım değerleri ile elde edilen yanıt yüzey ve kontur grafikleri sırasıyla Şekil 4.6 ve 4.7’de verilmiştir.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
1 mM

• Design points above predicted value
• Design points below predicted value
33.364
20.221

X1 = A: NMPderişimi
X2 = B: Tarama hızı

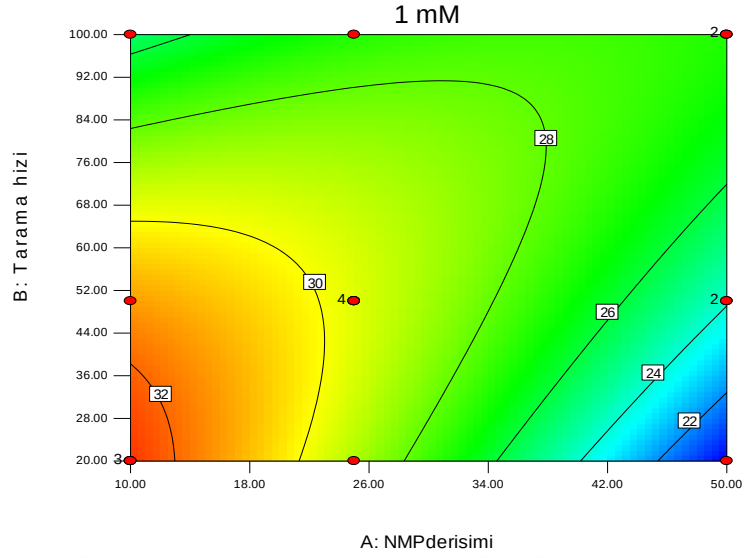


A: NMPderişimi

Şekil 4.6. Elektrot tasarımında PNMP sentezi aşamasında NMP derişimi ve tarama hızı etkisinin yanıt yüzey grafiğı

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
1 mM
• Design Points
33.364
20.221

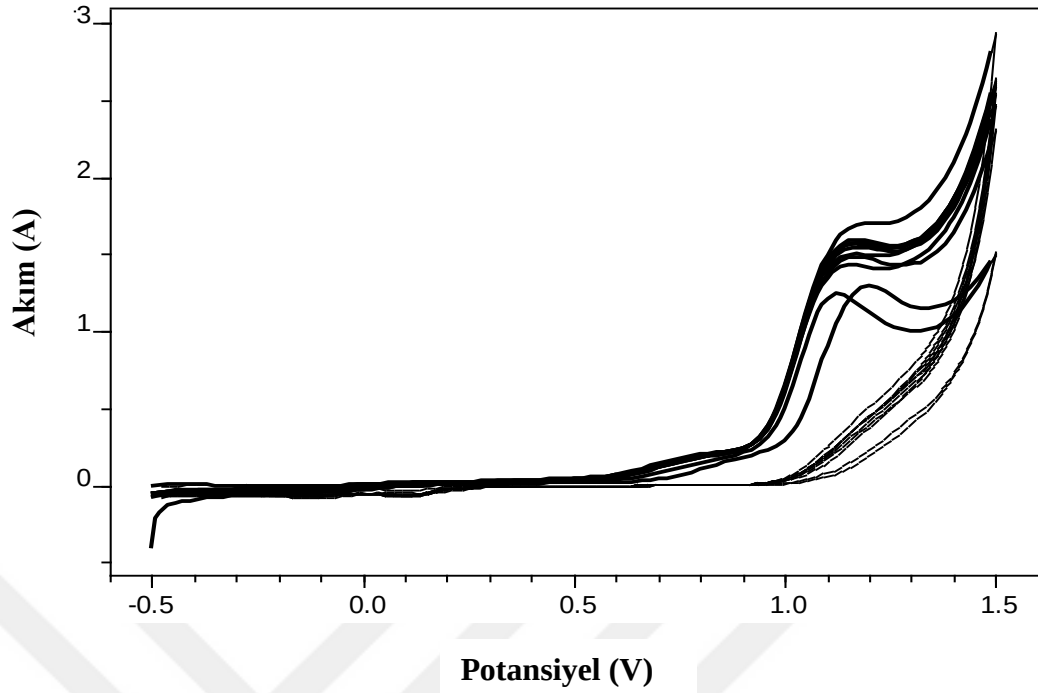
X1 = A: NMPderişimi
X2 = B: Tarama hızı



Şekil 4.7. Elektrot tasarımında PNMP sentezi aşamasında NMP derişimi ve tarama hızı etkisinin kontur grafiğı

Şekil 4.7’de görüldüğü gibi, yüksek tarama hızında (100 mV/s) elde edilen elektrotların akım cevabı üzerine NMP derişiminin etkisi yok denecek kadar azdır. Oysa düşük tarama hızında (20 mV/s) elde edilen elektrotlarda, kullanılan NMP monomer derişimi arttıkça net akım değerleri önemli deede azalmaktadır. Net akım cevabı üzerine NMP monomer derişimi ve tarama hızının eş zamanlı değerlendirilmesine imkân sağlayan YYY, bu nedenle klasik optimizasyon yöntemine göre oldukça avantajlıdır.

Şekil 4.6 ve 4.7’de verilen yanıt yüzey ve kontur grafiklerinde görüldüğü gibi düşük monomer derişimi ve tarama hızında akım cevabı yüksekken, NMP derişimi arttıkça biyosensörün akım cevabının azaldığı görülmektedir. 10 mM NMP ve 20 mV/s tarama hızı ile sentez edilen PNMP ile elde edilen elektrot en yüksek akım cevabına sahip olduğundan, sonraki çalışmalarda bu parametrelerin kullanımına karar verilmiştir. Bu elektrodun oluşturulmasında, optimum parametreler doğrultusunda yüzeye sentezlenmiş PNMP’ye ait CV eğrisi Şekil 4.8.’de gösterilmiştir.



Şekil.4.8. Optimum derişim(10 mM) ve tarama hızında (20 mV/s) Pt elektrot yüzeyine, sentezlenmiş PNMP'ye ait CV eğrisi

Şekil 4.8' deki CV eğrisi incelendiğinde, 0,1 V potansiyel aralığına karşılık gelen bölgede indirgenme-yükseltgenme reaksiyonlarının meydana geldiği görülmektedir. 1,1 V potansiyel değeri aralığına karşılık gelen bölge ise monomer oksidasyonunu göstermektedir.

4.1.1.3. PPy-ko-PNMP Sentez Şartlarının Optimizasyonu

Bu çalışmada toplam monomer derişimi 10 mM olacak şekilde NMP: Py oranı üç farklı değerde çalışılmıştır. Çizelge 4.7'de NMP derişimleri verilmiş olup Py derişimi toplam derişim 10 mM olacak şekilde eklenmiştir (NMP 1 mM ise Py 9 mM gibi). Tarama hızı 20, 50 ve 100 mV/s seçilerek 3 monomer oranı için optimal tasarım yapılmış ve Çizelge 4.7'de verilen 16 deney seti elde edilmiştir. Elde edilen elektrotlar kullanılarak 4 farklı glukoz derişimi için net akım değerleri de aynı çizelgede verilmiştir.

Çizelge 4.7. PPy-ko-PNMP sentez koşullarının optimizasyonunda YYY deney seti ve 4 farklı glukoz derişimi için ölçülen net akım cevapları

Deneyset çalışmaları	NMP Derişimi(mM)	Tarama Hızı (mV/s)	I ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)			
			0,5mM glukoz	1mM glukoz	2mM glukoz	3mM glukoz
1	1	50,0	13,79	27,91	55,39	81,49
2	5	50,0	16,81	33,55	66,49	97,60
3	5	20,0	14,52	29,12	58,31	85,56
4	1	100	10,46	21,27	42,74	64,08
5	9	50,0	14,15	28,47	56,13	80,28
6	1	20,0	15,27	30,73	61,03	90,01
7	5	50,0	15,53	32,48	49,17	79,70
8	5	50,0	15,83	31,92	65,25	96,26
9	9	100	13,80	28,18	56,99	84,17
10	1	20,0	14,42	29,14	58,11	85,78
11	1	100	13,04	26,44	53,37	79,05
12	9	100	14,57	29,92	60,49	89,51
13	5	100	17,61	31,24	67,18	96,82
14	9	20,0	13,41	25,94	53,43	78,93
15	5	50,0	14,00	29,37	60,42	89,08
16	5	20,0	12,59	25,73	52,04	76,22

Çizelge 4.7.'de görüldüğü gibi her elektrot için glukoz derişimi ile orantılı net akım değeri ölçülmüştür. Tüm elektrotlarda glukoz derişimine bağı olarak net akım değerlerinde artış gözlenmiştir Monomer derişimi oranlarının eşit (5:5), tarama hızının ise 100 mv/s olduğu durumda akım değerinin en yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle çalışmanın devamında bu değerler kullanılmıştır. Çizelge 4.7.'de verilen akım değerleri Design Expert bilgisayar programında analiz edildiğinde, akım cevaplarını tanımlamak için program tarafından oluşturulan matematiksel model analizi Çizelge 4.8.'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.8. PPy-ko-PNMP-monomer derişimi ve tarama hızı oranını optimizasyonunda elde edilen sonuçlara göre yapılan matematiksel model analizi

Kaynak	Sequential p-değeri	Model		R ² _{adj}	Pred-R ²
		Uygunsuzluğu p-değeri			
Doğrusal	0,1281	0,0252		0,1589	-0.2562
İki faktör etkileşimli	0,0233	0,0701		0,4169	0.0903
<u>Kuadratik</u>	<u>0,2231</u>	<u>0,0734</u>		<u>0,4816</u>	<u>0.1307</u> önerilen
Kübik	0,2095	0,0591		0,5616	-2.5263

Seçilecek matematiksel modelde, model uygunsuzluğunun (Lack of Fit) p-değerinin 0,05'ten büyük olması gerekir, ayrıca düzeltilmiş belirtme katsayısı (R²_{adj}) ve tahminlenmiş belirtme katsayısı (Pred-R²) arasındaki farkın 0,2'den fazla olmaması gereklidir. Çizelge 4.8.'deki sonuçlardan, 1 mM glukoz çözeltisi için en iyi tanımlama Kuadratik model ile yapılabildiğinden program tarafından önerilen model bu olmuştur. Önerilen Kuadratik modelde kullanılan terimlerin model üzerine etkisi en küçük kareler yönteminin kullanıldığı varyans analizi (ANOVA) ile incelenmiş, ANOVA değerlerine ait modelin uygunluğunun test edilmesi amacıyla belirlenen istatistiki veriler Çizelge 4.9.'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. PPy-ko-PNMP sentez koşullarının optimizasyonu çalışmasının ANOVA analizi (Kuadratik Model)

Kaynak	Kareler toplamı	SD	Ortalama kareler	F değeri	p-değeri Prob > F	
Model	89,81	5	17,96	3,70	0,0373	anlamlı
A-NMP derişimi	0,69	1	0,69	0,14	0,7145	
B-Tarama hızı	0,089	1	0,089	0,018	0,8950	
AB	40,22	1	40,22	8,28	0,0165	
A ²	19,51	1	19,51	4,2	0,0729	
B ²	15,50	1	15,50	3,19	0,1044	
Kalıntı	48,60	10	1,00			
Model uygunsuzluğu	17,31	3	5,77	1,29	0,3501	anlamsız
Saf hata	31,29	7	4,47			
Toplam	138,41	15				
	Standart sapma	2,20		R ²	0,6489	
	Ortalama	28,84		R ² _{adj}	0,4733	
	C.V. %	7,64		Pred-R ²	-0,0004	
	PRESS	138,47		Adeq Precision	5,3470	

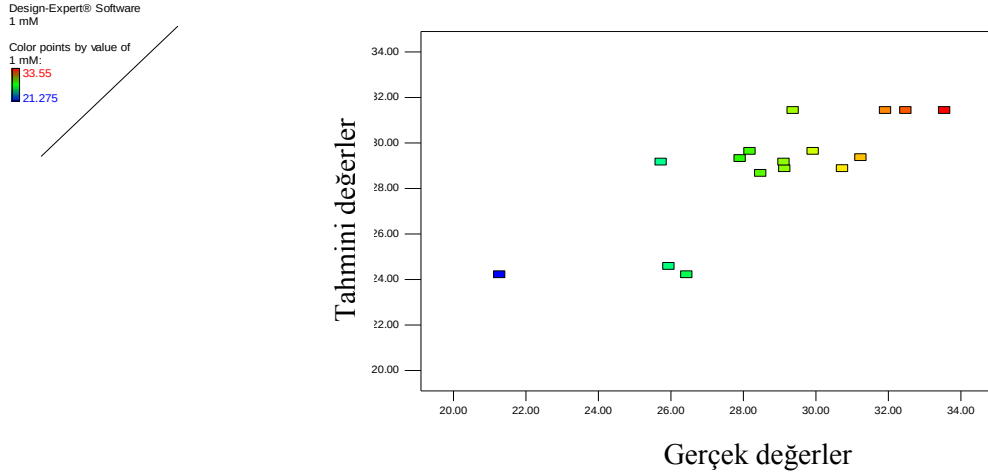
S.D. Serbestlik Derecesi

Çizelge 4.9’da görüldüğü gibi verilerin analizinde yanıt cevabı için kuadratik model önerilmiştir. Model için p değeri 0,0373 olarak hesaplanmış ve sonuç anlamlı bulunmuştur. Model için belirlenen lack of fit değeri ise 0,3501 olarak anlamlı bulunmamıştır. Monomer derişiminin, tarama hızına kıyasla ortalama kareler değerinin daha yüksek olması, net akım değeri üzerine etkisinin daha önemli olduğunu göstermektedir. Varyasyon katsayısı, % C.V. değerinin 7,64 olması verilerin ortalama değere oldukça yakın olduğunu göstermektedir. R^2 değeri 0,6489 olması ve R^2_{adj} (0,4733) ile $Pred-R^2$ (-0,0004) değerleri arasında 0,2 den daha fazla fark olması model için olumlu olmayan istatistiki verilerdir. $Pred. R^2$ değerinin negatif çıkması ortalama değerin modele göre daha iyi tahminleme yaptığı anlamına gelmektedir (Aygün 2012). Sinyalin gürültüye oranını veren Adeq. Precision (yeterli hassasiyet) değerinin 4’den büyük olması gerekir. Çalışmada Adeq. Precision. değeri 5,347 olduğundan model bu kriter açısından uygundur.

Tüm bu istatiki değerlendirilmeler neticesinde, bu modelin oluşturulmasında kullanılan NMP derişimi (toplam 10 mM monomer derişiminin geri kalan kısmı Py olmak koşuluyla) ve tarama hızı bağımsız değişkenlerinin aralık değerleri dikkate alınmak kaydıyla, 1 mM glukoz derişiminde ölçülecek akım değeri için önerilen Eşitlik 4.3. aşağıda verilmiştir.

$$I = +26.59012 + 0.68188 \times \text{NMPderişimi} + 0.10186 \times \text{Tarama hızı} + 0.015186 \\ \times \text{NMPderişimi} \times \text{Tarama hızı} - 0.15226 \times \text{NMPderişimi}^2 - 1.46126E-003 \\ \times \text{Tarama hızı}^2 \quad (4.3)$$

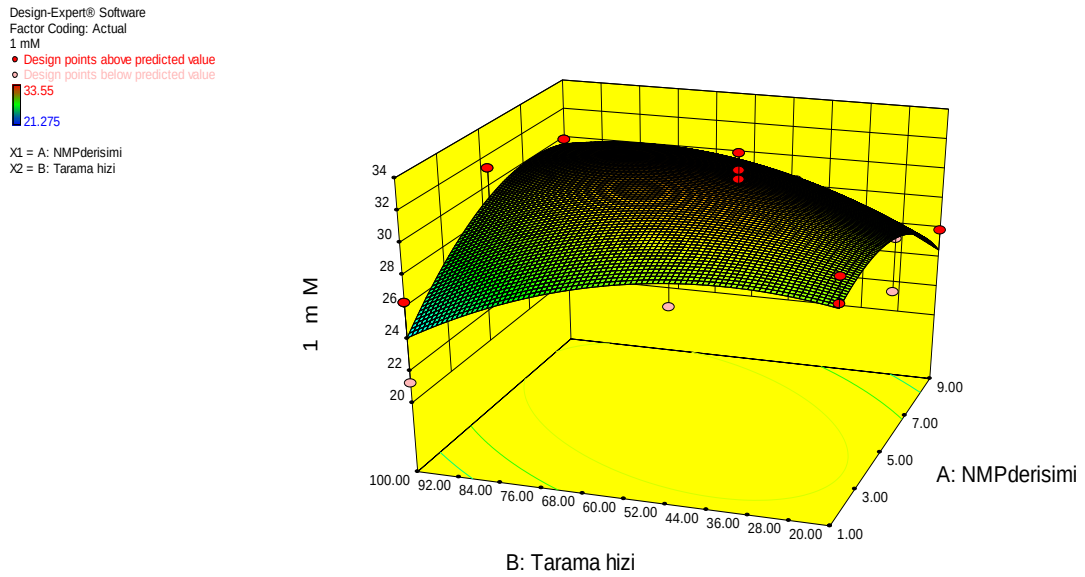
Eşitlik 4.3. kullanılarak tahmin edilen net akım cevapları ile gerçek sonuçların birbirine yakınlığını gösteren gerçek ve tahmini değerler grafiği Şekil 4.9.da gösterilmiştir.



Şekil 4.9. Elektrot tasarımında PPy-ko-NMPPsentezi aşamasında NMP derişimi ve tarama hızı etkisinin gerçek ve tahmini değerler grafiğı (Toplam monomer derişimi: 10mM)

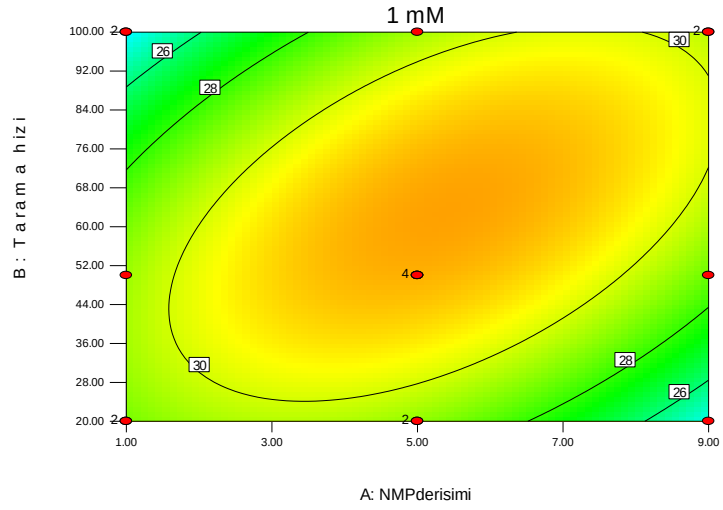
Şekil 4.9’da görüldüğü gibi bu model değerlerin tahminlenmesinde gerçek değerlere yakın sonuçlar vermektedir.

Monomer derişim oranı (NMP:Py) ve tarama hızının akım cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla oluşturulan deney setleri sonucu ölçülen akım değerleri ile elde edilen yüzey yanıt ve kontur grafikleri sırasıyla Şekil 4.10 ve 4.11’de verilmiştir.



Şekil 4.10. Elektrot tasarımında PPy-ko-PNMP sentezi aşamasında NMP derişimi ve tarama hızı etkisinin yanıt yüzey grafiğı (Toplam monomer derişimi: 10mM)

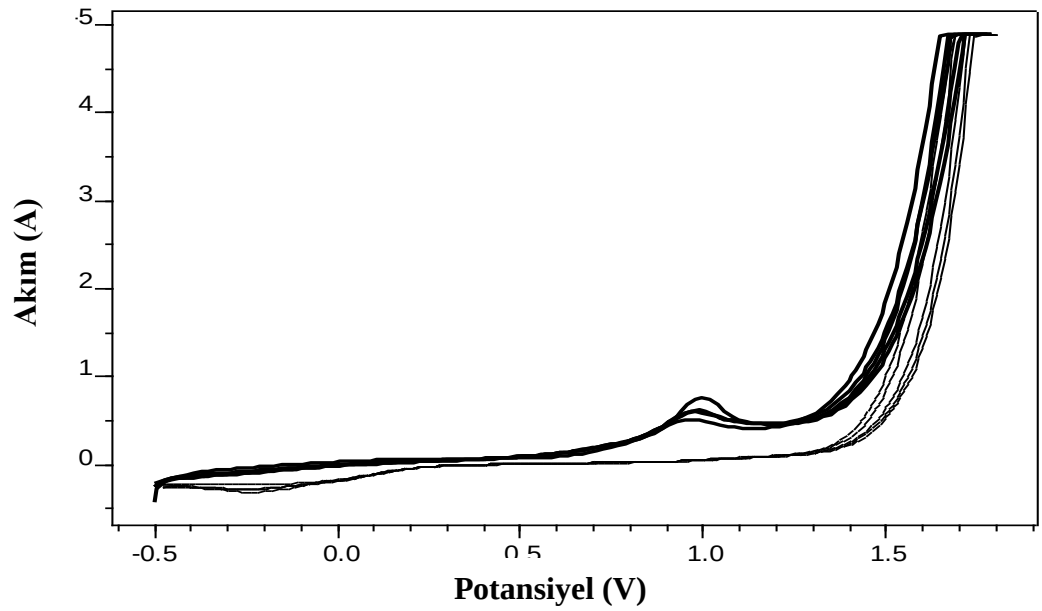
Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
1 mM
Design Points
33.55
21.275
X1 = A: NMPderisimi
X2 = B: Tarama hızı



Şekil 4.11. Elektrot tasarımında PPy-ko-PNMP sentezi aşamasında NMP derişimi ve tarama hızı etkisinin kontur grafiğı (Toplam monomer derişimi:10 mM)

Şekil 4.10 ve 4.11’de görüldüğü gibi, NMP ve Py derişimlerinin 5’er mM ve tarama hızının 50 mV/s olduğı şartlarda sentezlenen kopolimer ile oluşturulan elektrotların akım değerleri en yüksek çıkmıştır. Bu nedenle sonraki çalışmalarda bu parametreler kullanılarak kopolimer sentezi gerçekleştirilmiştir.

Bu elektrodun oluşturulmasında, optimum parametreler doğrultusunda yüzeye sentezlenmiş PPy-ko-PNMP’ye ait CV eğrisi Şekil 4.12.’de gösterilmiştir.



Şekil.4.12. Optimum derişim(5:5 mM) ve tarama hızında (50 mV/s) Pt elektrot yüzeyine, sentezlenmiş PPy-ko-PNMP’ye ait CV eğrisi

Şekil 4.12’de verilen CV eğrisi incelendiğinde, -0,5 ile -0,1 V potansiyel aralığında aşağıya doğru bakan pikin, polimer filmde meydana gelen indirgenmeyi temsil ettiği görülmektedir. Aynı pike karşılık gelen yukarıdaki çizgi de yüzeydeki pasif tabakanın meydana geldiğini göstermektedir. 0,9-1,1 V potansiyel aralığında oluşan pik ise monomer oksidasyonuna karşılık gelmektedir.

4.1.2. İletken Polimerlerle Modifiye Edilmiş Elektrotlar için Chi, GOD ve GAL Derişimlerinin YYY ile Optimizasyonu

4.1.2.1. PPy Kaplı Elektrot için Chi, GOD ve GAL Derişimlerinin YYY ile Optimizasyonu

Bu aşamada daha önce belirlenen optimum Pirol derişimi (10 mM) ve tarama hızı (50 mV/s) şartlarında oluşturulan Ppy tabakası üzerinde GOD içeren kitosan ve GAL derişimlerinin optimizasyonu için YYY uygulanmıştır. Bu çalışmada Box-Behnken tasarım optimizasyonu kullanılmıştır. Her çalışma elektrodu Çizelge 4.10.’da belirtilen Chi, GOD ve GAL oranlarında hazırlanmış 50 mM fosfat tamponunda ve 0,8 V çalışma potansiyelinde kararlı hal akımları elde edilinceye kadar bekletilmiş, ardından 0,5, 1, 2 ve 3 mM glukoz çözeltilerindeki net akım değerleri ölçülmüştür. Diğer çalışmalarda olduğu gibi bu çalışmada da 4 farklı glukoz derişimi için okunan net akım değerlerinin doğrusal olarak arttığı ve yanıt yüzey, kontur ve gerçek değer-tahmini değer grafiklerinin, ayrıca ANOVA değerlerinin benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Bu nedenle 4 farklı glukoz derişimi için ölçülen net akım değerleri Çizelge 4.10.’da verilmiştir. Ancak sadece 1 mM glukoz için elde edilen değerlerin ANOVA analizleri, yanıt yüzey, kontur ve gerçek değer-tahmini değerler grafikleri verilmiştir.

Çizelge 4.10. PPy ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box-Behnken tasarımı ile optimizasyonu

Deneyisel Çalışmalar	Chi derişimi (%)	GOD derişimi (mg/ml)	GAL derişimi (%)	I ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)			
				0,5 Mm glukoz	1mM glukoz	2mM glukoz	3mM glukoz
1	0,63	1,00	0,1000	2,191	4,56	8,99	13,29
2	1,00	2,50	0,1000	6,97	13,89	26,96	39,60
3	1,00	2,50	0,0250	7,08	14,24	27,56	40,42
4	0,25	1,00	0,0625	1,83	3,44	6,52	9,34
5	0,63	4,00	0,0250	9,415	18,54	36,05	52,45
6	0,63	4,00	0,1000	9,895	19,91	38,96	57,04
7	0,25	2,50	0,1000	4,684	9,41	18,05	25,99
8	0,25	4,00	0,0625	3,46	7,04	13,36	17,85
9	0,63	1,00	0,0250	2,71	5,55	10,83	15,87
10	1,00	4,00	0,0625	11,72	23,35	45,55	66,39
11	0,63	2,50	0,0625	6,39	12,77	24,84	36,08
12	0,25	2,50	0,0250	8,73	17,34	33,77	48,68
13	0,63	2,50	0,0625	6,13	12,23	23,31	33,61
14	0,63	2,50	0,0625	7,19	14,30	28,14	40,82
15	0,63	2,50	0,0625	5,85	11,51	21,55	31,38
16	0,63	2,50	0,0625	7,06	14,05	27,39	40,15
17	1,00	1,00	0,0625	4,71	9,40	17,65	25,99

Çizelge 4.10.'da verilen bulgulardan da görüldüğü gibi, glukoz derişimi arttıkça akım değerleri de doğrusal olarak artmıştır. En yüksek akım değeri %1 Chi, %0,0625 GAL ve 4 mg/ml GOD ile hazırlanan enzim elektrot kullanıldığında gözlenmiştir.

Çizelge 4.10.'da 1 mM glukoz için elde edilen net akım değerleri Design Expert bilgisayar programında analiz edildiğinde, akım cevaplarını tanımlamak için program tarafından oluşturulan doğrusal, iki faktör etkileşimli, kuadratik ve kübik modeller için model analizi yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.11.'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.11. PPy ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin optimizasyonunda elde edilen sonuçlara göre matematiksel model analizi

Kaynak	p-değeri	Model uygunsuzluğu p-değeri	R²_{adj}	Pred-R²	
<u>Doğrusal</u>	<u>0,0010</u>	<u>0,0170</u>	<u>0,6314</u>	<u>0,3872</u>	<u>önerilen</u>
İki faktör etkileşimli	0,3061	0,0168	0,6608	-0,0310	
Kuadratik	0,6780	0,0083	0,6046	-1,5996	
Kübik	0,0083		0,9535		

Çizelge 4.11.'deki sonuçlardan görüldüğü gibi akım değerinin tahminlenmesinde istatistiki verilere göre program tarafından doğrusal model önerilmiştir. Seçilen matematiksel modele göre düzenlenmiş ANOVA değerleri ve doğrusal modele ait istatistiksel veriler Çizelge 4.12.'de verilmiştir.

Çizelge 4.12. PPy ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box-Behnken tasarımı ile optimizasyonu ANOVA analizi

Kaynak	Kareler toplamı	SD	Ortalama kareler	F değeri	p-değeri Prob>F	
Model	340,92	3	113,64	10,14	0,0010	anamlı
A-C-Chi	69,90	1	69,90	6,24	0,0267	
B-C-GOD	263,19	1	263,19	23,48	0,0003	
C-C-GAL	7,82	1	7,82	0,70	0,4185	
Kalıntı	145,73	13	11,21			
Model uygunsuzluğu	140,07	9	15,56	11,00	0,0170	anamlı
Saf hata	5,66	4	1,41			
Toplam	486,65	16				

Standart sapma	3,35	R²	0,7005
Ortalama	12,44	R²_{adj}	0,6314
C.V. %	26,90	Pred-R²	0,3872
PRESS	298,23	Adeq Precision	10,704

S.D. Serbestlik Derecesi

Çizelge 4.12' de görüldüğü gibi hem model hem de model uygunsuzluğu(lack of fit) analizi sonucu sonuçlar anlamlı bulunmuştur ki model uygunsuzluğu değerinin 0.05'den büyük olması yani anlamsız olması arzu edilir. Chi, GOD ve GAL derişimleri için belirlenen ortalama kareler toplamı değerleri kıyaslandığında, net akım cevabı üzerinde etkili olan parametreler büyükten küçüğe sırayla GOD, Chi ve GAL derişimi olarak belirlenmiştir. % 26,90 olan % C.V. değeri de standart sapmanın yüksek ve değerlerin birbirinden farklı olduğunu göstermektedir.

R^2_{Adj} ile $Pred.R^2$ değerleri arasındaki fark da (0,2442) 0,2'den büyük çıkmıştır. Ancak çalışmada Adec. Precision (yeterli hassasiyet) değeri 4'den büyük olup 10,704 olarak belirlenmiştir. PPy ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin optimizasyonunda 1 mM glukoz için ölçülecek akım cevaplarını tahmin etmek için Desing Expert yazılımı gerçek değişkenlere bağlı olarak Lineer model için önerilen eşitlik 4.4. aşağıda verilmiştir.

$$I = -0.39374 + 7.88267 \times C_{Chi} + 3.82383 \times C_{GOD} - 26.37333 \times C_{GAL}$$

(4.4.)

