



**BİYOLOJİK SIVILARDA GLUKOZ TAYİNİ İÇİN YENİ BİR
BİYOSENSÖR HAZIRLANMASI**

Rabia Esra KELEŞ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

EYLÜL 2016

Rabia Esra KELEŞ tarafından hazırlanan “BİYOLOJİK SIVILARDA GLUKOZ TAYİNİ İÇİN YENİ BİR BİYOSENSÖR HAZIRLANMASI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Servet ÇETE

Kimya Bölümü, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Başkan: Prof. Dr. Handan YAVUZ

Kimya Bölümü, Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye: Prof. Dr. Elif LOĞOĞLU

Kimya Bölümü, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Tez Savunma Tarihi: 09/09/2016

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Prof. Dr. Hadi GÖKÇEN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Rabia Esra KELEŞ

09.09.2016

BİYOLOJİK SIVILARDA GLUKOZ TAYİNİ İÇİN YENİ BİR BİYOSENSÖR
HAZIRLANMASI
(Yüksek Lisans Tezi)

Rabia Esra KELEŞ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Eylül 2016

ÖZET

Bu çalışmada, glukoz tayini için yeni bir amperometrik biyosensör geliştirildi. Bu amaçla, platin levha üzerinde anilin ve pirolün dodesilbenzen sülfonatlı, ortamda elektropolimerleşmesi ile polianilin-polipirol-dodesilbenzen sülfonat filmi hazırlandı. Polianilin-polipirol-dodesilbenzen sülfonat filminin en iyi çalışma şartları belirlendi. Glukoz oksidaz enzimi, polianilin-polipirol-dodesilbenzen sülfonat filmi içine hapsetme yöntemiyle immobilize edildi. Glukoz tayini, hazırlanan biyosensörün yüzeyinde gerçekleşen enzimatik tepkime sonucu oluşan hidrojen peroksitin +0,40V'da yükseltgenmesine dayanılarak yapıldı. Biyosensörün glukoz tayini için çalışma aralığı tayin edildi. Glukoz biyosensörünün cevabına pH'nın ve sıcaklığın etkisi araştırıldı. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliği ve raf ömrü tayin edildi. Biyolojik ortamlarda olabilecek girişimlerin biyosensörün cevabı üzerine etkileri incelendi.

Bilim Kodu : 20104
Anahtar Kelimeler : Glukoz, glukoz oksidaz, biyosensör, polipirol, polianilin, dodesil benzen sülfonat
Sayfa adedi : 81
Danışman : Doç. Dr. Servet ÇETE

PREPARATION OF A NEW BIOSENSOR FOR GLUCOSE DETERMINATION IN
BIOLOGICAL FLUIDS.

(M. Sc. Thesis)

Rabia Esra KELEŞ

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

September 2016

ABSTRACT

In this study, new amperometric biosensor for determination of glucose was developed. Polyaniline- dodecylbenzene sulphonate film have been prepared on the platinum electrode by the electropolymerization of aniline and pyrrole was carried out in the presence of dodecylbenzene sulphonate. Optimum conditions of polyaniline-polypyrrole-dodecylbenzene sulphonate film was determined. Glucose oxidase enzyme has been immobilized in polyaniline-polypyrrole- dodecylbenzene sulphonate film via the entrapment method. Glucose detection is based on the oxidation of hydrogen peroxide at 0,4 V produced by the enzymatic reaction on the biosensor surface. The linear working range of biosensor for glucose was determined. The effects of pH and temperature on the response of the glucose biosensor were investigated. Reusability and storage stability were determined of the biosensor. Interference effects were investigated on the amperometric response of the biosensor.

Science Code : 20104

Key Words : Glucose, glucose oxidase, biosensor, polypyrrole, polyaniline, sodium dodecyl benzene sulphonate.

Page Number : 81

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Servet ÇETE

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca benden bilgi birikimini ve manevi desteğini hiç esirgemeyen, sabırla yönlendiren değerli hocam Sayın Doç. Dr. Servet ÇETE'ye gösterdiği sabır ve iyi niyeti için sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca bilgisi ve tecrübesi ile desteğini esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet YAŞAR'a çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca beni maddi, manevi destekleyen ve sürekli arkamda güçlerini hissettiğim, benim bu noktaya gelmemde büyük rolü olan annem Nedime KELEŞ'e ve babam İhsan KELEŞ'e; manevi olarak desteklerini benden hiç esirgemeyen hayatımdaki değerli varlıklar abim Ahmet Ertuğrul KELEŞ'e ve kız kardeşim Zeynep Sueda KELEŞ'e çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Enzimler	5
2.2. Glukoz Oksidaz Enziminin Özellikleri ve Glukoz Tayininin Önemi	7
2.3. Biyosensörler	9
2.3.1. Biyosensörlerin tarihi, gelişimi ve uygulama alanları	10
2.3.2. Biyobileşenler	11
2.3.3. Dönüştürücüler (Transduserler)	11
2.4. İletken Polimerlerle Dönüştürücü Hazırlanması	12
2.4.1. İletken polimerler	12
2.4.2. Doping	13
2.4.3. Elektrokimyasal polimerizasyon	16
2.4.4. Elektrokimyasal polimerleşme mekanizması	17
2.4.5. İletken polimerlerle enzim immobilizasyonu	19
2.5. Biyobileşen İmmobilizasyonu	20
2.5.1. Kovalent bağlama	21
2.5.2. Tutuklama (Hapsetme)	21

	Sayfa
2.5.3. Çapraz bağlama	22
2.5.4. Adsorpsiyon.....	23
2.6. Enzim Sensörleri.....	23
2.6.1. Enzim sensörlerinin genel çalışma ilkesi	24
2.6.2. Enzim sensörlerinin sınıflandırılması	25
2.7. Performans Faktörleri	26
2.7.1. Seçicilik.....	26
2.7.2. Kalibrasyon gereksinmesi	26
2.7.3. Tekrarlanabilirlik	27
2.7.4. Kullanım ömrü.....	27
2.7.5. Kararlılık	27
2.7.6. Yüksek duyarlılık.....	27
2.7.7. Yeterli düzeyde tayin sınırı	27
2.7.8. Geniş ölçüm aralığı	28
2.7.9. Hızlı cevap zamanı.....	28
2.7.10. Basitlik ve ucuzluk.....	28
2.8. Kaynak Araştırması	29
3. DENEYSEL KISIM	37
3.1. Cihazlar ve Malzemeler	37
3.1.1. Elektrokimyasal analiz cihazı.....	37
3.1.2. Hücre ve elektrotlar	37
3.1.3. Mikro pipet.....	37
3.1.4. Argon gazı	38
3.1.5. Saf su.....	38
3.1.6. pH metre.....	38
3.1.7. Su banyosu	38

	Sayfa
3.1.8. SEM analizi	38
3.1.9. AFM cihazı.....	38
3.1.10. Yüzey temas açısı analiz cihazı	38
3.2. Kullanılan Reaktifler ve Özellikleri.....	39
3.2.1. Kullanılan çözeltiler	39
3.3. Platin Yüzeye Polianilin-Polipirol Kaplanması.....	41
3.4. Platin/Polianilin-Polipirol (Pt/PANI-PPy) Elektrot İçin En İyi Çalışma Koşullarının Araştırılması.....	42
3.4.1. Çalışma potansiyelinin belirlenmesi	42
3.4.2. Anilin derişiminin etkisi.....	42
3.4.3. Pirol derişiminin etkisi	43
3.4.4. Dodesil benzen sülfonat derişiminin etkisi	43
3.4.5. Polianilin için çevrim sayısının etkisi	44
3.4.6. Polipirol için çevrim sayısının etkisi	44
3.4.7. Pt/PANI-PPy film elektrodun SEM analizi.....	45
3.4.8. Pt/PANI-PPy film elektrodun AFM analizi	45
3.4.9. Pt/PANI-PPy film elektrodun yüzey temas açısı analizi	45
3.5. Pt/PANI-PPy Film Elektrot İle Serbest Enzim Çalışması.....	46
3.6. Biyosensörün Hazırlanması.....	46
3.6.1. Pt/PANI-PPy-GOx biyosensörünün SEM analizi	46
3.6.2. Pt/PANI-PPy-GOx biyosensörünün AFM analizi	47
3.6.3. Pt/PANI-PPy-GOx biyosensörünün yüzey temas açısı analizi	47
3.7. Biyosensörün Duyarlılığının Belirlenmesi.....	47
3.8. Biyosensörün En İyi Çalışma Koşullarının Belirlenmesi	47
3.8.1. pH'nın etkisi	48
3.8.2. Sıcaklığın etkisi	48
3.8.3. Substrat derişiminin etkisi.....	49

	Sayfa
3.8.4. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi	49
3.8.5. Biyosensörün raf ömrünün belirlenmesi	49
3.8.6. Biyosensör üzerine girişim yapan maddeler	50
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	53
4.1. Pt/PANI-PPy Elektrot İçin En İyi Çalışma Koşullarının Araştırılması	54
4.1.1. Çalışma potansiyelin belirlenmesi	54
4.1.2. Anilin derişiminin etkisi.....	55
4.1.3. Pirol derişiminin etkisi	56
4.1.4. Dodesil benzen sülfonat derişiminin etkisi	57
4.1.5. Polianilin için çevrim sayısının etkisi	57
4.1.6. Polipirol için çevrim sayısının etkisi	58
4.2. Serbest Enzim Çalışması.....	60
4.3. Biyosensörün Hazırlanması.....	60
4.3.1. Pt/PANI-PPy-GOx biyosensörünün SEM analizi	61
4.3.2. Pt/PANI-PPy-GOx biyosensörünün AFM analizi	62
4.3.3. Pt/PANI-PPy-GOx biyosensörünün yüzey temas açısı analizi	64
4.4. Biyosensörün En İyi Çalışma Koşulları.....	65
4.4.1. pH etkisi	65
4.4.2. Sıcaklığın etkisi	66
4.4.3. Substrat derişiminin etkisi	67
4.4.4. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliği	69
4.4.5. Raf ömrünün belirlenmesi.....	69
4.5. Biyosensör Üzerine Girişim Yapan Maddeler	70
5. SONUÇLAR.....	73
KAYNAKLAR	75
ÖZGEÇMİŞ	81

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Doping edilmiş bazı konjuge polimerlerin yapıları ve iletkenlikleri.....	15
Çizelge 2.2. İletken polimerlerin kullanıldığı biyosensörler	20
Çizelge 2.3. Enzim sensörlerinin sınıflandırılması	26
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin adları, saflık dereceleri ve temin edildikleri firmalar	39
Çizelge 4.1. Pt/PANI-PPy elektrodunun hazırlanması için en iyi koşullar	60
Çizelge 4.2. Biyosensör üzerine girişim yapan maddeler ve girişim etkileri	71

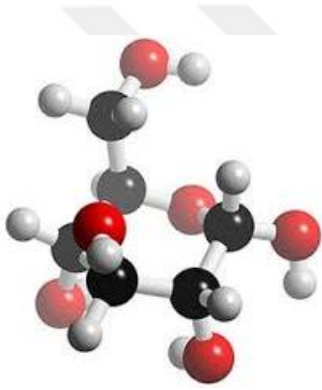
ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. Glukozun yapısı	1
Şekil 2.1. Glukoz oksidaz enziminin yapısında bulunan FAD grubu	7
Şekil 2.2. Glukoz oksidaz enziminin katalizlediği reaksiyon	8
Şekil 2.3. Bir biyosensörün tipik yapısı ve bileşenleri	9
Şekil 2.4. Polimerleşmiş aromatik hidrokarbonların doping reaksiyonları	14
Şekil 2.5. Polianilin'in oluşum mekanizması	18
Şekil 2.6. Polipirölün oluşum mekanizması	19
Şekil 2.7. Enzimin tutuklama yöntemi ile immobilizasyonu	22
Şekil 2.8. Çapraz bağlama ile immobilizasyon	22
Şekil 2.9. Bazı bifonksiyonel reaktiflerin kimyasal formülleri	23
Şekil 2.10. Biyosensör teknolojisinde kullanılan biyoaktif materyal sıralamasında enzimlerin yeri	24
Şekil 2.11. Enzim sensörlerinin genel şematik gösterimi	24
Şekil 3.1. Kaplama ve ölçümde kullanılan hücre sistemi	37
Şekil 4.1. Glukozun glukonik aside yükseltgenmesi sırasında elektrot yüzeyinde gerçekleşen elektron aktarımı	53
Şekil 4.2. Pt/PANI-PPy filmin elde edilme potansiyeli	54
Şekil 4.3. Pt/PANI-PPy elektrodunun hidrojen peroksida duyarlılığına anilin derişiminin etkisi	55
Şekil 4.4. Pt/PANI-PPy elektrodunun hidrojen peroksida duyarlılığına pirol derişiminin etkisi	56
Şekil 4.5. Pt/PANI-PPy elektrodunun hidrojen peroksida duyarlılığına dodesil benzen sülfonat derişiminin etkisi	57
Şekil 4.6. Polianilin'in hidrojen peroksida duyarlılığına çevrim sayısının etkisi	58
Şekil 4.7. Polipirölün hidrojen peroksida duyarlılığına çevrim sayısının etkisi	60
Şekil 4.8. Serbest enzimin aktivitesi üzerine glukoz derişiminin etkisi (pH=7,0 fosfat tamponu, 25 °C)	60

Şekil	Sayfa
Şekil 4.9. Biyosensörün glukoza duyarlılığı (pH=7,0 fosfat tamponu, 25 °C)	61
Şekil 4.10. Pt/PANI-PPy filminin SEM fotoğrafı	61
Şekil 4.11. Pt/PANI-PPy-GOx biyosensörünün SEM fotoğrafı	62
Şekil 4.12. Pt/PANI-PPy filminin AFM fotoğrafı.....	63
Şekil 4.13. Pt/PANI-PPy-GOx biyosensörünün AFM fotoğrafı	63
Şekil 4.14. Pt/PANI-PPy filminin yüzey temas açısı fotoğrafı.....	64
Şekil 4.15. Pt/PANI-PPy-GOx biyosensörünün yüzey temas açısı fotoğrafı.....	64
Şekil 4.16. Biyosensörün glukoza duyarlılığına pH'nın etkisi	65
Şekil 4.17. Biyosensörün glukoza duyarlılığına sıcaklığın etkisi	66
Şekil 4.18. Biyosensörün amperometrik cevabına glukoz derişiminin etkisi	67
Şekil 4.19. Biyosensörün üzerine derişiminin etkisini gösteren Lineweaver-Burk Grafiği	68
Şekil 4.20. Glukoz biyosensörünün kalibrasyon grafiğinin incelenmesi (0,1 M pH=7,5 fosfat tamponu, 25 °C).....	70
Şekil 4.21. Enzimli biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi.....	71
Şekil 4.22. Biyosensörün raf ömrünün incelenmesi	70

1. GİRİŞ

Glukoz ($C_6H_{12}O_6$, MA: 180,16, Erime noktası: 146^0C); yüksek polar, suda kolayca çözünebilen, tek zincirli veya halkalı yapıda bulunabilen 6 karbonlu bir monosakkarittir. Glukoz, bitkilerde bir fotosentez ürünüdür. Doğada serbest ya da diğer maddelerle birlikte bolca bulunur. Ayrıca vücudumuzda kanda ve az miktarda lenf bezlerinde bulunmaktadır. Bu hekzos molekül, L ve D konformasyonlarında bulunabilir. Ancak vücudumuz sadece D-glukozu tanır. Glukoz beyin için tercih edilen enerji kaynağıyken, çok az veya hiç mitokondrisi olmayan hücrelerin örneğin olgun eritrositlerin muhtaç oldukları enerji kaynağıdır [1].



Şekil 1.1. Glukozun yapısı

Glukoz, gelişmiş canlı organizmaların yaşamı için en önemli karbohidratlardan biridir. Hücrelerin enerji kaynağı olmasının yanı sıra proteinlerin üretiminde ve lipid metabolizmasında kullanılan altı karbonlu bir şekerdir. Kandaki glukoz miktarı insülin ve glukagon hormonları ile belli değerde tutulur. Sağlıklı bir insanın kanındaki glukoz derişimi 4,4-6,6 mM olmalıdır [2].

Özellikle insülin hormonu tarafından baskılanan glukoz, bu hormonun yeterli miktarda üretilmediği durumlarda olması gereken derişimin üstüne çıkar. Glukozun kandaki derişiminin yüksek olması günümüzde sıkça karşılaşılan bir hastalık olan diyabete yol açar. Diyabetli hastalarda görme bozuklukları, sinir hasarı, kalp yetmezliği, yaraların geç iyileşmesi gibi rahatsızlıklar gözlenebilir.

Bu bozukluk, halk sağlığını yakından ilgilendirdiği ve ileri dönemlerinde organlarda kalıcı hasarlara hatta ölüme yol açabildiği için kan glukozu sürekli olarak takip edilmelidir [3].

Kan glukoz düzeyine glisemi adı verilir. Normal sınırlardaki glisemiye glisemi, normal sınırın altındaki glisemiye hipoglisemi ve normal sınırın üstündeki glisemiye ise hiperglisemi adı verilir. Kan glukoz seviyesi, glukoz metabolizması ile ilgili bütün metabolik yolların (glikoliz, glikojenoliz, glikojenez, glukoneogenez vb.) koordineli çalışması ve kontrolü ile ayarlanır. Kan glukoz seviyesinin düzenlenmesinde, karaciğer ve hormonların etkisi önemlidir. Kısa süreli açlıklarda, karaciğerdeki glikojenden glikojenoliz sonucu kana glukoz verilirken uzun süreli açlıklarda ise karaciğer tarafından glukoneogenezle kana glukoz verilir [4].

Şeker hastalığı (diabetes mellitus), dünyada yaklaşık 200 milyon insanın etkilendiği bir hastalıktır. Bu hastalığın komplikasyonları, kandaki glukozun sıkı bir takibi ile büyük oranda azaltılabilmektedir. Bu nedenle, milyonlarca diyabet hastası, kandaki glukoz miktarını günlük olarak ölçmektedir. Bu durum glukozu, klinik teşhiste en yaygın test edilen analit yapmıştır [5].

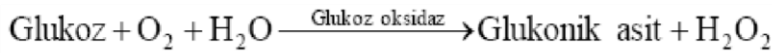
Glukoz oksidaz temelli amperometrik enzim elektrotları, kan şekeri testi için basit, kullanımı kolay sistemler arasında başı çekmektedir ve glukozun devamlı izlenmesinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Bir amperometrik biyosensörün spesifik özellikleri; yüksek oranda immobilize edilen enzimin aktif merkezi ile uygun bir çalışma potansiyelinin uygulandığı bir elektrot yüzeyi arasındaki elektron transfer sürecinin kinetiğine bağlıdır. Yüksek duyarlılık ve hızlı cevap özelliklerine sahip bir amperometrik biyosensör geliştirmenin temel ön koşulu; biyobileşenden elektroda hızlı bir elektron transferini mümkün kılmaktadır [6,7].

Günümüze kadar glukozun tayini için birçok yöntem geliştirilmiştir. Bunlardan ilki Clark ve Lyons tarafından geliştirilen amperometrik glukoz biyosensörüdür ve literatürler de tanımlanan ilk enzim elektrot olma özelliğini taşır [8].

Glukoz tayin metotları kolorimetrik ve enzimatik metotlar olmak üzere iki tanedir. Kolorimetrik metotlar Folin-Wu metodu ve o-Toluidin metodu; enzimatik metotlar ise glukoz oksidaz metodu (enzimatik kolorimetrik metot) ve heksokinaz metodudur (enzimatik ultraviyole metot) [9].

Glukoz oksidaz enziminde (EC 1.1.3.4, β -D-glukoz: oksijen oksidoredüktaz) prostetik grup (aktif merkez) olarak FAD (flavin adenin dinükleotid) bulunur. Glukoz oksidaz enzimi glukozun moleküler oksijen ile yükseltgenip glukono- δ -lakton (glukono-1,5-lakton) ve hidrojen peroksidin (H_2O_2) olduğu reaksiyonu katalizler. Lakton sulu ortamda herhangi bir enzime ihtiyaç duymaksızın hidroliz olarak glukonik aside dönüşür [10].

Reaksiyon aşağıdaki gibidir;



Glukoz tayini gıda işlemleri ve fermentasyonda olduğu kadar klinik, biyolojik ve kimyasal örneklerde de çok önemlidir. Şeker hastalığının izlenmesi ve tıbbi teşhis amacıyla glukoz tayinleri yaygın olarak kullanılmaktadır. 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 [11].

Çalışmamızda glukozu duyarlı yeni bir amperometrik biyosensör hazırlandı. Bunun için sülfürik asitli ortamda anilin ve sonra DBS(sodyum dodesilbenzen sülfonat)li ortamda pirolün elektropolimerleşmesiyle Platin/Polianilin-polipirol (Pt/PANI-PPy) filmi hazırlandı. Hazırlanan bu elektrodun en iyi çalışma koşulları araştırıldı. Daha sonra elektrot yüzeyindeki polianilin-polipirol kaplanmış filme glukoz oksidaz enzimi hapsetme yöntemiyle immobilize edildi. Glukoz tayini enzimatik reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksidin 0,40 V'da yükseltgenmesi üzerinden yapıldı. Enzim elektrodun en iyi çalışma koşulları bulundu ve performansını etkileyen faktörler incelendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enzimler

Bir grup katalitik RNA molekülünü saymazsak enzimlerin tamamı protein yapısındadır. Enzimlerin katalitik aktiviteleri protein konformasyonunun bütünlüğüne bağlıdır. Eğer bir enzim denatüre olursa veya alt birimleri ayrıştırılırsa katalitik aktivitesi genellikle kaybolur. Eğer bir enzim onu oluşturan aminoasitlere parçalanırsa katalitik aktivitesi her zaman kaybolur. Bu nedenle enzim proteinlerinin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapıları onların katalitik aktifliklerinin temelidir [12].

Enzimler, genellikle sentetik veya inorganik katalizörlerden çok daha büyük olağanüstü bir kataliz gücüne sahiptir. Enzimler substratlarına karşı son derece özgüdürler ve kimyasal tepkimeleri olağanüstü derecelerde hızlandırırlar. Ayrıca sulu çözeltilerde, çok ılıman sıcaklık ve pH'larda çalışırlar. Biyolojik olmayan katalizörden birkaçı bu özelliklerin tamamına sahiptir [12].

Çok defa renksizdirler, bazen sarı, yeşil, mavi, kahverengi ya da kırmızı olabilirler. Suda ya da tuz çözeltisinde çözülebilirler. Kuramsal olarak bir enzim belli bir tepkimeye girip bir değişikliğe uğramadan çıktığı için, sürekli olarak aynı türden tepkimelere katılabilir. Ancak gerçekte durum böyle değildir, çünkü enzimlerin de bir ömrü vardır [13].

Doğal olarak yalnız canlılar tarafından sentezlenirler. Hücrelerde organik maddelerin yapılması ve yıkılması, sindirim olayı, kas kasılması, hücre solunumu gibi önemli fizyolojik faaliyetler ve çeşitli metabolizma reaksiyonlarının sonucudur ve bütün bu reaksiyonların tümü enzimlerin katalitik etkisi ile mümkün olmaktadır. Bu sebeple yaşam birçok enzim reaksiyonlarının bir araya gelmesinden ibaret olan bir sistem olarak tanımlanmıştır [12-16].

Enzimlerin miktarı, aktiviteleri esas alınarak belirlenir ve enzim ünitesi (E.Ü) cinsinden verilir. Birkaç farklı türde enzim ünitesi tanımı olmasına rağmen genelde 25 °C'de ve optimal şartlarda 1 mikromol substratı 1 dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiştir.

Spesifik aktivite, 1 mg protein başına düşen enzim ünitesi olarak tanımlanır ve bu da enzimin saflığının bir ölçüsüdür [12,14].

Enzimin, reaksiyonun aktivasyon enerjisini düşürerek, substratı ürüne çevirmesine katalitik etki denir. Aktivasyon enerjisi, kimyasal bir reaksiyonun gerçekleşebilmesi için aşılması gereken enerji değeridir. Enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonların hızı katalizlenmeyen reaksiyonlara göre 10³-10⁸ kat daha fazladır. Her enzim molekülü saniyede 100-1000 arası substrat molekülünü ürüne çevirebilir [17].

Enzimlerin en önemli özelliklerinden birincisi, katalizledikleri reaksiyon tiplerine ve ürüne dönüştürdükleri substratlara karşı son derece spesifik olmalarıdır. Bundan dolayı enzimler hücre içinde reaksiyonların hatasız ve hiçbir yan ürün oluşturmada yürümelerini sağlarlar. İkincisi ise laboratuvar şartlarında gerçekleşmesi çok zaman alan ve birçok basamağa ihtiyaç duyan, bazen de yüksek sıcaklık, yüksek basınç, aşırı bazik ve asidik ortam gerektiren reaksiyonların, enzimler sayesinde hücre içi şartlarda birkaç saniye gibi çok kısa bir zamanda meydana gelmesini sağlayan katalizleme güçleridir [18-20].

Üreaz, pepsin gibi bazı enzimler katalizleme fonksiyonlarını yalnız protein yapılarıyla yerine getirebilirken, bazıları da protein yapısında olmayan 'kofaktör' adı verilen gruplara ihtiyaç duymaktadır. Katalitik olarak aktif olan enzim-kofaktör kompleksine holoenzim adı verilir. Kofaktörler organik veya inorganik olmak üzere ikiye ayrılır. Organik kofaktörlere koenzim, inorganik kofaktörlere metal iyonu adı verilmektedir. Gerek organik gerekse inorganik kofaktörler enzime kuvvetli veya gevşek bağlanabilmektedirler. Organik kofaktör enzime sıkıca bağlandığında prostetik grup, gevşek bağlandığında ikinci substrat olarak isimlendirilirken; metal iyonu kuvvetli bağlandığında metalloenzim, gevşek bağlandığında iyonik aktivatör olarak ifade edilir [21].

İnsanlar gerçekte binlerce yıl öncesinden bu yana enzimlerden yararlanmışlardır. Örneğin; alkol fermentasyonu, bira ve ekmek yapımı gibi işlemler ilk biyoteknolojik çalışmalar olarak tanımlanabilir.

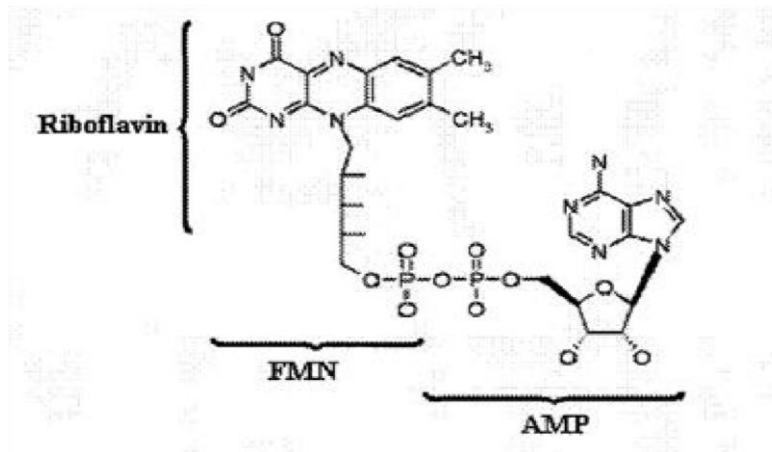
Buna karşılık enzimler hakkında bilimsel denebilecek araştırma ve bulgular ancak geçtiğimiz yüzyılda görülmeye başlanmıştır. 1783 yılında Spallanzani'nin atmaca mide suyunun eti çözebileceğini bulması, 1811 yılında Kirrchoff'un buğday nişastasının

zamanla dekstrin ve diğer bileşiklerine dönüştüğünü belirlemesi enzimoloji konusundaki ilk çalışmalar olarak gösterilebilir [22].

2.2. Glukoz Oksidaz Enziminin Özellikleri ve Glukoz Tayininin Önemi

Glukoz Oksidaz (GOD) enziminin aktivitesi ilk defa 1904'de Maksimow tarafından *Aspergillus Niger*'de saptanmıştır. Enzimin oksidatif etkisi olduğunu belirleyen Müller (1928), saflaştırılan enzimin sahip olduğu sarı rengin, bünyesindeki prostetik gruptan (flavin adenin dinükleotid, FAD) kaynaklandığını öne sürmüştür. Keilin ve Hartree (1948) oksidasyonun FAD tarafından gerçekleştirildiğini; enzimin açığa çıkardığı H_2O_2 ile antimikrobiyal aktivite gösterip antibiyotik olarak davrandığını belirlemişlerdir [23].