Bu modelde yüzey lineer olduğundan sabit GAL derişimi için sadece Chi ve GOD derişimlerine bağlı yüzey grafikleri elde edilmiştir. Bu nedenle her üç değişkenin değişimine bağlı akım cevaplarının yüzey grafiklerini göstermek amacıyla kuadratik model üzerinden değerlendirme yapılmıştır. Aynı verilerle elde edilen kuadratik modele ait ANOVA analiz sonucu Çizelge 4.13'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.13. PPy ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box Behnken tasarımı ile optimizasyonu ANOVA analizi (Kuadratik Model)

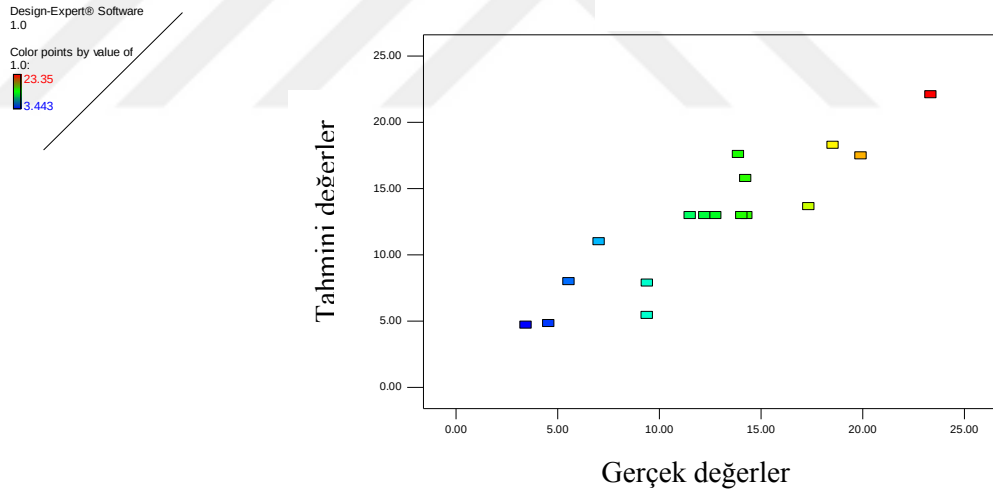
Kaynak	Kareler toplamı	SD	Ortalama kareler	F değeri	p-değeri Prob > F	
Model	402,47	9	44,720	3,72	0,0486	anlamlı
A-C-Chi derişimi	69,90	1	69,900	5,81	0,0467	
B-C-GOD	263,19	1	263,19	21,89	0,0023	
C-C-GAL	7,82	1	7,82	0,65	0,4464	
AB	26,80	1	26,80	2,23	0,1791	
AC	14,37	1	14,37	1,19	0,3105	
BC	1,40	1	1,40	0,12	0,7431	
A ²	0,36	1	0,36	0,03	0,8672	
B ²	14,76	1	14,76	1,23	0,3045	
C ²	4,56	1	4,56	0,38	0,5576	
Kalıntı	84,17	7	12,02			
Model uygunsuzluğu	78,51	3	26,17	18,50	0,0083	anlamsız
Saf hata	5,66	4	1,41			
Toplam	486,65	16				
Standart sapma		3,47		R ²	0,8270	
Ortalama		12,44		R ² _{adj}	0,6046	
C.V. %		27,87		Pred-R ²	-1,5996	
PRESS		1265,07		Adeq Precision	6,536	

S.D. Serbestlik Derecesi

Çizelge 4.13.'de görüldüğü gibi model değeri ve lack of fit değeri lineer modelde olduğu gibi kuadratik modelde de anlamlı çıkmıştır. R^2 değeri, % C.V., R^2_{Adj} ile $Pred.R^2$ değerleri arasındaki fark da lineer modele daha yüksek çıkmıştır-ki bu durum kuadratik modelin lineer modele göre uygunluğunun daha düşük olduğu anlamına gelmektedir. Kuadratik modele göre 1 mM glukoz derişiminde ölçülecek akım değeri içim önerilen Eşitlik 4.5. aşağıda verilmiştir.

$$I = +11.10714 - 9.43800 \times C_{Chi} + 4.45144 \times C_{GOD} - 229.35778 \times C_{GAL} + 4.60133 \times C_{Chi} \times C_{GOD} + 134.77333 \times C_{Chi} \times C_{GAL} + 10.51111 \times C_{GOD} \times C_{GAL} - 2.08480 \times C_{Chi}^2 - 0.83208 \times C_{GOD}^2 + 739.78667 \times C_{GAL}^2 \quad (4.5.)$$

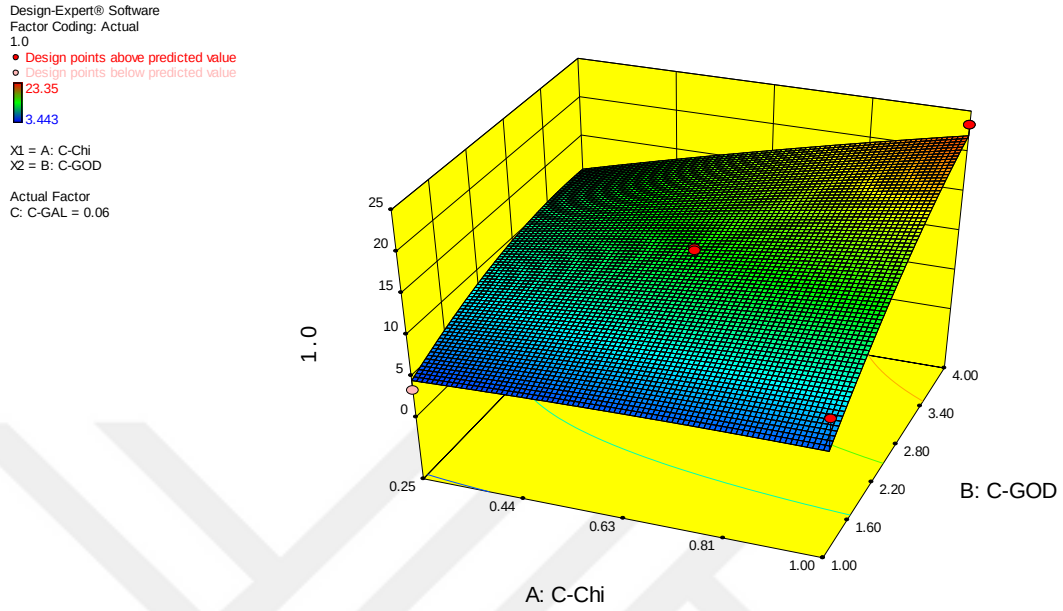
Eşitlik 4.5. kullanılarak tahmin edilen net akım cevapları ile gerçek sonuçların birbirine yakınlığını gösteren gerçek ve tahmini değerler grafiği Şekil 4.13.de gösterilmiştir.



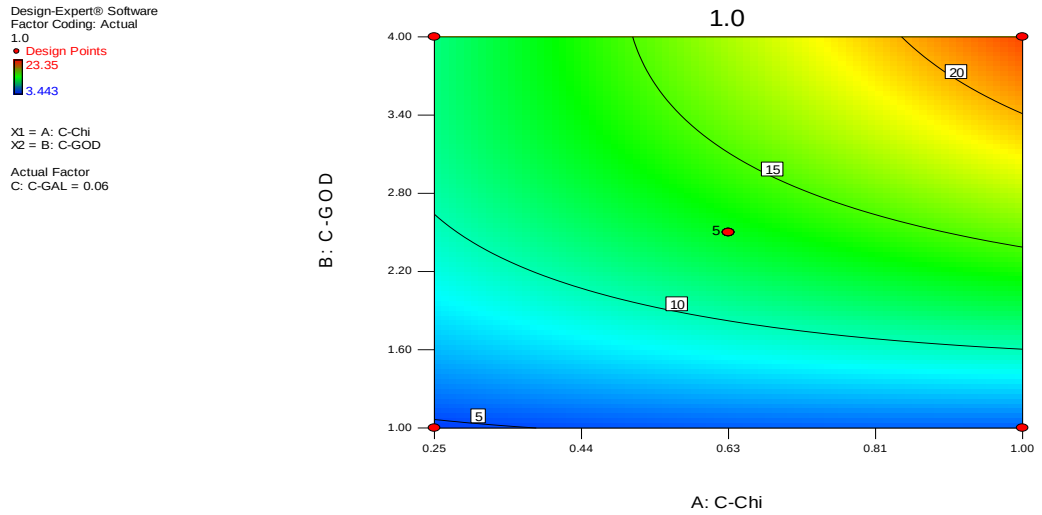
Şekil 4.13. PPy ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen gerçek ve tahmini değerler grafiği

Şekil 4.13'de görüldüğü gibi akım cevabının yüksek olduğu değerlerde gerçek değer ile tahmini değerler birbirine yaklaşmıştır. Çalışmada 3 değişken olduğu için yanıt yüzey grafikleri bir değişkenin sabit tutularak diğer iki değişkene göre verilir. Model için, GAL derişiminin sabit olup Chi ve GOD derişimine bağlı akım cevaplarına

ait yanıt yüzey ve kontur grafikleri sırasıyla 4.14 ve 4.15’de verilmiştir. Elde edilen bu grafikler Lineer model için elde edilen grafiklerle aynı özelliktedir.



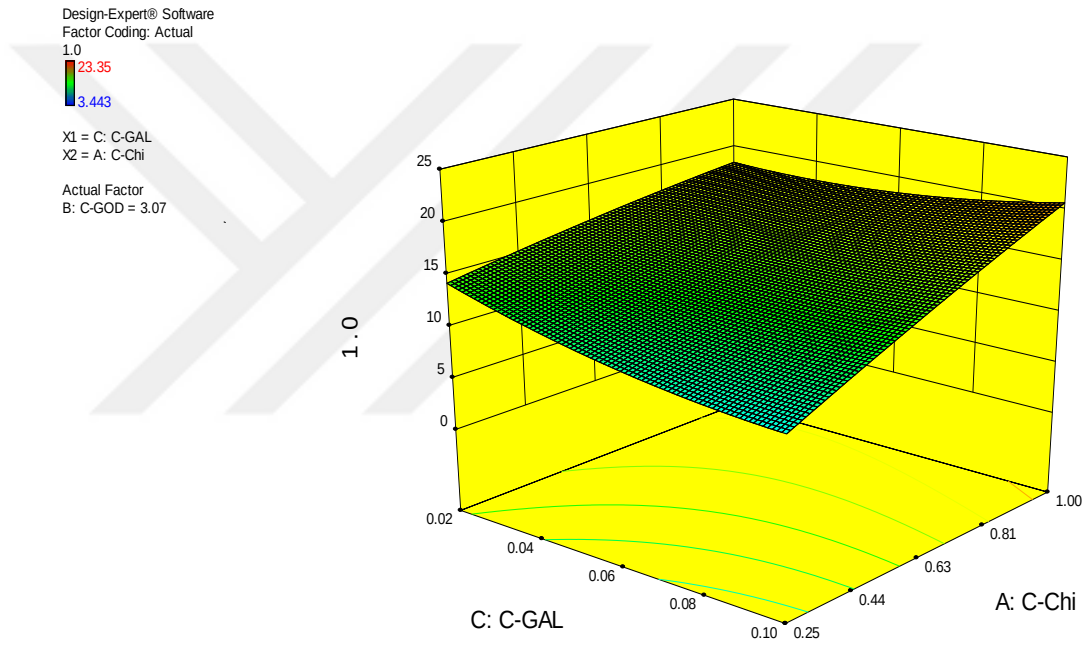
Şekil 4.14. PPy ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box-Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen yanıt yüzey grafiğı



Şekil 4.15. PPy ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box-Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen kontur grafiğı

Şekil 4.14 ve 4.15’de görüldüğü gibi GOD derişimi arttıkça akım cevabı değerleri artmıştır. Ayrıca Chi derişimi arttıkça GOD derişimindeki artışa bağı net akım değerlerindeki atrış oranı da yükselmiştir. En yüksek akım cevabı % 1.0 Chi ve 4 mg/ml GOD derişimi için elde edilmiştir.

Aynı çalışmada GOD derişiminin sabit tutulup Chi ve GAL değışkenleri için yanıt yüzey ve kontur grafikleri sırasıyla Şekil 4.16 ve 4.17’de verilmiştir. Yanıt yüzey ve kontur grafikleri gözönüne alındığında, cevap yüzeyini Chi değışkeninin belirlediğı açıkça görölmektedir. Chi derişimi arttıkça akım değerleri artmıştır.

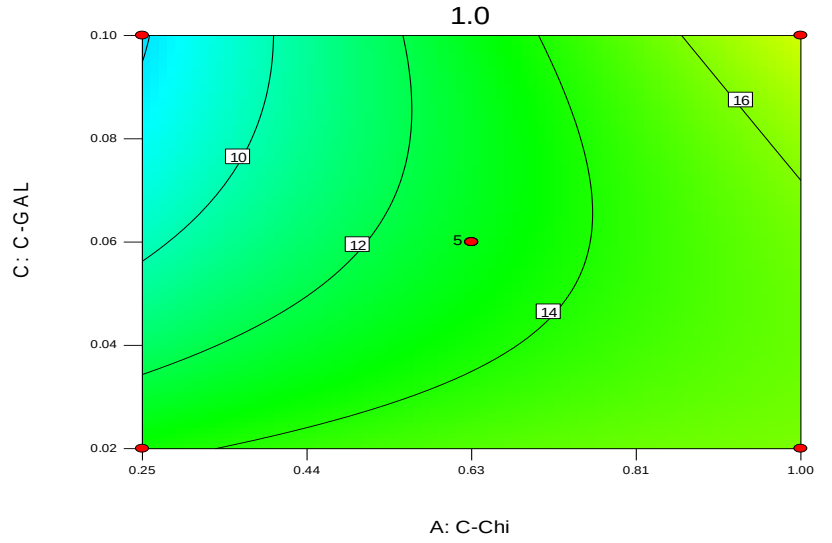


Şekil 4.16. PPy ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box-Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen yanıt yüzey grafiğı

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
1.0
● Design Points
23.35
3.443

X1 = A: C-Chi
X2 = C: C-GAL

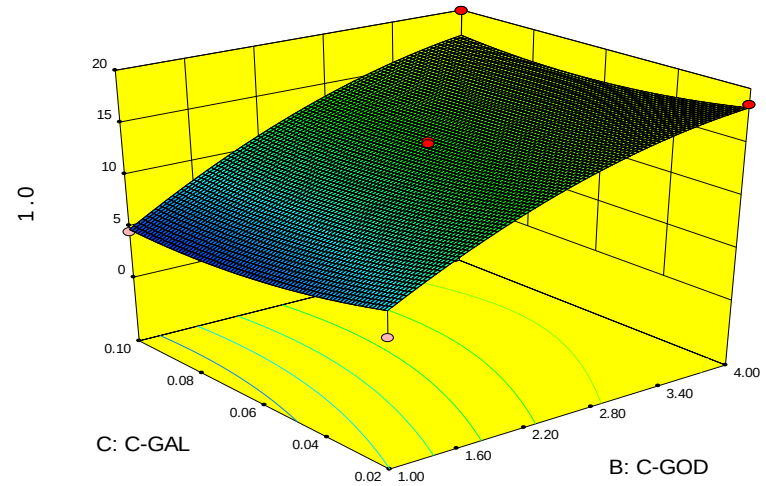
Actual Factor
B: C-GOD = 2.50



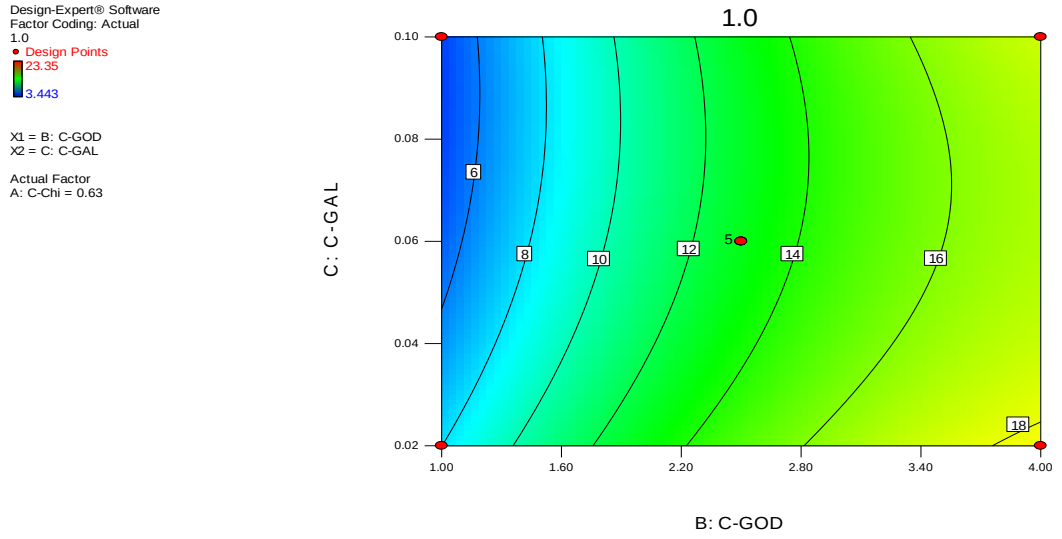
Şekil 4.17. PPy ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box -Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen kontur grafiğı

Chi derişiminin sabit tutulup GOD ve GAL derişimine bağılı yanıt yüzey ve kontur grafikleri Şekil 4.18 ve 4.19’da verilmiştir. Yanıt yüzey grafiğinde görüldüğü gibi akım cevabı GOD derişimine bağılı olarak artmaktadır. Sabit GOD derişimi için GAL derişiminin önemli bir etkisi bulunmamaktadır.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
1.0
● Design points above predicted value
○ Design points below predicted value
23.35
3.443
X1 = B: C-GOD
X2 = C: C-GAL
Actual Factor
A: C-Chi = 0.63



Şekil 4.18. PPy ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box-Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen yanıt yüzey grafiğı



Şekil 4.19. PPy ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box- Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen kontur grafiğı

4.1.2.2. PNMP ile Modifiye Edilmiş Elektrottan Enzim Elektrot Tasarımında Chi, GOD ve GAL Derişimlerinin Optimizasyonu

Bu çalışmada Box-Behnken tasarım optimizasyonu kullanılmıştır. Çalışmanın bu aşamasında daha önce belirlenen optimum NMP derişimi (10 mM) ve tarama hızı (20 mV/s) şartlarında oluşturulan PNMP tabakası üzerinde GOD içeren kitosan ve GAL derişimlerinin optimizasyonu için YYY uygulanmıştır. Her çalışma elektrodu Çizelge 4.14.'de belirtilen Chi, GOD ve GAL oranlarında hazırlanmış, 50 mM fosfat tamponunda ve 0,8 V çalışma potansiyelinde kararlı hal akımları elde edilinceye kadar bekletilmiş, ardından 0,5, 1, 2 ve 3 mM glukoz çözeltilerindeki net akım değerleri ölçülmüştür. Diğer çalışmalarda olduğu gibi bu çalışmada da 4 farklı glukoz derişimi için okunan net akım değerlerinin doğrusal olarak arttığı ve yanıt yüzey, kontur ve gerçek değer-tahmini değer grafiklerinin ve ayrıca ANOVA değerlerinin benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Bu nedenle 4 farklı glukoz derişimi için ölçülen net akım değerleri Çizelge 4.14.'de verilmiştir. Ancak sadece 1 mM glukoz için elde edilen değerlerin ANOVA analizleri, yanıt yüzey, kontur ve gerçek ve tahmini değer grafikleri verilmiştir.

Çizelge 4.14. PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box Behnken tasarımı ile optimizasyonu

DeneySEL Çalışmalar	Chi derişimi (%)	GOD derişimi (mg/ml)	GAL derişimi (%)	I(μA/cm ²)			
				0,5 Mm glukoz	1mM glukoz	2mM glukoz	3mM glukoz
1	0,63	1,00	0,10	6,51	13,32	26,44	39,03
2	1,00	2,50	0,10	7,75	15,67	30,68	45,24
3	1,00	2,50	0,02	6,62	13,60	26,65	38,66
4	0,25	1,00	0,06	1,14	2,38	4,70	6,831
5	0,63	4,00	0,02	6,47	12,98	25,39	37,14
6	0,63	4,00	0,10	6,71	13,82	27,23	40,17
7	0,25	2,50	0,10	2,62	5,57	10,63	15,55
8	0,25	4,00	0,0625	4,18	8,84	17,17	25,21
9	0,625	1,00	0,025	3,94	9,87	21,39	32,36
10	1,00	4,00	0,0625	10,13	20,63	41,06	60,12
11	0,625	2,50	0,0625	4,99	10,09	19,49	28,49
12	0,25	2,50	0,0250	2,50	5,12	9,70	13,87
13	0,625	2,50	0,0625	4,95	9,95	18,68	26,95
14	0,625	2,50	0,0625	4,36	8,99	16,93	24,62
15	0,625	2,50	0,0625	4,04	9,62	17,37	24,86
16	0,625	2,50	0,0625	3,71	7,71	15,01	21,75
17	1,00	1,00	0,0625	3,31	6,77	13,04	18,63

Çizelge 4.14’de görüldüğü gibi çalışılan deney setlerinin tümünde de glukoz derişimine bağılı olarak net akım değerleri artmıştır. En yüksek net akım 10 no’lu çalışmada %1 Chi, 4 mg/ml GOD ve % 0,0625 GAL ile hazırlanan elektrot için elde edilmiştir. Çizelge 4.15’de ise program tarafından yapılan matematiksel model analizi verilmiştir.

Çizelge 4.15. PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin YYY optimizasyonunda elde edilen sonuçlara göre matematiksel model analizi

Kaynak	p-değeri	Model uygunsuzluğu p-değeri	R²_{adj}	Pred-R²	
<u>Doğrusal</u>	<u>0,0006</u>	<u>0,0205</u>	<u>0,6646</u>	<u>0,4617</u>	<u>önerilen</u>
İki faktör etkileşimli	0,5240	0,0157	0,6480	0,0034	
Kuadratik	0,2315	0,0161	0,7174	-0,8102	
Kübik	0,0161		0,9534		

Çizelge 4.15.'deki sonuçlardan görüldüğü gibi akım değerinin tahminlenmesinde istatistiki verilere göre program tarafından doğrusal model önerilmiştir. Seçilen matematiksel modele göre düzenlenmiş ANOVA değerleri ve modele ait istatistiksel veriler Çizelge 4.16.'de verilmiştir.

Çizelge 4.16. PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box Behnken tasarımı ile optimizasyonu-ANOVA analizi (Lineer Model)

Kaynak	Kareler toplamı	SD	Ortalama kareler	F değeri	p-değeri Prob > F	
Model	228,54	3	76,18	11,57	0,0373	anlamlı
A-C-Chi derişimi	151,79	1	151,79	23,05	0,7145	
B-C-GOD	70,83	1	70,83	10,75	0,8950	
C-C-GAL	5,92	1	5,92	0,90	0,0165	
Kalıntı	85,61	13	6,59			
Model uygunsuzluğu	81,95	9	9,11	9,95	0,0205	anlamlı
Saf hata	3,66	4	0,92			
Toplam	314,15	16				

Standart sapma	2,57	R²	0,7275
Ortalama	10,12	R²_{adj}	0,6646
C.V. %	25,36	Pred-R²	0,4617
PRESS	169,10	Adeq Precision	11,779

S.D. Serbestlik Derecesi

Çizelge 4.16'da çalışma verilerinin değerlendirilmesi sonucu, yüzey cevabına en uygun modelin lineer model olduğu ANOVA analizlerinden anlaşılmıştır. Ancak PPy için yapılan çalışmalardaki sonuçlara paralel olarak hem model hem de lack of fit analizi sonucu sonuçlar anlamlı bulunmuştur-ki lack of fit değerinin anlamsız olması arzu edilir. % 25,36 olan % C.V. değeri de standart sapmanın yüksek ve değerlerin birbirinden farklı olduğunu göstermektedir. R²_{Adj} ile Pred.R² değerleri arasındaki fark yaklaşık 0,2; çalışmada Adeq. Precision (yeterli hassasiyet) değeri 11,78 olarak

belirlenmiştir. Lineer modele göre 1 mM glukoz derişiminde ölçülecek net akım değeri için önerilen Eşitlik 4.6. aşağıda verilmiştir.

$$I = - 3.53268 + 11.61567 \times C_{Chi} + 1.98367 \times C_{GOD} + 22.94333 \times C_{GAL} \quad (4.6)$$

3 değişkenli modelde yanıt yüzey grafikleri verilirken, değişkenlerden birinin sabit değeri için diğer iki değişkenin ilişkisi irdelenir. Bu nedenle 3 farklı grafik oluşturulur. Ancak lineer modelleme gereği, değişkenlerden birinin sabit olduğu ve diğer iki bileşenin yanıt yüzey grafiği vardır. Bu nedenle PPy ile yapılan çalışmada da olduğu gibi 3 değişkenin yüzey cevaba etkilerini ayrı ayrı görebilmek amacıyla kuadratik model oluşturulmuştur. Bu model kapsamında yapılmış olan ANOVA analiz sonuçları Çizelge 4.17’de verilmiştir.

Çizelge 4.17. PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box-Behnken tasarımı ile optimizasyonu-ANOVA analizi (Kuadratik Model)

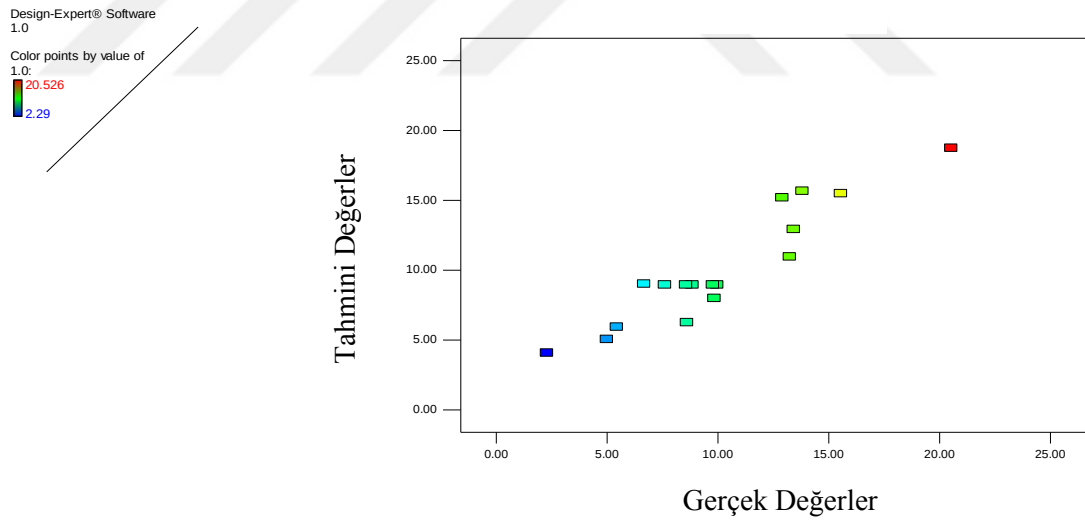
Kaynak	Kareler toplamı	SD	Ortalama kareler	F değeri	p-değeri Prob > F	
Model	275,31	9	30,59	5,51	0,0174	anlamlı
A-C-Chi derişimi	151,79	1	151,79	27,35	0,0012	
B-C-GOD	70,83	1	70,83	12,76	0,0091	
C-C-GAL	5,92	1	5,92	1,07	0,3360	
AB	14,24	1	14,24	2,57	0,1533	
AC	0,70	1	0,70	0,13	0,7324	
BC	1,55	1	1,55	0,28	0,6132	
A ²	4,34	1	4,34	0,78	0,4058	
B ²	10,58	1	10,58	1,91	0,2098	
C ²	15,42	1	15,42	2,78	0,1395	
Kalıntı	38,85	7	5,55			
Model uygunsuzluğ	35,18	3	11,73	112,81	0,0161	anlamlı
Saf hata	3,66	4	0,92			
Toplam	314,15	16				
Standart sapma		2,36		R ²	0,8763	
Ortalama		10,12		R ² _{adj}	0,7174	
C.V. %		23,28		Pred-R ²	- 0,8102	
PRESS		568,67		Adeq Precision	8,116	

Çizelge 4.17.’de görüldüğü gibi model değeri ve lack of fit değeri lineer modelde olduğu gibi kuadratik modelde de anlamlı çıkmıştır. Chi, GOD ve GAL derişimleri için belirlenen ortalama kareler değerleri kıyaslandığında, net akım cevabı üzerinde etkili olan parametreler büyükten küçüğe sırayla Chi, GOD ve GAL olarak

belirlenmiştir. R^2 değeri, % C.V., R^2_{Adj} ile $Pred.R^2$ değerleri arasındaki fark da lineer modele daha yüksek çıkmıştır-ki bu durum kuadratik modelin lineer modele göre uygunluğunun daha düşük olmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca -0,81 olan negatif $Pred.R^2$ değeri modelin değil de ortalama değer tahminlemede kullanımının daha uygun olduğu anlamına gelmektedir. Design expert tarafından kuadratik model için önerilen Eşitlik 4.7 ise aşağıda verilmiştir.

$$I = + 6.87216 + 10.39300 \times C_{Chi} - 2.94339 \times C_{GOD} - 138.10556 \times C_{GAL} + 3.35378 \times C_{Chi} \times C_{GOD} + 29.81333 \times C_{Chi} \times C_{GAL} - 11.07556 \times C_{GOD} \times C_{GAL} - 7.22009 \times C_{Chi}^2 + 0.70463 \times C_{GOD}^2 + 1360.83556 \times C_{GAL}^2 \quad (4.7.)$$

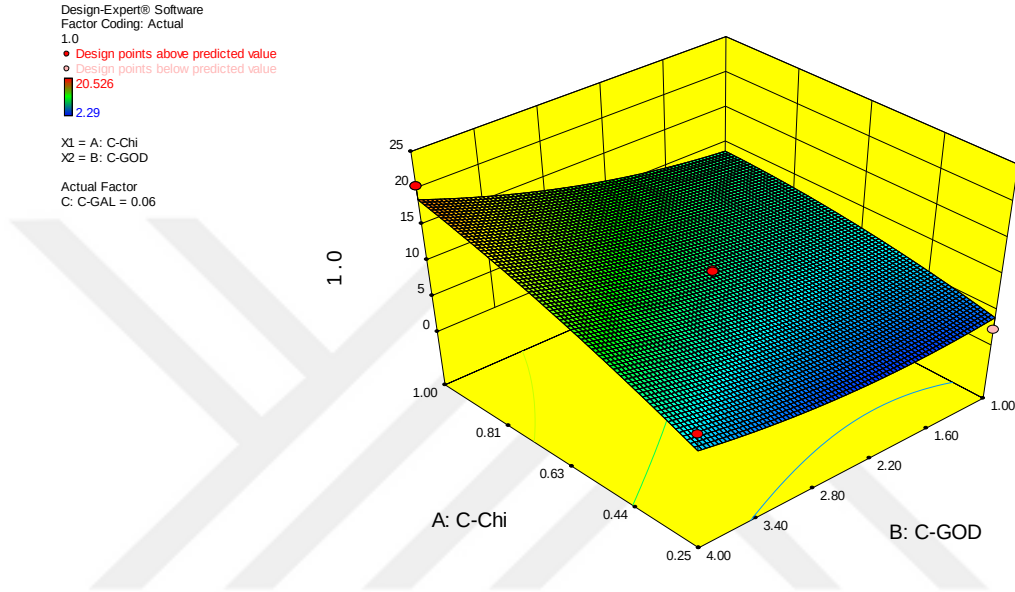
Eşitlik 4.7. kullanılarak PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin YYY-Box Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen tahmin edilen net akım cevapları ile gerçek sonuçların birbirine yakınlığını gösteren, gerçek ve tahmini değerler grafiği Şekil 4.20.'de verilmiştir.