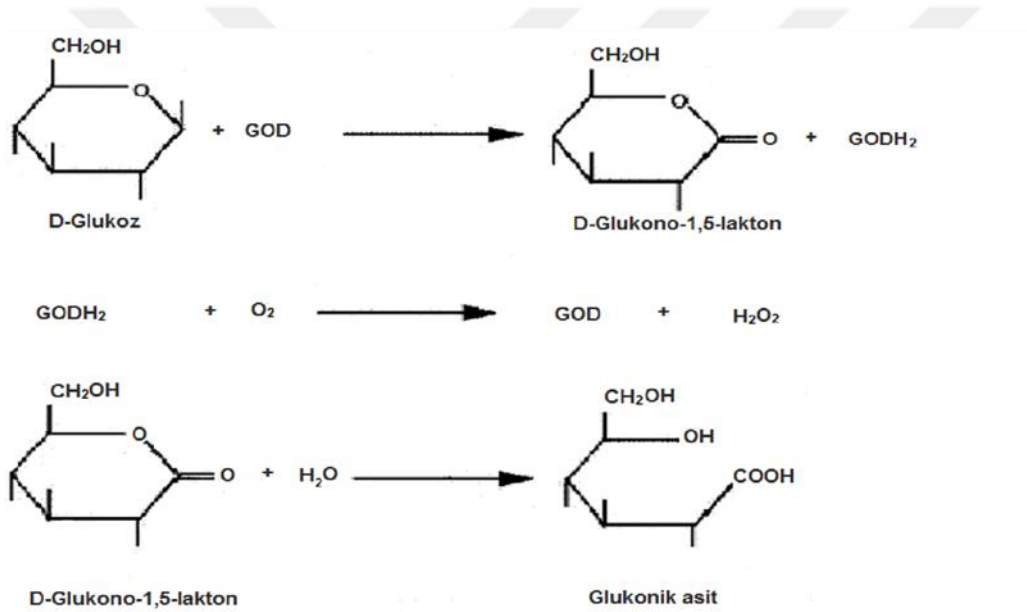
Glukoz oksidaz, moleküler kütlesi ve kaynağına bağlı olarak 120 kDa ila 290 kDa arasında çeşitlilik gösteren, dimerik veya tetramerik bir proteindir. *Aspergillus niger* kaynaklı GOD enzimleri ise molekül kütlesi 150 kDa ila 186 kDa arasında değişen, dimerik bir proteindir. Yapısının her monomerinde kofaktör olarak flavin adenin dinükleotit (FAD, şekil 2.1) bulunur. Bir enzim molekülünde tam olarak iki FAD bağlanma bölgesi vardır. FAD olmaksızın gerideki apo enzim biyolojik aktivite gösteremez. Ama doğal veya yapay olarak modifiye FAD kofaktörü tekrar apo enzim molekülüne bağlanabilir. Kaynağına ve türüne bağlı olarak enzim molekülü % 10-24 aralığında değişim gösteren karbohidrat bileşimine sahiptir. Karbohidrat birimlerinin yaklaşık %80'ini mannoz birimi oluşturur. Mannoz Asparagin(Asn), Treonin(Thr) ve Serin(Ser) artıkları üzerinden N ve O atomlarına bağlıdır [24-29].



Şekil 2.1. Glukoz oksidaz enziminin yapısında bulunan FAD grubu

FAD'nin indirgenme özelliği riboflavin molekülünün indirgenmesi esasına dayanır. FAD elektron akseptörü olarak davranarak glukozu yükseltir; ardından moleküler oksijeni indirgeyerek hidrojen peroksit oluşturur ve kendisi tekrar oksitlenmiş formuna dönüşür [30].

GOD'nin glukozu glukonik aside oksitlediği reaksiyon şekil 2.2'de görülmektedir. Reaksiyon flavoenzimin önce indirgendiği ve sonra da yükseltgenmesinin meydana geldiği iki basamak üzerinden yürür. İndirgenme yarı basamağında glukoz 2 proton ve elektronu enzime aktararak glukonolaktona dönüşür. Yükseltgenme yarı basamağında ise enzim moleküler oksijen ile yükseltgenir ve hidrojen peroksit oluşur [31].



Şekil 2.2. Glukoz oksidaz enziminin katalizlediği reaksiyon

Şekil 2.2.'de verilen tepkime Glukoz oksidaz enziminin bünyesinde bulunan FAD grubu üzerinden yürümektedir.

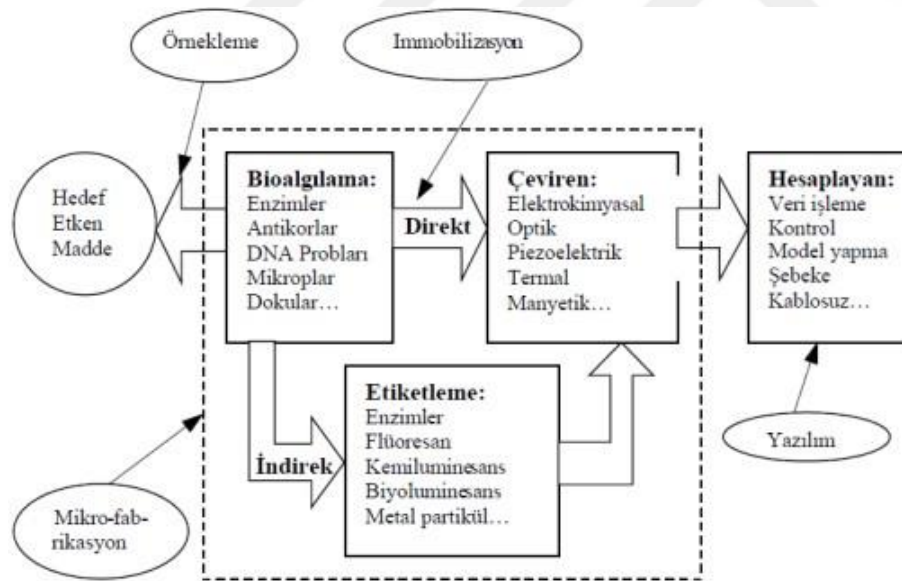
Glukoz oksidaz, glukoz tayininde analitik reaktif olarak, özellikle biyosensör uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Dünya çapında nanoteknoloji alanında, bu tip biyosensör çalışmalarının uygulanabilirliği, özellikle diyabetikler için glukoz sensörü olarak ince elektrotlar geliştirildiğinden beri çok fazla artmıştır. Başta vücut sıvılarında olmak üzere, içeceklerde (bira, şarap, kolalı içecekler, gazlı içecekler ve meyve suları vb.) ve diğer bazı gıdasal ürünlerde, glukoz tayini glukoz biyosensörleri kullanılarak yapılmaktadır [29].

2.3. Biyosensörler

Genel olarak biyosensör; biyolojik, kimyasal veya biyokimyasal sinyali ölçülebilir ve işlenebilir elektriksel sinyale dönüştürebilen, kimyasal veya fiziksel transdüser ile birleştirilmiş biyolojik algılama materyali içeren bir cihaz veya enstrümandır [32].

Klinik elektrokimya ile sadece anyon ve katyonları belirleyen sensörler hazırlanabilirken sisteme biyomateryalin de katılması ile diğer birçok organik ve biyolojik maddenin tayini mümkündür. Böylece hazırlanan analiz sistemlerine biyosensörler adı verilir [33].

Biyosensör terimi farklı şekillerde kullanılmaktadır. Ancak genellikle bir biyosensör biyolojik veya kimyasal etken bir maddeye seçici olarak, hızla ve sürekli şekilde reaksiyon göstermeli, biyoaktif veya bir biyoalgılama materyali içermelidir, bu materyal ilgi duyulan türdeki maddeleri ya da bir analiti tanımalı, biyoalgılama materyali bir transdüser adı verilen aygıtla yakın temas içindedir.



Şekil 2.3. Bir biyosensörün tipik yapısı ve bileşenleri

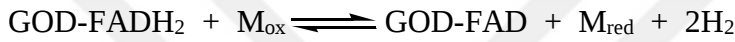
Biyosensörde kullanılan transdüser, elektrokimyasal (voltametri, amperometrik, potansiyometrik, iletken, kapasitif, impedans olanlarda dahil), optik (emilim, yüzey plazmon rezonans, kimyasal ışıldama (kemiluminesans), biyolojik ışıldama (biyoluminesans), floresans, optik fiber olanlar da dahil), piezoelektrik (kuartz kristal mikrobals, yüzey ses (akustik) dalgası), kalorimetrik, manyetik ve diğerleri olabilir.

Biyalgılama materyali, transdüserle tespit edilebilir sinyal gönderir, label free biyosensör oluşturmak için transdüserle doğrudan bağı olabilir [32].

Clark ve Lyons'un geliştirdiği birinci nesil biyosensörlerde elektron alıcı olarak oksijen kullanılırken, ikinci nesil biyosensörlerde elektron alıcı olarak redoks mediyatörleri kullanılmaya başlanmıştır [22].



GOD = Glukoz oksidaz



$\text{M}_{\text{red}} = \text{M}_{\text{ox}}$ = redoks mediyatörü

Üçüncü nesil biyosensörlerde enzimin redoks merkezi ile elektrot yüzeyi arasında direkt elektriksel iletişim sağlanmış ve redoks mediyatörlerine gereksinim kalmamıştır [22].

Biyosensörlerde biyobileşen olarak enzimler yanında doku kültürleri, mikroorganizmalar, organeller, antikorlar ve nükleik asitler de kullanılabilmekte olup ölçüm tekniğine göre amperometrik, potansiyometrik, termal, piezoelektrik, optik sensörler olarak adlandırılmaktadırlar [22].

Biyosensörlerin yüksek spesifikklik yanında; renkli ve bulanık çözeltilerde geniş bir derişim aralığında ölçüme olanak sağlamak gibi üstünlükleri vardır. Fakat biyobileşenlerin pH, sıcaklık, iyon şiddeti gibi ortam koşullarından etkilenmesi biyosensörün kullanım ömrünü kısalttığından bir dezavantajdır [22].

2.3.1. Biyosensörlerin tarihi, gelişimi ve uygulama alanları

Biyosensörlerin tarihi 50'li yılların ortalarında Clark'ın Cincinnati Hastanesi'nde (Ohio, ABD) ameliyat sırasında kanın O_2 miktarını bir elektrot ile izlemesiyle başlar. 1962 yılında Clark ve Lyons Glukoz oksidaz (GOx) enzimini O_2 elektrodu ile kombine ederek kanın glukoz düzeyini ölçmeyi başardılar. Böylece yeni bir analitik sistem oluştu. Bu sistem bir yandan biyolojik sistemin yüksek spesifikkliğini (enzim) diğer taraftan ise fiziksel sistemin

(elektrot) tayin duyarlılığını birleştirmiş ve geniş spektrumlu bir uygulama olanağı bulmuştur.

Biyosensörlerin önemli uygulaması, öncelikle klinik teşhisler üzerine gerçekleşmiştir. Glukoz sensörler, günümüzde bile en başarılı ve en geniş kapsamlı olanlarıdır. Daha sonra, biyosensör teknolojisi kan örneklerinin analizinde, bulaşıcı hastalıkların teşhisinde ve ilaç taramasında uygulanmıştır. Bunun ötesinde, biyosensörler, tarımsal üretim, gıda analizi ve çevresel izlemenin yanında madencilik, biyoişlem, biyosavaş ve ülke güvenliği alanlarında biyolojik ve kimyasal etken maddelerin tespitinde benimsenmiştir. Son on yılda, biyosensörler üzerine araştırmalar hem bilimsel hem mühendislik gibi birçok disiplinde yoğun şekilde sürdürülmüştür. 40 yıllık bir gelişimden sonra, biyosensörler biyospesifik etkileşimleri izleme ve biyolojik ve kimyasal etken maddeleri tüm alanlarda tespit etme noktasında daha güçlü cihazlar ve enstrümanlar haline gelmiştir [32].

2.3.2. Biyobileşenler

Biyosensörlerin yapısında görev alan biyobileşenler çoğu kez biyoreseptör olarak da adlandırılırlar. Biyobileşenler içinde en yaygın kullanılanlar enzimler ve antikorlardır [22].

Enzimler, mikroorganizmalar, organeller, doku kesitleri, antikorlar ve nükleik asitler ve biyolojik membranlar içine yerleşmiş kimyasal reseptörler, sensörlerde biyobileşen (biyoreseptör) olarak kullanılırlar. Biyoreseptörler analizlenecek maddeyi dönüşüme uğratarlar ve bu dönüşüme eşlik eden değişimler dönüştürücü tarafından algılanır. Yüksek spesifikliklerinden dolayı enzimler en yaygın kullanılan biyoreseptörlerdir. Uygun bir enzimin bulunamaması veya enzimin kararsız olması ve birden çok sayıda maddenin tayini durumlarında hücre sistemleri ve tercihen mikroorganizmalar kullanılır. Mikroorganizmalar değişik reseptör davranışları gösterirler ve biyolojik oksijen gereksinimi (BOİ), toksisite ve mutajenite testlerinde başarı ile kullanılmaktadırlar [22].

2.3.3. Dönüştürücüler (Transduserler)

Dönüştürücüler biyokimyasal sinyali elektronik sinyale çevirir. Ölçülen elektriksel sinyal analit derişimiyle orantılıdır. İlgili türlerin biyokimyasal etkileşiminin doğasına göre uygun bir dönüştürücü sistem seçilmelidir. Fiziksel dönüştürücüler elektrokimyasal,

spektroskopik, termal, piezoelektronik ve yüzey akustik dalga teknolojisi olarak çeşitlendirilebilir.

Dönüştürücüler dört grupta toplanabilir;

1) Elektrokimyasal dönüştürücüler

- Amperometrik esaslı
- Potansiyometrik esaslı
- Kondüktometrik esaslı

2) Optik dönüştürücüler

- Absorbans ölçümünü temel alanlar
- Floresans veya fosforesans ölçümünü temel alanlar
- Kırılma indisini temel alanlar

3) Kütle değişimini temel alan dönüştürücüler

4) Isı değişimini temel alan dönüştürücüler

- Termistörler [34]

2.4. İletken Polimerlerle Dönüştürücü Hazırlanması

2.4.1. İletken polimerler

Polimer, monomer denen küçük moleküllü yapıların polimerizasyon tepkimesi sonucu yan yan gelerek oluşturdukları büyük mol kütleli, uzun zincirli yapılara denir. Polimerler metallerle kıyaslandığında, polimerlerin genellikle metallerden daha hafif ve ucuz olduğu, kolay şekil alabildiği fakat iletken olmadıkları göze çarpmaktadır. Metallerin ise zor işlenebilen, ağır, pahalı olmalarının aksine iletkenlikleri yüksek maddeler olduğu bilinmektedir. Polimerler ile metallerin üstün özellikleri bir araya getirilerek iletkenlik özelliği taşıyan polimerlerin elde edilmesi mümkün olmuştur. Bu amaçla hazırlanan polimerler, iletken polimerler olarak isimlendirilmiştir [35].

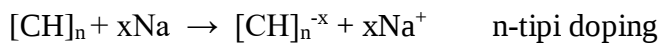
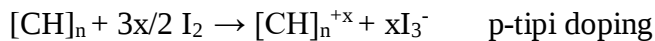
İletken polimerler konusundaki çalışmalar 1950'lerde başlamıştır. İletkenlikleri oda sıcaklığında 10-5 S/cm olan yarı iletken polimerler 1950-1960 yılları arasında üretilmiştir. Günümüzdeki anlayışa uygun iletken polimerler 1970'lerin sonunda ortaya çıkmaya başlamıştır. Shirakawa yöntemiyle üretilen poliasetilenin yükseltgen ile dop edilmesi sonucunda iletkenliğinin 108 kat arttırıldığı görülmüştür [36].

İletkenlik konusunda en önemli adım 1979'da Diaz'ın pirolü elektrokimyasal yöntemle yükseltgeyerek polipirolü üretmesiyle atılmıştır. Polipirol anot üzerinde üretilmiş ve güçlü bir film olarak yüzeyden çıkarıldığında iletkenliği 100 S/cm'ye ulaşabilmiştir. Benzer şekilde, elektro yükseltgenme yöntemiyle iletken politiyofen anot üzerinde üretilmiştir [37].

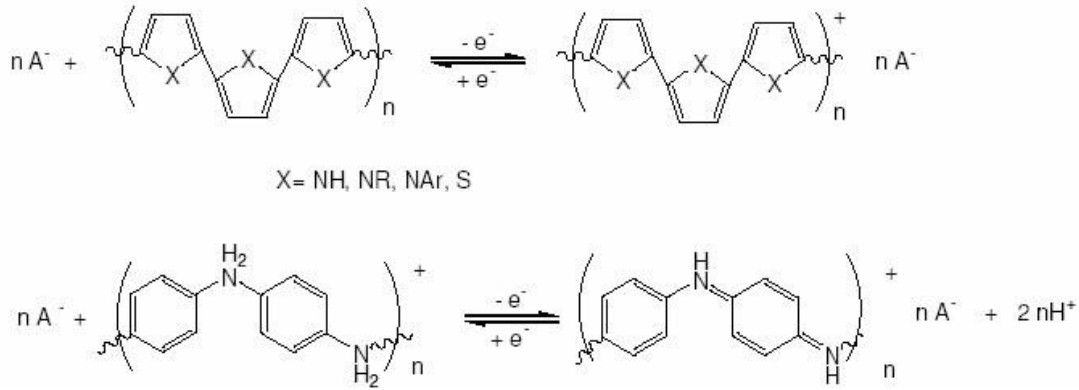
Analitik kimya ve biyosensör alanlarında iletken polimerler ile çalışan pek çok araştırmacı vardır. Yeni ve ilginç özellikler sunan bu maddelere yaygın olarak kullanılan elektrotların yüzey modifikasyonları için farklı imkanlar oluşmakta ve elektrokataliz, membran ayırmaları ve kromatografi alanlarında uygulanmaktadır. Aynı zamanda kimyasal ve biyokimyasal sensör üretiminde de yeni teknolojik imkanlar oluşmaktadır [38-39].

2.4.2. Doping

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



Böylece polimerler dop edilerek tuza dönüşür. Fakat I_3^- ya da Na^+ iyonları yok edilemez. Bu iyonlar polimerde hareketli yük taşıyıcılar olur.



Şekil 2.4. Polimerleşmiş aromatik hidrokarbonların doping reaksiyonları

Poliparafenilen, polianilin, polipirol, politiyofen gibi değişik özellikteki başka polimerler de keşfedilmiştir. Bu polimerler genellikle poliasetilenen daha düşük iletkenlik göstermiştir yine de birçok amaç için yeterli bir iletkenliktir. Ayrıca yüksek kararlılık ve işlenebilirlik açısından avantajlıdır.

Konjuge pi elektronunun genel özellikleri düşük iyonizasyon potansiyeli, yüksek elektron afinitesi, polimere transfer enerjisinin düşük olmasıdır. Genellikle polimerler çoğu saf haliyle bu özellikleri gösterir. Bu özellikleri gösteren polimerlerin iletkenlikleri yaklaşık 10^{-12} S/cm ya da daha düşüktür ve yalıtkan özellik gösterirler. İletkenlik, taşıyıcı derişimi ve taşıyıcının mobilitesine bağlıdır.

Konjuge polimerlerde taşıyıcıların derişiminin yükselmesi doping ile sağlanabilir. Doping yöntemi, ya elektron alıcı kullanarak yükseltgenme ya da elektron verici kullanarak indirgenme gerektirir. İlk olarak polimerden bir elektron uzaklaşır ve katyon ya da boşluk oluşur. Karşıt anyon, termal enerji ile boşluğu geçebilirse polimere doğru hareket eder ve iletkenliğe katkıda bulunur.

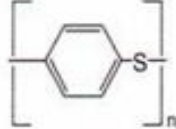
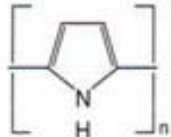
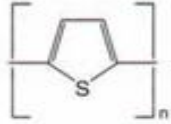
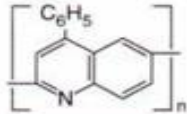
Doping yöntemi, polimer filmlerin ya da polimer tozların, gaz veya çözelti dopantlara ya da elektrokimyasal etkiye maruz kalmasını gerektirir. Elektron alıcılarının çoğu konjuge polimerlerin yükseltgenmesinde kullanılabilir.

Dopantlar güçlü indirgen veya yükseltgen maddelerdir. Kolaylıkla iyon oluşturabilen inorganik tuzlar veya bileşikler, nötral moleküller, organik ve polimerik dopant olabilirler. İletken polimerlerin kararlılığında dopantların yapısı önemli bir etkindir. Bazı polimerlerde elektron eklenmeden ya da uzaklaştırılmadan protonlama ile doping olabilir.

Protonlama ile iletken emeraldine tuzu oluşur. Emeraldine tuzu, leucoemeraldine bazının yükseltgenmesiyle de oluşabilir.

Doping'in özet olarak açıklaması şöyledir; polimer zincirine elektron eklenir ya da kopartılır. Bu işlemden sonra kullanılan dopant iyonlarının etkisi ihmal edilebilir. Hem yüksek derecede iletken olan metaller hem de zayıf dopant türlerinde bu hipotez güvenilirdir. Bu varsayım, yüksek yoğunluğa sahip pi elektron modellerinin ideal dopantlar olduğunu gösterir [40].

Çizelge 2.1. Doping edilmiş bazı konjuge polimerlerin yapıları ve iletkenlikleri

Polimer	Yapısı	Doping Metodu	İletkenliği (Scm^{-1})
Poliasetilen		Kimyasal Elektrokimyasal (AsF_5 , I_2 , Li, K)	$500 - 1,5 \times 10^5$
Polifenilen		Kimyasal (AsF_5 , Li, K)	500
Poli(fenilen sülfür)		Kimyasal (AsF_5)	1
Polipirol		Elektrokimyasal	600
Politiyofen		Elektrokimyasal	100
Poli(fenil-kinolin)		Elektrokimyasal, Kimyasal (sodyumnaftalür)	50

Çizelge 2.1'de çeşitli metotlar ile dop edilmiş bazı iletken polimerlerin iletkenlik değerleri verilmiştir.

2.4.3. Elektrokimyasal polimerizasyon

Elektrokimyasal yöntem, iletken polimer sentezinde eskiden beri bilinen bir yöntem olup, değişik tekniklerle beraber günümüzde de sıkça uygulanmaktadır. Bu metotta, monomer uygun bir çözücü veya destek elektrolitle beraber polimerleşme hücresine konularak yapılan elektroliz sonucunda, elektrot yüzeyinde veya çözeltide polimer elde edebilmektedir.

Polimerleşme hücresi genellikle, çalışma, karşıt ve referans elektrottan oluşan üç elektrotlu bir sistemdir. Hücre içine konulan sulu veya susuz ortamdaki monomer çözeltinin, dönüşümlü voltametri (CV) tekniği ile uygun bir voltamogramı alınarak sabit akım ve sabit potansiyelde polimerleşme gerçekleştirilmektedir. Burada dikkat edilmesi gereken nokta, monomerin yükseltgenme veya indirgenme potansiyelinde çözücü olarak destek elektrolit ve elektrotların reaksiyon vermemesidir.

Monomerin indirgenmesi veya yükseltgenmesi ile oluşan radikal anyon veya radikal kation zinciri büyümekte ve bunlar da iletken polimer zincirleri oluşturmaktadır. Elektrokimyasal polimerleşmede kontrollü potansiyel veya akım uygulanması (sabit potansiyel ve sabit akım elektroliz), başlangıcı ve bitiş basamaklarının kontrol edilebilmesi gibi üstünlükleri vardır. Bu yüzden kimyasal yöntemle göre daha saf, yan ürünlerden ve kirlilikten arınmış ürünler elde etmek mümkündür [41].

Elektroindirgenme yönteminin en büyük dezavantajı, polimerin yalıtkan formunda elde edilmesidir ki bu durum, elektrodun pasifleşmesine yol açar ve polimer filminin elektrot yüzeyinde birikerek kalınlaşmasını sınırlar. Elektroyükseltgenme ile sentezlenmiş polimerler, genellikle, kimyasal veya elektroindirgenme yolu ile sentezlenmiş polimerlere göre daha iyi özellikler gösterirler. Yükseltgenme elektropolimerizasyonu yönteminin avantajları sıralanacak olursa;

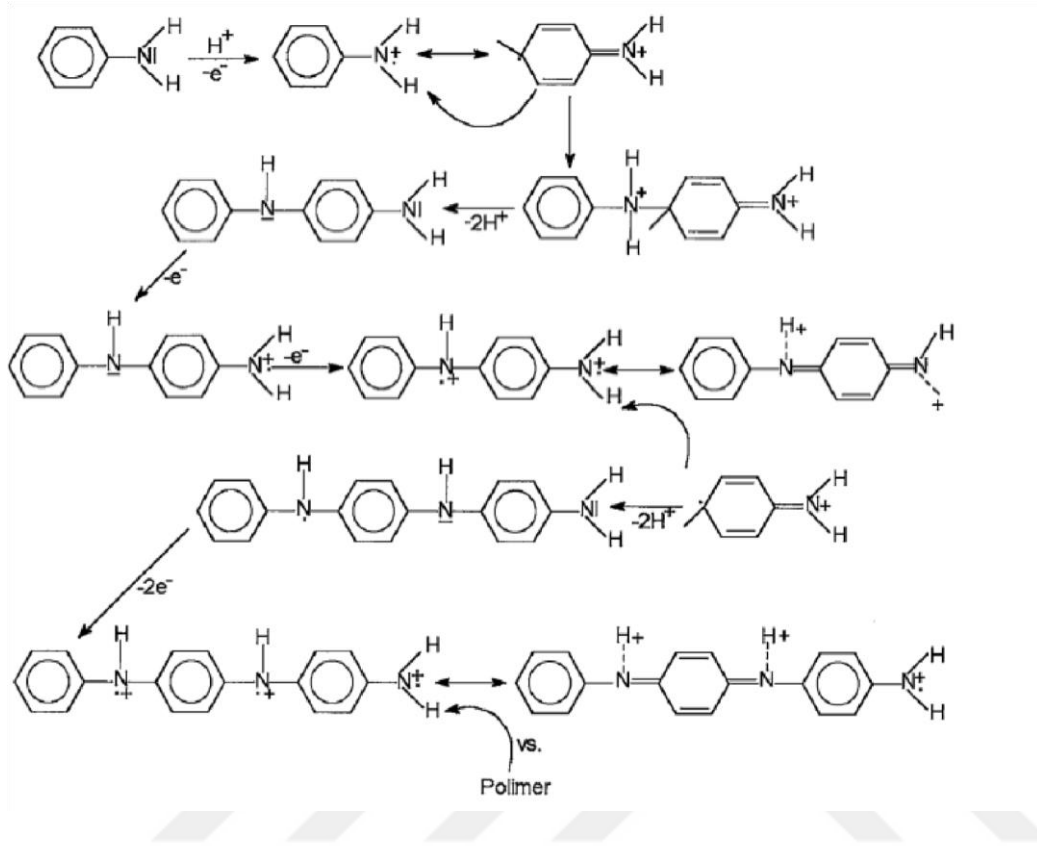
- 1) Yüksek elektroaktifliğe sahip iletken polimerler, bir elektrot yüzeyinde kolayca oluşturulabilir.
- 2) Uygulanan potansiyel, polimerleşme zamanı ve tarama hızı yardımıyla, film kalınlığı, morfolojisi ve iletkenliği kolayca kontrol edilebilir.

- 3) Polimerizasyon yönteminin ve elektrokimyasal/spektroskopik tekniklerle, iletken polimerlerin özelliklerinin incelenmesine olanak sağlar [42].

2.4.4. Elektrokimyasal polimerleşme mekanizması

Polianilinin sentezinde kullanılan birçok yöntem, değişik özellikte ve yapıda ürünler vermektedir. Genellikle polimerizasyon işleminde monomerin radikal bir katyonu, bir diğer radikal katyon ile iki proton ayrılması sonucu bir dimer oluşturmaktadır. Monomerin yükseltgenmesi için gerekli olan voltajda, ortamda bulunan dimer ya da oligomerler de yükseltgenir ve bunlar, anilin zinciri oluşturmak üzere daha sonra monomerin radikal katyonu ile tepkimeye girerler. Genies ve Arkadaşları (1985) ve Syed ve Sinesan (1991)'in bildirdiğine göre Mohilner ve Arkadaşları (1962); Bretienbach ve Heckner (1971); Hand ve Nelson (1974), anilinin elektropolimerizasyonu için mekanizma önermişlerdir. Önerilen mekanizmalardaki ortak radikal şekil 2.5'de görüldüğü gibi, üç farklı rezonans formu verir. Bretienbach ve Heckner (1971), tarafından asidik ve bazik ortamda anilinin anodik yükseltgenmesi için iki mekanizma rapor edilmiştir. Mohilner ve Arkadaşları (1962), asidik ortamda önerilen mekanizmanın, başlangıçtaki yük transfer adımı için kinetik parametrelerin ölçülmesine ve anot üzerinde oluşan çökeğin infrared çalışmalarındaki özellikleriyle direkt olarak karşılaştırılmasına dayandığını açıklamışlardır. Elde ettikleri deneysel bulgular ışığında, anilinin elektrokimyasal yükseltgenmesinde paminodifenilaminin bir ara ürün olarak oluştuğunu önermişlerdir. Onlar, paminodifenilaminin elektrokimyasal yükseltgenmesinin anilinden daha kolay olduğunu göstermişlerdir. Asetonitril-piridin gibi bazik bir ortamda anilinin polimerizasyon mekanizması, daha önce asidik ortamda önerilen mekanizmaya oldukça benzemektedir.