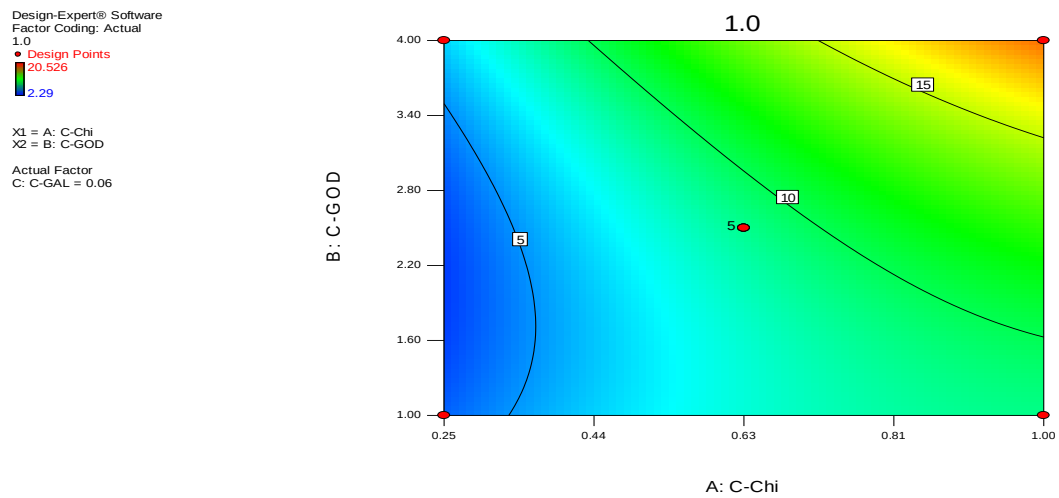
Şekil 4.20. PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen gerçek ve tahmini değerler grafiği

Şekil 4.20.'de görüldüğü gibi model yardımıyla tahmin edilen biyosensörün akım cevapları ile deneysel olarak elde edilen gerçek akım değerleri arasında önemli bir değişim bulunmamaktadır.

Çalışmada 3 değişken olduğu için yanıt yüzey grafikleri bir değişkenin sabit tutularak diğer iki değişkene göre verilir. Model için, GAL derişiminin sabit olup Chi ve GOD derişimine bağlı akım cevaplarına ait yanıt yüzey ve kontur grafikleri sırasıyla Şekil 4.21 ve 4.22’de verilmiştir. Elde edilen bu grafikler lineer model için elde edilen grafiklerle aynı özelliktedir.

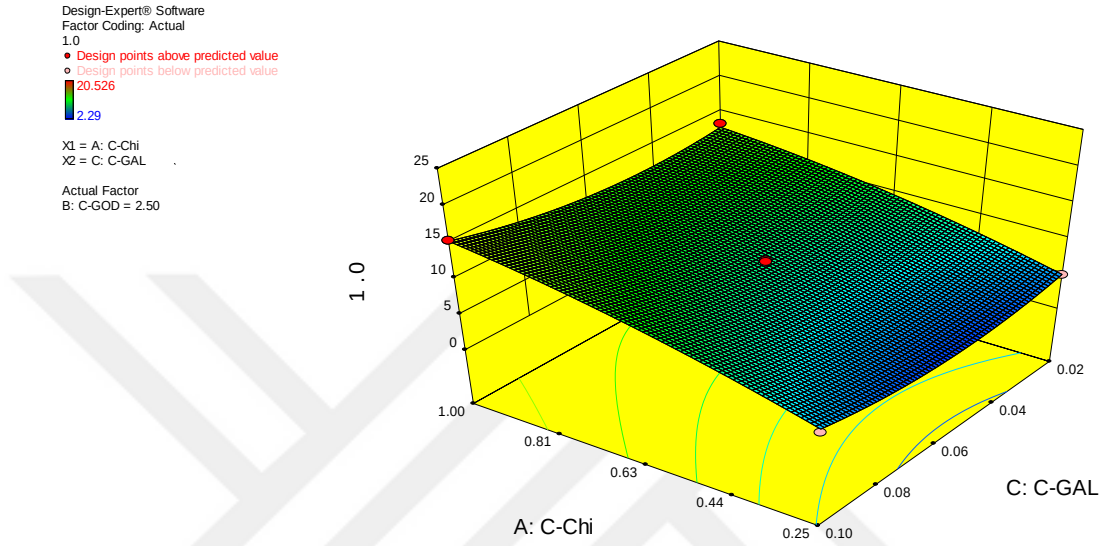


Şekil 4.21. PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen yanıt yüzey grafiği

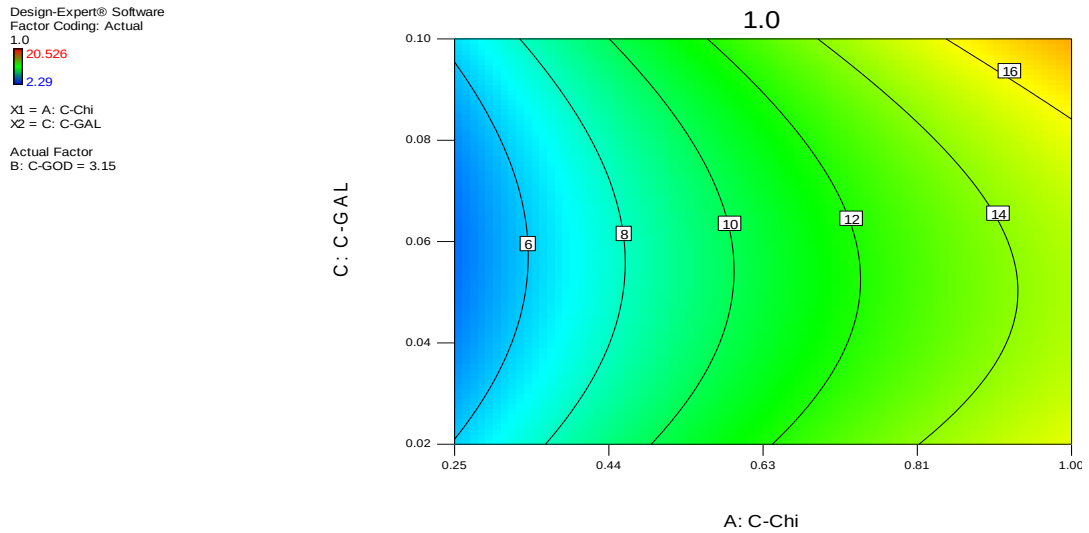


Şekil 4.22. PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box-Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen kontur grafiği

Şekil 4.21 ve 4.22 de görüldüğü gibi Chi ve GOD derişimi arttıkça akım cevabı artmıştır. En yüksek akım cevabı % 1 Chi ve 4 mg/ml GOD ile hazırlanan elektrotlar için elde edilmiştir. Şekil 4.23 ve 4.24’de ise GOD derişiminin sabit tutularak Chi ve GAL derişkenlerinin derişimine bağılı yanıt yüzey ve kontur grafikleri verilmiştir.

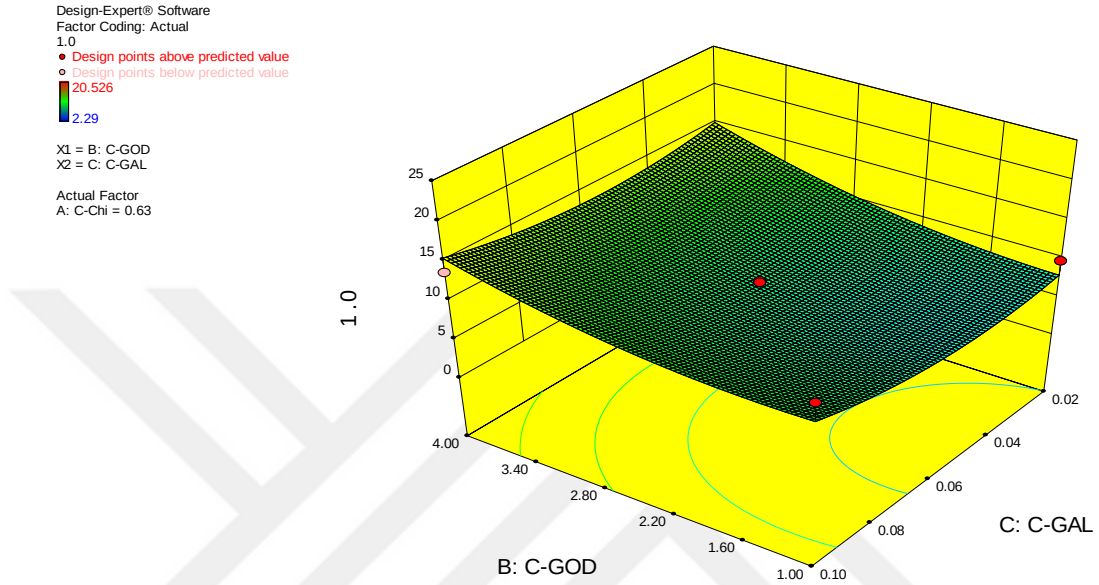


Şekil 4.23. PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box-Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen yanıt yüzey grafiğı

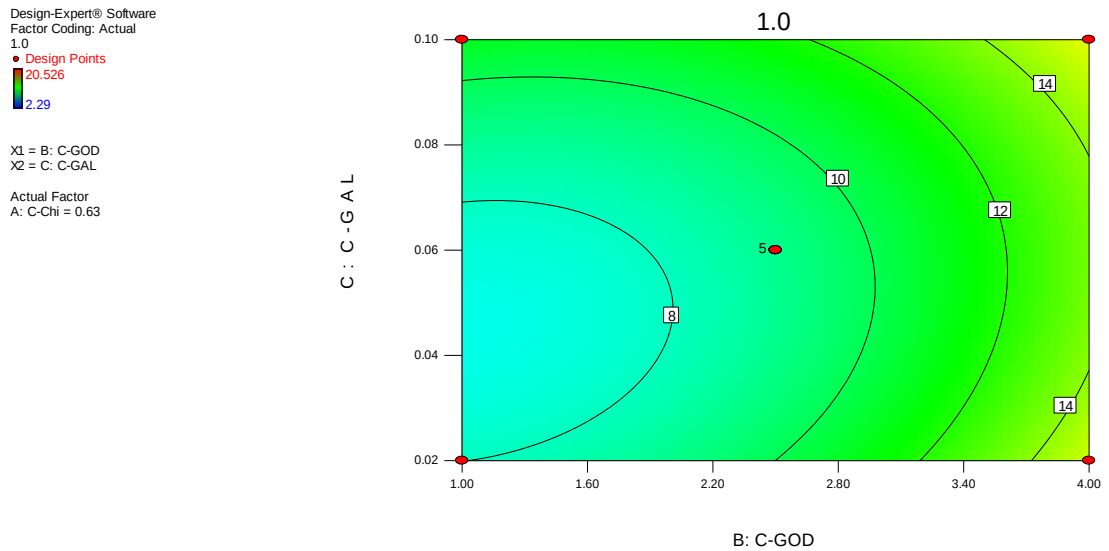


Şekil 4.24. PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box-Behnken tasarımı ile optimizasyonunda Kuadratik model için elde edilen kontur grafiğı

Şekil 4.23 ve 4.24’de görüldüğü gibi Chi derişimi arttıkça akım değerleri artmıştır. Aynı Chi derişimi için GAL derişimi değışse de akım değerlerinde önemli bir değışim gözlenmemiştir. Şekil 4.25 ve 4.26, Chi derişimi sabitken GOD ve GAL derişimine bağılı yanıt yüzey ve kontur grafikleri verilmiştir.



Şekil 4.25. PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerini Box Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen yanıt yüzey grafiğı



Şekil 4.26. PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box-Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen kontur grafiğı

Şekil 4.25 ve 4.26’da görüldüğü gibi GOD derişimi arttıkça akım cevabı artmış, aynı GOD derişimi için GAL derişimine bağı olarak önemli bir akım değışiminin meydana gelmediğı gözlenmiştir.

4.1.2.3. PPy-ko-PNMP Kaplı Elektrodun Chi, GOD ve GAL Derişiminin Optimizasyonu

Bu çalışmada Box-Behnken tasarımı optimizasyonu kullanılmıştır. YYY ile belirlenen optimum derişim oranı olan NMP ve Py derişiminden 5’er mM (toplam 10 mM monomer) alınarak 50 mV/s tarama hızı ile elde edilen PPy-ko-PNMP filmi üzerinde GOD içeren kitosan ve GAL derişimlerinin optimizasyonu için YYY uygulanmıştır. Her çalışma elektrodu Çizelge 4.18.’da belirtilen Chi, GOD ve GAL oranlarında hazırlanmış, 50 mM fosfat tamponunda ve 0,8 V çalışma potansiyelinde kararlı hal akımları elde edilinceye kadar bekletilmiş, ardından 0,5, 1, 2 ve 3 mM glukoz çözeltilerindeki net akım değıerleri hesaplanmıştır. Diğér çalışmalarda olduğı gibi bu çalışmada da 4 farklı glukoz derişimi için okunan net akım değıerlerinin doğrusal olarak arttığı ve yanıt yüzey, kontur ve gerçek değıer-tahmini değıer grafiklerinin ve ayrıca ANOVA değıerlerinin benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Bu nedenle 4 farklı glukoz derişimi için hesaplanan net akım değıerleri Çizelge 4.18.’de verilmiştir. Ancak sadece 1 mM glukoz için elde edilen değıerlerin ANOVA analizleri, yanıt yüzey, kontur ve gerçek değıer-tahmini değıer grafikleri verilmiştir.

Çizelge 4.18’de görüldüğü gibi, her elektrot için akım değıerleri glukoz derişimine bağı olarak artmıştır. Deney setindeki 5 no’lu çalışma (% 0,625 Chi, 4 mg/ml GOD ve %0,025 GAL ile hazırlanan elektrot) ile hesaplanan net akım değıerleri belirgin derecede yüksek çıkmıştır.

Çizelge 4.18.’de verilen akım değıerleri Design Expert bilgisayar programında analiz edildiğinde, net akım cevaplarını tanımlamak için program tarafından oluşturulan doğrusal, iki faktör etkileşimli, kuadratik ve kübik modeller için model analizi yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.19.’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.18. PPy-ko-PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box-Behnken tasarımı ile optimizasyonu

Deneyisel Çalışmalar	Chi derişimi (%)	GOD derişimi (mg/ml)	GAL derişimi (%)	I($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)			
				0,5 Mm glukoz	1mM glukoz	2mM glukoz	3mM glukoz
1	0,625	1,00	0,1000	4,27	8,74	16,94	24,72
2	1,000	2,50	0,1000	8,92	17,73	36,55	53,54
3	1,000	2,50	0,0250	9,58	19,07	37,82	56,31
4	0,250	1,00	0,0625	3,17	6,46	12,91	18,77
5	0,625	4,00	0,0250	13,98	28,02	55,42	81,23
6	0,625	4,00	0,1000	12,13	24,14	47,23	69,85
7	0,250	2,50	0,1000	2,84	5,86	11,27	16,60
8	0,250	4,00	0,0625	4,47	8,83	17,23	25,52
9	0,625	1,00	0,0250	5,52	10,79	20,83	30,05
10	1,000	4,00	0,0625	11,84	23,60	46,29	68,85
11	0,625	2,50	0,0625	4,103	8,16	15,61	22,92
12	0,250	2,50	0,0250	2,91	5,85	11,35	16,62
13	0,625	2,50	0,0625	5,86	11,82	22,48	32,87
14	0,625	2,50	0,0625	5,48	10,81	21,13	30,93
15	0,625	2,50	0,0625	4,20	8,68	17,09	24,39
16	0,625	2,50	0,0625	4,09	7,96	16,12	23,32
17	1,000	1,00	0,0625	3,98	8,12	16,08	23,63

Çizelge 4.19. PPy-ko-PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin optimizasyonu çalışmasında elde edilen sonuçlara göre yapılan matematiksel model analizi

Kaynak	Sequential p-değeri	Model uygunsuzluğu p-değeri	R ² _{adj}	Pred-R ²
Doğrusal	0,0017	0,0233	0,4495	0,3921
İki faktör etkileşimli	0,5835	0,0169	0,6353	-0,0828
<u>Kuadratik</u>	<u>0,0135</u>	<u>0,0937</u>	<u>0,9259</u>	<u>0,1933</u>
Kübik	0,0937		0,9404	

Çizelge 4.19'daki sonuçlardan görüldüğü gibi en uygun model kuadratik model olarak seçilmiş 1 mM glukoz çözeltisi için en iyi tanımlama kuadratik model ile yapılabilmektedir. Elde edilen modifiye modelin ANOVA analizi Çizelge 4.20.'de verilmiştir.

Çizelge 4.20. PPy-ko-PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box-Behnken tasarımı ile optimizasyonu(ANOVA analizi)

Kaynak	Kareler toplamı	SD	Ortalama kareler	F değeri	p-değeri Prob > F	
Model	750,52	9	83,39	11,40	0,0021	anlamlı
A-C-Chi derişimi	215,50	1	215,50	29,46	0,0010	
B-C-GOD	318,62	1	318,62	43,56	0,0003	
C-C-GAL	6,60	1	6,60	0,90	0,3739	
AB	42,98	1	42,98	5,88	0,0458	
AC	0,46	1	0,46	0,063	0,8097	
BC	0,84	1	0,84	0,11	0,7449	
A ²	0,36	1	13,1	21,79	0,2223	
B ²	68,36	1	68,3	69,35	0,0184	
C ²	81,74	1	81,74	11,18	0,0124	
Kalıntı	84,17	7	7,31			
Model uygunsuzluğu	51,20	3	13,09	4,38	0,0937	anlamsız
Saf hata	11,94	4	2,99			
Toplam	801,72	16				
	Standart sapma	2,70		R ²	0,9361	
	Ortalama	12,63		R ² _{adj}	0,8540	
	C.V. %	21,42		Pred-R ²	0,1933	
	PRESS	646,76		Adeq Precision	11,089	

S.D. Serbestlik Derecesi

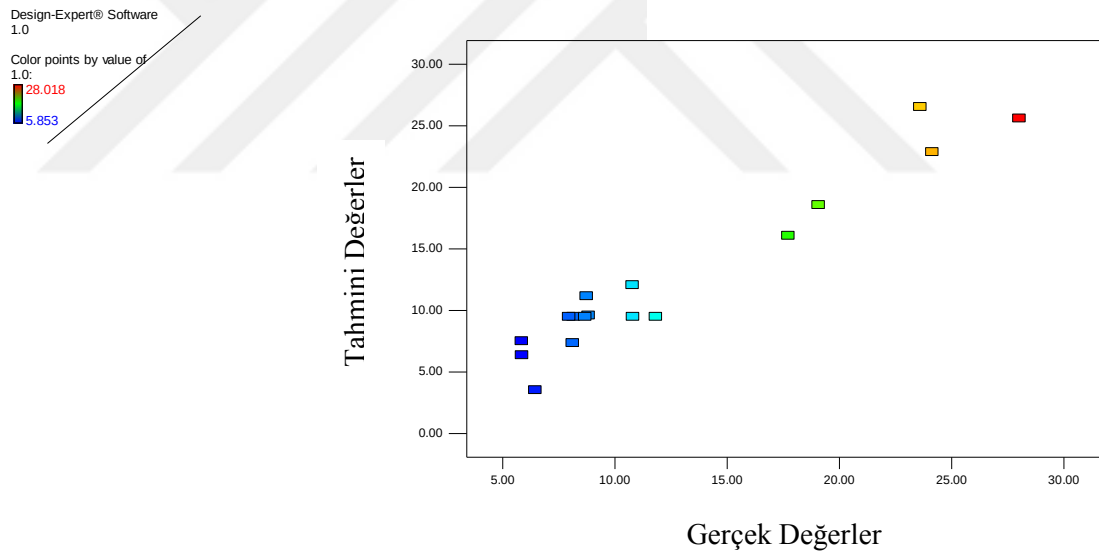
Çizelge 4.20’de görüldüğü gibi model için p değeri 0,0021 olarak hesaplanmış ve sonuç anlamlı bulunmuştur. Model için belirlenen lack of fit değeri ise 0,0937 olarak anlamlı bulunmamıştır. Chi ve GOD varlığının net akım üzerine etkisi ortalama kareler değerlerine bakıldığında; GAL etkisinin, bu iki parametreye göre etkinliğinin düşük olduğu görülmektedir. R² değeri 0,9361 olduğundan, bağımlı değişkende meydana gelen derişimlerin yaklaşık % 94’ünün bağımsız derişkenler tarafından açıklandığı görülmektedir. R²_{adj} değeri 0,8540 olarak hesaplanmıştır ve bu değerin R² değerine olan yakınlığı uygulanan model ile tahmin edilen akım değerlerinin deneysel çalışmalarla elde edilen gerçek sonuçları oldukça iyi yansıttığını göstermektedir.

Uygun bir modelde R²_{adj} ile Pred-R² değeri ile arasındaki farkın 0.2’den fazla olmaması ve %C.V. değerinin küçük olması önerilmektedir. Ancak bu çalışmada R²_{adj} ile Pred-R² değerleri arasındaki fark da (0,6607), % C.V. (%21,42) değeri de büyük çıkmıştır. Çalışmada Adeq. Precision. değeri 11,089 olduğundan model bu kriter açısından da uygundur.

PPy-ko-PNMP ile modifiye elektrot tasarımı optimizasyonunda 1 mM glukoz için ölçülecek akım cevaplarını tahmin etmek amacıyla gerçek değişkenlere bağlı olarak kuadratik model için önerilen Eşitlik 4.8. aşağıda verilmiştir:

$$I = +17.25486 + 16.46500 \times C_{Chi} - 7.88047 \times C_{GOD} - 380.48889 \times C_{GAL} + 5.82756 \times C_{Chi} \times C_{GOD} - 24.05333 \times C_{Chi} \times C_{GAL} - 8.13778 \times C_{GOD} \times C_{GAL} - 12.55218 \times C_{Chi}^2 + 1.79082 \times C_{GOD}^2 + 3133.22667 \times C_{GAL}^2 \quad (4.8.)$$

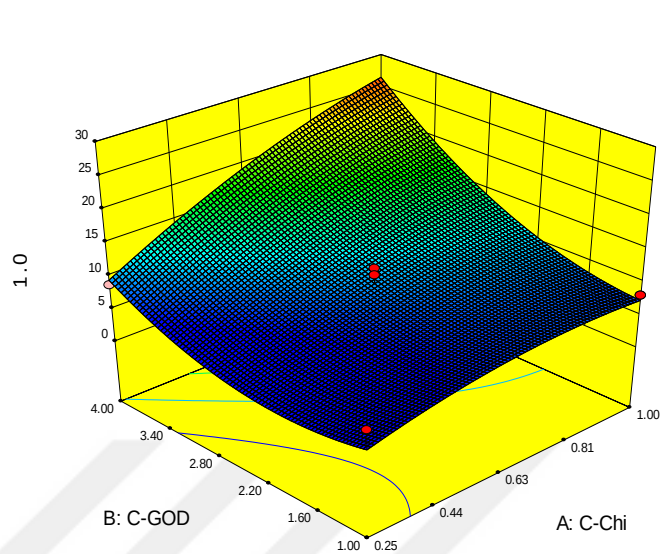
PPy-ko-PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen Eşitlik 4.8. kullanılarak hesaplanan net akım cevapları ile gerçek sonuçların birbirine yakınlığını gösteren gerçek ve tahmini değerler grafiğı Şekil 4.27.'de gösterilmiştir.



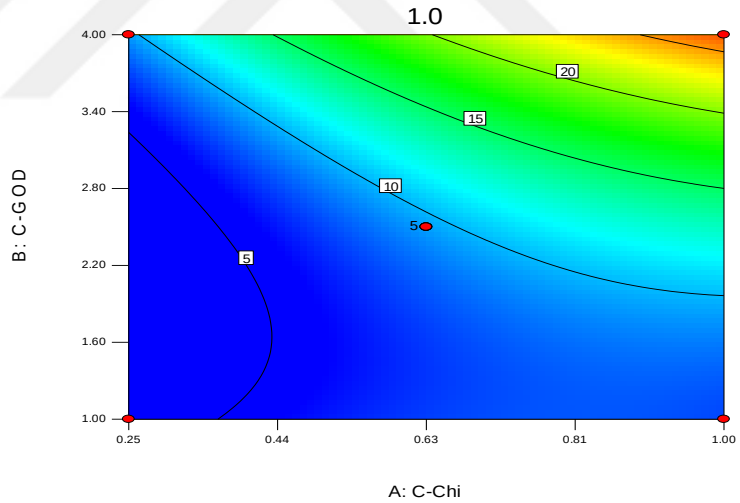
Şekil 4.27. PPy-ko-PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box-Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen gerçek ve tahmini değerler grafiğı

Şekil 4.27'de görüldüğü gibi, model yardımıyla tahmin edilen akım değerleriyle deneysel olarak elde edilen sonuçlar örtüşmektedir. PPy-ko-PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için 3 değişkenden birinin sabit tutulup diğer iki değişkene bağlı elde edilen grafikler düzenlenmiştir. Şekil 4.28 ve 4.29'da sırasıyla

sabit GAL derişimi için Chi ve GOD derişimlerine bağlı yanıt yüzey ve kontur grafikleri verilmiştir.



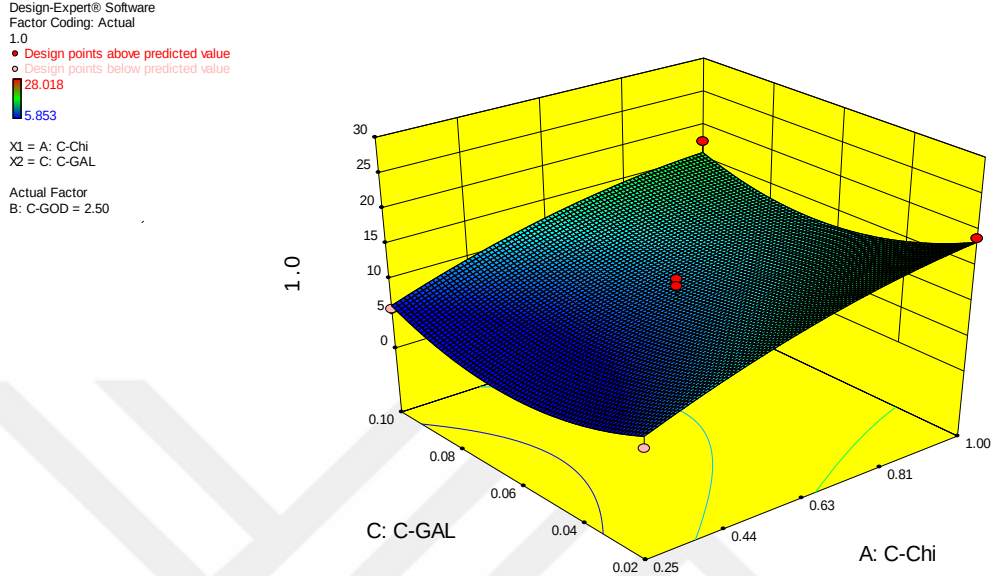
Şekil 4.28. PPy-ko-PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box-Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen yanıt yüzey grafiği



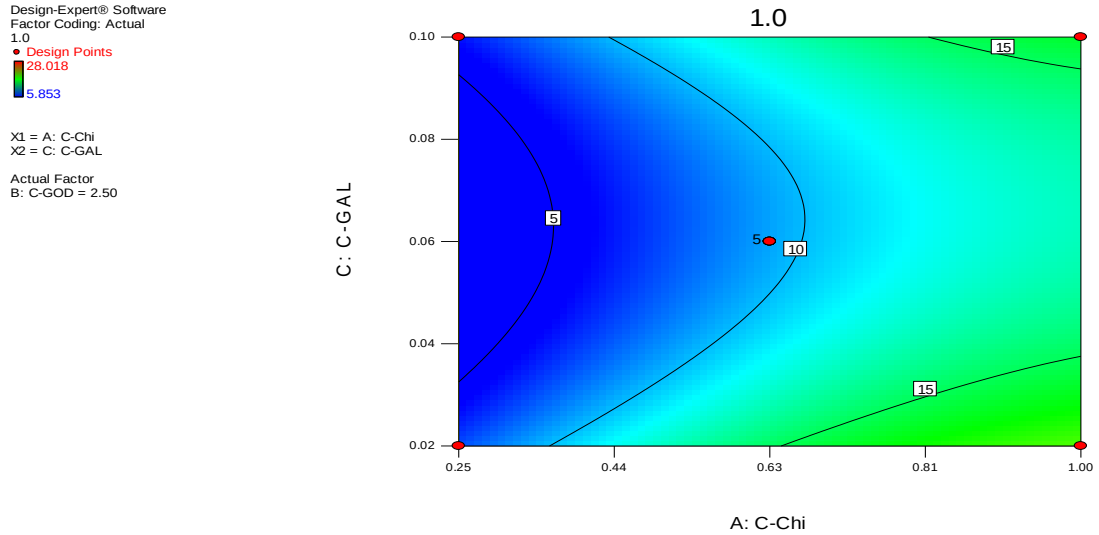
Şekil 4.29. PPy-ko-PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box-Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen kontur grafiği

Şekil 4.28 ve 4.29’da hem Chi, hem de GOD derişimi arttıkça net akım cevapları da belirgin bir biçimde artmaktadır. En yüksek net akım cevabı % 1 Chi ve 4 mg/ml GOD için elde edilmiştir. Benzer şekilde GOD derişimi sabit tutularak Chi ve GAL derişimine bağlı akım cevaplarının yüzey yanıt ve kontur grafikleri Şekil 4.30 ve

4.31’de verilmiştir. Net akım cevabının Chi derişimiyle arttığı görölmektedir. Ancak GAL derişim etkisinin çok yüksek olmadığı görölmektedir.

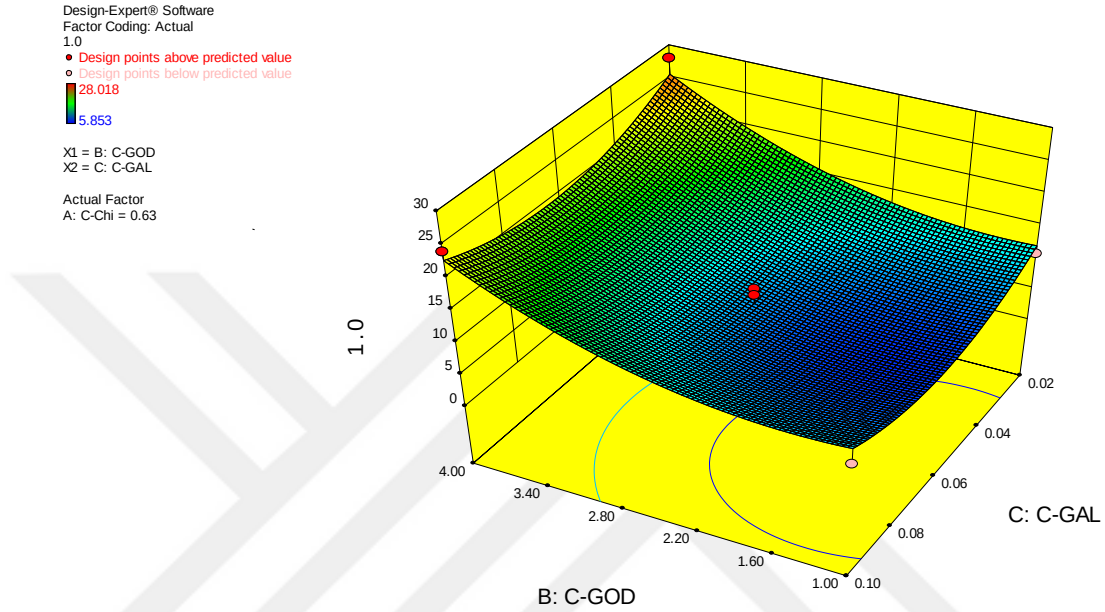


Şekil 4.30. PPy-ko-PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box-Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen yanıt yüzey grafiğı

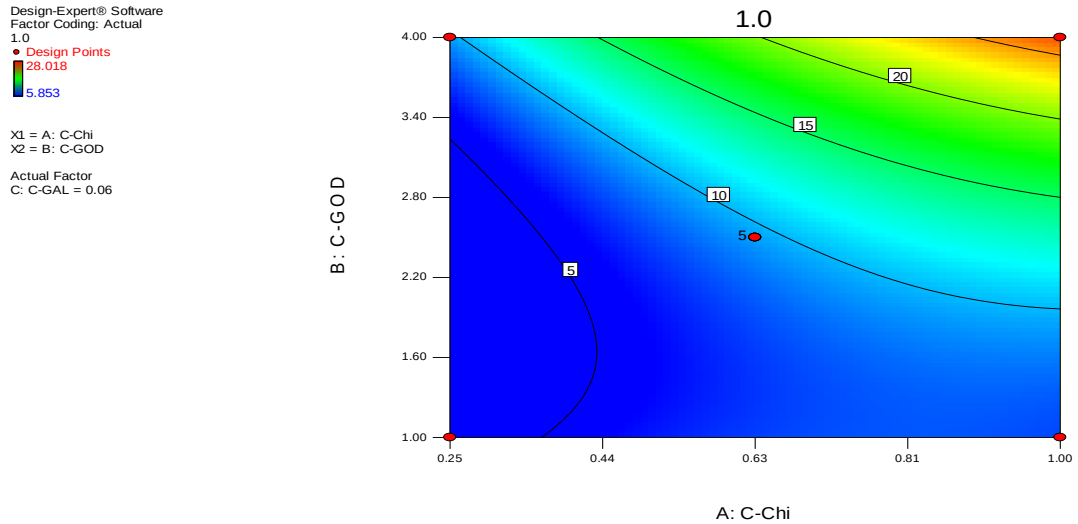


Şekil 4.31. PPy-ko-PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box-Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen kontur grafiğı

Şekil 4.32 ve 4.33’de sabit Chi derişimi için GOD ve GAL derişimine bağı net akım cevaplarının yanıt yüzey ve kontur grafikleri verilmiştir. Grafikler incelendiğinde, akım cevabı üzerinde GOD derişiminin daha belirleyici olduğı, enzim derişimi ile net akım cevabının doğrusal olarak arttığı görülmektedir.



Şekil 4.32. PPy-ko-PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box-Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen yanıt yüzey grafiğı

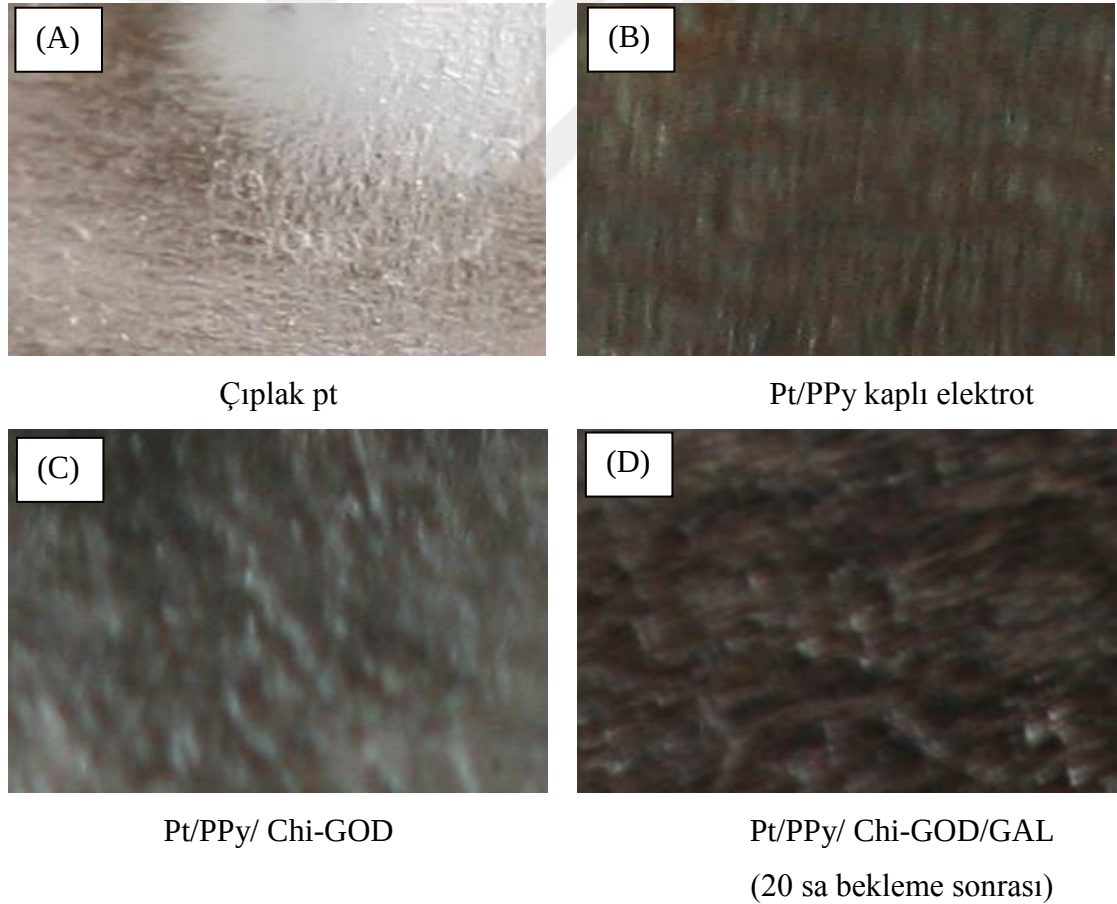


Şekil 4.33. PPy-ko-PNMP ile modifiye elektrot tasarımında Chi, GOD ve GAL derişimlerinin Box -Behnken tasarımı ile optimizasyonunda kuadratik model için elde edilen kontur grafiğı

4.1.3. Enzim Elektrotların Yapısal Karakterizasyonu

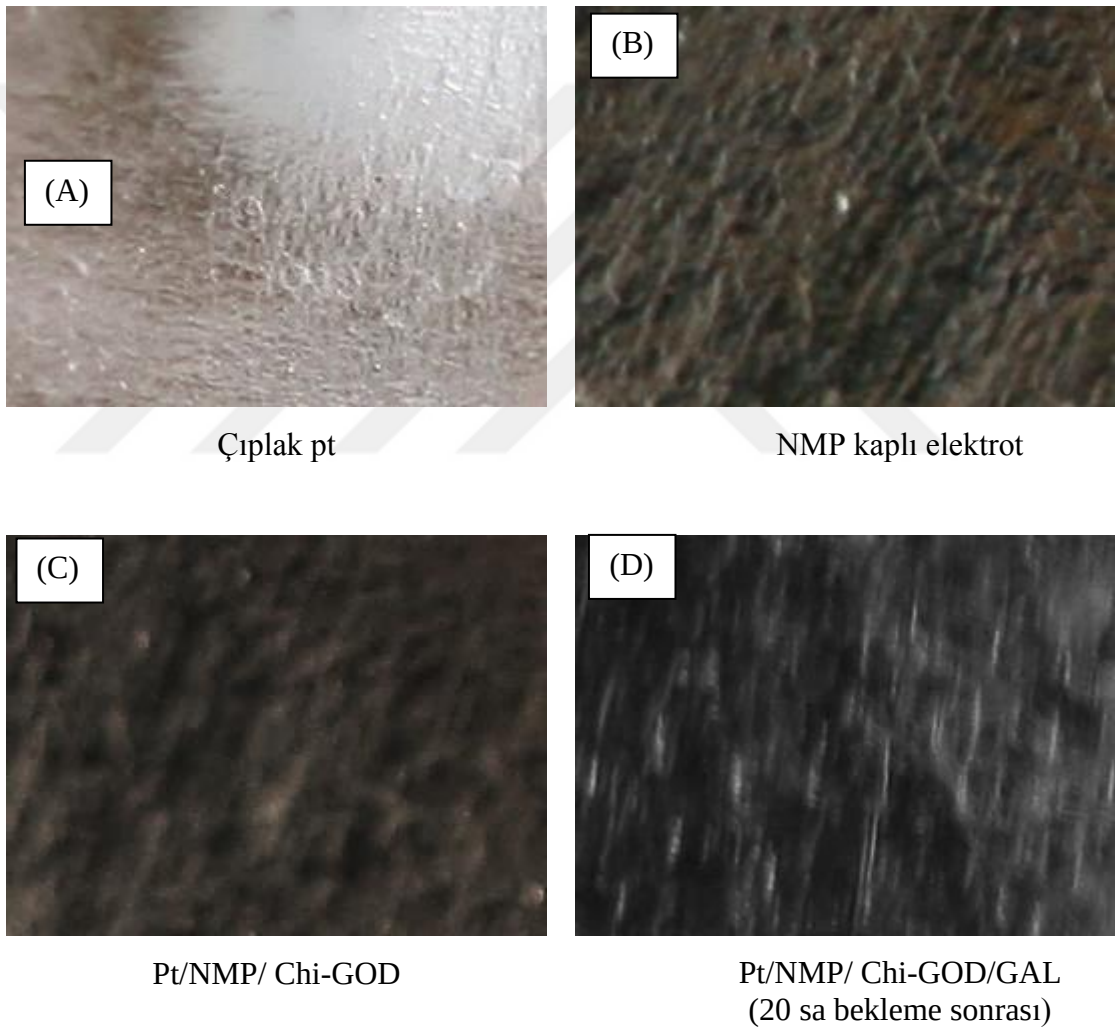
4.1.3.1. Enzim Elektrotların Dijital Fotoğraf Makinesi ile Elde Edilen Görüntüleri

Çıplak Pt, Pt/PPy, Pt/PNMP, Pt/PPy-ko-PNMP, Pt/PPy/Chi-GOD/GAL, Pt/PNMP/Chi-GOD/GAL ve Pt/PPy-ko-PNMP/Chi-GOD/ elektrotların yüzeylerinin görüntüleri dijital fotoğraf makinesi ile 67 kez büyütülerek elde edilmiştir. Şekil 4.34’de çıplak Pt (A) elektrot parlak gri metalik renk iken, Pt/PPy elektrot yüzeyinin koyu mavi renk olduğu, daha sonra enzim immobilizasyonu ile oluşan Pt elektrot GOD+Chi karışımı ile etkileştirildiğinde oluşan Pt/PPy/ Chi-GOD (C) elektrot yüzeyinin koyu gri renkte olduğu ve bu yüzeyin GAL ile etkileştirilmesi sonucu oluşan, Pt/PPy/ Chi-GOD/GAL (D) elektrodun görüntüleri yüzey renginin kahverengine dönüştüğünü göstermektedir. Pt elektrot yüzeyinde her etkileşmeden sonra yüzeyin farklı renge dönüşmesi, etkileşmelerin gerçekleştiğini göstermektedir.

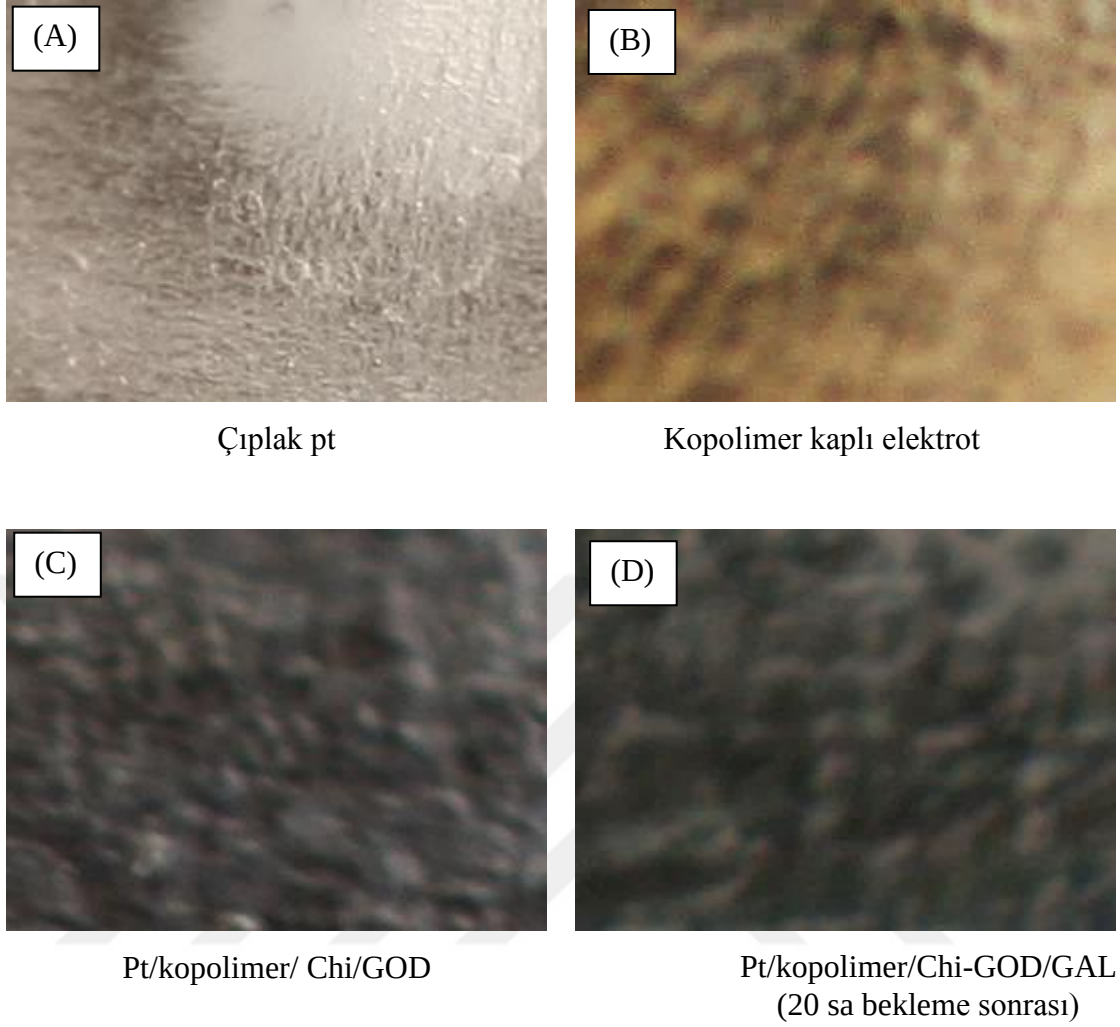


Şekil 4.34. Pt (A), Pt/PPy (B), Pt/PPy/GOD+Chi (C) ve Pt/PPy/GOD+Chi/GAL (D) elektrot yüzeylerinin fotoğraf görüntüleri

Şekil 4. 34’de görüldüğü gibi PNMP kaplı elektrodun yüzeyinin homojen ve siyah renkli olduğu belirlenmiştir. PNMP kaplı yüzeyin Chi ile etkileştirildiğinde rengin açıldığı görülmektedir. Elektrodun 20 saat GAL’a maruz bırakıldıktan sonra da yüzeyinin değişmesi elektrot yüzeyindeki modifikasyonlardan kaynaklanmaktadır. Pt/PPy/ Chi-GOD/GAL elektrot yüzeyinin Pt/PNMP/ Chi-GOD/GAL yüzeyine göre daha homojen olduğu görülmüştür. Şekil 4.35’de ise Pt elektrot yüzeyine uygulanan Pt/PPy-ko-PNMP/Chi-GOD/GAL kopolimer kaplamaların, homopolimer olan PPy ve PNMP yüzeylerine göre daha açık renkli olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.35. Pt (A), Pt/PNMP (B), Pt/PNMP/ Chi-GOD (C) ve Pt/PNMP/ Chi-GOD/GAL (D) elektrot yüzeylerinin fotoğraf görüntüleri

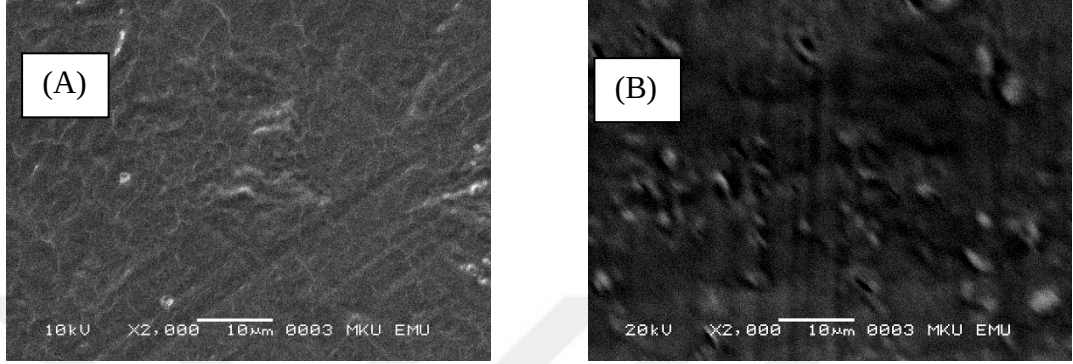


Şekil 4.36. Pt (A), Pt/PPy-ko-PNMP(B), Pt/PPy-ko-PNMP)/ Chi /GOD (C) ve Pt/PPy- ko-PNMP /GOD+Chi/GAL (D) elektrot yüzeylerinin fotoğraf Görüntüleri

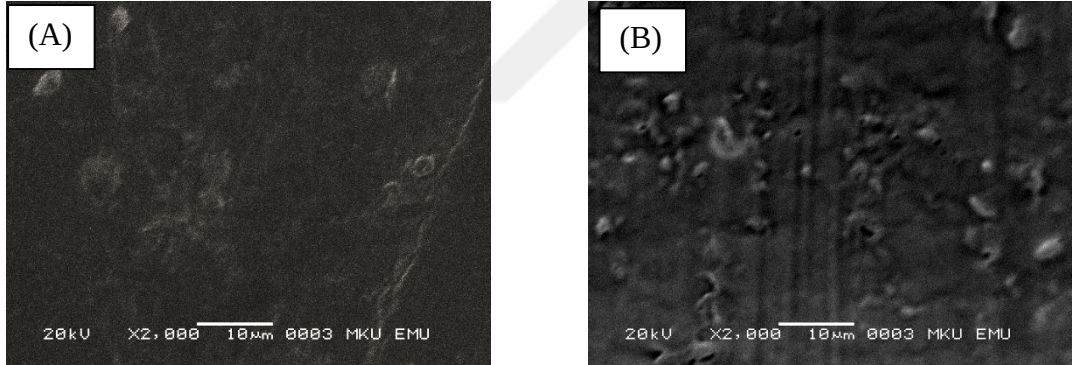
4.1.3.2. Enzim Elektrotların SEM Görüntüleri

Polimer kaplı (A) Pt/PPy, Pt/PNMP, Pt/PPy-ko-PNMP için GOD+Chi ve GAL (B) ile modifiye edilerek hazırlanan elektrotların 2000 kez büyütülmüş SEM görüntüleri Şekil 4.37, 4.38 ve 4.39’da verilmiştir. Şekil 4.37’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 Şekil 4.38’deki PNMP film yüzeyine GOD+Chi ve GAL ile kaplamalar sonucu da gözlenmiş olup, bazı bölgelerin gözenekli olduğu görülmektedir. Şekil 4.39’da PPy-ko-PNMP kopolimer filmin PPy ve PNMP

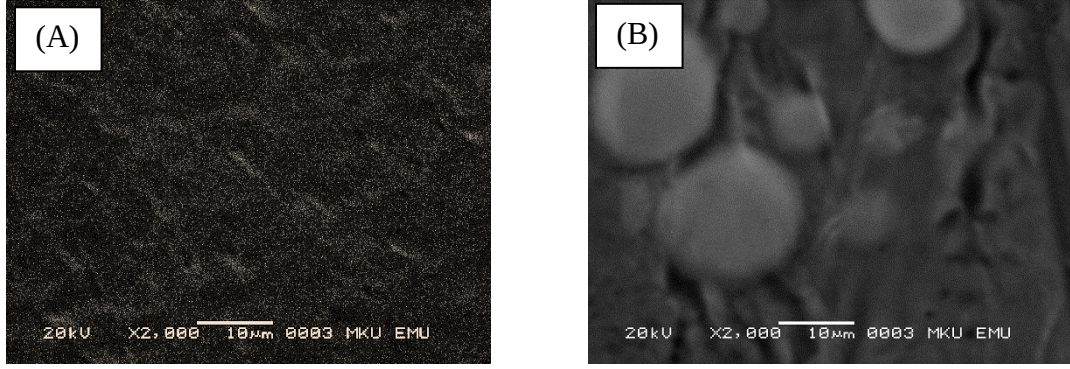
homopolimer filmlere göre daha kalın bir görünüme sahip olduğu düşünülmektedir. Bu yüzeyin, etkileşimler sonrası görüntüsünün, homopolimer film yüzeyindeki etkileşimler sonrası görüntüsünden farklı olarak heterojen yapıda olduğu gözlenmektedir.



Şekil 4.37. Pt/PPy (A) ve Pt/PPy / Chi-GOD/GAL (B) elektrot yüzeylerinin SEM görüntüleri



Şekil 4.38. Pt/PNMP (A) ve Pt/PNMP/ Chi-GOD /GAL (B) elektrot yüzeylerinin SEM görüntüleri



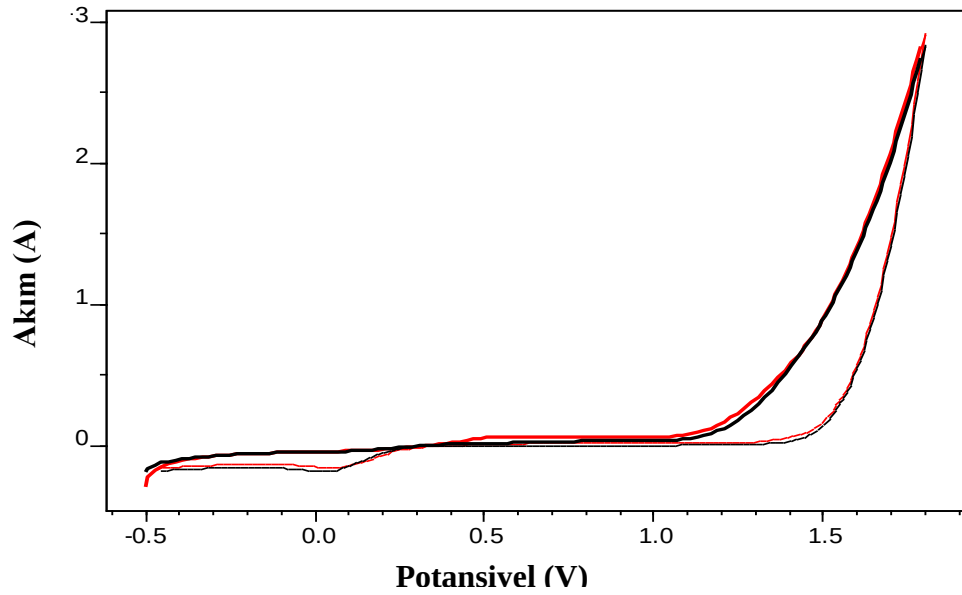
Şekil 4.39. Pt/PPy-ko-PNMP (A) ve Pt/PPy-ko-PNMP /GOD+Chi/GAL (B) elektrot yüzeylerinin SEM görüntüleri

4.1.4. Enzim Elektrotların Elektrokimyasal Karakterizasyonu

4.1.4.1. Enzim Elektrotların CV Analizleri

4.1.4.1.1. PPy ile Modifiye Edilerek Oluşturulan Enzim Elektrodun CV Analizi

Pt/PPy/Chi-GOD/GAL elektrodun glukoz içermeyen ve glukoz içeren tampon çözeltilerde 50 mV/s tarama hızı ile elde edilen dönüşümlü voltammogram eğrisi (CV) Şekil 4.40'da verilmiştir. Dönüşümlü voltametri tekniği metal/çözelti arayüzeyinde elektrot yüzeyinde gerçekleşen yükseltgenme ve indirgenme olaylarını gözlemek için başvurulan tekniktir.

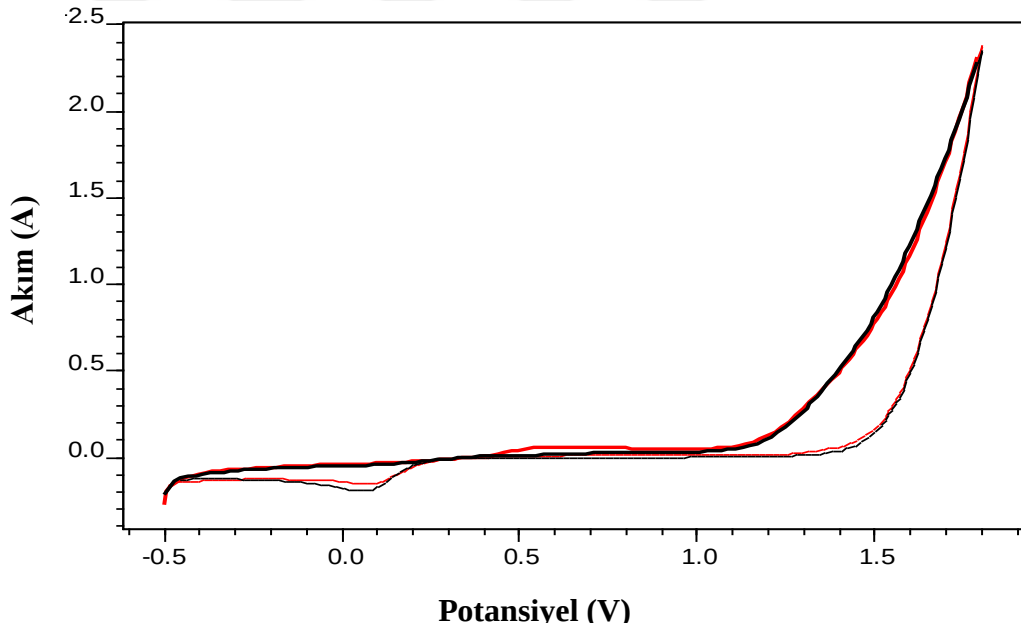


Şekil.4.40. PPy ile modifiye edilerek oluşturulan enzim elektrodun glukoz içermeyen (-) ve glukoz içeren (-) tampon çözeltide elde edilen CV diyagramı (50 mV/s)

Şekil 4.40’da görülen eğride anodik tarama esnasında glukozsuz tampon çözeltide -0,5 V ile 1,1 V potansiyel aralığında elde edilen akım değerleri ile kıyaslandığında glukozlu tampon çözeltide elde edilen 0,45 V’tan sonraki hızlı akım artışı glukoz kaynaklı hidrojen peroksitin parçalandığı tepkimeler sonucu meydana gelmektedir.