Polianilinin oluşum mekanizması şekil 2.5' de verilmiştir [43].

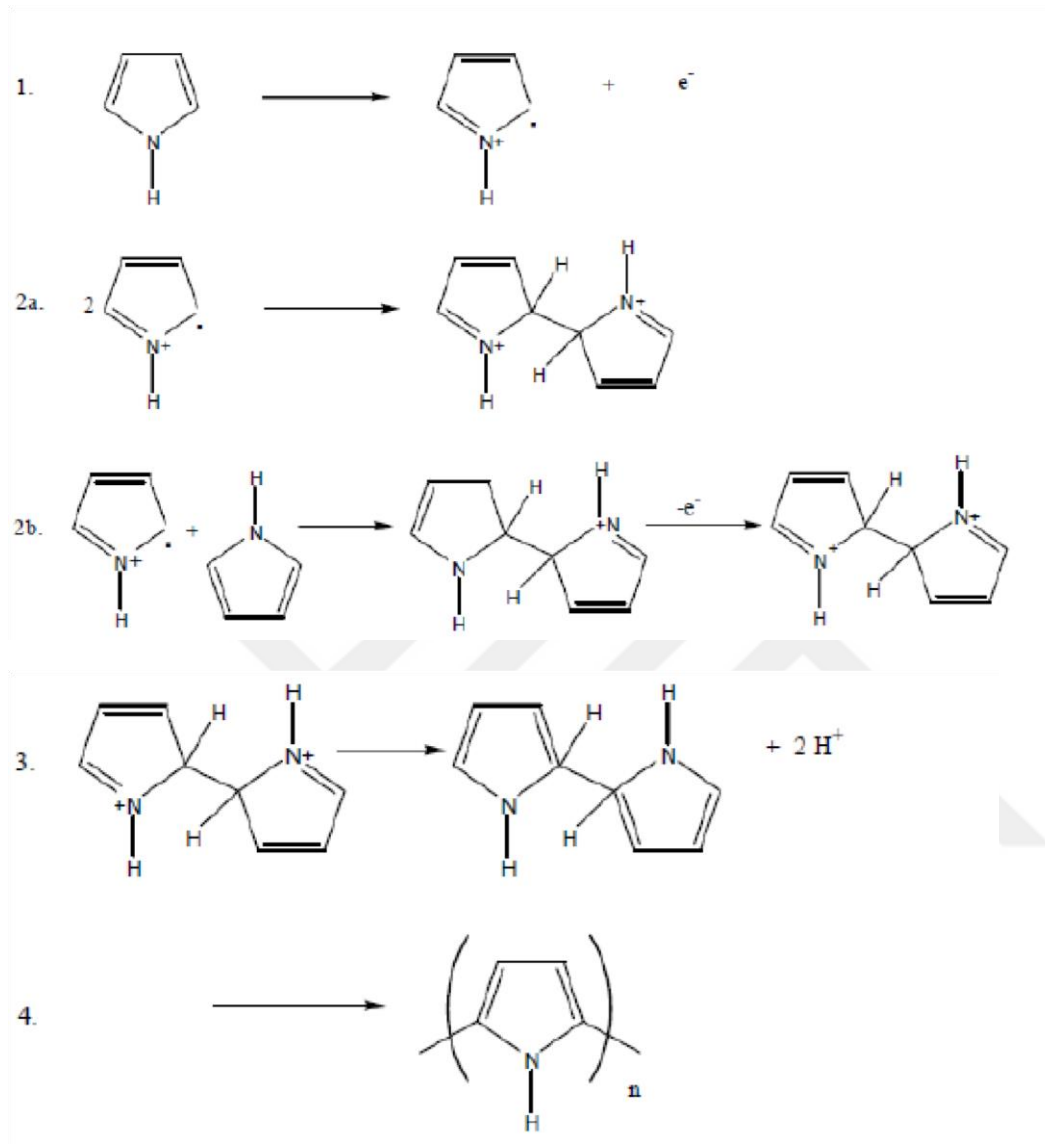


Şekil 2.5. Polianilinin oluşum mekanizması

Polipirol (PPy), pratik uygulamalara yönelik diğer iletken polimerler ile kıyaslandığında bazı avantajlara sahiptir ve daha fazla çalışılmıştır. Elektronik iletkenliği diğer polimerlere oranla daha yüksektir, elektrokimyasal ya da kimyasal yolla kolayca sentezlenebilir, elde edilen ürünün termal kararlılığı ve mekanik özellikleri oldukça iyidir. Bu avantajlarından dolayı çok geniş bir uygulama alanına sahiptir. Polipirol (PPy) filmler, pirolün kimyasal ya da elektrokimyasal oksidasyonu ile kolaylıkla sentezlenebilirler fakat kolaylıkla çözülerek ya da eritilerek biçimlendirilemiyor olması bir dezavantajdır. Polipirolün doğrudan ya da polipirol esaslı kompozitlerinin demir ya da nitrik asit ile muamele edilmiş çelik üzerine adhezyonu oldukça kuvvetlidir ve korozyona karşı koruyabilecek niteliktedir.

Elektronik iletken polipirol filmlerinin oluşumu anodik olarak asetonitrilin yükseltgenmesiyle ilk olarak Diaz tarafından yapılmıştır. Pirolün elektropolimerizasyonu filmlerin hem potansiyostatik (potansiyele karşı) hem de galvanostatik (akıma karşı) yükseltgenme monomeri radikal katyon türleri üretir, bunlarda oldukça reaktiftir.

Polipirolün oluşum mekanizması şekil 2.6’ da verilmiştir.



Şekil 2.6. Polipirolün oluşum mekanizması

2.4.5. İletken polimerlerle enzim immobilizasyonu

İletken polimerler elektrotların elektroanalitik uygulamalarında, enzim immobilizasyonuna sıklıkla rastlanmaktadır.

Enzimler tek başlarına iken zayıf iletkendir, çünkü redoks merkezleri kalın bir protein tabakasıyla çevrelenerek yalıtılmıştır. İletken polimerler ise bu tabakadan işleyerek redoks merkezleri ile elektrot yüzeyi arasında direkt elektriksel iletkenlik sağlayabilirler [44].

Çizelge 2.2. İletken polimerlerin kullanıldığı biyosensörler

Substrat	Enzim	Polimer	Tayin yöntemi
D-Alanin	D-Aminoasit oksidaz	Polipirol	Amperometri
Atrazin	Tirosinaz	Polipirol	Amperometri
Kolesterol	Kolesterol oksidaz	PPD	Amperometri
	Kolesterol oksidaz ve Kolesterol esteraz	Polipirol	Amperometri
Kolin	Kolin oksidaz	Polipirol	Amperometri
Dopamin	Tirosinaz	Polipirol	
Katekolamin			
Galaktoz	Galaktoz oksidaz	Polianilin	Amperometri
Glutamat	Glutamat	Polipirol	Amperometri
	Dehidrojenaz	Polipirol	Amperometri
Fruktoz	Fruktoz dehidrojenaz	Polianilin	Kondüktometri
Hemoglobin	Pepsin	Polipirol	Amperometri
Hidrojen peroksit	Peroksidaz	Polianilin	
		PPD	Amperometri
L-Laktat	Laktat oksidaz	Polianilin	Kondüktometri
Lipitler	Lipaz	Polipirol	Amperometri
NADH	NADH dehidrojenaz	Polipirol	Amperometri
Fenoller	Tirosinaz	Polipirol	Amperometri
Üre	Üreaz	Polianilin	Potansiyometri
			Kondüktometri
Ürik asit	Ürikaz	Polianilin	Amperometri
Trigliseritler	Lipaz	Polianilin	Kondüktometri

2.5. Biyobileşen İmmobilizasyonu

Biyosensörler, farklı özellikteki iki elemanın (dönüştürücü ve biyoreseptör) kombinasyonu ile oluşurlar. Uygun biyoreseptör ve dönüştürücü seçildikten sonra bunların birbirine bağlanması aşılması gereken en önemli sorundur.

Bu bağlama işlemi biyoreseptör immobilizasyonu olarak tanımlanır. Bağlama işleminde çok farklı yöntemler kullanılabilir. Hangi yöntemin kullanılacağı seçilen dönüştürücü ve biyoreseptöre göre belirlenir [45].

Biyosensör immobilizasyonunda başlıca dört yöntem kullanılmaktadır. Bunlar kovalent bağlama, adsorbiyon, çapraz bağlama ve tutuklama yöntemidir. Taşıyıcıya bağlamada bir protein olan enzim molekülünün yapısından faydalanılır. Molekül yapısındaki fonksiyonel gruplar, iyonik gruplar ve hidrofobik bölgeler bu bağlanmada rol alırlar.

2.5.1. Kovalent bağlama

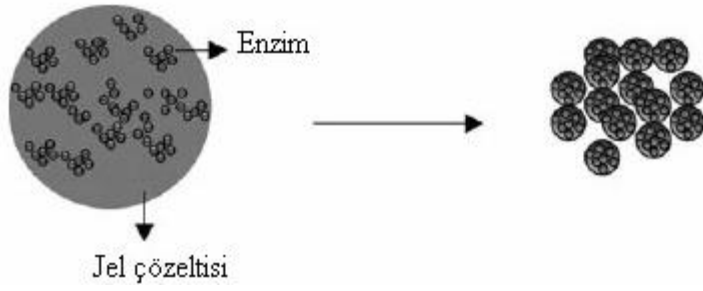
Kovalent bağlama ile immobilizasyon, destek yüzeylerde uygun bir yöntemle etkin bölgeler oluşturarak enzim molekülleri ile destek yüzeyler arasında kovalent bağ oluşturur. Kovalent bağlanma genellikle enzimin yapısının ve fonksiyonel gruplarının bilindiği durumlarda kullanılır. Kovalent bağlanma yönteminin en büyük avantajı, bağların çok kuvvetli olması, böylece her türlü akış ortamında kullanılabilirliğidir. Enzim destek materyali üzerinde yer aldığından substrat ile teması kolaydır. Ayrıca enzim molekülü ve destek materyali birlikte genellikle ısı kararlılık gösterirler. Yöntemin dezavantajı, destek materyali ile enzim arasındaki sıkı etkileşim enzimin doğal konformasyonunu bozabilmesidir [46].

2.5.2. Tutuklama (Hapsetme)

Enzimler makromoleküler yapı proteinler olup polimer jel matrikslerde ve daha basit olarak diyaliz membranlarında tutuklanabilirler (Şekil 2.9). Bu yöntem enzimler yanında organeller, hücreler ve antikorlar için de uygulanabilir [47].

Tutuklama yöntemiyle enzim molekülleri polimerizasyon yardımı ile agar, agaroz gibi doğal ya da poliüretan, poliakrilamit gibi sentetik polimer matrislerde hapsedilir.

Tutuklama yöntemi kolay ve ucuzdur; fakat zamanla enzim sızması, yüksek difüzyon sınırı ve sterik engel gibi dezavantajlara sahiptir [48].

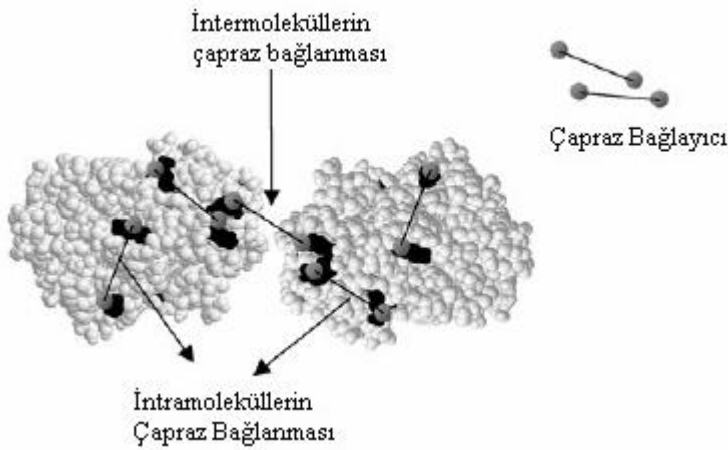


Şekil 2.7. Enzimin tutuklama yöntemi ile immobilizasyonu

2.5.3. Çapraz bağlama

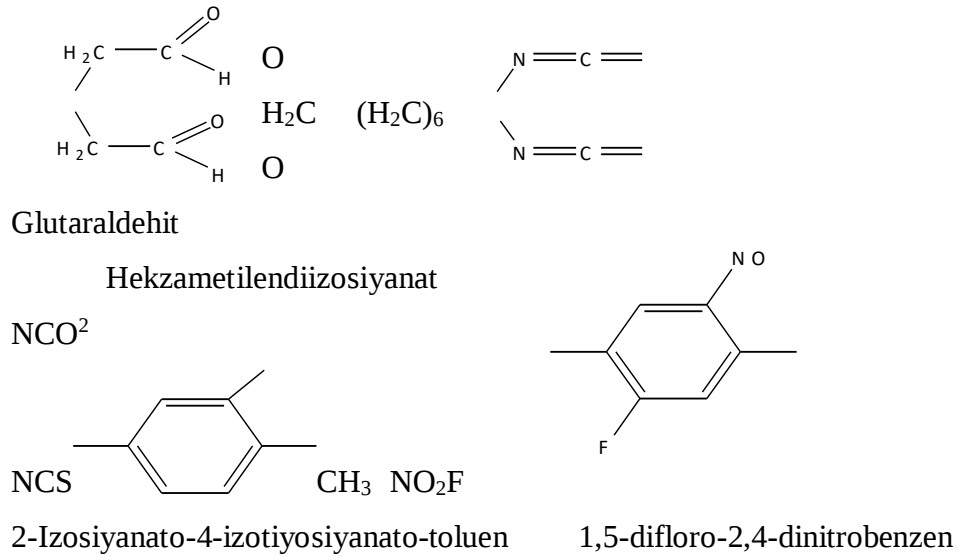
Enzim immobilizasyonu enzimlerin her birinin diğer bir enzim molekülüne (Şekil 2.10) ya da suda çözünmeyen bir matriksin fonksiyonel gruplarına moleküller arası çapraz bağlanmasıyla sağlanır.

Enzimlerin birbirlerine çapraz bağlanması bir kısım enzim moleküllerinin çoğunlukla bir destek gibi davranmasının kaçınılmaz olması sebebi ile pahalı ve yetersizdir. Ayrıca göreceli olarak düşük aktivite ile sonuçlanır [49].



Şekil 2.8. Çapraz bağlama ile immobilizasyon

Çapraz bağlama reaktantları olarak gluteraldehit, heksametilen diizosiyanat, diflorodinitrobenzen sık kullanılır. Bifonksiyonel reaktantlar enzimler yanında organeller, hücreler ve antijenlerin immobilizasyonunda da uygulanır. Bazı çapraz bağlayıcıların formülleri aşağıda (şekil 2.9'da) gösterilmektedir [47].



Şekil 2.9. Bazı bifonksiyonel reaktiflerin kimyasal formülleri

2.5.4. Adsorpsiyon

Bu yöntemde biyobileşenin film veya tabakaya adsorbe olması sağlanır. Biyobileşenlerin kimyasal yapısı ve fiziksel durumuna göre immobilizasyon yöntemi belirlenir. Enzimler için uygulanan tüm immobilizasyon yöntemleri protein yapısındaki diğer biyoreseptörler için de uygulanabilir [47].

İmmobilizasyon yöntemine göre enzim elektrotların ortalama ömürleri aşağıda verilmiştir [47].

Adsorpsiyon: 1 gün

Membranda tutuklama: 1 hafta

Fiziksel tutuklama: 3-4 hafta

Kovalent bağlama: 4-14 ay

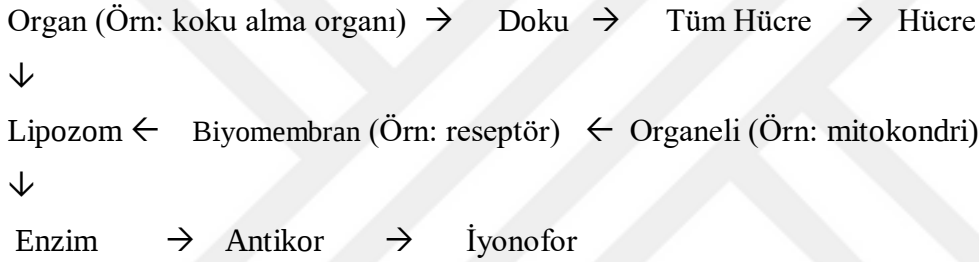
2.6. Enzim Sensörleri

Biyokomponent veya reseptör elemanı olarak enzim kullanılan biyosensörlere ‘enzim biyosensörleri’ adı verilir. İlk biyosensör uygulamaları enzimlerle gerçekleştirilmiştir. Temel bilimlerdeki ilerlemeler enzimlerin yanı sıra diğer biyolojik materyallerin fonksiyonlarının da çok daha ayrıntılı bir şekilde ortaya çıkarılmasına imkan vermiştir. Bu ilerlemelerin doğal bir sonucu olarak farklı biyolojik materyallerin ve iletim sistemlerinin kombinasyonu ile çok çeşitli biyosensörler geliştirilmiş ve geliştirilmeye devam

edilmektedir. Bugünkü sonuca bakıldığında, hangi temel iletim sistemi söz konusu olursa olsun pratik ve ticari uygulamalarda enzim elektrotlarının büyük bir üstünlüğü göze çarpmaktadır.

Biyosensör hazırlamada enzimleri kullanmak; spesifiklik bakımından avantajlı ancak saf enzimin pahalı oluşuda dezavantajlıdır [50-51].

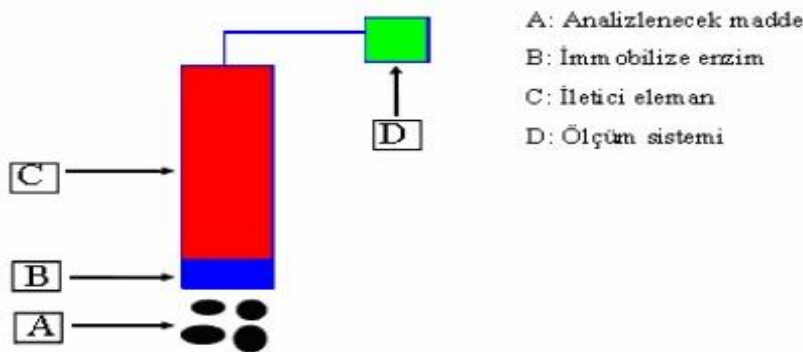
Biyosensör teknolojisinde kullanılan biyolojik materyaller artan kompleksliklerine göre sıralandıklarında; iyonoforlar, antikörler, enzimler, lipozomlar, biyomembran parçaları (örn: reseptör), hücre organelleri (örn: mitokondri), doku veya tüm hücreler ve organlar (örn: görme ve koklama organları) şeklinde sınıflandırılabilirler [50].



Şekil 2.10. Biyosensör teknolojisinde kullanılan biyoaktif materyal sıralamasında enzimlerin yeri

2.6.1. Enzim sensörlerinin genel çalışma ilkesi

En genel anlamda bakıldığında bir enzim sensörü; iletici, ince bir enzim tabakası ve ölçüm kombinasyonundan oluşmaktadır. Diğer biyosensörlerden tek fark biyoaktif tabakada biyomolekül olarak enzimler bulunmaktadır [50].



Şekil 2.11. Enzim sensörlerinin genel şematik gösterimi

Bir enzim elektrodunda enzimi içeren biyoaktif tabaka, enzimin katalizlediği tepkimeye uygun bir iletim ve ölçüm sisteminin uzantısı olan bir iletici ile birleştirilmektedir. İletim sistemi biyoaktif tabakada gerçekleşen enzimatik tepkime sonucu oluşan ürünün miktarındaki artışı tespit edebilecek şekilde seçilmelidir.

Biyoaktif tabakadaki ve biyoaktif tabaka iletici ara yüzeyindeki derişimlerin hızlı bir şekilde dengeye ulaşabilmesi için difüzyon engelini en aza indirmek amacıyla biyoaktif tabaka kalınlığının mümkün olduğunca ince olması gerekmektedir. Bunun yanı sıra biyoaktif tabakada sabit bir substrat derişimi sağlayabilmek için ölçme çözeltisinin yeterli bir şekilde karıştırılması gerekmektedir. İletici sistemin ölçme sistemine gönderdiği sinyal biyoaktif tabaka ile iletici ara yüzeyindeki derişimlerdeki değışikliğe bağlıdır. Ancak söz konusu derişimler denge halinde ölçme çözeltisindeki derişimlerle orantılı olduğu için çoğu zaman kalibrasyon grafiğı çizilerek sonuca varılır [52].

2.6.2. Enzim sensörlerinin sınıflandırılması

Enzim sensörlerinin sınıflandırılması en yaygın şekilde, enzimatik reaksiyon uyarınca oluşan sinyalin ölçüm yöntemine göre yapılmaktadır. Çizelge 2.3’de bu sınıflandırma gösterilmektedir [53].

Çizelge 2.3. Enzim sensörlerinin sınıflandırılması

1- Elektrokimyasal Esaslı Enzim Sensörleri;
Amperometrik Enzim Sensörleri;
Birincil nesil, İkincil nesil, Üçüncü nesil.
Potansiyometrik Enzim Sensörleri;
Proton duyar,
Amonyak duyar,
Karbondioksit duyar,
Diğer iyon duyar.
Yarı İletkenleri Esas Alan Enzim Sensörleri;
Enzim Alan Etki Transistörler (ENFET)
2- Optik Enzim Sensörleri;
Absorpsiyon esaslı,
Flouresans esaslı,
Biyoluminesans esaslı.
3- Kalorimetrik Enzim Sensörleri
4- Piezoelektrik Enzim Sensörleri

2.7. Performans Faktörleri

2.7.1. Seçicilik

Enzim elektrodun kompleks bir matriks içerisinde tek başına analitik bir ölçüm cihazı olarak kullanılabilmesini sağlar. Seçiciliğin yeterli olmadığı durumlarda çalışma prosedürüne bu eksiği giderecek ek işlemler eklenmesi gerekir. Seçiciliğin zayıf olmasından kaynaklanan sorunlar enzim elektrodun kullanımını zor hale getirmektedir [54].

2.7.2. Kalibrasyon gereksinmesi

İdeal bir enzim elektrodun hiç kalibrasyona gerek duymaması ya da en az kalibrasyona gereksinmesi istenir. Ama teorikte planlanan bu özellik pratikte günümüzde gerçekleştirilememiştir. Enzim elektrotların kullanım ömürleri boyunca sıkça ya da belirli aralıklarla kalibre edilerek duyarlılıklarından bir şey kaybedip kaybetmedikleri araştırılır [54].

2.7.3. Tekrarlanabilirlik

İdeal bir enzim elektrodunun aynı derişimde ya da aynı özelliklere sahip birden fazla örneğe daldırılmasıyla yapılan deneylerde aynı sonuçların okunması gerekir. Tekrarlanabilirlik değeri ne denli iyi olursa o enzim elektrot uygulamasıda o denli iyi olur [54].

2.7.4. Kullanım ömrü

Biyolojik çevirici olarak enzim kullanıldığı durumlarda enzim aktivitesindeki azalma kullanım ömrünü kısıtlayan en önemli faktördür. Enzimin yaşam süresi, enzim elektrodun kullanım ömrü yanı sıra kalibrasyon sıklığı, stabilite, tekrarlanabilirlik gibi parametreleride etkilemektedir [54].

2.7.5. Kararlılık

Elektrot kararlılığının yüksek olduğu durumlar ideal enzim elektrotlar için gereklidir. Kararlılık, kullanılan enzimin fiziksel dayanıklılığından etkilendiği gibi; pH, ısı, nem, ortam O₂ derişimi, enzimi immobilize etmede kullanılan polimerin kimyasal ve fiziksel karakteri gibi parametrelerden de etkilenmektedir [54].

2.7.6. Yüksek duyarlılık

Hazırlanan elektroda immobilize edilmiş olan enzim; sadece belirli maddelere (substratlara) karşı duyarlı olmalıdır. Duyarlılık, akım-derişim eğrisinin eğimi ile orantılıdır. Eğim değeri büyüdükçe duyarlılıkta da artış gözlenir. Kullanılan enzimin substratları dışında enzim elektrotların girişim yapan maddelerden etkilenmemesi istenir [54].

2.7.7. Yeterli düzeyde tayin sınırı

Tasarlanan enzim elektrotun ideal tanımına uyması için tayin sınırının belirli bir derişim değerinin altında olması gerekmektedir. Belirtilen bu tayin sınırı elektrot yüzeyinin büyüklüğü, enzimin tayin edilecek maddeye karşı olan afinitesi, immobilize edilen enzim

miktarı, enzimin immobilizasyonunda kullanılan polimer tabakasının kalınlığı gibi faktörlerden etkilenir [54].

2.7.8. Geniş ölçüm aralığı

Ölçüm aralığı denen bölge, enzim elektrottan alınan akım-derişim eğrilerinin lineer olduğu derişim aralığıdır. Tüm enzim elektrot uygulamalarında çalışma ortamında belirli bir derişim değeri ne ulaşıldıktan sonra akım-derişim eğrilerinde lineerlikten sapma gözlenmeye başlar. Bu durum enzimatik eğrilerin en önemli ve de karakteristik özelliğidir. Lineerlikten sapmanın nedeni yanıt olarak okunan akım değeri lerindeki değ işimin azalmasından kaynaklanır. Bunun nedeniyse ortamda artan analizlenecek madde miktarının fazlasıyla reaksiyona girecek enzim olmamasıdır [54].

2.7.9. Hızlı cevap zamanı

Amperometrik uygulamalarda analizlenecek bir madde örneğini çalışma ortamına enjekte etmeden önce elektrot yüzeyinde oluşan akımın sabit kalması istenir. Akım sabit kaldıktan sonra analizlenecek madde ortama enjekte edilir ve akımdaki değ işim kaydedilir. İkinci bir enjeksiyondan önce akım değeri nin yine sabit kalması beklenir. İşte ilk enjeksiyondan sonra akımın tekrar sabit kalmasına kadar geçen zamana ‘cevap zamanı’ denir. Cevap zamanının kısa ya da hızlı olması ideal sensörlerin özelliklerindendir [54].

2.7.10. Basitlik ve ucuzluk

Kullanımı, tasarımı basit ve ucuz enzim elektrotlar hazırlamak enzim elektrot yapımında her zaman hedef alınmış bir düşüncedir. Enzim elektrot yapılarının basitleştirilmesine en iyi örnek ikinci kuşak enzim elektrotların yapılarında bulunan mediyatörlerin daha gelişmiş modeller olan üçüncü kuşak enzim elektrotlarda ortadan kaldırılmasıdır [54].

2.8. Kaynak Araştırması

Gao ve arkadaşları karbon elektrot üzerindeki alümina nano partikül membran içinde glukoz oksidaz ve bir difüze polimerik medyatör olan polivinilferrosenkoakrilamitin ortak dağılımına dayanan bir glukoz biyosensörü geliştirmişlerdir. Hazırlanan biyosensör kinetik olarak hızlı bir redoks çiftinin klasik özelliklerini göstermiştir. Optimum deney şartlarında 0,3 V potansiyelde, 5. saniyedeki pik akımı ve daha uzun test zamanlarında ölçülen akımların 0,005 - 6,0 mg/mL glukoz derişim aralığında doğrusal olduğunu tespit etmişlerdir. Karbon elektrot yüzeyine kanal açarak nanopartikül duyarlı membran ile doldurmuşlar ve glukoz tayini yapmışlardır. Kan şekeri tayininde başarılı çalışmalar yapmışlardır [55].

Gaikwad ve arkadaşları glukoz tayini için polianilin sülfürik asit glukoz oksidaz elektrodu geliştirmişlerdir. Polianilin sülfürik asit filmi hazırlamak için platin elektrot ve potansiyometrik metot kullanmışlardır. Sentezledikleri polianilin sülfürik asit filmini elektrokimyasal teknik, elektrik iletkenliği, UV-görünür bölge spektroskopisi, FTIR spektroskopisi ve taramalı elektron mikroskopisi yardımıyla karakterize etmişlerdir. Bu film üzerine glukoz oksidaz enzimini glutaraldehitte çapraz bağlama yöntemiyle immobilize etmişlerdir [56].