4.1.4.1.2. PNMP ile Modifiye Edilerek Oluşturulan Enzim Elektrodun CV Analizi

Pt/PNMP/Chi-GOD /GAL elektrodun glukoz içermeyen ve glukoz içeren tampon çözeltilerde 20 mV/s tarama hızı ile elde edilen CV eğrisi Şekil 4.41’de verilmiştir. Pt/PNMP/Chi-GOD/GAL elektrodun glukozsuz ortama göre glukozlu tampon çözeltisinde akım artışının ortaya çıkması çözeltide glukozun tepkimeye girdiğinin, elektrokimyasal yansıması olarak düşünülmektedir.



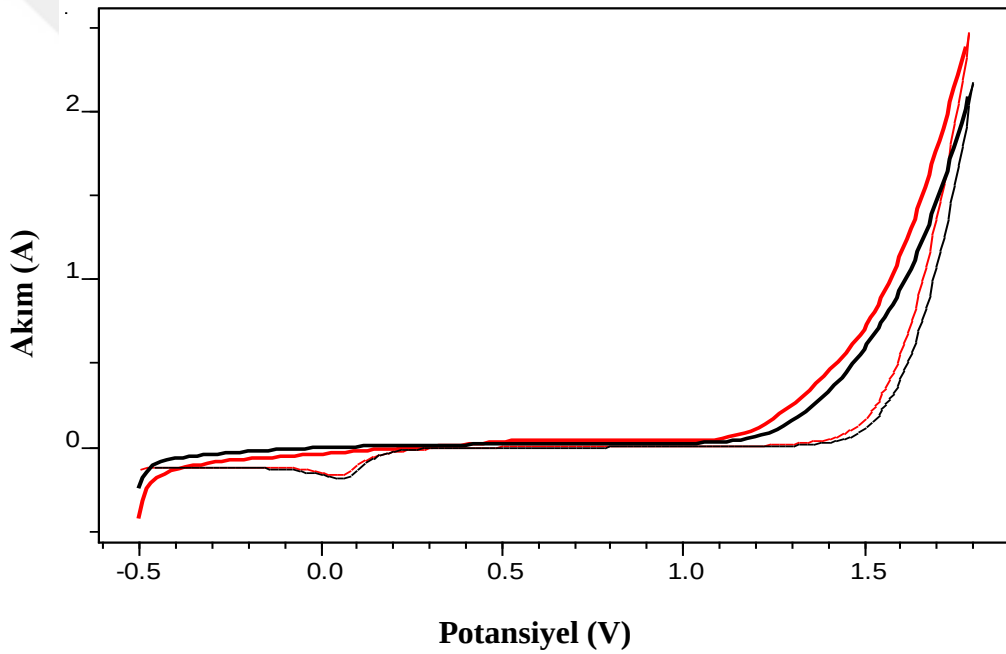
Şekil 4.41. PNMP ile modifiye edilerek oluşturulan enzim elektrodun glukoz içermeyen (-) ve glukoz içeren (-) tampon çözeltide elde edilen CV diyaqramı (20mV/s)

Şekil 4.41’de görülen eğride anodik tarama esnasında glukozsuz tampon çözeltide -0,5 V ile 1,1 V potansiyel aralığında elde edilen akım değerleri ile kıyaslandığında glukozlu tampon çözeltide elde edilen 0,45 V’tan sonraki hızlı akım artışı glukoz kaynaklı hidrojen peroksitin parçalandığı tepkimeler sonucu meydana

gelmektedir. Pt/PNMP/ Chi-GOD/GAL elektrodun glukozlu tampon çözeltisindeki akım artış değerlerinin Pt/PPy/Chi-GOD /GAL elektroduna göre daha düşük olduğu görülmüştür.

4.1.4.1.3.PPy-ko-PNMP ile Modifiye Edilerek Oluşturulan Enzim Elektrodun CV Analizi

Pt/PPy-ko-PNMP/ Chi-GOD/GAL elektrodun glukoz içermeyen ve glukoz içeren tampon çözeltilerinde 100 mV/s tarama hızı ile elde edilen CV eğrisi Şekil 4.42’de verilmiştir.



Şekil 4.42. PPy-ko-PNMP ile modifiye edilerek oluşturulan enzim elektrodun glukoz içermeyen (-) ve glukoz içeren (-) tampon çözeltide elde edilen CV diyagramı (100 mV/s)

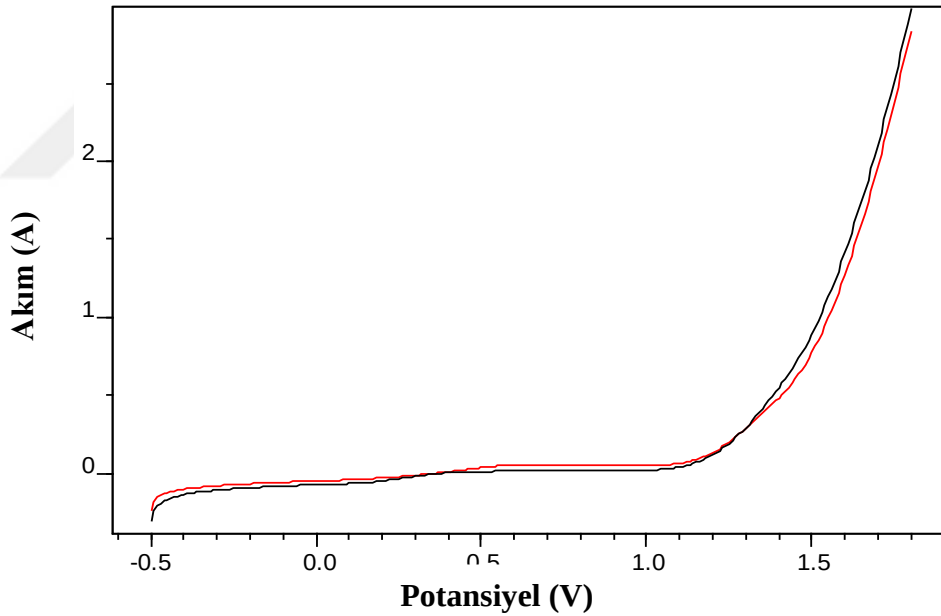
Şekil 4.42’de görülen eğride anodik tarama esnasında glukozsuz tampon çözeltide -0,5 V ile 1,1 V potansiyel aralığında elde edilen akım değerleri ile kıyaslandığında glukozlu tampon çözeltide elde edilen 0,45 V’tan sonraki hızlı akım artışı glukoz kaynaklı hidrojen peroksitin parçalandığı tepkimeler sonucu meydana

gelmektedir. Pt/PPy-ko-PNMP/Chi-GOD/GAL elektrodun glukozsuz ortama göre glukozlu tampon çözeltisinde akım artışının diğer iki elektroda göre daha düşük olduğu gözlenmiştir.

4.1.4.2. Enzim Elektrotların DTV Analizleri

4.1.4.2.1. PPy ile Modifiye Edilerek Oluşturulan Enzim Elektrodun DTV Analizi

Pt/PPy/Chi-GOD/GAL elektrodun glukoz içermeyen ve glukoz içeren tampon çözeltilerde 10 mV/s tarama hızı ile elde edilen doğrusal taramalı voltammogram eğrisi (DTV) Şekil 4.43’de verilmiştir. Dönüşümlü voltametriye göre daha düşük tarama hızı ile elde edilen doğrusal taramalı voltammogram eğrisinde de glukozlu tampon çözeltide özellikle yaklaşık 0,56 V dolaylarındaki kararlı akım artışı metal/çözelti arayüzeyinde elektrokimyasal tepkimelerin gerçekleştiğini göstermektedir.

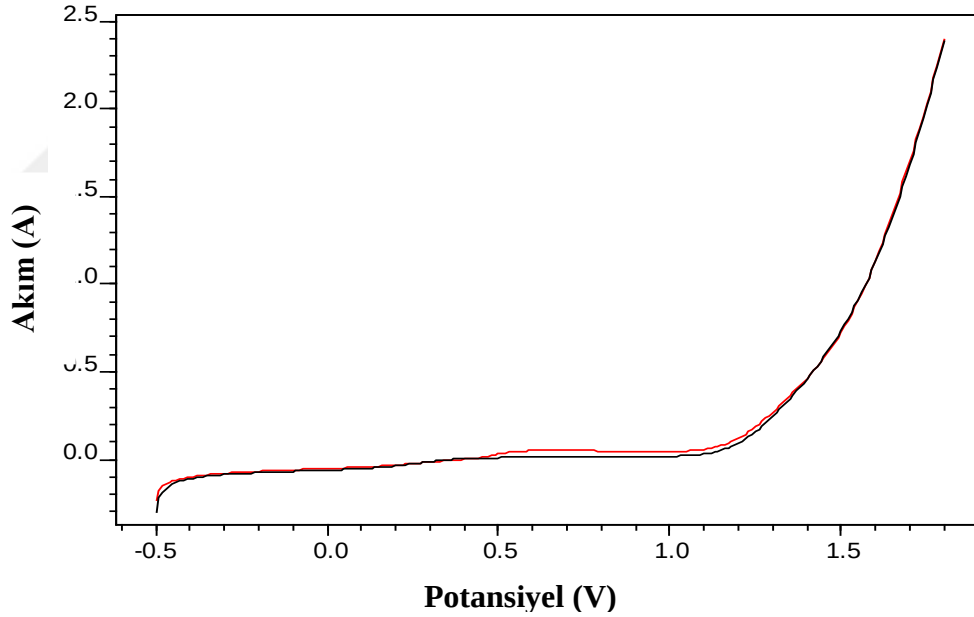


Şekil 4.43. PPy ile modifiye edilerek oluşturulan enzim elektrodun glukoz içermeyen (-) ve glukoz içeren (-) tampon çözeltide elde edilen DTV diyagramı (10 mV/s)

4.1.4.2.2. PNMP ile Modifiye Edilerek Oluşturulan Enzim Elektrodun DTV

Analizi

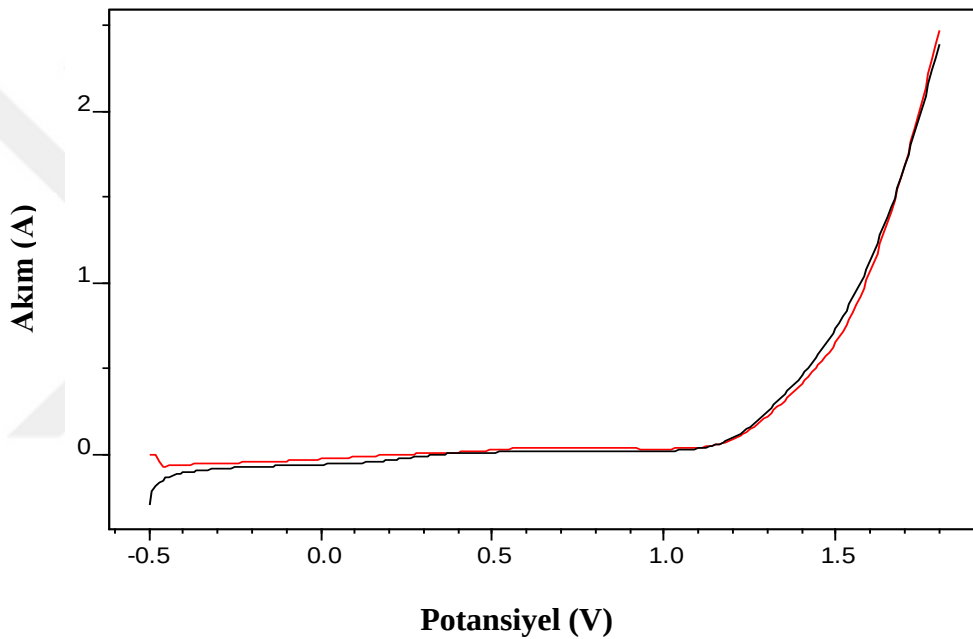
Pt/PNMP/GOD+Chi/GAL elektrodun glukoz içermeyen ve glukoz içeren tampon çözeltilerde 10 mV/s tarama hızı ile elde edilen DTV eğrisi Şekil 4.44’de verilmiştir. Pt/PNMP/GOD+Chi/GAL elektrodun glukozsuz ortama göre glukozlu tampon çözeltide akım artışı çok az da olsa daha yüksek potansiyele taşınmıştır. Pt/PNMP/GOD+Chi/GAL elektrodun glukozlu tampon çözeltisindeki akım artış değerlerinin Pt/PPy/GOD+Chi/GAL elektroduna göre daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bu davranış, Pt elektrot yüzeyinde PPy filmin, PNMP filme göre metal/çözelti arayüzeyinde elektron transferini hızlandırdığının bir göstergesidir.



Şekil 4.44. PNMP ile modifiye edilerek oluşturulan enzim elektrodun glukoz içermeyen (-) ve glukoz içeren (-) tampon çözeltide elde edilen DTV diyagramı (10 mV/s)

4.1.4.2.3. PPy-ko-PNMP ile Modifiye Edilerek Oluşturulan Enzim Elektrodunun DTV Analizi

Pt/PPy-ko-PNMP/Chi-GOD/GAL elektrodun glukoz içermeyen ve glukoz içeren tampon çözeltilerde 10 mV/s tarama hızı ile elde edilen DTV eğrisi Şekil 4.45’de verilmiştir. Pt/PPy-ko-PNMP/Chi-GOD /GAL elektrodun glukozsuz ortama göre glukozlu tampon çözeltisinde akım artışının çok az arttığı, bu değerlerin iki elektroda göre daha düşük olduğu gözlenmiştir.

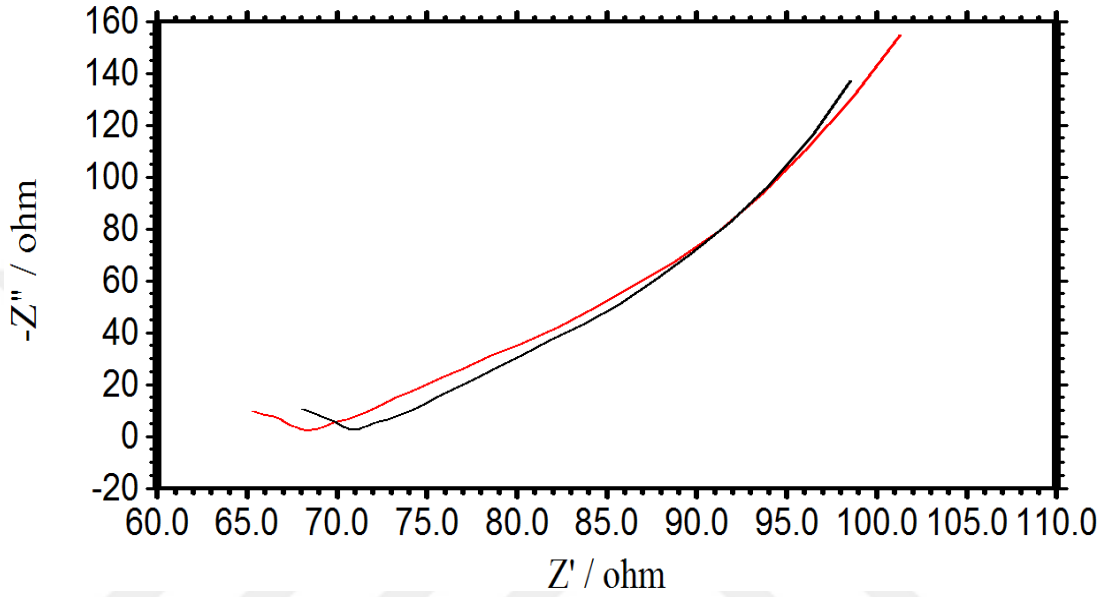


Şekil 4.45. PPy-ko-PNMP ile modifiye edilerek oluşturulan enzim elektrodun glukoz içermeyen (-) ve glukoz içeren (-) tampon çözeltide elde edilen DTV diyagramı (10 mV/s)

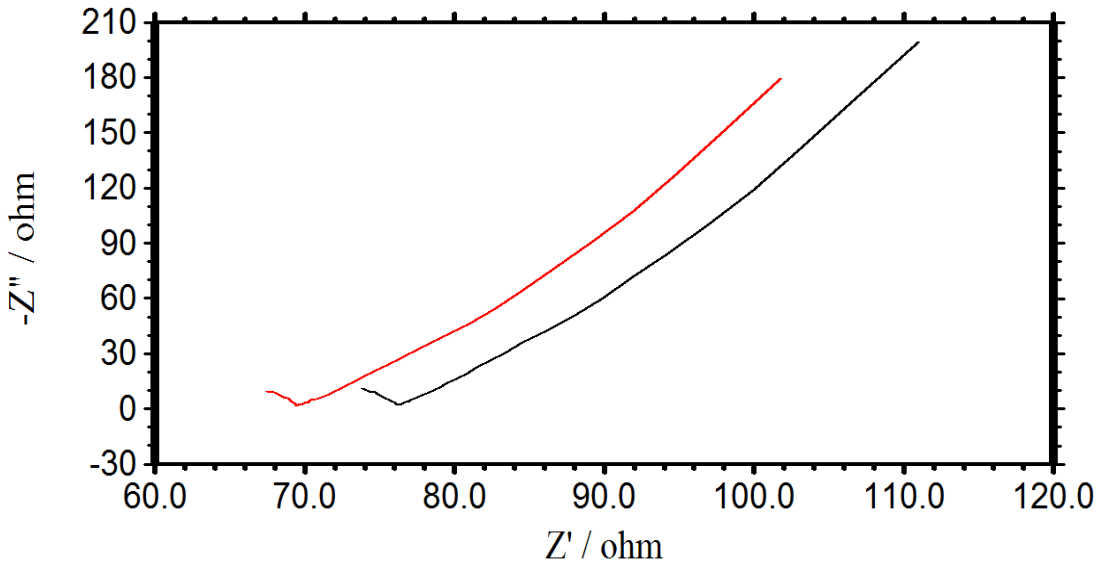
4.1.4.3. Enzim Elektrotların İmpedans Analizleri

Pt/PPy/ Chi-GOD/GAL elektrodun glukoz içermeyen ve glukoz içeren tampon çözeltilerinde elde edilen impedans ölçümü Şekil 4.46’da verilmiştir. Şekil 4.46’daki glukoz içeren tampon çözeltisi için elde edilen Nyquist eğrilerinde yüksek frekans bölgesinde gözlenen yük transfer direncine karşılık gelen, kısmi yarım dairenin çapının daha küçük olması yük transferinin daha iyi olduğunu göstermektedir.

Pt/PNMP/Chi-GOD/GAL elektrodun glukoz içermeyen ve glukoz içeren tampon çözeltilerde elde edilen impedans ölçümü Şekil 4.47’de verilmiştir. Pt/PNMP/Chi-GOD/GAL elektrodun glukoz içeren tampon çözeltide elde edilen Nyquist eğrilerinde yüksek frekans bölgesinde gözlenen kısmi yarım dairenin çapının glukozsuz çözeltiliye göre daha küçük olduğu gözlenmiştir.

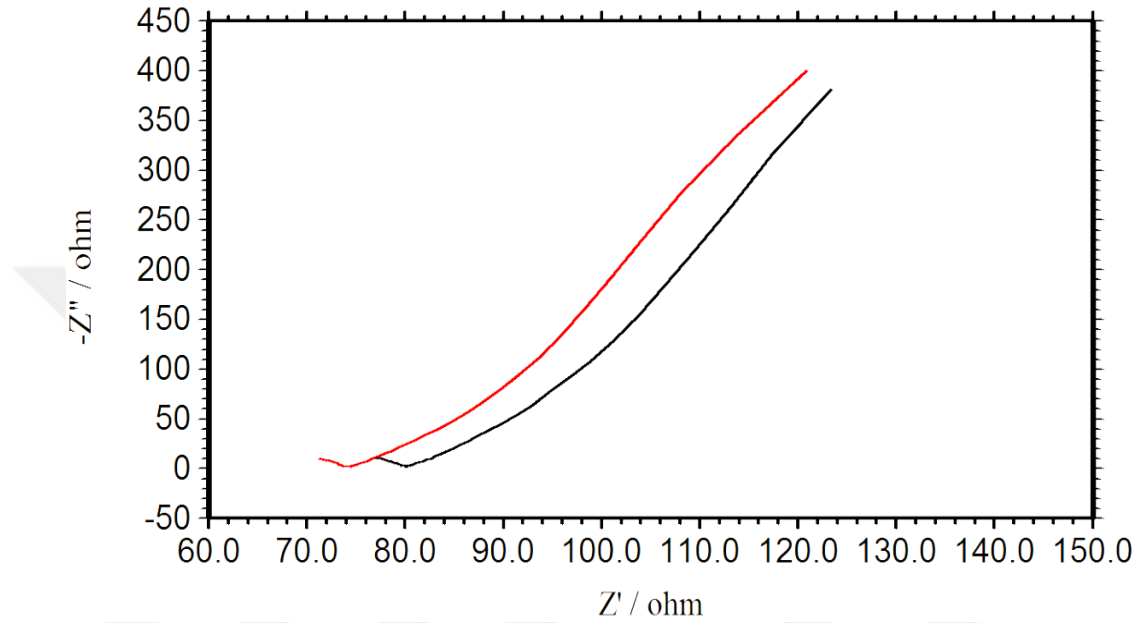


Şekil 4.46. PPy ile modifiye edilerek oluşturulan enzim elektrodun glukoz içermeyen (-) ve glukoz içeren (-) tampon çözeltide elde edilen impedans ve Nyquist eğrileri



Şekil 4.47. PNMP ile modifiye edilerek oluşturulan enzim elektrodun glukoz içermeyen (-) ve glukoz içeren (-) tampon çözeltide elde edilen impedans ve Nyquist eğrileri

Pt/PPy-ko-PNMP/ Chi-GOD/GAL elektrodun glukoz içermeyen ve glukoz içeren tampon çözeltilerde elde edilen impedans ölçümü Şekil 4.48’de verilmiştir. Pt/PPy-ko-PNMP/ Chi-GOD/GAL elektrodun glukoz içeren tampon çözeltide elde edilen Nyquist eğrilerinde yüksek frekans bölgesinde gözlenen kısmi yarım dairenin çapının glukozsuz çözeltiliye göre daha küçük olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.48. PPy-ko-PNMP ile modifiye edilerek oluşturulan enzim elektrodun glukoz içermeyen (-) ve glukoz içeren (-) tampon çözeltide elde edilen impedans ve Nyquist eğrileri

4.1.5. Enzim Elektrotların Biyokimyasal Karakterizasyonu

4.1.5.1. Enzim Elektrotların Glukoz Akım Cevabı Üzerine pH ve Potansiyel Etkisinin YYY ile Araştırılması

PPy, PNMP ve PPy-ko-PNMP olmak üzere 3 farklı polimer ile oluşturulan enzim elektrotların her biri YYY ile belirlenen optimum şartlarda elde edilmiş ve bu elektrotların biyokimyasal karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle elektrodun pH ve potansiyele bağlı akım cevabı, kinetik parametreleri, tekrar kullanım ve depolama kararlılıkları tayin edilmiştir.

4.1.5.1.1. PPy ile Modifiye Enzim Elektrodun Akım Cevabına Potansiyel ve pH Etkisi

Çizelge 4.20’de PPy ile modifiye edilmiş elektrot kullanılarak 5 farklı potansiyel (0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 V) ve 5 farklı pH (4, 5, 6, 7, 8) için optimal tasarım uygulanmış ve 16 çalışmadan oluşan deney seti çizelge 4.22’de verilmiştir.

Çizelge 4.21. PPy ile oluşturulmuş enzim elektrodun pH ve potansiyel değerlerinin optimizasyonunda glukoz derişimine bağı akım cevabı (Optimal tasarım)

Deneyset çalışmaları	Potansiyel aralık (V)	pH	I (µA/cm ²)			
			0,5mM glukoz	1mM glukoz	2mM glukoz	3mM glukoz
1	0,40	4	4,636	6,901	10,635	12,707
2	0,60	5	10,335	20,531	40,65	59,342
3	0,60	4	6,763	13,449	25,71	36,188
4	0,50	7	8,578	16,944	32,483	46,125
5	0,40	8	8,686	16,432	28,575	36,863
6	0,60	5	11,308	22,881	44,276	64,468
7	0,80	6	12,024	25,32	53,964	75,178
8	0,80	8	4,824	9,686	18,496	27,002
9	0,60	8	10,311	20,372	39,376	57,262
10	0,50	7	9,022	18,289	34,440	48,02
11	0,70	7	12,723	25,726	50,862	74,703
12	0,40	5	1,431	2,966	5,534	7,205
13	0,60	5	9,369	18,13	34,502	49,195
14	0,80	6	13,342	27,069	53,175	80,001
15	0,80	6	10,519	21,043	40,62	59,804
16	0,40	5	1,194	2,408	4,413	5,428

Çizelge 4.21’de görüldüğü gibi bütün elektrotlarda glukoz derişimine bağı net akım cevaplarında artış gözlenmiştir. En yüksek net akım değeri 0,8 V potansiyelde pH 6 tamponunda elde edilmiştir.

Çizelge 4.21.’de 1 mM glukoz çözeltisi için verilen net akım değerleri Design Expert bilgisayar programında analiz edildiğinde, program tarafından doğrusal, iki

faktör etkileşimli, kuadratik ve kübik modeller için model analizi yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.22.'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.22. PPy ile oluşturulmuş enzim elektrodun pH ve çalışma potansiyeli optimizasyonu çalışmasında elde edilen sonuçlara göre matematiksel model analizi

Kaynak	p-değeri	Model uygunsuzluğu p-değeri	R^2_{adj}	Pred- R^2
Doğrusal	0,0119	0,0016	0,4166	0,1034
iki faktör etkileşimli	0,0352	0,0031	0,5699	-0,1245
<u>Kuadratik</u>	<u>0,0284</u>	<u>0,0091</u>	<u>0,7468</u>	<u>0,1528</u> önerilen
<u>Kübik</u>	<u>0,0095</u>	<u>0,1159</u>	<u>0,9415</u>	<u>-1,6924</u> önerilen
Kuartik	0,1159		0,9592	

Çizelge 4.22.'deki sonuçlardan görüldüğü üzere 1 mM glukoz çözeltisi ile en iyi tanımlama için kuadratik ve kübik model önerilmiştir. Önerilen matematiksel model p-değeri, model uygunsuzluğu p-değeri ve R^2_{adj} açısından karşılaştırıldığında, en uygun modelin kübik model olduğu belirlenmiş ve ANOVA analiz sonuçları değerlendirilerek program tarafından kübik model seçilmiş ve ANOVA değerlendirmesi yapılmıştır. Seçilen matematiksel modele göre düzenlenmiş ANOVA değerleri ve modele ait istatistiksel veriler Çizelge 4.23.'de verilmiştir.

Çizelge 4.23.'de görüldüğü gibi, kuadratik model için p değeri 0,0010 olarak hesaplanmış ve sonuç anlamlı bulunmuştur. Model için belirlenen lack of fit değeri ise 0,0552 olarak anlamlı bulunmamıştır. Ortalama kareler toplamı değerleri kıyaslandığında, çalışma potansiyeli etkisinin net akım üzerine, pH etkisine göre daha büyük olduğu belirlenmiştir. İdeal bir model için, matematiksel formunun uygunsuzluğu (lack of fit) için anlamsız bulunmuştur. R^2 değeri 0,9655 olduğundan, bağımlı değişkende meydana gelen değişimlerin yaklaşık % 97'sinin bağımsız değişkenler tarafından açıklandığı görülmektedir. R^2_{adj} değeri 0,9138 olarak hesaplanmıştır ve bu değer R^2 değerine olan yakınlığı (%5,17) uygulanan model ile tahmin edilen akım değerlerinin deneysel çalışmalarla elde edilen gerçek sonuçları oldukça iyi yansıttığını göstermektedir.

Çizelge 4.23. PPy ile oluşturulmuş enzim elektrodun pH ve çalışma potansiyeli optimizasyonuna ait modifiye edilmiş ANOVA değerlendirmesi (Kübik Model)

Kaynak	Kareler toplamı	SD	Ortalama kareler	F değeri	p-değeri Prob>F	
Model	870,75	9	96,75	18,68	0,0010	anlamlı
A-Çalışma Potansiyeli	64,74	1	64,74	12,50	0,0123	
B-pH	13,12	1	13,12	2,530	0,1627	
AB	121,44	1	121,44	23,44	0,0029	
A ²	109,57	1	109,57	21,15	0,0037	
B ²	24,90	1	24,90	4,81	0,0708	
A ² B	13,37	1	13,37	2,58	0,1592	
AB ²	100,16	1	100,16	19,33	0,0046	
A ³	2,01	1	2,01	0,39	0,5563	
B ³	0,62	1	0,62	0,12	0,7402	
Kalıntı	31,08	6	5,18			
Model uygunsuzluğu	17,21	1	17,21	6,20	0,3736	anlamsız
Saf hata	13,88	5	2,78			
Toplam	901,83	15				
Standart sapma		2,28		R ²	0,9655	
Ortalama		16,76		R ² _{adj}	0,9138	
C.V. %		13,58		Pred-R ²	-4,2180	
PRESS		4705,78		Adeq Precision	12,926	

S.D. Serbestlik Derecesi

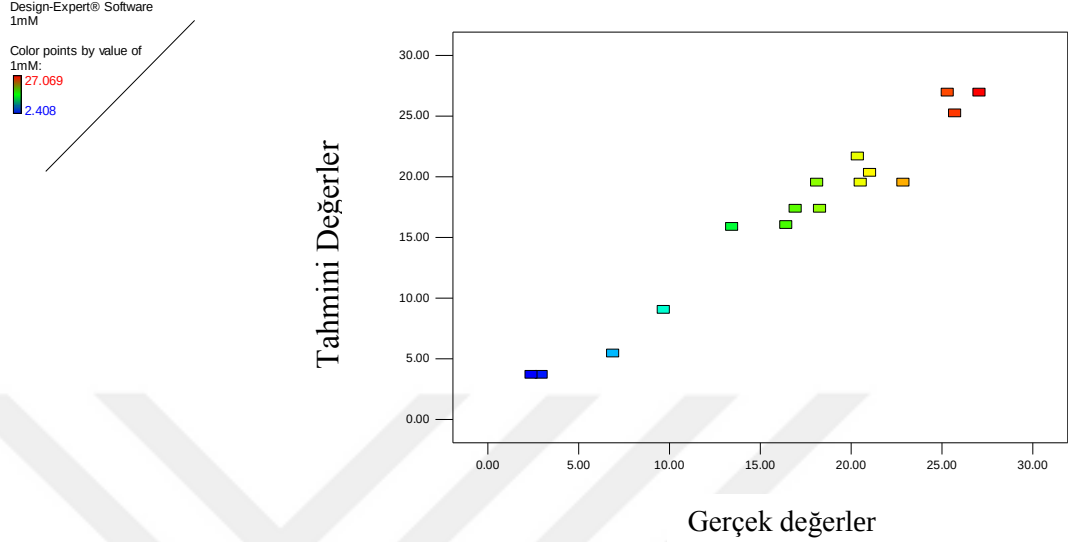
Pred-R² değerinin negatif (-4,21809) olması model için hesaplanan ortalama değer tahminlemede model için önerilen denklemden daha kullanışlı olduğu anlamına gelmektedir. %C.V. değerinin küçük olması (%13,58) gerçek değerlerin ortalamaya yakın olduğunu göstermektedir. Çalışmada Adeq. Precision. değeri 12,926 olup, sinyalin gürültüye oranını vermektedir-ki bu değer en az 4 olması istenir. Dolayısıyla model bu kriter açısından da uygundur.