Gaikwad ve arkadaşları glukoz tayini için potansiyometrik esaslı PANI-PVS-GOD elektrodu geliştirmişlerdir. PANI-PVS filminin sentezi için ITO kaplı cam elektrotu ve potansiyometrik metot kullanmışlardır. Sentezledikleri PANI-PVS kompozit filmini elektrokimyasal teknik, elektrik iletkenliği, UV-görünür bölge spektroskopisi, FTIR spektroskopisi ve taramalı elektron mikroskopisi yardımıyla karakterize etmişlerdir. Sonra glukoz oksidazı; PANI-PVS filminin üzerine glutaraldehitte çapraz bağlama yoluyla immobilize etmişlerdir [57].

Sung ve Bae yaptıkları çalışmada yeni bir glukoz biyosensörü hazırlamak için pirol ile birlikte polianyon, polietilen glikol ve glukoz oksidazın elektrokimyasal polimerizasyonunu kullanmışlardır. Pt elektrot yüzeyinde polipirol matriksi içine glukoz oksidazı tutuklamışlardır. Daha sonra tutuklanan glukoz oksidaz, PEG (polietilen glikol) üzerinden polianyon ile birleşmiştir. PEG 1000, 2000, 3000, 4000 gibi dört farklı zincir uzunluğu denenmiş, bunların enzim immobilizasyonu ve elektrot işlevi üzerindeki etkisi

incelenmiştir. Enzim elektrodun hazırlanmasında 800 mV potansiyel ve 225 mC/cm² film kalınlığı kullanılmıştır. Elektrot üzerindeki immobilize enzimin aktivitesi 119-209 mU/cm² arasında değişmiştir. Biyoaktivite ise daha uzun PEG' lerde artmıştır. Amperometrik cevap 270 nA mM⁻¹ cm⁻² kadar değişen duyarlılık ile 20 mM glukoz derişimine kadar doğrusallık gözlemiştir [58].

Fei ve arkadaşları altın elektrot yüzeyinde glukoz oksidaz ve polivinilimidazol kompleksini kullanarak glukoz biyosensörünü geliştirmişlerdir. Özellikle bu metod mikrosensörle uygulandığında çok daha iyi bir kontrol sağlamıştır. Redoks polimer elektrot yüzeyinde 0.14 V potansiyelde hızlı redoks çifti klasik özelliklerini göstermiştir. Tarama hızı 200 mV s⁻¹ ve potansiyel aralığı 25 mV'dan daha az olan bir aralıkta çalışmışlardır [59].

Yavuz bu çalışmada 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 yöntemi araştırmış, bu çalışmada iki yeni glukoz enzim elektrodu geliştirmiştir. Çalışmanın birinci adımında, PVF kaplanmış Pt elektrot enzim çözeltisine daldırılarak glukoz oksidaz enziminin (GOD) polimer matriks içerisinde tutuklanması sağlanmış ve bu enzim elektrot PVF-GOD enzim elektrodu olarak tanımlanmıştır. Elektrot cevabı üzerine polimerik film kalınlığı, pH, sıcaklık, substrat ve enzim konsantrasyonu etkisi araştırılmış ve 25°C sıcaklıkta pH 7,4 olarak bulunmuştur. Lineer çalışma aralığının üst sınırı 73,86 mM glukoz derişimi, tutuklanmış enzim sistemi için görünür Michaelis-Menten sabiti (K_{mg}) ve aktivasyon enerjisi sırasıyla 417,57 mM glukoz ve 14,48 kJ/mol olarak bulunmuştur. Çalışmanın ikinci adımında GOD, PVF kaplanmış ve ardından Au biriktirilmiş Pt elektrot üzerinde aynı yöntemle tutuklamıştır ve bu enzim elektrot PVF-Au-GOD enzim elektrodu olarak tanımlamıştır. Enzim elektrot cevabı üzerine Au etkisi araştırmıştır. 25°C sıcaklıkta pH 7,4 olarak bulunmuştur. Lineer çalışma aralığının üst sınırı 105,26 mM glukoz derişimidir. Tutuklanmış enzim sistemi için görünür Michaelis-Menten sabiti (K_{mg}) ve aktivasyon enerjisi sırasıyla 371 mM glukoz ve 18,76 kJ/mol olarak bulunmuştur. Girişim yapabilecek maddelerin etkisi ve enzim elektrodunun kararlılığı araştırmıştır [60].

Sağlam 2016 yılında bu çalışmada anorganik yarı iletken nanomateriyaller (CdS-ZnS), iki farklı elektrot (çok duvarlı karbon nanotüp/camımsı karbon elektrot (GCE/MWCNT) ve

kalem grafit elektrot (PGE)) yüzeyine modifiye edilmiş ve elde edilen bu kuantum nokta modifiye elektrotlara glukoz oksidaz (GOD) enzimi immobilize edilmiştir. Hazırlanan elektrotlar akışa enjeksiyon analiz (Flow injection analysis, FIA) sisteminde oksidaz enzimine dayalı amperometrik ve fotoamperometrik glukoz biyosensörü tasarımı kullanmıştır. Her bir elektrodun SEM görüntüleri alarak yüzeysel karakterizasyonu ve $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ redoks probu ortamında impedans eğrileri ve döngüsel voltammogramları kaydederek elektrokimyasal karakterizasyonu gerçekleştirmiştir. Optimum koşullar altında, PGE/CdS-ZnS/GOD ve GCE/MWCNT/CdS-ZnS/GOD kullanılarak tasarlanan glukoz biyosensörü için doğrusal aralık 0,01-1,0 mM glukoz olarak bulunmuştur. Bu çalışmada PGE için yeni bir akış hücresi tasarlanarak yine ilk defa FIA sisteminde bir amperometrik glukoz biyosensörü geliştirmiştir. Bu çalışmanın sonucunda GCE/MWCNT/CdS-ZnS/GOD modifiye elektrot kullanılarak glukoz için ilk defa fotoelektrokimyasal biyosensör FIA sisteminde başarılı bir şekilde geliştirilmiştir [61].

Luo ve arkadaşları 2004 yılında yaptıkları çalışmada glukozun tayini için kolay hazırlanabilen ve homojen bir biokompoziti temel alan amperometrik bir enzim elektrot hazırlamışlardır. Bu biokompoziti chitosan hidrojel, altın parçacıkları ve glukoz oksidazın direkt ve kolay elektrokimyasal tutuklanma metotlarından yararlanarak hazırlamışlardır. Enzim elektrodun cevap süresini oldukça kısa bulmuşlardır. Glukoz için tayin sınırını 2,7 μM ; 5,0 mM ile 2,4 mM arasında doğrusallık sergilediğini belirtmişlerdir [62].

Bal ve arkadaşları 2012 yılında yaptıkları çalışmada glukoz tayini için amperometrik biyosensör hazırlamışlardır. Glukoz oksidaz enzimi, pirolün paratoluensülfonatlı ortamda elektropolimerleşmesiyle hazırlanan polipirol-paratoluensülfonat film üzerine glutaraldehitte çapraz bağlama yöntemiyle immobilize edilmiştir. Bu amaçla önce polipirol-paratoluensülfonat filminin en uygun çalışma Şartları belirlenmiştir. Glukoz tayini, hazırlanan enzim elektrodun yüzeyinde gerçekleşen enzimatik tepkime sonucu oluşan hidrojen peroksitin 0,30 V'da yükseltgenmesine dayanarak yapılmıştır. Enzim elektrodun glukoz için doğrusal çalışma aralığı $1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ - $7,5 \times 10^{-2} \text{ M}$ olarak tespit edilmiştir immobilize edilen glukoz oksidazın $\text{KM}(\text{göz})$ ve $\text{Vmaks}(\text{göz})$ değerleri sırasıyla 0,267 mM ve $\text{Vmaks}(\text{gözlenen})$ değeri 4,048 mM olarak hesaplanmıştır. Enzim elektrodun optimum pH değeri 7,5 optimum sıcaklık değeri ise 55 °C olarak bulunmuştur. Enzim elektrodun 16 ölçüm sonunda aktivitesini % 68 oranında koruduğu gözlemlenmiştir ve 7 hafta sonunda başlangıç amperometrik cevabının % 53'ünü koruduğu görülmüştür.

Hazırlanan biyosensörle biyolojik sıvıda (kan) glukoz tayini yapılmıştır. Biyolojik ortamlarda olabilecek girişimlerin biyosensör cevabı üzerine etkileri incelenmiştir [40].

Jing-Juan Xu ve arkadaşları enzimatik reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksidin 0,6 V potansiyelde amperometrik cevabını ölçerek glukoz tayini yapmışlardır. Bu sensörün performans özelliklerini, farklı monomer konsantrasyonlarını ve polimerizasyon potansiyellerini ayrıntılı şekilde çalışmışlardır. Optimum şartlar altında hazırlanan biyosensörün $2,5 \times 10^{-4}$ M - $1,5 \times 10^{-2}$ M glukoz konsantrasyonu aralığında doğrusal bir cevap verdiği gözlemlenmiştir, korelasyon katsayısı 0,997 cevap süresi 2 saniyeden daha az bulunmuştur. 90 gün sonra biyosensör cevabının hiç değişmediği ve iyi bir kararlılığa sahip olduğu gözlemlenmiştir [63].

Can 2010 yılında bu çalışmada yüzey alanı $0,18 \text{ cm}^2$ olan platin levha üzerine dönüşümlü voltametri tekniği ile para toluen sülfonik asit (pTSA) ve sodyum para toluen sülfonat ortamında (NapTS) polipirrol (PPy) sentezlenmiş ve sentez ortamında bulunan glukoz oksidaz (GOD) enziminin eş zamanlı olarak immobilize edilmesi ile glukoz biyosensörü tasarlanmıştır. Pt/PPy-GODpTSA ve Pt/PPy-GODNapTS enzim elektrotların SEM görüntüleri ve dijital fotoğrafları elde edilmiş ve GOD içermeyen elektrotlar için elde edilen görüntüler ile karşılaştırılarak enzimin immobilizasyonu teyit edilmiştir. Elektrotlar farklı glukoz derişimlerinde dönüşümlü voltametri ve doğrusal taramalı voltametri teknikleri ile karakterize edilmiştir. Elde edilen Pt/PPy-GODpTSA ve Pt/PPy-GODNapTS enzim elektrotları için optimum potansiyel değerleri sırasıyla 0,7 ve 0,6 V; optimum pH değerleri ise sırasıyla 4,5 ve 7,0 olarak bulunmuştur. Glukoz derişimine bağlı olarak (0,05-30 mM) gözlenen akım değerlerinde her iki elektrot için 1mM glukoz derişimine kadar doğrusal bir artış gözlenmiş, ancak daha yüksek glukoz derişimlerinde akım değerlerindeki artış azalmıştır. Lineweaver-Burk eğrisinden Pt/PPy-GODpTSA ve Pt/PPy-GODNapTS için KM değerleri sırasıyla 5,2 ve 1,7 mM, Vmax değerleri ise 14,2 ve 25,4 μA olarak hesaplanmıştır. Glukoz biyosensörünün depolama kararlılığı sulu tampon ortamında bekletilerek ayrı ayrı ölçülmüştür. Genel olarak Pt/PPy-GODNapTS elektrodunun depolama kararlılığının daha yüksek olduğu, ancak 30 gün sonunda her iki elektrodun aktivitelerinin neredeyse tamamını kaybettikleri gözlenmiştir. Pt/PPy-GODpTSA ve Pt/PPy-GODNapTS elektrotların tekrar kullanım kararlılıkları 5, 10 ve 20 mM glukoz çözeltilerinde belirlenmiş ve 50 ardışık ölçüm sonrasında Pt/PPy-GODNapTS elektrodun daha yüksek kararlılık gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca Pt/PPy-GODpTSA elektrodunun

tekrar kullanım kararlılığı glukoz derişimi arttıkça azalırken Pt/PPy-GODNapTS elektrodunun tekrar kullanım kararlılığı glukoz derişiminden etkilenmemiştir. Ayrıca tasarlanan biyosensörler ile malt içeceği, gazoz, şarap, bal ve üzüm suyu olmak üzere 5 sıvıda glukoz tayini yapılmış ve Pt/PPy-GODNapTS elektrodunun Pt/PPy-GODpTSA elektroda göre daha doğru sonuçlar verdiği gözlenmiştir [64].

Xue ve arkadaşları, 2000 yılında iletken polianilin-poliizopren (PANI-PIP) kompozit filmine GOD'yi immobilize ederek H₂O₂ seçici geçirgen bir biyosensör tasarlamışlardır. Pt elektrot önce poliizopren ile kaplandıktan sonra 1 M HCl içindeki 0,02 M anilin içeren çözeltiye daldırılarak 0,65 V sabit potansiyel altında elektrokimyasal olarak polianilin sentezlemişlerdir. PANI-PIP filmi ile kaplı olan Pt elektrotu pH 4,50 olan 0,1 M fosfat tamponuna daldırılıp -0,50 V potansiyel altında film bünyesinde bulunan Cl⁻ iyonlarını mümkün olduğunca uzaklaştırdıktan sonra 20 M GOD içeren pH 6,52 olan fosfat tamponuna daldırımış ve bu ortamda 0,65 V potansiyel fark uygulanarak (-) yüklü olan GOD'yi (pI değeri 4,2) PANI-PIP filminin içine immobilize etmişlerdir. Enzim sistemini glukoz çözeltisine daldırılarak oluşan H₂O₂'nin elektrokimyasal oksidasyonu sırasında açığa çıkan akımı ölçmüşlerdir. Film bileşimi ile biyosensörün hassaslığını, H₂O₂ geçirgenliğini ve interferens özellik gösteren askorbik asitin etkisini inceleyerek biyosensörü karakterize etmişlerdir [65].

Chen ve arkadaşları, 2006 yılında askorbik asit gibi safsızlıkların girişimlerini elimne etmek amacıyla; polipirol film elektrot, polipirol-glukoz oksidaz elektrot, karşı elektrot, referans elektrot gibi dörtlü elektrot hcreti ile meydana gelen, girişimsiz bir glukoz biyosensörü hazırlamışlardır. Glukoz oksidazın net katalitik akımını, glukoz oksidazsız iki çalışma elektrotun cevap akımları farkından elde etmişlerdir. Glukoz biyosensörünün analitik performansı üzerine pH'nın, sıcaklığın ve potansiyelin etkisini araştırmışlardır. Enzim ile katalizlenen reaksiyonun optimum pH'ını ve aktivasyon enerjisini sırasıyla 5,5 ve 25 kJ/mol olarak bulmuşlardır. IMAX ve KM değerlerini sırasıyla 5,88 A ve 23,3 mmol/dm³ bulmuşlardır. Biyosensör cevap akımlarının 0,005'ten 20 mmol/dm³'e artan glukoz derişimleriyle lineer bir şekilde arttığını bildirmişlerdir. Ayrıca glukoz biyosensörünü UV ve FTIR ile karakterize etmişlerdir. Elde edilen girişimsiz polipirol glukoz biyosensrnde glukoz tayininin hassas bir şekilde yapılıp insan plazma örneklerine uygulamada ilerlenebileceği sonucuna varmışlardır [66].

Gölce ve arkadaşları laktoz tayini için çift enzimli amperometrik enzim elektrot geliştirmişlerdir. Glukoz oksidaz ve galaktosidaz enzimlerini, platin elektrot yüzeyine kaplanmış poli (vinilferrosenyum) matrikse, elektrodu enzim çözeltisinde 30 dakika bekleterek iyon değişimi yöntemi ile immobilize etmişlerdir. Enzimatik yolla oluşan hidrojen peroksitin elektrooksidasyonuna bağlı olan amperometrik cevabı doğun kalomel elektroda (DKE) karşı +0,70 V'luk sabit potansiyelde ölçmüşlerdir. Elektrodun aktivitesinin fazla değişmediğini ve elektrodun kararlılığının oldukça iyi olduğunu bulmuşlardır [67].

Xianhua Pan ve arkadaşları 2004 yılında yaptıkları çalışmada polianilin glukoz oksidaz sensörünün hazırlanmasında yeni bir metot geliştirmişlerdir. İlk olarak polianilin glukoz oksidaz elektrodunu tek bir basamakla elde etmişlerdir. Anilinin elektrokimyasal polimerizasyonuna kadar bir polimer filmi içine enzimler tutuklamışlardır. Daha sonra PANI elektrot filminden glukoz oksidaz uzaklaştırmak için 6,0 mol/dm³ hidroklorik asit çözeltisiyle hidroliz etmişlerdir. Son olarak, aktif PANI glukoz oksidaz sensörü tekrar elde etmek için PANI filmine glukoz oksidaz immobilize etmişlerdir. Substrat derişimi, potansiyel, pH, sıcaklık gibi çeşitli faktörlerin cevap akımına etkisini araştırmışlardır. Hazırlanan enzim elektrodun akım cevabı ilk 2 günde maksimuma ulaşmış, daha sonra 30 günlük bir süreçte sadece % 4,6 azalmıştır. İşlemden yapılan ikinci adım aktif enzim içeren tampon çözeltisindeki indirgenmiş polianilinin oksidasyon derecesi süresince enzim uygulanmıştır. Hazırlanan PANI glukoz oksidaz sensörünün karakterizasyonunu hakkında bilgiyi SEM, FTIR, UV-Vis yardımıyla tespit etmişlerdir [68].

Yuezhong Xian ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları çalışmada Au nanopartikül (NPs)-iletken polianilin (PANI) nanofiberlerin kompozitlerine dayanan yeni bir glukoz enzim elektrodu hazırlamışlardır. Hidrojen peroksidin elektrokimyasal oksidasyonu ile nanokompozit yüzeyi üzerine Nafion ve glukoz oksidazla immobilize edilmiş, glukozu duyarlı hassas ve seçici bir enzim elektrot geliştirmişlerdir. Glukoz enzim elektrodu için $5,0 \times 10^{-7}$ M ve 2,3 mA/M'lık eğim ve algılama kararlılığıyla $8,0 \times 10^{-4}$ mol/L ile $1,0 \times 10^{-6}$ mol/L aralığında doğrusal bir kalibrasyon eğrisi elde etmişlerdir. Ayrıca, glukoz enzim elektrodunun mükemmel bir tekrarlanabilirlik ve iyi işlevsel kararlılık gösterdiğini tespit etmişlerdir [69].

Li ve arkadaşları 2008 yılında yaptıkları çalışmada glukoz oksidaz enzimini, kitosan kullanarak çapraz bağlama tekniği ile NiO boş nanoküreleri yüzeyine immobilize etmişlerdir. Hazırlanan biyosensör ile SCE'ye karşı +0,35 V'da yapılan glukoz tayini için en düşük tayin limiti 47 μ M bulunmuştur [70].

Salimi ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları çalışmada 1 mM nikel nitrat içeren fosfat tamponu içinde Ag/AgCl'e karşı -0,80 V potansiyelde camsı karbon elektrot yüzeyinde elektrokaplama yöntemi ile NiO nanopartikülleri oluşturulmuştur. Hazırlanan NiO modifiye camsı karbon elektrot GOx çözeltisi içerisine daldırılmış ve +0,80 V potansiyelde elektroçözünme yöntemi ile enzimin elektrot yüzeyine immobilizasyonu sağlanmıştır. NiO/GOx/GC elektrodu ferrosenmetanol medyatörü varlığında +0,30 V potansiyelde glukozun yükseltgenmesine karşı üstün elektrokatalitik özellik göstermiştir [71].

Kong ve arkadaşları 2009 yılında yaptıkları bir çalışmada altın elektrot yüzeyini ZnO nanotüpleri ile kaplamış ve glutaraldehit ile çapraz bağlanan glukoz oksidaz enzimi Au-ZnO nanotüp elektrodun yüzeyine adsorplanmıştır. Hazırlanan biyosensör ile SCE'ye karşı +0,80 V potansiyelde glukoz tayini yapılmış ve tayin sınırı 1,0 μ M olarak bulunmuştur [72].

Doretta ve arkadaşları 1997 yılında yaptıkları çalışmada PVA kriyojel membran üzerine glukoz oksidaz immobilize edilerek yeni bir biyosensör hazırlanmıştır. Enzim immobilizasyonunda herhangi bir çapraz bağlayıcı kullanılmamıştır. Biyosensörün davranışı, oluşan hidrojen peroksit ile izlenmiştir. Kalibrasyon Grafiğinin $5,0 \times 10^{-5}$ - $13,0 \times 10^{-3}$ M aralığında doğrusal olduğu gözlenmiştir [73].



3. DENEYSEL KISIM

3.1. Cihazlar ve Malzemeler

3.1.1. Elektrokimyasal analiz cihazı

Amperometrik ölçme işlemlerinde BAS Epsilon-EC-Ver 1.40.67 NT elektrokimyasal analiz cihazı kullanıldı.

3.1.2. Hücre ve elektrotlar

Amperometrik ölçme işlemlerinde Şekil 3.1' de verilen üç elektrotlu ölçme sistemi kullanıldı. Referans elektrot olarak BAS RE-5B no'lu Ag/AgCl, karşıt elektrot olarak MW 1032 no'lu platin tel ve çalışma elektrodu olarak 0,5 cm² yüzey alanlı ve polianilin-polipirolile kaplanmış platin levha elektrotlar kullanıldı.



Şekil 3.1. Kaplama ve ölçümde kullanılan hücre sistemi

3.1.3. Mikro pipet

5 µL – 500 µL çözelti ilaveleri için $\pm 0,05$ µL hassasiyeti olan mikro pipetler kullanıldı.

3.1.4. Argon gazı

Çözeltide çözünmüş halde bulunan oksijeni uzaklaştırmak için Kargaz firmasından temin edilen yüksek saflıktaki (% 99,999) argon gazı kullanıldı.

3.1.5. Saf su

Çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan saf su; GFL marka saf su cihazından sağlandı.

3.1.6. pH metre

Tampon çözeltilerinin pH'larının ölçülmesinde ORION Model 720A pH iyonmetre cihazı kullanıldı.

3.1.7. Su banyosu

Isıtma, soğutma ve sabit sıcaklık çalışmalarının gerektiği durumlarda Grant W14 marka termostatlı sirkülasyonlu su banyosu kullanıldı.

3.1.8. SEM analizi

Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde JEOL JSM-6060 LV markalı cihazda elektrotların yüzey fotoğrafları elde edildi.

3.1.9. AFM cihazı

Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Fizik bölümünde Omicron AFM/STM kombine sistem markalı cihazda elektrotların yüzey fotoğrafları elde edildi.

3.1.10. Yüzey temas açısı analiz cihazı

Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya bölümünde flaş kamera aksesuarlı Kruss DSA100 markalı cihazda elektrotların yüzey fotoğrafları elde edildi.

3.2. Kullanılan Reaktifler ve Özellikleri

Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin adları, saflık dereceleri ve temin edildikleri firmalar Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin adları, saflık dereceleri ve temin edildikleri firmalar

Kimyasal Madde	Saflık Derecesi	Temin Edildiği Firma
Pirol	%98	Aldrich
Dodesil Benzen Sülfonat	-	Aldrich
Sodyum hidroksit(NaOH)	%96	Carlo Erba
Hidroklorik asit(HCl)	%36,5	BDH
Monosodyumhidrojenfosfat(NaH_2PO_4)	%99	Carlo Erba
Disodyumhidrojenfosfat(Na_2HPO_4)	%99	Merck
Hidrojen peroksit(H_2O_2)	%30 $\delta=1,11$ g/mL	Merck
Sodyum perklorat(NaClO_4)	%98	Aldrich
Glukoz($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	-	Merck
Ürik asit ($\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$)	%99	Sigma
Parasetamol(Asetaminofen)	%99,4	-
Askorbik asit($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$)	%99,7	BDH

3.2.1. Kullanılan çözeltiler

Hidrojen peroksit: % 30’luk $\delta=1,11$ g/mL olan hidrojen peroksitten 102 μL alınarak derişimi 0,1 M olacak şekilde 10 mL stok çözelti hazırlandı. 10’ar mL $1,0 \times 10^{-2}$ M ve $1,0 \times 10^{-5}$ M hidrojen peroksit çözeltileri de su ile seyreltilerek hazırlandı.

Fosfat tamponu: Monosodyum hidrojen fosfat ve disodyum hidrojen fosfattan sırasıyla 2,184 ve 12,513 gram tartılarak saf suda çözüldü, hazırlanan çözeltinin pH’sı 1,0 M NaOH ve 1,0 M HCl ile 8’e ayarlandı ve çözeltideki analitik derişimi 0,1 M olacak şekilde seyreltildi. Farklı pH ve derişimlerdeki tampon çözeltileri hazırlamak için aynı yol izlendi. Tampon çözelti buzdolabında +4 °C’de saklandı.

Enzim çözeltisi: Toplam aktivitesi 21200 ünite olan glukoz oksidaz enziminden 0,1 g alındı ve pH'sı 7 olan 0,1 M fosfat tamponunda çözüldükten sonra hacim ölçülü balonda 10 mL'ye tamamlandı (2120 ünite/mL). Deney sırasında kullanılacak olan enzim çözeltisi buzdolabında bekletildi. Çözelti uzun süre kullanılmadığı zaman derin dondurucuda saklandı.

Glukoz çözeltisi: 1,9817 gram tartılan glukoz, pH'sı 7 olan 0,1 M fosfat tamponuyla tamamlanarak 1 M 10 mL stok çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden belirli bir miktar alınarak ve aynı şekilde 0,1 M fosfat tamponu ile seyreltilerek $1,0 \times 10^{-1}$ M- $1,0 \times 10^{-4}$ M 10 mL glukoz çözeltileri hazırlandı. Farklı pH'larda glukoz platin yüzeyde elektropolimerleşmesi gerçekleştirildi. Elektrokimyasal hücreye pH çözeltisi hazırlamak için 0,1 M fosfat tamponu, 1 M NaOH ve 1 M HCl ile istenilen pH'lara ayarlandı ve aynı yol izlendi. Hazırlanan glukoz çözeltisi en fazla 7 gün kullanıldı. Bu süre içinde buzdolabında muhafaza edildi.

Sodyum perklorat: Katı sodyum perklorattan 12,5 gram tartılıp 1 M 100 mL stok NaClO_4 çözeltisi hazırlandı.

Askorbik asit çözeltisi: Katı askorbik asitten 0,044 gram tartılarak pH=7,5 olan 0,1 M fosfat tamponunda $1,0 \times 10^{-2}$ M 25 mL stok askorbik asit çözeltisi hazırlandı. Farklı derişimlerdeki askorbik asit çözeltileri, stok askorbik asit çözeltisinden belli hacimlerde alınarak fosfat tamponuyla seyreltilerek hazırlandı.

Ürik asit çözeltisi: Katı ürik asitten 0,042 gram tartılarak 0,1 M Li_2CO_3 çözeltisinde çözüldükten sonra pH=7,5 olan 0,1 M fosfat tamponu eklenerek $1,0 \times 10^{-2}$ M 25 mL stok ürik asit çözeltisi hazırlandı. Farklı derişimlerdeki ürik asit çözeltileri, stok ürik asit çözeltisinden belli hacimlerde alınarak fosfat tamponuyla seyreltilerek hazırlandı.

Parasetamol çözeltisi (asetaminofen): Katı parasetamolden 0,037 gram tartılarak, üzerine pH=7,5 olan 0,1 M fosfat tamponu eklenip $1,0 \times 10^{-2}$ M 25 mL stok parasetamol çözeltisi hazırlandı. Farklı derişimlerdeki parasetamol çözeltileri stok parasetamol çözeltisinden belli hacimlerde alınarak fosfat tamponuyla seyreltilerek hazırlandı.

Sodyum hidroksit çözeltisi: Katı sodyum hidroksitten 1,01 gram tartılıp saf suda çözülerek 1 M 25 mL çözeltisi hazırlandı.

Hidroklorik asit çözeltisi: Derişik HCl'den 2,3 mL alınıp saf su ile seyreltilerek 1 M 25 mL çözeltisi hazırlandı.

3.3. Platin Yüzeye Polianilin-Polipirol Kaplanması

Elektrot yüzeyinin temizlenmesi: Kaplama işleminden önce platin levhanın yüzeyi mekanik, kimyasal ve elektrokimyasal olarak temizlendi. İlk olarak platin yüzeyi sıfır numara zımpara ile parlatıldı, daha sonra aleve tutuldu. 5 dakika süre ile aseton, etil alkol, derişik HCl ve derişik nitrik asit içerisinde bekletildi. Tekrar saf su ile yıkandı, kurutuldu ve yüzeydeki su uzaklaştırıldı. Her kaplama işleminden önce yüzey bu şekilde temizlendi [74].

Temizlenmiş Pt levha elektrodunun yüzeyi polianilin-polipirol-dodesilbenzen sülfonat film ile kaplandı. Polianilin ve polipirol, elektrot yüzeyine anilinin ve pirolün elektropolimerleşmesi ile biriktirildi. Elektropolimerleşmede üçlü elektrot sistemi kullanıldı. Çalışma elektrodu olarak platin levha (0,5 cm²), karşıt elektrot olarak platin tel ve referans elektrot olarak da Ag/AgCl elektrot kullanıldı. Polianilin-polipirol-dodesilbenzen sülfonat filmi 2 aşamada oluşturuldu. Polianilin film elde etmek amacıyla anilin hücre içi derişimi 0,15 M olacak şekilde 106 µL anilin, 9,894 mL sülfürik asit eklenmesiyle toplam 10 mL'lik bir çözelti hazırlandı. Bu çözeltiye temizlenmiş platin elektrot daldırıldı ve 10 dakika argon gazı geçirilerek çözeltideki oksijen uzaklaştırıldı. Elektropolimerizasyon işlemi dönüşümlü voltametri tekniği ile -1,2 V - +1,0 V potansiyelleri arasında, 20 mV/s tarama hızında ve 10 çevrimde yapıldı. Kaplama işleminden sonra elektrot yüzeyi saf su ile temizlendikten sonra elektrot üzerine polipirol-dodesilbenzen sülfonat kaplamak üzere pirol hücre içi derişimi 0,15 M olacak şekilde 106 µL pirol, 5 mL dodesilbenzen sülfonat, 4,894 mL saf su eklenmesiyle toplam 10 mL'lik bir çözelti hazırlandı. Bu polianilin kaplı platin elektrot daldırıldı ve 10 dakika argon gazı geçirilerek çözeltideki oksijen uzaklaştırıldı. Elektropolimerizasyon işlemi dönüşümlü voltametri tekniği ile -0,80 V - +0,80 V potansiyelleri arasında, 20 mV/s tarama hızında ve 4 çevrimde yapıldı. Kaplama işleminden sonra elektrot yüzeyi saf su ile yıkandıktan sonra

kullanılmak üzere tampon çözelti içinde bekletildi. Böylece platin/polianilin-polipirol (Pt/PANI-PPy) elektrot hazırlandı.

3.4. Platin/Polianilin-Polipirol (Pt/PANI-PPy) Elektrot İçin En İyi Çalışma Koşullarının Araştırılması

3.4.1. Çalışma potansiyelinin belirlenmesi

Bölüm 3.3’de anlatıldığı gibi hazırlanan Pt/PANI-PPy elektrot, Ag/AgCl elektrot ve platin tel pH’sı 7,0 olan 9 mL fosfat tamponu ve 1 mL 1 M sodyum perklorattan oluşan hücreye batırıldı. Kararlı bir akım elde etmek için 0,40 V’da dengeye bırakıldı ve denge akımı kaydedildi. Daha sonra elektrokimyasal hücreye artan derişimlerde hidrojen peroksit çözeltisi eklendi, her bir ilaveden sonra 300 saniye karıştırıldı [39] ve 0,40 V sabit potansiyelde 200 saniye sonunda akım değerleri okundu ve kaydedildi. Okunan akım değerleri ile denge akımı arasındaki farklar alınarak her bir derişim için Δi değerleri hesaplandı. Elde edilen akım farkları (Δi) hidrojen peroksit derişimine karşı grafiğe geçirildi. 0,50 V, 0,60 V ve 0,70 V potansiyelleri için de aynı işlemler gerçekleştirildi.

Elde edilen akım farkları (Δi) hidrojen peroksit derişimine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.2) ve grafikten elektropolimerleme için en iyi çalışma potansiyeli belirlendi.

3.4.2. Anilin derişiminin etkisi

Bölüm 3.3’de anlatıldığı gibi Pt/PANI-PPy elektrot hazırlanırken kullanılan elektrokimyasal hücredeki anilin derişiminin elektrodun hidrojen peroksit duyarlılığına etkisini incelemek amacıyla, elektropolimerleştirme işlemi 3 farklı anilin derişiminde gerçekleştirildi: 0,1 M; 0,15 M; 0,2 M. Elektrokimyasal hücreye hücre içi derişimi 0,05 M olacak şekilde anilin, 9,965 ml sülfürik asit konuldu. Bu çözeltiye temizlenmiş platin elektrot, Ag/AgCl elektrot ve platin tel daldırıldı. Daha sonra 10 dakika argon gazı geçirilerek ortamdan oksijen uzaklaştırıldı. -1,2 V - +1,0 V’da anilinin sülfürik asitli ortamda platin yüzeyde elektropolimerleşmesi gerçekleştirildi. Elektrokimyasal hücreye pH değeri 7,0 olan fosfat tamponu çözeltisinden 9 mL ve 1 M sodyum perklorat çözeltisinden 1 mL ilave edildi. Kararlı bir akım elde etmek için 0,40 V sabit potansiyelde dengeye getirildi. Daha sonra elektrokimyasal hücreye artan derişimlerde hidrojen peroksit

çözeltisi ilave edildi. 300 saniye karıştırıldı ve sabit potansiyelde 200 saniye sonunda akımlar kaydedildi. Bu işlemler diğer 0,15 M; 0,2 M anilin derişimleri için de gerçekleştirildi. Elde edilen akım farkları hidrojen peroksit derişimine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.3) ve grafikten elektropolimerleşme için en iyi anilin derişimi belirlendi.

3.4.3. Pirol derişiminin etkisi

Bölüm 3.3’de anlatıldığı gibi Pt/PANI-PPy film elektrot hazırlanırken kullanılan elektrokimyasal hücredeki pirol derişiminin elektrodun hidrojen peroksit duyarlılığına etkisini incelemek amacıyla elektropolimerleştirme işlemi 5 farklı pirol derişiminde gerçekleştirildi: 0,025, 0,05 M; 0,1 M; 0,15 M; 0,2 M. Elektrokimyasal hücreye, hücre içi derişimi 0,05 M olacak şekilde pirol, 5 mL DBS ve 4,9645 mL su konuldu. Bu çözeltiye polianilin kaplı platin elektrot, Ag/AgCl elektrot ve platin tel daldırıldı. Daha sonra 10 dakika argon gazı geçirilerek ortamdan oksijen gazı uzaklaştırıldı. -0,80 V - +0,80 V’da pirolün dodesilbenzen sülfonatlı ortamda platin yüzeyde elektropolimerleşmesi gerçekleştirildi.

Elektrokimyasal hücreye pH değeri 7,0 olan fosfat tamponu çözeltisinden 9 mL ve 1 M sodyumperklorat çözeltisinden 1 mL ilave edildi. Kararlı bir akım elde etmek için elektrot 0,40 V sabit potansiyelde dengeye getirildi ve denge akımı kaydedildi. Daha sonra elektrokimyasal hücreye artan derişimlerde hidrojen peroksit çözeltisi ilave edildi, her bir ilaveden sonra 300 saniye karıştırıldı ve 0,40 V sabit potansiyelde 200 saniye sonunda akım değerleri okundu ve kaydedildi. Okunan akım değerleri ile denge akımı arasındaki farklar alınarak her bir derişim için Δi değerleri hesaplandı. Elde edilen akım farkları (Δi) hidrojen peroksit derişimine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.4). Aynı işlemler 0,025 M; 0,1 M; 0,15 M; 0,2 M pirol derişimleri için de gerçekleştirildi. Elde edilen grafikten elektropolimerleşme için en iyi pirol derişimi belirlendi.

3.4.4. Dodesil benzen sülfonat derişiminin etkisi

Bölüm 3.3’de anlatıldığı gibi Pt/PANI-PPy elektrot hazırlanırken kullanılan elektrokimyasal hücredeki dodesilbenzen sülfonat derişiminin elektrodun hidrojen peroksit duyarlılığına etkisini incelemek amacıyla, elektropolimerleştirme işlemi 3 farklı DBS derişiminde gerçekleştirildi: 0,05 M; 0,1 M; 0,15 M. Elektrokimyasal hücreye hücre

içi derişimi 0,05 M olacak şekilde 2,5 mL DBS, 106 µL pırol ve 7,394 mL su konuldu. Bu çözeltiye polianilin kaplı platin elektrot, Ag/AgCl elektrot ve platin tel daldırıldı. Daha sonra 10 dakika argon gazı geçirilerek ortamdan oksijen uzaklaştırıldı. -1,2 V - +1,0 V'da pırolün dodesil benzen sülfonatlı ortamda değeri 7,0 olan fosfat tamponu çözeltisinden 9 mL ve 1 M sodyumperklorat çözeltisinden 1 mL ilave edildi. Kararlı bir akım elde etmek için 0,4 V sabit potansiyelde dengeye getirildi ve denge akımı kaydedildi. Daha sonra elektrokimyasal hücreye artan derişimlerde hidrojen peroksit çözeltisi ilave edildi, her bir ilaveden sonra 300 saniye karıştırıldı ve 0,4 V sabit potansiyelde 200 saniye sonunda akım değerleri okundu ve kaydedildi. Okunan akım değerleri ile denge akımı arasındaki farklar alınarak her bir derişim için Δi değerleri hesaplandı. Elde edilen akım farkları (Δi) hidrojen peroksit derişimine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.5). Aynı işlemler 0,1 M; 0,15 M DBS derişimleri için de gerçekleştirildi. Elde edilen grafikten elektropolimerleşme için en iyi DBS derişimi belirlendi.

3.4.5. Polianilin için çevrim sayısının etkisi

Bölüm 3.3'de anlatıldığı gibi hazırlanan polianilin film elektrodunun film kalınlığının, elektrodun hidrojen peroksit duyarlılığına etkisi farklı çevrimlerde kaplama işlemi gerçekleştirilerek incelendi. Bu amaçla platin elektrot 8 çevrim, 10 çevrim, 12 çevrimde anilinin hücre içi derişimi 0,15 M olacak şekilde bölüm 3.3'de anlatıldığı gibi kaplandı ve her bir elektrot pH'sı 7,0 olan fosfat tamponu çözeltisinden 9 mL ve 1 mL sodyum perklorat çözeltisinden oluşan elektrokimyasal hücre içerisinde 0,4 V'da dengeye getirildi ve denge akımı kaydedildi. Denge işleminden sonra elektrokimyasal hücreye artan derişimlerde hidrojen peroksit çözeltisi ilave edildi, her bir ilaveden sonra 300 saniye karıştırıldı ve 0,4 V sabit potansiyelde 200 saniye sonunda akım değerleri okundu ve kaydedildi. Okunan akım değerleri ile denge akımı arasındaki farklar alınarak her bir derişim için Δi değerleri hesaplandı. Elde edilen akım farkları (Δi) hidrojen peroksit derişimine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.6) ve grafikten en uygun çevrim sayısı belirlendi.

3.4.6. Polipırol için çevrim sayısının etkisi

Bölüm 3.3'de anlatıldığı gibi hazırlanan Pt/PANI-PPy film elektrodunun film kalınlığının, elektrodun hidrojen peroksit duyarlılığına etkisi farklı çevrimlerde kaplama işlemi gerçekleştirilerek incelendi.

Bu amaçla platin elektrot 2 çevrim, 4 çevrim, 6 çevrim; pirolün hücre içi derişimi 0,15 M; DBS'nin hücre içi derişimi 0,1 M olacak şekilde bölüm 3.3'de anlatıldığı gibi kaplandı ve her bir elektrot pH'sı 7,0 olan fosfat tamponu çözeltisinden 9 mL ve 1 mL sodyum perklorat çözeltisinden oluşan elektrokimyasal hücre içerisinde 0,4 V'da dengeye getirildi ve denge akımı kaydedildi. Denge işleminden sonra elektrokimyasal hücreye artan derişimlerde hidrojen peroksit çözeltisi ilave edildi, her bir ilaveden sonra 300 saniye karıştırıldı ve 0,4 V sabit potansiyelde 200 saniye sonunda akım değerleri okundu ve kaydedildi. Okunan akım değerleri ile denge akımı arasındaki farklar alınarak her bir derişim için Δi değerleri hesaplandı. Elde edilen akım farkları (Δi) hidrojen peroksit derişimine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.7) ve grafikten en uygun çevrim sayısı belirlendi.

3.4.7. Pt/PANI-PPy film elektrodun SEM analizi

Bölüm 3.3'de anlatıldığı gibi hazırlanan Pt/PANI-PPy film elektrodun en iyi çalışma koşulları belirlendikten sonra film elektrodun SEM analizi yapılması için değişik yüzey fotoğrafları çekildi ve çekilen fotoğraflar arasından en uygun olan görüntü seçildi (Şekil 4.10).

3.4.8. Pt/PANI-PPy film elektrodun AFM analizi

Bölüm 3.3'de anlatıldığı gibi hazırlanan Pt/PANI-PPy film elektrodun en iyi çalışma koşulları belirlendikten sonra film elektrodun AFM analizi yapılması için değişik yüzey fotoğrafları çekildi ve çekilen fotoğraflar arasından en uygun olan görüntü seçildi (Şekil 4.12).

3.4.9. Pt/PANI-PPy film elektrodun yüzey temas açısı analizi

Bölüm 3.3'de anlatıldığı gibi hazırlanan Pt/PANI-PPy film elektrodun en iyi çalışma koşulları belirlendikten sonra film elektrodun yüzey temas açısı analizi yapılması için değişik yüzey fotoğrafları çekildi ve çekilen fotoğraflar arasından en uygun olan görüntü seçildi (Şekil 4.14).

3.5. Pt/PANI-PPy Film Elektrot İle Serbest Enzim Çalışması

Bölüm 3.3’de anlatıldığı gibi hazırlanan elektrot; pH’sı 7,0 olan 0,1 M 9 mL fosfat tamponu ve 1 mL 1 M destek elektrolit (NaClO_4) bulunan çözeltiye daldırılarak 0,40 V’da dengeye getirildi. Ardından 50 μL glukoz oksidaz enzimi ilave edilerek enzimli ortamda dengeye gelmesi beklendi ve denge akımı kaydedildi. Daha sonra artan derişimlerde glukoz çözeltisi ilaveleri yapıldı. Her bir ilaveden sonra 300 saniye karıştırıldı ve 0,40 V sabit potansiyelde 200 saniye sonunda akım değerleri okundu ve kaydedildi. Okunan akım değerleri ile denge akımı arasındaki farklar alınarak her bir derişim için Δi değerleri hesaplandı. Elde edilen akım farkları (Δi) glukoz derişimine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.8).

3.6. Biyosensörün Hazırlanması

Glukoz oksidaz enzimi, polimerin elektrot yüzeyinde elektropolimerleşmesi sırasında ortama konularak, polimere hapsedme yöntemiyle immobilize edildi. İmmobilizasyon için üçlü elektrot sistemi kullanıldı (Şekil 3.1). Çalışma elektrodu olarak platin levha (0,5 cm^2), karşıt elektrot olarak platin tel ve referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrot kullanıldı. Bölüm 3.3’de anlatıldığı gibi platin levha, ilk olarak anilin ile kaplandı. Daha sonra anilin ile kaplı olan platin levha, Ag/AgCl elektrot ve platin tel 106 μL piro; 5 mL dodesil benzen sülfonat; 500 μL glukoz oksidaz (2120 ünite/mL) enzimi, 4,394 mL saf su içeren 10 mL’lik hücre içerisine daldırıldı ve 10 dakika argon gazı geçirilerek çözeltideki oksijen uzaklaştırıldı. Elektropolimerizasyon işlemi dönüşümlü voltametri tekniği ile -0,8 V - +0,8 V potansiyelleri arasında, 20 mV/s tarama hızında ve 4 çevrimde yapıldı. Glukoz oksidaz hapsedme yöntemiyle immobilize edilmiş oldu. Elde edilen Pt/Polianilin-Polipiro;glukoz oksidaz (Pt/PANI-PPy-GOx) enzim elektrodunun yüzeyi bol saf su ile yıkandı. Biyosensör kullanılmadığı zamanlarda buzdolabında +4 °C’de fosfat tamponunda bekletildi.

3.6.1. Pt/PANI-PPy-GOx biyosensörünün SEM analizi

Bölüm 3.6’da anlatıldığı gibi hazırlanan biyosensörün SEM analizi yapılmak için değişik yüzey fotoğrafları çekildi ve çekilen fotoğraflar arasından en uygun olan görüntü seçildi. Pt/PANI-PPy film elektrot ile Pt/PANI-PPy-GOx biyosensörünün SEM fotoğrafları (Şekil 4.11) karşılaştırıldı.

3.6.2. Pt/PANI-PPy-GOx biyosensörünün AFM analizi

Bölüm 3.6’da anlatıldığı gibi hazırlanan biyosensörün AFM analizi yapılmak için değişik yüzey fotoğrafları çekildi ve çekilen fotoğraflar arasından en uygun olan görüntü seçildi. Pt/PANI-PPy film elektrot ile Pt/PANI-PPy-GOx biyosensörünün AFM fotoğrafları (Şekil 4.13) karşılaştırıldı.

3.6.3. Pt/PANI-PPy-GOx biyosensörünün yüzey temas açısı analizi

Bölüm 3.6’da anlatıldığı gibi hazırlanan biyosensörün yüzey temas açısı analizi yapılmak için değişik yüzey fotoğrafları çekildi ve çekilen fotoğraflar arasından en uygun olan görüntü seçildi. Pt/PANI-PPy film elektrot ile Pt/PANI-PPy-GOx biyosensörünün yüzey temas açısı fotoğrafları (Şekil 4.15) karşılaştırıldı.

3.7. Biyosensörün Duyarlılığının Belirlenmesi

Bölüm 3.6’da anlatıldığı gibi hazırlanan Pt/PANI-PPy-GOx biyosensörünün glukoz duyarlılığının belirlenmesi için üçlü elektrot sistemi kullanıldı (Şekil 3.1). Üçlü elektrot sisteminde çalışma elektrodu olarak hazırlanan biyosensör, referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrot, karşıt elektrot olarak ise platin tel kullanıldı. Elektrokimyasal hücreye pH’sı 7,0 olan fosfat tamponu çözeltisinden 9 mL ve 1 M’lık destek elektrolit (NaClO_4) çözeltisinden 1 mL konuldu. Kararlı bir akım elde etmek için 0,40 V sabit potansiyelde biyosensör dengeye getirildi ve denge akımı kaydedildi. Kararlı hale gelmesinden sonra farklı derişimlerde hazırlanan glukoz çözeltilerinden ilaveler yapıldı. Her bir ilaveden sonra çözelti 300 saniye karıştırıldı ve 0,40 V sabit potansiyelde 200 saniye sonunda akım değerleri okundu ve kaydedildi. Okunan akım değerleri ile denge akımı arasındaki farklar alınarak her bir derişim için Δi değerleri hesaplandı. Elde edilen akım farkları (Δi) glukoz derişimine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.9) ve grafikten glukoz için duyarlı çalışma aralığı belirlendi.

3.8. Biyosensörün En İyi Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

Biyosensörün en iyi çalışma koşullarının belirlenmesi için pH’nın etkisi, sıcaklığın etkisi, substrat derişiminin etkisi, biyosensörün tekrar kullanılabilirliği, girişim etkisi ve raf ömrünün belirlenmesi çalışıldı.

3.8.1. pH'nın etkisi

Bölüm 3.6'da anlatıldığı gibi hazırlanan ve kararlı hale getirilen biyosensörün amperometrik cevap akımı üzerine pH'nın etkisini incelemek amacıyla sekiz farklı pH değerinde biyosensörün amperometrik cevap akımları ölçüldü. Her bir tampon çözeltisiyle ayrı ayrı $1,0 \times 10^{-2}$ M'lık glukoz çözeltileri hazırlandı. Hücre içine pH değeri 5,5 olan tampon çözeltisinden 9 mL ve 1 M'lık destek elektrolit (NaClO_4) çözeltisinden 1 mL konuldu. Kararlı bir akım elde etmek için biyosensör bu çözeltide 0,40 V'da dengeye getirildi ve denge akımı kaydedildi. Daha sonra pH değeri 5,5 olan tampon çözeltisi ile hazırlanan glukoz çözeltisinden hücre içi glukoz derişimi $5,0 \times 10^{-5}$ M olacak şekilde hücreye ilave edildi. 300 saniye karıştırıldı ve 0,40 V sabit potansiyelde 200 saniye sonunda akım değeri kaydedildi ve denge akımıyla farkı alınarak pH 5,5 için Δi değeri hesaplandı. Aynı işlemler pH değeri 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0 olan fosfat tamponları için tekrarlandı. Okunan akım değerleri ile denge akımı arasındaki farklar alınarak her bir pH ortamı için Δi değerleri hesaplandı. Farklı pH değerlerindeki her bir çözelti için sabit potansiyelde elde edilen akım farkları (Δi) pH'ya karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.16) ve grafikten biyosensörün en iyi çalışma pH değeri belirlendi.

3.8.2. Sıcaklığın etkisi

Bölüm 3.6'da anlatıldığı gibi hazırlanan ve kararlı hale getirilen biyosensörün amperometrik cevap akımı üzerine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla on bir farklı sıcaklık değerinde biyosensörün amperometrik cevap akımları ölçüldü. Hücre içine pH'sı 7,5 olan tampon çözeltisinden 9 mL ve 1 M'lık destek elektrolit (NaClO_4) çözeltisinden 1 mL konuldu. Su banyosu kullanılarak hücre içindeki çözeltinin sıcaklığı 20 °C olacak şekilde ayarlandı. 0,40 V sabit potansiyelde dengeye getirildi ve denge akımı kaydedildi. Sonra hücre içi derişimi $5,0 \times 10^{-5}$ M olacak şekilde glukoz çözeltisi ilave edildi. İlave sonrasında 300 saniye karıştırıldı ve 0,40 V sabit potansiyelde 200 saniye sonunda akım değeri kaydedildi ve denge akımıyla farkı alınarak 20 °C için Δi değeri hesaplandı. Aynı işlemler 25 °C; 30 °C; 35 °C; 40 °C; 45 °C; 50 °C; 55 °C; 60 °C; 65 °; 70 °C sıcaklıkları için tekrarlandı. Okunan akım değerleri ile denge akımı arasındaki farklar alınarak her bir sıcaklık için Δi değerleri hesaplandı. Sıcaklığa karşı ölçülen bu akım farkları grafiğe geçirildi (Şekil 4.17) ve grafikten biyosensörün en iyi çalışma sıcaklık değeri belirlendi.

3.8.3. Substrat derişiminin etkisi

Bölüm 3.6’da anlatıldığı gibi hazırlanan biyosensörün glukoza cevabı ve çalışma aralığı belirlendi. Biyosensör, pH’sı 7,5 olan 0,1 M 9 mL destek elektrolit (NaClO_4) ve 1 mL 1 M sodyum perklorat bulunan çözeltiye daldırıldı. 0,40 V sabit potansiyelde dengeye getirilerek denge akımı kaydedildi. Daha sonra $1,0 \times 10^{-7}$ M - $1,0 \times 10^{-1}$ M hücre içi derişim aralığında glukoz ilaveleri yapıldı. Her bir ilaveden sonra çözelti 300 saniye karıştırıldı ve 0,40 V sabit potansiyelde 200 saniye sonundaki akım değerleri okundu ve kaydedildi. Okunan akım değerleri ile denge akımı arasındaki farklar alınarak her bir glukoz derişimi için Δi değerleri hesaplandı. Glukoz derişimine karşı ölçülen bu akım farkları grafiğe geçirildi (Michaelis-Menten eğrisi) (Şekil 4.18). Çizilen bu grafikten yararlanılarak biyosensörün çalışma aralığı belirlendi. Ayrıca elde edilen verilerden Lineweaver-Burk Grafiği çizildi ve bu grafikten yararlanarak glukoz oksidaz enzimine özgü K_m (gözlenen) ve V_{mak} (gözlenen) değerleri belirlendi (Şekil 4.19).

3.8.4. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi

Bölüm 3.6’da anlatıldığı gibi hazırlanan ve kararlı hale getirilen enzimsiz ve enzimli biyosensörün optimum şartlarda tekrar kullanılabilirliğini belirlemek amacıyla hücre içi derişimi $5,0 \times 10^{-5}$ M olacak şekilde glukoz çözeltileri ile arka arkaya ölçümler yapıldı. Okunan akım değerleri ile denge akımı arasındaki farklar alınarak Δi değerleri hesaplandı. Bu ölçümler sonucunda elde edilen amperometrik cevap akımlarına karşı ölçme sayısı grafiğe geçirildi (Şekil 4.21) ve bu grafikten ölçülen akım değışiklikleri kullanılarak elektrodun tekrar kullanılabilme sayısı belirlendi.

3.8.5. Biyosensörün raf ömrünün belirlenmesi

Bölüm 3.6’da anlatıldığı gibi hazırlanan ve kararlı hale getirilen biyosensörün raf ömrünü belirlemek için 35 gün boyunca değışik zaman aralıklarında $5,0 \times 10^{-5}$ M glukoz derişiminde biyosensörün amperometrik cevap akımı ölçüldü. Okunan akım değerleri ile denge akımı arasındaki farklar alınarak Δi değerleri hesaplandı. Yapılan ölçümler sonucunda elde edilen amperometrik cevap akımları saklama süresine karşı grafiğe geçirilerek biyosensörün raf ömrü belirlendi (Şekil 4.22). Raf ömrünü belirleme süresince

+4 °C’da buzdolabında fosfat tamponu içinde bekletilen biyosensörün zaman geçtikçe polimerden enzimin sızıp sızmadığı kontrolü yapıldı.

3.8.6. Biyosensör üzerine girişim yapan maddeler

Bölüm 3.6’da anlatıldığı gibi hazırlanan ve kararlı hale getirilen biyosensörün optimum şartlarda elde edilen amperometrik cevap akımı üzerine biyolojik sıvılarda var olan ve girişim etkisi yapabilecek bazı maddelerden ürik asit, parasetamol (asetaminofen) ve askorbik asidin girişim etkileri incelendi.

Parasetamolün (asetaminofen) girişim etkisinin incelenmesi

Bölüm 3.6’da anlatıldığı gibi hazırlanan ve kararlı hale getirilen biyosensörün cevap akımı üzerine parasetamolün girişim etkisini incelemek üzere hazırlanan stok parasetamol çözeltisinden, glukoz derişiminin 5×10^{-5} M olduğu hücre ortamına, kandaki sınır değeri olan $1,0 \times 10^{-6}$ M olacak şekilde ilave edildi. Daha sonra 0,40 V sabit potansiyelde amperometrik cevap akımı ölçüldü. Okunan akım değeri ile denge akımı arasındaki fark alınarak Δi değerleri hesaplandı. Aynı çözelti üzerine hücre içi derişimi 1×10^{-4} M olacak şekilde parasetamol eklendi. 300 s karıştırılıp 200 s sonundaki akım okundu ve denge akımı ile arasındaki fark alınarak glukoz ve parasetamolün neden olduğu toplam cevap akımı kaydedildi. Bu toplam akımdan 5×10^{-5} M glukozun neden olduğu cevap akımı çıkarılarak 1×10^{-4} M parasetamolün sebep olduğu cevap akımı bulundu. Bulunan bu akım toplam cevap akımına oranlanarak 1×10^{-4} M parasetamolün yüzde girişimi hesaplandı.

Aynı çözelti üzerine hücre içi derişimi $1,0 \times 10^{-5}$ M olacak şekilde parasetamol ilavesi yapıldı. Aynı işlemler uygulanarak $1,0 \times 10^{-5}$ M parasetamol yüzde girişimi hesaplandı. (Çizelge 4.2).

Ürik asidin girişim etkisinin incelenmesi

Bölüm 3.6’da anlatıldığı gibi hazırlanan ve kararlı hale getirilen biyosensörün amperometrik cevap akımı üzerine ürik asidin girişim etkisini incelemek üzere hücre içi derişimi 5×10^{-5} M olacak şekilde ürik asit ilavesi yapıldı. Çözelti 300 saniye karıştırılıp, 200 saniye sonundaki akım okundu ve denge akımı ile arasındaki fark alınarak; $1,0 \times 10^{-4}$ M glukozun sebep olduğu cevap akımı kaydedildi. Aynı çözelti üzerine hücre içi derişimi

$3,0 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde ürik asit ilavesi yapıldı. Çözelti 300 saniye karıştırılıp, 200 saniye sonundaki akım okundu ve denge akımı ile arasındaki fark alınarak; glukozun ve ürik asidin sebep olduğu toplam cevap akımı kaydedildi. Bu akımdan 5×10^{-5} M glukozun sebep olduğu cevap akımı çıkarılarak $3,0 \times 10^{-4}$ M ürik asidin sebep olduğu cevap akımı bulundu. Bulunan bu akım toplam cevap akımına oranlanarak $3,0 \times 10^{-4}$ M ürik asidin yüzde girişimi hesaplandı. Aynı çözelti üzerine hücre içi derişimi $5,0 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde ürik asit ilavesi yapıldı. Aynı işlemler uygulanarak $5,0 \times 10^{-4}$ M ürik asidin yüzde girişimi hesaplandı. (Çizelge 4.2).