PPy ile oluşturulmuş enzim elektrodun, ortam pH'sı ve çalışma potansiyeline bağlı olarak 1 mM glukoz çözeltisindeki akım cevabını belirlemek için Desing Expert programı gerçek değişkenler için Eşitlik 4.9.'u önermiştir.

$$I = +256.68181 - 705.19006 \times \text{Potansiyel aralık} - 86.59650 \times \text{pH} + 164.65293 \times \text{Potansiyel aralık} \times \text{pH} + 684.31125 \times \text{Potansiyel aralık}^2 + 8.07441 \times \text{pH}^2 - 38.49700 \times \text{Potansiyel aralık}^2 \times \text{pH} - 11.01104 \times \text{Potansiyel aralık} \times \text{pH}^2 - 336.08501 \times \text{Potansiyel aralık}^3 - 0.12945 \times \text{pH}^3$$

(4.9.)

Eşitlik 4.9. kullanılarak tahmin edilen net akım cevapları ile gerçek sonuçların birbirine yakınlığını gösteren gerçek ve tahmini değerler grafiği Şekil 4.49.da gösterilmiştir.

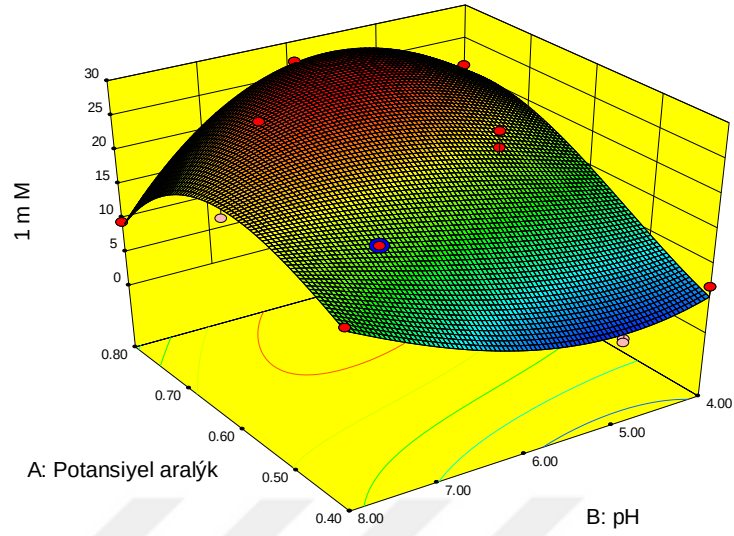


Şekil 4.49. PPy ile oluşturulmuş enzim elektrodun pH ve potansiyel değerlerinin optimizasyonunda gerçek ve tahmini değerler grafiği

Şekil 4.49'da görüldüğü gibi gerçek değerler ile model tarafından hesaplama ile tahmin edilen değerler birbiri ile önemli derecede örtüşmektedir.

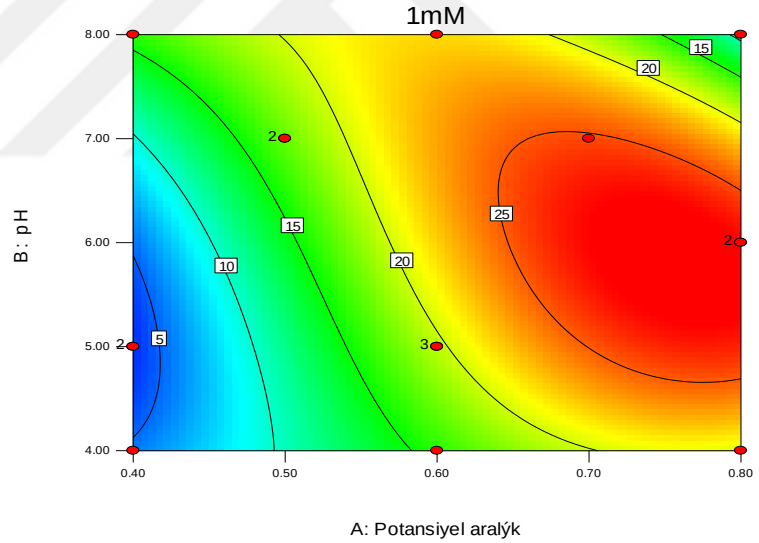
Şekil 4.50 ve 4.51'de sırasıyla PPy ile oluşturulmuş enzim elektrodun pH ve potansiyel değerlerinin YYY ile optimizasyonunda yanıt yüzey ve kontur grafikleri verilmiştir.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
1mM
● Design points above predicted value
○ Design points below predicted value
27.069
2.408
1mM = 18.289
Std # 11 Run # 10
X1 = A: Potansiyel aralık = 0.50
X2 = B: pH = 7.00



Şekil 4.50. PPy ile oluşturulmuş enzim elektrodun pH ve potansiyel değerlerinin optimizasyonunda elde edilen yanıt yüzey grafiği

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
1mM
● Design Points
27.069
2.408
X1 = A: Potansiyel aralık
X2 = B: pH



Şekil 4.51. PPy ile oluşturulmuş enzim elektrodun pH ve potansiyel değerlerinin optimizasyonunda elde edilen kontur grafiği

Şekil 4.50 ve 4.51 incelendiğinde, düşük pH ve potansiyelde akım cevabının küçük olduğu; pH ve potansiyel arttıkça akım cevabının arttığı görülmektedir. Ancak, potansiyel 0,8'e yaklaştığında, pH değeri ise 6'nın üzerine çıktığında akım cevabı düşmeye başlamıştır. Yüzey grafiğine göre 0,77 V ve pH 6 civarında en yüksek değer

elde edilmiştir. Bu nedenle akım cevabı ölçümünde pH 6 ve 0,8 potansiyel değerlerinin uygun olduğuna karar verilmiştir.

4.1.5.1.2. PNMP ile Modifiye Enzim Elektrodun Akım Cevabına Potansiyel ve pH Etkisi

PNMP ile modifiye edilmiş elektrot kullanılarak 5 farklı potansiyel (0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8) ve 5 farklı pH (4, 5, 6, 7, 8) için Yüzey yanıt-optimal tasarım uygulanmış ve 16 çalışmadan oluşan deney seti çizelge 4.24'de verilmiştir.

Çizelge 4.24. PNMP ile oluşturulmuş enzim elektrodun pH ve potansiyel değerlerinin optimizasyonu glukoz derişimine bağlı akım cevabı (Optimal tasarım)

Deneyssel çalışmaları	Potansiyel aralık (V)	pH	I ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)			
			0,5mM glukoz	1mM glukoz	2mM glukoz	3mM glukoz
1	0,4	4	0,42	0,53	0,50	0,53
2	0,6	5	8,44	17,29	32,76	48,67
3	0,6	4	6,95	14,12	27,87	38,45
4	0,5	7	12,61	25,25	48,39	69,88
5	0,4	8	7,85	15,70	29,80	42,39
6	0,6	5	10,20	20,61	39,99	50,77
7	0,8	6	12,37	25,51	50,56	72,05
8	0,8	8	10,99	21,91	43,39	63,87
9	0,6	8	12,59	25,37	49,38	72,54
10	0,5	7	11,53	23,61	46,58	69,29
11	0,7	7	10,11	20,42	40,37	59,92
12	0,4	5	0,84	1,48	2,11	2,75
13	0,6	5	7,00	14,34	27,21	39,01
14	0,8	6	12,91	26,24	52,19	76,91
15	0,8	4	11,33	23,12	41,28	62,91
16	0,4	5	0,75	1,30	2,29	2,99

Çizelge 4.24.'de verilen bulgulara da görüldüğü gibi, glukoz derişimi arttıkça akım değerleri de doğrusal olarak artmıştır. En yüksek akım değeri 0,8 V potansiyelde pH 6 tamponunda elde edilmiştir. Çizelge 4.24.'de verilen net akım değerleri Design Expert bilgisayar programında analiz edildiğinde, net akım cevaplarını tanımlamak için program tarafından oluşturulan doğrusal, İki faktör etkileşimli, kuadratik ve kübik modeller için model analizi yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.25.'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.25. PNMP ile oluşturulmuş enzim elektrodun pH ve çalışma potansiyeli optimizasyonunda elde edilen sonuçlara göre matematiksel model analizi

Kaynak	p-değeri	Model	R^2_{adj}	Pred- R^2	
		uygunsuzluğu p-değeri			
Doğrusal	0,0004	0,0108	0,6530	0,3201	
İki faktör etkileşimli	0,0089	0,0332	0,7921	0,3392	
Kuadratik	0,0665	0,0636	0,8549	0,8283	
Kübik	<u>0,0234</u>	<u>0,6996</u>	<u>0,9541</u>	<u>0,8023</u>	önerilen
Kuartik	0,6996		0,9467		

Çizelge 4.25.'deki sonuçlarda görüldüğü gibi akım değerinin tahminlenmesinde istatistiki verilere göre program tarafından Kübik model önerilmiştir. Kübik model için ANOVA değerlendirmesi yapılmış, seçilen matematiksel modele göre düzenlenmiş ANOVA değerleri ve modele ait istatistiksel veriler Çizelge 4.25.'de verilmiştir.

Çizelge 4.26. PNMP ile oluşturulmuş enzim elektrodun pH ve potansiyel değerlerinin optimal tasarımı ANOVA analizi (Kübik Model)

Kaynak	Kareler toplamı	SD	Ortalama kareler	F değeri	p-değeri Prob>F	
Model	1177,97	9	130,89	35,67	0,0002	anamlı
A-Çalışma Potansiyeli	9,14	1	9,14	2,49	0,1655	
B-pH	41,44	1	41,4	11,29	0,0152	
AB	69,72	1	69,72	19,00	0,0048	
A ²	73,49	1	73,49	20,03	0,0042	
B ²	0,60	1	0,60	0,16	0,6999	
A ² B	5,44	1	5,44	1,48	0,2692	
AB ²	12,49	1	12,49	3,40	0,1146	
A ³	65,91	1	65,91	17,96	0,0055	
B ³	1,29	1	1,29	0,35	0,5747	
Kalıntı	22,02	6	3,67			
Model uygunsuzluğu	0,71	1	0,71	0,17	0,6996	anlamsız
Saf hata	21,31	5	4,26			
Toplam	1199,99	15				
Standart sapma		1,92		R^2	0,9817	
Ortalama		17,30		R^2_{adj}	0,9541	
C.V. %		11,07		Pred- R^2	0,8023	
PRESS		237,26		Adeq Precision	17,028	

S.D. Serbestlik Derecesi

Çizelge 4.26.'da görüldüğü gibi, kübik model için p değeri 0,0002 olarak hesaplanmış ve sonuç anlamlı bulunmuştur. Model için belirlenen lack of fit değeri ise 0,6996 olarak anlamsız bulunmuştur. Ortalama kareler değerleri kıyaslandığında, net akım üzerine pH etkisinin, çalışma potansiyeli etkisine göre daha büyük olduğu belirlenmiştir. R^2 değeri yaklaşık 0,982, R^2_{adj} ise 0,954 olarak hesaplanmıştır.

%C.V. değerinin küçük olması (%11,07) gerçek değerlerin ortalamaya yakın olduğunu göstermektedir. Çalışmada Adeq. Precision değeri 17,028 olup, sinyalin gürültüye oranını vermektedir-ki bu değer en az 4 olması istenir. Dolayısıyla model bu kriter açısından da uygundur.

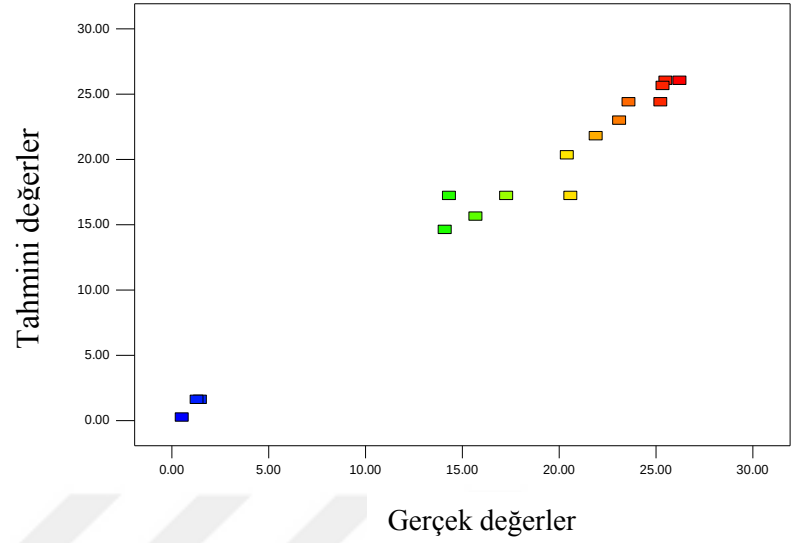
Biyosensörün, ortam pH'sı ve çalışma potansiyeline bağlı olarak 1 mM glukoz çözeltisindeki net akım cevabını belirlemek için Desing Expert programı gerçek değişkenler için Eşitlik 4.10.'u önermiştir.

$$\begin{aligned} I = & -310.50423 + 1947.83165 \times \text{Potansiyel aralık} - 45.61159 \times \text{pH} + 65.75722 \times \\ & \text{Potansiyel aralık} \times \text{pH} - 3441.37783 \times \text{Potansiyel aralık}^2 + 5.54943 \times \text{pH}^2 \\ & -24.54682 \times \text{Potansiyel aralık}^2 \times \text{pH} - 3.88858 \times \text{Potansiyel aralık} \times \text{pH}^2 \\ & +1924.71544 \times \text{Potansiyel aralık}^3 - 0.18612 \times \text{pH}^3 \end{aligned} \quad (4.10.)$$

Eşitlik 4.10. kullanılarak tahmin edilen net akım cevapları ile gerçek sonuçların birbirine yakınlığını gösteren gerçek ve tahmini değerler grafiği Şekil 4.52'de gösterilmiştir.

Design-Expert® Software
1mM

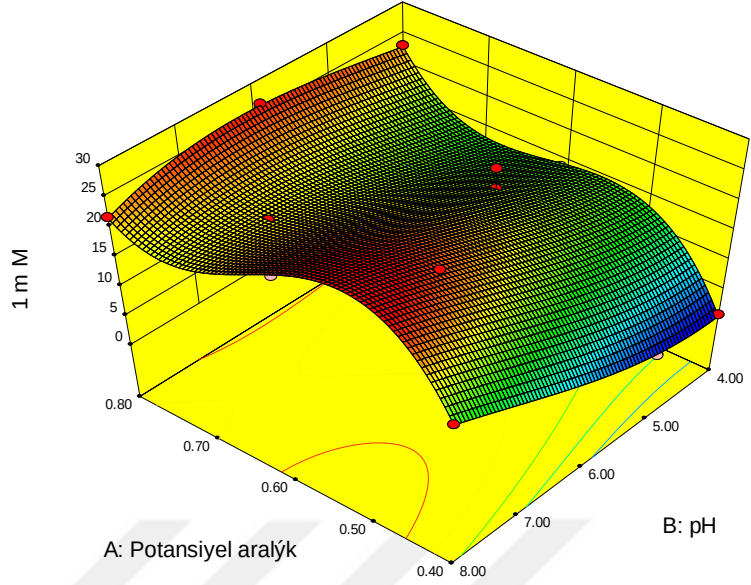
Color points by value of
1mM:
26.236
0.534



Şekil 4.52. PNMP ile oluşturulmuş enzim elektrodun pH ve potansiyel değerlerinin optimizasyonunda elde edilen gerçek ve tahmini değerler grafiği

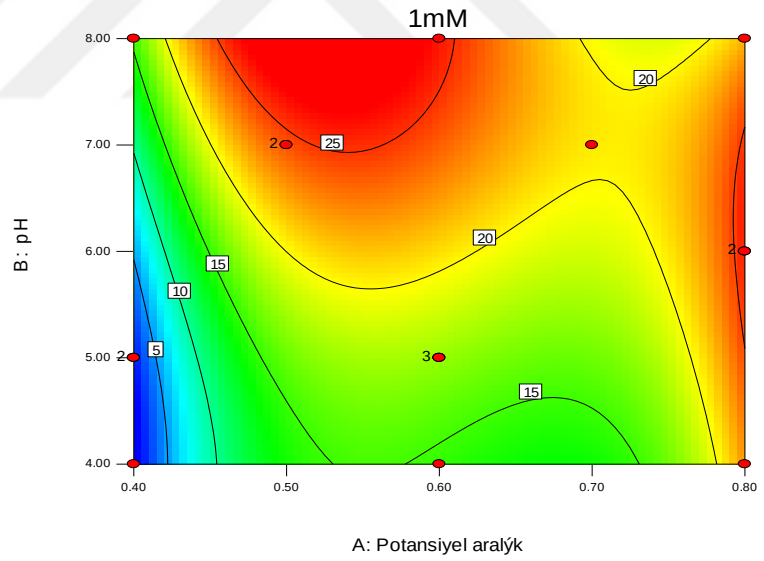
Şekil 4.52’de görüldüğü gibi, gerçek değerler ile model tarafından önerilen denklemlle hesaplanan tahmini değerler birbirine oldukça yakın çıkmıştır. Bu nedenle önerilen modelin 1 mM glukoz derişimi için akım cevaplarının hesaplanmasında başarıyla kullanılabileceği ortaya çıkmaktadır. Önerilen kubik model için yanıt yüzey ve kontur grafikleri sırasıyla Şekil 4.53 ve 4.54’de verilmiştir.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
1mM
● Design points above predicted value
○ Design points below predicted value
26.236
0.534
X1 = A: Potansiyel aralık
X2 = B: pH



Şekil 4.53. PNMP ile oluşturulmuş enzim elektrodun pH ve potansiyel değerlerinin optimizasyonunda elde edilen yanıt yüzey grafiği

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
1mM
● Design Points
26.236
0.534
X1 = A: Potansiyel aralık
X2 = B: pH



Şekil 4.54. PNMP ile oluşturulmuş enzim elektrodun pH ve potansiyel değerlerinin optimizasyonunda elde edilen kontur grafiği

Yanıt yüzey ve kontur grafikleri incelendiğinde, 0,4 potansiyel ve özellikle pH 4 ve pH 5 gibi düşük pH'larda akım cevabı oldukça düşük çıkmıştır. pH 7 ile pH 8 aralığında ancak 0,5 ile 0,6 V potansiyel aralığında akım değerleri yüksek çıkmıştır. Benzer şekilde pH 6 ve 0,8 potansiyel şartlarında da akım değeri yüksek çıkmıştır.

4.1.5.1.3. PPy-ko-PNMP ile modifiye enzim elektrodun akım cevabına Potansiyel ve pH etkisi

PPy-ko-PNMP ile modifiye edilmiş elektrot kullanılarak 5 farklı potansiyel (0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8) ve 5 farklı pH (4, 5, 6, 7, 8) için Yüzey yanıt-optimal tasarım uygulanmış ve 16 çalışmadan oluşan deney seti çizelge 4.27’de verilmiştir.

Çizelge 4.27. PPy-ko-PNMP ile oluşturulmuş enzim elektrodun pH ve potansiyel değerlerinin optimizasyonunda glukoz derişimine bağlı akım cevabı (Optimal tasarım)

Deneyssel çalışmalar	Potansiyel aralık (V)	pH	I ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)			
			0,5mM glukoz	1mM glukoz	2mM glukoz	3mM glukoz
1	0,4	4	0,55	1,055	1,80	2,17
2	0,6	5	9,44	18,92	36,56	50,44
3	0,6	4	4,47	8,92	17,20	23,55
4	0,5	7	8,57	16,98	32,57	46,78
5	0,4	8	9,94	19,17	35,52	49,13
6	0,6	5	9,54	19,24	35,61	52,23
7	0,8	6	10,91	21,81	42,81	63,08
8	0,8	8	9,17	17,16	33,18	46,92
9	0,6	8	11,41	22,82	44,29	63,96
10	0,5	7	8,19	16,28	31,39	45,45
11	0,7	7	9,40	21,36	37,11	54,29
12	0,4	5	1,01	1,96	3,72	4,96
13	0,6	5	9,46	19,05	36,48	52,12
14	0,8	6	11,04	22,02	43,17	64,17
15	0,8	4	10,98	20,93	41,69	60,59
16	0,4	5	1,08	2,03	3,77	4,96

Çizelge 4.27’de görüldüğü gibi özellikle 0.4 potansiyel ve düşük pH’larda net akım değerleri düşük çıkmıştır. Tüm elektrotlarda akım cevabı glukoz derişimine bağlı olarak artmıştır. En yüksek akım değeri 9 no’lu çalışmada görüldüğü gibi, 0,6 V potansiyel ve pH 8 tamponunda elde edilmiştir.

Çizelge 4.27.’de verilen akım değerleri Design Expert bilgisayar programında analiz edildiğinde, akım cevaplarını tanımlamak için program tarafından oluşturulan doğrusal, iki faktör etkileşimli, kuadratik ve kübik modeller için model analizi yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.28.’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.28. PPy-ko-PNMP ile oluşturulmuş enzim elektrodun pH ve çalışma potansiyeli optimizasyonunda elde edilen sonuçlara göre matematiksel model analizi

Kaynak	p-değeri	Model uygunsuzluğu p-değeri	R²_{adj}	Pred-R²	
Doğrusal	0,0011	< 0,0001	0,5957	0,4037	
İki faktör etkileşimli	0,0020	<0,0001	0,8085	0,6864	
<u>Kuadratik</u>	<u>0,0304</u>	<u><0,0001</u>	<u>0,8858</u>	<u>0,7484</u>	önerilen
Kübik	0,2729	<0,0001	0,9100	-8,6876	
Kuartik	<0,0001		0,9989		

Çizelge 4.28.'deki sonuçlarda görüldüğü gibi akım değerinin tahminlenmesinde istatistiki verilere göre program tarafından kübik model önerilmiştir. Kübik model için ANOVA değerlendirmesi yapılmış, seçilen matematiksel modele göre düzenlenmiş ANOVA değerleri ve modele ait istatistiksel veriler Çizelge 4.29.'da verilmiştir.

Çizelge 4.29.'da görüldüğü gibi, kuadratik model için hem p değeri <0.0001 hem de lack of fit değeri de <0.0001 olduğundan, anlamlı bulunmuştur. Ancak, bu sonuç tercih edilen bir durum değildir. Ortalama kareler değerleri kıyaslandığında, net akım üzerine çalışma potansiyeli etkisinin, pH etkisine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. R² değeri yaklaşık 0,924 olduğundan, bağımlı değişkende meydana gelen değişimlerin % 92'sinden fazlasının bağımsız değişkenler tarafından açıklandığı görülmektedir. R²_{adj} değeri 0,886 olarak hesaplanmıştır ve bu değer R² değerine olan yakınlığı (%3,8) ve bu iki parametre arasındaki farkın 0,2'den küçük olması uygulanan model ile tahmin edilen akım değerlerinin deneysel çalışmalarla elde edilen gerçek sonuçları oldukça iyi yansıttığını göstermektedir.

Pred-R² değerinin (0,748) R²_{adj} değerine (0,886) yakın olması model için tanımlanan denklemin akım değerlerinin tahminlenmesinde güvenilir bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir. Çalışmada Adeq. Precision. değeri 15,306 olup, model bu kriter açısından da uygundur.

Biyosensörün, ortam pH'sı ve çalışma potansiyeline bağlı olarak 1 mM glukoz çözeltisindeki akım cevabını belirlemek için Desing Expert programı gerçek değişkenler için Eşitlik 4.11.'i önermiştir.

$$I = -115.28580 + 237.90485 \times \text{Potansiyel aralık} + 15.99623 \times \text{pH} - 14.35553 \times \text{Potansiyel aralık} \times \text{pH} - 101.16807 \times \text{Potansiyel aralık}^2 - 0.44197 \times \text{pH}^2$$

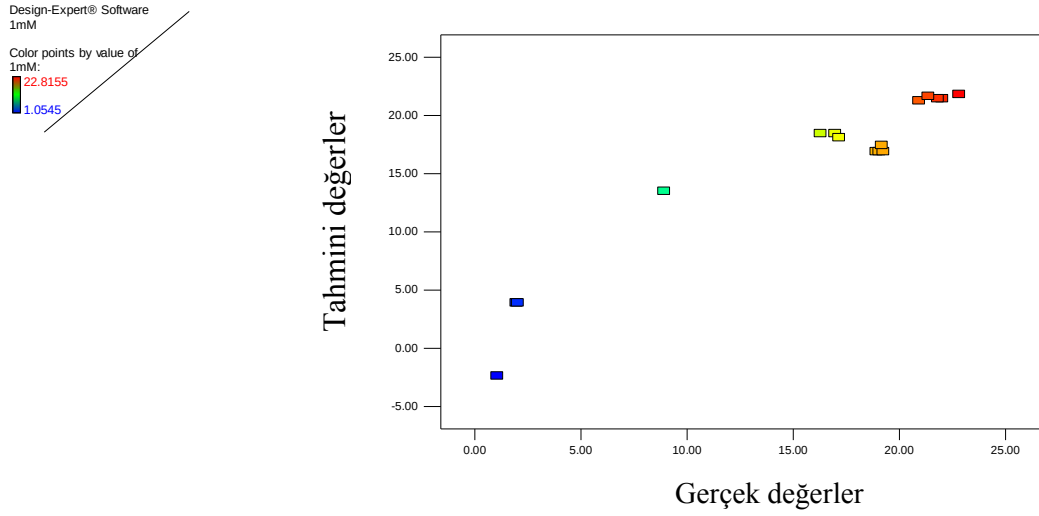
(4.11.)

Çizelge 4.29. PPy-ko-PNMP ile oluşturulmuş enzim elektrodun pH ve potansiyel değerlerinin Optimal tasarımı ANOVA analizi (Kubik model)

Kaynak	Kareler toplamı	SD	Ortalama kareler	F değeri	p-değeri Prob>F	
Model	807,21	5	161,44	24,26	< 0,0001	anamlı
A-Çalışma Potansiyeli	314,00	1	314,00	47,18	<0,0001	
B-pH	134,71	1	134,71	20,24	0,0011	
AB	147,32	1	147,32	22,14	0,0008	
A ²	53,860	1	53,860	8,090	0,0174	
B ²	7,5900	1	7,5900	1,140	0,3105	
Kalıntı	66,550	10	6,6500			
Model uygunsuzluğu	66,230	5	13,250	210,41	< 0,0001	anamlı
Saf hata	0,3100	5	0,0630			
Toplam	873,75	15				
Standart sapma		2,58		R ²	0,9238	
Ortalama		15,61		R ² _{adj}	0,8858	
C.V. %		16,53		Pred-R ²	0,7484	
PRESS		219,82		Adeq Precision	15,306	

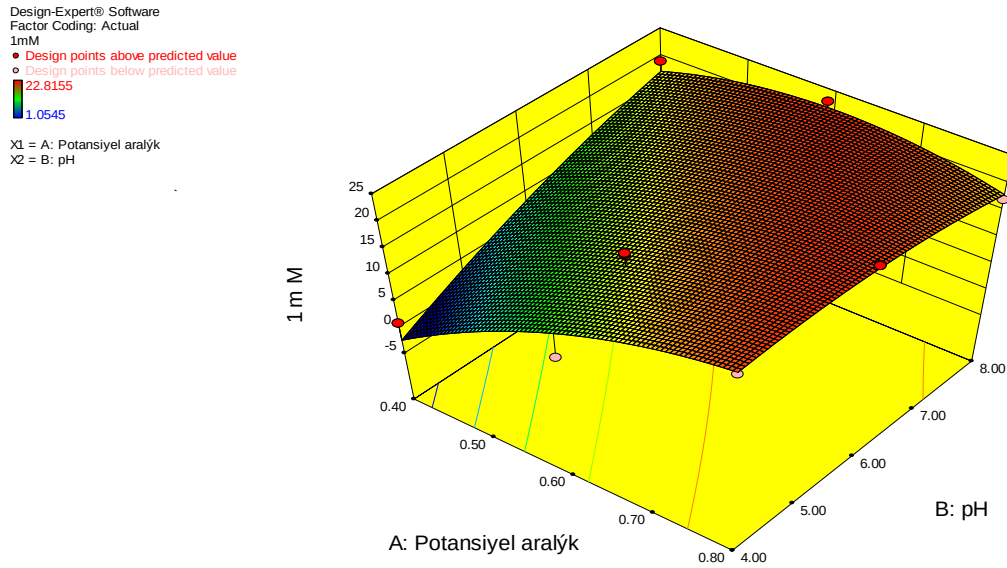
S.D. Serbestlik Derecesi

Eşitlik 4.11. kullanılarak tahmin edilen net akım cevapları ile gerçek sonuçların birbirine yakınlığını gösteren gerçek ve tahmini değerler grafiği Şekil 4.55’de gösterilmiştir.