Askorbik asidin girişim etkisinin incelenmesi

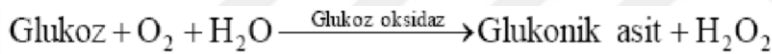
Bölüm 3.6'da anlatıldığı gibi hazırlanan ve kararlı hale getirilen biyosensörün amperometrik cevap akımı üzerine askorbik asidin girişim etkisini incelemek üzere hücre içi derişimi 5×10^{-5} M olacak şekilde glukoz ilavesi yapıldı. Çözelti 300 s karıştırılıp 200 s sonundaki akım okundu ve denge akımı ile arasındaki fark alınarak glukozun neden olduğu cevap akımı kaydedildi. Aynı çözelti üzerine hücre içi derişimi 1×10^{-4} M olacak şekilde askorbik asit eklendi. 300 s karıştırılıp 200 s sonundaki akım okundu ve denge akımı ile arasındaki fark alınarak glukoz ve askorbik asitin neden olduğu toplam cevap akımı kaydedildi. Bu toplam akımdan 5×10^{-5} M glukozdan kaynaklanan cevap akımı çıkarılarak 1×10^{-4} M askorbik asidin cevap akımı bulundu. Bulunan bu akım toplam cevap akımına oranlanarak 1×10^{-4} M askorbik asidin yüzde girişimi hesaplandı. Aynı çözelti üzerine hücre içi derişimi $1,0 \times 10^{-5}$ M olacak şekilde askorbik asit ilavesi yapıldı. Aynı işlemler uygulanarak $1,0 \times 10^{-5}$ M askorbik asidin yüzde girişimi hesaplandı. (Çizelge 4.2).



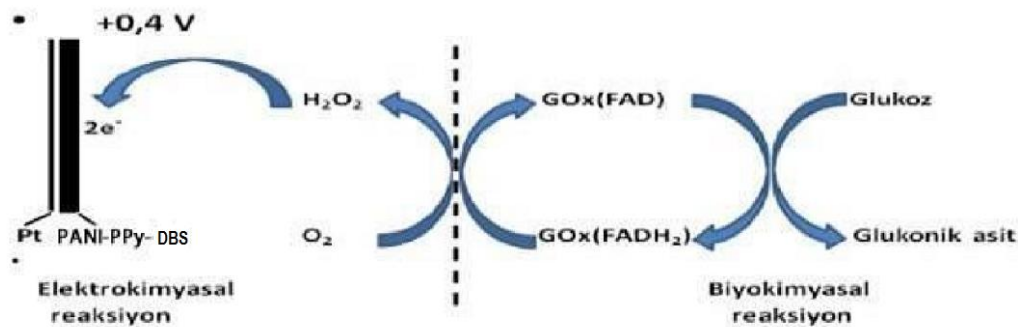
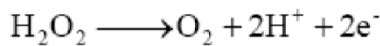
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada iletken polimer olan polipirol ve polianilin; platin yüzey üzerine dodesilbenzen sülfonatlı ortamda kaplandı. Bu şekilde hazırlanan film elektrodun en iyi çalışma şartları belirlendi. Bu amaçla çalışma potansiyeli, pirol derişimi, anilin derişimi, dodesilbenzen sülfonat derişimi, çevrim sayısı belirlendi. Bu film üzerine enzim hapsetme yöntemiyle immobilize edildi. Hazırlanan biyosensörün analitik ve biyokimyasal özellikleri incelendi. Film elektrot ve biyosensör yüzeyinin morfolojik yapısı SEM, AFM, Yüzey Temas Açısı ölçümü gibi yöntemlerle karakterize edildi. Biyosensör üzerine pH, sıcaklık, substrat derişimi, girişim etkisi incelendi. Ayrıca biyosensörün tekrarlanabilirliği ve raf ömrü belirlendi.

Glukoz oksidazın tutturulduğu PANI-PPy filmi çözeltideki glukoz ile temas ettiğinde oksijen varlığında glukoz oksidaz enziminin etkisiyle glukonik asit ve hidrojen peroksit oluşmaktadır.



Enzimatik reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksit elektrot yüzeyinde sabit bir potansiyelde yükseltgenmektedir [75]. Hidrojen peroksidin anodik akımındaki artış glukoz derişimiyle orantılıdır.



Şekil 4.1. Glukozun glukonik aside yükseltgenmesi sırasında elektrot yüzeyinde gerçekleşen elektron aktarımı

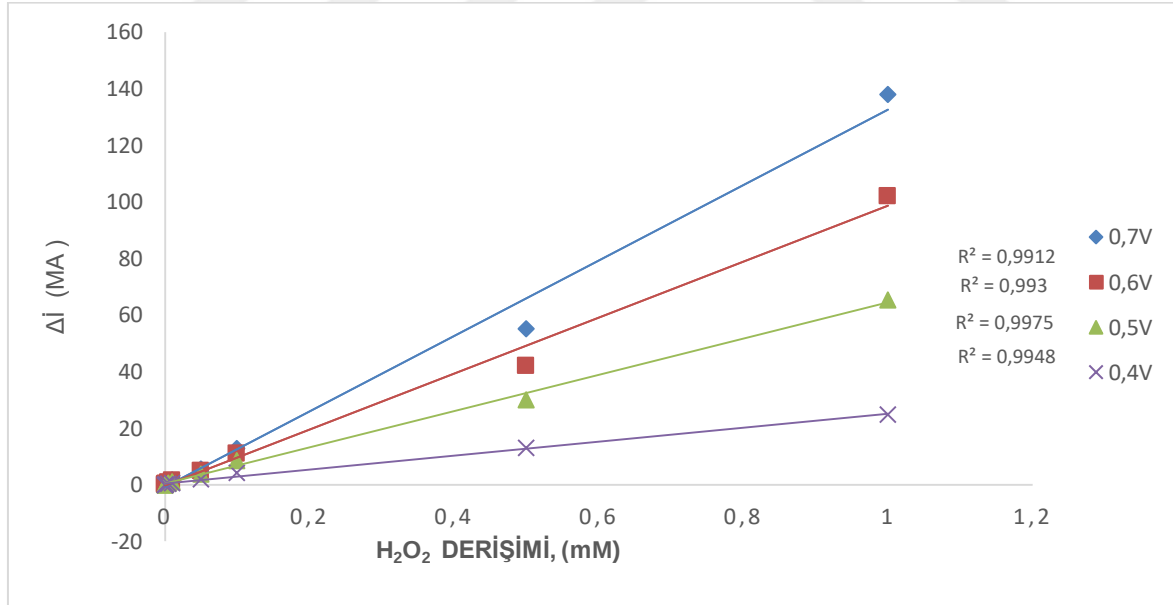
Çalışmada ilk olarak PANI-PPy filminin en iyi çalışma koşulları belirlenmiştir. Daha sonra bu filme glukoz oksidaz enzimi immobilize edilerek elde edilen biyosensörün biyokimyasal ve analitik özellikleri incelenmiş ve ilgili sonuçlarla yorumlar aşağıda verilmiştir.

4.1. Pt/PANI-PPy Elektrot İçin En İyi Çalışma Koşullarının Araştırılması

4.1.1. Çalışma potansiyelin belirlenmesi

Bölüm 3.3’de anlatıldığı gibi hazırlanan platin elektrot polianilin, polipirrol ve dodesilbenzen sülfonat ile kaplandı. Kaplama işlemi gerçekleştirildikten sonra 0,40 V; 0,50 V; 0,60 V ve 0,70 V olmak üzere dört farklı potansiyelde dengeye getirildi.

Sonra biyosensörün hidrojen perokside duyarlılığını belirlemek amacıyla yapılan hidrojen peroksit ilavelerinden sonra elde edilen akım farkları alınarak Δi değerleri hesaplandı ve hidrojen peroksit derişimine karşı grafiğe geçirildi, elde edilen grafik şekil 4.2’de verildi.



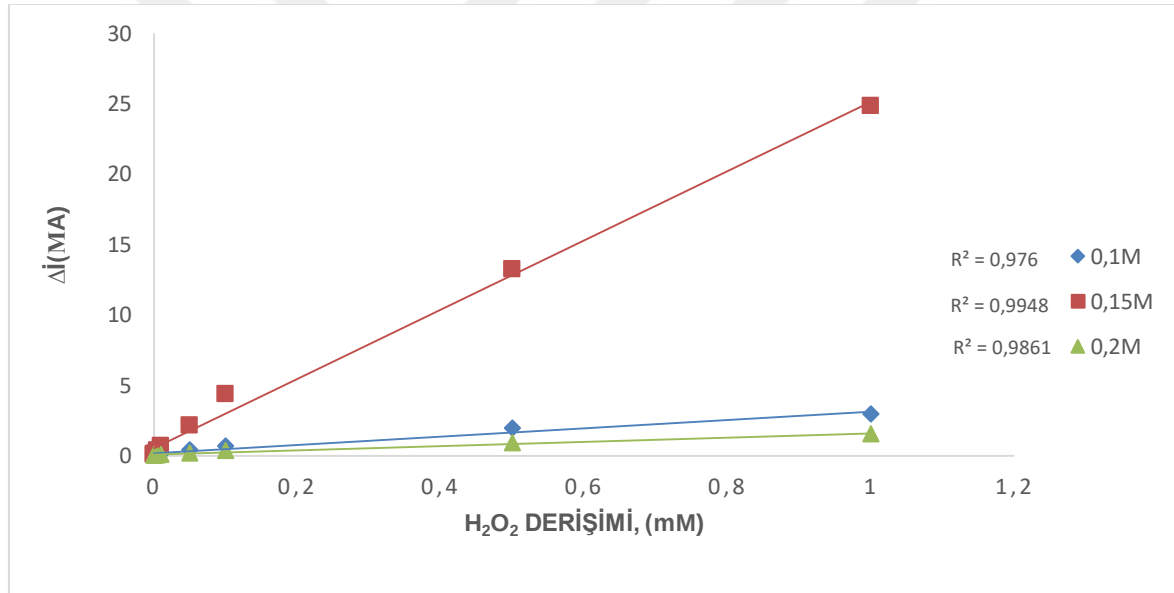
Şekil 4.2. Pt/PANI-PPy filmin elde edilme potansiyeli

Grafik incelendiğinde 0,70 V sabit potansiyelde elde edilen akım değerlerinin diğer potansiyellere göre daha yüksek olduğu ve 0,60 V potansiyelinde çizilen eğrinin doğrusallığının diğer potansiyellere göre daha iyi olduğu görülmektedir. Fakat yüksek potansiyel değerlerinde biyolojik sıvılarda bulunan bazı moleküllerin (askorbik asit, ürik

asit, parasetamol v.b.) girişim yapması nedeniyle girişimin daha az olacağı en düşük potansiyel olan 0,40 V seçildi. Ayrıca 0,40 V'daki yapılan ölçümler sonucu elde edilen grafiğin doğrusallığının daha iyi olduğu görülmektedir. Bu sebeplerden dolayı çalışma potansiyeli olarak 0,40 V seçildi.

4.1.2. Anilin derişiminin etkisi

Bölüm 3.3'de anlatıldığı gibi hazırlanan platin elektrotlar sülfürik asitli ortamda 0,1 M; 0,15 M; 0,02 M derişimlerdeki anilin ile kaplandı. Bu dört farklı derişimlerde kaplanarak oluşturulan elektrotların 0,40 V sabit potansiyelde hidrojen perokside olan duyarlılığı incelendi ve elde edilen grafik şekil 4.3'de verildi.

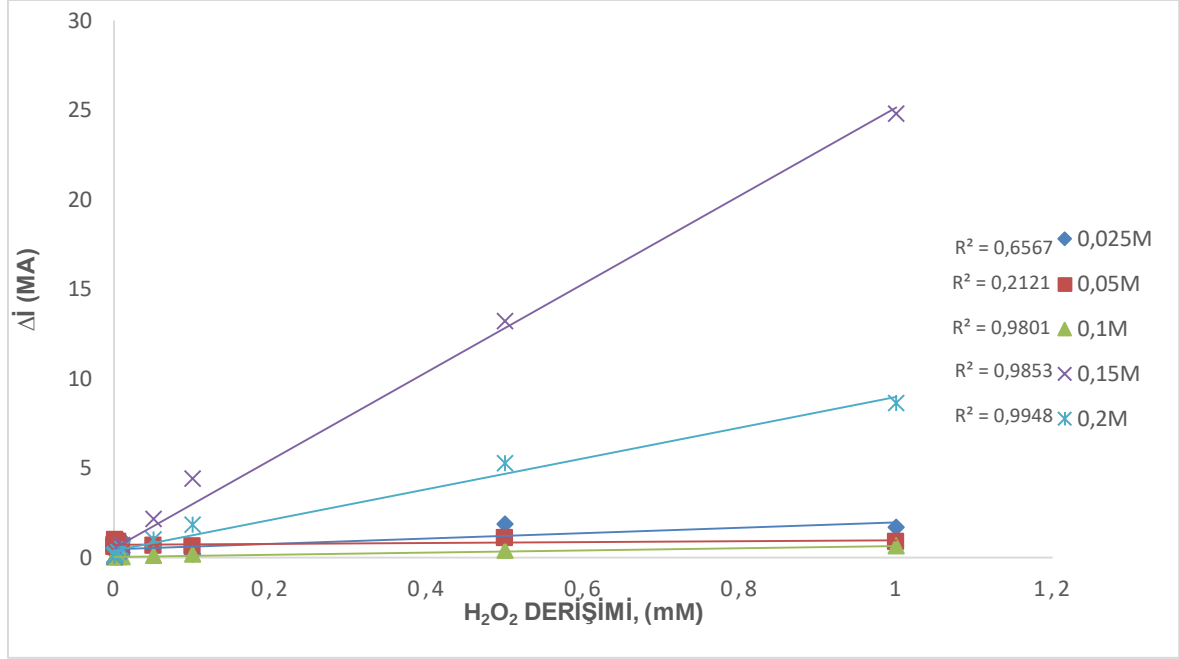


Şekil 4.3. Pt/PANI-PPy elektrodunun hidrojen perokside duyarlılığına anilin derişiminin etkisi

0,1 M ve 0,2 M anilin derişimlerinde yapılan kaplamalarda elde edilen elektrotlar kullanılarak çizilen eğrilerin akım değerlerinin düşük olduğu grafikte görülmektedir. 0,15 M anilin derişiminde çizilen kalibrasyon eğrisinin akım değerinin oldukça iyi olduğu görülmektedir. Anilin derişiminin düşük olduğu durumlarda kaplama sonucunda hazırlanan elektrottaki platin yüzeyinde çok ince bir film olduğu, yüksek derişimlerde ise filmin kalın olup akım iletiminin zor olduğu görüldü. Bundan dolayı en uygun anilin derişimi 0,15 M olarak seçildi.

4.1.3. Pirol derişiminin etkisi

Bölüm 3.3’de anlatıldığı gibi hazırlanan platin elektrotlar dodesilbenzen sülfonatlı ortamda 0,05 M; 0,1 M; 0,15 M; 0,2 M derişimlerdeki pirol ile kaplandı. Bu dört farklı derişimlerde kaplanarak oluşturulan elektrotların 0,40 V sabit potansiyelde hidrojen perokside olan duyarlılığı incelendi ve elde edilen grafik şekil 4.4’de verildi.

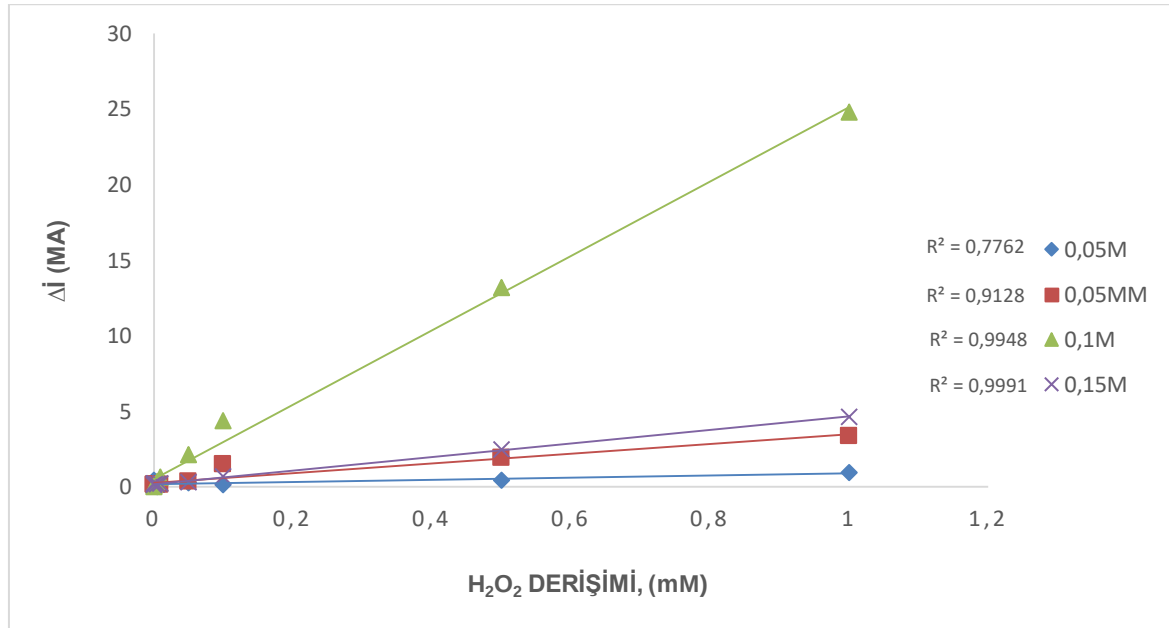


Şekil 4.4. Pt/PANI-PPy elektrodunun hidrojen perokside duyarlılığına pirol derişiminin etkisi

0,025 M; 0,05 M; 0,1 M ve 0,2 M pirol derişimlerinde yapılan kaplamalarda elde edilen elektrotlar kullanılarak çizilen eğrilerin akım değerlerinin düşük olduğu grafikten görülmektedir. 0,15 M’lık pirol derişiminde akımların diğerlerine göre yüksek olduğu görülmektedir. 0,15 M pirol derişiminde çizilen kalibrasyon eğrisinin akım değerlerinin oldukça iyi olduğu görülmektedir. Pirol derişiminin düşük olduğu durumlarda kaplama sonucunda hazırlanan elektrottaki platin yüzeyinde çok ince bir film oluştuğu, yüksek derişimlerde ise filmin kalın olup akım iletiminin zor olduğu görüldü. Bundan dolayı en uygun pirol derişimi 0,15 M olarak seçildi.

4.1.4. Dodesil benzen sülfonat derişiminin etkisi

Bölüm 3.3’de anlatıldığı gibi hazırlanan platin elektrotlar 0,15 M anilin ve 0,15 M pirollü ortamda 0,005 M; 0,05 M; 0,1 M; 0,15 M derişimlerdeki dodesilbenzen sülfonat ile kaplandı. Bu üç farklı derişimlerde kaplanarak oluşturulan elektrotların 0,40 V sabit potansiyelde hidrojen perokside olan duyarlılığı incelendi ve elde edilen grafik şekil 4.5’de verildi.



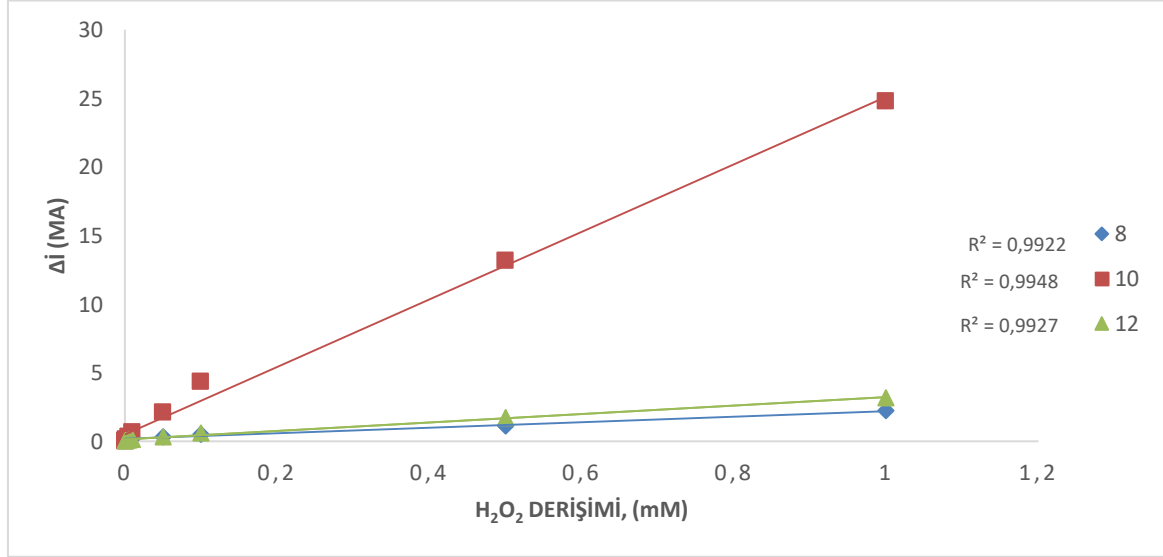
Şekil 4.5. Pt/PANI-PPy elektrodunun hidrojen perokside duyarlılığına dodesil benzen sülfonat derişiminin etkisi

0,005 M; 0,05 M; 0,1 M; 0,15 M; dodesil benzen sülfonat derişimlerinde yapılan kaplamalarda elde edilen elektrotlar kullanılarak çizilen eğrilerde doğrusallığın en iyi ve akımların en yüksek olduğu derişim 0,1 M olduğu grafikten görülmektedir. Bundan dolayı en uygun dodesilbenzen sülfonat derişimi 0,1 M olarak seçildi.

4.1.5. Polianilin için çevrim sayısının etkisi

Bölüm 3.3’de anlatıldığı gibi hazırlanan platin elektrotların cevabına çevrim sayısının etkisini belirlemek için elektrodu kaplamak için kullanılan çevrim sayısı değiştirildi ve 8 çevrim, 10 çevrim, 12 çevrim sayılarında kaplama işlemi gerçekleştirildi. En ince film kalınlığına sahip elektrot olarak 8 çevrim kaplama yapılarak elde edilen polianilin kaplı elektrot alındı. Daha sonra çevrim sayıları artırılarak kaplamalar gerçekleştirildi. Bu

şekilde hazırlanan 3 farklı çevrim sayısına sahip polianilin kaplı elektrotlarının hidrojen peroksit duyarlılığı incelendi. Hidrojen peroksit derişimine karşı akım farkları alınarak Δi değeri hesaplandı ve hidrojen peroksit derişimine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.6).

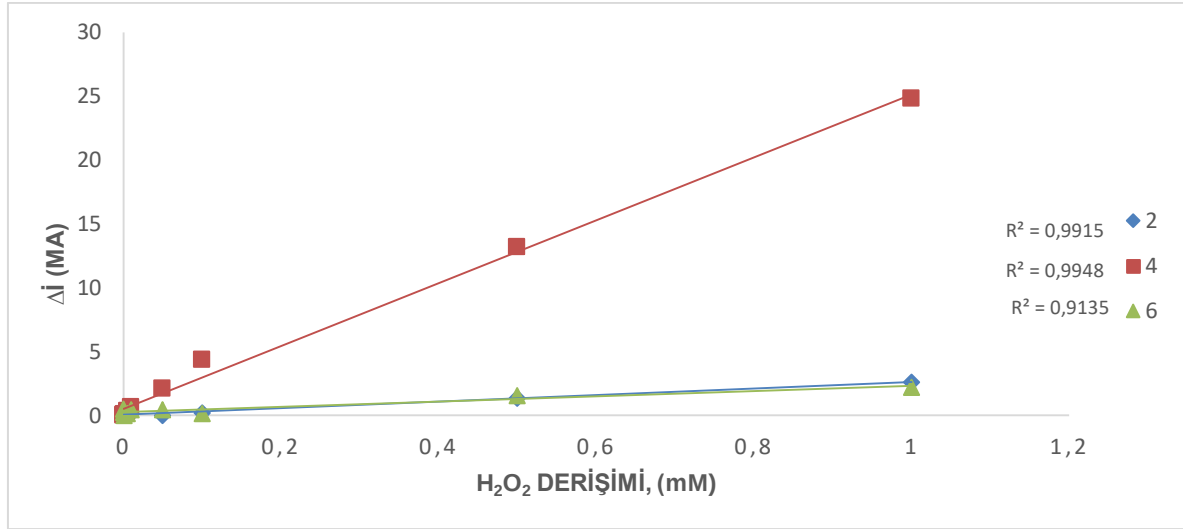


Şekil 4.6. Polianilin'in hidrojen peroksit duyarlılığına çevrim sayısının etkisi

Grafik incelendiğinde üç farklı kaplamada en yüksek akım 10 çevrim için gözlemlenmiştir. Çevrim sayısı 8 ve 12 olan elektrot ile gerçekleştirilen kaplama sonucunda hazırlanan elektrotlardaki hidrojen peroksit ölçümlerinde en iyi sonucu veren ve polimer tabakasının ince olmasından dolayı iletkenliğin çok daha fazla olduğu tahmin edilmektedir.

4.1.6. Polipirol için çevrim sayısının etkisi

Bölüm 3.3'de anlatıldığı gibi hazırlanan platin elektrotların cevabına çevrim sayısının etkisini belirlemek için elektrodu kaplama da kullanılan çevrim sayısı 2 çevrim, 4 çevrim, 6 çevrimde kaplama işlemi gerçekleştirildi. 2 çevrimden başlanmasının nedeni; çalışmada kullandığımız platin elektrot çok kalın olup iletkenliği artırmaktı. Daha az çevrimde yapılan kaplama sonucunda elektrot yüzeyinin tam olarak kaplanmadığını, kaplama kalınlığının ince olduğu belirlendi. Bu yüzden en ince film kalınlığına sahip elektrot olarak 2 çevrim kaplama yapılarak elde edilen polipirol kaplı elektrot alındı. Daha sonra çevrim sayıları artırılarak kaplamalar gerçekleştirildi. Bu şekilde hazırlanan 3 farklı çevrim sayısına sahip Pt/PANI-PPy elektrotlarının hidrojen peroksit duyarlılığı incelendi. Hidrojen peroksit derişimine karşı akım farkları alınarak Δi değeri hesaplandı ve hidrojen peroksit derişimine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Polipirolün hidrojen perokside duyarlılığına çevrim sayısının etkisi

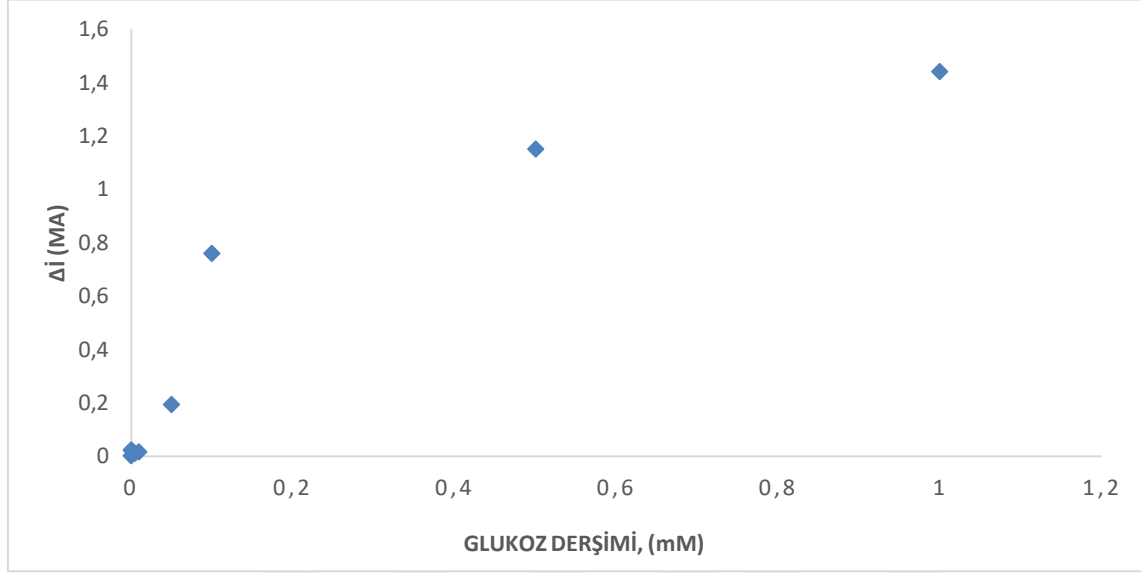
Grafik incelendiğinde üç farklı kaplamada en yüksek akım 4 çevrim için gözlenmiştir. Çevrim sayısı 2 ve 6 olan elektrot ile gerçekleştirilen kaplama sonucunda hazırlanan elektrottaki platin yüzeyinde istenen etki gözlenememiştir. Tüm bu sebeplerden dolayı çalışmamızda en uygun çevrim sayısı 4 olarak seçilmiştir. Hazırlanan Pt/PANI-PPy elektrodun hazırlanması için en iyi koşullar Çizelge 4.1’de verildi.

Çizelge 4.1. Pt/PANI-PPy elektrodunun hazırlanması için en iyi koşullar

Değişkenler	En Uygun Şartlar
Çalışma Potansiyeli	+ 0,4 V
Anilin Derişimi	0,15 M
Pirol Derişimi	0,15 M
Dodesil Benzen Sülfonat	0,1 M
Polianilin için çevrim sayısı	10 Çevrim
Polipirol için çevrim sayısı	4 Çevrim

4.2. Serbest Enzim Çalışması

Bölüm 3.5' e göre yapılan deneyler sonucunda ölçülen amperometrik cevap akımları glukoz derişimine karşı grafiğe geçirildi.



Şekil 4.8. Serbest enzimin aktivitesi üzerine glukoz derişiminin etkisi (pH=7,0 fosfat tamponu, 25 °C)

Grafiğe göre glukoz derişimi arttıkça akım değerlerinin arttığı, aynı zamanda Pt/PANI-PPy elektrodun glukozu duyarlı olduğu görölmektedir.

4.3. Biyosensörün Hazırlanması

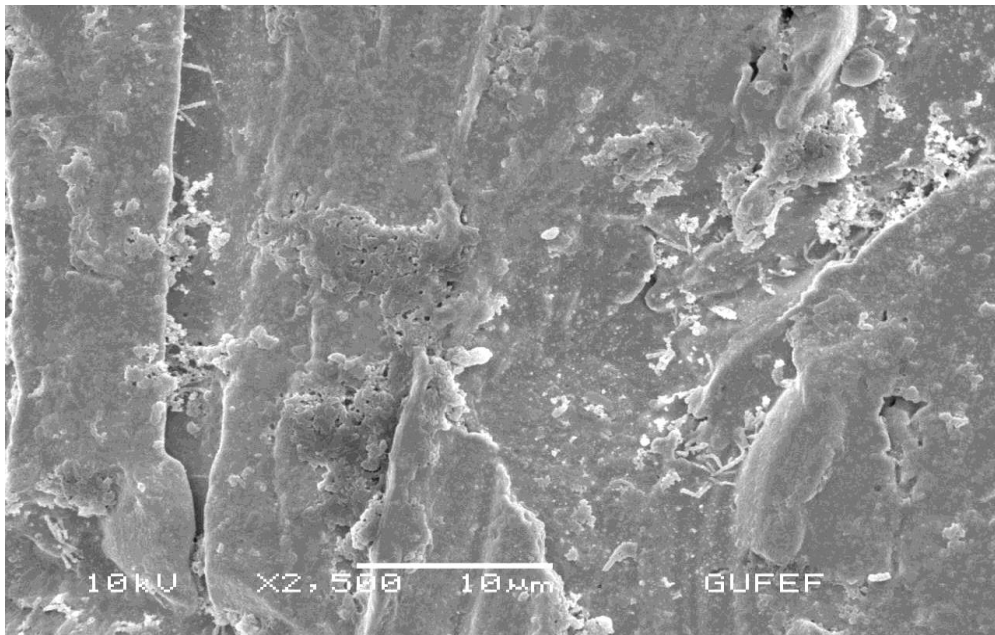
Yaptığımız çalışmada glukozu duyarlı bir biyosensör elde etmek amacıyla bölüm 3.6'da anlatıldığı gibi polianilin-polipirol filme glukoz oksidaz enzimi hapsedme yöntemi ile immobilize edildi ve artan derişimlerde glukoz ilaveleri sonucu amperometrik cevap akımları kaydedildi. Elde edilen Δi değerleri hesaplanarak grafiğe geçirildi (Şekil 4.9). Grafikten görüldüğü gibi biyosensör glukozu karşı duyarlıdır ve glukozun derişimi artıkça cevap akımında artmaktadır.



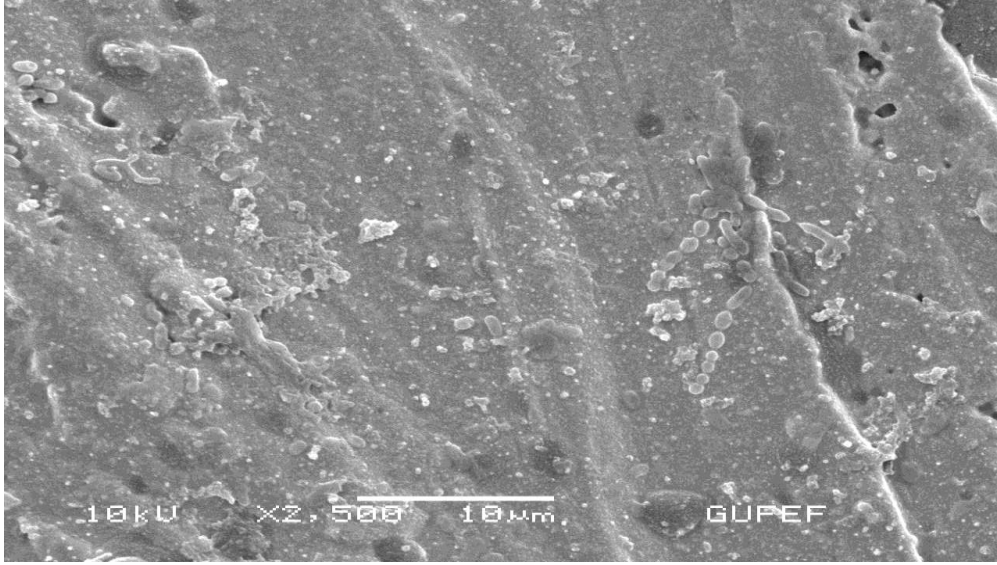
Şekil 4.9. Biyosensörün glukoz duyarlılığı (pH=7,0 fosfat tamponu, 25 °C)

4.3.1. Pt/PANI-PPy-GOx biyosensörünün SEM analizi

Bölüm 3.3’de anlatıldığı gibi hazırlanan film elektrot ve bölüm 3.6’da anlatıldığı gibi hazırlanan biyosensörün taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile çekilen fotoğrafları şekil 4.10 ve şekil 4.11’de görülmektedir.



Şekil 4.10. Pt/PANI-PPy filminin SEM fotoğrafı

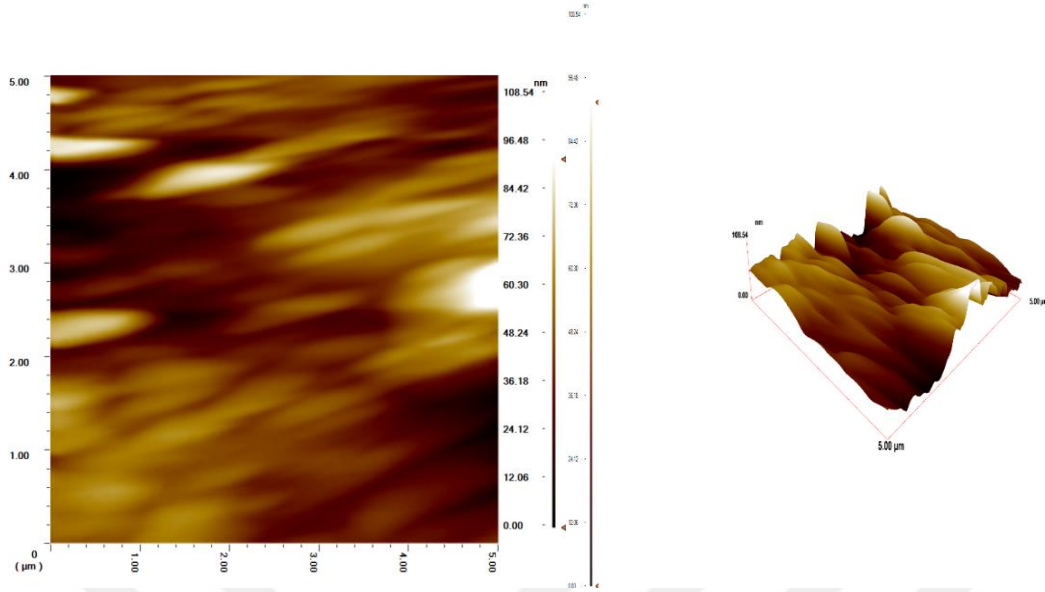


Şekil 4.11. Pt/PANI-PPy-GOx biyosensörünün SEM fotoğrafı

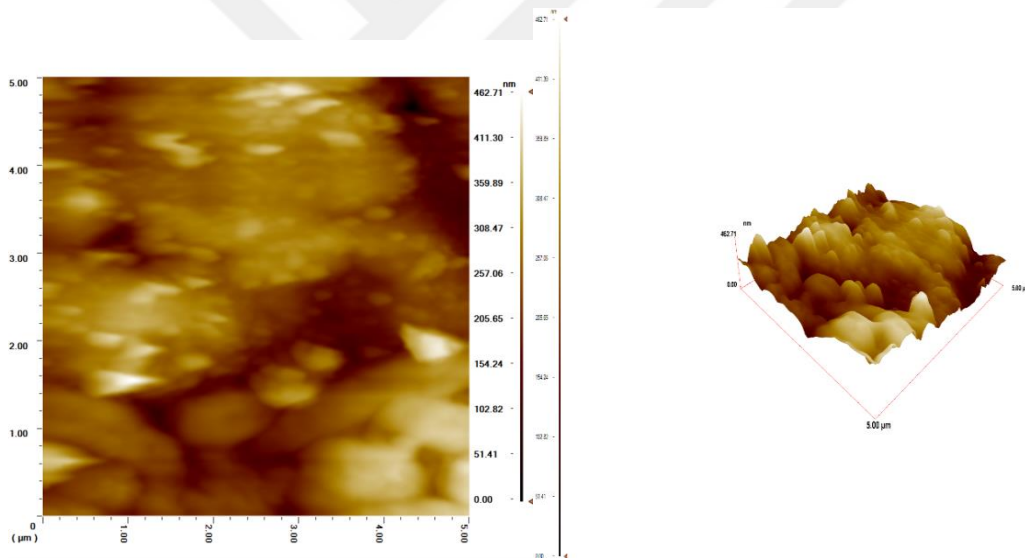
Enzim ile kaplanan elektrot filminin SEM fotoğrafı ile enzimsiz kaplanan elektrot filminin SEM fotoğrafına bakıldığında ikisinin birbirinden çok farklı olduğu görülmektedir. Biyosensör yüzeyinin SEM fotoğrafına bakıldığında enzim moleküllerinin, polimer yapının üstünde değişik bir şekilde yerleşmiş olarak bulunduğu görülmektedir. PANI-PPy filmin doğal görüntüsü taneciklidir. Glukoz oksidaz enzimi immobilize edildikten sonra glukoz oksidazın hepsinin aynı biçimde dağılmasıyla tanecikli yapı artmıştır.

4.3.2. Pt/PANI-PPy-GOx biyosensörünün AFM analizi

Bölüm 3.3’ de anlatıldığı gibi hazırlanan film elektrot ve bölüm 3.6’da anlatıldığı gibi hazırlanan biyosensörün AFM (atomik kuvvet mikroskobu) ile çekilen fotoğrafları şekil 4.12 ve şekil 4.13’de görülmektedir.



Şekil 4.12. Pt/PANI-PPy filminin AFM fotoğrafı



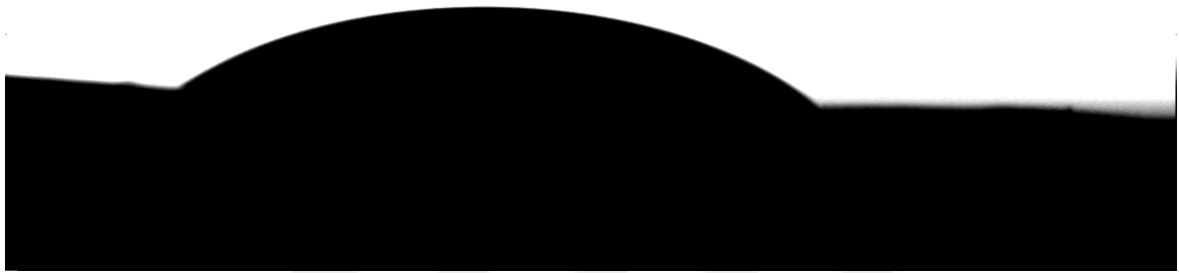
Şekil 4.13. Pt/PANI-PPy-GOx biyosensörünün AFM fotoğrafı

Detaylı olarak görüntüler üzerinde çalışmalar yapılmış olup farklı büyüklüklerde görüntüler alınmıştır. Ancak yapıyı en iyi gösteren görüntüler yukarıda verilmiştir. Enzimli ve enzimsiz görüntüler birbirinden açık bir şekilde ayırt edilebilir durumdadır. Yapıya glukoz oksidaz enziminin immobilizasyonu işlemiyle yapıda oluşmuş olan rastgele dağılmış tanecikli yapılar enzimli yapı olduğu görülmektedir. Enzimsiz (PANI-PPy) yapısının yüzey morfolojisi, yapıya glukoz oksidaz enzimi ilavesiyle yüzeyde yeni bir morfolojik yapılanma oluşmuştur. Buna bağlı olarak glukoz oksidaz immobilizasyon işlemi yüzeyi daha pürüzlü yapmıştır.

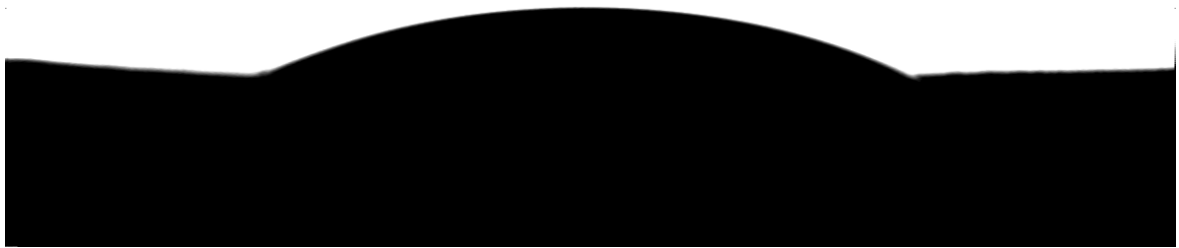
Bu sonuç, yüzey pürüzlülük değeri olan Root Mean Square (RMS) değeri ile desteklenmektedir. Enzimli görüntü için RMS değeri 64,95 nm ve enzimsiz yapının RMS değeri 16,19 nm dir. Alınan sonuçlar literatür sonuçları ile uyumludur [40].

4.3.3. Pt/PANI-PPy-GOx biyosensörünün yüzey temas açısı analizi

Bölüm 3.3’de anlatıldığı gibi hazırlanan film elektrot ve bölüm 3.6’da anlatıldığı gibi hazırlanan enzim elektrodun yüzey temas açısı fotoğrafları şekil 4.14 ve şekil 4.15’de görülmektedir.



Şekil 4.14. Pt/PANI-PPy filminin yüzey temas açısı fotoğrafı



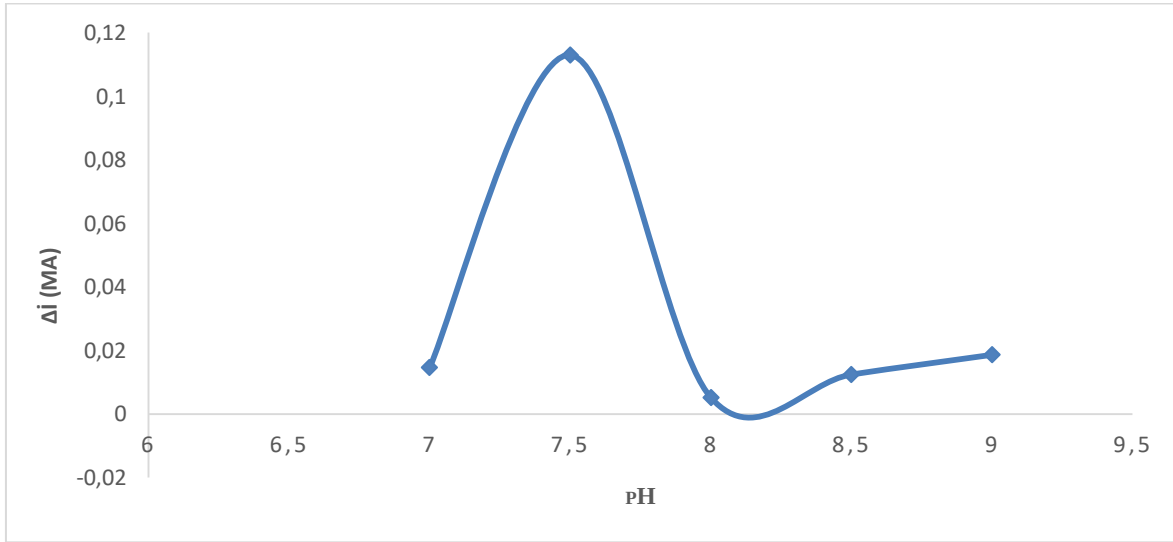
Şekil 4.15. Pt/PANI-PPy-GOx biyosensörünün yüzey temas açısı fotoğrafı

Şekil 4.14 ve Şekil 4.15 görüntüleri incelendiğinde sırasıyla yüzey temas açılarının 51° , 14° olduğu görülmektedir. Yüzey açısının biyosensörde daha düşük olması yüzeyin hidrofilikliğinin bir göstergesidir. Şekiller incelendiğinde enzim immobilize edilen film elektrot görüntüsünün (Şekil 4.14) daha yayvan olduğu görülmektedir. Bu da biyosensör yapısının hidrofilik, PANI-PPy film elektrodun ise daha hidrofobik olduğunun göstergesidir. Glukoz oksidaz enzimi yapısında hidrofilik gruplar içerdiğinden şekil 4.15’nin daha yayvan olması beklenen sonuçtur. Bu görüntüler ise enzimin yüzeye immobilize edildiğini kanıtlamaktadır.

4.4. Biyosensörün En İyi Çalışma Koşulları

4.4.1. pH etkisi

Biyosensörlerin aktivitesini etkileyen en önemli faktörlerden biri çalışma ortamının pH değeridir. Çünkü enzimlerin aktivitesi pH'a bağlı olarak değişmektedir. Biyosensörün aktivitesine ortam pH'sının etkisini araştırmak amacıyla $5,0 \times 10^{-5}$ M sabit glukoz derişiminde pH değeri değiştirilerek akımlar ölçüldü. Amperometrik cevap akımları pH'ya karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.16).



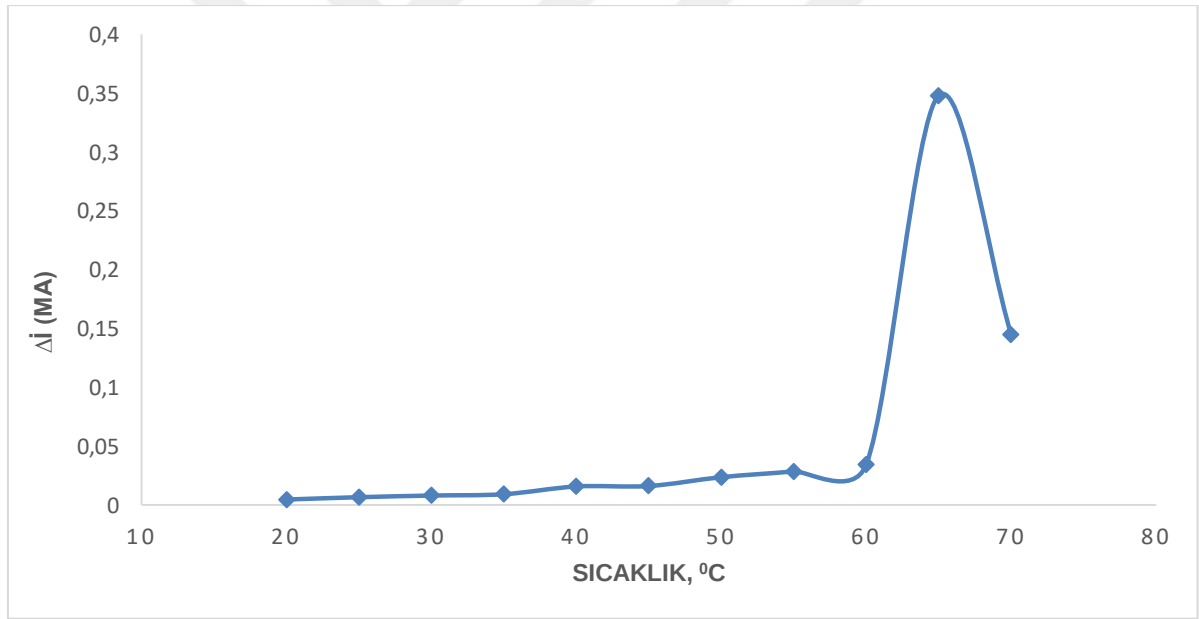
Şekil 4.16. Biyosensörün glukoz duyarlılığına pH'nın etkisi (0,1 M fosfat tamponu, 25°C)

Grafik incelendiğinde biyosensörün maksimum aktivite gösterdiği pH değeri 7,5 olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar yardımıyla çizilen, ortam pH'sına karşı cevap akımları grafiğine (Şekil 4.16) bakıldığında pH 7'den 7,5'e kadar akımlarda artma, 7,5'den sonra düşme gözlenmektedir. Cevap akımlarındaki artış en iyi pH değerine yaklaştıkça beklenen bir durumdur. Enzim ve glukoz moleküllerinde asidik ve bazik gruplar olduğundan (E-S) aktifleşmiş kompleksinin en kolay bir şekilde oluşması yani tepkime hızının maksimum olması için bu grupların belirli bir iyonlaşma durumunda olması gereklidir. Bunun dışındaki iyonlaşmalarda (E-S) kompleksinin oluşumu zorlaşacak ve reaksiyon hızı düşeceğinden akımlardaki azalma beklenen bir durumdur [40].

Bulunan sonuçlar literatür değerleriyle desteklenmemektedir. Literatürler incelendiğinde glukoz oksidaz için pH değeri 6,8; 7,4 ve 8,0 olarak bulunmuştur [57-69-76]. Literatürlerle karşılaştırıldığında bulunan pH değerinin literatür değerlerine yakın olduğu görülmüştür.

4.4.2. Sıcaklığın etkisi

Sıcaklık, enzimlerin kararlılığını ve enzimatik reaksiyonların hızını etkileyen önemli bir faktördür. Her enzimin optimum aktiflik gösterdiği bir sıcaklık vardır. Bu amaçla hazırladığımız Pt/PANI-PPy-GOx biyosensörünün 20°C; 25 °C; 30 °C; 35 °C; 40 °C; 45 °C; 50 °C; 55 °C; 60 °C; 65 °C; 70 °C sıcaklık değerlerinde $5,0 \times 10^{-5}$ M sabit glukoz derişiminde amperometrik cevap akımları ölçüldü. Amperometrik cevap akımları sıcaklığa karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Biyosensörün glukoz duyarlılığına sıcaklığın etkisi (0,1 M pH=7,5 fosfat tamponu)

Elde edilen sonuçlar yardımıyla çizilen, sıcaklığa karşı cevap akımları grafiğine (Şekil 4.17.) bakıldığında sıcaklık 20°C 'den 65°C'ye kadar arttığında akımlarda artma, 70 °C'den sonra düşme gözlenmiştir. En yüksek cevap akımı 65°C gözlemiştir. Bu sıcaklık yüksek bir sıcaklıktır ve literatür değerlerinden biraz yüksektir. Ancak bölümümüzde yapılan bir yüksek lisans tezinde glukoz oksidaz enzimine ait sıcaklık grafiğinde benzer bir durumla karşılaşılmıştır [43].

Enzimler protein yapısında olduklarından dolayı yüksek sıcaklıklarda enzimin protein yapısı denatürasyona uğrar ve böylelikle aktivitesini kaybeder [40]. Uzun süreli çalışma durumlarında yüksek sıcaklıkta çalışmak enzim yapısını bozar. Bu nedenle bundan sonraki çalışmalar oda sıcaklığında devam edilmiştir.

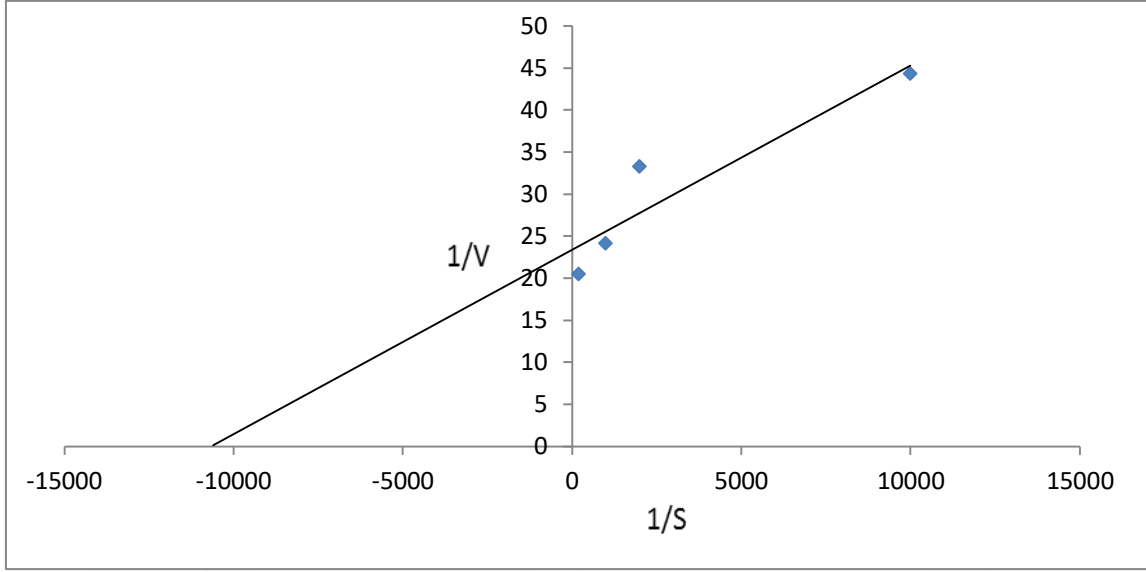
4.4.3. Substrat derişiminin etkisi

Hazırlanan Pt/PANI-PPy-GOx biyosensörünün doğrusal çalışma aralığının saptanması için ölçülen akım değerlerine substrat derişiminin etkisi incelenmiştir. Bu amaçla $10^{-7} - 10^{-2}$ M derişim aralığında hazırlanan bir seri glukoz çözeltisi için akım değışimleri kaydedilerek grafiğe geçirildi (Şekil 4.18). Elde edilen Michaelis-Menten Grafiğine (Şekil 4.18) bakıldığında, glukoz ilavelerinden sonra öncelikle cevap akımlarının arttığı daha sonra sabit kalmaya başladığı görülmüştür. Bu da bize enzimin substrata doyduğunu gösterir.



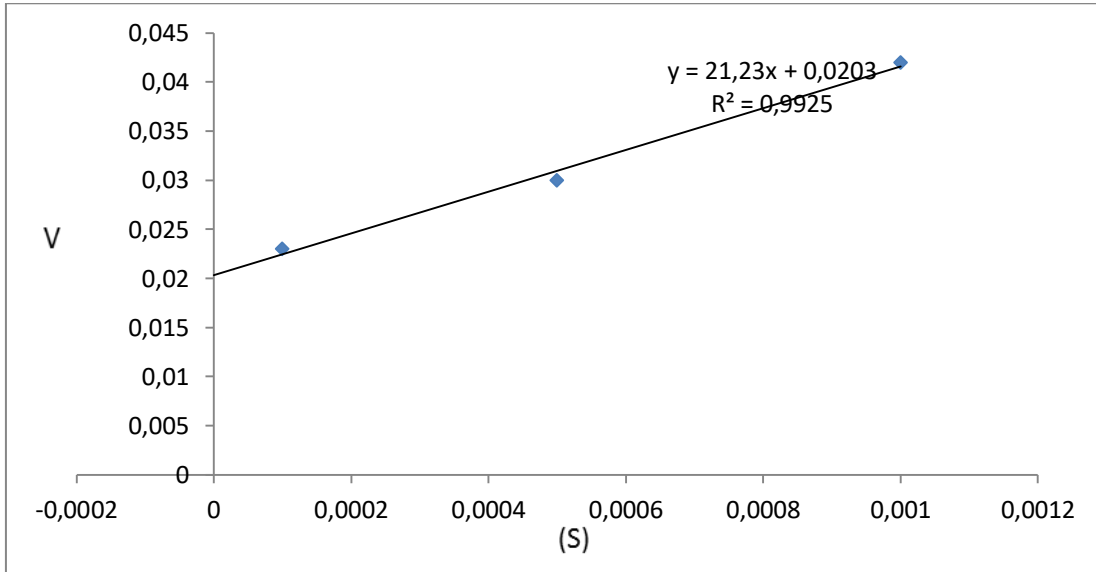
Şekil 4.18. Biyosensörün amperometrik cevabına glukoz derişiminin etkisi (0,1 M pH=7,5 fosfat tamponu, 25°C)

Grafik incelendiğinde akımların belli bir derişime kadar doğrusal olarak arttığı daha sonra ise bu doğrusallıktan saptığı görülmektedir.