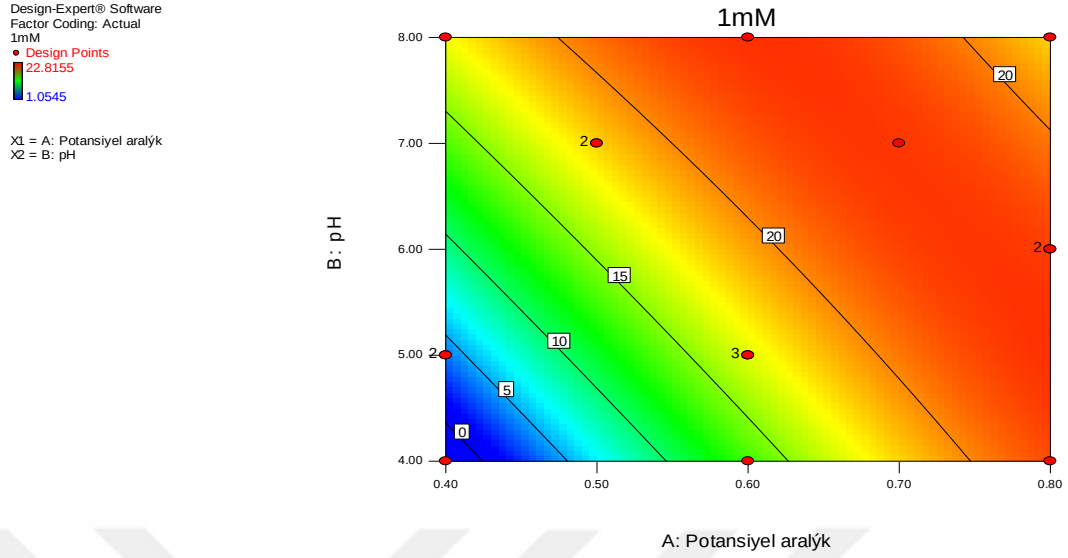


Şekil 4.55. PPy-ko-PNMP ile oluşturulmuş enzim elektrodun pH ve potansiyel değerlerinin optimizasyonunda elde edilen gerçek ve tahmini değerler grafiği

Şekil 4.55’de görüldüğü gibi, özellikle yüksek net akım cevaplarında hem gerçek hem de tahmini değerler birbirine yakın çıkmıştır. Önerilen kuadratik model için yanıt yüzey ve kontur grafikleri sırasıyla Şekil 4.56 ve 4.57’de verilmiştir. Yanıt yüzey ve kontur grafiğinde görüldüğü gibi düşük pH ve potansiyelde akım cevapları belirgin derecede düşük çıkmıştır. pH ve potansiyel arttıkça akım değerlerinde artış gözlenmiştir.



Şekil 4.56. PPy-ko-PNMP ile oluşturulmuş enzim elektrodun pH ve potansiyel değerlerinin optimizasyonunda elde edilen yanıt yüzey grafiği



Şekil 4.57. PPy-ko-PNMP ile oluşturulmuş enzim elektrodun pH ve potansiyel değerlerinin optimizasyonunda elde edilen kontur grafiği

Yanıt yüzey ve kontur grafikleri incelendiğinde en yüksek akım cevabının pH 8 ve 0,6 V potansiyel fark için elde edildiği görülmektedir.

Çalışma potansiyeli ve pH'sının optimizasyonu için yapılan çalışmada tüm elektrot yüzeyleri için en iyi net akım değerlerinin elde edildiği optimum şartlar Çizelge 4.30.'da özetlenmiş ve çalışmanın devamında bu değerler kullanılmıştır.

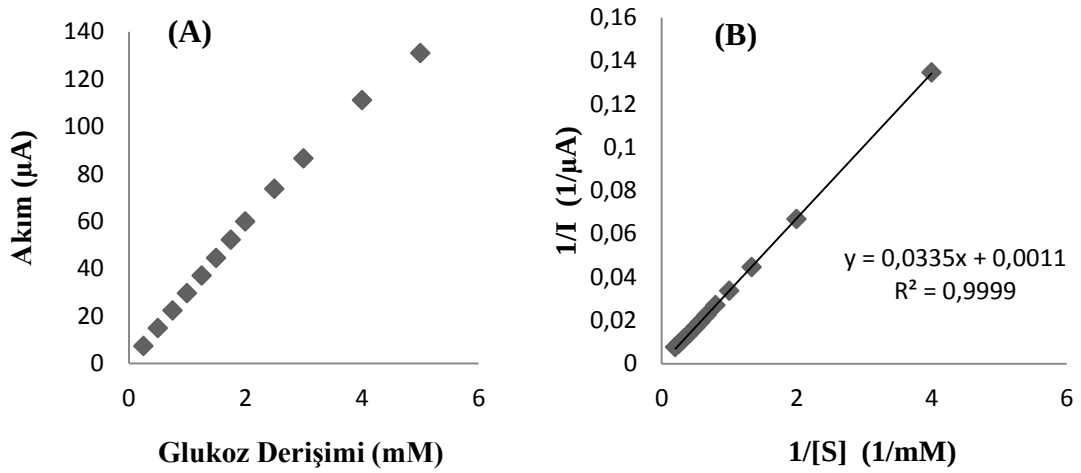
Çizelge 4.30. Elektrot yüzeylerine ait optimum pH ve çalışma potansiyeli değerleri

	PPy	PNMP	Ppy-ko-PNMP
Çalışma potansiyeli (V)	0,8	0,8	0,6
pH	6	6	8

4.1.6. Enzim Elektrotların Kinetik Parametreleri

4.1.6.1. PPy ile Modifiye Edilen Elektrodun Kinetik Parametreleri

Bu çalışmada, optimal şartlarda PPy ile oluşturulan enzim elektrodun farklı derişimlerdeki glukoz çözeltilerindeki akım değerleri pH 6'da 0,8 V potansiyel uygulanarak, Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri Şekil 4.58'de verilmiştir.

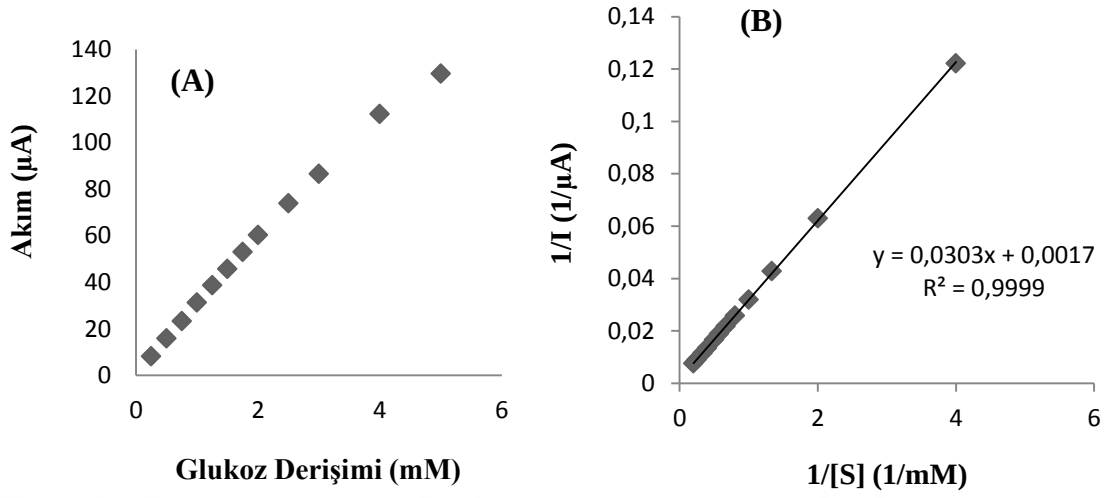


Şekil 4.58. PPy ile modifiye edilmiş elektrodun Michaelis-Menten (A) ve Lineweaver-Burk grafiği (B)

Şekil 4.58.'de 4 mM glukoz derişimine kadar net akım cevabının lineer olarak arttığı 5 mM glukoz derişiminde lineerlikten saptığı görülmektedir. 4 mM glukoz derişimine kadar olan veriler kullanılarak $1/[S]$ değerine karşı $1/I$ değerleri grafiğe geçirilerek elde edilen Lineweaver-Burk grafiğine göre; edilen denklemde kayma (0,0011) $1/I_{max}$ değerini, eğim (0,0335) ise K_m/V_{max} değerini vermektedir. Bu veriler kullanılarak PPy ile modifiye edilmiş elektrodun I_{max} değeri 909,1 µA, K_m değeri ise 30.5 mM olarak hesaplanmıştır.

4.1.6.2. PNMP ile Modifiye Edilen Elektrodun Kinetik Parametreleri

PNMP için elde edilen optimal şartlarda oluşturulan enzim elektrodun farklı derişimlerdeki glukoz çözeltilerindeki net akım değerleri pH 6'da 0,8 V potansiyel uygulanarak, Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri Şekil 4.59.'da verilmiştir.



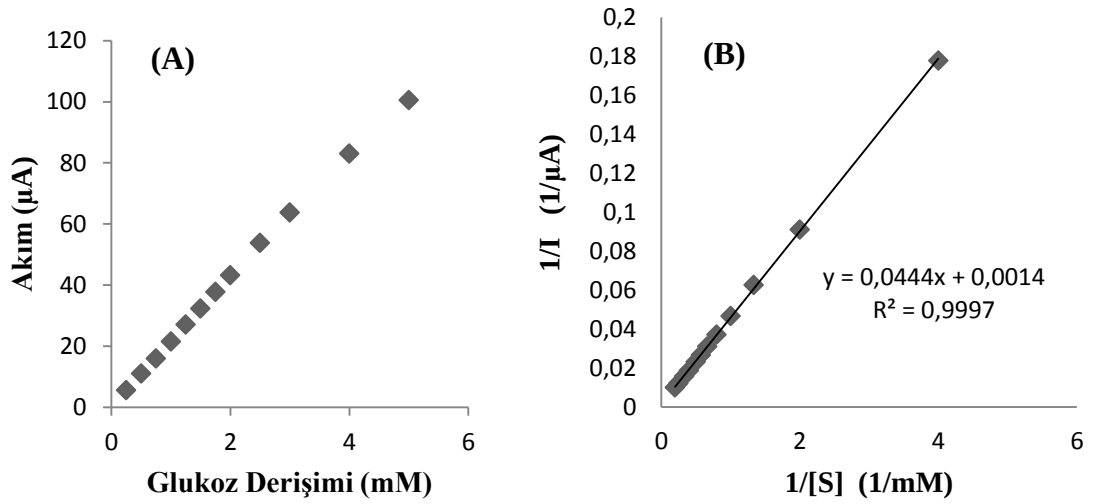
Şekil 4.59. PNMP ile modifiye edilmiş elektrodun Michaelis-Menten (A) ve Lineweaver-Burk grafiği (B)

Şekil 4.59.'da görüldüğü gibi akım cevabı 3 mM glukoz derişimine kadar doğrusal artış göstermiş, daha yüksek derişimlerde doğrusallıktan sapmaya başlamıştır. 3 mM glukoz derişimine kadar olan veriler kullanılarak $1/[S]$ değerine karşı $1/I$ değerleri grafiğe geçirilerek elde edilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 4.59'da verilmiştir. Grafiğin eğilim çizgisi denklemi kullanılarak I_{max} değeri 588,23 µA; K_m değeri ise 17,82 mM olarak hesaplanmıştır.

4.1.6.3. PPy-ko-NMP ile Modifiye Edilen Elektrodun Kinetik Parametreleri

Optimal şartlarda Ppy-ko-PNMP ile oluşturulan enzim elektrodun farklı derişimlerdeki glukoz çözeltilerindeki net akım değerleri pH 8'de 0,6 V potansiyel uygulanarak, Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri Şekil 4.60'da verilmiştir.

Şekil 4.60. incelendiğinde 5 mM glukoz derişimine kadar akım cevabının lineer olarak arttığı görülmektedir. $[S]$ derişimine karşı ölçülen I verileri ile $1/[S]$ değerine karşı $1/I$ değerleri grafiğe geçirilerek elde edilen LineWeaver-Burk grafiğinden elde edilen kinetik parametrelere göre, I_{max} değeri 714,28µA; K_m değeri ise 31,72 mM olarak hesaplanmıştır.

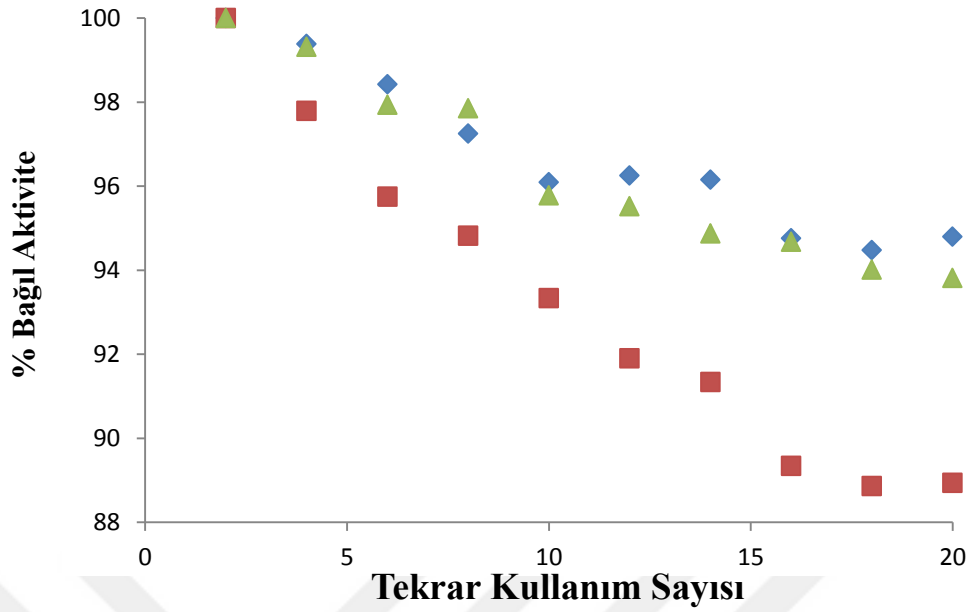


Şekil 4.60. PPy-ko-PNMP ile modifiye edilmiş elektrodun Michaelis-Menten (A) ve Lineweaver-Burk grafiğı (B)

4.1.7. Enzim Elektrotların Tekrar Kullanım Kararlılığı

Optimum şartlarda oluşturulan sırasıyla PPy, PNMP ve PPy-ko-PNMP ile modifiye edilmiş enzim elektrotların önce tampon çözeltide 1 kez, sonrasında da 5 mM glukoz varlığında ardışık olarak 20 kez kronoamperometrik yöntemle akım değerleri ölçülmüştür. Her ölçüm için net akım değerleri hesaplanmış, ilk kullanımdaki net akım değerine göre % bağıl aktiviteler hesaplanarak kullanım sayısına bağılı değışimleri Şekil 4.61.'de verilmiştir.

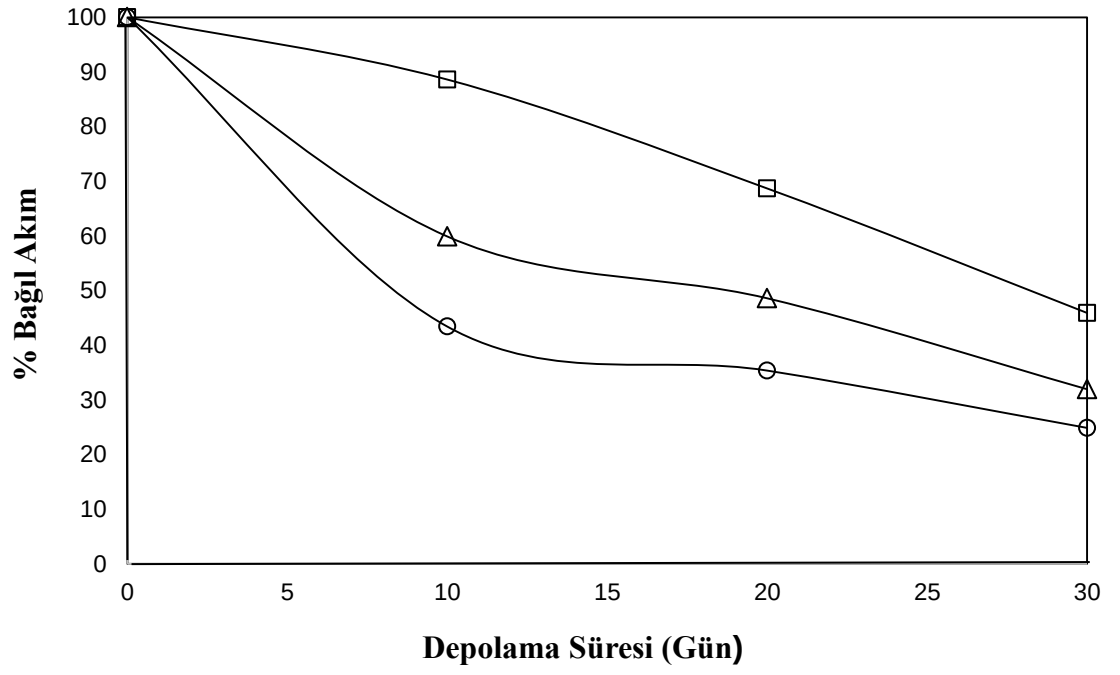
Şekil 4.61.'de 20 ardışık kullanım sonunda başlangıca göre 3 elektrot için de enzimin neredeyse aynı akım değerini ölçtüğü görülmektedir. PPy, PNMP ve PPy-ko-PNMP ile modifiye edilen enzim elektrotların, 20. Kullanımda başlangıca göre etkinliklerini sırasıyla %95,5, %92,7 ve %89,38 oranında korumakta oldukları belirlenmiştir.



Şekil 4.61. PPy, PNMP ve PPy-ko-PNMP ile modifiye edilen enzim elektrotların tekrar kullanım kararlılığı (◆: PPy, ▲: PNMP, ■ : PPy-ko-PNMP)

4.1.8. Enzim Elektrotların Depolama Kararlılığı

Enzim elektrotlar oluşturulduktan sonra 3 mM glukoz içinde net akım değerleri ölçülmüş, 4 °C’de 30 gün bekletilmiştir. 10 gün aralıklarla 3 mM glukoz için net akım değerleri belirlenerek başlangıç aktivitesine göre % bağıl akım değerleri hesaplanmıştır. % bağıl akım değerlerinin depolama süresine bağlı değişimi PPy, PNMP ve PPy-ko-PNMP ile modifiye edilen enzim elektrotlar için Şekil 4.62.’de verilmiştir. Şekil 4.62’de görüldüğü gibi, her üç elektrodun % bağıl akım değerlerinin azaldığı tespit edilmiştir. En yüksek depolama kararlılığı PPy-ko-PNMP ile modifiye elektroda ait olup 30 gün sonunda başlangıca göre %45,91 bağıl akım değerine sahiptir. Diğer elektrotların 30 gün için depolama kararlılıkları PPy ve PNMP için sırasıyla % 24,87 ve % 31,95 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.62. Enzim elektroların depolama kararlılıkları (O: PPy; Δ : PNMP; $\square$: PPy-ko-NMP) ile modifiye elektrotlar

4.2. TARTIŞMA

4.2.1. Elektrot Tasarım Parametlerinin Optimizasyonu

Bu çalışmada, üç elektrot tekniği ile Pt elektrot üzerine pirol ve N-metilpirolün homo ve ko-polimerleri sentezlenerek GOD içeren ince bir Chi film ile kaplanmış ve sonrasında, Chi film içerisinden enzim kaçıışını engellemek amacıyla Chi ve GOD bünyesinde bulunan $-NH_2$ grupları ile glutaraldehit (GAL) arasında çapraz bağlar oluşturulmuştur. Enzim elektrotların tasarımında polipirol (PPy), poli(N-metilpirol) (PNMP) ve poli(pirol-ko-N-metilpirol) PPy-ko-PNMP kullanılarak 3 ayrı elektrot oluşturulmuştur. Biyosensörlerde, iletken polimerler biyolojik türler için uygun bir immobilizasyon ortamı olarak kullanılır. Bu malzemelerin redoks özelliklerinden dolayı son yıllarda kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır. Özellikle PPy, nispeten daha kararlı olması, kolay hazırlanması ve iletkenliğinin yüksek olmasından dolayı, sensör çalışmalarında en umut verici iletken polimerden biridir. Bu sebeple PPy ile yapılan çalışmalar daha fazladır.

YYY, az sayıda deney ile bağımlı değişkenin birden fazla bağımsız değişken değişimine bağılı olarak en uygun model ile tahminlemesi olanağı sağladığından son derece kullanışlı bir yöntemdir. Ancak YYY'nin biyosensör optimizasyonu ve karakterizasyonu konusunda oldukça sınırlı sayıda çalışma mevcuttur.

Gouda ve ark. (2001), amperometrik biyosensör tasarlamışlardır. İnvertaz, mutarotaz ve glukoz oksidaz enzimleri için YYY ile her enzim için en iyi bağlanma oranlarını belirlemişlerdir.

Ebrahimi ve ark. (2010), amperometrik biyosensör tasarlamışlardır. Enzim aktivitesi, çok duvarlı karbon nanotüp ve asidik sol jel miktarını yanıt yüzey yöntemine göre optimize etmişlerdir.

Yağız, E. (2015), amperometrik biyosensör tasarlamıştır. Karbon pastanın grafit:mineral yağ oranı, monomer derişimi, tarama hızı, enzim derişimi, çalışma pH'sı ve potansiyel değerlerini YYY ile optimize etmiştir.

ANOVA analizi ile elde edilen p-değerinin 0.05'den düşük olması önerilmektedir. Bu değer 0.05'den küçük olması sonuçların anlamlı olduğu ve önerilen modelin uygun olduğu anlamına gelmektedir. İdeal bir model için,

matematiksel formunun uygunsuzluğu (lack of fit) için anlamsız ve regresyon modeli için anlamlı olması gerekmektedir (Myers ve Montgomery, 1995). Yapılan çalışmaların tümü p değeri açısından anlamlı, çoğunda ise lack of fit değeri anlamsız bulunmuştur. Varyasyon katsayısı (C.V.), standart sapmanın ortalamaya göre yüzde kaçlık bir değişim gösterdiğini belirtir. Büyük varyasyon katsayısı değerleri, verilerin ortalamadan çok fazla uzaklaştığını, küçük varyasyon katsayısı değerleri ise verilerin hemen hemen ortalama ile aynı değere sahip olduğunu göstermektedir (Laziç, 2004). Dolayısı ile % C.V. değerinin düşük olması modelin uygunluğu açısından önemlidir. Regresyon (belirtme) katsayısı (R^2) bağımlı değişkenlerin değerlerinin değişimlerinin, deneysel faktörlerle ve etkileşimleriyle ne derecede açıklanabileceğini gösterir. R^2 değeri her zaman 0 ile 1 arasındadır ve ne kadar 1'e yaklaşırsa, modelin uygunluğu ve tahmin etmede kullanılabilirliği o kadar iyidir (Akın, 2009). Ayrıca; bağımlı değişkende meydana gelen değişimlerin bağımsız değişkenler tarafından açıklanma başarısı o kadar yüksektir (Akın 2009). İstatistiki olarak önemsiz terimlerin modelde kullanılabilmesi nedeniyle oluşturulan modellerin değerlendirilmesi aşamasında yüksek R^2 değerleri ile karşılaşılabilmektedir. Bu nedenle düzeltilmiş belirtme katsayısı R^2_{adj} değerlerinin modelin uygunluğunun değerlendirilmesinde kullanılması önerilmektedir. R^2 ve R^2_{adj} değerlerinin birbirlerine yakın olması ve aralarındaki farkın en fazla 0.2 olması önerilmektedir. Fark ne kadar küçükse uygulanan modelin elde edilen gerçek sonuçları yansıtmada derecesi o kadar yüksektir. R^2_{adj} ile $Pred-R^2$ değerleri arasındaki farkın da 0.2'den fazla olmaması önerilmektedir. Bu katsayıların oranları arasında % 20'den fazla değişim olması durumunda önerilen model uygun değildir (Aygün, 2012). Modelin uygun olabilmesi için, sinyalin gürültüye oranını veren Adeq. Precision (yeterli hassasiyet) değerinin 4'den büyük olması gerekir. Çalışmada belirlenen Adeq. Precision. değerlerinin tamamı 4'den yüksek bulunmuştur.

Pt elektrot üzerine, elektropolimerizasyon tekniği kullanılarak PPy ve PNMP için 10, 25 ve 50 mM monomer derişimi ile 20, 50 ve 100 mV/s tarama hızında polimer film kaplanmıştır. YYY ile monomer derişimi ve tarama hızı optimize edilmiştir. Optimizasyon sonucu monomer derişiminin, PPy ve PNMP için 10 mM, tarama hızının ise PPy için 50 mV/s, PNMP için ise 20 mV/s olduğu değerlerde en yüksek net akım değerleri elde edilmiştir. PPy-ko-PNMP için ise Py ve NMP monomer derişiminin

toplamda 10 mM olacak şekilde 5:5 oranındaki derişim ve 50 mV/s tarama hızında en yüksek net akım değerleri elde edilmiştir.

Polimer filmlerin sentezi farklı monomer derişimi ve tarama hızı ile yapıldığında, her iki parametrenin de biyosensör akım cevabına önemli derecede etkisi olduğu belirlenmiştir. Monomer derişimi ve tarama hızı amperometrik biyosensörlerde hassasiyeti etkileyeceğinden dolayı önemli parametrelerdir. Monomer derişiminin değışimi sentezlenecek polimerin 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 gerçekleşecektir. 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 olur. 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 bağlı akım yoğunluğu orantılı olacaktır. Bu bağlamda sentezlenen polimer filmin gözenekliliği ve homojenliği akım yoğunluğunda önemli bir role sahiptir. Tarama hızının da 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. 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. En yüksek net akımların elde edilebileceği monomer derişimi ve tarama hızının belirlenmesi amacıyla da YYY kullanılmıştır. YYY klasik yöntemlerin aksine, zamandan ve maliyetten tasarruf sağlayarak çalışmaya olumlu yönde katkı sağlamıştır. Literatürdeki çalışmalarla kıyaslandığında; derişim ve tarama hızı değerlerinin bu çalışmayla benzerlik gösterdiğini söyleyebiliriz.

Uang ve ark. (2003), galvanostatik elektropolimerizasyon yöntemini kullanarak 0.1 M KCl ortamında, PPy film ile kapladıkları Pt elektrot ile yeni bir glukoz

biyosensörü tasarlamışlardır. Yaptıkları çalışmada, 50 mM Py derişimi ve 100 mV/s tarama hızında çalışmışlardır.

Ren ve ark. (2008), üç elektrot tekniğini kullandıkları, paratoluensülfonik asit elektrolit ortamında kronopotansiyometrik yöntemle, Pt elektrot üzerine PPy film oluşturdıkları biyosensör tasarımında 150 mM Py derişimi ve 60 mV/s tarama hızında en iyi sonuçları elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Özyılmaz ve ark., (2011), Pt elektrot yüzeyinde elektrokimyasal olarak polipirol (PPy) sentezleyerek, sentez ortamında bulunan glukoz oksidaz (GOD) enziminin polimer matriksi içinde tutuklanmasıyla glukoz biyosensörü tasarlamıştır. Çalışmada, 0,2 M Paratoluensülfonikasit ortamında 100 mM Py derişimi ve 50 mV/s tarama hızında en iyi sonuçları elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Xu ve ark. (2012), iyice hizalanmış polipirol nanotellerin (PPyNWA) üzerini Pt nanopartiküllerle kaplayarak (PtNPs) , GOD'nin yüzey adsorpsiyonu ile yeni glukoz biyosensörü tasarlamışlardır. PPyNWA-PtNPs-GOD glikoz biyosensörünün, hem potansiyometrik hem de amperometrik duyarlılığı için optimum koşulları 200 mM pirol ve 50 mV/s tarama hızı olarak belirlemişlerdir.

Biyosensör tasarımında, Chi derişimi özellikle yığın çözeltide bulunan glukozun elektrot yüzeyindeki GOD molekülüne ulaşımında büyük bir öneme sahiptir. Chi derişimi arttıkça viskozitesi artacak, ancak gözenek büyüklüğü azalacaktır. Bu da substratın enzime ulaşmasında etkili olacaktır. GAL, Chi ve GOD moleküllerinin yapısında bulunan NH₂ 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. GOD, glukozu moleküler oksijen varlığında okside ederek H₂O₂ üreten molekül olduğundan ölçülen akım yoğunluğundan sorumlu olan moleküldür. Dolayısı ile GOD derişimi arttıkça akım cevabı yükselmiştir.

Pt elektrot, polimer film ile kaplandıktan sonra üzerine GOD immobilizasyonunda kullanılmak üzere hazırlanan GOD ,Chi ve GAL çözeltilerinin derişimleri YYY ile optimize edilmiştir. Bu sebeple her üç elektrot için de % 0,25, % 0,625 ve % 1 Chi derişimi için yapılan optimizasyon sonucunda PPy ve PNMP kaplı elektrotlar için en iyi net akım değeri % 1, PPy-ko-PNMP kaplı elektrot için % 0,625

Chi derişiminde elde edilmiştir. GOD derişimi için yapılan optimizasyon sonucunda PPy, PNMP ve PPy-ko-PNMP ile kaplı elektrotlar ile yapılan ölçüm sonucunda en iyi net akım değeri 1, 2,5 ve 4 mg/ml derişimleri arasından % 4 GOD derişiminde elde edilmiştir. Aynı şekilde %0,01 %0,025 ve %0,0625 GAL derişimi için de yapılan optimizasyon sonucunda, PPy ve PNMP kaplı elektrotlarda en iyi net akım %0,0625, PPy-ko-PNMP kaplı elektrotta ise % 0,025 GAL derişiminde elde edilmiştir.

Sung ve ark. (2003), elektropolimerizasyon ile PPy üzerine polianyon/polietilen glikol/GOD immobilize ettikleri yeni glukoz biyosensörü tasarlamışlardır. Yaptıkları çalışmada pH'sı 7,4 olan fosfat tamponunda çalıştıklarını bildirmişlerdir.

Özyılmaz ve ark., (2011), Pt elektrot yüzeyinde elektrokimyasal olarak polipirol (PPy) sentezleyerek, sentez ortamında bulunan glukoz oksidaz (GOD) enziminin polimer matriksi içinde tutuklanmasıyla glukoz biyosensörü tasarlamıştır. Çalışmada, Pt elektrot üzerine PPy sentezi gerçekleştirilerek 2,5 mg/ml GOD immobilize etmişlerdir. Elde edilen Pt/PPy-GODpTSA ve Pt/PPy-GODNapTS enzim elektrotları için optimum potansiyel akım değerlerini sırasıyla 0,7 ve 0,6 V; optimum pH değerleri ise sırasıyla 4,5 ve 7,0 olarak bulmuşlardır.

Bayram, (2015), Pt elektrot üzerine sodyum okzalat ortamında Poli-orto-anisidin sentezleyerek, amperometrik glukoz biyosensör geliştirmiştir. Yaptığı klasik optimizasyon sonucu, glukoz biyosensörünün % 0,5 Chi, % 0,075 GAL ve 4 mg/ml GOD derişiminde en iyi aktiviteyi gösterdiğini bildirmiştir.

YYY ile elektrot oluşturma parametrelerinin etkisi glukoz derişimine bağlı olarak ölçülen net akım cevabına bağlı olarak değerlendirilmiştir. Bu akım değerleri kullanılarak program tarafından belirli bir glukoz derişimi için ölçülecek akım değerini verecek en uygun model önerilmiştir.

pH değerleri 4, 5, 6, 7 ve 8 olmak üzere hazırlanan fosfat tamponlarında, akım cevabına bağlı olarak YYY ile optimizasyon yapılmıştır. PPy ve PNMP ile hazırlanan elektrot için en yüksek net akım pH 6 da, PPy-ko-PNMP ile hazırlanan elektrot için ise pH 8'de elde edilmiştir.

PPy, PNMP ve PPy-ko-PNMP ile kaplı elektrotların 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 ve 0,8 V potansiyelde akım cevabına bağlı olarak YYY ile optimizasyonu yapılmıştır. PPy ve PNMP için 0,8 V, PPy-ko-PNMP elektrot için 0,6 V en iyi potansiyel değer olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar uygulanan potansiyele bağlı olarak akım

değerlerinin arttığı yönündedir. Uygulanan potansiyelin artışına bağlı olarak akım cevabının artması beklenen bir sonuçtur. Çalışma kapsamında elde edilen veriler Çizelge 4.31’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.31. Enzim elektrotların elektrokimyasal ve biyokimyasal optimizasyonu ve karakterizasyonunda elde edilen veriler

	PPy	PNMP	PPy-ko-PNMP
Tarama Hızı (mV/s)	50	20	100
Derişim (mM)	10	10	5-5
GOD (mg/ml)	4	4	4
GAL (%)	0,0625	0,0625	0,025
Chi (%)	1	1	0,625
pH	6	6	8
Potansiyel (V)	0,8	0,8	0,6
Imax (µA)	909,1	588,23	714,28
Km (mM)	30,5	17,82	31,72
Tekrar Kullanım Kararlılığı*	95,5	92,7	89,38
Depolama Kararlılığı**	24,87	31,95	45,91

***: 20 tekrar kullanım**

**** : 30 gün depolama**

Çizelge 4.33’de görüldüğü gibi en yüksek I_{max} değeri ve tekrar kullanım kararlılığı PPy ile modifiye edilmiş elektroda aitken, depolama kararlılığında en yüksek değer PPy-ko-PNMP ile modifiye edilmiş elektroda aittir.

Razola ve ark. (2002), platin elektrot üzerine peroksidaz (HRP) immobilize ederek hazırladıkları biyosensörün, depolama kararlılığının belirlenmesi için yapılan çalışma sonucunda 35 gün sonra aktivitesinin %90’ını koruduğunu belirlemişlerdir.

Yavuz, (2005), polivinilferrosen (PVF) ile kapladığı Pt elektrodu GOD çözeltisine daldırarak, enzimin polimer matriks içerisinde tutuklanmasını sağlamıştır. Tasarladığı elektrodun, Michaelis-Menten sabitini (K_m) 417,57 mM olarak bulmuştur.

Özyılmaz ve ark. (2011), Pt elektrot yüzeyinde elektrokimyasal olarak PPy sentezleyerek, sentez ortamında bulunan glukoz oksidaz (GOD) enziminin polimer matriksi içinde tutuklanmasıyla glukoz biyosensörü tasarlamışlardır. 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 hesaplamışlardır. Genel olarak Pt/PPy-GODNapTS elektrodunun depolama kararlılığının daha yüksek olduğunu, ancak 30 gün sonunda her iki elektrodun aktivitelerinin neredeyse tamamını kaybettiklerini gözlemlemişlerdir.

BAL, (2012), yaptığı çalışmada Piroli, paratoluensülfonatlı ortamda elektropolimerleştirerek hazırladığı polipiroli-paratoluensülfonat film üzerine glutaraldehit yardımıyla GOD'yi çapraz bağlama yöntemiyle immobilize etmiştir. Polipiroli-paratoluensülfonat filmle yaptığı enzim elektrotteki immobilize enzime ait gözlenen K_m değerini 0,267 mM, I_{maks} değerini ise 4,048 mM/dk olarak bulmuştur.

Elde edilen veriler ışığında; modifiye enzim elektrot tasarımında PPy ile hazırlanan biyosensörün düşük derişimde daha hassas ve tekrar kullanılabilirliğininin daha yüksek olduğu görülmüştür. Fakat depolama kararlılığı, diğer modifiye enzim elektrolara göre düşüktür. Bu durum da raf ömrünün kısa olduğu anlamına gelmektedir. Raf ömrünün kısa olması maliyeti arttıracığından bu özellik istenmeyen bir durumdur.

PNMP ile modifiye edilen enzim elektrodun depolama kararlılığı, PPy ile modifiye edilen enzim elektrottan daha yüksek iken, hassasiyet bakımından daha düşük değere sahiptir.

PPy-ko-PNMP ile modifiye edilen enzim elektrot diğer elektrotlara göre en yüksek depolama kararlılığına sahiptir. Bu da raf ömrü en uzun elektrot anlamına gelmektedir. Tekrar kullanım kararlılığı da yüksek olan elektrodun glukoz biyosensör tasarımına elverişli olduğu söylenebilir.

PPy, PNMP ve PPy-ko-PNMP ile oluşturulan enzim elektrotların optimal koşullarda elde edilmiş örnekleri CV, DTV ve impedans analizleri ile elektrokimyasal olarak karakterize edildiğinde genel olarak enzimin elektrot üzerinde glukoz ile reaksiyona girerek H_2O_2 oluşturduğu ve akım cevabını meydana getirdiği gözlenmiştir. CV (Şekil 4.40-42) ve DTV (Şekil 4.42-45) analizlerinde glukozlu ortamda, glukoz içermeyen ortama göre daha yüksek akım artışı bunun en önemli göstergesidir. Ayrıca impedans analizleri de (Şekil 4.46-48) çok önemli veriler ortaya koymuştur.

Nyquist ölçümleri yüksek frekans bölgesinden düşük frekans bölgesine uzanan metal/çözelti arayüzeyinde yüksüz bölgeye karşılık gelen yarım dairesel kısım elektrot yüzeyinde olası gerçekleşecek elektron transferinin zorluğundan dolayı ortaya çıkan dirençten kaynaklanmaktadır. Metal/çözelti arayüzeyinde oluşan her arayüzeye karşılık

gelen Nyquist eğrilerinde yüksek frekans bölgesinden düşük frekans bölgesine doğru uzanan kısmi yarım daireler oluşacaktır. Bu alışma için önemli olan metal/çözelti arayüzeyinde yüksek frekans bölgesindeki yük transfer direncine karşılık gelen kısmi yarım dairenin çapı ne kadar küçükse olası elektrokimyasal tepkimeler için elektron transferinin daha kolay olacağı anlamını taşımaktadır. Glukoz içeren tampon çözelti için elde edilen Nyquist eğrilerinde yüksek frekans bölgesinde gözlenen kısmi yarım dairenin çapının daha küçük olması yük transferinin daha iyi olduğunu göstermektedir (zyılmaz ve ark. 2014)



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

- ✓ Çalışmada hazırlanan modifiye Pt enzim elektrotların, glukozu duyarlı amperometrik biyosensör olarak kullanılabilecekleri belirlenmiştir.
- ✓ Polimer filmlerin sentezi farklı monomer derişimi ve tarama hızı ile yapıldığında, her iki parametrenin de biyosensör akım cevabına önemli derecede etkisi olduğu belirlenmiştir. Py ve NMP'nin homo ve kopolimer sentezinin, YYY ile optimizasyon çalışmalarında optimum monomer derişimleri Py ve NMP için farklılık gösterirken, kopolimer sentezinde eşmolar monomer derişimleri en yüksek etkinlikte enzim elektrodu oluşturdukları belirlenmiştir. PPy, PNMP ve PPy-ko-PNMP modifiyeli elektrotlar için YYY ile optimizasyonda belirlenen optimal tarama hızlarının ise farklı çıktığı tespit edilmiştir.
- ✓ 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. Bu nedenle GAL ve Chi derişimi YYY ile optimize edilerek en uygun derişim oranı belirlenmiştir.
- ✓ YYY ile elektrot oluşturma parametrelerinin etkisi glukoz derişimine bağlı olarak ölçülen net akım cevabına bağlı olarak değerlendirilmiştir. Bu net akım değerleri kullanılarak program tarafından belirli bir glukoz derişimi için ölçülecek akım değerini verecek en uygun model önerilmiştir.
- ✓ Enzim elektrotları ile ölçülen akım değerlerinin, her üç elektrot türünde de glukoz derişimi ile orantılı olarak arttığı belirlenmiştir.
- ✓ YYY ile yapılan çalışmaların ANOVA analizlerinde modellemelerin hepsinde de model p değerleri anlamlı bulunmuştur.
- ✓ 1 mM glukoz derişiminde ölçülecek akım değeri için oluşturulan modellemelerde monomer derişimi ve tarama hızı parametreler için oluşturulan modellemelerin

PPy, PNMP ve PPy-ko-PNMP için kuadratik modele uygun olduğu belirlenmiştir.

- ✓ Chi, GOD ve GAL derişimlerinin 1 mM glukoz derişimi için ölçülecek akım değeri için yapılan çalışmalarda lineer modelin uygun olduğu tespit edilmiştir.
- ✓ 1 mM glukoz derişiminde ölçülecek akım değerine çalışma pH'sı ve uygulanan potansiyelin etkisi için oluşturulan modellemelerde PPy ve PNMP için kubik; PPy-ko-PNMP ile modifiye elektrot için kuadratik modellerin daha uygun olduğu tespit edilmiştir.
- ✓ Glukoz derişimine bağı olarak ölçülen akım değerleri ile elde edilen veriler karşılaştırıldığında, modifiye elektrotların I_{max} değerleri, en yüksekten düşüğe doğru PPy, PPy-ko-PNMP ve PNMP olarak sıralanabilir.
- ✓ Tekrar kullanım kararlılığı en yüksek elektrot PPy; en düşük elektrot PPy-ko-PNMP iken, depolama kararlılığında ise tam tersi bir sonuç elde edilmiştir.
- ✓ Tasarlanan elektrotların 1 mM glukoz için ölçülen net akım değerleri ile oluşturulan modelleme ile hesaplanan tahmini akım değerlerinin genel olarak birbirine yakın çıktığı belirlenmiştir.
- ✓ Elde edilen elektrotların meşrubat ve kandaki glukoz derişiminin ölçülmesi ile ilgili çalışmalar yapılarak elektrotların potansiyel kullanım alanları araştırılabilir.
- ✓ Elektrotların tasarımı sırasında kitosan içerisine bazı nanomateriyaller eklenerek glukoz derişimine bağı net akım değerlerinde duyarlılık artırılabilir.
- ✓ Glukoz derişimi bir değişken olarak kullanılıp YYY ile akım değerini veren modelleme yapılırken glukoz derişimini de içeren ve böylece herhangi bir glukoz derişiminde akım değerini tahminleyen bir denklem oluşturulabilir.
- ✓ Bu çalışma sentez koşullarının değiştirilmesi ile zenginleştirilebilir. Örneğin farklı elektrolit türleri denenebilir, sentez sıcaklığı optimize edilebilir. Ayrıca polimer film kalınlığının etkisi detaylı bir şekilde incelenebilir.
- ✓ Elektrolit ortam olarak kullanılan sodyum okzalat çözeltisi değişken olarak kullanılıp YYY ile derişim optimizasyonu yapılabilir.
- ✓ Enzim elektrotlar oluşturulurken GOD ile beraber invertaz kullanılarak sakkaroz; laktaz kullanılarak laktöz; maltaz kullanılarak maltoz; amilaz kullanılarak nişasta derişimini ölçmekte kullanılabilecek biyosensörler tasarlanabilir.

KAYNAKLAR

- Ahuja, T., Mir, I.A., Kumar, D., Rajesh, 2007. Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications. **Biomaterials**, 28: 791-805.
- Akın, A., 2009. Bir tekstil yüzey aktif maddesinin H₂O₂/UV-C prosesiyle arıtılabilirliğinininyanıt yüzey yöntemiyle modellenmesi ve optimizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul
- Amam, M., Franser, J., 2010. Two-enzyme lactose biosensor based on β -galactosidase and glucose oxidase deposited by AC-electrophoresis: Characteristics and performance for lactose determination in milk. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 148, 583-589.
- Anazawa K, Shimotani K, Manabe C, Watanabe H, 2002. Shimizu M. High-purity carbonnanotube synthesis method by an arc discharging in magnetic field. **Appl Phys Lett**; 81:739–41.
- Azevedo, A. M., Prazeres, D. M. F., Cabral, J. M. S., Fonseca, L. P., 2005. Ethanol biosensors based on alcohol oxidase. **Biosensors & Bioelectronics**. 21, 235-247.
- Bal, Ö., 2012. Biyolojik Sıvılardaki Glukozun Tayini için Polipirol Filme Glukoz Oksidaz Enziminin İmmobilizasyonu ile Yeni Bir Biyosensör Hazırlanması Yüksek Lisans Tezi, 1-3
- Bayram, E.İ., 2015. Nanipartikülle Modifiye Edilmiş Polianilin Türevli Enzim Elektrotlarının, Optimizasyonu ve Karakterizasyonu. Mustafa Kemal Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi
- Borole, D. D., Kapadi, U.R., Mahulikar, P.P. and Hundiware, D.G., 2004. Glucose Oxidase Electrodes of Polyaniline, Poly(o-toluidine) and Their Copolymer as Biosensor: a Comparative Study. **Polymer Advantage Technology**, 15: 306-312.
- Box GEP., Wilson KB., 1951. On the experimental attainment of optimum conditions J.R.Stat.Soc.Ser.B13:1-45
- Can, Ö., 2012. β -Galaktozidaz Kullanımı İle Galaktooligosakkarit Sentezi ve Sentezin Yüzey Yanıt Yöntemi Kullanımı İle Optimizasyonu. Yüksek Lisans Tezi
- Chen, C., Jian, Y., Kan, J., 2005. A noninterference polypyrrole glucose biosensor. **Biosensors Bioelectronics**, 22: 639-643
- Clark. Jr., Li, Lyons, C. 1962. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery, *Annals of the New York Academy of Sciences* 102: 29-45.
- Comba, F. N., Rubianes, M. D., Herrasti, P., Rivas, G. A., 2010. Glucose biosensing at carbon paste electrodes containing iron nanoparticles. **Sensors and Actuators B: Chemical**. 149, 306–309.
- Contractor, A.Q., Sureshkumar, T.N., Narayanan, R, Sukeerthi, S., Lal, R., Srinivasa, R.S., 1994. Conducting polymers based biosensors. *Electrochim. Acta*, 39, 1321–1324.
- Deshpande, M.V., Amalnerkar, D.P., 1993. Biosensors prepared from electrochemically synthesized conducting polymers. *Prog. Polym. Sci* 18:623–649.
- Dzyadevych, N.J., Bouirgua, S., Ichi, H., Karri-Yousoufi, A., Maaref, S., 2011. Renault, Biosens. Bioelectron

- Ebrahimi, B., Shojaosadati, S.A., Daneshgar, P., Norouzi, P., Mousavi, S.M., 2010. Performance evaluation of fast Fourier-transform continuous cyclic-voltammetry pesticide biosensor. *Analytica Chimica Acta*. 687:168-176
- Erden, P.E., 2010. Ksantin ve Ürik Asit Tayini için Farklı Medyatörlü Modifiye Karbon Pasta Enzim Elektrotların Hazırlanması. Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi
- Ekanayake, E.M.I.M., Preethichandra, D.M.G., Kaneto K., 2007. Polypyrrole nanotube array sensor for enhanced adsorption of glucose oxidase in glucose biosensors, **Biosensors and Bioelectronics**, 23: 107–113
- Fortier, G., Belanger, D., 1991. Characterization of the biochemical behavior of glucose oxidase entrapped in a polypyrrole film. **Biotechnol. Bioeng.** 37:854–858.
- Gambhir, A. Gerard, M., Jain, S.K., Malhotra, B.D., 2001a. Characterization of DNA immobilized on electrochemically prepared conducting polypyrrole-polyvinyl sulphate films. **Appl. Biochem. Biotech.** (in press).
- Gerard, M., Ramanathan, K., Chaubey, A., Malhotra, B.D., 1999. Immobilization of lactate dehydrogenase on electrochemically prepared polyaniline films. **Electroanalysis**, 12:450–452.
- Gerard, M., Chaubey A., Malhotra, B.D., 2002. Application of conducting polymers to biosensors. *Biosensors & Bioelectronics*, 17:345–359
- Gouda, M. D., Thakur, M. S., Karanth, N. G., 2001. Optimization of the multienzyme system for sucrose biosensor by response surface methodology. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 17, 595-600.
- Greene, R.L., Street, G.B., Suter, L.J., 1975. Superconductivity in polysulfur nitride (SN)_x. **Phys. Rev. Lett**, 34:577–579.
- Göncü, Y., 2011. Yanıt Yüzey Metodu (RSM) ile Bor Nitrürün Saflaştırılmasının En iyilemesi. Yüksek Lisans Tezi Anadolu Üniversitesi Müh. Mim. Fak. Mlz. Bil. ve Müh. Böl., Eskişehir.
- Huang, K.J., Wang, L., Li, J., Gan, T., Liu Y.M., 2012. Glassy carbon electrode modified with glucose oxidase graphene nano copper composite film for glucose sensing. **Measurement**, 46:378
- Ivory, D.M., Miller, G.G., Sowa, J.M., Shacklette, L.W., Chance, R.R., Baughman, R.H. 1979. Highly conducting charge transfer complexes of poly(p-phenylene). **J. Chem. Phys.** 71:1506–1507.
- Jie, Z., Xiaoqiang, L., Xinhai, W. Xiaohe H., Rui, Y., 2015. Preparation of polyaniline-TiO₂ nanotube composite for the development of electrochemical biosensors. **Sensors and Actuators B-Chemical**, 221: 450-45
- Karpuz, G. 2013. Polipirol-paratoluensülfonat (ppy-pts) filme ürikaz enziminin immobilizasyonu ile yeni bir biyosensör hazırlanması. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
- Kartal, F., Kılınç, A., Timur, S., 2007. Lipase biosensor for tributyrin and pesticide detection. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, 87, 715-722
- Kawai, T., Kuwabara, T., Wang, S., Yoshino, K., 1990. Secondary battery characteristics poly(3-alkylthiophene). **Jap. J. Appl. Phys.** 29:602–605.
- Kotani, N.C., Tlili, C., Guisepe-Elie, A., 2012. Amperometric glucose biosensor based on electroconductive hydrogels. **Talanta**, 109:228-235
- Lazic, Ž.R., 2004. Design of experiments in chemical engineering., *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*, Weinheim,

- 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.
- Lu, M., Li, X.H., Yu, B.Z., Li, H.L., 2002. Electrochemical behavior of Au colloidal electrode through layer-by-layer self-assembly. **J. Colloid Interface Sci**, 248: 376–382.
- Luque, G. L., Rodriguez, M. C., Rivas, G. A., 2005. Glucose biosensors based on the immobilization of copper oxide and glucose oxidase within a carbon paste matrix. **Talanta**, 66: 467-471
- Lupu, S., et al. 2013. Development of Amperometric Biosensors Based on Nanostructured Tyrosinase-Conducting Polymer Composite Electrodes. **Sensors**, 13:6759-6774
- Ma, M., Qu, L., Shi, G., 2003. Glucose Oxidase Electrodes Based on Microstructured Polypyrrole Films. **Journal of Applied Polymer Science**, Vol. 98:2550-2554
- Malinauskas, A., Garjonyte, R., 2000. Amperometric glucose biosensors based on Prussian Blue-and Polyaniline-glucose oxidase modified electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, 15:445-451
- Mirmoghaddaie, L., Ensafi, A., Kadivar, M., Norouzi, P., 2013. Highly selective electrochemical biosensor for the determination of folic acid based on DNA modified-pencil graphite electrode using response surface methodology. **Material Science and Engineering C** 33:1753-1758
- Miyamoto, S., De Taxis du Poet, P., Murakami, T., Kimura, J., Karube, I., 1990. Direct electron transfer with glucose oxidase immobilized in an electropolymerized poly-N-methylpyrrole film on a gold microelectrode. **Anal. Chim. Acta** 235, 255–264.
- Mosbach, K., Danielsson, B., 1981. Thermal bioanalyzers in flow stream enzyme thermister devices. **Anal. Chem**, 53:83A–94A
- Myers R.H., Montgomery D.C., 1995. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. New York: John Wiley.
- Nishizawa, M., Matsue, T., Uchida, I., 1992. Penicillin sensor based on a microarray electrode coated with pH-responsive polypyrrole. **Anal. Chem**, 64:2642–2644.
- Özyilmaz, G., Ozyilmaz, A. T., Can, F., 2011. Glucose oxidase-polypyrrole electrodes synthesized in *p*-toluenesulfonic acid and sodium *p*-toluenesulfonate. **Applied Biochemistry and Microbiology**. 47, 196-205.
- Özyilmaz A.T., Avsar B., Ozyilmaz G., Karahan İ.H., Çamurcu T., Çolak F., 2014. Different copolymer films on ZnFeCo particles: Synthesis and anticorrosion properties, **Applied Surface Science**, 318, 262-268,
- Özyurt, M., 2014. Glukoz Tayini İçin Yeni Bir Biyosensör Hazırlanması. Gazi Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi
- Pang, X., He, D., Luo, S., Cai, Q., 2008. An amperometric glucose biosensor fabricated with Pt nanoparticle-decorated carbon nanotubes/TiO₂ nanotube arrays composite. **Sensors and Actuators B**. 137:134-138
- Rai, P. Majumdar, G.C., DasGupta S., Deb, S., (2004) Optimizing pectinase usage in pretreatment of mosambi juice for clarification by response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, 64:397–403
- Ramanavicius, A., Ramanavicien, A., Malinauskas, A., 2006. Electrochemical sensors based on conducting polymer—polypyrrole. **Electrochimica Acta**, 51: 6025–6037

- Ratcliffe, N.M., 1990. Polypyrrole-based sensor for hydrazine and ammonia. **Anal. Chim. Acta**, 239: 257–262
- Razola, S. S., Ruiz B. L., Diez, N. M., Mark, H.B., Kauffmann, J.M., 2002. Hydrogen peroxide sensitive amperometric biosensor based on horseradish peroxidase entrapped in a polypyrrole electrode. **Biosensors and Bioelectronics** 17: 921-928
- Ren, X., Meng, X., Tang F. Zhang, L., 2009. Biosensor enhanced by glucose oxidase biomimetic membrane containing the platinum and silica nanoparticles. **Materials Science and Engineering**, C29:2234-2238
- 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
- Witt, S., Singh, M., Kalisz, H.M., 1998. Structural and kinetic properties of nonglycosylated recombinant *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase expressed in *Escherichia coli*., *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1405-1411
- Santhanam, K.S.V., Gupta, N., 1993. Conducting-polymer electrodes in batteries **TRIP** 1, 284–289.
- Saraswathi, R., Gerard, M., Malhotra, B.D., 1999. Characteristics of aqueous polycarbazole batteries. **J. Appl. Polym. Sci.**, 74,:145–150.
- Shin, K.S., Youn, H.D., Han, Y.H., Kang, S.O., Hah, Y.C., 1993. Purification and characterisation of D-glucose oxidase from white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Eur. J. Biochem.* 215:747-752
- Shukla, N.K., Pandey, P.C., Upadhyay, S., Sharma, S. 2003. Studies on the Electrochemical Performance of Glucose Biosensor Based on Ferrocene Encapsulated ORMOSIL and Glucose Oxidase Modified Graphite Paste Electrode. **Biosens. Bioelectron.** 18,:1257–1268
- Singhal, R., Chaubey, A., Pande, K.K., Malhotra, B.D., 2000. Immobilization of Glucose oxidase on Poly(3-Hexyl Thiophene) LB films for application to Glucose biosensor, in 4th National Conference on Solid State Ionics, 3–5 March, 2000. Indian Institute of Technology, Mumbai
- Song Y.Y., Gao, Z., Lee, K., Schmuki, P., 2001. A self-cleaning nonenzymatic glucose detection system based on titania nanotube arrays modified with platinum nanoparticles. **Electrochemistry Communications**, 13:1217-1220
- Subaşı, A., 2010. Yanıt yüzey yöntemi yardımı ile ısı değiştirici optimizasyonu .Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Makine Mühendisliği Anabilim Dalı
- Sue, J.W., Hung, C.J., Chen, W.C., Zen, J.M., 2008. Amperometric determination of sugars at activated barrel plating nickel electrodes. **Electroanalysis**, 20:1647-1654.
- Sung, W.J., Bae, Y. H., 2003. A glucose oxidase electrode based on polypyrrole with polyanion/PEG/enzyme conjugate dopant. **Biosensors and Bioelectronics**, 18:1231-1239
- Telefoncu A., 1999. Biyosensörlere genel bakış, Biyosensörler, Biyokimya Lisans Üstü Yazokulu, Kuşadası, 1-9
- Trivedi, U. B., Lakshminarayana, I. L., Patel, P. B., Panchal, C. J., 2009. Amperometric fructose biosensor based on fructose dehydrogenase enzyme. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 136, 45-51.

- Trojanowicz, M., Matuszewski, W., Szczepanczyk, B., Lewenstam, A., 1993. In: Guilbault, G.G., Mascini, M. (Eds.), *Uses of Immobilized Biological Compounds*. Kluwer, **Dordrecht**, pp., 141–150.
- Turan, M. D., Altundogan, H. S., 2011. Hidrometalurjik Araştırmalarda Yanıt Yüzey Yöntemlerinin Kullanımı. *Madencilik*, 50: 11-23.
- Uang, Y.M., Chou, T.S., 2003. Fabrication of glucose oxidase/polypyrrole biosensor by galvanostatic method in various pH aqueous solutions. **Biosensors and Bioelectronics**, 19: 141-147
- Umana, M., Waller, J., 1986. Protein modified electrodes: the glucose oxidase/polypyrrole system. **Anal. Chem.**, 58:2979–2983.
- Urkut, Z., Kara, P., Goksungur, Y., Ozsoz, M., 2011. Response Surface Methodology for Optimization of Food Borne Pathogen Detection in Real Samples Based on Label Free Electrochemical Nucleic Acid Biosensors. **Electroanalysis**, Ege Üniversitesi İzmir
- Ustabaş S., 2010. Glukoz Tayini İçin Yeni Bir Biyosensör Hazırlanması. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi
- Xie, B., Khayyami, M., Nwosu, T., Larsson, P., Danielsson, B., 1993. Ferrocene mediated thermal biosensor. *Analyst* 118:845–848.
- Xu, G., B. Adeloju, S., Wu, Y., Zhang, X., 2012. Modification of polypyrrole nanowires array with platinum nanoparticles and glucose oxidase for fabrication of a novel glucose biosensor. **Analytica Chimica Acta**, 755:100-107
- Wang, J., Myung, N. V., Yun, M., Monbouquette, H. G., 2005. Glucose oxidase entrapped in polypyrrole on high-surface-area Pt electrodes: a model platform for sensitive electroenzymatic biosensors. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 575:139–146
- Yağız, E., 2015. Modifiye Karbon Pasta Elektrotlarının Yanıt Yüzey Yöntemi ile Optimizasyonu, Karakterizasyonu ve Biyosensör Uygulamalarında Kullanımı. Mustafa Kemal Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora tezi
- Yavuz, A., 2005. Polivinil Ferrosen Modifiye Elektrodunu TemeL Alan Glukoz Biyosensörünün Geliştirilmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi
- Yıldız, N., 2011. Gümüş Nanopartiküllerinin Liken Özü İle Biyosentezi. Türkiye Cumhuriyeti Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Kesin Raporu
- Zajoncova, L., Jilek, M., Beranova, V., Pec, P., 2004. A biosensor for the determination of amylase activity. *Biosensors & Bioelectronics*. 20, 240-245.
- Zejun, C. Huiling, L., Xufei, Z., Dongdong L., Shaoyu Z., Xiaoyuan, C., Ye, S., 2014. Electropolymerization of Aniline onto Anodic WO₃ Film: An Approach to Extend Polyaniline Electroactivity Beyond pH 7. **Journal of Physical Chemistry C**. 118: 27449-27458
- Zhang, M., Yan, Y., Gong, K., Mao, L., Guo, Z., Chen, Y., 2004. *Langmuir* 20, 8781-8785
- Zhang, Q., Qu, Y., Zhou, J., Zhang, X., Zhou, H., Ma, Q., Li, X., 2011. Optimization of 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase expression and its application for biosensor. *Bioresource Technology*. 102:10553-10560
- Zhao, C.Z., Shao, C.L., Li, M.H., Jiao, K., 2007. Flow-injection analysis of glucose without enzymatic based on electrocatalytic oxidation of glucose at a nickel electrode, **Talanta**. 71:1769-1773.

ÖZGEÇMİŞ

Yazar, 1990 yılında İskenderun’da doğdu. İlkokul ve Ortaöğrenimini Arsuz’da tamamladı. Mustafa Kemal Üniversitesi Kimya Bölümünü 2008 yılında kazandı. Üniversiteden 2012 yılında Kimyager olarak mezun oldu. Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında 2013 – 2016 yılları arasında Yüksek Lisans öğrenimine devam etti. 2016 yılında yüksek lisans derecesiyle mezun oldu.