Şekil 4.19. Biyosensörün üzerine derişiminin etkisini gösteren Lineweaver-Burk Grafiğı

Michaelis-Menten denklemi bir hiperbolik eğrinin denklemidir ve hiperbolik bir eğrinin karakteristik noktalarını belirlemek zordur. Bu nedenle Michaelis-Menten denkleminin tersine çevrilip çarpanlarına ayrılmasıyla elde edilen denklemin grafiğı (Lineweaver-Burk, Şekil 4.19) çizilmiştir. Doğrusal olan bu grafikten yararlanılarak, glukoz oksidaz enzimine ait K_m (gözlenen) ve V_{max} (gözlenen) değerleri sırasıyla 0,092 mM ve 0,043 $\mu A/dak$ olarak hesaplanmıştır.

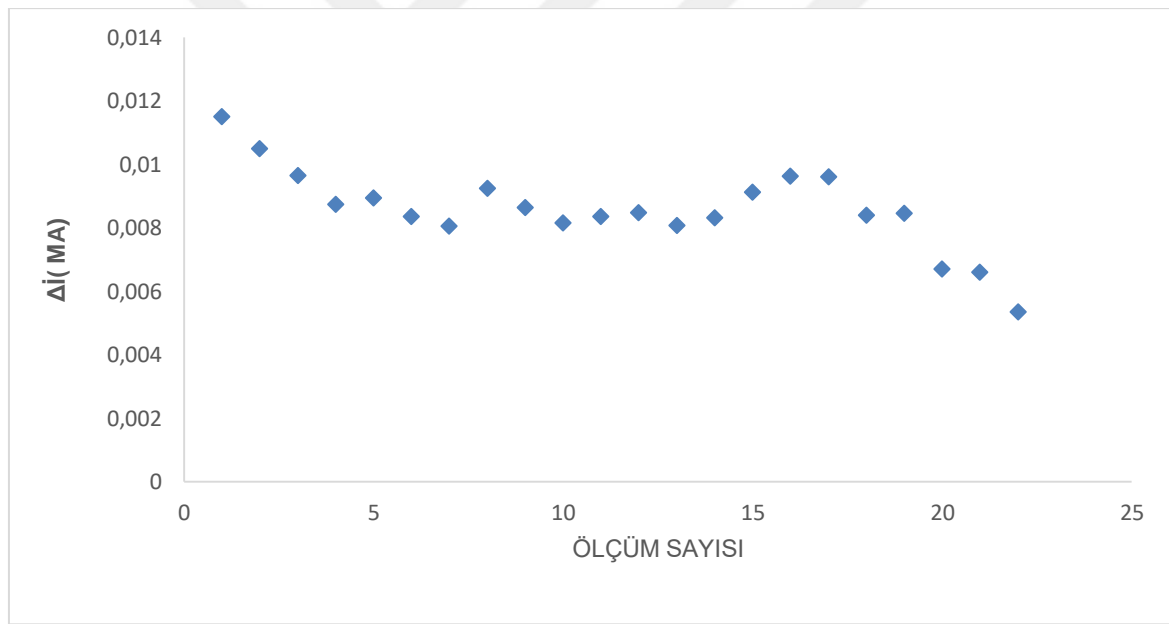


Şekil 4.20. Glukoz biyosensörünün kalibrasyon grafiğinin incelenmesi (0,1 M pH=7,5 fosfat tamponu, 25 °C)

Grafik incelendiğinde $1,0 \times 10^{-6}$ M – $1,0 \times 10^{-5}$ M aralığında doğrusallığın çok iyi olduğu ve bu aralığın kantitatif analizlerde kullanılabileceği söylenebilir. Literatürlerde glukoz oksidaz enzimi için verilen $K_m(\text{göz.})$ değerleri 9,34; 0,267 mM' dır [77-78]. Literatürlerde glukoz oksidaz enzimi için verilen $V_{\text{maks}}(\text{göz.})$ değerleri 4,048; 0,121 mM/dk" dır [79-81]. Literatürdeki değerlerle bizim bulduğumuz $K_m(\text{göz.})$ ve $V_{\text{maks}}(\text{göz.})$ değerlerinin biraz farklı olması polimerimizin farklı olmasından kaynaklanabilir.

4.4.4. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliği

Bölüm 3.8.4'de belirtildiği gibi hazırlanan biyosensörün tekrar kullanılabilirliği incelendi. Deneyler sonunda elde edilen amperometrik cevap akımları ölçme sayısına karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.21).



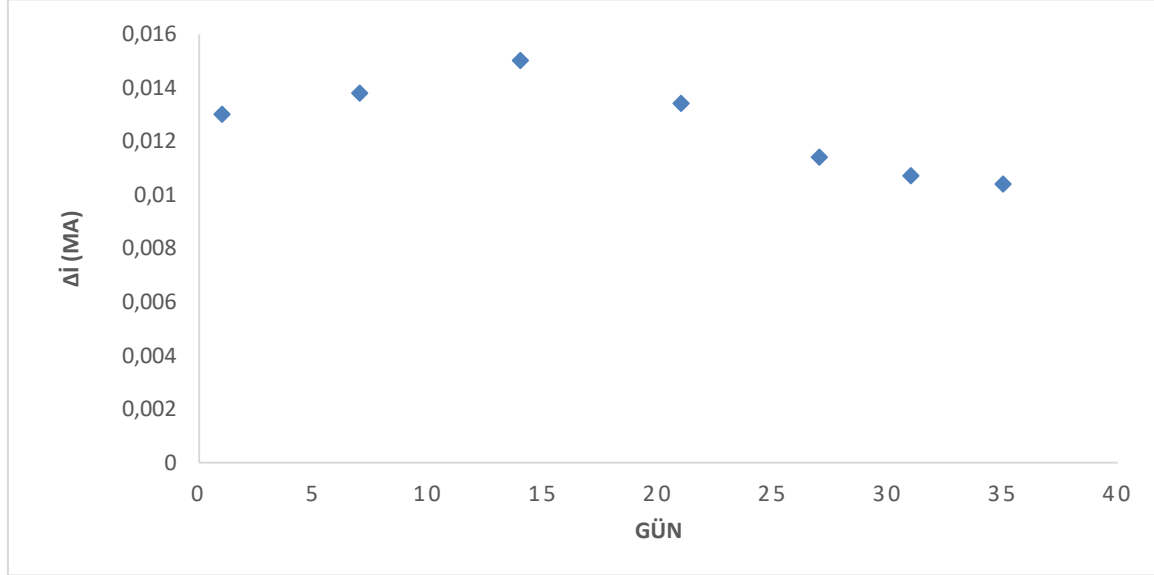
Şekil 4.21. Enzimli biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi (0,1 M pH=7,5 fosfat tamponu, 25°C)

Biyosensörün 22 ölçüm sonunda başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 53,47'sini koruduğu görülmüştür.

4.4.5. Raf ömrünün belirlenmesi

Biyosensörde aranan en önemli özelliklerden biri de elektrodun uzun ömürlü olmasıdır. Bu amaçla biyosensörün raf ömrünün belirlenmesi Bölüm 3.8.5'de anlatıldığı gibi yapıldı.

Biyosensör +4 °C’de buzdolabında fosfat tamponu içinde bekletildi. Saklama süresine karşı akım değişimi değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 4.22).



Şekil 4.202. Biyosensörün raf ömrünün incelenmesi (0,1 M pH=7,5 fosfat tamponu, 25°C)

Pt/PANI-PPy elektrodunun yüzeyine hapsetme yöntemiyle immobilize edilen GOx enzimi, zaman geçtikçe elektrot yüzeyinden ayrılarak tampon çözeltiye geçer. Ayrıca, enzimlerin aktif merkezinin geometrik şeklinde sıcaklığın, havanın ve bazı kimyasal maddelerin etkisiyle değişiklikler meydana gelir. Enzimler kullanılmadıkları zaman uygun koşullarda muhafaza edilsin ya da edilmesin zamana karşı aktivite kaybına uğrarlar. $5,0 \times 10^{-5}$ M sabit glukoz derişiminde yapılan çalışmada 35. günün sonunda biyosensörün başlangıç amperometrik cevabının %31’ini koruduğu görüldü.

4.5. Biyosensör Üzerine Girişim Yapan Maddeler

Çalışma elektroduna yüksek bir anodik potansiyel uygulanmasıyla; glukoz ile birlikte kanda bulunan bazı maddeler (ürik asit, askorbik asit, parasetamol vb.) de yükseltgenirler. Bu durum amperometrik cevap akımının artmasına dolayısıyla glukozun, kandaki gerçek değerinden daha yüksek bir değerde bulunmasına sebep olur.

Parasetamolün (asetaminofen) girişim etkisinin incelenmesi: Bölüm 3.8.6’da yapılan deneyler sonunda elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2’de gösterilmiştir. $1,0 \times 10^{-4}$ M parasetamol için girişim etkisi % 14,6; $1,0 \times 10^{-5}$ M parasetamol için girişim etkisi % 6,11

olarak bulundu. Literatürde de parasetamolün girişim etkisinin büyük oranda seyreltmeleryapılarak giderilebildiği belirtilmektedir [79-80]. Bizim çalışmamızda da seyreltme sonucu parasetamol derişimi azalmakta ve girişim etkisi çok aza indirilmektedir.

Ürik asidin girişim etkisinin incelenmesi: Bölüm 3.8.6'da yapılan deneyler sonunda elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2'de gösterilmiştir. $1,0 \times 10^{-4}$ M ürik asit için girişim etkisi % 90,3; $3,0 \times 10^{-4}$ M ürik asit için girişim etkisi % 92,4 ve $5,0 \times 10^{-4}$ M ürik asit için girişim etkisi %94,8 olarak bulundu. Literatürlerde de hazırlanan farklı biyosensörler için ürik asidin girişim etkisinin görüldüğü ve bunun seyreltme yapılarak giderildiği belirtilmektedir [40-74]. Bizim çalışmamızda da seyreltme sonucu ürik asit derişimi azalmakta ve girişim etkisi çok aza indirilmektedir.

Askorbik asidin girişim etkisinin incelenmesi: Bölüm 3.8.6'da askorbik asidin girişim etkisine göre yapılan deneyler sonunda elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2'de verildi. $1,0 \times 10^{-4}$ M askorbik asit için girişim etkisi % 75; $1,0 \times 10^{-5}$ M askorbik asit için girişim etkisi %46,5 olarak bulundu. Biyolojik sıvılarda bulunan askorbik asidin girişim yaptığı ve bunu önlemenin kolay olmadığı belirtilmektedir. Askorbik asidin ciddi girişimlere sebep olduğu ve bu girişim etkisinin büyük oranlarda seyreltme, salatalık suyu ilavesi ve doğrudan askorbik asidi yükseltgeyen askorbat oksidaz ilavesi yöntemleri ile giderilmeye çalışıldığı literatürde belirtilmiştir [75-80].

Bizim çalışmamızda da seyreltme sonucu askorbik asit derişimi azalmakta ve girişim etkisi çok aza indirilmektedir.

Çizelge 4.2. Biyosensör üzerine girişim yapan maddeler ve girişim etkileri

Girişim Yapan Tür	Hücre İçi Derişimi	% Girişim
Parasetamol	$1,0 \times 10^{-4}$ M	% 14,6
Parasetamol	$1,0 \times 10^{-5}$ M	% 6,11
Ürik Asit	$1,0 \times 10^{-4}$ M	% 90,3
Ürik Asit	$3,0 \times 10^{-4}$ M	% 92,4
Ürik Asit	$5,0 \times 10^{-4}$ M	% 94,8
Askorbik Asit	$1,0 \times 10^{-4}$ M	% 75
Askorbik Asit	$1,0 \times 10^{-5}$ M	% 46,5



5. SONUÇLAR

Sonuç olarak; bu çalışmada hazırladığımız biyosensörün;

- Doğrusal çalışma aralığı $1,0 \times 10^{-6}$ M – $1,0 \times 10^{-5}$ M olarak bulundu. Bu aralık kantitatif analizler için geniş bir aralık olup, düşük derişimlerde analiz yapabilme imkanı sağlar. Literatür değerleri ile karşılaştırıldığında düşük derişimlere inebilme ve geniş derişim aralığında çalışabilme gibi avantajlara sahiptir.
- Tekrar kullanılabilirliği iyidir. 22 ölçüm sonunda biyosensörün aktivitesini % 53,47 oranında koruduğu görüldü. Tekrarlanabilirlik biyosensör için çok önemli olup hazırlanan biyosensörle arka arkaya fazla sayıda analiz yapabileceğimizi göstermektedir.
- Raf ömrü uygundur (35 gün sonunda başlangıç amperometrik cevabının yaklaşık % 31'ini koruduğu görülmüştür).
- Pt/PANI-PPy-GOx biyosensörünün K_m (gözlenen) ve V_{max} (gözlenen) değerleri sırasıyla 0,092 ve 0,043 $\mu A/dak$ olarak bulundu.
- En iyi çalışma pH'sı 7,5 olarak bulundu.
- Hazırlanan biyosensörün 65 $^{\circ}C$ 'e kadar dayanıklı olduğu bulundu. Biyosensörün yüksek sıcaklıklara kadar dayanıklı olması iletken polimer filmin mikro çevre oluşturarak enerjiyi korumasından kaynaklanmaktadır. Biyosensörün yüksek sıcaklığa dayanıklı olması iyi bir özelliktir.



KAYNAKLAR

1. Olsan, A. (1991). Glucose and glucose containing syrups. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 12, 457-475.
2. Li, Y., Liu, X., Yuan, H. and Xiao D. (2009). Glucose biosensor based on the roomtemperature phosphorescence of TiO₂/SiO₂ nanocomposite. *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 3706-3710.
3. Comba, F.N., Rubianes, M.D., Herrasti, P. and Rivas, G.A. (2010). Glucose biosensing at carbon paste electrodes containing iron nanoparticles. *Sensors and Actuators B*, 149, 306-309.
4. Alegret, S., Dominguez, C., Munoz, J. (1997). Glukose biosensors based on a reagentless graphite-epoxy screen-printable biocomposite. *Sensors and Actuators B*, 45, 5562.
5. Wang, J. (2008). In vivo glucose monitoring: Towards 'Sense and Act' feedbackloop individualized medical systems. *Talanta*, 75, 636-641.
6. Habermüller, K., Mosbach, M., Schuhmann, W. (2000). Electron-transfer mechanisms in amperometric biosensors. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 366, 560-568.
7. Gispen, W. H., Biessels, G. J. (2000). Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosci*, 23(11), 542-9.
8. D'Orazio, P. (2003). Biosensors in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*, 41-69.
9. Spichiger-Keller, U. E. (1998). *Chemical sensors and biosensors for medical and biological applications*. Weinheim: Verlag Chemie.
10. Kılınç, E. (1996). *Enzime dayalı elektrokimyasal biyosensörlerin mediyatör kullanarak tasarımı*. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
11. Sljukia, B., Banks, C.E., Salter, C., Crossiey, A. (1995). Electrochemically polymerized composites of multi walled carbon nanotubes and poly(vinylferrocene) and their use as modified electrodes: Application to glucose sensing. *Analyst*, 131, 670-677.
12. Lehninger, A. L. (1982). *Principles of biochemistry*. New York: Worth Publisher, 587-665.
13. Arnold, S., Donnert, C. (1999). Directed evolution of industrial enzymes. *Trens in Biotechnology*, 17, 135-136.
14. Bingöl, G. (1983). *Biyokimya*. Ankara: Güven Matbaası.
15. Keba, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ. (1997). *Biyokimya, muhtelif kısımlar*. Erzurum: Şafak Yayınevi.

16. Tekman, S., Öner, N. (1986). *Genel kimya*. İstanbul: Fatih Yayınevi Matbaası.
17. Champe, P., Harvey, R. (1997). *Enzimler, biyokimya*. İstanbul: Nobel Tıp Kitap Evleri.
18. Söyler, M. (2006). *Van kedisi eritrositlerinden karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
19. Lehninger, A. L. (1993). *Principles of biochemistry*. New York: Worth Publishers Inc.
20. Stryer, L. (1981). *Introduction to enzymes, biochemistry*. San Fransisco: W.H. Freeman and Company.
21. Özabacıgil, F. (2005). *İnsan eritrosit 6-fosfoglukonat dehidrojenaz enziminin saflaştırılması, bazı ilaçların enzim aktivitesi üzerine in vitro ve tavşanlarda in vivo etkisinin incelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
22. Telefoncu, A. (1999). *İmmobilize enzimler*. Kuşadası: Biyokimya Lisans Üstü Yazokulu.
23. Özyılmaz, G. (2005). *Glukoz oksidaz ve katalazın ayrı ayrı ve birlikte immobilizasyonu ve karakterizasyonu*. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
24. Witt, S., Singh, M., Kalisz, H. M. (1998). Structural and kinetic properties of nonglycosylated recombinant *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase expressed in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 1405-1411
25. 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*. *European Journal of Biochemistry*, 215, 747-752.
26. Nakamura, S., Hayashi, S., and Koga, K. (1976). Effect of periodate oxidation on the structure and properties of glucose oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 445(2), 294-308.
27. Pazur, J. H. (1966). Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Methods in Enzymology*, 9, 82-87.
28. Bright, H. J., Porter, D. J. (1975). 7 Flavoprotein Oxidases. *The enzymes*, 12, 421-505.
29. Egi, Y. (2009). *Çapraz bağlı baskılanmış glukoz oksidazın hazırlanması ve karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
30. Weibel, M. K., Brights, H. J. (1971). The glucose oxidase mechanism, interpretation of the pH dependence. *The Journal of Biological Chemistry*, 246(9), 2734-2744.

31. Li, Yanbin. 2006. Section 2.3 Biosensors, pp. 52-93, of Chapter 2 Hardware, in *CIGR Handbook of Agricultural Engineering Volume VI Information Technology. Edited by CIGR-The International Commission of Agricultural Engineering; Volume Editor, Axel Munack. St. Joseph, Michigan, USA: ASABE. Copyright American Society of Agricultural Engineers.*
32. Aykut, U., Temiz H. (2006). Biyosensörler ve gıdalarda kullanımı. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 3, 51-59.
33. Topçu, M. (2003). *Altın biriktirilmiş polivinil ferrosen modifiye Pt elektrodunu temel alan glukoz biyosensörünün geliştirilmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
34. Aydın, Y. (2012). *İletken polimerlerin içerisinde enzim tutuklamasıyla yapılan biyosensörler*. Yüksek Lisans Tezi, Karamanoğlu Mehmet Bey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Karaman.
35. Akbulut, U., Telefoncu A. (1999). *İletken polimerlerle transduser hazırlanması*. Kuşadası: Biyokimya Lisans Üstü Yazokulu.
36. Muhammet, S.M. (2008). *Kolesterol tayini için biyosensör hazırlanması*. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
37. Trojanowicz, M., Krawczyk, T.K. (1995). Electrochemical biosensors based on enzymes immobilized in electropolymerized films. *Microchimica Acta*, 121, 167-81.
38. Bartlett, P.N., Cooper, J.M. (1993). A review of the immobilization of enzymes in electropolymerized films. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 362, 1-12.
39. Bal, Ö. (2012). *Biyolojik sıvılardaki glukozun tayini için polipirol filme glukoz oksidaz enziminin immobilizasyonu ile yeni bir biyosensör hazırlanması*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
40. Aydın, Y. (2012). *İletken polimerlerin içerisinde enzim tutuklamasıyla yapılan biyosensörler*. Yüksek Lisans Tezi, Karamanoğlu Mehmet Bey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Karaman.
41. Roncali, J. (1992). Conjugated poly(thiophenes)-synthesis, functionalization and applications. *Chemical Reviews*, 711-738.
42. Ustabaş, S. (2010). *Glukoz tayini için yeni bir biyosensör hazırlanması*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
43. Akbulut, U. (1999). *İletken polimerlerle transdüser hazırlanması*. Kuşadası: Biyokimya Lisans Üstü Yaz Okulu.
44. Telefoncu, A. (1997). *İmmobilize enzimler*. Biyokimya Lisans Üstü Yaz okulu, Kuşadası, 1-243
45. Gerharts, W. (1990). *Enzyme in industry*. Weinheim: UCH Velosgesellschaft MbH.

46. Telefoncu, A. (1999). *Biyoreseptör immobilizasyonu*. Kuşadası: Biyokimya Lisans Üstü Yaz Okulu.
47. Mello, L. D., Kubota L. T. (2001). Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry*, 77, 237-256.
48. Telefoncu, A., Dinçkaya, E. (1997). *Enzimoloji*. İzmir: Ege Üniversitesi Yayınları.
49. Dinçkaya, E. (1999). *Enzim sensörleri*. İzmir: Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi.
50. Telefoncu, A. (1999a). *Biyosensörlere genel bakış*. İzmir: Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi.
51. Arslan, F. (2004). *Ksantin tayini için polipirol filme ksantin oksidaz enziminin immobilizasyonu ile yeni bir biyosensör hazırlanması*. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
52. Dinçkaya, E. (1999). *Enzim sensörleri*. Kuşadası: Biyokimya Lisans Üstü Yazokulu.
53. Kılınç, M.E. (1996). *Enzime dayalı elektrokimyasal enzim elektrotların mediyatör kullanarak tasarımı*. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
54. Gao, Z., Xie, F., Shariff, M., Arshad, M. and Ying, J. Y. (2005). A disposable glucose biosensor based on diffusional mediator dispersed in nanoparticulate membrane on screen-printed carbon electrode. *Sensors and Actuators B*, 111-346.
55. Gaikwad, P.D., Shirale, D.J., Gade, V.K., Savale, P.A., Kharat, H.J., Kakde, K.P., Shirsat, M.D. (2006). Immobilization of GOD on electrochemically synthesized PANI film by cross-linking via glutaraldehyde for determination of glucose. *International Journal of Electrochemical Science*, 1, 425-434.
56. Gaikwad, P.D., Shirale, D.J., Savale, P.A., Datta, K., Ghosh, P., Shirsat, M.D. (2007). Development of PANI-PVS-GOD electrode by potentiometric method for determination of glucose. *International Journal of Electrochemical Science*, 2, 488-497.
57. Sung, W., Bae, Y. (2002). A glucose oxidase electrode based on polypyrrol with polyanion/PEG/enzyme conjugate dopant. *Biosensors and Bioelectronics*, 18, 1231-1239.
58. Fei, J., Wu, Y., Ji, X., Wang, J., Hu, S., and Gao, Z. (2003). An amperometric biosensor for glucose based on electrodeposited redox polymer/glucose oxidase film on a gold electrode. *Analytical sciences*, 19(9), 1259-1263.
59. Yavuz, A. G. (2005). *Polivinilferrosen modifiye elektrodunu temel alan glukoz biyosensörünün geliştirilmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.

60. Sağlam, Ö. (2016). *Kuantum nokta modifiye elektrotlar kullanılarak amperometrik glukoz biyosensör tasarımı*. Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale.
61. Luo, X., Xu, J., Du, Y., Chen, H. (2004). A glucose biosensor based on chitosan-glucose oxidase-gold nanoparticles biocomposite formed by one-step electrodeposition. *Analytical Biochemistry*, 334, 284-289
62. Xu, J. J., Zhang, X. Q., Yu, Z. H., Fang, H. Q., and Chen, H. Y. (2001). A stable glucose biosensor prepared by co-immobilizing glucose oxidase into poly (p-chlorophenol) at a platinum electrode. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 369(6), 486-490.
63. Can, F. (2010). *Glukoz oksidaz enziminin iletken polimerlere immobilizasyonu ve karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Hatay.
64. Xue, H., Shen, Z., Li, Y. (2001). Polyaniline-polyisoprene composite film based glucose biosensor with high permselectivity. *Synthetic Metals*, 124, 345-349.
65. Chen, C., Jiang, Y., and Kan, J. (2006). A noninterference polypyrrole glucose biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 639–643.
66. Gülce, H., Ataman, İ., Gülce, A., and Yıldız, A. (2002). A new amperometric electrode for galactose determination. *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 41-44.
67. Pan, X., Kan, J., and Yuan, L. (2004). Polyaniline glucose oxidase biosensor prepared with template process. *Sensors and Actuators B*, 102, 325-330.
68. Xian, Y., Hu, Y., Liu, F., Xian, Y., Wang, H., Jin, L. (2006). Glucose biosensor based on Au nanoparticles-conductive polyaniline nanocomposite. *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 1996-2000.
69. Li, C., Liu, Y., Li, L., Du, Z., Xu, S., Zhang, M., Yin, X. and Wang, T. (2008). A novel amperometric biosensor based on NiO hollow nanospheres for biosensing glucose, *Talanta*, 77, 455-459.
70. Salimi, A., Sharifi E., Noorbakhsh A. and Soltanian, S. (2007). Immobilization of glucose oxidase on electrodeposited nickel oxide nanoparticles: Direct electron transfer and electrocatalytic activity. *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 3146-3153
71. Kong, T., Chen, Y., Ye, Y., Zhang, K., Wang, Z. and Wang, X. (2009). An amperometric glucose biosensor based on the immobilization of glucose oxidase on the ZnO nanotubes. *Sensors and Actuators B*, 138, 344-350
72. Doretto, L., Ferrara, D., Gattolin, P. Lora, S. (1997). Amperometric biosensors with physically immobilized glucose oxidase on a PVA cryogel membrane. *Talanta*, 44, 859-866.
73. Qiong, C., Tuzhi, P. (1998). Silk fibroin/cellulose acetate membrane electrodes incorporating xanthine oxidase for the determination of fish freshness. *Analytica Chimica Acta*, 369, 245-251.

74. Deng, S., Jian, G., Lei, J., Hu, Z. and Ja, H. (2009). A glucose biosensor based on direct electrochemistry of glucose oxidase immobilized on nitrogen-doped carbon nanotubes. *Biosensors and Bioelectronics*, 25, 373-377.
75. Dönmez, S. (2014). Preparation of carbon paste electrodes including poly(styrene) attached glycine-Pt(IV) for amperometric detection of glucose. *Biosensors and Bioelectronics*, 54, 149.
76. Sui, J., Travas-Sejdic, J., Chu, S.Y., Li, K.C., Kilmartin, P.A. (2009). The actuation behavior and stability of p-toluene sulfonate doped polypyrrole films formed at different deposition current densities. *Journal of Applied Polymer Science*, 111, 876-882.
77. Thompson, B.C., Moulton, S.E., Richardson, R. T., and Wallace, G.G. (2011). Effect of the dopant anion in polypyrrole on nerve growth and release of a neurotrophic protein. *Biomaterial*, 32, 3822-3831.
78. Chen, C., Jiang, Y. and Kan, J. (2006). A noninterference polypyrrole glucose biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(5), 639-643.
79. Yao, D., Vlessidis, A. G. and Evmiridis, N. P. (2003). Microdialysis sampling and monitoring of uric acid in vivo by a chemiluminescence reaction and an enzyme on immobilized chitosan support membrane. *Analytica Chimica Acta*, 478, 23-30.
80. Beskan, U. (2011). *Glukoz tayini için polianilin-polivinilsülfonat filme glukoz oksidaz enzimin immobilizasyon ile yeni bir biyosensör hazırlanması*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
81. Zen, J. M., Hsu, C. T.(1997). A selective voltammetric method for uric acid detection at Nafion-coated carbon paste electrodes. *Talanta*, 46, 1363-1369.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : KELEŞ, Rabia Esra
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 05.06.1991, Ankara
Medeni hali : Bekar
Telefon : 0 (530) 405 61 74
e-mail : ekeles91@hotmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi /Kimya Anabilim Dalı	Devam Ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi /Kimya Bölümü	2013
Lise	Çağlayan Anadolu Lisesi	2009

Yabancı Dil

İngilizce



GAZİ GELECEKTİR..